

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480036307.1

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 3 日

[11] 公开号 CN 1889977A

[22] 申请日 2004.10.11

[21] 申请号 200480036307.1

[30] 优先权

[32] 2003.10.13 [33] GB [31] 0323965.4

[86] 国际申请 PCT/EP2004/011620 2004.10.11

[87] 国际公布 WO2005/039634 英 2005.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.6

[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

共同申请人 史密丝克莱恩比彻姆公司

[72] 发明人 C·E·M·布鲁克

C·M·G·格拉尔

Z·L·乔纳克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 梁 谋

权利要求书 4 页 说明书 43 页 附图 7 页

[54] 发明名称

含白介素 18 和皂苷佐剂系统的疫苗组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种用于治疗或预防感染性疾病、癌症、自身免疫病和相关病症的联合治疗。

1. 一种增强哺乳动物中针对抗原的免疫应答的方法，其包括给予哺乳动物安全有效量的 1) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体，和
5 2)含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫原性组合物。

2. 权利要求 2 的方法，其中所述抗原或其免疫原性衍生物来自选自以下的生物：人免疫缺陷病毒 HIV-1、人单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、轮状病毒、EB 病毒、水痘-带状疱疹病毒；来自肝炎病毒，例如乙肝病毒、甲肝病毒、丙肝病毒和戊肝病毒；来自呼吸道合胞病毒、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、黄病毒或流感病毒；来自奈瑟氏球菌(*Neisseria spp*)；莫拉氏菌(*Moraxella spp*)；博德特氏菌(*Bordetella spp*)；分枝杆菌(*Mycobacterium spp*)，包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)；埃希氏菌(*Escherichia spp*)，包括肠毒性大肠杆菌；沙门氏菌(*Salmonella spp*)；利斯特氏菌(*Listeria spp*)；螺杆菌(*Helicobacter spp*)；葡萄球菌(*Staphylococcus spp*)，包括金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)；疏螺旋体(*Borrelia spp*)；衣原体(*Chlamydia spp*)，包括砂眼衣原体(*C. trachomatis*)、肺炎衣原体(*C. pneumoniae*)；疟原虫(*Plasmodium spp*)，包括恶性疟原虫(*P. falciparum*)；弓形虫(*Toxoplasma spp*)；假丝酵母
10 15 20 (*Candida spp*)。

3. 一种减轻患者癌症严重性的方法，包括给予有需要的患者安全有效量的 i) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体，和 ii)含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫原性组合物。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物选自：MAGE 家族抗原、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、Prostein、P501S、HASH2、Cripto、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、前列腺蛋白酶、STEAP、酪氨酸酶、端粒酶、生存蛋白、CASB616、P53 或 her 2 neu。
25

5. 权利要求 1-4 任一项的方法, 其中所述 IL-18 多肽或其生物活性片段或变体和免疫原性组合物同时、单独或以任何顺序序贯给予。

6. 权利要求 5 的方法, 其中所述 TH-1 细胞因子和免疫原性组合物以联合药物制剂的形式同时给予。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中所述 IL-18 多肽或其生物活性片段或变体为人或鼠源。

8. 权利要求 7 的方法, 其中 IL-18 是 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 7 的多肽或其生物活性片段或衍生物。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法, 其中所述皂苷佐剂是 QS-21 或 QS-17。

10. 一种含以下各种组分作为活性成分的联合制剂: (1) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体, 和(2)含抗原和皂苷佐剂的免疫原性组合物, 所述活性成分同时、单独或序贯用于预防和/或治疗感染性疾病、癌症、自身免疫病和相关病症。

11. 权利要求 10 的联合制剂, 其中组分(1)和(2)混合在组合物中。

12. 权利要求 10 或 11 的联合制剂, 其中所述免疫原性组合物含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物, 其具有抗癌症的预防或治疗活性。

13. 权利要求 12 的联合制剂, 其中所述肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物选自: MAGE 家族抗原、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、Prostein、P501S、HASH2、Cripto、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、前列腺蛋白酶、STEAP、酪氨酸酶、端粒酶、生存蛋白、CASB616、P53 或 her 2 neu。

14. 权利要求 10-13 任一项的联合制剂, 其中所述 IL-18 多肽或其生物活性片段或变体为人或鼠源。

15. 权利要求 14 的联合制剂, 其中 IL-18 是 SEQ ID NO. 6 或 SEQ

ID NO. 7 的多肽或其生物活性片段或衍生物。

16. 权利要求 10-15 任一项的联合制剂，其中所述皂苷佐剂为 QS-21 或 QS-17。

5 17. 权利要求 10-16 任一项中要求保护的联合制剂，其中所述免疫原性组合物另外含选自以下的免疫刺激化学物质：3D-MPL、胆固醇、含至少一种免疫刺激性 CG 二核苷酸的 CpG 寡核苷酸、氢氧化铝、磷酸铝、生育酚和水包油乳剂或两种或多种所述佐剂的组合。

18. 权利要求 17 中要求保护的联合制剂，其中所述免疫原性组合物佐剂包含 3D-MPL、QS21、胆固醇、水包油乳剂。

10 19. 权利要求 18 中要求保护的联合制剂，其中所述水包油乳剂包含鲨烯、生育酚和聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(Tween 80)。

20. 权利要求 17 中要求保护的联合制剂，其中所述免疫原性组合物包含 QS21、胆固醇和含至少一种免疫刺激性 CG 二核苷酸的 CpG 寡核苷酸。

15 21. 权利要求 10-20 任一项中要求保护的联合制剂，其中两种活性组分都是可注射溶液的形式。

22. 一种含以下各组分作为活性成分的药盒：(1) IL-18 多肽或其生物活性片段，和(2)含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫原性组合物，所述活性成分同时、单独或序贯用于预防和/或治疗感染性疾病、癌症和自身免疫病。

23. 权利要求 22 的药盒，其中所述免疫原性组合物包含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物，其具有抗癌症的预防或治疗活性。

24. 权利要求 23 的药盒，其中所述肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物选自：MAGE 家族抗原、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、
25 SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、Prostein、P501S、HASH2、Cripto、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、前列腺蛋白酶、STEAP、酪氨酸酶、端粒酶、生存蛋白、CASB616、P53 或 her 2 neu。

25. 权利要求 10-20 任一项中要求保护的联合制剂，其用于药

物。

26. 权利要求 1-9 任一项中要求保护的方法，其包括使用权利要求 10-20 任一项的联合制剂。

5 27. IL-18 多肽或其生物活性片段或变体在药物生产中的用途，
所述药物用于预防和/或治疗患或易患感染性疾病、癌症、自身免疫
病和相关疾病并已用含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫
原性组合物初免的患者。

10 28. 含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫原性组合物在
药物生产中的用途，所述药物用于治疗患或易患感染性疾病、癌症、
自身免疫病和相关疾病并已用 IL-18 多肽或其免疫原性片段或变体初
免的患者。

29. 权利要求 27 或 28 的用途，其中所述抗原为肿瘤相关抗原，
所述癌症选自乳癌、肺癌、NSCLC、结肠癌、黑素瘤、卵巢癌、膀
胱癌、头颈鳞状细胞癌、食道癌。

15 30. 权利要求 27-29 任一项的用途，其中所述 IL-18 多肽或其生
物活性片段或变体为人或鼠源。

31. 权利要求 30 的用途，其中 IL-18 为 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID
NO. 7 的多肽或其生物活性片段或衍生物。

20 32. 权利要求 27-31 任一项的用途，其中所述皂苷佐剂为 QS-21
或 QS-17。

含白介素 18 和皂苷佐剂系统的疫苗组合物

5 本发明涉及一种应用于感染性疾病、癌症、自身免疫病和相关疾病的治疗或预防的联合治疗。具体地说，该联合治疗包括给予 TH-1 细胞因子(具体地说为 IL-18)和免疫原性组合物(具体地说为含抗原和皂苷佐剂的疫苗)。具体地说，本发明涉及 IL-18 或其生物活性片段或变体以及含肿瘤相关抗原和皂苷佐剂的免疫原性组合物治疗癌
10 前病变或癌症的用途。本发明进一步涉及适于本发明用途的联合制剂和药盒。这些治疗方法和药用制剂对刺激适于预防和免疫治疗应用(特别是用于预防和/或治疗肿瘤)的免疫应答尤其有用。

发明背景

15 癌症是由于遗传改变而由单细胞发展成的一种疾病。尽管投入了众多的财力和人力资源，但癌症仍然是主要的死因之一。临床上检查出这些肿瘤通常是在疾病的较晚期，在通过手术可去除原发性肿瘤时，经常已经出现聚集在不同器官中的微量转移。尽管在了解致癌机制方面取得了显著进步，但在转移性癌症治疗和防止早期肿瘤向更恶性和转移性病变发展方面进展甚微。化疗经常不能完全去
20 除这些细胞，那么这些细胞仍然是疾病复发源。

 TH-1 型细胞因子，如 IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-12、IL-18 等，趋向于支持诱导针对所给予抗原的细胞介导的免疫应答。相反，高水平的 Th2-型细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)趋向于支持诱导体液免疫应答。白介素(IL-18)，也叫做干扰素- γ (IFN γ)诱导因子，
25 被称为是一种具有刺激患者自身免疫系统对抗疾病(例如癌症)的免疫调节作用的多效细胞因子。IL-18 在免疫应答早期表达，对体液和细胞免疫应答都起作用，并将应答导向更好的 TH-1 型模式。IL-18 由活化的抗原提呈细胞产生，据报道其具有几种生物活性，具体地说

是促进幼稚 CD4 T 细胞分化为 Th1 细胞，刺激天然杀伤(NK)细胞、天然杀伤 T (NKT)细胞，以及诱导活化 T 细胞增殖，主要是诱导细胞毒性 T 细胞(CD8+表型)分泌 γ 干扰素(IFN- γ)(Okamura H. et al. 1998, Adv. Immunol. 70: 281-312)。IL-18 还介导 Fas-诱导的肿瘤死亡，促进产生 IL-1a 和 GM-CSF，并具有抗血管生成活性。

IL-18 能够刺激先天免疫以及 Th1 和 Th2 二者介导的应答。在 IL-12 存在时，IL-18 可作用于 Th1 细胞、非极化 T 细胞、NK 细胞、B 细胞和树突细胞，以产生 IFN γ 。在没有 IL-12 辅助时，IL-18 在 T 细胞、NK 细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞中潜在诱导 IL-4 和 IL-13 产生。

已经表明，IL-18 通过产生 IFN- γ 诱导肿瘤退化，IFN- γ 是内源性和细胞因子诱导性抗肿瘤免疫应答的关键组分。已用不同肿瘤动物模型证实了效力(Jonak Z et al. 2002, J. Immunother. 25, S20-S27; Akamatsu S; et al. 2002, J. Immunother. 25, S28-S34)。含 IL-18 和其它物质组合的组合物已有描述，特别是 IL-18 和化疗剂组合(US 6,582,689)。还描述了 IL-18 起疫苗佐剂作用(WO 99/56775; WO 03/031569)。

皂苷述于：Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins , Phytomedicine, 第 2 卷, 363-386 页)。皂苷为类固醇或三萜糖苷，广泛分布于植物和海洋动物界。皂苷的特点是形成振荡起泡沫的胶体水溶液和沉淀胆固醇。当皂苷接近细胞膜时，其在膜中产生孔样结构，使膜爆裂。红细胞溶血是该现象的一个实例，该实例是某些而不是全部皂苷的特性。

已知皂苷为系统给予疫苗的佐剂。本领域已深入研究了各种皂苷的佐剂和溶血活性(Lacaille-Dubois and Wagner, 出处同上)。例如，Quil A (来源于南美奎拉雅属皂树(Quillaja Saponaria Molina)的树皮)及其组分描述于 US 5,057,540 和 "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil,

C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55 以及 EP 0 362 279 B1。含 Quil A 或其组分的颗粒结构称为免疫刺激复合物 (ISCOM), 已用于生产疫苗(Morein, B., EP 0 109 942 B1)。这些结构据报道具有佐剂活性(EP 0 109 942 B1; WO 96/11711)。美国专利 No. 5,057,540 和 EP 0 362 279 B1 描述了为有效系统佐剂的溶血性皂苷 QS21 和 QS17 (Quil A 的 HPLC 纯化组分), 并公开了其生产方法。在这些参考文献中还描述了 QS7 (Quil-A 的一种非溶血性组分)起系统疫苗有效佐剂作用的用途。QS21 的用途进一步描述于 Kensil et al. (1991. *J. Immunology*, 146 卷, 431-437)。还已知 QS21 和聚山梨醇酯或环糊精的组合(WO 99/10008)。含 Quil A 组分的颗粒佐剂系统如 QS21 和 QS7 描述于 WO 96/33739 和 WO 96/11711。

已用于系统接种研究的其它皂苷包括来源于其它植物物种如满天星和肥皂草的皂苷(Bomford et al., *Vaccine*, 10 (9): 572-577, 1992)。

还已知皂苷已用于粘膜应用疫苗的研究, 其在诱导免疫应答方面取得了不同成果。先前已表明当鼻内给予抗原时 Quil-A 皂苷对诱导免疫应答无效(Gizurason et al. 1994. *Vaccine Research* 3, 23-29)。同时, 其它作者使用该佐剂取得了成功(Maharaj et al., *Can. J. Microbiol*, 1986, 32 (5): 414-20; Chavali and Campbell, *Immunobiology*, 174 (3): 347-59)。含 Quil A 皂苷的 ISCOM 已用于胃内和鼻内疫苗制剂, 并表现出佐剂活性(Mcl Mowat et al., 1991, *Immunology*, 72, 317-322; Mcl Mowat and Donacie, *Immunology Today*, 12, 383-385)。还描述了 Quil A 的无毒组分 QS21 为口服或鼻内佐剂(Sumino et al., *J. Virol.*, 1998, 72 (6): 4931-9; WO 98/56415)。

本发明涉及令人惊奇的发现: 联合给予 TH-1 细胞因子如 IL-18 和含抗原与皂苷佐剂(包括但不限于 QS-21)的免疫原性组合物是极为有效的, 提供了对感染性疾病、原发性和转移性肿瘤疾病(即癌症)、自身免疫病和相关病症的有效和良好耐受的预防或治疗, 特别是有效抑制表达肿瘤相关抗原的人癌症细胞的生长。

