

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/30

A61K 39/00 A61K 39/015



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00815933.5

[43] 公开日 2003 年 1 月 15 日

[11] 公开号 CN 1391609A

[22] 申请日 2000.9.20 [21] 申请号 00815933.5

[30] 优先权

[32] 1999.9.21 [33] GB [31] 9922361.2

[86] 国际申请 PCT/GB00/03601 2000.9.20

[87] 国际公布 WO01/21201 英 2001.3.29

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.20

[71] 申请人 埃西斯创新有限公司

地址 英国牛津

[72] 发明人 J·施奈德 S·C·吉尔伯特

C·M·翰南 A·V·S·希尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用复制缺陷腺病毒载体加强 CD8 + T 细胞对抗原的免疫应答

[57] 摘要

在给予激发组合物后用编码抗原或抗原的 CD8 + T 细胞表位的复制缺陷腺病毒载体加强个体中对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答。激发组合物包含抗原或表位或编码抗原或表位的核酸,并可以是 DNA, Ty - LVP's 或修饰病毒 Ankara (MVA)。可以是皮内或肌肉内给药。

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

1. 编码抗原或该抗原的 CD8 + T 细胞表位的复制缺陷腺病毒载体在生产药物中的用途, 此药物用于治疗体内对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答具有治疗或预防益处的个体, 其中药物用于在给予包含所述抗原或表位或编码所述抗原或表位的核酸的激发组合物之后给予这种个体, 从而加强在个体中对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答。

2. 权利要求 1 的用途, 其中激发组合物包含编码所述抗原或表位的 DNA。

3. 权利要求 1 的用途, 其中激发组合物包含重组 Ty - VLP。

10 4. 权利要求 1 的用途, 其中激发组合物包含修饰病毒 Ankara (MVA)。

5. 权利要求 1 至 4 的任何一项的用途, 其中药物为加强组合物, 在给予另一种不同的含所述抗原或表位的加强组合物之前给药。

15 6. 权利要求 1 至 4 的任何一项的用途, 其中药物为加强组合物, 在给予另一种不同的含所述抗原或表位的加强组合物之后给药。

7. 权利要求 1 至 6 的任意一项的用途, 其中药物用于皮内给药。

8. 权利要求 1 至 6 的任意一项的用途, 其中药物用于肌肉内给药。

20 9. 一种加强个体中对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答的方法, 此方法包括在个体中提供复制缺陷腺病毒载体, 此载体包括与调节序列可操作性连接的编码抗原或该抗原的 CD8 + T 细胞表位的核酸, 用于通过核酸的表达在个体中产生所述抗原或表位, 从而加强对前面在个体中激发的抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答。

25 10. 一种在个体中诱导对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答的方法, 此方法包括给予个体包含抗原或该抗原的 CD8 + T 细胞表位或编码该抗原或表位的核酸的激发组合物, 然后给予包含复制缺陷腺病毒载体的加强组合物, 此载体包括与调节序列可操作性连接的编码所述抗原或表位的核酸, 用于通过核酸的表达在个体中产生所述抗原或表位。

11. 权利要求 10 的方法, 其中激发组合物包含编码所述抗原或表位的 DNA。

30 12. 权利要求 10 的方法, 其中激发组合物包含重组 Ty - VLP。

13. 权利要求 10 的方法, 其中激发组合物包含修饰病毒 Ankara (MVA)。

14. 权利要求 9 至 13 的任何一项的方法, 进一步包含给予另一种不同的, 含上述抗原或表位的加强组合物。

15. 权利要求 9 至 14 的任何一项的方法, 其中加强组合物是皮内给药。

5 16. 权利要求 9 至 14 的任何一项的方法, 其中加强组合物是肌肉给药。

DNA 疫苗表现出激发抗约氏疟原虫 CS 蛋白的体液和细胞应答〔Sedegah et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (21): 9866-70〕。然而, 用表达伯氏疟原虫 CS 基因的 DNA 疫苗免疫的小鼠对保护性 CD8 + T 细胞表位 pb9 只有微弱的 CD8 + T 细胞应答〔Romero et al., (1989) Nature 341 (6240): 323-6〕并且甚至在重复免疫后也不能防御感染性子孢子的侵袭〔Schneider et al., (1998) Nat. Med. 4 (4): 397-402〕。由聚集为 30nm 颗粒的重组蛋白组成的类 Ty 病毒颗粒诱导更强的 CD8 + T 细胞应答, 但不能防御感染〔Gilbert et al., (1997) Nat. Biotechnol. 15 (12): 1280-4〕。

- 10 重组病毒也可以用作疫苗。修饰的疫苗病毒 Ankara (MVA) 在人细胞中不复制, 并且是用作疫苗的非常安全的病毒〔Mayr et al., (1978) Zentralbl. Bakteriol. 167 (5-6): 375-90; Sutter and Moss (1992) Proc Natl. Acad. Sci. 89 (22): 10847-51; Sutter et al., (1994) Vaccine 12 (11): 1032-40〕。在小鼠中也检验了表达伯氏疟原虫 CS 的重组 MVA, 细胞毒性测定中产生与用 Ty VLPs 免疫小鼠时相似水平的肽特异性裂解〔Gilbert et al., (1999) Biol. Chem. 380 (3): 299-303〕。同样, 这些小鼠不能防御感染侵袭。然而, 尽管单独使用 DNA 疫苗、Ty VLPs 或 MVA 都不能防御疟疾感染, 使用 DNA 或 Ty VLPs 激发 T 细胞应答并用 MVA 加强导致了分泌 IFN- γ 的 CD8 + T 细胞数目很大程度上的增加, 当静脉给予 MVA 时, 产生了完全的感染防御〔Schneider et al., (1998) Nat. Med. 4 (4): 397-402, WO 98/56919〕。

