

[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 200480037217.4

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 10 日

[11] 公开号 CN 1893974A

[22] 申请日 2004. 10. 11

[21] 申请号 200480037217.4

[30] 优先权

[32] 2003. 10. 13 [33] GB [31] 0323968.8

[86] 国际申请 PCT/EP2004/011621 2004. 10. 11

[87] 国际公布 WO2005/039630 英 2005. 5. 6

[85] 进入国家阶段日期 2006. 6. 13

[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 程 淼 梁 谋

权利要求书 4 页 说明书 34 页 附图 3 页

[54] 发明名称

免疫原性组合物

[57] 摘要

本发明涉及在治疗或预防传染性疾病、癌症、自体免疫疾病和相关状况中具有实用性的组合治疗。

1. 在哺乳动物中增强对抗原的免疫反应的方法，包括向所述哺乳动物施用安全和有效量的 1) IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体，和 2) 包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合
5 物。

2. 根据权利要求 2 的方法，其中所述抗原或其免疫原性衍生物来源于选自下组的有机体：人类免疫缺陷性病毒 HIV-1、人类单纯性疱疹病毒、巨细胞病毒、轮状病毒、Epstein Barr 病毒、水痘带状疱疹病毒，来自肝炎病毒例如 B 型肝炎病毒、A 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒和 E 型肝炎病毒，来自呼吸道合胞体病毒、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人类乳头状瘤病毒、黄病毒或流感病毒、来自 *Neisseria*
10 *spp.*、*Moraxella spp.*、*Bordetella spp.*；*Mycobacterium spp.*，包括 *M. tuberculosis*；*Escherichia spp.*，包括肠毒性 *E. coli*；*Salmonella spp.*；*Listeria spp.*；*Helicobacter spp.*；*Staphylococcus spp.*，包括 *S. aureus*、
15 *S. epidermidis*；*Borrelia spp.*；*Chlamydia spp.*，包括 *C. trachomatis*、*C. pneumoniae*；*Plasmodium spp.*，包括 *P. falciparum*；*Toxoplasma spp.*，*Candida spp.*

3. 在患者中降低癌症的严重程度的方法，包括向需要它的患者施用安全和有效量的 1) IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和 2)
20 包含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合物。

4. 根据权利要求 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包括以下的组：来自 MAGE 家族的抗原、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、
25 PSCA、prostein、P501S、HASH2、Cripto、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、Protease、STEAP、酪氨酸酶、端粒酶、存活蛋白、CASB616、P53 或 her 2 neu。

5. 根据权利要求 1 到 4 的任何一个的方法，其中所述 IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和所述免疫原性组合物是同时地、分开地、或按任何顺序次序地施用的。
30

6. 根据权利要求 5 的方法，其中所述 IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和所述免疫原性组合物是以组合药物制品的形式同时施

用的。

7. 根据权利要求1到6的任何一个的方法, 其中所述 IL-18 多肽或其生物学活性片段或衍生物来自人类或鼠来源。

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

9. 根据权利要求1到7的任何一个的方法, 其中所述 CpG 佐剂包含嘌呤、嘧啶、C、G、嘧啶、嘧啶序列。

10. 根据权利要求1到8的任何一个的方法, 其中所述 CpG 佐剂选自包括以下的组: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEQ ID NO:1); TCT CCC AGC GTG CGC CAT (SEQ ID NO:2); ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO:3); TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (SEQ ID NO:4); TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (SEQ ID NO:5)。

11. 根据权利要求1到8的任何一个的方法, 其中所述 CpG 佐剂含有被至少3个核苷酸分隔的至少两个未甲基化的 CG 重复。

12. 根据权利要求11的方法, 其中所述免疫刺激性寡核苷酸含有被6个核苷酸分隔的至少两个未甲基化的 CG 重复。

13. 一种组合制品, 包括以下单独组分作为活性成分: (1) IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和 (2) 包含抗原和 CpG 佐剂的免疫原性组合物, 所述活性成分被同时地、分开地或次序地使用, 用于传染性疾病、癌症, 自体免疫疾病和相关状况的预防和/或治疗。

14. 根据权利要求13的组合制品, 其中组分(1)和(2)混合在组合物中。

15. 根据权利要求13或14的组合制品, 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, 并有对抗癌症的预防或治疗活性。

16. 根据权利要求15的组合制品, 其中所述肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物选自包括以下的组: 来自 MAGE 家族的抗原、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、prostein、P501S、HASH2、Cripto、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、Protease、STEAP、酪氨酸酶、端粒酶、存活蛋白、CASB616、P53 或 her 2 neu。

17. 根据权利要求13到16的任何一个的组合制品, 其中所述 IL-18

多肽或其生物学活性片段或衍生物来自人类或鼠来源。

18. 根据权利要求 17 的组合制品, 其中 IL-18 是 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 7 的多肽或其生物学活性片段或衍生物。

19. 根据权利要求 13 到 18 的任何一个的组合制品, 其中所述 CpG 佐剂是如权利要求 9 到 12 中的任何一个所定义的。

20. 如权利要求 13 到 19 中任何一个所要求的组合制品, 其中所述免疫原性组合物另外包含选自包括以下的组的免疫刺激剂化学品: 3D-MPL、QS21、QS21 和胆固醇的混合物、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。

21. 如权利要求 20 中所要求的组合制品, 其中所述免疫原性组合物佐剂包含 3D-MPL、CpG、QS21、胆固醇、水包油乳剂。

22. 如权利要求 21 中所要求的组合制品, 其中所述水包油乳剂包含角鲨烯、生育酚和聚氧乙烯单油酸山梨聚糖酯 (Tween 80)。

23. 如权利要求 20 中所要求的组合制品, 其中所述免疫原性组合物包含 QS21、胆固醇和 CpG 佐剂。

24. 如权利要求 13 到 23 的任何一个中所要求的组合制品, 其中两种活性组分都是可注射溶液的形式。

25. 一种药物试剂盒, 包括以下单独组分作为活性成分: (1) IL-18 多肽或其生物学活性片段和 (2) 包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合物, 所述活性成分被同时地、分开地或次序地使用, 用于传染性疾病、癌症和自体免疫疾病的预防和/或治疗。

26. 根据权利要求 25 的药物试剂盒, 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, 并有对抗癌症的预防或治疗活性。

27. 根据权利要求 26 的药物试剂盒, 其中所述肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物选自包括以下的组: 来自 MAGE 家族的抗原、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、prostein、P501S、HASH2、Cripto、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、Prostate、STEAP、酪氨酸酶、端粒酶、存活蛋白、CASB616、P53 或 her 2 neu。

28. 在药物中使用的如权利要求 13 到 23 的任何一个所要求的组合制品。

29. 如权利要求 1 到 12 的任何一个中所要求的方法，包括使用根据权利要求 13 到 24 的任何一个的组合制品。

30. IL-18 多肽或其生物学活性片段或衍生物在制造用于患者的预防
5 和/或治疗的药物中的用途，所述患者患有传染性疾病、癌症、自体免疫疾病和相关状况或对其敏感，并已经用包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合物激发。

31. 包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合物
10 在制造用于患者的治疗的药物中的用途，所述患者患有传染性疾病、癌症、自体免疫疾病和相关状况或对其敏感，并已经用 IL-18 多肽或其生物学活性片段或衍生物激发。

32. 根据权利要求 30 或 31 的用途，其中所述抗原是肿瘤相关抗原，所述癌症选自包括以下的组：乳腺癌、肺癌、NSCLC、结肠癌、黑素瘤、卵巢癌、膀胱癌、头和颈鳞状细胞癌、食道癌。

33. 根据权利要求 30 到 32 的任何一个的用途，其中所述 IL-18
15 多肽或其生物学活性片段或衍生物来自人类或鼠来源。

34. 根据权利要求 33 的用途，其中 IL-18 是 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 7 的多肽或其生物学活性片段或衍生物。

35. 根据权利要求 30 到 34 的任何一个的用途，其中所述 CpG 佐剂是如权利要求 9 到 12 中的任何一个所定义的。

免疫原性组合物

5 本发明涉及在治疗或预防传染性疾病、癌症、自体免疫疾病和相关状况中具有实用性的组合治疗。特别地，该组合治疗包括施用 TH-1 细胞因子，特别是 IL-18，和免疫原性组合物，特别是疫苗，包含抗原和 CpG 佐剂。特别地，本发明涉及使用 IL-18 或其生物学活性片段或变体，和包含肿瘤相关抗原和 CpG 佐剂的免疫原性组合物，用于治疗前肿瘤病变或癌症。本发明进一步涉及适合于根据本发明使用的组合制品和药物试剂盒。这些治疗方法和药物制品对于刺激适合于预防和免疫治疗应用的免疫反应特别有用，特别是对于肿瘤的预防
10 和/或治疗特别有用。

发明背景

15 癌症是由于遗传变化从单个细胞发展来的疾病。尽管投入了巨大的财政和人力资源，癌症仍然是死亡的一个主要原因。这些肿瘤的临床检查主要在疾病的相对晚期发生，此时原发性肿瘤可以通过手术切除，留存在不同器官的微小转移的存在通常已经发生。尽管在了解引起癌症的机制上有了可观的进展，在治疗转移性癌症和预防早期肿瘤
20 向更为恶性的和转移性病变发展方面仅有很少的进展。化疗常常不能完全地消除这些细胞，这些细胞仍然作为复发疾病的根源存在。

TH-1 型细胞因子，例如，IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-12、IL-18 等等，往往有助于诱导针对施用的抗原的细胞介导的免疫反应。与此相反，高水平的 Th2-型细胞因子（例如，IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10）
25 往往有助于诱导体液免疫反应。白细胞介素 - 18 (IL-18)，也称为干扰素 - 伽马 (IFN γ) 诱导因子，已经被描述为多效性细胞因子，具有刺激病人自己的免疫系统对抗疾病（例如，癌症）的免疫调节效果。IL-18 在免疫反应的早期表达，作用于体液的和细胞的免疫反应并驱使反应走向更好的 TH-1 型分布。它由活化的抗原呈递细胞产生，已经报告具有几种生物活性，特别是促进幼稚 (naive) CD4 T 细胞分化
30 成 Th1 细胞，刺激天然杀伤 (NK) 细胞、天然杀伤 T (NKT) 细胞，和诱导活化的 T 细胞的增殖，主要是细胞毒 T 细胞 (CD8+表型) 分

泌伽马干扰素 (IFN-伽马) (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 IL-1a 和 GM-CSF 的产生, 和具有抗血管生成活性。

5 IL-18 具有刺激先天免疫、以及刺激 Th1-和 Th2-介导的反应的能力。在存在 IL-12 时, IL-18 可以作用于 Th1 细胞、非极化的 T 细胞、NK 细胞、B 细胞和树突状细胞以产生 IFN γ 。没有 IL-12 帮助时, IL-18 具有诱导 T 细胞、NK 细胞、肥大细胞和嗜碱性细胞中 IL-4 和 IL-13 产生的潜力。

