



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104717971 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 17

(21) 申请号 201380040156. 6

A61K 39/00(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 05

A61K 39/21(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 31/00(2006. 01)

2012902345 2012. 06. 05 AU

A61P 31/18(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2013/000589 2013. 06. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/181696 EN 2013. 12. 12

(71) 申请人 澳大利亚国立大学

地址 澳大利亚澳大利亚首都直辖区

(72) 发明人 罗纳德·詹姆士·杰克逊

查拉尼·拉纳辛哈

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61K 38/20(2006. 01)

权利要求书3页 说明书30页

序列表5页 附图20页

(54) 发明名称

用白介素-4拮抗剂进行疫苗接种

(57) 摘要

本发明涉及用于诱导抗原特异性免疫应答的方法、用于增大免疫细胞对抗原的亲合力的方法、用于增大对抗原具有特异性的免疫细胞的数目的方法、预防或治疗感染的方法和疫苗接种的方法，所述方法包括联合抗原、尤其选自 gag、pol 或 env 的 HIV-1 抗原施用白介素-4受体 (LL-4R) 拮抗剂。

1. 一种用于诱导受试者中抗原特异性免疫应答的方法,所述方法包括联合白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂向所述受试者施用所述抗原。

2. 一种用于增大受试者中免疫细胞对抗原的亲合力的方法,所述方法包括联合白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂向所述受试者施用所述抗原。

3. 一种用于增大受试者中对抗原具有特异性的免疫细胞的数目的方法,所述方法包括联合白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂向所述受试者施用所述抗原。

4. 根据权利要求2或权利要求3所述的方法,其中所述免疫细胞为T淋巴细胞。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞为CD8⁺T淋巴细胞。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述抗原为病毒抗原。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述抗原为人免疫缺陷病毒抗原。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原:gag、pol或env基因产物,或其任何组合。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述抗原和白介素-4受体拮抗剂依次向所述受试者施用。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述抗原和白介素-4受体拮抗剂同时向所述受试者施用。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述抗原和白介素-4受体拮抗剂作为初免剂量向所述受试者施用。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,所述施用包括施用编码所述抗原的多核苷酸、编码所述白介素-4受体拮抗剂的多核苷酸,或两者。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述IL-4R拮抗剂为能够与IL-4R α 结合并且防止IL-4R信号传导的白介素-4受体 α 链(IL-4R α)拮抗剂。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述IL-4R拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素-4分子:在残基121上的突变、在残基124上的突变、在位置123之后一个或多个残基的缺失、白介素-4基因的外显子2编码的片段的缺失,或其任何组合。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其包括向所述受试者施用加强剂量,其中所述加强剂量包括所述抗原和IL-4R拮抗剂。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述加强剂量的所述抗原和IL-4R拮抗剂同时施用。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述加强剂量的所述抗原和IL-4R拮抗剂依次施用。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的方法,其中施用所述加强剂量包括施用编码所述抗原的多核苷酸、编码所述IL-4R拮抗剂的多核苷酸,或两者。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的方法,其中所述IL-4R拮抗剂为能够与

IL-4R α 结合并且防止 IL-4R 信号传导的白介素 -4 受体 α 链 (IL-4R α) 拮抗剂。

22. 根据权利要求 16 至 21 中任一项所述的方法, 其中所述加强剂量的所述 IL-4R 拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素 -4 分子: 在残基 121 上的突变、在残基 124 上的突变、在位置 123 之后一个或多个残基的缺失、白介素 -4 基因的外显子 2 编码的片段的缺失, 或其任何组合。

23. 根据权利要求 15 或权利要求 22 所述的方法, 其中所述突变选自: R121D、Y124D、白介素 -4 基因的外显子 2 编码的片段的缺失, 或其任何组合。

24. 一种组合物, 其包含:

(i) 抗原和 / 或编码所述抗原的多核苷酸; 以及

(ii) 白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂和 / 或编码所述 IL-4R 拮抗剂的多核苷酸。

25. 根据权利要求 24 所述的组合物, 其中所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

26. 根据权利要求 24 或权利要求 25 所述的组合物, 其中所述抗原为病毒抗原。

27. 根据权利要求 24 至 26 中任一项所述的组合物, 其中所述抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原: gag、pol 或 env 基因产物, 或其任何组合。

28. 根据权利要求 24 至 27 中任一项所述的组合物, 其中所述 IL-4R 拮抗剂为能够与 IL-4R α 结合并且防止 IL-4R 信号传导的白介素 -4 受体 α 链 (IL-4R α) 拮抗剂。

29. 根据权利要求 24 至 28 中任一项所述的组合物, 其中所述 IL-4R 拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素 -4 分子: 在残基 121 上的突变、在残基 124 上的突变、在位置 123 之后一个或多个残基的缺失、白介素 -4 基因的外显子 2 编码的片段的缺失, 或其任何组合。

30. 根据权利要求 29 所述的组合物, 其中所述突变选自: R121D、Y124D、白介素 -4 基因的外显子 2 编码的片段的缺失, 或其任何组合。

31. 根据权利要求 24 至 30 中任一项所述的组合物, 其中所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

32. 根据权利要求 31 所述的组合物, 其中所述重组病毒选自由以下组成的组: 痘病毒、牛痘病毒、减毒牛痘病毒 (例如 NYVAC)、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉 (MVA) 病毒。

33. 一种用于预防或治疗受试者中感染的方法, 其中所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求 24 至 32 中任一项所述的组合物。

34. 一种针对感染向受试者进行疫苗接种的方法, 所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求 24 至 30 中任一项所述组合物的初次剂量和加强剂量。

35. 根据权利要求 33 或权利要求 34 所述的方法, 其中所述感染为人免疫缺陷病毒感染并且所述组合物包含选自以下的人免疫缺陷病毒抗原: gag、pol 或 env 基因产物, 或其任何组合。

36. 根据权利要求 13 或权利要求 20 所述的方法, 其中所述重组病毒选自由以下组成的组: 痘病毒、牛痘病毒、减毒牛痘病毒 (例如 NYVAC)、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉 (MVA) 病毒。

37. 根据权利要求 13、20 或 36 所述的方法, 其中所述重组病毒瞬时表达所述受试者中

所述白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂。

用白介素 -4 拮抗剂进行疫苗接种

[0001] 以交叉引用方式并入

[0002] 本申请要求 2012 年 6 月 5 日提交的澳大利亚临时专利申请号 2012902345 的优先权,所述申请的所有内容以交叉引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及免疫学领域。更确切地说,本发明涉及用于增强抗原特异性免疫应答的组合物和方法。所述组合物和方法尤其应用于预防和 / 或治疗包括但不限于传染病的各种疾病。

[0004] 背景

[0005] 普遍认为有效抗病毒粘膜 CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应为病毒疫苗诱导的免疫应答的主要组分。具体地说,在粘膜表面处局部抗病毒免疫应答的重要性日益明显。还日益明显的是,不仅抗病毒 T 细胞应答的强度,而且抗病毒 T 细胞应答的‘质量’或亲合力在保护免受病毒感染中可为重要的,尤其那些证明对现有免疫接种策略具有抗性的病毒感染。T 细胞应答的质量可以在 T 细胞对靶细胞上 MHC- 肽复合物的功能性亲合力中反映出。高亲合力 CTL 可识别低浓度抗原,然而低亲合力 CTL 在低浓度抗原下在效应子功能方面无效。已经确立的是,高亲合力 CTL 相较于低亲合力 T 细胞具有增大的清除感染的功能性能力。但是,已发现高亲合力 CTL 和低亲合力 CTL 的相对比率随着感染的时程而改变。尽管如此,公认的是高亲合力 CTL 具有比低亲合力 T 细胞更大的清除感染的能力。

[0006] 例如,就人免疫缺陷病毒 (HIV) 而言,通常首先遭遇 HIV 的生殖组织和直肠组织中的局部抗病毒免疫应答是极其重要的。胃肠道中的局部免疫应答也是重要的,因为胃肠道是 HIV 复制的主要部位。最初 HIV 暴露的部位 (粘膜) 处高亲合力抗病毒 T 细胞的存在提供减少粘膜 CD4⁺T 细胞消耗和局部控制 HIV 感染的可能。鉴于疫苗策略识别表达极低水平病毒抗原的靶细胞的实际能力 (例如在细胞的感染之后早期),以及它们在低浓度靶抗原下更快速地引发靶细胞溶解,引发高亲合力 CTL 的疫苗策略潜在地可能提供更大保护免受感染。

[0007] 存现对能够引发高亲合力 CTL 的抗病毒疫苗的需要。具体地说,需要能够在作为许多病毒感染的起始点的粘膜表面引发高亲合力 CTL 的抗病毒疫苗。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明已发现,抗病毒疫苗诱导的抗原特异性 T 淋巴细胞的强度和亲合力可通过短暂地减小白介素 -4 (IL-4) 的可用性和 / 或短暂地抑制 IL-4 功能得以增大。

[0010] 在第一个方面中,本发明提供一种用于诱导受试者中抗原特异性免疫应答的方法,所述方法包括联合白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂向受试者施用抗原。

[0011] 在第二个方面中,本发明提供一种用于增大受试者中免疫细胞对抗原的亲合力的方法,所述方法包括联合白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂向受试者施用抗原。

[0012] 在第三个方面中,本发明提供一种用于增大受试者中对抗原具有特异性的免疫细胞的目的的方法,所述方法包括联合白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂向受试者施用抗原。

[0013] 在上述方面的一个实施方案中,本发明包括向受试者施用初免剂量和加强剂量,每种所述剂量包括联合白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂向受试者施用抗原。

[0014] 在上述方面的一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用初免剂量,其中初免剂量包括抗原和IL-4R拮抗剂。

[0015] 在上述方面的一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用加强剂量,其中加强剂量包括抗原和IL-4R拮抗剂。

[0016] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量的抗原和IL-4R拮抗剂可依次施用或同时施用。

[0017] 在上述方面的一个实施方案中,施用初次剂量包括施用编码抗原的多核苷酸,编码IL-4R拮抗剂的多核苷酸,或两者。

[0018] 在上述方面的一个实施方案中,施用加强剂量包括施用编码抗原的多核苷酸,编码IL-4R拮抗剂的多核苷酸,或两者。

[0019] 在上述方面的一个实施方案中,初次剂量中多核苷酸中的任何一种或多种可为重组病毒的组分。

[0020] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量中多核苷酸中的任何一种或多种可为重组病毒的组分。

[0021] 在上述方面的一个实施方案中,初次剂量的重组病毒为痘病毒。

[0022] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量的重组病毒为痘病毒。

[0023] 在上述方面的一个实施方案中,初次剂量的重组病毒为选自由以下组成的组的痘病毒:牛痘病毒、减毒牛痘病毒(例如NYVAC)、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉(MVA)病毒。

[0024] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量的重组病毒为选自由以下组成的组的痘病毒:牛痘病毒、减毒牛痘病毒(例如NYVAC)、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉(MVA)病毒。

[0025] 在上述方面的一个实施方案中,初次剂量的IL-4R拮抗剂为能够与IL-4R α 结合并且防止IL-4R信号传导的白介素-4受体 α 链(IL-4R α)拮抗剂。

[0026] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量的IL-4R拮抗剂为能够与IL-4R α 结合并且防止IL-4R信号传导的白介素-4受体 α 链(IL-4R α)拮抗剂。

[0027] 在上述方面的一个实施方案中,初次剂量的IL-4R拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素-4分子:在残基121上的突变、在残基124上的突变、在位置123之后一个或多个残基缺失、白介素-4基因的外显子2编码的片段缺失,或其任何组合。

[0028] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量的IL-4R拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素-4分子:在残基121上的突变、在残基124上的突变、在位置123之后一个或多个残基缺失、白介素-4基因的外显子2编码的片段缺失,或其任何组合。

[0029] 在上述方面的一个实施方案中,初次剂量的IL-4R拮抗剂为包括选自以下突变的人白介素-4分子:R121D、Y124D、白介素-4基因的外显子2编码的片段缺失,或其任何组合。

[0030] 在上述方面的一个实施方案中,加强剂量的 IL-4R 拮抗剂为包括选自以下突变的人白介素 -4 分子:R121D、Y124D、白介素 -4 基因的外显子 2 编码的片段缺失,或其任何组合。

[0031] 在上述方面的一个实施方案中,施用包括施用编码抗原的多核苷酸、编码白介素 -4 受体拮抗剂的多核苷酸,或两者。

[0032] 在上述方面的一个实施方案中,所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

[0033] 在上述方面的一个实施方案中,重组病毒为痘病毒。

[0034] 在上述方面的一个实施方案中,重组病毒为选自由以下组成的组的痘病毒:牛痘病毒、减毒牛痘病毒(例如 NYVAC)、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉病毒。

[0035] 在上述方面的一个实施方案中,重组病毒瞬时表达受试者中白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂。

[0036] 在上述方面的一个实施方案中,联合白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂向受试者施用抗原减少受试者中 CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞的数目和/或增加受试者中 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞。CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞和/或 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞可对抗原具有特异性。抗原可为 HIV 抗原(例如 HIV gag、p_{ol} 和/或 env 抗原)。

[0037] 在第四个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂在制备用于诱导受试者中对抗原的特异性免疫应答的药物中的用途。

[0038] 在第五个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂在制备用于提高受试者中对抗原具有特异性的免疫细胞的亲合力的药物中的用途。

[0039] 在第六个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂在制备用于提高受试者中对抗原具有特异性的免疫细胞的数目的药物中的用途。

[0040] 在第七个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂,其用于诱导受试者中对抗原具有特异性的免疫应答。

[0041] 在第八个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂,其用于提高受试者中对抗原具有特异性的免疫细胞的亲合力。

[0042] 在第九个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体(IL-4R)拮抗剂,其用于提高受试者中对抗原具有特异性的免疫细胞的数目。

[0043] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,抗原以编码抗原的多核苷酸提供。

[0044] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,白介素 -4 受体拮抗剂以编码白介素 -4 受体拮抗剂的多核苷酸提供。

[0045] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

[0046] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,重组病毒为痘病毒。

[0047] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,重组病毒为选自由以下组成的组的痘病毒:牛痘病毒、减毒牛痘病毒(例如 NYVAC)、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉病毒。

[0048] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,重组病毒瞬时表达受试者中白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂。

[0049] 在第四个、第五个和第六个方面的一个实施方案中,药物为疫苗。

[0050] 在第四个、第五个和第六个方面的一个实施方案中,药物为包含第一组分和第二组分的疫苗,其中第一组分包含白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂并且第二组分包含抗原,并且其中第一组分和第二组分用于或配制用于同时或依次向受试者施用。

[0051] 在第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,抗原和白介素-4受体(IL-4R)拮抗剂为疫苗的组分。

[0052] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,疫苗作为初次剂量、加强剂量或两者用于向受试者施用或配制用于向受试者施用。

[0053] 在第四个、第五个、第六个、第七个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,疫苗在向受试者施用之后能够减少受试者中 CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞的数目和 / 或增加受试者中 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞。CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞和 / 或 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞可对抗原抗原具有特异性。抗原可为 HIV 抗原(例如 HIV gag、pol 和 / 或 env 抗原)。

[0054] 在第一个、第二个、第三个、第五个、第六个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,免疫细胞为 T 淋巴细胞。

[0055] 在第一个、第二个、第三个、第五个、第六个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,免疫细胞为 CD8⁺T 淋巴细胞。

[0056] 在第一个、第二个、第三个、第五个、第六个、第八个和第九个方面的一个实施方案中,免疫细胞为细胞毒性 CD8⁺T 淋巴细胞。

[0057] 在上述方面的一个实施方案中,抗原为病毒抗原。

[0058] 在上述方面的一个实施方案中,抗原为人免疫缺陷病毒抗原。

[0059] 在上述方面的一个实施方案中,抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原: gp120env、gp140env、gp160env、p18、gag、pol、vif、vpr、vpu、tat、rev 和 nef 基因产物,和其组合。

[0060] 在上述方面的一个实施方案中,抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原:gag、pol 或 env 基因产物,或其任何组合。

[0061] 在上述方面的一个实施方案中,抗原为选自组合的 gag/pol,或组合的 gag/pol/env 基因产物的人免疫缺陷病毒抗原。

[0062] 在上述方面的一个实施方案中,抗原和白介素-4受体拮抗剂依次向受试者施用。

[0063] 在上述方面的一个实施方案中,抗原和白介素-4受体拮抗剂同时向受试者施用。

[0064] 在上述方面的一个实施方案中,抗原和白介素-4受体拮抗剂作为初免剂量向受试者施用。

[0065] 在上述方面的一个实施方案中,IL-4R拮抗剂为能够与 IL-4R α 结合并且防止 IL-4R 信号传导的白介素-4受体 α 链(IL-4R α)拮抗剂。

[0066] 在上述方面的一个实施方案中,IL-4R拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素-4分子:在残基 121 上的突变、在残基 124 上的突变、在位置 123 之后一个或多个残基的缺失、白介素-4基因的外显子 2 编码的片段的缺失,或其任何组

合。

[0067] 在第十个方面中,本发明提供一种组合物,其包含:

[0068] (i) 抗原和 / 或编码抗原的多核苷酸;以及

[0069] (ii) 白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂和 / 或编码 IL-4R 拮抗剂的多核苷酸。

[0070] 在第十一个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂在制备用于预防或治疗受试者感染的药物中的用途。

[0071] 在第十二个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂在制备用于针对感染向受试者进行疫苗接种的药物中的用途。

[0072] 在第十三个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂,其用于预防或治疗受试者感染。

[0073] 在第十四个方面中,本发明提供抗原和白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂,其用于针对感染向受试者进行疫苗接种。

[0074] 在第十一个方面的一个实施方案中,药物为疫苗。

[0075] 在第十三个方面中的一个实施方案中,抗原和白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂为疫苗的组分。

[0076] 在第十一个和第十三个方面中的一个实施方案中,疫苗包含第一组分和第二组分,其中第一组分包含白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂并且第二组分包含抗原,并且其中第一组分和第二组分用于,或配制用于同时或依次向受试者施用。

[0077] 在第十一个和第十三个方面中的一个实施方案中,疫苗用于作为初次剂量、加强剂量或两者向受试者施用或配制用于向受试者施用。

[0078] 在第十二方面的一个实施方案中,药物用于作为初次剂量、加强剂量或两者向受试者施用或配制用于向受试者施用。

[0079] 在第十四个方面中的一个实施方案中,抗原和白介素 -4 受体 (IL-4R) 拮抗剂用于作为初次剂量、加强剂量或两者向受试者施用,或配制用于向受试者施用。

[0080] 在第十一个和第十三个方面中的一个实施方案中,疫苗在向受试者施用之后能够减少受试者中 CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞的数目和 / 或增加受试者中 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞。CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞和 / 或 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞可对抗原抗原具有特异性。抗原可为 HIV 抗原 (例如 HIV gag、pol 和 / 或 env 抗原)。

[0081] 在第十二和第十四个方面的一个实施方案中,所述接种能够减少受试者中 CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞的数目和 / 或增加受试者中 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞。CD103⁺、b220⁺、CD8 α ⁺ 细胞和 / 或 CD11b⁺、CD103⁻、b220⁻、CD8 α ⁻ 细胞可对抗原抗原具有特异性。抗原可为 HIV 抗原 (例如 HIV gag、pol 和 / 或 env 抗原)。

[0082] 在第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中,抗原提供为编码抗原的多核苷酸。

[0083] 在第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中,白介素 -4 受体提供为编码白介素 -4 受体抗原的多核苷酸。

[0084] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中,所述多核苷酸中的任何一种或多种为重组病毒的组分。

[0085] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中,重

组病毒为痘病毒。

[0086] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，重组病毒为选自以下组成的组的痘病毒：牛痘病毒、减毒牛痘病毒（例如 NYVAC）、鸡痘病毒、金丝雀痘病毒和修饰的牛痘安卡拉病毒。

[0087] 在第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，重组病毒瞬时表达受试者中白介素-4受体（IL-4R）拮抗剂。

[0088] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，抗原为病毒抗原。

[0089] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原：gp120env、gp140env、gp160env、p18、gag、pol、vif、vpr、vpu、tat、rev 和 nef 基因产物，和其组合。

[0090] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原：gag、pol 或 env 基因产物，或其任何组合。

[0091] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，抗原为选自组合的 gag/pol，或组合的 gag/pol/env 基因产物的人免疫缺陷病毒抗原。

[0092] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，IL-4R 拮抗剂为能够与 IL-R α 结合并且防止 IL-4R 信号传导的白介素-4受体 α 链（IL-4R α ）拮抗剂。

[0093] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，IL-4R 拮抗剂为缺乏信号肽并且包括选自以下的一种或多种突变的人白介素-4分子：在残基 121 上的突变、在残基 124 上的突变、在位置 123 之后一个或多个残基的缺失、白介素-4基因的外显子 2 编码的片段的缺失，或其任何组合。

[0094] 在第十个、第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，突变选自：R121D、Y124D、白介素-4基因的外显子 2 编码的片段的缺失，或其任何组合。

[0095] 在第十五个方面中，本发明提供一种用于预防或治疗受试者感染的方法，所述方法包括向受试者施用根据第十个方面的组合物。

[0096] 在第十六个方面中，本发明提供一种用于针对感染向受试者进行疫苗接种的方法，所述方法包括施用根据第十个方面的初次剂量和加强剂量。

[0097] 在第十五个和第十六个方面的一个实施方案中，感染为人免疫缺陷病毒感染并且组合物包含选自以下的人免疫缺陷病毒抗原：gag、pol 或 env 基因产物，或其任何组合。

[0098] 在第十一个、第十二个、第十三个和第十四个方面的一个实施方案中，感染为人免疫缺陷病毒感染并且抗原为选自以下的人免疫缺陷病毒抗原：gag、pol 或 env 基因产物，或其任何组合。

[0099] 附图简述

[0100] 现将参考附图，仅通过举例的方式描述本发明的优选实施方案，其中：

[0101] 图 1 示出包括在 MVA164 与 MVA165 之间产生的基因间插入位点的 MVA del-III 合成载体序列，其包括 FseI 至 HindIII 位点的序列，并且并入鸡痘病毒早期 / 晚期启动子。

[0102] 图 2 示出 MVA “HindIII F” 插入位点，其中含有 FseI 至 HindIII 的多克隆位点（包括上游 T5NT 早期转录终止信号）已插入在 ORF F8L 与 F7L 之间。

[0103] 图3示出对于在猕猴中表达优化的合成SIV mac239gag/pol序列。序列含有在基因上游的合成痘病毒早期/晚期启动子和侧接于限制性核酸内切酶位点以促进克隆的早期转录终止子序列(T5NT)。在重叠区中的翻译期间,基因由于读框移位而表达为融合蛋白。

[0104] 图4为时程图,其示出在与IL-4受体(IL-4R)拮抗剂(IL-4C118)联合疫苗接种之后HIV KdGag特异性CD8⁺T细胞亲合力。FPV HIVIL-4C118/VV HIV IL-4C118 =用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组牛痘病毒进行加强接种。FPV HIV/VV HIV =用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组鸡痘病毒进行初次接种,接着用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组牛痘病毒进行加强接种。

[0105] 图5为柱状图,其示出在与IL-4受体拮抗剂联合疫苗接种之后HIV KdGag特异性CD8⁺T细胞亲合力和HIV KdGag特异性CD8⁺T-细胞应答的强度。FPV HIV/VV HIV =用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组牛痘病毒进行加强接种;FPV HIV IL-4C118/VV HIV =用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的牛痘病毒进行加强接种;FPV HIV/VV HIV IL-4C118 =用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组牛痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的鸡痘病毒进行加强接种;FPV HIV IL-4C118/VV HIV IL-4C118 =用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组牛痘病毒进行加强接种。

[0106] 图6为柱状图,其示出在与IL-4受体拮抗剂联合疫苗接种之后HIVKdGag特异性全身(脾)CD8⁺T细胞免疫。灰色柱=使用编码IL-4受体拮抗剂(IL-4C118)和HIV gag/pol抗原的重组病毒疫苗的引发和进行加强接种。黑色柱-仅使用编码HIV gag/pol抗原(无IL-4受体拮抗剂)的重组病毒疫苗的引发和进行加强接种。

[0107] 图7为柱状图,其示出在IL-4受体拮抗剂(IL-4C118)初次-加强接种之后的HIV KdGag特异性粘膜(生殖-直肠结节)CD8⁺T细胞免疫。FPV HIV IL-4C118/VV HIV IL-4C118 =用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组牛痘病毒进行加强接种;FPV HIV/VV HIV =用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组牛痘病毒进行加强接种;

