[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580016322.4

[43] 公开日 2007 年 5 月 2 日

[11] 公开号 CN 1956729A

[22] 申请日 2005.5.19
[21] 申请号 200580016322.4
[30] 优先权
[32] 2004. 5.21 [33] GB [31] 0411411.2
[86] 国际申请 PCT/EP2005/005555 2005.5.19
[87] 国际公布 WO2005/112991 英 2005.12.1
[85] 进入国家阶段日期 2006.11.21
[71] 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司
地址 比利时里克森萨特
[72] 发明人 P·肖梅兹
C·P·A·G·科利弄
M·P·范梅歇伦
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 权陆军 刘 玥
权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图 13 页

[54] 发明名称

疫苗

[57] 摘要

本发明提供了一种疫苗组合物，其含有能结合 Gb3 受体上、与抗原复合的志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物，而且还含有佐剂，前提是当佐剂只是一种金属盐时，就可以以这样的方式配制：不超过约 50％的抗原被吸附到金属盐上。和与抗原复合但无佐剂的志贺菌毒素或其免疫学上的功能等价物相比，或者和有佐剂的单独抗原相比，这种组合物提供了增强的免疫反应。

1. 一种疫苗组合物，其含有能结合 Gb3 受体上、与抗原复合的志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物，而且还含有佐剂，前提是当佐剂只是一种金属盐时，就可以以这样的方式配制：不超过约 50%的抗原被吸附到金属盐上。

2. 如权利要求 1 的疫苗组合物，其中所述志贺菌毒素的 B 亚单位的免疫学上的功能等价物与志贺菌毒素的 B 亚单位有至少 50%的氨基酸序列同一性。

3. 如权利要求 2 的疫苗组合物，其中所述载体是志贺菌毒素的 B 亚单位或其功能片段。

4. 如权利要求 2 的疫苗组合物，其中所述载体是 Vero 细胞毒素-1 的 B 亚单位或其功能片段。

5. 如权利要求 1-4 任一项中所请求保护的疫苗组合物，其中所述佐剂选自金属盐、水包油乳剂、Toll 样受体激动剂、皂苷或其组合。

6. 如权利要求 5 中所请求保护的疫苗组合物，其中所述佐剂是 Toll 样受体激动剂。

7. 如前面任一项权利要求中所请求保护的疫苗组合物，其中所述抗原和 B 亚单位是共价附着的。

8. 如权利要求 7 中所请求保护的疫苗组合物，其中所述抗原通过半胱氨酸残基与毒素附着。

9. 如前面任一项权利要求中所请求保护的疫苗组合物，其中所述佐剂选自：金属盐、皂苷、脂质 A 或其衍生物、烷基氨基葡糖苷磷酸、免疫刺激寡核苷酸或其组合。

10. 如权利要求 9 中所请求保护的疫苗组合物，其中所述皂苷以脂质体、Iscom 或水包油乳剂的形式存在。

11. 如权利要求 9 或 10 中所请求保护的疫苗组合物，其中所述皂苷是 QS21。

12. 如权利要求 9、10 或 11 中所请求保护的疫苗组合物，其中所述脂质 A 衍生物选自一磷酸脂质 A、3 脱酰一磷酸脂质 A、OM174、OM197、OM294。

13. 如权利要求 1-12 任一项中所请求保护的疫苗组合物，其中所述佐剂是来自以下组的两个的至少一个代表物的组合，

i) 皂苷，

ii) Toll 样受体 4 激动剂，和

iii) Toll 样受体 9 激动剂。

14. 如权利要求 13 中所请求保护的疫苗组合物，其中所述皂苷是 QS21，并且 toll 样受体 4 激动剂是 3 脱酰一磷酸脂质 A，以及 toll 样受体 9 是含有 CpG 的免疫刺激寡核苷酸。

15. 如权利要求 1-14 任一项中所请求保护的疫苗组合物，其中所述抗原选自提供针对选自细胞内病原体或增殖性疾病的疾病组的免疫的抗原。

16.一种疫苗组合物，其含有志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物以及抗原和医学用佐剂。

17. 志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物和抗原和佐剂在生产用于预防或治疗疾病的疫苗中的用途。

18. 如权利要求 17 中的用途，其用于提高抗原特异性的 CD8 反应。

19. 一种治疗或预防疾病的方法，其包括给患有或易患某种疾病的病人施用根据权利要求 1-15 的任一项的疫苗组合物。

20. 一种引起抗原特异性的 CD8 免疫反应的方法，其包括给病人施用根据权利要求 1-15 的任一项的疫苗。

21. 一种生产根据权利要求 1-15 的任一项的疫苗的方法，其中将与志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物组合的抗原与佐剂混合。

疫苗

本发明提供了改良的疫苗组合物，其生产方法及其在医学上的用途。具体而言，本发明提供了佐剂化的（adjuvanted）疫苗组合物，其含有志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物和用佐剂配制的抗原。

美国专利 6613882 公开了具有下式的嵌合多肽:

B--X，其中 B 代表志贺菌毒素的 B 片段或其功能等价物，而 X 代表具有治疗价值的一种或多种多肽，其中所述多肽与由 B 介导的逆向转运相容，以确保 X 的加工或正确寻址。

WO02/060937 为公开了直接或间接靶向 Gb3 受体且具有式 STxB-Z(n)-Cys 的通用多肽载体的申请，其中 StxB 为志贺菌毒素的 B 亚单位，Z 为无巯基的氨基酸接头，n 为 0、1、2 或多肽，且 Cys 为半胱氨酸。

要求主要诱导细胞反应的疫苗的开发仍然是一个挑战。因为 CD8+T 细胞（细胞免疫反应的主要效应细胞）识别在病原体感染细胞中合成的抗原，所以成功的接种要求在疫苗接种者的细胞中合成免疫原性抗原。这可通过减毒活疫苗实现，然而该疫苗也存在明显的局限。首先，当疫苗接种者受到免疫抑制时或当病原体（如人免疫缺陷病毒）本身能诱导免疫抑制时，有感染的风险。其次，一些病原体难以或不可能在细胞培养物中生长（如丙型肝炎病毒）。其他现有的疫苗如灭活的全细胞疫苗或明矾佐剂化的重组蛋白亚单位疫苗是极差的 CD8 反应诱导物。

出于这些原因，正在开发备选的方案：活载体化（vectored）疫苗、质粒 DNA 疫苗、合成多肽或特异性佐剂。活载体化疫苗的优点在于能诱导强细胞反应，但针对载体的已有免疫（例如腺病毒）或疫苗诱导的免疫会危及额外疫苗剂次的有效性(Casimiro 等人，JOURNAL OF VIROLOGY, June 2003, p. 6305-6313)。质粒 DNA 疫苗也能诱导细胞反应(Casimiro 等人，JOURNAL OF VIROLOGY, June 2003, p. 6305-6313)，但所述反应在人中很弱(Mc Conkey 等人，Nature Medicine 9,729-735,2003)，而且抗体反应非常弱。另外，合成

多肽目前在临床试验中进行评价(Khong 等人, J Immunother 2004; 27:472-477)，但疫苗逃逸突变体的出现或必需首先选择 HLA-匹配的病人会妨碍这种编码有限数目的 T 细胞表位的疫苗的功效。

也已描述了基于使用非活载体如细菌毒素递送抗原的备选方案。志贺菌毒素 B 载体化(vectorisation)系统（STxB）以志贺菌毒素的无毒性 B 亚单位为基础。该分子具有许多似乎是倾向于作为抗原呈递载体的特征：无毒性、低免疫原性、通过 CD77 受体寻靶和能诱导所载抗原进入 1 类 MHC 限制的抗原呈递途径(Haicheur 等人, (2003) Int. Immunol 15 pp 1161-1171)。具体而言，在小鼠模型中已显示抗原与志贺菌毒素的 B 亚单位的物理连接可诱导可检测的 CD8 反应(Haicheur 等人，2000 Journal of Immunology 165 pp 3301-3308; Haicheur 等人，2003 Int. Immunol 15 pp 1161-1171)。但是，该反应要求分三次注射大量抗原（最高达 80μg，Haicheur 等人，2003 Int. Immunol 15 pp 1161-1171），而且当腹膜内施用时不能通过与弗氏不完全佐剂混合得到促进(Haicheur 等人，2000 Journal of Immunology 165 pp 3301-3308)。

疫苗抗原和递送系统的这些局限性证明寻找新的疫苗组合物是对的。本发明人发现，在含有志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物的组合物中包含佐剂能在所造成的免疫反应（具体来说是 CD8 特异反应）中具有有益的作用。

所以本发明提供了含有志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物的疫苗组合物，其能与 Gb3 受体结合；能与抗原复合；并且还含有佐剂，前提是当佐剂只是一种金属盐时，其就可照这种方法配制：不超过约 60%的抗原被吸附到金属盐上。

特定的佐剂是选自金属盐、水包油乳剂、Toll 样受体激动剂（具体而言为 Toll 样受体 2 激动剂、Toll 样受体 3 激动剂、Toll 样受体 4 激动剂、Toll 样受体 7 激动剂、Toll 样受体 8 激动剂和 Toll 样受体 9 激动剂）、皂苷或其组合的那些佐剂，附带条件是，金属盐仅与另一种佐剂一起使用而不单独使用，除非其照这种方法配制：不超过约 60%的抗原被吸附到金属盐上。优选地，不超过约 50%，如 40%的抗原被吸附到金属盐上，且在一个实施方案中，不超过约 30%的抗原被吸附到金属盐上。吸附到金属盐上的抗体水平可由本领域熟知的

技术确定，如在实施例 1.5 中所列的方法。可通过，如在磷酸根离子（如磷酸缓冲盐水）存在的情况下配制组合物，或通过增大抗原对金属盐的比率来增加游离抗原的水平。在一个实施方案中，佐剂不包括金属盐作为单一佐剂。在一个实施方案中，佐剂不包括金属盐。与现有技术所示的情况相反，本发明人展示了当这种组合物不经肌内施用时，不完全弗氏佐剂增加志贺菌毒素（或其免疫学上的功能等价物）和抗原的作用的能力。另外，在一次注射后和当用低剂量抗原时，很容易观察到 CD8 反应的促进。

志贺菌毒素的 B 亚单位和其免疫学上的功能等价物在本文中称为本发明的蛋白.志贺菌毒素的 B 亚单位的免疫学上的功能等价物定义为能结合 Gb3 受体的蛋白，诸如，但不限于毒素、毒素亚基或其功能片段。这种结合能力可按照在实施例 1.2 中列出的测定规程确定。认为 Gb3 结合可诱导目的抗原的正确运输并由此促进抗原的 1 类 MHC 呈递。在一个实施方案中，这种蛋白在氨基酸水平上与志贺菌毒素的 B 亚单位的成熟形式有至少 50%的氨基酸序列同一性，优选 60%、70%、80%、90%或 95%的同一性。

这种免疫学上的功能等价物包括从各种志贺氏菌属（Shigella）物种中分离的毒素的 B 亚单位，尤其是痢疾志贺氏菌(Shigella dysenteriae)。另外，志贺菌毒素的 B 亚单位的免疫学上的功能等价物包括能结合其他细菌的 Gb3 受体的同源毒素，这些毒素优选与志贺菌毒素的 B 亚单位具有至少 50%的氨基酸序列同一性。例如，大肠杆菌(E coli)的 Vero 细胞毒素-1(VT1)的 B 亚单位与志贺菌毒素的 B 亚单位是相同的。已知大肠杆菌的 VT1 和 VT2 以及其他细菌产生的其他志贺菌样毒素能结合 Gb3 受体并且可用于本发明的背景中。在本发明的背景中，词语毒素用来表示已经脱毒的毒素，从而它们就不再对人有毒性了，或者表示其毒素亚单位或片段，后者在人体中基本上没有毒性。

本发明的疫苗组合物能促进 CD8 特异性免疫反应。当与对无佐剂的含有与本发明的蛋白复合的抗原的组合物的反应或有佐剂的含有抗原的制剂的反应比较时，通过观察对本发明的组合物的反应可测量促进，其中本发明的组合物包含与本发明的蛋白复合的抗原和佐剂。促进可定义为免疫反应水平的提高；用更低剂量的抗原产生等同

的免疫反应；免疫反应质量的提高；免疫反应持久性的提高；或上述情况的任意组合。这种促进在第一次免疫后可以观察得到，和/或可在接着的免疫后观察到。

在本发明的一个实施方案中，可利用低剂量的抗原（一只小鼠低至 8ng 抗原）增强这种免疫反应。在该实施方案中，与佐剂化的、没有复合本发明蛋白的抗原，或复合了本发明蛋白但无佐剂的抗原相比，上述这些抗原不能产生持久的反应，佐剂化的、与本发明蛋白复合的抗原能诱导持久的初级 CD8 反应（正如通过四聚体染色、细胞内的细胞因子染色和体内细胞毒素的活性测得的）。

CD8 免疫反应随时间推移变弱：峰值后，有一个收缩阶段，在该阶段大多数效应细胞死亡，而记忆细胞还活着。该反应性记忆 T 细胞群体的确立通过对抗原特异性细胞及其被加强的能力的长期检测来鉴别。

佐剂优选选自：皂苷，脂质 A 或其衍生物，免疫刺激寡核苷酸，烷基氨基葡糖苷磷酸（alkyl glucosaminide phosphate），或它们的组合。进一步优选的佐剂是结合另一种佐剂的金属盐。优选的是，佐剂是 Toll 样受体激动剂，具体而言是 Toll 样受体 2、3、4、7、8 或 9 的激动剂，或皂苷，尤其是 Qs21。还优选的是，佐剂系统包括前面所列的两个或更多个佐剂。具体而言，组合优选地包含皂苷（尤其是 Qs21)佐剂和/或 Toll 样受体 9 激动剂如含有 CpG 的免疫刺激寡核苷酸。其他优选的组合包含皂苷（尤其是 QS21）和 Toll 样受体 4 激动剂如一磷酸脂质 A 或其 3 脱酰衍生物，3D-MPL，或皂苷（尤其是 QS21）和 Toll 样受体 4 配体如烷基氨基葡糖苷磷酸。

特别优选的佐剂是 3D-MPL 和 QS21 的组合(EP 0 671 948 B1)，含有 3D-MPL 和 QS21 的水包油乳剂(WO 95/17210,WO 98/56414)，或用其他载体配制的 3D-MPL(EP 0 689 454 B1)。其他优选的佐剂系统包括 3D-MPL、QS21 和 CpG 寡核苷酸的组合，如 US6558670、US6544518 中所述。

在一个实施方案中，佐剂是 Toll 样受体(TLR)4 配体，优选激动剂如脂质 A 衍生物，特别是一磷酸脂质 A 或更特别为 3 脱酰一磷酸脂质 A(3D-MPL)。

3D-MPL 由 Corixa 公司以 MPL®商标进行销售，且主要促进了

IFN-g(Th1)表型的 CD4+ T 细胞反应。可依据 GB 2 220 211 A 中公开的方法生产 3D-MPL。在化学上，3D-MPL 是具有 3、4、5 或 6 个酰化链的 3-脱酰一磷酸脂质 A 的混合物。在本发明的组合物中优选使用小颗粒的 3D-MPL。小颗粒 3D-MPL 具有这样的颗粒大小，从而使其可通过 0.22μm 的过滤器进行无菌过滤。在国际专利申请 No. WO 94/21292 中描述了这种制备。已知并且认为脂质 A 的合成衍生物是 TLR4 激动剂，包括但不限于:

OM174（2-脱氧-6-o-[2-脱氧-2-[(R)-3-十二酰氧十四酰基氨基]-4-o-膦酰基-β-D-吡喃葡糖基]-2-[(R)-3-羟基十四酰基氨基]-α-D-吡喃葡糖基二氢磷酸脂），(WO 95/14026)

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-十二酰氧十四酰基氨基]-4-氧-5-氮杂-9(R)-[(R)-3-羟基十四酰基氨基]癸-1,10-二醇,1,10-双（二氢磷酸脂），（WO 99/64301 和 WO 00/0462）

OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-十二酰氧十四酰基氨基]-4-氧-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰基氨基]癸-1,10-二醇,1-二氢磷酸脂 10-（6-氨基己酸）(WO 01/46127)

其他可用的 TLR4 配体是烷基氨基葡糖苷磷酸（AGP），如在 WO 9850399 或 US6303347 中公开的那些（也公开了 AGP 的制备方法），或如 US6764840 中所公开的 AGP 的药学上可接受的盐。有些 AGP 是 TLR4 激动剂，而有些是 TLR4 拮抗剂。两者都被认为可用作佐剂。

另一个用于本发明的优选免疫刺激剂是 Quil A 和其衍生物。Quil A 是从南美皂皮树(*Quilaja Saponaria Molina*)中分离出来的皂苷制剂，并且被 Dalsgaard 等人在 1974 年首次描述为具有佐剂活性（“Saponin adjuvants”, Archiv. Für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)。通过 HPLC 已经分离了 Quil A 的纯化片段，其保留了佐剂活性而没有与 Quil A 相关的毒性（EP 0 362 278），例如 QS7 和 QS21（也称为 QA7 和 QA21）。QS-21 是来源于皂皮树树皮的天然皂苷，其诱导 CD8+细胞毒性 T 细胞（CTL）、Th1 细胞和主要的 IgG2a 抗体反应，并且是本发明背景的优选皂苷。

已经描述了特别优选的 QS21 的具体制剂，这些制剂还包括固醇(WO 96/33739)。本发明的皂苷形成部分可以是独立的微团形式、混

合的微团（优选地但不仅仅是胆盐）的形式，或者当用胆固醇和脂质制备时可以是 ISCOM 基质（EP 0 109 942 B1）、脂质体或相关胶体结构的形式，如蠕虫状或环状多聚体复合物或者脂质的/分层的结构和薄片，或者是水包油乳剂（例如 WO 95/17210 中所述）的形式。皂苷优选与金属盐结合，诸如氢氧化铝或磷酸铝（WO 98/15287）。优选地，皂苷以脂质体、ISCOM 或水包油乳剂的形式存在。

还可以使用免疫刺激寡核苷酸或任何其他的 Toll 样受体（TLR）9 激动剂。用于本发明佐剂或疫苗的优选寡核苷酸为包含 CpG 的寡核苷酸，优选包含两个或更多个二核苷酸 CpG 基元，该基元是由至少三个，更优选至少六个或更多个核苷酸分离的。一个 CpG 基元是胞嘧啶核苷酸后接鸟嘌呤核苷酸。本发明的 CpG 寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在一个优选的实施方案中，寡核苷酸内核苷酸间是二硫代磷酸酯，或更优选为硫代磷酸酯键，然而磷酸二酯和其他核苷酸间键也在本发明的范围内。还包括在本发明范围内的是具有混合核苷酸间键的寡核苷酸。生产硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法在 US5,666,153、US5,278,302 和 WO 95/26204 中描述。

优选寡核苷酸的实例具有以下序列。序列优选包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键。

OLIGO 1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
OLIGO 3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

