

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/245

A61K 39/39



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 99804331.1

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1224422C

[22] 申请日 1999.2.10 [21] 申请号 99804331.1

[30] 优先权

[32] 1998.2.12 [33] US [31] 60/074,503

[86] 国际申请 PCT/US1999/002923 1999.2.10

[87] 国际公布 WO1999/040938 英 1999.8.19

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.22

[71] 专利权人 惠氏控股有限公司

地址 美国新西州

[72] 发明人 E·M·米什金

J·H·埃尔德里奇

审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 含有白细胞介素 IL-12 和单纯疱疹病毒抗原的疫苗

[57] 摘要

本发明涉及含有抗原，(例如单纯疱疹病毒抗原)和白细胞介素 IL-12 混合物的疫苗组合物，该疫苗组合物可吸附于矿物悬液。这些疫苗组合物调节对抗原的保护性免疫应答。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种疫苗组合物的用途，所述疫苗组合物包含选自单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D，单纯疱疹病毒 II 型的糖蛋白 D，和其组合的单纯疱疹病毒抗原，辅
5 佐剂量的白细胞介素 IL-12 和明矾的水悬浮液的混合物，其特征在于，该疫苗组合物用于制备药物，以诱导对单纯疱疹病毒抗原免疫应答。
2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，该组合物还含有生理学上可接受的载体。
3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于：白细胞介素 IL-12 吸附于明
10 矾的水悬浮液。
4. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于：白细胞介素 IL-12 是人白细胞介素 IL-12。
5. 如权利要求 3 所述的用途，其特征在于：明矾是氢氧化铝或磷酸铝。
6. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于：白细胞介素-12 的辅佐剂量
15 是 1 纳克到 20 毫克。
7. 一种免疫原性组合物，其特征在于：它包括选自单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D，单纯疱疹病毒 II 型的糖蛋白 D，和其组合的单纯疱疹病毒抗原，辅佐剂量的白细胞介素 IL-12 和明矾的水悬浮液的混合物。
8. 如权利要求 7 所述的免疫原性组合物，其特征在于，该组合物还含有生
20 理学上可接受的载体。
9. 如权利要求 7 所述的免疫原性组合物，其特征在于：白细胞介素 IL-12 吸附于明矾的水悬浮液。
10. 如权利要求 7 所述的免疫原性组合物，其特征在于：白细胞介素 IL-12 是人白细胞介素 IL-12。
- 25 11. 如权利要求 9 所述的免疫原性组合物，其特征在于：明矾是氢氧化铝或磷酸铝。
12. 如权利要求 7 所述的免疫原性组合物，其特征在于：白细胞介素-12 的辅佐剂量是 1 纳克到 20 毫克。
13. 如权利要求 7 所述的免疫原性组合物，其特征在于，所述免疫原性组合物
30 是疫苗组合物。

14. 如权利要求 13 所述的免疫原性组合物, 其特征在于: 白细胞介素 IL-12 吸附于明矾的水悬浮液。

15. 如权利要求 13 所述的免疫原性组合物, 其特征在于: 白细胞介素 IL-12 是人白细胞介素 IL-12。

5 16. 如权利要求 14 所述的免疫原性组合物, 其特征在于: 明矾是氢氧化铝或磷酸铝。

17. 如权利要求 13 所述的免疫原性组合物, 其特征在于: 白细胞介素-12 的辅佐剂量是 1 纳克到 20 毫克。

含有白细胞介素 IL-12 和单纯疱疹病毒抗原的疫苗

发明背景

免疫系统采用许多机制来攻击病原体；然而，并不是所有这些机制在免疫接种后均必定被激活。接种疫苗诱导的保护性免疫力依赖于疫苗诱导恰当的免疫应答的能力来抵抗或消灭病原体。根据病原体，这可能需要细胞介导的免疫应答和/或体液免疫应答。

辅助性 T 细胞在免疫应答中作用的最近范例是，它们可以根据它们产生的细胞因子分成细胞亚群，而且在这些细胞亚群中观察到的独特性细胞因子分泌决定了它们的功能。此 T 细胞模型包括两个主要亚群：产生 IL-2 和干扰素 γ (IFN- γ)的 TH-1 细胞，它同时增强细胞和体液免疫应答；产生 IL-4、IL-5 和 IL-10 的 TH-2 细胞，它增强体液免疫应答。(Mosmann 等，免疫学杂志。126: 2348(1986))。通常理想的是增强抗原的免疫原性以在被接种的生物体内获得更强的免疫应答，并增强宿主对抗原物质的抵抗力。一类和被接种的抗原一起施用，能增强抗原的免疫原性的物质称为佐剂。例如，已证明某些淋巴因子有佐剂活性，能增强对抗原的免疫应答(Nencioni, 等，免疫学杂志。139:800-804(1987);EP285441 授予 Howard 等)。