[0108] 图8提供两个图,其表明在IL-4受体拮抗剂或白介素13(IL-13)的存在或不存在下粘膜流感KdGag攻毒之后保护性免疫的水平,如通过重力损失和CD8⁺T细胞应答所分析。FPV HIV IL-4C118/VV HIV IL-4C118 =用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol抗原和突变体IL-4C118的重组牛痘病毒进行加强接种;FPV HIV/VV HIV =用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组牛痘病毒加强接种;FPV HIV Δ 10/VV HIV Δ 10 =用编码HIV gag/pol抗原和IL-13Ra2可溶受体的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码HIV gag/pol抗原和IL-13Ra2可溶受体的重组牛痘病毒进行加强接种;FPV HIV/VV HIV(IL 13-/-) =用编码HIV gag/pol(无IL-4受体拮抗剂)的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码IL-13敲除小鼠中HIV gag/pol(无IL-4

受体拮抗剂)的重组牛痘病毒进行加强接种;(n = 6-14 每组;误差棒 = SEM)。

[0109] 图 9 提供两个图,其示出通过 ELISpot 在加强免疫接种后 8 个星期测量的记忆全身和粘膜 HIV 特异性 T 细胞应答。FPV HIV/VV HIV = 用编码 HIV gag/pol (无 IL-4 受体拮抗剂)的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码 HIV gag/pol (无 IL-4 受体拮抗剂)的重组牛痘病毒进行加强接种;FPV HIV IL-4C118/VV HIV IL-4C118 = 用编码 HIV gag/pol 抗原和突变体 IL-4C118 的重组鸡痘病毒进行初免接种,接着用编码 HIV gag/pol 抗原和突变体 IL-4C118 的重组牛痘病毒进行加强接种。

[0110] 图 10 提供一系列点图,其说明用于评估进行初免接种后 24 小时肺粘膜中 APC 亚群的抗原呈递细胞 (APC) 亚群设门策略。R1 = 总 APC 亚群;R2 = 正向散射 (FSC) 双粘体辨别;R3 = 侧向散射 (SSC) 双粘体辨别;R5 = 对 MHC II+CD11c⁺ = APC 亚群设门的细胞;APC = 抗原呈递细胞;DC = 树突细胞;CD11c = DC 标记;1A^d = MHC II 细胞标记。

[0111] 图 11 提供一系列点图,其评估初免接种后 24h 肺粘膜中 CD103 缔合抗原呈递细胞亚群。FPV-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的鸡痘病毒或表达 HIV gag/pol/env 基因的鸡痘病毒;VV-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的牛痘病毒;MVA-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的修饰牛痘安卡拉病毒;FPV-HIV IL-13KO = 给予对照疫苗 FPV-HIV 的 IL-13 敲除动物;FPV-HIV IL-13R α 2 = 鸡痘病毒共表达 HIV gag/pol 基因和可溶 IL-13Ra2 的鸡痘病毒或共表达 HIVgag/pol/env 基因和可溶 IL-13Ra2 的鸡痘病毒;FPV-HIV C118 = 共表达 HIV gag/pol 基因和 IL-4 拮抗剂的鸡痘病毒或表达 HIV gag/pol/env 基因和 IL-4 拮抗剂的鸡痘病毒;CD11b = 树突细胞标记;CD103 = 肺 / 皮肤特异性 T 细胞标记;IL-13KO = IL-13^{-/-} 基因敲除小鼠。

[0112] 图 12 提供一系列点图,其评估初免接种后 24h 肺粘膜中 B220 缔合抗原呈递细胞亚群。FPV-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的鸡痘病毒或表达 HIV gag/pol/env 基因的鸡痘病毒;VV-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的牛痘病毒;MVA-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的修饰牛痘安卡拉病毒;FPV-HIV IL-13KO = 给予对照疫苗接种 FPV-HIV 的 IL-13 敲除动物;FPV-HIV IL-13R α 2 = 鸡痘病毒共表达 HIV gag/pol 基因和可溶 IL-13Ra2 的鸡痘病毒或共表达 HIVgag/pol/env 基因和可溶 IL-13Ra2 的鸡痘病毒;FPV-HIV C118 = 共表达 HIV gag/pol 基因和 IL-4 拮抗剂的鸡痘病毒或表达 HIV gag/pol/env 基因和 IL-4 拮抗剂的鸡痘病毒;VV-IL13KO = 给予对照疫苗 VV-HIV 的 IL-13 敲除动物;VV-HIV IL-13R α 2 = 共表达 HIV gag/pol 基因和可溶 IL-13Ra2 的牛痘病毒;CD11b = 树突细胞标记;B220 = B 细胞标记;C118 = IL-4 拮抗剂。

[0113] 图 13 提供一系列点图,其评估初免接种后 24h 肺粘膜中 CD8 缔合抗原呈递细胞亚群。FPV-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的鸡痘病毒或表达 HIV gag/pol/env 基因的鸡痘病毒;VV-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的牛痘病毒;MVA-HIV = 表达 HIV gag/pol 基因的修饰牛痘安卡拉病毒;FPV-HIV IL-13KO = 给予对照疫苗接种 FPV-HIV 的 IL-13 敲除动物;FPV-HIV IL-13R α 2 = 鸡痘病毒共表达 HIV gag/pol 基因和可溶 IL-13Ra2 的鸡痘病毒或共表达 HIVgag/pol/env 基因和可溶 IL-13Ra2 的鸡痘病毒;FPV-HIV C118 = 共表达 HIV gag/pol 基因和 IL-4 拮抗剂的鸡痘病毒或表达 HIV gag/pol/env 基因和 IL-4 拮抗剂的鸡痘病毒。CD11b = 树突细胞标记;CD8 α = 树突细胞标记。

[0114] 图 14 为柱状图,其说明对 p24Gag 的血清 IgG1 应答在 HIV-IL-4R 拮抗剂辅助疫苗

接种之后增强。

[0115] 定义

[0116] 除非上下文另外明确指明,否则本申请所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个参照物。例如,短语“病毒”还包括多种病毒。

[0117] 如本文所用,术语“包含”意味“包括”。词语“包含”的变化形式,如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”具有相应的变化的含义。因此,例如,“包含”重组病毒的疫苗可仅由那个重组病毒组成或可包括一中或多种其它组分(例如其它类型的重组病毒)。

[0118] 如本文所用,“治疗有效量”的含义是指本发明中所用的药剂或组合物的量没有毒性但足以得到所需的治疗效果。所需的精确量将随受试者而变化,取决于如治疗的物种、受试者的年龄和一般条件、治疗病状的严重性、施用的具体药剂、施用方式等因素。因此,不可能指明可应用于所有实施方案的精确“有效量”。但是,对于任何给定情况,适当的“有效量”可由本领域普通技术人员仅使用常规实验方法确定。

[0119] 如本文所用,术语“受试者”包括经济、社会或研究重要性的任何动物,包括牛、马、羊、灵长类、鸟类和啮齿动物物种。因此,“受试者”可为哺乳动物,例如像人或非人哺乳动物。

[0120] 如本文所用,术语“IL-4 拮抗剂”涵盖能够预防或抑制 IL-4 的产生和 / 或生物功能的任何药剂,例如, IL-4 受体 (IL-4R) 和 IL-4 受体 α 链 (IL-4R α) 拮抗剂。

[0121] 如本文所用,术语“IL-4R 的拮抗剂”、“IL-4R 拮抗剂”和“白介素-4 受体拮抗剂”可互换使用并且具有相同含义。术语涵盖能够防止或抑制 IL-4R α 或包括 IL-4R α 的受体复合物起始(即直接经由它们开始)的细胞信号传导通路的活化和 / 或延长的任何药剂。在一些实施方案中, IL-4R 拮抗剂可为以下药剂,这种药剂与 IL-4R α 结合而不引发 IL-4R α 介导的细胞信号传导,并且从而防止或改变 IL-4R α 与一种或多种配体(例如 IL-4 和 / 或 IL-13) 之间的结合相互作用,从而可另外能够在拮抗剂不存在的情况下活化 IL-4R 受体复合物。在其它实施方案中, IL-4R 拮抗剂可为以下药剂,这种药剂与 IL-4R α 结合的一种或多种配体(例如 IL-4 和 / 或 IL-13),从而阻断或改变配体与 IL-4R α 之间的结合相互作用。在其它实施方案中, IL-4R 拮抗剂可为以下药剂,这种药剂能够抑制或阻断已由 IL-4R α 或包括 IL-4R α 的受体复合物引发(即经由它们开始)的细胞信号传导通路。例如,药剂可与由 IL-4R α 或包括 IL-4R α 的受体复合物引发(即经由它们开始)的信号传导通路中的下游蛋白质或分子相互作用或修改它们的活性。

[0122] 如本文所用,免疫细胞 / 免疫细胞种群和给定抗原在上下文中的术语“亲和力”意味引起免疫细胞 / 免疫细胞种群中抗原特异性应答所需的抗原的量或浓度。

[0123] 如本文所用,术语“抗体”包括 IgG(包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)、IgA(包括 IgA1 和 IgA2)、IgD、IgE 或 IgM 和 IgY,全抗体,包括单链全抗体,和其抗原结合片段。抗原结合抗体片段包括但不限于 Fab、Fab' 和 F(ab')₂、Fd、单链 Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs(sdFv) 和包括 VL 或 VH 域的片段。抗体可来自于任何动物来源。包括单链抗体的抗原结合抗体片段可包括单独或与以下中的全部或部分组合的一个或多个可变区: 较链区、CH1 域、CH2 域和 CH3 域。还包括一个或多个可变区与较链区、CH1 域、CH2 域和 CH3 域的任何组合。抗体可为特异性结合生物分子的单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、人

源化抗体和人单克隆和多克隆抗体。

[0124] 如本文所用,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”各自是指由肽键连接在一起的氨基酸组成的聚合物,并且可互换使用。出于本发明的目的,“多肽”可由全长蛋白质或全长蛋白质的一部分组成。

[0125] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸碱基、核糖核酸碱基、天然核苷酸的抑制类似物和其混合物的单链或双链聚合物。

[0126] 如本文所用,术语“核苷酸序列”应理解为涵盖 DNA 序列、RNA 序列和互补 (cDNA) 序列。

[0127] 如本文所用,术语“亲代病毒”应理解为是指可修改以并入外源性遗传物质以形成本发明重组病毒的病毒。

[0128] 如本文所用,术语“重组病毒”应理解为是指包括至少一个外源性核苷酸序列的“亲代病毒”。

[0129] 如本文所用,重组病毒当用于上下文时的术语“外源性核苷酸序列”应理解为涵盖插入到亲代病毒的基因组中以形成重组病毒的任何核苷酸序列。

[0130] 如本文所用,例如像核苷酸序列、多肽、外源性核苷酸序列、外源性多肽、抗原或表位的给定组分当用于上下文时的术语“免疫原性”意味,药剂能够单独或与一种或多种其它药剂组合起作用诱导免疫应答,增强现有免疫应答,或改变现有免疫应答。

[0131] 应理解,如本文考虑的“诱导”免疫应答包括激发免疫应答并且增强先前存在的免疫应答。

[0132] 如本文所用,术语“试剂盒”是指递送材料的任何递送系统。这类递送系统包括允许从一个地方到另一地方地储存、运输或递送反应试剂(例如在适当容器中的标签、参考样品、支持材料等)和/或支持材料(例如缓冲液、进行测定的说明书等)的系统。例如,试剂盒可包括如盒子的一个或多个套罩,其含有相关反应试剂和/或支持材料。术语“试剂盒”包括分段试剂盒和组合试剂盒。

[0133] 如本文所用,术语“分段试剂盒”是指包括两个或更多个单独容器的递送系统,每一容器含有总试剂盒组分的子部分。这些容器可共同或单独输送至预定接受者。包括两个或更多个各自含有总试剂盒的子部分的单独容器的递送系统包括在术语“分段试剂盒”的含义内。

[0134] 如本文所用,“组合试剂盒”是指单个容器中含有反应测定的所有组分(例如单个盒子中容纳每一种所需组分)的递送系统。

[0135] 应理解,本文中参考所述数值使用术语“约”包括所述数值和在所述值的加或减百分之十内的数值。

[0136] 应理解,本文中当指代数值的范围时使用术语“之间”涵盖在范围的每一端点处的数值,例如,长度在 10 个残基与 20 个残基之间的多肽包括长度在 10 个残基的多肽和长度在 20 个残基的多肽。

[0137] 本文对在先前领域文件的任何描述或来源于那些文件或基于那些文件的说明并非认可这些文件或来源于它们的说明是相关领域的普通一般知识的一部分。

[0138] 出于描述的目的,除非另外说明,否则本文提到的所有文件以全文引用的方式并入本文。

[0139] 详述

[0140] 以下详述足够详细地传达本发明的示例性实施方案使得本领域普通技术人员能够实践本发明。所述的各种实施方案的特征和限制不必要地限制本发明其它实施方案或本发明整体。因此,以下详述不限制本发明的范围,本发明范围仅由权利要求限定。

[0141] 能够对抗病毒抗原引起高亲合力 T 淋巴细胞应答和 / 或 T 淋巴细胞应答的颇高强度的疫苗为本领域中所积极追求的。鉴于粘膜表面为病毒的第一进入入口,在这些位点能够引起应答的疫苗也是合乎需要的。本发明人已鉴别出,抗原特异性 T 淋巴细胞应答的亲合力和 / 或强度可通过抑制 IL-4 显著,即通过减小 IL-4 的可用性和 / 或抑制 IL-4 功能来增强。这可以短暂地进行,以使得正常 IL-4 水平和功能可在长时期内恢复。

[0142] 因此,本发明的一些方面设计能够增强免疫细胞应答的强度和 / 或增强免疫细胞对靶标感染性药剂的亲合力的组合物、疫苗和药物。组合物可包含连同能够抑制 IL-4 的产生和 / 或活性的组分一起的能够针对感染性药剂诱导免疫的免疫原性组分。或者,免疫原性组分和能够抑制 IL-4 的产生和 / 或活性的组分可提供在单独组合物中用于同时施用或依次施用。本发明组合物可提供在试剂盒中。

[0143] 本发明的其它方面涉及用于诱导受试者中抗原特异性免疫应答的方法。所述方法包括施用一种或多种本发明组合物,并且可有效增大受试者中免疫细胞对抗原的亲合力和 / 或提高对抗原具有特异性的免疫细胞的数目。

[0144] 本发明的又其它方面涉及用于通过施用本文所提供的组合物、疫苗和药物预防和 / 或治疗感染的方法。所述方法可涉及施用预防性和 / 或治疗性疫苗。

[0145] 白介素 -4 (IL-4) 拮抗剂

[0146] 如本领域技术人员所已知,IL-4 为能够结合两个单独受体复合物的免疫调节细胞因子。I 型受体复合物包括白介素 -4 受体 α (IL-4R α) 和普通 γ 链 (γ c)。II 型受体复合物包括 IL-4R α 链但 γ c 由 IL-13 蛋白质受体 α 1 (IL-13R α 1) 链或 IL-13 蛋白质受体 2 (IL-13R α 2) 链取代。就两种情况而言,仅 IL-4R α 链能够结合 IL-4,并且 IL-4R α 链与 γ c、IL-13R α 1 或 IL-13R α 2 的异二聚体也是引发细胞信号传导 (就 IL-4R α / γ c 和就 IL-4R α / IL-13R α 1 而言经由 JAK/STAT 通路) 所需的。

[0147] 本发明组合物和方法采用 IL-4 产生和 / 或功能的拮抗剂。如本说明书的实施例中所说明,已发现 IL-4 拮抗剂显著提高 / 增强免疫细胞对共施用的抗原的应答的强度和 / 或亲合力。在不受理论束缚的情况下,假设抑制免疫应答的局部环境中 IL-4 产生和 / 或功能降低对抗原特异性 CTL 产生和 / 或功能的抑制效应。因此,当共施用具体抗原时,IL-4 拮抗剂提供抗原特异性细胞 (例如抗原特异性 CD8⁺T 淋巴细胞) 的增大的强度和 / 或亲合力。

[0148] 如本文所考虑的 IL-4 拮抗剂涵盖能够防止或抑制 IL-4 的产生和 / 或生物功能的任何药剂。鉴于 IL-4 的许多生物功能通过与 IL-4R 的结合相互作用介导,IL-4 产生和 / 或功能的许多拮抗剂还为 IL-4R 的拮抗剂 (并且反之亦然)。

[0149] IL-4 拮抗剂可由于与 IL-4 的结合相互作用抑制 IL-4 的产生和 / 或生物功能。拮抗剂与 IL-4 之间的结合相互作用可防止 IL-4 与一种或多种其它分子 (例如 IL-4R α) 结合或以其它方式与它们相互作用,并且从而抑制 IL-4 功能和 / 或产生。就此而言,IL-4 与拮抗剂之间的结合相互作用的亲合力可高于 IL-4 与 IL-4 以其它方式结合的一种或多种

其它分子之间的结合相互作用的亲合力。仅通过非限制实施例,IL-4 受体的可溶形式可用作 IL-4 拮抗剂。这些可突变以便以高亲合力与 IL-4 结合(例如仅由 IL-4R α 链的胞外区组成的可溶 IL-4R)。抗体也可用作 IL-4 拮抗剂。抗体可具有对 IL-4R(例如 IL-4R α)或 IL-4R α 的配体(例如 IL-4)的结合特异性。

[0150] 另外地或替代地,IL-4 拮抗剂可通过防止或抑制由 IL-4R 引发(即经由它开始)的信号传导通路中任何一种或多种下游蛋白质或分子的表达和/或功能来抑制 IL-4 的产生和/或生物功能。例如,药剂可与由 IL-4R 或包括 IL-4R α 的受体复合物引发(即经由它们开始)的信号传导通路中的下游蛋白质或分子相互作用或修改它们的活性。

[0151] 另外地或替代地,IL-4 拮抗剂可由于与 IL-4R 或其组分(例如 IL-4R α)的结合相互作用抑制 IL-4 的产生和/或生物功能。就此而言,结合相互作用将一般不引发通过 IL-4R 介导的细胞信号传导,但是结合亲合力将一般足够防止其它配体与 IL-4R 或其组分(例如 IL-4R α)结合,或以能够经由 IL-4R 引发细胞信号传导的方式结合的能力。

[0152] 通过非限制性实施例,IL-4 拮抗剂可为与 IL-4R 或其组分(例如 IL-4R α 结合的拮抗剂。这些 IL-4 拮抗剂还因此为 IL-4R 拮抗剂和 IL-4R α 拮抗剂。结合相互作用一般不经由 IL-4R 诱导显著水平的细胞信号传导,或诱导任何细胞传导,但相互作用的亲合力足够强大以防止 IL-4R 的其它配体(例如 IL-4 和/或 IL-13)与 IL-4R 结合(例如与 IL-4R α 结合),或以能够经由 IL-4R 引发细胞信号传导的方式结合的能力。

[0153] 在某些实施方案中,IL-4 拮抗剂与 IL-4R α 结合(并且因此也为 IL-4R α 的拮抗剂)。与 IL-4R α 结合而基本上不使细胞信号传导发生,同时防止 IL-4R α (或包括 IL-4R α 的 IL-4R)与其配体之间的相互作用的任何 IL-4 拮抗剂可用于本发明组合物和方法中。这类拮抗剂为本领域技术人员所熟知的,并且包括例如 IL-4R α 的修饰配体(例如突变体 IL-4 分子),所述配体能够与 IL-4R α 结合而不引发细胞信号传导,因此阻断 IL-4R 功能。修饰 IL-4R α 配体的特定和非限制性实例包括具有以下的 IL-4 :C- 末端突变,如一个或多个 C 末端残基的缺失(例如本文所述的如 IL-4C118 的鼠 IL-4 的分泌形式中酪氨酸残基 119 的缺失或取代)和其它哺乳动物 IL-4 同系物中的等效突变;人或猕猴 IL-4 的分泌形式(例如本文所述的 IL-4C123)中在 124 位处的酪氨酸的缺失或取代和其它哺乳动物 IL-4 同系物中的等效突变;剪接变体,如具有 IL-4 基因的外显子 2 编码的一个或多个残基的缺失的变体(例如人中的 IL-4 δ 2 和其它哺乳动物 IL-4 同系物中的等效突变);和人 IL-4 蛋白质的成熟分泌形式中 121 位和/或 124 位和其它哺乳动物 IL-4 同系物中等效位处的突变(例如人 IL-4Y124D 突变体或 R121D/Y124D IL-4 突变体;小鼠 Q116D/Y119D IL-4 突变体或 Y119D 突变体)。还考虑到,IL-4R α 特异性抗体还可设计成与 IL-4R α 结合而基本上不使细胞信号传导发生。

[0154] 许多方法可用于测定 IL-4R 结合相互作用和/或 IL-4R 介导的细胞信号传导,并且为本领域技术人员所熟知的。非限制性实例包括表面等离子共振、荧光共振能量转移(TR-FRET)、化学免疫共沉淀、生物发光共振能量转移(BRET)、由电泳迁移率变动测定(EMSA)测量的 IL-4 依赖性 STAT6 活化等。

[0155] 抗原

[0156] 本发明组合物和方法采用刺激免疫应答的抗原。包括的抗原特异性免疫应答通过 IL-4 拮抗剂(例如 IL-4R α 拮抗剂)的存在而增强。

[0157] 抗原可为能够刺激受试者中免疫应答的任何分子（例如蛋白质、肽、多糖等），包括内源性（自体）抗原和外源性（外来）抗原。可使用抗原的组合。

[0158] 在某些实施方案中，抗原为肽抗原。肽抗原可为适于刺激对关注的靶抗原的免疫应答的大小。所用的肽的大小可对于 T 细胞和 / 或 B 细胞表位处理要求来优化。本领域技术人员将认识到，主要组织相容性复合物 I 类限制的 T 细胞表位的长度一般在 8 个氨基酸残基与 10 个氨基酸残基之间，然而 II 类限制的 T 细胞表位的长度一般在 12 个氨基酸残基与 25 个氨基酸残基之间。侧翼残基可包括在任一种情况下用于最佳蛋白水解处理（例如 2-3 个天然侧翼氨基酸残基用于 I 类限制的 T 细胞表位）。II 类限制的表位可含有特异性结合 II 类 MHC 分子的中心 9-10 氨基酸残基核心，其中核心的任一侧的侧翼残基用于使结合稳定。

[0159] 线性 B 细胞表位可为至少：6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25 或 30 个氨基酸残基。B 细胞表位的大小可为长度小于约 500、200、100、80、60、50 或 40 个氨基酸残基。

[0160] 本发明组合物或方法中所用的肽的大小可适于通过抗原呈递细胞将含于肽内的表位呈递到 T 淋巴细胞和 / 或 B 淋巴细胞。

[0161] 鉴别和选择有效抗原肽（例如能够引发免疫应答的最小肽序列）的技术为本领域技术人员所熟知的。仅通过非限制性实例，参考 Rappuoli 和 Bagnoli 编，(2011), “Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies”, Caister Academic Press, UK; 和 Agudelo 和 Patarroyo, (2010), “Quantum chemical analysis of MHC-peptide interactions for vaccine design”, Mini Rev Med Chem; 10(8): 746-58, 其全部内容以引用方式并入本文。

[0162] 在一些实施方案中，抗原可为病毒抗原。抗原所来源的示例性病毒组分包括被膜、外壳、囊、衣壳、毒素、RNA、DNA 和其组合。不存在关于抗原所来源的病毒的具体类型的具体限制。非限制性实例包括疱疹病毒（例如人疱疹病毒 (HHV) 1-8 型）如单纯疱疹病毒 I 型和 II 型、巨细胞病毒、水痘带状疱疹病毒、埃巴氏病毒 (epstein barr virus); 肝炎病毒（例如肝炎 A、B、C）; 正粘病毒（例如流感病毒 A 型、B 型、C 型和其重组形式）; 黄病毒（例如登革病毒、西尼罗病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒）; 冠状病毒（例如 SARS 病毒）; 副粘病毒（例如亨德拉病毒、麻疹病毒、仙台病毒、腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒）; 肠道病毒（例如柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒）; 披盖病毒（例如风疹病毒）; 腺病毒（例如 4 型和 7 型）; 乳头状瘤病毒（例如人乳头状瘤病毒）; 纤丝病毒（例如埃博拉病毒）; 布尼亚病毒（例如汉坦病毒、白蛉热病毒）; 弹状病毒（例如水泡性口炎病毒; 如狂犬病毒的狂犬病病毒）; 和逆转录病毒（例如慢病毒如 HIV-1、HIV-2、SIV 和绵羊髓鞘脱落病毒）。