备选的 CpG 寡核苷酸可包含上述优选序列，因为它们具有序列内的不重要的缺失或添加。

本发明所用的 CpG 寡核苷酸可通过本领域已知的任一方法合成（如参见 EP 468520）。为了方便起见，这种寡核苷酸可利用自动合成仪合成。

TLR2 激动剂的实例包括肽聚糖或脂蛋白。咪唑并喹啉，如咪喹莫特和 Resiquimod 是已知的 TLR7 激动剂。单链 RNA 也是已知的

TLR 激动剂（人类为 TLR8 和小鼠为 TLR7），而双链 RNA 和聚 IC（聚肌胞苷酸----一种商品化的病毒 RNA 合成模拟物）是 TLR3 激动剂的实例。3D-MPL 是 TLR4 激动剂的实例，而 CpG 是 TLR9 激动剂的实例。

在一个实施方案中，志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物和抗原复合在一起。复合是指志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物和抗原是物理结合的，例如经静电作用或疏水相互作用或共价键。在一个优选的实施方案中，志贺菌毒素的 B 亚单位和抗原或者作为融合蛋白共价连接（Haicheur 等人，2000 Journal of Immunology 165 pp 3301-3308）或者以 WO 02/060937 中所述的方式经半胱氨酸残基连接（同前）。在本发明的实施方案中，每一个毒素 B 分子连接了超过一个抗原，如每个毒素 B 上 2、3、4、5、6 个抗原分子。当存在超过一个抗原时，这些抗原可以全部相同，可以一个或多个与其他的不同，或者全部抗原可以彼此不同。

抗原本身可以是包含一个或多个目的表位的肽或蛋白。选择抗原，从而当按本发明预期方式配制时，所述抗原可提供针对细胞内病原体如 HIV、结核、衣原体、HBV、HCV 和流感的免疫，这是优选的实施方案。本发明也发现了抗原的效用，其能够增强针对良性病症和增殖性病症如癌的相关免疫反应。

本发明的疫苗制剂优选地包含能引发针对人类病原体的免疫反应的抗原或抗原性组合物，该抗原或抗原性组合物来源于 HIV-1，（如 gag 或其片段，诸如 p24、tat、nef，被膜如 gp120 或 gp160，或这些的任一个的片段），人类疱疹病毒，如 gD 或其衍生物或立即早期蛋白(Immediate Early protein)如来自 HSV1 或 HSV2 的 ICP27，巨细胞病毒（（尤其是人类）（如 gB 或其衍生物）、轮状病毒抗原、非洲淋巴瘤病毒（如 gp350 或其衍生物）、水痘-带状疱疹病毒（如 gpI、II 和 IE63），或来自肝炎病毒如乙型肝炎病毒（例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物），或来自甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒的抗原，或来自其他病毒病原体，如副粘病毒：呼吸道合胞病毒（如 F G 和 N 蛋白或其衍生物），副流感病毒，麻疹病毒，腮腺炎病毒，人乳头瘤病毒（例如 HPV6、11、16、18），黄病毒（如黄热病毒，登革病毒，蜱传脑炎病毒，日本脑炎病毒）或流感病毒纯化蛋

白或其重组蛋白，如 HA、NP、NA 或 M 蛋白，或其组合），或来源于细菌病原体，如奈瑟氏球菌属物种(*Neisseria spp*)，包括淋病奈瑟氏球菌(*N. gonorrhea*)和脑膜炎奈瑟氏球菌(*N. meningitidis*)（例如，运铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PilC、粘附素）；化脓链球菌(*S. pyogenes*)（如 M 蛋白或其片段，C5A 蛋白酶），无乳链球菌(*S. agalactiae*)，变异链球菌(*S. mutans*)；杜氏嗜血菌(*H. ducreyi*)；莫拉氏菌属物种(*Moraxella spp*)，包括粘膜炎莫拉氏菌(*M catarrhalis*)，也称为粘膜炎布兰汉氏球菌(*Branhamella catarrhalis*)（例如高分子量和低分子量的粘附素和侵袭素）；博德特氏菌属物种(*Bordetella spp*)，包括百日咳博德特氏菌(*B. pertussis*)（例如 pertactin、百日咳毒素或其衍生物、丝状血凝素(filamenteous hemagglutinin)、腺苷酸环化酶，菌毛），副百日咳博德特氏菌(*B. parapertussis*)和支气管炎博德特氏菌(*B. bronchiseptica*)；分枝杆菌属物种(*Mycobacterium spp.*)，包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)（例如 ESAT6、抗原 85A、-B 或-C），牛分枝杆菌(*M. bovis*)，麻风分枝杆菌(*M. leprae*)，鸟分枝杆菌(*M. avium*)，副结核分枝杆菌(*M. paratuberculosis*)，耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)；军团菌属物种(*Legionella spp*)，包括侵肺军团菌(*L. pneumophila*)；埃希氏菌属物种(*Escherichia spp*)，包括肠产毒性大肠杆菌(*enterotoxic E. coli*)（例如定居因子、热不稳定毒素或其衍生物、热稳定毒素或其衍生物），肠出血性大肠杆菌，肠致病性大肠杆菌；弧菌属物种(*Vibrio spp*)，包括霍乱弧菌(*V. cholera*)（例如霍乱毒素或其衍生物）；志贺氏菌属物种(*Shigella spp*)，包括索氏志贺氏菌(*S. sonnei*)，痢疾志贺氏菌，弗氏志贺氏菌(*S. flexnerii*)；耶尔森氏菌属物种(*Yersinia spp*)，包括小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Y. enterocolitica*)（例如 Yop 蛋白），鼠疫耶尔森氏菌(*Y. pestis*)，假结核耶尔森氏菌(*Y. pseudotuberculosis*)；弯曲杆菌属物种(*Campylobacter spp*)，包括空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)（例如毒素、粘附素和侵袭素）和大肠弯曲杆菌(*C. coli*)；沙门氏菌属物种(*Salmonella spp*)，包括伤寒沙门氏菌(*S. typhi*)，副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi*)，猪霍乱沙门氏菌(*S. choleraesuis*)，肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)；利斯特氏菌属物种(*Listeria spp*)，包括单核细胞增生利斯特氏菌(*L. monocytogenes*)；螺杆菌属物种(*Helicobacter spp*)，包括幽门螺杆菌(*H. pylori*)（例如脲酶、过氧化氢

酶、空泡毒素）；假单胞菌属物种(*Pseudomonas spp*)，包括铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)；葡萄球菌属物种(*Staphylococcus spp*)，包括金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)，表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)；肠球菌属物种(*Enterococcus spp*)，包括粪肠球菌(*E. faecalis*)，屎肠球菌(*E. faecium*)；梭菌属物种(*Clostridium spp*)，包括破伤风梭菌(*C. tetani*)（例如破伤风毒素和其衍生物），肉毒梭菌(*C. botulinum*)（例如肉毒杆菌毒素和其衍生物），艰难梭菌(*C. difficile*)（例如梭菌毒素 A 或 B 和其衍生物）；芽孢杆菌属物种(*Bacillus spp*)，包括炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)（例如肉毒杆菌毒素和其衍生物）；棒杆菌属物种(*Corynebacterium spp*)，包括白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*)（例如白喉毒素和其衍生物）；疏螺旋体属物种(*Borrelia spp.*)，包括布氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)（例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB），嗄氏疏螺旋体 (*B. garinii*)（例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB），阿氏疏螺旋体（*B. afzelii*）（例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB），*B. andersonii*（例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB），赫氏蜱疏螺旋体(*B. hermsii*)；埃里希氏体属物种(*Ehrlichia spp*)，包括马埃里希氏体(*E. equi*)和人粒细胞埃里希氏体病（*Ehrlichiosis*）试剂；立克次氏体属物种(*Rickettsia spp*)，包括立氏立克次氏体(*R. rickettsii*)；衣原体属物种(*Chlamydia spp.*)，包括砂眼衣原体(*C. trachomatis*)（例如 MOMP，肝素结合蛋白），肺炎衣原体(*C. pneumoniae*)（例如 MOMP，肝素结合蛋白），鹦鹉热衣原体(*C. psittaci*)；钩端螺旋体属物种(*Leptospira spp.*)，包括问号钩端螺旋体(*L. interrogans*)；密螺旋体属物种(*Treponema spp.*)，包括苍白密螺旋体(*T. pallidum*)（例如稀有外膜蛋白），齿垢密螺旋体(*T. denticola*)，猪痢疾密螺旋体(*T. hyodysenteriae*)；或来源于寄生物，如疟虫属物种(*Plasmodium spp.*)，包括恶性疟虫(*P. falciparum*)；弓形虫属物种(*Toxoplasma spp.*)，包括鼠弓形虫(*T. gondii*)（例如 SAG2、SAG3、Tg34）；内变形虫属物种(*Entamoeba spp.*)，包括痢疾内变形虫(*E. histolytica*)；巴贝虫属物种(*Babesia spp.*)，包括果氏巴贝虫(*B. microti*)；锥虫属物种(*Trypanosoma spp.*)，包括克鲁氏锥虫(*T. cruzi*)；贾第虫属物种(*Giardia spp.*)，表吮贾第虫(*G. lamblia*)；利什曼虫属物种(*Leishmania spp.*)，包括硕大利什曼虫(*L. major*)；肺囊虫属物种(*Pneumocystis spp.*)，包括卡氏肺囊虫(*P. carinii*)；毛滴虫属物种

(*Trichomonas spp.*)，包括阴道毛滴虫(*T. vaginalis*)；血吸虫属物种(*Schisostoma spp.*)，包括曼氏血吸虫(*S. mansoni*)，或来源于酵母，如假丝酵母属物种(*Candida spp.*)，包括白色假丝酵母(*C. albicans*)；隐球酵母属物种(*Cryptococcus spp.*)，包括新型隐球酵母(*C. neoformans*)。

其他针对结核分枝杆菌的优选特异性抗原是例如 Tb Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb38-1、Erd 14、DPV、MTI、MSL、mTTC2 和 hTCC1 (WO 99/51748)。针对结核分枝杆菌的蛋白也包括融合蛋白和其变体，其中结核分枝杆菌的至少两个，优选三个多肽融合到一个更大的蛋白上。优选的融合体包括 Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、DPV-MTI-MSL、Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTCC2、TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748)。

大多数针对衣原体的优选抗原包括例如高分子量蛋白(HMW)(WO 99/17741)、ORF3(EP 366 412)和推定的膜蛋白(Pmp)。疫苗制剂的其他衣原体抗原可选自 WO 99/28475 所述的组。

优选的细菌疫苗包含源自链球菌属物种(*Streptococcus spp.*)的抗原，包括肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)（例如 PsaA、PspA、链球菌溶血素、胆碱结合蛋白）和蛋白抗原肺炎球菌溶血素(Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins 等人, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342)，和其突变体解毒衍生物(WO 90/06951; WO 99/03884)。其他优选的细菌疫苗包含源自嗜血菌属物种(*Haemophilus spp*)的抗原，包括 B 型流感嗜血菌(*H. influenzae*)，不可定型的流感嗜血菌，例如 OMP26、高分子量粘附素、P5、P6、蛋白 D 和脂蛋白 D，和丝束蛋白和丝束蛋白衍生的肽(US 5,843,464)或多重拷贝变体或其融合蛋白。

乙型肝炎表面抗原的衍生物是本领域熟知的，且尤其包括，那些在欧洲专利申请 EP-A-414 374、EP-A-0304 578 和 EP 198-474 中所列出的 PreS1、PreS2 S 抗原。在一个优选的方面，本发明的疫苗制剂包含 HIV-1 抗原，gp120，尤其是在 CHO 细胞中表达时。在另一个实施方案中，本发明的疫苗制剂包含如本文前面所述的 gD2t。

在本发明的一个优选的实施方案中，含有请求保护的佐剂的疫苗包括源于人乳头瘤病毒（HPV）的抗原，认为 HPV 是造成生殖疣的

原因（HPV6 或 HPV11 等），且 HPV 病毒也是造成子宫颈癌的原因（HPV16、HPV18 等）。

生殖疣预防性或治疗性疫苗的特别优选形式包括 L1 蛋白，和含有一个或多个选自 HPV 蛋白 E1、E2、E5、E6、E7、L1 和 L2 的抗原的融合蛋白。

融合蛋白的最优选形式是：如 WO 96/26277 中公开的 L2E7，和 WO 99/10375 中公开的蛋白 D(1/3)-E7。

优选的 HPV 子宫颈感染或癌的预防性或治疗性疫苗、组合物可含有 HPV16 或 18 抗原。

特别优选的 HPV16 抗原包括早期蛋白 E6 或 E7，所述早期蛋白与蛋白 D 载体融合形成了 HPV16 的蛋白 D-E6 或 E7 融合体，或其组合；或 E6 或 E7 与 L2 的组合(WO 96/26277)。

备选地，HPV16 或 18 早期蛋白 E6 和 E7 可以以单分子的形式存在，优选为蛋白 D-E6/E7 融合体的形式。这种疫苗可任选地包含 HPV18 的 E6 和 E7 蛋白的一种或两种，优选为蛋白 D-E6 或蛋白 D-E7 融合蛋白或蛋白 D E6/E7 融合蛋白的形式。

本发明的疫苗可另外包含其他 HPV 品系的抗原，优选为品系 HPV31 或 33。

本发明的疫苗还包含源于可导致疟疾的寄生物的抗原，例如来自恶性疟虫的抗原，其包括环子孢子蛋白（CS 蛋白）、RTS,S、MSP1、MSP3、LSA1、LSA3、AMA1 和 TRAP。RTS 是基本上含有恶性疟虫的环子孢子(CS)蛋白全部 C-末端部分的杂合蛋白，所述杂合蛋白经乙型肝炎表面抗原的 preS2 部分的四个氨基酸连接到乙型肝炎病毒的表面(S)抗原上。其完整结构在国际专利申请号 PCT/EP92/02591 中公开，在要求了 UK 专利申请号 9124390.7 优先权的编号 WO 93/10152 下发表。当在酵母中表达时，RTS 作为脂蛋白颗粒生产，而当与 HBV 的 S 抗原共表达时，得到称为 RTS,S 的混合颗粒。TRAP 抗原在国际专利申请号 PCT/GB89/00895 中描述，在 WO 90/01496 下发表。可能是多级疟疾疫苗组分候选物的疟虫抗原是恶性疟虫 MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、钳合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230 和它们在疟虫属物种中

的类似物。本发明的一个实施方案是疟疾疫苗，其中抗原制剂包括RTS,S 或 CS 蛋白或其片段，如 RTS,S 的 CS 部分，其与一个或多个其他疟疾抗原组合，其之一或两者可与按照本发明的志贺菌毒素 B 亚单位附着。该一个或多个其他疟疾抗原可选自，例如 MPS1、MSP3、AMA1、LSA1 或 LSA3。

制剂也可包含抗肿瘤抗原并且用于癌症的免疫治疗性的治疗中。例如，佐剂制剂与肿瘤排斥抗原一起发挥效用，如针对前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌或黑素瘤癌的那些抗原。示例性的抗原包括 MAGE1 和 MAGE3 或其他 MAGE 抗原（用于治疗黑素瘤）、PRAME、BAGE 或 GAGE(Robbins 和 Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde 等人, International Journal of Clinical & Laboratory Research（1997 年提交）; Correale 等人(1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293。实际上这些抗原在广泛的肿瘤类型中表达，如黑素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌。其他肿瘤特异性的抗原适合与本发明的佐剂一起使用，且包括但不限于肿瘤特异性的神经节苷脂、前列腺特异性抗原(PSA) 或 Her-2/neu 、 KSA(GA733) 、 PAP 、 乳腺珠蛋白（mammaglobin）、MUC-1、癌胚抗原(CEA)。因此，在本发明的一个方面中提供了含有根据本发明的佐剂组合物和肿瘤排斥抗原的疫苗。

本发明特别优选的方面是疫苗含有肿瘤抗原，如前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、卵巢癌或黑素瘤癌。因此，制剂可包含肿瘤相关抗原，以及与肿瘤支持机制（即血管生成、肿瘤侵袭）相关的抗原。另外，治疗癌症的疫苗的特定相关抗原也包括前列腺特异性膜抗原（PSMA）、前列腺干细胞抗原（PSCA）、酪氨酸酶、survivin、NY-ESO1、prostase、PS108(WO 98/50567)、RAGE、LAGE、HAGE。另外，所述抗原可以是自身肽激素，如全长促性腺激素释放激素（GnRH，WO 95/20600），其是短的 10 个氨基酸长的肽，用于治疗许多癌症，或用于免疫去势。

本发明的疫苗可用于变态反应的预防或治疗。这种疫苗可包含变应原特异性抗原，如 Der p1。

每剂疫苗中抗原的量选择为可诱导一般的疫苗接种者的免疫保

护性反应，而没有明显的、不良的副作用的量。该量会根据所施用的特定的免疫原以及提供方式而有所变化。其中组合物包含作为单一佐剂的金属盐时，本领域技术人员应该理解的是，游离的抗原水平（例如用实施例 1.5 中所列方法进行测量的）是免疫保护的决定量。

一般说来，预计用于人的每剂量包含 0.1-1000μg 的抗原，优选为 0.1-500μg，优选为 0.1-100μg，最优选为 0.1-50μg。具体疫苗的最佳量能通过标准研究确定，包括观察疫苗接种的受试者的合适的免疫反应。首次接种之后，受试者可得到一次或几次足够间隔的加强免疫。这样一种疫苗制剂可以以引发或加强疫苗接种的方案应用于哺乳动物的粘膜表面；或备选地做全身性施用，例如经皮肤、皮下或肌内途径。优选肌内施用。

所用 3D MPL 的量一般很小，但取决于疫苗制剂，3D MPL 的量可为每剂 1-1000μg，优选每剂 1-500μg，且更优选每剂 1-100μg。

本发明的佐剂或疫苗中 CpG 或免疫刺激寡核苷酸的量一般很小，但取决于疫苗制剂，CpG 或免疫刺激寡核苷酸的量可为每剂 1-1000μg，优选每剂 1-500μg，且更优选每剂 1-100μg。

用于本发明佐剂的皂苷的量可为每剂 1-1000μg，优选每剂 1-500μg，更优选每剂 1-250μg，且最优选每剂 1-100μg。

本发明的制剂可用于预防和治疗的目的。因此，本发明提供了如本文所述的用于医学的疫苗组合物。

在另一个实施方案中，提供了通过施用基本上如本文所述的组合物来治疗疑似或患有某一疾病的个体的方法。

也提供了预防个体免于感染疾病的方法，所述疾病选自细菌和病毒性传染病，寄生物病，尤其是细胞内病原体的疾病，增殖性疾病如前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、卵巢癌或黑素瘤癌；非癌症慢性病，变态反应，所述方法包括给所述个体施用基本上如本文所述的组合物。

此外，阐述了诱导哺乳动物的 CD8+抗原特异性免疫反应的方法，包括给所述哺乳动物施用本发明的组合物。还提供了生产疫苗的方法，其包括使与志贺菌毒素的 B 亚单位或其免疫学上的功能等价物组合的抗原与佐剂混合。

用于本发明组合的合适的药学上可接受的赋形剂的实例除了别

的以外包括水、磷酸缓冲盐水、等渗缓冲溶液。

本说明书中引用的所有出版物，包括但不限于专利和专利申请均被引入本文作为参考，正如具体和单独显示每一单独出版物被仿佛完全阐释一样引入本文作为参考。

参考以下实施例和附图来举例说明本发明。在所有附图中，adeno-ova（包含 OVA 蛋白的腺病毒载体）被用作首次注射的阳性对照。P/B（引发/加强）是首次注射 Adeno-ova 及第二次加强注射 AS A 中的 Ova 蛋白（在图 6B 中为 AS H）的阳性对照。