本发明使用了复制缺陷腺病毒, 如下面描述的实验所示, 发现它是对用任何各种不同的激发组合物激发的对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答提供加强的有效方法。

- 25 源于人血清型 5 的复制缺陷腺病毒由 Graham 和同事开发为活病毒载体〔Graham and Prevec (1995) Mol. Biotechnol. 3 (3): 207-20; Bett et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (19): 8802-6〕。腺病毒是含约 3600 bp 的线性双链 DNA 基因组的无被膜病毒。重组病毒可以通过腺病毒基因组质粒和含感兴趣的基因与强真核启动子的穿梭载体之间的体外重组, 在允许病毒复制的允许细胞系中构建。可以
30 从允许细胞系中获得高病毒滴度, 但产生的病毒尽管可以感染许多细胞类型, 但并不在允许细胞系以外的细胞中复制, 所以是安全的抗原

用复制缺陷腺病毒载体加强
CD8 + T 细胞对抗原的免疫应答

5 本发明涉及对抗抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答的产生。更具体地说，本发明涉及“激发和加强”免疫方案，其中通过给予激发组合物而诱导的免疫应答由给予加强组合物而加强。本发明是基于发明者的实验证明，即在用任何各种不同类型的激发组合物激发后，通过使用复制缺陷腺病毒载体可以获得有效的加强。

10 抗许多病原体的免疫应答的主要保护成分是由 CD8 + 类型的 T 淋巴细胞，也称作细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 介导的。CD8 + T 细胞的一项重要功能是分泌 γ 干扰素 ($\text{IFN}\gamma$)，这提供了 CD8 + T 细胞免疫应答的测量方法。

CD8 + T 细胞应答在防御许多寄生虫，包括原生动物寄生虫如弓形虫属和锥体虫属、恶性疟原虫（在小鼠中为伯氏疟原虫），病毒如 HIV、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、HBV、HCV、流感病毒、EBV、麻疹病毒、登革热病毒和 HTLV - 1，细菌如结核杆菌和利斯特菌，以及各种癌症，如黑色素瘤和肾癌中是重要的。

用伯氏疟原虫感染小鼠为人体中的恶性疟原虫提供了良好的模型，发明者选择将其用于举例说明本发明提供对抗抗原的强 CD8 + T 细胞免疫应答的能力。疟疾是全球的一个主要健康问题，针对找到用于接种的有效免疫组合物已经付出了许多努力。

为防御恶性疟的红细胞前期，免疫原性组合物必需诱导强 CD8 + T 细胞免疫。总的说来，可以在健康个体中产生无害的短期感染的减毒活疫苗可以有效诱导 T 细胞应答。接受过辐射的疟原虫子孢子可以感染肝细胞但不进展为血液期感染，它们表现出通过诱导抗红细胞前期抗原的 T 细胞应答而防御小鼠和人的疟疾 [Nardin and Nussenzweig (1993) Annu. Rev. Immunol. 11: 687 - 727]。然而在人中，这要求长时间中的多种免疫，同时尽管这些实验免疫提供了有价值的信息，

25 这种方法对开发疫苗是无用的。

重组蛋白亚单位疫苗激发了体液应答，但只激发了微弱的 CD8 + T 细胞免疫 [Schirmbeck et al., (1995) Vaccine 13(9): 857 - 865]。

运送系统。重组腺病毒表现出激发了抗许多抗原包括蜚传播的脑炎病毒 NS 1 蛋白 [Jacobs et al., (1992) J. Virol. 66 (4): 2086-95] 和麻疹病毒核蛋白 [Fooks et al., (1995) Virology 210 (2): 456-65] 的保护性免疫应答。另外, 单剂量的重组腺病毒导致小鼠中肝寄生虫约氏疟原虫的 rRNA 水平减少 93%, 以及表现为 CD8+T 细胞介导的 40% 的保护作用 [Rodrigues et al., (1997) J. Immunol. 158 (3): 1268-74]。

很显然, 下面描述的实验工作证明了本发明实施方案的使用允许表达抗原的重组复制缺陷腺病毒(特别用伯氏疟原虫的 CS 基因举例说明)增强由 DNA 疫苗、Ty-VLPs 或重组的修饰疫苗病毒 Ankara(MVA) 激发的 CD8+T 细胞免疫应答。发现皮内或肌肉内免疫后复制缺陷腺病毒诱导 CD8+T 细胞应答。在初次/加强接种方案中, 复制缺陷腺病毒也可以激发能被 MVA 加强的应答。

用复制缺陷腺病毒免疫并用 MVA 加强的小鼠完全抵抗伯氏疟原虫子孢子侵袭。重组复制缺陷腺病毒和重组 MVA 是用于人安全的疫苗。有利的是, 本发明者发现可以采用初次和加强免疫都使用皮内免疫的接种方案, 制定适于诱导 CD8+T 细胞的通用免疫方案, 如在人类中。

