

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98808063. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/30 (2006.01)

C12N 15/48 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100379865C

[22] 申请日 1998.6.9 [21] 申请号 98808063. X

[30] 优先权

[32] 1997. 6. 9 [33] GB [31] 9711957. 2

[86] 国际申请 PCT/GB1998/001681 1998. 6. 9

[87] 国际公布 WO1998/056919 英 1998. 12. 17

[85] 进入国家阶段日期 2000. 2. 12

[73] 专利权人 奥克森治疗有限公司

地址 英国牛津郡

[72] 发明人 A·J·麦克迈克尔

A·V·S·希尔

S·C·吉尔伯特 J·施奈德尔

M·普勒班斯基 T·汉克

G·L·史密斯 T·布兰查德

[56] 参考文献

WO9626271A1 1996. 8. 29

审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 46 页 附图 13 页

[54] 发明名称

用于产生 CD8T 细胞免疫应答的试剂盒及其用途

[57] 摘要

公开了产生抗疟疾和其他抗原诸如病毒和肿瘤抗原的 CD8T 细胞免疫应答接种的新方法和试剂。也公开了新型的接种方案，该方案使用一种引发组合物和一种促进组合物，该促进组合物包括携带至少一个也存在于引发组合物中的 CD8T 细胞表位的非复制或复制受损伤的痘病毒载体。

1. 一种用于产生抗至少 1 种靶抗原的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答的试剂盒, 该试剂盒包括:

(i) 一种引发组合物, 该组合物包括 1 种或多种靶抗原的 CD8+ T 细胞表位的来源, 和药用可接受的载体; 以及

(ii) 一种促进组合物, 该组合物包括 1 种或多种靶抗原的 CD8+ T 细胞表位的来源, 包括至少 1 种与引发组合物的 CD8+ T 细胞表位相同的 CD8+ T 细胞表位, 其中 CD8+ T 细胞表位的来源是非复制或复制受损的重组痘病毒载体, 与药用可接受的载体一起使用;

条件是如果 (i) 中表位的来源是一种病毒载体, 在 (ii) 中的病毒载体则来源于不同的病毒。

2. 根据权利要求 1 的试剂盒, 其中在 (i) 中 CD8+ T 细胞表位的来源是非病毒载体或非复制或复制受损的病毒载体。

3. 根据权利要求 2 的试剂盒, 其中 (i) 中 CD8+ T 细胞表位的来源不是痘病毒载体。

4. 根据权利要求 3 的试剂盒, 其中在 (i) 中 CD8 +T 细胞表位的来源是 DNA 或 RNA。

5. 根据权利要求 4 的试剂盒, 其中在 (i) 中表位的来源是重组 DNA 质粒。

6. 根据权利要求 5 的试剂盒, 进一步包括作为 (i) 中佐剂的 GM-CSF。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的试剂盒, 其中在 (i) 中的 CD8+ T 细胞表位的来源编码或包括靶抗原。

8. 根据权利要求 4-6 中任一项的试剂盒, 其中在 (i) 中表位的来源编码单个 CD8+ T 细胞表位或 2 个或多个 CD8+ T 细胞表位的重组表位串。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项的试剂盒, 其中在 (i) 中表位的来源是包含 2 个或多个存在于重组的 CD8+ T 细胞表位串或靶抗原中的 CD8+ T 细胞表位的蛋白。

10. 根据权利要求 9 的试剂盒, 其中在 (i) 中 CD8+ T 细胞表位的来源是 Ty 病毒样颗粒。

11. 根据权利要求 1~3 中任一项的试剂盒, 其中 (i) 中的表位来源是重组腺病毒载体。

12. 根据权利要求 1~6 中任一项的试剂盒, 其中在 (ii) 中 CD8+ T 细胞表位的来源是重组痘苗病毒载体。

13. 根据权利要求 12 的试剂盒, 其中重组痘苗病毒载体是修饰过的 Ankara 病毒痘苗病毒株。

14. 根据权利要求 12 的试剂盒, 其中重组痘苗病毒载体是 NYVAC 株。

15. 根据权利要求 1~6 中任一项的试剂盒, 其中在 (ii) 中 CD8+ T 细胞表位的来源是选自金丝雀痘病毒或禽痘病毒和 ALVAC 的重组禽痘病毒载体。

16. 根据权利要求 1~6 中任一项的试剂盒, 其中靶抗原是病原体或肿瘤抗原。

17. 根据权利要求 16 的试剂盒, 其中靶抗原是恶性疟原虫抗原。

18. 根据权利要求 17 的试剂盒, 其中在 (i) 中或由 (i) 编码的 CD8+ T 细胞表位包括 1 种或多种疟疾表位, 所述表位选自表位 Ls8, Cp26, Ls6, Tr42/43, Tr39, Cp6, St8, Ls50, Pb9, Tr26, Ls53, Tr29, NANP, TRAP AM, Cp39, La72, ex23, CSP, BCG, 和 TT。

19. 根据权利要求 18 的试剂盒, 其中在 (i) 中的 CD8+ T 细胞表位包括表位 Ls8, Cp26, Ls6, Tr42/43, Tr39, Cp6, St8, Ls50, Pb9, Tr26, Ls53, Tr29, NANP, TRAP AM, Cp39, La72, ex23, CSP, BCG, 和 TT。

20. 根据权利要求 16 的试剂盒, 其中靶抗原是 HIV 抗原。

21. 根据权利要求 20 的试剂盒, 其中在 (i) 中或由 (i) 编码的 CD8+ T 细胞表位 1 种或多种 HIV 表位, 所述表位选自 YLKDQQLL, ERYLKDQQL, EITPIGLAP, PPIPVGEIY, GEIYKRWII, KRWIILGLNK, IILGLNKIVR, LGLNKIVRMY, YNLTMKCR, RGPGRFVTL, GRAFVTIGK, TPYDINQML, CTPYDINQM, RPQVPLRPMTY, QVPLRPMTYK, VPLRPMTY,

AVDLSHFLK, DLSHFLKEK, FLKEKGGL, ILKEPVHGV, ILKEPVHGVY, HPDIVIYQY, 和 VIYQYMDDL.

22. 根据权利要求 20 的试剂盒, 其中在 (i) 中或由 (i) 编码的 CD8+ T 细胞表位包括表位 YLKDQQLL, ERYLKDQQL, EITPIGLAP, PPIPVGEIY, GEIYKRWII, KRWIILGLNK, IILGLNKIVR, LGLNKIVRMY, YNLTMKCR, RGPGRAFVTI, GRAFVTIGK, TPYDINQML, CTPYDINQM, RPQVPLRPMTY, QVPLRPMTYK, VPLRPMTY, AVDLSHFLK, DLSHFLKEK, FLKEKGGL, ILKEPVHGV, ILKEPVHGVY, HPDIVIYQY, 和 VIYQYMDDL.

23. 根据权利要求 1~6 中任一项的试剂盒, 其中引发和促进组合物是相同的, 都含有 (i) 的表位来源和 (ii) 的表位来源.

24. 根据权利要求 1~6 中任一项的试剂盒, 其中引发组合物和/或促进组合物被包被到金颗粒以便可用于基因枪.

25. 根据权利要求 1 的试剂盒, 其中所述引发组合物包括含有至少 1 种病原体或癌症的表位或抗原的重组蛋白, 所述促进组合物包括编码相同表位或抗原的重组 MVA 载体.

26. 根据权利要求 25 的试剂盒, 其用于产生抗疟疾的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答.

27. 根据权利要求 25 的试剂盒, 其用于产生抗 HIV 的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答.

28. 根据权利要求 1-6 或 25-27 中任一项的试剂盒, 其中 (ii) 通过静脉内、表皮内或真皮内输送.

29. 一种促进抗至少 1 种靶抗原的引发过的 CD8+ T 细胞应答的药物, 包括 1 种或多种靶抗原的 CD8+ T 细胞表位的来源和药用可接受的载体, 其中 CD8+ T 细胞表位的来源是非复制或复制受损的重组痘病毒载体.

30. 根据权利要求 29 的药物, 其中所述的载体是 MVA.

31. 根据权利要求 29 或 30 的药物, 其中靶抗原是疟疾抗原.

32. 重组非复制或复制受损的痘病毒载体在制备促进 CD8+ T 细胞免疫应答的药物中的用途.

33. 权利要求 32 的用途, 其中重组非复制或复制损害的痘病毒载体是 MVA 载体。

34. 重组 Ty 病毒样颗粒, 其包括表位串 Ls8, Cp26, Ls6, Tr42/43, Tr39, Cp6, St8, Ls50, Pb9, Tr26, Ls53, Tr29, NANP, TRAP AM, Cp39, La72, ex23, CSP, BCG, 和 TT, 其用于抗疟疾的免疫。

35. 编码表位串 Ls8, Cp26, Ls6, Tr42/43, Tr39, Cp6, St8, Ls50, Pb9, Tr26, Ls53, Tr29, NANP, TRAP AM, Cp39, La72, ex23, CSP, BCG, 和 TT 的重组 DNA 质粒或重组非复制或复制受损的痘病毒, 其用于抗疟疾的免疫。

36. 一种根据权利要求 35 的病毒, 其为 MVA 株。

用于产生 CD8 T 细胞免疫应答的试剂盒及其用途

本发明涉及用不同的引发和促进剂组合物作为 CD8+ T 细胞表位的来源，产生针对靶抗原的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答。

引言

疫苗学中的一个普遍问题是不能通过免疫反应产生高水平的 CD8 T 细胞。该问题妨碍开发抗包括疟疾等几种疾病的疫苗。

恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 疟疾每年引起数以亿计的疟疾感染者并且导致 1-2 百万人死亡。因此开发抗疟疾的有效疫苗是全球公共健康优先要考虑的项目。在过去 20 多年中，大量的免疫学研究确认了来自疟原虫的疫苗抗原和宿主中存在的可能保护免受感染和患病的免疫学机制。然而，尽管有此进展，仍没有在试验领域中表现为有效的抗疟疾感染的接种方法。

已被确认的主要问题是在接种的个体中为免受感染和患病诱导足够强免疫应答的方法。因此，尽管已知许多疟疾抗原可用于抗疟疾的接种，问题是如何传递由免疫系统的细胞识别的上述抗原或称之为表位的它们的片段，形成诱导足够强的特殊类型免疫应答的方式。

多年来已知通过用大剂量照射过的来自蚊子叮咬得到的疟疾孢子免疫接种，可能对个体有保护作用。尽管这是大量接种不完全实用的方法，但该方法提供一种模型，用于分析介导孢子感染保护性免疫的免疫应答 (Nardin 和 Nussenzweig 1993)。

在近 10 年或更长的时间中，大量的研究表明抗恶性疟原虫疾病早期前红细胞阶段的主要保护性免疫应答是由 CD8+ ve 型的 T 淋巴细胞 (CD8+ T 细胞) 所介导的。在小鼠疾病感染模型中显示上述细胞直接介导保护作用 (Nardin 和 Nussenzweig 1993)。在天然与疾病接触的个体和用照射过的孢子免疫接种的志愿者中，也已鉴定出了这些细胞 (Hill 等, 1991; Aidoo 等, 1995, Wizek 等, 1995)。还有许多非直接的证据表明上述 CD8+ T 细胞在人类抗疟疾感染和患病中起保护作用 (Lalvani 等, 1994)。

CD8+ T 细胞可能有不只一个方面的功能。众所周知的功能是杀死或裂解含有 MHC I 类分子肽抗原的靶细胞。因此这些细胞常定名为杀伤性 T 淋巴细胞 (CTL)。然而, 另一个功能, 也许在疟疾感染中起更大保护作用有关的是 CD8+ T 细胞能分泌干扰素 γ (IFN- γ)。因此分析裂解活性和 IFN- γ 释放在测定 CD8+ T 细胞免疫应答中具有双重价值。在疟疾中, 产生该疾病的任何症状之前, 这些 CD8+ ve 细胞能通过杀死疟疾感染早期肝内阶段的寄生虫而起保护作用 (Seguin 等, 1994)。

致死性人类疟疾的病因恶性疟原虫感染有限数量的宿主物种: 人类、黑猩猩和一些新世界 (New World) 猴类的物种。最好的非人类疟疾模型是黑猩猩, 因为该物种与人类亲缘关系近并且不象猴宿主那样, 它可以连续观察肝感染阶段 (Thomas 等, 1994)。由于黑猩猩昂贵且来源有限, 大多数疟疾研究在小鼠中进行, 用啮齿类疟原虫伯氏疟原虫 (*P. berghei*) 或约氏疟原虫 (*P. yoelii*)。后二种模型已进行了彻底的研究, 表明在该 2 种模型中 CD8+ ve 淋巴细胞在抗孢子激发的保护性免疫中起关键作用。

以前的研究已估计到各种各样的方法诱导 CD8+ T 细胞抗疟疾的应答。几种这些方法显示在啮齿类模型中, 抗疟疾感染的某些水平 CD8+ T 细胞应答和部分保护作用 (如 Li 等, 1993; Sedegah 等, 1994; Lanar 等, 1996)。然而, 过去未见对用亚单位疫苗免疫接种而诱导足够高水平的 CD8+ T 淋巴细胞, 以有效地保护对抗疟疾孢子感染的有效方法的描述。

近年来通过改变用于传递抗原的载体探索对潜在的疫苗产生的改善免疫应答。有证据显示用 2 种不同的载体作为引发和促进剂连续施用, 在某些情况下可改善抗体的应答。各种引发和促进的组合已在不同的潜在疫苗方案中进行了试验。

Leong 等 (疫苗 1995, 327 - 331) 描述首先用表达流感血细胞凝集素 (HA) 抗原的 DNA 给小鼠免疫接种然后用表达 HA 的重组禽痘病毒载体的方法。在后续的促进阶段获得增强的抗体应答。

Richmond 等 (病毒学 1997, 230: 265 - 274) 描述用 DNA 引发法和重组痘苗病毒促进法企图提高抗 HIV-1 env 的中和抗体。用该

引发促进方案仅观察到低水平的抗体应答，该结果令人失望。

Fuller 等(疫苗 1997, 15: 924 - 926 和免疫细胞生物学 1997, 75: 389 - 396) 描述了用复制性重组痘苗病毒作为促进剂免疫接种，增强了对猕猴 DNA 免疫接种的抗体应答。不过，这不能转变成大大降低病毒负载的增强保护效能，也不能在 DNA 引发和促进的动物中看到减少 CD4 T 细胞丢失。

Hodge 等(疫苗 1997, 15: 759 - 768) 描述用在重组的禽痘病毒 (ALVAC) 中表达的人癌胚抗原 (CEA)、诱导在小鼠模型中对癌症的增殖性 T 淋巴细胞应答。作者用重组 CEA 能复制的 Wyeth 或 WR 株的痘苗病毒引发免疫应答，然后用重组 CEA 的 ALVAC 促进该应答。这导致 T 细胞增殖增加，但如果与 3 种野生型重组免疫接种 (100% 保护) 相比较不能增强保护效能，3 种重组 ALVAC - CEA 免疫接种 (70% 保护) 或 WR 引发然后 2 种 ALVAC - CEA 免疫接种 (63% 保护)。

因而一些异源性引发 - 促进组合研究发现，在动物模型中抗体和淋巴增殖应答的某种程度增强，但对保护效能没有明显影响。在这些研究中没有测定 CD8 T 细胞。有限地增强抗体应答可能简单地反映如下事实：针对引发免疫原的抗体总是降低用相同的免疫原进行第 2 次免疫接种的免疫原性，而用不同的载体促进将部分克服该问题。预计这种机制不受免疫接种的顺序明显影响。

异源性引发促进免疫接种方案可能影响 CD8 T 细胞应答的证据由 Li 等 (1993) 提供。他们描述通过施用 2 种活病毒载体，重组复制流感病毒接着用编码疟疾表位的重组复制痘苗病毒，在小鼠中诱导抗疟疾孢子激发的部分保护效能。免疫接种的相反顺序导致所有保护性效能的丧失，作者认为这种痘苗肝细胞感染有关，导致 CTL 在肝中定位以保护抗疟疾寄生虫的肝细胞阶段。

Rodrigues 等(免疫学杂志 1994, 4636 - 4648) 描述用重复剂量的表达疟疾环孢子 (CS) 蛋白的显性免疫 B 细胞表位的重组流感病毒免疫接种小鼠，接着用重组痘苗病毒促进剂。在促进剂中使用野生型痘苗病毒株和减毒但能复制的痘苗病毒株产生非常相似水平的部分保护作用。然而减毒但能复制的病毒株与野生型痘苗病毒株相比较，轻微减少

引发 CD8 T 细胞的免疫原性。

Murata 等 (细胞免疫学 1996, 173: 96 - 107) 报道用复制性重组流感病毒引发然后用痘苗病毒复制株促进增强了 CD8 T 细胞的应答, 表明在更早期的二项研究中观察到的部分保护作用起因于该增强的 CD8 T 细胞诱导。

因此综合这三项研究提供了证据, 用复制性重组痘苗病毒的促进剂免疫接种可以增强由复制性重组流感病毒引发的某种程度的 CD8 T 细胞诱导。然而, 从它们潜在的应用角度考虑, 对这些发现有 2 种限制因素。首先, 所诱导的免疫原性仅足以获得抗疟疾的部分保护作用而甚至这依赖于用不常见的复制性重组流感病毒引发的免疫接种的高度免疫原性。其次, 因为用这些复制性病毒作免疫原的潜在及文献记载的副作用, 这些重组载体不能作为疫苗用于一般人群。

修饰过的痘苗病毒 Ankara (MVA) 是一种在大多数细胞类型包括正常人组织中不复制的痘苗病毒株。MVA 由在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中连续传代 > 500 次衍生而来, 该病毒来源于土耳其 Ankara 一匹马中皮疹损伤得到 (Mayr 等, 1975)。研究表明它是复制受损但仍能诱导抗兽医疱疹病毒感染的保护性免疫 (Mayr 1976)。在根除天花战役的最后阶段, MVA 被用作人疫苗, 通过皮内、皮下和肌肉途径在德国南部给 > 120, 000 的受试者施用。未记录到明显的副作用, 尽管是故意对诸如患湿疹的高风险组接种疫苗 (Mayr 等, 1978; Stickl 等, 1974; Mahnel 等, 1994;)。MVA 的安全性反映了在动物模型中病毒的无毒害性, 这些动物包括照射过的小鼠和颅内施用后的新生小鼠。MVA 的非复制作用与鸡尿囊绒毛膜的增殖性白斑的产生、非鸟类细胞的流产性感染和存在总计大约 30 kb 的 6 个基因组缺失有关 (Meyer 等, 1991)。MVA 的无毒害性部分归结于缺失影响宿主范围基因 K1L 和 C7L, 尽管有限的病毒复制仍在人 TK - 143 细胞和非洲绿猴 CV - 1 细胞中发生 (Altenburger 等, 1989)。恢复 K1L 基因仅部分恢复 MVA 的宿主范围 (Sutter 等, 1994)。宿主范围限制似乎在病毒颗粒成熟过程中出现, 在人 HeLa 细胞中用电子显微镜仅观察到未成熟的病毒颗粒 (Sutter 等, 1992)。在病毒复制中的晚期阻断不能防止在 MVA 中重组基因的有效表达。已证实表达流感核蛋白、流感血细胞凝集素和 SIV