[0163] 可使用给定病毒的任何合适抗原。单纯疱疹病毒抗原的非限制性实例包括即早蛋白、糖蛋白 B、糖蛋白 D 和 VZV 抗原 9PI 和 gpII。肝炎病毒的抗原的非限制性实例包括 S、M 和 L 包膜蛋白和 pre-S 表面抗原。合适流感病毒抗原的非限制性实例包括血凝素、神经氨酸酶和其它流感病毒包膜蛋白。日本脑炎病毒抗原的非限制性实例包括蛋白 E、M-E、M-E-NS 1、NS 1 和 NS 1-NS2A。麻疹病毒抗原的非限制性实例包括麻疹病毒融合蛋白。风疹病毒的示例性抗原包括但不限于蛋白 E1 和 E2。示例性轮状病毒抗原包括 VP7sc。呼吸道合胞病毒抗原的非限制性实例包括 RSV 融合蛋白和 M2 蛋白。示例性狂犬病毒抗原包括但不限于狂犬病毒糖蛋白和狂犬病毒核蛋白。乳头状瘤病毒抗原的非限制性实例包括 L1 和 L2 衣壳

蛋白和与子宫颈癌相关联的 E6/E7 抗原。

[0164] 在某些实施方案中,病毒抗原来自逆转录病毒。逆转录病毒可为人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)。HIV 的合适抗原的非限制性实例包括以下基因产物的抗原: gp120env、gp140env、gp160env、p18、gag、pol、vif、vpr、vpu、tat、rev 和 nef 基因,以及其组合。例如,抗原可为 HIV-1gag、pol、env、gag/pol 或 gag/pol/env 基因产物。

[0165] 组合物

[0166] 本发明组合物可包含连同能够抑制 IL-4 的产生和 / 或活性的组分一起的能够针对靶标药剂诱导免疫的免疫原性组分(例如抗原)。

[0167] 或者,免疫原性组分(例如抗原)和能够抑制 IL-4 的产生和 / 或活性的组分可提供在配制用于同时施用或依次施用的单独组合物中。

[0168] - 多肽和蛋白质

[0169] 本发明组合物可包含 IL-4 拮抗剂(例如 IL-4R α 拮抗剂)和 / 或能够针对靶标药剂诱导免疫的免疫原性组分(例如抗原)。

[0170] 组合物可配制用于注射、吸附或局部施用,促进宿主细胞和组织对拮抗剂和 / 或免疫原性组分的直接暴露。在某些实施方案中,拮抗剂和 / 或免疫原性组分可呈纳米粒子的形式提供(参见例如美国专利号 7,611,690、7,858,596 和 8,048,404 中所述的方法)。另外地或替代地,组合物可呈适于通过粒子轰击递送的干燥粉末形式配制(参见例如依赖于气体驱动粒子加速的方法,如美国专利号 5,584,807、5,865,796 和 6,010,478 中所述的方法;和依赖于气体驱动无针注射的方法,如美国专利号 5,299,163、5,383,851 和 5,993,412 中所述的方法)。

[0171] - 核酸构建体

[0172] 本发明组合物可包含能够表达编码 IL-4 拮抗剂和 / 或能够针对靶标药剂诱导免疫的免疫原性组分(例如抗原)的一或多种多核苷酸的核酸构建体。编码 IL-4 拮抗剂的多核苷酸可在与编码免疫原性组分的多核苷酸相同或不同的构建体中。核酸构建体可为例如表达载体、质粒载体、病毒载体、phosmid、黏粒、重组病毒或适于插入外来序列、引入细胞中并且随后表达引入序列的任何其它载体构建体。

[0173] 构建体可为以复制子粒子为基础的疫苗载体。非限制性实例包括来源于辛德毕斯病毒(SIN)、塞姆利基森林病毒(SFV)和委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)的以 α 病毒复制子粒子为基础的疫苗载体。

[0174] 编码 IL-4 拮抗剂和 / 或免疫原性组分(例如抗原)的多核苷酸可以可操作地连接到调控多核苷酸序列(例如转录和 / 或翻译控制序列,如启动子序列、5' 端非翻译区、3' 端非翻译区、c/s- 调控区、核糖体结合序列、转录和翻译起始位点等)。启动子可为组成型或诱导型。调控多核苷酸序列可为相容的用于在旨在施用构建体的细胞或组织类型中的表达。

[0175] 应将启动子理解为意味细胞的转录机构识别以引发下游多核苷酸序列的转录的 DNA 序列。合适启动子的非限制性实例包括:组成型启动子,如一些真核生物病毒中所见的启动子,如腺病毒、多瘤病毒、CMV(例如巨细胞病毒即早基因启动子)、SV40、劳斯肉瘤病毒(例如长末端重复启动子)、禽类肉瘤病毒、单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子、B 型肝炎病毒逆转录 LTR 区;存在于真核生物基因中的启动子,如:EF-1 α 启动子、金属硫蛋白基因启动子、

肌动蛋白启动子和免疫球蛋白启动子；需要添加用于表达的物质或外源信号的诱导型启动子，如四环素启动子、NFKappaB/UV 光、Cre/lox、热休克启动子、可调控 RNA 聚合酶 II 启动子（参见 PCT 公开号 WO/2006/135436）；组织特异性启动子，如 PCT 公开号 WO/2006/012221 中所述的 PSA 启动子；和组成型 RNA 聚合酶 III 启动子，如 5S ARN、ARN 7SLARNt、ARNsn、H1 和 U6 基因的 RNA pol III 启动子。其它非限制性实例包括人延长因子 1 α 启动子和人泛素 c 启动子。

[0176] 核酸构建体可使用本领域已知的任何合适方法配制用于递送到靶细胞和组织。

[0177] 在某些实施方案中，构建体可配制用于以裸 DNA 的形式递送（参见例如美国专利号 6,265,387、6,972,013 和 7,922,709 中所述的技术）。

[0178] - 重组病毒

[0179] 在一些实施例中，包括在本发明组合物中的核酸构建体可呈重组病毒的形式。一般可将病毒修饰以表达编码一种或多种外源性蛋白质或外源性蛋白质组分的多核苷酸。例如，可改造重组病毒以便表达编码 IL-4 拮抗剂（例如 IL-4R α 拮抗剂）和 / 或包括一种或多种抗原的免疫原性组分的多核苷酸。

[0180] 本发明的重组病毒可通过修饰“亲代”病毒以并入外源性遗传物质来产生。本文提及的特定类型的重组病毒（例如重组鸡痘病毒、牛痘病毒或痘病毒）表示已修饰以并入外源性遗传物质的指定类型的亲代病毒。

[0181] 关于用以产生本发明重组病毒的特定类型的亲代病毒不存在具体限制。合适亲代病毒的非限制性实例包括逆转录病毒（例如慢病毒，如 HIV、HIV-1、HIV-2、FIV、BIV、EIAV、MW、CAEV 和 SIV）、腺病毒和腺相关病毒、 α 病毒（例如 VEE）、黄病毒和痘病毒（例如牛痘病毒、鸟痘病毒（如鸡痘病毒）和禽痘病毒）。

[0182] 重组病毒可为活重组病毒或活减毒重组病毒。一般来说，重组病毒是具有复制能力的病毒，这意味着它们能够在它们感染的宿主细胞中繁殖。

[0183] 本发明重组病毒包括至少一个外源性核苷酸序列。应理解，在本发明上下文中，核苷酸序列涵盖 DNA、RNA 和互补（cDNA）序列。

[0184] 如本文所用的外源性核苷酸序列涵盖插入到亲代病毒的基因组中以形成重组病毒的任何核苷酸序列。在某些实施方案中，外源性核苷酸序列编码 IL-4 拮抗剂（例如 IL-4R α 拮抗剂）和 / 或不同微生物（例如不同病毒）的免疫原性分子（例如抗原）。

[0185] 在不对核苷酸序列的长度施加任何特定限制的情况下，在一些实施方案中序列的长度可在约 10 个核苷酸至 15 个核苷酸之间、15 个核苷酸至 25 个核苷酸之间、20 个核苷酸至 30 个核苷酸之间、25 个核苷酸至 35 个核苷酸之间、30 个核苷酸至 40 个核苷酸之间、35 个核苷酸至 45 个核苷酸之间、40 个核苷酸至 50 个核苷酸之间、50 个核苷酸至 75 个核苷酸之间、75 个核苷酸至 100 个核苷酸之间、100 个核苷酸至 150 个核苷酸之间、150 个核苷酸至 200 个核苷酸之间、200 个核苷酸至 275 个核苷酸之间、275 个核苷酸至 350 个核苷酸之间、350 个核苷酸至 500 个核苷酸之间、500 个核苷酸至 750 个核苷酸之间、750 个核苷酸至 1000 个核苷酸之间、1000 个核苷酸至 1250 个核苷酸之间、1250 个核苷酸至 1500 个核苷酸之间、1500 个核苷酸至 1750 个核苷酸之间、1750 个核苷酸至 2000 个核苷酸之间、2000 个核苷酸至 2500 个核苷酸之间、2500 个核苷酸至 3000 个核苷酸之间或大于 3000 个核苷酸。

[0186] 本发明重组病毒可包括多外源性多核苷酸序列，包括同一外源性序列的一个或多

个副本和 / 或不同外源性序列的组合 (例如编码 IL-4 拮抗剂 (例如 IL-4R α 拮抗剂) 的多核苷酸和编码包括一种或多种抗原的免疫原性组分的多核苷酸)。

[0187] 关于一个或多个外源性多核苷酸序列插入到病毒基因组中的位置不存在具体限制, 这将主要依赖于具体多核苷酸和亲代病毒。但是, 优选的是, 外源性序列插入在病毒基因组中使对翻译病毒多肽的病毒功能、复制和 / 或蛋白水解处理的不良作用最小的位置处。

[0188] 外源性多核苷酸可插入到病毒的开放阅读框架 (ORF) 中。例如, 多核苷酸可插入在两个病毒基因之间的交叉点处。或者, 多核苷酸可插入到不在 ORF 中的区中的病毒基因组中。例如, 多核苷酸可插入到两个不同 ORF 之间的非编码序列中, 5' 端到 ORF (例如在 5' - 非翻译区 (5' -UTR) 中) 或 3' 端到 ORF (例如在 3' - 非翻译区 (3' -UTR) 中)。

[0189] 插入到亲代病毒中的外源性多核苷酸可包括编码蛋白水解切割位点的至少一个核苷酸序列。若作为单个多肽的组分翻译, 蛋白水解切割位点可在促进从其它病毒编码的多肽切割和释放编码多肽方面为有利的。编码蛋白水解切割位点的合适序列和它们并入到其它序列中的方法为此项技术中熟知的并且描述于标准文本中。

[0190] 本发明重组病毒可包括用于从亲代病毒和 / 或从不同外来病毒引发外源性序列 (例如 5' 端帽、内部核糖体进入位点等) 的翻译的至少一个内源性或外源性核苷酸序列。

[0191] 插入到亲代病毒中的外源性多核苷酸可包括用于引导编码 IL-4 拮抗剂和 / 或免疫原性组分 (例如抗体) 在感染细胞 (例如内质网) 内和 / 或离开感染细胞的运输的信号肽。

[0192] 根据本发明的重组病毒可使用本领域技术人员已知的标准分子生物学技术和重组核酸技术产生。所利用的具体方法将依赖于所用的亲代病毒和待插入的具体外源性多核苷酸。将外源性核苷酸序列插入到亲代病毒中可使用标准的分子生物学技术完成。合适的技术描述于例如标准文本中, 包括 Sambrook 等, (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York; 和 Ausubel 等编, (2000-2010), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons 公司。本说明书的实施例也提供对将外源性核苷酸序列插入到亲代病毒中的方法的特定指导。使用这些原理, 各种外源性核苷酸序列中的任一个可插入到亲代病毒基因组中。

[0193] 仅通过非限制性实施例, 遗传重组可用以通过同源或异源重组事件将外源性多核苷酸性载体转移到亲代病毒。外源性多核苷酸可提供在侧翼有亲代病毒序列的载体中。外源性多核苷酸或侧翼序列可包括可选择的标记。在由载体和亲代病毒感染宿主细胞之后, 重组事件可用于用载体的外源性序列置换亲代病毒的外源性序列。这样产生的重组病毒可使用可选择的标记选择。

[0194] 另外地或替代地, 可产生重组病毒互补 DNA (cDNA) 构建体, 包括具有在基因组中靶标位置处插入的一个或多个外源性 cDNA 序列的亲代基因组的 cDNA 拷贝。这可例如通过经由聚合酶链式反应 (PCR) 产生病毒基因组的 cDNA 片段和 / 或克隆包括片段的质粒来实现。各种遗传片段可使用例如切割遗传 cDNA 片段的适当限制性位点结合在一起以产生例如可连接到其它片段末端的悬垂端 (overhanging end)。以这种方式, 病毒基因组的 cDNA 拷贝可用在所需位置处插入的外源性 cDNA 序列与针对 RNA 聚合酶适当定位的启动子序列

一起构建。重组 cDNA 构建体的 RNA 拷贝可然后使用适当 RNA 聚合酶产生。病毒 RNA 转录物可然后使用适当技术（例如电穿孔）转染成适当细胞系（例如 BHK-21 细胞或维洛细胞），其中重组病毒的产生可然后发生。

[0195] 从亲株制备重组病毒的合适方法的其它非限制性实例包括：逆转录病毒系统，如美国专利号 5,219,740、5,219,740、7,250,299 和 7,608,273 中所公开的系统； α 病毒系统，如美国专利号 6,465,634 和 7,811,812 中所述的系统；黄病毒系统，如美国专利号 5,744,140 和 8,124,398 中所述的系统；腺相关病毒系统，如美国专利号 5,173,414、7,022,519 和 7,125,705 中所述的系统；以腺病毒为基础的系统，如美国专利号 6,905,862、7,989,425 和 6,468,771 中所述的系统；痘病毒系统，如美国专利号 7,015,024 和 7,338,662 中所述的系统；和禽痘病毒系统，如美国专利号 5,871,742 和 6,340,462 中所述的系统。

[0196] - 示例性重组病毒

[0197] 本发明某些实施方案涉及包括重组痘病毒（即痘病毒科）的组合物，并且具体地说痘病毒的脊椎动物痘病毒亚科的组合物。使用这类病毒的有利之处可在于它们的基因组可适应大的外来 DNA 序列的并入。这继而使得能够改造这些病毒来表达编码全蛋白（例如包括 IL-4R α 受体拮抗剂的 IL-4 拮抗剂和 / 或包括抗原的免疫原性肽）的异源基因序列。使用这些病毒还可由于包括人的动物中的良好的安全性特征为有利的。

[0198] 仅通过非限制性实施例，如修饰的牛痘病毒安卡拉 (MVA) 的减毒牛痘病毒和 NYVAC 可用作亲株以产生重组痘病毒。亲代病毒可具有在它们产生期间移除或失活的一个或多个致病基因。

[0199] 另外地或替代地，如基于金丝雀痘病毒 (ALVAC) 或鸡痘病毒 (TROVAC) 的禽痘病毒载体的宿主受限菌株可用作亲株以产生重组痘病毒。

[0200] 重组痘病毒可用于本发明组合物中，以便提供以短暂方式，例如在免疫接种的局部位点处表达 IL-4 拮抗剂（例如 IL-4R α 受体拮抗剂）。当共施用如抗原（例如在同一或单独痘病毒中表达）的免疫原性组合物时，IL-4 拮抗剂可增强抗原特异性免疫细胞（例如 CD8⁺T 淋巴细胞）以高亲合力的感应。形成的抗重组痘病毒的免疫应答将最终清除病毒，因此意味 IL-4 拮抗剂瞬时表达而非永久地表达，从而提高安全性特征。

[0201] 在示例性实施方案中，本发明组合物可包括一种或一系列重组牛痘病毒和 / 或鸡痘病毒。一种或多种重组病毒可包括编码 IL-4 拮抗剂（例如 IL-4R α 受体拮抗剂）、来自感染性微生物（例如致病病毒）的至少一种抗原或两者的一个或多个外源性多核苷酸序列。抗原可为病毒抗原（例如逆转录病毒抗原）。抗原可为 HIV-1 和 / 或 HIV-2 的抗原。抗原可由以下中的一个或多个编码：gp120env、gp140env、gp160env、p18、gag、pol、vif、vpr、vpu、tat、rev 和 nef 基因，或其组合。IL-4 拮抗剂可为 IL-4 的突变体形式，包括使 IL-4 拮抗剂能够与 IL-4R α 结合而不引发细胞信号传递的突变。例如，突变可在残基 121 和 / 或 124（例如 IL-4 的成熟分泌人形式的 R121D 和 / 或 Y124D）处或另一物种的 IL-4 同系物中的相应位置处。突变可为 IL-4 基因的外显子 2 编码的一些或所有残基的缺失。

[0202] - 制剂、药物和疫苗

[0203] 本发明组合物和药物可使用本领域普通技术人员已知的方法制备。合适方法的非限制性实例描述于 Gennaro 等编，(1990)，"Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack

Publishing 公司, Easton, Pennsylvania, USA 中。

[0204] 本发明组合物和药物可包括药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂和 / 或佐剂。如本文所考虑的“药学上可接受的”载体、赋形剂、稀释剂和 / 或佐剂为当向如人或非人动物的具体接受者施用时一般不产生显著不良反应的物质。药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂和佐剂一般也与组合物或药物的其它成分相容。合适赋形剂、稀释剂和载体的非限制性实例可见于“Handbook of Pharmaceutical Excipients”第 4 版, (2003) Rowe 等编, The Pharmaceutical Press, London, American Pharmaceutical Association, Washington 中。

[0205] 本发明组合物和药物可配制成疫苗。本发明疫苗包括预防性疫苗 (即, 出于预防感染的目的施用的疫苗) 和治疗性疫苗 (出于治疗感染的目的施用的疫苗)。本发明疫苗可因此出于预防、改善、缓解或治疗目的向接受者施用。

[0206] 本发明组合物和药物可呈适于注射施用的形式, 呈适于口服摄取的制剂 (例如像胶囊、片剂、囊片、酏剂), 呈适于局部施用的软膏、霜剂或洗剂的形式, 呈适于作为滴眼剂递送的形式, 呈适于吸入施用 (如通过鼻内吸入或经口吸入) 的气雾剂形式, 或呈适于胃肠外施用的形式, 即皮下、肌内或静脉内注射。

[0207] 如佐剂或生物应答调节剂的补充活性成分还可并入到本发明组合物和药物中。尽管佐剂可包括在本发明药物组合物中, 但是它们不必要包括佐剂。就这些而言, 可避免使用佐剂所产生的反应原性问题。

[0208] 一般来说, 在本发明组合物或药物方面的佐剂活性包括但不限于增强组合物或药物 (例如抗原) 中免疫原性组分所诱导的免疫应答 (定量地或定性的) 的能力。这可减小产生免疫应答所需的免疫原性组分的剂量或水平和 / 或减小产生所需免疫应答所需的免疫接种的数目或频率。

[0209] 任何合适佐剂可包括在本发明组合物或药物内。例如, 可利用以铝为基础的佐剂。合适的以铝为基础的佐剂包括但不限于氢氧化铝、磷酸铝和其组合。可利用的以铝为基础的佐剂的其它特定实例描述于欧洲专利号 1216053 和美国专利号 6, 372, 223 中。其它合适佐剂包括弗氏不完全佐剂和完全佐剂 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); 默克佐剂 65 (Merck and Company, Rahway, N. J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); 如氢氧化铝凝胶 (明矾) 或磷酸铝的铝盐; 钙、铁或锌的盐; 酰化酪氨酸的不可溶悬浮液; 酰化糖; 阳离子或阴离子衍生化多糖; 聚磷腈; 生物可降解微球; 单磷酰基脂质 A 和 quil A; 水包油乳状液, 包括描述于欧洲专利号 0399843、美国专利号 7, 029, 678 和 PCT 公开号 WO 2007/006939 中的乳状液; 和 / 或其它细胞因子, 如 GM-CSF 或白介素 -2、白介素 -7 或白介素 -12、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、单磷酰基脂质 A (MPL)、霍乱毒素 (CT) 或它的组成亚单位、热不稳定肠毒素 (LT) 或它的组成亚单位、toll 样受体配体佐剂, 如脂多糖 (LPS) 和其衍生物 (例如单磷酰基脂质 A 和 3 脱酰单磷酰基脂质 A)、胞壁酰二肽 (MDP) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 的 F 蛋白。

[0210] 方法

[0211] 本发明提供用于诱导受试者中抗原特异性免疫应答的方法。所述方法可有效增大受试者中免疫细胞对施用抗原的亲合力和 / 或提高特异于施用抗原的免疫细胞的数目。所述方法可出于预防、改善、缓解和 / 或治疗目的进行。例如, 所述方法可用于预防受试者中的感染 (即疫苗接种) 和 / 或治疗受试者中的感染 (例如病毒感染、逆转录病毒感染、HIV-1

和 / 或 HIV-2 感染)。

[0212] 所述方法需要施用本发明的一种或多种组合物、药物或疫苗。因此,所述方法需要施用 IL-4 拮抗剂,例如像上文标题为“白介素 -4(IL-4) 拮抗剂”的节中所述的拮抗剂中的任何一种或多种。例如,所述方法可包括施用与 IL-4 结合的拮抗剂或如与 IL-4R α 结合的拮抗剂的 IL-4R 拮抗剂。所述方法还需要施用免疫原性组分,如包括一种或多种抗原的组分。合适抗原的非限制性实例包括上文标题为“抗原”的节中所述抗原中的任何一种或多种。抗原可来自于如病毒的病原微生物。例如,所述方法可包括施用 HIV-1 和 / 或 HIV-2 的抗原,包括由以下中的任何一种或多种编码的抗原:gp120env、gp140env、gp160env、p18、gag、pol、vif、vpr、vpu、tat、rev 和 nef 基因和其组合(例如 gag/pol、gag/pol/env)。

[0213] 所述方法可涉及同时施用 IL-4 拮抗剂和免疫原性组分,或涉及依次施用 IL-4 拮抗剂,接着施用免疫原性组分(或反之亦然)。当同时施用时,IL-4 拮抗剂和免疫原性组分可提供在同一组合物中,或提供在单独组合物中。组合物可包含一种或多种核酸构建体或包括编码 IL-4 拮抗剂和 / 或免疫原性组分的多核苷酸序列的重组病毒(例如一种或多种重组痘病毒,如重组牛痘病毒、重组鸡痘病毒和 / 或重组 MVA 病毒)。合适核酸构建体和重组病毒的非限制性实例阐述于上文标题为“核酸构建体”、“重组病毒”和“示例性重组病毒”的亚节中。

[0214] 发明人已鉴别出,抗原特异性免疫细胞应答的强度和 / 或免疫细胞对抗原的亲合力可通过对抗原的免疫应答的局部环境中 IL-4/IL-4R 信号传导的短暂拮抗来进一步提高。例如,高亲合力抗原特异性免疫细胞(例如记忆 CD8^T 细胞)的产生可通过在初始施用抗原之后 IL-4 拮抗剂(例如 IL-4R α 拮抗剂)的短暂表达(例如持续小于 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、14 天或 21 天的时间)得以提高。

[0215] 用于施用的示例性制剂描述于上文标题为“制剂和疫苗”的亚节中。示例性施用剂量和途径描述于下文标题为“施用剂量和途径”的节中。

[0216] 一般来说,组合物、药物和疫苗以治疗有效量向受试者施用。“治疗有效量”的含义是指本发明中所用的活性组分的量没有毒性但足以得到所需的治疗效果。所需的精确量将随受试者而变化,取决于如治疗的物种、受试者的年龄和一般条件、治疗病状的严重性、所预防的感染的性质、施用的具体药剂、施用方式等因素。因此,不可能指明精确的“治疗有效量”。但是,对于任何给定情况,适当的“治疗有效量”可由本领域普通技术人员仅使用常规实验方法确定。

[0217] 如本文所考虑的“受试者”包括社会、经济或研究重要性的任何物种的哺乳动物(例如人)和个体,包括但不限于羊、牛、马、猪、猫、犬、鸟、灵长类和啮齿动物物种。

