



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101657213 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 26

(21) 申请号 200880012207. 3

(22) 申请日 2008. 02. 15

(30) 优先权数据

60/901, 980 2007. 02. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 10. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/002044 2008. 02. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/100598 EN 2008. 08. 21

(73) 专利权人 曼康公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 托马斯·昆迪希 阿德里安·博特

肯特·安德鲁·史密斯 裘志勇

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

A61K 39/145 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03103636 A1, 2003. 12. 18,

WO 03103636 A1, 2003. 12. 18,

WO 2006120474 A2, 2006. 11. 16,

CN 1221349 A, 1999. 06. 30, 全文.

Sivori S. 等. CpG and double-stranded
RNA trigger human NK cells by Toll-like
receptors: Induction of cytokine release
and cytotoxicity against tumor and
dendritic cells. 《PNAS》. 2004, 第 101 卷 (第
27 期), 第 10116 页 - 第 10121 页.

审查员 蔡苗

权利要求书2页 说明书28页
序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

用于增强 T 细胞应答的方法

(57) 摘要

本发明的实施方案涉及这样的方法和组合物,其用于相对于现有技术基于的 I 类 MHC CD8⁺T 细胞应答的抗原刺激而指数增加 I 类 MHC CD8⁺T 细胞应答的抗原刺激。一些实施方案涉及增强受试者中免疫应答的免疫原性组合物。在一些实施方案中,所述免疫原性组合物包括与免疫增强剂或生物反应调节剂 (BRM) 组合的抗原。总而言之,本发明公开的本发明说明以独立于抗原剂量的方式增加抗原刺激增强了免疫原性。

1. 多个用于刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的免疫原性组合物在制备用于治疗或预防传染性或肿瘤性疾病的试剂盒中的应用, 其中多个用于刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的免疫原性组合物是连续剂量, 其中在起始剂量后给药的每个剂量大于紧接其前的剂量, 并且其中所述连续剂量作为起始剂量的指数函数增加, 其中与使用相同累积剂量而无连续增加剂量的免疫相比较获得了增强的应答, 其中所述免疫原性组合物包括作为蛋白质或肽提供的免疫原。

2. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫原性组合物包括免疫原, 加上免疫增强剂或生物反应调节剂。

3. 权利要求 2 的应用, 其中所述免疫增强剂或生物反应调节剂选自下列各项组成的组: 细胞因子, 病原体相关分子模式 (PAMP), TLR- 配体, 免疫刺激序列, 胞吞模式的识别受体 (PRR) 配体, 脂多糖 (LPS), 皂树皂苷, 和妥卡雷琐。

4. 权利要求 3 的应用, 其中所述细胞因子是趋化因子。

5. 权利要求 3 的应用, 其中所述免疫刺激序列是包含 CpG 的 DNA 或 dsRNA。

6. 权利要求 1 的应用, 其中所述指数函数由 $\geq 2^{n-1}$ 的指数因子限定。

7. 权利要求 6 的应用, 其中所述指数因子是 5^{n-1} 。

8. 权利要求 1 的应用, 其中所述连续剂量包括多于 2 个剂量。

9. 权利要求 8 的应用, 其中所述连续剂量包括多于 6 个剂量。

10. 权利要求 1 的应用, 其中最后一次剂量在第一次剂量的 6 天内施用。

11. 权利要求 1 的应用, 其中所述增强的应答包括反应性 T 细胞数量的增加。

12. 权利要求 1 的应用, 其中所述增强的应答包括增加的细胞因子产生。

13. 权利要求 12 的应用, 其中所述细胞因子是 IL-2 或 IFN- γ 。

14. 权利要求 1 的应用, 其中所述增强的应答包括免疫抑制细胞因子的峰值产生的延迟。

15. 权利要求 14 的应用, 其中所述免疫抑制细胞因子是 IL-10。

16. 权利要求 1 的应用, 其中所述增强的应答包括细胞溶解活性的增加。

17. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫原性组合物适于直接递送到哺乳动物的淋巴系统。

18. 权利要求 17 的应用, 其中直接递送到哺乳动物的淋巴系统包括结节内递送。

19. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫原性组合物适于皮下、肌肉、皮内、透皮、透粘膜、鼻、支气管、口部或直肠施用到哺乳动物。

20. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫原作为多肽、合成表位或模拟表位提供。

21. 权利要求 1 的应用, 其中免疫原刺激对这样的抗原的反应, 所述抗原选自下列各项组成的组: 病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、分化抗原、肿瘤抗原和胚胎抗原。

22. 权利要求 1 的应用, 其中免疫原刺激对癌基因抗原的反应。

23. 权利要求 1 的应用, 其中免疫原刺激对突变的肿瘤抑制基因的抗原的反应。

24. 权利要求 1 的应用, 其中免疫原刺激对由染色体易位导致的独特肿瘤抗原的反应。

25. 权利要求 21-24 任一项的应用, 其中所述抗原是自体抗原。

26. 权利要求 3 的应用, 其中所述免疫增强剂是 TLR- 配体。

27. 权利要求 26 的应用, 其中所述 TLR- 配体是包含 CpG 的 DNA。

28. 试剂盒,其包括用于刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的免疫原性组合物的组,还包括用于将所述组合物施用于需要其的受试者的说明书,所述免疫原性组合物包括作为蛋白质或肽提供的免疫原,加上免疫增强剂或生物反应调节剂,其中所述组的每个成员的剂量作为指数系列相关。

29. 权利要求 28 的试剂盒,其中剂量的指数系列由 $\geq 2^{n-1}$ 的指数因子限定。

30. 权利要求 28 的试剂盒,其中所述剂量的指数系列由指数因子 5^{n-1} 限定。

31. 权利要求 28 的试剂盒,其中所述免疫增强剂或生物反应调节剂选自下列各项组成的组:细胞因子、PAMPs、TLR- 配体、免疫刺激序列、胞吞模式识别受体 (PRR) 配体、LPS、皂树皂苷和妥卡雷琐。

32. 权利要求 31 的试剂盒,其中所述细胞因子是趋化因子。

33. 权利要求 31 的试剂盒,其中所述免疫刺激序列是包含 CpG 的 DNA 或 dsRNA。

34. 权利要求 28 的试剂盒,其中所述免疫原,和免疫增强剂或生物反应调节剂分别包含在单独的容器中。

35. 权利要求 28 的试剂盒,其中所述免疫原和免疫增强剂或生物反应调节剂包含在相同的容器中。

36. 权利要求 28 的试剂盒,其包含分别处在单独的适合的容器中的两个或更多剂量的免疫原性组合物。

37. 权利要求 36 的试剂盒,其中所述适合的容器是注射器,安瓿或小瓶。

38. 一组注射器,其包括连续增加剂量的用于刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的免疫原性组合物,其中在所述一组注射器的每个注射器中在起始剂量之后的每个剂量大于紧接其前的剂量,其中所述连续增加剂量作为起始剂量的指数函数增加,并且其中所述免疫原性组合物包括作为蛋白质或肽提供的免疫原,和免疫增强剂或生物反应调节剂,从而增强受试者中的 T- 细胞应答。

39. 一组小瓶,其包括连续增加剂量的用于刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的免疫原性组合物,其中在所述一组小瓶的每个小瓶中在起始剂量之后的每个剂量大于紧接其前的剂量,其中所述连续增加剂量作为起始剂量的指数函数增加,并且其中所述免疫原性组合物包括作为蛋白质或肽提供的免疫原,和免疫增强剂或生物反应调节剂,从而增强受试者中的 T- 细胞应答。

40. 多个免疫原性组合物在制备用于刺激哺乳动物中 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的试剂盒中的应用,其中多个免疫原性组合物的量是连续剂量,并且在起始剂量之后的每个剂量大于紧接其前的剂量,并且其中所述连续剂量作为起始剂量的指数函数增加,其中所述免疫原性组合物包括作为蛋白质或肽提供的免疫原。

用于增强 T 细胞应答的方法

对相关申请的交叉参考

[0001] 本申请要求于 2007 年 2 月 15 日提交的美国临时申请系列号 60/901,980 的优先权,将其全文结合于此作为参考。

发明背景

[0002] 本发明的实施方案涉及免疫学和疫苗开发领域。本文公开的本发明的实施方案涉及用于增强免疫和接种的方法和组合物。更具体地,本发明的实施方案涉及提高 T 细胞应答刺激的方法。本发明的一些实施方案具有作为在治疗疾病如传染病或癌症的接种策略中的进一步应用。

背景

[0003] 活性减毒疫苗通常在一次注射后诱导强的和长期持续的免疫应答,并且许多这种类型的病毒疫苗具有超过 90% 的效力 (Nossal, G. Vaccines in Fundamental Immunology (基础免疫学中的疫苗) (Paul, W. E. 编辑) 1387-1425; Lippincott-Raven 出版商,费城,1999,将其全文结合于此作为参考)。与此相反,由杀死的微生物、毒素、包括肽疫苗的亚单位疫苗,或裸 DNA 疫苗组成的疫苗是相当较低效力的,并且加强免疫是必需的。尽管活疫苗产生激发强免疫应答的增加的抗原剂量,但是非复制性的疫苗产生减少的抗原模式,其如在本文实施例中所证实,是 T 细胞的相当弱的刺激物。

[0004] 对于开发增强针对疾病的 T 细胞应答的免疫模型存在着持续的需要,所述疾病如,但不限于传染病或癌症。因此,本文公开的本发明的实施方案涉及包括在免疫过程中增加抗原性刺激的免疫治疗方法,其独立于累积的总抗原剂量,从而增强免疫原性。因此,本文公开的本发明的实施方案提供对目前免疫模型的修正并且提供用于设计并应用疫苗和免疫疗法的方法和组合物。

发明概述

[0005] 本文公开的本发明的实施方案涉及最优化 CD8⁺T 细胞应答的方法和组合物。因此,本发明的一些实施方案涉及刺激哺乳动物中 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答的方法;所述方法包括向哺乳动物施用多个连续剂量的免疫原性组合物,其中在起始剂量后的每个剂量大于紧接其前的剂量。

[0006] 在一些实施方案中,连续剂量作为起始剂量的线性函数增加。在另一个实施方案中,连续剂量作为起始剂量的指数函数增加。指数函数由 $\geq 2^{n-1}$ 的指数因子限定。在另一些实施方案中,指数因子是 5^{n-1} 。

[0007] 在一些实施方案中,所述免疫原性组合物包括免疫原加上免疫增强剂或生物反应调节剂。所述免疫增强剂或生物反应调节剂可以是例如,但不限于细胞因子,趋化因子 PAMP, TLR- 配体,免疫刺激序列,包含 CpG 的 DNA, dsRNA, 胞吞模式的识别受体 (PRR) 配体, LPS, 皂树皂苷 (quillaja saponin), 妥卡雷琐等。

[0008] 多个剂量可以是 2 个或更多个剂量。在一些实施方案中,多个剂量包括 2-6 个剂量。在其他实施方案中,多个剂量包括多于 6 个剂量。在本发明的一些实施方案中,多个剂量可以受免疫原的半衰期 ($t_{1/2}$) 影响。例如,为了实现相似的结果,与具有相对较长半衰期的免疫原相比,具有相对较短半衰期的免疫原可需要更频繁的施用,并且因此需要更多数量的剂量。

[0009] 在一些实施方案中,最后一次剂量可以在第一次剂量的 6 天内施用。在一些实施方案中,最后一次剂量可以在第一次剂量后的 7,8,9,10 或更多天内施用。

[0010] 本发明的实施方案涉及这样的方法,其中与使用相同累积剂量而在剂量中没有随时间的线性或指数增加的免疫接种比较,获得了增强的应答。增强的应答可以包括增加数量的反应性 T 细胞。在一些实施方案中,增强的应答可以包括增加的免疫刺激细胞因子的产生。所述细胞因子可以是例如, IL-2 或 IFN- γ 。在一些实施方案中,增强的应答可以包括细胞溶解活性的增加。在一些实施方案中,增强的应答可以包括免疫抑制细胞因子的峰值产生的延迟。免疫抑制细胞因子可以是,例如 IL-10。

[0011] 本发明的实施方案涉及这样的方法,所述方法通过直接递送到淋巴系统将免疫原性组合物施用于哺乳动物。例如,施用免疫原性组合物至哺乳动物的方法可以通过节内递送进行。

[0012] 在本发明的一些实施方案中,可以将免疫原性组合物经过皮下、肌肉、皮内、透皮、透粘膜、鼻、支气管、口部、直肠等施用于哺乳动物。

[0013] 在一些实施方案中,免疫原可以作为蛋白质、肽、多肽、裸 DNA 疫苗、RNA 疫苗、合成表位、模拟表位等进行提供,但是优选而不限于这些。

[0014] 所述免疫原刺激针对这样的抗原的应答,所述抗原与待治疗或针对其进行保护的疾病相关。所述抗原可以是,例如,但不限于,病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、分化抗原、肿瘤抗原、胚胎抗原、癌基因和突变肿瘤抑制基因的抗原,由染色体易位导致的独特肿瘤抗原等和 / 或它们的衍生物。所述抗原可以是自体抗原。

[0015] 在一些实施方案中,免疫增强剂可以是 TLR- 配体。所述 TLR- 配体可以是包含 CpG 的 DNA。在一些实施方案中,所述免疫增强剂可以是双链 RNA,例如多 IC。

[0016] 本文公开的本发明的一些实施方案涉及一组免疫原性组合物,其中所述组包括免疫原、加上免疫增强剂或生物反应调节剂,其中所述组每个成员的剂量作为指数系列相关。在一些实施方案中,所述剂量的指数系列由 $\geq 2^{n-1}$ 的指数因子限定。在一些实施方案中,剂量的指数系列由 5^{n-1} 的指数因子限定。

[0017] 本发明的其他实施方案涉及试剂盒,其包括免疫原性组合物的组,所述组合物包括抗原和免疫增强剂或生物反应调节剂和将所述组合物施用于需要其的受试者的说明书。

[0018] 免疫增强剂或生物反应调节剂可以是,例如,但不限于,细胞因子,趋化因子 PAMP, TLR- 配体,免疫刺激序列,包含 CpG 的 DNA, dsRNA, 胞吞模式的识别受体 (PRR) 配体, LPS, 皂树皂苷, 妥卡雷琐, 等。在一些实施方案中,免疫原和所述免疫增强剂或生物反应调节剂可以分别包含在不同的容器中或在相同的容器中。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,所述试剂盒可以包含两个或更多剂量的免疫原性组合物,其分别包含在不同的适当的容器中。所述适合的容器可以是,例如,但不限于,注射器、安瓿、小瓶等或它们的组合。

[0020] 本发明的实施方案涉及一组注射器,其包括连续增加剂量的免疫原性组合物,其中在该组注射器的每个注射器中,在起始剂量后的每个剂量大于紧接其前的剂量,其中免疫原性组合物包括免疫原,和免疫增强剂或生物反应调节剂,从而增强受试者中的 T 细胞应答。

[0021] 在其他实施方案中,免疫原性组合物包括细胞。所述细胞可以是肿瘤细胞或抗原呈递细胞,但不限于这些。在其他实施方案中,所述抗原呈递细胞可以是树突细胞。在另一些实施方案中,免疫原组合物包括细胞。

[0022] 在其他实施方案中,更大的剂量包括增加数量的细胞。在另一个实施方案中,更大的剂量包括在细胞表面上的增加数量的表位-MHC 复合物。

[0023] 一些实施方案涉及一组小瓶,所述小瓶包括连续增加剂量的免疫原性组合物,其中在该组小瓶的每个小瓶中,在起始剂量之后的每个剂量大于紧接其前的剂量,其中免疫原性组合物包括免疫原、和免疫增强剂或生物反应调节剂,从而增强受试者中的 T 细胞应答。

[0024] 一些实施方案涉及用于刺激 I 类 MHC 限制性 T 细胞应答的免疫原性组合物的多个连续剂量的应用,其中在起始剂量之后的每个剂量大于紧接其前的剂量。在一些实施方案中,刺激 I 类 MHC 限制性 T 细胞应答用于治疗肿瘤性疾病或用于治疗传染病或两者。在一些实施方案中,刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答用于预防肿瘤性疾病或用于预防传染病,或两者。

[0025] 一些实施方案涉及多个连续剂量的免疫原性组合物用于制备药物的应用,所述免疫原性组合物包含免疫原和免疫增强剂或生物反应调节剂,其中在起始剂量之后的每个剂量大于紧接其前的剂量。一些实施方案涉及包含免疫原加免疫增强剂或生物反应调节剂的一组免疫原性组合物在制备药物中的应用,其中所述组的每个成员的剂量作为指数系列相关。优选地,所述药物刺激哺乳动物中的 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答。因此,所述药物可以用于治疗肿瘤性疾病或用于治疗传染病或两者。在一些实施方案中,所述药物用于预防肿瘤性疾病或用于预防传染病,或两者。

[0026] 其他目的和特征在下文将部分显而易见和部分被指出。

附图简述

[0027] 下面的附图形成本发明说明书的部分并且被包括以进一步说明本文公开的本发明的实施方案的某些方面。可以通过参考这些附图的一个或多个并组合本文描述的具体实施方案的详细描述而更好地理解本发明。

[0028] 图 1 举例说明这样的数据,其指出 gp33 和 CpG 的指数增加的剂量增强 CD8⁺T 细胞应答。

[0029] 图 2 是柱状图,其指出 CD8⁺T 细胞应答的增强独立于 T 细胞辅助。

[0030] 图 3 显示这样的数据,其指出 4 天的抗原刺激对于 CD8⁺T 细胞诱导是最佳的。

[0031] 图 4 举例说明这样的数据,其指出 gp33 和 CpG 的指数增加剂量增强抗病毒 CD8⁺T 细胞应答。

[0032] 图 5 显示这样的数据,其指出抗原动力学不影响 DC 激活。

[0033] 图 6A 举例说明流式细胞术数据,其指出指数免疫接种有利于持续的 T 细胞增殖。

- [0034] 图 6B 举例说明流式细胞术数据,其指出指数免疫接种有利于持续的 T 细胞增殖。
- [0035] 图 7 显示这样的数据,其指出用肽 - 负载的树突细胞进行的指数免疫接种诱导强的 T 细胞和抗肿瘤应答。
- [0036] 图 8 举例说明这样的数据,其指出体外指数刺激 CD8⁺T 细胞增强 IL-2 产生和细胞毒性。

