



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108472255 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680049705.X

(22)申请日 2016.06.23

(30)优先权数据

62/185230 2015.06.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/064613 2016.06.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/207314 EN 2016.12.29

(71)申请人 拜耳动物保健有限责任公司

地址 德国莱沃库森

(72)发明人 T.伊尔格 A.阿伯拉罕 J.尼克尔

D.凯尔 C.魏斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 赵苏林 万雪松

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书31页 附图69页

(54)发明名称

调节胞质DNA监测分子的方法

(57)摘要

本发明总体涉及通过活化特异性固有性免疫信号传导分子和途径引发对象的免疫反应的方法。具体而言,使用免疫调节剂组合物来刺激固有性免疫信号传导分子和途径。

1. 一种引发接受对象的免疫反应的方法,其包括:

a. 向所述对象施用免疫调节剂组合物,其中所述免疫调节剂组合物包含核酸序列和阳离子脂质体,所述核酸序列包含至少一个免疫刺激CpG基序、至少一个非免疫刺激CpG基序;和

b. 活化免疫监测受体,其中所述免疫监测受体活化参与固有免疫反应的信号传导途径。

2. 权利要求1的方法,其中所述信号传导途径包括选自以下的信号传导分子:TLR9、TLR21、cGAS、IFI16、DDX41、DNA-PK、DAI、Mre11、LRRFIP1、AIM2、RNA-聚合酶III/RIG-I、STING、ASC、NFκB、AP1、MAPK、IRF3,及其组合。

3. 一种刺激对象的免疫反应的方法,其包括:

a. 向所述对象施用免疫调节剂组合物,其中所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 1的序列具有至少80%序列同源性的核酸序列和脂质体递送媒介物,和

b. 活化免疫监测受体,其中所述免疫监测受体活化参与固有免疫反应的信号传导途径。

4. 权利要求3的方法,其中所述脂质体递送媒介物包含选自多层囊泡脂质和挤出脂质的脂质。

5. 权利要求3的方法,其中所述脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;和二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB)和胆固醇。

6. 权利要求3的方法,其中施用选自:静脉内、肌内、乳房内、真皮内、腹膜内、皮下、通过喷雾、通过气溶胶、卵内、经粘膜、经皮、通过浸没、经口、眼内、气管内和鼻内。

7. 权利要求3的方法,其中所述免疫调节剂组合物进一步包含生物剂。

8. 权利要求3的方法,其中所述施用在暴露于感染病原体之前。

9. 权利要求3的方法,其中所述施用在暴露于感染病原体之后。

10. 权利要求3的方法,其中所述对象选自哺乳动物物种、水产养殖物种和禽类物种。

11. 权利要求3的方法,其进一步包含药学上可接受的载体。

12. 一种刺激对象的免疫反应的方法,其包括:

a. 向所述对象施用免疫调节剂组合物,其中所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 4的序列具有至少80%序列同源性的核酸序列和脂质体递送媒介物;和

b. 活化免疫监测受体,其中所述免疫监测受体活化参与固有免疫反应的信号传导途径。

13. 权利要求12的方法,其中所述脂质体递送媒介物包含选自多层囊泡脂质和挤出脂质的脂质。

14. 权利要求12的方法,其中所述脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;和二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB)和

胆固醇。

15. 权利要求12的方法,其中施用选自:静脉内、肌内、乳房内、真皮内、腹膜内、皮下、通过喷雾、通过气溶胶、卵内、经粘膜、经皮、通过浸没、经口、眼内、气管内和鼻内。

16. 权利要求12的方法,其中所述免疫调节剂组合物进一步包含生物剂。

17. 权利要求16的方法,其中所述生物剂选自:免疫增强蛋白、免疫原、疫苗、抗微生物剂,和其任何组合。

18. 权利要求12的方法,其中所述施用在暴露于感染病原体之前。

19. 权利要求12的方法,其中所述施用在暴露于感染病原体之后。

20. 权利要求12的方法,其中所述对象选自哺乳动物物种、水产养殖物种和禽类物种。

21. 权利要求12的方法,其进一步包含药学上可接受的载体。

22. 一种调节STING信号传导途径以引发接受对象的免疫反应的方法,其包括:

a. 向所述对象施用免疫调节剂组合物,其中所述免疫调节剂组合物包含核酸序列和阳离子脂质体,所述核酸序列包含至少一个免疫刺激CpG基序、至少一个非免疫刺激CpG基序。

23. 一种调节对象的免疫反应的方法,其包括:

a. 向所述对象施用免疫调节剂组合物,其中所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 4的序列具有至少80%序列同源性的核酸序列和脂质体递送媒介物;和

b. 活化免疫监测受体,其中所述免疫监测受体活化参与调节免疫反应的信号传导途径。

24. 权利要求23的方法,其中所述免疫监测受体活化参与刺激固有免疫反应的信号传导途径。

25. 权利要求23的方法,其中所述免疫监测受体活化参与刺激获得性免疫反应的信号传导途径。

26. 权利要求23的方法,其中所述免疫监测受体活化参与抑制炎症性免疫反应的信号传导途径。

27. 一种增加被诊断患有牛呼吸疾病的牛的增重的方法,其包括:

向对象施用抗微生物剂与免疫调节剂组合物的组合,所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 1具有至少80%同源性的核酸序列和脂质递送媒介物,其中所述组合增加所述对象的增重。

28. 权利要求27的方法,其中所述抗微生物剂是恩诺沙星。

29. 一种增加被诊断患有牛呼吸疾病的牛的增重的方法,其包括:

向对象施用抗微生物剂与免疫调节剂组合物的组合,所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 4具有至少80%同源性的核酸序列和脂质递送媒介物,其中所述组合增加所述对象的增重。

30. 权利要求27的方法,其中所述抗微生物剂是恩诺沙星。

调节胞质DNA监测分子的方法

[0001] 交叉引用

本申请要求根据35 U.S.C §119 (e) 在2015年6月26日提交且标题为“METHODS OF MODULATING CYTOSOLIC DNA SURVEILLANCE MOLECULES”的美国临时专利申请号62/185,230 (其以其整体通过引用并入本文中)的权益。

发明领域

[0002] 本发明总体涉及通过活化特异性固有免疫信号传导分子和途径来引发对象的免疫反应的方法。具体而言,使用免疫调节剂组合物来刺激固有免疫信号传导分子和途径。

[0003] 发明概述

本发明涉及使用免疫刺激质粒调节固有免疫信号传导分子和途径的方法。免疫刺激质粒可包含与SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4或其组合的序列具有至少89%序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒可包含与SEQ ID NO: 4的序列具有至少84%序列同一性的核酸分子。在一些方面,所述免疫刺激质粒可包含SEQ ID NO: 1的序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒可包含SEQ ID NO: 4的序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒可包含SEQ ID NO: 2的序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒可包含SEQ ID NO: 3的序列。

[0004] 在其他方面,所述免疫刺激质粒可由与SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4或其组合的序列具有至少89%序列同一性的核酸序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒可由与SEQ ID NO: 4的序列具有至少84%序列同一性的核酸分子组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒可由SEQ ID NO: 1的序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒可由SEQ ID NO: 4的序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒可由SEQ ID NO: 2的序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒可由SEQ ID NO: 3的序列组成。

[0005] 在一些方面,所述免疫刺激质粒优选不包含编码全长或功能性可选择或可筛选标记物的核酸序列。在其他方面,所述免疫刺激质粒包含编码不是抗生素抗性基因的可选择或可筛选标记物的核酸序列。

[0006] 本发明还涉及药物制剂,其包含本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列中的任一者和药学上可接受的载体。

[0007] 本发明进一步涉及免疫调节剂组合物,其包含阳离子脂质体递送媒介物以及本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列中的任一者。

[0008] 在一些方面,本发明涉及使用本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列的方法。合适的使用方法包括向对象的治疗性施用。此治疗性施用包括一个或多个对象的预防性治疗(prophylactic treatment)、补救预防性治疗(metaphylactic treatment)和感染后治疗。

[0009] 本发明涉及刺激或引发对象的免疫反应的方法。在一些方面,所述方法包括通过向对象施用本文所述的免疫调节剂组合物来刺激对象的免疫反应。在一些方面,所述方法包括通过向对象施用本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列来刺激对象的免疫反应。

[0010] 还提供了用于增加被诊断患有牛呼吸疾病的牛的增重的方法,其包括向对象施用

抗微生物剂与免疫调节剂组合物的组合,所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 1具有至少80%同源性的核酸序列和脂质递送媒介物,其中所述组合增加对象的体重。

[0011] 本文还提供用于增加被诊断患有牛呼吸疾病的牛的增重的方法,其包括向对象施用抗微生物剂与免疫调节剂组合物的组合,所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 4具有至少80%同源性的核酸序列和脂质递送媒介物,其中所述组合增加对象的增重。

[0012] 在下文中将部分地显现且部分地指出其他目标和特征。

[0013] 附图简述

以下附图构成本说明书的一部分且包括以进一步展示本发明的某些方面。可通过参照这些图中的一幅或多幅且组合本文所呈现的具体实施方案的详细描述来更好地理解本发明。

[0014] 图1显示pMB75.6质粒 (SEQ ID NO: 2) 的图;

图2显示pGCMB75.6质粒 (SEQ ID NO: 1) 的图;

图3显示pLacZ75.6质粒 (SEQ ID NO: 4) 的图;

图4图示说明与对照 (红色,正方形,PBS对照) 相比的IRF-3的IFN α 1 (蓝色,菱形) 活化;

图5图示说明使IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物或阳性对照 (INF α 1) 接触的结果。免疫调节剂组合物包括未用脂质体载体配制的SEQ ID NO.2 DNA (Seq No 2) 和用脂质体载体配制的SEQ ID NO.2 DNA (Seq No 2-F)。

[0015] 图6图示说明使用IRF-3报告子稳定转染的IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物接触的结果。免疫调节剂组合物包括未配制的SEQ ID NO.2 DNA (蓝色,菱形,Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 DNA (红色,正方形,Seq No 1)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No.2-F,绿色,三角形)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F,紫色,十字形) 和PBS (阴性对照,蓝色,星形);

图7图示说明使IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物 (195ng/mL) 和已知标准配体工具 (250ng/mL) 接触的结果。免疫调节剂组合物包括未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-制剂)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-制剂) 和DOTIM/胆固醇 (单独制剂) 和PBS对照 (阴性对照)。已知标准配体工具包括HSV-60-Lyovec; VACV-Lyovec; POLY- (dA/dT) -Lyovec;

图8图示说明使IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物 (195ng/mL) 和已知标准配体工具 (1000ng/mL) 接触的结果。免疫调节剂组合物包括未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-制剂)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq NO 1制剂) 和DOTIM (单独制剂) 和PBS对照 (阴性对照)。已知标准配体工具包括HSV-60-Lyovec; VACV-Lyovec; POLY- (dA/dT) -Lyovec;