发明简述

本发明涉及疫苗组合物，它包括单纯疱疹病毒糖蛋白 D，白细胞介素 IL-12 和矿物悬液的混合物。IL-12 可吸附于矿物悬液或简单的与其混合。在本发明的具体实施例中，IL-12 吸附于例如明矾（例如，氢氧化铝或磷酸铝）的矿物悬液，该矿物悬液是水悬液。在一具体实施例中，IL-12 是人 IL-12。本发明也涉及进一步含有生理学上可接受的载体的疫苗组合物。本发明还涉及包括单纯疱疹病毒糖蛋白 D、佐剂剂量的白细胞介素-12、矿物悬液的混合物，以及可任选的含有生理学上可接受的载体的免疫原性组合物。

本发明的组合物调节对抗原的保护性免疫应答；即，该疫苗组合物能够在量和质上促进接种疫苗宿主的抗体应答，在量上增加细胞介导的免疫力，提供对病原体的保护性免疫应答。在本发明的一个具体实施例中，抗原是单纯疱疹病毒(HSV) 抗原，例如单纯疱疹病毒 I 型和/或 II 型的衣壳糖蛋白 D (gD)。

本发明还涉及制备含有与矿物悬液混合的 HSV gD 和 IL-12 的疫苗组合

物的方法。特别是，IL-12 吸附于矿物悬液。本发明还涉及诱导或增强被免疫者保护性免疫应答的体液和/或细胞介导的免疫力，包括对脊椎动物宿主施用有效量的疫苗组合物，该组合物包含以生理学上可接受的溶液配制的 HSV gD、IL-12 和矿物悬液的混合物。特别是，IL-12 吸附于矿物悬液。

5 发明详述

糖蛋白 D (gD) 是单纯疱疹病毒 (HSV) I 型和 II 型的包膜糖蛋白。已证明 HSV gD 是动物模型中抵御初次或复发性 HSV 感染保护性免疫力的强诱导物。(Mishkin 等, 疫苗 9:147-153(1991); Landolfi 等, 疫苗 11: 407-414(1993))。

10 IL-12 由各种各样的抗原递呈细胞产生，主要是由巨噬细胞和单核细胞产生。它是诱导原初 T 细胞成为 TH-1 细胞的关键要素。IL-12 的产生或对其反应的能力在保护性 TH-1 类应答的发展中证明是关键性的，例如，在寄生虫感染中，最值得注意的利士曼病中就是如此 (Scott, 等, 美国专利号 No. 5, 571, 515)。IL-12 的作用由 NK 细胞和辅助性 T 细胞产生的 IFN- γ 所介导。
15 IFN- γ 则是诱导抗 T 依赖性蛋白抗原的 IgG2a 抗体 (Finkelman 和 Holmes, 免疫学年度综述, 8: 303-33(1990)) 和抗 T 非依赖性抗原的 IgG3 应答 (Snapper 等, 实验医学杂志, 175: 1367-1371(1992))。白细胞介素-12 (IL-12), 原称为自然杀伤细胞刺激因子, 是一种异二聚体细胞因子 (Kobayashi 等, J. Exp. Med. 170:827(1989))。IL-12 蛋白在重组宿主细胞中的表达和分离在国际专利申请 W090/05147 (1990 年 5 月 17 日公开) 中有所描述。

本文所描述的研究是关于 IL-12 在单纯疱疹病毒 (HSV) 疫苗中作为佐剂的应用。因此, 本发明涉及含有 HSV gD、IL-12 和矿物悬液的混合物的疫苗组合物。在本发明的具体实施例中, IL-12 吸附于例如明矾的矿物悬液 (例如, 氢氧化铝或磷酸铝)。这些疫苗组合物调节对 HSV 的保护性免疫应答;
25 即, 该疫苗组合物能诱导被接种宿主产生细胞介导的免疫力, 以提供对病原性抗原的保护性免疫应答。

IL-12 可从数种适当的来源获得。它可通过重组 DNA 工艺学生产; 例如, 将编码人 IL-12 的基因在宿主系统中克隆并表达, 使能大量生产纯化的人 IL-12。在本发明中同样有用的是 IL-12 的生物学活性亚基或片段。另外, 某些 T
30 淋巴细胞系产生高水平的 IL-12, 从而提供了易于得到的来源。重组人 IL-12 和小鼠 IL-12 的商品来源包括 Genetics Institute, Inc. (Cambridge,

MA)。

本发明的抗原，例如，HSV 抗原，可用于在脊椎动物如哺乳动物宿主中诱导对该抗原的免疫应答。例如，该抗原可以是 HSV gD 蛋白质抗原或其保留了有刺激免疫应答能力的部分。

5 本发明的方法包括对哺乳动物，特别是人或其它灵长类，施用免疫有效剂量的疫苗组合物，该疫苗组合物含有抗原，例如 HSV gD 抗原，和辅佐剂量的 IL-12 以及矿物悬液的混合物。特别是，IL-12 吸附于矿物悬液。在本文中所用的，IL-12 的“辅佐剂量”是指从 1 纳克到大约 20 毫克的剂量，更具体的说，从 100 纳克到大约 5 毫克。本文中所用的，疫苗组合物的“免疫有效”剂量是指适合诱导免疫应答的剂量。IL-12 和抗原的具体剂量由待治疗的哺乳动物的年龄、体重和医学状况所决定，同时还由施药方法所决定。本领域熟练的技术人员很容易确定合适的剂量。该疫苗组合物可任选的配制在药