图 1：首次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后 7 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 2：首次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 3：首次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后第 15 天通过 siinfekl 特异性的细胞因子产生性 CD8 T 细胞在 PBL 中评价的效应 T 细胞反应的持久性。

图 4：首次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后第 15 天通过抗原特异性的细胞因子产生性 CD8 T 细胞在 PBL 中评价的效应 T 细胞反应的持久性。

图 5：首次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后 15 天通过体内检测到的细胞毒素活性评价的效应 T 细胞反应。

图 6：(A) 第二次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后 47 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。(B)第 0 天至第 98 天的 PBL 中 Siinfekl 特异性的 CD8 频率的动力学。

图 7：第二次注射 AS A 和 AS H STxB Ova 疫苗后 47 天通过 PBL 中的抗原特异性的细胞因子产生性 CD4 T 细胞评价的效应 T 细胞反应。

图 8：第二次注射 AS A 和 AS H STxB Ova 疫苗后 47 天通过 PBL 中的抗原特异性的细胞因子产生性 CD8 T 细胞评价的效应 T 细胞反应。

图 9：第二次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后 47 天通过体内检测到的细胞毒素活性评价的效应 T 细胞反应。

图 10A：第二次注射 AS A STxB Ova 和 AS H STxB Ova 疫苗后

15 天和 40 天的体液反应。

图 10B：第二次注射 AS H STxB-OVA 后 78 天在脾内评价的抗-Ova 记忆 B 细胞频率。

图 11：首次注射 AS A、AS F、AS D、AS E、STxB-ova 疫苗后 13 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 12A：首次注射 AS A、AS B、AS C、AS G、AS I 和 AS H STxB-ova 疫苗后 15 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 12B：第二次注射 AS A、AS B、AS C、AS G、AS I 和 AS H STxB-ova 疫苗后 6 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 13：用相同剂量 AS H 配制的 STxB-ova 疫苗的不同剂量的 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 14：通过首次注射后 14 天在 PBL 中测得的具有 AS J（两剂）或 AS K 的 STxB-Ova 体内诱导的免疫反应的评价。(A) Siinfekl 特异性的 CD8 频率。(B) 抗原特异性的细胞因子产生性 CD8 频率。(C) 体内测得的 Siinfekl 特异性的裂解。

图 15：首次注射 AS L、AS G、AS M STxB-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 16：首次注射 AS B、AS C、AS K、AS F 或 AS T STxB-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 17：首次注射 AS B、AS N、AS I STxB-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 18：首次注射 AS G、AS O、AS P、AS Q STxB-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 19：首次注射 AS G、AS R、AS S STxB-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 20：首次注射 AS A STxB-ova 疫苗后 14 天或 42 天进行的第二次注射后 15 天测得的体液反应。

图 21：首次注射 AS G、AS L、AS U、AS V STxB-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

图 22：首次注射 ASW1、ASW2-ova 疫苗后 14 天 PBL 中的 Siinfekl 特异性的 CD8 频率。

实施例:

1. 试剂和介质

1.1 佐剂化的 STxB-Ova 的制备

与全长鸡卵清蛋白偶联的 STxB: 为使蛋白化学偶联到 STxB 上限定的受体位点，将半胱氨酸添加到野生型蛋白的 C-末端，从而产生 STxB-Cys。按照以前的介绍(Haicheur 等人，2000, J. Immunol. 165, 3301)生产重组突变体 STxB-Cys 蛋白。通过鲎测定检验确定的内毒素浓度低于 0.5EU/ml。以前已经对 STxB-ova 进行过阐述(HAICHEUR 等人，2003, Int. Immunol, 15, 1161-1171)，而且 Ludger Johannes 和 Eric Tartour (Curie Institute)友善提供 STxB-ova。

在下面所注的每一个佐剂系统中配制与全长鸡卵清蛋白偶联的 StxB。

1.2 Galabiose 结合测定

由志贺菌毒素的 B 亚单位优选识别的 Gb3 受体是细胞表面鞘糖脂，神经酰胺三己糖苷（globotriaosylceramide）（Galα-1-4Galβ1-4 葡糖神经酰胺），其中 Gal 是半乳糖。下面叙述的方法是以 Tarrago-Trani 叙述的方法(Protein Extraction and Purification 38, pp 170-176, 2004)为基础的，且涉及在商业可获得的 galabiose 连接的琼脂糖凝胶(calbiochem)上的亲和层析。Galabiose (Galα1->4Gal)是 Gb3 的寡糖部分的末端碳水化合物部分，而且被认为代表了志贺菌毒素的 B 亚单位可识别的最小结构。该方法已经成功地应用于直接从大肠杆菌裂解物中纯化志贺菌毒素。所以可假定结合该部分的蛋白可结合 Gb3 受体。

将 PBS 缓冲液(500µl)中的目的蛋白与 100µl 事先在同样的缓冲液中平衡过的固定化 galabiose 树脂(Calbiochem)混合，且在旋转轮（rotating wheel）上于 4℃温育 30 分钟到 1 小时。于 5000rpm 第一次离心一分钟后，将沉淀用 PBS 洗涤两次。然后通过在 2 x 500µl 的 100mM 甘氨酸 pH2.5 中重悬终沉淀来洗脱结合的材料两次。然后用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯染色和蛋白印迹分析相当于流过的、合并的洗涤液和合并的洗脱物的样品。这些分析技术允许鉴定蛋白是否结合到 galabiose 上，并从而结合 Gb3 受体。

1.3 – 用于佐剂系统的水包油乳剂的制备

遵循 WO 95/17210 中所述规程制备水包油乳剂。该乳剂包含：5%角鲨烯，5%生育酚，2.0%tween 80；颗粒大小为 180nm。

水包油乳剂的制备（2 倍浓度）

将 Tween 80 溶于磷酸缓冲盐水(PBS)中，以得到溶于 PBS 中的 2%溶液。为提供 100ml 两倍浓度的乳剂，涡旋 5 克的 DL α 生育酚和 5ml 的角鲨烯，直到彻底混合。加入 90 ml PBS/Tween 溶液并彻底混合。接着使所得乳剂通过注射器并最终用 M110S 微流化机器（microfludics machine）微流化（microfluidise）。所得油滴具有约 180nm 的大小。

1.4 – 佐剂系统的制备

1.4.1 佐剂系统 A: QS21 和 3D-MPL

将溶于有机溶剂中的脂质（例如来自卵黄或合成的磷脂酰胆碱）和胆固醇和 3D-MPL 的混合物在真空（或备选地在惰性气体流）下干燥。然后加入水性溶液（如磷酸缓冲盐水），并搅动容器，直到所有脂质都处于悬浮状态。接着将悬浮液微流化，直到脂质体的大小减少到约 100nm，并然后通过 0.2μm 的过滤器无菌过滤。挤出或超声处理可取代所述步骤。

胆固醇:磷酸酰胆碱的比率通常是 1:4(w/w)，并加入水性溶液，以获得 5-50mg/ml 的胆固醇终浓度。

脂质体具有 100nm 的限定大小，且被称为 SUV（表示小的单层脂质体）。脂质体本身随时间推移是稳定的，并且没有融合能力。将大量无菌的 SUV 加入 PBS 中，以达到 10、20 或 100μg/ml 的 3D-MPL 终浓度。PBS 组成为磷酸氢二钠：9mM；磷酸二氢钾：48mM；氯化钠：100mM，pH6.1。将溶于水性溶液中的 QS21 加入 SUV。该混合物被称为 DQMPLin。然后加入 Stx-OVA。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。如果需要，检查 pH 并用 NaOH 或 HCl 调节至 6.1+/-0.1。

在下面 3.1 部分描述的实验中，StxB-OVA 的浓度为 4、10、20 或 100μg/ml，而 3D-MPL 和 QS21 的浓度为 10μg/ml。在这些情况下，50μl 注射体积对应于 0.2-5μg 的 STxB-OVA 和 0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21。0.2μg 的 STxB-OVA 注射结果显示在图 1—10 中。也进行 50μl 注射体积对应于 0.5、1 和 5μg 的 STxB-OVA 的实验。这些实验得出

图 1—10 中所示的比较结果。

在其他实验中，StxB-OVA 的浓度为 20 或 40μg/ml，而 3D-MPL 和 QS21 的浓度为 20 或 100μg/ml。

在这些实验中，25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-OVA 和 0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21（在图 12A 和 12B 中示出）或 1μg 的 STxB-OVA 和各 2.5μg 的 3D-MPL 和 QS21（在图 11 和 20 中示出）。

1.4.2 佐剂系统 B：QS21

1.4.2.1：佐剂系统 B1

根据用于佐剂系统 A 但去除 3D-MPL 的方法制备佐剂。

调节 StxB-OVA 和 QS21 的浓度为 10 或 20μg/ml。

25 或 50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 StxB-OVA 和 0.5μg 的 QS21（如图 12A、12B 和 17 所示）。

1.4.2.2：佐剂系统 B2

在 pH6.8 的 PBS 中稀释 QS21 为浓度 100μg/ml，然后加入 StxB-OVA 以达到抗原终浓度为 40μg/ml。

25μl 注射体积对应于 1μg 的 StxB-OVA 和 2.5μg 的 QS21（如图 16 所示）。

1.4.3 佐剂系统 C：3D-MPL

1.4.3.1：佐剂系统 C1

在终浓度为 9.25%的蔗糖溶液中稀释大量无菌的 3D-MPL 为 100 或 200μg/ml。加入 StxB-OVA，以达到抗原终浓度为 20 或 40μg/ml。

25μl 注射体积对应于 1μg 的 StxB-OVA 和 5μg 的 3D-MPL（参见图 16）或 0.5μg 的 StxB-OVA 和 2.5μg 的 3D-MPL（结果未示出，但是可比较的）。

1.4.3.2：佐剂系统 C2

根据用于佐剂系统 A 但去除 QS21 的方法制备佐剂。

调节 StxB-OVAT 和 MPL 的浓度为 10μg/ml。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 StxB-OVA 和 0.5μg 的 MPL。

1.4.4 佐剂系统 D：水包油乳剂中的 3D-MPL 和 QS21

将按实施例 1.3 制备的大量无菌乳剂加入 PBS 中，以达到每毫升 250 或 500μl 乳剂(v/v)的终浓度。然后加入 3D-MPL，以达到 50 或 100μg/ml 的终浓度。接着加入 QS21，以达到 50 或 100μg/ml 的终浓

度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。然后加入 StxB-OVA，以达到 10 或 40μg/ml 的终浓度。15 分钟后，检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.8+/-0.1。

25 或 50μl 注射体积对应于 0.5 或 1μg 的 STxB-OVA、2.5μg 的 3D-MPL 和 QS21、12.5μl 或 25μl 的乳剂。用 50μl 注射体积的实验在图 11 中示出。用 25μl 注射体积的实验给出了可比较的结果。

1.4.5 佐剂系统 E：水包油乳剂中的高剂量 3D-MPL 和 QS21

将按实施例 1.3 制备的大量无菌乳剂加入 PBS 中，以达到每毫升 500μl 乳剂(v/v)的终浓度。然后加入 200μg 的 3D-MPL 和 200μg 的 QS21。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。然后加入 StxB-OVA，以达到 40μg/ml 的终浓度。15 分钟后，检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.8+/-0.1。

25μl 注射体积对应于 1μg 的 STxB-Ova、5μg 的两种免疫刺激剂和 12.5μl 的乳剂。

1.4.6 佐剂系统 F：低浓度水包油乳剂中的 3D-MPL 和 QS21

水包油乳剂如实施例 1.3 所述，其中将胆固醇加入到有机相中，以达到 1%角鲨烯、1%生育酚、0.4%tween 80 和 0.05%胆固醇的终组成。形成乳剂后，接着加入 3D-MPL，以达到 100μg/ml 的终浓度。然后加入 QS21，以达到 100μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。然后加入 StxB-OVA，以达到 40μg/ml 的终浓度。15 分钟后，检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.8+/-0.1。25μl 注射体积对应于 1μg 的 STxB-Ova、2.5μg 的 3D-MPL 和 QS21、2.5μl 的乳剂。

1.4.7 佐剂系统 G：CpG2006

将大量无菌的 CpG 加入到 PBS 或氯化钠 150mM 溶液中，以达到 100 或 200μg/ml 的终浓度。

然后加入 StxB-OVA，以达到 10 或 20μg/ml 的终浓度。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.1+/-0.1。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 5μg 的 CpG(图 12A，

12B 和 21）。进行 25μl 注射体积（对应于 05μg 的 STxB-OVA 和 5μg 的 CpG）的实验。结果未示出但是可比较的。

1.4.8 佐剂系统 H: QS21、3D-MPL 和 CpG2006

将大量无菌的 CpG 加入到 PBS 溶液中，以达到 100μg/ml 的终浓度。PBS 组成为磷酸氢二钠: 9mM; 磷酸二氢钾: 48mM; 氯化钠: 100mM，pH6.1。然后加入 StxB-OVA，以达到 20μg/ml 的终浓度。最后，加入作为含有 3D-MPL 和 QS21 的大量无菌 SUV 的预混合物（被称为 DQMPLin）的 QS21 和 3D-MPL，以达到 10μg/ml 的 3D-MPL 和 QS21 的终浓度。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.1+/-0.1。

50μl 注射体积对应于 1μg 的 STxB-Ova、0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21 和 5μg 的 CpG。然后在 3D-MPL/QS21 和 CpG 的溶液中稀释该制剂（浓度分别是 10、10 和 100μg/ml），以获得 0.2、0.04 和 0.008μg 剂量的 STxB-OVA。（使用了这些制剂的实验显示在图 1—10 和 13）

在图 12A 和 12B 所示的实验中，CpG 的浓度为 100μg/ml，3D-MPL 和 QS21 的浓度为 10μg/ml，且 STxB-OVA 的浓度为 10μg/ml。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-OVA、0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21 和 5μg 的 CpG。

在另外一个实验中，CpG 的浓度为 1000μg/ml，3D-MPL 和 QS21 的浓度为 100μg/ml，且 STxB-OVA 的浓度为 40μg/ml。25μl 注射体积对应于 1μg 的 STxB-OVA、2.5μg 的 3D-MPL 和 QS21 和 25μg 的 CpG。这个实验的结果未示出，但与具有其他浓度的组分的结果可进行比较。

1.4.9 佐剂系统 I: QS21 和 CpG2006

将大量无菌的 CpG 加入到 PBS 或氯化钠 150mM 溶液中，以达到 100 或 200μg/ml 的终浓度。PBS 组成为 PO4 10mM，NaCl 150mM，pH7.4 或者磷酸氢二钠: 9mM; 磷酸二氢钾: 48mM; 氯化钠: 100mM; pH6.1。然后加入 StxB-OVA，以达到 10 或 20μg/ml 的终浓度。最后，加入作为大量无菌 SUV 和 QS21 的预混合物（被称为 DQ，按实施例

1.3.14 制备）的 QS21，以达到 10 或 20μg/ml 的 QS21 的终浓度。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.1 或 7.4+/-0.1。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、0.5μg 的 QS21 和 5μg 的 CpG（图 12A 和 12B）。

也进行 25μl 注射体积(对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、0.5μg 的 QS21 和 5μg 的 CpG）的实验。结果未示出，但是可比较的。

1.4.10 佐剂系统 J: 不完全弗氏佐剂(IFA)

IFA 是从 CALBIOCHEM 得到的。将 IFA 用大量的抗原在 1 分钟期间内进行乳化，其中使用涡旋。

在 pH6.8 或 7.4 的 PBS 中稀释 STxB-ova 为浓度 40μg/ml，并与 500μl/ml 的 IFA 混合，所述 IFA 或者就这样使用，或者用 PBS 稀释 20 倍后再使用。

25μl 注射体对应于 1μg 的 STxB-ova 和 12.5 或 0.625μl 的 IFA(在图 14 中示出）。

在其他实验中，在 pH6.8 或 7.4 的 PBS 中稀释 STxB-OVA 为浓度 10μg/ml，并与 500 或 250μl/ml 的 IFA 混合。50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-OVA 和 12.5 或 25μl 的 IFA。这些实验给出了与图 14 中示出的那些可比较的结果。

1.14.11 佐剂系统 K: 水包油乳剂

1.4.11.1 佐剂系统 K1

按实施例 1.3 但去除 3D-MPL 和 QS21 制备大量无菌乳剂。

25μl 注射体积对应于 1μg 的 STxB-OVA 和 12.5μl 的乳剂。结果显示为图 16 的佐剂系统 K。

1.4.11.2 佐剂系统 K2

按佐剂系统 F 但去除 3D-MPL 和 QS21 制备大量无菌乳剂。

25μl 注射体积对应于 1μg 的 STxB-OVA 和 2.5μl 的含胆固醇的乳剂。

结果未示出，但与佐剂系统 K1 看到的那些可比较。

1.4.12 佐剂系统 L: Poly I:C

Poly I:C（聚肌胞苷酸）是 Amersham 公司商业合成的病毒 RNA 的模拟物。在一些实验中，将 StxB-OVA 在 NaCl 150mM 中稀释，以达到 20μg/ml 的终浓度。然后加入大量无菌 Poly I:C 以达到 20μg/ml 的终浓度。

在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 0.5μg 的 Poly I:C(在图 15 和 21 中示出）。

在其他实验中，STxB-OVA 的浓度为 10μg/ml，而 Poly I:C 的浓度为 20 或 100μg/ml。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-OVA 和 1 或 5μg 的 Poly I:C。

这些实验给出了与图 15 和 21 中示出的那些可比较的结果。

1.4.13 佐剂系统 M: CpG5456

在 NaCl 150mM 中稀释 StxB-OVA，以达到 20μg/ml 的终浓度。然后加入大量无菌 CpG，以达到 200μg/ml 的终浓度。

所用 CpG 为 22 聚体，其具有如下序列 5'-TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G-3'(CpG5456)。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 5μg 的 CpG。

1.4.14 佐剂系统 N: QS21 和 Poly I:C

将溶于有机溶剂中的脂质（如来自卵黄或合成的磷脂酰胆碱）和胆固醇的混合物在真空（或备选地在惰性气体流）下干燥。然后加入水性溶液（如磷酸缓冲盐水），并搅动容器直到所有脂质均处于悬浮状态。接着将悬浮液微流化，直到脂质体大小减少到约 100nm，然后通过 0.2μm 过滤器无菌过滤。挤压或超声处理可取代该步骤。

胆固醇:磷脂酰胆碱的比率通常是 1:4(w/w)，且然后加入水性溶液，以得到 5-50 mg/ml 的胆固醇终浓度。

脂质体具有 100nm 的限定大小，且被称为 SUV（表示小的单层脂质体）。脂质体本身随时间推移是稳定的，并且没有融合能力。

将大量无菌的 SUV 加入 PBS 中，以达到 100μg/ml 的 MPL 终浓度。将 QS21 水溶液加入 SUV，以达到 100μg/ml 的 QS21 终浓度。这种脂质体和 QS21 的混合物被称为 DQ。