图9图示说明使IRF-THP-1细胞与已知胞质DNA识别活化剂 (HSV-60,红色,正方形; VACV 70,绿色,三角形; POLY,紫色,十字形; PBS阴性对照,蓝色,十字形; 脂质体,蓝色,菱形) 接触的结果;

图10图示说明使IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物接触的结果。免疫调节剂组合物包括SEQ ID NO.2 (Seq No 2,蓝色,菱形); SEQ ID NO.1 (Seq No 1,红色,正方形); SEQ ID NO.2加脂质体 (Seq No 2-F,绿色,三角形); SEQ ID NO.1加脂质体 (Seq No 1,紫色,十字形); 和PBS阴性对照 (蓝色,十字形);

图11显示在测量SEAP信号的IRF-THP-1细胞中,在1.5-50 μ g/mL的浓度范围内,IFN- α 1 (蓝色,菱形)、未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2,红色,正方形)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F,绿色,三角形)和PBS对照(紫色,十字形)的剂量反应曲线;

图12显示在测量SEAP信号的IRF-THP-1细胞中,在0.3-25 μ g/mL的浓度范围内,未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2,蓝色菱形)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1,红色,正方形)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F,绿色,三角形)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F,紫色,十字形)和PBS对照(黑色,正方形)的剂量反应曲线;

图13图示说明与以下接触的IRF-THP-1细胞的刺激:未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F)和单独的脂质体/制剂、PBS对照(阴性对照)和已知标准配体工具(包括HSV-60-Lyovec;VACV-Lyovec;和Poly-(dA/dT)-Lyovec);

图14图示说明与以下接触的IRF-THP-1细胞的刺激:未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-制剂)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-制剂)和单独的脂质体/制剂、PBS对照(阴性对照)和已知标准配体工具(包括HSV-60-Lyovec;VACV-Lyovec;和POLY-(dA/dT)-Lyovec);

图15图示说明与以下接触的IRF-THP-1细胞的刺激:未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-制剂)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-制剂)、PBS对照(阴性对照)、已知标准配体工具(包括HSV-60-Lyovec;VACV-Lyovec;和POLY-(dA/dT)-Lyovec)、单独Lyovec以及用Lyovec配制的SEQ ID NO.2、用Lyovec配制的SEQ ID NO.1,和IFN- α 1;

图16显示SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.1在IRF-THP-1细胞中的剂量反应曲线,其中SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.1作为:未配制(裸SEQ ID NO.2,绿色三角形;和裸SEQ ID NO.1,橙色圆形)、脂质体制配的(Seq No 2-F,蓝色菱形;和Seq No 1-F,紫色十字形)和Lyovec配制的(Seq No 2-Lyovec,红色正方形;和Seq No 1 Lyovec,蓝色星形);

图17显示作为用Lyovec转染剂配制的SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.1在IRF-THP-1细胞中的剂量反应曲线,其中包括Seq No 2/Lyovec (蓝色,菱形)、Seq No 1/Lyovec (红色,正方形)、单独Lyovec (绿色,三角形)、空白(蓝色,星形)和IFN α 1 (橙色,圆形);

图18显示作为用Mirus转染剂配制的SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.1在IRF-THP-1细胞中的剂量反应曲线,其中包括SEQ ID NO.2/Mirus (Seq No 2,蓝色,菱形)、SEQ ID NO.1/Mirus (Seq No 1,红色,正方形)、单独Mirus (绿色,三角形)、未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2,紫色,十字形)、空白(蓝色,星形)和IFN α 1 (橙色,圆形);

图19显示作为用X-tremeGen转染剂配制的SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.1在IRF-THP-1细胞中的剂量反应曲线,其中包括SEQ ID NO.2/X-tremeGen (Seq No 2/XtremeGen,蓝色,菱形)、SEQ ID NO.1/X-tremeGen (Seq No 1/xtremeGen,红色,正方形)、单独X-tremeGen (绿色,三角形)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1,紫色,十字形)、空白(蓝色,星形)和IFN α 1 (橙色,圆形);

图20显示B16 Blue™ ISG细胞在用IFN α 1阳性对照刺激后的剂量-反应;

图21图示说明与以下接触的B16-Blue™ ISG细胞的刺激:PBS对照、IFN α 1、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-制剂)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-制剂)、未配制的SEQ ID NO.2

(Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、单独的脂质体/制剂(脂质体对照)、3'-3'-cGAMP和POLY-(dA/dT)；

图22图示说明与以下接触的THP-1-Blue™ ISG细胞的刺激：PBS对照、IFN α 1、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-制剂)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-制剂)、未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)和单独的脂质体/制剂(脂质体对照)；

图23图示说明与以下接触的THP-1-Blue™ ISG-KD-STING细胞的刺激：PBS对照、IFN α 1、配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)、配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F)、未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)和单独的脂质体/制剂(脂质体对照)；

图24A和图24B图示说明配制的SEQ ID NO.2 (质粒-F)的胞质DNA识别；

图25A和图25B图示说明STING在配制的SEQ ID NO.2 (质粒-F)的免疫调节功能中的关键作用；

图26A和图26B图示说明STING在由配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)和配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F)引起的免疫调节功能中的关键作用；

图27A、图27B和图27C说明配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)诱导猪外周血单核细胞中的干扰素释放的能力；

图28A、图28B和图28C说明配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)诱导牛外周血单核细胞中的干扰素释放的能力；