蛋白的重组 MVA 在动物模型中具有免疫原性并且提供不同程度的保护作用，尽管这种作用绝不能单独归因于 CD8+ T 淋巴细胞（Sutter 等，1994；Hirsch 等，1995；Hirsch 等，1996）。因为安全性和免疫原性的这些特性，重组的 MVA 被认为是一种有希望的人疫苗候选者（Moss 等，1995）。含有编码外来抗原 DNA 的重组 MVA 在 US 5, 185, 146 专利中有描述（Altenburger）。

痘病毒为逃避宿主免疫应答进化出的策略包括产生起肿瘤坏死因子、IL - 1 β 、干扰素（IFN）- α/β 和 IFN - γ 的可溶性受体作用的分泌蛋白，一般来说这些蛋白具有的序列与细胞因子受体的细胞外结构域相似（Symons 等，1995；Alcami 等，1995；Alcami 等，1992）。最近描述该性质的受体是趋化因子受体（Graham 等，1997）。这些病毒受体一般抑制或破坏合适的宿主免疫应答，并且它们的存在和增加的致病原性相关。IL - 1 β 受体是一个例外，它的存在减弱宿主的热应答并增强面对感染时的宿主存活率（Alcami 等，1996）。我们已经发现 MVA 缺乏针对干扰素 γ 、干扰素 $\alpha\beta$ 、肿瘤坏死因子和 CC 趋化因子的功能性细胞因子受体，可是的确拥有潜在有益的 IL - 1 β 受体。MVA 是唯一熟知的拥有该细胞因子受体特征的痘病毒株，理论上使其比其他痘病毒更安全和更具免疫原性。另一种熟知的称为 NYVAC 的复制损伤和安全的痘病毒株在 Tartaglia 等（病毒学 1992，188：217 - 232）的文章中详细描述。

很长时间以来已意识到活病毒作为重组疫苗的载体拥有某些吸引人的特征，包括对外来抗原的高容量和相当好的对细胞免疫应答的免疫原性（Ellis 1988，制造疫苗的新技术，选自疫苗一书。编著者：Plotkin S A 和 Mortimer E A. W B Saunders, Philadelphia, 568 页；Woodrow G C. 1977，新产生的疫苗一书，第二版。编著者：Levine M M, Woodrow G C, Kaper J B, Cobon G, 33 页）。这导致设法以各种方式减弱上述活载体的病毒性，包括降低它们的复制能力（Tartaglia J 等，1992 病毒学，188：217 - 232）。然而上述在复制方面的降低也降低由病毒产生的抗原数量，因而可预期降低疫苗免疫原性。确实以前的研究显示减弱复制性痘病毒株导致在抗体应答方面某种基本降低（Lee M S 等，1992 病毒学杂志 66：2617 - 2630）。相似地，在狂犬病的研究中发现非复

制性禽痘病毒载体比复制性野生型痘病毒株更少的针对抗体产生的免疫原性和更少的保护作用 (Taylor J 等, 1991 疫苗 9: 190 - 193)。

目前已发现非复制性和复制受损的痘病毒株提供的载体能对引发的 CTL 应答极其良好的促进效应。显然, 该效应比由野生型痘病毒引起的促进效应明显要强。该效应可用疟疾和其他抗原如病毒和肿瘤抗原观察到, 并且其保护作用在小鼠和非人的灵长类激发实验中显示。用该新型的免疫方案观察到对孢子子的激发完全而不是部分的保护作用。

本发明的目的是鉴别一种有效的抗疟疾免疫方法。本发明的进一步目的是鉴别抗 CD8+ T 细胞应答起保护作用的其他疾病的免疫方法。上述疾病包括但不局限于由 HIV 病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、丙肝病毒、乙肝病毒、流感病毒、EB 病毒、麻疹病毒、登革病毒和 HTLV - 1; 由细菌结核分支杆菌和李斯特菌类和由原生动物寄生虫弓形虫和锥虫及某些类型的癌症如黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌所引起的感染和患病。

我们在此描述一种新的产生非常高水平 CD8+ T 细胞的免疫方法并且发现能诱导抗伯氏疟原虫子孢子激发的前所未有的完全保护作用。在更高等的灵长类中也检测了相同的方法, 也发现在该物种中高度的免疫原性, 并且发现诱导抗恶性疟原虫激发的部分保护作用。诱导保护性免疫应答也在 2 种另外的病毒感染和癌症的小鼠模型中说明。

我们进一步显示在该描述的新型免疫方案也在产生抗 HIV 表位的强 CD8+ T 细胞应答中有效。大量的证据显示所产生的上述 CD8+ T 细胞应答预计在抗该病毒感染和患病的预防或治疗免疫中具有价值 (Gallimore 等 1995; Ada 1996)。我们阐明用来自 2 种微生物 HIV 和疟疾序列的表位串, 可产生抗来自 HIV 和疟疾表位的强 CD8+ T 细胞应答。成功产生抗 HIV 和疟疾表位并且也抗流感和肿瘤表位的增强免疫原性表明该新型的免疫方案一般对许多感染性病原性有效, 并且对产生强 CD8+ T 细胞应答可能具有价值的非感染性疾病也有效。

本发明令人惊奇的特征是发现在引发和尤其是促进 CD8+ T 细胞应答中的非常高效能的非复制性药剂。一般而言, 由活的复制性病毒载体诱导的 CD8+ T 细胞免疫原性过去发现比非复制性药剂或复制损伤的载体更高。这可从能在宿主中复制的药剂产生更大量的抗原估计出来。然

而在此我们发现用非复制性载体观察到最大的免疫原性和保护效能，这是令人吃惊的。后者拥有免疫接种的附加优点，因为它们一般比复制性载体更安全地用于人类。

本发明在一个方面提供一种试剂盒，以产生抗至少一种靶抗原的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答，该试剂盒包括：

(i) 一种引发组合物，包括来源于一种或多种靶抗原的 CD8+ T 细胞表位，和药用可接受的载体一起使用；和

(ii) 一种促进组合物，包括来源于一种或多种靶抗原的 CD8+ T 细胞表位，包括至少一种 CD8+ T 细胞表位与引发组合物的 CD8+ T 细胞表位相同，其中 CD8+ T 细胞表位的来源是非复制性或复制受损的重组痘病毒载体，和药用可接受的载体一起使用；

条件是如果在 (i) 中表位的来源是病毒载体，(ii) 中的病毒载体来源于不同的病毒。

在另一方面本发明提供一种产生抗至少一种靶抗原的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答的方法，该方法包括根据本发明施用至少一种剂量的组分 (i) ，接着施用至少一种剂量的该试剂盒的组分 (ii) 。

优选地，根据本发明方法 (i) 中的 CD8+ T 细胞表位的来源是一种非病毒载体或非复制性或复制损伤的病毒载体，尽管也可用复制性病毒载体。

优选地，在 (i) 中 CD8+ T 细胞表位的来源不是一种痘病毒载体，这样使引发剂和促进剂之间存在极小的交叉反应性。

在本发明的一个优选实施方案中，引发组合物的 CD8+ T 细胞表位的来源是一种核酸，可以是 DNA 或 RNA ，尤其是重组的 DNA 质粒。DNA 或 RNA 可以包装在例如溶酶体中，或自由的形式存在。

在本发明的另一个优选实施方案中，引发组合物中的 CD8+ T 细胞表位的来源是存在于重组 CD8+ T 细胞表位串或在靶抗原中的肽、多肽、蛋白、聚蛋白或包括二种或多种 CD8+ T 细胞表位的颗粒。聚蛋白包括二种或多种可能相同或优选地不同连接在一起的蛋白。在本实施方案中特别优选的是重组蛋白颗粒如 Ty 病毒样颗粒 (VLP) (Burns 等，分子生物技术 1994 ， 1： 137 - 145) 。

优选地，促进组合物中的 CD8+ T 细胞表位的来源是诸如 MVA 或

NYVAC 的痘苗病毒载体。最优选的是修饰过的 ankara 病毒 (MVA) 或衍生于该病毒的痘苗株。可选用的痘苗载体包括禽痘病毒载体如禽痘病毒或金丝雀痘病毒载体。特别适用的禽痘病毒载体是熟知的 ALVAC 金丝雀痘病毒病毒株 (可从 Kanapox 购得) 和衍生于此的病毒株。

禽痘病毒携带大量的异源遗传信息。用于痘苗对病毒载体的其他要求包括良好的免疫原性和安全性。MVA 是一种具有良好的安全性记录的复制受损的痘苗病毒株。在大多数细胞类型和正常人组织中, MVA 不复制; 在少数的诸如 BHK 21 细胞的转化细胞类型中观察到 MVA 的有限复制。由本发明描述的目前结果显示, 当用 DNA 质粒、重组 Ty - VLP 或重组腺病毒引发后施用促进组合物时, 重组的 MVA 和其他非复制或复制受损的病毒株在产生保护性 CD8+ T 细胞应答方面, 比常规的重组痘苗载体惊人地和明显地好。

很明显, 来源于 MVA 的痘苗病毒株或具有 MVA 特征使 MVA 特别适合用于疫苗而独立开发的病毒株, 也将适用于本发明的用途。

含有插入表位串的 MVA (在实施例中描述的 MVA - HM) 保藏在欧洲动物细胞培养物保藏中心, CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, 英国, 登记号 V97060511, 保藏时间 1997 年 6 月 5 日。

在此所用的术语“非复制”或“复制受损”意味着在大多数正常哺乳动物细胞或正常人细胞中不能有任何明显的复制延伸。非复制或复制受损的病毒可能天然 (即它们可能从天然环境中分离) 或如通过体外育种或遗传操作, 如缺失对复制起关键作用的基因的人工方法得到。一般来说所述的病毒生长在一种或少数细胞类型中, 如 CEF 细胞适于 MVA。

病毒的复制一般用 2 种方法测定: 1) DNA 合成和 2) 病毒滴度。更准确而言, 在此所用和把其用于痘病毒的术语“非复制或复制受损”意味着病毒符合一种或二种下列的标准:

1) 与痘苗病毒哥本哈根株相比, 在 MRC 与细胞 (人细胞系) 中 DNA 合成表现为 1 log (10 倍) 的降低;

2) 与痘苗病毒哥本哈根株相比较, 在 HELA 细胞 (人细胞系) 中病毒滴度表现为 2 log 的降低。

落入该限定范围的痘病毒实施例为 MVA、NYVAC 和禽痘病毒,

而在该限定范围之外的病毒为减毒的痘苗病毒株 M7。

根据本发明另外的用于引发组合物的优选病毒载体包括遗传上残缺致使非复制或复制受损的各种不同的病毒。上述病毒例如包括非复制的腺病毒如 E1 缺失突变体。遗传残缺的病毒产生非复制或复制受损的载体在文献中已有大量描述（如 McLean 等，1994）。

其他用于引发组合物中合适的病毒载体是基于疱疹病毒和 Venezuelan 马脑炎病毒（VEE）（Davies 等，1996），用于引发的合适细菌载体包括重组 BCG 和重组沙门氏苗和用质粒 DNA 转化的沙门氏菌（Darji A 等，1997 细胞 91：765 - 775）。

另外的用于引发组合物的合适非病毒载体包括带有脂质尾的肽如熟知的脂肽，与载体蛋白融合的肽如 KLH（要么作为融合蛋白或通过化学连接），含有佐剂的完整抗原和其他相似的系统。诸如 QS 21 或 SBAS 2 的佐剂（Stoute J A 等，1997 新英格兰医学杂志 226：86 - 91）可和蛋白、肽或核酸一起使用，以增强诱导 T 细胞应答。这些系统有时称为“免疫原”而不是“载体”，在本发明中从它们携带相关的 CD8+ T 细胞表位的意义上说它们是载体。

没有理由为什么引发和促进组合物不应该一致，因为它们两者可含有如上述（i）中定义的 CD8+ T 细胞表位的引发来源物和如上述（ii）中定义的 CD8+ T 细胞表位的促进来源物。能用作引发剂和促进剂的单一制剂将简化施用方法。重要的事情是该引发剂含有至少上述（i）中定义的表位引发来源物和促进剂含有至少上述（ii）中定义的表位促进来源物。

存在于引发和促进组合物中或由它们编码的 CD8+ T 细胞表位可用各种不同的形式提供，如一个或二个或多个表位的重组串，或天然靶抗原的形式或上述二者的组合。对许多不同的疾病来说，已经鉴定了 CD8+ T 细胞表位并能在文献中找到。有可能设计表位串，以产生抗任何所选的含有上述表位的抗原的 CD8+ T 细胞应答。有利地，在多个表位的串中的表位在没有间隔序列的情况下连接在一起，结果能避免非必需的核酸和/或氨基酸材料。除了 CD8+ T 细胞表位，包括由 T 辅助细胞识别的一个或多个表位可能是优选的，以增强由表位串产生的免疫应答。特别合适的 T 辅助细胞表位是那些在不同的 HLA 型个体中活化的种类，例

如来源于破伤风（大多数个体已经引发抗此疾病）的 T 辅助细胞表位。3 种 T 辅助细胞表位的有用组合已用在本发明描述的实施例中。包括刺激 B 细胞应答和抗体产生的 B 细胞表位也可能是有用的。

所述的引发和促进组合物可能包括佐剂，这是有利的。尤其是，包括 DNA 质粒载体的引发组合物也可包括粒细胞巨噬细胞 - 集落刺激因子（GM - CSF）或编码该因子的质粒用作佐剂；以多肽形式使用 GM - CSF 可观察到有利的效应。

在此所述的组合物可用作治疗或预防的疫苗。是否预防或治疗免疫更合适的方案通常依赖于疾病的性质。例如，可预期癌症可以治疗免疫而是确诊之前使用，而抗疟疾的疫苗是优选的，尽管用作预防免疫为非必需的。

根据本发明的组合物可经各种不同的途径施用。某些途径对某些组合物是有益的，由于导致产生更有效的应答，或较少的可能诱导副作用，或施用更容易些。本发明显示在金粒上或作为粉末用基因枪输送是有效的。

进一步方面，本发明提供：

一种产生抗病原或肿瘤的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答的方法，该方法包括施用至少一种剂量的编码一种病原或癌症的 CD8+ T 细胞表位或抗原的重组 DNA 质粒，然后施用至少一种剂量的编码相同表位或抗原的非复制或复制受损的重组痘病毒；

一种产生抗病原或肿瘤的保护性 CD8+ T 细胞免疫应答的方法，该方法包括施用至少一种剂量的包含至少一种病原或癌症的表位或抗原的重组蛋白或颗粒，然后施用至少一种剂量的编码相同表位或抗原的重组 MVA 载体；

重组的非复制或复制受损的痘病毒载体在制备促进 CD8+ T 细胞免疫应答中的药物的用途；

MVA 载体在制备促进 CD8+ T 细胞免疫应答的药物中的用途；

一种促进抗至少一种靶抗原或表位的引发的 CD8+ T 细胞应答的药物，包括靶抗原一种或多种 CD8+ T 细胞表位的来源，其中 CD8+ T 细胞表位的来源是非复制或复制受损的重组痘病毒载体，和药用可接受的载体一起使用；以及

在本发明中所述的引发和/或促进组合物，特别适于用基因枪输送的形式出现；和包括通过基因枪的方法输送组合物的免疫方法。

由本发明提供的还有：在此描述的表位串，包括包含在表 1 和表 2 中所列的氨基酸序列的表位串；编码该表位串的重组 DNA 质粒；包含表位串的重组 Ty - VLPs；编码恶性疟原虫抗原 TRAP 的重组 DNA 质粒或非复制或复制受损的重组痘病毒；和包含完整或基本完整的蛋白抗原如 TRAP 及在序列中二个或多个表位的串如来源于疟疾的 CTL 表位的重组多肽。

制剂和免疫方法举例

制剂 1

引发组合物：DNA 质粒 1 mg/ml 溶在 PBS 中

促进组合物：重组 MVA， 10^8 ffu 在 PBS 中

方法：在 0 和 3 周肌内施用 2 个剂量的 1 mg 引发组合物，接着在 6 和 9 周真皮内施用 2 个剂量的促进剂。

制剂 2

引发组合物：Ty - VLP 500 μ g 在 PBS 中

促进组合物：MVA， 10^8 ffu 在 PBS 中

方法：在 0 和 3 周肌内施用 2 个剂量的引发组合物，然后在 6 和 9 周施用 2 个剂量的促进剂。对于肿瘤治疗，作为最有效的途径之一 MVA 静脉内给入。

制剂 3

引发组合物：蛋白 500 μ g + 佐剂 (QS - 21)

促进组合物：重组 MVA， 10^8 ffu 在 PBS 中

方法：在 0 和 3 周施用 2 个剂量的引发组合物而在 6 和 9 周同上施用 2 个剂量的促进剂感染量。

制剂 4

引发组合物：腺病毒载体， 10^9 pfu 在 PBS 中

促进组合物: 重组 MVA, 10^8 ffu 在 PBS 中

方法: 在 0 和 3 周真皮内施用 1 个或 2 个剂量的引发组合物以及在 6 和 9 周同上施用 2 个剂量的促进剂感染量。

以上剂量和方法可随优化的保护作用而变化。所给的剂量如在 1 - 8 周的间隔而不是 2 周间隔。

本发明将在下列实施例中进一步描述。

实施例

实施例 1

材料和方法

产生表位串

疟疾表位串制自系列的盒, 每个盒编码在表 1 所示的 3 个表位, 在盒的每个末端具有限制性酶位点。每个盒由 4 个合成的寡核苷酸共用退火而构建, 连接到克隆载体中然后测序检查无错误导入。然后按要求将单个盒连接在一起。C 盒的 3' 末端的 BamHI 位点与 A 盒的 5' 末端 BglII 位点融合, 使 2 个盒之间失去 2 个限制性酶位点并且编码 2 个氨基酸间隔子 (GS)。然后以相同的方法把盒 B、D 和 H 连接到串上。含有 CABDHFE 较长的串也按相同的方法构建。

表 1. 疟疾 (M) 串的 CTL 表位

盒	表位	氨基酸序列	DNA 序列	类型	HLA 限制性
A	Ls8	KPNDKSLY	AAGCCGAACGACAAGTCCTTGTAT	CTL	B35
	Cp26	KPKDEL DY	AAACCTAAGGACGAATTGGACTAC	CTL	B35
	Ls6	KPIVQYDNF	AAGCCAATCGTTCAATACGACAACTTC	CTL	B35
B	Tr42/43	ASKNKEKALII	GCCTCCAAGAACAAGGAAAAGGCTTTGATCA TC	CTL	B8
	Tr39	GIAGGLALL	GGTATCGCTGGTGGTTTGGCCTTGTTG	CTL	A2.1
	Cp6	MNPNDPNRN V	ATGAACCCTAATGACCCAAACAGAAACGTC	CTL	B7