本发明在各种方面和实施方案中使用编码抗原的复制缺陷腺病毒载体, 从而增强由前面给予抗原或编码抗原的核酸激发的对该抗原的 CD8+T 细胞免疫应答。

本发明总体方面提供复制缺陷腺病毒载体在加强对抗原的 CD8+T 细胞免疫应答中的用途。

本发明的一方面提供了一种增强对个体中抗原的 CD8+T 细胞免疫应答的方法, 此方法包括在个体中提供复制缺陷腺病毒载体。此复制缺陷腺病毒载体包括与调节序列可操作性连接的编码抗原的核酸序列, 从而通过核酸表达而在个体中产生抗原, 由此加强前面在个体中激发的对抗原的 CD8+T 细胞免疫应答。

对抗原的免疫应答可以通过免疫, 通过用感染性媒介感染, 或通过生成肿瘤或恶性肿瘤而激发。

本发明的另一方面提供了一种在个体中诱导对抗原的 CD8+T 细胞免疫应答的方法, 此方法包含给予个体包含抗原或编码抗原的核酸

的激发组合物然后给予包含复制缺陷腺病毒载体的加强组合物，复制缺陷腺病毒载体包括与调节序列可操作性连接的编码抗原的核酸序列从而通过核酸表达而在个体中产生抗原。

如文中所公开的，本发明的另一方面提供了复制缺陷腺病毒在生产给予哺乳动物而加强对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答的药物中的用途。这种药物一般在给予包含抗原的激发组合物之后给予。

激发组合物可以包含任何病毒载体，尽管一般不是腺病毒，如疫苗病毒载体，如复制缺陷株如修饰病毒 ankara (MVA) (Mayr et al., (1978) Zentralbl. Bakteriologie 167 (5-6): 375-90; Sutter and Moss (1992) Proc. Natl. Acad. Sci 89 (22): 10847-51; Sutter et al., (1994) Vaccine 12 (11): 1032-40) 或 NYVAC (Tartaglia et al., Virology (1992) 118 (1): 217-32)，禽痘病毒载体如禽痘或黄雀痘，如称作 ALVAC 的株 (Knapox, Paoletti et al., Dev Biol Stand (1994) 82: 65-9)，或疱疹病毒载体。激发组合物可以包含重组细菌载体，如重组 BCG 或沙门氏菌。包含重组禽痘病毒的激发组合物是用于本发明的优选实施方案之一。

激发组合物可以包含编码抗原的 DNA，这种 DNA 优选以不能在哺乳动物细胞中复制的环形质粒的形式存在。任何可选择的标记不应该对临床上使用的抗生素耐药，所以例如卡那霉素耐药比氨苄青霉素耐药优选。抗原表达应由在哺乳动物细胞中有活性的启动子，例如巨细胞病毒即刻早期 (cytomegalovirus immediate early) (CMV IE) 启动子驱动。

激发组合物可以是重组 Ty - VLP。这些是由从酿酒酵母的 Ty 1 反转座子得到的自发聚集为颗粒的单种蛋白组成的蛋白颗粒。重组 Ty - VLPs 的产生可以通过将要求的表位或抗原的编码序列与 TyA 蛋白的编码序列的 3'端融合，并用包括编码序列的载体转化酿酒酵母而表达融合蛋白，融合蛋白然后在酵母细胞浆中聚集为颗粒，并可以在此被纯化。Ty - VLP 的特殊属性允许它们被抗原呈递细胞摄取并激发对包含在它们中的表位的 CD8 + T 细胞应答。

其它适当的激发组合物包括带有脂质尾的肽、融合蛋白、佐剂组合物等。

在本发明各方面的特定实施方案中，在给予激发组合物后用第一

和第二加强组合物加强，第一和第二加强组合物互不相同，如下面的举例说明。可以使用进一步的加强组合物而不离开本发明的范围。在一种实施方案中，一种三次免疫方案使用 DNA，然后将腺病毒作为第一加强组合物，然后将 MVA 作为第二加强组合物，其后可以选用进一步的（第三）加强组合物或后续加强给予一种或另一种或两种相同或不同的载体。另一种选择是 DNA，然后是 MVA，然后是 Ad，然后可以选用后续加强给予一种或另一种或两种相同或不同的载体。

分别包括于激发和加强组合物的抗原（不管使用多少加强组合物）不需要相同，但至少应该有一个相同的 CD8 + T 细胞表位。抗原可以对应于靶病原体或细胞中的完整抗原或其片段。可以使用肽表位或人工表位串，切掉抗原中不必要的蛋白序列和载体中的编码序列更有效。可以包括一种或更多额外的表位，例如由 T 辅助细胞识别的表位，特别是在不同 HLA 类型个体中识别的表位（如破伤风表位）。

在复制缺陷腺病毒载体中，编码抗原表达的调节序列包括启动子。“启动子”表示一种核苷酸序列，它可以起始下游的（即双链 DNA 有义链的 3' 方向）可操作性连接的 DNA 的转录。“可操作性连接”表示作为同一核酸分子的部分被连接，为转录从启动子起始而适当定位和定向。与启动子可操作性连接的 DNA 在启动子的“转录起始调节下”。其它调节序列包括终止子片段，聚腺苷酸化序列，增强子序列，标记基因和其它可以包括的适当的，符合本领域普通技术人员知识和惯例的序列：见，例如，Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press。许多操作核酸的已知技术和方案，例如制备核酸构建体、诱变、测序、将 DNA 引入细胞和基因表达，以及蛋白质分析都详细描述于 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1994。