10 已经显示 IL-18 通过 IFN-伽马的产生诱导肿瘤衰退, IFN-伽马是内源性和细胞因子诱导的抗肿瘤免疫反应的关键成分。效力已经在不同的肿瘤动物模型中展现了 (Jonak Z et al. 2002, J. Immunother. 25, S20-S27; Akamatsu S; et al. 2002, J. Immunother. 25, S28-S34)。已经描述了包含与其他试剂组合的 IL-18 的组合物, 特别是 IL-18 与化学治疗剂组合 (US 6,582,689)。还已经描述了 IL-18 充当疫苗的佐剂
15 (WO 99/56775; WO 03/031569)。

含有 CpG 的寡核苷酸 (其中 CpG 二核苷酸是未甲基化的) 也诱导主要 Th1 反应。这种寡核苷酸是公知的, 已经在例如 WO 96/02555、WO 99/33488 和美国专利 No.6,008,200 和 5,856,462 中描述。还描述了免疫刺激 DNA 序列, 例如, Sato et al., *Science* 273: 352, 1996。
20 含有未甲基化的 CpG 二核苷酸 (“在下文中称 CpG”) 的免疫刺激性寡核苷酸, 作为佐剂通过全身性和粘膜途径施用是本领域已知的 (WO 96/02555, 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 中存在的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸基序的缩写。历史上, 观察到
25 BCG 的 DNA 级分可以发挥抗肿瘤效果。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了能够诱导免疫刺激效果 (体外和体内)。这些研究的作者断定某些回文序列, 包括中央 CG 基序带有这种活性。之后在出版物 Krieg, *Nature* 374, p546 1995 中阐明了 CG 基序在免疫刺激中的主要作用。详细的分析已经显示, CG 基序
30 必须处于某种序列环境中, 这种序列在细菌 DNA 中是常见的, 但在脊椎动物 DNA 中是稀少的。免疫刺激性序列常常是: 嘌呤、嘌呤、C、G、嘧啶、嘧啶; 其中二核苷酸 CG 基序没有甲基化, 但是已知其他

的未甲基化的 CpG 序列有免疫刺激性并且可被用于本发明中。

在某些六核苷酸的组合中存在回文序列。这些基序中的几个，作为一个基序的重复或不同基序的组合，可以存在于相同的寡核苷酸中。一个或多个这些含有免疫刺激性序列的寡核苷酸的存在可以激活各种免疫子集 (immune subsets)，包括天然杀伤细胞 (其产生干扰素 γ 和具有细胞溶解活性) 和巨噬细胞 (Wooldrige et al Vol 89 (no. 8), 1977)。不过其他含有未甲基化的 CpG、不具有这个共有序列的序列现在已经显示了有免疫调节性。

当 CpG 被配制到疫苗中时，一般在游离溶液中施用，与游离抗原一同 (WO 96/02555; McCluskie and Davis, 同上)，或与抗原共价结合 (PCT 公开 No. WO 98/16247)，或与载体 (carrier) 例如氢氧化铝配制 ((肝炎表面抗原) Davis et al. 同上; Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1998, 95 (26), 15553-8)。

本发明涉及令人惊讶的发现，TH-1 细胞因子例如 IL-18 与包含抗原和 CpG 佐剂的免疫原性组合物的组合施用是极其有效的，提供了对传染性疾病、原发的和转移性的肿瘤疾病 (即癌症)、自体免疫疾病和相关状况的有效率的和良好耐受的预防或治疗，在抑制表达肿瘤相关抗原的人类癌细胞的生长方面特别有效。

20 发明的陈述

因此，提供了在患者中引发针对抗原的增强的免疫反应的方法，包括向所述患者施用安全和有效量的 i) 免疫原性组合物，特别是疫苗，包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂，和 ii) IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体。在另一个实施方式中，本发明提供了在患者中降低癌症的严重程度的方法，包括处理预先形成的 (pre-established) 肿瘤 (原发性肿瘤和转移性肿瘤) 或阻止癌症再发生，所述方法包括向需要的患者施用安全和有效量的 i) IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和 ii) 免疫原性组合物，特别是疫苗，包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂。

30 在一个实施方式中，所述 IL-18 多肽是鼠或人 IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体。在另一个实施方式中，所述抗原是肿瘤相关抗原。因此，在一个实施方式中，本发明涉及在患者中降低癌症的严重

程度的方法，包括处理预先形成的肿瘤（原发肿瘤和转移性肿瘤）或阻止癌症再发生，特别是乳腺癌、肺癌（特别是非小细胞肺癌）、黑素瘤、结肠直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、头颈鳞状细胞癌、胃和其他 GI（胃肠）癌，特别是食道癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤，所述方法包括向哺乳动物施用 i) 免疫原性组合物，特别是疫苗，包含肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物和 CpG，和 ii) IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体。

本发明还涉及组合制品，包括以下单独组分作为活性成分：（1）IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和（2）包含抗原和 CpG 佐剂的免疫原性组合物，所述活性成分被同时地、分开地或次序地使用，用于传染性疾病、癌症，包括原发肿瘤和转移性肿瘤、自体免疫疾病和相关状况的预防和/或治疗。在一个实施方式中，所述组合制品内的所述免疫原性组合物含有其他免疫刺激剂化学药品，选自包括以下的组：3D-MPL、QS21、QS21 和胆固醇的混合物、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。例如，其他的佐剂是皂角苷，例如 QS-21。

在相关方面中本发明还提供了药物试剂盒，包括以下单独组分作为活性成分：（1）IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和（2）包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合物，所述活性成分被同时地、分开地或次序地使用，用于传染性疾病、癌症，包括原发肿瘤和转移性肿瘤和自体免疫疾病的预防和/或治疗。

本发明进一步涉及（1）IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和（2）包含抗原或其免疫原性衍生物和 CpG 佐剂的免疫原性组合物在制造药物中的用途，所述药物通过向患者施用安全和有效量的两种组分在患者中实现保护性免疫反应或降低疾病的严重程度。

本发明进一步涉及制造这种免疫原性组合物的方法，这种组合物用于预防和/或治疗疾病、特别是癌症的用途，和这种组合物在哺乳动物、包括人类中抑制肿瘤或癌细胞的生长的用途。

30 详细说明

在本发明的一个形式中，免疫原性组合物内的 CpG 佐剂含有一个、或两个或多个二核苷酸 CpG 基序，由至少三个，例如至少 6 个

或更多核苷酸分隔。本发明的寡核苷酸一般是脱氧核苷酸。在一个实施方式中，在寡核苷酸中的核苷酸间（internucleotide）是二硫代磷酸酯或硫代磷酸酯键，然而磷酸二酯和其他核苷酸间键也在本发明的范围内，包括带有混合的核苷酸间连接的寡核苷酸。在 US 5,666,153、
5 US 5,278,302 和 W095/26204 中描述了产生硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法。

寡核苷酸的实例具有以下序列。该序列可以含有硫代磷酸酯修改的核苷酸间连接。

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

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

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

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

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

替换性的 CpG 寡核苷酸可以包含上述序列，在其中具有不重要的删除或添加。

在本发明中利用的 CpG 寡核苷酸可以通过本领域已知的任何方法（例如，EP 468520）合成。方便地，这种寡核苷酸可以利用自动
15 化合物合成仪合成。

在本发明中利用的寡核苷酸一般是脱氧核苷酸。在一个实施方式中，在寡核苷酸中的核苷酸间键是二硫代磷酸酯或硫代磷酸酯键，然而磷酸二酯也在本发明的范围内。包含不同的核苷酸间连接的寡核苷酸是预期的，例如，混合的硫代磷酸酯磷酸二酯。可以使用稳定寡核苷酸的其他核苷酸间键。
20

抗原可以是来源于传染性生物体的抗原，例如肿瘤相关抗原或其免疫原性衍生物或衍生物。所述 IL-18 多肽可以是鼠或人 IL-18 多肽或其生物学活性片段。免疫原性组合物和 IL-18 在诱导抗原特异性抗体方面可以协同地起作用，在诱导或增强通常与 TH-1 型免疫系统相关的体液或/和细胞免疫反应方面是有效的。免疫反应的增强意思是免疫反应方面的总体增加，由体液和/或细胞介导的免疫反应确定，或由
25

肿瘤大小和/或负荷的降低来确定。协同意思是，当在用本发明的免疫原性组合物的组合治疗中施用**5**时，所述 IL-18 多肽或其免疫原性片段或变体能够诱导免疫反应，这种免疫原性组合物的存在可以增强所述 IL-18 多肽或其免疫原性片段或变体的效力。诱导免疫反应的结果可以是预防、疾病的严重程度的降低（包括，就癌症来说，原发的或转移的预先形成的肿瘤的减小，或癌症再发生的预防）、和/或治疗。

因此，在一个实施方式中，提供了在哺乳动物中引发针对抗原的免疫反应的方法，包括向所述哺乳动物施用 i) 有效量的、包含来源于传染性生物体的抗原或肿瘤相关抗原、和 CpG 佐剂的免疫原性组**10**合物，和 ii) IL-18 或其生物学活性片段或变体。在一个实施方式中，治疗的两种组分是次序地给予的。也就是，所述免疫原性组合物被用于加强通过施用 IL-18 而激发的（primed）体液和/或细胞免疫反应。做为选择，在另一个实施方式中，根据本发明的免疫原性组合物被用于在将要随后接受 IL-18 的个体中激发体液和/或细胞免疫反应。在再**15**另一个实施方式中，所述治疗的两个组分是同时给予的，通过在两个不同位置的共施用，或混合到相同的制品内。技术人员将能理解，免疫原性组合物和 IL-18 多肽都可以一次性地或反复地给予。

与单独使用任何一个组分相比，在本发明的范围内预期的组合治疗至少是同等有效的，或可以有提高的效力。特别是在癌症领域，该组合治疗是有益的，因为它组合了两种抗癌试剂，每一种都以加成的**20**方式工作，例如协同地，通过不同的作用机制来产生针对人类肿瘤细胞的增强的细胞毒反应。

在相关的实施方式中，提供了组合制品（例如，药物试剂盒或药物多瓶包装），包含作为活性成分的（1）IL-18 多肽或其生物学活性片段或变体和（2）包含抗原和 CpG 佐剂的免疫原性组合物，所述活**25**性成分被同时地、分开地或次序地使用，用于传染性疾病和癌症的预防和/或治疗。

组合制品意思是药物制品或药物（多瓶）包装或配药装置，其可含有含所述活性成分的一个或多个单位剂型。所述包装可以例如包含**30**金属或塑料薄膜，例如泡罩包装。所述包装或配药装置可以伴有施用的说明。当计划将 IL-18 多肽和免疫原性组合物作为两个独立的组合物施用**35**时，这些可以以例如多瓶包装的形式存在。根据本发明，同时