发明陈述

因此, 本发明提供在患者中激发针对抗原的增强免疫应答的方法, 其包括给予患者安全有效量的 i) 免疫原性组合物, 具体地说是疫苗, 其包含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂, 和 ii) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体。在另一个实施方案中, 本发明提供减轻患者癌症严重性的方法, 包括治疗既有肿瘤(原发性肿瘤和转移性肿瘤)或防止癌症复发, 所述方法包括给予有需要患者安全有效量的 i) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体, 和 ii) 免疫原性组合物, 具体地说是疫苗, 其包含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂。

在一个实施方案中, IL-18 多肽为鼠或人 IL-18 多肽或其生物活性片段或变体。在另一个实施方案中, 抗原为肿瘤相关抗原。在再另一个实施方案中, 皂苷为 Quil A 的无毒组分, 例如 QS-17 或 QS-21。在一个实施例中, 皂苷为 QS21。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及减轻患者癌症严重性的方法, 包括治疗既有肿瘤(原发性肿瘤和转移性肿瘤)或防止癌症复发, 具体地说是乳癌、肺癌(特别是非小细胞肺癌)、黑素瘤、结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、头颈鳞状细胞癌、胃癌和其它 GI (胃肠)癌, 特别是食道癌, 所述方法包括给予哺乳动物 i) 免疫原性组合物, 具体地说是疫苗, 其包含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物和 QS-21, 和 ii) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体。

本发明还涉及含以下各种组分作为活性成分的联合制剂: (1) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体, 和(2)含抗原和皂苷佐剂的免疫原性组合物, 活性成分同时、单独或序贯用于预防和/或治疗感染性疾病、癌症(包括原发性和转移性肿瘤)、自身免疫病和相关病症。在一个实施方案中, 联合制剂中的免疫原性组合物包含其它的免疫刺激化学物质, 其选自: 胆固醇、3D-MPL、免疫刺激性寡核苷酸、氢氧化铝、磷酸铝、生育酚和水包油乳剂或者两种或多种所述佐剂的组

合。例如，另外的佐剂可为免疫刺激性寡核苷酸。

在相关方面，本发明还提供药盒，其包含以下各种组分作为活性成分：(1) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体，和(2)含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫原性组合物，活性成分同时、单独或序贯用于预防和/或治疗感染性疾病、癌症(包括原发性和转移性肿瘤)和自身免疫病。

本发明进一步涉及以下组分在药物生产中的用途：(1) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体，和(2)含抗原或其免疫原性衍生物和皂苷佐剂的免疫原性组合物，以通过给予患者安全有效量的两种组分，在所述患者中获得保护性免疫应答或减轻疾病严重性。

本发明进一步涉及制备所述免疫原性组合物的方法、所述组合物预防和/或治疗疾病(特别是癌症)的用途以及所述组合物在哺乳动物(包括人)中抑制肿瘤或癌细胞生长的用途。

15 发明详述

在一种形式的本发明中，免疫原性组合物中的皂苷佐剂为 Quil A 的无毒组分，例如 QS-17 或 QS-21，如 QS-21。抗原可为感染性生物来源的抗原，例如肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物或衍生物。在一个实施方案中，TH-1 细胞因子是鼠或人 IL-18 或其生物活性片段。免疫原性组合物和 IL-18 可在诱导抗原特异性抗体时协同起作用，并可有效诱导或增强按惯例与 TH-1 型免疫系统相关的体液或/和细胞免疫应答。所述免疫应答增强指免疫应答总体增加，这可由体液和/或细胞介导的免疫应答确定，或由肿瘤大小和/或肿瘤载荷的减小确定。所述协同性指 IL-18 多肽或其免疫原性片段或变体在联合治疗中与本发明的免疫原性组合物一起给予时，能够诱导免疫应答，该免疫原性组合物的存在可增强 IL-18 多肽或其免疫原性片段或变体的效力。诱导免疫应答的结果可为预防、减轻疾病严重性(对于癌症，包括减轻既有的原发性或转移性肿瘤或防止癌症复发)和/或治疗。

因此，在一个实施方案中，本发明提供一种在哺乳动物中激发针对抗原的免疫应答的方法，其包括给予哺乳动物 i)有效量的免疫原性组合物，其包含感染性生物来源的抗原或肿瘤相关抗原和 QS-21，和 ii) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体。在一个实施方案中，治疗的两种组分序贯给予。就是说使用所述免疫原性组合物加强通过给予 IL-18 激发的体液和/或细胞免疫应答。或者，在另一个实施方案中，使用本发明的免疫原性组合物在随后接受 IL-18 的个体中激发体液和/或细胞免疫应答。在再另一个实施方案中，所述治疗的两种组分同时给予，方法是在两个不同部位一起给予或混合在同一制剂中。技术人员会理解，两种免疫原性组合物和 IL-18 多肽或其免疫原性片段或变体可一次性给予或重复给予。

所规划的属于本发明范围的联合治疗与任一种组分单独使用相比至少等效，例如效力增加。特别是在癌症领域，联合治疗是有优势的，因为其组合了两种抗癌剂，每种都通过不同的作用机制以累加方式(例如协同地)起作用，产生增强的抗人肿瘤细胞的细胞毒性反应。

在一个相关实施方案中，本发明提供含以下组分作为活性成分的联合制剂(例如药用多瓶包装)：(1) IL-18 多肽或其生物活性片段或变体，和(2)含抗原和皂苷佐剂的免疫原性组合物，活性成分同时、单独或序贯用于预防和/或治疗感染性疾病和癌症。

所述联合制剂指药用制剂或药物(多瓶)包装或分配装置，其可含一种或多个含活性成分的单位剂型。包装例如可包含金属或塑料箔，例如泡罩包装。包装或分配装置可附有给予说明。当 IL-18 多肽或其生物活性片段或变体和免疫原性组合物欲作为两种单独的组合物给予时，可以例如多瓶包装的形式提供这些组合物。同时、单独或序贯给予的本发明活性成分不是表现为已知物质的单纯累积，而是具有令人惊奇的有价值特性的全新组合，IL-18 多肽或其生物活性片段或变体的应用使得可以同时刺激免疫系统的先天部分和获得性部

分, 包括 NK 细胞活化以及 T 细胞介导的免疫应答和细胞因子产生, 由此增加免疫原性组合物的效力。这产生了一种新的有效治疗。要理解地是, 联合制剂, 也称为配套试剂盒, 是指联合制剂的组分不必一体化(例如以组合物)提供, 以便可单独或序贯应用。因此, 表述
5 配套试剂盒是指就组分的物理分离而言不必真正混合。

联合制剂可用于治疗或预防癌症, 具体地说是减轻癌症严重性或防止癌症复发。可由本文所述联合治疗获益的癌症包括其特征在于不受控的细胞生长和增殖、瘤前病变、原发性肿瘤和转移性肿瘤病变的任何疾病, 其包括但不限于乳癌、肺癌(特别是非小细胞肺癌, NSCLC)、黑素瘤、结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、头颈鳞
10 状细胞癌、胃癌和其它 GI(胃肠)癌(特别是食道癌)、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和浆细胞瘤。

代表性的抗原或其衍生物和片段(包括肽, 即少于约 50 个氨基酸)包括 MAGE (黑素瘤抗原编码基因)家族编码的被称为癌症(睾丸)抗原的抗原(Gaugler B. et al. J. Exp. Med., 1994, 179: 921; Weynants P. et al. Int. J. Cancer, 1994, 56: 826; Patard J. J. et al. Int. J. Cancer, 1995, 64: 60)。表达 MAGE 蛋白的癌症被称为 MAGE 相关肿瘤。MAGE 基因属于一个紧密相关基因的家族, 包括即位于染色体 X 上的 MAGE 1、MAGE 2、MAGE 3 (黑素瘤抗原编码基因-3)、MAGE 4、MAGE 5、
15 MAGE 6、MAGE 7、MAGE 8、MAGE 9、MAGE 10、MAGE 11、MAGE 12, 其编码序列互相之间共有的同源性的 64-85% (De Plaen E. et al., Immunogenetics, 1994, 40, 360-369)。有时这些基因被称为 MAGE A1、MAGE A2、MAGE A3、MAGE A4、MAGE A5、MAGE A6、MAGE A7、MAGE A8、MAGE A9、MAGE A10、MAGE A11、MAGE
20 MAGE A12 (MAGE A 家族)。两个其它蛋白组也是 MAGE 家族的一部分, 尽管相关性更远。它们是 MAGE B 组和 MAGE C 组。MAGE B 家族包括 MAGE B1 (也称为 MAGE Xp1 和 DAM 10)、MAGE B2 (也称为 MAGE Xp2 和 DAM 6)、MAGE B3 和 MAGE B4, MAGE C 家族目

前包括 MAGE C1 和 MAGE C2。一般而言, MAGE 蛋白可定义为包含核心序列特征, 其位于蛋白的 C 末端(例如对于 MAGE A1 来说, 其为 309 个氨基酸的蛋白, 核心特征对应于氨基酸 195-279)。

因此, 如下描述核心特征的共有模式: 其中 x 代表任意氨基酸, 小写字母残基是保守的(允许为保守变体), 大写字母残基是完全保守的。

核心序列特征:

LixvL(2x)l(3x)g(2x)apEExiWexl(2x)m(3-4x)Gxe(3-4x)gxp(2x)lIt(3x)VqexYLxYxqVPxsxP(2x)**yeFLWGprA**(2x)Et(3x)kv

保守取代是众所周知的, 一般在序列比对计算机程序中作为默认记分矩阵。这些程序包括 PAM250 (Dayhoft M. O. et al., 1978, “A model of evolutionary changes in proteins”, 载于 “Atlas of Protein sequence and structure” 5 (3) M. O. Dayhoft (编辑), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington, 以及 Blosum 62 (Steven Henikof & Jorja G. Henikof (1992), “Amino acid substitution matrices from protein blocks”), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915-10919。

一般地说, 以下组内的取代为保守取代, 但组间的取代被认为是非保守的。所述组为:

- i) 天冬氨酸/天冬酰胺/谷氨酸/谷氨酰胺
- ii) 丝氨酸/苏氨酸
- iii) 赖氨酸/精氨酸
- iv) 苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸
- v) 亮氨酸/异亮氨酸/缬氨酸/甲硫氨酸
- vi) 甘氨酸/丙氨酸

一般地和在本发明范围内, MAGE 蛋白的核心区与 MAGE A1 的氨基酸 195-279 的同一性约为 50%。

MAGE-3 在 69%的黑素瘤中表达(Gaugler B. et al. J. Exp. Med.,

1994, 179: 921), 还可在 44%的 NSCLC (Yoshimatsu T. J SurgOncol., 1998, 67, 126-129)、75%的小细胞肺癌(SCLC)(Traversari C. et al., Gene Ther. 1997, 4: 1029-1035)、48%的头颈鳞状细胞癌、34%的膀胱过渡型细胞癌、57%的食道癌、32%的结肠癌和 24%的乳癌(Van Pel A. et al., Immunol. Rev., 1995, 145: 229; Inoue H. et al. Int. J. Cancer, 1995, 63: 523; Nishimura S et al., Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 1997, Apr, 20 (2): 95-101)中检测出来。已在 MAGE-3 蛋白上鉴别出几种表位, 其分别具有 MHC I 类分子 HLA.A1 或 HLA.A2 (Van der Bruggen P. et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 3038-3043)和 HLA.B44 (Herman, J. et al., Immunogenetics, 1996, 43, 377-383)等位基因的特异性结合基序。

尽管已在黑素瘤、肺和食道癌中检测出 MAGE-3, 但这些抗原在 MAGE-相关肿瘤患者中的表达水平看起来有限, 低于免疫识别的阈值(Weiser T. S. et al., Ann. Thorac. Surg. 2001, 71: 295-302)。

其它代表性的抗原或其衍生物或由其产生的片段包括例如公开于 WO 99/40188 的 MAGE 抗原、PRAME (WO 96/10577)、BAGE、RAGE、LAGE 1 (WO 98/32855)、LAGE 2 (也称为 NY-ESO-1, WO 98/14464)、XAGE (Liu et al, Cancer Res, 2000, 60: 4752-4755; WO 02/18584)、SAGE 和 HAGE (WO 99/53061)或 GAGE (Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, 628-636 页; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 提交); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, 293 页。实际上, 这些抗原在广泛类型的肿瘤中表达, 例如黑素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌。

在一个实施方案中, 使用前列腺抗原, 例如前列腺癌抗原或前列腺特异性分化抗原(PSA)、PAP、PSCA (PNAS 95 (4) 1735-1740 1998)、PSMA 或称为前列腺蛋白酶(Prostase)的抗原。

在另一个实施方案中, 前列腺抗原是 P501S 或其片段。P501S 也叫做 Prostein (Xu et al., Cancer Res. 61, 2001, 1563-1568), 已知为 WO 98/37814 的 SEQ ID NO. 113, 是一个 553 个氨基酸的蛋白。在

以上引用的专利申请中公开了其含 20 或至少 20、50 或至少 50 或 100 或至少 100 个连续氨基酸的免疫原性片段和部分, 本发明具体规划了其用途。可使用的片段公开于 WO 98/50567 (PS108 抗原), 其为前列腺癌相关蛋白(WO 99/67384 的 SEQ ID NO: 9)。可使用的其它片段为全长 P501S 蛋白的氨基酸 51-553、34-553 或 55-553。具体地说, 可考虑使用构建物 1、2 和 3 (参见图 2, SEQ ID NO. 27-32), 其可在酵母系统中表达, 例如可在酵母系统中表达编码该多肽的 DNA 序列。

前列腺蛋白酶是前列腺特异性丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶样), 254 个氨基酸长, 具有保守的丝氨酸蛋白酶催化三联体 H-D-S 和氨基末端前原肽序列, 表明潜在的分泌功能(P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. linas, L. Hood & K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression" 载于 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 3114-3119)。描述了推定的糖基化位点。预测的结构非常类似于其它已知的丝氨酸蛋白酶, 表明成熟多肽折叠成单个结构域。成熟蛋白为 224 个氨基酸长, 具有至少一个显示出被天然加工的 A2 表位。前列腺蛋白酶核苷酸序列和推定的多肽序列以及同源物公开于 Ferguson, et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119)和国际专利申请 WO 98/12302 (还有对应的授予专利 US 5,955,306)、WO 98/20117 (还有对应的授予专利 US 5,840,871 和 US 5,786,148)(前列腺特异性激肽释放酶)和 WO 00/04149 (P703P)。