10 物学或生理学上可接受的载体，例如生理盐水、磷酸缓冲盐或多元醇，（例如甘油或丙烯醇）中施药。也可加入少量去污剂以增强疫苗稳定性。

15 该疫苗组合物可任选的含有另外的佐剂，例如植物油或其乳剂，表面活性物质，例如：十六烷基胺，十八烷基胺，十八烷基胺，溶血卵磷脂，二甲基-二(十八烷基溴化铵)，N，N-双十八烷基-N'-N' 双(2-羟乙基-丙烷 二胺)，羟甲基十六烷基甘油，以及复合多元醇；聚胺，例如：吡喃，硫酸葡聚糖，多聚 IC，聚羧乙烯；肽，例如：胞壁酰二肽，二甲基甘氨酸，促吞噬肽，

20 免疫刺激复合物，油乳剂；脂多糖，例如：MPL®(3-O-去乙酰基-磷酸脂 A；RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana)和矿物凝胶。也可将本发明的抗原掺入脂质体，共轭物 (cochleates)，可生物降解多聚物例如聚丙交酯，聚乙交酯和聚丙交酯-共-乙交酯，或 ISCOMS(免疫刺激复合物)中，以及还可使用添加的活性成分。本发明的抗原也可和细菌毒素及其减毒

25 衍生物联用。本发明的抗原也可和其它的淋巴因子，包括，但不限于，白细胞介素-2，IFN- γ 和 GM-CSF 联用。

疫苗可通过多种途径施用给人或动物，包括但不限于，肠胃外、动脉内、真皮内、透皮(例如通过使用缓释多聚物)，肌肉内、腹腔内、静脉内、皮下、口腔或鼻内施药途径。在这些疫苗中使用的抗原量，视抗原的特性而不同。

30 为适合本发明疫苗，需要对采用传统载体抗原所确定的剂量范围进行判定和操作，这正好在本领域熟练技术人员的能力内。本发明的疫苗计划用于治疗

未成年和成年温血动物，特别是人。通常，抗原和 IL-12/铝联合将同时施用。

IL-12 的佐剂作用具有许多重要意义。IL-12 的佐剂活性能增加免疫接种生物体针对抗原产生的保护性抗体的浓度。因此，有效的（亦即，保护性的）接种可用比通常所需更少量的抗原而达到。抗原所需量的减少可以使得制备困难且昂贵的抗原被更广泛的使用。另外，IL-12 用作佐剂能增强免疫原性微弱或免疫原性贫乏的抗原诱导免疫应答的能力。当抗原在有效免疫通常所要求的浓度是有毒的情况下，它可提供更安全的免疫接种。通过减少抗原量，毒性反应的危险也降低了。

通常，疫苗接种方案要求在几星期或几个月的时间内施用抗原，以激发“保护性”免疫应答。保护性免疫应答是足以保护被免疫生物体抵抗疫苗针对的一种或多种特定病原体所致疾病的免疫应答。IL-12，当和抗原，（例如 HSV 抗原）并和矿物悬液（例如，铝）混合或吸附于其上时一起施用时，能加速保护性免疫应答的产生。这能减少接种方案起效的时间过程。在某些例子中，单剂即能产生保护性应答。本发明的疫苗组合物在治疗上也有用，可减少已感染 HSV 个体的症状发作次数和严重程度。

作为本文所述工作的结果，联合施用 HSV 亚基疫苗和吸附于铝悬液的 IL-12 已显示出能诱导压倒性的 TH-1 相关应答；这是 gD 亚基疫苗免疫诱导的一种新模式。如本文进一步所述，在用可溶性和磷酸铝吸附 gD 免疫的临床前（动物）模型中测定了能发挥作用的 IL-12 剂量范围。本文所述的结果也揭示了用细胞因子/糖蛋白联合或不联合铝免疫，可诱导 TH-1 相关抗体。疫苗和 IL-12/铝联合施用对亚基疫苗的免疫应答有佐剂作用，如用 ELISA 和病毒中和反应测定表明，抗-gD 抗体水平提高那样。

糖蛋白 D (gD) 是单纯疱疹病毒 I 和 II 型的一种包膜糖蛋白，已证明其为病毒感染性所需并且是体液以及细胞免疫应答的主要目标，可用作抵御人初次和复发性疱疹感染的主要候选疫苗。施用基于铝或其它目前可接受的人用免疫吸附剂配制的 gD 亚基疫苗在几项临床前研究中已显示能诱导 TH-2 辅助性 T 淋巴细胞激活占优势的免疫应答。然而，看来复发性疱疹疾病的终止和适当保护性免疫功能的建立需要诱导强 TH-1 应答。

本文所述工作的结果表明 IL-12 和可溶性的、吸附于 $AlPO_4$ 的 gD 联合施用可导致体液和细胞免疫应答量的增加，以及体液应答质的变化。这可由 IL

—12 存在时, 疫苗诱导了不同的 IgG 亚类分泌所证明。事实上, 对具有有效固定补体能力的 IgG2a 抗体的优先诱导, 是 TH—1 应答的一个特点。施用 IL—12 对免疫应答的免疫调节作用和 IL—4 (TH—2 相关) 相比, 在 IFN— γ (TH—1 相关) 分泌的比率和数量上发生的变化是明显的。