发明详述

[0037] 免疫系统已经进化至针对病原体最佳反应 (Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. (接近渐近线? 免疫学的进化和革新) Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54 Pt 1, 1-13, 1989; Zinkernagel, R. M., Science (科学) 271, 173-8, 1996; Germain, R. N., Nat Med (自然医学) 10, 1307-20, 2004, 将其每个全部内容结合在本文中作为参考)。可以通过采用病原体的特征来优化免疫接种,并增强 baccines 的功效。例如,为了增强吞噬作用和抗原呈递,可以以具有与病原体相当的尺寸的颗粒形式,如乳状液、微粒、免疫刺激复合物 (iscom)、脂质体、病毒颗粒和病毒样颗粒递送疫苗,从而增强吞噬作用和抗原呈递 (O' Hagan, D. T. & Valiante, N. M. Nat Rev Drug Discov (自然药物发现综述) 2, 727-35, 2003, 将其全部内容结合在本文中作为参考)。此外,可以将通过模式识别受体 (PRR) 刺激免疫系统的病原体相关分子模式 (PAMPs) 用作佐剂以激活抗原呈递细胞并增强针对疫苗的免疫应答,所述模式识别受体包括 toll 样受体 (TLR) (Johansen, P., 等, Clin Exp Allergy (临床实验过敏学) 35, 1591-1598, 2005b; O' Hagan, D. T. & Valiante, N. M. Nat Rev Drug Discov (自然药物发现综述) 2, 727-35, 2003; Krieg, A. M., Annu Rev Immunol (免疫学年度综述) 20, 709-60, 2002, 将其每个全部内容结合在本文中作为参考)。病原体的一个关键性标志是复制。病原体复制将免疫系统暴露于随着时间数量增加的抗原和免疫刺激性 PAMPs。

[0038] 免疫学目前的范例是 T 细胞应答的强度和质量可以由抗原的剂量和定位以及共刺激信号控制。提高接种的效率的策略的目标可以在于增加抗原呈递的延续时间 (Lofthouse, S. Adv Drug Deliv Rev (药物递送进展综述) 54, 863-70, 2002; Ehrenhofer, C. & Opdebeeck, J. P., Vet Parasitol 59, 263-73, 1995; Guery, J. C., 等, J Exp Med (实验医学杂志) 183, 485-97, 1996; Zhu, G., 等, Nat Biotechnol (自然生物技术) 18, 52-7, 2000; Borbulevych, O. Y., 等, J Immunol (免疫学杂志) 174, 4812-20, 2005; Levitsky, V., 等, J Exp Med (实验医学杂志) 183, 915-26, 1996; van der Burg, S. H., 等, J Immuno (免疫学杂志) 156, 3308-14, 1996; Chen, J. L. 等, J Exp Med (实验医学杂志) 201, 1243-55, 2005; Rivoltini, L 等, Cancer Res (癌症研究) 59, 301-6, 1999; Blanchet, J. S. 等, J Immunol (免疫学杂志) 167, 5852-61, 2001; Brinckerhoff, L. H. 等, Int J Cancer (国际癌症杂志) 83, 326-34, 1999; Ayyoub, M. 等, J Biol Chem (生物化学杂志) 274, 10227-34, 1999; Stemmer, C. 等, J Biol Chem (生物化学杂志) 274, 5550-6, 1999; O' Hagan, D. T. & Valiante, N. M., Nat Rev Drug Discov (自然药物发现综述) 2, 727-35, 2003, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。

[0039] 最优化 T 细胞诱导的方法仍旧是本领域的一个挑战。如本领域公知,免疫接种的“长效制剂 (depot)”理论假定抗原随延长的时间缓慢渗漏到组织中与疫苗的免疫原效力相

关。目前,这种抗原长效制剂示例是大部分佐剂开发计划的基础。然而,本公开内容显示以剂量逐步升高的方式在连续的几天或在紧密间隔的日子施用疫苗而不是以长效制剂或一次单一大丸剂(bolus)施用疫苗将是远远更加有效的。与单次大丸剂或多次不变剂量施用相比时,在本文显示用指数增加的剂量进行的每日抗原刺激增强 CD8⁺T 细胞应答。用于本文时,刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答包括,但不限于诱导、引发(priming)、起始、延长、维持、扩增、增强或加强所述应答。

[0040] 本领域公知在一次注射后活的减毒疫苗通常诱导强的且长期持续的免疫应答,并且这种类型的许多病毒疫苗具有大于 90% 的效率(Nossal, G. Vaccines in Fundamental Immunology(基础免疫学中的疫苗)(Paul, W. E. 编辑)1387-1425;Lippincott-Raven 出版商,费城,1999,将其全部内容结合在本文作为参考)。与此相对,由杀死的微生物、毒素、包括肽疫苗的亚单位疫苗、或裸 DNA 疫苗组成的疫苗是相当低效的并且加强免疫是必须的。尽管活疫苗产生引起强免疫应答的增加的抗原剂量,但是不复制的疫苗产生减少的抗原模式,即如本文实施例所证实的,这是对于 T 细胞的相对弱的刺激。

[0041] 公知的是不能复制型(replication-incompetent)的疫苗比活疫苗更安全。本发明的实施方案挑战使用不能复制型的疫苗的疫苗开发的趋势而不考虑抗原刺激的剂量动力学。此外,本发明的实施方案提供免疫治疗方法以增强针对疾病的 T 细胞应答,所述疾病如但不限于传染病或癌症。

[0042] 本文公开的本发明的实施方案旨在通过操控作为免疫原性关键参数的抗原刺激动力学来解决疫苗设计领域和免疫治疗实施过程中的缺陷。如本文公开,与以恒定水平提供的刺激相对,线性或指数增加的免疫原刺激诱导显著更强的 CD8⁺T 细胞应答。作为单脉冲(single shot)或作为多次减少剂量给药的免疫原诱导最弱的免疫应答。对于本文公开的发现的进化学解释可以是复制并因此产生增加量的抗原的病原体需要最强的 CD8⁺T 细胞应答。与此相对,均一或减少量的抗原显示非病原性刺激或感染由先天或已经正在获得的免疫性充分控制。

[0043] 尽管不希望受限于该理论,认为介导对危险的增加的敏感性的可能候选物是抗原呈递细胞,并且特别是对于 CD8⁺T 细胞诱导的树突细胞(DCs)。这由下面的实施例支持,因为尽管不同的接种方案在淋巴结中的绝对 DC 数量或 DC 活化水平上不同,它们在达到 DC 活化和数量的峰值所用的时间上也不同。在指数增加的疫苗接种模式上,与大丸剂接种相比,DC 活化的峰值被延迟 3 天。关于两种疫苗接种方案,DC 活化的峰值发生在施用最大疫苗剂量后一天。这种观察可以提示优化的疫苗接种计划表将在单次肽注射前一天使用 CpG 的单次注射,以致肽呈递在最大活化的 DCs 上。然而,目前的数据显示所述免疫方案,以及在单一肽剂量后的指数增加剂量的 CpG 与平行的指数逐渐增加剂量的 CpG 和肽相比具有显著更少的免疫原性。

[0044] 为了检验独立于治疗过程的总剂量(累积剂量)的抗原的剂量动力学是否是单独的免疫原性参数,将小鼠用固定累积剂量的抗原肽,如 gp33 和免疫增强剂或生物反应调节剂(BRM),如胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸(CpG ODNs)免疫。进行不同的动力学,即用指数增加或减少的剂量、恒定的每日剂量进行的免疫或单次大丸剂免疫。选择 I 类 MHC 结合肽作为抗原,因为它们的短体内半衰期容许产生急剧的抗原动力学(Falo 等, Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院学报)89,8347-8350,1992;Widmann 等, J Immunol(免疫学

杂志). 147, 3745-3751, 1991, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。因为用相同总剂量的疫苗免疫小鼠, 可以将特异性 T 细胞诱导作为肽和 BRM(CpG) 施用的动力学的函数进行监测。

[0045] 如在本文实施例和其它地方所公开的, 通过不同的计划表施用包括肽和 BRM(CpG) 的固定累积疫苗剂量以产生抗原刺激的独特剂量动力学。与均一或恒定每日抗原刺激或作为单次大剂施用疫苗相比, 指数增加的抗原刺激引发对 CD8⁺T 细胞的显著更强的刺激并增强针对病毒感染和肿瘤的长期免疫性。当在体外刺激 T 细胞时, 观察到相同现象。

[0046] 因此, 一些实施方案涉及方法和组合物, 其用于线性或指数增加 I 类 MHC CD8⁺T 细胞应答的抗原刺激, 结果超过本领域所述的那些。数据显示增加的抗原刺激独立于抗原剂量增强的免疫原性。因此, 本发明提供增强免疫原性的新方法, 由此改善疫苗开发。

[0047] 本发明的实施方案提供数组免疫原性组合物, 其包括免疫原加上免疫增强剂或 BRM。一些实施方案包括共施用抗原以及免疫增强剂从而通过以指数增加的方式提供抗原和免疫增强剂来获得增强的免疫 (CTL) 应答。

[0048] 抗原的免疫原性可以通过许多参数进行确定, 所述参数包括抗原剂量 (Mitchison, N. A., Proc R Soc Lond Biol Sci 161, 275-92, 1964; Weigle, W. O., Adv Immunol (免疫学进展) 16, 61-122, 1973; Nossal, G. J., Annu Rev Immunol (免疫学年度综述) 1, 33-62, 1983, 将其每个全部内容结合在本文作为参考); 抗原的定位 (Zinkernagel, R. M., Semin Immunol 12, 163-71; discussion (讨论) 257-344, 2000; Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H., Science (科学) 293, 251-3, 2001, 将其每个全部内容结合在本文作为参考); 抗原的颗粒或可溶性性质 (O' Hagan, D. T. & Valiante, N. M. Nat Rev Drug Discov (自然药物发现综述) 2, 727-35, 2003; Bachmann, M. F., 等, Science (科学) 262, 1448-51, 1993, 将其每个全部内容结合在本文作为参考); 以及抗原是否与其刺激信号一起存在 (Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology (接近渐近线? 免疫学的进化与革新). Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54Pt 1, 1-13, 1989; Germain, R. N., Nat Med (自然医学) 10, 1307-20, 2004; Matzinger, P., Annu Rev Immunol (免疫学年度综述) 12, 991-1045, 1994; Schwartz, R. H., Cell (细胞) 71, 1065-8, 1992, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。

[0049] 还认为免疫原和免疫方案越与致病性病原体的感染相似, 其越具有免疫原性。抗原在淋巴器官中的高抗原剂量和抗原的存在, 两者都对应于致病性病原体的普遍复制, 诱导强烈的免疫应答。与病毒或细菌结构相似的颗粒抗原诱导比可溶性抗原更强的免疫应答。此外, 抗原与病原体成分的共同存在强烈增强免疫应答, 所述病原体成分如例如细菌 DNA, 脂多糖或病毒 RNA。如本文教导, 指数增加的抗原刺激也可以作为与病原体相关模式由免疫系统进行识别, 驱动强烈的免疫应答。

[0050] 因此, 鉴于前述, 意欲用于本发明的实施方案中的抗原是这样的抗原, 其刺激具有恶性肿瘤或传染病的受试者的免疫系统以攻击肿瘤或病原体, 从而抑制其生长或消除它, 由此治疗或治愈疾病。在一些情况下, 所述抗原可以与在被治疗以诱导 CTL 应答 (也称为细胞介导的免疫应答) 的动物中发现的具体疾病相匹配, 所述 CTL 应答即由导致靶细胞溶解的免疫系统的细胞毒性反应 (例如, 恶性肿瘤细胞或病原体感染的细胞)。如本领域普通技术人员所理解, 增加的细胞溶解活性可以是相对于不存在免疫原性组合物的情况, 在存

在免疫原性组合物的情况下被杀死或裂解的靶细胞的数量测量。确定或测量被杀死或溶解的靶细胞的数量方法可以是本领域普通技术人员已知的任何方法,包括但不限于铬释放测定,四聚体测定等。

[0051] 用于本文时,刺激 I 类 MHC- 限制性 T 细胞应答包括,但不限于诱导、引发、起始、延长、维持、扩增、增强或加强所述应答。

[0052] 意欲用在本文公开的方法中的抗原包括,但不限于蛋白质,肽,多肽及其衍生物以及非肽大分子。所述衍生物可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法进行制备,并且可以通过本领域普通技术人员已知的任何方式进行测定。因此,在一些实施方案中,用于本发明中的抗原可以包括肿瘤抗原,如但不限于,分化抗原,胚胎抗原,癌-睾丸抗原,癌基因和突变的肿瘤抑制基因的抗原,由染色体易位导致的独特肿瘤抗原,病毒抗原,和其它目前或将来对于本领域技术人员是显而易见的抗原。用于公开的方法和组合物中的抗原还包括在传染病生物中发现的那些,如结构和非结构病毒蛋白。意欲用在公开的组合物和方法中的潜在靶微生物包括,但不限于肝炎病毒(例如,B,C,和 δ),疱疹病毒,HIV,HTLV,HPV,EBV,等。用于由免疫应答识别或靶向的这些抗原的一般术语是靶相关抗原(TAA)。

[0053] 可以用在公开的方法和组合物中的蛋白质抗原包括,但不限于:分化抗原如例如 MART-1/MelanA(MART-I),gp100(Pmel 17),酪氨酸酶,TRP-1,TRP-2 和肿瘤特异性多谱系抗原如例如,MAGE-1,MAGE-3,BAGE,GAGE-1,GAGE-2,p15;过量表达的胚胎抗原如,例如 CEA;过量表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因如例如,p53,Ras,HER-2/neu;由染色体易位导致的独特肿瘤抗原如例如,BCR-ABL,E2A-PRL,H4-RET,IGH-IGK,MYL-RAR;和病毒抗原如例如,埃巴病毒抗原 EBVA 和人乳头瘤病毒(HPV)抗原 E6 和 E7。其它蛋白质抗原可以包括,例如 TSP-180,MAGE-4,MAGE-5,MAGE-6,RAGE,NY-ESO,p185erbB2,p180erbB-3,c-met,nm-23HI,PSA,TAG-72,CA 19-9,CA 72-4,CAM 17.1,NuMa,K-ras, β -联蛋白,CDK4,Mum-1,p15,p16,43-9F,5T4,791Tgp72,甲胎蛋白, β -HCG,BCA225,BTAA,CA 125,CA 15-3\CA 27.29\BCAA,CA 195,CA242,CA-50,CAM43,CD68\KP1,CO-029,FGF-5,G250,Ga733\EpCAM,HTgp-175,M344,MA-50,MG7-Ag,MOV18,NB/70K,NY-CO-1,RCAS1,SDCCAG16,PLA2,TA-90\Mac-2 结合蛋白\亲环蛋白 C- 相关蛋白,TAAL6,TAG72,TLP,和 TPS。这些基于蛋白质的抗原是已知的并且是本领域技术人员通过文献或商购可获得的。

[0054] 在本发明的其他情形中,意欲 8-15 个氨基酸长度的肽抗原。所述肽可以是更大抗原的表位,即使是这样的肽,其具有对应于更大分子上位点的氨基酸序列,所述分子由 MHC/HLA 分子呈递并且可以由例如抗原受体或 T 细胞受体识别。这些更小的肽可由本领域技术人员获得,并且可以例如通过下列的教导获得:美国专利号 5,747,269 和 5,698,396;以及提交于 1995 年 7 月 4 日,题为 METHOD OF IDENTIFYING AND PRODUCING ANTIGEN PEPTIDES AND USE THEREOF AS VACCINES(鉴定并产生抗原肽的方法及其作为疫苗的应用)的 PCT 申请号 PCT/EP95/02593(公布为 WO 96/01429)和提交于 1996 年 2 月 26 日,题为 AGENT FOR TREATING TUMOURS AND OTHER HYPERPLASIA(治疗肿瘤和其它增生的药剂)的 PCT 申请号 PCT/DE96/00351(公开为 WO96/27008),将其每个全部内容结合在本文作为参考。表位发现的另外的方法描述在美国专利号 6,037,135 和 6,861,234 中,将其每个的全部内容结合在本文作为参考。

[0055] 尽管一般最终确定 T 细胞的抗原特异性识别的分子是肽,要注意的是实际以免疫

原性制剂,免疫原形式施用的抗原形式不需要本身是肽。当被施用,所述表位肽可以存在于更长的多肽中,不管其是否作为完整的蛋白质抗原还是其一些片段或是一些改造的序列。包括在所述改造序列中的将是结合在载体序列中的多表位 (polyepitopes) 和表位如抗体或病毒衣壳蛋白。所述更长的多肽可以包括例如在美国专利申请号 09/561,571 中所述的表位簇,所述美国专利申请号 09/561,571 提交于 2000 年 4 月 28 日,题为“EPITOPE CLUSTERS(表位簇)”,将其完全结合在本文作为参考。表位肽或其包含在其中的更长的多肽可以是微生物(例如,病毒,细菌,原生动物等)或哺乳动物细胞(例如,肿瘤细胞或抗原呈递细胞)的成分或前述任一项完全或部分纯化的裂解物。可以将它们用作与其他蛋白的复合物,所述其他蛋白例如热休克蛋白。还可以将表位肽进行共价修饰,如通过脂质化(lipidation)或制备合成化合物的成分进行,所述合成化合物如树状聚体,多种抗原肽系统(MAPS),和多胍(polyoximes),或可以结合在脂质体或微球体等中。如用在本文公开内容中,术语“多肽抗原”涵盖所有的这样的可能性和组合。本发明包括所述抗原可以是微生物或哺乳动物细胞的天然成分。所述抗原也可以由微生物或哺乳动物细胞通过重组 DNA 技术或尤其在抗原呈递细胞的情况下通过在施用前用多肽抗原或表位肽脉冲细胞来表达所述抗原。另外,可以施用的抗原由这样的核酸编码,所述核酸随后由 APCs 表达。最后,尽管经典 I 类 MHC 分子呈递肽抗原,但是存在另外的 I 类分子,其适应于呈递非肽大分子,特别是微生物细胞壁的成分,包括但不限于脂质和糖脂。用于本发明公开内容时,术语抗原,免疫原和表位还可以包括所述大分子。而且,基于核酸的疫苗可以编码合成所述大分子所必需的一种或多种酶并由此赋予在 APC 上的抗原表达。

[0056] 还意欲由美国专利申请系列号 09/560,465 公开的方法鉴定的新肽,所述美国专利申请系列号 09/560,465 于 2000 年 4 月 28 日提交并题为“EPITOPE SYNCHRONIZATION IN ANTIGEN PRESENTING CELLS(抗原呈递细胞中的表位同步化)”(全部内容结合在本文作为参考),所述新肽目前或在将来对于本领域技术人员可以是显而易见的,并且用于本文公开的本发明的实施方案中。

[0057] 公开了可以用于本文公开的本发明的实施方案中的另外的肽和肽类似物,其公开在例如下列中:提交于 2004 年 6 月 17 日的美国临时申请号 60/581,001,和提交于 2005 年 6 月 17 日的美国专利申请号 11/156,253,两者都题为 SSX-2 PEPTIDE ANALOGS(SSX-2 肽类似物);和提交于 2004 年 6 月 17 日的美国临时申请号 60/580,962 和提交于 2005 年 6 月 17 日的美国专利申请号 11/155,929,两者题为 NY-ESO PEPTIDE ANALOGS(NY-ESO 肽类似物);美国专利申请号 09/999,186,提交于 2001 年 11 月 7 日,题为 METHODS OF COMMERCIALIZING AN ANTIGEN(商品化抗原的方法);美国专利申请号 11/323,572(公开为 US 2006/016571A1),其提交于 2005 年 12 月 29 日,题为, METHODS TO ELICIT, ENHANCE AND SUSTAIN IMMUNE RESPONSES AGAINST MHC CLASS I-RESTRICTED EPITOPES, FOR PROPHYLACTIC or THERAPEUTIC PURPOSES(激发、增强和维持针对 I 类 MHC 限制性表位的免疫应答的用于预防或治疗目的的方法);和美国专利申请号 11/323,520,提交于 2005 年 12 月 29 日,题为 METHODS TO BYPASS CD4⁺ CELLS IN THE INDUCTION OF AN IMMUNE RESPONSE(在免疫应答的诱导绕过 CD4⁺ 细胞的方法),将其每个全部内容结合在本文作为参考。用于免疫治疗的有益表位选择原理公开在下列中:例如,美国专利申请号 09/560,465,其提交于 2000 年 4 月 28 日,美国专利申请号 10/026,066(公开为