图29图示说明在测试进程期间测量的直肠温度；

图30A和图30B图示说明在动物期开始和结束时的平均体重；

图31A、图31B、图31C、图31D、图31E和图31F描绘从猪对象收集的血液学数据；

图32A、图32B、图32C、图32D、图32E和图32F描绘从猪对象收集的血液学数据；

图33A、图33B、图33C、图33D、图33E、图33F、图33G和图33H描绘从猪对象收集的血液学数据；

图34A、图34B、图34C和图34D描绘治疗之前和之后IL 1和IL 2的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图35A、图35B、图35C和图35D图示说明治疗之前和之后IL 4和IL 6的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图36A、图36B、图36C和图36D说明治疗之前和之后IL 8和IL 10的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图37A、图37B、图37C和图37D说明治疗之前和之后IL 12和INF γ 的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图38A和图38B说明治疗之前和之后TNF α 的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图39A、图39B、图39C、图39D、图39E和图39F说明静脉内施用低或高剂量的测试物质之前和之后IL 1、IL2和IL 4的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图40A、图40B、图40C、图40D、图40E和图40F说明静脉内施用低或高剂量的测试物质之前和之后IL 6、IL 8和IL 10的含量和血清细胞因子含量的相对变化；

图41A、图41B、图41C、图41D、图41E、图41F、图41G和图41H说明治疗后IL 1 mRNA的相对

量和比例变化(用高或低剂量的测试物质i.m.和s.c.接种;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图42A、图42B、图42C和图42D说明治疗后IL 2 mRNA的相对量和比例变化(用高或低剂量的测试物质i.m.和s.c.接种;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图43A、图43B、图43C和图43D说明治疗后IL 2 mRNA的相对量和比例变化(用高或低剂量的测试物质i.m.和s.c.接种;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图44A、图44B、图44C、图44D、图44E、图44F、图44G和图44H说明治疗后IL 6 mRNA的相对量和比例变化(用高或低剂量的测试物质i.m.和s.c.接种;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图45A、图45B、图45C、图45D、图45E、图45F、图45G和图45H图示说明治疗后IL 10 mRNA的相对量和比例变化(用高或低剂量的测试物质i.m.和s.c.接种;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图46A、图46B、图46C、图46D、图46E、图46F、图46G和图46H说明治疗后IL 12 mRNA的相对量和比例变化(用高或低剂量的测试物质i.m.和s.c.接种;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图47A、图47B、图47C、图47D和图47E说明施用高剂量的测试物质后不同细胞因子的比例变化(组合i.m.施用和s.c.施用途径;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图48A、图48B、图48C、图48D和图48E说明施用高剂量的测试物质后,不同细胞因子的比例变化(组合i.m.施用和s.c.施用途径;各量在接种后的时间点-1小时、2小时、6小时、24小时和48小时测定);

图49A和图49B说明静脉内施用高(上小图)或低(下小图)剂量的测试物质后在一只猪中观察到的细胞因子mRNA表达的变化;且

图50A和图50B显示在接受用Seq No 2-F和对照治疗的阉牛中肺病灶的百分比(图50A)和由于BRD导致的死亡率(图50B)。

[0016] 发明详述

根据本发明,已发现能够活化接受对象中的胞质DNA监测分子的组合物以及使用方法。具体而言,本发明涉及新颖核酸组合物或免疫调节剂组合物和其用途。已发现,此类免疫调节剂组合物用于调节对象的免疫系统。本发明尤其可用于治疗和预防由微生物引起的感染性疾病,所述微生物诸如但不限于病毒、细菌、霉菌、真菌、酵母、寄生虫和本领域已知的其他微生物。所述组合物和使用免疫调节剂组合物的方法更详细讨论于下文中。

[0017] 组合物

可用于本发明中的组合物(诸如本文所述的那些)通常能够用作感染性疾病的预防性疗法、补救预防性疗法或治疗疗法。此类组合物在本文中称为免疫调节剂组合物。免疫调节剂组合物包括能够活化接受对象中的胞质DNA监测分子的至少一种免疫刺激质粒或免疫刺激DNA序列。在一些方面,免疫调节剂组合物也可包括脂质体递送媒介物。

[0018] A. 核酸

在一些方面,本发明涉及可用于治疗或预防感染性疾病致病剂的核酸分子。本文所述的核酸分子可以作为线性双链或单链DNA、氨基酸序列、核糖核酸(RNA)或其组合包括在免疫刺激质粒中。在一些方面,本发明涉及核酸分子、载体和宿主细胞(体外、体内或离体),其含有免疫刺激质粒或免疫刺激DNA序列。

[0019] 本文所述的核酸分子富含CpG基序。此类CpG基序可经由特定Toll-样受体(诸如TLR9和TLR21)来诱导免疫刺激。另外,本文所述的核酸分子还含有非CpG免疫刺激基序。在一些方面,核酸分子含有的CpG基序比随机核酸序列中预期的CpG基序频率高约2%-20%。在一些方面,核酸分子含有的CpG基序比随机核酸序列中预期的CpG基序频率高约3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%或更多。在一些方面,核酸分子含有的CpG基序比随机核酸序列中预期的CpG基序频率高约10%。在一些方面,观察到与脊椎动物DNA相比多于10倍的CpG基序的富集。在一些方面,核酸分子含有与脊椎动物DNA相比约2倍至50倍或更多倍的CpG基序。在一些方面,核酸分子含有与脊椎动物DNA相比约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或更多倍的CpG基序。