C	St8	MINAYLDKL	ATGATCAACGCCTACTTGGACAAGTTG	CTL	A2.2
	Ls50	ISKYEDEI	ATCTCCAAGTACGAAGACGAAATC	CTL	B17
	Pb9	SYIPSAEKI	TCCTACATCCCATCTGCCGAAAAGATC	CTL	小鼠 H2-K ^d
D	Tr26	HLGNVKYLV	CACTTGGGTAACGTTAAGTACTTGGTT	CTL	A2.1
	Ls53	KSLYDEHI	AAGTCTTTGTACGATGAACACATC	CTL	B58
	Tr29	LLMDCSGSI	TTATTGATGGACTGTTCTGGTTCTATT	CTL	A2.2
E	NANP	NANPNANPN ANPNANP	AACGCTAATCCAAACGCAAATCCGAACGCCA ATCCTAACGCGAATCCC	B 细胞	
	TRAP AM	DEWSPCSVT CGKGTRSRK RE	GACGAATGGTCTCCATGTTCTGTCACTTGTG GTAAGGGTACTCGCTCTAGAAAGAGAGAA	肝素 结合 基序	
	F	Cp39	YLNKIQNSL	TACTTGAACAAAATTCAAACCTCTTTG	CTL
F	La72	MEKLKELEK	ATGGAAAAGTTGAAAGAATTGGAAAAG	CTL	B8
	ex23	ATSVLAGL	GCTACTTCTGTCTTGGCTGGTTTG	CTL	B58
H	CSP	DPNANPNVD PNANPNV	GACCCAAACGCTAACCCAAACGTTGACCCA AACGCCAACCCAAACGTC	T 辅助 细胞	通用 表位
	BCG	QVHFQPLPP AVVKL	CAAGTTCACTTCCAACCATTGCCTCCGGCCG TTGTCAAGTTG	T 辅助 细胞	
	TT	QFIKANSKFI GITE	CAATTCATCAAGGCCAACTCTAAGTTCATCG GTATCACCGAA	T 辅助 细胞	

表 1 包括在疟疾表位串中的序列。每个盒由如上所示的表位组成，按顺序显示，在盒中表位之间不具有额外的序列。BglII 位点被加在 5' 末端而 BamHI 位点加在 3' 末端，结果在表位串的盒之间，BamHI/BglII 连接编码 GS。所有表位来源于恶性疟原虫抗原（pb9 除外（伯氏疟原虫），BCG（结核分支杆菌）和 TT（破伤风））。在表中所示的氨基酸和 DNA 序列具有按顺序出现的 SEQ ID NOS. 1 ~ 40。

图 1 显示用于表达具有疟疾表位盒 CABDHFE 的 Ty - VLP 的构建体。CTL 表位来自恶性疟原虫 STARP（富含苏氨酸和天冬酰胺的孢子

蛋白) (st)、LSA-1 (肝阶段抗原1) (1s)、CSP (环孢子蛋白) (cp)、TRAP (血小板反应蛋白相关的粘着蛋白) (tr)、LSA-3 (肝阶段抗原3) (la) 和 Exp-1 (外排蛋白1) (ex)。辅助表位来自恶性疟原虫 CS 蛋白、分支结核杆菌 38 kd 抗原和破伤风类毒素。NANP 是来自 CS 的抗体表位而 AM 来自恶性疟原虫 TRAP 的粘着基序 (Muller 等, 1993)。完整串的长度如在表 1 所示为 229 个氨基酸, 具有的氨基酸序列:

MINAYLDKLI SKYEDEISYIPSAEKIGSKPNDKSLYKPKDEL DYKPIV
QYDNFGSASKNKEKALIGIAGGLALLMNPNDPNRN VGSHLGNVK
YLVKSLYDEHILLMDCSGSIGSDPNANPNVDPNANPNVQVHFQPLP
PAVVKLQFIKANSKFIGITEGSYLNKIQNSLMEKLKELEKATSVLA
GLGSNANPNANPNANPNANPNANPDEWSPCSVTCGKGTRSRKREGSGK
[SEQ ID NO: 41].

HIV 表位串也由退火寡核苷酸法合成。最后 HIV 和疟疾表位串通过在 HIV 表位 3' 末端的 BamHI 位点连接到盒 CAB 5' 末端的 BglII 位点, 融合形成 HM 串 (表 2)。

表 2 HIV/SIV 表位串的 CTL 表位

表位	限制性	来源
YLKDQQLL	A24, B8	HIV-1 gp41
ERYLKDQQL	B14	HIV-1 gp41
EITPIGLAP	Mamu-B*01	SIV env
PPIPVGEIY	B35	HIV-1 p24
GEIYKRWII	B8	HIV-1 p24
KRWIILGLNK	B*2705	HIV-1 p24
IILGLNKIVR	A33	HIV-1 p24
LGLNKIVRMY	Bw62	HIV-1 p24
YNLTMKCR	Mamu-A*02	SIV env
RGPGRAFVTI	A2, H-2Dd	HIV-1 gp 120
GRAFVTIGK	B*2705	HIV-1 gp 120

TPYDINQML	B53	HIV-2 gag
CTPYDINQM	Mamu-A*01	SIV gag
RPQVPLRPMTY	B51	HIV-1 nef
QVPLRPMTYK	A*0301, A11	HIV-1 nef
VPLRPMTY	B35	HIV-1 nef
AVDLSHFLK	A11	HIV-1 nef
DLSHFLKEK	A*0301	HIV-1 nef
FLKEKGGL	B8	HIV-1 nef
ILKEPVHGV	A*0201	HIV-1 pol
ILKEPVHGVY	Bw62	HIV-1 pol
HPDIVIYQY	B35	HIV-1 pol
VIIQYMDDL	A*0201	HIV-1 pol

表 2 来自 HIV 或 SIV 的表位序列含在 H 表位串中并如图 2 所示装配。在表中的氨基酸拥有按顺序出现的 SEQ ID NOS: 42 ~ 64。

图 2 显示 H、M 和 HM 蛋白的图解性略图。在图中代表多肽蛋白的条形类型表示序列的来源（见表 1 和 2）。各个表位和它们的 MHC 限制性的部位已在蛋白的上下标明。Pb 是唯一来源于伯氏疟原虫的蛋白。所有在 M 蛋白中的其他表位起源于恶性疟原虫蛋白：cs - 环孢子蛋白，st - STARP、Is - LSA - 1 和 tr - TRAP、BCG - 结核分支杆菌的 38 kDa 蛋白；TT - 破伤风毒素。

对于抗肿瘤的疫苗，与疟疾和 HIV 表位串相似产生了含有 CTL 表位的表位串。在所公布的该肿瘤表位串中，鼠 CTL 表位被融合在一起以制造具有下列氨基酸序列的肿瘤表位串：

MLPYLGWLVF - AQHPNAELL - KHYLFRNL - SPSYVYHQF - IPNPLLGLD [SEQ ID NO: 65]。在此所示的 CTL 表位融合在一起。导入了第一个氨基酸甲硫氨酸以启动翻译。

Ty 病毒样颗粒 (VLPs)

含有盒 CABDH 的表位串导入到酵母表达载体中，以形成 C - 末端框内与 TyA 蛋白融合。当 TyA 或 TyA 融合蛋白从该载体在酵母中表达中，该蛋白自发地形成病毒样颗粒，该颗粒能通过蔗糖梯度离心从酵母

的细胞质中纯化。用这种方法制备重组的 Ty - VLPs，并针对 PBS 透析以在注射前移去蔗糖（参见 Layton 等，1996）。

腺病毒

具有缺失的 E1 基因复制缺陷的重组腺病毒被用于本研究中（McGrory 等，1988）。该腺病毒在 CMV IE 启动子的控制下表达大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶。用于免疫接种， 10^7 pfu 病毒真皮内施用到耳垂内。

肽

购自遗传学研究公司（美国）的肽，以 10 mg/ml 溶解在 DMSO（Sigma）中并进一步用 PBS 稀释到 1 mg/ml。在此所述的用于本实验含有 CTL 表位的肽在表 3 中列出。

表 3 CTL 肽表位的序列

序列	抗原	MHC 限制性
LPYLGWLVF	P1A 肿瘤抗原	L ^d
SYIPSAEKI	伯氏疟原虫 CSP	K ^d
RGPGRAFVTI	HIV gag	D ^d
TRHPARIGL	大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶	L ^d
TYQRTRALV	流感 A 病毒 NP	K ^d
SDYEGRLI	流感 A 病毒 NP	K ^k
ASNENMETM	流感 A 病毒 NP	D ^b
INVAFNRFL	恶性疟原虫 TRAP	K ^b

在表 3 中的氨基酸序列为 SEQ ID NOS: 66 ~ 73，在表中它们按顺序出现。

质粒 DNA 构建体

许多不同的载体用于构建 DNA 疫苗。质粒 pTH 含有具有内含子 A 的 CMVIE 启动子，接着是一个多连接子，以允许导入抗原编码序列和牛生长激素转录终止序列。该质粒携带有氨苄青霉素抗性基因并且能在大肠杆菌而不是哺乳动物细胞中复制。该质粒用于制取表达下列每一种抗原的 DNA 疫苗：伯氏疟原虫 TRAP、伯氏疟原虫 CS、恶性疟原虫

TRAP、恶性疟原虫 LSA - 1 (仅 C 末端的 278 个氨基酸)、含有盒 CABDH 的表位串和 HM 表位串 (HIV 表位后接盒 CAB)。除了抗生素抗性基因外, 质粒 pSG2 和 pTH 相似。在 pSG2 中, pTH 的氨苄青霉素抗性基因已被卡那霉素抗性基因所取代。用 pSG2 制取表达下列抗原的 DNA 疫苗: 伯氏疟原虫 PbCSP、小鼠肿瘤表位串、含有盒 CABDH 的表位串和 HM 表位串。质粒 V1J - NP 在 CMVIE 启动子的控制下表达流感病毒核蛋白。质粒 CMV - TRAP 和 CMV - LSA - 1 与 pTH. TRAP 和 pTH. LSA - 1 相似, 但不含有 CMV 启动子的内含子 A。质粒 RSV. TRAP 和 RSV. LSA - 1 含有 RSV 启动子, SV 40 转录终止序列并且是四环素抗性。为诱导 β - 半乳糖苷酶特异的 CTL, 用质粒 pcDNA3/His/LacZ (Invitrogen)。所有 DNA 疫苗用 Qiagen 质粒纯化柱从大肠杆菌 DH5 α 株中制备。

重组痘苗病毒的产生

首先把抗原序列克隆到具有病毒启动子的穿梭载体如质粒 pSC11 中而制得重组的 MVAs (Chakrabarti 等, 1985; Morrison 等, 1989)。伯氏疟原虫 CS 和恶性疟原虫 TRAP、流感病毒核蛋白及 HM 和小鼠肿瘤表位多表位串每一个用 P7.5 启动子表达 (Mackett 等, 1984), 而伯氏疟原虫 TRAP 用合成的强启动子表达 (SSP; Carroll 等, 1995)。然后用穿梭载体 pSC11 或 pMCO3 转化用野生型的 MVA 感染过的细胞, 结果位于启动子侧翼的病毒序列、抗原编码序列和标记基因能和 MVA 结合, 而产生重组体。重组病毒表达标记基因 (β - 葡糖醛酸酶或 β - 半乳糖苷酶), 可以使鉴别含有重组病毒的斑点。在用于免疫前对重组体重复进行斑点纯化。重组的 NYVAC - PbCSP 痘苗病毒以前已描述 (Lanar 等, 1996)。野生型或编码 PbCSP 的重组痘苗病毒西式保存 (WR) 株前已描述 (Satchidanandam 等, 1991)。

细胞和培养基

鼠细胞和 EB 病毒转化的黑猩猩和猕猴 B 细胞 (BCL) 培养在添加 10 % 热灭活的胎中血清 (FCS) 的 RPMI 中。脾细胞在含有 10 % FCS、2 mM 谷氨酰胺、50 U/ml 青霉素、50 μ M 2 - 巯基乙醇和 10 mM HEPES pH 7.2 (Gibco, 英国) 的 MEM 培养基中, 用所示的肽 (终浓度 1 μ g/ml) 重新刺激。

动物

所示的 6 - 8 周龄的小鼠品系购自 Harlan Olac (Shaws 农场, Blackthorn, 英国)。在位于荷兰 Rijswijk 的灵长类生物医学研究中心研究黑猩猩 H1 和 H2。在牛津大学研究猕猴。

免疫接种

质粒 DNA 给小鼠免疫接种在麻醉下把 DNA 肌肉免疫接种到胫骨肌中进行。有时小鼠肌肉在免疫接种前 5 - 9 天按 Davis 等 (1993) 所述的方法, 用 50 μ l 1 mM 的心脏毒素 (Latoxan, 法国) 预处理, 但没有发现上述预处理组或未预处理组对免疫原性或保护效能有任何明显的影响。MVA 免疫小鼠可通过肌肉 (i. m.)、静脉内 (进入尾侧静脉) (i. v.)、真皮内 (i. d.)、腹膜内 (i. p.) 或皮下 (s. c.) 免疫法进行。质粒 DNA 和 MVA 免疫接种黑猩猩 H1 和 H2 在麻醉状态下由腿肌肉的肌肉免疫法进行。对这些黑猩猩的免疫接种, 质粒 DNA 和作为佐剂的 15 微克人 GM - CSF 共同施用。给黑猩猩施用重组 MVA 按兽医管理法肌肉内接种进行。重组人 GM - CSF 购自 Sandoz (Camberley, 英国)。对于用基因枪进行质粒 DNA 免疫, DNA 被沉淀到金颗粒上。至于真皮内输送, 用了 2 种不同类型的基因枪, Acell 和牛津生物科学装置 (PowerJect 药业公司, 牛津, 英国)。

ELISPOT 分析

用所示的肽表位和由 Miyahara 等 (1993) 所述的 ELISPOT 分析法, 没有用体外重新刺激的情况下确定在免疫过的小鼠脾中的 CD8+ T 细胞。简言之, 96 孔硝酸纤维素板 (Miliscreen MAHA, Millipore, Bedford, 英国) 用在 50 μ l 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 15 μ g/ml 抗小鼠干扰素 - γ 的单克隆抗体 R4 (EACC) 包被。在 4 $^{\circ}$ C 温育过夜后, 包被孔用 PBS 洗一次, 然后在室温下用 100 μ l 含 10 % FCS 的 RPMI 封闭。来自免疫过的小鼠的脾细胞被重新悬浮至 1×10^7 细胞/ml, 重复放置到包被抗体的孔中然后系列稀释。给每孔加入肽至终浓度 1 μ g/ml。没有肽的另外孔用作肽依赖的干扰素 - γ 分泌的对照。在 37 $^{\circ}$ C 5 % CO₂ 中温育 12 - 18 小时后, 克隆板用 PBS 和水洗 6 次。然后加样孔在室温下用在 PBS 中的 1 μ g/ml 生物素化的抗小鼠干扰素 - γ 单克隆抗体 XMG1.2 (Pharmingen, CA, 美国) 温育 3 小时。进一步用 PBS 洗涤后, 加 50 μ l

1 $\mu\text{g/ml}$ 的链霉亲和素碱性磷酸酶聚合物 (Sigma) 溶液, 室温温育 2 小时。反应点加 50 μl 碱性磷酸酶结合底物溶液 (Biorad, Hercules, CA, 美国) 显色。出现反应点后, 用水洗涤终止反应。反应点的数目用立体显微镜帮助下确定。

对黑猩猩外周血淋巴细胞的 ELISPOT 分析, 用非常相似的方法采用开发作检测人 CD8 T 细胞的分析法和试剂 (Mabtech, Stockholm) 进行。

CTL 分析

按 Allsopp 等 (1996) 所述的显示和培养小鼠脾细胞作效应器细胞的方法, 用铬标记的靶细胞法进行 CTL 分析。用黑猩猩或猕猴细胞的 CTL 分析按 Hill 等 (1992) 所述的检测人 CTL 的方法进行, 用 EBV 转化的自身黑猩猩或猕猴 B 细胞系作为靶细胞。

伯氏疟原虫激发

按所述的静脉内接种法 (Lanar 等, 1996), 用在 200 μl RPMI 中的伯氏疟原虫 ANKA 株的 2000 (BALB/c) 或 200 (C57BL/6) 孢子激发小鼠。这些孢子从史氏按蚊的唾液腺中解剖得到, 维持在饲养感染的小鼠后在 18 $^{\circ}\text{C}$ 下 20 - 25 天。在激发后 5 - 12 天观察所取的吉姆沙染色的血液涂片中出现伯氏疟原虫的环形, 以检测血液阶段的疟原虫感染, 有感染表明免疫接种失败。

恶性疟原虫激发

用解剖自冈比亚按蚊唾液腺的 20, 000 个恶性疟原虫 NF 54 孢子, 在麻醉状态下用静脉接种法激发黑猩猩。为了检测在外周血中出现低水平的恶性疟原虫寄生虫, 自激发后第 5 天开始, 用显微镜和寄生虫培养法每天检查来自这些黑猩猩的血液样品。

P815 肿瘤激发

通过静脉内接种法, 用在 200 μl PBS 中的 1×10^5 P815 细胞激发小鼠。监测这些动物的成活率。

流感病毒激发

通过鼻腔内接种, 用 100 血细胞凝集素单位 (HA) 的流感病毒 A/PR/8/34 激发小鼠。激发后每天给小鼠称重并监测成活率。

用四聚体确定肽特异的 CTL

由 Mamu - A* 01 - 重链和 β_2 - 微球蛋白组成的四聚体复合物按 Ogg 等 (1998) 所描述的方法制得。用 5' 引物 MamuNdeI: 5' - CCT GAC TCA GAC CAT ATG GGC TCT CAC TCC ATG [SEQ ID NO: 74] 和 3' 引物: 5' - GTG ATA AGC TTA ACG ATG ATT CCA CAC CAT TTT CTG TGC ATC CAG AAT ATG ATG CAG GGA TCC CTC CCA TCT CAG GGT GAG GGG C [SEQ ID NO: 75], 从 cDNA PCR 扩增出编码 Mamu - A* 01 MHC I 型重链的无导肽细胞外部分的 DNA。前者引物含有 NdeI 限制性位点, 后者包括 HindIII 位点和编码生物素化酶 BriA 底物肽。PCR 产物用 NdeI 和 HindIII 消化, 然后连接到细菌表达载体 pGMT7 的多连接子的相同位点。编码无导肽的 β_2 - 微球蛋白的罗猴基因从 cDNA 克隆用 PCR 扩增得到, 所用的引物 B2MBACK: 5' - TCA GAC CAT ATG TCT CGC TCC GTG GCC [SEQ ID NO: 76] 和 B2MFOR: 5' - TCA GAC AAG CTT TTA CAT GTC TCG ATC CCA C [SEQ ID NO: 77], 然后用相似的方法克隆到 pGMT7 的 NdeI 和 HindIII 位点。两条链在大肠杆菌 BL - 21 株中表达, 从包含体中纯化, 在肽 CTPYDINQM [SEQ ID NO: 54] 存在下重新折叠, 用 BirA 酶生物素化 (亲和性) 然后用 FPLC 和 monoQ 离子交换柱纯化。重新折叠生物素化的 MHC - 肽复合体的数量用 ELISA 分析法估计, 因此单聚合复合体首先通过敏感单克隆抗体 W6/32 共形成而捕获, 然后用连接有碱性磷酸酶 (AP) 的链霉亲和素 (Sigma) 及针对 AP 的化学比色底物而检测到。加连接有藻红蛋白的链霉亲和素 (ExtrAvidin; Sigma) 到重新折叠生物素化的单聚体中, 以 MHC - 肽: PE - 链霉亲和素摩尔比 4 : 1 诱导四聚复合体的形成。复合体避光贮存在 4 °C 中。这些四聚体用于分析在免疫过的猕猴外周血淋巴细胞 (PBL) 中 Mamu - A* 01/gag 特异的 CD8+ T 细胞的频率。

实施例 2

在小鼠中免疫原性的研究

诱导抗在伯氏疟原虫和约氏疟原虫的环孢子 (CS) 蛋白中的表位的 CTL 的过去研究显示, 用不同的输送系统 CTL 诱导水平有变化。据报道用质粒 DNA (Sedegah 等, 1994)、由复制性痘苗病毒促进的流感