- 5 另外, 特别重要的是, 发现联合施用 IL—12 和可溶性亚基疫苗免疫的小鼠中诱导了抗原—特异性溶细胞活性。该应答模式提示 IL—12 的加入导致对 gD 亚基疫苗免疫应答特征上的基础性改变, 因为在前人研究中 gD 亚基疫苗很少 (如果有的话,) 显示过能诱导溶细胞活性。

- 10 用该新配方疫苗诱导的免疫应答谱和天然病毒感染诱导的紧密相关, 并和无疾病而血清反应阳性人体中观察到的免疫力模式相关。联系在一起, 这些结果提示 IL—12 介导的免疫调节在抗单纯疱疹病毒疾病的免疫治疗性和/或预防性干涉中为建立有效的免疫应答提供了明显有益的作用。

给出以下的实施例目的是阐明本发明, 但不能解释成限制本发明的范围。本文所引用的所有参考文献的内容在此纳入以备参考。

15

实施例

材料和方法

单纯疱疹病毒糖蛋白 D 的表达和纯化以及疫苗制备

- 20 单纯疱疹病毒糖蛋白 D (gD 疫苗) 的制备如 Landolfi 等 (Vaccine 11(4):407-414(1993)) 先前所述。

实验设计

- 25 雌性 Balb/C 小鼠被随机编入表 1 描述的组中 (N=10/组)。在第 0 和 21 日, 给动物股部肌肉内接种单独的或和不同剂量 IL—12 混合的上述 gD 疫苗。在免疫前和免疫后每隔 7 日小鼠分别取血。第 28 天和第 35 天杀死每组中的 5 只小鼠, 收集免疫脾细胞和阴道洗涤液。用酶联免疫试验 (EIA) 分析血清和阴道洗涤液中对 gD 抗原应答的 IgA 和 IgG 亚类抗体数量。功能性抗体活性用血清中和 HSV 感染的能力来评估。细胞介导活性用溶细胞 T 淋巴细胞试验、淋巴细胞增殖分析和细胞因子分泌模式来评估。

EIA 分析

- 30 各血清的 HSV gD 特异性抗体应答用 York 等 (Vaccine 13:1706-1712(1995)) 所述的 EIA 定量测定。

简单来说,用纯化的 gD 以 20 纳克/孔包被 96 孔培养板 1 小时。用 0.01M PBS 和 0.1% Tween-20 溶液将板洗涤 3 次,然后用 PBS 和 1%BSA 溶液封闭。室温下将板培养 1 小时,然后用 0.01M PBS 和 0.1% Tween-20 洗涤 3 次。将以 0.05M Tris-缓冲盐水配制的 2 倍系列稀释度的血清加入双份孔中,培养 1 小时。用 0.01M PBS 和 0.1% Tween-20 洗涤各孔,然后加入第二抗体。第二抗体由辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG (1: 2000 稀释于 TBS 和 0.1% Tween-20), 和生物素化的山羊抗小鼠 IgG1 和 IgG2a (400 纳克/毫升以 TBS 和 0.1% Tween-20 配制) 组成。50 纳克/毫升浓度的亲和素-HRP 被加入 IgG1 和 IgG2a 检测孔中。1 小时培养后,洗涤各孔,然后加入 ABTS (2,2'-连氮-1,3-二乙基苯并噻唑啉)-6 磺酸二铵盐) 底物。产生的颜色在 405 纳米处定量测定 OD 值,滴度用终点外推法确定。

血清中和

各血清用前述 (Mishkin 等, Vaccine 9:147-153(1991)) 的微量中和试验评估 HSV 中和滴度。

简单的说,将 Vero 细胞在 96 孔平底培养板中培养至铺满。测试血清在 56 °C 加热灭活 30 分钟,然后以培养液作 2 倍系列稀释,体积为 0.1 毫升。加入等体积的 HSV1 或 HSV2 (含大约 100 噬斑形成单位(PFU)的病毒)。加入 10%(v/v) 豚鼠补体进行补体依赖性试验。将病毒/血清/(补体)混合物在 37°C (5%CO₂) 温和振荡培养 1 小时,然后直接加到 Vero 细胞单层上。每次试验均包括病毒 (即,无血清的培养液), 培养液 (即,未感染细胞), 和补体 (即,无血清或补体的培养液) 对照。37°C 培养后,细胞用 1%的甲基纤维素覆盖。37°C (5%CO₂) 培养平板,直至病毒对照孔中大约可数到 50 个噬斑 (亦即,48-72 小时)。计数噬斑,滴度定义为产生 50%以上噬斑减少的最大血清稀释度的倒数。

淋巴细胞增殖应答

HSV-特异性淋巴细胞增殖试验的方法先前已有详述 (Ishizaka 等, 病毒免疫学 4:187-193(1991))。收集小鼠脾细胞,合并于补充的 RPMI (Roswell Park Memorial Institute 培养基号 1640,用于淋巴细胞培养系统的常用组织培养基) 中。然后将 0.1 毫升细胞以 2×10^5 活细胞/孔置于 96 孔平底板中。对采用的每一种体外刺激抗原均作 5 个重复孔。这些孔包括培养液、Vero 细