[0020] 在一些方面,本发明涉及不包含抗生素抗性基因的免疫刺激质粒或DNA序列。所述质粒可不含任何可选择或可筛选标记物基因。例如,本文所述的pGCMB75.6质粒不包含任何全长或功能性可选择或可筛选标记物基因。pGCMB75.6的序列提供于SEQ ID NO: 1中。

[0021] 在一些方面,本文所述的免疫刺激质粒优选不包含编码全长或功能性可选择或可筛选标记物的核酸序列。在一些方面,免疫刺激质粒不包含抗生素抗性基因。例如,所述质粒不包含卡那霉素抗性基因。在一些方面,本文所述的质粒优选不编码免疫原。

[0022] 在一些方面,所述免疫刺激质粒可包含编码不是抗生素抗性基因的可选择或可筛选标记物基因的核酸序列。例如,本文所述的pLacZMB75.6质粒包含LacZ基因作为可筛选标记物。pLacZMB75.6的图提供于图3中且pLacZMB75.6的核苷酸序列作为SEQ ID NO: 4提供。如图3中所显示,pLacZMB75.6类似于pGCMB75.6,但含有LacZ可筛选标记物。

[0023] 应理解,pMB75.6、pGCMB75.6或pLacZMB75.6质粒的核苷酸序列可在特定程度上变化,但不显著不利地影响其免疫刺激性质。在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其包含与pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO: 1)具有至少89%序列同一性的核酸序列。所述免疫刺激质粒优选包含与pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO: 1)具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选包含pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO: 1)。

[0024] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其包含与pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO: 4)具有至少84%序列同一性的核酸序列。所述免疫刺激质粒优选包含与pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO: 4)具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选包含pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO: 4)。

[0025] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其包含与SEQ ID NO: 2的序列具有至少80%序列同一性的核酸序列。所述免疫刺激质粒优选包含与SEQ ID NO: 2的序列具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选包含SEQ ID NO: 2的序列。

[0026] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其包含与SEQ ID NO: 3的序列具有至少80%序列同一性的核酸序列。所述免疫刺激质粒优选包含与SEQ ID NO: 3的序列具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选包含SEQ ID NO: 3的序列。

[0027] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其由与pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO: 1)具有至少89%序列同一性的核酸序列组成。所述免疫刺激质粒优选由与pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO: 1)具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选由pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO: 1)组成。

[0028] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其由与pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO: 4)具有至少84%序列同一性的核酸序列组成。所述免疫刺激质粒优选由与pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO: 4)具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选由pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO: 4)组成。

[0029] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其由与SEQ ID NO: 2的序列具有至少80%序列同一性的核酸序列组成。所述免疫刺激质粒优选由与SEQ ID NO: 2的序列具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选由SEQ ID NO: 2的序列组成。

[0030] 在一些方面,本发明涉及免疫刺激质粒,其由与SEQ ID NO: 3的序列具有至少80%序列同一性的核酸序列组成。所述免疫刺激质粒优选由与SEQ ID NO: 3的序列具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列组成。在一些方面,所述免疫刺激质粒更优选由SEQ ID NO: 3的序列组成。

[0031] 本发明的另一重要方面提供能够刺激免疫反应的免疫刺激DNA序列或免疫刺激质

粒,其包括在高严格度条件下与SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4杂交的核酸序列。合适的核酸序列包括与本发明的核酸同源、实质上相似或相同的那些。在一些方面,同源核酸序列将具有与SEQ ID NO: 1或各自互补序列至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他方面,同源核酸序列将具有与SEQ ID NO: 4或各自互补序列至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他方面,同源核酸序列将具有与SEQ ID NO: 2或各自互补序列至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他方面,同源核酸序列将具有与SEQ ID NO: 3或各自互补序列至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。序列相似性可使用本领域已知的多种算法(诸如 Altschul, S. F., 等人, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990中所述的BLAST)来计算。核酸的序列可由于遗传密码的简并性而与上述核酸不同。一般而言,参照序列将为18个核苷酸,更通常30个或更多个核苷酸,且可包含组合物的整个核酸序列用于比较的目的。

[0032] 本文涵盖可与SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4杂交的核苷酸序列。严格杂交条件包括以下条件,诸如在50℃或更高和0.1×SSC (15mM氯化钠/1.5mM柠檬酸钠)下杂交。另一实例是在42℃下在50%甲酰胺、5×SSC (150mM NaCl、15mM柠檬酸三钠)、50mM磷酸钠(pH 7.6)、5×Denhardt氏溶液、10%硫酸葡聚糖和20μg/ml变性剪切鲑鱼精DNA的溶液中孵育过夜,随后在约65℃下在0.1×SSC中洗涤。示例性严格杂交条件是严格度为上述特定条件的至少约80%、85%、90%或95%的杂交条件。其他严格杂交条件是本领域已知的且也可用于鉴定本发明核酸的同源物(Current Protocols in Molecular Biology, Unit 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989)。

[0033] 可使用本文所述的DNA分子的突变体核苷酸,只要突变体包括维持如本文所述的活化胞质DNA监测分子的能力的核酸序列。具有此突变的DNA序列通常将相差一个或多个核苷酸或氨基酸。所述序列变化可以是取代、插入、缺失或其组合。用于诱变克隆的基因的技术是本领域已知的。位点特异性诱变的方法可见于Gustin等人, Biotechniques 14:22, 1993; Barany, Gene 37:111-23, 1985; Colicelli等人, Mol. Gen. Genet. 199:537-9, 1985;和Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108,且都通过引用并入本文中。总之,本发明涉及能够活化对象中的胞质DNA监测分子的核酸序列和其变体或突变体。而且,本发明涵盖由所述核酸序列编码的中间RNA以及所编码的任何所得氨基酸序列。