[0218] 本发明方法可用于诱导受试者中对抗与 IL-4 拮抗剂共施用的抗原的抗原特异性免疫应答。抗原特异性免疫应答可包括 T 淋巴细胞(例如 CD8^T 淋巴细胞)。应理解,如本文所考虑的“诱导”抗原特异性免疫应答包括激发免疫应答以及调节先前存在的免疫应答(例如增强或现存的免疫应答)。将抗原与 IL-4 拮抗剂共施用可增强对抗原具有特异性的免疫应答,这些免疫应答优于通过施用抗原而不施用 IL-4 拮抗剂实现的免疫应答。

[0219] 另外地或替代地,本发明方法可用于提高免疫细胞对向受试者与 IL-4 拮抗剂共施用的抗原的亲合力。免疫细胞可为 T 淋巴细胞(例如 CD8^T 淋巴细胞)。通过提高免疫细胞对抗原的亲合力,引起免疫细胞 / 免疫细胞种群中应答所需的抗原的量或浓度减小。将

抗原与 IL-4 拮抗剂共施用可增强免疫细胞对抗原的亲合力,所述亲合力优于通过施用抗原而不施用 IL-4 拮抗剂实现的亲合力。

[0220] 另外地或替代地,本发明方法可用于提高特异于受试者中抗原的免疫细胞的数目。免疫细胞可为 T 淋巴细胞(例如 CD8⁺T 淋巴细胞)。将抗原与 IL-4 拮抗剂共施用可提高对抗原具有特异性的免疫细胞的数目,所述数目大于通过施用抗原而不施用 IL-4 拮抗剂实现的数目。

[0221] 抗原特异性免疫应答的感应和抗原特异性免疫细胞的数目和亲合力可使用本领域技术人员已知的标准方法测定。示例性方法包括但不限于:固相异质测定(例如酶联免疫吸附测定)、溶液相测定(例如电化学发光测定)、扩增发光邻近均质测定、流失细胞测量术、胞内细胞因子染色、功能性 T 细胞测定、功能性 B 细胞测定、功能性单核细胞-巨噬细胞测定、四聚体结合和解离测定、五聚体结合和解离测定、树状和网状内皮细胞测定、NK 细胞应答的测量、氧化暴发测定、细胞毒素特异性细胞溶解测定和吞噬和凋亡评估。

[0222] 所述方法可包括施用抗原和白介素-4 受体拮抗剂的初免剂量,并且随后施用抗原和白介素-4 受体拮抗剂的稍后加强剂量。例如,加强剂量可在初免剂量之后至少 7 天、14 天、21 天或 28 天,至少 1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月或 6 个月,或至少 1 年、2 年、3 年、4 年或 5 年施用。引发疫苗剂量的抗原和 IL-4 拮抗剂可单独地或依次地施用。加强剂量的抗原和 IL-4 拮抗剂可单独地或依次地施用。初免剂量和加强剂量可通过相同或不同途径施用。例如,初免剂量和加强剂量可粘膜(例如鼻内)、肌内、静脉内或皮下施用。此外,初免剂量可粘膜(例如鼻内)施用来诱导粘膜抗原特异性免疫细胞,并且加强剂量可肌内、皮下或静脉内施用来诱导全身抗原特异性免疫细胞。

[0223] 施用剂量和途径

[0224] 本发明组合物、药物和疫苗可通过标准途径向接受者施用,包括但不限于胃肠外(例如静脉内、脊柱内、皮下或肌内)、经口、局部或粘膜(例如鼻内)途径。

[0225] 组合物、药物和疫苗可以隔离方式或以与其它附加治疗药剂组合方式向接受者施用。在将组合物、药物和疫苗与治疗药剂一起施用的实施方案中,施用可为同时的或依次的(即施用组合物/药物/疫苗,接着施用药剂,或反之亦然)。

[0226] 一般来说,组合物、药物和疫苗可以以与施用途径和接受者的身体特征(包括健康状况)相容的方式并且以引起所需效应(即治疗有效性、免疫原性和/或保护性)的这种方式配制。例如,本发明组合物、药物和疫苗的适当剂量可取决于各种因素,包括但不限于:受试者的身体特征(例如年龄、体重、性别);组合物、药物或疫苗是作为单一药剂还是辅助治疗使用;患者的 MHC 限制类型;病毒感染的进展(即病理状态);和本领域技术人员可认识到的其它因素。当测定适当剂量时可考虑到的各种总体考虑描述于例如 Gennaro 等编,(1990),“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing 公司,Easton, Pennsylvania, USA;和 Gilman 等编,(1990),“Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics”,Pergamon Press 中。

[0227] 本领域技术人员通过常规实验将能够测定有效无毒的量的本文所述抗原和/或 IL-4 拮抗剂以包括在本发明组合物、药物或疫苗中用于所需治疗结果。一般来说,本发明组合物、药物或疫苗可以以约 50 微克至约 5mg 的活性组分的量向患者施用。剂量可以以约 50 微克至约 500 微克的活性组分的量。一般来说,有效剂量预期在每 24 小时每千克体重

约 0.0001mg 至约 1000mg 活性组分范围内 ;通常,为约每 24 小时每千克体重约 0.001mg 至约 750mg ;每 24 小时每千克体重约 0.01mg 至约 500mg ;每 24 小时每千克体重约 0.1mg 至约 500mg ;每 24 小时每千克体重约 0.1mg 至约 250mg ;或每 24 小时每千克体重约 1.0mg 至约 250mg。更通常,有效剂量范围预期为在以下范围内 ;每 24 小时每千克体重约 1.0mg 至约 200mg ;每 24 小时每千克体重约 1.0mg 至约 100mg ;每 24 小时每千克体重约 1.0mg 至约 50mg ;每 24 小时每千克体重约 1.0mg 至约 25mg ;每 24 小时每千克体重约 5.0mg 至约 50mg ;每 24 小时每千克体重约 5.0mg 至约 20mg ;或每 24 小时每千克体重约 5.0mg 至约 15mg。

[0228] 通常,在治疗应用中,治疗可用于疾病状态或病状的持续时间。此外,本领域普通技术人员应明白,个体剂量的最佳量和间隔将通过治疗的疾病状态或病状的性质和程度,施用的形式、途径和部位,和治疗的具体个体的性质来决定。最佳条件可使用常规技术得以测定。

[0229] 在许多情况下(例如预防性应用),具有本发明组合物、药物或疫苗的数次或多次施用可为合乎需要的。例如,组合物、药物或疫苗可施用 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次、6 次、7 次、8 次、9 次、10 次或更多次。施用可为约一周至约十二周间隔,并且在某些实施方案中为约一周至约四周间隔。定期再次施用可就反复暴露于靶标的具体抗原而言为合乎需要的。

[0230] 本领域普通技术人员还应明白,施用的最佳时程可使用治疗测定试验的常规时程确定。

[0231] 在向受试者“协同地”施用两个或更多个实体时,它们可在单一组合物在同一时间施用,或在单独组合物中在同一时间施用,或在单独组合物中在单独时间施用。

[0232] 本发明的某些实施方案涉及以多单独剂量施用组合物、药物或疫苗。因此,本文所述预防(即疫苗接种)和治疗感染的方法涵盖例如在限定时间段内向受试者施用多个单独剂量。因此,本文公开的预防(即疫苗接种)和治疗感染的方法包括施用初免剂量。初免剂量可在加强剂量之前。加强剂量可用于再次疫苗接种的目的。在各种实施方案中,组合物、药物或疫苗施用至少一次、两次、三次或更多次。

[0233] 试剂盒

[0234] 包括组合物、药物和疫苗的适于进行本发明方法的药剂可作为试剂盒中的组分提供。

[0235] 本发明试剂盒可包含有助于进行本发明方法的组分,例如像施用装置、缓冲液和/或稀释剂。试剂盒可包括用于容纳各种组分的容器和用于以本发明方法使用试剂盒组分的说明书。

[0236] 试剂盒可为如本文所定义的分段试剂盒或组合试剂盒。分段试剂盒包含容纳于单独容器中的试剂,并且可包括小玻璃容器、塑料容器等。这类容器可允许试剂在避免试剂的交叉污染同时从一个隔室向另一隔室的有效转移,和以定量方式从一个隔室向另一隔室添加每一容器的药剂或溶液。通常,本发明试剂盒还将包括使用试剂盒组分的说明书从而进行适当方法。

[0237] 例如,试剂盒可包含第一容器和第二容器。第一容器可包含 IL-4 拮抗剂(例如像与 IL-4R α 结合的拮抗剂)。第二容器可包含带有或编码免疫原性药剂(例如一种或多种病毒抗原)的组分。试剂盒可还包含一个或多个其它容器,容器含有例如有助于如所需向受试者施用试剂盒的组分的一个或多个装置以进行本发明方法。

[0238] 本领域普通技术人员将了解,在不脱离广义上描述的本发明的精神或范围的情况下,可对所述特定实施方案中所公开的本发明作出众多的变化和/或修改。因此,本实施方案在所有方面都被视为是说明性的而不是限制性的。

实施例

[0239] 现将参考以下特定实施例描述本发明,所述实施例不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0240] 实施例 1:疫苗的制备

[0241] - 鼠 IL-4 突变序列的设计和制备

[0242] 将小鼠 IL-4C118cDNA 使用基因特异性引物和一步 RT-PCR 试剂盒 (QIAGEN) 从脾的总 RNA 扩增。

[0243] 正向引物 5' GGATCCACCATGGGTCTCAACCCCCAGCTA 3' (SEQ ID NO:1) 含有促进克隆的 BamHI (GGATCC) 限制性位点和重叠甲硫氨酸起始密码子的共有 Kozak 翻译起始序列 (CCACCATGG)。

[0244] 反向引物 5' GAATTCTAATCCATTTGCATGATGCTC 3' (SEQ ID NO:2) 含有框内 STOP 密码子 (TAG) 的插入以提前终止在成熟分泌蛋白上 118 位之后的氨基酸序列,从而缺乏完整基因序列编码的 20 氨基酸信号肽。成熟分泌蛋白的氨基酸 118 因此对应于完整基因序列的密码子 138 位 (其包括氨基末端可切割信号肽)。终止密码子的插入产生两个末端氨基酸 119 和 120 的缺失,从而移除细胞信号传导所需的 119 位处的必需的酪氨酸。反向引物还含有 EcoRI 限制性位点以促进 DNA 亚克隆。

[0245] 将 431bp PCR 片段 (SEQ ID NO:3) 直接连接到 U 尾载体 pDrive 中并且转化到 QIAGEN EZ 感受态细胞中 (QIAGEN)。将 PCR 片段在 pBluescriptSK+ 的 BamHI 与 EcoRI 位点之间亚克隆,以添加下游 HindIII 位点,然后以 BamHI-HindIII 片段的形式亚克隆到 pAF09 中 (参见参考文献 7),与含于载体中的鸡痘病毒早期/晚期启动子 ATG 密码子在框内。还将小鼠 IL-4C118BamHI-HindIII 片段亚克隆到 pTK7.5A 中 (参见参考文献 9),在牛痘病毒 P7.5 早期/晚期启动子下游。

[0246] - 共表达 IL-4C118 的 FPV-HIV 和 VV-HIV 疫苗的构建

[0247] 共表达 HIV gag/pol(mut) 抗原和小鼠 IL-4C118 的重组病毒使用亲代病毒 FPV-HIV 086 和 VV-HIV 336 构建 (参见参考文献 1)。重组 FPV 通过用 FPV-HIV 086 (MOI 0.05) 感染鸡胚皮肤 (CES) 细胞培养基,接着使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 用 pAF09-IL-4C118 转染得以构建。将 rFPV 通过在含有 MX-HAT (2.5mg/ml 霉酚酸、250mg/ml 黄嘌呤、100mg/ml 次黄嘌呤、0.4mg/ml 氨基蝶呤 (aminopterin) 和 30mg/ml 胸苷) 的最低必须培养基 (MEM) 中 CES 细胞上病毒的继代来选择,以选择表达 gpt (黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖激酶) 基因的病毒。含有重组病毒的蚀斑使用含有 X-gal (200mg/ml) 的琼脂覆盖物 (MEM 中 1% 琼脂) 鉴别以检测 lacZ 基因的共表达。将染成蓝色的蚀斑挑出,并且在选择培养基下进行 3 轮至 4 轮蚀斑纯化。重组病毒通过 PCR 确认 IL-4C118 基因的存在和野生型病毒的缺少。

[0248] 类似地,将 rVV 通过用 VV-336 (MOI 0.05) 感染 H143B TK 细胞并且用 pTK7.5A-IL-4C118 转染来构建。重组病毒使用含有 HAT 补充液的 MEM 来选择,以选择表达

含于载体中的单纯疱疹病毒 TK 基因的病毒。将病毒在选择下蚀斑纯化并且类似于 rFPV 进行纯度确定。

[0249] 共表达小鼠 IL-4C118 的重组 FPV-092 (HIV gagpol 和 env) 和 VV337 (HIV env) (参见参考文献 1) 使用上述方法类似地构建。

[0250] 产生的 IL-4C118 重组病毒的简要描述提供如下。如上文所述,每一重组病毒的构建描述于参考文献 1 中,并且每一重组病毒可商购自 CSIRO 生物试剂目录(参见:<http://asnet1-mi.act.csiro.au/index.aspx>)。

[0251] (i)FPV086 为在 PE/L(fpv 早期/晚期)的控制下表达 HIV-1 亚型 B gagpol(具有特异性突变)的重组鸡痘病毒,并且使用 pKG10a 插入于 FPV-M3 的 F6, 7, 9 基因座中;

[0252] (ii)VV336 为在 PE/L(fpv 早期/晚期)的控制下表达 HIV 亚型 A/E gagpol(具有特异性突变)的 TK 阴性重组牛痘病毒,并且使用 pJmcs 插入于 VV-WR-L929 的 TK 基因座中;

[0253] (iii)FPV092 为在 PE/L(fpv 早期/晚期)的控制下表达 HIV-1 亚型 AE gagpol(具有特异性突变)的重组鸡痘病毒,并且使用 pKG10a 插入于 FPV-090(AE env) 的 F6, 7, 9 基因座中;

[0254] (iv)VV337 为在 PE/L(fpv 早期/晚期)的控制下表达 HIV 亚型 A/E env(具有特异性突变)的 TK 阴性重组牛痘病毒,并且使用 pJmcs 插入于 VV-WR-L929 的 TK 基因座中。

[0255] - 猕猴 IL4C123 疫苗

[0256] 自然猕猴 IL-4cDNA 序列获自 GenBank 数据库(参见 GenBank/NCBI 参考序列: NM_001032904 下的条目 - SEQ ID NO:8-9)。设计合成 DNA 序列 (SEQ ID NO:4), 以使得终止密码子紧接着成熟分泌蛋白上的氨基酸 123 引入, 从重组突变蛋白删除羧基末端序列。通过类推小鼠和人 IL4 蛋白, 删除细胞信号传导所需的 124 位处的必需酪氨酸。

[0257] 将 DNA 序列如下修饰。将含有 BamHI 位点和 Kozak 序列的唯一上游序列包括在内以促进亚克隆并且分别确保蛋白质的有效翻译。还将 HindIII 位点包括在 3' 端处以促进克隆到表达载体中。合成 DNA 序列以通过 Genscript USA 公司排序。将合成 DNA 如上文所述在 pAF09 的 BamHI 与 HindIII 位点之间亚克隆, 并且使用编码 SIV gagpol 基因的 FPV089 分离重组鸡痘病毒。FPV089 为在 PE/L(fpv 早期/晚期)的控制下表达 SIV gagpol 的重组鸡痘病毒, 并且使用 pKG10a 插入于 FPV-M3 的 F6, 7, 9 基因座中。FPV089 的构建描述于参考文献 1 中, 并且 FPV089 可商购自 CSIRO 生物试剂目录(参见:<http://asnet1-mi.act.csiro.au/index.aspx>)。

[0258] 为了将猕猴 IL-4C123 和 SIV gag/pol 基因插入并且表达到修饰牛痘安卡拉病毒中, 基于 MVA “del-III” (图 1 - SEQ ID NO:10) 和牛痘 “HindIII-F 区” (图 2 - SEQ ID NO:11) 使用 GFP- 灭瘟素 S 脱氨基酶 (BSD) 融合基因作为可选择的标记基因(参见参考文献 8) 利用基因间插入位点(参见图 1 和 2) 发展一系列新载体。使用合成 SIV mac239gag/pol 序列, 将所述序列优化用于猕猴中的表达(图 3-SEQ ID NO:12)。序列含有在基因上游的合成痘病毒早期/晚期启动子和在下游侧接限制性核酸内切酶位点以促进克隆的早期转录终止子序列 (T5NT)。在重叠区中的翻译期间, 基因由于读框移位而表达为融合蛋白。

[0259] 可以设想并且预测, 相较于例如包括 SIVgagpol 基因而无产生的突变体 IL-4 序列的类似或相同的疫苗, 上文产生的猕猴 IL4C123 疫苗将诱导施用疫苗的猕猴中对抗 SIV 的

免疫应答提高。更确切地说,可以设想并且预测,疫苗将诱导抗原特异性 T 细胞亲合力提高和 / 或对抗 SIV gagp1 基因产物的抗原特异性 T 细胞应答的强度提高。

[0260] - 人 IL-4 突变序列的设计

[0261] 考虑到猕猴和人中 IL-4 基因与蛋白质之间的高水平的序列同源性,人 IL-4 序列也以残基 123 下的突变设计。

[0262] 人 IL-4mRNA 序列的非限制性实例提供在 GenBank/NCBI 参考序列 :NM_000589.2 中。SEQ ID NO:13 提供人 IL-4 的成熟分泌形式的 mRNA 和氨基酸序列。

[0263] SEQ ID NO:5 提供编码突变体 IL-4 蛋白 (IL-4C123) 的人 IL-4DNA 序列。人 IL-4C123 通过在密码子 148 位并入终止密码子 (TGA) 来设计,以使得蛋白质将在成熟分泌蛋白上的氨基酸 123 位之后终止,接着删除 24 氨基酸信号肽。成熟分泌蛋白上氨基酸一位对应于 mRNA 上密码子 25 位。这将导致产生缺乏细胞信号传导所需的 124 位上的必需酪氨酸的突变体 IL-4。可以设想并且预期,它的蛋白质将与 I 型和 II 型 IL-4R 结合而无信号传导,从而防止通过外源性 IL-4 和 IL-13 活化。

[0264] 上文序列已优化用于当用于疫苗方面时增强人细胞的表达 (SEQ ID NO:6)。密码子优化导致罕见 FseI 限制性位点的产生 (GGCCGGCC)。这个限制性位点在向鸡痘和 MVA 载体中的亚克隆过程期间使用,所以从提出的优化人 IL4C123 序列移除,而不改变氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。

[0265] 可设想并且预测,这些序列编码的人 IL-4 蛋白突变体将为能够与 IL-4 受体结合而不在任何显著程度上引发 IL-4 受体介导的细胞信号传导的 IL-4 受体拮抗剂。

[0266] 此外,可设想并且预测,相较于例如施用包括抗原 / 抗原编码而不包括人 IL-4 蛋白突变体的类似或相同疫苗的人,包括与抗原 / 抗原编码序列组合的任何一个或多个人 IL-4 蛋白序列的人疫苗将诱导施用疫苗的人中对抗抗原的免疫应答提高。更确切地说,可以设想并且预测,这种人疫苗将诱导抗原特异性 T 细胞亲合力提高和 / 或施用的人中抗原特异性 T 细胞应答的强度提高。

[0267] 实施例 2 :IL-4 拮抗剂疫苗接种诱导高亲合力 CD8⁺T 细胞

[0268] (i) 材料和方法

[0269] -小鼠的免疫接种: 无病原 6-7 周龄磁性 BALB/c (H-2^d) 小鼠获自约翰科廷医学研究学院 (JCSMR) 的动物育种机构。所有动物根据澳大利亚国立大学动物实验伦理准则进行保持并且使用。将小鼠如表 1 中所述在温和甲氧氟烷麻醉下间隔两个星期使用 i. n. / i. m. 联合粘膜全身疫苗接种途径用 1x 10⁷pfu rFPV 接着 1x 10⁷pfu rVV 进行初期-加强免疫接种,从而表达 HIV-1 抗原或 / 和 IL-4R 拮抗剂。为评估进行加强接种后 6 个星期的保护性免疫,将小鼠用 75 蚀斑形成单位 (PFU) 的流感病毒 PR8 (A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)) 进行鼻内攻毒,从而如 Ranasinghe 等 2011 (参见参考文献 2) 中所述表达神经氨酸酶茎中的 HIV 的 K^dGag₁₉₇₋₂₀₅表位。这使用反向遗传技术 (参见参考文献 3 和 4) 构建。攻毒之后检测体重 10 天。

[0270] 表 1. 本研究中所用的初次加强接种策略。

[0271]

| | | |
|--|----|----|
| | 初次 | 加强 |
|--|----|----|

| | | |
|---|--------------------------|-----------------------|
| 1 | i. n. FPV-HIV | i. m. VV-HIV |
| 2 | i. n. FPV-HIV IL-4C118 | i. m. VV-HIV |
| 3 | i. n. FPV-HIV | i. m. VV-HIV IL-4C118 |
| 4 | i. n. FPV-HIVIL-IL-4C118 | i. m. VV-HIV IL-4C118 |

[0272] 所有 rFPV 和 rVV 构建体编码 HIV-1 gag/pol 抗原。表 1 中所述的所有病毒使用 FPV-086 和 VV-336 构建,从而如参考文献 1 中所述表达 HIV gag/pol(mut) 蛋白。

[0273] i. n. = 鼻内, i. m. = 肌内。

[0274] 四聚体染色和解离测定: 将别藻蓝蛋白缀合的 K^dGag₁₉₇₋₂₀₅ 四聚体在约翰科廷医学研究学院的生物分子资源实验室 (Bio-Molecular Resource Facility) 合成。将 2-5x 10⁶ 脾细胞或粘膜淋巴细胞用抗 CD8a-FITC 抗体 (BD PharMigen, San Diego, CA) 和 APC 缀合的 K^dGag₁₉₇₋₂₀₅ 四聚体在室温下染色并且如先前所述分析 (参见参考文献 2 和 5)。

[0275] 类似地,在 K^dGag₁₉₇₋₂₀₅ 四聚体染色之后,如先前所述进行解离测定 (参见参考文献 2)。设置板以评估每个样品五个时间点 (0-60min)。将 50 μg/ml 抗 H-2K^d 竞争性结合抗体 (BD PharMigen, San Diego, USA) 添加到每一孔中以防止解离的四聚体重新结合,并且将板以 37°C, 5% CO₂ 孵育。在每一时间点,将细胞转移到冰冷 FACS 缓冲液中以停止反应,洗涤并且重悬浮于含有 0.5% 多聚甲醛的 100 μl FACS 缓冲液中。在 FACs Calibur 流式细胞仪 (Becton-Dickinson, San Diego, USA) 上获得 100,000 个事件,并且使用 Cell Quest Pro 软件分析。

[0276] IFN-γ 和 IL-2 ELISpot 测定: 将 IFN-γ 或 IL-2HIV 特异性 T 细胞应答如先前所述通过 IFN-γ 或 IL-2 捕获 ELISpot 测定进行测量 (参见参考文献 2 和 6)。简单地说,将 2x10⁵ 个脾细胞或 GN 细胞添加到涂布有 5 μg/ml 小鼠抗 IFN-γ 或 IL-2 捕获抗体 (BD PharMigen, San Diego, CA) 的 96 孔 Millipore PVDF 板 (Millipore, MA, Ireland), 并且在 H-2K^d 免疫优势的 CD8⁺T 细胞表位, Gag₁₉₇₋₂₀₅-AMQMLKETI (SEQ ID NO:14) (在 JCSMR 的生物分子资源实验室合成) 的存在下针对 IL-2 或 IFN-γ ELISpot 分别刺激 12h 或 22h。ConA 刺激的细胞 (Sigma, USA) 用作阳性对照,并且未刺激的细胞用作阴性对照。对于两个 ELISpot 测定,所有步骤准确地如先前所述进行 (参见参考文献 2 和 5)。绘制的数据表示为 SFU 每 10⁶ 个 T 细胞并且表示平均值 ± SD。在绘制数据之前从每一刺激的值扣除未刺激的细胞计数。在所有情况下,背景 SFU 计数是极低的。