在 NaCl 150mM 中稀释大量无菌 Poly I:C（Amersham，同前），以达到 20μg/ml 的终浓度，然后加入 DQ，以达到 QS21 中的 20μg/ml 终浓度。然后加入 Stx-OVA，以达到 20μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、0.5μg 的 QS21 和 0.5μg 的 Poly I:C。

1.4.15 佐剂系统 O：CpG2006 和水包油乳剂

按实施例 1.3 制备水包油乳剂。

将大量无菌的乳剂加入 PBS，以达到每毫升 500μl 乳剂(v/v)的终浓度。然后加入 CpG，以达到 200μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。然后加入 StxB-OVA，以达到 20μg/ml 的终浓度。15 分钟后，检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.8+/-0.1。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、5μg 的 CpG 和 12.5μl 的乳剂。

1.4.16 佐剂系统 P：CpG2006 和水包油乳剂

遵循公开在 Chiron Behring FluAd 疫苗所含说明书小册子中的配方制备水包油乳剂。

通过在 200ml 水中混合 36.67mg 柠檬酸与 627.4mg 二水合柠檬酸钠，制备柠檬酸缓冲液。在磁力搅拌条件下单独混合 3.9g 角鲨烯和 470mg 的 Span 85。

将 470mg Tween 80 与柠檬酸缓冲液混合。将所得混合物加入到角鲨烯/Sapn 85 混合物中，并用磁力搅拌“强力”混合。终体积为 100ml。

接着将混合物放入 M110S 微流化机器（购自 Microfluidics），以减小油滴的大小。用 0.06 的多分散性得到 145nm 的 z 平均值。使用以下技术条件在 Zetasizer 3000HS（购自 Malvern）上获得该大小。

- 激光波长：532nm (Zeta3000HS)
- 激光器功率：50mW (Zeta3000HS)
- 在 90°检测到的散射光(Zeta3000HS)

- 温度：25℃

- 持续时间：由软件自动确定

- 数值：3 次连续测量

- z-平均直径：通过累积量分析

将大量无菌的所得乳剂加入 PBS，以达到每毫升 500μl 乳剂(v/v)的终浓度。然后加入 CpG，以达到 200μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。然后加入 StxB-OVA，以达到 20μg/ml 的终浓度。15 分钟后，检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 6.8+/-0.1。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、5μg 的 CpG 和 12.5μl 的乳剂。

1.4.17 佐剂系统 Q：CpG2006 和 IFA 水包油乳剂

将从 CALBIOCHEM 得到的 IFA 加入 PBS，以达到每毫升 500μl 乳剂(v/v)的终浓度。然后加入 CpG，以达到 200μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。然后加入 StxB-OVA，以达到 20μg/ml 的终浓度。15 分钟后，检查 pH，且如果需要，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 7.4+/-0.1。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 5μg 的 CpG、12.5μl 的乳剂。

1.4.18 佐剂系统 R： CpG2006 和 $Al(OH)_3$

将得自 Brentag 的 $Al(OH)_3$ 在水中稀释为终浓度 1mg/ml (Al+++)，做注射用。在 30 分钟期间，StxB-OVA 被吸附到 Al+++上，浓度为 20μg/ml。加入 CpG，以达到 200μg/ml 浓度，并温育 30 分钟，然后加入 NaCl 以达到 150mM 的终浓度。全部温育在室温下在定轨振荡(orbital shacking)下进行。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、5μg 的 CpG 和 25μg

的 Al+++。

1.4.19 佐剂系统 S: CpG2006 和 AlPO4

将得自 Brentag 的 AlPO4 在水中稀释为终浓度 1mg/ml (Al+++)，做注射用。在 30 分钟期间，StxB-OVA 被吸附到 Al+++上，浓度为 20μg/ml。加入 CpG，以达到 200μg/ml 浓度，并温育 30 分钟，然后加入 NaCl 以达到 150mM 的终浓度。全部温育在室温下在定轨振荡下进行。

所用 CpG 为 24 聚体，其具有如下序列 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'(Seq ID No. 4)。

25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、5μg 的 CpG 和 25μg 的 Al+++。

1.4.20 佐剂系统 T: 3D-MPL 和 Al(OH)3

将得自 Brentag 的 Al(OH)3 在水中稀释为终浓度 1mg/ml (Al+++)，做注射用。在 30 分钟期间，StxB-OVA 被吸附到 Al+++上，浓度为 40 或 20μg/ml。加入 3D-MPL，以达到 100μg/ml 浓度，并温育 30 分钟，然后加入 NaCl 以达到 150mM 的终浓度。全部温育在室温下在定轨振荡下进行。

25μl 注射体积对应于 1 或 0.5μg 的 STxB-Ova、2.5μg 的 3D-MPL 和 25μg 的 Al+++。1μg 的 STxB-Ova 的结果在图 16 中示出。注射 0.5μg 的 STxB-Ova 的实验没有显示，但给出了与图 16 所示的可比较的结果。

1.4.21 佐剂系统 U: TLR2-配体

所用 TLR2 配体为合成的 Pam3CysSerLys4，其是从 Microcollections 购买的细菌脂肽（其已知是 TLR2 特异性的）。在 NaCl 150mM 或 PBS pH7.4 中稀释 StxB-OVA，以达到 10 或 20μg/ml 的终浓度。然后加入大量无菌的 Pam3CysSerLys4，以达到 40、100 和 200μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 5 或 10μg 的 Pam3CysSerLys4。（5μg 的结果在图 21 中示出，参见 3.2.9 部分对其他剂量 TLR2 的结果的讨论）

在其他实验中，25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-OVA 和 1μg 的 Pam3CysSerLys4。

1.4.22 佐剂系统 V: TLR7/8 配体

所用 TLR7/8 配体是称为 resiquimod 或 R-848(Cayla)的咪喹莫特衍生物。R-848 是咪唑并喹啉家族的低分子量化合物，其在动物模型中具有很强的抗病毒和抗肿瘤特性。咪喹莫特的活性主要是通过诱导细胞因子介导的，所述细胞因子包括 IFN-a 和 IL-12。R-848 是咪喹莫特的更强效类似物(Akira, S. 和 Hemmi, H.; IMMUNOLOTY LETTER, 85 (2003), 85-95)。

在 PBS pH7.4 中稀释 StxB-OVA，以达到 10 或 20μg/ml 的终浓度。然后加入大量无菌的 R-848，以达到 20 和 100μg/ml 的终浓度。在每次加入组分之间，搅拌中间产物 5 分钟。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 1 或 5μg 的 R-848。在其他实验中，25μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-OVA 和 0.5μg 的 R-848。

1.4.22 佐剂系统 W: AlPO4

1.4.22.1 佐剂系统 W1

将得自 Brentag 的 AlPO4 在水中稀释为终浓度 0.5mg/ml (Al+++)，做注射用。在 30 分钟期间，StxB-OVA 被吸附到 Al+++上，浓度为 10μg/ml，然后加入 NaCl，以达到 150mM 的终盐浓度。全部温育在室温下在定轨振荡下进行。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova 和 25μg 的 Al+++。

1.4.22.2 佐剂系统 W2

将得自 Brentag 的 AlPO4 在 PBS pH7.4 中稀释为终浓度 0.5mg/ml (Al+++)。在 30 分钟期间，STxB-OVA 被吸附到 Al+++上，浓度为 10μg/ml。全部温育在室温下在定轨振荡下进行。

50μl 注射体积对应于 0.5μg 的 STxB-Ova、5μg 的 CpG 和 25μg 的 Al+++。按 XXXXX 中所述的 SDS-PAGE 检查表明，约 70%的抗原没有吸附到 AlPO4 上。

1.5 确定抗原/金属盐复合物上吸附的抗原的水平

将目的制剂在 6500g 离心 6 分钟。使所得上清液的样品在 95℃变性 5 分钟，并加载到在还原性样品缓冲液中的 SDS-PAGE 凝胶上。不含佐剂的抗原样品也进行加载。然后在 200V、200mA 电泳凝胶 1 小时。接着按照 Daichi 方法银染凝胶。通过比较佐剂化制剂的样品

与无佐剂抗原的样品，确定制剂中游离抗原的水平。也可以使用本领域熟知的其他技术，如蛋白印迹。

实施例 2：给 C57/B6 小鼠接种本发明的疫苗

用上面所述的各种制剂接种 6-8 周龄的 C57BL/B6 雌小鼠（10 只/组）。小鼠得到一次注射或相隔 14 天的两次注射，且在 1、2、3 和 8 周放血（实际放血天数参见具体实施例）。以肌内方式接种小鼠（将 25μl 或 50μl 终体积注射到左侧腓肠肌内）。以 $5\ 10^7$-10^8VP 的各种剂量注射卵清蛋白重组腺病毒。

在完全培养基中实施转体内（ex-vivo）PBL 刺激，所述完全培养基是 RPMI 1640(Biowitaker)，其补加了 5%FCS(Harlan, Holland)，抗小鼠抗体 CD49d 和 CD28(BD, Biosciences)每种各 1μg/ml，2mM L-谷氨酰胺，1mM 丙酮酸钠，10μg/ml streptamycin sulfate，10 单位/ml 青霉素 G 钠(Gibco)，10μg/ml streptamycin，50μM B-ME 巯基乙醇和 100X 稀释的非必需氨基酸，所有这些添加剂均来自 Gibco Life Technologies。肽刺激总是在 37℃，5% CO2 下进行。

2.1 免疫学测定

2.1.1 抗原特异性 T 细胞的检测

分离 PBL 和四聚体染色。血液取自后眼窝静脉（retro orbital vein）（每只小鼠 50μl，每组 10 只小鼠）并直接在 RPMI+肝素(LEO)培养基中稀释。通过 lymphoprep 梯度(CEDERLANE)分离 PBL。然后洗涤、计数细胞，且最终将 1-5 10^5 个细胞重悬在含有 1/50 终浓度(f.c.)的 CD16/CD32 抗体(BD Biosciences)的 50μl FACS 缓冲液(PBS, FCS 1%,0.002%NaN3)中。10 分钟后，向细胞悬浮液中加入 50μl 的四聚体混合物。四聚体混合物包含分别来自 Immunosource 或 Immunomics Coulter 的 0.2μl 或 1μl siinfekl-H2Kb 四聚体-PE，根据可用性而定。抗 CD8a-PercP(1/100 f.c.)和抗 CD4-APC(1/200 f.c.) (BD Biosciences)抗体也加入测试。然后在室温放置细胞 45 分钟（对 Immunosource 四聚体而言）或在 37℃放置细胞 10 分钟（对 Immunomics Coulter 四聚体而言），然后洗涤一次并使用 FACS Calibur™ 用 CELLQuest™ 软件进行分析。

2.1.2 细胞内细胞因子染色(ICS)

对如 2.1.1 段中所述采集的血液样品进行 ICS。

将 5-10 10^5PBL 重悬于完全培养基中，所述完全培养基补加了或没有补加 1μg/ml 的 siinfekl 肽或 17 个 15 聚体的 Ova 肽的集合（11 个 I 型 MHC 限制的肽和 6 个 II 型 MHC 限制的肽），每一 Ova 肽的浓度都是 1μg/ml。2 小时后，加入 1μg/ml 布雷菲尔德菌素-A(BD Biosciences)，进行 16 小时，并在总计 18 小时后收集细胞。洗涤细胞一次，然后用抗小鼠抗体（全部购自 BD，Biosciences）染色；所有进一步的步骤都在冰上进行。首先在 50μl CD16/32 溶液（1/50f.c.，FACS 缓冲液）中温育细胞 10 分钟。加入 50μl T 细胞表面标记的混合物（1/100 CD8a perCp，1/100 CD4 PE），并温育细胞 20 分钟，然后洗涤细胞。在 200μl 透化/固色（perm/fix）溶液(BD, Biosciences)中固定及透化细胞，在透化/洗涤(perm/wash)缓冲液(BD, Biosciences)中洗涤一次，然后在 4℃用抗 IFNg-APC 和抗 IL2-FITC 各染色 2 小时或者过夜。用 FACS Calibur™ 用 CELLQuest™ 软件分析数据。

在图 14B 中，抗 CD4 抗体用 APC Cy7 标记，抗 CD8 抗用 PercP Cy5.5 标记体，而且在细胞因子染色步骤中包括抗 TNFa-PE 抗体。

2.1.3 在体内检测到的细胞介导的细胞毒素的活性（体内 CMC）

为评价 siinfekl 特异性的细胞毒性，给免疫小鼠和对照小鼠注射由 2 个 CFSE 差别标记的同源脾细胞和淋巴结群体组成的靶混合物，所述混合物加载了或没有加载 1nM siinfekl 肽。使用浓度 0.2μM 或 2.5μM 的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯（CFSE；分子探针 – Palmoski 等人；2002, J. Immunol. 168, 4391-4398）进行差别标记。两种类型的靶都以 1/1 的比率合并，并重悬为浓度 10^8 靶/ml。第一次注射后 15 天，将每只小鼠 200μl 靶混合物注射到尾静脉内。通过对从在不同的时间点（在靶注射后 4、18 或 24 小时）被宰杀的动物身上采集的引流淋巴结（draining lymphnode）或血液（颈静脉）进行 FACS® 分析来评价细胞毒性。相对于抗原阴性的对照，用下式计算加载了 siinfekl 的靶细胞的平均裂解百分比。

$$\text{裂解\%} = 100 - \left(\frac{\text{校正靶(+)}}{\text{对照靶(-)}} \times 100 \right)$$

$$\text{校正靶}+ = \text{靶}+ \times \frac{(\text{preinj.-})}{(\text{preinj.+})}$$

注射前的靶细胞 = 体内注射前，由 FACS 获得的肽脉冲的靶（preinj.+）和非脉冲靶（preinj.-）的混合物。

校正靶 (+)= 体内注射后，由 FACS 获得的肽脉冲的靶数目，进行校正是为了把注射前的混合细胞中的 preinj.+ 细胞数目考虑在内（见上）。

2.1.4 Ag 特异性抗体滴定（总 IgG 的个别分析）：ELISA

在第二次注射后 15 天和 40 天评价血清学分析。通过后眼窝穿刺给小鼠（每组 10 只）放血。用 ELISA 测量抗-ova 的总 IgG。在 4℃用抗原包被 96 孔板(NUNC, 免疫吸附板)过夜（每孔 50μl ova 溶液（ova 10μg/ml，PBS）。然后在洗涤缓冲液（PBS/0.1%Tween 20(Merck)）中洗涤板并用 100μl 饱和缓冲液（PBS/0.1% Tween 20/1%BSA/10%FCS）在 37℃饱和 1 小时。在洗涤缓冲液中又洗涤三次后，加入 100μl 稀释的小鼠血清并在 37℃温育 90 分钟。再洗涤三次后，将板与在饱和缓冲液中稀释 1000 倍的生物素化抗小鼠总 IgG 在 37℃再温育 1 小时。饱和之后按照上述再洗涤 96 孔板。加入在饱和缓冲液中稀释 1000 倍的链霉抗生物素蛋白过氧化物酶(Amersham)溶液，每孔 50μl。最末次洗涤是在洗涤缓冲液中的 5 步洗涤。最后，每孔加入 50μl TMB（溶于酸性缓冲液中的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺—H_2O_2 的浓度是 0.01% - BIORAD），并将板室温放在黑暗中 10 分钟。

为了终止反应，每孔加入 50μl H_2SO_4 0.4N。用 BIORAD 公司的 ELISA 读板仪（plate reader）在 450/630nm 波长读出吸收。使用 softmax-pro 软件计算结果。

2.1.5 B 细胞酶联免疫斑点(Elispot)

在第二次注射后 78 天收集脾细胞和骨髓细胞，并在完全培养基上 37℃培养五天，所述完全培养基补加了 3μg/ml CpG2006 和 50U/ml rhIL-2 以使记忆 B 细胞分化成抗体分泌性浆细胞。五天后，将 96 孔过滤器板与 70%乙醇温育 10 分钟，洗涤，并用卵清蛋白(50μg/ml)或山羊抗小鼠 Ig 抗血清包被。然后用完全培养基饱和它们。收获细胞，洗涤，并分装到板上，每孔 2×10^5 个细胞，于 37℃进行 1 小时。接

着于4℃过夜贮存板。第二天，通过用PBS Tween 20 0.1%洗涤板来去除细胞。然后将细胞与在1/500 PBS中稀释的抗IgG生物素化抗体在37℃温育1小时，洗涤，并与extravidin-辣根过氧化物酶(4μg/ml)温育1小时。洗涤步骤后，通过与氨基-乙基-咔唑(AEC)和H_2O_2的溶液温育10分钟，并用自来水洗涤板进行固定，来揭示斑点。每一个已分泌IgG或Ova特异性IgG的细胞均呈现为红色斑点。结果用每100个总IgG斑点中ova-特异性IgG斑点的频率表示。

3. 结果

下述结果表明通过将STxB系统与各种佐剂系统或一些其组分组合起来，STxB系统诱导CD8反应的效率急剧提高。

3.1 佐剂系统A和H的数据

3.1.1 对AS A和AS H的初级反应的评价

所得结果表明没有佐剂时STxB-ova的低剂量(0.2μg)免疫不能诱导可被转体内检测到的强的CD8 T细胞免疫反应。相反，当STXB-OVA与佐剂系统A或H之一组合起来时，观察到了强的免疫反应。而且，在佐剂化的蛋白上证实了明确的优势。

用佐剂系统A或H佐剂化的STxB-ova在诱导强而持久的初级反应方面是强效的。它诱导了高频率的抗原特异性CD8 T细胞（图1－对于AS H，注射液包括0.2μg的STxB-OVA，0.5μg的3D-MPL和QS21，和5μg的CPG。方法按上面2.1.1所述的实行，在第一次注射后7天给小鼠放血）。另外，图2（对于AS H，注射液包括0.2μg的STxB-OVA，0.5μg的3D-MPL和QS21，和5μg的CPG。方法按上面2.1.1所述的实行，在第一次注射后14天给小鼠放血）表明在注射后第7天至第14天siinfekl特异性CD8反应仍然在增加。这种情况在接种了佐剂化的蛋白后没有观察到，但却有由活载体如腺病毒诱导的初级反应的特征。引发的CD8 T细胞是容易地分化的效应T细胞，不论是否用免疫优势肽或ova肽集合进行刺激，所述效应T细胞都能产生IFNγ（分别在图3和4中示出，对于AS H，注射液包括0.2μg的STxB-OVA，0.5μg的3D-MPL和QS21，和5μg的CPG。方法按上面2.1.2所述的实行，在第一次注射后14天给小鼠放血）。用肽集合重刺激后观察到更高频率的反应CD8 T细胞，表明初级CD8 T细胞库并不局限于I类免疫优势表位。另外，只有当STxB-ova被佐剂

化时，才能在体内检测到高细胞毒素活性（图 5－对于 AS H，注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.3 所述的实行，在靶注射后 18 小时进行）。

最后，由 AS H 佐剂化的 STxB-ova 诱导的初级反应是强烈持久的，如图 6B 中所释（注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.1 所述的实行，在不同时间点给小鼠放血）。