[0034] 在一些方面,在免疫刺激质粒的核苷酸序列与SEQ ID NO.1、2、3和4中所提供的序列不同的情况下,则优选使质粒中的CpG二核苷酸保持完整。或者,如果改变质粒的核苷酸序列使得消除CpG二核苷酸,则可在另一位置改变质粒的序列,使得质粒中的CpG二核苷酸的总数保持相同。也可将除了已存在于pGCMB75.6或pLacZMB75.6的核苷酸序列中的CpG二核苷酸以外的其他CpG二核苷酸引入质粒中。因此,例如,本文所述的免疫刺激质粒优选包含至少约200个、至少约220个、至少约240个、至少约260个、至少约270个、至少约275个、至少约280个、至少约283个、至少约285个或至少约288个CpG二核苷酸。例如,所述免疫刺激质

粒可包含283个CpG二核苷酸。

[0035] 在一些方面,在免疫刺激质粒的核苷酸序列与本文所提供的序列不同的情况下,改变质粒中的CpG基序类型以调节胞质DNA监测分子的所得活化。例如,可增加免疫刺激CpG基序的数量以增加特异性胞质DNA监测分子响应于免疫刺激质粒/DNA的特定阈值的活化。通过另一实例的方式,可增加非免疫刺激CpG基序的数量以降低特异性胞质DNA监测分子的活化和/或增加其他DNA监测分子的活化。

[0036] 具体而言,本发明涉及药物制剂,其包含本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列中的任一者和药学上可接受的载体。

[0037] B. 免疫调节剂

适于与本文所述的免疫刺激质粒一起使用的免疫调节剂组合物描述于美国专利申请公开号2012/0064151 A1和2013/0295167 A1,两者的内容以其整体通过引用并入本文中。

[0038] 免疫调节剂组合物包含脂质体递送媒介物和本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列中的至少一者。

[0039] 合适的脂质体递送媒介物包含能够将核酸分子递送至所治疗对象的组织的脂质组合物。脂质体递送媒介物优选能够在对象中保持稳定达足够时间量以递送核酸分子和/或生物剂。例如,脂质体递送媒介物在接受对象中稳定达至少约5分钟、至少约1小时或至少约24小时。

[0040] 本发明的脂质体递送媒介物包含能够促进核酸分子至细胞中的递送的脂质组合物。当核酸分子编码一种或多种蛋白时,核酸:脂质体复合物优选具有至少约1皮克(pg)所表达蛋白/毫克(mg)总组织蛋白/微克(μ g)所递送核酸的转染效率。例如,核酸:脂质体复合物的转染效率可以是至少约10pg所表达蛋白/mg总组织蛋白/ μ g所递送核酸;或至少约50pg所表达蛋白/mg总组织蛋白/ μ g所递送核酸。复合物的转染效率可低至1飞克(fg)所表达蛋白/mg总组织蛋白/ μ g所递送核酸,且上述量是更优选的。

[0041] 本发明的优选脂质体递送媒介物的直径在约100纳米和500纳米(nm)之间。例如,脂质体递送媒介物的直径可以在约150nm和450nm之间或约200nm和400nm之间。

[0042] 合适的脂质体包括任何脂质体,诸如常用于例如本领域技术人员已知的基因递送方法中的那些。优选的脂质体递送媒介物包含多层囊泡(MLV)脂质和挤出脂质。用于制备MLV的方法是本领域中熟知的。更优选的脂质体递送媒介物包含具有聚阳离子脂质组合物的脂质体(即,阳离子脂质体)和/或具有缀合至聚乙二醇的胆固醇主链的脂质体。示例性阳离子脂质体组合物包括,但不限于,N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇、N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇、1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)-咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇、二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB)和胆固醇及其组合。用作递送媒介物的最优选的脂质体组合物包括DOTIM和胆固醇。

[0043] 合适的核酸分子包括本文所述的任一免疫刺激质粒。编码核酸序列编码蛋白或肽的至少一部分,而非编码序列不编码蛋白或肽的任何部分。根据本发明,“非编码”核酸可包括转录单元的调控区域,诸如启动子区域。术语“空载体”可与术语“非编码”互换使用,且尤其是指蛋白编码部分不存在的情况下的核酸序列,诸如无基因插入物的质粒载体。由本文所述的质粒编码的蛋白的表达并非活化胞质DNA监测分子所需;因此,所述质粒无需含有

可操作连接至转录控制序列的任何编码序列。然而,可通过在组合物中包括编码免疫原和/或细胞因子的核酸序列(DNA或RNA)中来获得进一步优点(即,抗原特异性和增强的免疫)。编码免疫原和/或细胞因子的此核酸序列可包括在本文所述的免疫刺激质粒中,或可包括在组合物中的单独核酸(例如,单独质粒)中。