胞裂解液、HSV1 (10^5 热灭活的噬斑形成单位/孔)、HSV2 (10^5 热灭活噬斑形成单位/孔)、和纯化的杆状病毒表达的 HSV2 重组糖蛋白 D (bgD2) (20 纳克/孔)。这些抗原各孔加入 0.1 毫升体积。

然后将培养板 37°C ($5\%\text{CO}_2$) 培养 5 天。收集前 5 到 6 小时, 各孔加入 25 5 微升 $0.5\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -胸苷的 25mlRPMI 液。将细胞用细胞收集器收集到玻璃纤维过滤网上, 用 β -平板计数器测定掺入的活性。

细胞毒 T 细胞活性

如前所述 (York 等, 1995) 脾细胞用于特异性 CTL 活性的二次刺激。在 10 本实验中, 免疫后 14 周收集脾细胞。制备脾细胞悬浮液, 然后在室温下用 $0.17\%\text{NH}_4\text{Cl}$ (5ml/脾脏) 处理 4 分钟, 渗透法除去红细胞。然后洗涤细胞, 计数并用台盼蓝染色排除法测定存活率。

采用原初动物的脾细胞作为抗原递呈细胞 (APC)。这些细胞受到 γ -辐射 (2000R) 然后用 HSV1 (NS 株) 和 HSV2 (186 株) 感染, 感染复数 (MOI) 15 为 5, 37°C ($5\%\text{CO}_2$) 涡旋感染 1 小时。洗涤细胞 1 次, 以 5×10^6 细胞/毫升重悬浮, 再培养 4 小时。然后暴露于短波 UV 辐射 15 分钟灭活病毒。将 5 毫升培养液中的 APC (1 毫升含 5×10^6 细胞) 加至 2×10^7 效应细胞/孔。培养物再培养 5 天, 然后用 ^{51}Cr -释放试验测定溶细胞活性。

体外再次刺激后, 从培养板上收集效应细胞, 用台盼蓝排除法评估存活 20 率。然后用培养液调节细胞浓度, 分成 200 微升的三等份, 以得到所要的效: 靶 (E: T) 比率。然后进行双倍稀释。

收集适宜数量的 A20 靶细胞用于试验。这些细胞在初始 1 小时吸收阶段用 HSV1 和 HSV2 以 10 MOI 感染, 洗涤并再培养 3 小时。用作对照的未感染 A20 细胞用相同方法作模拟感染。3 小时培养后, 沉淀 5×10^6 到 1×10^7 的 A20 靶细 25 胞并重悬浮于加有 $200\mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ 的 0.2 毫升胎牛血清中, 培养 1 小时 (37°C , $5\%\text{CO}_2$)。用 10mlRPMI 洗涤细胞两次, 在 1ml 培养液中重悬浮, 稀释得到 E: T 比率适宜的每份 100 微升的 (混合细胞)。

培养效应细胞和标记靶细胞 (37°C , $5\%\text{CO}_2$) 4 小时, 此时, 从每孔小心收集 $100\mu\text{l}$ 上清液, 用 γ 计数器测定 γ 放射量。用 2%Tween-20 处理过的标记靶 30 细胞的三重复孔确定总释放。自发释放用仅在培养液中培养 4 小时的标记靶细胞三重复孔计数。特异释放百分数用以下公式计算:

$$\% \text{特异释放} = \frac{(CPM_{\text{实验}}) - (CPM_{\text{自发}})}{(CPM_{\text{总}}) - (CPM_{\text{自发}})} \times 100$$

5

如先前报告 (York 等, 1995) 采用酶联免疫斑点试验 (ELISPOT) 来直接计数分泌 IL-4 和 IFN- γ 的细胞。在无菌条件下, Millipore HA 硝酸纤维素 96 孔微量滴定板用以无菌 PBS 配制的 5 微克/毫升 (抗 IFN- γ) 或 2 微克/毫升 (抗 IL-4) 浓度的 100 μ l 体积抗细胞因子 MoAb 包被。室温培养平板过夜, 然后用无菌水洗涤 4 次, PBS 和 0.05% Tween-20 洗涤 3 次。接着用 0.2ml RPMI 1640 和 1% BSA 封闭各孔, 在 5%CO₂ 中 (37 $^{\circ}$ C) 培养 10 分钟。此时, 制备所需浓度的细胞悬液。

分别用 PBS 和含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次除去封闭溶液。以预先确定的浓度和稀释度 (即, 1 $\times$ 10⁶/孔) 将细胞一式三份以 0.1ml 体积接种入孔中。培养板在 5%CO₂ (37 $^{\circ}$ C) 培养箱中培养 20 小时。每次用 PBS, 然后是 PBS 和 0.05% Tween-20 洗涤 3 次, 除去细胞。生物素化的 MoAb 用 PBS 和 0.05% Tween-20+1% FB 配制成最终浓度为 0.25 μ g/ml 的抗 IFN- γ 或 4 μ g/ml 的抗 IL-4, 在孔中加入 0.1ml 抗体溶液。培养板 4 $^{\circ}$ C 湿室中培养过夜。