[0277] 细胞内细胞因子分析 (ICS): 产生 HIV 特异性 CD8⁺T 细胞的 IFN-γ 和 INF-α 如 Ranasinghe 等中所述进行分析 (参见参考文献 2 和 5)。简单地说,2x 10⁶ 个淋巴细胞用 AMQMLKETI (SEQ ID NO:14) 肽以 37°C 刺激 16h,并且用 Brefeldin A (eBioscience, CA, USA) 进一步孵育 4h。将细胞用 CD8-APC (BD PharMigen, San Diego, CA) 表面染色,然后固定并且透化,之后用 IFN-γ -FITC 和 TNF-α -PE (BD PharMigen, San Diego, CA) 进行细胞内染色。每个样品总计 100,000 个设门事件使用 FACS Calibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Diego, CA) 收集,并且结果使用 Cell Quest Pro 软件分析。在绘制图形之前,将未刺激的背景值从数据中扣除。

[0278] -数据的统计学分析:计算 SD 或 SEM, 并且使用双尾两样品等变异或不等变异斯氏 T 检验测定 p 值。小于 0.05 的 p 值被认为是显著的。除非另外说明, 否则将实验重复最少三次。

[0279] (ii) 结果

[0280] -共表达 IL-4 可溶拮抗剂的 HIV-1 疫苗可诱导全身和粘膜 HIV 特异性 CD8⁺T 细胞的高亲合力和高强度:将 i. n. /i. m. 初期 - 加强免疫接种策略选择用于这些研究, 因为 HIV 是一种粘膜疾病, 并且持续的粘膜和全身免疫都是合乎需要的。数据表明, 用共表达 IL-4R 拮抗剂 (IL-4C118) (FPV-HIV-IL-4C118/VV-HIV-IL-4C118) 的 HIV 疫苗初期 - 加强诱导长久的高亲合力 K^dGag₁₉₇₋₂₀₅ 特异性 CTL (图 4)。接种有 FPVHIVgag/pol 和 VVHIVgag/ppol 的小 IL-4^{-/-} 鼠可在 14 天内产生高亲合力 CD8T 细胞, 但在 8 个星期内无法产生高亲合力记忆 CD8T 细胞。据推测, IL-4 因此在正常免疫功能的细胞环境中是必须的, 然而以 IL-4C118 的 IL-4R 短暂抑制能够诱导长久的高亲合力 CTL, 伴以更好的保护 (图 9)。数据还表面, 初期中包含 IL-4C118 在产生高亲合力 HIV 特异性 CD8T 细胞亚群方面是有利的 (图 4)。相反, 如果受体仅包括在加强免疫接种 (i. n. FPV-HIV/VV-HIV-IL-4C118) 中, 那么 T 细胞亲合力更类似于对照 i. n. FPV-HIV/i. m. VV-HIV 疫苗接种, 即使观察到 HIV 特异性 CD8T 细胞的强度提高 (图 5)。

[0281] i. n. FPV-HIV-IL-4C118/i. m. VV-HIV-IL-4C118 疫苗策略还诱导产生全身 (图 6) 和粘膜 (图 7) K^dGag₁₉₇₋₂₀₅ 特异性 CTL 的 IFN- γ 提高。更有趣的是, 产生增强的 IL-2 和 IFN- γ (图 7) 的生殖 - 直肠 (粘膜) CTL 为 HIV 疫苗的令人兴奋的前景, 因为用这种性质的疫苗有待 IL-2 可为一项困难的任務 (通常多功能、特异性 IL-2 产生被认为是保护性免疫的标志)。IL-4 拮抗剂疫苗策略能够不仅诱导 HIV 特异性效应 T 细胞免疫提高, 还诱导全身和粘膜区室中的记忆 CD8T 细胞 (图 9)。

[0282] -HIV-1 IL-4 拮抗剂疫苗策略可产生稳健的保护性免疫:在加强免疫接种之后 8 个星期, 将小鼠用表达 K^dGag₁₉₇₋₂₀₅ 免疫显性表位的 75pfu 流感病毒攻毒, 并且每天监测体重持续 10 天。保持体重并且未受到流感病毒感染的小鼠被认为是保护性免疫的量度 (参见参考文献 2)。接受对照 i. n. FPV-HIV/i. m. VV-HIV 免疫接种的攻毒后 IL-13^{-/-} 小鼠与接受相同疫苗的野生型 BALB/c 小鼠相比体重未显著损失 (图 8B)。有趣的是, 接受 i. n. FPV-HIV-IL-4C118/i. m. VV-HIV-IL-4C118 疫苗的小鼠表现得极类似于接受对照疫苗的 IL-13^{-/-} 小鼠或用可溶 IL-13 抑制剂疫苗 (i. n. FPV-HIV-IL-13R Δ 10/i. m. VV-HIV-IL-13R Δ 10) 测试的小鼠 (图 8A 和 8B)。从攻毒后五天, 相较于接受对照接种 p<0.05 的野生型 BALB/c 小鼠, 上文三个疫苗接种组的恢复率显著更高。上文保护性数据与给以 i. n. FPV-HIV/i. m. VV-HIV 疫苗的 IL-13^{-/-} 小鼠或接受 i. n. FPV-HIV-IL-13R Δ 10/i. m. VV-HIV-IL-13R Δ 10 的 BALB/c 小鼠的 CD8⁺T 脾细胞的解离速率良好地相关 (图 4), 并且还和观察到的效应子 / 记忆粘膜和全身免疫应答 (通过 IFN- γ 和 IL-2 产生测量) 良好地相关 (图 6、7 和 9)。未免疫接种的小鼠展示在第七天内高达 20-24% 的体重损失, 并且展示在攻毒后第十天的恢复体征 (图 8B)。在十天, IL-4 拮抗剂疫苗展示相较于对照疫苗接种策略显著更高的 IFN- γ 应答。数据清楚地表明, IL-4 拮抗剂疫苗策略可产生优异的保护性免疫。

[0283] -小鼠中引发和 / 或加强 IL-4 拮抗剂疫苗诱导的 T 细胞应答的强度和亲合力:进

行实验以测定 IL-4 拮抗剂施用对 CD8⁺T 细胞亲合力和强度在初次和 / 或加强疫苗阶段的影响。

[0284] T 细胞应答用四聚体染色测量。如图 5 中所示,以共表达 IL-4 拮抗剂 IL-4C118[(i) FPV-HIV-IL-4C118/(ii) VV-HIV; 或 (i) FPV-HIV-IL-4C118/(ii) VV-HIV-IL-4C118] 的 HIV 疫苗的加强诱导高亲合力 CTL。以共表达 IL-4 拮抗剂 IL-4C118[(i) FPV-HIV-IL-4C118/(ii) VV-HIV-IL-4C118] 的 HIV 疫苗的引发和加强高亲合力和高强度 CD8⁺T 细胞应答。但是,仅以加强剂量 [(i) FPV HIV/(ii) VV HIVIL-4C118] 递送 IL-4 拮抗剂仅诱导 CD8⁺T 细胞应答的高强度,但不诱导高亲合力。

[0285] 由小鼠中引发和加强 IL-4 拮抗剂疫苗诱导的全身 T 细胞应答:进行实验以测定通过以 IL-4 拮抗剂引发和加强诱导的全身 CD8⁺T 细胞免疫的水平。如图 6 中所示,细胞内细胞因子染色表明,以初期和进行加强接种递送的 IL-4 拮抗剂 (IL-4C118) (灰色条纹) 可增强全身 HIV 特异性 CD8⁺IFN γ ⁺T 细胞的感应。

[0286] 由小鼠中引发和加强 IL-4 拮抗剂疫苗诱导的粘膜 T 细胞应答:进行 ELISPOT 测定以测定通过以 IL-4 拮抗剂引发和加强诱导的粘膜 CD8⁺T 细胞免疫的水平。如图 7 中所示,ELISPOT 数据表明,以初期和进行加强接种递送的 IL-4 拮抗剂 (IL-4C118) 可增强可表达 IFN γ ⁺和白介素 2(IL-2) 的 HIV 特异性粘膜 CD8⁺T 细胞的感应。

[0287] 实施例 3:FPV HIV IL-4 拮抗剂疫苗的评估

[0288] (i) 材料和方法

[0289] 针对肺抗原呈递研究的小鼠的免疫接种:无病原 6-7 周龄磁性 BALB/c (H-2^d) 小鼠获自约翰科廷医学研究学院 (JCSMR) 的动物育种机构。所有动物根据澳大利亚国立大学 (ANU) 动物实验伦理准则进行保持并且使用。将小鼠 (n = 3-5) 在温和甲氧氟烷麻醉下鼻内免疫接种 1x 10⁷pfu 不同重组 FPV、VV 或 MVA HIV 疫苗构建体 (参考上文实施例 1 和 2)。紧接在递送之前,将病毒稀释于磷酸缓冲盐水 (PBS) 中,最终体积为 25 微升 / 小鼠,并且超声处理 20-30s 以获得均匀的病毒悬浮液。

[0290] 将 FPV 早期 / 晚期启动子和 HIV gagp1 使用引物和 PCR 从 FPV092 扩增。

[0291] FseIFPVe1 GGGCCGGCCATTTAGTATCCTAAAATTGAATTG

[0292] Sa1IKG10a CCTTTTAAACAACCATGGGTCGAC

[0293] 将产物与 GFP-BSD 盒一起连接到 MVA 载体中,选择用以构建图 2 中所述的 pMVA“F 位点”。重组 MVA-HIV gagp1 通过对鸡皮肤细胞的 Blasicidine 抗性选择,并且通过针对 gag 的 GFP 表达和 PCR 确认。

[0294] 肺细胞样品的制备:将肺样品首先切割成小片,并且在含有 2mg/mL 胶原酶 (Sigma, USA)、2.4mg/mL 分散酶 (GIBCO, USA) 和 5 个单位 / 毫升 DNase (Calbiochem, USA) 的 2mL 完全 RPMI 缓冲液中以 37°C 在轻微涡旋下消化 1h。然后将样品过滤穿过细胞过滤器,用完全 RPMI 冲洗,红细胞溶解并且过滤穿过无菌纱布以移除碎片,如先前所述 (参见参考文献 2、10 和 11)。将单细胞悬浮液然后保持在 4°C 持续最少 4-6h 用于恢复,之后进行测定,因为我们已观察到,消化科降低一些表面标记的调节表达。

[0295] 使用 FACS 评估抗原呈递细胞:将 BALB/c 和 IL-13KO 小鼠用对照 FPV-HIV 免疫,并且另一组 BALB/c 小鼠用不同疫苗免疫。疫苗接种后 24 小时,将小鼠实施安乐死并且收集肺,并且如上文所述制备单细胞悬浮液。从每一样品等分 4x 10⁶个细胞,并且首先将细胞

用 Fc 阻断抗体 (抗小鼠 CD16/CD32Fc Block, BD Biosciences, USA) 以 40°C 孵育 20min, 并且将细胞用荧光标记的抗 MHCII I-A^d、CD11c、CD11b、B220、CD8a、CD103 (Biolegend, USA 或 e-Biosciences, USA) 抗体以 40°C 表面染色 30min。固定细胞, 并且每个样品总计 500,000 个设门事件使用 Fortessa 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Diego, CA) 收集, 并且结构使用 Cell Quest Pro 软件分析。

[0296] 针对抗体研究的小鼠的免疫接种: 无病原 6-7 周龄磁性 BALB/c (H-2^d) 小鼠获自约翰科廷医学研究学院 (JCSMR) 的动物育种机构。所有动物根据澳大利亚国立大学 (ANU) 动物实验伦理准则进行保持并且使用。将小鼠 (n = 5) 在温和甲氧氟烷麻醉下间隔两个星期使用 i. n. /i. m. 联合粘膜全身疫苗接种途径用 1x 10⁷pfu rFPV 接着 1x 10⁷pfu rVV 初次 - 加强免疫接种, 从而表达 HIV-1 抗原或 / 和 IL-4 拮抗剂。紧接在递送之前, 将 rFPV 和 rVV 稀释于磷酸缓冲盐水 (PBS) 中, 并且超声处理 20-30s 以获得均匀的病毒悬浮液, 给定鼻内 rFPV 最终体积为 20-25 μl, 并且递送 i. m. rFPV 或 rVV, 每个四头肌 50 μl。

[0297] 血清收集: 将血清从免疫前小鼠收集, 并且还在加强免疫接种后 2-8 个星期收集。将血通过尾部静脉穿刺收集, 并且血清通过离心分离并且储存在 -20°C 直到测定。

[0298] HIV-1 p24Gag 特异性血清酶联免疫吸附测定 (ELISA): ELISA 用以测定 HIV-1 p24Gag 特异性 IgG1 和 IgG2a 血清抗体滴度。将 Falcon Microtest III 板 (Becton Dickinson, Oxnard, CA) 用 HIV-1 p24Gag (由 NIH AIDS 研究和参考试剂计划友好提供) 的硼酸盐缓冲液 (Pierce) 涂布, 以 4°C 过夜。将板用 0.05% Tween20 的 PBS (PBST) 洗涤 5 次, 并且将非特异性结合位点通过添加 5% 脱脂牛奶 /PBST, 以 200 微升 / 孔在 37°C 阻断 2 小时。将板然后如之前洗涤, 并且将稀释于 5% 脱脂牛奶 /PBST 的血清样品以 50 μl 的体积添加到每一孔中。将血清样品双重稀释从 1/50 至 1/400。将板以 37°C 孵育 1.5h 并且用 PBST 如所指出洗涤。将于 1% 牛血清白蛋白 /PBST (Sigma) (BSA/PBST) 中稀释至 1:500 的第二抗体, 生物素缀合的抗小鼠 IgG1 或抗小鼠 IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 以 50 μl 体积添加到相应孔中, 并且以 4°C 孵育过夜。将板用 PBST 洗涤 5 次, 并且将 1% BSA/PBST 于中稀释 1:1000 的 50 μl 辣根过氧化物酶缀合的抗生蛋白链菌素 (HRP-SA, Amersham Life Science) 添加到每一孔中。将板以 37°C 孵育 1.5h, 用 PBS 洗涤 5 次, 并且将抗体使用溶解于二甲亚砷 (Sigma) 中并且稀释于 TMB 柠檬酸盐 / 磷酸盐底物缓冲液 (Sigma) 中的 0.01mg/ml 四甲基联苯胺 (TMB) (Sigma) 底物检测。在 405nm 处以 15min 和 30min 读取每一孔中的光密度 (OD)。

[0299] (ii) 结果

[0300] 为评估鼻内 IL-4 拮抗剂初期如何在 i. n. 递送之后诱导高亲合力 CD8T 细胞, 评估肺粘膜中的 APC 亚群。将 BALB/c 和 IL-13^{-/-} 小鼠 (n = 3) 如上文所述用不同疫苗鼻内免疫接种。疫苗接种后 24 小时收集肺并且将细胞如上文所述染色。

[0301] 图 10 提供一系列点图, 其说明用于评估肺粘膜中 APC 亚群的抗原呈递细胞 (APC) 亚群设门策略。FACS 曲线示出对活细胞预设门, 接着基于正向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 双粘体辨别, 并且对 MHCII I-A^d 和 CD11c⁺ 种群设门的细胞, 顶部图块 (R5 门)。然后使用这个 MHCII I-A^dCD11c⁺ 门, 分析表达各种水平 CD11b、B220、CD103、CD8 的肺 APC 亚群。

[0302] 初免接种后 24 小时评估 CD103 缔合小鼠肺粘膜的抗原呈递细胞亚群。如图 11 中所示, 相较于接受对照疫苗的野生型 BALB/c 小鼠或 IL-13^{-/-} (敲除) 小鼠, 鼻

内 (i. n.) FPV-HIV-C118 递送诱导肺粘膜中 $IA^d+CD11c+CD11b+CD103-APC$ 亚群提高和 $IA^d+CD11c+CD11b-CD103+$ 种群减小。数据表明, $IA^d+CD11c+CD11b+CD103-$ 种群在诱导高亲和力 CTL 中起重要作用。一般来说, 相较于 rVV 或 rMVA 载体, i. n. FPV 初期诱导表达肺粘膜中提高的 CD11b 和较低 CD103 的 APC 亚群 (上部图块)。

[0303] 初免接种后 24 小时在肺粘膜中评估 B220 缔合抗原呈递细胞亚群 (图 12)。鼻内 FPV-HIV-C118 递送诱导肺粘膜中 $IA^d+CD11c+CD11b+B220-$ (参见中间行的最右图块中左上种群) 抗原呈递细胞亚群, 相较于给予 FPV-HIV 对照疫苗的野生型 BALB/c (左上方图块) 或 IL-13^{-/-} 小鼠 (中间行, 从左边第二个图块)。类似地, FPV-HIV-C118 递送诱导作为 $IA^d+CD11c+CD11b-CD8-$ 的提高的 APC 亚群。鼻内重组 FPV 载体诱导较低的 $IA^d+CD11c+CD11b-B220+$, 相较于 VV-HIV 或 MVA-HIV (参见中间行的最右图块中右下种群)。

[0304] 图 12 中顶部右边行 (a) 突出显示相较于 VV 或 MVA 引发的鼻内 FPV 引发的重要性。图 12 中的中间右边行 (b) 示出, 鼻内递送含 IL-4R 拮抗剂作为佐剂的 FPV-HIV 疫苗诱导肺粘膜中优异的 CD11⁺B220⁻ 树突细胞, 并且 FPV-HIV-C118 初期诱导最高 $IA^d+CD11c+CD11b+B200-$ 树突细胞百分比。图 12(c) 中底部右边行示出, 鼻内递送 VV 增强肺粘膜中 CD11b⁻B200⁺DC 亚群。这清楚地表明, 鼻内 FPV 引发有益于感应在初免接种而非加强接种期间诱导的高亲和力 CD8T 细胞。

[0305] 初免接种后 24 小时评估肺粘膜中 CD8 缔合抗原呈递细胞亚群 (图 13)。鼻内 FPV-HIV-C118 递送诱导较低百分比的树突细胞, 这些细胞为肺粘膜中的 $IA^d+CD11c+CD11b-CD8+$ (底部右边图块 - 行中右下种群表明 CD11b⁻CD8⁺ 细胞), 相较于给予对照疫苗的野生型 BALB/c (顶部左边图块) 或 IL-13^{-/-} 小鼠 (底部左边图块)。类似地, FPV-HIV-C118 递送诱导 APC 亚群, 所述 APC 亚群为 $IA^d+CD11c+CD11b+CD8-$ (底部右边图块 - 左上种群)。鼻内重组 FPV-HIV、VV-HIV 或 MVA-HIV 疫苗接种诱导类似百分比的 DC, 所述 DC 为 $IA^d+CD11c+CD11b-CD8+$, 表明所用载体不影响 DC 亚群。

[0306] 图 14 说明在 HIV IL-4R 拮抗剂辅助疫苗接种之后 (加强接种后 2 个星期) 血清 IgG1 对 p24Gag 的应答增强。预期这些应答随时间增大, 因为观察到最佳抗体应答为疫苗接种后 4-8 个星期。观察到的应答比给予对照疫苗的 IL-13 KO 小鼠或接受 IL-13Ra2 辅助疫苗的组大得多 (参考 11)。

[0307] (iii) 讨论

[0308] 这些结果和其它观察突出显示至少以下几点:

[0309] A. 当鼻内 (i. n.) 递送时, 新颖的 FPV HIV IL-4 拮抗剂疫苗可在疫苗接种后 12-24h 将唯一抗原呈递细胞 (APC) 募集到肺粘膜, 从而最可能引起高亲和力 CTL 的感应。数据表明, 在 FPV-HIV-IL-4 拮抗剂疫苗之后所诱导的 APC 亚群 $IA^d+CD11c+CD11b+CD103-B220-CD8-$ 在调节 T 细胞亲和力中起关键作用 (图 10-13)。这些疫苗表现得极类似于给予对照 FPV-HIV 疫苗的 IL-13^{-/-} 小鼠 (图 11-13)。目前 APC 数据清楚得表明, IL-4 和 IL-13 消耗的细胞环境可将唯一 APC 亚群趋化到肺粘膜中, 提高高亲和力 CD8T 细胞的感应;

[0310] B. 鼻内 rPFV 初期可相较于重组牛痘或修饰牛痘安卡拉 (MVA) 将不同 APC 亚群募集到肺粘膜, 从而表明引发载体也在调节亲和力中起重要作用 (图 1-3)。确切地说, 在 VV 和 MVA 之后诱导的 $IA^d+CD11c+CD11b-CD103+$ 种群似乎对亲和力具有负面涵义;

- [0311] C. rFPV 为极其安全的递送载体,并且它不穿过小鼠中的血脑屏障(数据未示出)。
- [0312] D. 鼻内 FPV HIV IL-4 拮抗剂 (C118) 初期 /i. m. VV HIV C118 加强疫苗免疫策略即使在加强免疫接种后 2 个星期还可诱导提高的 p24gag IgG1 抗体应答。这些应答将通常在加强免疫接种后再增强 4-8 个星期。
- [0313] 实施例 1、2 和 3 的参考文献
- [0314] 1. Coupar, B. E. H., et al. Fowlpox virus vaccines for HIV and SIV clinical and pre-clinical trials. *Vaccine* 24,1378-1388(2006).
- [0315] 2. Ranasinghe, C., et al. A comparative analysis of HIV-specific mucosal/systemic T cell immunity and avidity following rDNA/rFPV and poxvirus-poxvirus prime boost immunisations. *Vaccine* 29,3008-3020(2011).
- [0316] 3. Cukalac, T., et al. Narrowed TCR diversity for immunised mice challenged with recombinant influenza A-HIV Env(311-320) virus. *Vaccine*. 27,6755-6761 Epub 2009 Sep 6758(2009).
- [0317] 4. Sexton, A., et al. Evaluation of recombinant influenza virus-simian immunodeficiency virus vaccines in macaques. *J Virol*. 83,7619-7628 Epub 2009May 7613(2009).
- [0318] 5. Ranasinghe, C., et al. Evaluation of fowlpox-vaccinia virus prime-boost vaccine strategies for high-level mucosal and systemic immunity against HIV-1. *Vaccine* 24,5881-5895(2006).
- [0319] 6. Ranasinghe, C., et al. Mucosal HIV-1 pox virus prime-boost immunization Induces high-avidity CD8+T cells with regime-dependent cytokine/granzyme B profiles. *J Immunol*. 178,2370-2379(2007).
- [0320] 7. Heine, G & Boyle, D. Infectious bursal disease virus structural protein VP 2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Archives of Virology*. 131,277-292(1993).
- [0321] 8. Wong, YC., et al. Engineering recombinant poxviruses using a compact GFP-blasticidin resistance fusion gene for selection. *Journal of Virological Methods*. 171,295-298(2011).
- [0322] 9. Coupar B. E. H., et al. A general method for the construction of recombinant vaccinia viruses expressing multiple foreign genes. *Gene* 68 : 1-10(1988).
- [0323] 10. Xi Y, Day SL, Jackson RJ, Ranasinghe C. Role of novel type I interferon epsilon in viral infection and mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2012 May 23 ; 5(6) :610--22
- [0324] 11. Ranasinghe C, Trivedi S, Stambas J, Jackson RJ. Unique IL-13R α 2 based HIV-1 vaccine strategy to enhance mucosal immunity, CD8+T cell avidity and protective immunity. *Mucosal Immunol* 2013 ;13th Feb Advance online.