由 WO 98/37418 和 WO/004149 可知其它的前列腺特异性抗原。另一个是 STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)。

用于本发明范围的其它肿瘤相关抗原包括: Plu-1 (J Biol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999)、HASH-1、HASH-2 (Alders, M. et al., Hum. Mol. Genet. 1997, 6, 859-867)、Cripto (Salomon et al Bioessays 199, 21 61-70, 美国专利 5654140)、CASB616 (WO 00/53216)、Criptin (US 5,981,215)。另外, 与癌症治疗中的疫苗特别相关的抗原还包括酪氨

酸酶、端粒酶、P53、NY-Br1.1 (WO 01/47959)和例如公开于 WO 00/43420 的其片段、B726 (WO 00/60076, SEQ ID NO 469 和 463; WO 01/79286, SEQ ID NO 474 和 475)、P510 (WO 01/34802 SEQ ID NO 537 和 538)和生存蛋白。

5 本发明还与乳癌抗原如 Her-2/neu、乳腺球蛋白(mammaglobin)(美国专利 5,668,267)、B305D (WO 00/61753 SEQ ID NO 299、304、305 和 315)或公开于 WO 00/52165、WO 99/33869、WO 99/19479、WO 98/45328 的那些抗原联用。其中 Her-2/neu 抗原公开于美国专利 5,801,005。Her-2/neu 可包含完整胞外结构域(大约含氨基酸 1-645)或其片段以及整个胞内结构域的至少免疫原性部分(大约 C 端的 580 个氨基酸)。具体地说,胞内部分可包含磷酸化结构域或其片段。这样的构建物公开于 WO 00/44899。一种可使用的构建物被称为 ECD-PhD, 第二种被称为 ECD δ PhD (参见 WO00/44899), 也叫做 dHer2。本文使用的 Her-2/neu 可来源于例如大鼠、小鼠或人。

15 某些肿瘤抗原是小肽抗原(即少于约 50 个氨基酸)。代表性的肽包括粘蛋白衍生肽, 例如 MUC-1 (参见例如 US 5,744,144、US 5,827,666、WO 88/05054、US 4,963,484)。具体考虑的是 MUC-1 衍生肽, 其包含 MUC-1 肽的至少一个重复单元, 或至少两个该重复单元, 其由 SM3 抗体识别(US 6,054,438)。其它的粘蛋白衍生肽包括来自 MUC-5 的肽。

20 或者, 所述抗原可为白介素, 例如 IL13 和 IL14。或者, 所述抗原可为自身肽激素, 例如完整长度的促性腺激素释放激素(GnRH, WO 95/20600), 其为 10 个氨基酸长度的短肽, 用于治疗多种癌症或用于免疫去势。其它的肿瘤特异性抗原包括但不限于肿瘤特异性神经节苷脂, 例如 GM2 和 GM3。

25 抗原还可以来自人致病原, 例如人免疫缺陷病毒 HIV-1 (例如 tat、nef、逆转录酶、gag、gp120 和 gp160)、人单纯疱疹病毒如 gD 或其衍生物或立即早期蛋白如 HSV1 或 HSV2 的 ICP27、巨细胞病毒

((esp Human)(例如 gB 或其衍生物))、轮状病毒(包括活-减毒病毒)、EB 病毒(例如 gp350 或其衍生物)、水痘-带状疱疹病毒(例如 gpI、II 和 IE63), 或来自肝炎病毒, 例如乙肝病毒(例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物)、甲肝病毒、丙肝病毒和戊肝病毒, 或来自其它病毒病原体, 例如副粘病毒: 呼吸道合胞病毒(如 F 和 G 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(例如黄热病毒、登革病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒)或流感病毒(在鸡蛋或 MDCK 细胞中培养的全活病毒或失活病毒、裂解流感病毒, 或全流感病毒组(如 R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920 所述)或其纯化或重组蛋白, 例如 HA、NP、NA 或 M 蛋白, 或其组合), 或来自细菌病原体, 例如奈瑟氏球菌(*Neisseria spp*), 包括淋病奈瑟氏球菌 (*N. gonorrhea*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*N. meningitidis*)(例如荚膜多糖及其缀合物、转铁结合蛋白、乳铁结合蛋白、PilC、粘附素); 酿脓链球菌(*S. pyogenes*)(例如 M 蛋白或其片段、C5A 蛋白酶、脂磷壁酸质)、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(*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*)(例如高和低分子量的粘附素和侵袭素); 博德特氏菌(*Bordetella spp*), 包括百日咳博德特氏菌(*B. pertussis*)(例如百日咳杆菌粘附素(Pertactin)、百日咳毒素或其衍生物、丝状血凝素、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(*Mycobacterium spp*), 包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)(例如 ESAT6、Antigen 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 (*Legionella spp*), 包括侵肺军团菌 (*L. pneumophila*); 埃希氏菌(*Escherichia spp*), 包括肠毒性大肠杆菌(例如定居因子、不耐热毒素或其衍生物、热稳定性毒素或其衍生物)、

肠出血性大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌(例如志贺毒素样毒素或其衍生物); 弧菌(*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(*Shigella spp*), 包括索氏志贺氏菌(*S. sonnei*)、痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌(*S. flexnerii*); 耶尔森氏菌(*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(*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(*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*)、肠沙门氏菌(*S. enteritidis*); 利斯特氏菌(*Listeria spp*), 包括单核细胞增生利斯特氏菌(*L. monocytogenes*); 螺杆菌(*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(*Pseudomonas spp*), 包括铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*); 葡萄球菌(*Staphylococcus spp*), 包括金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*); 肠球菌(*Enterococcus spp*), 包括粪肠球菌(*E. faecalis*)、屎肠球菌(*E. faecium*); 梭菌(*Clostridium spp*), 包括破伤风梭菌(*C. tetani*)(例如破伤风毒素及其衍生物)、肉毒梭菌(*C. botulinum*)(例如肉毒杆菌毒素及其衍生物)、艰难梭菌(*C. difficile*)(例如梭状芽孢杆菌毒素 A 或 B 及其衍生物); 芽孢杆菌(*Bacillus spp*), 包括炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)(例如肉毒杆菌毒素及其衍生物); 棒杆菌(*Corynebacterium spp*), 包括白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*)(例如白喉毒素及其衍生物); 疏螺旋体(*Borrelia spp*), 包括布氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)(例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、嘎氏疏螺旋体(*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(*Ehrlichia spp*), 包括马埃里希氏体(*E. equi*)和人粒细胞埃里希氏体病原体; 立克次氏体(*Rickettsia spp*), 包括立氏

立克次氏体(*R. rickettsii*); 衣原体(*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(*Leptospira spp*), 包括问号钩端螺旋体(*L. interrogans*); 5 密螺旋体(*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*); 或来自寄生物, 例如疟原虫(*Plasmodium spp*), 包括恶性疟原虫(*P. falciparum*); 弓形虫(*Toxoplasma spp*), 包括刚地弓形虫(*T. gondii*)(例如 SAG2、SAG3、Tg34); 阿米巴(*Entamoeba spp*), 10 包括溶组织内阿米巴(*E. histolytica*); 巴贝虫(*Babesia spp*), 包括田鼠巴贝虫(*B. microti*); 锥虫(*Trypanosoma spp*), 包括枯氏锥虫(*T. cruzi*); 贾第鞭毛虫(*Giardia spp*), 包括蓝氏贾第鞭毛虫(*G. lamblia*); 利什曼虫(*Leshmania spp*), 包括硕大利什曼虫(*L. major*); 肺囊虫(*Pneumocystis spp*), 包括卡氏肺囊虫(*P. carinii*); 毛滴虫(*Trichomonas spp*), 包括阴 15 道滴虫(*T. vaginalis*); 血吸虫(*Schistosoma spp*), 包括曼氏血吸虫(*S. mansoni*); 或来自酵母, 例如假丝酵母(*Candida spp*), 包括白假丝酵母(*C. albicans*); 隐球菌(*Cryptococcus spp*), 包括新生隐球菌(*C. neoformans*)。

其它结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)抗原例如为 TbRa12、Tb H9、 20 Tb Ra35、Tb38-1、Erd 14、DPV、MTI、MSL、mTTC2 和 hTCC1 (WO 99/51748)。结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)的蛋白还包括融合蛋白及其变体, 其中至少两个或至少三个结核分枝杆菌多肽融合成较大蛋白。融合蛋白的实例包括 Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、DPV-MTI-MSL、Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、 25 DPV-MTI-MSL-mTCC2、TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748)。

衣原体抗原包括例如高分子量蛋白(HWMP)(WO 99/17741)、ORF3 (EP 366 412)和推测膜蛋白(Pmp)。疫苗制剂的其它衣原体抗原可选自描述于 WO 99/28475 的抗原组。

细菌抗原可得自链球菌(*Streptococcus spp*), 包括肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)(例如荚膜多糖及其缀合物、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 et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), 以及其突变脱毒衍生物(WO 90/06951; WO 99/03884)。其它细菌抗原得自嗜血杆菌(*Haemophilus spp*), 包括 B 型流感嗜血杆菌(*H. influenzae type B*)(例如 PRP 及其缀合物)、不定型流感嗜血杆菌(*non typeable H. influenzae*), 例如 OMP26、高分子量粘附素、P5、P6、D 蛋白和脂蛋白 D, 以及丝束蛋白和丝束蛋白衍生肽(US 5,843,464)或其多拷贝变体或融合蛋白。

乙型肝炎表面抗原衍生物是本领域众所周知的, 其中包括描述于欧洲专利申请 EP-A-414 374、EP-A-0304 578 和 EP 198-474 的陈述为 PreS1、PreS2、S 抗原的那些抗原。在一个实施方案中, HBV 抗原为 HBV 聚合酶(Ji Hoon Jeong et al, 1996, BBRC 223, 264-271; Lee H. J. et al, Biotechnol. Lett. 15, 821-826)。还规划了 HIV 衍生抗原, 例如 HIV-1 抗原 gp120, 尤其是在 CHO 细胞中表达时。

本发明的免疫组合物可包含得自人乳头瘤病毒的抗原(HPV 6a、6b、11、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68), 特别是那些被认为引起生殖器疣的 HPV 血清型(HPV 6 或 HPV 11 等)和引起子宫颈癌的 HPV 病毒(HPV16、HPV18 等)。合适的 HPV 抗原是 E1、E2、E4、E5、E6、E7、L1 和 L2。作为生殖器疣预防或治疗形式的实例, 融合蛋白含 L1 颗粒或衣壳体, 融合蛋白所包含的一种或多种抗原选自: HPV 6 和 HPV 11 蛋白 E6、E7、L1 和 L2。融合蛋白的实例是: WO 96/26277 公开的 L2E7 和 WO 99/10375 公开的蛋白 D(1/3)-E7。HPV 子宫颈感染或子宫颈癌的预防或治疗性疫苗组合物可包含 HPV 16 或 18 抗原。例如, 一起提供 L1 或 L2 抗原单体或 L1 或 L2 抗原作为病毒样颗粒(VLP), 或在 VLP 或衣壳体结构中仅提供单独的 L1 蛋白。这样的抗原、病毒样颗粒和衣壳体本身是已知的。

参见例如 WO94/00152、WO94/20137、WO94/05792 和 WO93/02184。

另外，可包含单独的或作为融合蛋白的早期蛋白，例如 E7、E2 或 E5；其它实施方案包括含 L1E7 融合蛋白的 VLP (WO96/11272)。HPV 16 抗原可包含早期蛋白 E6 或 E7，其与 D 蛋白载体融合，形成 D 蛋白-HPV 16 的 E6 或 E7 融合体，或其组合；或 E6 或 E7 和 L2 的组合(WO96/26277)。

或者，HPV 16 或 18 早期蛋白 E6 和 E7 可以单个分子提供，例如 D 蛋白-E6/E7 融合体。其它融合体可选地包含 HPV 18 的 E6 和 E7 蛋白的任一种或两种，例如为 D 蛋白-E6 或 D 蛋白-E7 融合蛋白形式或 D 蛋白 E6/E7 融合蛋白形式。融合蛋白可包含其它 HPV 毒株的抗原，例如毒株 HPV 31 或 33 的抗原。

还考虑了得自引起疟疾的寄生物的抗原。例如恶性疟原虫 (*Plasmodia falciparum*) 抗原包括 RTS,S 和 TRAP。RTS 是杂种蛋白，包含恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 环孢(CS)蛋白的大致全部 C 末端部分，其通过乙型肝炎表面抗原 preS2 部分的 4 个氨基酸连接至乙型肝炎病毒的表面(S)抗原。其完整结构公开于 WO93/10152。当在酵母中表达时，生产的 RTS 为脂蛋白颗粒，当其与 HBV 的 S 抗原共表达时，其产生称为 RTS,S 的混杂颗粒。TRAP 抗原描述于 WO90/01496。本发明的一个实施方案是融合蛋白，其中抗原制剂包含 RTS,S 和 TRAP 抗原的组合。可能为融合蛋白组分候选物的其它疟原虫抗原为恶性疟原虫 (*P. falciparum*) MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、锚合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230 及其在疟原虫 (*Plasmodium spp*) 中的类似物。

本文使用的术语“免疫原性组合物”在其广义上用于指当给予患者时确实影响所述患者的免疫应答的组合物。免疫原性组合物提供给患者增强的系统或局部免疫应答，其或者为细胞免疫应答，例如 CTL，或者为体液免疫应答，例如激发抗体。具体地说，本发明

的免疫原性组合物可指一种制剂，其含有有效量的抗原多肽/蛋白(例如肿瘤相关抗原)及其免疫原性衍生物(例如其片段或编码多核苷酸)和药学可接受的载体。所述安全有效量是指蛋白剂量，如必要的话其可与佐剂相关联，当该剂量给予人时，产生可检测的免疫应答，例如体液应答(抗体)或细胞应答，或该剂量能够免疫调节免疫系统，而无通常的疫苗接种者中的明显的副作用。该量根据所使用的具体免疫原和其如何提供而有所变化。一般来说，预期每剂含 1-5000 μg 蛋白，例如 1-1000 μg 蛋白，例如 1-500 μg ，例如 1-100 μg ，例如 1-50 μg 。具体疫苗的最佳量可通过标准研究确定，包括观察受试者的合适免疫应答。在初始接种后，受试者可接受一次或数次足够间隔的加强免疫。疫苗制剂一般描述于 Vaccine Design (“The subunit and adjuvant approach” (eds. Powell M. F. & Newman M. J). (1995) Plenum Press New York)。在脂质体中包囊化描述于 Fullerton 的美国专利 4,235,877。