US2003/0215425A1), 提交于 2001 年 12 月 7 日, 和美国专利申请号 10/005, 905, 其提交于 2001 年 11 月 7 日, 全部题为 EPITOPE SYNCHRONIZATION IN ANTIGEN PRESENTING CELLS (在抗原呈递细胞中的表位同步化); 美国专利申请号 09/561, 571, 其提交于 2000 年 4 月 28 日并且题为 EPITOPE CLUSTERS (表位簇); 美国专利申请号 10/094, 699 (现在的美国专利 7, 252, 824), 提交于 2002 年 3 月 7 日并且题为 ANTI-NEOVASCULATURE PREPARATIONS FOR CANCER (用于癌症的抗新血管系统制备物); 美国专利申请号 10/117, 937 (公开为 US2003/0220239A1), 其提交于 2002 年 4 月 4 日, 美国专利申请号 10/657, 022 (公开为 US 2004/0180354A1), 其提交于 2003 年 9 月 5 日, 和 PCT 申请号 PCT/US2003/027706 (公开为 WO 04/022709A2), 提交于 2003 年 9 月 5 日, 全部题为 EPITOPE SEQUENCES (表位序列); 和美国专利号 6, 861, 234; 将其每个全部内容结合在本文作为参考。

[0058] 在本发明的一些方面中, 可以使用疫苗质粒。例如在下列各项中公开疫苗质粒的总体设计: 美国专利申请号 09/561, 572, 提交于 2000 年 4 月 28 日并且题为 EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS (编码靶相关抗原表位的表达载体); 美国专利申请号 10/292, 413 (公开为 US 2003/0228634A1), 提交于 2002 年 11 月 7 日并且题为 EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS AND METHODS FOR THEIR DESIGN (编码靶相关抗原表位的表达载体和设计它们的方法); 美国专利申请号 10/225, 568 (公开为 US 2003/0138808), 提交于 2002 年 8 月 20 日和 PCT 申请号 PCT/US2003/026231 (公开为公开号 WO 2004/018666), 其提交于 2003 年 8 月 19 日, 两者题为 EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS (编码靶相关抗原表位的表达载体); 和美国专利号 6, 709, 844, 题为 "AVOIDANCE OF UNDESIRABLE REPLICATION INTERMEDIATES IN PLASMID PROPAGATION (避免质粒增殖中的不合乎需要的复制中间体)", 将其每个全部内容结合在本文作为参考。

[0059] 本发明的实施方案还意欲在针对如下列各项中公开的具体癌症的定向免疫应答中的特定益处的具体抗原组合: 例如美国临时号 60/479, 554, 其提交于 2003 年 6 月 17 日, 和美国专利申请号 10/871, 708 (公开为 US 2005/0118186), 其提交于 2004 年 6 月 17 日, 美国专利申请号 11/323, 049 (公开为 US 2006/0159694A1), 其提交于 2005 年 12 月 29 日, 和 PCT 专利申请号 PCT/US2004/019571, 其提交于 2004 年 6 月 17 日, 全部题为 "COMBINATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN VACCINES FOR VARIOUS TYPES OF CANCERS (用于各种类型的癌症的疫苗中的肿瘤相关抗原的组合)", 将其每个全部内容结合在本文作为参考。

[0060] 本文所指并且由本领域技术人员公知的表位限定为这样的抗原部分, 所述抗原的部分与免疫系统的抗原受体相互作用; 在该情形中, 所述抗原部分由用于 T 细胞受体 (TCR) 识别的 MHC 分子所呈递。免疫原是能够刺激免疫应答的分子。如本文公开的本发明所意欲的免疫原可以以非限制性方式包括多肽或编码多肽的核酸, 其中所述多肽能够刺激免疫应答。免疫原可以与相应的 TAA 或其片段相同, 但是不必需如此。免疫原可以包括, 但不必限于在细胞表面上呈递的表位肽和非共价结合 (复合) 于 I 类 MHC 的结合裂隙 (cleft) 的肽, 以致它们可以与 T 细胞受体 (TCR) 相互作用。另外, 免疫原可以包括表位-MHC 复合物或在它们表面上表达所述复合物的细胞。

[0061] 将如本文所指并且如本领域技术人员公知的模拟表位 (mimotope) 定义为模拟表位结构并引起相同或交叉反应免疫应答的化合物。本文所指并且如本领域技术人员公知的

合成表位是化学合成的非天然表位分子。用于合成蛋白质、肽等的方法是本领域公知的。

免疫增强剂和生物反应调节剂 (BRMS)

[0062] 本文公开的本发明的实施方案包括通过施用免疫原性组合物增强 T 细胞免疫应答的方法,所述免疫原性组合物包括免疫原加上免疫增强剂或其它生物反应调节剂 (BRM)。BRMs 可以以免疫抑制或免疫刺激方式作用从而调节免疫应答,例如,通过促进效应反应或抑制 T 调节反应进行。用于本文的免疫增强剂或 BRMs 可以指通过除与抗原受体之外的相互作用调节免疫系统或其细胞的活性的任何分子。用于本文时,BRMs 还可以包括天然或合成的小有机分子,其通过刺激先天免疫性的途径发挥免疫调节作用。

[0063] 可以用于本发明的实施方案中的优选的免疫增强 BRMs 是引发细胞因子或趋化因子产生的分子,如但不限于在分别结合 TLR9 和 TLR3 的 APC 和先天免疫细胞上的 Toll-样受体 (TLRs) 的配体、肽聚糖、LPS 或类似物、咪喹莫特 (imiquimodes)、未甲基化的 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpGODNs)、dsRNAs、如细菌 dsDNA (其包含 CpG 基序) 和合成的 dsRNA (polyI:C)、等等。要注意的是,这些 BRMs 是与系统递送时安全问题相关的有效免疫调节剂。CpG 尤其 (TLR-9 配体) 通过容许抗原呈递细胞的有效成熟和随后的抗原特异性淋巴细胞的活化显示处广泛的实验应用以及作为佐剂的临床潜力 (Krieg, A. M., Annu Rev Immunol (免疫学年度综述) 20:709-760, 2002; Weigel, B. J. 等, Clin. Cancer Res. (临床癌症研究) 9:3105-3114, 2003; Verthelyi, D. 等, Aids (辅助) 18:1003-1008, 2004; Storni, T. 等, J Immunol (免疫学杂志) 172:1777-1785, 2004; 将其每个的全部内容结合在本文作为参考)。避免这些安全性问题的一个方法是使用如在下列各项中公开的淋巴管内 (intralymphatic) 施用:例如,美国专利申请号 11/321,967 (公开为 US. 2006/0153844A1), 其提交于 2005 年 12 月 29 日并且题为 METHODS TO TRIGGER, MAINTAIN, AND MANIPULATE IMMUNE RESPONSES BY TARGETED ADMINISTRATION OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS INTO LYMPHOID ORGANS (通过靶向施用生物反应调节剂到淋巴器官中来引发、维持和操控免疫应答的方法), 将其全部内容结合在本文作为参考。

[0064] 用于本文时,术语 BRM 可以指通过除与抗原受体之外的相互作用调节免疫系统或其细胞的活性的任何分子。还经常将 BRM 应用于复合生物制剂,所述复合生物制剂包括一种或多种活性实体,而不管混合物的活性成分是否已经被限定。用作 BRMs 的复合生物制剂的实例包括 OK-432, PSK, AIL, 香菇多糖,等。在本发明的一些实施方案中,所述混合物的活性成分被限定。在本发明的其它实施方案中,来源于复合生物制剂的 BRMs 至少部分被纯化或基本被纯化,如例如,OK-PSA (Okamoto 等, Journal of the National Cancer Institute (国家癌症研究所杂志), 95:316-326, 2003, 将其全部内容结合在本文作为参考) 或 AILb-A (Okamoto 等, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (临床和诊断实验室免疫学), 11:483-495, 2004 将其全部内容结合在本文作为参考)。在优选实施方案中,所述 BRM 是限定的分子组合物。BRMs 包括活化 pAPC 或 T 细胞的免疫增强佐剂,包括,例如:TLR 配体,胞吞模式的识别受体 (PRR) 配体,皂树皂苷,妥卡雷琐,细胞因子,等。公开了一些优选的佐剂,例如,在 Marciani, D. J. Drug Discovery Today (今日药物发现) 8:934-943, 2003 中所公开,将其全部内容结合在本文作为参考。

[0065] 在涉及施用细胞作为免疫原的一些实施方案中,所述 BRM 可以是由所述细胞表达

的分子。在一个方面中,所述 BRM 分子可以由细胞以组成型或响应一些生物刺激而天然表达。在另一个方面中,表达取决于重组 DNA 或其它遗传改造技术。

[0066] 一类 BRM 主要包括小的有机天然或合成分子,其通过刺激先天免疫性的途径发挥免疫调节作用。已经显示巨噬细胞、树突细胞和其它细胞携带所谓的 Toll 样受体 (TLRs),其识别微生物上的病原体相关的分子模式 (PAMPs) (Thoma-Uszynski, S. 等, Science (科学) 291:1544-1547, 2001; Akira, S., Curr. Opin. Immunol., (当前免疫学观点) 15:5-11, 2003; 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。还考虑了结合 TLRs 的小分子如新产生的纯合成的抗病毒咪唑并喹啉例如咪唑莫特和瑞喹莫德,已经发现其通过结合 TLRs 7 和 8 刺激免疫性的细胞途径 (Hemmi, H. 等, Nat Immunol (自然免疫学) 3:196-200, 2002; Dummer, R. 等, Dermatology (皮肤病学) 207:116-118, 2003; 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。

[0067] 将这样的 BRMs 用在优选的实施方案中,所述 BRMs 与检测微生物成分的受体直接相互作用。然而,还可以使用在信号传导途径下游作用的分子。因此,可以将结合共刺激分子(如,例如,抗-CD40, CTLA-4, 抗-OX40, 等)的抗体用作本发明的实施方案中的 BRMs。类似地,在其他实施方案中,用在本发明的实施方案中的 BRMs 可以包括,例如 IL-2, IL-4, TGF- β , IL-10, IFN- γ , 等;或引起它们的产生的分子。此外,如本发明所意欲的其他 BRMs 可以包括细胞因子,如例如 IL-12, IL-18, GM-CSF, flt3 配体 (flt3L), 干扰素, TNF- α , 等;或趋化因子如 IL-8, MIP-3 α , MIP-1 α , MCP-1, MCP-3, RANTES, 等。

[0068] 佐剂是提高抗原的免疫原性的分子和制备物。它们可以具有如上所述的免疫增强活性,但是取代所述活性或除了所述活性之外也可以具有改变免疫原的物理状态的性质。佐剂的作用不是抗原特异性的。然而,如果它们与纯化的抗原一起施用,可以将它们用于选择性促进对所述抗原的反应。例如,当蛋白质抗原被明矾沉淀时,免疫应答被增加。抗原的乳化作用也延长抗原呈递的持续时间。适合的佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物,如细胞因子,毒素或合成的组合物。经常优选的示例性佐剂包括,但不限于,弗氏完全佐剂(包含杀死的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的免疫应答的非特异性刺激物),弗氏不完全佐剂,和氢氧化铝佐剂。

[0069] 使肽更具有免疫原性的一个目前使用的方法是在专门抗原呈递细胞 (APCs) 如树突细胞 (DCs) 的背景下注射它们 (Steinmann, R. M., Ann Rev Immunol (免疫学年评) 9, 271-96, 1991, 将其全部内容结合在本文作为参考)。DCs 是免疫系统的有效 APCs。也可以使用的其它佐剂包括 MDP 化合物如,例如 thur-MDP 和 nor-MDP, CGP (MTP-PE), 脂质 A, 和单磷酸脂质 (monophosphoryl lipid) A (MPL)。还意欲 RIBI, 其在 2% 角鲨烯 / 吐温 80 乳状液中包含由细菌中提取的三种成分, MPL, 海藻糖霉菌酸酯 (trehalose dimycolate) (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS)。两亲性和表面活性剂,例如皂苷和衍生物如 QS21 (Cambridge Biotech (剑桥生物技术)), 形成另一组意欲在本发明的实施方案中使用的佐剂。还可以使用非离子嵌段共聚物表面活性剂 (Rabinovich 等, 1994, 将其全部内容结合在本文作为参考)。

施用本发明的免疫原性组合物

[0070] 本文公开的本发明的实施方案涉及给受试者施用包含免疫原加免疫增强剂或 BRM 的免疫原性组合物由此诱导或增强抗原特异性 T 细胞应答的方法。在优选实施方案中,将

免疫原性组合物以指数增加的方式提供给受试者。在另一个实施方案中,将免疫原性组合物以线性增加的方式提供给受试者。

[0071] 根据本文公开的方法,免疫原性组合物可以通过本领域技术人员已知的递送组合物的任何方法递送给受试者。因此,本发明的免疫原性组合物向受试者的施用可以是皮内、腹膜内、肌内、粘膜和节内施用到淋巴样器官(例如,淋巴结内),但不限于这些。例如,在一些实施方案中,施用免疫原性组合物可以通过透皮、透粘膜、鼻、支气管、口部、直肠和/或皮下方式进行。在一些实施方案中,施用免疫原性组合物可以包括直接递送到淋巴系统中。在其它实施方案中,施用免疫原性组合物可以由向淋巴系统中的直接递送组成。如本领域技术人员公知的,人淋巴系统包括淋巴、淋巴细胞、淋巴管、淋巴结、扁桃体、脾、胸腺和骨髓。

[0072] 在一些实施方案中,理想的是可以将有效量的包含免疫原加上免疫增强剂或 BRM 的免疫原性组合物节内施用或递送到受试者由此激发增强的 T 细胞应答。在一些实施方案中,增强的应答包括线性增加的 T 细胞应答刺激。在一些实施方案中,增强的应答包括指数增加的 T 细胞应答刺激。在下列各项中公开节内施用:例如美国专利号 6,994,851 和 6,977,074 ;PCT 专利公开号 WO/9902183A2 ;和美国专利公开申请号 20050079152,将其每个全部内容结合在本文作为参考。在下列各项中更充分讨论用于评估和监测免疫反应性的诊断技术与免疫方法的整合,例如美国专利申请号 11/155,928,提交于 2005 年 6 月 17 日并且题为"IMPROVEDEFFICACY OF ACTIVE IMMUNOTHERAPY BY INTEGRATINGDIAGNOSTIC WITH THERAPEUTIC METHODS(通过整合诊断与治疗方法提高主动免疫治疗的功效)",将其全部内容结合在本文作为参考。

施用装置

[0073] 本文公开的免疫原性组合物可以通过如下面的实施例所示的用皮下注射器(hypodermic syringe)进行的大丸剂注射,或其它本领域公知的用于接种的类似功能装置进行递送。递送/施用的其它方法可以包括输注,例如通过免疫原递送载体,如例如泵,皮下或直接递送到淋巴系统中。在优选实施方案中,递送载体在动物的外部但是包含递送抗原到体内、优选地到淋巴器官或高淋巴流区域的工具(例如,针或导管)。免疫原递送载体的优势是其避免多次进行的注射。

[0074] 位于患者体外的递送装置/载体(外部装置),包括容纳免疫原性组合物的储存器,将组合物泵出储存器的可编程的泵,传递组合物的传递通道或管道,和将组合物引入患者体内以最终达到淋巴系统的工具。在优选的实施方案中,可以将泵进行编程以增大输注的体积从而提供需要的增加的免疫原浓度。在备选的实施方案中,用包括连续加大浓度的免疫原的组合物填充泵的储存器。优选地,用于免疫原性组合物的储存器足够大以随时间递送需要量的免疫原,并且其是容易再填充的或可置换的,而不需要使用者再将引入免疫原组合物的工具插入淋巴系统中。进一步讨论用于免疫的外部泵包括示例性泵的应用,例如在美国专利号 6,997,074 题为"Method of Inducing a CTL Response,(诱导 CTL 应答的方法)"中进行讨论,将其全部内容结合在本文作为参考。

治疗和给药方案

[0075] 一般而言,本发明的实施方案用于治疗患有疾病的受试者,针对所述疾病受试者的免疫系统引发(mount)对疾病相关抗原的细胞介导的反应从而攻击所述疾病。所述类型的疾病可以是例如恶性肿瘤或由细菌、病毒、原生动物、寄生虫或任何微生物病原体引起的传染病,所述微生物病原体进入细胞内并且被例如细胞毒性 T 淋巴细胞攻击。在治疗方式上,所述方法充分适应于持续或慢性病症,但是不必限于此。此外,本发明用于免疫这样的受试者,所述受试者可以处于发展传染病或肿瘤的危险中。

[0076] 在治疗本发明意欲的疾病和 / 或病症中,可以使用施用包括免疫原加上免疫增强剂或 BRM 的免疫原性组合物的给药方案和计划表。在一些实施方案中,可以将本文公开的免疫原性组合物作为多个连续剂量进行施用,其中在起始剂量后的每个剂量是增加的剂量。所述连续增加的剂量可以作为线性或指数增加的剂量进行提供。用于本文时,线性增加的剂量指一系列等于 nd_i 的剂量,其中 d_i 是起始剂量并且 n 是所述系列的指数,以致所述剂量系列是 $d_i, 2d_i, 3d_i, \dots, nd_i$ 。通过指数增加的剂量,意指一系列剂量等于 $x^{n-1}d_i$, 其中 $x > 1$, 以致剂量系列是 $d_i, xd_i, x^2d_i, x^3d_i, \dots, x^{n-1}d_i$ 。因此,如果 $x = 2$, 每个剂量是所述系列中紧接其前的剂量的两倍;如果 $x = 5$, 每个剂量是所述系列中的紧接其前的剂量的 5 倍。因此,在优选的实施方案中,可以将本发明的免疫原性组合物施用为多个连续剂量,其中将每个剂量以起始剂量的指数因子 x^{n-1} 倍进行提供。根据需要,所述多个剂量可以是 2, 3, 4, 5, 6 或更多的剂量。在施用的起始剂量可以是产生免疫应答的非常低的剂量的情形中,可以将许多剂量(即, 7, 8, 9, 10, 12, 15 或更多剂量)施用给受试者以获得更具免疫原性的有效剂量应答。