用于本发明的一些方面和实施方案的适当启动子包括有或无内含子 A 的巨细胞即刻早期（CMV IE）启动子，以及在哺乳动物细胞中其它任何有活性的启动子。

激发和加强组合物之一或全部可以包括佐剂，如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）或其编码核酸。

给予加强组合物一般在给予激发组合物的约 10 天到 4 周之后，优

选约 2-3 周之后。

优选地，激发组合物，加强组合物，或激发组合物和加强组合物的给予是皮内或肌内免疫。

5 可以通过使用针头注射病毒悬浮液而完成腺病毒和 MVA 疫苗的皮内给予。另一种方法是使用无针头注射设备而给予病毒悬浮液（如使用 Biojector™）或含疫苗的冻干粉末（如依照 Powerject 的技术和产品），提供生产不需要冷藏的个别制备的剂量。这对非洲农村所需要的疫苗将是很大的优点。

10 腺病毒和 MVA 都是在人类免疫中有非常安全的记录的病毒。可以很简单地完成重组病毒的产生，并且可以大量重复生产。皮内给予重组复制缺陷病毒并随后给予重组 MVA 因此高度适合人类的预防或治疗性接种以对抗可以由 CD8 + T 细胞应答控制的疾病。

个体可以有疾病或紊乱，这样抗原运送和对抗原的 CD8 + T 细胞免疫应答的产生是有益的或有治疗上有益的作用。

15 更最多的情况下给予疫苗将有预防目的，是为了在感染或症状发展之前产生抗病原体或疾病的免疫应答。

可以依照本发明治疗或预防的疾病和紊乱包括前面已经指出的和其它 CD8 + T 细胞免疫应答可以起保护或治疗作用的疾病和紊乱。

20 依照本发明给予的成分可以配方为药物组合物。这些组合物可以包含可药用赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其它本领域技术人员公知的物质。这些物质应该是无毒的并不应该干扰活性成分的效果。载体或其它物质的精确特性取决于给药途径，如静脉内，皮肤或皮下，鼻，肌肉，腹膜内途径。

如提到的，优选皮内，皮下或肌肉给药。

25 液体药物组合物一般可以包括液体载体如水，石油，动物或植物油，矿物油或合成油。也可以包括生理盐水、葡萄糖或其它糖溶液或二元醇，如乙二醇，丙二醇或聚乙二醇。

30 对于静脉内、皮肤或皮下注射，或在病痛部位的注射，活性成分将以肠外可接受的水溶液的形式存在，它不含致热源并具有适当的 pH，等渗性和稳定性。本领域中的相关技术人员可以很容易用例如等渗载体如氯化钠注射液，林格氏液，乳酸化林格氏液制备适当的溶液。可以按要求包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。

可以使用缓释配方。

在产生复制缺陷腺病毒颗粒和选择将这些颗粒配制成组合物后，可以将这些颗粒给予个体，特别是人或其它灵长类动物。也可以给予其它哺乳动物，如啮齿类如小鼠、大鼠或仓鼠、豚鼠、兔、绵羊、山羊、猪、马、牛、驴、狗或猫。

10 优选以“有效预防量”或“有效治疗量”给药（视具体情况而定，尽管预防可以考虑为治疗），这足够对个体表现益处。实际给药剂量，给药速度和时间段将取决于处理情况的性质和严重程度。治疗的处方，如剂量的决定等都是在一一般实施者和其它医生，或在兽医学领域中的兽医的责任范围内，一般考虑需要治疗的疾病，个体病人的状况，运送位点，给药方式和实施者已知的其它因素。上面提到的技术和方案的例子可以在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980 中找到。

15 在一种优选方案中，以 0.5mg/注射的剂量给予 DNA（优选肌肉注射），然后给予剂量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ 个病毒颗粒/注射的腺病毒（优选肌肉或皮内注射）。

可以单独或与其它治疗结合给予组合物，可以同时或序贯给药，这取决于需要治疗的状况。

20 运送到非人哺乳动物不需要为了治疗目的，而可以是用于实验内容，例如，用于研究对感兴趣的抗原，如防御癌症、疟疾、其它病原体等抗原的免疫应答机制。

根据前面的公开内容和下面的通过图例说明但不限于此的实验举例，并参考附图，本发明的其它方面和实施方案对于本领域中的普通技术人员将是很明显的。在附图中，

25 图 1 表示证明由 Ad-PbCS 单次免疫激发的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞的实验结果。通过所表示的途径使用 10^7 pfu 免疫三只一组的各组小鼠。两周后对脾细胞进行两次 Elispot 测定而检测 IFN- γ 分泌 pb9 特异性 T 细胞。此图表示每种给药途径中每 100 万脾细胞中的斑点形成细胞（SFC）。

30 图 2 表示激发/加强免疫的结果。在第 0 天用所表示的第一种疫苗免疫三只一组的各组小鼠（D = pSG2.PbCS, A = Ad-PdCS, M = MVA-PbCS），在第 14 天用第二种疫苗免疫。DNA 用肌肉注射，腺病毒