病毒 (Li 等, 1991)、腺病毒 (Rodrigues 等, 1997) 和颗粒输送系统 (Schodel 等, 1994) 具有部分保护作用。用 50 微克编码 CS 蛋白的质粒肌内免疫小鼠, 经单次注射后小鼠的脾中产生中度水平的 CD8⁺ 细胞和 CTL 活性 (图 3, 4)。

作为比较, 用全部表达伯氏疟原虫 CSP 的 10^6 ffu/pfu 的重组痘苗病毒不同株 (WR、NYVAC 和 MVA) 静脉内注射 BALB/c 小鼠组 (n = 5)。肽特异的 CD8⁺ T 细胞频率 10 天后用 ELISPOT 分析法测定。WVA. PbCSP 诱导 181 ± 48 、而 NYVAC 221 ± 27 和 WR 94 ± 19 (平均数 \pm 标准差) 肽特异 CD8⁺ T 细胞。这些结果表明在引发 CD8⁺ T 细胞应答中, 复制受损的痘苗病毒比复制性病毒株惊人地优越。然后我们设法用同源或异源载体及质粒 DNA 或 MVA 引发诱导, 以促进这些中度的 CD8⁺ T 细胞应答。单独用 CS 重组 DNA 疫苗、单独重组 MVA 疫苗或重组 MVA 然后用重组 DNA 经 2 次免疫后观察到低水平的 CD8⁺ T 细胞 (图 3)。用重组 MVA 促进 DNA 引发的免疫应答, 观察到非常高水平的 CD8⁺ T 细胞。在第 2 次实验中每组用 10 只小鼠, 确证了 DNA/MVA 序列增强免疫原性: DNA/MVA 856 ± 201 ; MVA/DNA 168 ± 72 ; MVA/MVA 345 ± 90 ; DNA/DNA 92 ± 46 。因此用编码 CS 蛋白的重组质粒第一次免疫接着用重组 MVA 病毒第二次免疫的次序, 免疫后产生最高水平的 CD8⁺ T 淋巴细胞应答。

图 3 显示用不同的免疫方案后, 疟疾 CD8 T 细胞 ELISPOT 的数据。结果以每百万脾细胞的肽特异 T 细胞数表示。如在 X 轴所示用 PbCSP 质粒 DNA 或 PbCSP - MVA 病毒或二者的组合免疫小鼠, 以 2 周间隔为次, 对 bp 9 疟疾表位特异的脾细胞数在最后一次免疫后 2 周测定。每一个代表单个小鼠中测定的形成反应点的细胞数 (SFCs)。用质粒 DNA 引发和用重组 MVA 病毒促进诱导最高水平的 CD8⁺ T 细胞。这比相反的免疫次序 (MVA/DNA)、2 次 DNA 免疫 (DNA/DNA) 或 2 次 MVA 免疫 (MVA/MVA) 更有免疫原性。它也比同时给 DNA 和 MVA 免疫 (DNA + MVA 2w)、1 次 DNA 免疫 (DNA 4w) 或较早或较晚时间点 1 次 MVA 免疫 (MVA 2w 和 MVA 4w) 更有免疫原性。

图 4 显示用编码相同抗原的质粒 DNA 引发后, 基本上通过重组 MVA 免疫促进的疟疾 CD8 T 细胞 ELISPOT 和 CTL 水平。A 和 C. 用 γ -

干扰素 ELISPOT 分析法测定在 BALB/c 小鼠中的 CD8+ T 细胞应答, 该法用来自伯氏疟原虫 CSP 的 K^d 限制性肽 SYIPSAEKI [SEQ ID NO: 67] 和来自大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶的 L^d 限制性肽 TPHPARIGL [SEQ ID NO: 69] 计数值用对数标尺表示。B 和 D. 用常规 ⁵¹Cr 释放分析法, 用相同的肽 (1 μ g/ml) 体外重新刺激 6 天后, 在效应细胞 : 靶细胞比率为 100 : 1 时也测定来自相同小鼠的脾细胞。

用表达伯氏疟原虫 CSP 和 TRAP、单独 PbCSP、包括伯氏疟原虫 CTL 表位的疟疾表位盒 (标记为 pTH. M) 或 β - 半乳糖苷酶的质粒 DNA 免疫小鼠。1 次 DNA 免疫后 23 天测定在小鼠中的 ELISPOT 和 CTL 水平, 结果分别在 A 和 B 显示。相同的分析用接受额外的 1×10^7 ffu 表达相同抗原的重组 MVA 的动物、初次免疫后 2 周进行。在这些动物中 ELISPOT 和 CTL 水平分别在 C 和 D 显示。每一条表示来自单个动物的数据。

也进行研究包含串联排列的 HIV 和疟疾表位的表位串的免疫原性。用该表位, 当用 DNA 疫苗免疫, 接着用重组 MVA 疫苗免疫时, 再次产生最高水平的 CD8+ T 细胞和 CTL (表 4, 图 5)。

表 4 用 ELISPOT 分析法确定不同的 DNA/MVA 组合的免疫原性

第一次免疫	第二次免疫	HIV 表位	疟疾表位
DNA - HM	DNA-HM	56 \pm 26	4 \pm 4
MVA - HM	MVA-HM	786 \pm 334	238 \pm 106
MVA - HM	DNA-HM	306 \pm 78	58 \pm 18
DNA - HM	MVA-HM	1000 \pm 487	748 \pm 446
无	DNA-HM	70 \pm 60	100 \pm 10
无	MVA-HM	422 \pm 128	212 \pm 94

表 4 显示用所示的质粒 DNA 和 MVA 不同免疫方案后, 进行 ELISPOT 分析法测定针对 HIV 和疟疾表位的特异 CD8+ T 细胞水平的结果。数字为每百万脾细胞中形成反应点的细胞。HM 表位串在图 2 说明。在所有情况下用 BALB/c 小鼠。疟疾表位为 pb 9, 在图 2 和 3 所示。

HIV 表位是 RGPGRFVVTI [SEQ ID NO: 51]。免疫的剂量为 50 μ g 质粒 DNA 或 10^7 噬菌斑形成单位的重组 MVA。所有免疫在肌内进行。在所有情况下第 1 次和第 2 次免疫的间隔时间为 14 ~ 21 天。

表 5 显示使用质粒 DNA 和重组 MVA 通过各种免疫方案, 在 BALB/c 小鼠中诱导对疟疾和 HIV 表位的 CTL 应答。按表 3 相应所述的方法肌内免疫小鼠。对疟疾和 HIV 两种表位来说, 只有用质粒 DNA 引发和重组 MVA 促进后观察到高水平的 CTL (在效应细胞/靶细胞之比为 25:1 时特异裂解 > 30%)。在本实验所用的抗原是 HIV - 疟疾表位串。重组的 MVA 标记为 MVA. HM 而表达该表位串的质粒 DNA 标记为 pTH. HM。显示了在各种效应细胞与靶细胞比率的特异裂解水平。这些结果用 2 种肽 pb 9 和 RGPGRFVVTI [SEQ ID NO: 51] 体外重新刺激脾细胞 5 天后测定。

Allsopp 等 (1996) 报道比较诱导 CTL 的多种输送系统。重组的 Ty 病毒样颗粒 (Ty - VLPs) 和脂质尾巴的疟疾肽两者给出良好的 CTL 诱导率, 但 Ty - VLPs 更好因为对于良好的 CTL 诱导率它们仅需要单一的免疫剂量。然而, 正如本发明所示, 甚至 2 个剂量的 Ty 颗粒不能诱导明显的抗孢子激发的保护作用 (表 7, 第一行)。用编码伯氏疟原虫环孢子蛋白的修饰过的重组疫苗 Ankara 病毒免疫也产生良好水平的 CTL。然而, 通过用 Ty - VLP 第 1 次免疫接着用 MVA CS 疫苗第 2 次免疫, 可获得更高水平的 CD8+ T 细胞应答 (表 5)。

表 5 由 ELISPOT 和 CTL 分析法确定的各种 Ty - VLP/MVA 组合的免疫原性

第 1 次免疫	第 2 次免疫	ELISPOT 数	% 特异裂解
Ty-CABDH	Ty-CABDH	75	15
MVA. PbCSP	MVA. PbCSP	38	35
Ty-CABDH	MVA. PbCSP	225	42
Ty-CABDH	MVA. HM	1930	未做

表 5 用所示的 Ty-VLPs 和重组 MVA 病毒不同免疫方案接种后, 进行 ELISPOT 和 CTL 分析而测定对疟疾表位 pb 9 特异的 CD8+ T 细胞水平的结果。CTL 和 ELISPOT 数据来自不同实验。根据未重新刺激的细胞测定 ELISPOT 水平 (每百万淋巴细胞的反应点数), 而用 pb 9 肽体外重新刺激 5 - 7 天的细胞, 以效应细胞与靶细胞之比 40 : 1 测定 CTL 活性, 结果以特异裂解表示。2 种数据代表 3 只小鼠的平均水平。在所有情况下用 BALB/c 小鼠。免疫剂量为 50 μ g Ty - VLP 或 10^7 ffu (转化灶形成单位) 的重组 MVA。所有免疫接种为肌肉内。第 1 次和第 2 次免疫的时间间隔为 14 ~ 21 天。MVA.HM 包括盒 CAB。

通过基因枪输送 DNA 引发免疫应答和用重组 MVA 促进免疫原性和激发

研究了应用基因枪真皮内输送质粒 DNA, 因而引发免疫应答及用重组 MVA 促进。用下列的方案免疫 BALB/c 小鼠组。

I) 以 2 周间隔用 pTH. PbCSP (每次免疫 4 mg) 进行 3 次基因枪免疫

II) 2 次基因枪免疫, 接着 2 周后静脉注射 MVA

III) 一次肌内 DNA 免疫, 接着 2 周后静脉注射 MVA

3 种免疫方案的免疫原性用 ELISPOT 分析法分析。用 2 次基因枪免疫接着静脉注射 MVA 促进和肌内 DNA 注射接着静脉注射 MVA, 观察到最高频率的特异 T 细胞 (图 6)。

图 6 显示用不同的免疫方案接种后进行 ELISPOT 分析所测定的特异 CD8+ T 细胞水平的结果。如所示的方法免疫 BALB/c 小鼠组 (n = 3) (g. g. = 基因枪)。所有免疫时间为 14 天。最后一次免疫后 2 周进行 ELISPOT 分析。

在不同小鼠品系中对相同抗原的 CTL 诱导

为说明如上所述用 2 种 CTL 表位, 来源于伯氏疟原虫 CSP 的 SYIPSAEKI [SEQ ID NO: 67] 和来源于 HIV 的 RGPGRFVVTI [SEQ ID NO: 68] 在 BALB/c 小鼠中产生的促进效应是否普遍现象的问题, 进行了 2 组实验。在 5 种近交的小鼠品系中研究对流感病毒核蛋白的 CTL 应答。在第一次实验中研究了 3 种来源于流感病毒核蛋白的文献发表的鼠 CTL 表位 (见表 3)。用 3 种不同 H - 2 单倍型, BALB/c 和 DBA/2

(H-2^d)、C57BL/6 和 129 (H-2^b)、CBA/J (H-2^k) 的小鼠。一组动物以 2 周间隔用编码流感病毒核蛋白的质粒 V1J - NP 免疫 2 次。另一组相同的动物用 V1J - NP 引发, 2 周后用 10⁶ ffu 表达流感病毒 NP 的 MVA.NP 静脉内促进。在单个小鼠中的 CTL 水平用 ⁵¹Cr - 释放分析法, 用肽重新刺激的脾细胞测定。如图 7 中所示, 在所有分析过的小鼠品系中, DNA 引发/MVA 促进免疫方案诱导较高水平的裂解并且超过 2 次 DNA 注射的效果。

图 7 显示在不同的小鼠品系中抗流感病毒 NP 的 CTL 应答。不同品系的小鼠以 2 周间隔用编码流感病毒核蛋白的 DNA 疫苗 V1J - NP 免疫 2 次 (空心圆), 或者用相同的 DNA 疫苗引发然后 2 周后用表达流感病毒核蛋白的重组 MVA 促进 (实心圆)。最后一次免疫后 2 周, 用各种肽 (表 3) 体外重新刺激脾细胞。CTL 活性用标准 ⁵¹Cr - 释放测定法用 MHC I 型匹配的靶细胞测定。

在不同小鼠品系中对不同抗原的 CTL 诱导

用不同的抗原和不同的近交小鼠品系, 进一步研究 MVA 促进对质粒 DNA 引发的免疫应答的影响。不同品系的小鼠用 2 种 DNA 免疫法用不同的抗原免疫并且和 DNA/MVA 免疫法相比较所用的抗原是大肠杆菌 - 半乳糖苷酶、疟疾/HIV 表位串、鼠肿瘤表位串和恶性疟原虫 TRAP。与 2 次 DNA 免疫相比较, 在所有试验的不同小鼠品系和抗原组合中, DNA 引发/MVA 促进方案诱导更高水平的 CTL (图 8)。

图 8 显示在不同近交小鼠品系中诱导的抗不同抗原的 CTL 应答。小鼠以 2 周间隔用 2 次 DNA 疫苗免疫法免疫 (空心圆), 或者用 DNA 疫苗引发 2 周后, 用表达相同抗原的重组 MVA 促进 (实心圆)。所用的品系和抗原为: 在 A 中, C57BL/6, 疟原虫 TRAP; 在 B 中, DBA/2, 大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶; 在 C 中, BALB/c, 抗疟疾肽 (pb 9) CTL 活性的 HM 表位串; 在 D 中, DBA/2, 抗 pb 9 CTL 活性的 HM 表位串; 在 E 中, BALB/c, 抗 HIV 肽 CTL 活性的 HM 表位串; 在 F 中, DBA/2, 抗 HIV 肽 CTL 活性的 HM 表位串; 在 G 中, BALB/c, 抗衍生于 P1A 的肽 CTL 活性的肿瘤表位串。肽表位的序列在表 3 显示。每一条曲线显示各个小鼠的数据。

孢子能有效地引发能由 MVA 促进的免疫应答

生活在疟疾流行区的人群不断地接触疟原虫的侵入。在这些天然接触过的个体中发现低水平的疟疾特异 CTL。为说明低水平孢子诱导 CTL 应答是否能够通过 MVA 促进的问题, BALB/c 小鼠被照射过的伯氏疟原虫孢子(预防疟疾感染)免疫,然后用 MVA 促进。最后一次免疫后 2 周,重新刺激脾细胞,然后测定裂解活性。用 50 或 300 + 500 个孢子 2 次注射诱导非常低或无法检测的裂解水平。用 MVA 促进诱导高水平的肽特异 CTL。单独 MVA 仅诱导中度的裂解水平(图 9)。

图 9 显示孢子引发的 CTL 应答基本上被 MVA 所促进。在 A 中,用 2 种低剂量(50 + 50)照射过的孢子免疫小鼠。在 B 中,用 2 种高剂量(300 + 500)的孢子免疫;在 D 中,低剂量孢子引发后用 MVA. PbCSP 促进的小鼠;在 E 中用高剂量孢子引发。在 C 中显示用 MVA. PbCSP 免疫后的 CTL 应答。

重组的腺病毒作为引发剂

用质粒 DNA 和重组 Ty - VLP 作为引发剂实例说明引发 - 促进免疫方案。在此提供用非复制性腺病毒作为引发剂的一个实施例。用表达大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶(Adeno - GAL)的复制缺陷重组腺病毒。BALB/c 小鼠组用质粒 DNA 接着用 MVA 免疫或先用腺病毒接着用 MVA 免疫。所用的所有输送系统编码大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶。用质粒 DNA 或腺病毒引发然后用 MVA 促进的 CTL 应答诱导相似水平的 CTL(图 10)。

图 10 显示用质粒 DNA 或重组腺病毒引发,然后用 MVA 促进的 CTL 应答。BALB/c 小鼠组(n = 3)用质粒 DNA A 或表达 β - 半乳糖苷酶的重组腺病毒 B 引发。质粒 DNA 肌肉内施用, MVA 静脉内施用而腺病毒真皮内施用。最后一次免疫后 2 周用肽 TPHPARIGL [SEQ ID NO: 69] 重新刺激脾细胞。CTL 活性用肽标记 P815 细胞测定。

DNA 引发疫苗病毒促进方案的免疫原性依赖于所用的疫苗病毒株的复制能力

用不同的重组疫苗病毒株检验引发促进策略,以确定其复制能力有差异的不同病毒株是否在可能促进 DNA 引发的 CTL 应答有差异。与用相同剂量的能复制的 WR 疫苗病毒促发后的 CTL 应答相比较,用复制缺陷的重组疫苗病毒如 MVA 和 NYVAC 促进导致诱导更强的 CTL 应答(图

11)。

图 11 显示在 BALB/c 小鼠中用质粒 DNA 引发接着用不同的重组痘苗病毒促进的 CTL 应答。所述的动物用 pTH. PbCSP 50 μ g/鼠肌内注射引发, 2 周后用不同的表达 PbCSP 的重组痘苗病毒株(每小鼠静脉内注射 10^6 pfu)促进。不同的重组痘苗病毒株在 A 为 MVA; 在 B 为 NYVAC 而在 C 为 WR。在进一步的实验中发现复制受损的痘苗病毒株比复制性病毒株的优越性。BALB/c 小鼠组 (n = 6) 用 50 μ g/动物的 pSG2. PbCSP (肌内注射) 引发, 10 天后用 10^6 ffu/pfu 的表达 PbCSP 的重组 MVA、NYVAC 和 WR 静脉内注射促进。用 ELISPOT 分析法确定肽特异的 CD8+ T 细胞的频率。该频率为: MVA 1103 +/- 438, NYVAC 826 +/- 249 和 WR 468 +/- 135。因此用 CTL 和 ELISPOT 两种分析法作为 CD8 T 细胞免疫原的测定法, 观察到与能复制的病毒株相比复制受损的痘苗病毒株惊奇的基本上较强的免疫原性。

应用重组的金丝雀或禽痘病毒促进 CD8+ T 细胞应答

用过去所描述过的穿梭载体 (Taylor 等, 病毒学 1992, 187: 321 - 328 和 Taylor 等, 疫苗 1988, 6: 504 - 508), 制得重组的金丝雀痘病毒 (rCPV) 或禽痘病毒 (rFVP)。针对这些穿梭载体的策略是以痘苗病毒特异的启动子在前插入编码目的蛋白的基因, 所述的启动子位于包括来源于 CPV 或 FPV 基因组序列的 2 个侧翼之间。选择这些侧翼序列是为了避免插入到必需的病毒基因中。在允许的鸟类细胞系即原代鸡胚成纤维细胞中, 通过体内重组产生重组的 CPV 或 FPV。用禽痘病毒或金丝雀痘病毒能表达任何抗原或表位串的蛋白序列。重组的 CPV 或 FPV 的特征为, 用抗原特异的抗体或包括进入重组基因的抗体表位表达目的蛋白。重组的病毒生长在原代 CEF 中。按材料和方法中所述的方法, 用质粒 DNA 引发免疫应答。该质粒 DNA 引发的免疫应答用 10^7 ffu/pfu 的 rCPV 或 rFVP 静脉内、真皮内或肌内接种促进。监测 CD8+ T 细胞应答并按本发明所述的方法进行激发。