地、或分开地、或次序地施用的活性成分不代表已知试剂的简单的集合，而是具有令人惊讶的宝贵性质的新的组合，从而 IL-18 多肽的使用容许模拟 (simulation) 免疫系统的先天的和适应性的 (adaptive) 组分，包括 NK 细胞活化以及 T 细胞介导的免疫反应和细胞因子产生，从而提高所述免疫原性组合物的效力。这产生了新的和有效的治疗。要理解的是，所述组合制品，也指多部分的试剂盒 (kit-of-parts)，意思是为了可用于独立的或次序的应用，所述组合制品的组分不必作为联合物 (union) 存在，例如在组合物中。因而多部分的试剂盒的表述意味着，鉴于所述组分的物理上的分离，其不必是真实的组合。

所述组合制品可被用于癌症的治疗或预防，特别是用于降低癌症的严重程度或预防癌症再发生。可受益于在此描述的组合治疗的癌症包括以不受控制的细胞生长和增殖、前肿瘤病变、原发性肿瘤和转移性肿瘤病变为特征的任何疾病，包括但不限于乳腺癌、肺癌 (特别是非小细胞肺-NSCLC-癌)、黑色素瘤、结肠直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、头和颈鳞状细胞癌、胃和其他 GI (胃肠的) 癌，特别是食道癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和浆细胞瘤。

包括肽 (即，少于约 50 个氨基酸) 的、示范性的抗原或其衍生物和片段，包括由 MAGE (黑色素瘤抗原编码基因) 家族编码的抗原，其被称为癌症 (睾丸) 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 基因属于近相关 (closely related) 基因家族，包括，即，MAGE 1、MAGE 2、MAGE 3 (黑色素瘤抗原编码基因 3)、MAGE 4、MAGE 5、MAGE 6、MAGE 7、MAGE 8、MAGE 9、MAGE 10、MAGE 11、MAGE 12，位于 X 染色体上，在它们的编码序列中彼此享有 64 到 85% 的同源性 (De Plaen E. et al., Immunogenetics, 1994, 40, 360-369)。这些有时被称为 MAGE A1、MAGE A2、MAGE A3、MAGE A4、MAGE A5、MAGE A6、MAGE A7、MAGE A8、MAGE A9、MAGE A10、MAGE A11、MAGE A12 (MAGE A 家族)。两个其他的蛋白群组也是 MAGE 家族的部分，不过是更远缘地相关的。这些是 MAGE B 和 MAGE C 群组。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 家族当前包括 MAGE C1 和 MAGE C2。一般而言, MAGE 蛋白可被定义为含有位于接近蛋白 C-末端的核心序列标记(例如, 对于 309 个氨基酸的蛋白 MAGE A1, 核心标记(signature)相应于氨基酸 195-
5 279)。

就此如下描述核心标记的共有模式, 其中 x 代表任何氨基酸, 小写字母的残基是保守的(容许保守性变化), 大写字母残基是完全保守的。

核心序列标记:

10

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

保守性替换是公知的, 一般作为序列比对计算机程序中的默认计分矩阵来建立。这些程序包括 PAM250 (Dayhoft M. O. et al., 1978, "A model of evolutionary changes in proteins", In "Atlas of Protein
15 sequence and structure"5(3)M. O. Dayhoft(ed.), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington, 和 Blossum 62 (Steven Henikof & Jorja G. Henikof (1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915-10919。

20 一般而言, 以下各组内的替换是保守性替换, 但在各组之间的替换被认为是非保守性的。这些组是:

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

25 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

一般地和在本发明的上下文中, MAGE 蛋白在这个核心区域与
30 MAGE A1 的氨基酸 195 到 279 具有约 50% 的同一性。

MAGE-3 在 69% 的黑素瘤中表达 (Gaugler B. et al. J. Exp. Med., 1994, 179: 921), 也可以在 44% 的 NSCLC 中 (Yoshimatsu T. J Surg Oncol., 1998, 67, 126-129)、75% 的小细胞肺癌 (SCLC) (Traversari C. et al., Gene Ther. 1997, 4: 1029-1035)、48% 的头和颈鳞状细胞
5 癌、34% 的膀胱转移细胞癌、57% 的食道癌、32% 的结肠癌和 24% 的
乳腺癌 (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) 中检测到。已经
在 MAGE-3 蛋白上鉴定出几个 CTL 表位, 其分别具有 MHC I 类
10 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。

其他示范性的抗原或由其衍生的衍生物或片段包括例如在 WO
99/40188 中公开的 MAGE 抗原、PRAME (WO 96/10577)、BAGE、
15 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, pps 628-
636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical &
20 Laboratory Research(submitted 1997); Correale et al.(1997), Journal
of the National Cancer Institute 89, p293. 实际上这些抗原在广泛的
肿瘤类型, 例如黑素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌中表达。

在一个实施方式中, 利用前列腺抗原, 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)、
25 PSMA 或称为 prostase 的抗原。

在一个实施方式中, 前列腺抗原是 P501S 或其片段。P501S, 也
叫作 prostein (Xu et al., Cancer Res. 61, 2001, 1563-1568), 已知
作为 W098/37814 的 SEQ ID NO. 113, 是 553 氨基酸的蛋白。如以上
引用的专利申请中公开的包含 20 或至少 20、50 或至少 50、或 100 或
30 至少 100 个连续的氨基酸的免疫原性片段和其部分, 是本发明特别考
虑的。片段在 WO 98/50567 中公开了 (PS108 抗原), 并作为前列腺
癌相关蛋白 (WO 99/67384 的 SEQ ID NO: 9)。其他片段是全长 P501S

蛋白的氨基酸 51-553、34-553 或 55-553。特别地，构建体 1、2 和 3 (参见附图 2, SEQ ID NO. 27-32)) 是特意考虑的，可以在酵母系统中表达，例如编码这种多肽的 DNA 序列可以在酵母系统中表达。

Prostase 是前列腺特异性丝氨酸蛋白酶 (胰蛋白酶样)，254 个氨基酸长度，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-前体肽序列，显示了潜在的分泌功能。(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, *In Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 3114-3119). 已经描述了推定的糖基化位点。预测的结构非常类似其他已知的丝氨酸蛋白酶，显示了成熟多肽折叠成单个结构域。成熟蛋白为 224 个氨基酸长度，具有至少一个显示被天然加工的 A2 表位。Prostase 核苷酸序列和推断的多肽序列和同源物在 Ferguson, et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 3114-3119) 和国际专利申请 No. WO 98/12302 (以及相应的授权专利 US 5,955,306)、WO 98/20117 (以及相应的授权专利 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) 中公开了。

其他前列腺特异性抗原可从 W098/37418 和 WO/004149 得知。另一个是 STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)。

在本发明的范围中有用的其他肿瘤相关抗原包括: 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 *Bioassays* 199, 21 61-70, 美国专利 5654140), CASB616 (WO 00/53216), Criptin (US 5,981,215)。另外，在癌症治疗中与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) 和其片段，例如在 WO 00/43420 中公开的，B726 (WO 00/60076, SEQ ID nos 469 和 463; WO 01/79286, SEQ ID nos 474 和 475)、P510 (WO 01/34802 SEQ ID nos 537 和 538) 和存活蛋白 (survivin)。

本发明与乳腺癌抗原组合也是有用的，例如 Her-2/neu、乳房珠蛋白 (mammaglobin) (美国专利 5,668,267)、B305D (WO00/61753

SEQ ID nos 299、304、305 和 315), 或那些在 WO00/52165、W099/33869、W099/19479、WO 98/45328 中公开的。Her-2/neu 抗原特别地在美国专利 5,801,005 中公开了。Her-2/neu 可以包含完整细胞外结构域(包含大约氨基酸 1-645)或其片段, 和大约 C 末端 580 个氨基酸的完整细胞内结构域, 或至少它的免疫原性部分。特别地, 所述细胞内部分应包含磷酸化作用结构域或其片段。这种构建体在 WO00/44899 中公开了。一种构建体被称为 ECD-PhD, 第二种被称为 ECD deltaPhD (参见 WO00/44899) 也叫作 dHER2。在此使用的 Her-2/neu 可以来源于大鼠、小鼠或人类。

某些肿瘤抗原是小肽抗原(即, 少于约 50 个氨基酸)。示范性的肽包括粘蛋白(Mucin)衍生的肽, 例如 MUC-1(参见例如 US 5,744,144; US 5,827,666; W088/05054, US 4,963,484)。特别考虑的是 MUC-1 衍生的肽, 包含 MUC-1 肽的至少一个重复单元, 或至少两个这种重复, 其可被 SM3 抗体识别(US 6,054,438)。其他粘蛋白衍生的肽包括来自 MUC-5 的肽。

做为选择, 所述抗原可以是白细胞介素例如 IL13 和 IL14。或所述抗原可以是自身肽激素, 例如全长的促性腺激素释放激素(GnRH, W095/20600), 一种短的 10 氨基酸长度的肽, 对于治疗多种癌症或在免疫去势(immunocastration)中是有用的。其他肿瘤特异性抗原包括但不局限于肿瘤特异性神经节苷脂, 例如 GM2 和 GM3。

所述抗原也可来源于对于人类是病原性的来源, 包括病毒、细菌或寄生虫, 例如人类免疫缺陷病毒 HIV-1(例如 tat、nef、逆转录酶、gag、gp120 和 gp160), 人单纯性疱疹病毒, 例如 gD 或其衍生物, 或来自 HSV1 或 HSV2 的即时早期蛋白例如 ICP27, 巨细胞病毒((esp Human)(例如 gB 或其衍生物), 轮状病毒(包括活的减毒病毒), Epstein Barr 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型肝炎病毒(例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物), 甲型肝炎病毒、C 型肝炎病毒和 E 型肝炎病毒, 或来自其他病毒病原体, 例如副粘病毒: 呼吸道合胞体病毒(例如 F 和 G 蛋白或其衍生物), 副流感病毒, 麻疹病毒, 腮腺炎病毒, 人乳头状瘤病毒(例如 HPV6、11、16、18、...), 黄病毒(例如黄热病毒, 登革热病毒, 婢传播的脑炎病毒, 日本脑炎病毒)或流感病毒