[0001]

序列表

SEQ ID NO: 1 - 小鼠 IL-4C118 cDNA 正向引物

GGATCCACCATGGGTCTCAACCCCCAGCTA

SEQ ID NO: 2 - 小鼠 IL-4C118 cDNA 反向引物

GAATTCTAATCCATTTGCATGATGCTC

SEQ ID NO: 3 - 小鼠 IL4C118 DNA 序列

1 gga tcc acc atg ggt ctc aac ccc cag cta gtt gtc atc ctg ctc ttc ttt
 ctc gaa tgt acc agg agc cat atc cac gga tgc gac
 Met Gly Leu Asn Pro Gln Leu Val Ile Leu Leu Phe Phe
 Leu Glu Cys Thr Arg Ser His Ile His Gly Cys Asp

88 aaa aat cac ttg aga gag atc atc ggc att ttg aac gag gtc aca gga gaa
 ggg acg cca tgc acg gag atg gat gtg cca aac gtc
 Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn Glu Val Thr Gly Glu
 Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn Val

175 ctc aca gca acg aag aac acc aca gag agt gag ctc gtc tgt agg gct tcc
 aag gtg ctt cgc ata ttt tat tta aaa cat ggg aaa
 Leu Thr Ala Thr Lys Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg Ala Ser
 Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu Lys His Gly Lys

262 act cca tgc ttg aag aag aac tct agt gtt ctc atg gag ctg cag aga ctc
 ttt cgg gct ttt cga tgc ctg gat tca tgg ata agc
 Thr Pro Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu
 Phe Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser

349 tgc acc atg aat gag tc c aag tcc aca tca ctg aaa gac ttc ctg gaa
 agc cta aag agc atc atg caa atg gat tag aat tc
 Cys Thr Met Asn Glu Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser
 Leu Lys Ser Ile Met Gln Met Asp ---

SEQ ID NO: 4 - 猕猴 IL4C123 DNA 序列

1 gga tcc gcc acc atg ggt ctc acc tcc caa ctg ctt ccc cct ctg ttc ttc
 ctg cta gca tgt gcc ggc aac ttt gcc cac gga cac
 Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe
 Leu Leu Ala Cys Ala Gly Asn Phe Ala His Gly His

88 aac tgc cat atc gcc tta ogg gag atc atc gaa act ctg aac agc ctc aca
 gag cag aag act ctg tgc acc aag ttg acc ata acg
 Asn Cys His Ile Ala Leu Arg Glu Ile Ile Glu Thr Leu Asn Ser Leu Thr
 Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Lys Leu Thr Ile Thr

175 gac atc ctt gct gcc tcc aag aac aca act gag aag gaa acc ttc tgc agg
 gct gcg act gtg ctc cgg cag ttc tac agc cac cat
 Asp Ile Leu Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
 Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His

262 gag aag gac act cgc tgc ctg ggt gcg act gca cag cag ttt cac agg cac
 aag cag ctg atc cga ttc ctg aaa cgg ctc gac agg
 Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His
 Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg

[0002]

349 aac ctc tgg ggc ctg gcg ggc ttg aac tcc tgt cct gtg aag gaa gcc agc
 cag agt acg ttg gaa gac ttc ttg gaa agg cta aag
 Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Ser
 Gln Ser Thr Leu Glu Asp Phe Leu Glu Arg Leu Lys

436 acg atc atg aaa gag aaa tga agc tt
 Thr Ile Met Lys Glu Lys ---
 SEQ ID NO: 5 - 人 IL4C123

1 ATGGGTCTCA CCTCCCAACT GCTTCCCCCT CTGTTCTTCC TGCTAGCATG TGCCGGCAAC
 61 TTTGTCCACG GACACAAGTG CGATATCACC TTACAGGAGA TCATCAAAAC TTTGAACAGC
 121 CTCACAGAGC AGAAGACTCT GTGCACCGAG TTGACCGTAA CAGACATCTT TGCTGCCTCC
 181 AAGAACACAA CTGAGAAGGA AACCTTCTGC AGGGCTGCGA CTGTGCTCCG GCAGTTCTAC
 241 AGCCACCATG AGAAGGACAC TCGCTGCCTG GGTGCGACTG CACAGCAGTT CCACAGGCAC
 301 AAGCAGCTGA TCCGATTCTT GAAACGGCTC GACAGGAACC TCTGGGGCCT GGCCGGGCTG
 361 AATTCCTGTC CTGTGAAGGA AGCCAACCAG AGTACGTTGG AAAACTTCTT GGAAAGGCTA
 421 AAGACGATCA TGAGAGAGAA ATGA

SEQ ID NO: 6 - 人 IL4C123 (优化的)

1 ATGGGCCTGA CCAGCCAGCT GCTGCCCCCT CTGTTCTTCC TGCTGGCCTG CGCCGGCAAC
 61 TTCGTGCACG GCCACAAGTG CGACATCACC CTGCAGGAGA TCATCAAGAC CCTGAACAGC
 121 CTGACCGAGC AGAAGACCCT GTGCACCGAG CTGACCGTGA CCGACATCTT CGCCGCCAGC
 181 AAGAACACCA CCGAGAAGGA GACCTTCTGC AGAGCCGCCA CCGTGCTGAG ACAGTTCTAC
 241 AGCCACCACG AGAAGGACAC CAGATGCCTG GGCGCCACCG CCCAGCAGTT CCACAGACAC
 301 AAGCAGCTGA TCAGATTCTT GAAGAGACTG GACAGAAACC TGTGGGGCCT GGCCGGCCTG
 361 AACAGCTGCC CCGTGAAGGA GGCCAACCAG AGCACCTGG AGAACTTCTT GGAGAGACTG
 421 AAGACCATCA TGAGAGAGAA GTGA

SEQ ID NO: 7 - 人 IL4C123 (优化的无 FseI 位点)

1 ATGGGCCTGA CCAGCCAGCT GCTGCCCCCT CTGTTCTTCC TGCTGGCCTG CGCCGGCAAC
 61 TTCGTGCACG GCCACAAGTG CGACATCACC CTGCAGGAGA TCATCAAGAC CCTGAACAGC
 121 CTGACCGAGC AGAAGACCCT GTGCACCGAG CTGACCGTGA CCGACATCTT CGCCGCCAGC
 181 AAGAACACCA CCGAGAAGGA GACCTTCTGC AGAGCCGCCA CCGTGCTGAG ACAGTTCTAC
 241 AGCCACCACG AGAAGGACAC CAGATGCCTG GGCGCCACCG CCCAGCAGTT CCACAGACAC
 301 AAGCAGCTGA TCAGATTCTT GAAGAGACTG GACAGAAACC TGTGGGGCCT AGCTGGTTTA
 361 AACAGCTGCC CCGTGAAGGA GGCCAACCAG AGCACCTGG AGAACTTCTT GGAGAGACTG
 421 AAGACCATCA TGAGAGAGAA GTGA

SEQ ID NO: 8 - 猕猴白介素 4 (IL4), mRNA

1 atgggtctca cctcccaact gcttccccct ctgttcttcc tgetagcatg tgcgggcaac
 61 tttgcccacg gacacaactg ccatatcgcc ttacgggaga tcatcgaaac tctgaacagc
 121 ctcacagagc agaagactct gtgcaccaag ttgaccataa cggacatcct tctgctctcc
 181 aagaacacaa ctgagaagga aaccttctgc agggctgcca ctgtgctccg gcagttctac
 241 agccaccatg agaaggacac tcgctgcctg ggtgcgactg cacagcagtt tcacaggcac
 301 aagcagctga tccgattcct gaaacggctc gacaggaacc tctggggcct ggcgggcttg
 361 aactcctgtc ctgtgaagga agccagccag agtacgttg aagacttctt ggaaaggcta
 421 aagacgatca tgaaagagaa atattcaag tgtcggagct ga

SEQ ID NO: 9 - 猕猴白介素 4 (IL4), 肽

MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFAHGHNCHIALREIIETLNSLSEQKTLCTKLITDILAASKNTTEKETFCRA
 ATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEASQSTLEDFLERLKTIM
 KEKYSKCRS

SEQ ID NO: 10 - MVA del-III 合成载体序列

[0003]

```

gcgggcgcgg cgcgccacct aaagatgcca ttctgtttat tatatccata ggaaaggata 60
gagatgtttg tgaactatta atctcatctg ataaagcgtg tgcgtgtata gagttaaatt 120
catataaagt agccattctt cccatggatg ttctcttttt taccaaaagga aatgcatcat 180
tgattattct cctgtttgat ttctctatcg atgcggcacc tctcttaaga agtftaaccg 240
ataataatgt tattatatct agacaccagc gtctacatga cgagcttccg agttccaatt 300
ggttcaagtt ttacataaagt ataaagtcgg actattgttc tatattatat atggttgttg 360
atggatctgt gatgcatgca atagetgata atagaactta cgcaaatatt agcaaaaaa 420
tattagacaa tactacaatt aacgatgagt gtatagctgt ttattttgaa ccacagatta 480
ggattcttga tagagatgag atgctcaatg gatcatcgtg tgatatgaac agacattgta 540
ttatgatgaa ttacactgat gtaggcgaat ttggatctag tatgttgggg aaatatgaac 600
ctgacatgat taagattgct ctttcgggtg ctggtatttg gaaagtttta taggccggcc 660
gogatcgcat ttagtacctt aaaattgaaat tgtaattatc gataataaat ggacggatcc 720
cgggtogact gcagaagctt tagttgatag aacaaaatac ataattttgt aaaaataaat 780
cactttttat actaatatga cagcattacc aatacttttg ttactaatat cattagtata 840
cgctacacct ttctctcaga catctaaaaa aataggtgat gatgcaactt tatcatgtaa 900
tcgaaataat acaaatgact acgttgttat gagtgcctgg tataaggagc ccaattccat 960
tattctttta gctgctaaaa gcgacgtctt gtattttgat aattatacca aggataaaat 1020
atcttaegac tctccatcag atgatctagt tacaactatc acaattaaat cattgactgc 1080
tagagatgcc ggtacttatg tatgtgcatt ctttatgaca tcgcctacaa atgacactga 1140
taaagtagat tatgaagaat actccacaga gttgattgta aatacagata gtgaatcgac 1200
tatagacata atactatctg gatctacaca ttcaccggaa actagttctg agaaacctga 1260
ttatatagat aattctaatt gctcgtcggg attcgaaatc gcggccgc 1308

```

SEQ ID NO: 11 - MVA "HindIII F" 插入位点

```

gcgggcgcgg cgcgcccggg atccaagcta gaaaagaact gtaatgcgta tgcggagggt 60
aataatatta tagatataca gaaattggat atcggagaat gttcggctcc gcccggtcaa 120
catatgcttt tacagatagt taatacagga tccgcggaag caaattgtgg tttacagaca 180
attgttaagt ccttaataaa aatatacgtt ccacctatta tcgaaaaccg attgccgtat 240
tacgatccgt ggtttctagt ggggtgtagca attattctag ttatttttac tftagctatt 300
tgttctatta gacgaaatct ggctcttaa tacagatcag gaacgttttt atacgtttaa 360
ttaataaaaa aatttaatta caaggtataa aatagtaact catctacgca atcgcgataa 420
tggagggatc taaacgcaga cagcagctc ggcgactaca acaagaacag gagcagctc 480
gtccacgtac accgccatca tatgaagaaa ttgcaaaaata tggacactca tttaacgtga 540
aaagatttac gaatgaagaa atgtgtctta agaatgatta tccacgaatt atatcatata 600
atcctccacc aaaatagttt tttttggcgg gccgcgatcg caagcttagt atatatatat 660
catcatttca tgatgtatac tactgacata gtttcaatgt gaacttttca ctttcttccc 720
ggttatgaag aatattttta ttttaatggt cactactaat cgtatattat aattgaaaat 780
ggattagttt aatatacgc tcgtcatggg atcctgctgt ggtagattct gtgacgctaa 840
gaataagaat aagaaggaag atgtagaaga gggaagagaa ggatgttaca attataagaa 900
ccttaatgat ctggatgaat ccgaagcacg tgtagaattt ggaccattat atatgataaa 960
tgaagaaaaa tcagacataa atacattgga tataaaaaga agatatagac acacgataga 1020
gtctgtatat ttctaaaagt ttttataaaa aatgagtaaa atactcacgt ttgttaaaaa 1080
taagataatt gacttgatta ataatgacca aattaaatat tctagagtta taatgataga 1140
agagtccgat agtcttttac cggttgatga ggtgcatgct aaccacggat ttgactgtgt 1200
ggagatgata gatgaaaaa taagcaatga gaatatcgaa cagtataagc ggccgc 1256

```

SEQ ID NO: 12 - 合成的 SIV mac239 gag/pol 序列, 被优化以用于在猕猴中表达

```

1 GAATTCGGCC GGCCATTTAG TATCCTAAAA TTGAATTGTA ATTATCGATA ATAAATGGGC
61 GTGAGGAACT CCGTGCTGTC CGGCAAGAAG GCCGACGAGC TGGAGAAGAT CAGGCTGAGG
121 CCCAACGGCA AGAAGAAGTA CATGCTGAAG CACGTGGTGT GGGCCGCCAA CGAGCTGGAC
181 AGGTTCCGGC TGGCCGAGTC CCTGCTGGAG AACAAAGGAGG GCTGCCAGAA GATCCTGTCC
241 GTGCTGGCCC CCCTGGTGCC CACCGCTCC GAGAACCTGA AGTCCCTGTA CAACCCGTG
301 TCGGTGATCT GGTGCATCCA CGCCGAGGAG AAGGTGAAGC ACACCGAGGA GGCCAAGCAG

```

[0004]

361 ATCGTGCAGA GGCACCTGGT GGTGGAGACC GGCACCACCG AGACCATGCC CAAGACCTCC
 421 AGGCCACCG CCCCCTCCTC CGGCAGGGGC GGCAACTACC CCGTGCAGCA GATCGGCGGC
 481 AACTACGTGC ACCTGCCCT GTCCCCAGG ACCCTGAACG CCTGGGTGAA GCTGATCGAG
 541 GAGAAGAAGT TCGGCGCCGA GGTGGTGCC GGCTTCCAGG CCCTGTCCGA GGGCTGCACC
 601 CCCTACGACA TCAACCAGAT GCTGAATGC GTGGGCGACC ACCAGGCCCG CATGCAGATC
 661 ATCAGGGACA TCATCAACGA GGAGGCCGCG GACTGGGACC TCCAGCACCC CCAGCCC GCC
 721 CCCCAGCAGG GCCAGCTGAG GGAGCCCTCC GGCTCCGACA TCGCCGGCAC CACCTCCTCC
 781 GTGGACGAGC AGATCCAGTG GATGTACAGG CAGCAGAACC CCATCCCCGT GGGCAACATC
 841 TACAGGAGGT GGATTCAGCT GGGCCTGCAA AAGTGGGTGA GGATGTACAA CCCCACCAAC
 901 ATCCTGGACG TGAAGCAGGG CCCCAGGAG CCCTTCCAGT CCTACGTGGA CAGGTTCTAC
 961 AAGTCCCTGA GGGCCGAGCA GACCGACGCC GCCGTGAAGA ACTGGATGAC CCAGACCCTG
 1021 CTGATCCAGA ACGCCAACCC GACTGCAAG CTGGTGTCTGA AGGGCCTGGG CGTGAACCCC
 1081 ACCCTGGAGG AGATGCTGAC CGCTGCCAG GGGGTGGGCG GCCCCGGCCA GAAGGCCAGG
 1141 CTGATGGCGG AGGCCCTGAA GGAGGCCCTG GCCCCGTGC CCATCCCCTT CAGCCCGCC
 1201 CAGCAGAGGG GCCCAGGAA GCCCATCAAG TGCTGGAACT GCGGCAAGGA GGGCCACTCC
 1261 GCCAGGCAAT GCAGAGCCCC AAGAAGACAG GGATGCTGGA AATGTGGAAA AATGGACCAT
 1321 GTTATGGCCA AATGCCAGA CAGACAGGCG GGTTTTTTAG GCCTTGGTCC ATGGGGAAAG
 1381 AAGCCCCGCA ATTTCCCCTT GGCTCAAGTG CATCAGGGGC TGATGCCAAC TGCTCCCCCA
 1441 GAGGACCCAG CTGTGGATCT GCTAAGAAG TACATGCAGT TGGGCAAGCA GCAGAGAGAA
 1501 AAGCAGAGAG AAAGCAGAGA GAAGCCTTAC AAGGAGGTGA CAGAGGATT GCTGCACCTC
 1561 AATTCTCTCT TTGGAGGAGA CCAGTAGTGA CCGCCACAT CGAGGGCCAG CCCGTGGAGG
 1621 TGCTCTGGA CACCGGCCG GACGACTCCA TCGTGACCCG CATCGAGCTG GCCCCCCACT
 1681 ACACCCCCAA GATCGTGGGC GGCATCGGCG GCTTCATCAA CACCAAGSAG TACAAGAACG
 1741 TGGAGATCGA GGTGCTGGGC AAGAGGATCA AGGGCACCAT CATGACCGGC GACACCCCCA
 1801 TCAACATCTT CGGCAGGAAC CTGCTGACCG CCCTGGGCAT GTCCCTGAAC TTCCCCTCG
 1861 CCAAGGTGGA GCCCGTGAAG GTGGCCCTGA AGCCCGGCAA GGACGGCCCC AAGCTGAAGC
 1921 AGTGGCCCCT GTCCAAGGAG AAGATCGTGG CCCTGAGGGA GATCTGCGAG AAGATGGAGA
 1981 AGGACGGCCA GCTGGAGGAG GCCCCCCCA CCAACCCCTA CAACACCCCC ACCTTCGCCA
 2041 TCAAGAAGAA GGACAAGAAC AAGTGGAGGA TGCTGATCGA CTTCAGGGAG CTGACAGGG
 2101 TGACCCAGGA CTTACCCGAG GTGCAGTGG GCATCCCCCA CCCCCTGGC CTGGCCAAGA
 2161 GGAAGAGGAT CACCGTGTG GACATCGGCG ACGCCTACTT CTCCATCCCC CTGGACGAGG
 2221 AGTTCAGGCA GTACACCGCC TTCACCCTGC CCTCCGTGAA CAACGCCGAG CCCGCAAGA
 2281 GGTACATCTA CAAGGTGCTG CCCCAGGGCT GGAAGGGCTC CCCCGCCATC TTCCAGTACA
 2341 CCATGAGGCA CGTGCTGGAG CCCTTCAGGA AGGCCAACCC CGACGTGACC CTGGTGCAGT
 2401 ACATGGACGA CATCCTGATC GCCTCCGACA GGACCGACCT GGAGCAGCAG AGGGTGGTGC
 2461 TCCAGTCCAA GGAGCTGCTG AACTCCATCG GCTTCTCCAC CCCCAGGAG AAGTTCAGA
 2521 AGGACCCCCC CTTCCAGTGG ATGGGCTACG AGCTGTGGCC CACCAAGTGG AAGCTGCAA
 2581 AGATCGAGCT GCCCAGAGG GAGACCTGGA CCGTGAACGA CATCCAGAAG CTGGTGGCG
 2641 TGCTGAACTG GGCCGCCCTG ATCTACCCTG GCATCAAGAC CAAGCACCTG TCGAGGCTGA
 2701 TCAGGGGCAA GATGACCCTG ACCGAGGAGG TGCAGTGGAC CGAGATGGCC GAGGCCGAGT
 2761 ACGAGGAGAA CAAGATCATC CTGTCCCAGG AGCAGGAGGG CTGCTACTAC CAGGAGGGCA
 2821 AGCCCTGGA GGCCACCGTG ATCAAGTCCC AGGACAACCA GTGGTCTTAC AAGATCCACC
 2881 AGGAGGACAA GATCCTGAAG GTGGGCAAGT TCGCCAAGAT CAAGAACACC CACACCAACG
 2941 GCGTGAGGCT GCTGGCCAC GTGATCCAGA AGATCGGCAA GGAGGCCATC GTGATCTGGG
 3001 GCCAGGTGCC CAAGTTCAC CTGCCCCGTT AGAAGGACGT GTGGGAGCAG TGGTGGACCG
 3061 ACTACTGGCA GGTGACCTGG ATTCCCAGT GGGACTTCAT CTCCACCCCC CCCCTGGTGA
 3121 GGCTGGTGT CAACCTGGTG AAGACCCCA TCGAGGGCGA GGAGACCTAC TACACCGACG
 3181 GCTCCTGCAA CAAGCAGTCC AAGGAGGGCA AGGCCGGCTA CATCACCGAC AGGGGCAAGG
 3241 ACAAGGTGAA GGTGCTGGAG CAGACCACCA ACCAGCAGGC CGAGCTGGAG GCCTTCCTGA
 3301 TGGCCCTGAC CGACTCCGCG CCAAGGCCA ACATCATCGT GGACTCCCAG TACGTGATGG
 3361 GCATCATCAC CGGCTGCCCC ACCGAGTCCG AGTCCAGGCT GGTGAACCAG ATCATCGAGG
 3421 AGATGATCAA GAAGTCCGAG ATCTACGTGG CCTGGGTGCC CGCCACAAG GGCATCGGCG
 3481 GCAACCAGGA GATCCACCAC CTGGTGTCCC AGGGCATCAG GCAGGTGCTG TTCTGGAGA
 3541 AGATCGAGCC CGCCAGGAG GAGCAGCACA AGTACCCTC CAACGTGAAG GAGCTGGTGT
 3601 TCAAGTTCGG CCTGCCAGG ATCGTGCCA GGCAGATCGT GGACACCTG GACAAGTGCC
 3661 ACCAGAAGGG CGAGGCCATC CACGGCCAGG CCAACTCCGA CCTGGCCACC TGGCAGATGG
 3721 ACTGCACCCA CCTGGAGGGC AAGATCATCA TCGTGGCCGT GCACGTGGCC TCCGGCTTCA
 3781 TCGAGGCCGA GGTGATCCCC CAGGAGACCG GCAGGCAGAC CGCCCTGTTC CTGCTGAAGC
 3841 TGGCCGGCAG GTGGCCATC ACCACCTGC ACACCGACAA CGGCGCAAAC TTCGCTCCC
 3901 AGGAGGTGAA GATGGTGGCC TGGTGGGCG GCATCGAGCA CACCTTCGGC GTGCCCTACA
 3961 ACCCCAGTC CCAGGGCGTG GTGGAGGCCA TGAACCACCA CCTGAAGAAC CAGATCGACA

[0005]

4021 GGATCAGGGA GCAGGCCAAC TCCGTGGAGA CCATCGTGCT GATGGCCGTG CACTGCATGA
 4081 ACTTCAAGAG GAGGGGCGGC ATCGGCGACA TGACCCCGGC CGAGAGGCTG ATCAACATGA
 4141 TCACCACCGA GCAGGAGATC CAGTTCCAGC AGTCCAAGAA CTCCAAGTTC AAGAACTTCA
 4201 GGGTGTACTA CAGGGAGGGC AGGGACCAGC TGTGGAAGGG CCCCAGGCGAG CTGCTGTGGA
 4261 AGGGCGAGGG CGCCGTGATC CTGAAGGTGG GCACCGACAT CAAGGTGGTG CCCAGGAGGA
 4321 AGGCCAAGAT CATCAAGGAC TACGGCGGCG GCAAGGAGGT GGACTCCTCC TCCCACATGG
 4381 AGGACACCGG CGAGGCCAGG GAGGTGGCCT AGTTTTTTTT GCGATCGCAA GCTT

SEQ ID NO: 13 - 自然人 IL-4

1 ATG GGT CTC ACC TCC CAA CTG CTT CCC CCT CTG TTC TTC CTG CTA GCA TGT
 Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala Cys
 52 GCC GGC AAC TTT GTC CAC GGA CAC AAG TGC GAT ATC ACC TTA CAG GAG ATC
 Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile
 103 ATC AAA ACT TTG AAC AGC CTC ACA GAG CAG AAG ACT CTG TGC ACC GAG TTG
 Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu
 154 ACC GTA ACA GAC ATC TTT GCT GCC TCC AAG AAC ACA ACT GAG AAG GAA ACC
 Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr
 205 TTC TGC AGG GCT GCG ACT GTG CTC CGG CAG TTC TAC AGC CAC CAT GAG AAG
 Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr His Glu Lys Asp Thr
 256 GAC ACT CGC TGC CTG GGT GCG ACT GCA CAG CAG TTC CAC AGG CAC AAG CAG
 Arg Ser His Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln
 307 CTG ATC CGA TTC CTG AAA CGG CTC GAC AGG AAC CTC TGG GGC CTG GCG GGC
 Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
 358 TTG AAT TCC TGT CCT GTG AAG GAA GCC AAC CAG AGT ACG TTG GAA AAC TTC
 Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
 409 TTG GAA AGG CTA AAG ACG ATC ATG AGA GAG AAA TAT TCA AAG TGT TCG AGC
 Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
 460 TGA