实施例 3

在小鼠中研究疟疾激发

为估测诱导 CD8+ T 细胞应答水平的保护性效能, 用 2000 或 200 个

伯氏疟原虫子孢子经静脉内注射免疫激发 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠。这导致由孢子对肝细胞的感染。然而，在足够强的抗肝内寄生虫的 T 淋巴细胞应答存在下，没有活的寄生虫能离开肝脏并且也检测不到血液阶段的寄生虫。因此，激发后 5 - 12 天通过显微镜评价来自激发小鼠血涂片的寄生虫。

用分别编码伯氏疟原虫的 CS 蛋白和 TRAP 抗原的 2 种质粒 DNAs 混合物 2 次免疫过的 BALB/c 小鼠，不能保护抵抗孢子激发。用编码相同的 2 种抗原的重组 MVA 病毒混合物 2 次免疫过的小鼠不能保护抵抗孢子激发。第一次用 2 种 MVAs 和第二次用 2 种重组质粒免疫的小鼠也不能保护抵抗孢子激发。然而，第一次用 2 种质粒 DNAs 和第二次用 2 种重组的 MVA 病毒免疫的全部 15 只小鼠完全抗孢子激发（表 6A 和 B）。

为评价所观察到的保护作用是否由于对 CS 抗原或对 TRAP 或对二者抗原的免疫应答，于是各自用每种抗原免疫各组小鼠（表 6B）。第一次用 CS 质粒 DNA 和第 2 次用 CS MVA 病毒免疫的所有 10 只小鼠完全保护抵抗孢子激发。第一次用 TRAP 质粒 DNA 疫苗和第二次用 TRAP MVA 病毒免疫的 16 只小鼠，其中 14 只保护抵抗孢子激发。因此，当采用上述的免疫方案时，单独的 CS 抗原就有完全保护性而用相同的方案 TRAP 抗原基本上有保护性。

在诱导 CD8+ T 淋巴细胞应答水平和所观察到的保护作用之间的良好相关性，强烈暗示 CD8+ 应答是所观察到的保护作用的可靠原因。在以前过继转移实验中已经阐明，抗伯氏疟原虫 CS 蛋白中主要 CD8+ T 细胞表位的 CD8+ T 淋巴细胞克隆能保护抵抗孢子激发。为确定所诱导的保护作用是否确实由针对该表位的 CD8+ T 细胞所介导，我们于是采用质粒 DNA 和编码来自伯氏疟原虫仅 9 个氨基酸序列作为部分表位串的重组 MVA（表 6B）。（所有其他表位来源于不是伯氏疟原虫的微生物）。第一次用编码上述表位串的质粒和第二次用也编码具有伯氏疟原虫 CTL 表位的表位串的重组 MVA 免疫的 10 只小鼠，引起完全免受孢子激发的保护作用。因此，所诱导的保护免疫应答应该是 CTL 应答，该应答靶向所述的九肽序列。

表 6 用不同的 DNA 和 MVA 疫苗组合得到的小鼠激发实验的结果

第 1 次免疫	第 2 次免疫	感染数/激发数	% 保护作用
A. 所用的抗原: PbCSP + PbTRAP			
DNA	DNA	5/5	0 %
MVA	MVA	9/10	10 %
DNA	MVA	0/5	100 %
MVA	DNA	5/5	0 %
用β - 半乳糖苷酶免疫的对照小鼠			
DNA	DNA	5/5	0 %
MVA	MVA	5/5	0 %
DNA	MVA	5/5	0 %
MVA	DNA	5/5	0 %
B.			
DNA (CSP+TRAP)	MVA (CSP+TRAP)	0/10	100 %
DNA (CSP)	MVA (CSP)	0/10	100 %
DNA (TRAP)	MVA (TRAP)	2/16	88 %
DNA (表位)	MVA (表位)	0/11	100 %
DNA (β -gal)	MVA (β -gal)	6/7	14 %
无	无	9/10	10 %

表 6 所示的用质粒 DNA 和 MVA 的不同免疫方案进行 2 次激发实验的结果 (A 和 B)。免疫的剂量为 50 μ g 的质粒 DNA 或 10^6 ffu 的重组 MVA。在所有情况下, 第 1 次免疫和第 2 次免疫的时间间隔为 14 ~ 21 天。在最后一次免疫后 18 - 29 天通过静脉注射 2000 个伯氏疟原虫的子孢子进行激发, 然后在激发后 5、8 和 10 天评价血涂片。CSP 和 TRAP 表示为完全的伯氏疟原虫抗原而 ‘表位’ 表示在表 1 所示的仅含有单一伯氏疟原虫 K^d - 限制性九肽 CTL 表位的表位盒。注意在实验 B 中,

单独用表位串免疫产生 100 % 保护作用。

用编码 pb 9 的重组 Ty - VLPs 2 次免疫过的小鼠完全对感染敏感。相似地，用编码整个 CS 蛋白的重组 MVA 2 次免疫过的小鼠完全对感染敏感。然而，用 Ty - VLP 免疫一次接着用重组的 MVA 免疫一次的小鼠，当用表达全长的 CS 蛋白的 MVA 促进时显示为降低 85 % 的疟疾发生率，而当用表达包括 pb 9 的 HM 表位串的 MVA 促进时降低 95 % 的疟疾发生率（表 7）。

表 7 用 Ty - VLPs 和 MVA 的不同免疫方案得到的激发实验结果

第 1 次免疫	第 2 次免疫	感染数/激发数	% 保护作用
Ty-CABDHFE	Ty-CABDHFE	7/8	13 %
Ty-CABDH	MVA. PbCSP	2/13	85 %
Ty-CABDHFE	MVA-NP	5/5	0 %
MVA. PbCSP	MVA. PbCSP	6/6	0 %
MVA. HM	Ty-CABDHFE	14/14	0 %
Ty-CABDHFE	MVA. HM	1/21	95 %
无	MVA. HM	8/8	0 %
无	无	11/12	9 %

表 7 所示的用 Ty - VLPs 和 MVA 的不同免疫方案得到的激发实验结果。在所有情况下用 BALB/c 小鼠。静脉内施用 50 μ g Ty - VLP 或 10^7 ffu 的重组 MVA 进行免疫。在所有的情况下，第 1 次和第 2 次免疫的时间间隔为 14 - 21 天。最后一次免疫后 18 - 29 天通过静脉注射 2000 个伯氏疟原虫子孢子进行激发，激发后 5、8 和 10 天评价血涂片。CSP 表示完全的伯氏疟原虫抗原。Ty - VLPs 携带在表 1 所述的表位盒 CABDH 或 CABDHFE。MVA. HM 包括盒 CAB。

为确定所观察到的用重组 MVA 促进的增强免疫原性和保护效能是否对该特殊的疟疫苗病毒株是唯一的或可由其他重组疟疫苗病毒承担，进行了下列的实验。小鼠用编码伯氏疟原虫 CS 蛋白的 DNA 疫苗免疫，然后

用 (i) 编码该抗原的重组 MVA ; (ii) 编码相同抗原的重组野生型痘苗病毒 (西方保存株) (Satchidanandam 等, 1991) 或 (iii) 编码相同疟疾抗原的重组 NYVAC (COPAK) 病毒 (Lanar 等, 1996) 促进。用 MVA 重组体促进观察到最高程度的保护作用, 为 80 % (表 8)。用野生型重组痘苗病毒促进观察到非常低水平的保护作用 (10 %) 而用 NYVAC 重组体促进观察到明显水平的保护作用, 为 60 %。因此我们所描述的引发 - 促进方案可用任何非复制性痘苗病毒株诱导保护效能。MVA 重组体和 NYVAC 两者比 WR 株重组体明显更好 (每种均 $P < 0.05$)。

表 8 用不同的痘苗病毒株重组体促进的 DNA 的激发数据结果

第 1 次免疫	第 2 次免疫	感染数/激发数	% 保护作用
DNA- β gal.	MVA. NP	8/8	0 %
DNA-CSP	MVA-CSP	2/10	80 %
DNA-CSP	WR-CSP	9/10	10 %
DNA-CSP	NYVAC-CSP	4/10	60 %

表 8 所示的用质粒 DNA 和各种痘苗病毒重组体的不同免疫方案得到的激发实验的结果。在所有情况下用 BALB/c 小鼠。免疫的剂量为 50 μ g 质粒 DNA 或 10^6 ffu/pfu 的重组 MVA 或 10^4 ffu/pfu 的重组野生型 (WR) 痘苗病毒或 10^6 ffu/pfu 的重组 NYVAC。由于 WR 株能在宿主中复制而其他病毒株不能, 在本实验中用低剂量的 WR。第 1 次和第 2 次免疫的间隔时间为 23 天。最后一次免疫后 28 天通过静脉注射 2000 个伯氏疟原虫子孢子进行激发, 激发后 7、9 和 11 天评价血涂片。pbCSP 表示为完全的伯氏疟原虫抗原而 NP 表示流感病毒的核蛋白抗原 (用作对照抗原)。用表达 β - 半乳糖苷酶而不显疟疾抗原的质粒 DNA 载体第 1 次免疫 A 组小鼠。

在表 8 所示的进一步实验中, 小鼠被编码伯氏疟原虫 CS 蛋白的 DNA 疫苗免疫, 然后用 (i) 编码该抗原的重组 MVA ; (ii) 编码相同抗原的重组 WR 痘苗病毒或 (iii) 编码相同疟疾抗原的重组 NYVAC

(COPAK) 病毒促进, 所有的剂量为 10^6 ffu/pfu。用重组 NYVAC (80%) 或重组 MVA (66 %) 观察到高并且统计学上明显程度的保护作用。用 WR 重组痘苗病毒促进观察低和不明显水平的保护作用 (26%) (表 9)。MVA 和 NYVAC 每一种促进比 WR 促进给出更明显的保护作用 (分别为 $P = 0.03$ 和 $P = 0.001$)。这些数据重新强调非复制的痘病毒株是诱导高水平保护作用的较好促进剂。

表 9 不同的重组痘苗病毒株对保护作用的影响

第 1 次免疫	第 2 次免疫	感染数/激发数	% 保护作用
DNA			
CSP	MVA. PbCSP	5/15	66
CSP	NYVAC. PbCSP	2/15	80
CSP	WR. PbCSP	11/15	26
β -半乳糖苷酶	MVA. NP	8/8	0

表 9 用质粒 DNA 和作为促进免疫的不能复制的痘苗重组体的不同免疫方案得到的激发实验结果。在所有情况下用 BALB/c 小鼠。免疫的剂量为 $50 \mu\text{g}$ 的质粒 DNA 或 10^6 ffu/pfu 的重组 MVA 或重组野生型 (WR) 痘苗病毒或重组 NYVAC。第 1 次和第 2 次免疫的间隔时间为 23 天。最后一次免疫后 28 天通过静脉注射 2000 个伯氏疟原虫子孢子进行激发, 激发后 7, 9 和 11 天评价血涂片。PbCSP 表示整个伯氏疟原虫抗原而 NP 表示流感病毒的核蛋白抗原 (用作对照抗原)。对照免疫用表达 β - 半乳糖苷酶的质粒 DNA 载体接着用 MVA NP 进行。

用重组 MVA 促进免疫应答的不同途径

重组 MVA 静脉内注射并不是免疫人类的优选途径, 并且在大规模免疫中也不方便。因此用 MVA 促进的不同途径以检验其免疫原性和保护性效能。小鼠用质粒 DNA 肌内注射引发, 2 周后经下经途径: 静脉内 (i. v.)、皮下 (s. c.)、腹膜内 (i. p.)、肌肉内 (i. m.) 和真皮内 (i. d.), 用 MVA 促进它们。该促进 2 周后用 ELISPOT 测定法确定肽特异的 CD8+ T 细胞。诱导该细胞最高水平的最有效途径是 i. v. 和 i. d. 接种

MVA。其它途径引起中度至弱的应答（图 12）。

图 12 显示经不同途径的 MVA 促进后肽特异的 CD8+ T 细胞的频率。结果从每一百万脾细胞的斑点形成细胞（SFC）数表示。小鼠用质粒 DNA 引发然后 2 周后经所示的途径用 MVA 促进。最后一次免疫后 2 周，用 INF- γ -ELISPOT 法确定对 SYIPSAEKI [SEQ ID NO: 67] 肽特异的脾细胞数。每条代表来自单独分析的 3 只小鼠的 SFCs 平均数。

在一激发实验中经静脉内途径的促进与真皮内和肌肉内途径进行比较。真皮内途径引起高水平的保护作用（80% 保护作用）。在经肌肉内途径促进的动物组中，50% 的动物受到保护。用 MVA 静脉内施用获得完全的保护作用（表 10）。

表 10 MVA 施用途径对保护效能的影响

第 1 次免疫作用 DNA	第 2 次免疫作用 MVA	感染数/激发数	% 保护作用
CSP	CSP i. v.	*0/20	100
CSP	CSP i. d.	2/10	80
CSP	CSP i. m.	5/10	50
表位	表位 i. v.	1/10	90
NP	NP i. v.	10/10	0

* 来自 2 次独立实验的累积数据

表 10 用不同途径的 MVA 促进免疫的激发实验结果。动物通过肌肉内注射质粒 DNA 被引发，2 周后用所示的重组 MVA（ 10^6 ffu/小鼠）经所示的途径施用。最后一次免疫后 16 天，用 2000 个伯氏疟原虫子孢子激发小鼠，激发后第 8 和第 10 天筛选血阶段的寄生物血症。

DNA 引发的其他途径：用基因枪引发肽特异的 CD8+ T 细胞

作为实例在 Eisenbraun 等，DNA 细胞生物学 1993，12：791 - 797 和 Degano 等，疫苗 1998，16：394 - 398 中详细描述基因枪输送法。

到此为止描述的用质粒 DNA 引发免疫应答的小鼠疟疾激发实验用

肌肉骨注射质粒 DNA。用 Biolistic 装置真皮内输送 DNA 是另一种引发特异的 CTL 应答的途径。质粒 DNA 被包被到金颗粒上，然后用基因枪真皮内输送。单独用基因枪以 2 周间隔免疫小鼠组 (n = 10) 3 次 (4 μ g/每次免疫)，用基因枪接着用静脉内 MVA. PbCSP 促进免疫 2 次，或者用 50 μ g pTH. PbCSP 肌肉内免疫，2 周后用 MVA. PbCSP 静脉内促进。最后一次免疫后 2 周，所述的动物被 2000 个子孢子激活，以评价每种免疫方案的保护效能。在接受 2 次基因枪免疫后静脉内 MVA 促进的组中，10 只动物中有一只出现血液阶段寄生物血症 (90% 的保护作用)。用肌肉内 DNA 引发然后静脉注射 MVA 促进的组中观察到完全的保护作用。用基因枪免疫 3 次的 10 只动物，其中 7 只被感染 (30% 的保护作用) (表 11)。

第 1 次免疫 DNA	第 2 次免疫	第 3 次免疫	感染数/ 激发数	% 保护作用
基因枪 DNA	基因枪 DNA	基因枪 DNA	7/10	30
基因枪 DNA	基因枪 DNA	MVA. PbCSP	1/10	90
-	DNA i. m	MVA. PbCSP	0/10	100
首次组			10/10	0

表 11 比较不同的 DNA 引发途径 (用基因枪真皮内输送相对于肌肉内针头注射) 的激发实验结果。按所示的方法免疫 BALB/c 小鼠组 (n = 10)。每次基因枪免疫表真皮内输送 4 μ g 的质粒 DNA。对于肌肉内免疫，注射 50 μ g 的质粒 DNA。最后一次免疫后 20 天，按以前所描述的方法激发小鼠。

保护高度敏感的 C57BL/6 小鼠

C57BL/6 小鼠对伯氏疟原虫子孢子激发非常敏感。用 DNA - MVA 引发促进方案及用两种前红细胞抗原 PbCSP 和 PbTRAP 免疫 C57BL/6 小鼠，每只鼠用 200 或 1000 个感染性子孢子激发 (200 个子孢子相当于在该品系诱导感染所需的剂量 2 倍以上)。用 200 个子孢子激发的所有 10 只小鼠表现为使激发不起作用的免疫性。甚至用 1000 个子孢子激发的组中，60% 的小鼠受到保护 (表 12)。所有首次组 C57BL/6 小鼠激发

后被感染。

表 12 孢子激发 C57BL/6 小鼠的保护作用

	动物感染数/激发数	% 保护作用
1000 只孢子 DNA		
然后用 MVA	4/10	60
首次组	5/5	0
200 只孢子 DNA		
然后用 MVA	0/10	100
首次组	5/5	0

表 12 用 C57BL/6 小鼠的激发实验结果。用 DNA 接着用 MVA 引发促进方案及用 PbCSP 和 PbTRAP 免疫动物。14 天后按所示的方法用伯氏疟原虫子孢子激发小鼠。

实施例 4

在小鼠 2 种进一步的疾病模型中 DNA 引发/MVA 促进方案的保护效能

下列免疫原性研究中，在 2 种另外的小鼠激发模型中检测到 DNA - 引发 MVA - 促进方案的保护效能。2 种激发模型是 P815 肿瘤模型和 A 型流感病毒激发模型。在 2 种模型系统中显示 CTL 介导保护作用。

P815 肿瘤激发：

用 DNA 接着用表达肿瘤表位串或 HM 表位串的 MVA 的组合免疫 DBA/2 小鼠组 (n = 10)。最后一次免疫后 2 周静脉内给予 10^5 P815 细胞激发小鼠。该激发后，定期监测小鼠出现肿瘤相关的特征和成活率。

图 13 显示 2 组小鼠的成活率。激发后 60 天用肿瘤表位串免疫的组中，10 只小鼠其中 8 只仍成活。在用 HM 表位串免疫的组中，仅 2 只动物存活。该结果具有统计学显著性：2/10 相对于 8/10 卡方 = 7.2，P = 0.007。与用 HM 表位串免疫的组相比较，在用肿瘤表位串免疫的动物组中死亡的出现时间被延迟。

流感病毒激发:

BALB/c 小鼠被用质粒 DNA 3 次基因枪免疫、2 次肌肉内质粒 DNA 注射免疫、1 次肌肉内 DNA 注射接着 1 次静脉内 MVA. NP 促进免疫、或 2 次基因枪免疫接着 1 次 MVA. NP 静脉内促进。质粒 DNA 和重组的 MVA 表达流感病毒核蛋白。最后一次免疫后 2 周鼻内用流感 A/PR/8/34 病毒 100 HA 激发小鼠。激发后每天监测所述动物的成活率。

在下列动物组中观察到完全保护作用

- 2 次基因枪免疫接着 1 次 MVA. NP 静脉内促进。
- 1 次肌肉内 DNA 注射接着 1 次 MVA. NP 静脉内促进
- 2 次肌肉内 DNA 注射。

用基因枪 3 次免疫的动物组中, 71 % 的动物成活 (5/7) 而与对照组相比该差异值无统计学显著性 ($P > 0.05$)。在首发组中 25 % 的动物存活 (图 14) , 该组与完全保护的 2 组差异显著 ($P < 0.05$)。

图 14 显示流感病毒激发实验的结果。按所示的方法免疫 BALB/c 小鼠。GG = 基因枪免疫、im = 肌肉内注射、iv = 静脉内注射。激发后每天监测动物的成活率。

在第二次实验中以 10 只为一组的 BALB/c 小鼠用单独 MVA. NP 静脉内免疫, 用基因枪 3 次免疫, 2 次用基因枪接着一次 MVA. NP 静脉内促进和 2 次肌肉内注射 V1J - NP 接着一次 MVA. NP 促进免疫。最后一次免疫后 2 周, 小鼠用 100 HA 单位的流感 A/PR/8/34 病毒激发。

在下列动物组中观察到完全和统计学显著的保护作用:

- 2 次基因枪免疫接着一次 MVA. NP 促进。
- 2 次肌肉内注射 MVA. NP, 接着一次 MVA. NP 促进。

在接受一次 MVA. NP 静脉内注射的组中, 30 % 的动物 (10 只中有 3 只) 存活。通过基因枪用 DNA 疫苗免疫 3 次的组中, 70 % 的动物受到保护, 但该保护作用与首发组对照比较没有明显的差异。在本次激发实验中, 40 % (10 只中有 4 只) 的首发组动物在激发后存活。

实施例 5

在非人灵长类中的免疫原性研究

在非人灵长类中引发促进方案的免疫原性和保护效能

为了显示在小鼠中观察到的 DNA 引发/MVA 促进方案的强免疫原性转变成在灵长类中的强免疫原性, 在猕猴中检测了该方案。在质粒 DNA 或 MVA 中的由来自 HIV 和 SIV 序列 (图 2) 的 CTL 表位串组成的疫苗分别称为 DNA.H 和 MVA.H。在多表位串中应用限定的 CTL 表位可允许在猕猴中检测对 SIV 特异的 CTL。由于抗原肽的 MHC I 型的限制性, 选择的猕猴为 MHC I 型单位型和 Mamu - A*01 阳性的动物, 用于所描述的实验。

用下列的免疫免疫 3 种动物 (CYD、DI 和 DORIS):

第 0 周 DNA (8 μ g, i. d., 基因枪)

第 8 周 DNA (8 μ g, i. d., 基因枪)

第 17 周 MVA (5×10^8 pfu, i. d.)