(完整的活的或失活病毒, 分裂流感病毒, 在鸡蛋或 MDCK 细胞中生长的, 或整个流感病毒粒 (如 R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920 描述的) 或其纯化的或重组蛋白, 例如 HA、NP、NA、或 M 蛋白, 或其组合), 或来源于细菌性病原体例如 *Neisseria spp*, 包括 *N. gonorrhea* 和 *N. meningitidis* (例如荚膜多糖和其结合物, 转铁蛋白结合蛋白, 乳铁传递蛋白结合蛋白, PilC, 粘附素); *S. pyogenes* (例如 M 蛋白或其片段, C5A 蛋白酶, 脂磷壁质酸), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, 包括 *M. catarrhalis*, 也称为 *Branhamella catarrhalis* (例如高和低分子量粘附素和侵袭素); *Bordetella spp*, 包括 *B. pertussis* (例如 pertactin, 百日咳毒素或其衍生物, 丝状 (filamentous) 血球凝集素, 腺苷酸环化酶, 菌毛), *B. parapertussis* 和 *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, 包括 *M. tuberculosis* (例如 ESAT6, 抗原 85A, -B 或 -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, 包括 *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, 包括肠毒性 *E. coli* (例如集群因子, 不耐热毒素或其衍生物, 热稳定毒素或其衍生物), 肠出血性 *E. coli*, 肠致病性 *E. coli* (例如 shiga 毒素样毒素或其衍生物); *Vibrio spp*, 包括 *V. cholera* (例如霍乱毒素或其衍生物); *Shigella spp*, 包括 *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, 包括 *Y. enterocolitica* (例如 Yop 蛋白), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, 包括 *C. jejuni* (例如毒素、粘附素和侵袭素) 和 *C. coli*; *Salmonella spp*, 包括 *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, 包括 *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, 包括 *H. pylori* (例如脲酶、过氧化氢酶、空泡毒素); *Pseudomonas spp*, 包括 *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, 包括 *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, 包括 *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, 包括 *C. tetani* (例如破伤风毒素和其衍生物), *C. botulinum* (例如肉毒杆菌毒素和其衍生物), *C. difficile* (例如梭菌毒素 A 或 B 和其衍生物); *Bacillus spp.*, 包括 *B. anthracis* (例如肉毒素和其衍生物); *Corynebacterium spp.*, 包括 *C. diphtheriae* (例如白喉毒素和其衍生物); *Borrelia spp.*, 包括 *B. burgdorferi* (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (例如 OspA, OspC, DbpA,

DbpB), *B. andersonii* (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, 包括 *E. equi* 和人类 Granulocytic Ehrlichiosis 的试剂; *Rickettsia spp.*, 包括 *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, 包括 *C. trachomatis* (例如 MOMP, 肝素结合蛋白), *C. pneumoniae* (例如 MOMP, 肝
 5 素结合蛋白), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, 包括 *L. interrogans*; *Treponema spp.*, 包括 *T. pallidum* (例如稀有外膜蛋白), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; 或来源于寄生虫例如 *Plasmodium spp.*, 包括 *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, 包括 *T. gondii* (例如 SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, 包括 *E. histolytica*; *Babesia spp.*, 包括 *B.*
 10 *microti*; *Trypanosome spp.*, 包括 *T. cruzi*; *Giardia spp.*, 包括 *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, 包括 *L. major*; *Pneumocystis spp.*, 包括 *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, 包括 *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, 包括 *S. mansoni*, 或来源于酵母例如 *Candida spp.*, 包括 *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, 包括 *C. neoformans*.

15 其他 *M. tuberculosis* 的特异性抗原是例如 Tb Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb38-1、Erd 14、DPV、MTI、MSL、mTTC2 和 hTCC1 (WO 99/51748). *M. tuberculosis* 蛋白还包括融合蛋白和其变体, 其中至少两个、或三个 *M. tuberculosis* 的多肽被融合成更大的蛋白。融合物可以包括 Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、DPV-MTI-MSL、
 20 Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTCC2、TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748).

衣原体的大多数抗原包括例如高分子量蛋白 (HWMP) (WO 99/17741)、ORF3 (EP 366 412) 和推定的膜蛋白 (Pmps). 疫苗制剂的其他衣原体抗原可以选自在 WO 99/28475 中描述的组。

25 细菌抗原可以来源于 *Streptococcus spp.*, 包括 *S. pneumoniae* (例如荚膜多糖和其结合物、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) 和其突
 30 变解毒衍生物 (WO 90/06951; WO 99/03884). 其他细菌抗原可以来源于 *Haemophilus spp.*, 包括 *H. influenzae* B 型 (例如 PRP 和其结合物)、不可分型的 *H. influenzae*, 例如 OMP26、高分子量粘附素、P5、P6、蛋白 D 和脂蛋白 D, 和丝束蛋白和丝束蛋白衍生的肽 (US

5,843,464) 或其多拷贝变体或融合蛋白。

乙型肝炎表面抗原的衍生物是本领域公知的, 特别地包括, 在欧洲专利申请 EP-A-414 374; EP-A-0304 578, 和 EP 198-474 描述的那些 PreS1、PreS2 S 抗原。在一个实施方式中 HBV 抗原是 HBV 聚合酶 (Ji Hoon Jeong et al, 1996, BBRC 223, 264-271; Lee H. J. et al, Biotechnol. Lett. 15, 821-826)。HIV 衍生的抗原也是预期的, 例如 HIV-1 抗原 gp120, 特别是在 CHO 细胞中表达时。

本发明的免疫原性组合物可以包含来源于人类乳头状瘤病毒 (HPV 6a、6b、11、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68), 特别时那些与生殖器疣有关的 HPV 血清型 (HPV 6 或 HPV 11 等) 和与子宫颈癌有关的 HPV 病毒 (HPV16、HPV18 等) 的抗原。适合的 HPV 抗原是 E1、E2、E4、E5、E6、E7、L1 和 L2。生殖器疣预防性或治疗性融合物的形式的实例包括 L1 粒子或衣壳体, 和包含选自 HPV 6 和 HPV 11 蛋白 E6、E7、L1 和 L2 的一种或多种抗原的融合蛋白。融合蛋白的形式的实例有: W096/26277 中公开的 L2E7, 和 W099/10375 中公开的蛋白 D (1/3) E7。HPV 子宫颈感染或癌的预防性或治疗性疫苗、组合物可以包含 HPV 16 或 18 抗原。例如, L1 或 L2 抗原单体, 或以病毒样粒子 (VLP) 一同呈现的 L1 或 L2 抗原, 或在 VLP 或衣壳结构中单独呈现的单独的 L1 蛋白。这种抗原、病毒样粒子和衣壳体本身是已知的。参见例如 W094/00152、W094/20137、W094/05792 和 W093/02184。

其他早期蛋白可被单独地或作为融合蛋白包括, 例如 E7、E2 或 E5; 这种实施方式包括包含 L1E7 融合蛋白的 VLP (W096/11272)。HPV 16 抗原可以包含与蛋白 D 载体融合的早期蛋白 E6 或 E7, 形成来自 HPV 16 的蛋白 D-E6 或 E7 融合物, 或其组合; 或者 E6 或 E7 与 L2 的组合 (W096/26277)。做为选择, HPV 16 或 18 早期蛋白 E6 和 E7 可以以单个分子出现, 例如蛋白 D-E6/E7 融合物。其他融合物任选地含有来自 HPV18 的 E6 和 E7 蛋白的任一或两者, 例如以蛋白 D-E6 或蛋白 D-E7 融合蛋白或者蛋白 D E6/E7 融合蛋白的形式。融合物可以包含来自其他 HPV 毒株的抗原, 例如来自毒株 HPV31 或 33。

来源于引起疟疾的寄生虫的抗原也是预期的。例如, 来自 *Plasmodia falciparum* 的抗原包括 RTS、S 和 TRAP。RTS 是一种杂

化蛋白，包含 *P. falciparum* 的环孢子 (CS) 蛋白的基本上所有 C-末端部分，通过乙型肝炎表面抗原 preS2 部分的四个氨基酸与乙型肝炎病毒的表面 (S) 抗原连接。它的完整结构在 W093/10152 中公开。当在酵母中表达时，RTS 作为脂蛋白粒子产生，当与来自 HBV 的 S 抗原共表达时，产生称为 RTS, S 的混合粒子。在 W090/01496 中描述了 TRAP 抗原。本发明的一个实施方式是一种融合，其中抗原性制品包含 RTS, S 和 TRAP 抗原的组合。可能作为融合物组分的候选的其他变形体抗原是 *P. faciparum* MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、Sequestrin、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230 和它们在 *Plasmodium spp* 中的类似物。

如在此使用的，术语“免疫原性组合物”按照其最广义的含义使用，意思是一种组合物，在向患者施用，积极地影响所述患者的免疫反应。免疫原性组合物给患者提供了增强的全身性或局部免疫反应，可以是细胞免疫反应，例如 CTL，或是体液免疫反应，例如抗体的引发。特别地，根据本发明的免疫原性组合物可以指制剂，包含有效量的抗原多肽/蛋白，特别是肿瘤相关抗原，或其免疫原性衍生物，特别是其片段，或编码多核苷酸和药学上可接受的载体。安全和有效量意思是蛋白的剂量，如有必要是与佐剂联合的，当向人类施用时，产生可检测的免疫反应，例如体液反应（抗体）或细胞反应，或具有免疫调节免疫系统的能力，而在一般接种者中没有显著的不良副作用。这种数量将取决于应用的哪种特异性免疫原和其如何呈现而变化。一般地，预期每个剂量包含 1 - 5000 μg 的蛋白，例如 1 - 1000 μg 的蛋白，例如 1 - 500 μg ，例如 1 - 100 μg ，例如 1 - 50 μg 。特定疫苗的最佳数量可以通过标准研究方法来确定，包括观察受试者中适当的免疫反应。在初次疫苗接种后，受试者可以接受一次或几次有适当间隔的强化免疫。在 Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M. F. & Newman M. J). (1995) Plenum Press New York) 中一般性地描述了疫苗制备。Fullerton, 美国专利 4,235,877 描述了脂质体内的封装。

免疫原性抗原多肽是指在免疫测定（例如，ELISA 或 T 细胞刺激化验）中可检测地与来自表达所述多肽的患者的抗血清和/或 T 细胞

起作用的多肽。免疫原性活性的筛选可以使用本领域技术人员公知的技术来进行。例如，这种筛选可以使用如在 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 中描述的那些方法进行。在一个说明性的实例中，多肽可以固定
5 在固相支持物上，与患者的血清接触以容许所述血清内的抗体结合到所述固定的多肽上。然后可以除去未结合的血清，使用例如 ^{125}I 标记的蛋白 A 检测结合的抗体。

根据用 SDS PAGE 检测的，以例如至少 80% 的纯度或例如 90% 的纯度提供本发明的多肽抗原。多肽抗原可以表现为 SDS PAGE 的单个条带。
10

抗原的免疫原性衍生物，例如抗原的免疫原性片段或部分，特别是肿瘤相关或肿瘤特异抗原的免疫原性衍生物，也包括在本发明中。如在此使用的“免疫原性片段”是一种片段，其本身与识别所述多肽的 B 细胞和/或 T 细胞表面抗原受体有免疫反应性（即，特异性结合）。
15 一般地可以使用公知的技术，例如在 Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) 和其中引用的文献中总结的那些，来鉴定免疫原性部分。这样的技术包括根据与抗原特异性抗体、抗血清和/或 T 细胞系或克隆反应的能力筛选多肽。如在此使用的，抗血清和抗体如果与抗原特异性地结合（即，在 ELISA
20 或其他免疫测定中与蛋白反应，但不与无关蛋白可检测地反应）就是“抗原特异性的”。这种抗血清和抗体可以如在此描述的，和使用公知的技术来制备。