用 PBS 和 0.05% Tween-20 洗涤培养板 3 次, 然后加入用 PBS 和 0.05% Tween-20+1% FBS 1: 400 稀释的过氧化物酶偶联山羊抗生物素抗体, 每孔 0.1ml, 使斑点显影。

要使斑点可见, 用 PBS 洗涤培养板 3 次, 然后加入 0.2ml 底物。将 10 毫克 3-氨基-9-乙基吡唑溶于一玻璃试管中的 1ml 二甲基甲酰胺, 然后加入 30ml 0.1M 醋酸钠缓冲液制备该底物液。即将使用前, 在底物溶液中加入 15 微升 H₂O₂。室温下显影斑点 5-15 分钟, 然后加入自来水停止显影。用解剖显微镜计数斑点。

结果

EIA 反应

抗 gD IgG 类和亚类的应答总结于表 1。滴度低于 50 的 (第一个血清稀释度) 被赋值为 25。在第 7 日, 只有用活的 HSV1 诱导的小鼠显示出显著的总 IgG 滴度 (表 1a)。然而, 接受可溶性 gD 和 IL-12 的动物血清中记录到可测量

水平的活性。在第 28 天时，接受可溶性亚基疫苗和所有剂量 IL-12 的小鼠和单用可溶性疫苗相比，可见应答增强模式。在此，施用了可溶性 gD 和 1.0 微克 IL-12 的小鼠血清应答最大。在接种 AlPO₄-吸附糖蛋白的小鼠中，增强的 IgG EIA 应答仅在用 AlPO₄ 和 gD 加 0.2 微克 IL-12 免疫的动物中观察到，
5 免疫导致大约两倍的增加。第 35 日，可见对可溶性 gD(无 AlPO₄)的总 IgG 抗体应答呈剂量依赖性的 IL-12 佐剂效果。联合施用 0.2、1.0 和 5.0 微克的 IL-12 与 gD 分别导致应答增加 5-，24-和 215-倍。相反的，当 IL-12 加到 AlPO₄ 吸附的 gD 时，最大的应答发生在用 0.2 微克 IL-12 时。

除了 HSV1-感染动物组，IgG1 应答（表 1b）在任何处理组中第 7 日都未
10 见到，而在 HSV1 处理组中见到低水平的活性。滴度低于 50 的（第一个血清稀释度）被指定为 25。在第 28 日，用 AlPO₄ 吸附，但没有 IL-12 的糖蛋白免疫的小鼠血清可见最大的抗 gD IgG1 应答。事实上，在 AlPO₄ 吸附的疫苗中加入 IL-12 导致该应答明显可见且呈剂量相关性降低。相反，IL-12 和可溶性 gD 联合施用和单用亚基疫苗比较，导致 IgG1 应答增强。然而，无 IL-12 配
15 方疫苗产生的活性水平和单用 AlPO₄ 吸附的亚基疫苗观察到的同样大。第 35 日，在所有组中 IgG1 滴度减弱。此时，接受可溶性 gD 和 IL-12 的小鼠的 IgG1 滴度，达到了那些用 AlPO₄ 吸附的亚基疫苗免疫后的小鼠所见的可比水平。

抗 gD IgG2a 应答（表 1c）第 7 日时在 HSV1 引发的动物中是明显的。滴度低于 50 的（第一血清稀释度）被指定为 25。此时也注意到用可溶性 gD 和
20 0.2 或 5.0 微克 IL-12 引起一中等程度应答。第 28 日，施用 IL-12 导致了 IgG2a 滴度显著增加。这在接受可溶性 gD 的动物中特别明显，比这些动物中观察到的滴度增加 1000 倍以上。IL-12 和 AlPO₄ 吸附的疫苗的联合施用也导致 gD 特异性 IgG2a 抗体的显著增加。在这种情况下，当用 0.2 微克 IL-12 时，IgG2a 抗体应答最大，提示铝结合的 IL-12 显著增强了生物活性。第 35
25 日，注意到总 IgG 应答模式和 IgG2a 应答模式紧密并行，表明 IL-12 和亚基 gD 疫苗联合施用导致显著佐剂效应，以及诱导了高滴度的 IgG2a 抗体。

表 1a: IL-12 对 HSV-2 gD 免疫的血浆 IgG 抗体应答的增强

免疫方案	血浆抗-gD IgG 滴度					
	第 7 日		第 28 日		第 35 日	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
gD	25	0	29,159	10,420	9,063	2,993
gD+0.2 μ gIL-12	63	21	146,651	39,157	49,813	15,456
gD+1.0 μ gIL-12	34	7	210,267	67,806	217,061	88,404
gD+5.0 μ gIL-12	71	36	131,628	51,401	1,949,697	1,845,964
gD/AlPO ₄	25	0	95,979	23,312	62,578	34,793
gD/AlPO ₄ +0.2 μ gIL-12	25	0	212,949	44,935	179,917	116,925
gD/AlPO ₄ +1.0 μ gIL-12	25	0	82,313	52,122	69,958	47,544
gD/AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	25	0	32,182	29,807	28,673	24,310
AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	25	0	25	0	25	0
HSV1(1x10 ₆ pfu)	783	515	1,824	514	4,446	1,807