第 22 周 MVA (5×10^8 pfu, i. d.)

在实验的第 0、2、5、8、10、11、17、18、19、21、22、23、24 和 25 周抽取每只动物的血液。用 2 种不同的方法监测动物中诱导的 CTL。分离自每只动物血液的 PBMC 在体外用编码表位串的肽重新刺激, 然后用铬释放细胞毒性分析法检测其对自体负载肽的靶细胞的能力。另外, 用四聚体法对新鲜分离的 PBMC 染色, 以测定抗原特异的 CD8+ T 细胞。

用四聚体染色法 2 次基因枪免疫后检测到非常低水平的 CTL (图 15)。第 1 次 MVA 促进后 2 周, 通过四聚体染色法检测到所有 3 种动物出现肽特异的 CTL (图 15)。这可从体外重新刺激后检测到的中度 CTL 应答反映出来 (图 16, 第 19 周)。用 MVA.H 第 2 次促进诱导非常高水平的特异抗原 CD8+ T 细胞 (图 15) 以及也诱导非常高水平的肽特异杀伤性 T 细胞 (图 16, 第 23 周)。

图 15 显示用四聚体检测 SIV 特异的 MHC I 型限制性 CD8+ T 细胞。3 只 Mamu - A*A01 阳性猕猴按所示的方法用质粒 DNA (基因枪) 接着用 MVA 促进免疫。经 FACS 分析后确定 Mamu - A*A01/CD8 双阳性 T 细胞的百分率。每一条代表在所示的时间点对 Mamu - A*01/gag 表位特异的 CD8+ T 细胞的百分率。CD8 T 细胞的百分之一相当于大约 $5000/10^6$ 外周血淋巴细胞。因此在这些猕猴的外周血中表位特异 CD8 T 细胞的水平, 至少与在疟疾研究中免疫并受到保护的小鼠脾中所观察中

的水平一样高。

图 16 显示在猕猴中 DNA/MVA 免疫后 CTL 诱导。在第 18、19 和 23 周从 3 种不同的猕猴 (CYD、DI 和 DORIS) 分离 PBMC, 然后用肽 CTPYDINQM [SEQ ID NO: 54] 体外重新刺激。用肽 CTPYDINQM [SEQ ID NO: 54] 重新刺激 2 次后, 检测培养物中对肽刺激自体靶细胞的裂解活性。观察到强 CTL 活性。

实施例 6

在黑猩猩中的免疫原性和激发研究

为了表明用质粒 DNA 初次免疫接着用重组 MVA 免疫的相似方案能在较高等的灵长类中有效地抗恶性疟原虫, 用 2 只黑猩猩进行免疫和激发研究。黑猩猩 H1 接受 500 μg 质粒的初次免疫, 该质粒表达从 CMV 启动子开始没有内含子 A 的恶性疟原虫 TRAP、CMV - TRAP。黑猩猩 H2 接受相同剂量的 CMV - LSA - 1, CMV - LSA - 1 表达恶性疟原虫 LSA - 1 基因的 C - 末端部分。在接下去的 2 个月 2 只黑猩猩接受多于 3 次的免疫, 但每次免疫接种 3 种质粒。H1 接受前面所述的 CMV - TRAP, 加上 pTH - TRAP, pTH - TRAP 用具有内含子 A 的 CMV 启动子表达 TRAP, 这样可表达更高的水平。H1 也接受从 RSV 启动子开始表达 LSA - 1 的 C 末端部分的 RSV - LSA - 1。在第 2、3 和 4 次免疫时, H2 接受 CMV - LSA - 1、pTH - LSA-1t RSV-TRAP。所用的剂量始终是每种质粒 500 μg 。

接着发现 RSV 质粒不表达在其中含有的抗原, 因此 H1 仅用表达 TRAP 的质粒免疫, 而 H2 用表达 LSA - 1 的质粒免疫。

在这些 DNA 免疫的之间和之后, 在几个时间点进行细胞免疫应答的测定, 在第 4 次 DNA 免疫后的 3 个月进行最后一次测定, 但用 ELISPOT 分析法或用于 CD8+ T 细胞的 CTL 分析法未检测到对疟疾特异的 T 细胞。

接着在 6 周时间内 2 只动物用 3 次剂量的 10^8 ffu 编码恶性疟原虫 TRAP 抗原的重组 MVA 病毒免疫。在第 3 次 MVA 免疫刚开始前和之后, 用整个 TRAP 蛋白结合到乳胶珠上的 ELISPOT 分析法, 在 2 只黑猩猩中能检测到对 TRAP 抗原的 T 细胞应答。该分析法检测 CD4 + 和

CD8+ T 细胞应答。在 2 只免疫过的黑猩猩中用系列的 8 - 11 个氨基酸的短肽寻找特异的 CD8+ T 应答。对 CD8+ T 细胞应答的上述分析显示仅在黑猩猩 H1 中能检测到 CD8+ T 细胞。这些 CD8+ T 淋巴细胞的靶表位是来自 TRAP, tr57 序列 KTASCGVWDEW [SEQ ID NO: 78] 的 11 个氨基酸肽。这些来自 H1 的 CD8+ T 细胞具有抗用 tr57 肽激发的自体靶细胞和抗受重组 PfTRAP - MVA 病毒感染的自体靶细胞的裂解活性。最后一次 MVA 免疫后 2 个月用 ELISPOT 分析法, 在该黑猩猩 H1 外周血中检测到高频率的这些特异 CD8+ T 细胞的前体细胞, 大约为 500 个淋巴细胞 1 个。很显然未用表达 TRAP 的质粒 DNA 激发过的黑猩猩 H2 中, 没有检测到特异的 CD8+ T 细胞应答。

第 3 次 PfTRAP - MVA 免疫后 2 个月, 用 20, 000 个子孢子对 H1 和 H2 进行激发, 以前已经发现所用的子孢子数激发 7 天, 在黑猩猩中产生可靠的能检测的血液阶段感染 (Thomas 等, 1994 和未发表的资料)。该激发用疟原虫 NF54 株进行。这一点是非常重要的, 因为在质粒 DNA 和重组 MVA 中的 TRAP 序列来源于疟原虫 T9/96 株, 与 NF54 TRAP 等位基因有大量的氨基酸差异 (Robson 等, 1990)。所以, 该子孢子激发实验用异源而不是同源的寄生虫株进行。在黑猩猩 H2 中, 用体外寄生虫培养检测法, 如预期的那样子孢子激发后 7 天在外周血中能检测到寄生虫。然而, 在 H1 中, 来自第 7 天血液样品的培养物中血液阶段寄生虫的出现延迟了 3 天, 这和抗肝阶段感染的某种免疫保护效应相一致。在过去人类中候选疟疾疫苗的研究中, 已经估计到在外周血中延迟出现寄生虫与在肝中寄生虫密度的基本降低相一致 (Davis 等, 1989)。因此首先用恶性疟原虫 TRAP 质粒 DNA 接着用通过 MVA 病毒表达的相同抗原免疫的黑猩猩 H1 显示强 CD8+ T 淋巴细胞应答, 为对异源子孢子激发某种保护作用的证据。

讨论

这些实施例说明一种新型的抗疟疾免疫方案, 该方案在人疟疾感染的啮齿类模型中诱导高水平的保护性 CD8+ T 细胞。还说明的是用亚单位疫苗抗子孢子激发的史无前例的完全保护作用 (在表 6 中用 DNA 引发及含有疫苗的 CS 表位的 MVA 促进保护 36 只小鼠中的 36 只)。用 DNA

引发/MVA 促进方案诱导的保护性免疫应答在 2 种另外的病毒性感染流感病毒 A 模型和癌症（P815 肿瘤模型）的小鼠模型中阐明。对用于人类的疫苗更为重要的是，该免疫方案在灵长类中对 CD8+ T 细胞也具有高度免疫原性。用质粒 DNA 和表达表位串的 MVA 在 3 只猕猴中 3 只诱导强 SIV - gag 特异 CTL。所诱导的水平与 SIV 感染的动物中发现的水平相比拟。来自黑猩猩的研究资料显示，相同的免疫方案能在较高等的灵长类中诱导抗恶性疟原虫的 CD8+ T 淋巴细胞应答，提供了抗恶性疟原虫子孢子激发保护作用的一些证据。

过去报道 Ty - VLPs 诱导良好水平的抗伯氏疟原虫啮齿类疟原虫的 CD8+ T 细胞应答（Allsopp 等，1995），但单独该构建体没有保护作用。现在发现用重组 MVA 继续免疫非常明显地促进 CD8+ T 细胞应答并且产生高水平保护作用（表 7）。

过去没有估测重组 MVA 病毒作为疟疾疫苗的效能。单独的重组 MVA 没有明显的保护作用，用重组 MVA 引发接着用重组质粒 DNA 第 2 次免疫也没有保护作用。然而，用 Ty - VLPs 或质粒 DNA 初次免疫后用重组 MVA 第 2 次免疫产生令人印象深刻水平的保护作用。非重组 MVA 病毒已安全地用于数千人抗天花的痘苗接种并显现优异的安全性特征。增加该痘苗病毒株的安全性和免疫原性的分子基础已经详细的分子研究阐明（Meyer 等，1991；Sutter 等，1994）。

过去已试验质粒 DNA 用作对伯氏疟原虫啮齿类疟疾的疟疾疫苗。在某些品系中看到高水平但不完全的保护作用，但在小鼠的其他品系中甚至多次免疫后观察到很小或没有保护作用（Doolan 等，1996）。尽管建议把质粒 DNA 用作抗恶性疟原虫的免疫方法，过去一直没有获得成功。本发明提供的证据是第一次的证据，表明质粒 DNA 可用于免疫方案中以诱导抗人类疟疾恶性疟原虫寄生虫的保护性免疫。

可预计与本发明阐明的免疫方案相似的免疫方案能在人类中诱导抗恶性疟原虫的保护性免疫。应该注意的是用于这些研究以在啮齿类或黑猩猩中诱导保护性免疫的 5 个疫苗构建体含有恶性疟原虫序列，因而能用于抗恶性疟原虫的人类免疫中。这些构建体是：1. 恶性疟原虫 TRAP 质粒 DNA 疫苗，2. 恶性疟原虫 TRAP 重组 MVA 病毒，3. 编码多个恶性疟原虫的表位串以及单个伯氏疟原虫 CTL 表位的 Ty - VLP，4. 编

码与 3 相同的表位串的质粒 DNA，5. 编码在 3 和 4 中许多疟疾表位的较长 HM 表位串的重组 MVA。相似地，编码针对人 I 型分子的 HIV 表位的质粒 DNAs 和 MVA 能用于抗 HIV 感染的预防性或治疗性免疫。

这些研究提供明确的证据，用非复制性或复制受损的痘病毒作促进的新型顺序免疫方案能诱导抗疟疾寄生虫的强保护性 CD8+ T 细胞应答。实施例明确地说明与复制性痘病毒株相比较令人惊奇的并大量增强 CD8+ T 细胞应答和保护作用。由于没有理由相信来自疟疾寄生虫 CD8+ T 细胞表位的免疫原性与其他抗原中 CD8+ T 细胞表位的免疫原性有基本的差异，可预期在此所述的免疫方案可证实产生抗其他疾病的 CD8+ T 细胞应答的有效价值。本免疫方案的关键步骤是应用非复制或复制受损的重组痘病毒促进预先存在的 CTL 应答。我们显示 CTL 应答能用不同的抗原输送体系如真皮内和肌肉内输送 DNA 疫苗、重组的 Ty - VLP，重组的腺病毒和照射过的孢子。这由给出的资料支持，产生抗 HIV、流感病毒和肿瘤的 CD8+ T 细胞应答。抗 CD8+ T 细胞应答起重要作用的疾病的几个熟悉实施例如下：由 HIV 病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、流感病毒、EB 病毒、麻疹病毒、登革病毒和 HTLV - 1；由细菌结核分支杆菌和李斯特菌类；由原生动物寄生虫弓形虫和锥虫引起的感染和发病。诱导抗流感 A 病毒的保护性 CTL 应答在图 14 说明。此外，预计在此所描述的免疫方案在抗 CD8+ T 细胞应答起保护性作用的癌症类型免疫中具有价值。用 DNA 引发 MVA 促进方案抗肿瘤诱导的保护性 CTL 应答在图 13 显示。在人类中具体的实施例包括黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌。

参考文献

1. Nardin EH 和 Nussenzweig RS. 对前红细胞疟疾阶段的 T 细胞应答：在抗前红细胞阶段保护作用和疫苗开发中的作用。免疫学年评 (1993) 11: 687 - 727。
2. Hill AVS、Allsopp, CEM, Kwiatkowski D、Anstey NM、Twumasi P、Rowe PA、Bennett S、Brewster D、McMichael AJ、Greenwood BM (1991) 普通西非 HLA 抗原与对重度疟疾保护作用的关系。自然 352: 595 - 600。

3. Aidoo M、Lalvani A、Allsopp CEM 等, 诱导杀伤性 T 淋巴细胞抗疟疾的疫苗的保守抗原组分的鉴别。柳叶刀 (1995) 345: 1003 - 1007。

4. Wizel B、Houghten RA、Parker KC、Coligan JE、Church P、Gordon DM、Ballou WR、Hoffman SL. 照射过的孢子疫苗诱导 HLA - B8 限制性抗 2 种恶性疟原虫孢子表面蛋白 2 的重叠表位的杀伤性 T 淋巴细胞应答。实验医学杂志 (1995) 182: 1435 - 45。

5. Lalvani A、Aidoo M、Allsopp CE、Plebanski M、Whittle HC、Hill AV. 基于 HLA 途径设计诱导 CTL 抗恶性疟原虫的疫苗。免疫学研究 (1994) 145: 461 - 8。

6. Seguin MC、Klotz FW、Schneider I、Weir JP、Goodbary M、Slyter M、Raney JJ、Aniagolu JU、Green SJ. 诱导一氧化氮合酶保护抗照射过伯氏疟原虫感染性按蚊接触的小鼠疟疾: 涉及干扰素 γ 和 CD8+ T 细胞。实验医学杂志 (1994) 180: 353 - 8。

7. Thomas AW、Slierendregt B、Mons B、Druilhe P. 在疟疾前红细胞阶段研究中的黑猩猩和支持模型。Mem. Inst. Oswaldo Cruz (1994) 89 增刊 2: 111 - 4。

8. Sedegah M、Hedstrom R、Hobart P、Hoffman SL. 通过用编码环孢蛋白的质粒 DNA 免疫抗疟疾的保护作用。美国国家科学院院报 (1994) 91: 9866 - 70。

9. Li S、Rodrigues M、Rodriguez D、Rodriguez JR、Esteban M、Palese P、Nussenzweig RS、Zavala F. 用重组流感病毒引发然后施用重组痘苗病毒诱导抗疟疾的 CD8+ T 细胞介导的保护性免疫。美国国家科学院院报 (1993) 90: 5214 - 8。

10. Lanar DE、Tine JA、de - Taisne C、Seguin MC、Cox WI、Winslow JP、Ware LA、Kauffman EB、Gordon D、Ballou WR、Paoletti E、Sadoff JC. 减毒的痘苗病毒 - 环孢蛋白重组体赋予抗啮齿类疟疾的保护作用。感染和免疫 (1996) 64: 1666 - 71。

11. Ogg GS、Jin X、Bonhoeffer S、Dunbar PR、Nowak MA、Monard S、Segal JP、Cao Y、Rowland - Jones SL、Cerundolo 等, HIV - 1 特异的杀伤性 T 淋巴细胞和质膜负载的病毒

RNA 的定量。科学 (1998) 279: 2103 - 6。

12. Ada G. 杀伤性 T 淋巴细胞能清除某些 HIV/SIV 感染吗? 医用灵长类学杂志 (1996) 25: 158 - 62。

13. Gallimore A、Cranage M、Cook N、Almond N、Bootman J、Rud E、Silvera P、Dennis M、Corcoran T、Stott J 等, 在免疫接种过的猕猴中通过 CD8+nef 特异的杀伤性 T 细胞早期抑制 SIV 的复制。自然医学 (1995) 1: 1167 - 73。