和 MVA 用皮内注射。在第 28 天进行分离脾细胞的 Elispot。此图表示每种激发/加强免疫方案中每 100 万脾细胞中的 SFC。

图 3 表示三种疫苗结合免疫的结果，以及它与两种疫苗结合免疫的比较。用图示疫苗免疫三只一组的各组小鼠，间隔为 10 天 (D = pSG2. PbCS, A = Ad - PdCS, M = MVA - PbCS)，两种疫苗结合的第一种疫苗与三种疫苗结合的第二种疫苗是在同一天给予。在最后一次免疫后 10 天进行两次脾细胞 Elispot 测定。此图表示每种免疫方案中每 100 万脾细胞中的 SFC。

实验举例

10 本发明者构建了一种表达伯氏疟原虫 CS 基因的重组复制缺陷腺病毒，(Ad - PbCS)，并检验了病毒自身或与其它类型的疫苗结合在小鼠中诱导 CD8 + T 细胞反应的能力。

当用作单次免疫时，产生了高水平的抗原特异性 CD8 + T 细胞。用腺病毒激发并随后用 MVA 加强产生完全保护。显著的是，腺病毒
15 可以充分加强由 DNA, Ty - VLP 或 MVA 激发的反应。

材料和方法

DNA 疫苗

DNA 疫苗 pSG2. PbCS 由有内含子 A 的驱动伯氏疟原虫 CS 蛋白表达的 CMV 启动子及牛生长激素聚腺苷酸序列组成。此质粒为耐卡那
20 霉素的并且不能在真核细胞中复制。用 Qiagen 柱和在无内毒素的磷酸缓冲液 (PBS) 中稀释而制备质粒。

构建重组复制缺陷腺病毒

将从 pSG2. PbCS 得到的有内含子 A 的 CMA 启动子、伯氏疟原虫 CS 蛋白基因及牛生长激素聚腺苷酸序列连接到腺病毒穿梭载体 pΔE1sp
25 1A 的多克隆位点 [Bett et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(19): 8802 - 6]。此载体可以用于构建 E1 缺失的腺病毒 5 重组体。重组穿梭载体用于与腺病毒基因组质粒 pJM17 一起转染允许细胞系 293 [Graham and Prevec (1995) Mol. Biotechnol. 3(3): 207 - 20]。将从转染细胞得到的病毒通过在 293 细胞中的三次连续的有限稀释进行克隆纯化，并用免疫荧光证实伯氏疟原虫 CS 在感染了分离病毒的细胞中表达。在免疫前用感染的 293 细胞制备大量病毒并通过用 Arklone
30 提取而纯化 [Graham and Prevec (1995) Mol. Biotechnol. 3(3) 207

-20]。

Ty VLPs

按 [Gilbert et al., (1997) Nat. Biotechnol. 15 (12): 1280-4] 中所描述的制备表达伯氏疟原虫 CS 的 Pb9 表位 SYIPSAEKI 的重组 Ty VLPs 并将其悬浮在 PBS 中。

重组 MVA

通过在初级鸡胚胎成纤维细胞中由疫苗 P 7.5 启动子驱动的含 CS 基因的穿梭载体和 MVA 病毒之间的体外重组制备表达伯氏疟原虫 CS 的 MVA [Sutter et al., (1994) Vaccine 12 (11): 1032-40]。将也表达大肠杆菌 β 半乳糖苷酶的重组体进行重复噬斑纯化并用免疫荧光证实重组基因的表达。通过蔗糖缓冲的超速离心纯化用于免疫的病毒并将其悬浮在无内毒素的 PBS 中。

免疫

对于单个实验，按描述在麻醉下免疫 4-6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。每个胫骨肌用 50 μ g DNA 进行肌肉 DNA 免疫。将 MVA 和腺病毒（分别为每剂 10^6 和 10^7 pfu）皮内注射到耳廓。将 Ty VLP (100 μ g 每剂) 皮内注射到爪垫或静脉注射到尾外侧静脉。

ELISPOT 测定

按前面所描述的在新鲜脾细胞制剂中判断分泌 IFN- γ 的 pb9 特异性 T 细胞数目 [Schneider et al., (1998) Nat. Med. 4 (4): 397-402]。用抗鼠 IFN- γ 抗体 (ETCC 的 R4 克隆) 包被 96 个加样孔的硝化纤维滴定板，用 PBS 洗涤，然后用含 10% FCS 的完全培养基封闭。将从免疫小鼠得到的脾细胞以 $1-2 \times 10^7$ 细胞/毫升重新悬浮并放置两份于包被的加样孔中，并连续稀释。将 H2-K^d 限制肽 pb9 (SYIPSAEKI) (Romero) 加入试验加样孔并将无关肽加入对照加样孔。在过夜孵育后洗涤加样孔并将第二种生物素化的抗 IFN- γ 抗体 (Pharmingen 克隆) 加入加样孔。再次洗涤加样孔并加入链霉亲和素-碱性磷酸酶。在进一步洗涤后，通过加入碱性磷酸酶底物产生斑点。通过洗涤加样孔终止反应并在立体显微镜下计数斑点。

伯氏疟原虫侵袭

从实验室饲养的雌性按蚊中获得伯氏疟原虫 (ANKA 株克隆 1) 的子孢子，这些按蚊在用感染的小鼠喂养后在 18 $^{\circ}$ C 下维持 20-25 天。