免疫原性抗原多肽指在免疫实验(例如 ELISA 或 T 细胞刺激实验)中可检测地与表达所述多肽的患者的抗血清和/或 T 细胞反应的多肽。可使用技术人员众所周知的技术进行免疫活性的筛选。例如，可使用例如描述于 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 的方法进行该筛选。在一个说明性实施例中，可将多肽固定在固体支持体上，并与患者血清接触，以使血清中的抗体和固定化多肽结合。然后可去除未结合血清，并使用例如 ^{125}I -标记的 A 蛋白检测结合抗体。

本发明提供的多肽抗原经 SDS PAGE 检测例如至少为 80%纯，例如至少 90%纯。多肽抗原经 SDS PAGE 检测可呈现为单一条带。

本发明还包括免疫原性衍生物，例如抗原的免疫原性片段或部分，例如肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的片段或部分。本文使用的“免疫原性片段”是自身与识别多肽的 B 细胞和/或 T 细胞表面抗原受体免疫反应(即特异性结合)的片段。一般可使用众所周知的技术，例如概述于 Paul, *Fundamental Immunology*, 第 3 版, 243-247 (Raven

Press, 1993)和其中提及的参考文献中的技术, 鉴别免疫原性部分。这样的技术包括筛选与抗原特异性抗体、抗血清和/或 T 细胞系或克隆反应的能力。

5 如果本文使用的抗血清和抗体特异性结合抗原(即它们在 ELISA 或其它免疫实验中与蛋白反应, 但不与不相关蛋白可检测地反应), 则它们是“抗原特异性的”。这样的抗血清和抗体可如本文所述和使用众所周知的技术制备。

10 在一个实施方案中, 多肽的免疫原性部分是以基本不低于全长多肽的反应性(例如在 ELISA 和/或 T 细胞反应性实验中的反应性)的水平与抗血清和/或 T 细胞反应的部分。免疫原性部分的免疫活性水平可为全长多肽免疫原性的至少约 50%、至少约 70%或约 90%以上。在某些情况下, 鉴别出的免疫原性部分的免疫活性水平高于对应的全长多肽, 例如超过约 100%或 150%或更高的免疫活性。在某些其它实施方案中, 示例性免疫原性部分可包括 N 端前导序列和/或跨膜
15 结构域缺失的肽。相对于成熟蛋白, 其它示例性免疫原性部分少量 N 端或 C 端缺失(例如约 1-50 个氨基酸、约 1-30 个氨基酸、约 5-15 个氨基酸)。

20 在另一个实施方案中, 本发明的示例性免疫原性组合物, 例如疫苗组合物, 包含编码如上所述的一种或多种多肽的多核苷酸, 使得多肽原位产生。多核苷酸可在各种已知传递系统的任一种中给予。实际上, 众多的基因传递技术在本领域都是广为人知的, 例如描述于 Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15: 143-198, 1998 和其中提及的参考文献中的技术。当然, 合适的多核苷酸表达系统包含在患者中表达所必需的调节子 DNA 调节序列(例如合适的启动
25 子和终止信号)。或者, 细菌传递系统可包括给予在其细胞表面上表达免疫原性部分或分泌该表位的细菌(例如卡介苗)。

在本发明的一个实施方案中, 给予/传递的多核苷酸为“裸”DNA, 如 Ulmer et al., *Science* 259: 1745-1749, 1993 所述和 Cohen,

5 *Science* 259: 1691-1692, 1993 综述。通过将 DNA 包被在有效转运入细胞中的生物可降解珠上,可增加裸 DNA 的摄取。在一个实施方案中,皮内传递组合物。具体地说,利用基因枪(特别是颗粒轰击)给予技术传递组合物,该技术如 Haynes et al, *J Biotechnology* 44: 37-42 (1996)所述,包括将载体包被在珠(例如金)上,然后在高压下给入表皮中。

10 在一个说明性实施例中,用例如 Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) and Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI)生产的装置可实现气体驱动的颗粒加速,其一些实例描述于美国专利 No. 5,846,796、6,010,478、5,865,796、5,584,807 和 EP 专利 No. 0500799。该方法提供了一种无针传递途径,其中极微小颗粒(例如多核苷酸)的干粉制剂在通过手提装置产生的氦气流中加至高速,将颗粒推进入目标靶组织中,通常是皮肤。颗粒可为 0.4-4.0 μm 、0.6-2.0 μm 直径的金珠, DNA 缀合物包被在其上,然后封装入放置“基因枪”的弹筒或弹盒中。

15 在一个相关实施方案中,可用于本发明组合物的气体驱动无针注射的其它装置和方法包括 Bioject, Inc. (Portland, OR)提供的方法,其一些实例描述于美国专利 No. 4,790,824、5,064,413、5,312,335、5,383,851、5,399,163、5,520,639 和 5,993,412。

20 因此,在某些实施方案中,使用众多已知的病毒型系统中的任一种,将编码本文所述的免疫原性多肽的多核苷酸导入适于表达的哺乳动物宿主细胞中。在一个说明性实施方案中,逆转录病毒提供了一种方便有效的基因传递系统平台。可将选择的编码本发明多肽的核苷酸序列插入到载体中,并使用本领域已知的技术包装入逆转录病毒颗粒中。然后可分离重组病毒,并传递入受试者中。已经描述了许多示例性的逆转录病毒系统(例如美国专利 No. 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7: 980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180: 849-

852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037; 和 Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: 102-109)。

另外, 还描述了很多示例性的腺病毒型系统。与整合入宿主基
5 因组的逆转录病毒不同, 腺病毒驻留在染色体外, 因此使与插入诱
变相关的风险最小化(Haj-Ahmad and Graham (1986) J. Virol. 57: 267-
274; Bett et al. (1993) J. Virol. 67: 5911-5921; Mittereder et al. (1994)
Human Gene Therapy 5: 717-729; Seth et al. (1994) J. Virol. 68: 933-
940; Barr et al. (1994) Gene Therapy 1: 51-58; Berkner, K. L. (1988)
10 BioTechniques 6: 616-629; 和 Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4:
461-476)。因为人有时受到普通的人腺病毒血清型如 AdHu5 感染,
所以相当大比例的人群对腺病毒具有中和抗体反应, 其可能影响针
对重组疫苗型系统中的外源抗原的免疫应答。非人灵长类腺病毒载
体如黑猩猩腺病毒 68 (AdC68, Fitzgerald et al. (2003) J. Immunol 170
15 (3): 1416-22)可提供一种替代的腺病毒系统, 其没有先前存在的中和
抗体反应的劣势。

还开发了各种用于多核苷酸传递的腺相关病毒(AAV)载体系
统。可使用本领域众所周知的技术容易地构建 AAV 载体。参见例如
美国专利 No. 5,173,414 和 5,139,941、国际公开申请 WO 92/01070 和
20 WO 93/03769、Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8: 3988-3996;
Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory
Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3: 533-
539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol.
158: 97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5: 793-801;
25 Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1: 165-169; 和 Zhou et al. (1994)
J. Exp. Med. 179: 1867-1875。

用于通过基因转移传递本发明多肽编码核酸分子的其它病毒载
体包括来源于痘病毒家族的载体, 例如痘苗病毒和禽痘病毒。作为

实例，可如下构建表达新分子的痘苗病毒重组体。首先将多肽编码 DNA 插入到合适的载体中，以使其邻近于痘苗启动子，并位于痘苗 DNA 序列侧翼，例如编码胸苷激酶(TK)的序列。然后使用该载体转染细胞，该细胞同时用痘苗感染。同源重组用于将痘苗启动子和目的多肽编码基因插入到病毒基因组中。可通过在 5-溴脱氧尿嘧啶存在下培养细胞，并挑选抗 5-溴脱氧尿嘧啶的病毒斑，选择产生的 TK-重组体。

痘苗型感染/转染系统可方便地用于在生物体宿主细胞中提供可诱导的瞬时表达或共表达的一种或多种本文所述多肽。在该特定系统中，首先用编码噬菌体 T7 RNA 聚合酶的痘苗病毒重组体体外感染细胞。该聚合酶展示出灵敏的特异性，即其仅转录携带 T7 启动子的模板。在感染后，在 T7 启动子引导下用一种或多种目的多核苷酸转染细胞。在胞浆中表达的痘苗病毒重组体聚合酶将转染的 DNA 转录成 RNA，然后由宿主翻译系统将 RNA 翻译成多肽。该方法提供了高水平的、瞬时的、胞浆生产的大量 RNA 及其翻译产物。参见例如 ElroyStein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 8122-8126。

或者，还可以使用禽痘病毒如鸟痘病毒和金丝雀痘病毒传递目的编码序列。已知当表达哺乳动物病原体免疫原的重组禽痘病毒给予非禽物种时，产生保护性免疫。在人和其它哺乳动物物种中使用禽痘病毒载体是特别适合的，因为禽痘病毒属成员仅可在易感的禽物种中有效复制，因此在哺乳动物细胞中不是感染性的。生产重组禽痘病毒的方法是本领域已知的，如上文关于痘苗病毒生产的描述使用基因重组。参见例如 WO 91/12882、WO 89/03429 和 WO 92/03545。

还可使用众多 α 病毒载体中的任一种传递本发明的多核苷酸组合物，例如描述于美国专利 No. 5,843,723、6,015,686、6,008,035 和 6,015,694 的那些载体。还可以使用某些基于委内瑞拉马脑炎(VEE)的

载体, 示例性实例可见于美国专利 No. 5,505,947 和 5,643,576。

以预防或治疗有效量给予含抗原性肽编码核苷酸序列的载体。
要给予的量可在每剂 1 pg 至 16 mg 核苷酸的范围内, 对于颗粒介导
的传递在每剂 1 pg 至 10 μ g 核苷酸范围内, 对于其它途径在每剂 10 μ g
5 至 16 mg 核苷酸的范围内。确切的量可根据要免疫患者的体重和给
予途径而显著变化。

适于将裸多核苷酸或载体导入患者中的技术还包括合适载体的
局部应用。核酸可通过例如鼻内、口、阴道内或直肠内给予局部给
予至皮肤或粘膜表面。裸多核苷酸或载体可与药学可接受的赋形剂
10 一起提供, 例如磷酸缓冲盐水(PBS)。可通过使用单独的或纳入 DNA
制剂中的促进剂如丁哌卡因进一步促进 DNA 摄取。其它直接给予受
者核酸的方法包括超声波、电刺激、电穿孔和描述于 US 5,697,901
的微接种。

可利用几种已知转染技术增强核酸构建物的摄取, 例如包括使
15 用转染剂的技术。这些转染剂的实例包括阳离子剂(例如磷酸钙)和
DEAE 葡聚糖和脂转染剂, 例如 Lipofectam 和 Transfectam。要给予
的核酸的剂量可改变。

在再另一个实施方案中, 本发明的免疫原性组合物包括抗体或
血清或抗体结构域, 例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段。抗体可为单克隆抗体
20 或其片段。有效剂量通常为 100 μ g 至 500 mg/kg 患者体重, 例如为 1 mg
至 50 mg/kg 患者体重。因此, 本发明的方法包括被动免疫治疗或被
动免疫预防。

本发明的免疫原性组合物和 IL-18 多肽可通过各种途径传递, 例
如肌内、皮下、腹膜内或静脉内。

25 本发明的 IL-18 多肽或其生物活性片段诱导主要为 Th1 型的免
疫应答。高水平的 Th1 型细胞因子(例如 IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-12、
IL-18 等)倾向于支持诱导针对所给予抗原的细胞介导的免疫应答。相
反, 高水平的 Th2-型细胞因子(例如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)倾向

于支持诱导体液免疫应答。关于细胞因子家族的综述,参见 Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989。所述“IL-18”或“IL-18 多肽”指公开于 EP0692536、EP0712931、EP0767178 和 WO97/2441 的 IL-18 多肽。IL-18 多肽衍生物或变体包括分离的多肽,其含有的氨基酸序列与图 1 所示的 SEQ ID NO: 6 (人 IL-18)或 SEQ ID NO: 7 (鼠 IL-18)的氨基酸序列的同一性,分别为全长 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 的至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 97-99%。这样的多肽包括分别含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 的氨基酸的多肽。IL-18 多肽可为 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 所列出的氨基酸序列。还规划了 IL-18 片段,即能够表现出 IL-18 的生物(抗原性或免疫原性)活性(如诱导 IFN- γ)的 IL-18 片段。可使用 IL-18 生物活性片段,可使用 IL-18 免疫原性片段。

IL-18 多肽可为成熟蛋白形式,或者可为较大蛋白如融合蛋白的一部分。还规划了 IL-18 变体,即通过由一个具有类似特性的残基取代另一个残基的保守氨基酸取代而改变的多肽。通常,所述取代发生在 Ala、Val、Leu 和 Ile 之间;在 Ser 和 Thr 之间;在酸性残基 Asp 和 Glu 之间;在 Asn 和 Gln 之间;在碱性残基 Lys 和 Arg 之间;或芳香族残基 Phe 和 Tyr 之间。例如,其中几个、5-10、1-5、1-3、1-2 或 1 个氨基酸以任意组合被取代、缺失或添加的变体。还规划了 IL-18 生物活性片段。所述“生物活性片段”指基本保留了和全长 IL-18 相同的生物活性的 IL-18 片段。所述生物活性指任一种以下特性:增强了天然杀伤(NK)细胞活性和 Th1 细胞应答(活化 NK、NKT 细胞、诱导活化的 T 细胞增殖)、抗血管生成活性;增强活化的 NK、NKT 细胞和 T 细胞上的 Fas 配体的表达;增加 IFN γ 、GM-CSF 和其它细胞因子如 Th1-型细胞因子的生产;能够刺激先天免疫性以及 Th1-和 Th2-介导的应答。

具体地说,IL-18 的生物活性片段是根据 KG-1 检测系统的体外检测,保留了增加 IFN γ 生产的能力的片段。表达人 IL-18 受体的人

髓样单核细胞系(KG-1)对 IL-18 治疗有反应,即增加 IFN γ 的生产(分泌)(通过 ELISA 检测)和活化 NF κ B (Matsuko Taniguchi et al. J. Immunological Methods, 1998, 217, 97-102)。