[0077] 在本发明的一些实施方案中,免疫原性组合物包括包含抗原或其免疫原性部分的细胞。在这些实施方案的一些中,所述细胞充当抗原呈递细胞,表达并且处理所述抗原,或被所述抗原或所述抗原的表位肽或其他免疫原部分脉冲(pulse)。所述细胞可以天然表达抗原(或免疫原),例如表达 TuAA 的癌症细胞,或可以被操控以这样进行,例如被编码免疫原的 mRNA 转染的树突细胞。例如,所述细胞可以是癌症或肿瘤细胞或抗原呈递细胞,但不限于此。所述肿瘤细胞可以是膀胱细胞、乳腺细胞、肺细胞、结肠细胞、前列腺细胞、肝细胞、胰腺细胞、胃细胞、睾丸细胞、脑细胞、卵巢细胞、淋巴细胞、皮肤细胞、脑细胞、骨细胞、软组织细胞等。所述抗原呈递细胞可以是例如,树突细胞。可以通过相对于紧接其前的剂量的施用的细胞连续增加施用的细胞数量或通过相对于紧接其前的剂量的细胞表面上的表位-MHC 复合物,连续增加的细胞表面上的表位-MHC 复合物的数量来增加这些实施方案中的剂量,其中所述表位来自靶抗原,或两者。在细胞表面上的表位-MHC 复合物的数量可以通过用不同浓度的表位脉冲来最容易地进行操控。

[0078] 因此,施用以与剂量制剂相容的任何方式和以这样的量如治疗或预防有效的量进行。本发明的免疫原性组合物的有效量或剂量是提供被治疗的受试者的需要的应答所需要的量,包括但不限于:疾病或病症、其进展或其症状的预防、减轻、逆转、稳定或其它改善。免疫原性组合物的剂量和剂量计划表可以根据受试者,以受试者为基础,考虑例如这样的因素而变化,所述因素如受试者的体重和年龄,待治疗的疾病和 / 或病症的类型,疾病或病症的严重性,以前或同时发生的治疗干预,个体免疫系统响应的能力,需要的保护的程 度,施用的方式等,全部这些可以由执业医师容易地确定。

[0079] 本文所用的组合物可以包括各种“单位剂量”。将单位剂量定义为包含预定量的治

疗组合物,对所述预定量进行计算以产生与其施用相关的需要的响应,即适当的路径和治疗方案。待施用的量和特定的路径和制剂在临床领域技术人员的技术之内。待治疗的受试者,特别是受试者的状态和需要的保护也是重要的。单位剂量不需要作为单次注射施用,但是可以包含在设定的时间段内的持续输注。

[0080] 在本发明的其它实施方案中,意欲将多个剂量的免疫原性组合物在彼此的约24-48小时内施用,在彼此的约12-24小时内施用,但是最优选地在彼此的约6-12小时内施用,在剂量之间约24小时的间隔是最优选的。在一些实施方案中,理想的是以数天间隔施用多个本发明的免疫原性组合物剂量,其中在随后的施用之间经过(lapse)数天(例如,1,2,3,4,5,6或7)。例如,起始剂量可以以低剂量随后以第二低剂量或高剂量进行施用,所述第二剂量可以在起始剂量后的1,2,3或更多天进行施用;接着,第三剂量可以在第二剂量后的1,2,3或更多天进行施用;接着,第四剂量可以在第三剂量后的1,2,3或更多天进行施用等。在一些实施方案中,连续剂量可以以受抗原的半衰期影响的间隔进行提供。抗原的半衰期是抗原的50%被受试者的正常生物过程代谢或消除的时间。因此,技术或临床从业者将确定施用多个剂量的免疫原性组合物的时间阶段以及随后的施用之间经过的时间从而优化CD8⁺T细胞免疫应答。

[0081] 取决于给药方案和施用的剂量的有效性,施用本发明的免疫原性组合物的间隔可以在数分钟到数天的范围内。然而,意欲在第一次剂量的数天内施用最后一次剂量从而增加反应性T细胞的数量,所述反应性T细胞的数量随时间对应于剂量的线性或指数增加。在各种实施方案中,在第一次和最后一次剂量之间的时间间隔可以是少于7天,优选地其可以是4或5天,并且更优选地,最后一次剂量可以在第一次剂量的6天内施用。因此,待施用的最后一次剂量不仅取决于施用的天数以及起始剂量的有效性,还由产生免疫应答的T细胞的数量增加而确定。随着时间,激发的免疫应答将衰退并且所述程序可以重复以延长或重新建立免疫性。

[0082] 本发明的免疫原性组合物可以作为治疗剂向其进行施用的受试者可以包括各种年龄的人和动物,如,但不限于,牛、绵羊、猪、山羊和家庭宠物如狗、猫、兔、仓鼠、小鼠、大鼠等。本发明的免疫原性组合物可以主要用于治疗这样的人,其需要在治疗疾病或病症如癌症或传染病中诱导、持续或指数刺激特异性免疫原性反应。

试剂盒

[0083] 本文所述的任何组合物可以在试剂盒中一起组装。在非限制性实施例中,用于递送免疫原性组合物的一种或多种药剂或试剂可以在试剂盒中单独提供或与另外的试剂组合以治疗由传染病或癌症导致的疾病或病症。然而,这些成分不意味着限制。所述试剂盒将提供贮存和分配药剂或试剂的适合的容器工具。

[0084] 试剂盒通常在适当的容器工具中包含用于施用于受试者的包含免疫原的药用制剂加免疫增强剂或BRM的免疫原性组合物,以及用于施用的说明书。所述试剂盒可以具有单一容器工具和/或其可以具有用于另外的化合物的单独的容器工具,所述另外的化合物如用于治疗由于传染病或癌症引起的疾病或病症的治疗剂的免疫学/治疗有效的制剂。所述试剂盒可以在适当的容器工具中另外包含数个剂量的免疫原性组合物,其分别在单独的容器工具中。数个剂量的免疫原性组合物可以是两个或更多连续增加剂量的免疫原性组合

物,其中每个在后的剂量大于紧接其前的剂量。在一些实施方案中,所述试剂盒包含两个或多个剂量的免疫原性组合物,每个剂量在适当的单独的容器工具中。例如,所述试剂盒可以包含 2,3,4,5,6,7 或更多剂量的免疫原性组合物,每个剂量在适当的单独的容器工具中。在其它实施方案中,所述试剂盒可以包括数个剂量的免疫原,或免疫增强剂或 BRM,其每个在单独的容器工具中。

[0085] 在试剂盒的成分以一种和 / 或多种液体溶液提供的情形中,液体溶液是水性溶液,其中无菌水性溶液是特别优选的。还可以将所述组合物配制成可注射的组合物,在所述情形中,容器工具本身可以是注射器、吸液管和 / 或其它这样的装置,从其中所述制剂可以递送或注射到受试者中,和 / 或甚至应用和 / 或与试剂盒的其它成分混合。在一些实施方案中,试剂盒的成分可以作为干粉提供。当成分(例如试剂)作为干粉提供时,所述粉末可以通过加入适合的溶剂进行重构。考虑所述溶剂还可以以另外的容器工具进行提供。

[0086] 根据本发明使用的增加的剂量可以通过施用甚至更大体积的相同浓度,或相同体积的更大浓度,或其一些组合进行提供。因此,在各种实施方案中,试剂盒可以包含单独包装的剂量;或一个或多个多剂量容器,从所述容器可以分配和施用增加的体积;或一个或多个多剂量容器,从所述容器体积被分配,进行连续更少的稀释和施用固定的体积;或如将它们提示给本领域技术人员的类似的装配和应用。

[0087] 容器工具将通常包括至少一个小瓶,安瓿,测试管,烧瓶,瓶,注射器和 / 或其它容器工具,其包含免疫原和 / 或免疫增强剂或 BRM。所述试剂盒还可以包含用于包含无菌药用缓冲剂和 / 或其它稀释剂的第二容器工具。本发明的试剂盒还将典型地包括用于包含实施本发明方法的材料的工具,以及被紧密封闭用于商业销售的任何其它试剂容器。所述容器可以包括在其中保持需要的小瓶的注射或吹塑塑料容器。不管容器的数量或类型,本发明的试剂盒还可以包含用于辅助在受试者体内注射 / 施用免疫原性组合物的仪器或与其一起包装,所述免疫原性组合物包含免疫原,加上免疫增强剂或 BRM。所述仪器可以是注射器、泵和 / 或任何这样的医学批准的递送工具。

[0088] 在一些实施方案中,提供包含增加剂量的免疫原性组合物的一组注射器,其中在起始剂量后的每个剂量大于紧接其前的剂量。在一些实施方案中,提供一组包含增加剂量的免疫原性组合物的小瓶,其中在起始剂量后的每个剂量大于紧接其前的剂量。所述增加的剂量可以通过线性方式或通过指数方式连续增加。

[0089] 已经详细描述了本发明,显而易见的是在不背离后附的权利要求中定义的本发明范围的情况下,改进、变化和等价的实施方案是可能的。此外,应该理解在本发明公开内容中的所有实施例作为非限制性实施例进行提供。

实施例

[0090] 提供下列非限制性实施例以进一步说明本发明。本领域技术人员应当理解下列实施例中所披露的技术代表了发明人在发明实践中发现作用良好的方法,因而可以认为构成了其操作模式的实例。不过,本领域技术人员在本说明书的启示下,应当理解可以在披露的特定实施方案中进行许多改变,并且仍然能够获得一样或类似的结果,而不背离本发明的精神和范围。

实施例 1 :材料和方法

[0091] 小鼠 .6-12 周龄 C57BL/6 小鼠购自 Harlan(Horst, 荷兰)。TCR318 转基因小鼠获自 Cytos Biotechnology AG(Cytos 生物技术 AG)(Schlieren, 瑞士),其表达对肽 gp33(aa33-41) 特异性的 T 细胞受体,该肽代表在 H-2^b 小鼠中位于糖蛋白中的、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 (choriomeningitis) 病毒 (LCMV) 的优势免疫表位 (Pircher, H., 等 1989. Nature(自然)342:559-561;Pircher, H. 等, Nature(自然)346,629-633,1990,将其每个全部内容结合在本文作为参考)。表达 HLA A2.1 的 HHD 转基因小鼠初始获自 MannKind Corporation(MannKind 公司)(Valencia, CA;Pascolo, S. 等, J Exp Med(实验医学杂志)185,2043-2051,1997,将其全部内容结合在本文作为参考)。根据瑞士兽医管理机构的规定,将小鼠在苏黎士的大学医院中的无特异性病原体设备中进行培育和保持。

[0092] 病毒,肽和寡脱氧核苷酸. LCMV 分离株 WE 获自实验免疫学研究所,大学医院,苏黎士,瑞士 (the Institute of Experimental Immunology, University Hospital, Zurich, Switzerland)。使用病灶形成测试 (focus forming assay) 在 MC-57 成纤维细胞上测定 LCMV 滴度 (Battegay, M. 等, J Virol Methods(病毒学方法杂志)33,191-198;1991,将其全部内容结合在本文作为参考)。将表达 LCMV 糖蛋白 (vacc-gp) 的重组牛痘病毒 (Bachmann, M. F. 等, Eur J Immunol(欧洲免疫学杂志)24,2228-2236,1994,将其全部内容结合在本文作为参考) 在 BSC40 细胞上生长和成斑 (Kundig, T. M. 等, J Virol(病毒学杂志)67,3680-3683;1993,将其全部内容结合在本文作为参考)。LCMV 糖蛋白肽 gp33(aa33-41; KAVYNFATM, SEQ ID NO:3) 和 gp61(aa61-80;GLNGPDIYKGVYQFKSVEFD, SEQ ID NO:4) 和 VSV 肽 np52(SDLRGYVYQGLKSG, SEQ ID NO:5) 购自 EMC Microcollections(Tübingen, 德国)。流感基质肽 (GILGFVFTL, SEQ ID NO:6) 购自 Neosystems(Strasbourg, 法国)。所用的 HPV16 E7(aa49-57;RAHYNIVTF, SEQ ID NO:7) 肽在曼康公司 (Mannkind Corporation)(Valencia, CA) 合成至 > 99% 纯度。硫代磷酸酯修饰的富含 CG 的寡脱氧核苷酸 1668(5' -TCCATG ACG TTC CTG AAT AAT-3', SEQ ID NO:8) 由 Microsynth(Balgach, 瑞士) 合成。

[0093] 免疫计划表. 设计不同的免疫计划表 (s1-s6) 以便在一到四天时间内递送固定累积剂量的 125 μ g gp33(KAVYNFATM, SEQ ID NO:3) 肽或流感基质肽 (GILGFVFTL, SEQ ID NO:6;Falk, K. 等 Immunology(免疫学)82,337-342,1994,将其全部内容结合在本文作为参考) 和 12.5nmol CpG 1668(表 1)。注意计划表 3(s3) 和 4(s4) 分别在 5 倍稀释步骤上遵循指数降低或升高模式。用相同的累积剂量 125 μ g, 并按照相同的计划表实施用流感基质肽进行免疫。

[0094] 过继转移实验. 将 1×10^6 TCR- 转基因 T 细胞重悬于 250 μ l PBS 中并注射入性别匹配的 C57BL/6 小鼠尾静脉中,以便提高前体 T 细胞频度并利于对免疫应答的评估。一天后,如表 1 所示,将受体动物在颈区用混合了胞嘧啶-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸 (CpG ODN) 的不同剂量的 gp33 肽进行皮下接种。或者,将小鼠静脉内感染 LCMV-WE 株 (250pfu)。用相同的累积剂量 125 μ g, 按照相同的计划表实施用流感基质肽进行免疫。

[0095] FACS 分析. 为了进行表面抗原的 FACS 分析,准备无 RBC 的血液、脾或淋巴结的单细胞混悬液。将细胞在冰上用抗 -CD16/CD32 培育五分钟进行 Fc γ - 受体封闭,并用 PE 标记的 gp33I 类 MHC 四聚体 (gp33/H-2Db) 于 37°C 染色 15 分钟,随后用其它表面抗原在冰上染色 20 分钟。所有的染色都在 PBS/FCS 2% 中用 0.01% 叠氮化钠进行。为了进行 IFN- γ 的

细胞内染色,将单细胞混悬液在完全培养基中用 $2 \times 10^{-6} \text{M}$ gp33 肽和 $10 \mu \text{g/ml}$ 布雷菲德菌素 (Brefeldin A) (西格玛 (Sigma), Buchs, 瑞士) 体外培养四小时。随后如上对淋巴细胞进行表面染色,在无蛋白质的 PBS/PFA 1% 中固定 10 分钟,在 PBS/NP40 0.1% 中于冰上透化处理 3 分钟,最后用抗 IFN- γ 抗体在 PBS/FCS 2% 中于冰上温育 35 分钟。样品捕获在 FACSCalibur 上并使用来自 BD Biosciences (San Jose, CA) 的 CellQuest 软件或来自 TreeStar Inc. (TreeStar 公司) (Ashland, OR) 的 FlowJo 软件进行分析。所有其它抗体都购自 BD Pharmingen (San Diego, CA)。

[0096] 体内的抗病毒免疫性评估. 将接种的雌性 C57BL/6 小鼠于腹膜内感染 $1.5 \times 10^6 \text{pfu}$ vacc-gp。五天后,分离出卵巢并如 Kundig, T.M. 等在 J Virol (病毒学杂志) 67, 3680-3; 1993, 同上中所述在 BSC 40 细胞上测定牛痘的滴度。或者,用 250pfu LCMV-WE 感染小鼠,并在 MC57 细胞上测定脾中的病毒滴度 (Battegay 等, 1991, 同上)。

[0097] 细胞毒性测定和细胞因子分泌分析. 将 1×10^5 转基因 gp33- 特异性 T 细胞在 24 孔板中与同系经辐照的喂饲细胞 (2×10^6 细胞 / 孔; 2000 rads) 一起培养六天,并用指定量的 gp33 肽进行脉冲。随后将效应细胞重悬于 $300 \mu \text{l}$ 新鲜培养基中并进行三倍稀释。将 EL-4 细胞用 10^{-6}M gp33 肽进行脉冲并在五小时的 ^{51}Cr 释放测定中用作靶细胞 (Bachmann, M. F. 等, Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志) 24, 2228-36, 1994, 同上)。用 Cobra II 计量器 (Canberra Packard, Downers Grove, IL) 测量细胞培养物上清液中的放射活性。每天评估非放射活性的培养物上清液的 IFN- γ , IL-2 和 IL-10 浓度。利用珠-多重-测定和流式细胞计数进行细胞因子分析。

[0098] 制备骨髓来源的树突细胞进行接种. 骨髓细胞分离自幼年 C57BL/6 小鼠的股骨,并以 2×10^6 细胞接种在 100-mm 培养皿, 10ml 具有 50ng/ml rmGM-CSF 和 25ng/ml rmIL-4 的补充培养基中 (R&D 系统 (R&D Systems), Minneapolis, MN)。在第七天,收获细胞,并使用抗 CD11c 微珠 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 德国) 通过阳性选择来纯化 DCs。将纯化的细胞接种于六孔板中并用 $2 \mu \text{M}$ CpG ODN 1668 刺激过夜。使用一组针对 CD80、CD86、CD40、CD11c 的标记过的 mAb, 以及小鼠种系抗体混合物 (CD3e, Cd11b, CD45R/B220, Ly-76, Ly-6G, Ly-6C) 通过流式细胞术来评估 DC 表型。所有抗体都获自 BD Pharmingen。随后,将 DCs 用 HPV E7(aa49-57) 肽 (RAHYNIVTF, SEQ ID NO: 7) 于 $10 \mu \text{g/ml}$ 在 37°C 下脉冲两小时。在向麻醉 C57/B6 小鼠的腹股沟淋巴结双侧施用 $25 \mu \text{l}$ LDC 之前,用 PBS 洗涤 DCs 三次 (Johansen 等 2005a, Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志) 35: 568-574, 将其全部内容结合在本文作为参考)。十只小鼠组在第 1 天 (s1) 接受单次大丸剂注射 DCs (1.11×10^5) (s1), 或第 1, 3 和 6 天注射指数或逐渐升高数目的 DCs (10^3 , 10^4 , 和 10^5) (s4)。

[0099] E7 四聚体分析. 在第 17 天从小鼠 ($n = 10$) 中分离 PBMCs, 并在密度离心后从 RBCs 中分离单核细胞 (哺乳动物淋巴细胞分离液 (Lympholyte Mammal), Cedarlane 实验室)。通过用 H-2Db HPV16 E7 (RAHYNIVTF, SEQ ID NO: 7)-PE MHC 四聚体 (Beckman Coulter) 和 FITC 缀合的抗 CD8a (Ly-2) (BD Pharmingen) mAb 于 40°C 染色细胞一小时来量化 E7₄₉₋₅₇ 特异性 CTL 应答。使用 FACSCalibur 收集数据并使用 CellQuest 软件进行分析。

[0100] ELISPOT 分析. 为了进行产 IFN- γ 细胞的量化,在第 21 天时分离脾并制备单细胞混悬液 ($n = 7$)。通过密度离心分离单核细胞并重悬于无血清的 HL-1 完全培养基中,其包含非必需氨基酸,丙酮酸钠,谷氨酰胺 pen-strep, β -巯基乙醇,和 HEPES。在 96 孔滤膜

板中 (Multi-screen IP 膜 96-孔板, Millipore) 将一式三份的 2.5×10^5 脾细胞与 $10 \mu\text{g}$ /孔的 HPV16E7 肽于 37°C 温育 72 小时。在利用来自 U-Cytech biosciences (Utrecht, 荷兰) 的包被和检测 IFN- γ 抗体的 24 小时显色后, 使用 ELISpot 读取器和来自 AID (Strassberg, 德国) 的软件量化 ELISPOTs。