3.1.2 对 AS A 和 AS H 的次级反应的评价

将 STxB 毒素递送系统与强佐剂组合起来也能提高次级免疫反应的幅度和持久性。通过在加强后 47 天评价反应最好地例证了这一点。重要的是，由佐剂化的 STxB-OVA 诱导的高 CD8 反应与由重组腺病毒引发/佐剂化蛋白加强策略诱导的反应有相似的强度和持久性（图 6A－对于 AS H，注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.1 所述的实行，在第二次注射后 47 天给小鼠放血）。关于效应 T 细胞群体，在 CD4 和 CD8 T 细胞区室内都能检测到细胞因子产生性 T 细胞（图 7 和 8－对于 AS H，注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.2 所述的实行，在第二次注射后 47 天给小鼠放血，用 ova 肽集合刺激 PBL）。此外，在所述晚的时间点上，在靶注射后 4 小时（数据未显示）和 24 小时（图 9－对于 AS H，注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.3 所述的实行）的体内仍能检测到细胞毒素活性。

研究了加强后 15 天和 40 天的体液反应（图 10a－对于 AS H，注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.4 所述的实行，结果通过计算每组 10 个小鼠的 geomean 表示）。没有佐剂时，单独的 STxB-ova 不能诱导任何 B 细胞反应。相反，在两个测试的时间点上，不论佐剂化蛋白是否偶联在 STxB 上，都检测到了相等的抗体效价。

在图 10B 中（注射液包括 0.2μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.5 所述的实行），显示了注射后 78 天的抗 ova 记忆 B 细胞频率。尽管两次注射后 15 天和 40

天检测的抗体效价是相等的，但与佐剂化蛋白相比，记忆 B 细胞反应的质量是不同的，因为当 STxB-ova 被佐剂化时，检测到了更高频率的记忆 B 细胞。单独的 STxB-ova 本身不能诱导记忆 B 细胞。

有趣的是，当引发和加强的间隔时间用 42 天代替 14 天时（图 20－注射液包括 0.5μg 的 STxB-OVA 和 0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，方法按上面 2.1.4 所述的实行），由 STxB-OVA AS A 诱导的体液反应比 OVA AS A 诱导的高，再次表明当与佐剂化组合起来时，载体化可以诱导更高频率的 B 细胞记忆细胞。

3.1.3 由低剂量 STxB-OVA 与 AS H 佐剂系统组合起来诱导的免疫反应的评价

图 13（注射液包括 0.008、0.04、0.2 或 1μg 的 STxB-OVA，0.5μg 的 3D-MPL 和 QS21，和 5μg 的 CPG。方法按上面 2.1.1 所述的实行，在第一次注射后 14 天给小鼠放血）表明，在单次注射剂量低至 8ng 的 STxB-ova（在 AS H 中制备，对应于 4ng 抗原）后 14 天，仍能检测到 siinfekl 特异性的 CD8 群体。这些结果表明，佐剂与 STxB 系统的组合使用允许显著降低抗原剂量而不会减弱被诱导的 T 细胞反应。

3.2 由 STxB-OVA 与其他佐剂系统组合起来诱导的免疫反应的评价

接下来我们想查出不同于 AS A 或 AS H 的佐剂系统是否也能与 STxB 载体化系统协同作用。

3.2.1 接种 AS A、F、D 或 E STxB-ova 疫苗后的免疫反应评价

初级反应评价清楚地表明，无论测试什么佐剂系统，佐剂化的 STxB-ova 都诱导了高频率的抗原特异性 TCD8（图 11—方法按上面 2.1.1 所述的实行，在第一次注射后 13 天给小鼠放血）。明显地，甚至是 AS D 和 AS E 也能看到这一点，对于 AS D 和 AS E，在用佐剂化蛋白单次接种后通常不能检测到与检测的 CD8 反应。佐剂化的 STxB-ova 强烈地引发了很容易分化成细胞因子分泌性效应 T 细胞的 CD8 T 细胞（数据未显示）。

3.2.2 由 STxB-OVA 与佐剂系统（3D-MPL-AS C2，QS21-AS B，CpG2006-AS G）的单个组分组合起来诱导的免疫反应的评价

接下来我们评价在体内的前面佐剂系统的不同组分。图 12A（方

法按上面 2.1.1 所述的实行，在第一次注射后 15 天给小鼠放血)表明，如果 STxB-ova 被单个的免疫刺激剂如 QS21 或 TLR9-配体如 CpG，以及在较小程度上被 TLR-4 配体如 3D-MPL (AS C2)佐剂化，就能检测到 siinfekl 特异性的 CD8 群体，后面的这种免疫刺激剂当按高剂量使用时甚至更有效（AS C1），如图 16 所示。如上述，这些被引发的 CD8 T 细胞很容易分化成细胞因子分泌性效应细胞（数据未显示）。由每次佐剂组分单独诱导的次级 CD8 反应是相等的，但是当 STxB-ova 被 QS21 和至少一个 TLR 配体的组合佐剂化时，观察到更高的反应（图 12B-方法按上面 2.1.1 所述的实行，在第二次注射后 6 天给小鼠放血）。

3.2.3 由与佐剂 J 或佐剂 K 组合的 STxB-OVA 诱导的免疫反应的评价

与以前公开的观察结果相反的是，当 STxB-OVA 与乳剂如 IFA 组合时，也观察到 CD8 反应的增强。含有 IFA，即油包水乳剂的制剂，以剂量依赖性的方式增强了 CD8 反应。Siinfekl 特异性 CD8 T 细胞的增加的频率（图 14A）对应于增强的 CD8 效应子功能如细胞因子生产（图 14B）和细胞毒素活性（图 14C）。当 STxB-ova 与水包油乳剂组合起来时，得到了相似的结果。

3.2.4 由与佐剂系统 C1、B、K、F 或 T 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

接下来我们评价 AS T 和佐剂系统 F 的不同组分。图 16 表明，当与 STxB-OVA 组合起来时，每种组分都能增强 siinfekl 特异性的 CD8 T 反应。不过，当这些组分在制剂中结合起来时，观察到最高的反应。

3.2.5 由与佐剂 L、G 或 M 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

图 15 表明，STX-B-OVA 与 TLR 配体如代表了 B 类和 C 类的 polyI:C(TLR3)或 CpG 序列(TLR9)的组合显著地增强了 siinfekl 特异性的 CD8 T 反应的幅度。

3.2.6 由与佐剂系统 B、N 或 I 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

图 17 表明，当被单独的 QS21 或与 TLR3 配体(poly I:C)或 TLR9 配体(CpG)组合的 QS21 佐剂化时，由 STxB-OVA 诱导的 CD8 反应明

确地被促进。

3.2.7 由与佐剂系统 G、O、P 或 Q 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

图 18 表明，当被单独的 CpG 或与 IFA 或与不同的水包油乳剂组合的 CpG 佐剂化时，由 STxB-OVA 诱导的 CD8 反应明确地被促进。

3.2.8 由与佐剂系统 G、R 或 S 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

图 19 表明，当被单独的 CpG 或与 Al(OH)3 或 AlPO4 组合的 CpG 佐剂化时，由 STX-B-OVA 诱导的 CD8 反应明确地被促进。

3.2.9 由与佐剂系统 G、L、U 或 V 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

图 21 表明，除了 TLR9 和 3 配体外，STX-B-OVA 与 TLR2 和 TLR7/8 配体的组合也能显著增强 siinfekl 特异性的 CD8 T 反应的幅度。以 0.2-10μg 的剂量范围测试了 TLR2 配体。剂量低于 5μg 时看不到增强。有趣的是，当剂量增加到 10μg 时，看到了降低的反应。这可用 TLR2 配体诱导调控分子如 IL-10 的能力加以解释。

3.2.10 由与佐剂系统 W1 或 W2 组合的 STxB-ova 诱导的免疫反应的评价

图 22 表明，STxB-ova 和 AS W1(其在制剂中含有磷酸铝，制剂中抗原被吸附到铝盐上)的组合给予免疫反应超过用非佐剂化的 STxB-ova 肽所看到的很小的促进。不过，当这样配制组合物，从而一些抗原（在这种情况中为约 70%）没有吸附到铝盐上，例如用溶解到磷酸缓冲盐水中的铝盐进行吸附，如可在 AS W2 中看到的，那么看到了免疫反应超过由不含佐剂的 STxB-ova 所给予的反应的促进。

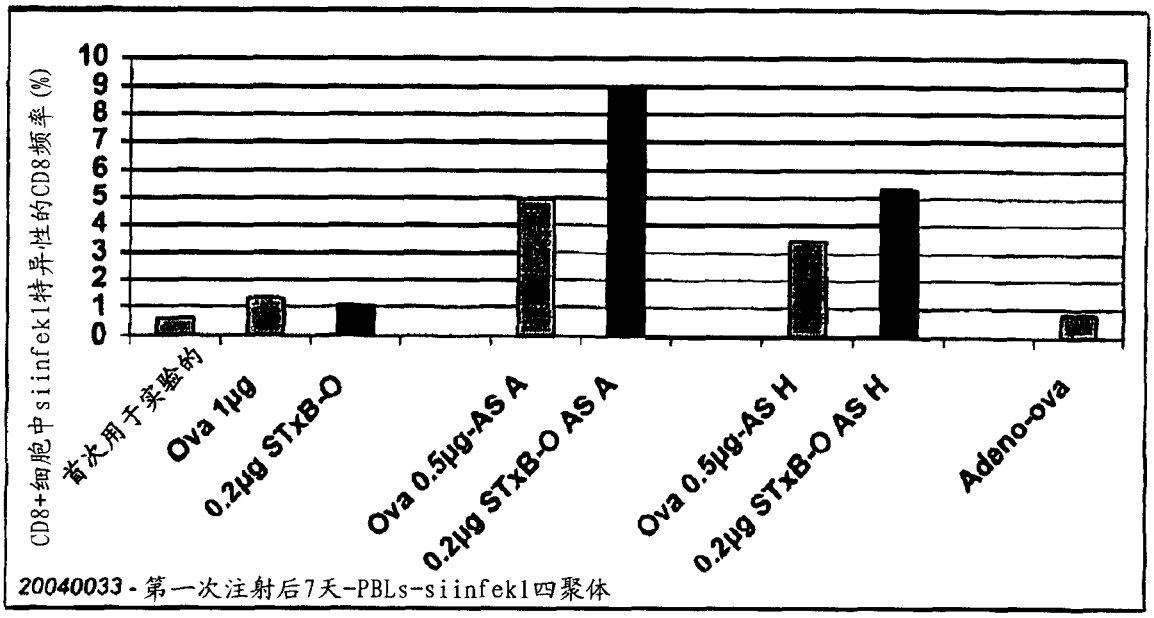

CD8+细胞中siinfekl特异性的CD8频率(%)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
首次用于实验的
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
Adeno-ova
20040033 - 第一次注射后7天-PBLs-siinfekl四聚体

图 1

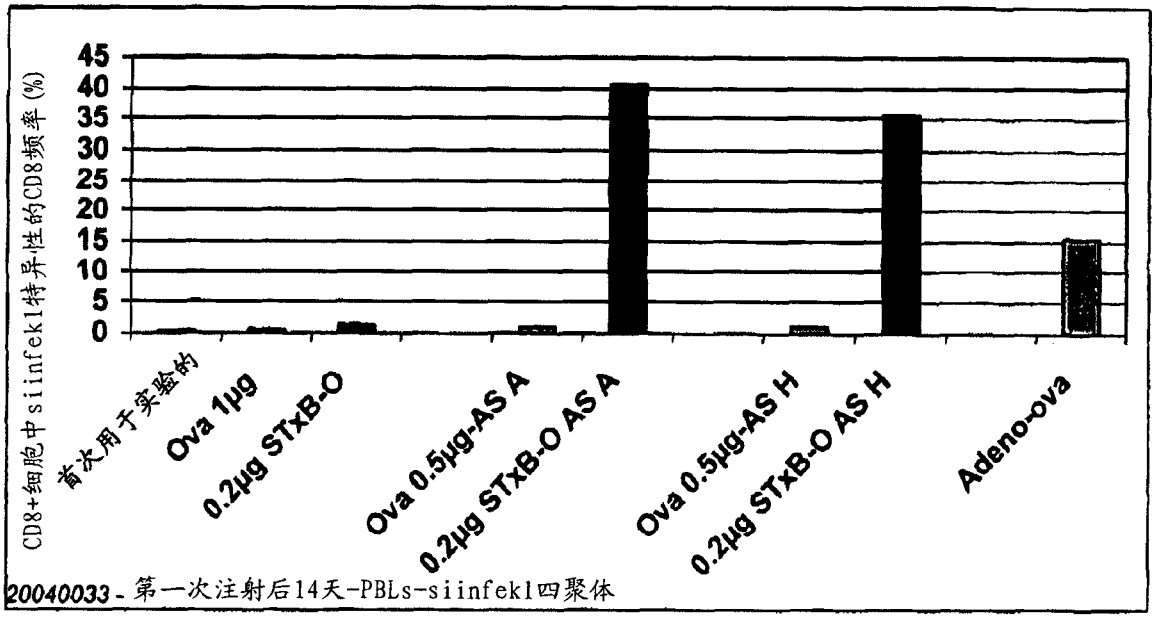

CD8+细胞中siinfekl特异性的CD8频率(%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
首次用于实验的
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
Adeno-ova
20040033 - 第一次注射后14天-PBLs-siinfekl四聚体

图 2

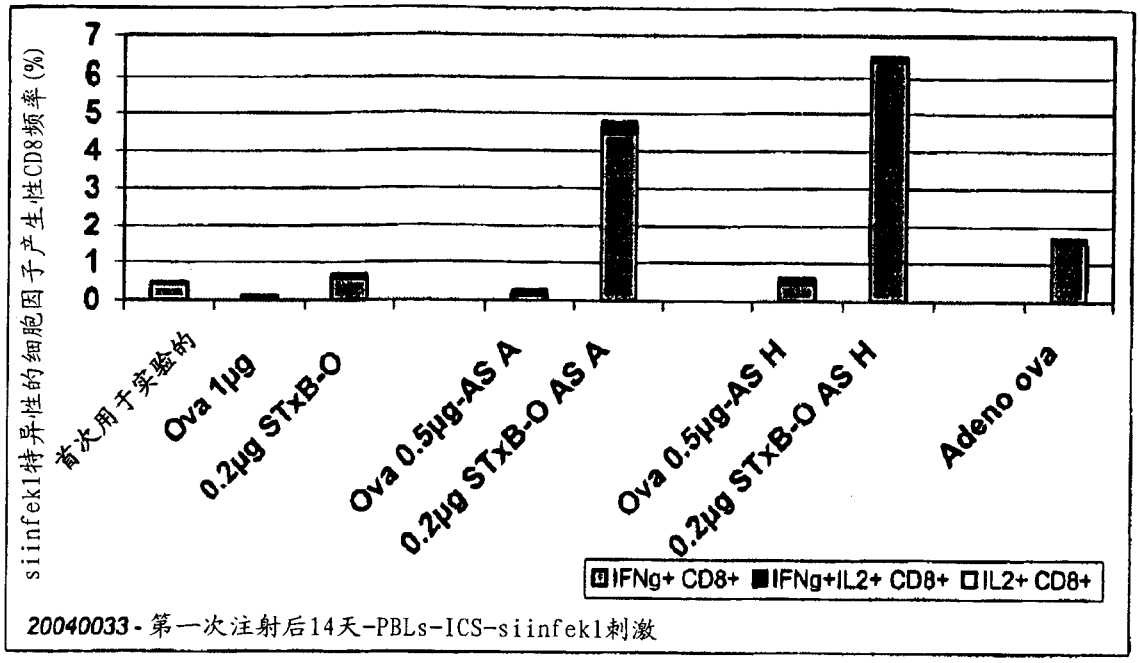

siinfekl特异性的细胞因子产生性CD8频率(%)
7
6
5
4
3
2
1
0
首次用于实验的
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
Adeno ova
IFNg+ CD8+ IFNg+IL2+ CD8+ IL2+ CD8+
20040033 - 第一次注射后14天-PBLs-ICS-siinfekl刺激

图 3

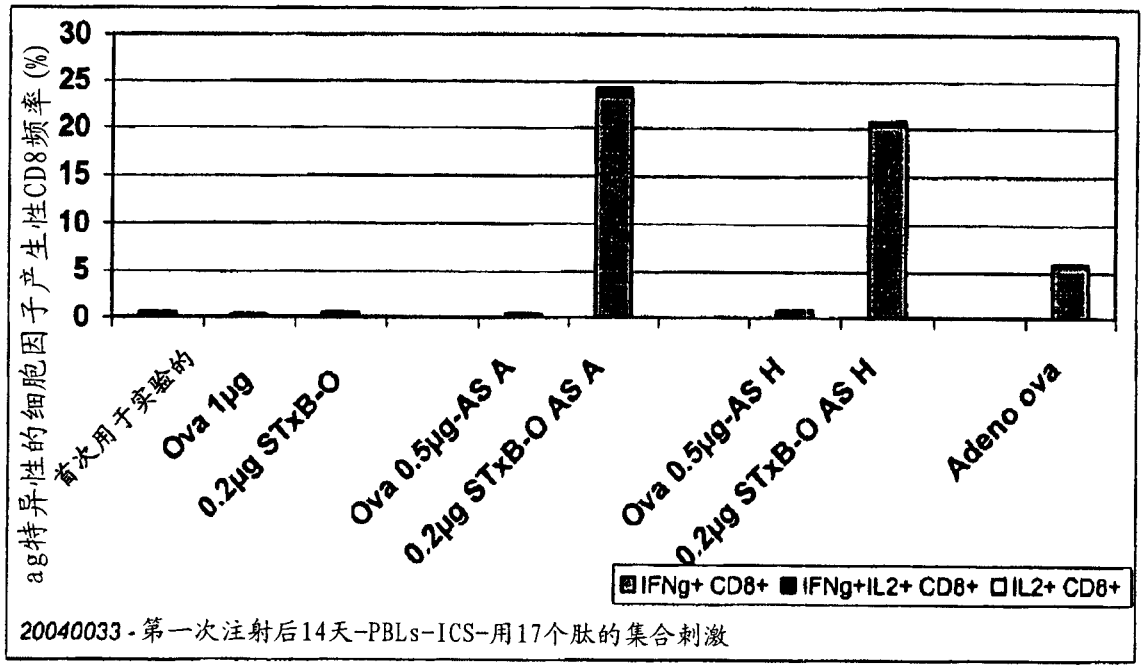

ag特异性的细胞因子产生性CD8频率 (%)
30
25
20
15
10
5
0
首次用于实验的
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
Adeno ova
IFNg+ CD8+ IFNg+IL2+ CD8+ IL2+ CD8+
20040033 - 第一次注射后14天-PBLs-ICS-用17个肽的集合刺激