SEQ ID NO: 14 - H-2K^d 免疫显性 CD8⁺ T 细胞表位 , Gag197-205

AMQMLKETI

```

EshII
-----
SacII
-----
MspAI
-----
NotI   AscI
-----
1  GCGGCCGGG CCGGCCACT AAGATGCCA TTCCTGTAT TATATCCATA GGNAGGNTA GAGATGTTG TGAACIATA ATCTATCTG ATNAGCGTG
>.....MVA164.....>
-----
FokI
-----
BstCI
-----
XcmI
-----
TsoI   NcoI
-----
101 TCGGTGATA GAGTAAAT CATATAAGT AGCAATCTT CCGATGGAG TTCCCTTTT TACCAAGGA AATGCATCAT TGATATTCI CCGTTTGT
>.....MVA164.....>
-----
SmlI   DrdI
-----
BamI   XbaI   HgaI   MniI
-----
201 TTCTCATCG ATGGGACC TCTCTTAGA AGTGTACCG ATAAATATG TATATAICT AGACCCAGC GCTACATGA CGAGTCCG AGTCCRAIT
>.....MVA164.....>
-----
MneI   BccI   NspI   SphI
-----
301 GGTCAAGT TTACATAGT ATAAGTCCG ACTATTGTC TATATTAT ATGTTGTTG ATGATCTGT GATCATGCA ATAGCTGATA ATAGAACTTA
>.....MVA164.....>

```

图 1

```

SspI
-----
401  CGCAATATT ACCAAAATA TATTAGACAA TACTACAAIT AACTGATGAGT GTAGATGCTG TTAATTTGAA CCACAGATTA GGATTTCTGA TAGAGATGAG
>.....MVA164.....>

EcoNI
-----
BspI
-----
501  ATGCTCAATG GATCATCGTG TGATATGNAC AGACATTGTA TTATGATGAA TTTACCTGAT GTAGGCGAAT TTGGATCTAG TAATGTTGGG AAATATGAAAC
>.....MVA164.....>

NgoMIV
-----
NaeI
-----
PvuI
-----
FseI
-----
AclSI
-----
BclVI
-----
601  CTGCATGAT TAGATTGCT CTTTCGGTGG CTGGTATTTG GAAAGTTTAA TAGCCCGGCC GCGATCGCAT TTAGTATCCT AAATTTGAAAT TGTATTTATC
>.....MVA164.....>

Sall
-----
XmaI
-----
SmaI
-----
BamHI
-----
HincII
-----
TspGI
-----
AvaI
-----
PstI
-----
HindIII
-----
701  GATMATAAT GGACGGATCC CGGTCCGACT GCAGAGCTT TAGTTGATAG AACAAATAC ATAAATTTGT AAAAATAAAT CACTTTTTAT ACTATATATGA
>>>>

```

图1(续)

```

Bst1107I
-----
801 CACGATTACC AATACCTTTG TTACTAATAT CATTAGTATA CGCTACACCT TTTCCTCAGA CACTAATAAA AATAGTGAT GATGCAACTT TATCATGTAA
>.....MVA165.....^

ZraI
-----
Bsp1286I
-----
TseI
-----
BsaHI
-----
BanII
-----
BbvI
-----
AatII
-----

901 TCGAATAAT ACAATGACT ACGTTGTTAT GAGTGCTTGG TATAGGAGC CCAATTCCAT TATTCITTTA GCTGCTAATA GCGAGTCTT GTATTITGAT
>.....MVA165.....^

PleI
-----
MlyI
-----
RsaI
-----
CviQI
-----

1001 AANTATACCA AGGATAAAT ATCTTACGAC TCTCCATACG ATGATCTAGT TACAACATATC ACAATTAAAT CATTGACTGC TAGAGATGCC GGTACTTTATG
>.....MVA165.....^

BsmI
-----
BtgZI
-----
TspRI
-----

1101 TATGTGCATT CTTTATGACA TCGCCTACAA ATGACACTGA TAAAGTAGAT TATGAAGANT ACTCCACAGA GTTGATTGTA AATACAGATA GTGAATCGAC
>.....MVA165.....^

BsaWI
-----
SpeI
-----
BstBI
-----

1201 TATAGACATA ATACTATCTG GATCTACACA TTCACCGGAA ACTAGTCTCG AGAACCCTGA TTATATAGAT AATTCATAT GCTCGTGGT ATTCGAATC
>.....MVA165.....^

NotI
-----

1301 GCGGCCGC

```

图1(续)

```

BssHII
-----
NotI   AscI   BclVI
-----
1  GCGGCCGCGG CGGCCCGGAT ATCCAAGCTA GAAAGACT GTATGCGGTA TCGCGAGGTT AATAATATTA TAGATATACA GAAATGGAT ATCGGAGAAAT
>>.....F9L.....>

EcoRV
-----

EcoRI   HincII
-----
101 GTTCGGCTCC GCGCGGTCRA CATATGCTTT TACAGATAGT TAATACAGGA TCCGGGGAG CAATTCGCG TTTACAGACA ATTGTTAAGT CCTTAATAAA
>>.....F9L.....>

BceAI   TaqII   SfiI
-----
201 AATATACGTT CCACCTATTA TCGAAACCG ATTGCGGTAT TAGGATCGGT GGTTCCTAGT GGGTGTAGCA ATTATTCAG TTAGTTTAC TGTAGCTATT
>>.....F9L.....>

TatI
-----
ScaI
-----

AclI   PacI
-----
301 TGTTCATTA GACGAAATCT GGCTTTAAA TACAGATAGG GAACGTTTT ATACGTTTAA TTAATAAAA AATTTAATA CAAGGTATAA AATAGTATCA
>>.....F9L.....>

NruI   DrdI   TseI
-----
401 CATCTACGCA ATCGGATTA TGGAGGATC TAAAGCAGA CACGACAGTC GGGACTACA ACAAGACAG GAGCGGCTC GTCCACGTAC ACCGCCATCA
>>.....F8L.....>

SmlI
-----
AflII
-----

```

图 2

```

-----
501 TATGAGAAA TTGCAAAATA TGGACACTCA TTTAACGIGA AAGATTAC GAATGAGAA ATGTGCTTGA AGAATGATTA TCCACGATTT ATATCATATA
>.....F8L.....>
-----
                    NgcMIV
-----
                    NaeI      PvuI      Bst1107I
-----
                    FseI      AseI  HindIII  BspHI  AccI
-----
601 ATCCTCCACC AANATAGTTT TTTTGGCCG GCGCGATCG CAAGCTTAST ATATATATAT CATCAATTCA TCATGATATAC TACTGACATA GTTCAATGT
>.....F8L.....>
-----
                    PshAI
-----
701 GAACATTTCA CTTTCTTGCC GGTATGAG AGATATTTTA TTTTAAAGGT CATTACTAAT CGTATATTAT AATTGAAAT GGATTAGTTT AATAGACGC
>>F7L.>
-----
                    Tsp45I
-----
801 TCGTCATGG ATCCGTGCT GTGACGCTAA GAATAGAAAT AAGAGGAG ATGTAGAGA GGGAGACAA GGATGTTACA ATTATAGAA
>.....F7L.....>
-----
                    Ssp96I
-----
                    AflIII  BmgT120I
-----
                    PmlI    AvaII
-----
901 CCTTAATGAT CTGGATGAT CCGACGACG TGTAGATTT GGACCATTT ATATGATAAA TGAAGAAA TCAGACATA ATACATTGGA TATRAAAGA
>.....F7L.....>
-----
1001 AGATATAGAC ACAGATAGA GTCTGTATAT TTCTAAAAGT TTTTATAAA ANTGATAAA ATACTCAGT TTGTTAAA TAAGTAAAT GACTTGATTA

```

图 2(续)

```

>.....F7L.....>>
>>.....F6L.....^
          BsaWI          SphI
          -----
          AgeI           NspI   TsoI
          -----
1101 ATAATGACCA AATTAATAT TCTAGAGTTA TAAATGATAGA AGAGTCCGAT AGTCTTTTAC CCGTTGATGA GGTCATGCT AACACGGAT TTGACTGTGT
>.....F6L.....^
          XbaI
          -----
          BsrDI          NotI
          -----
1201 GGAGATGATA GATGAAATA TTAGCAATGA GAATATCGAA CAGTATPAGC GGCCGC
>.....F6L.....>>

```

图2(续)

```

          EaqI
          -----
EcoRI
-----
  ApoI   FseI           BciVI           ClaI
-----
1  GAATTCGGCC GGCCATTAG TATCCTAAAA TTGAATTGTA ATTATCGATA ATAAATGGGC
    >>>>>

61  GTGAGGAACT CCGTGCTGTC CGGCAAGAAG GCCGACGAGC TGGAGAAGAT CAGCCTGAGG
    >.....gag.....>

121  CCCAACGGCA AGAAGAAGTA CATGCTGAAG CACGTGGTGT GGGCCGCCAA CGAGCTGGAC
    >.....gag.....>

181  AGGTTCCGCC TGGCCGAGTC CCTGCTGGAG AACAAGGAGG GCTGCCAGAA GATCCTGTCC
    >.....gag.....>

241  GTGCTGGCCC CCCTGGTGCC CACCGGCTCC GAGAACCTGA AGTCCCTGTA CAACACCGTG
    >.....gag.....>

301  TCGTGATCT  GGTGCATCCA CGCCGAGGAG AAGGTGAAGC ACACCGAGGA GGCCAAGCAG
    >.....gag.....>

BstAPI
-----
361  ATCGTGCAGA GGCACCTGGT GGTGGAGACC GGCACCACCG AGACCATGCC CAAGACCTCC
    >.....gag.....>

421  AGGCCACCG  CCCCCTCTC CGGCAGGGGC GGCAACTACC CCGTGCAGCA GATCGGGCGC
    >.....gag.....>

481  AACTACGTGC ACCTGCCCT  GTCCCCAGG ACCCTGAACG CCTGGGTGAA GCTGATCGAG
    >.....gag.....>

XmnI
-----
541  GAGAAGAAGT TCGGCGCCGA GGTGGTGCCC GGCTCCAGG CCCTGTCCGA GGGCTGCACC
    >.....gag.....>

601  CCCTACGACA TCAACCAGAT GCTGAACTGC GTGGGCGACC ACCAGGCCGC CATGCAGATC
    >.....gag.....>

661  ATCAGGGACA TCATCAACGA GGAGCCGCC GACTGGGACC TCCAGCACCC CCAGCCCGCC
    >.....gag.....>

721  CCCAGCAGG  GCCAGCTGAG GGAGCCCTCC GGCTCCGACA TCGCCGGCAC CACCTCCTCC
    >.....gag.....>

781  GTGGACGAGC AGATCCAGTG GATGTACAGG CAGCAGAACC CCATCCCCGT GGGCAACATC
    >.....gag.....>

841  TACAGGAGGT GGATTCAGCT GGGCCTGCAA AAGTGCCTGA GGATGTACAA CCCCACCAAC
    >.....gag.....>

901  ATCCTGGACG TGAAGCAGGG CCCCAAGGAG CCCTCCAGT CCTACGTGGA CAGGTTCTAC
    >.....gag.....>

```

图 3

```

961 AAGTCCCTGA GGGCCGAGCA GACCGACGCC GCCGTGAAGA ACTGGATGAC CCAGACCCCTG
>.....gag.....>

1021 CTGATCCAGA ACGCCAACCC CGACTGCAAG CTGGTGCTGA AGGGCCTGGG CGTGAACCCC
>.....gag.....>

1081 ACCCTGGAGG AGATGCTGAC CGCCTGCCAG GGCCTGGGCG GCCCCGGCCA GAAGGCCAGG
>.....gag.....>

1141 CTGATGGCCG AGGCCCTGAA GGAGGCCCTG GCCCCCGTGC CCATCCCCTT CGCCGCCGCC
>.....gag.....>

                                                                 EciI
-----
1201 CAGCAGAGGG GCCCCAGGAA GCCCATCAAG TGCTGGAAct GCGGCAAGGA GGGCCACTCC
>.....gag.....>

          BsrDI          BbsI
          -----          -----
1261 GCCAGGCAAT GCAGAGCCCC AAGAAGACAG GGATGCTGGA AATGTGAAA AATGGACCAT
>.....gag.....>
>>.....pol.....>

1321 GTTATGGCCA AATGCCAGA CAGACAGGCG GGTTTTTTAG GCCTGGTCC ATGGGGAAAG
>.....gag.....>
>.....pol.....>

                                                                 SmlI
                                                                 -----
                                                                 BpuEI
                                                                 -----
1381 AAGCCCCGCA ATTTCCCAT GGCTCAAGTG CATCAGGGGC TGATGCCAAC TGCTCCCCCA
>.....gag.....>
>.....pol.....>

1441 GAGGACCCAG CTGTGGATCT GCTAAAGAAC TACATGCAGT TGGCAAGCA GCAGAGAGAA
>.....gag.....>
>.....pol.....>

1501 AAGCAGAGAG AAAGCAGAGA GAAGCCTTAC AAGGAGGTGA CAGAGGATT GCTGCACCTC
>.....gag.....>
>.....pol.....>

1561 AATTCTCTCT TTGGAGGAGA CCAGTAGTGA CCGCCACAT CGAGGGCCAG CCCGTGGAGG
>.....gag.....>>
>.....pol.....>

1621 TGCTGCTGGA CACCGGCGCC GACGACTCCA TCGTGACCGG CATCGAGCTG GGCCCCACT
>.....pol.....>

1681 ACACCCCCAA GATCGTGGC GGCATCGGC GCTTCATCAA CACCAAGGAG TACAAGAAGC
>.....pol.....>

                                                                 BspHI
                                                                 -----
1741 TGGAGATCGA GGTGCTGGC AAGAGGATCA AGGCACCAT CATGACCGC GACACCCCA
>.....pol.....>

```

图3(续)

```

1801 TCAACATCTT CGGCAGGAAC CTGCTGACCG CCCTGGGCAT GTCCCTGAAC TTCCCCATCG
>.....pol.....>
1861 CCAAGGTGGA GCCCGTGAAG GTGGCCCTGA AGCCCGGCAA GGACGGCCCC AAGCTGAAGC
>.....pol.....>
1921 AGTGGCCCCT GTCCAAGGAG AAGATCGTGG CCCTGAGGGA GATCTGCGAG AAGATGGAGA
>.....pol.....>
1981 AGGACGGCCA GCTGGAGGAG GCCCCCCCA CCAACCCCTA CAACACCCCC ACCTTCGCCA
>.....pol.....>
2041 TCAAGAAGAA GGACAAGAAC AAGTGGAGGA TGCTGATCGA CTTCAGGGAG CTGAACAGGG
>.....pol.....>

      AleI
      -----
2101 TGACCCAGGA CTCACCGAG GTGCAGCTGG GCATCCCCCA CCCC GCCGGC CTGGCCAAGA
>.....pol.....>

      EarI
      -----
2161 GGAAGAGGAT CACCGTGCTG GACATCGGCG ACGCCTACTT CTCATCCCC CTGGACGAGG
>.....pol.....>
2221 AGTTCAGGCA GTACACCGCC TTCACCCTGC CCTCCGTGAA CAACGCCGAG CCCGGCAAGA
>.....pol.....>
2281 GGTACATCTA CAAGGTGCTG CCCAGGGCT GGAAGGGCTC CCCC GCCATC TTCCAGTACA
>.....pol.....>
2341 CCATGAGGCA CGTGCTGGAG CCCTTCAGGA AGGCCAACCC CGACGTGACC CTGGTGCAGT
>.....pol.....>
2401 ACATGGACGA CATCCTGATC GCCTCCGACA GGACCGACCT GGAGCACGAC AGGGTGGTGC
>.....pol.....>
2461 TCCAGTCCAA GGAGCTGCTG AACTCCATCG GCTTCTCCAC CCCCGAGGAG AAGTTCCAGA
>.....pol.....>
2521 AGGACCCCCC CTCCAGTGG ATGGGCTACG AGCTGTGGCC CACCAAGTGG AAGCTGCAAA
>.....pol.....>
2581 AGATCGAGCT GCCCCAGAGG GAGACCTGGA CCGTGAACGA CATCCAGAAG CTGGTGGGCG
>.....pol.....>
2641 TGCTGAACTG GGCCGCCAG ATCTACCCCG GCATCAAGAC CAAGCACCTG TGCAGGCTGA
>.....pol.....>
2701 TCAGGGGCAA GATGACCCTG ACCGAGGAGG TGCAGTGGAC CGAGATGGCC GAGGCCGAGT
>.....pol.....>
2761 ACGAGGAGAA CAAGATCATC CTGTCCCAGG AGCAGGAGGG CTGCTACTAC CAGGAGGGCA
>.....pol.....>
2821 AGCCCCTGGA GGCCACCGTG ATCAAGTCCC AGGACAACCA GTGGTCCTAC AAGATCCACC
>.....pol.....>

```

图3(续)

2881 AGGAGGACAA GATCCTGAAG GTGGGCAAGT TCGCCAAGAT CAAGAACACC CACACCAACG
 >.....pol.....>

2941 GCGTGAGGCT GCTGGCCCAC GTGATCCAGA AGATCGGCAA GGAGGCCATC GTGATCTGGG
 >.....pol.....>

AflIII

3001 GCCAGGTGCC CAAGTTCCAC CTGCCCGTGG AGAAGGACGT GTGGGAGCAG TGGTGGACCG
 >.....pol.....>

3061 ACTACTGGCA GGTGACCTGG ATTCCCGAGT GGGACTTCAT CTCCACCCCC CCCCTGGTGA
 >.....pol.....>

3121 GGCTGGTGT CAACCTGGTG AAGGACCCCA TCGAGGGCGA GGAGACCTAC TACACCGACG
 >.....pol.....>

3181 GCTCCTGCAA CAAGCAGTCC AAGGAGGGCA AGGCCGGCTA CATCACCGAC AGGGGCAAGG
 >.....pol.....>

3241 ACAAGGTGAA GGTGCTGGAG CAGACCACCA ACCAGCAGGC CGAGCTGGAG GCCTTCCTGA
 >.....pol.....>

3301 TGGCCCTGAC CGACTCCGGC CCCAAGGCCA ACATCATCGT GGACTCCCAG TACGTGATGG
 >.....pol.....>

3361 GCATCATCAC CGGCTGCCCC ACCGAGTCCG AGTCCAGGCT GGTGAACCAG ATCATCGAGG
 >.....pol.....>

3421 AGATGATCAA GAAGTCCGAG ATCTACGTGG CCTGGGTGCC CGCCCACAAG GGCATCGGCG
 >.....pol.....>

3481 GCAACCAGGA GATCGACCAC CTGGTGTCCC AGGGCATCAG GCAGGTGCTG TTCCTGGAGA
 >.....pol.....>

3541 AGATCGAGCC CGCCCAGGAG GAGCAGACA AGTACCACTC CAACGTGAAG GAGCTGGTGT
 >.....pol.....>

3601 TCAAGTTCGG CCTGCCCAGG ATCGTGGCCA GGCAGATCGT GGACACCTGC GACAAGTGCC
 >.....pol.....>

3661 ACCAGAAGGG CGAGGCCATC CACGGCCAGG CCAACTCCGA CCTGGGCACC TGGCAGATGG
 >.....pol.....>

3721 ACTGCACCCA CCTGGAGGGC AAGATCATCA TCGTGGCCGT GCACGTGGCC TCCGBCTTCA
 >.....pol.....>

3781 TCGAGGCCGA GGTGATCCCC CAGGAGACCG GCAGGCAGAC CGCCCTGTTC CTGCTGAAGC
 >.....pol.....>

3841 TGGCCGGCAG GTGGCCCATC ACCCACCTGC ACACCGACAA CGGGCCCAAC TTCGCCTCCC
 >.....pol.....>

SfiI

3901 AGGAGGTGAA GATGGTGGCC TGGTGGGCCG GCATCGAGCA CACCTTCGGC GTGCCCTACA
 >.....pol.....>

图3(续)

```

3961 ACCCCCAGTC CCAGGGCGTG GTGGAGGCCA TGAACCACCA CCTGAAGAAC CAGATCGACA
>.....pol.....>
4021 GGATCAGGGA GCAGGCCAAC TCCGTGGAGA CCATCGTGCT GATGGCCGTG CACTGCATGA
>.....pol.....>
4081 ACTTCAAGAG GAGGGGCGGC ATCGGCGACA TGACCCCGC CGAGAGGCTG ATCAACATGA
>.....pol.....>
4141 TCACCACCGA GCAGGAGATC CAGTCCAGC AGTCCAAGAA CTCCAAGTTC AAGAACTTCA
>.....pol.....>
4201 GGGTGTACTA CAGGGAGGGC AGGGACCAGC TGTGGAAGGG CCCCGGCGAG CTGCTGTGGA
>.....pol.....>
4261 AGGGCGAGGG CGCCGTGATC CTGAAGGTGG GCACCGACAT CAAGGTGGTG CCCAGGAGGA
>.....pol.....>
4321 AGGCCAAGAT CATCAAGGAC TAGGGCGCG GCAAGGAGGT GGACTCCTCC TCCCACATGG
>.....pol.....>

                                     PvuI
                                     -----
                                     BsiEI
                                     -----
                                     SgfI
                                     -----
                                     BfaI
                                     -----
                                     AsiSI  HindIII
                                     -----
4381 AGGACACCGG CGAGGCCAGG GAGGTGGCCT AGTTTTTTTT GCGATCGCAA GCTT
>.....pol.....>
    
```

图 3(续)