[0101] 肿瘤保护研究. 第 21 天时 (最后一次注射 DCs 后 15 天), 用 HPV 转化的肿瘤细胞系 C3.43 的 10^5 个细胞刺激来自每个接种组的三只小鼠和七只首次用于实验的 C57/B6 小鼠 (Feltkamp 等 1993. Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志) 23 :2242-2249 ;Feltkamp 等 1995. Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志) 25 :2638-2642, 将其每个全部内容结合在本文作为参考), 并在 DMEM, 10% FBS, 2mM L-谷氨酰胺, 和 $50 \mu\text{M}$ 2-巯基乙醇中进行培养。在左肋皮下施用细胞。通过口径测量 (mm) 和计算的肿瘤体积来监测肿瘤进程。

[0102] 统计学分析. 进行假定等变量的斯氏 t-检验, 并以低于 0.05 的未配对的双尾 p 值来考虑数据的显著性。使用 Mann Whitney U 检验或通过 Kurskal-Wallis ANOVA 来分析非参数或非正常分布的数据。使用对数排列检验 (log rank test) 进行 Kaplan-Meier 存活曲线的比较。

实施例 2 : 指数增加的抗原刺激增强 CD8⁺T 细胞应答

[0103] 研究了是否可以通过提高抗原刺激来增强 T 细胞应答。在第一个实验中, 将 1×10^6 转基因 gp33-特异性 T 细胞转移入 C57BL/6 野生型受体小鼠以提高前体 T 细胞频度并利于对免疫应答的评估。

[0104] 使用图 1D 和表 1 中公开的不同接种方案, 将混合了 CpGODN 的相同累积剂量的 gp33 肽 (总共 $125 \mu\text{g}$ gp33 和 12.5nmol CpG) 来免疫所有小鼠 :s1) 第 0 天时大丸剂注射单次剂量 ;s2) 在四天里四次等同剂量 ;s3) 在四天里减少剂量 ;和 s4) 在四天里增加剂量。此外, 用单次剂量的 CpG 免疫小鼠组, 随后用指数增加剂量的 gp33 肽 (s5), 或用单次剂量的 gp33 随后用指数增加剂量的 CpG (s6) 免疫小鼠组。在第 0 天时静脉内感染 250pfu LCMV 病毒的小鼠充当阳性对照。在第 6 天 (图 1A), 第 12 天 (图 1B) 和第 8 天 (图 1C), 通过血液淋巴细胞的细胞内 IFN- γ 染色来量化 CD8⁺T 细胞应答, 所述淋巴细胞在体外用 gp33 肽进行再刺激。图 1B 描绘了第 12 天分析的代表性 FACS 实施例。

[0105] 选择 CpG ODN 作为佐剂, 因为它们强烈增强 CD8⁺T 细胞应答 (Krieg, A. M., Annu Rev Immunol (免疫学年度综述) 20, 709-60, 2002 ;Schwarz, K. 等, Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志) 33, 1465-70, 2003, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。将硫代磷酸酯稳定化的 ODN 从血浆中清除, 半衰期为 30-60 分钟 (Farman, C. A. & Kornbrust, D. J., ToxicolPathol (毒物学和病理学) 31Suppl, 119-22, 2003, 将其全部内容结合在本文作为参考)。不过, 在组织中 CpG ODN 相对稳定, 半衰期为 48 小时 (Mutwiri, G. K., 等, J Control Release (控释杂志) 97, 1-17, 2004, 将其全部内容结合在本文作为参考)。另外, 在文献中提到, 在 60 分钟内, 血清蛋白酶将游离的肽降解到检测水平之下 (Falo, L. D., Jr., 等, Proc Natl Acad SciUSA (美国国家科学院学报) 89, 8347-50, 1992 ;Widmann, C., 等, J Immunol (免疫学杂志) 147, 3745-51, 1991, 同上)。

[0106] 数据显示, 导致与 LCMV 野生型感染相当量级的 CD8⁺T 细胞应答的免疫需要将 gp33 和 CpG 都以指数增加方式进行施用。使用每天均一剂量的 gp33 和 CpG 的免疫诱导第二次

最强烈的 CD8⁺T 细胞应答,然而其显著弱于剂量升高刺激(第 6 天时, $p = 0.0001$)。如果疫苗组分的任一种作为单一剂量递送,免疫效力显著减弱,但与首次用于实验的对照相比要显著(在第六天时, $2.23 \pm 0.84\%$ 对 $0.19 \pm 0.12\%$ $p = 0.02$)。

[0107] 在未接受 TCR 转基因细胞的首次用于实验的野生型小鼠中进行类似的观察(图 1C)。与其它接种方案相比,用指数增加的疫苗(gp33 和 CpG)剂量免疫的 C57BL/6 小鼠显示出显著增强的 CD8⁺T 细胞诱导($2.1 \pm 0.4\%$),所述其它接种方案诱导出勉强可检测的特定 CD8⁺T 细胞频度。在第四天没有测试组显示出可测量的免疫应答(数据未显示)。这些结果表明,不依赖于总体剂量,接种动力学是免疫原性的关键参数。

[0108] 在第四天没有测试组显示出可测量的免疫应答(数据未显示)。总体来说,这些结果显示出不依赖于总体剂量,抗原和佐剂的动力学是免疫原性的关键参数。

[0109] 在附图中:s1:单次剂量的 gp33 肽和 CpG;s2:等剂量的 gp33 肽和 CpG;s3:指数减少剂量的 gp33 肽和 CpG;s4:指数增加剂量的 gp33 肽和 CpG;s5:指数增加剂量的 gp33 肽和初始单次剂量的 CpG;s6:初始单次剂量的 gp33 肽和指数增加剂量的 CpG;首次用于实验的:未处理的小鼠;LCMV:在第 0 天用 250pfu LCMV 静脉内免疫的小鼠。数值代表每组四只小鼠的平均值和 SEM。显示了三次类似实验中的一次代表性实验。

[0110] 图 1B 是在第 12 天时分析的代表性 FACS 实施例。上组:用 gp33 肽再刺激,下组:无 gp33 再刺激的对照染色(下组)。

表 1: 免疫计划表

计划表		第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	累积剂量
s1	肽 (μg)	125	0	0	0	125 μg
	CpG (nmol)	12.5	0	0	0	12.5 nmol
s2	肽 (μg)	31.25	31.25	31.25	31.25	125 μg
	CpG (nmol)	3.1	3.1	3.1	3.1	12.4 nmol
s3	肽 (μg)	100	20	4	0.8	125 μg
	CpG (nmol)	10	2	0.4	0.08	12.5 nmol
s4	肽 (μg)	0.8	4	20	100	125 μg
	CpG (nmol)	0.08	0.4	2	10	12.5 nmol
s5	肽 (μg)	0.8	4	20	100	125 μg
	CpG (nmol)	12.5	0	0	0	12.5 nmol
s6	肽 (μg)	125	0	0	0	125 μg
	CpG (nmol)	0.08	0.4	2	10	12.5 nmol

实施例 3: CD8⁺T 细胞应答的增强不依赖于 T 细胞辅助

[0111] 与 CD8⁺T 细胞引发相关的 T-辅助的作用是本领域公知的。Th 表位可能对于功能性 CD8⁺T 细胞免疫性是关键性的(Johansen 等, Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志)., 34, 91-97,

2004 ;Shedlock 和 Shen, Science(科学), 300, 337-339, 2003 ;Sun 和 Bevan, Science(科学), 300, 339-342, 2003, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。另一方面,在前体频度高的情况下,CD8⁺T 细胞应答的 Th 依赖性较小 (Mintern 等, J Immunol. (免疫学杂志), 168, 977-980, 2002, 将其全部内容结合在本文作为参考),特别是当使用强免疫原,例如, LCMV gp33 时。而且,施用途径也可以影响对 T- 辅助的需求 (Bour 等, J Immunol. (免疫学杂志), 160, 5522-5529, 1998, 将其全部内容结合在本文作为参考)。所以,CTL 的 Th- 依赖性非常依赖于实验条件设置。基于这一假说,发明人通过用指数增加的疫苗剂量进行接种检查了 CD8⁺T 细胞应答的增强是否不依赖于 T 细胞辅助。

[0112] 使用 LCMV 的 I 类 LCMV gp33(aa33-41) 肽和 II 类 LCMVgp61(aa61-80) Th 抗原表位的混合物如上述方案(见表 1)一样用指数增加的疫苗剂量对小鼠进行免疫。观察到通过用指数增加的疫苗剂量进行接种的 CD8⁺T 细胞应答的增强不依赖于 T 细胞辅助,因为在用上述方案免疫的小鼠中获得了对于 CD8⁺T 细胞应答的剂量动力学的相同效应(数据未显示)。

[0113] 为了检查上面观察到的指数免疫是否可以用其它肽实现,将分析扩展到另一种源自流感基质蛋白的肽,其结合人 HLA A2.1I 类分子 (Falk, K. 等, Immunology(免疫学):82, 337-42, 1994, 同上)。用流感基质肽 (GILGFVFTL, SEQ ID NO:1) 和 CpG ODN 皮下免疫表达 HLA A2.1 的转基因小鼠 (HHD ;Pascolo, S. 笔, J. Exp. Med. (实验医学杂志)185, 2043-51, 1997, 同上)。免疫计划表如表 1 中所述(上面)。将疫苗给药为单次大丸剂 (125 μg 肽和 12.5nmol CpG, s1) 或者以剂量增加的方式在四天里施用相同的总剂量 (s4)。将弗氏不完全佐剂 (IFA), 其作为一种缓慢释放抗原的矿物油, 用作阳性对照 (Miconnet, I. 等, J Immunol(免疫学杂志)., 168, 1212-8, 2002 ;Speiser, D. E. 等, J Clin. Invest. (临床研究杂志)115, 739-46, 2005 ;Aichele, P., 等, J Exp. Med. (实验医学杂志)182, 261-6 ;1995, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。八天后在用肽体外再刺激血液淋巴细胞后对 CD8⁺T 细胞分析 IFN-γ 的产生(平均值 ±SEM ;n = 3-4)。观察到指数增加的疫苗剂量比用单次剂量的肽和 CpG (0.6% ±0.2) 或在 IFA 中乳化的肽和 CpG (2.5% ±1.9) 进行处理产生更高频度的产 IFN-γ 细胞 (6.2% ±1.5) ;(图 2)。

实施例 4 :抗原施用四天或更多天诱导最大的 CD8⁺T 细胞应答

[0114] 如上面实施例中所示,在四天时间里指数增多的抗原比大丸剂注射或每天注射等量疫苗剂量诱导显著更加强烈的 T 细胞应答。所以进行实验以检查进一步延长抗原呈递是否还会进一步增强反应。通过作为大丸剂注射剂量或在四、六或八天里注射剂量(图 3A), 用相同总剂量的 gp33 肽和 CpG (125 μg gp33 和 12.5nmol CpG) 皮下免疫 C57BL/6 小鼠组, 但是遵循不同的指数动力学,在第 0 天(大丸剂)、三天、五天或七天时达到峰值。

[0115] 在最后一次注射的不同时间点,分离血液淋巴细胞并用 gp33 肽体外再刺激以便通过流式细胞术测定 CD44 表达和细胞内 IFN-γ。如图 3B 中所示,与单次大丸剂注射相比,在四、六或八天里注射在免疫应答的高峰导致相当的显著增强频度的特异性 CD8⁺T 细胞,所述高峰是在最后一次注射后的四到七天。FACS 密度印迹描绘了在免疫应答的峰值上通过 FACS 测量的 CD44^{hi} 和产 IFN-γ 的 CD8⁺ 阳性淋巴细胞的频度,数目显示了产 IFN-γ 的 CD44^{hi} CD8⁺T 细胞的平均百分比。两次类似实验中显示其中一次 (n = 3-4)。

[0116] 产 IFN- γ 的 CD44^{hi} CD8⁺T 细胞的平均百分比也被描述为时间函数 (图 3C)。两次类似实验中显示其中一次 ($n = 3-4$)。与诱导显著更弱反应的更短或更长的抗原模式相比,在第四天出现峰值的抗原动力学诱导显著更强的 CTL 反应。而且,在最后一次注射后的四周测量的休眠记忆细胞的数量没有统计学上的差异。对这些观察结果的生物学原因可能是 CD8⁺T 细胞增殖和分化成效应细胞要花几天时间,对于免疫系统来说在一天或两天内甚至与压倒性感染宿主的病原体相抗衡也是困难的。另一方面,当它们被 CTL 一直抵抗时,在延长时间内复制的病原体引发更多的损害。

实施例 5:指数增加的抗原刺激增强保护性抗病毒反应

[0117] 为了进一步阐明以上观察结果的功能相关性,根据不同方案 (如表 1 中所示的 s1-s4) 用固定累积剂量的 gp33 肽和 CpG 免疫雌性野生型 C57BL/6 小鼠,随后在 T 细胞应答已经处于收缩期或记忆期时的时间点用 LCMV 或表达 LCMV 糖蛋白 (vacc-gp) 的重组牛痘病毒进行攻击 (Kaeck, S. M., 等, Nat Rev Immunol (自然免疫学综述) 2, 251-62, 2002, 将其全部内容结合在本文作为参考)。针对两种病毒的保护都排他性地依赖于 CD8⁺T 细胞 (Binder, D. 和 Kundig, T. M., J Immunol (免疫学杂志) 146, 4301-7, 1991; Kundig, T. M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (美国国家科学院学报) :93, 9716-23, 1996, 将其每个全部内容结合在本文作为参考)。

[0118] 如上所述用指数增加量的 (s4) 或大丸剂注射 (s1) gp33 肽和 CpG 免疫小鼠 ($n = 4$) (表 1)。阴性对照小鼠不进行处理 (首次用于实验的) 并将阳性对照小鼠用 LCMV (250pfu) 感染。在第 10 天和 30 天将小鼠放血以便使用 gp33-MHC- 四聚体和流式细胞术分析 gp33 特异性效应或记忆 CTLs (图 4A) 或在第 30 天体外用 gp33 再刺激后分析产 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞 (图 4B)。图 4A 描绘了第 10 天和 30 天的 gp33- 四聚体阳性 CD44^{hi} 表达,从左到右为首次用于实验的, s1, s4 和 LCMV。根据上述结果,指数增加剂量的肽 (gp33) 和 CpG 比单次免疫接种诱导显著更高频度的产 IFN- γ 效应和记忆细胞 (图 4B) 和 gp33- 四聚体阳性记忆 (CD44^{hi}) 细胞 (图 4A)。第 30 天时,通过腹膜内注射 250pfu LCMV 刺激所有小鼠。四天后,在脾中测量病毒滴度。第 30 天时,腹膜内用 250pfu LCMV 攻击小鼠。四或五天后,收集脾或卵巢用于测定 LCMV。尽管大丸剂 (s1)- 免疫接种的小鼠未得到针对病毒复制的显著保护 (图 4C),但当与首次用于实验或大丸剂- 免疫接种的小鼠相比时,指数增加的接种诱导抑制 LCMV 滴度大约 10 到 20 倍的显著的保护 ($p < 0.01$)。

[0119] 在另一组实验中,使用不同方案免疫 C57BL/6 小鼠,随后在第 8 天 (图 4D) 或 24 天 (图 4E) 用 1.5×10^6 pfu 的重组牛痘病毒 (vacc-gp) 静脉内进行刺激。五天后,在卵巢中测定 vacc-gp 复制 (图 4D 和 4E)。同样地,只有以剂量增加方式免疫的小鼠能够呈现出显著保护性 CD8⁺T 细胞应答,比其它肽免疫方案在平均两到三个数量级上更好地抑制病毒复制。

[0120] 所以这些结果,证明在免疫期间抗原呈递的动力学的生物学相关性。

实施例 6:激活的 APCs 的数目并不依赖于刺激动力学的类型

[0121] 为了测试免疫动力学是否影响激活状态和激活的 APCs 的数目,根据图 1-3 和表 1 中所述免疫方案 s1 (大丸剂注射) 和 s4 (指数增加的剂量) 用 gp33 肽和 CpG 免疫 C57BL/6 小鼠。在腹股沟区皮下施用疫苗。一、四、六和八天后,移除腹股沟淋巴结并通过流式细胞术

对其单细胞混悬液分析 DC 标记 CD11c、以及 CD86 和 II 类 MHC 标记 I-Ab 的表达 (图 5A)。结果被显示为作为相对于首次用于实验的对照 (第 0 天) 的平均荧光的表达。结果提示不同的动力学既不关键性地影响引流淋巴结中 DCs 的数目, 它们的状态也并非通过 II 类 MHC(I-Ab) 和 CD86 表达来监测 (图 5A)。不过, 尽管 DC 数目和激活的峰是可比较的, 但它们在时间上间隔 2-3 天。DC 激活在最大 CpG 剂量后一天达到其最大值, 不取决于免疫动力学类型。

[0122] 所以, 指数增加接种对于 CD8⁺T 细胞诱导是最佳的, 仅仅因为抗原肽是在 DCs 最具活化性的时间点被递送的, 这一可能性得到验证。如果这是真实的, 在大丸剂注射 CpG 后一天或在四天内以指数增加方式最后一次给药 CpG 剂量后一天以大丸剂施用高剂量的肽, 应当导致与以剂量增多方式给与肽和 CpG 相当的 CD8⁺T 细胞应答。在单独实验中, 根据改进的所述方案 (图 5B) 用 gp33 肽和 CpG 免疫小鼠。一组在第三天接受 CpG 大丸剂并在第四天接受 gp33 肽大丸剂。一组在 0 到 3 天接受指数升高的 CpG 剂量, 随后在第四天接受 gp33 肽快速注射。最后一组在一到四天如上所述接受指数增加剂量的 gp33 肽和 CpG(s4)。在第 10 天于外周血中测量产 IFN- γ CD8⁺T 细胞的频度。结果显示两次相当实验的其中之一的平均值和 SEM(n = 3)。由图 5B 显而易见, 用 CpG 预刺激 APCs 导致 gp33- 特异性免疫应答, 其比通过指数增加模式一起施用 gp33 和 CpG 所产生的应答显著更低 (p = 0.016)。

实施例 7 : 指数增加的抗原刺激支持延长的 T 细胞刺激

[0123] 为了测试免疫动力学如何影响 CD8⁺T 细胞的增殖, 如上和在表 1 中所述, 用单次剂量 (s1), 等同每日剂量 (s2) 或用指数增加剂量 (s4) 的 gp33 肽和 CpG 注射小鼠。一组小鼠未处理作为阴性对照。为了监测增殖, 所有小鼠在第一次免疫前一天静脉内接受来自转基因 TCR318 小鼠的 10^7 或 1.5×10^6 CFSE- 标记的脾细胞。在不同的时间点, 通过尾部放血分离淋巴细胞, 并通过流式细胞术分析 CD8 表达和 CFSE 染色。p 值显示关于已经进入分裂的 CFSE- 标记的 CD8⁺T 细胞, 在 s1 和 s4 计划表之间的统计学差异。所述结果显示两个相当的实验中的一个。大丸剂注射 gp33 肽和 CpG 在免疫后三天引发 CFSE- 标记的 CD8⁺T 细胞分裂 (图 6A 和 6B)。已经两天后可以检测增殖 (图 6B)。在第 5 天, 前体细胞仍旧进入分裂, 尽管以比在第 3 天时更低的程度分裂, 并且到第 7 天, CFSE- 标记的细胞已经停止进入新的分裂。与此相对, 指数增加的刺激显著延长 T 细胞增殖。进入分裂的细胞可以在早至引发后三天进行测定, 尽管尚未接受完全的免疫方案, 并且分裂延长至第五天和第七天 (图 6B)。甚至在第 9 天, 还可以观察到增殖 (未显示)。而且, 分裂指数, 即进行分裂的平均数, s4 比 s2 显著更高 (p < 0.05, 通过 Mann Whitney)。