5 可以任何合适的方式制备本发明的 IL-18 多肽。其包括分离的天然多肽、重组或合成产生的所述多肽等。该制备方法是本领域周知的。

10 有利地,本发明的免疫原性组合物可包含药学可接受的赋形剂或载体。载体分子可含几种形式,包括载体生物,例如活细菌载体或细菌载体菌株,水、盐水或免疫刺激化学物质。载体可为水、盐水或其它缓冲性生理溶液。载体分子还可包括多孔聚合颗粒,例如微珠或纳米颗粒,以及金属盐颗粒,例如氢氧化铝、磷酸铝或磷酸钙或磷酸镁、磷酸铁、碳酸钙、碳酸镁、硫酸钙、氢氧化镁,或双盐,例如磷酸铵-铁、磷酸钾-铁、磷酸钙-铁、碳酸钙-镁或任一种这些盐的混合物。

15 在给予本文提供的联合制剂时,患者将承受包括 Th1-型和 Th2-型应答的免疫应答。

可通过各种途径传递本发明的免疫原性组合物和 IL-18 多肽或其生物活性片段或变体,例如肌内、皮下、腹膜内或静脉内。

20 以预防或治疗有效量给予含抗原性肽编码核苷酸序列的载体。要给予的量一般在每剂 1 pg 至 16 mg 核苷酸的范围内,对于颗粒介导的传递在每剂 1 pg 至 10 μ g 核苷酸范围内,对于其它途径在每剂 10 μ g 至 16 mg 核苷酸的范围内。确切的量可根据要免疫患者的体重和给予途径而显著变化。

25 适于将裸多核苷酸和载体导入患者中的技术还包括合适载体的局部应用。核酸可通过例如鼻内、口、阴道内或直肠内给予局部给予至皮肤或粘膜表面。裸多核苷酸或载体可与药学可接受的赋形剂一起提供,例如磷酸缓冲盐水(PBS)。可通过使用单独的或纳入 DNA 制剂中的促进剂如丁哌卡因促进 DNA 摄取。其它直接给予受者核酸

的方法包括超声波、电刺激、电穿孔和描述于 US 5,697,901 的微接种。

可通过几种已知的转染技术增强核酸构建物的摄取，例如包括使用转染剂的技术。这些转染剂的实例包括阳离子剂(例如磷酸钙)和 DEAE 葡聚糖和脂转染剂，例如 Lipofectam 和 Transfectam。要给予的核酸的剂量可改变。

本发明的 IL-18 多肽或其生物活性片段诱导主要为 Th1 型的免疫应答。高水平的 Th1 型细胞因子(例如 IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-12、IL-18 等)倾向于支持诱导针对所给予抗原的细胞介导的免疫应答。相反，高水平的 Th2-型细胞因子(例如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)倾向于支持诱导体液免疫应答。关于细胞因子家族的综述，参见 Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989。这些细胞因子的水平可使用标准检测容易地评价。所述“IL-18”指公开于 EP0692536、EP0712931、EP0767178 和 WO97/2441 的 IL-18 多肽。IL-18 多肽包括分离的多肽，其含有的氨基酸序列与图 1 所示的 SEQ ID NO: 1 (人 IL-18)或 SEQ ID NO: 2 (鼠 IL-18)的氨基酸序列的同一性，分别为全长 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%或至少 97-99%。这样的多肽包括分别含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的氨基酸的多肽。IL-18 多肽可具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所列出的氨基酸序列。还规划了 IL-18 片段，即能够表现出 IL-18 的生物(抗原性或免疫原性)活性(如诱导 IFN- γ)的 IL-18 片段。

IL-18 多肽可为成熟蛋白形式，或者可为较大蛋白如融合蛋白的一部分。还规划了 IL-18 变体，即通过由一个具有类似特性的残基取代另一个残基的保守氨基酸取代而改变的多肽。典型的所述取代在 Ala、Val、Leu 和 Ile 之间；在 Ser 和 Thr 之间；在酸性残基 Asp 和 Glu 之间；在 Asn 和 Gln 之间；在碱性残基 Lys 和 Arg 之间；或芳香族残基 Phe 和 Tyr 之间。例如，其中几个、5-10、1-5、1-3、1-2 或 1

个氨基酸以任意组合被取代、缺失或添加的变体。

可以任何合适的方式制备本发明的 IL-18 多肽。其包括分离的天然多肽、重组或合成产生的所述多肽等。该制备方法是本领域周知的。

5 在给予本文提供的联合制剂时，患者将发生包括 Th1-型和 Th2-型应答的免疫应答。

 在本发明的实施方案中，免疫原性组合物还包含另一种佐剂，例如诱导主要为 Th1 型的免疫应答的佐剂。TH-1 诱导佐剂可选自以下佐剂：脂多糖衍生的佐剂如肠细菌脂多糖(LPS)、3D-MPL、胆固醇和 CpG 寡核苷酸或两种或多种所述佐剂的混合物。主要激发 Th1 型应答的佐剂可包括例如单磷酸脂质 A (例如 3-脱氧-酰化单磷酸脂质 A)和铝盐的组合。MPL[®]佐剂可得自 Corixa Corporation (Seattle, WA; 参见例如美国专利 No. 4,436,727、4,877,611、4,866,034 和 4,912,094)。

15 在一个实施方案中，本发明的免疫原型组合物还含有免疫刺激性 CpG 寡核苷酸。

 含 CpG 的寡核苷酸(其中 CpG 二核苷酸未甲基化)也诱导 Th1 为主的应答。这样的寡核苷酸是众所周知的，描述于例如 WO 96/02555、WO 99/33488 和美国专利 No. 6,008,200 和 5,856,462。例如，Sato et al.,
20 *Science* 273: 352, 1996 也描述了免疫刺激性 DNA 序列。

 本领域已知 CpG 在系统和粘膜途径给予时都是佐剂 (WO96/02555、EP 468520, Davis et al., *J. Immunol*, 1998, 160 (2): 870-876; McCluskie and Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161 (9): 4463-6)。CpG 是 DNA 中存在的胞嘧啶-鸟苷二核苷酸基序的缩写。在历史上，观察到 BCG DNA 组分可发挥抗肿瘤作用。在进一步的研究中，来源于 BCG 基因序列的合成寡核苷酸显示出能够诱导免疫刺激作用(体外和体内均可)。这些研究的作者断定：某些回文序列，包括中央 CG
25 基序，具有这种活性。CG 基序在免疫刺激中的核心作用后来由 Krieg,

Nature 374, 546 页, 1995 的出版物阐明。详细分析表明, CG 基序肯定在某些序列当中, 这些序列常见于细菌 DNA, 但在脊椎动物 DNA 中罕见。免疫刺激序列通常为: 嘌呤、嘌呤、C、G、嘧啶、嘧啶; 其中双核苷酸 CG 基序未甲基化, 但已知其它未甲基化 CpG 序列是免疫刺激性的, 可用于本发明。

在某些 6 个核苷酸的组合中存在回文序列。这些基序或者为一个基序的重复, 或者为不同基序的组合, 其中有几个可存在于相同的寡核苷酸。存在一个或多个含寡核苷酸的这些免疫刺激序列可活化各种免疫组成部分, 包括天然杀伤细胞(其产生 IFN γ , 并具有溶细胞活性)和巨噬细胞(Wooldrige et al Vol 89 (no. 8), 1977)。尽管其它含未甲基化 CpG 的序列不具有该共有序列, 但已被表明其是免疫刺激性的。

用于本发明的寡核苷酸可包含两个或多个双核苷酸 CpG 基序, 其由至少 3 个、至少 6 个或更多个核苷酸分隔。本发明的寡核苷酸可为脱氧核苷酸。在一个实施方案中, 寡核苷酸中的核苷酸之间是二硫代磷酸酯键或硫代磷酸酯键, 尽管磷酸二酯键和其它核苷酸间键在本发明范围内, 包括具有混合的核苷酸间键的寡核苷酸。生产硫代磷酸寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法描述于 US 5,666,153、US 5,278,302 和 WO95/26204。

寡核苷酸的实例具有以下序列。该序列可包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键。

OLIGO 1 (SEQ ID NO: 3): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO: 4): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID NO: 5): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO: 6): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006 也称为 CpG 7909)

OLIGO 5 (SEQ ID NO: 7): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT
(CpG 1668)

替代性的 CpG 寡核苷酸可包含其中具有无义缺失或添加的以上序列。

5 本发明使用的 CpG 寡核苷酸可利用本领域已知的任何方法(例如 EP 468520)合成。方便地,可使用自动化合成仪合成该寡核苷酸。

用于本发明的寡核苷酸可为脱氧核苷酸。在一个实施方案中,寡核苷酸中的核苷酸间键为二硫代磷酸酯键或硫代磷酸酯键,尽管磷酸二酯属于本发明范围。规划了含不同核苷酸间键的寡核苷酸,
10 例如混合的硫代磷酸酯磷酸二酯。可使用使寡核苷酸稳定的其它核苷酸间键。

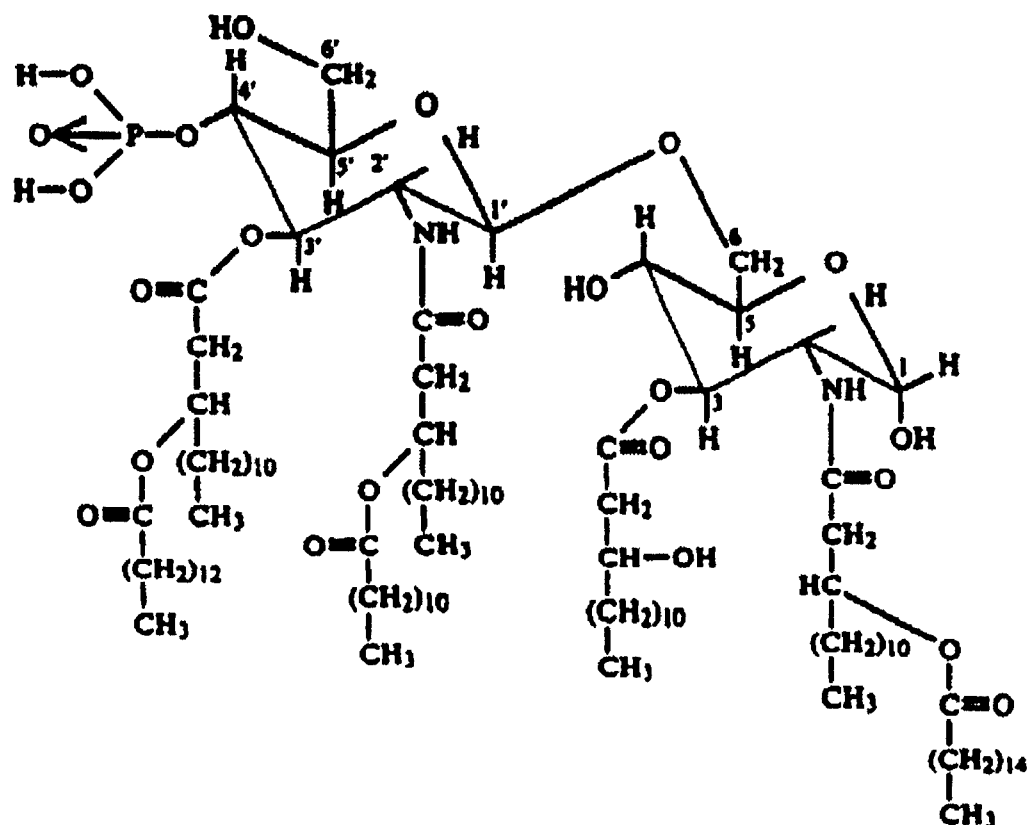
CpG 当配制成疫苗时,一般在和游离抗原一起的游离溶液中给予(WO 96/02555; McCluskie and Davis, 出处同上),或共价缀合至抗原给予(PCT 说明书 WO 98/16247),或与载体如氢氧化铝配制给予
15 ((乙肝表面抗原) Davis et al. 出处同上; Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1998, 95 (26), 15553-8)。

一种增强的制剂可包括含 CpG 的寡核苷酸和皂苷衍生物的组合,特别是如 WO00/09159 和 WO00/62800 所公开的 CpG 和 QS21 的组合。这样的制剂还可含有水包油乳浊液和生育酚。因此,在再
20 另一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含 CpG 寡核苷酸和皂苷(例如 QS21)的组合,可选地配制成水包油乳剂。可选地,制剂还可包含 3D-MPL[®]佐剂。可如 WO 96/33739 所述,以其基本无反应原性的组合物提供 QS-21,其中 QS21 用胆固醇抑制。

在另一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物另外包含肠细菌脂多糖衍生的佐剂,例如单磷酸脂质 A,如 3-脱氧-酰化单磷酸脂质 A。
25

很久以来就知道肠细菌脂多糖(LPS)是免疫系统的有效刺激物,尽管其毒性作用削弱了其佐剂用途。Ribi et al (1986, *Immunology and*

Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, 407-419 页)描述了 LPS 的无毒衍生物单磷酸脂质 A (MPL), 其通过去除核心糖基和还原末端葡萄糖胺的磷酸产生, 其具有以下结构:



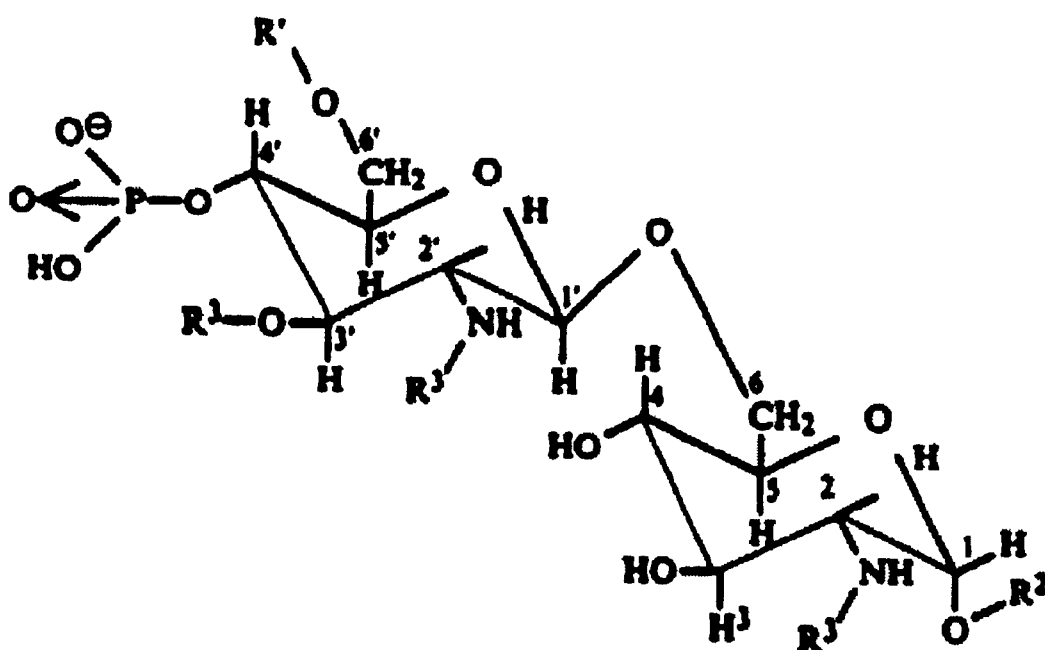
- 5 进一步脱毒形式的 MPL 叫做 3-O-脱酰化单磷酸脂质 A (3D-MPL), 其通过去除二糖骨架 3-位的酰基链产生。其可通过 GB 2122204B 讲述的方法纯化和制备, 该参考文献还公开了二磷酸脂质 A 及其 3-O-脱酰化变体的制备。3D-MPL 可为小颗粒直径小于 0.2 μm 的乳浊液形式, 其生产方法公开于 WO94/21292。在 WO98/43670A2
- 10 中公开了含单磷酸脂质 A 和表面活性剂的水性制剂。

- 可由细菌来源纯化和加工配制成本发明佐剂组合物的细菌脂多糖衍生的佐剂, 或者可合成该佐剂。例如, Ribí et al 1986 (出处同上) 描述了纯化的单磷酸脂质 A, GB 2220211 和 US 4912094 描述了来源于沙门氏菌(*Salmonella sp.*)的 3-O-脱酰化单磷酸脂质 A 或 3-O-脱酰化二磷酸脂质 A。其它纯化和合成的脂多糖也有描述(WO 98/01139;
- 15

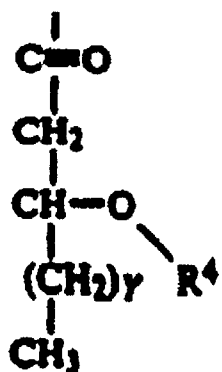
US 6,005,099 和 EP 0 729 473 B1; Hilgers et al., 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79 (4): 392-6; Hilgers et al., 1987, *Immunology*, 60 (1): 141-6; 以及 EP 0 549 074 B1)。细菌脂多糖佐剂可包括描述于 US 6,005,099 和 EP 0 729 473 B1 的 3D-MPL 和 $\beta(1-6)$ 葡糖胺二糖。

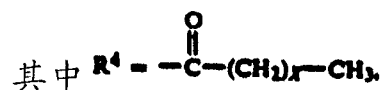
5 因此, 可用于本发明的 LPS 衍生物是那些结构上类似于 LPS 或 MPL 或 3D-MPL 的免疫刺激物。在本发明的另一方面, LPS 衍生物可为酰化单糖, 其为以上 MPL 结构的附属部分。

二糖佐剂的实例是下式的纯化或合成的脂质 A:



10 其中 R2 可为 H 或 PO_3H_2 ; R3 可为具有下式的酰基链或 β -羟基肉豆蔻酰或 3-酰氧基酰基残基:





其中 X 和 Y 的值为 0 至约 20。

在 EP 0 761 231 B 中描述了 3D-MPL 和来源于奎拉雅属皂树树皮的皂苷佐剂的组合。WO 95/17210 公开了基于鲨烯、 α -生育酚和聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(TWEEN80)的佐剂乳浊液系统，其
5 与免疫刺激物 QS21 一起配制，任选与 3D-MPL 一起配制。

因此，在另一个实施方案中，本发明的免疫原性组合物包含(1)抗原或其免疫原性片段，和(2)皂苷(例如 QS21，例如为其用胆固醇抑制的形式)和一种或多种例如选自以下的佐剂的组合：CpG 免疫刺
10 激性寡核苷酸、3D-MPL 和水包油乳剂。

在一个实施方案中，免疫原性组合物包括单磷酸脂质 A 和皂苷佐剂的组合，例如 WO94/00153 所述的 3D-MPL[®]佐剂和 QS21 的组合，或如 WO96/33739 所述的较小反应原性的组合物，其中 QS21 用胆固醇抑制。其它制剂除了 QS21 以外，还可包含水包油乳剂和生育酚。WO95/17210 描述了另一种制剂，其使用 QS21、3D-MPL[®]佐剂
15 和生育酚在水包油乳剂中的组合。因此，本发明的免疫原性组合物包含抗原(例如肿瘤相关抗原)、皂苷佐剂(例如 QS21)以及 3D-MPL[®]佐剂，除了包含 QS21 以外，还可选地含有水包油乳剂和生育酚。例如，用胆固醇抑制 QS-21。

另一种制剂包括含 CpG 的寡核苷酸和皂苷衍生物的组合，例如在 WO00/09159 和 WO00/62800 中公开的 CpG 和 QS21 的组合。该制剂还可含有水包油乳剂和生育酚。因此，在再另一个实施方案中，本发明的免疫原性组合物包含皂苷(例如 QS21)和 CpG 寡核苷酸的组合，其可选地配制在水包油乳剂中。该制剂可选地还可含有 3D-MPL[®]
20 佐剂。QS-21 可在如 WO96/33739 所述的较小反应原性的组合物中提供，其中 QS21 用胆固醇抑制。

或者，在本发明免疫原性组合物中的皂苷佐剂可联用由壳聚糖

或其它聚阳离子聚合物组成的疫苗载体、聚交酯和聚交酯-共-乙交酯颗粒、聚-N-乙酰葡萄糖胺型聚合基质、由多糖或化学修饰的多糖组成的颗粒、脂质体和脂质型颗粒、由甘油单酯组成的颗粒等。还可在胆固醇存在下配制皂苷，以形成例如脂质体或 ISCOM 的颗粒结构。

- 5 而且，可将皂苷和聚氧乙烯醚或酯一起配制成无颗粒溶液或悬浮液，或配制成例如少层微泡(paucilamellar)脂质体或 ISCOM 的颗粒结构。皂苷还可与赋形剂如 Carbopol[®]配制，以增加粘度，或者可与粉末赋形剂如乳糖一起配制成干粉形式。

- 10 疫苗和免疫原性组合物可以单位剂量或多剂量容器提供，例如密封安瓿或小瓶。这样的容器可进行密封，以保持制剂的无菌性，直至使用。一般而言，制剂可作为在油性或水性溶媒中的悬浮液、溶液或乳浊液储存。或者，可将疫苗或免疫原性组合物在冻干条件下储存，在临使用前仅需加入无菌液体载体。

- 15 在免疫原性组合物和疫苗中可使用各种传递载体中的任一种，以利于产生靶向肿瘤细胞的抗原特异性免疫应答。按照本发明的一个实施方案，本文描述的免疫原性组合物通过抗原提呈细胞(APC)传递至宿主，抗原提呈细胞例如为树突细胞、巨噬细胞、B 细胞、单核细胞和其它可制成有效 APC 的细胞。APC 细胞可以(但不是必须的)进行遗传修饰，以增加提呈抗原的能力、改善 T 细胞应答的活化和/或维持、自身具有抗肿瘤作用和/或与受者免疫相容(即匹配的 HLA 单倍型)。APC 一般可分离自各种生物流体和器官中的任一种，包括肿瘤和肿瘤周围的组织，并可为自体、异体、同源或异源细胞。
- 20

- 25 本发明的某些实施方案使用树突细胞或其祖作为抗原提呈细胞。树突细胞是高度有效的 APC (Banchereau J. & Steinman R. M., Nature, 1998, 392: 245-251)，并已表明其作为生理佐剂有效激发预防性或治疗性抗肿瘤免疫(参见 Timmerman J. M. and Levy R., Ann. Rev. Med, 1999, 50: 507-529)。一般来说，树突细胞可根据其典型形状(原位星型，体外可见具有明显的胞突(树突))、高效摄取、加工和提呈

抗原的能力及其活化原初 T 细胞应答的能力来鉴别。当然，树突细胞可制成表达通常在体内或先体外后体内的树突细胞上不常见的特异性细胞表面受体或配体，本发明规划了这样的修饰的树突细胞。作为树突细胞的替代物，可在疫苗中使用载荷分泌性囊泡抗原的树突细胞(称为外体)(参见 Zitvogel L. et al., Nature Med., 1998, 4: 594-600)。因此，本发明提供一种免疫刺激性制剂，例如疫苗，其含有有效量的树突细胞或抗原提呈细胞以及药学有效载体，这些细胞通过体外载荷本文所述的多肽进行修饰，或体外遗传修饰，以表达本文所述多肽。

树突细胞和祖细胞可得自外周血、骨髓、肿瘤浸润细胞、肿瘤周围组织浸润细胞、淋巴结、脾、皮肤、脐带血或任何其它合适的组织或体液。例如，可通过向由外周血收集的单核细胞培养物中加入组合的细胞因子如 GM-CSF、IL-4、IL-13 和/或 $\text{TNF}\alpha$ ，先体外后体内分化树突细胞。或者，可通过向培养基中加入 GM-CSF、IL-3、 $\text{TNF}\alpha$ 、CD40 配体、脂多糖 LPS、flt3 配体和/或其它诱导树突细胞分化、成熟和增殖的化合物，将由外周血、脐带血或骨髓收集的 CD34 阳性细胞分化为树突细胞。树突细胞通常被分类为“不成熟”和“成熟”细胞，其提供了一种在两种充分表征的表型之间进行区分的简单方法。但是，该命名法不应被解释为排除了分化的所有可能中间阶段。不成熟树突细胞的特征在于具有高抗原摄取和加工能力的 APC，其与 $\text{Fc}\gamma$ 受体和甘露糖受体的高表达相关联。成熟表型通常表征为这些标记物的较低表达，但负责 T 细胞活化的细胞表面分子(例如 MHC I 类和 II 类分子、粘附分子(例如 CD54 和 CD11)以及共刺激分子(例如 CD40、CD80、CD86 和 4-1BB))高表达。

APC 一般可用编码肿瘤蛋白(例如 MAGE-3、Her2/neu 或其衍生物)的多核苷酸转染，使得肿瘤多肽或其免疫原性部分表达在细胞表面上。这样的转染可先体外后体内发生，然后，含该转染细胞的混合物或疫苗可如本文所述用于治疗目的。或者，可将靶向树突细胞

或其它抗原提呈细胞的基因传递载体给予患者，使得转染在体内发生。例如，一般可使用本领域已知的任何方法，例如描述于 WO 97/24447 的方法或 Mahvi D. M. et al., Immunology and Cell Biology, 1997, 75: 456-460 描述的基因枪方法，进行树突细胞的体内和先体外后体内转染。通过将树突细胞或祖细胞与肿瘤多肽、DNA (裸 DNA 或在质粒载体中)或 RNA 温育；或将树突细胞或祖细胞与表达抗原的重组细菌或病毒(例如痘苗病毒、鸟痘病毒、腺病毒或慢病毒载体)温育，可实现树突细胞的抗原载荷。

其它合适的传递系统包括微球体，其中抗原物质掺入到或缀合至生物可降解聚合物/微球体，使得抗原物质可与合适的药用载体混合，并用作疫苗。术语“微球体”一般用于描述大致为球形并且直径在 10 nm 至 2 mm 范围内的胶体颗粒。已发现由广泛范围的天然和合成聚合物制备的微球体可有各种各样的生物医学用途。对于体内半寿期短、需要多次治疗来提供效力的蛋白，或由于其相对较高的分子量而在生物流体中不稳定或不能被胃肠道完全吸收的蛋白，该传递系统特别有优势。已经描述了几种为蛋白释放基质的聚合物。合适的聚合物包括明胶、胶原、藻酸盐、葡聚糖。传递系统可包括生物可降解聚(DL-乳酸)(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(ϵ -己内酯)(PCL)和共聚物聚(DL-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。其它系统可包括异源水凝胶，例如含基于亲水性聚(乙二醇)(PEG)和疏水性聚(丁烯对苯二甲酸酯)(PBT)或聚(乙二醇)-对苯二甲酸酯/聚(丁烯对苯二甲酸酯)(PEGT/PBT)的重复嵌段的聚(醚酯)多嵌段共聚物(Sohier et al. Eur. J. Pharm and Biopharm, 2003, 55, 221-228)。例如 PLGA、PLA 和 PEGT/PBT 的系统可提供 1-3 个月的持续释放。

根据有关患者的大小和种族、给予的核酸疫苗和/或蛋白组合物的量、给予途径、使用的任一种佐剂化合物的效力和剂量以及其它对熟练医师显而易见的因素，治疗方案可显著变化。

参照以下的非限制性实施例进一步阐述本发明：

实施例 I

使用 QS21 型免疫原性组合物的疫苗制剂

I.1.-在水包油乳浊液中含 QS21 和 3 脱氧-酰化单磷酸脂质 A (3D-MPL) 的免疫原性制剂(AS02 制剂):

该佐剂系统 AS02 先前已描述于 WO95/17210。

3D-MPL: 是来源于革兰氏阴性菌明尼苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*)的脂多糖(LPS)的免疫刺激物。MPL 已脱酰化, 在脂质 A 部分没有磷酸基团。该化学处理极大地降低了毒性, 同时保留了免疫刺激特性(Ribi, 1986)。Ribi Immunochemistry 为 SB-Biologicals 生产和提供 MPL。

QS21: 是由南美奎拉雅属皂树的树皮提取的天然皂苷分子。开发出一种分离树皮粗提物中的各种皂苷的纯化技术, 该技术允许分离特定皂苷 QS21, 其是一种三萜糖苷, 和亲代组分相比, 其显示出更强的佐剂活性和更低的毒性。已经表明, QS21 活化针对几种亚单位抗原的 MHC I 类限制性 CTL, 并刺激抗原特异性淋巴细胞增殖(Kensil, 1992)。Aquila (正式地为 Cambridge Biotech Corporation)为 SB-Biologicals 生产和提供 QS21。