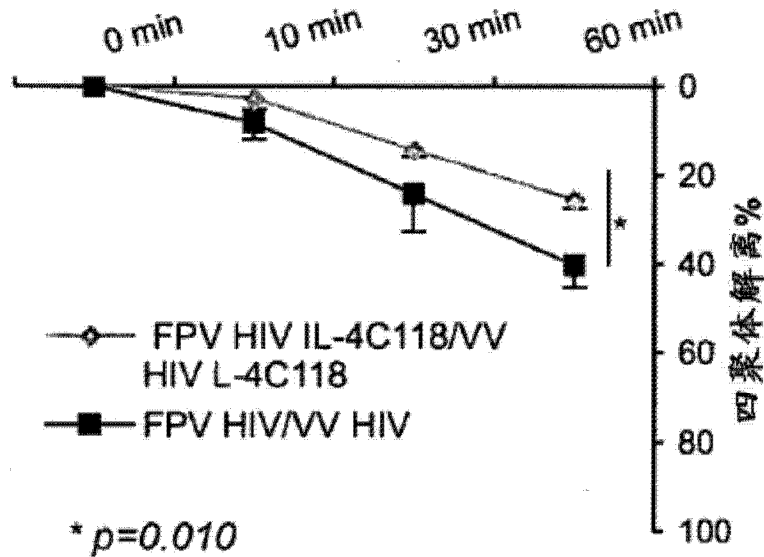


图 4

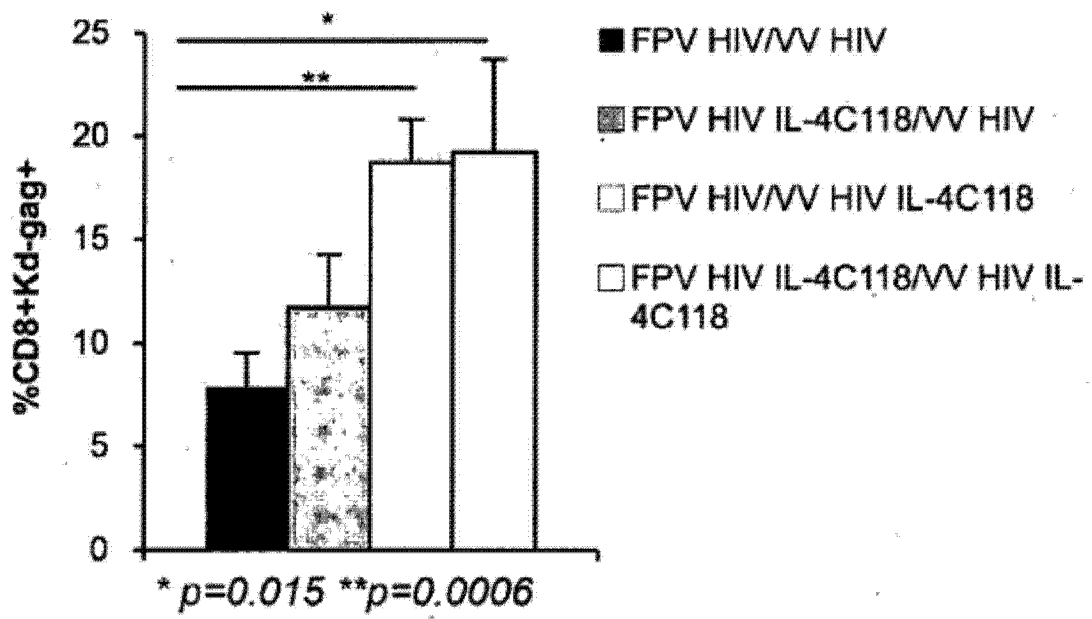


图 5

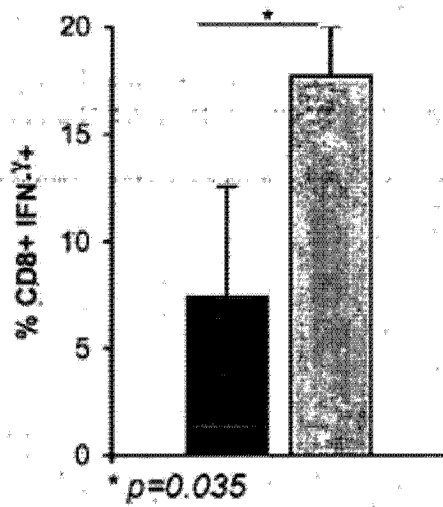


图 6

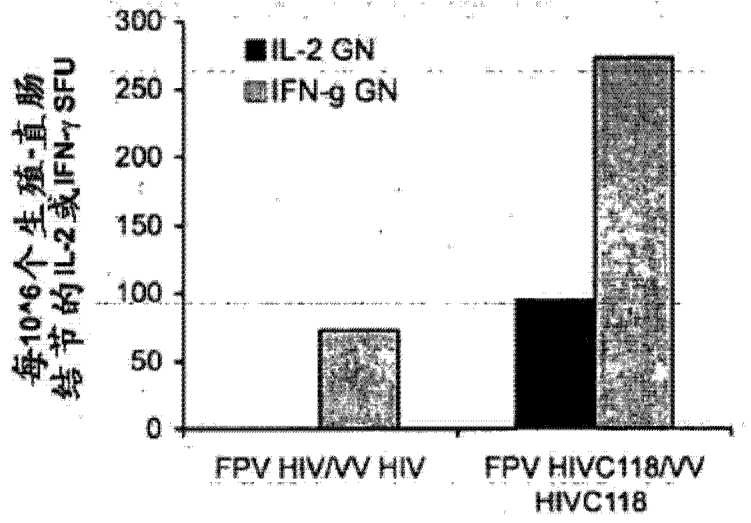
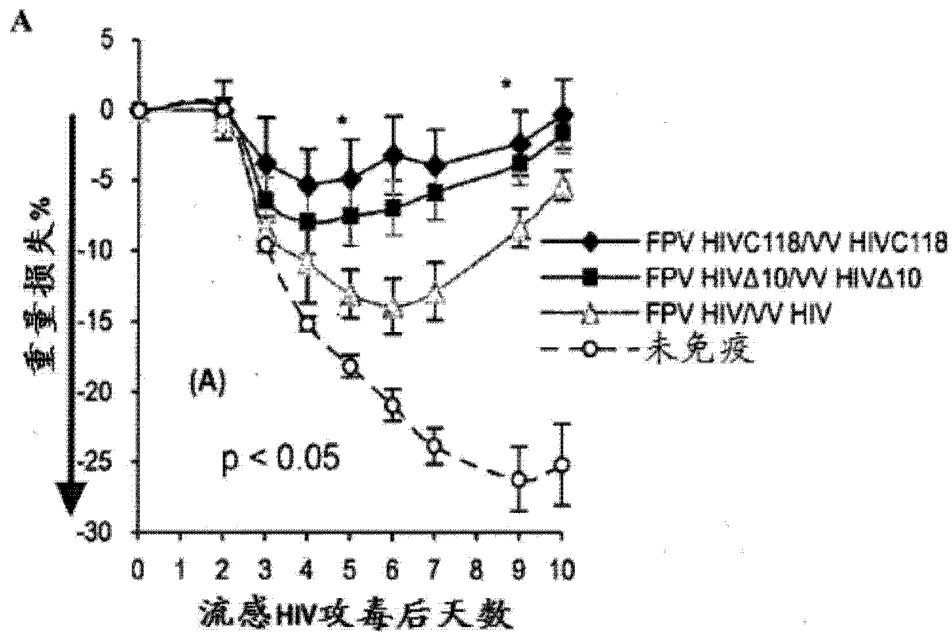


图 7



B

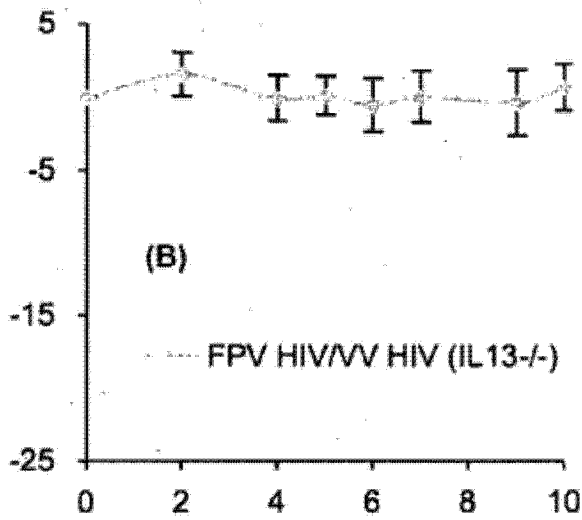


图 8

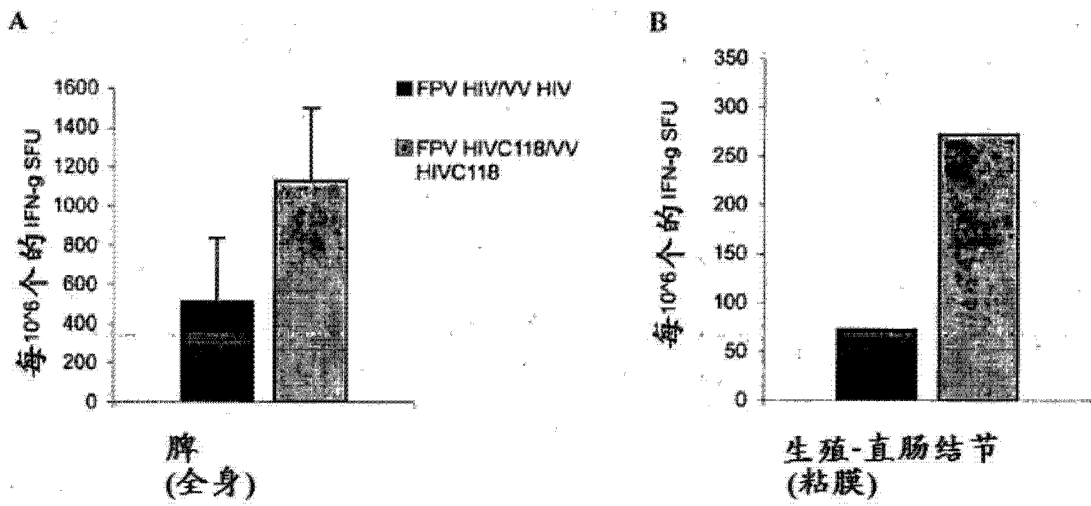


图 9

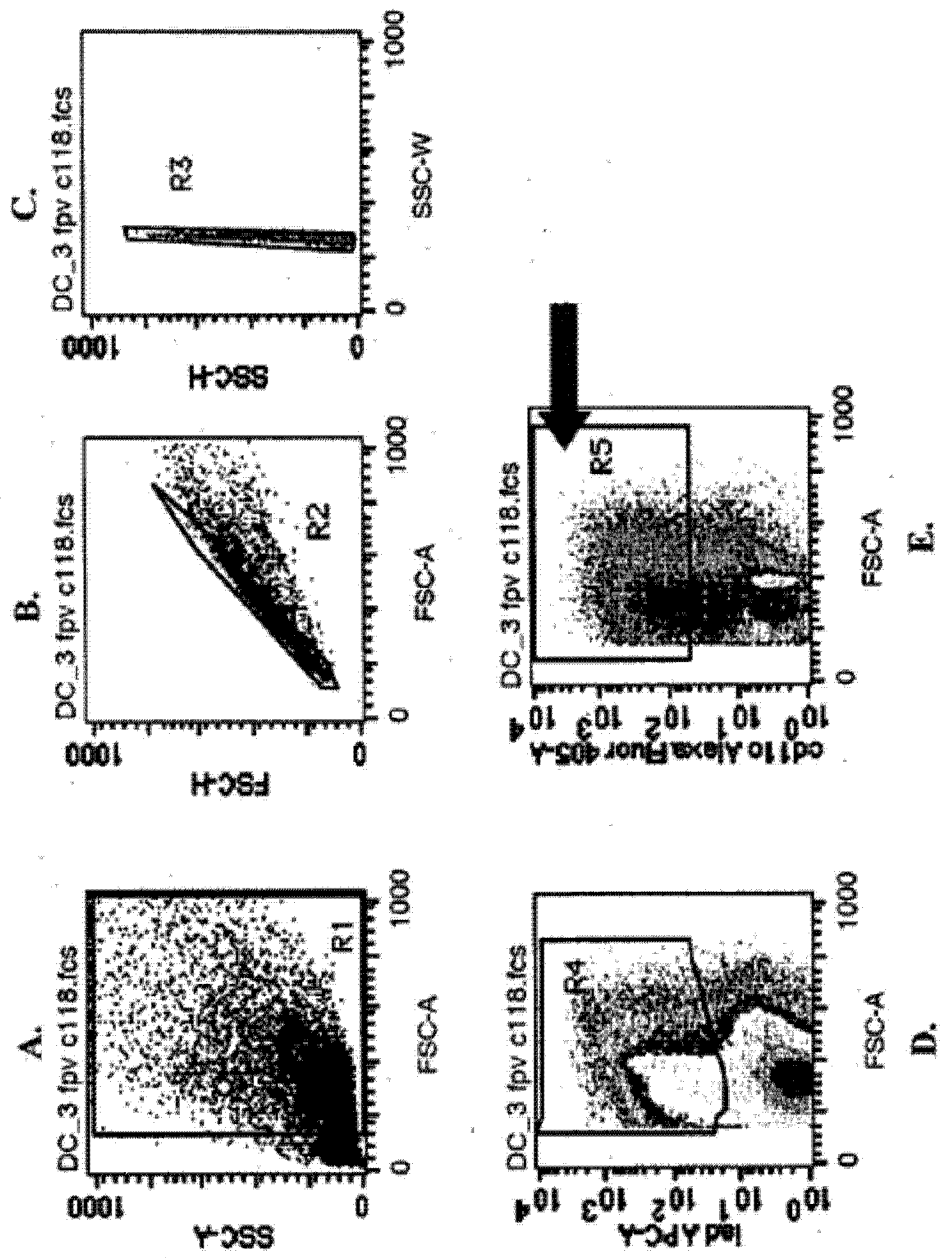


图 10

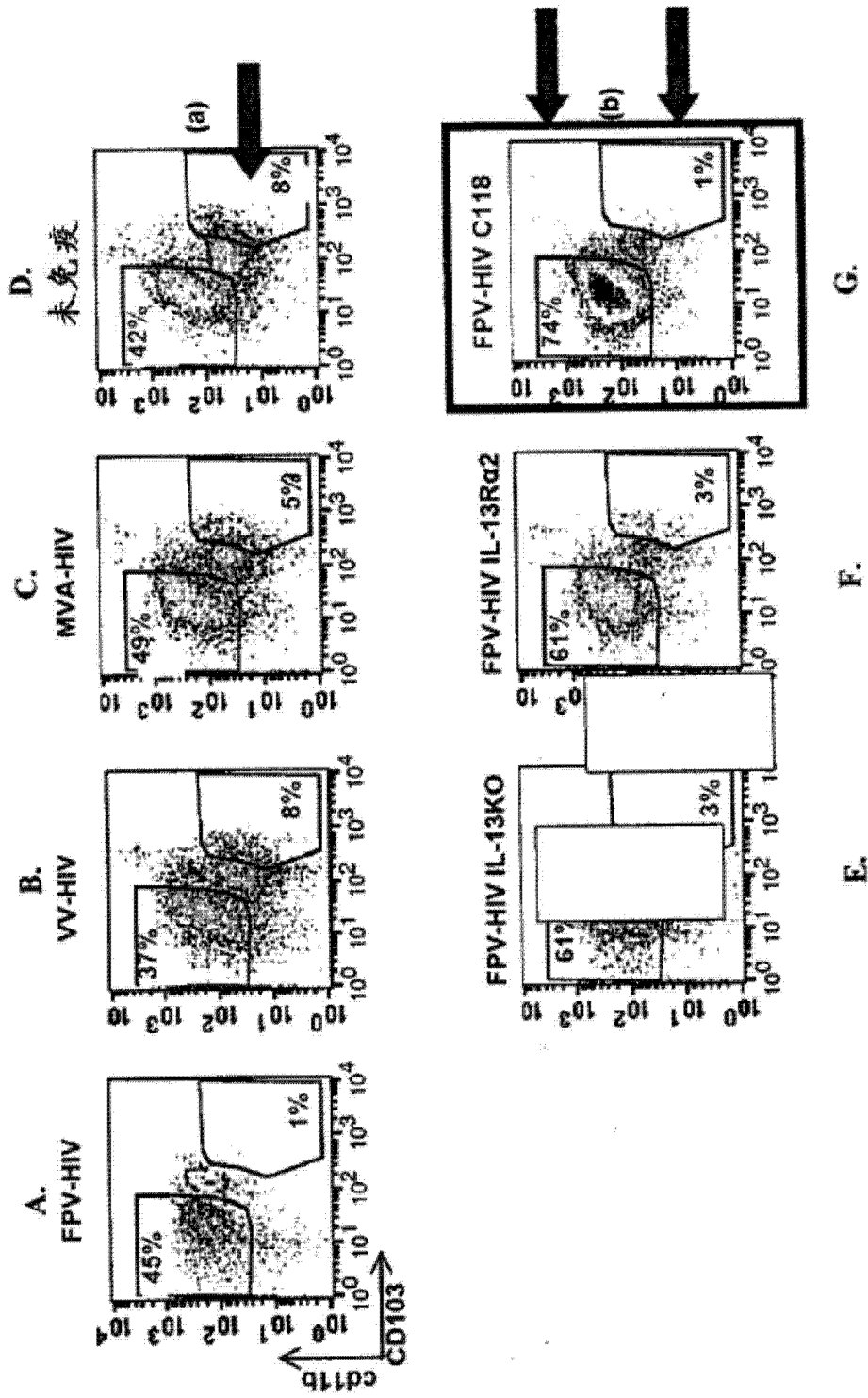


图 11

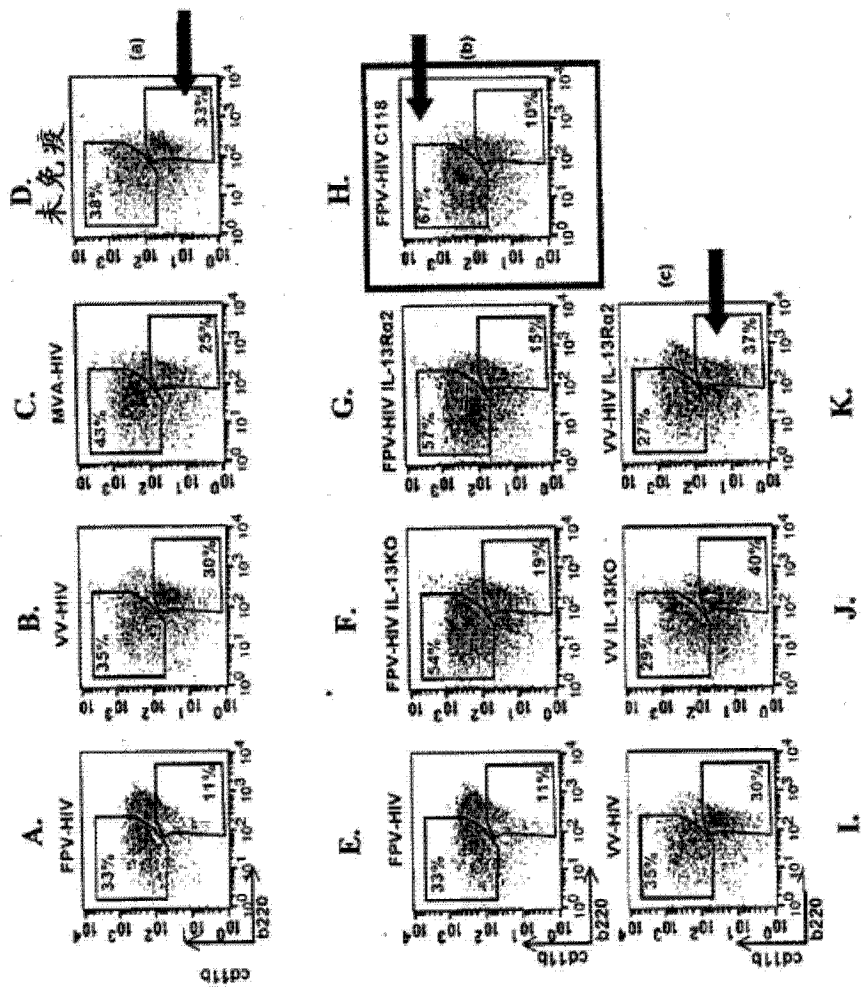


图 12

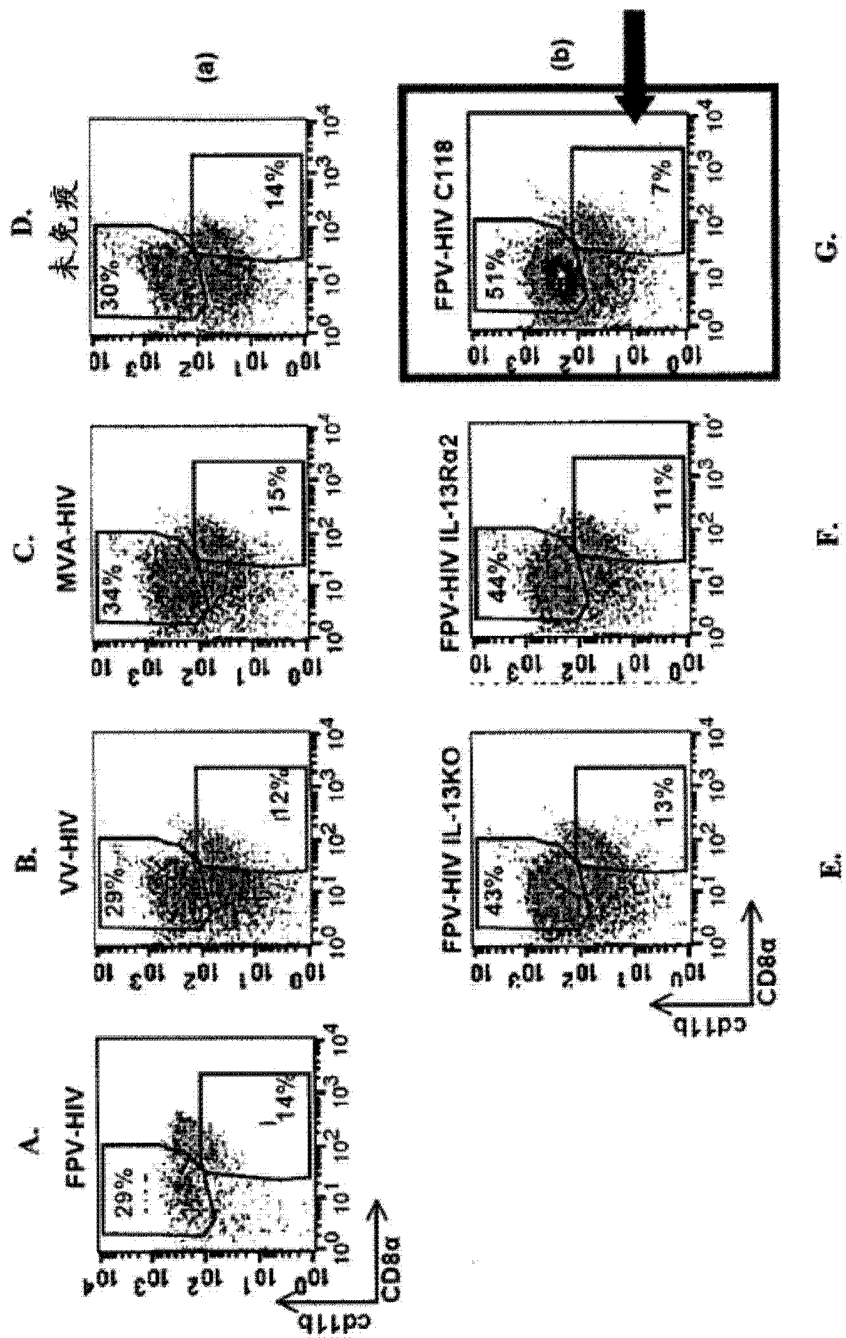


图 13

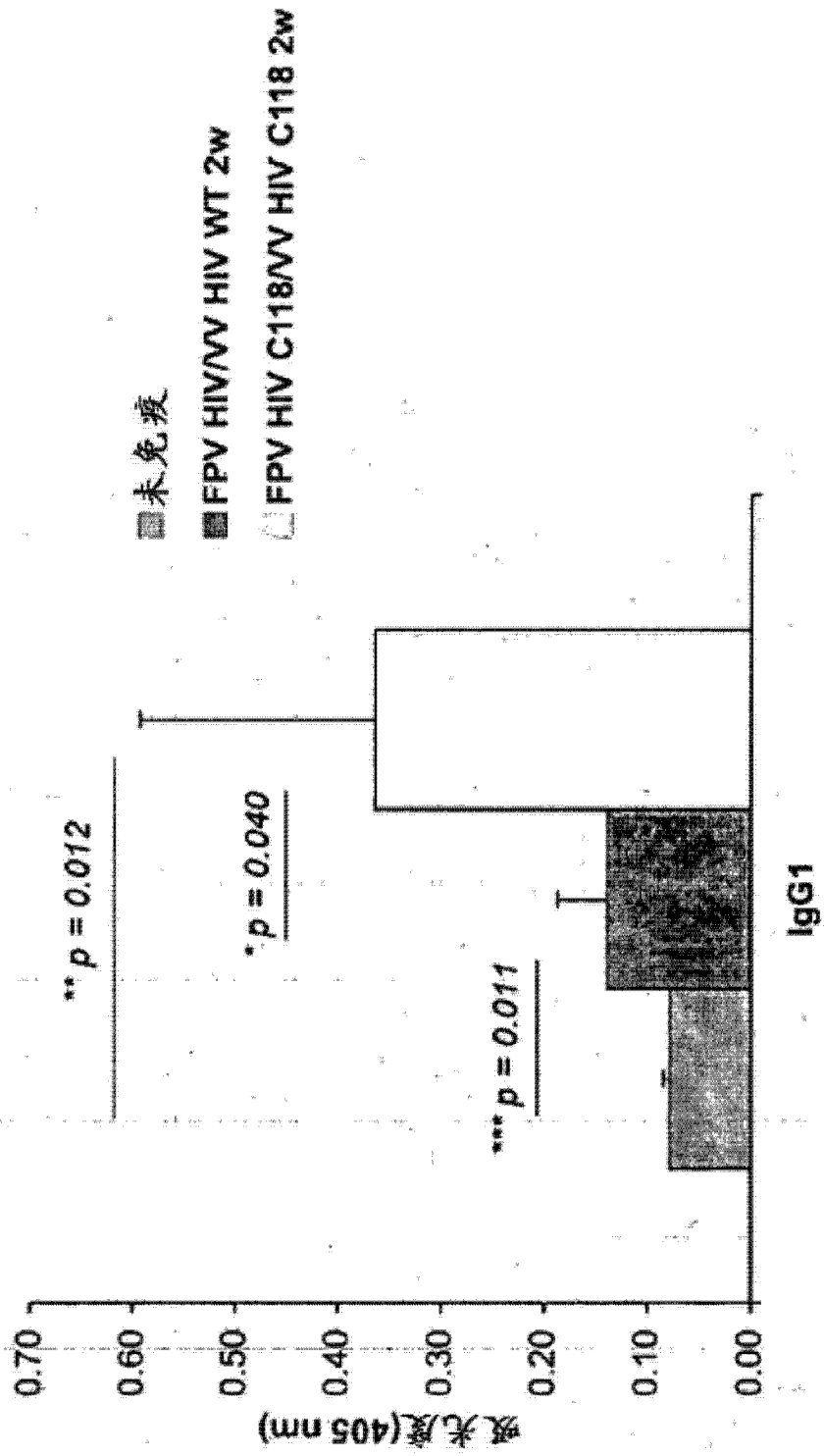


图 14