通过解剖收集按蚊的唾液腺并将其与 RPMI 1640 (Sigma) 放置于组织匀浆器中释放孢子, 然后用血细胞计数器计数。通过注射 2000 个子孢子到尾静脉而侵袭小鼠。通过感染后 7 天和 9 天后制作的吉姆萨染色的血涂片上环形体的出现判断感染。如果在两个时间点都观察到了血液期的寄生物血症, 则处死小鼠。至少进一步观察 3 周看存活动物是否出现疟疾症状。

结果

用不同给药途径的单次腺病毒免疫的免疫原性

最先检验了给药途径对 Ad-PbCS 诱导 pb9 特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞能力的作用。

Rodrigues 等 (Rodrigues et al., (1997) J. Immunol. 158 (3): 1268-74) 发现在肌肉和皮下免疫后诱导了高水平的疟疾特异性 CD8 + T 细胞, 但静脉内、腹膜内或鼻内免疫却没有。本发明者没有检验静脉内和腹膜内免疫, 因为这些不是用于人的预防性疫苗的适当途径, 但包括了皮内和“基因涂抹 (gene paint) 组一即简单地将重组腺病毒给药到皮肤 (称作基因涂抹), 此方法在以前已经表明可以诱导对抗病毒表达的抗原的免疫应答 [Tang et al., (1997) Nature 388(6644): 729-30]。

各组小鼠接受单次 10^7 pfu Ad-PbCS 免疫, 在 14 天后检验了脾细胞中肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞。

肌肉或皮内免疫后检测到的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞数量 (图 1) 比单次用肌肉 DNA 免疫后检测到的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞略高, 并比用肌肉 MVA 免疫后检测到的 IFN- γ 分泌 T 细胞略低 [Gilbert et al., (1999) Biol. Chem. 380 (3): 299-303]。鼻内或皮下免疫产生数目非常低的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞, 而“基因涂抹”组检测不到任何肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞。以下实验均使用皮内免疫。

不同激发/加强免疫的免疫原性

图 2 表示在第 0 天接受激发免疫并在第 14 天接受加强免疫后在免疫小鼠脾中检测到的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞数目。

使用同样的疫苗进行激发和加强产生特异性 CD8 + T 细胞的增加, 但在异种加强后可以看到大得多的增加。DNA 并不加强正存在的应答。然而腺病毒激发和 MVA 加强的结合产生极高数目的肽特异性

CD8 + T 细胞。除了可以激发能被加强到这种高水平的应答, Ad - PbCS 可以加强由 DNA 或 MVA 激发的应答。

三种疫苗结合免疫的免疫原性

5 异种激发和加强很明确比重复用同种疫苗有效。序贯使用三种不同的疫苗。DNA 疫苗不加强, 所以有两种可能的结合, 使用 DNA/Ad/MVA 和 DNA/MVA/Ad。以 10 天的间隔免疫各组小鼠并在最后一次免疫 10 天后检测脾细胞。

如以前的实验, 在 DNA/MVA, Ad/MVA, MVA/Ad 和 DNA/Ad 免疫后检测到了高数目的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞 (图 3)。然而, 10 当给予第三种异种加强免疫时, 这些数目并不增加到同样程度 (3 到 10 倍)。

防御感染性侵袭

一些使用腺病毒作为激发或加强剂的激发/加强结合产生预计保护小鼠不受伯氏疟原虫子孢子侵袭的高数目的肽特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞。所以用许多不同的异种激发/加强结合免疫 8~11 只小鼠一组的各15 组小鼠并在加强免疫 2 周后用 2000 个感染性伯氏疟原虫子孢子侵袭。结果见表 1。

皮内给予腺病毒后皮内给予 MVA 完全保护被免疫小鼠。在以前的伯氏疟原虫侵袭实验中发现肌肉 DNA 免疫后皮内 MVA 免疫产生高20 水平保护, 但只有在静脉给予 MVA 时才获得完全保护 [Schneider et al., (1998) Nat. Med. 4 (4): 397-402]。然而使用腺病毒激发和 MVA 加强时, 两种疫苗都可以皮内给予而不失去保护。MVA 激发和腺病毒加强也产生高水平保护, 而两次连续的腺病毒免疫则不产生。腺病毒也加强由 DNA 或 Ty - VLPs 激发的应答, 产生与 DNA 激发和25 皮内 MVA 加强相当的保护水平。

表 1

用不同异种激发/加强结合免疫小鼠的保护。肌肉给予 DNA (剂量为 50 μ g)。除特别指出外, MVA (剂量为 10⁶ ffu)、腺病毒 (剂量为 10⁷ pfu) 和 Ty VLPs (剂量为 100 μ g) 均采用皮内给药。在第 0 天给30 予激发免疫, 在第 14 天加强免疫, 在第 28 天进行侵袭。

激发	加强	感染数	侵袭数	保护 %
DNA	MVA	5	10	50
Ad	MVA	0	10	100
MVA	Ad	2	10	80
Ad	Ad	7	8	13
DNA	Ad	5	11	55
MVA	MVA	5	8	38
Ty (i.v.)	Ad	7	10	30
Ty (i. v.)	MVA (i, v.)	1	11	91
Ty	Ad	4	10	60
未免疫的		8	10	20