[0044] 脂质体与本文所述的免疫刺激质粒的复合可使用本领域的标准方法或如美国专利号6,693,086中所述来实现,所述专利的内容以其整体通过引用并入本文中。添加至脂质体中的质粒的合适浓度包括有效地将足量质粒递送至对象中、使得引发全身性免疫反应的浓度。例如,约0.1 μ g至约10 μ g质粒可与约8nmol脂质体组合,约0.5 μ g至约5 μ g质粒可与约8nmol脂质体组合,或约1.0 μ g质粒可与约8nmol脂质体组合。组合物中质粒与脂质的比率(μ g质粒:nmol脂质)可以是至少约1:1质粒:脂质(例如,1 μ g质粒:1nmol脂质)。例如,质粒与脂质的比率可以是至少约1:5、至少约1:10或至少约1:20。本文所表示的比率基于组合物中阳离子脂质的量,而非基于组合物中脂质的总量。本发明的组合物中质粒与脂质的比率合适地为以重量计约1:1至约1:80质粒:脂质;以重量计约1:2至约1:40质粒:脂质;以重量计约1:3至约1:30质粒:脂质;或以重量计约1:6至约1:15质粒:脂质。

[0045] C. 生物剂

除了脂质体递送媒介物和至少一种本文所述的质粒以外,本文所述的任一免疫调节剂组合物可进一步包含至少一种生物剂。

[0046] 合适的生物剂是可有效地预防或治疗疾病的药剂。此类生物剂包括免疫增强蛋白、免疫原、疫苗、抗微生物剂或其任何组合。合适的免疫增强蛋白是已知增强免疫的那些蛋白。通过非限制性实例的方式,包括蛋白家族的细胞因子是已知的增强免疫的蛋白家族。合适的免疫原是引发体液和/或细胞免疫反应的蛋白,如此以致向对象施用免疫原引起针对见于对象组织内的相同或相似蛋白的免疫原特异性免疫反应。免疫原可包括由细菌、病毒、寄生虫或真菌表达的致病性抗原。优选的抗原包括源自引起对象中的感染性疾病的生物体的抗原。根据本发明,免疫原可以是天然存在或合成衍生的,引发体液和/或细胞免疫反应的蛋白的任何部分。因此,抗原或免疫原的大小可小至约5-12个氨基酸且大至全长蛋白,包括其之间的任何大小。抗原可以是多聚体蛋白或融合蛋白。抗原可以是纯化的抗原。或者,免疫增强蛋白或免疫原可由免疫刺激质粒或由包括在免疫调节剂组合物中的另一核酸编码。在免疫增强蛋白或免疫原由免疫调节剂组合物中的核酸分子编码的情况下,编码该免疫增强蛋白或免疫原的核酸序列可操作连接至转录控制序列,使得免疫原在对象组织中表达,由此引发对象的免疫原特异性免疫反应以及非特异性免疫反应。针对免疫原性(诸如病原体抗原免疫原性)或细胞因子活性进行筛选的技术是本领域技术人员已知的且包括多种体外和体内测定法。

[0047] 在生物剂为疫苗的情况下,疫苗可包括活的、感染性、病毒、细菌或寄生虫疫苗或杀死的、失活的、病毒、细菌或寄生虫疫苗。一种或多种疫苗、活的或杀死的病毒疫苗可与本发明的免疫调节剂组合物组合使用。合适的疫苗包括本领域已知用于禽类或牛物种的那些。

[0048] 生物剂可以是抗微生物剂。合适的抗微生物剂包括:喹诺酮类,优选氟喹诺酮类、 β 内酰胺类和大环内酯-林可酰胺类-链阳性菌素(MLS)抗生素。

[0049] 合适的喹诺酮类包括培诺沙星、宾氟沙星、西诺沙星、环丙沙星、克林沙星、达氟沙

星、二氟沙星、依诺沙星、恩诺沙星、氟罗沙星、吉米沙星、依巴沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、马波沙星、莫西沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、奥比沙星、帕珠沙星、普多沙星、培氟沙星、沙拉沙星、司帕沙星、替马沙星和托氟沙星。优选的氟喹诺酮类包括环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、莫西沙星和普多沙星。合适的茶啉酮类包括茶啉酮酸。

[0050] 合适的 β 内酰胺类包括青霉素(例如,阿莫西林、氨苄青霉素、阿洛西林、苄星青霉素、苄青霉素、羧苄青霉素、氯唑西林、阿莫克拉[即阿莫西林/克拉维酸]、双氯西林、氟氯西林、甲氧西林、美洛西林、萘夫西林、苯唑西林、苯氧甲基青霉素、哌拉西林、普鲁卡因青霉素、替莫西林和替卡西林);头孢菌素类(例如,头孢克洛、头孢洛宁、头孢孟多、头孢匹林、头孢唑林、头孢吡肟、头孢克肟、头孢噻肟、头孢西丁、头孢匹罗、头孢泊肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢噻吩、头孢曲松、头孢呋辛、头孢氨苄、头孢噻吩和头孢替坦);碳青霉烯类和青霉烯类(例如,多利培南、厄他培南、法罗培南、亚胺培南和美罗培南);单内酰胺环类(例如,氨曲南、诺卡霉素A、烟草毒素- β -内酰胺和替吉莫南);和 β 内酰胺酶抑制剂(例如,克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦)。优选的 β -内酰胺类包括头孢菌素类,特别是头孢唑啉。

[0051] 合适的MLS抗生素包括克林霉素、林可霉素、吡利霉素和任何大环内酯抗生素。优选的林可酰胺抗生素是吡利霉素。

[0052] 其它抗微生物剂包括氨基糖苷类、氯羟吡啶、迪美唑类、红霉素、弗氏菌丝素、呋喃唑酮、卤夫酮、2-吡啶酮、氯苯胍、磺胺类、四环素类、甲氧苄啶、各种截短侧耳素(例如,泰妙菌素和沃尼妙林)和各种链霉素(例如,莫能菌素、甲基盐霉素和盐霉素)。