实施例 8 : 指数增加数目的肽脉冲 DCs 增强 CD8⁺T 细胞应答

[0124] 为了研究不同数目 APCs 的贡献, 用相同总数的肽脉冲 DCs 免疫 C57BL/6 小鼠, 但使用不同的动力学。将骨髓来源的 DCs 用 HPV E7(aa49-57, RAHYNIVTF, SEQ ID NO :2) 肽加载, 并在第 1 天将总共 1.11×10^5 个细胞作为大丸剂注射到腹股沟节点 (s1), 或第 1 天 (10^3 细胞), 第 3 天 (10^4 细胞), 和第 6 天 (10^5 细胞) 以逐渐增多 (s4) 模式施用相同总数的细胞。另外, 于淋巴管内施用疫苗, 以便确保恒定总数的可用于 T 细胞致敏的 DCs。首次用于实验的小鼠被用作阴性对照。在第 17 天和 22 天, 通过流式细胞术分析外周血中的 E7- 四

聚体阳性 CD8⁺T 细胞的频度 (图 7A(■))。数值代表平均值和 SEM(n = 10)。由脾 (n = 7) 中分析 IFN- γ ELISPOTs (图 7A(□))。数值代表平均值和 SEM(n = 7)。在第 21 天,用 HPV 转化的肿瘤细胞系 C3.43 刺激三只接种过的小鼠和十只首次用于实验的小鼠 (图 7B)。通过计算肿瘤体积的口径测量 (mm) 监测肿瘤进程。在通过 s.c 注射加载了 VSV np52 肽的 DCs 免疫的 C57BL/6 小鼠 (n = 4) 中研究刺激后的存活 (图 7C)。Kaplan Meier 曲线的 Log-rank 检验 :s4 $\neq$ s2 :p = 0.0084 ;s2 $\neq$ s1 :p = 0.0082 ;s1 $\neq$ 首次用于实验的 :p = 0.401。

[0125] 指数增加的剂量 (s4) 再次比大丸剂注射疫苗 (s1) 诱导更高数目的抗原特异性 CD8⁺T 细胞。对于分别在第 17 天和第 22 天测量的 MHC-E7- 四聚体阳性的 (图 7A(■)) 和产 IFN- γ (图 7A(□)) CD8⁺T 细胞的频度来说这都是显而易见的。与所测量的 CD8⁺T 细胞应答的强度相一致,用剂量增加方案接种的小鼠抵制用 HPV 转化的肿瘤细胞系 C3.43 进行的刺激 (图 7B)。相反,仅用单次大丸剂免疫接种的小鼠未被保护。

[0126] 通过相同的标记,在用转染的小鼠淋巴瘤细胞 EL-4 刺激以表达 VSV 核蛋白后,用加载了 VSV np52 肽的 DCs 的 (s4) 方案免疫的小鼠显示提高的存活 (图 7C)。通过 s.c 注射负载了 VSV np52 肽 (n = 4) 的 DCs 来免疫 C57BL/6 小鼠。在第一天 (s1) 作为大丸剂或作为等量 (s2) 或在第 1,3,6 天作为剂量升高剂量 (s4) 给药 1.11×10^5 DCs。将首次用于实验的小鼠用作对照。在第 14 天,用剂量 10^6 EL-4N.1 细胞 i.p 刺激所有的小鼠 (Kundig 等, J Immunol (免疫学杂志). 150, 4450-4456, 1993, 同上)。数据说明 (s4) 免疫的小鼠的存活也显著好于根据 (s2) 方案,用在三天以均一数目给药的 DCs 免疫的小鼠的存活 (p = 0.084)。

[0127] 因此,指数增加的接种证实比大丸剂接种更具有免疫原性。因为这些实验在整个免疫过程中以相同水平保持 DC 激活,并且 DCs 的总量是相同的,这证实激活的肽呈递 DCs 的出现动力学确定 CD8⁺T 细胞应答的强度。因此,本发明人得出结论:DC 数量与特异性 T 细胞频度的同步化增加 T 细胞应答的最终爆发能力。尽管在早期反应过程中的特异性 T 细胞的低频度可以有效地用少量抗原脉冲的 DC 刺激,重要的是在后面的初级应答过程中用大量 DCs 再刺激特异性 T 细胞的高频度。

实施例 9:指数增加的抗原刺激增强 T 细胞中的 IL-2 产生:在 T 细胞克隆水平上抗原动力学的影响

[0128] 本发明人接下来研究在上述实施例中的观察是否可以在 T 细胞克隆水平上进行解释,或它们是否是体内 T 细胞选择过程的结果,所述选择过程涉及差别亲和力,抗体亲抗原性 (avidity) 和功能性的 T 细胞克隆型。

[0129] 将 1×10^5 TCR- 转基因 T 细胞与 2×10^6 辐照的充当喂养细胞的同源脾细胞共同培养。将表达识别 gp33 的转基因 T 细胞受体的 T 细胞在 D^b 背景下用相同总剂量的抗原进行体外刺激,所述相同总剂量的抗原对应于不同的模式,即在第 0 天用 10^{-9} M gp33 的大丸剂 (■);在 4 天内分别第 0、1、2 和 3 天,用 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 和 10^{-9} M 的指数增加的 gp33 剂量 (◆);每天用相同的 0.25×10^{-9} M 的 gp33 剂量进行 4 天 (▲);或在 0,1,2 和 3 天分别用 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} 和 10^{-12} M 的指数递减 gp33 剂量 (•)。将没有 gp33 刺激的对照细胞描述为 (*)。每日确定上清液中的 IL-2, IL-10 和 IFN- γ (图 8B),并且在 6 天后,在 5 小时 ⁵¹Cr 释放测定中确定 CTL 活性 (图 8A)。所述值代表两次重复 (图 8A) 和三次重复 (图 8B) 培

养物的平均值。

[0130] 类似于体内发现,指数增加的免疫原剂量诱导最强的 CTL 应答,随后每日施用相同的 gp33 剂量,尽管以大丸剂或用减少的剂量模式施用免疫原产生更弱的 CTL 应答。当用十分之一的肽剂量刺激细胞时,差异甚至更大。CTL 活性与 IL-2 的产生相关(图 8B,上图)。指数增加的免疫原剂量诱导最高量的 IL-2,而恒定的每日免疫原剂量诱导少得多的 IL-2。恒定的抗原刺激诱导高量的 IL-10,与指数增加的抗原刺激相比具有较早的开始(图 8B,中图)。IFN- γ 在用免疫原大丸剂或指数减少量的免疫原刺激的细胞的早期阶段瞬时产生(图 8B,下图)。与此相对,通过恒定或指数增加的剂量的每日刺激诱导特异性 T 细胞分泌更高量的 IFN- γ 。

[0131] 因此,如观察到的,持续和充足的抗原刺激对于维持 IFN- γ 产生是必需的。指数增加的抗原刺激与恒定每日剂量相比似乎产生更少的 IFN- γ 的事实可以通过 IFN- γ 的高体外稳定性以及由于更早产生 IFN- γ 造成的连续累积进行解释。

[0132] 总而言之,用指数增加的免疫原剂量体外刺激克隆型 T 细胞与所有其它抗原模式相比,在较晚的时间点产生更高量的 IL-2 和 IFN- γ 以及刺激的 IL-10。这些观察与这样的结论一致,即由增加的抗原刺激导致的增强的免疫应答在克隆型水平运作。还已经显示这些现象伴随更高的 T 细胞抗体亲抗原性,其对于 T 细胞和树突细胞之间的有效相互作用是重要的(Bousso 和 Robey. 2003. Nat Immunol (自然免疫学) 4:579-585,将其全部内容结合在本文作为参考)。

[0133] 产生 IL-2 是 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞激活的标志,并在调控 T 细胞应答几个阶段中发挥重要作用。TCR(信号 1)和共刺激分子(信号 2)联合使用只诱导 T 细胞的有限克隆扩充。T 细胞的广泛扩增以及分化成效应细胞以呈现多产的 T 细胞应答需要通过 IL-2R 的信号传导(信号 3;Malek, T. R. 和 Bayer, A. L., Nat. Rev. Immunol. (自然免疫学综述), 4, 665-74, 2004,将其全部内容结合在本文作为参考),并且通过 CD8⁺T 细胞生产自分泌 IL-2 是体内 CD8⁺T 细胞扩充的关键驱动物(Malek, T. R. & Bayer, A. L., Nat. Rev. Immunol. (自然免疫学综述), 4, 665-74, 2004,同上;D' Souza, W. N., 等, J Immunol (免疫学杂志), 168, 5566-72, 2002,将其全部内容结合在本文作为参考)。另一方面,IL-10 是 T 细胞增殖的主要抑制剂,其主要通过对树突细胞的调节进行(Moore, K. W., 等, Annu. Rev. Immunol. (免疫学年度综述), 19, 683-765, 2001,将其全部内容结合在本文作为参考)。因此,本发明的体内数据说明,在克隆水平, T 细胞能够解码抗原暴露的动力学。

实施例 10:线性增加的抗原刺激增强 CD8⁺T 细胞应答

[0134] 进行研究以确定 T 细胞应答是否可以通过增加抗原刺激而增强。在实验中,将 1×10^6 转基因 gp33- 特异性 T 细胞转染到 C57BL/6 野生型受体小鼠中,以增加前体 T 细胞频度并且促进对免疫应答的评估。

[0135] 将所有的小鼠用相同累积剂量的混合 CpG ODN 的 gp33 肽(共 125 μ g gp33 和 12.5nmol CpG)进行免疫,使用如下不同的接种方案:s1) 在第 0 天以大丸剂注射进行的一次单一剂量;s2) 在 4 天内的 4 次相等剂量;s3) 在 4 天内线性减少的剂量;和 s4) 在 4 天内线性增加的剂量。另外,将数组小鼠用单次剂量的 CpG 随后用线性增加剂量的 gp33 肽(s5),或用单次剂量的 gp33 随后线性增加剂量的 CpG(s6)进行免疫。将在第 0 天静脉内感

染 250pfu 的 LCMV 病毒的小鼠用作阳性对照。在第 6 天,第 12 天和第 8 天,通过对用 gp33 肽体外再刺激的血液淋巴细胞进行细胞内 IFN- γ 染色来量化 CD8⁺T 细胞应答。

[0136] 将 CpG ODN 选作佐剂,因为它们强烈增强 CD8⁺T 细胞应答 (Krieg, A. M., Annu Rev Immunol (免疫学年度综述) 20, 709-60, 2002; Schwarz, K. 等, Eur J Immunol (欧洲免疫学杂志) 33, 1465-70, 2003, 同上)。将硫代磷酸酯稳定的 ODN 从血浆中清除,其具有 30-60 分钟的半衰期 (Farman, C. A. & Kornbrust, D. J., Toxicol Pathol (毒性病理学) 31 增刊, 119-22, 2003, 同上)。然而,在组织中, CpG ODN 相对稳定,具有 48 小时的半衰期 (Mutwiri, G. K., 等, J Control Release (控释杂志) 97, 1-17, 2004, 上文)。此外,要注意在文献中指出在 60 分钟内,血浆蛋白酶将游离肽降解在检测水平下 (Falo, L. D., Jr., 等, Proc Natl Acad Sci USA (美国国家科学院院报) 89, 8347-50, 1992; Widmann, C., 等, J Immunol (免疫学杂志) 147, 3745-51, 1991, 同上)。

[0137] 观察到导致与用 LCMV 野生型感染相当量级的 CD8⁺T 细胞应答的免疫通过以线性增加方式施用 gp33 和 CpG 进行提供。还观察到尽管诱导强烈的 CD8⁺T 细胞应答,使用均一每日剂量的 gp33 和 CpG 进行的免疫与剂量升高的刺激相比,显著更弱。此外,观察到当疫苗成分之一作为单一剂量递送时,免疫的功效被显著降低,但是与首次用于实验的对照相比,仍然是显著的。

[0138] 在没有接受 TCR 转基因细胞的首次用于实验的野生型小鼠中进行类似的观察。用线性增加的疫苗 (gp33 和 CpG) 剂量免疫的 C57BL/6 小鼠与其它接种方案相比显示出显著增强的 CD8⁺T 细胞诱导,所述其它接种方案诱导勉强可检测的特异性 CD8⁺T 细胞频度。这些结果说明,独立于总体剂量,接种的动力学是免疫原性的关键参数。

实施例 11:线性增加的抗原刺激增强保护性抗病毒反应

[0139] 进行研究以确定保护性抗病毒反应是否可以通过增加抗原刺激增强。在实验中,根据不同的方案 (如在实施例 10 中所述的 s1-s4),用固定累积剂量的 gp33 肽和 CpG (共 125 μ g gp33 和 12.5nmol CpG),接着在 T 细胞应答已经处于收缩或记忆阶段的时间点用 LCMV 或表达 LCMV 糖蛋白 (vacc-gp) 的重组牛痘病毒进行刺激,来免疫雌性野生型 C57BL/6 小鼠 (Kaeck, S. M., 等, Nat Rev Immunol (自然免疫学综述) 2, 251-62, 2002, 同上)。针对两种病毒的保护排他性地取决于 CD8⁺T 细胞 (Binder, D. 和 Kundig, T. M., J Immunol (免疫学杂志) 146, 4301-7, 1991; Kundig, T. M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (美国国家科学院学报) 93, 9716-23, 1996, 同上)。

[0140] 用线性增加量 (s4) 或用实施例 10 所述的大丸剂注射 (s1) gp33 肽和 CpG 来免疫小鼠 (n = 4)。阴性对照小鼠未作处理 (首次用于试验的),并且阳性对照小鼠用 LCMV (250pfu) 感染。在第 10 天和 30 天将小鼠放血,以便使用 gp33-MHC- 四聚体和流式细胞术分析 gp33 特异性效应或记忆 CTLs,或在第 30 天体外用 gp33 再刺激后分析产 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞。据观察线性增加剂量的肽 (gp33) 和 CpG 比单次免疫接种诱导显著更高频度的产 IFN- γ 效应和记忆细胞和 gp33- 四聚体阳性记忆 (CD44^{hi}) 细胞。第 30 天时,通过腹膜内注射 250pfu LCMV 刺激所有小鼠。四天后,在脾中测量病毒滴度。第 30 天时,用 250pfu LCMV 腹膜内刺激小鼠。四或五天后,收集脾或卵巢用于测定 LCMV。据观察尽管大丸剂 (s1)- 免疫接种的小鼠未得到针对病毒复制的显著保护,但当与首次用于实验或大丸

剂免疫接种的小鼠相比时,线性增加的接种诱导抑制 LCMV 滴度的显著的保护 ($p < 0.01$)。

[0141] 在另一组实验中,使用不同方案免疫 C57BL/6 小鼠,随后在第 8 天或 24 天用 1.5×10^6 pfu 的重组牛痘病毒 (vacc-gp) 静脉内进行刺激。五天后,在卵巢中测定 vacc-gp 复制。据观察,只有以剂量增加方式免疫的小鼠能够呈现显著保护性 CD8⁺T 细胞应答,以比其它肽免疫方案更好的数量级抑制病毒复制。

实施例 12 :线性增加的抗原刺激有利于延长的 T 细胞刺激

[0142] 为了测试免疫动力学如何影响 CD8⁺T 细胞的增殖,如实施例 10 中所述,用单次剂量 (s1),相同每日剂量 (s2) 或用线性增加剂量 (s4) 的 gp33 肽和 CpG 注射小鼠。一组小鼠未处理作为阴性对照。为了监测增殖,所有小鼠在第一次免疫前一天静脉内接受来自转基因 TCR318 小鼠的 10^7 CFSE- 标记的脾细胞。在不同的时间点,通过尾部放血分离淋巴细胞,并通过流式细胞术分析 CD8 表达和 CFSE 染色。据观察,相对于单次大丸剂注射刺激方案,线性增加的刺激显著延长 T 细胞增殖。

实施例 13 :线性增加数目的肽脉冲 DCs 增强 CD8⁺T 细胞应答

[0143] 为了研究不同数目 APCs 的贡献,用相同总数的肽脉冲 DCs 免疫 C57BL/6 小鼠,但使用不同的动力学。将骨髓源 DCs 用 HPV E7 (aa49-57, RAHYNIVTF, SEQ ID NO :2) 肽加载,并在第 1 天将总共 1.2×10^5 个细胞作为大丸剂注射入腹股沟节点 (s1),或第 1 天 (2×10^4 细胞)、第 3 天 (4×10^4 细胞)、和第 6 天 (6×10^4 细胞) 以线性增多 (s4) 模式施用相同总数的细胞。另外,于淋巴管内施用疫苗,以便确保恒定总数的可用于 T 细胞引发的 DCs。首次用于实验的小鼠被用作阴性对照。在第 17 天和 22 天,通过流式细胞术分析外周血中的 E7- 四聚体阳性 CD8⁺T 细胞的频度,并由脾中分析 IFN- γ ELISPOTs。在第 21 天,用 HPV 转化的肿瘤细胞系 C3.43 刺激三只接种过的小鼠和十只首次用于实验的小鼠。通过计算肿瘤体积的口径测量 (mm) 监测肿瘤进程。在通过 s.c 注射加载了 VSV np52 肽的 DCs 免疫的 C57BL/6 小鼠中,研究刺激后的存活。

[0144] 据观察线性增加的剂量 (s4) 比大丸剂注射的疫苗 (s1) 诱导更高数目的抗原特异性 CD8⁺T 细胞,这是由分别在第 17 天和第 22 天测量的 MHC-E7- 四聚体阳性和产 IFN- γ CD8⁺T 细胞的频度所证明的。还观察到用剂量增加方案接种的小鼠抵制用 HPV 转化的肿瘤细胞系 C3.43 进行的刺激,而仅用单次大丸剂注射接种的小鼠未被保护。

[0145] 通过 s.c 注射负载 VSV np52 肽的 DCs 来免疫 C57BL/6 小鼠。在第一天作为大丸剂 (s1)、或第 1,3,6 天作为等量剂量 (s2) 或作为剂量升高剂量 (s4) 给药 1.2×10^5 DCs。将首次用于实验的小鼠用作对照。在第 14 天,用剂量 10^6 EL-4N.1 细胞 i.p 刺激所有的小鼠 (Kundig 等, J Immunol (免疫学杂志). 150, 4450-4456, 1993, 同上)。据观察用负载 VSVnp52 肽的 DCs (s4) 方案免疫的小鼠的存活显著好于根据 (s1) 或在该三天以等量给予 DCs 的 (s2) 方案免疫的小鼠的存活。