在一个实施方式中，多肽的免疫原性部分是以不明显低于全长多肽的反应性的水平与抗血清和/或 T 细胞反应的部分（例如，在 ELISA
25 和/或 T 细胞反应性化验中）。免疫原性部分的免疫原活性水平可以是全长多肽的免疫原性的至少约 50%，或至少约 70%，或大于约 90%。在有些情况下，免疫原性部分可以被鉴定为具有高于相应全长多肽的免疫原性水平，例如，具有大于约 100% 或 150% 或更高的免疫原活性。在某些其他实施方式中，说明性的免疫原性部分可以包括其中已经删除了 N-末端前导序列和/或跨膜结构域的肽。其他说明性的免疫
30 原性部分可含有相对于成熟蛋白的小的 N-和/或 C-末端删除（例如，约 1-50 个氨基酸，例如约 1-30 个氨基酸，例如约 5-15 个氨基酸）。

在另一个实施方式中，本发明的说明性的免疫原性组合物，例如疫苗组合物，包含编码一种或多种如上所述的多肽的多核苷酸，从而多肽在原位产生。可以在多种已知递送系统的任何一种中施用所述多核苷酸。实际上，许多基因递送技术是本领域公知的，例如 Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15: 143-198, 1998 和其中引用的文献描述的那些。毫无疑问，合适的多核苷酸表达系统将含有必要的调节性 DNA 调节序列，用于在患者中表达（例如，适合的启动子和终止信号）。做为选择，细菌递送系统可以包括施用在细胞表面表达所述多肽的免疫原性部分或分泌这种表位的细菌（例如 *Bacillus-Calmette-Guerrin*）。

在本发明的一个实施方式中，作为“裸”DNA 施用/递送本发明的多核苷酸，例如在 Ulmer et al., *Science* 259: 1745-1749, 1993 中描述的和 Cohen, *Science* 259: 1691-1692, 1993 综述的。通过将 DNA 包被在生物可降解的珠中可以增加裸 DNA 的摄取，所述生物可降解的珠被有效地转运到细胞中。在一个实施方式中，组合物是皮内递送的。特别地，所述组合物是通过基因枪（特别是粒子轰击）施用技术递送的，其包括将载体包被到珠子上（例如，金），然后在高压下施用到表皮中，例如，如 Haynes et al, *J Biotechnology* 44: 37-42 (1996) 中描述的。

在一个说明性的实例中，用例如 Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) 和 Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI) 制造的那些装置可以实现气体驱动的粒子加速，这一点的一些实例在美国专利 No. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; 和 EP Patent No. 0500 799 中描述了。这种方法提供了一种无针的递送方法，其中微观粒子，例如多核苷酸的干粉制剂在手持装置产生的氦气喷射内被加速到高速，推动所述粒子进入目标靶组织，一般是皮肤。所述粒子可以是 0.4-4.0 μm ，例如 0.6-2.0 μm 直径的金珠，DNA 结合物包被在这些金珠上，然后封装到用于放置到“基因枪”中的筒或盒中。

在相关的实施方式中，对于气体驱动的非注射本发明的组合物有用的其他装置和方法包括 Bioject, Inc. (Portland, OR) 提供的那些，其某些实例在美国专利 No. 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 和 5,993,412 中描述了。

因此,在某些实施方式中,使用多种已知的基于病毒的系统任何一种将编码在此描述的免疫原性多肽的多核苷酸导入到适合的哺乳动物宿主细胞中用于表达。在一个说明性的实施方式中,逆转录病毒提供了基因递送系统的方便和有效的平台。编码本发明的多肽的选定核苷酸序列可以使用本领域已知的技术插入到载体中,并封装到逆转录病毒粒子中。然后能分离重组病毒并递送给受试者。已经描述了许多说明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。

此外,还已经描述了许多说明性的基于腺病毒的系统。与整合到宿主基因组中的逆转录病毒不同,腺病毒存留在染色体外,因而使与插入突变有关的风险最小化(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) *BioTechniques* 6: 616-629; and Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4: 461-476)。由于人类有时被常见的人类腺病毒血清型,例如 AdHu5 感染,显著比例的人群具有对腺病毒的中和抗体反应,在基于重组疫苗的系统中可能影响对异源抗原的免疫反应。非人灵长类腺病毒载体,例如黑猩猩腺病毒 68 (AdC68, Fitzgerald et al. (2003) *J. Immunol* 170 (3): 1416-22)) 可以提供替换性的腺病毒系统,而没有预先存在的中和抗体反应的缺点。

也已经开发出各种腺病毒相关病毒(AAV)载体系统用于多核苷酸递送。使用本领域公知的技术可以容易地构建 AAV 载体。参见,例如,美国专利 No. 5,173,414 和 5,139,941; 国际公开 No. WO 92/01070 和 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; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1: 165-169; and Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179: 1867-1875.

对于通过基因转移递送编码本发明的多肽的核酸分子有用的其他病毒载体包括那些来源于痘病毒家族的, 例如牛痘病毒和禽痘病毒。举例来说, 表达新型分子的牛痘病毒重组体可以如下构建。首先将编码多肽的 DNA 插入到合适的载体中, 使得它接近牛痘启动子和侧翼牛痘 DNA 序列, 例如编码胸苷激酶 (TK) 的序列。然后这个载体被用于转染同时感染了牛痘的细胞。同源重组用于将牛痘启动子加编码所述目标多肽的基因插入到病毒基因组中。可以通过在存在 5-溴脱氧尿核苷的情况下培养所述细胞, 并选取对其有抗性的病毒斑块, 来选择产生的 TK. sup. (-) 重组体。

基于牛痘的感染/转染系统可以被方便地用于提供在生物体的宿主细胞中在此描述的一种或多种多肽的可诱导的、瞬时的表达或共表达。在这个特定的系统中, 细胞首先在体外用编码噬菌体 T7 RNA 聚合酶的牛痘病毒重组体感染。该聚合酶显示了精确的特异性, 仅转录带有 T7 启动子的模板。在感染之后, 将细胞用由 T7 启动子驱动的多核苷酸或目标多核苷酸转染。在细胞质中表达的、来自牛痘病毒重组体的聚合酶将转染的 DNA 转录成 RNA, 然后 RNA 通过宿主的翻译机制被翻译成多肽。该方法提供了高水平的、瞬时的、细胞质的大量 RNA 和它的翻译产物的产生。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。

做为选择, 也可以使用禽痘病毒例如鸟痘 (fowlpox) 和雀痘 (canarypox) 病毒来递送目标编码序列。已知表达来自哺乳动物病原体的免疫原的重组禽痘病毒, 当给非禽类物种施用, 给予了保护性免疫。在人类和其他哺乳动物物种中施用 Avipox 载体是特别希望的, 因为 Avipox 属的成员仅在易感的禽类物种中生产性复制, 因而在哺乳动物细胞中没有传染性。生产重组禽痘病毒的方法是本领域已知的, 并应用了遗传重组, 在以上关于牛痘病毒的生产中描述了。参见, 例如 WO 91/12882; WO 89/03429; 和 WO 92/03545。

许多甲病毒属载体的任何一种也可以被用于递送本发明的多核苷

酸组合物，例如那些在美国专利 No.5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 和 6,015,694 中描述的。也可以使用某些基于委内瑞拉马脑炎 (VEE) 的载体，这些的说明性实例可以在美国专利 No.5,505,947 和 5,643,576 中找到。

5 以将有预防性或治疗性效果的数量，施用包含编码抗原性肽的核苷酸序列的载体。施用的数量一般地在 1 皮克到 16 毫克的范围内，例如对于粒子介导的递送每剂 1 皮克到 10 微克，例如对于其他途径的核苷酸每剂 10 微克到 16 毫克。确切数量可以取决于被免疫患者的体重和施用途径显著地变化。

10 用于将裸多核苷酸或载体导入到患者中的适合的技术还包括与合适的赋形剂局部施用。例如，可以通过鼻内的、口服、阴道内的或直肠内的施用将所述核酸局部地施用到皮肤、或施用到粘膜表面。裸多核苷酸或载体可以与药学上可接受的赋形剂，例如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 一同存在。可以单独地或包括在 DNA 制剂内使用促进试剂，
15 例如丁哌卡因，来进一步促进 DNA 摄取。直接向受者施用核酸的其他方法包括超声、电刺激、电穿孔和在 US 5,697,901 中描述的微播种 (microseeding)。

核酸构建体的摄取可以通过几种已知的转染技术来增强，例如那些包括施用转染试剂的技术。这些试剂的实例包括阳离子试剂，例如，
20 磷酸钙和 DEAE-Dextran 和脂转染剂，例如，lipofectam 和 transfectam。可以改变要施用的核酸的剂量。

在再另一个实施方式中，本发明的免疫原性组合物包含抗体、或血清、或抗体的结构域，例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段。例如，抗体是单克隆抗体或其片段。有效的剂量一般是 100 μg 到 500 mg，例如 1 mg
25 到 50 mg 每千克患者体重。因此，本发明的方法包括被动的免疫疗法或被动的免疫预防。

本发明的免疫原性组合物和 IL-18 多肽可以通过多种途径递送，例如肌内的、皮下地、腹膜内地或静脉内地递送。

根据本发明的 IL-18 多肽或其生物学活性片段是诱导主要为 Th1
30 型免疫反应的物质。高水平的 Th1 型细胞因子 (例如，IFN-γ、TNFα、IL-2、IL-12、IL-18，等等) 往往有助于诱导针对施用的抗原的细胞介导的免疫反应。与此相反，高水平的 Th2-型细胞因子 (例如，IL-4、

IL-5、IL-6 和 IL-10) 往往有助于诱导体液免疫反应。关于细胞因子家族的综述, 参见 Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989. “IL-18”或“IL-18 多肽”意思是如 EP0692536、EP 0712931、EP0767178 和 W097/2441 中公开的 IL-18 多肽。IL-18 多肽衍生物或变体包括包含氨基酸序列的分离的多肽, 所述氨基酸序列与附图 1 中描述的 SEQ ID NO: 6 (人类 IL-18) 或 SEQ ID NO: 7 (鼠 IL-18) 的氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 的完整长度上具有至少 70% 的同一性, 例如至少 80% 的同一性, 例如至少 90% 的同一性, 例如至少 95% 的同一性, 例如至少 97-99% 的同一性。这种多肽包括分别包含 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 的氨基酸的那些。IL-18 多肽可以具有如 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 中阐述的氨基酸序列。IL-18 片段也是预期的, 这是能展现 IL-18 的生物学的 (抗原性或免疫原性) 活性, 例如诱导 IFN- γ 的、IL-18 的片段。可以使用 IL-18 生物学活性片段和/或 IL-18 免疫原性片段。

IL-18 多肽可以是成熟蛋白的形式, 或可以是更大的蛋白, 例如融合蛋白的一部分。IL-18 变体也是预期的, 这是通过保守性氨基酸替换改变了的多肽, 其中残基被另一个有类似特性的残基替代。典型的这样的替换是在 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。可以使用其中几个、5-10 个、1-5 个、1-3 个、1-2 个或 1 个氨基酸以任意组合被替换、删除或添加的变体。IL-18 生物学活性片段也是预期的。“生物学活性片段”意思是 IL-18 的片段, 其基本上保存了与全长 IL-18 相同的生物活性。生物活性意思是任一以下的性质: 强化天然杀伤 (NK) 细胞活性和 Th1 细胞反应 (活化 NK、NKT 细胞, 诱导活化 T 细胞的增殖), 抗血管生成活性, 增强活化的 NK、NKT 细胞和 T 细胞上 Fas 配体的表达, IFN γ 、GM-CSF 和其他细胞因子例如 Th1-型细胞因子的增加的产量、刺激先天免疫和刺激 Th1-和 Th2-介导的免疫反应的能力。

特别地, IL-18 的生物学活性片段是一种片段, 根据在体外通过 KG-1 化验系统测量的, 其保持了提高 IFN γ 的生产的能力。表达人类 IL-18 受体的人类骨髓单核细胞系 (KG-1) 将通过提高 IFN γ 的产量 (分泌) (ELSA 测量的) 和活化 NF κ B 来响应 IL-18 的治疗 (Matsuko

Taniguchi et al. *J. Immunological Methods*, 1998, 217, 97-102).