油/水乳浊液由有机相(由两种油(生育酚和鲨烯)制备)和含 Tween 80 作为乳化剂的水相组成。乳浊液含 5%鲨烯、5%生育酚、0.4% Tween 80, 平均颗粒大小为 180 nm, 称为 SB62 (参见 WO 95/17210)。

乳浊液 SB62 (2 倍浓缩液)的制备:

将 Tween 80 溶解在磷酸缓冲盐水(PBS)中, 以获得 2%的 PBS 溶液。为提供 100 ml 的 2 倍浓缩乳浊液, 将 5g DL α 生育酚和 5 ml 鲨烯涡旋至充分混合。加入 90 ml PBS/Tween 溶液, 并充分混合。然后, 将产生的乳浊液通过注射器, 最后用 M110S 微流体化设备微流体化。产生的油滴大小约为 180 nm。

制剂: 如下制备在油/水乳浊液中含 3D-MPL 和 QS21 的典型制

剂：将 20 μg -25 μg C-LytA P2-P501S 稀释在 10 倍浓缩的 PBS pH 6.8 和水中，然后连续加入 SB62 (50 μl)、MPL (20 μg)、QS21 (20 μg)，可选地含 CpG 寡核苷酸(100 μg)和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫柳汞作为防腐剂。每种组分的量可根据需要变化。所有的温育都在搅拌下于室温进行。

5

I.2.-在脂质体制剂中含 QS21 和 CpG 的免疫原性制剂(AS15 佐剂):

该佐剂系统 AS15 先前已描述于 WO00/62800。

AS15 是两种佐剂系统 AS01B 和 AS07A 的新组合。AS01B 由含 3D-MPL 和 QS21 的脂质体组成，AS07A 由 CpG 7909 (也称为 CpG 2006)的磷酸缓冲盐水溶液组成。

10

QS-21 如上所述。

CpG: CpG ODN 7909 是一种 24 个碱基长的合成单链硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(ODN)。其碱基序列为 **5'-TCGTCGTTTTCGTCGTTTTCGTT-3'**，已为刺激人免疫系统进行了优化。已知 CpG DNA 或含 CpG 基序的合成 ODN 活化树突细胞、单核细胞和巨噬细胞，以使其分泌 TH1-样细胞因子，并诱导 TH1 T 细胞应答，包括产生细胞毒性 T 细胞，刺激 NK 细胞分泌 IFN γ ，并增加其溶细胞活性，它们还活化 B 细胞，以使其增殖(Krieg A et al. 1995 Nature 374: 546, Chu R et al. 1997 J. Exp. Med. 186: 1623)。CpG 7909 对任何已知的人基因组序列都不是反义的。CpG 7909 是以 Coley Pharmaceutical Group, Inc., MA, US 的名义开发和生产的一种专有佐剂。

15

20

含 CpG 的制剂:

在注射日进行配制。1 只小鼠的注射体积是 50 或 100 μl 。如下制备在脂质体中含 CpG、3D-MPL 和 QS21 的典型制剂: 将 20 μg -25 μg 的抗原稀释在等渗的水和 PBS pH 7.4 中。5 分钟后，将以 1/5 的 QS21/胆固醇重量比率与脂质体混合的 QS21 (0.5 μg)(称为 DQ)加入到制剂中。30 分钟后，加入 10 μg CpG (ODN 2006)，30 分钟后加入 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫柳汞作为防腐剂。所有的温育都在搅拌下于室温进行。

25

实施例 II

mIL18 和用 AS02 作为佐剂的 HPV16 D 蛋白-E7 疫苗的组合在 TC1 治疗模型 E7-Tg 小鼠和非 E7-Tg 小鼠中的作用

II.1 实验设计

在第 0 日,使每组 5 只共 7 组的雌性 E7 Tg (C. Ledent et al. PNAS (USA) 1990, 87; 6176-6180)或非 Tg C57BI/6 (Iffa Credo)小鼠接受 200 μ l 的 10^6 TC1 细胞(SC)的肿瘤攻击。

表达 HPV16 E7 蛋白的转基因小鼠:

转基因小鼠品系由 M. Parmentier 和 C. Ledent 在 IRIBHN (ULB) 生产(参考文献: PNAS (USA) 1990, 87; 6176-6180)。由于转基因小鼠从出生就携带 E7 HPV16 基因, 所以认为该小鼠对该基因“耐受”: E7 来自 HPV 16, 在此情况下认为其是“自身抗原”。转基因的表达受甲状腺球蛋白启动子驱动。因为甲状腺球蛋白仅在甲状腺中组成型表达, 所以 E7 在甲状腺中表达。由于该表达使甲状腺细胞增殖, 小鼠出现甲状腺肿和小结, 在 6 个月至 1 年后小鼠可发展成侵袭性癌症。

肿瘤细胞系 TC1:

用 HPV 16 E6 和 E7 永生化 C57BL/6 小鼠的原初肺上皮细胞, 然后用活化的 ras 癌基因转化, 产生表达 E6 和 E7 的致瘤细胞系(Lin KY et al. 1996)。使用小鼠 HPV 16 E7 单克隆抗体(Triton Corp. Alameda, CA)通过 FACS 分析固定化和通透性 TC1 细胞, 由此检验 E7 的表达。

疫苗: 在第 7 天和第 14 天, 肌肉(IM)给予疫苗, 该疫苗含如 WO99/10375 所述制备的 5 μ g PD1/3E7 (PDE7, 批号 02/025), 以含 QS-21 的 AS02B 佐剂(人剂量的 1/5 (MPL 20 μ g/QS21 20 μ g/SB62 50 μ l) 作为佐剂。

鼠 IL18-mIL-18 (batch_SB-528775 批号 MJG-28800-176, 1 mg/ml), 在 3 周内每日皮下(S.C.)给予 100 μ l (在第 7 天开始)。

II.2 体内肿瘤生长:

将在培养基中体外生长的 TC1 细胞胰蛋白酶化, 用无血清培养基清洗两次, 在小鼠的右肋腹皮下(S.C.)注射。

5 为评价既有肿瘤的治疗, 以 1×10^6 细胞/小鼠的剂量注射 TC1 细胞。在肿瘤细胞注射后的第 1 周和第 2 周, 用如 WO99/10375 所述制备的 5 μ g 100 μ l protD 1/3 E7 His 肌肉(IM)接种小鼠, 该 5 μ g 100 μ l protD 1/3 E7 His 以含 QS21 的 AS02 佐剂作为佐剂, 或与单独的 PBS 一起。每组使用 5 只小鼠。

10 小鼠组别

- 组 1: PBS
- 组 2: PDE7 AS02B
- 组 3: PDE7 AS02B +100 μ g mL-18
- 组 4: PDE7 AS02B + 1 μ g mL-18
- 15 -组 5: PDE7 AS02B + 0.1 μ g mL-18
- 组 6: 1 μ g mL18
- 组 7: 0.1 μ g mL18

20 在 5 周内(直至第 35 天)一周两次监测小鼠的体内肿瘤生长。在第 35 天分析血清学(免疫球蛋白总量和同种型)。平均肿瘤块/组(表示为 mm²/每组 5 只小鼠)示于图 2 (对照非 Tg 小鼠)和图 3 (E7 Tg 小鼠)。图 2A 显示了用 1 μ g IL-18 所获得的结果, 图 2B 显示了用 100 μ g IL-18 所获得的结果。图 3A 显示了用 1 μ g IL-18 所获得的结果, 图 3B 显示了用 100 μ g IL-18 所获得的结果。

25 以下的表 1 概述了接种时组合或不组合 IL-18 重复注射的情况下完全抑制其肿瘤的小鼠的百分率, 还清楚显示了疫苗和高剂量 IL18 组合的好处。

表 1

小鼠组别	%完全退化的对照	%完全退化的 E7Tg
------	----------	-------------

	小鼠	小鼠
PBS	0	0
PDE7+AS02B	20	0
PDE7+AS02B 0.1 μ g IL-18	20	0
PDE7+AS02B 1 μ g IL-18	0	0
PDE7+AS02B 100 μ g IL-18	100	100
0.1 μ g mlL18	0	0
1 μ g mlL18	0	0
100 μ g mlL18 (来自先前的实验)	20	0

II.3 结论

该实验获得的数据表明:

- 将 IL-18 与用含 QS21 的 AS02B 作为佐剂的 E7 疫苗组合, 对对照非转基因小鼠以及 E7Tg 小鼠的肿瘤抑制都具有明显的益处。
- 在攻击后保持无肿瘤的唯一小鼠组别是同时接受了疫苗和 IL-18 的小组。
- 组合的益处也是剂量依赖性的。

II.4 血清学-免疫学结果

如下所述, 使用 PD1/3E7-16 (02/025)作为包被抗原, 通过 ELISA 检测抗体应答和同种型谱(对于合并的血清而言)。

以和取器官相同的时间取各种血清, 并提交进行间接 ELISA。使用 2 μ g/ml 纯化的 E7 蛋白作为包被抗原。于 37 $^{\circ}$ C 在 PBS、0.1% tween 20、1% BSA 中饱和 1 小时后, 在饱和缓冲液中连续稀释血清(以 1/100 开始), 并于 37 $^{\circ}$ C 温育 90 分钟。在用 PBS、Tween 20 0.1%清洗后, 使用生物素化山羊抗小鼠 Ig (1/5000)或山羊抗小鼠 Ig 亚型(合计为 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b)抗血清(1/5000)作为第二抗体, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 90 分钟后, 加入偶联过氧化物酶的链霉抗生物素蛋白, 使用 TMB

(四-甲基-联苯胺/过氧化物)作为底物。10 分钟后,用 H_2SO_4 0.5 M 终止反应,并检测 O.D.450。图 4 显示了用对照非 Tg 小鼠获得的结果,而图 5 显示了用 E7 Tg 小鼠获得的结果。

5 II.5 结论

在接受单独的 IL-18 的对照小鼠中,如所预期地一样未检测到 E7-特异性抗体。无论哪组,都未观察到总 Ig 有大的差别。加入 IL-18 倾向于改善 TH1 同种型谱,尤其是在以高剂量和疫苗组合时。

10 在 E7Tg 小鼠中,看起来 IL-18 剂量和针对 E7 的抗体水平之间存在负相关。加入 IL-18 对同种型谱无大影响。

II.6 总体结论

- IL-18 自身以剂量依赖方式作用于 TC1 肿瘤生长;
- 联合注射对对照小鼠和 E7Tg 小鼠的 TC1 肿瘤生长都有明显
15 益处,尤其是在高剂量 mIL-18 (100 μg)和 E7 + AS02B 接种组合时;
- IL-18 稍微影响接种诱导的抗体应答(对照小鼠的 TH1 同种型谱较好, E7Tg 小鼠的滴度较好)。

20 实施例 III

mIL18 与以 AS15 作为佐剂的 Her2/neu 疫苗组合对 TC1 Her2 治疗模型的作用

III.1. 实验设计

疫苗

25 Her-2/neu 疫苗是 ECD-PhD,含完整的胞外结构域(含氨基酸 1-645)和含磷酸化结构域的胞内结构域的免疫原性部分。该疫苗构建物公开于 WO00/44899,称为 dHER2。

通过将抗原稀释在水、蔗糖和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 的混合物中,使 dHER2 蛋白和 CpG 共同冻干。5 分钟后,加入 CpG ODN 7909,

获得含 625 µg/ml Her2neu、1250 µg/ml CpG、3.15%蔗糖和 5 mM PO₄ pH 7 的最终原液，然后冻干。最终原液按照 3 天的周期冻干。对于即时配制，将含 CpG 和抗原的冻干饼重悬浮在 625 µl 含 100 µg/ml MPL 和 DQ 的 AS01B 稀释液中。

5 用 50 µl 含 25 µg Her2/neu、50 µg CpG 和 5 µg MPL 和 DQ 的液体注射小鼠。

表达 HER-2/neu 的肿瘤模型

在这些实验中使用的肿瘤模型：用编码 HER-2/neu 的重组逆转录病毒通过逆转录病毒转导 TC1 细胞(Dr T. C. Wu John's Hopkins University Baltimore 提供)产生 TC1HER2。

10 分离、扩增各个克隆，通过流式细胞仪证实 HER2/neu 的稳定性和 MHC I 类表达。

小鼠组别：

在第 0 天使每组 5 只共 4 组的雌性 CB6F1 小鼠接受 2×10⁶ TC1Her2 cl8 细胞的皮下(SC)攻击，接着用以下任一组接种：

- 15 -组 1: PBS
- 组 2: 由第 7 日至第 27 日每日皮下(SC)注射 100 µg mIL18 (鼠)
- 组 3: 在第 7 日和第 14 日肌肉(IM)注射 25 µg dHER2 蛋白的 AS15 溶液
- 20 -组 4: 疫苗和 mIL-18 的组合。

II.2. 体内肿瘤生长和死亡率：

结果示于图 6 和表 2。

25 表 2: 在 TC1HER2 肿瘤攻击后 27 天保持无肿瘤的小鼠的百分率

PBS	0%
Mil18	20% (死亡率: 2/5)
dHER2/AS15	0%

dHER2/AS15 mIL18	60% (2/5 出现小肿瘤)
---------------------	-----------------

II.3 结论

与单独用疫苗组合物或 IL-18 的接种策略相比，基于使用配制在佐剂(AS15)中的重组纯化的 HER-2/neu 蛋白(dHER2)并联合重复注射鼠重组 IL-18 的疫苗策略确实对表达 HER2/neu 抗原的既有肿瘤产生改善结果。先前已经表明，基于使用配制在 AS15 佐剂中的重组 dHER 蛋白的接种非常有效地保护小鼠抗表达 HER2/neu 抗原的这些肿瘤细胞的攻击。该保护作用是 HER2/neu 抗原特异性的，并与诱导长期免疫记忆相关。在为既有肿瘤的更严格的该治疗模型，已经表明接种基本无效，对生长的肿瘤仅有有限的作用(在这些条件下没有小鼠完全排斥肿瘤)。但是，令人惊奇的是，当两种治疗相伴给予时，观察到协同作用，60%的小鼠保持完全无肿瘤，而 40%的小鼠仅出现小肿瘤。总之，如表 2 所示，联用 mIL-18 和疫苗有明显益处。这可能表示，疫苗诱导 HER2/neu 特异性 T 细胞应答和重复注射 IL-18 活化免疫系统实现肿瘤退化都是至关重要的。