图 4

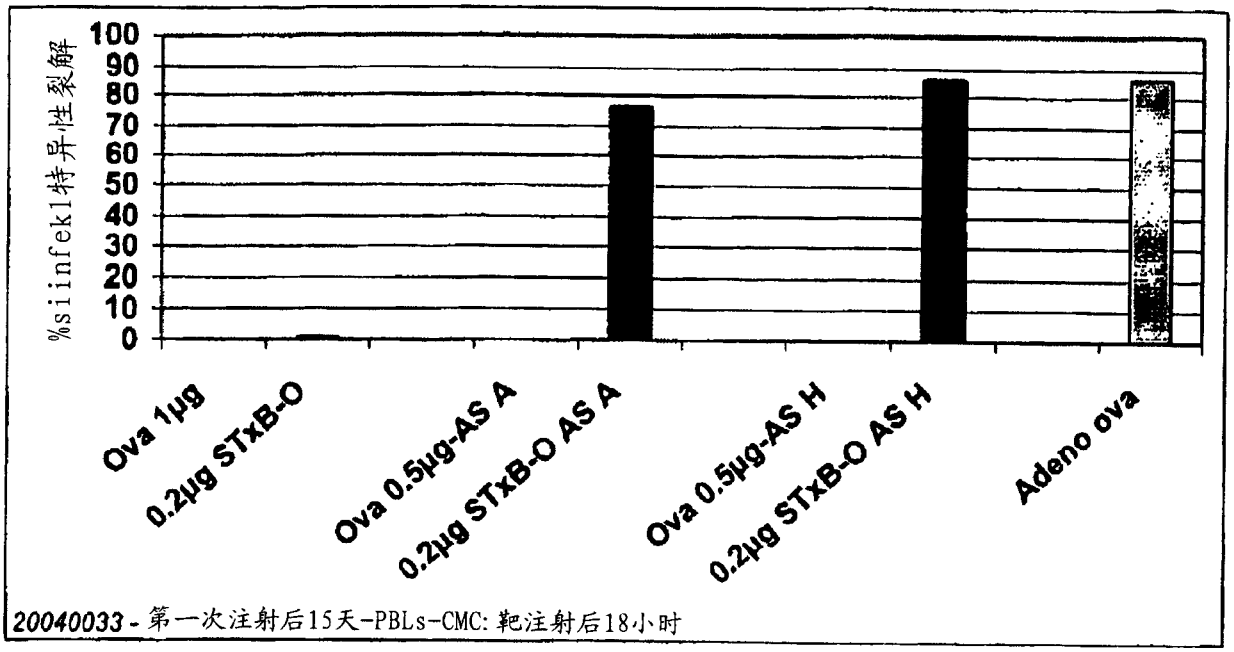

%siinfekl特异性裂解
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
Adeno ova
20040033 - 第一次注射后15天-PBLs-CMC: 靶注射后18小时

图 5

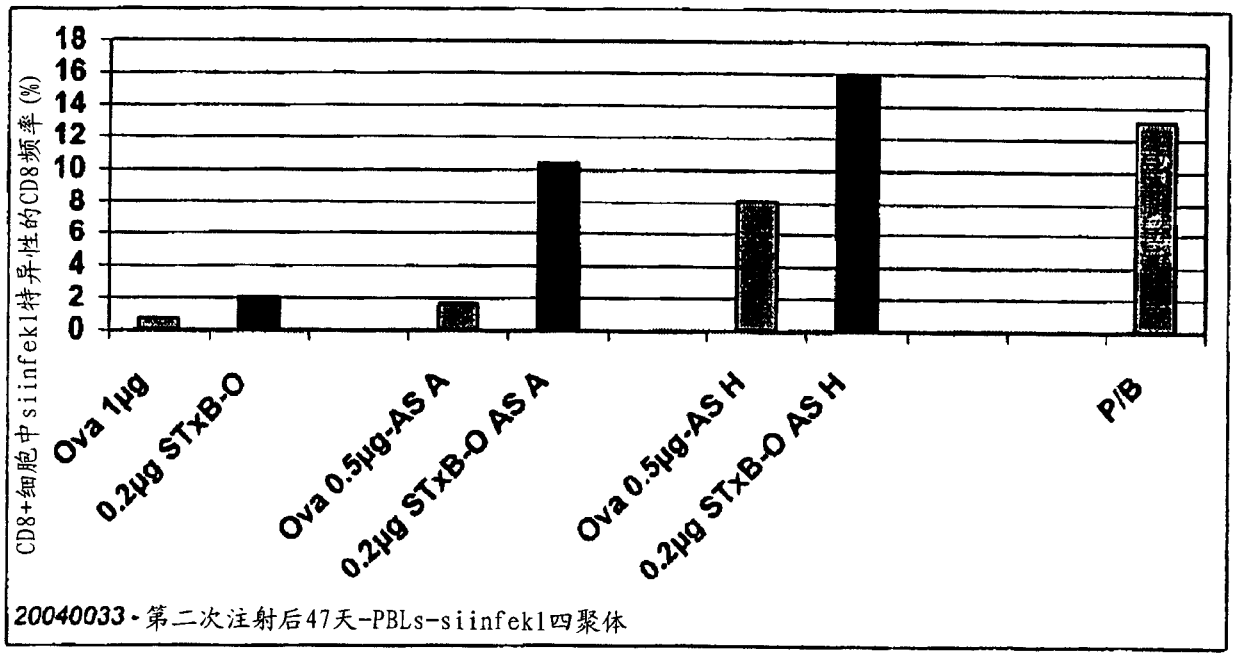

CD8+细胞中siinfekl特异性的CD8频率 (%)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
P/B
20040033 - 第二次注射后47天-PBLs-siinfekl四聚体

图 6A

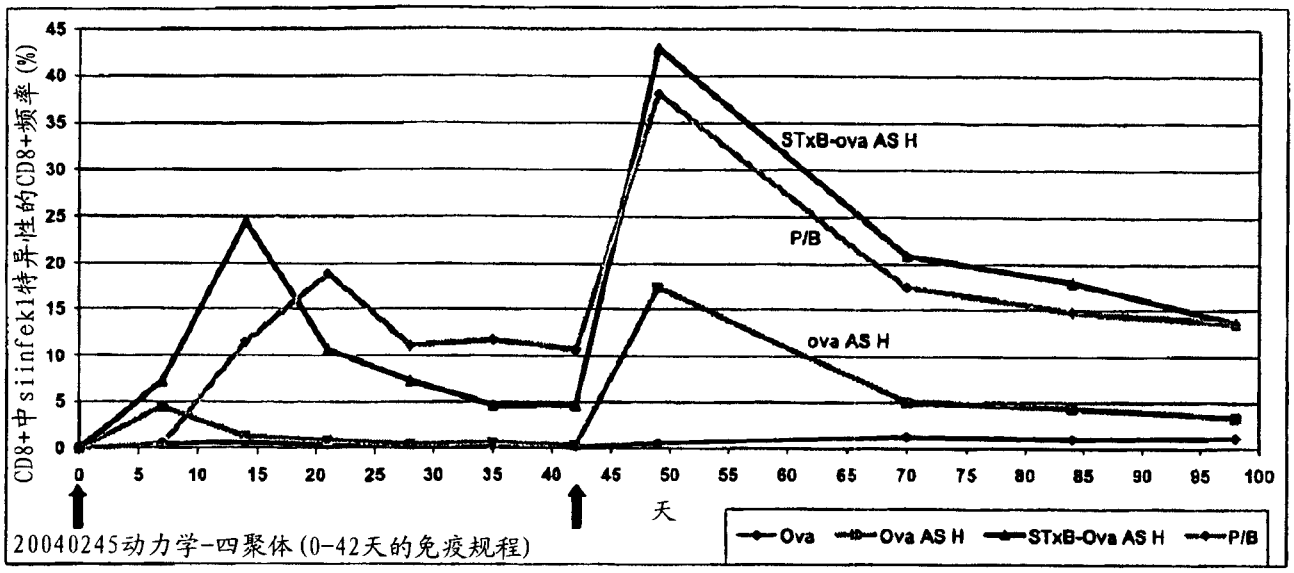

CD8+中siinfekl特异性的CD8+频率(%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
天
STxB-ova AS H
P/B
ova AS H
20040245动力学-四聚体(0-42天的免疫规程)
Ova
Ova AS H
STxB-Ova AS H
P/B

图 6B

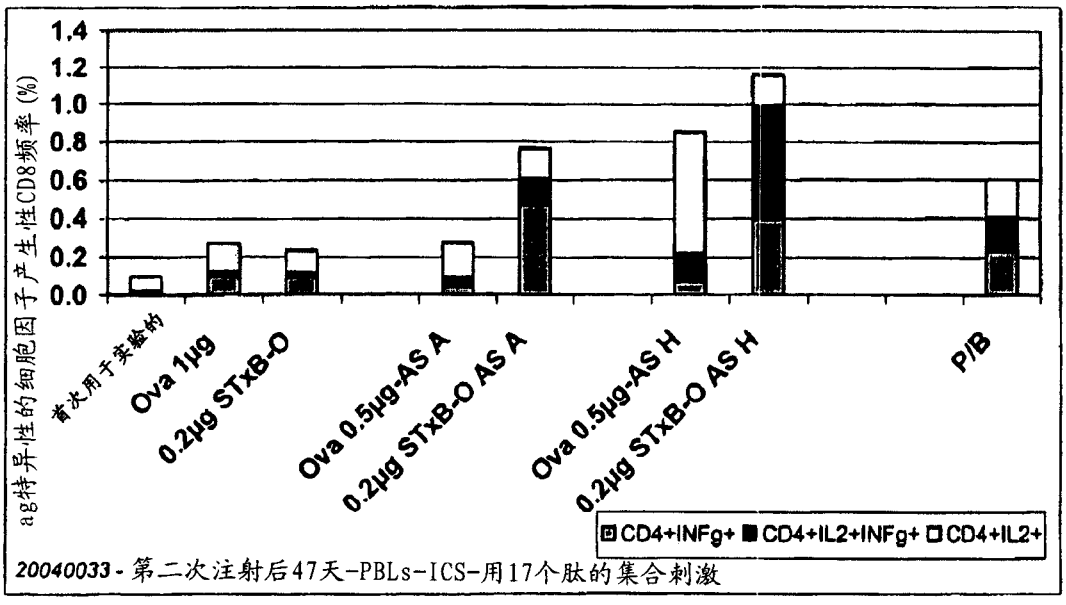

ag特异性的细胞因子产生性CD8频率(%)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
首次用于实验的
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
P/B
CD4+INFg+ CD4+IL2+INFg+ CD4+IL2+
20040033 - 第二次注射后47天-PBLs-ICS-用17个肽的集合刺激

图 7

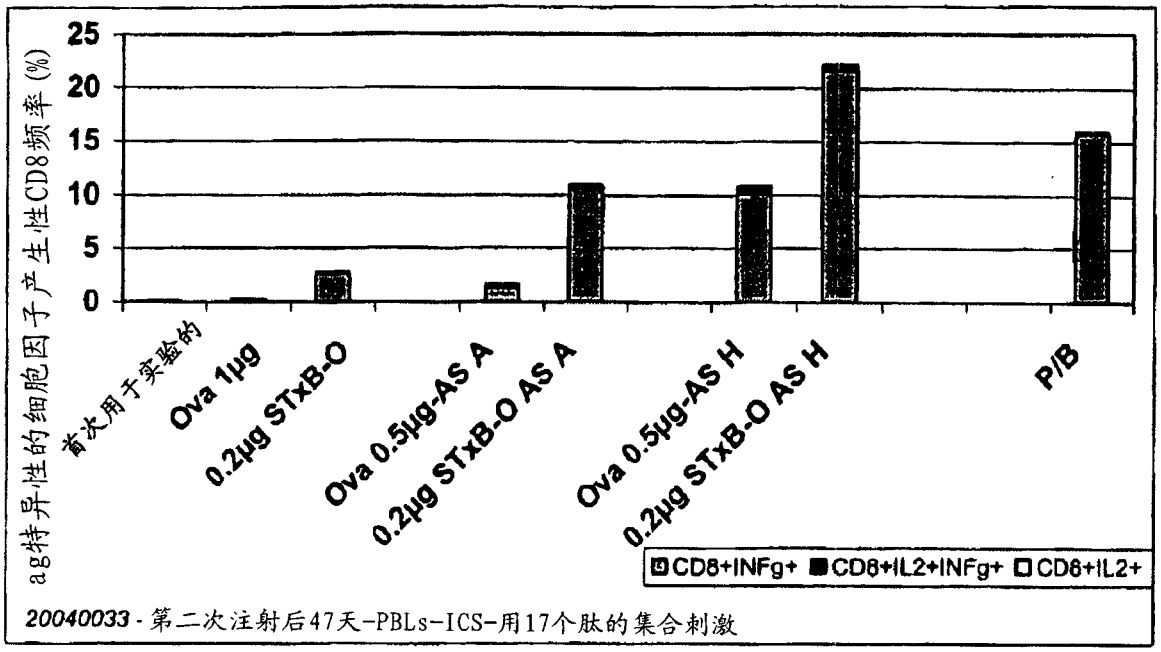

ag特异性的细胞因子产生性CD8频率 (%)
25
20
15
10
5
0
未用于实验的
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
P/B
CD8+INFg+
CD8+IL2+INFg+
CD8+IL2+
20040033 - 第二次注射后47天-PBLs-ICS-用17个肽的集合刺激

图 8

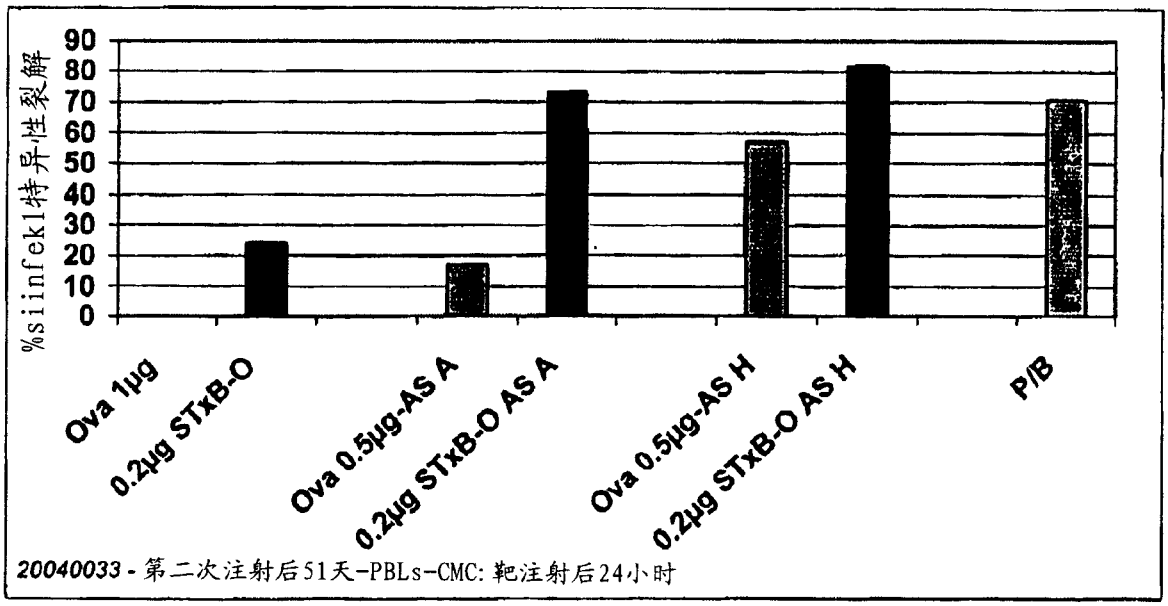

%siinfek1特异性裂解
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Ova 1μg
0.2μg STxB-O
Ova 0.5μg-AS A
0.2μg STxB-O AS A
Ova 0.5μg-AS H
0.2μg STxB-O AS H
P/B
20040033 - 第二次注射后51天-PBLs-CMC: 靶注射后24小时

图 9

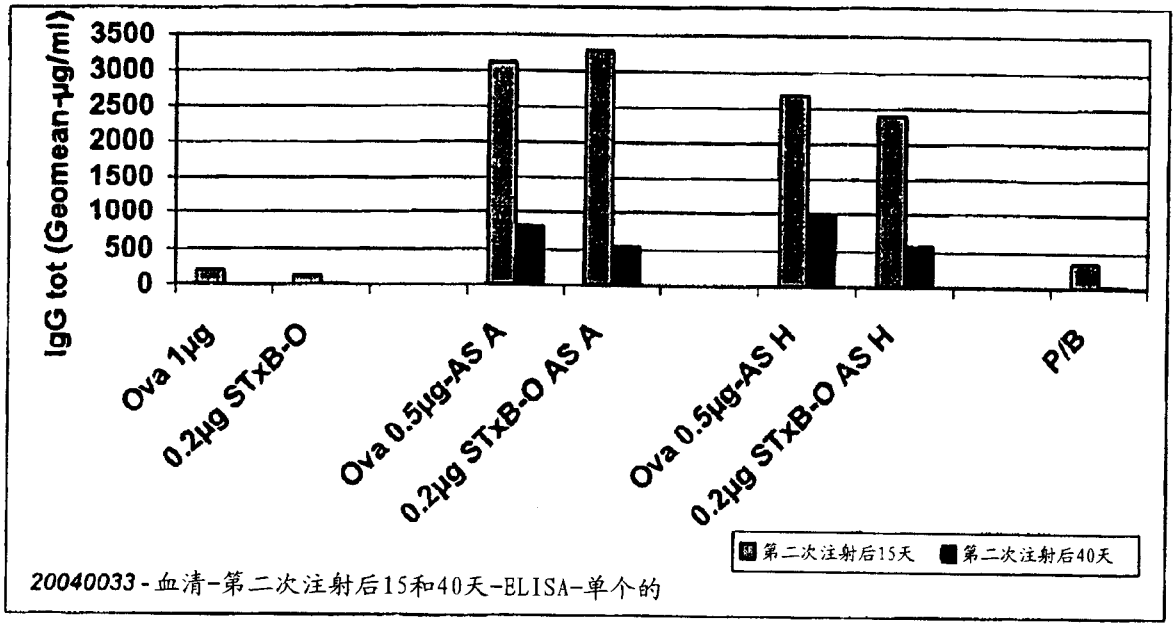

IgG tot (Geomean-µg/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Ova 1µg
0.2µg STxB-O
Ova 0.5µg-AS A
0.2µg STxB-O AS A
Ova 0.5µg-AS H
0.2µg STxB-O AS H
P/B
第二次注射后15天
第二次注射后40天
20040033 - 血清-第二次注射后15和40天-ELISA-单个的

图 10A

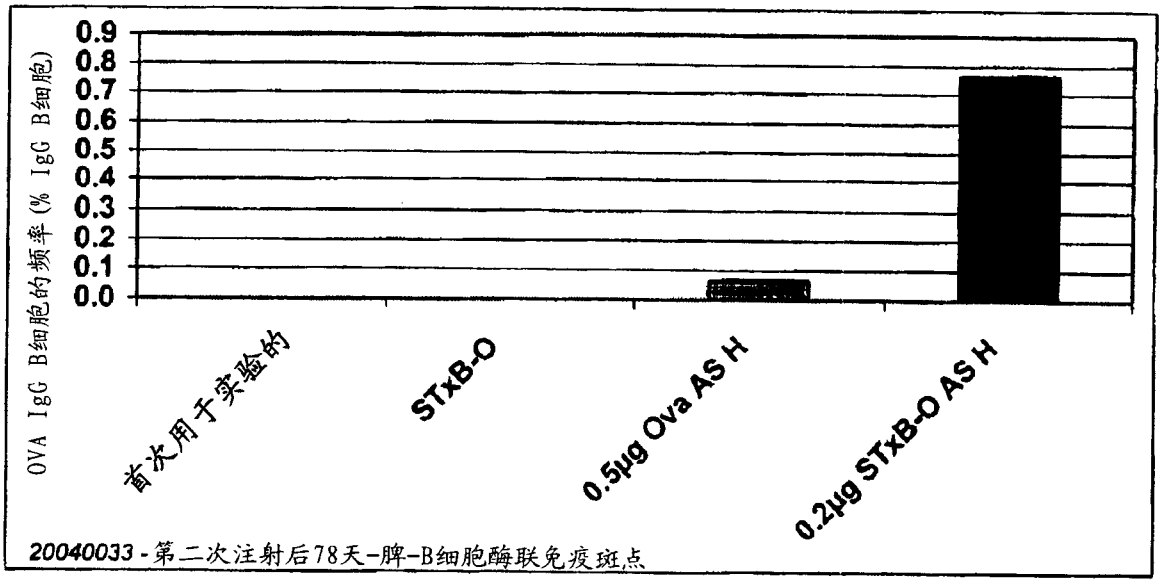

OVA IgG B细胞的频率(% IgG B细胞)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
首次用于实验的
STxB-O
0.5µg Ova AS H
0.2µg STxB-O AS H
20040033 - 第二次注射后78天-脾-B细胞酶联免疫斑点