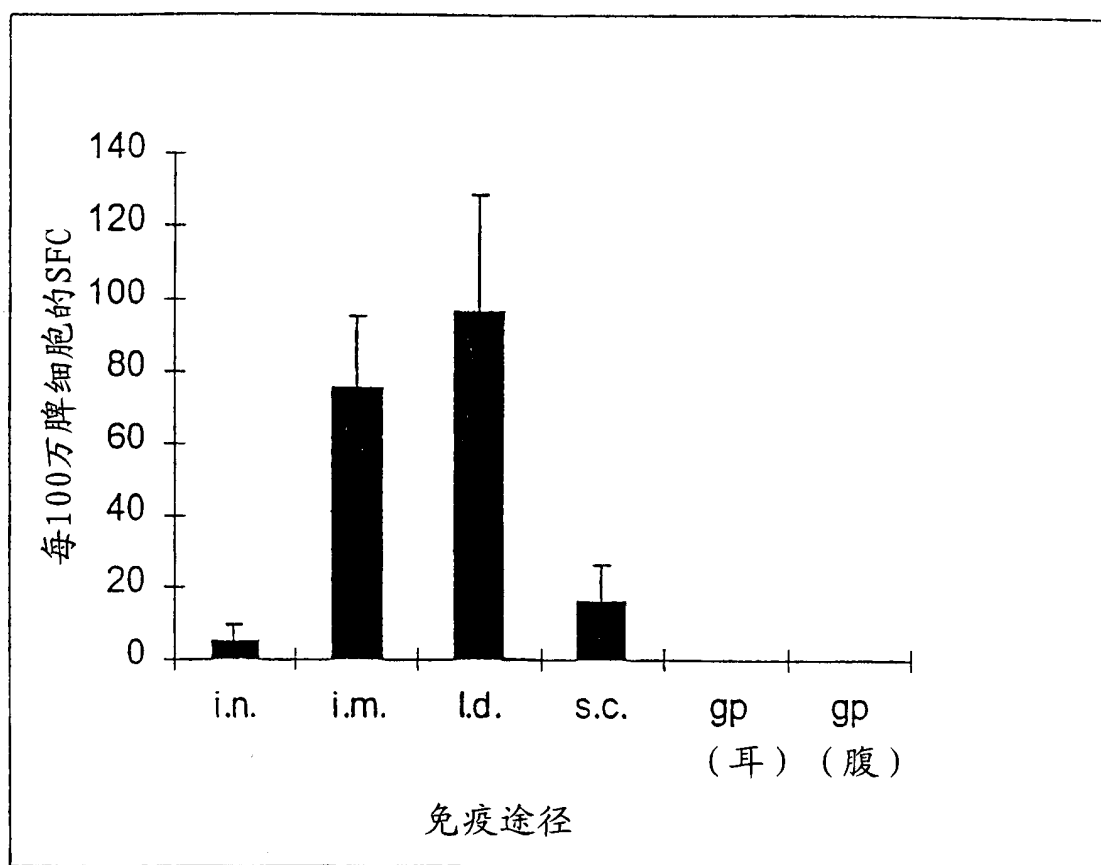


图 1

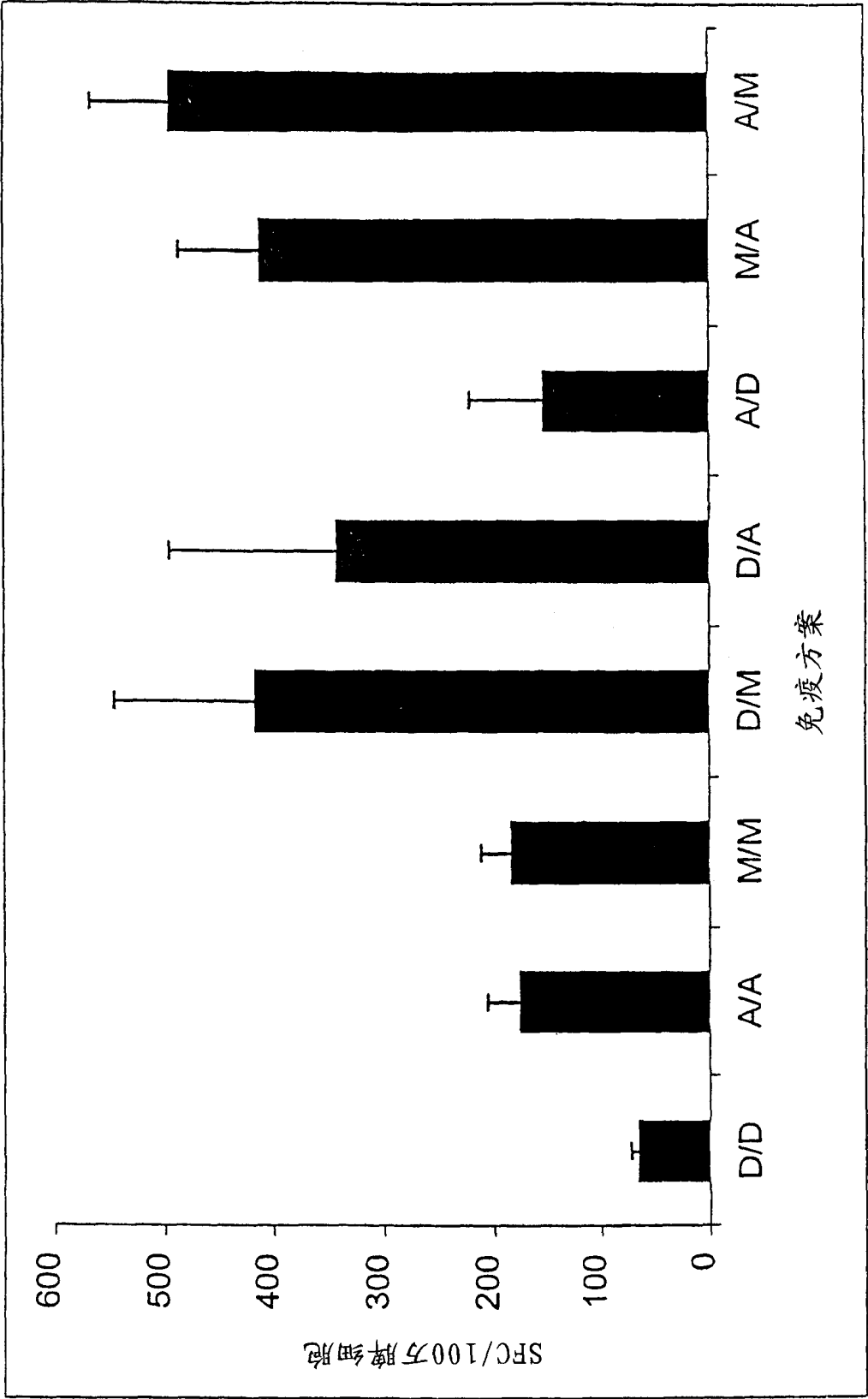