表 1b: IL-12 对 HSV-2 gD 免疫的血浆 IgG1 抗体应答的增强

免疫方案	血浆抗-gD IgG1 滴度					
	第 7 日		第 28 日		第 35 日	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
gD	25	0	14,323	4,939	4,421	1,019
gD+0.2 μ gIL-12	25	0	40,246	13,626	22,464	4,427
gD+1.0 μ gIL-12	25	0	59,536	25,196	21,592	5,511
gD+5.0 μ gIL-12	25	0	17,637	8,137	5,512	3,023
gD/AlPO ₄	25	0	82,882	57,045	17,232	5,177
gD/AlPO ₄ +0.2 μ gIL-12	25	0	28,247	4,147	10,421	4,726
gD/AlPO ₄ +1.0 μ gIL-12	25	0	1,604	734	5,426	3,588
gD/AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	25	0	1,345	1,206	3,957	24,310
AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	25	0	25	0	25	0
HSV1(1x10 ₆ pfu)	43	17	180	53	209	1,807

表 1c: IL-12 对 HSV-2 gD 免疫的血浆 IgG2a 抗体应答的增强

免疫方案	血浆抗-gD IgG2a 滴度					
	第 7 日		第 28 日		第 35 日	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
gD	25	0	25	0	152	127
gD+0.2 μ gIL-12	32	7	36,807	12,926	6,009	1,846
gD+1.0 μ gIL-12	25	0	49,034	18,983	33,547	11,290
gD+5.0 μ gIL-12	36	11	39,943	22,448	67,681	53,732
gD/AlPO ₄	25	0	522	330	30	5
gD/AlPO ₄ +0.2 μ gIL-12	25	0	48,321	19,366	47,153	40,467
gD/AlPO ₄ +1.0 μ gIL-12	25	0	22,400	12,011	7,715	3,418
gD/AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	25	0	5,801	5,288	2,669	1,195
AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	25	0	25	0	25	0
HSV1 (1x10 ₆ pfu)	746	603	659	227	668	283

5 分泌性抗体应答

用 IL-12 配制的 gD 免疫后,测定了阴道分泌物的抗体活性。在一些处理组中观察到抗-gD IgA (表 2a)。最大滴度发生在接种可溶性 gD 和 1.0 微克 IL-12 的小鼠分泌物中。该组在第 28 日也显示出抗 gD IgG 的最高滴度 (表 2b)。在施用 AlPO₄ 吸附的 gD 和 0.2 微克 IL-12 的小鼠中见到相对强的 IgG 滴度。滴度低于 5 的 (第一个血清稀释度) 被指定为 3。第 35 日,任何一组的阴道冲洗液中都没有显著的 gD 特异性 IgA。然而,用可溶性或 AlPO₄ 吸附的 gD 加上 5.0 微克 IL-12 免疫的动物阴道洗液显示出显著的抗原特异性 IgG 滴度。

表 2a: 对配制有 IL-12 的 gD 的粘膜抗 HSV-2 IgA 应答

免疫方案	阴道洗液抗 gD IgA 滴度			
	第 28 日		第 35 日	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
gD	6.2	3.2	3.0	0
gD+0.2 μ gIL-12	9.4	7.7	3.0	0
gD+1.0 μ gIL-12	25.0	7.7	4.0	1.0
gD+5.0 μ gIL-12	3.0	0	4.0	1.0
gD/AlPO ₄	9.8	6.8	3.2	0.2
gD/AlPO ₄ +0.2 μ gIL-12	3.0	0	3.0	0
gD/AlPO ₄ +1.0 μ gIL-12	3.0	0	3.0	0
gD/AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	3.0	0	3.0	0
AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	6.2	3.2	3.0	0
HSV1(1x10 ₆ pfu)	4.6	1.6	3.0	0

表 2b: 对配制有 IL-12 的 gD 的粘膜抗 HSV-2 IgG 应答

免疫方案	阴道洗液抗 gD IgG 滴度			
	第 28 日		第 35 日	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
gD	12.2	9.2	5.6	2.6
gD+0.2 μ gIL-12	7.4	3.0	5.0	0.9
gD+1.0 μ gIL-12	521.2	134.9	8.6	3.2
gD+5.0 μ gIL-12	15.0	12.0	61.6	28.5
gD/AlPO ₄	13.2	3.6	18.6	3.4
gD/AlPO ₄ +0.2 μ gIL-12	165.41	143.1	3.0	0
gD/AlPO ₄ +1.0 μ gIL-12	12.2	9.2	3.0	0
gD/AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	50.8	6.2	123.4	59.0
AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	3.0	0	3.0	0
HSV1(1x10 ₆ pfu)	3.0	0	3.0	0