图 10B

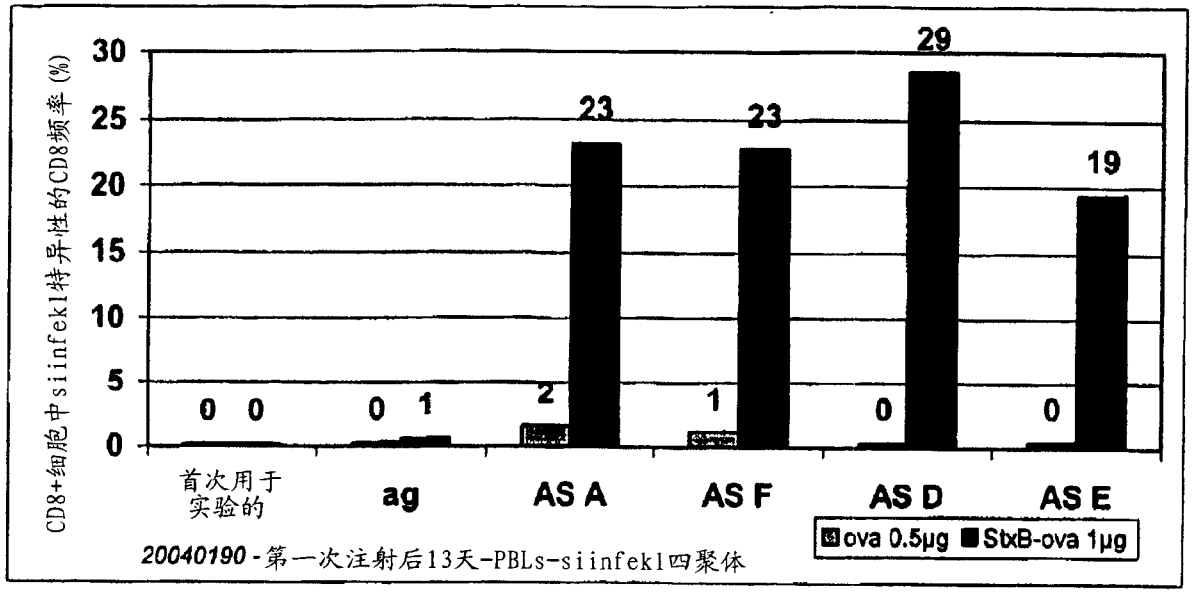

CD8+细胞中siinfekl特异性的CD8频率 (%)
30
25
20
15
10
5
0
0 0
0 1
2
23
1
23
0
29
0
19
首次用于实验的
ag
AS A
AS F
AS D
AS E
ova 0.5μg
StxB-ova 1μg
20040190 - 第一次注射后13天-PBLs-siinfekl四聚体

图 11

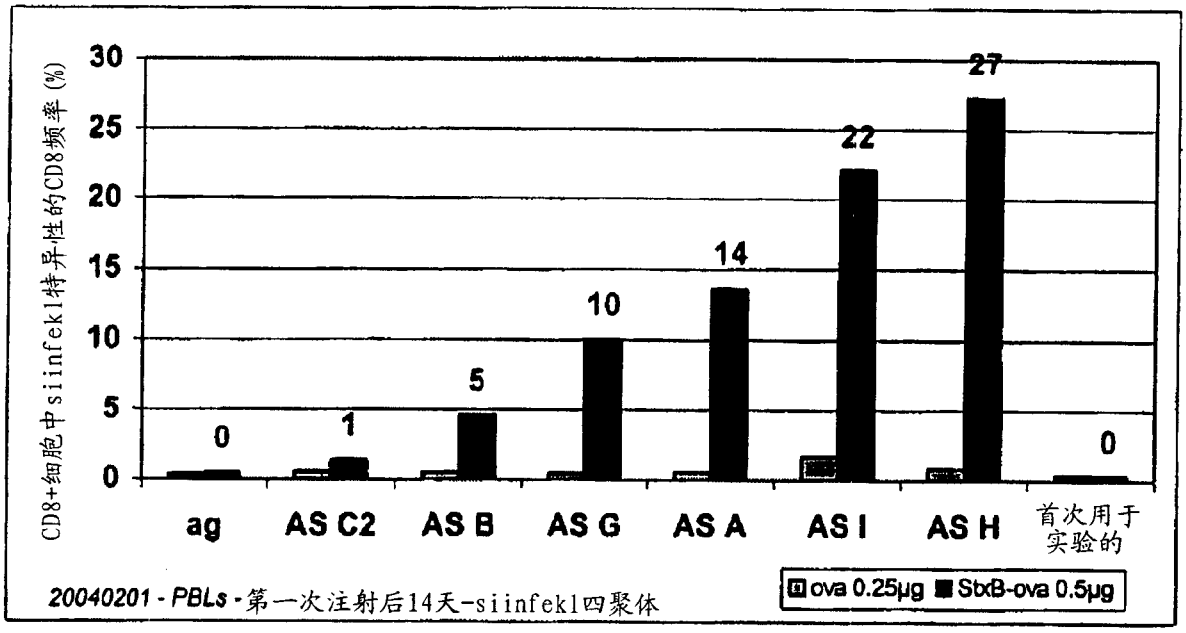

CD8+细胞中siinfekl特异性的CD8频率 (%)
30
25
20
15
10
5
0
0
1
5
10
14
22
27
0
ag
AS C2
AS B
AS G
AS A
AS I
AS H
首次用于实验的
ova 0.25μg
StxB-ova 0.5μg
20040201 - PBLs - 第一次注射后14天-siinfekl四聚体

图 12A

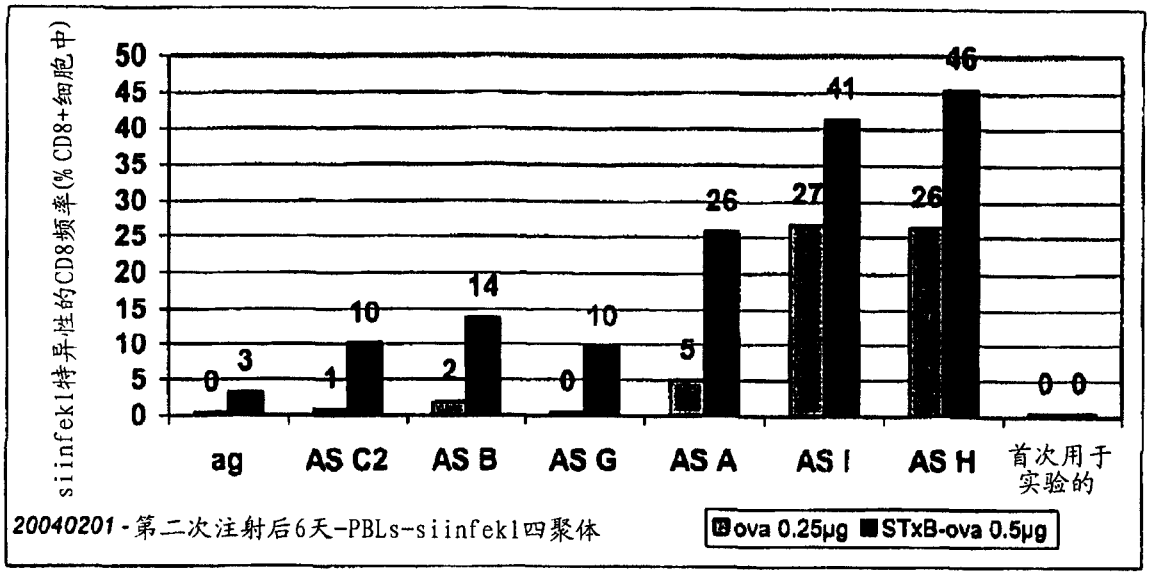

siinfekl特异性的CD8频率(% CD8+细胞中)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 3
1 10
2 14
0 10
5 26
27 41
26 46
0 0
ag
AS C2
AS B
AS G
AS A
AS I
AS H
首次用于实验的
20040201 -第二次注射后6天-PBLs-siinfekl四聚体
ova 0.25μg
STxB-ova 0.5μg

图 12B

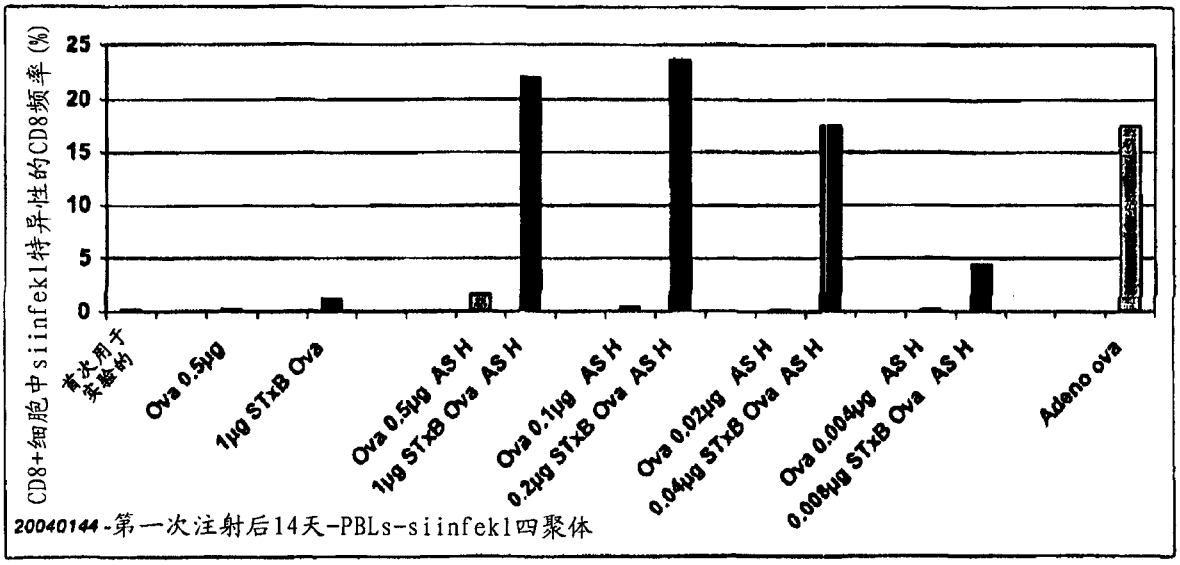

CD8+细胞中siinfekl特异性的CD8频率 (%)
25
20
15
10
5
0
首次用于实验的
Ova 0.5μg
1μg STxB Ova
Ova 0.5μg AS H
1μg STxB Ova AS H
Ova 0.1μg AS H
0.2μg STxB Ova AS H
Ova 0.02μg AS H
0.04μg STxB Ova AS H
Ova 0.004μg AS H
0.008μg STxB Ova AS H
Adeno ova
20040144 -第一次注射后14天-PBLs-siinfekl四聚体

图 13

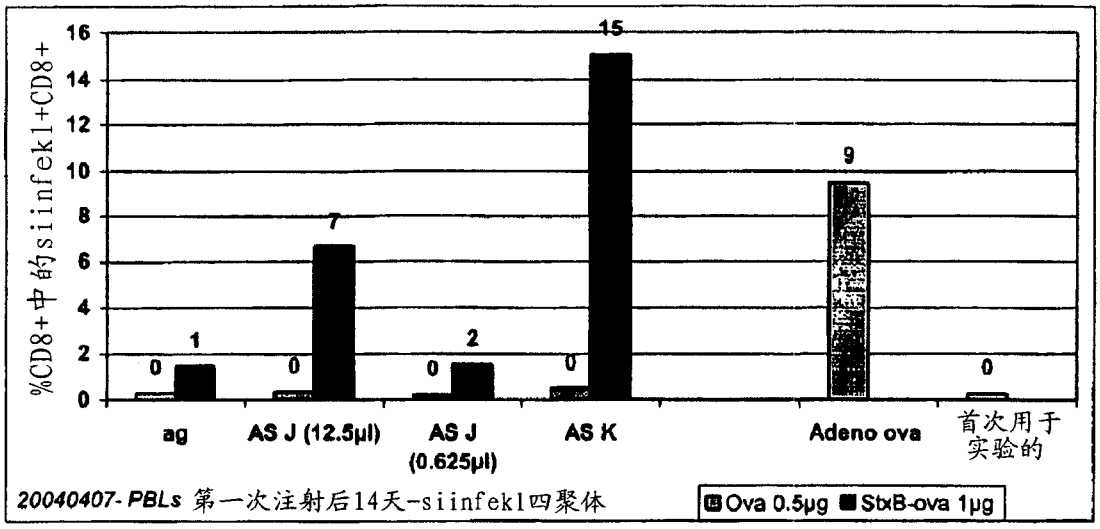


图 14A

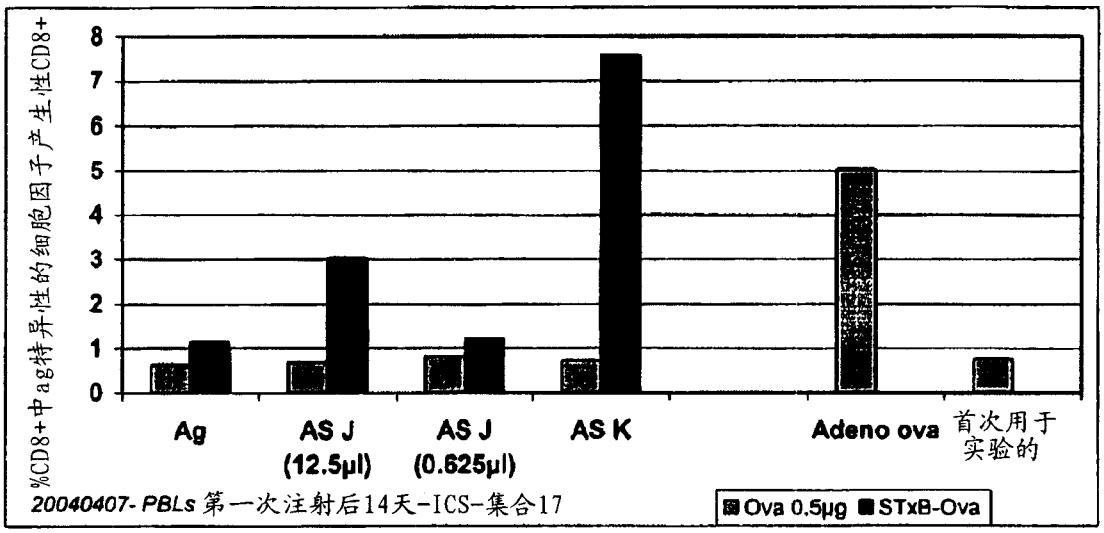


图 14B

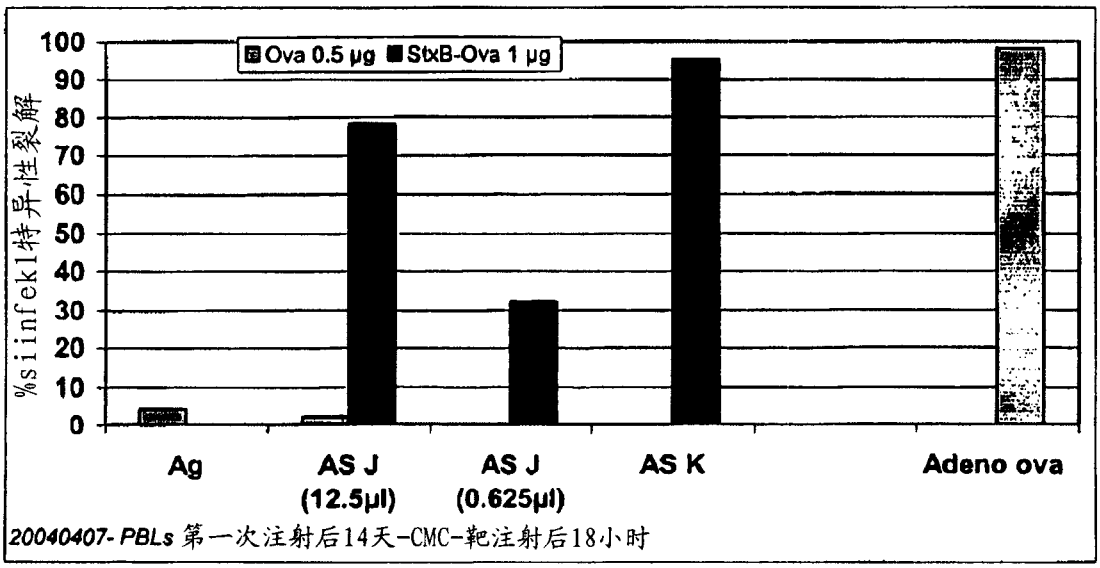


图 14C

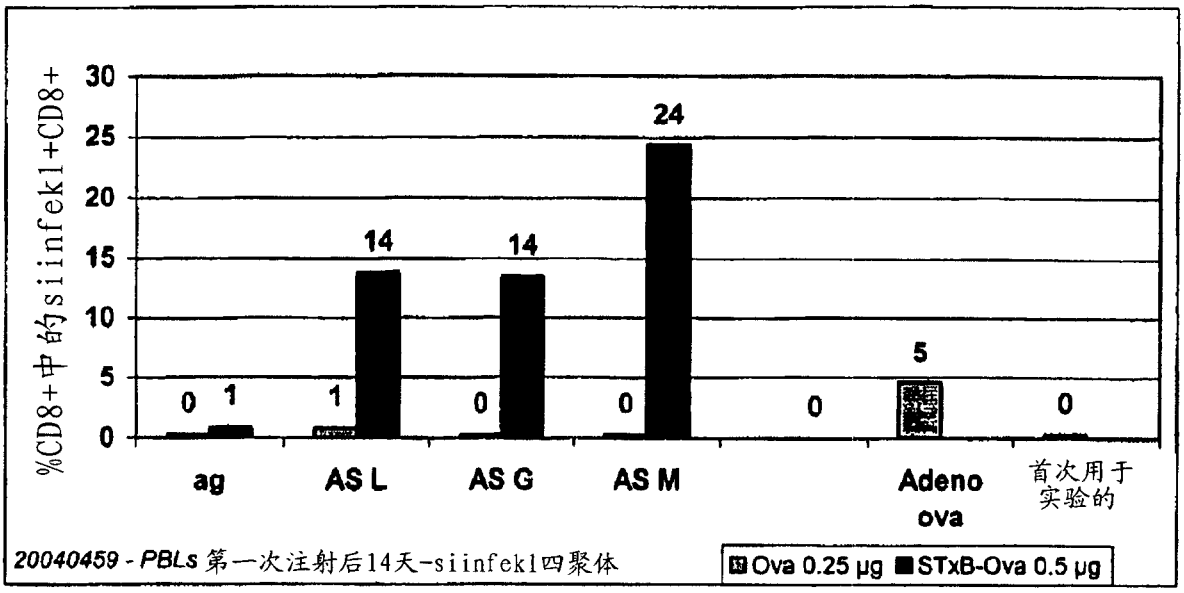

%CD8+中的siinfekl+CD8+
30
25
20
15
10
5
0
0
1
1
14
0
14
0
24
0
5
0
0
ag
AS L
AS G
AS M
Adeno ova
首次用于实验的
20040459 - PBLs 第一次注射后14天-siinfekl四聚体
Ova 0.25 µg
STxB-Ova 0.5 µg