[0146] 上面所述的各种方法和技术提供了多种方式来实施本发明。当然,应当理解根据本文所述的任何特定实施方案,并非必须全部所述的目标或优点都可以实现。因而,例如,本领域技术人员将会认识到,所述方法可以用这样的方式来实施,即实现或最优化如本文所教导的一种优点或一组优点,而不必实现可能在本文所教导或提示的其它目标或优点。

本文提到了多种有利的或不利的备选方案。应当理解一些优选的实施方案特别包括一种、另一种、或几种有利特征,而其它的实施方案特别包括一种、另一种、或几种不利特征,而另一些特别通过包括一种、另一种、或几种有利特征而减缓了现存的不利特征。

[0147] 另外,本领域技术人员将会认识到来自不同实施方案的各种特征的适用性。类似地,上面讨论的各种元件、特征和步骤,以及与这每种元件、特征或步骤等同的其它已知等同物,可以由本领域普通技术人员混合和匹配以便根据本文所述的原理来实施方法。在各种元件、特征和步骤中,一些可以被特别包括在不同实施方案中,而另一些则被特别排除在外。

[0148] 尽管已经在某些实施方案和实施例的内容披露了本发明,本领域技术人员将会理解本发明延伸超越特定公开的实施方案至其它备选实施方案,和/或其用途和改进和等同物。

[0149] 已经公开了本发明的许多变化和替代元件。还有其它变化和替代元件对于本领域技术人员来说是显而易见的。在这些变化中,包括但不限于,在筛选组中或由治疗产品靶向的特定数目的抗原,抗原的类型,癌症的类型,以及指定的特定抗原。本发明的各种实施方案可以特别包括或排除这些变化或元件中的任何一种。

[0150] 在一些实施方案中,用于描述和要求保护本发明的某些实施方案的表示成分量的数字,诸如分子量的特性,反应条件等等的性质,在某些情况下,应该理解为通过术语“大约”修饰的。因此,在一些实施方案中,书面表示的数字参数和随附的权利要求是近似值,其可以根据特定实施方案所要寻求获得的有利特性而变化。在一些实施方案中,应当根据所报道的明显的位数并通过应用常规舍入(rounding)技术来分析数字参数。尽管设定本发明的一些实施方案的较宽范围的数字范围和参数是近似值,将在具体实施例中提出的数值报道为如实际一样精确。在本发明的一些实施方案中提出的数值可以包含由在它们各自的测量中发现的标准误差而导致的必然出现的某些误差。

[0151] 在一些实施方案中,在描述本发明的特定实施方案(尤其在某些下列权利要求中的某些)中所用的术语“a(一个)”和“an(一种)”和“the(所述)”和类似的指示可以被理解为涵盖单数和复数。本文值的范围的引用仅意欲充当分别指落入所述范围的每个单独的值的简略表达方法。除非在本文另外指出,将每个单独的值如同其在本文单独引用一样结合在说明书中。在本文所述的所有方法可以以任何适当的顺序进行,除非本文另外指出或通过上下文可知是明显冲突的。关于本文的某些实施方案提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅仅意欲更好地说明本发明,并没有对另外要求保护的本发明的范围做出限制。在说明书中的语言不应被解释为实施本发明所需要的任何不要求保护的元件。

[0152] 在本文公开的本发明的备选元件或实施方案的分组不应该被解释为限制性的。每个组成员可以单独或与本文发现的其它组的成员或其它元件组合被引用并且被要求保护。要预期的是,为了方便和/或专利性,可以将组的一个或多个成员包括在组内或从所述组中删去。当任何所述包含或删除发生时,所述说明书在本文被认为包含修改的组,因此满足在后附权利要求中所用的所有马库什权利要求组的书面描述。

[0153] 在本文描述了本发明的优选实施方案,包括本发明人已知地实施本发明的最佳方式。在阅读了前述说明之后,在那些优选实施方案上的变化将对于本领域技术人员而言是

显而易见的。意欲技术人员可以适当地使用所述变化,并且本发明可以以除本文具体描述之外的方式来实施。因此,本发明的许多实施方案包括可应用法律所容许的本文后附的权利要求中引用的主题的所有改进和等价物。此外,在其所有可能变化中的上述元件的任何组合由本发明涵盖,除非本文另外指出或通过上下文可知是明显冲突的。

[0154] 此外,该说明书通篇参考了许多专利和印刷的出版物。将上述引用的参考文献和印刷的出版物中的每一个的全部内容分别结合在本文作为参考。

[0155] 最后,要理解的是本文公开的本发明的实施方案举例说明本发明的原理。可以使用的其它修改也在本发明的范围内。因此,通过实施例的方式,但不局限地,本发明的备选构型可以根据本文的教导使用。因此,本发明不限于如所明确显示和描述的那些。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 托马斯·昆迪希
- [0003] 阿德里安·博特
- [0004] 肯特·史密斯
- [0005] 裘志勇
- [0006] <120> 用于增强 T 细胞应答的方法
- [0007] <130> 40000220-0057-010
- [0008] <140> PCT/US2008/002044
- [0009] <141> 2008-02-15
- [0010] <150> US 60/901,980
- [0011] <151> 2007-02-15
- [0012] <160> 8
- [0013] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0014] <210> 1
- [0015] <211> 9
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <220>
- [0019] <223> 合成肽
- [0020] <400> 1
- [0021] Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
- [0022] 1 5
- [0023] <210> 2
- [0024] <211> 9
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> 人工序列
- [0027] <220>
- [0028] <223> 合成肽
- [0029] <400> 2
- [0030] Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
- [0031] 1 5
- [0032] <210> 3
- [0033] <211> 9
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人工序列
- [0036] <220>
- [0037] <223> 合成肽
- [0038] <400> 3

[0039]	Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met
[0040]	1 5
[0041]	<210>4
[0042]	<211>20
[0043]	<212>PRT
[0044]	<213> 人工序列
[0045]	<220>
[0046]	<223> 合成肽
[0047]	<400>4
[0048]	Gly Leu Asn Gly Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Gln Phe Lys Ser
[0049]	1 5 10 15
[0050]	Val Glu Phe Asp
[0051]	20
[0052]	<210>5
[0053]	<211>14
[0054]	<212>PRT
[0055]	<213> 人工序列
[0056]	<220>
[0057]	<223> 合成肽
[0058]	<400>5
[0059]	Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly
[0060]	1 5 10
[0061]	<210>6
[0062]	<211>9
[0063]	<212>PRT
[0064]	<213> 人工序列
[0065]	<220>
[0066]	<223> 合成肽
[0067]	<400>6
[0068]	Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
[0069]	1 5
[0070]	<210>7
[0071]	<211>9
[0072]	<212>PRT
[0073]	<213> 人工序列
[0074]	<220>
[0075]	<223> 合成肽
[0076]	<400>7
[0077]	Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

[0078]	1	5	
[0079]	<210>8		
[0080]	<211>21		
[0081]	<212>DNA		
[0082]	<213> 人工序列		
[0083]	<220>		
[0084]	<223> 合成肽		
[0085]	<400>8		
[0086]	tccatgacgt tcctgaataa t		21