根据本发明的 IL-18 多肽可以以任何适合的方式制备。包括分离天然发生的多肽、重组地或合成地生产所述多肽，等。这种制备方法是本领域公知的。

- 5 根据本发明的免疫原性组合物有利地可以包括药学上可接受的赋形剂或载体。载体分子可以包括几种形式，包括载运有机体，例如活的细菌载体或细菌载运菌株、水、盐水或免疫刺激剂化学药品。载体可以是水、盐水或其他缓冲生理溶液。载体分子也可包括多孔的聚合粒子，例如微珠或纳米粒子，和金属盐类粒子例如氢氧化铝、磷酸铝
- 10 或磷酸钙、磷酸镁、磷酸铁、碳酸钙、碳酸镁、硫酸钙、氢氧化镁、或双盐，如磷酸铵铁、磷酸钾铁、磷酸钙铁、碳酸钙镁或任何这些盐的混合物。

在施用在此提供的组合制品时，患者将支持 (support) 免疫反应，包括 Th1 和 Th2 型反应。

- 15 在本发明的实施方式中，免疫原性组合物可以额外包含另一个佐剂，例如主要诱导 Th1 型免疫反应的佐剂。TH-1 诱导佐剂可以选自佐剂的组，包括：脂多糖衍生的佐剂，例如肠细菌脂多糖 (LPS)、3D-MPL、QS21、QS21 和胆固醇的混合物、CpG 寡核苷酸或两种或多种所述佐剂的混和物。引发主要地是 Th1 型反应的某些佐剂可以包
- 20 括，例如，单磷酸基脂质 A，例如 3-de-O-酰化的单磷酸基脂质 A 以及铝盐。MPL®佐剂可从 Corixa Corporation 获得 (Seattle, WA; 参见，例如美国专利 No. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 和 4,912,094)。

- 在一个实施方式中，根据本发明的免疫原性组合物另外可以包含皂角苷佐剂，例如 Quil A 的无毒部分，例如 QS-17 或 QS-21，例如
- 25 QS-21。

- 皂角苷在 Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386) 中教导了。皂角苷是广泛地分布于植物和海洋动物界的类固醇或三萜烯糖苷。皂角苷具有在水中形成摇
- 30 动时起泡沫的胶体溶液的特点，并有沉淀胆固醇的特点。当皂角苷接近细胞膜时，它们在膜上产生孔样结构，引起膜破裂。红血球的溶血作用是这种现象的实例，其是某些皂角苷、但不是全部皂角苷的性质。

皂角苷作为用于全身性施用的疫苗中的佐剂是已知的。在本领域中已经广泛地研究了各种皂角苷的佐剂和溶血活性 (Lacaille-Dubois and Wagner, 同上)。例如, Quil A (来源于南美洲的树木 *Quillaja Saponaria* Molina 的树皮) 和其部分, 在 US 5,057,540 和 "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; and EP 0 362 279 B1 中有描述。包含 Quil A 或其片段的微粒结构, 称为免疫刺激复合物 (Immune Stimulating Complexes, ISCOMS), 已经被用于疫苗的制造 (Morein, B., EP 0 109 942 B1)。已经报道这些结构具有佐剂活性 (EP 0 109 942 B1; WO 96/11711)。溶血的皂角苷 QS21 和 QS17 (Quil A 的 HPLC 纯化的部分) 已经被描述为强力的全身性佐剂, 生产它们的方法在美国专利 No.5,057,540 和 EP 0 362 279 B1 中公开了。在这些参考文献中还描述了的是 QS7 (Quil-A 的非溶血部分) 的用途, 其作为全身性疫苗的强力佐剂起作用。在 Kensil et al. 中进一步描述了 QS21 的用途 (1991. J. Immunology vol 146, 431-437)。QS21 和聚山梨酸酯或环糊精的组合也是已知的 (WO 99/10008)。在 WO 96/33739 和 WO 96/11711 中描述了包含 QuilA 的部分 (fractions), 例如 QS21 和 QS7 的微粒佐剂系统。

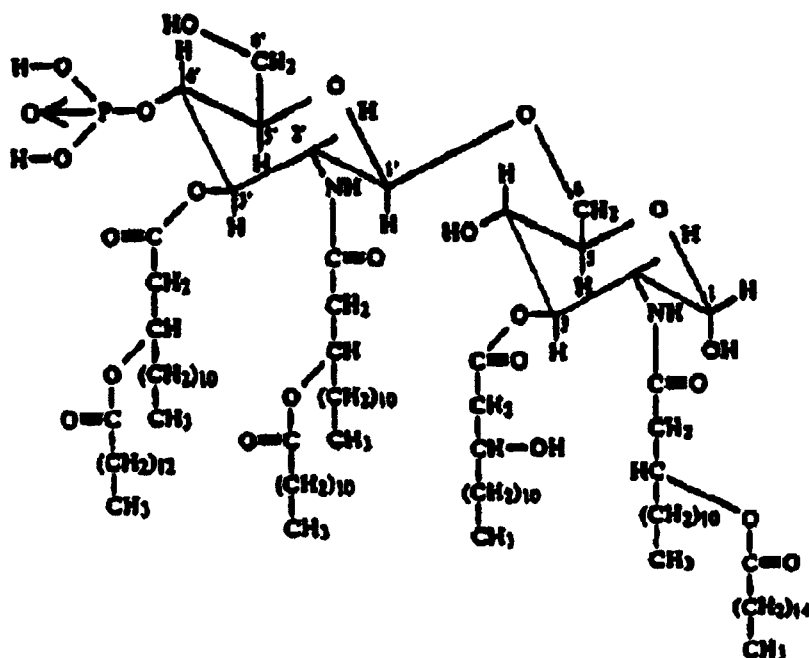
已经用于全身性疫苗接种研究的其他皂角苷包括来源于其他植物品种, 例如 *Gypsophila* 和 *Saponaria* 的那些 (Bomford et al., Vaccine, 10 (9): 572-577, 1992)。

也已知皂角苷被用于粘膜应用的疫苗研究, 在诱导免疫反应方面遇到了易变的成功。早先已经显示当抗原是鼻内地施用的时候, Quil-A 皂角苷在诱导免疫反应方面没有效果 (Gizurarson et al. 1994. Vaccine Research 3, 23-29)。同时, 其他作者已经成功使用了这个佐剂 (Maharaj et al., Can. J. Microbiol, 1986, 32 (5): 414-20; Chavali and Campbell, Immunobiology, 174 (3): 347-59)。包含 Quil A 皂角苷的 ISCOM 已经被用于胃内的和鼻内的疫苗制剂, 展现出佐剂活性 (McI Mowat et al., 1991, Immunology, 72, 317-322; McI Mowat and Donachie, Immunology Today, 12, 383-385)。Quil A 的无毒部分 QS21 也被描述为口服或鼻内的佐剂 (Sumino et al., J. Virol., 1998, 72 (6): 4931-9; W098/56415)。

一种增强的制剂可以包括含 CpG 的寡核苷酸与皂角苷衍生物的组合，例如如 WO00/09159 和 WO00/62800 中公开的 CpG 和 QS21 的组合。这种制剂另外可以包含水包油乳剂和生育酚。因此，在再进一步的实施方式中，本发明的免疫原性组合物包含 CpG 寡核苷酸和皂角苷例如 QS21 的组合，任选的配制在水包油乳剂中。所述制剂可以任选的另外包含 3D-MPL®佐剂。QS-21 可以按其较低的反应原性组合物来提供，其中它与胆固醇淬火，如 WO 96/33739 中描述的。

在另一个实施方式中，本发明的免疫原性组合物另外包含肠细菌脂多糖衍生佐剂，例如单磷酸基脂质 A，例如 3-de-O-酰化的单磷酸基脂质 A。

很早就知道肠细菌脂多糖 (LPS) 是免疫系统的强力刺激物，但它在佐剂中的使用被它的毒性效果限制。LPS 的无毒衍生物单磷酸基脂质 A (MPL)，通过从还原末端葡萄糖胺除去核心碳水化合物基团和磷酸盐产生，已经由 Ribb 等人描述了 (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419), 具有以下结构:



MPL 的进一步解毒的型式是由从二糖主干的 3-位置除去酰基链产生，被称为 3-O-脱酰基单磷酸基脂质 A (3D-MPL)，可以通过 GB

2122204B 中教导的方法来纯化和制备它，这个参考文献还公开了二磷酸基脂质 A、和其 3-O-脱酰基的变体的制备。3D-MPL 的一种形式是具有直径小于 0.2 μm 的小微粒尺寸的乳剂的形式，在 W094/21292 中公开了其制备方法。在 W098/43670A2 中已经描述了包含单磷酸基

5 脂质 A 和表面活性物质的水性制剂。

将要配制在本发明的佐剂组合中的细菌脂多糖衍生的佐剂可以从细菌来源纯化和加工，或作为选择可以是合成的。例如，在 Ribí 等 1986 (同上) 中描述了纯化的单磷酸基脂质 A，在 GB2220211 和 US 4,912,094 中描述了来源于 *Salmonella sp.* 的 3-O-脱酰基单磷酸基或二

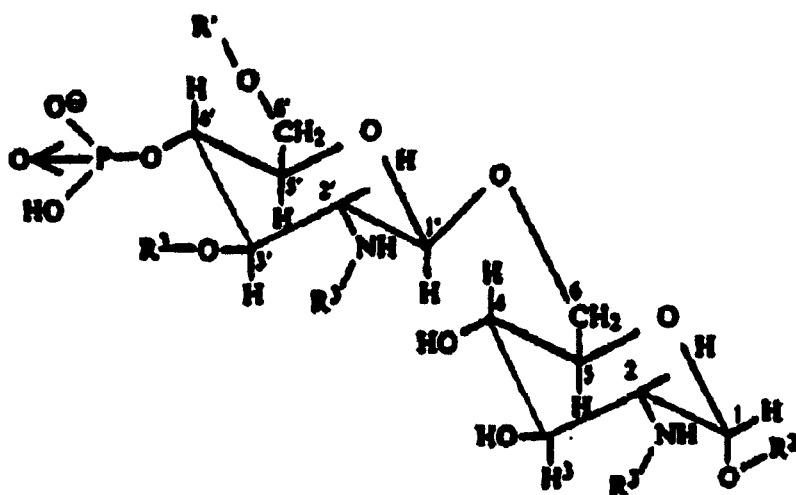
10 磷酸基脂质 A。已经描述了其他纯化的和合成的脂多糖 (W098/01139; US 6,005,099 and EP 0 729 473 B1; Hilgers *et al.*, 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79 (4): 392-6; Hilgers *et al.*, 1987, *Immunology*, 60 (1): 141-6; and EP0549074B1)。可以使用的细菌脂多糖佐剂是在 US 6,005,099 和 EP0729 473B1 中描述的 3D-MPL 和 β (1-6) 葡萄糖