14. Mayr A、Hochstein - Mintzel V、Stickl H. 感染 (1975) 33: 6 - 14。

15. Mayr A, Zentralbl Veterinarmed B (1976) 23: 417 - 30。

16. Mayr A、Stichl H、Muller HK、Danner K、Singer H、Zentralbl Bakteriolog B (1978) 167: 375 - 90。

17. Stickl H、Hochstein - Mintzel V、Mayr A、Huber HC、Schafer H、Holzner A、Dtsch Med Wochenschr. (1974) 99: 23866 - 922。

18. Mahnel H、Mayr A、Berl Munch Tierarztl Wochenschr (1994) 107: 253 - 6。

19. Meyer H、Sutter G、Mayr A. 普通病毒学杂志 (1991) 72: 1031 - 8。

20. Altenburger W、Suter CP、Altenburger, J. Arch Virol. (1989) 105: 15 - 27。

21. Sutter G、Ramsey - Ewing A、Rosales R、Moss B. 病毒学杂志 (1994) 68: 4109 - 16。

22. Sutter G、Moss B, 美国国家科学院院报 (1992) 89: 10847 - 51。

23. Sutter GW、Wyatt LS、Foley PL、Bennink JR、Moss B, 疫苗 (1994) 12: 1032 - 40。

24. Hirsch VM、Goldstein S、Channock R, 等, Channock R 编著疫苗 95。冷泉港实验室出版社 (1995) 195 - 200。

25. Hirsch VM、Fuerst TR、Sutter G 等, 病毒学杂志 (1996) 70: 3741 - 52。

26. Moss B、Carroll MW、Wyatt L, 等, 匿名编著。疫苗: 设计和生产的新型策略。Plenum 出版社 (1995)。
27. Symons JA、Alcami A、Smith GL, 细胞 (1995) 81: 551 - 60。
28. Alcami A、Smith GL, 病毒学杂志 (1995) 69: 4633 - 9。
29. Alcami A、Smith GL, 细胞 (1992) 71: 153 - 67。
30. Graham KA 等, 病毒学 (1997) 229: 12 - 24。
31. Alcami A、Smith GL, 美国国家科学院院报 (1996) 93: 11029 - 34。
32. Blanchard TJ、Rowland - Jones S、Gotch F、McMichael AJ、Smith GL, 柳叶刀 (1997) 348: 1741。
33. McLean CS、Erturk M、Jennings R、Challanain DN、Minson AC、Duncan I、Boursnell ME、Inglis SC. 感染疾病杂志 (1994) 170 (5): 1100 - 9。
34. Davis NL、Brown KW、Johnston RE, 病毒学杂志 (1996) 70 (6): 3781 - 7。
35. Layton GT、Harris SJ、Myhan J、West D、Gotch F、Hill - Perkins M、Cole JS、Meyers N、Woodrow S、French TJ、Adams SE、Kingsman AJ, 用重组杂交 Ty - 病毒样颗粒诱导对病毒蛋白的单独和双重杀伤性 T - 淋巴细胞应答。免疫学 (1996) 87: 171 - 8。
36. McGrory - WJ、Bautisla - DS、Graham - FL。获救早期区 I 突变进入感染性人类腺病毒 5 型的简单技术。病毒学 (1988) 163: 614 - 7。
37. Rodrigues EG、Zavala F、Eichinger D、Wilson JM、Tsuji M, 单一免疫剂量的重组腺病毒有效地诱导 CD8+ T 细胞介导的抗疟疾保护性免疫。免疫学杂志 (1997) 158: 1268 - 74。
38. Davis HL、Michel ML、Whalen RG, 基于 DNA 的免疫方法诱导乙型肝炎表面抗原的持续性分泌和高水平的循环抗体。人类分子遗传学 (1993) 2: 1847 - 51。
39. Miyahira Y、Murata K、Rodriguez D 等, 用 ELISPOT 分

析法定量抗原特异的 CD8+ T 细胞。免疫学方法杂志 (1995) 18: 45 - 54。

40. Allsopp CEM、Plebanski M、Gilbert S 等, (1996) 诱导杀伤性 T 淋巴细胞的多种输送系统的比较。欧洲免疫学杂志 (1996) 26: 1951 - 1959。

41. Rodrigues EG、Zavala F、Eichinger D、Wilson JM、Tsuji M, 单一免疫剂量的重组腺病毒有效地诱导 CD8+ T 细胞介导的抗疟疾保护性免疫。免疫学杂志 (1997) 158: 1268 - 74。

42. Schodel F、Wirtz R、Peterson D、Hughes J、Warren R、Sadoff J、Milich D, 由携带环孢子蛋白表位的杂交乙型肝炎病毒核心颗粒激发的对疟疾的免疫。实验医学杂志 (1994) 180: 1037 - 46。

43. Satchidanandam V、Zavala F、Moss B, 用重组痘苗病毒表达伯氏疟原虫的环孢子蛋白的研究。分子生物化学寄生虫学 (1991) 48: 89 - 99。

44. Davis JR、Murphy JR、Baqar S、Clyde DF、Herrington DA、Levine MM, 在用合成的环孢子蛋白 (NANP) 3 免疫接种的人群中抗恶性疟原虫孢子活性的估测。热带医学和卫生皇家学会会报 (1989) 83: 748 - 50。

45. Meyer, H、Sutter, G 和 Mayr, A (1991) 在高度减毒的痘苗病毒 MVA 基因组中缺失作图以及缺失对毒力的影响。普通病毒学杂志 72: 1031 - 38。

46. Sutter G、Wyatt LS、Foley PL、Bennink JR、Moss B, 来源于宿主范围限制和高度减毒的 MVA 痘苗病毒株的重组载体在小鼠中刺激对流感病毒的保护性免疫。疫苗 (1994) 12: 1032 - 40。

47. Doolan DL、Sedegah M、Hedstrom RC、Hobart P、Charoenvit Y、Hoffman, SL. 用多基因 DNA 免疫法克服抗疟疾保护作用的遗传限制: 依赖于 CD8+ 细胞、干扰素 γ 和一氧化氮的免疫性。实验医学杂志 (1996) 183: 1739 - 46。

48. Muller HM、Reckmann I、Hollingdale MR、Bujard H、Robson KJ、Crisanti A. 血小板反应蛋白相关的恶性疟原虫无名蛋白 (TRAP) 特异地结合到硫酸化的糖缀合物及 Hep G2 肝癌细胞上, 表

明该分子在子孢子侵入肝细胞中的作用。EMBO - J (1993) 12 : 2881 - 9。

49. Chakrabarti S 等, 分子细胞生物学 (1995) 5 : 3403 - 9。

50. Morrison HG、Bauer SP、Lange JV、Esposito JJ、McCormick JB、Auperin DD. 通过表达拉沙病毒的核蛋白或被膜糖蛋白的痘苗病毒重组体保护豚鼠免受拉沙热。病毒学 (1989) 171 : 179 - 88。