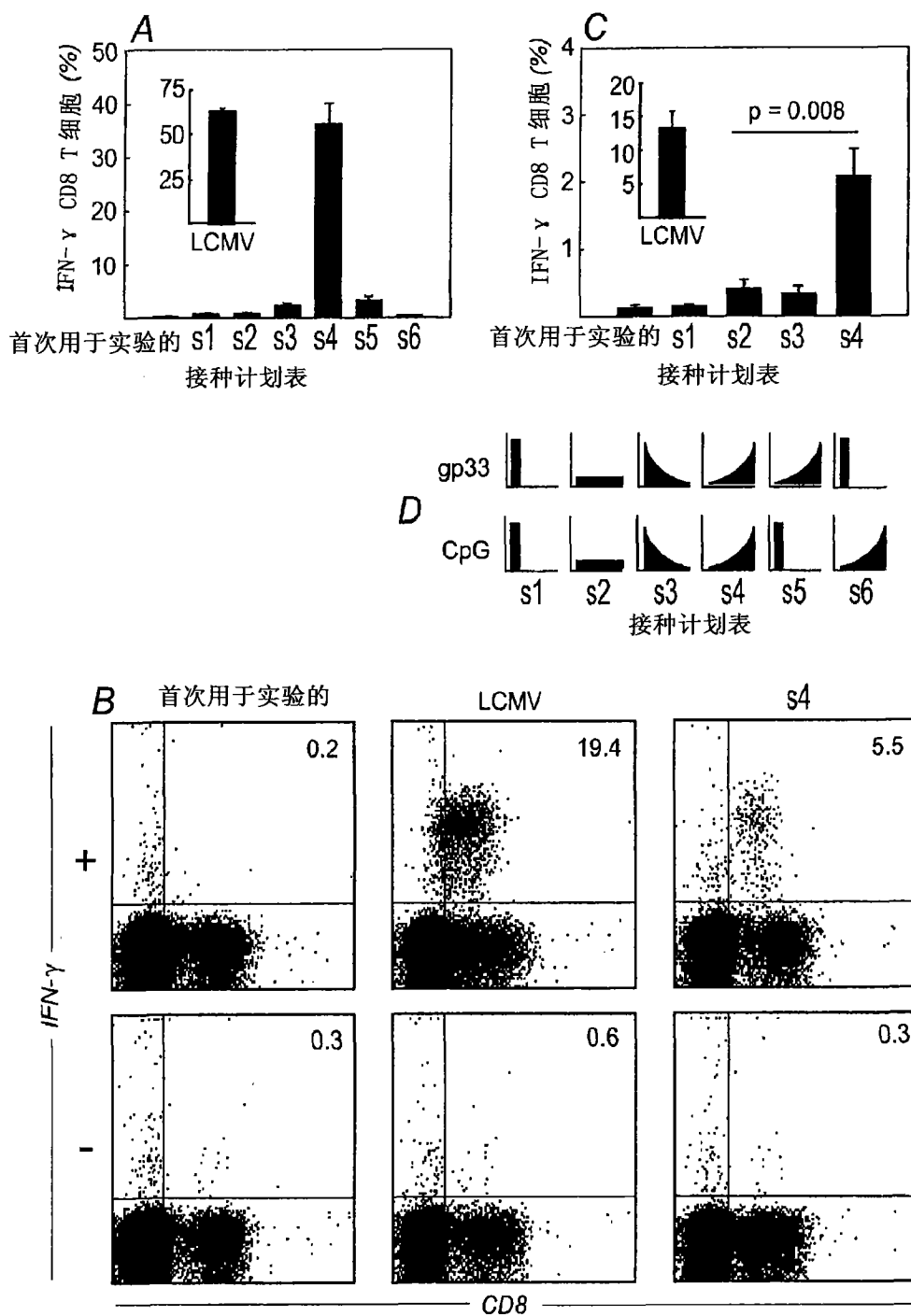


图 1

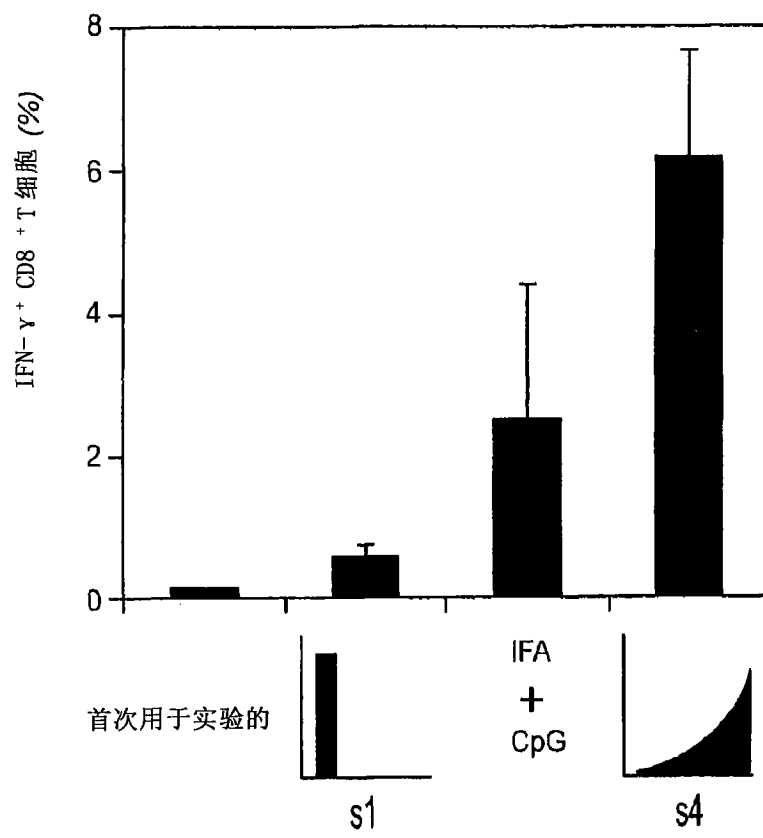


图 2

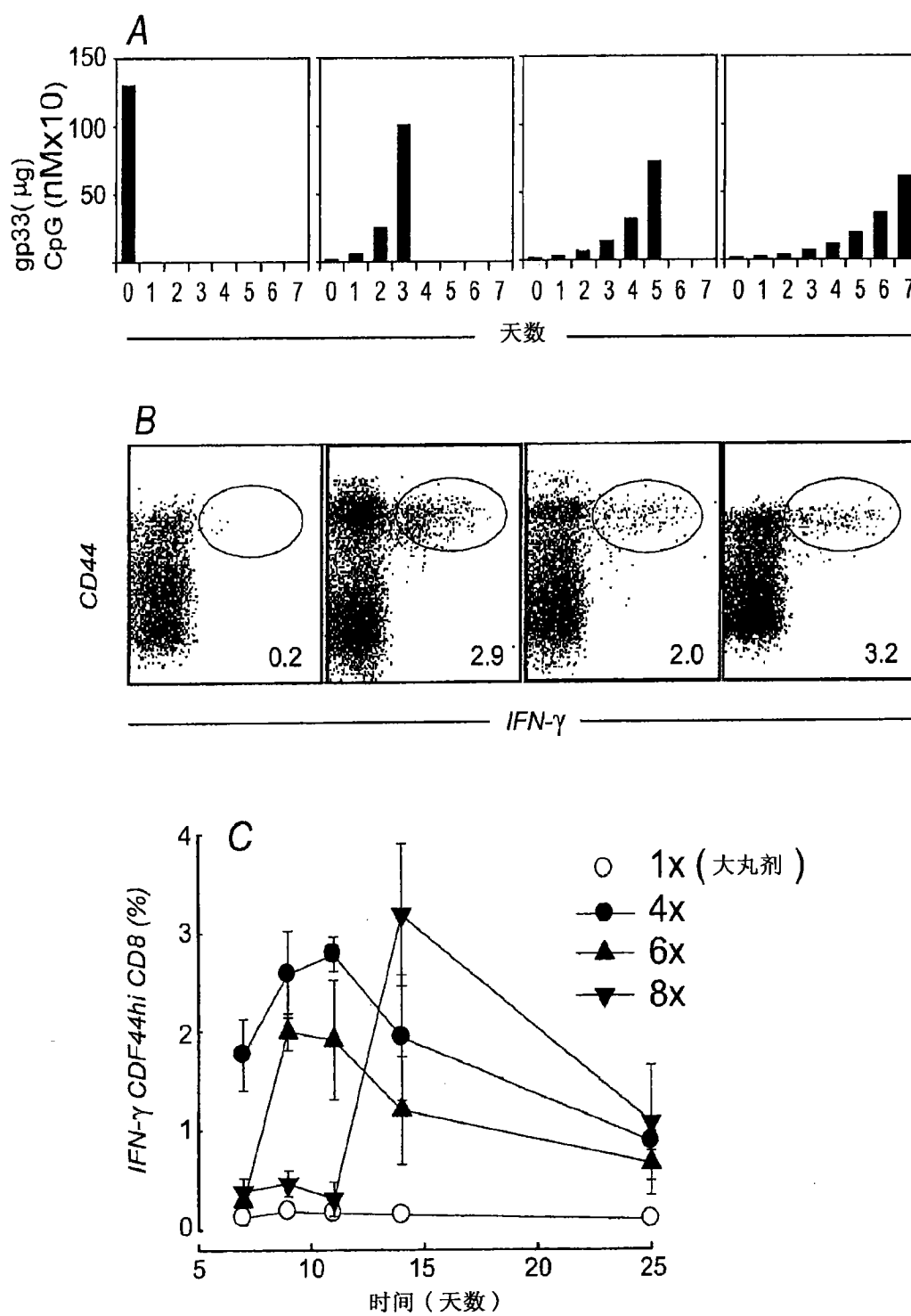


图 3

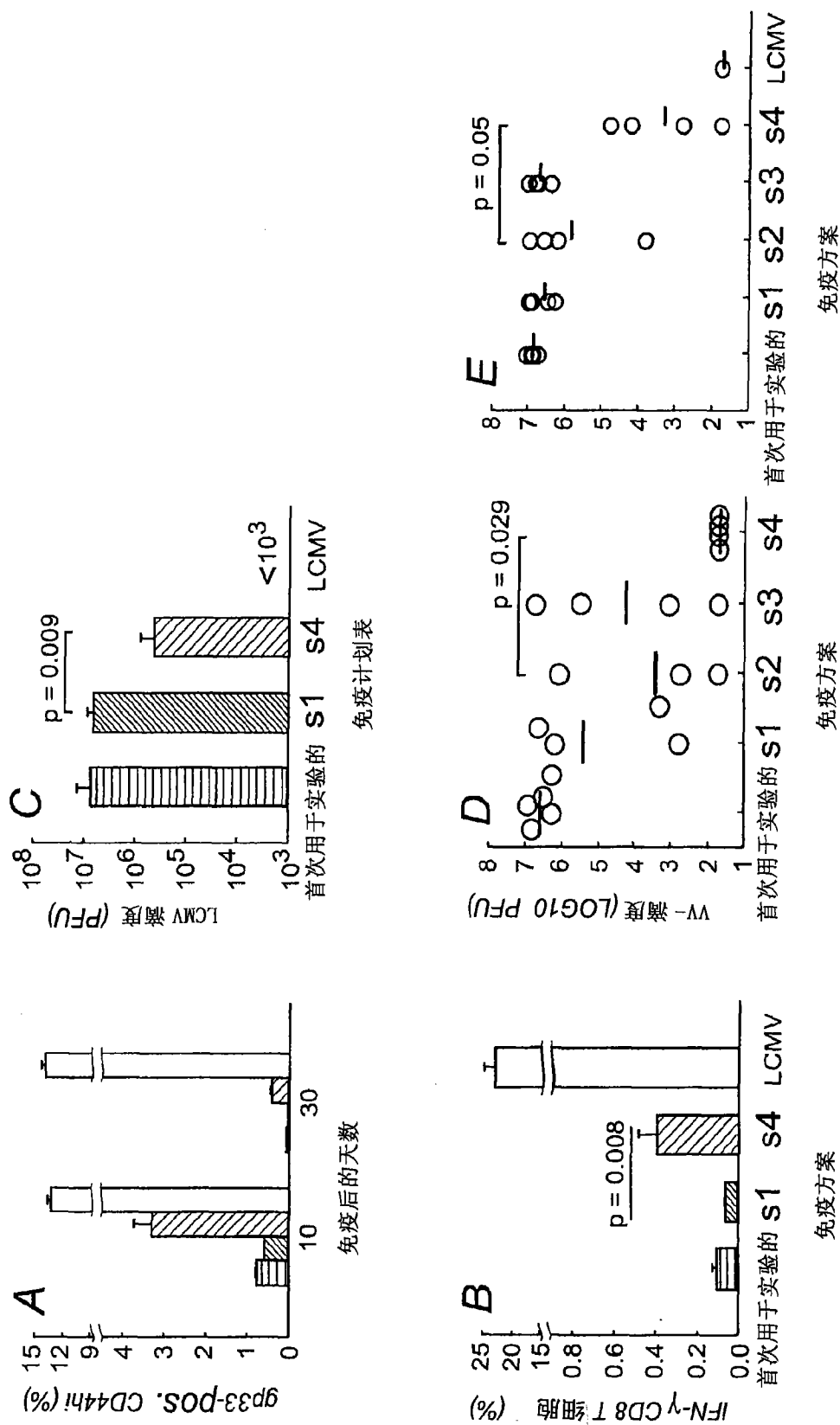


图 4

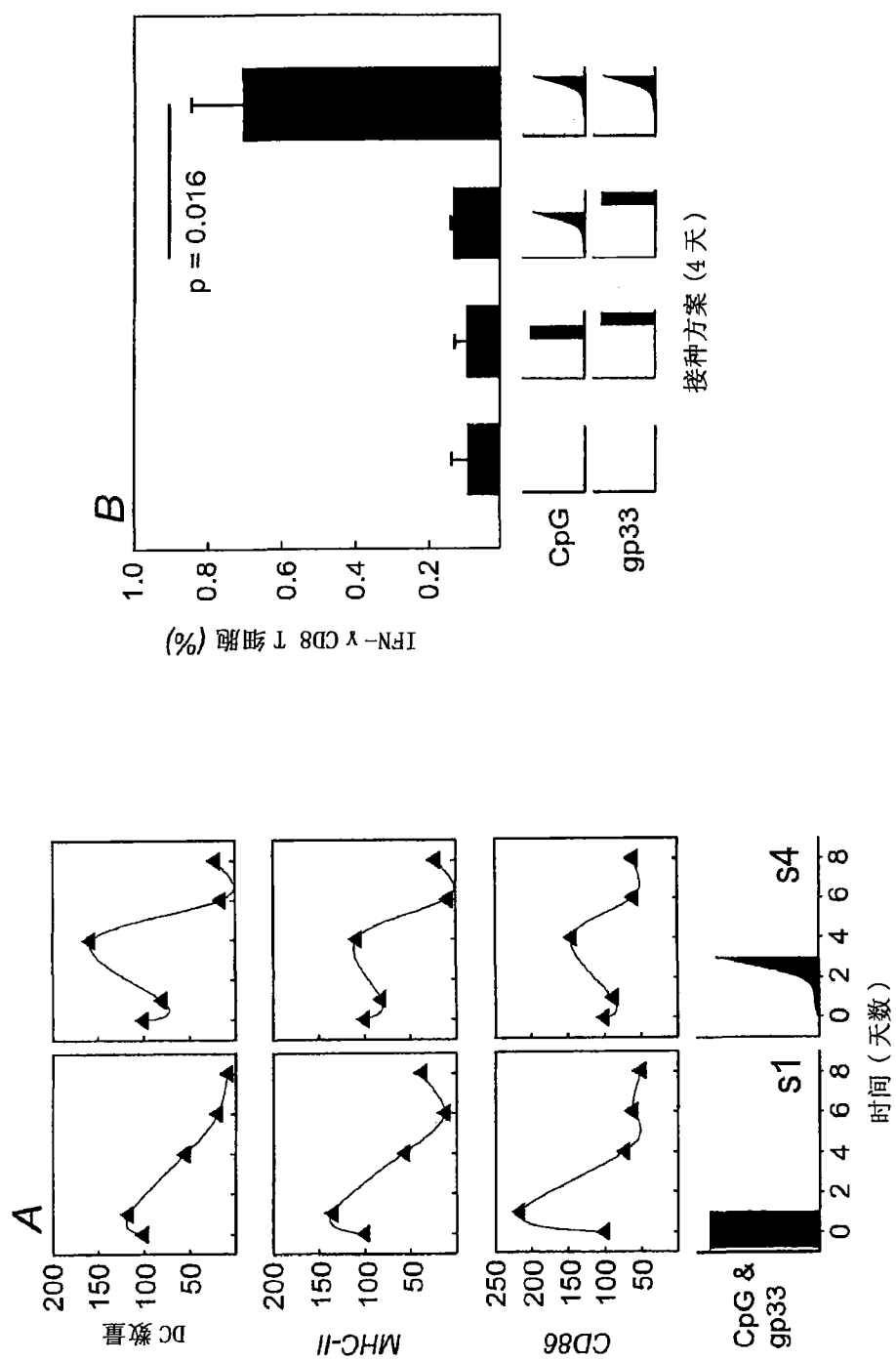


图 5

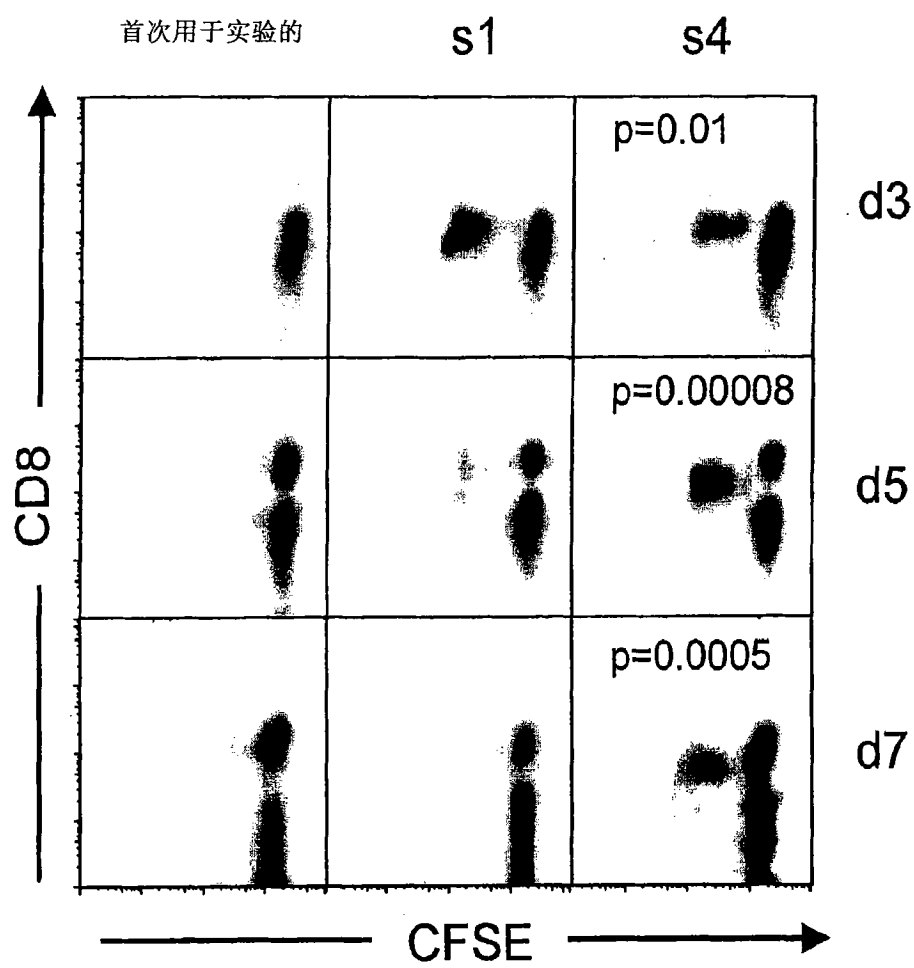


图 6A

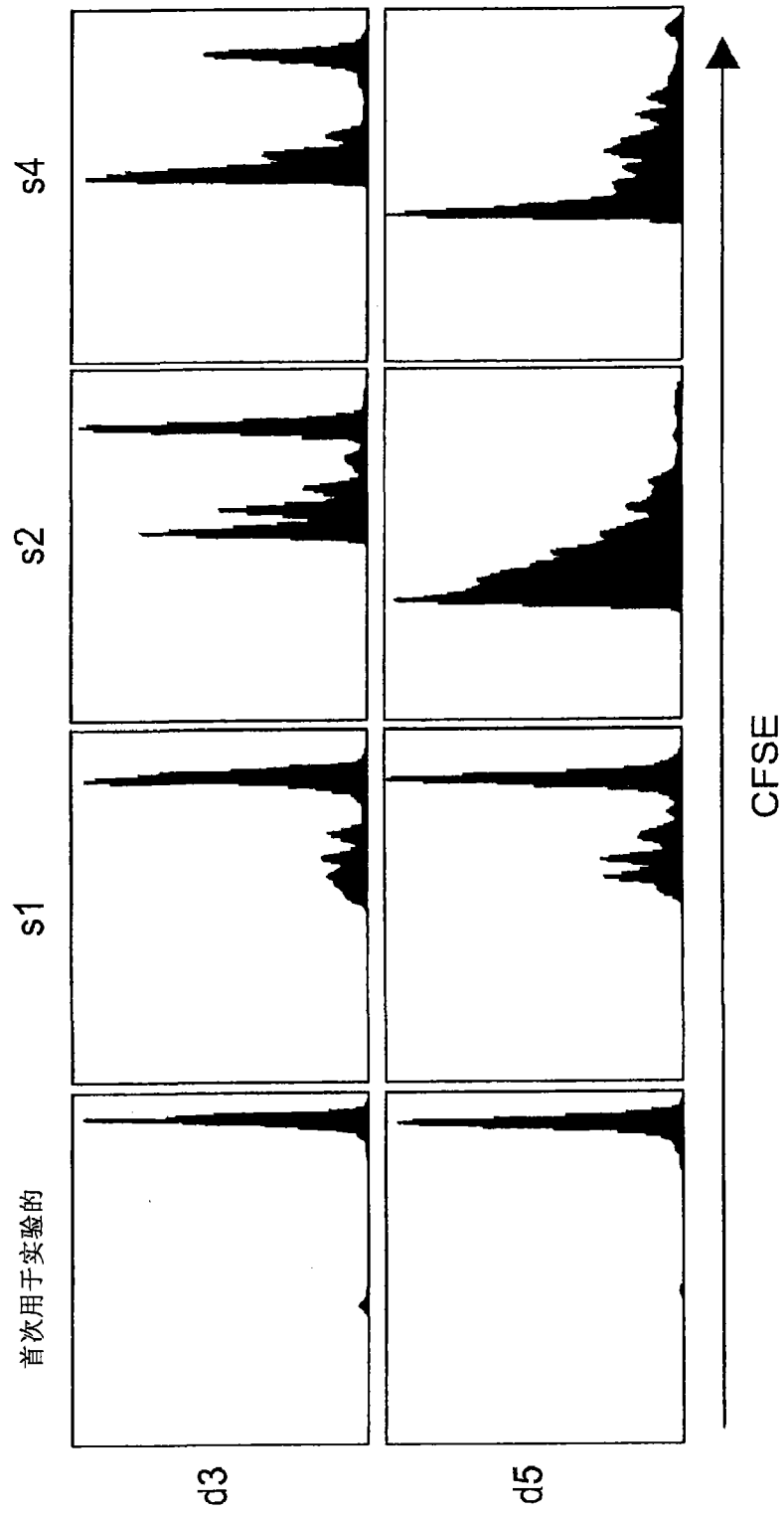


图 6B

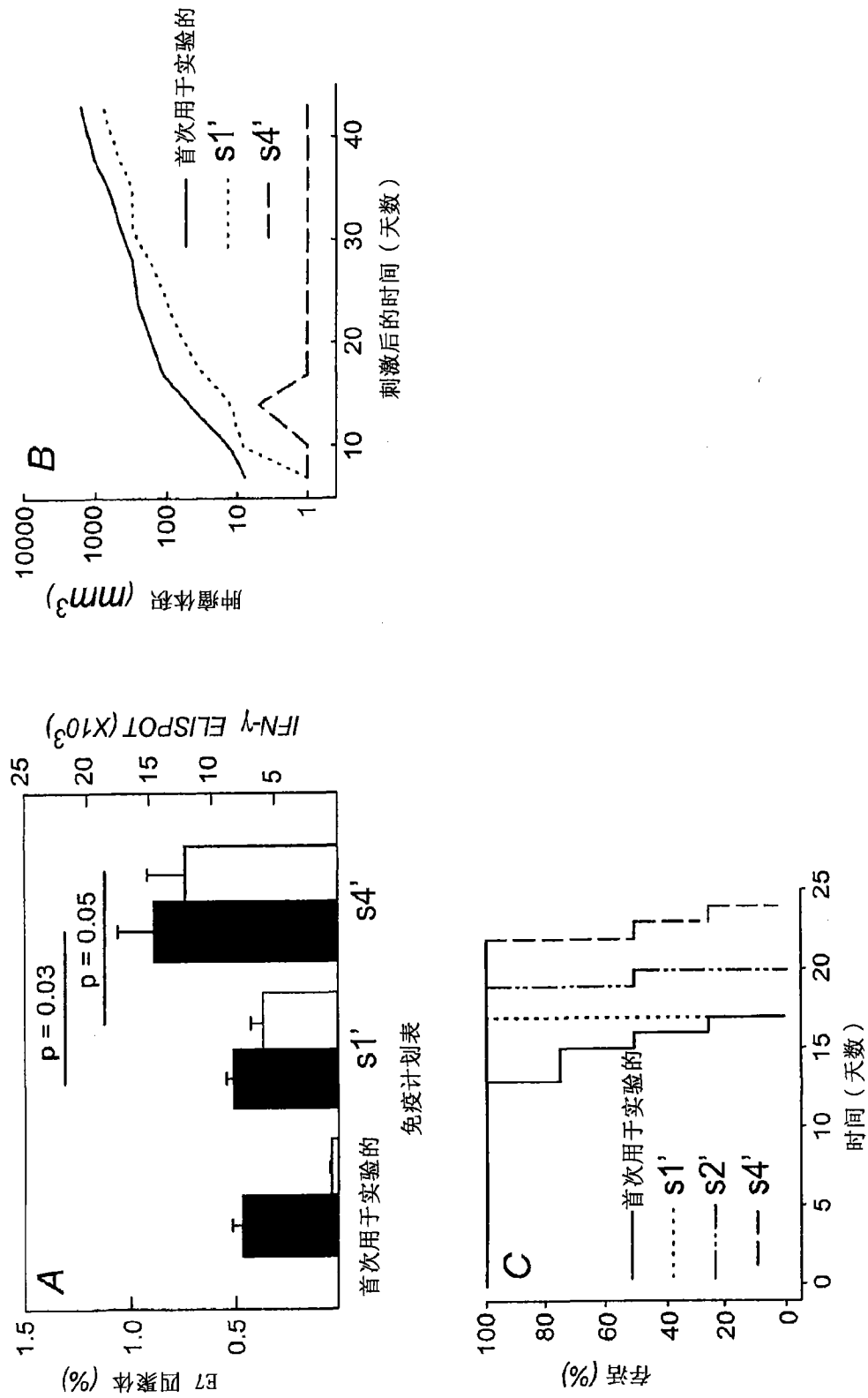


图 7

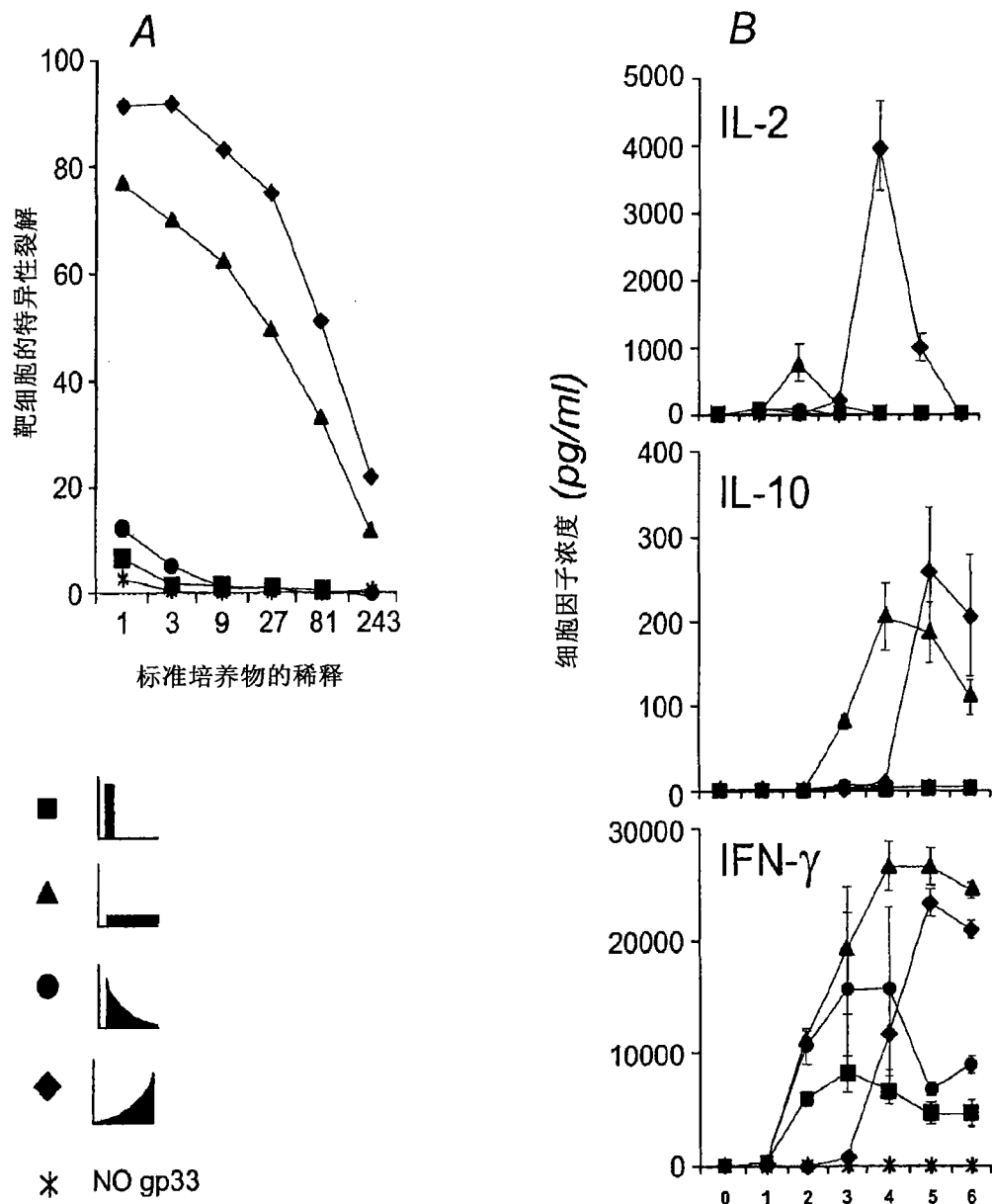


图 8