15 胺二糖。

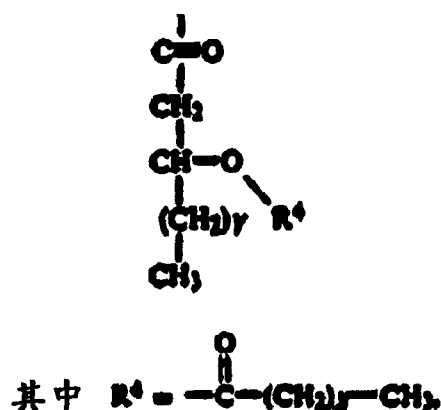
因此，可被用于本发明的 LPS 衍生物是在结构上类似于 LPS 或 MPL 或 3D-MPL 的那些免疫刺激剂。在本发明的另一个方面，LPS 衍生物可以是酰化的单糖，其是上述 MPL 结构的子部分。

一种二糖佐剂是下式的纯化的或合成的脂质 A:

20



其中 R2 可以是 H 或 PO_3H_2 ; R3 可以是酰基链或具有下式的 β -羟基肉豆蔻酰基或 3-酰氧基酰基残基:



和其中 X 和 Y 具有从 0 直到约 20 的值。

5 已经在 EP0761231B 中描述了 3D-MPL 和来源于 *Quillaja Saponaria molina* 的树皮的皂角苷佐剂的组合。W095/17210 公开了基于角鲨烯、 α -生育酚和聚氧乙烯单油酸山梨聚糖酯 (TWEEN80) 的、与免疫刺激剂 QS21、任选的与 3D-MPL 配制的佐剂乳剂系统。

因此，在另一个实施方式中，根据本发明的免疫原性组合物包含
10 (1) 抗原或其免疫原性片段和 (2) CpG 佐剂与一种或多种选自列表的以下佐剂的组合，所述列表包括例如：皂角苷佐剂，例如 QS21，例如以其与胆固醇淬火的形式，3D-MPL，和水包油的乳剂。

在一个进一步的实施方式中，根据本发明的免疫原性组合物包括
15 单磷酸基脂质 A 与 CpG 佐剂的组合，并可以包括单磷酸基脂质 A 的组合和皂角苷佐剂的组合这两者，例如 3D-MPL®佐剂与 QS21，如 W094/00153 中描述的，或更低反应原性组合物，在所述更低反应原性组合物中 QS21 与胆固醇淬火，如 W096/33739 中所描述的。其他制剂可以包括除 QS-21 以外的水包油的乳剂和生育酚。可以添加到
20 CpG 佐剂中的另一个制剂是 W095/17210 中描述的、应用水包油的乳剂中 QS21、3D-MPL®佐剂与生育酚的组合的制剂。因此，根据本发明的免疫原性组合物包含抗原，例如，肿瘤相关抗原，CpG 佐剂、皂角苷佐剂，例如 QS-21，任选的与 3D-MPL®佐剂一同，任选的除 QS-21 之外包含水包油的乳剂和生育酚。例如 QS-21 与胆固醇淬火。

做为选择，当出现在根据本发明的免疫原性组合物中时，皂角苷
25 佐剂可以与疫苗赋形剂组合，所述疫苗赋形剂由壳聚糖或其他聚阳离

子聚合物、聚交酯和聚交酯-共-乙交酯粒子、基于聚-N-乙酰基葡萄糖胺的聚合物基质、由多聚糖或化学修饰的多糖组成的粒子、脂质体和基于脂质的粒子、由甘油单酯组成的粒子，等等组成。所述皂角苷也可以在存在胆固醇的情况下配制以形成诸如脂质体或 ISCOM 的结构。此外，所述皂角苷可以与聚氧乙烯醚或酯一同配制，可以在非微粒溶液或悬浮液中，或可以在微粒结构例如少片层 (paucilamellar) 脂质体或 ISCOM 中。所述皂角苷也可以与赋形剂例如 Carbopol® 配制来增加粘度，或与粉末赋形剂例如乳糖以干粉形式配置。

疫苗和免疫原性组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中，例如密封的安瓿瓶或小瓶。这种容器可以被密封以保持制剂的无菌性直到使用时。一般地，制剂可以作为在油性或水性赋形剂中的悬浮液、溶液或乳剂保存。做为选择，疫苗或免疫原性组合物可被保存在冻干状况，仅需要在即将使用前添加无菌的液体载体。

可以在免疫原性组合物和疫苗内应用各种递送赋形剂的任何一种来促进靶向肿瘤细胞的抗原特异性免疫反应的产生。根据本发明的一个实施方式，在此描述的免疫原性组合物通过抗原呈递细胞 (APC) 被递送给宿主，例如树突状细胞、巨噬细胞、B 细胞、单核细胞和其他可被工程化成为有效的 APC 的细胞。APC 细胞可以、但不必被遗传地修饰来增加呈递抗原的能力，来改善 T 细胞反应的活化和/或维持，来具有本身的抗肿瘤效果，和/或与接受者免疫兼容 (即，匹配的 HLA 单体型)。APC 一般可以从各种生物学的液体和器官的任何一种分离，包括肿瘤和肿瘤周组织，可以是自体的、异源的、同源的或异种的细胞。

本发明的某些实施方式可以使用树突状细胞或其祖代作为抗原呈递细胞。树突状细胞是高度有效的 APC (Banchereau J. & Steinman R. M., Nature, 1998, 392: 245-251), 已被证明作为用于引发预防性或治疗性抗肿瘤免疫的生理学佐剂是有效的 (参见, Timmerman J. M. and Levy R., Ann. Rev. Med, 1999, 50: 507-529)。一般地，可以根据它们的典型形状 (原位是星形的，在体外具有可见的显著的胞质突 (树突))、它们高效率接受、加工和呈递抗原的能力和它们活化幼稚 T 细胞反应的能力来鉴定树突状细胞。毫无疑问，树突状细胞可以被工程化以表达通常不存在于体内或体外的树突状细胞上的、特定的

细胞表面受体或配体，这种修饰的树突状细胞是本发明预期的。作为对树突状细胞的替代，加载了分泌的泡囊抗原的树突状细胞（称为外来体）可以在疫苗内使用（参见，Zitvogel L. et al., Nature Med., 1998, 4: 594-600）。因此，提供了一种免疫刺激剂制剂，例如一种疫苗，包含有效量的树突状细胞或抗原递呈细胞、和药学上有效的载体，所述细胞通过在体外加载在此描述的多肽而修饰，或在体外遗传地修饰以表达在此描述的多肽。

树突状细胞和祖代可以从外周血、骨髓、肿瘤渗透细胞、肿瘤周组织渗透细胞、淋巴结、脾脏、皮肤、脐带血或任何其他适合的组织或液体获得。例如，可以通过向从外周血收获的单核细胞培养物中添加细胞因子的组合，例如 GM-CSF、IL-4、IL-13 和/或 $\text{TNF}\alpha$ ，来体外分化树突状细胞。做为选择，通过向培养基中添加 GM-CSF、IL-3、 $\text{TNF}\alpha$ 、CD40 配体、脂多糖 LPS、flt3 配体和/或诱导树突状细胞的分化、成熟和增殖的其他化合物的组合，可以将从外周血、脐带血或骨髓收获的 CD34 阳性细胞分化成树突状细胞。树突状细胞被方便地分类为“不成熟的”和“成熟的”细胞，这容许一种简单的方法来辨别两种被良好表征的表型。然而，这种命名法不应当被认为排除了分化的所有可能的中间阶段。不成熟的树突状细胞被表征为具有高的抗原摄取和加工能力的 APC，这与 $\text{Fc}\gamma$ 受体和甘露糖受体的高表达有关。成熟的表型一般地以这些标记的更低表达为特征，但与 T 细胞活化有关的细胞表面分子，例如 I 类和 II 类 MHC、粘附分子（例如，CD54 和 CD11）和共刺激分子（例如，CD40、CD80、CD86 和 4-1 BB）具有高表达。

一般可以用编码肿瘤蛋白（例如，MAGE-3、Her2/neu，或其衍生物）的多核苷酸转染 APC，从而所述肿瘤多肽、或其免疫原性部分在所述细胞表面上表达。这种转染可以在体外发生，然后包含这种转染的细胞的组合物或疫苗可被用于治疗目的，如在此描述的。做为选择，可以向患者施用靶向树突状细胞或其他抗原递呈细胞的基因递送载体，产生在体内发生的转染。树突状细胞的体内和体外转染，例如，一般地可以使用本领域已知的任何方法进行，例如在 WO 97/24447 中描述的那些，或 Mahvi D. M. et al., Immunology and Cell Biology, 1997, 75: 456-460 描述的基因枪方法。树突状细胞的抗原加载可以

通过与肿瘤多肽、DNA（裸的或在质粒载体内）或 RNA；或与抗原表达重组细菌或病毒（例如，牛痘、禽痘、腺病毒或慢病毒载体）孵化树突状细胞或祖细胞来实现。

其他适合的递送系统包括微球体，其中抗原性材料被掺入或结合到可生物降解的聚合物/微球上，使得所述抗原性材料可以与适合的
5 药物载体混和并用作疫苗。一般地使用术语“微球体”来描述基本上是球形和具有 10 nm 到 2 mm 范围内的直径的胶体粒子。从非常广泛的天然和合成的聚合物制备的微球体已经在各种生物医学应用中使用。这种递送系统对于具有短的体内半衰期需要多次治疗来提供效力的
10 蛋白，或在生物学液体中不稳定的蛋白、或由于它们相对高的分子量不能从胃肠道完全吸收的蛋白，是特别有益的。几种聚合物已经被描述为用于蛋白释放的基质。适合的聚合物包括明胶、胶原蛋白、藻酸盐、葡聚糖。递送系统可以包括生物可降解的聚（DL-乳酸）（PLA）、聚（丙交酯-共-乙交酯）（PLG）、聚（羟基乙酸）（PGA）、聚（ε-己内酯）（PCL）和共聚物聚（DL-乳酸-共-羟基乙酸）（PLGA）。
15 其他系统可以包括异质的水凝胶例如聚（醚酯）多嵌段共聚物，含有基于亲水的聚-（乙二醇）（PEG）和疏水的聚（丁烯对苯二酸酯）（PBT），或聚（乙二醇）-对苯二酸酯/聚（-丁烯对苯二酸酯）（PEGT/PBT）的重复嵌段（Sohier et al. Eur. J. Pharm and
20 Biopharm, 2003, 55, 221-228）。可以提供持续释放 1 到 3 个月的系统例如 PLGA、PLA 和 PEGT/PBT。