图 2

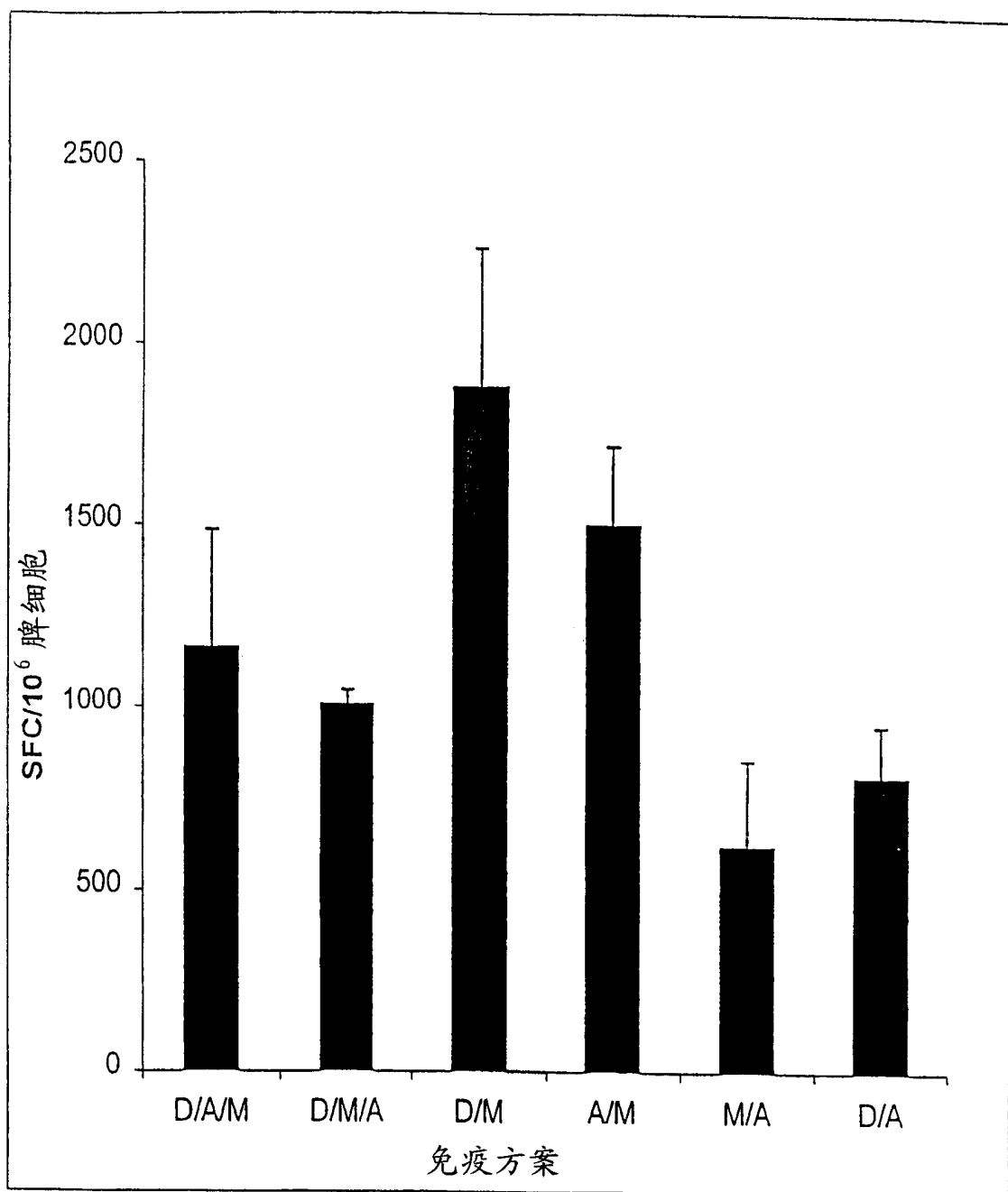


图 3