血清 HSV-2 中和滴度

补体增强的中和性抗体滴度（表 3）在接受可溶性 gD 和 IL-12 的小鼠血清中呈剂量依赖性方式增加。这些滴度分别在该细胞因子水平为 0.2, 1.0 和 5.0 微克时呈 5-，15-，和 50-倍增加。滴度低于 10 的（第一个血清稀释度）
5 被指定为 5。就 ELISA 测定的抗 gD 应答而言，由铝吸附的 gD 诱导的最大病毒中和应答是用 0.2 微克 IL-12 诱导的。

表 3: IL-12 对 gD 免疫的血浆中和抗体应答的增强

免疫方案	血浆 HSV-2 中和滴度	
	平均值	标准偏差
gD	22. 5	11. 1
gD+0. 2μgIL-12	111. 2	29. 0
gD+1. 0μgIL-12	353. 4	116. 2
gD+5. 0μgIL-12	1, 125. 8	852. 4
gD/AlPO ₄	81. 0	40. 9
gD/AlPO ₄ +0. 2μgIL-12	294. 8	213. 7
gD/AlPO ₄ +1. 0μgIL-12	17. 9	7. 0
gD/AlPO ₄ +5. 0μgIL-12	8. 5	2. 2
AlPO ₄ +5. 0μgIL-12	5. 0	0
HSV1 (1x10 ₆ pfu)	100. 8	52. 2

10

淋巴细胞增殖反应

对回忆抗原的体外母细胞形成反应总结在表 4 中。回忆抗原是宿主在先前遇到过的抗原；在本例中，免疫小鼠的回忆抗原是 gD。使用关于 HSV-1 和
15 HSV-2 的该术语推测和病毒表达的 gD 有高度的交叉反应性。未观察到任何一组显示出对 Vero 细胞对照抗原的高水平非特异性作用。对 HSV-1 抗原的异源应答在用可溶性和 AlPO₄ 吸附的 gD 和 1.0 微克 IL-12 免疫的小鼠收获的细胞中最大。体外用 HSV2 和 gD2 抗原刺激也记录到相似模式的应答。有趣的是，

用 HSV-1 诱导的小鼠脾细胞在本实验中显示出对 HSV-2gD 的应答性。

表 4: gD/IL-12 淋巴细胞增殖反应

免疫方案	对体外刺激的刺激指数			
	Vero	HSV1	HSV2	gD2
gD	0.73	0.32	1.79	2.39
gD+0.2 μ gIL-12	1.77	1.31	11.54	6.14
gD+1.0 μ gIL-12	0.51	29.18	17.42	2.59
gD+5.0 μ gIL-12	0.60	3.78	7.97	1.58
gD/AlPO ₄	1.08	0.67	4.19	5.87
gD/AlPO ₄ +0.2 μ gIL-12	1.13	4.44	3.14	1.67
gD/AlPO ₄ +1.0 μ gIL-12	0.68	16.54	33.87	17.79
gD/AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	1.25	4.2	4.42	1.71
AlPO ₄ +5.0 μ gIL-12	0.91	1.64	1.96	2.28
HSV1 (1 $\times$ 10 ⁶ pfu)	0.94	2.71	9.15	1.36

细胞因子应答

- 5 评价了用 1.0 微克剂量 IL-12 (免疫) 的所选小鼠组的细胞因子分泌情况, 并总结于表 5。和单用可溶性 gD 或用 AlPO₄ 吸附的 gD 免疫组比较, 加入 IL-12 导致 IFN- γ 分泌比 IL-4 显著增加。

表 5: 细胞因子分泌情况

免疫方案	SFC/10 ⁶ 培养细胞		
	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
5 μ g gD	35	45	1.28
5 μ g gD+1 μ gIL-12	85	215	2.53
5 μ g gD/AlPO ₄	40	35	0.88
5 μ g gD/AlPO ₄ +1 μ gIL-12	60	185	3.08
AlPO ₄ +1 μ gIL-12	50	85	1.70
HSV1	495	545	1.10
原初	30	65	1.85

溶细胞活性

用 gD 加上 1.0 微克 IL-12, 或对照疫苗免疫动物的 CTL 应答总结于表 6。

- 5 E: T 比率在 25: 1 到 3: 1 范围时, HSV-1 诱导的小鼠产生相对均一的溶细胞活性。用可溶性 gD 加 1.0 微克 IL-12 免疫的小鼠获得的免疫细胞培养物中观察到可比较水平的杀伤。在其它疫苗组或对照组脾细胞中未见显著的溶细胞活性。

表 6: CTL 活性

免疫	以下 E: T 比率时的净细胞裂解			
	25: 1	12: 1	6: 1	3: 1
gD	4.9	-1.0	7.2	9.3
gD+1 μ gIL-12	29.3	7.6	23.6	18.1
gD/AlPO ₄	10.1	7.6	9.7	3.1
gD/AlPO ₄ +1 μ gIL-12	7.1	5.6	6.5	5.5
AlPO ₄ +1 μ gIL-12	15.1	-3.4	2.4	-4.7
HSV1	24.6	36.9	32.1	26.1
原初	-0.3	3.7	-	4.0

等效例

- 5 本领域中熟练技术人员使用常规实验方法将会认识, 或能够确定, 本文所述的本发明具体实施例的许多等效例。这些等效例应包括在本申请的权利要求中。