图 15

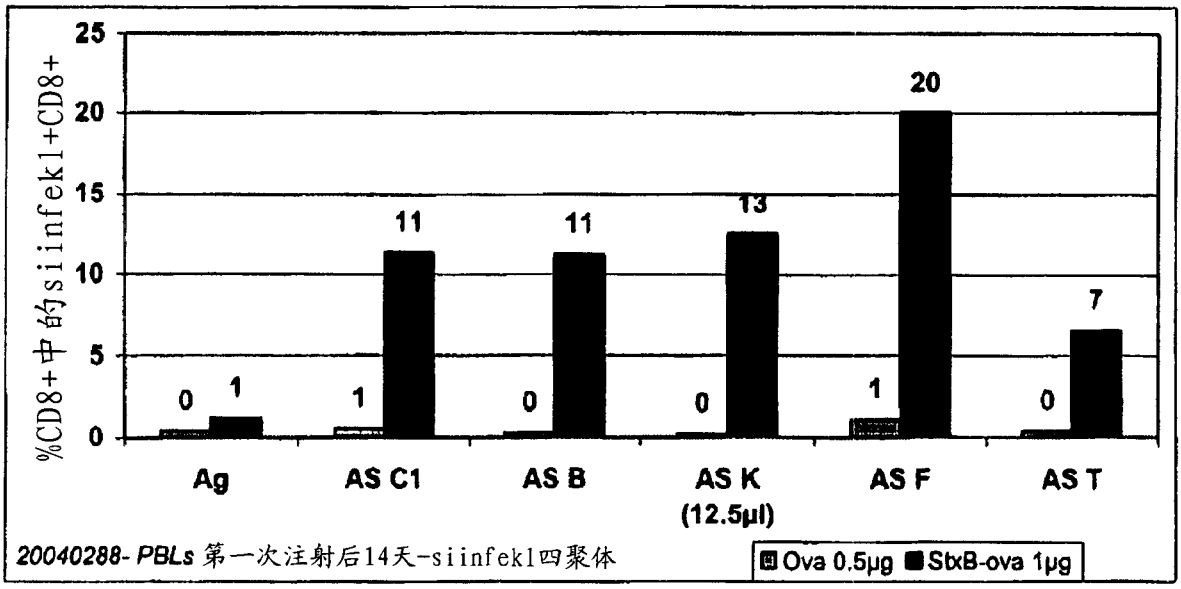

%CD8+中的siinfekl+CD8+
25
20
15
10
5
0
0
1
1
11
0
11
0
13
1
20
0
7
Ag
AS C1
AS B
AS K (12.5µl)
AS F
AS T
20040288- PBLs 第一次注射后14天-siinfekl四聚体
Ova 0.5µg
StxB-ova 1µg

图 16

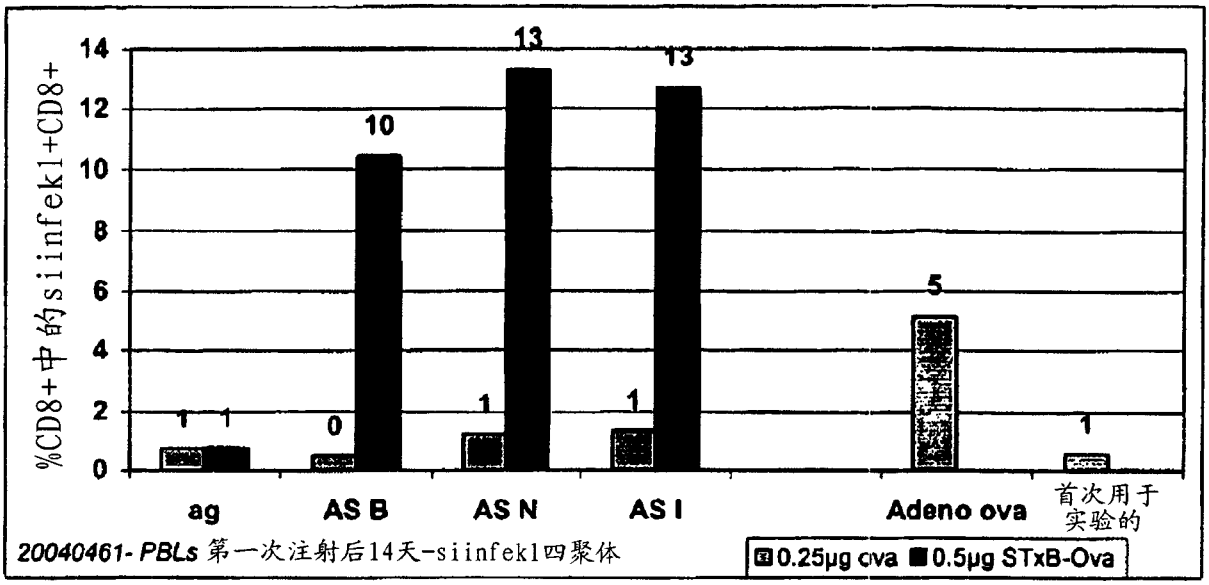

%CD8+中的siinfekl+CD8+
14
12
10
8
6
4
2
0
1 1
0
10
1
13
1
13
5
1
ag
AS B
AS N
AS I
Adeno ova
首次用于实验的
20040461- PBLs 第一次注射后14天-siinfekl四聚体
0.25μg ova
0.5μg STxB-Ova

图 17

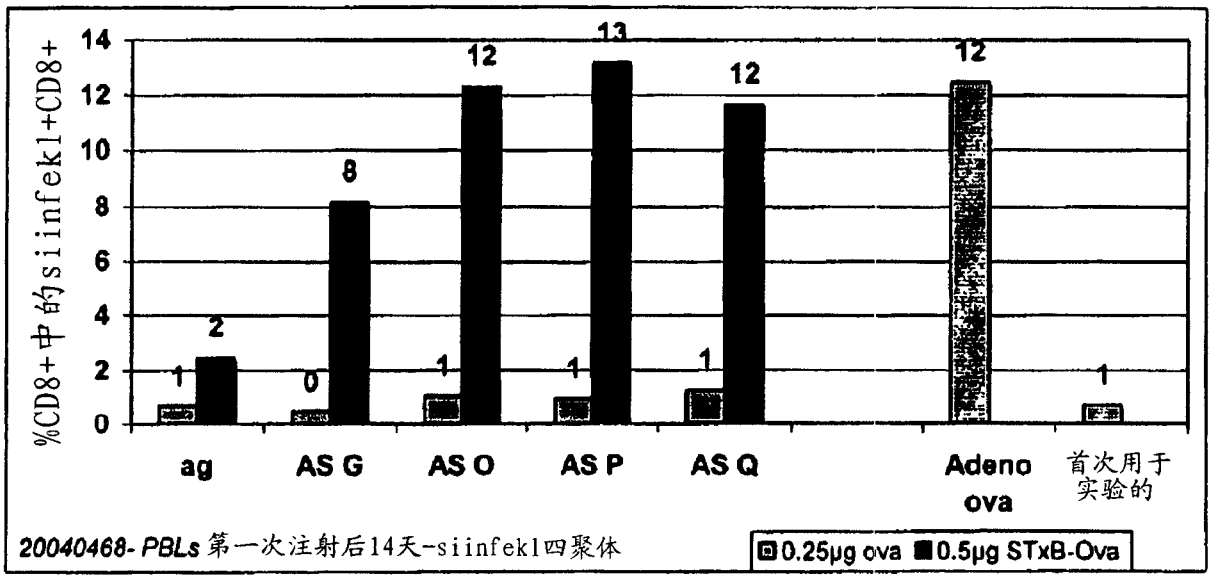

%CD8+中的siinfekl+CD8+
14
12
10
8
6
4
2
0
1
2
0
8
1
12
1
13
1
12
1
12
1
ag
AS G
AS O
AS P
AS Q
Adeno ova
首次用于实验的
20040468- PBLs 第一次注射后14天-siinfekl四聚体
0.25μg ova
0.5μg STxB-Ova

图 18

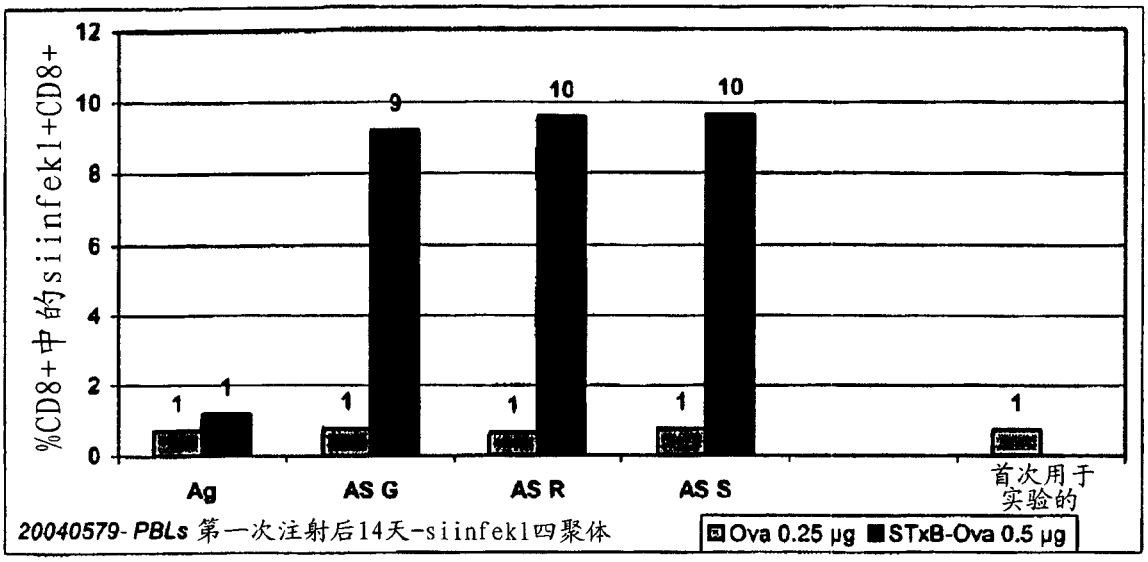

%CD8+中的siinfekl+CD8+
12
10
8
6
4
2
0
1
1
1
9
1
10
1
10
1
Ag
AS G
AS R
AS S
首次用于实验的
20040579- PBLs 第一次注射后14天-siinfekl四聚体
Ova 0.25 µg
STxB-Ova 0.5 µg

图 19

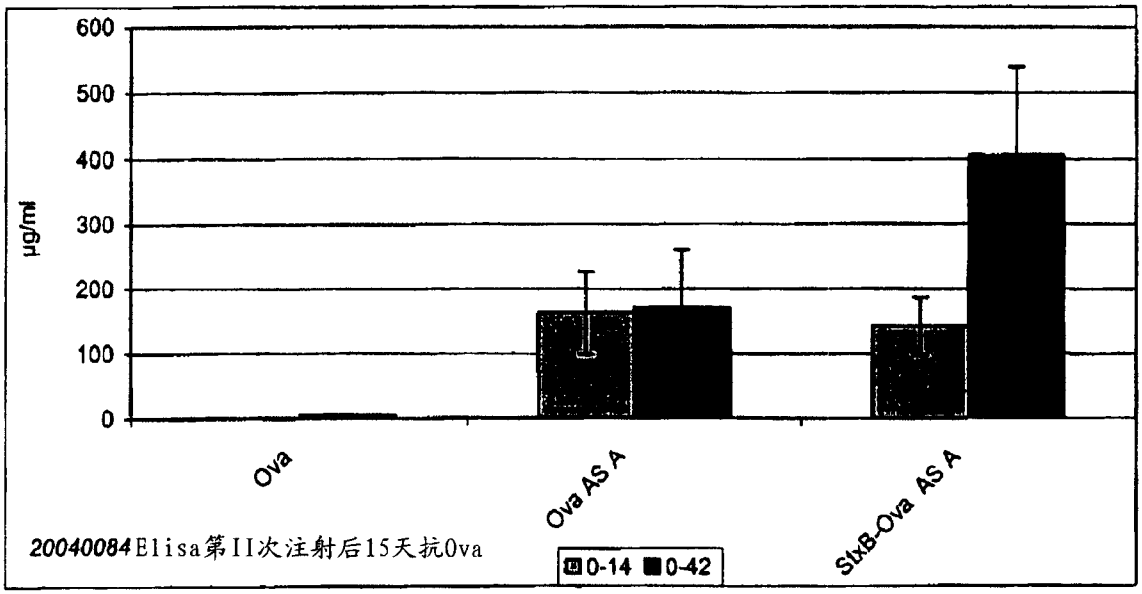

µg/ml
600
500
400
300
200
100
0
Ova
Ova AS A
StxB-Ova AS A
20040084 Elisa第II次注射后15天抗Ova
0-14
0-42

图 20

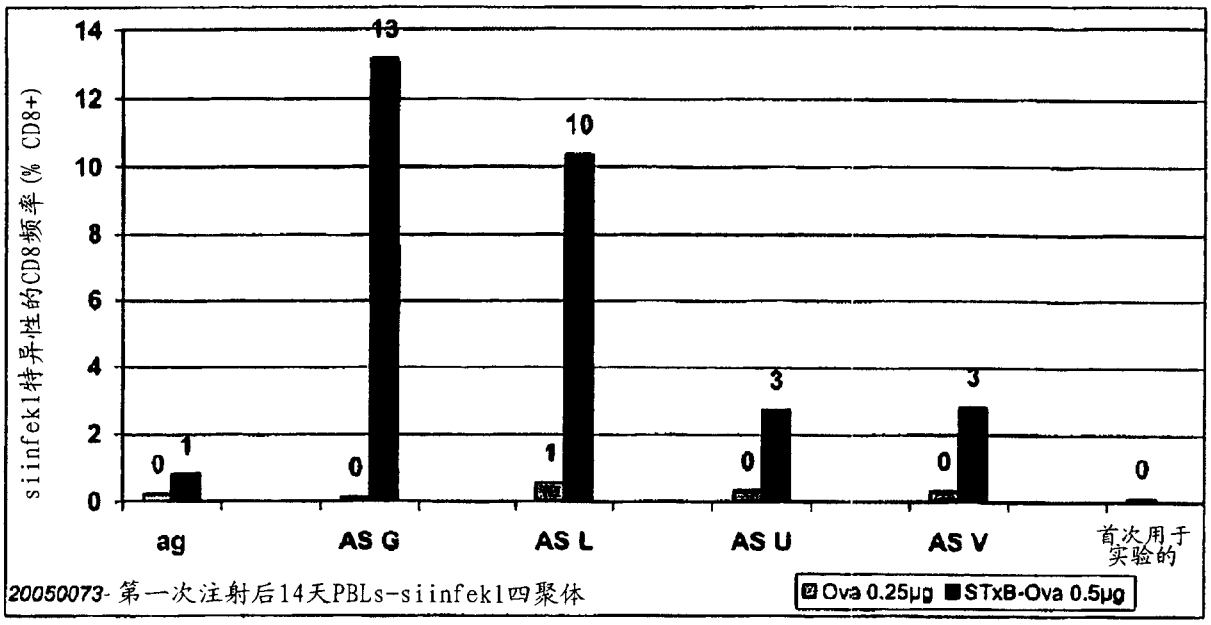

siinfekl特异性的CD8频率(% CD8+)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
0
13
1
10
0
3
0
3
0
0
ag
AS G
AS L
AS U
AS V
首次用于实验的
20050073- 第一次注射后14天PBLs-siinfekl四聚体
Ova 0.25μg
STxB-Ova 0.5μg

图 21

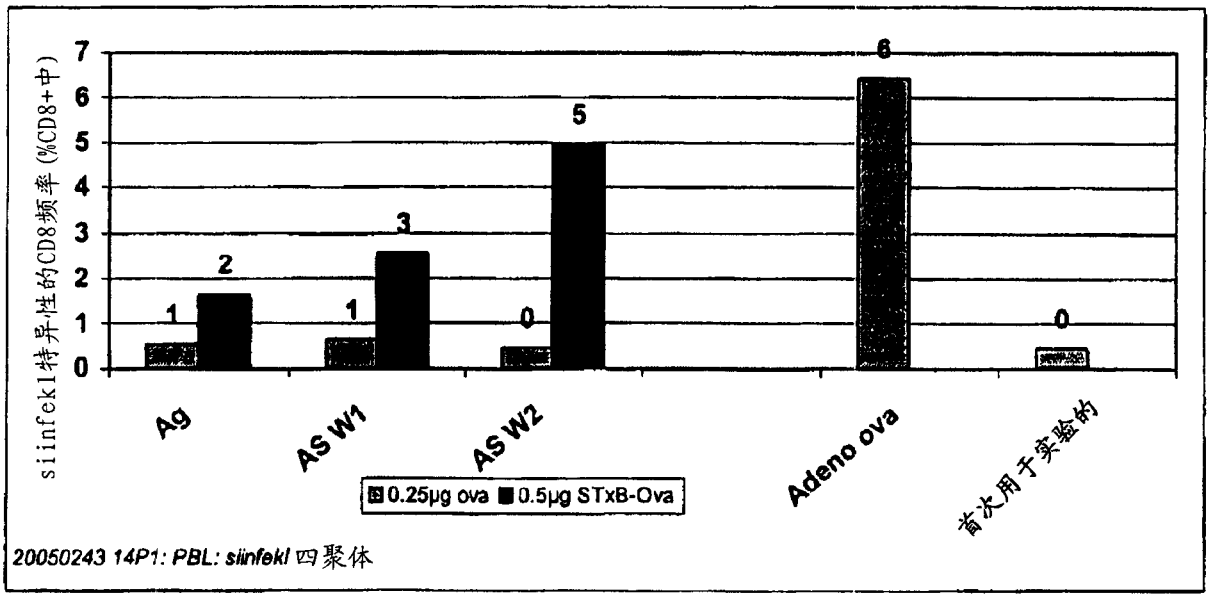

siinfekl特异性的CD8频率(%CD8+中)
7
6
5
4
3
2
1
0
1
2
1
3
0
5
6
0
Ag
AS W1
AS W2
Adeno ova
首次用于实验的
0.25μg ova
0.5μg STxB-Ova
20050243 14P1: PBL: siinfekl 四聚体

图 22