取决于涉及的患者的大小和物种、施用的核酸疫苗和/或蛋白组合物的数量、给药途径、使用的任何佐剂化合物的效力和剂量和其他因素，治疗方式将显著地变化，这对于有经验的开业医生是显而易见的。

25 参考以下非限制性的实施例进一步描述本发明：

实施例 I

使用基于 CpG 的免疫原性组合物的疫苗制品

I.1.- 脂质体制剂（AS15 佐剂）中的含有 QS21 & CpG 的免疫原性制
30 品：

这种佐剂系统 AS15 早先已经在 WO 00/62800 中描述。

AS15 是两种佐剂系统 AS01B 和 AS07A 的新型组合。AS01B 由

含有 3D-MPL 和 QS21 的脂质体组成, AS07A 由磷酸盐缓冲盐水中的 CpG 7909 (也称为 CpG 2006) 组成。

5 **3D-MPL:** 是来源于革兰氏阴性细菌 *Salmonella minnesota* 的脂多糖 (LPS) 的免疫刺激剂。MPL 已经脱酰基化, 并缺少脂质 A 部分上的磷酸基团。这种化学处理显著地降低了毒性, 而保持了免疫刺激剂性质 (Ribi, 1986)。Ribi Immunochemistry 为 GSK-Biologics 生产和提供了 MPL。

10 **QS21:** 是从南美洲树木 *Quillaja saponaria* Molina 的树皮提取的天然皂角苷分子。开发了从树皮的粗提物分离单独的皂角苷的纯化技术允许分离特定的皂角苷 QS21, 这是一种与亲本成分相比表现了更强佐剂活性和更低毒性的三萜烯糖苷。已经显示 QS21 活化 MHC I 类限制性 CTL 成几种亚单位 Ags, 以及刺激 Ag 特异性淋巴细胞增殖 (Kensil, 1992)。Aquila (正式地称 Cambridge Biotech Corporation) 为 GSK-Biologics 生产和提供了 QS21。

15 **CpG:** CpG ODN 7909 是 24 碱基长度的合成的单链的硫代磷酸寡脱氧核苷酸 (ODN)。它的碱基序列 5'-TCGTCGTTTTG-TCGTTTTGTTCGTT-3' 已经最优化以刺激人类免疫系统。含有 CpG 基序的 CpG DNA 或合成的 ODN 已知能激活树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞来分泌 TH1-样细胞因子和诱导 TH1 T 细胞反应, 包括细胞溶解 T 细胞的产生、刺激 NK 细胞分泌 IFN γ 和提高
20 它们的溶胞活性, 它们还激活 B 细胞的增殖 (Krieg A et al. 1995 Nature 374: 546, Chu R et al. 1997 J. Exp. Med. 186: 1623)。CpG 7909 不是任何人类基因组的已知序列的反义序列。CpG 7909 是由 Coley Pharmaceutical Group, Inc., MA, US 开发, 并代表其生产的专有的佐剂。
25

含 CpG 的制剂:

在注射的当天进行制剂。一只小鼠的注射体积是 50 或 100 μ l。含有脂质体中的含 CpG、3D-MPL 和 QS21 的典型制剂按如下进行: 20 μ g - 25 μ g 抗原用 H₂O 和 pH 7.4 PBS 稀释到等渗。5 min 后, 将按 1/5
30 的 QS21/胆固醇重量比 (称为 DQ) 与脂质体混和的 QS21 (0.5 μ g) 添加到制剂中。30 min 以后添加 10 μ g CpG (ODN 2006), 30 分钟后添加 1 μ g/ml 硫柳汞作为防腐剂。所有孵化在室温下搅动进行。

I.2. - 含有 CpG 和 AS02 的免疫原性制品 (AS02 是水包油乳剂形式的 QS21 & 3 de-O-酰化的单磷酸基脂质 A (3D-MPL)):

该佐剂系统 AS02 早先已经在 WO 95/17210 中描述。

5 **3D-MPL:** 如上所述。

QS21: 如上所述。

油/水乳剂由 2 油剂 (生育酚和角鲨烯) 制成的有机相和含作为乳化剂的 Tween 80 的 PBS 的水相组成。该乳剂包含 5%角鲨烯、5%生育酚、0.4%Tween80, 具有 180 nm 的平均粒度, 被称为 SB62 (参见
10 WO 95/17210)。

乳剂 SB62 (2 倍浓缩物) 的制备:

将 Tween 80 溶于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中, 得到 2%的 PBS 中的溶液。为提供 100ml 两倍浓缩的乳剂, 5g DL 阿尔法生育酚和 5ml 的角鲨烯彻底地涡旋混合。添加 90 ml PBS/Tween 溶液并彻底地混合。
15 然后使产生的乳剂通过注射器, 最后使用 M110S 微流化机进行微流体化。产生的油滴具有大约 180 nm 的大小。

含 CpG 的制剂:

典型的油/水乳剂形式的含有 3D-MPL 和 QS21 的制剂如下进行:
将 20 μg - 25 μg 的抗原稀释在 10 倍浓缩的 pH 6.8 PBS 和 H_2O 中,
20 之后连续添加 SB62 (50 μl), MPL (20 μg), QS21 (20 μg), 包含 CpG 寡核苷酸 (100 μg) 和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫柳汞 (thiomersal) 作为防腐剂。每种成分的数量可以根据需要变化。所有孵化在室温下搅动进行。

实施例 II

25 在 TC1 Her2 治疗模型中 mIL18 与添加 AS15 作为佐剂的 Her2/neu 疫苗组合的效果

II.1.实验设计

疫苗

Her-2/neu 疫苗是 ECD-PhD, 包含完整细胞外的结构域 (包含氨基酸 1 - 645) 和包含磷酸化结构域的细胞内结构域的免疫原性部分。
30 这种疫苗构建体在 WO00/44899 中公开, 被称为 dHER2。

通过将抗原稀释在 H_2O 、蔗糖和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 的混合物中,

将 dHER2 蛋白与 CpG 进行共同冻干。5 分钟后，冻干前，添加 CpG ODN 7909 来获得最终的物料(bulk),含有 625 µg/ml 的 Her2neu, 1250 µg/ml 的 CpG, 3.15%蔗糖和 5 mM PO4, pH 7。最终的物料按照 3 天的周期冻干。对于临时的制剂，含有 CpG 和抗原的冻干块用含 100 µg/ml MPL 和 DQ 的 625 µl AS01B 稀释剂重悬浮。

给动物注射 50 µl，含有 25 µg 的 Her2/neu，50 µg 的 CpG 和 5 µg 的 MPL 和 DQ。

表达 HER-2/neu 的肿瘤模型

用于这些实验的肿瘤模型：通过用编码 HER-2/neu 的重组逆转录病毒来逆转录病毒性地转导 TC1 细胞 (Dr T. C. Wu John's Hopkins University Baltimore 提供) 产生 TC1HER2。

已经分离和扩增了单独的克隆，HER2/neu 和 MHC I 类表达的稳定性通过流式细胞术确认。

小鼠组：

4 组各 5 只雌性 CB6F1 小鼠在 0 天接受用 2×10e6 TC1Her2 cl8 细胞的皮下 (SC) 攻击，随后用以下之一疫苗接种：

- gr1: PBS
- gr2: 从 7 天到 27 天每天注射 100ug 的 mIL18 (鼠的) (SC)
- gr3: 在 7 天和 14 天 25vg AS15 中的 dHER2 蛋白 (IM)
- gr4: 疫苗和 mIL18 的组合

II.2. 体内肿瘤生长和死亡：
结果在附图 2 和表 1 中示出。

表 1: TC1HER2 肿瘤攻击 27 天后保持无肿瘤的小鼠的百分比。

PBS	0%
mIL18	20% (死亡率: 2/5)
dHER2/AS15	0%
dHER2/AS15 mIL18	60% (2/5 发展了小肿瘤)

II.3 结论

基于使用配制在佐剂 (AS15) 中的重组纯化的 HER-2/neu 蛋白 (dHER2) 与重复注射鼠重组 IL-18 相组合的免疫策略, 与单独的疫苗组合物或 IL-18 的疫苗接种策略相比, 对于表达 HER2/neu 抗原的预先形成的肿瘤确实得出改善的结果。基于使用配制在 AS15 佐剂中的重组 dHER 蛋白的疫苗接种早先已经显示了非常有效地保护小鼠对抗这些表达 HER2/neu 抗原的肿瘤细胞的攻击。这种保护是特异于 HER2/neu 抗原的, 与长期的免疫记忆的诱导有关。在这个肿瘤为预先形成的更严格的治疗模型中, 疫苗接种已经显示有较低的效果, 对生长的肿瘤仅有有限的影响 (在这些条件下没有小鼠完全地排斥肿瘤)。然而令人惊讶地, 当同时地给予这两种治疗时, 观察到协同作用, 60% 的小鼠完全地保持了无肿瘤, 而 40% 仅发展出小肿瘤。总之, 如表 1 所示, 组合 mIL-18 和疫苗有清楚的益处。这可能意味着, 通过疫苗诱导 HER2/neu 特异性 T 细胞反应和通过重复注射 IL-18 活化免疫系统对于获得肿瘤衰退都是重要的。

实施例 III

在 TC1 Mage3 治疗模型中 mIL18 与添加 AS15 作为佐剂的 MAGE-3 疫苗组合的效果

III.1. 实验设计

疫苗

已经通过编码 Mage3 的 DNA 质粒 (PcDNA3 Mage3) 的标准转染遗传地修饰 TC1 亲本细胞产生了表达 Mage3 肿瘤抗原的肿瘤模型 (TC1 Mage3)。通过用编码 Mage3 的 PcDNA3 质粒转染亲本 TC1 细胞 (T. C. Wu at John's Hopkins University, Baltimore 提供) 产生这种肿瘤模型。根据试剂盒供应商 (Gibco BRL Life Technologies, cat no 18324-012) 的推荐使用 lipofectamin 进行了转染。

这些细胞是致瘤的, 用 2×10^6 TC1 Mage3 细胞攻击的小鼠 100% 发展出肿瘤。

4 组各 5 只雌性 C57BL/6 小鼠在 0 天接受用 2×10^6 TC1 Mage3 细胞的皮下 (SC) 攻击, 随后用以下之一接种:

-gr1: PBS

-gr2: 从 7 天到 27 天每天注射 100ug 的 mIL18 (鼠的) (SC)

-gr3: 在 7 天和 14 天 AS15 中的 10 µg Mage3 蛋白 (IM)

-gr4: 疫苗和 mIL18 的组合

- 5 评定 AS15 中的 Mage3 疫苗接种、IL18 注射和组合治疗诱导肿瘤衰退的能力。还测量了疫苗接种或/和 IL18 治疗对免疫参数的影响 (淋巴增殖、细胞因子产生...)。**

图 1 IL-18多肽

图1A 人类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 TC1 Her2治疗模型中的体内肿瘤生长