51. Mackett M 等, 病毒学杂志 (1984) 49 : 857 - 864。

52. Carroll MW 和 Moss BE, 生物技术 (1995) 19 : 352 - 4。

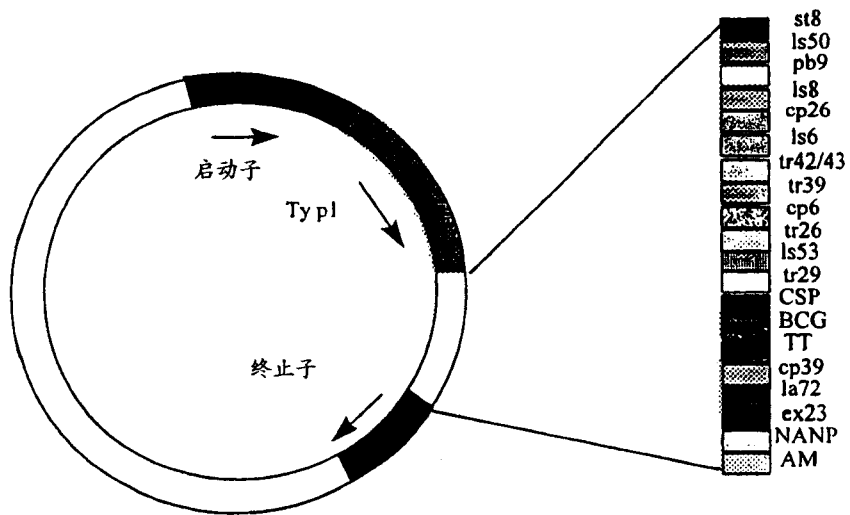


图 1

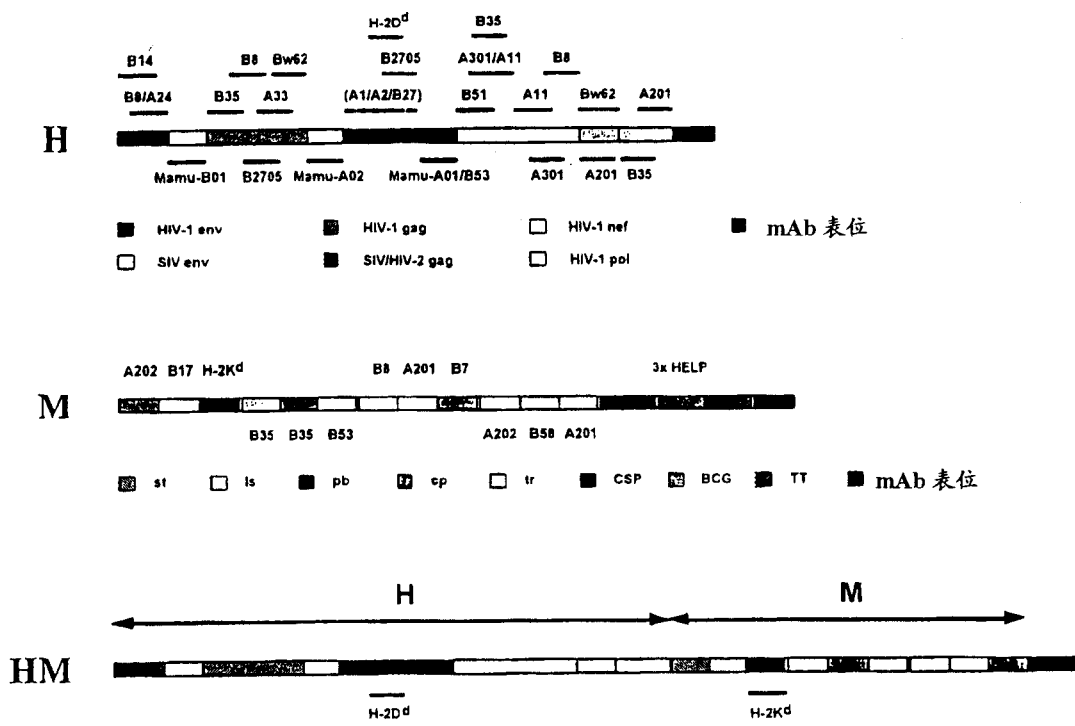


图 2

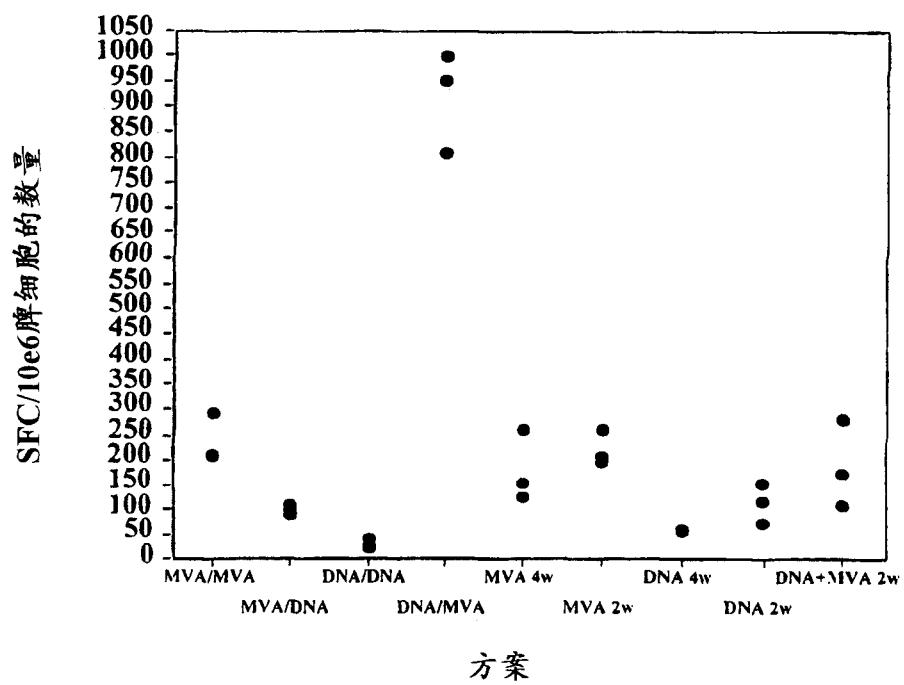


图 3

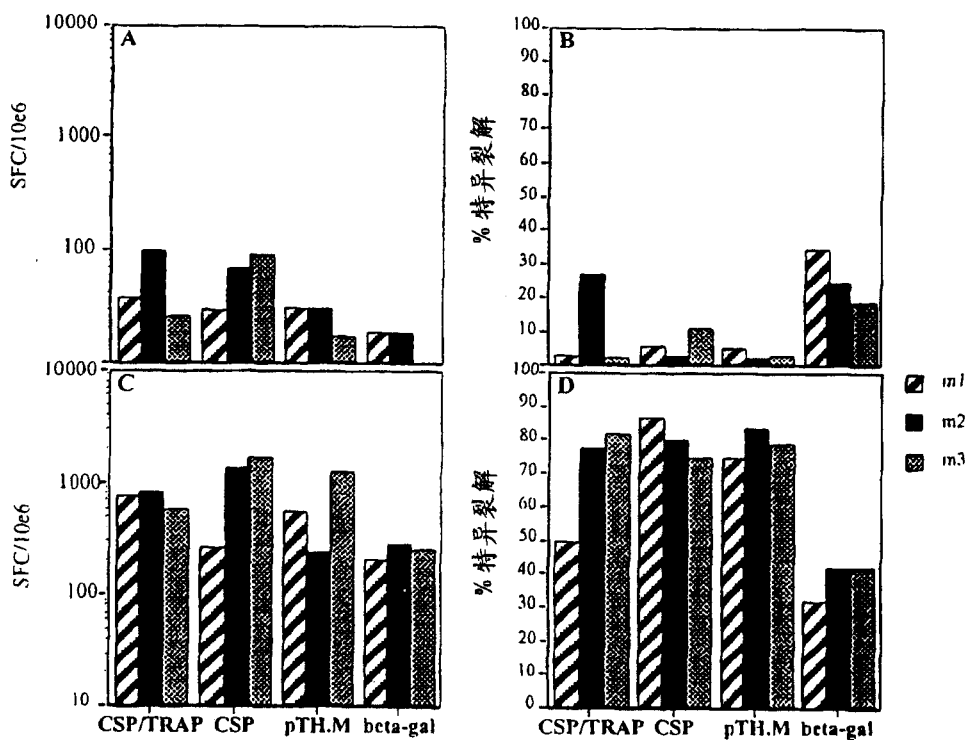


图 4

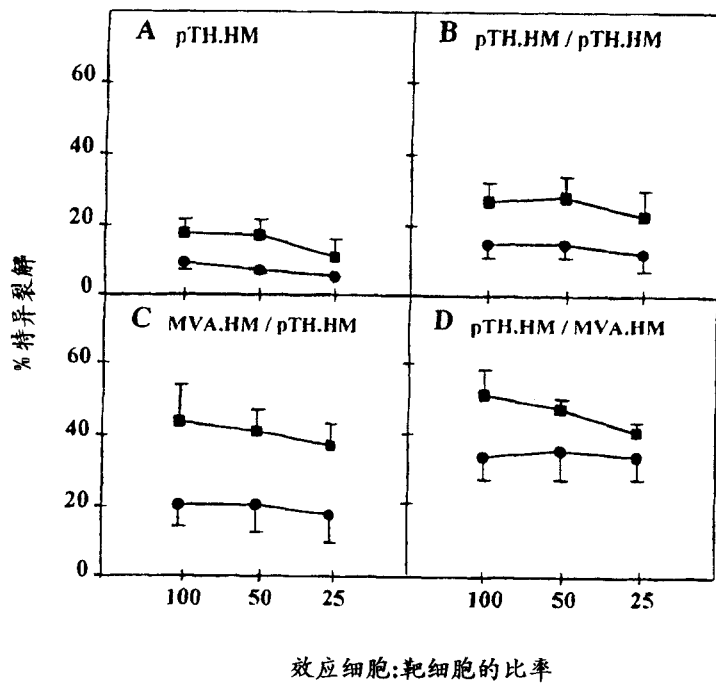


图 5

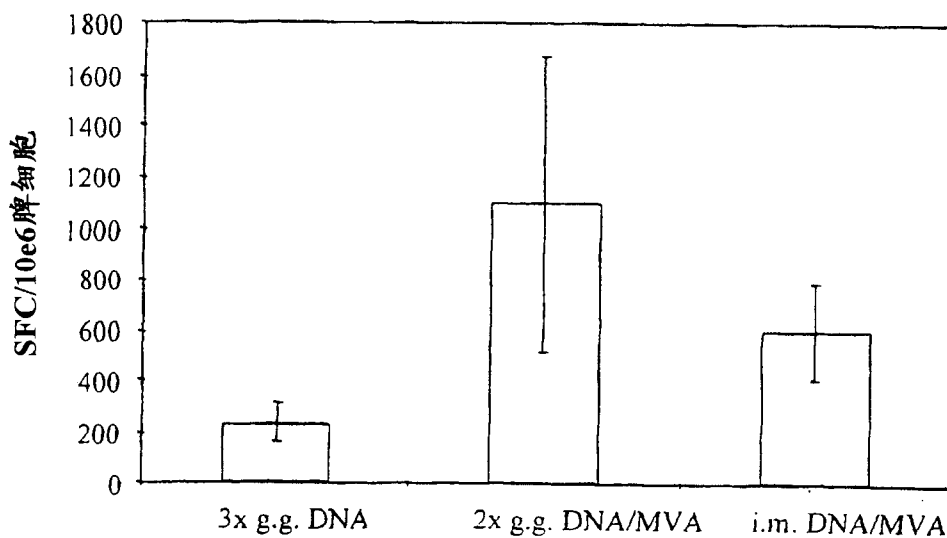


图 6

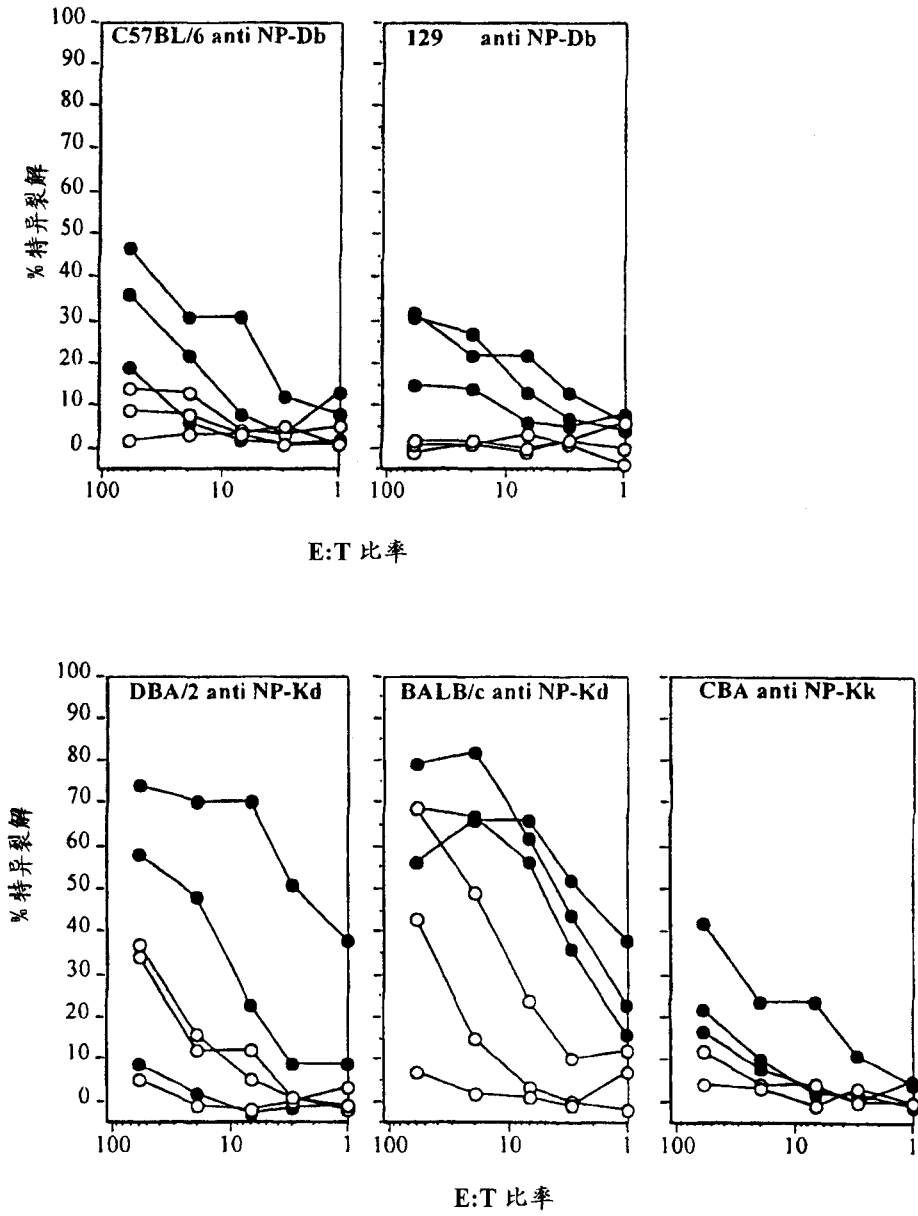


图 7

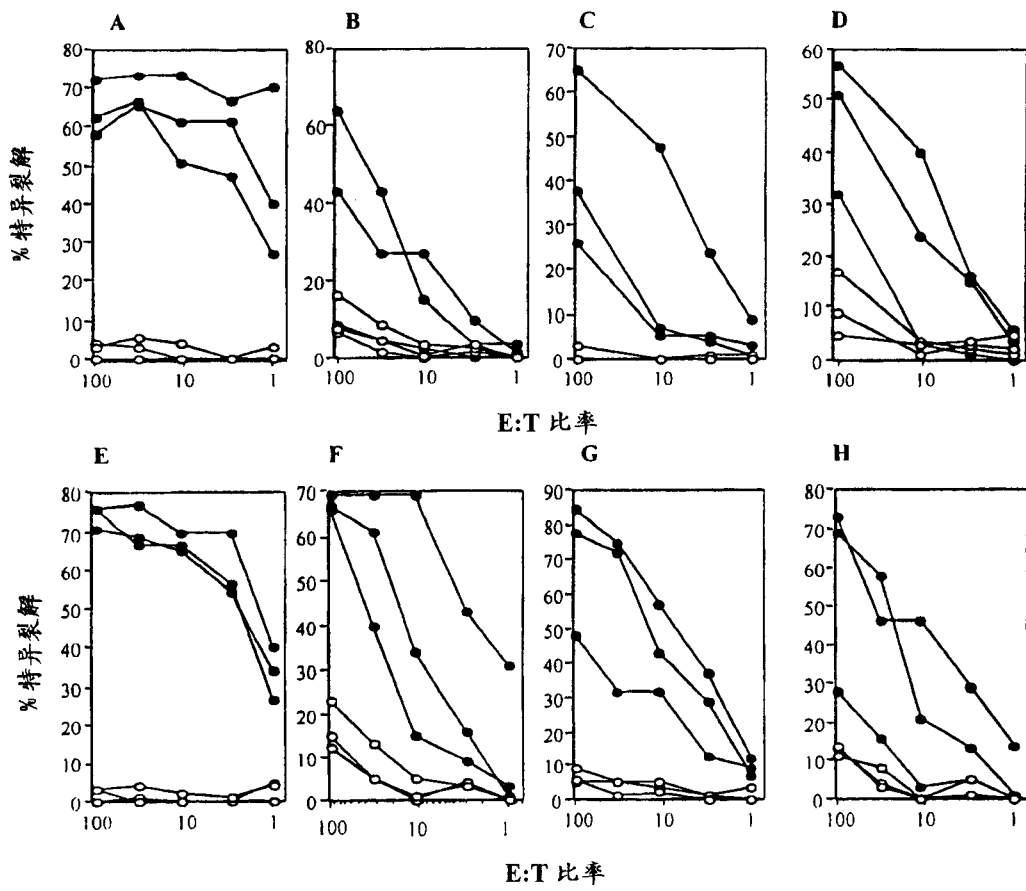


图 8

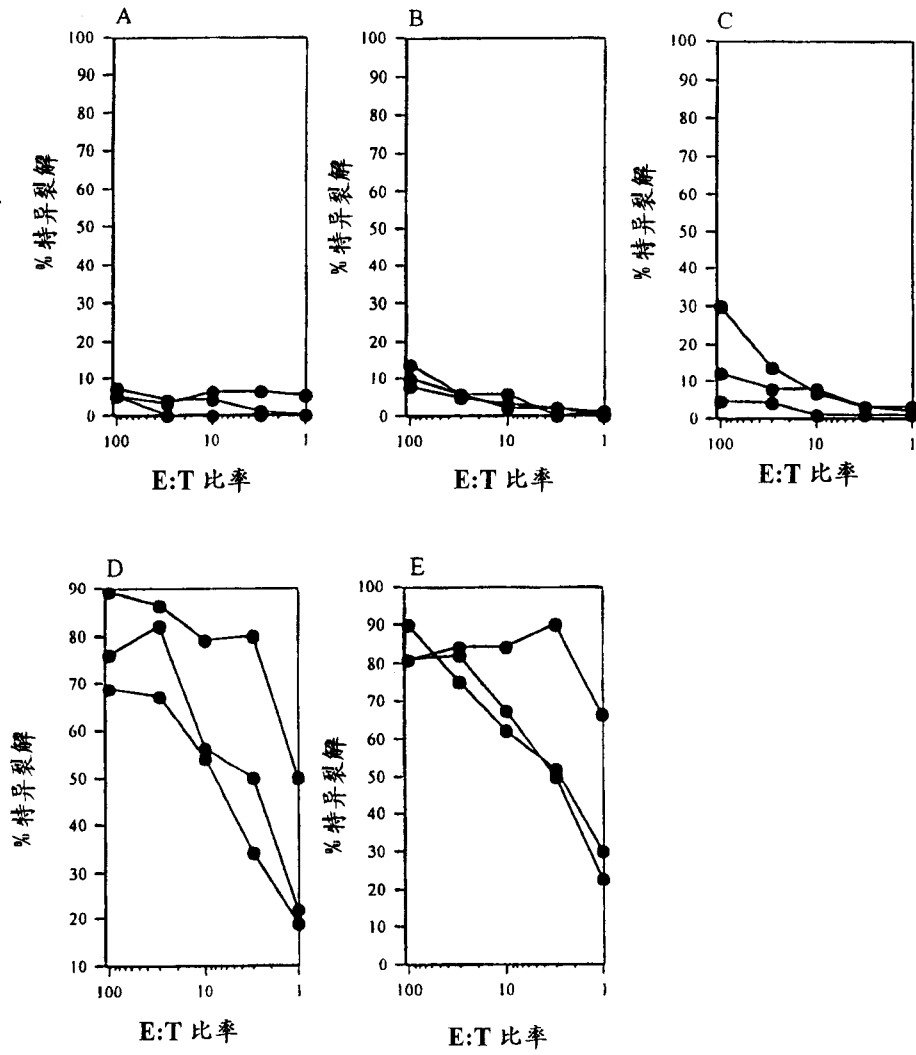


图 9

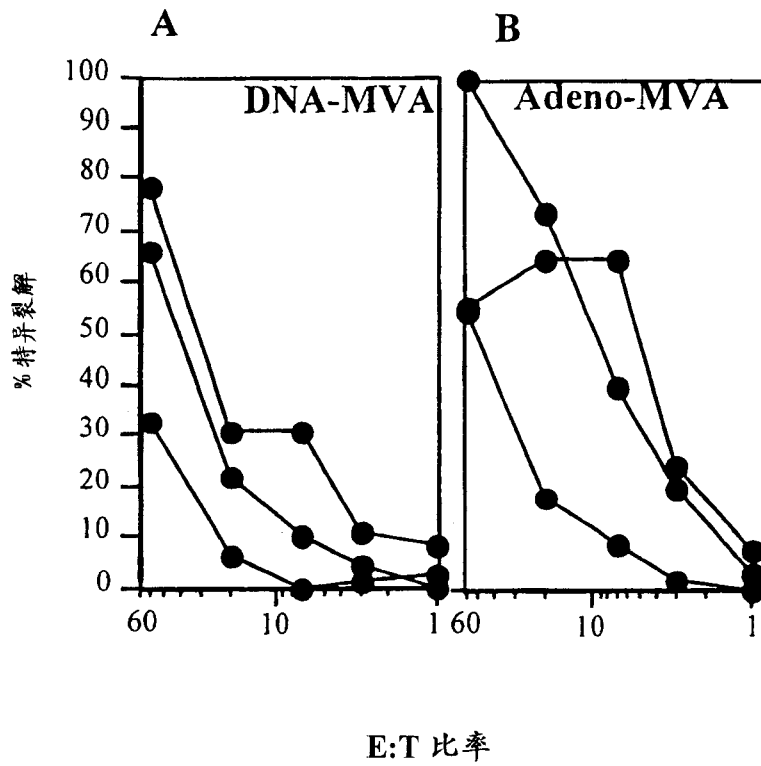


图 10

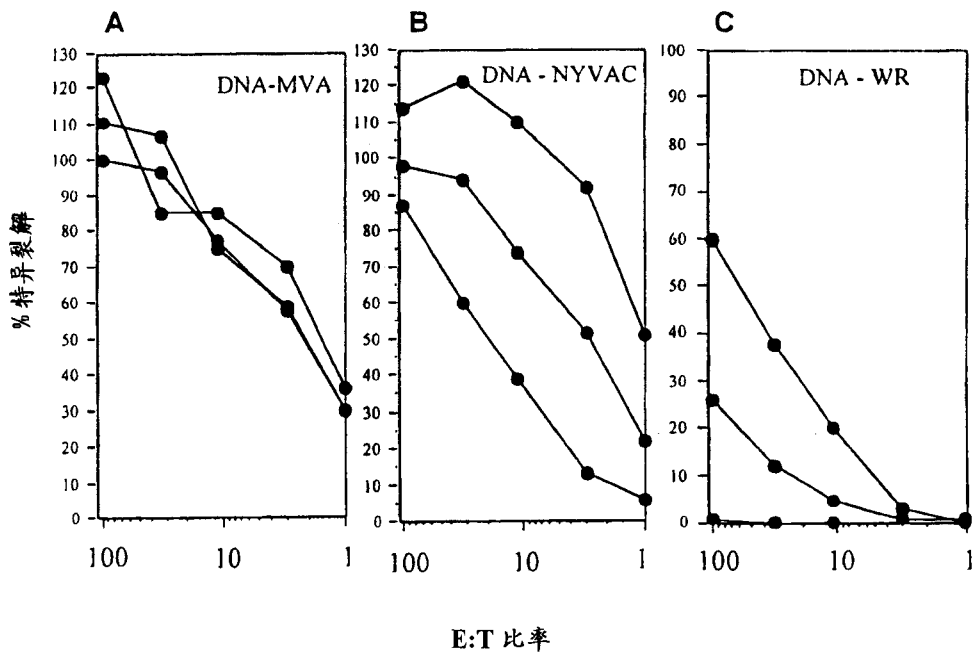


图 11

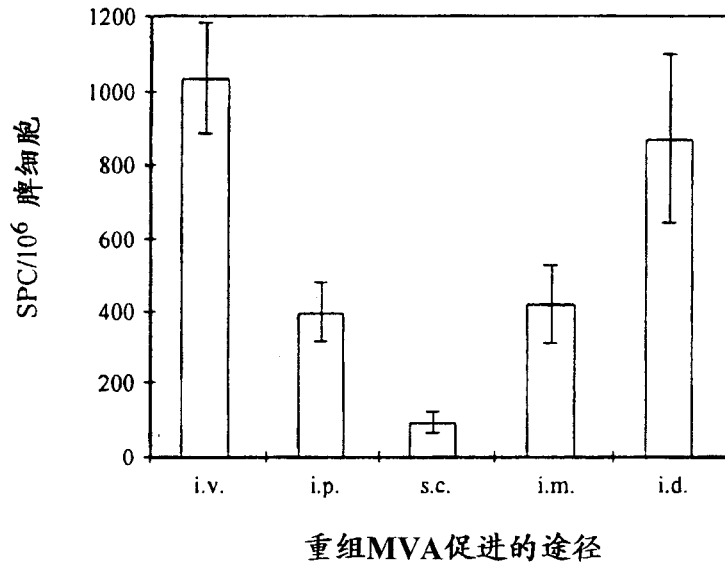


图 12

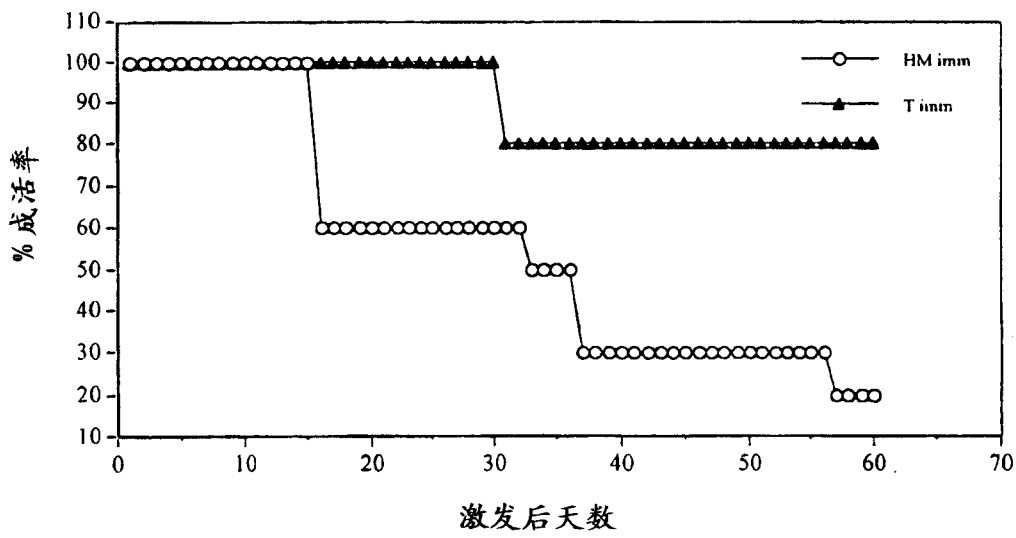


图 13

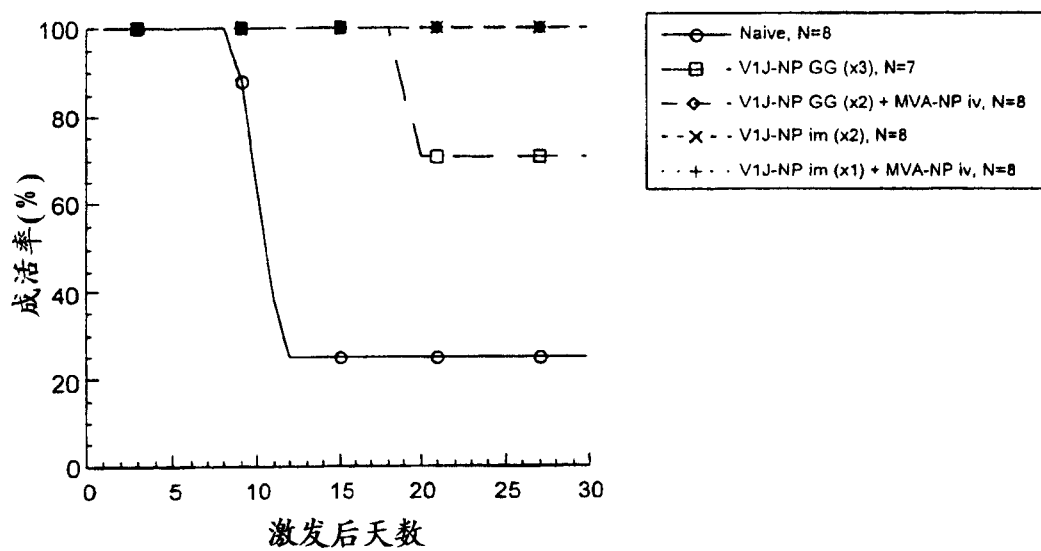


图 14

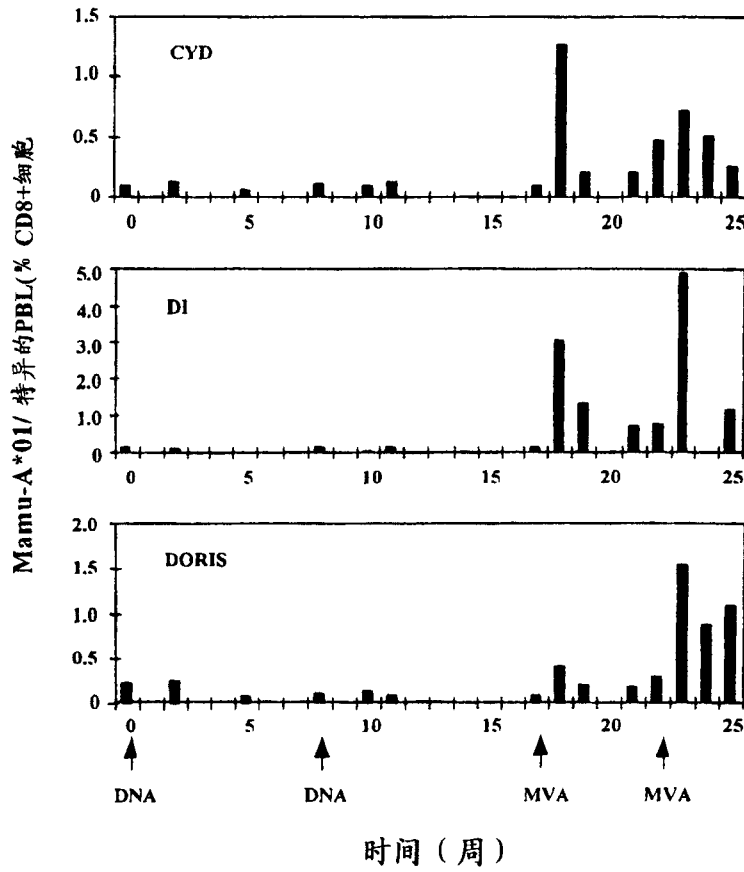


图 15

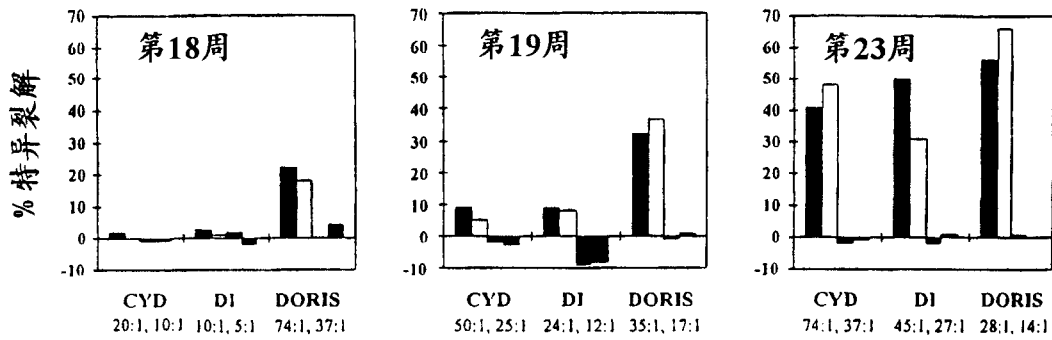


图 16