实施例 IV

mIL18 与用??作为佐剂的 MAGE-3 疫苗组合对 TC1 Mage3 治疗模型的作用

III.1. 实验设计

疫苗

通过编码 Mage3 的 DNA 质粒(PcDNA3 Mage3)的经典转染遗传修饰 TC1 亲代细胞，由此产生表达 Mage3 肿瘤抗原的肿瘤模型(TC1Mage3)。该肿瘤模型通过用编码 Mage3 的 PcDNA3 转染亲代 TC1 细胞(由 John's Hopkins University, Baltimore 的 T. C. Wu 提供)产生。按照试剂盒供应商(Gibco BRL Life Technologies, 目录号 18324-012)的建议，使用 Lipofectamin 进行转染。

这些细胞是致瘤性的,用 2×10^6 TC1 Mage3 细胞攻击的小鼠 100% 出现肿瘤。

在第 0 天使每组 5 只共 4 组的雌性 CB6F1 小鼠接受 2×10^6 TC1Mage3 细胞的皮下(SC)攻击,接着用以下任一组接种:

- 5 -组 1: PBS
- 组 2: 由第 7 日至第 27 日每日皮下(SC)注射 $100 \mu\text{g}$ mIL18 (鼠)
- 组 3: 在第 7 日和第 14 日肌肉(IM)注射 $10 \mu\text{g}$ Mage3 蛋白的 AS15 溶液
- 组 4: 联用疫苗和 mIL-18。

- 10 评价 Mage3 的 AS15 溶液接种、IL-18 注射和联合治疗诱导肿瘤退化的能力。还检测了接种或/和 IL18 治疗对免疫参数的影响(淋巴细胞增殖、细胞因子产生……)。

图 1: IL-18 多肽

图 1A: 人 IL-18 多肽序列

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1           5           10          15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
          20           25           30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
          35           40           45
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
          50           55           60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
65           70           75           80
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
          85           90           95
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
          100          105          110
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
          115          120          125
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
          130          135          140
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
145           150           155

```

图 1B：鼠 IL-18 多肽序列

```

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1           5           10           15
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
          20           25           30
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
          35           40           45
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
          50           55           60
Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65           70           75           80
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
          85           90           95
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
          100          105          110
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
          115          120          125
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
          130          135          140
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145           150           155

```

图 2：对照非 Tg 小鼠的体内肿瘤生长

图 2A： IL-18 1 μ g +用 E7 + AS02 接种

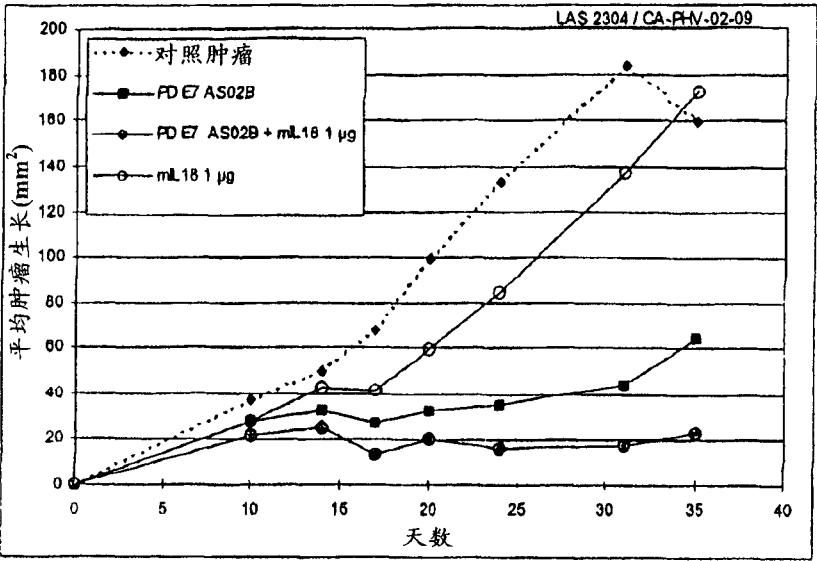


图 2B： IL-18 100 μ g +用 E7 + AS02 接种

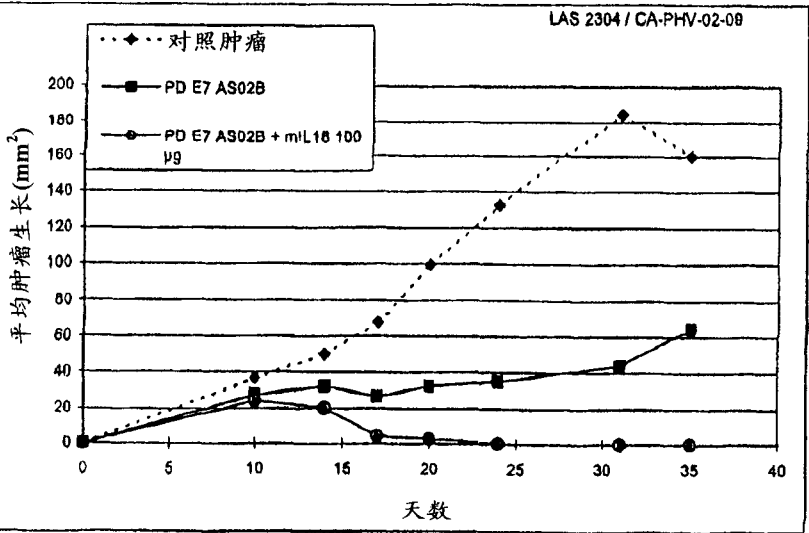


图 3： E7 Tg 小鼠的体内肿瘤生长

图 3A： IL-18 1 μ g +用 E7 + AS02 接种

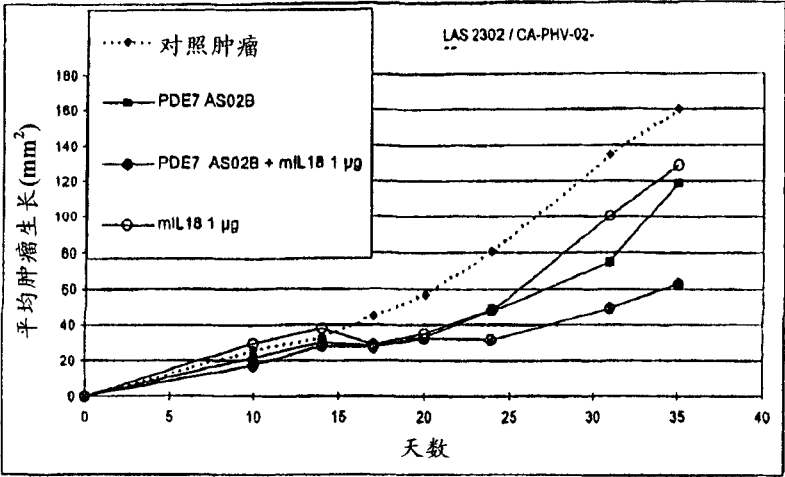


图 3B： IL-18 100 μ g +用 E7 + AS02 接种

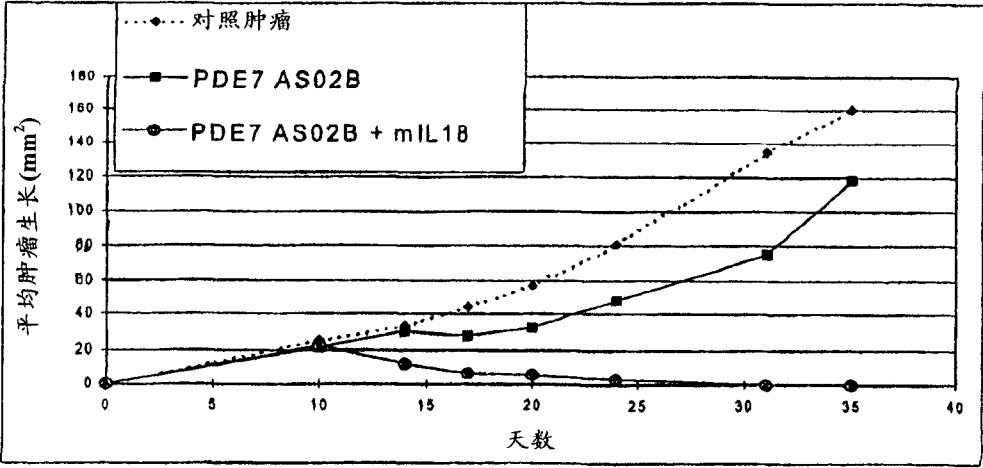


图 4：对照非 Tg 小鼠中的抗体应答和同种型谱

图 4A：抗体应答

总 Ig 应答(标准滴度表示为 EU/ml)

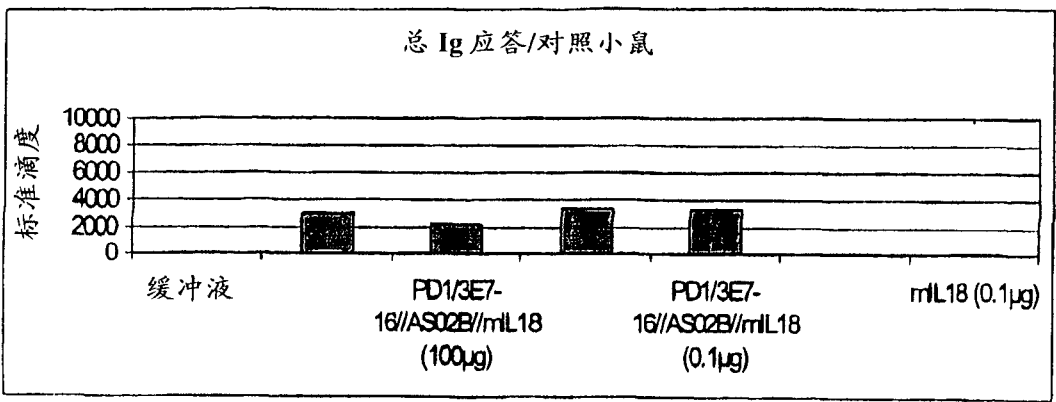


图 4B：同种型谱

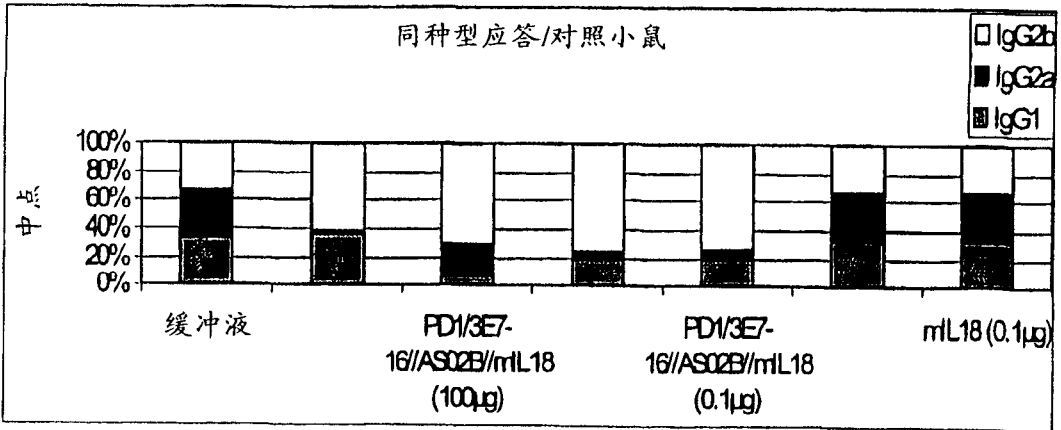


图 5： E7 Tg 小鼠中的抗体应答和同种型谱

图 5A： 抗体应答
总 Ig 应答(标准滴度表示为 EU/ml)

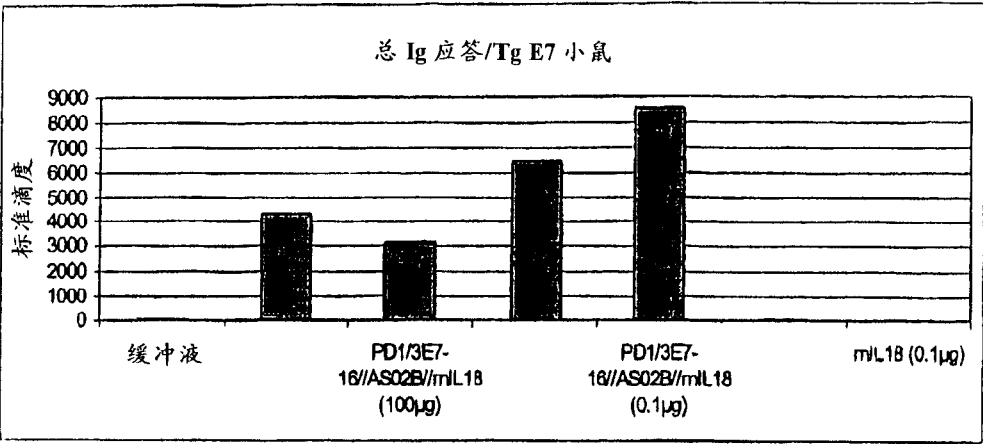


图 5B： 同种型谱

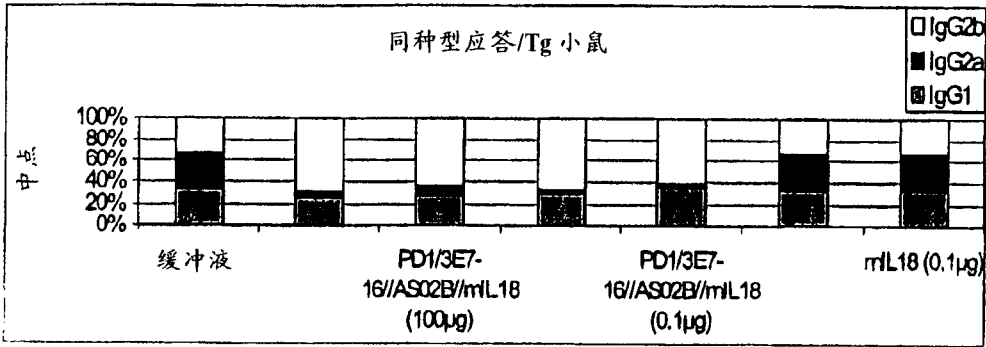


图 6： TC1 Her2 治疗模型的体内肿瘤生长