[0053] 牛呼吸疾病或牛呼吸疾病复合症(BRD)是牛产业中的经济损失的主要原因。当使牛经受应激源时,其固有性和获得性免疫功能受损,这允许作为牛呼吸道正常菌群的一部分的微生物旺盛生长且定殖下呼吸道。下呼吸系统通常为无菌区域,因此微生物增殖可引起重度疾病且甚至死亡。

[0054] 可实现除了有效针对BRD的抗微生物剂以外施用本发明的免疫调节剂组合物的组合疗法,以刺激免疫反应并直接作用于病原体。该组合疗法可减少恢复时间,或甚至在预防性施用防止感染。发病率的降低可导致饲养场动物的生产力增加。如本文所用的“生产力”是指饲养场动物所进行的导致增重的活动。如本文所用的“增重”可指每个动物的平均日增量和/或平均体重的增加。尽管患病和受应激的动物可增重,但在接受组合疗法的动物中所观察到的增重可超过患病动物的增重。因此,本发明的一些实施方案提供用于增加对象体重的方法,其包括向对象施用抗微生物剂与免疫调节剂组合物的组合,所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 1具有至少80%同源性的核酸序列和脂质递送媒介物,其中该组合增加对象的体重。在一些方面,所述抗微生物剂是抗生素,诸如上文所列的那些。在一些方面,所述抗微生物剂是恩诺沙星。

[0055] 其他方面提供用于增加对象的增重的方法,其包括向对象施用抗微生物剂与免疫调节剂组合物的组合,所述免疫调节剂组合物包含与SEQ ID NO: 4具有至少80%同源性的核酸序列和脂质递送媒介物,其中该组合增加对象的体重。在一些方面,所述抗微生物剂是抗生素,诸如上文所列的那些。在一些方面,所述抗微生物剂是恩诺沙星。

[0056] II. 方法

本发明的目标是提供活化胞质DNA监测分子的免疫调节剂组合物、免疫刺激质粒(或DNA序列)和方法,以向未感染对象提供保护性免疫、向感染的对象提供保护性免疫、向未感

染对象提供增强的免疫、向感染的对象提供增强的免疫、向感染的对象提供治疗性免疫,或其组合。因此,本发明组合物可用于预防性免疫对象或用于治疗对象。本文所述的方法包括向对象施用本文所述的免疫刺激质粒或DNA序列,和活化对象中的胞质DNA监测分子。

[0057] A. 活化胞质DNA监测分子的方法

本发明涉及活化接受对象中的胞质DNA监测分子的方法。所述方法包括向对象施用有效量的本文所述的免疫调节剂组合物以活化胞质DNA监测分子。在一些方面,免疫调节剂组合物活化胞质DNA监测分子。在一些方面,当在此类疫苗之前施用、与疫苗共同施用、疫苗接种后施用或与疫苗混合时,所述免疫调节剂组合物增强至少一种生物剂(诸如疫苗)的作用。在一些方面,所述方法提供了用于保护接受对象免于感染性疾病并且治疗患有感染性疾病的群体的新的治疗策略。在一些方面,当免疫调节剂与疫苗组合使用时,相比使用没有所述免疫调节剂组合物的疫苗,所述方法提供了针对疾病的更快速、更长且更好的保护。

[0058] 可以通过施用有效量的免疫调节剂组合物而在接受对象中活化胞质DNA监测分子,所述免疫调节剂组合物包含本文所述的任何脂质体递送媒介物、本文所述的任何免疫刺激性质粒(或DNA序列)和任选地本文所述的任何生物剂。设想了生物剂可以与免疫调节剂混合或共同施用,或者其独立施用。独立施用可以在施用免疫调节剂之前或之后。还设想了可以使用免疫调节剂或生物剂的多于一次的施用。此外,多于一种生物剂可以与免疫调节剂共同施用、在免疫调节剂之前施用、在免疫调节剂施用之后施用,或者与免疫调节剂同时施用。

[0059] 可使用本文所述的免疫调节剂组合物来调节或活化本领域已知或尚待发现的任何胞质DNA监测分子。技术人员将理解,此类胞质DNA监测分子太多而无法列于本文中。因此,本文所述的免疫调节剂组合物可用于活化或调节能够识别本文所述的组合物的至少一种免疫调节剂组分的任何胞质DNA监测分子。举例而非限制性地,此类胞质DNA监测分子包括AIM2、AP1、ASC、Atg9a、B-连环蛋白、胱天蛋白酶-1、环状GMP-AMP合酶(cGAS)、DAI、DDX41、DEC205、DHX9、DHX36、DNA-PK、ERIS、IFI16、IKK复合物、IKK ϵ 、IPSI、IRF1、IRF3、IRF7、ISRE1/7、ISRE7、JNK、Ku70、LGP2、LRRFIP1、MAPK、MDA-5、MITA、MKK3/6、MPYS、Mre11、Mx1、MyD88、NAP1、NFAT、NF-KB、NLRC5、OAS-3/OAS-L、前-胱天蛋白酶-1、p38、RIG-I、RNA Pol III、SOCS1、SOCS3、STING、TANK、TBK1、TLR1、TLR2.1、TLR3、TLR7、TLR9、TLR21、TMEM173、TRAF3、TRAF6、TRAM、TRIF、TREX1、TRIM32、TRIM56、本领域已知的其他干扰素响应因子,及其组合。

[0060] 可向对象施用有效量的本文所述的任一免疫调节剂组合物。该有效量足以活化接受对象中的至少一(1)种胞质DNA监测分子。该有效量是引起接受对象中的至少一(1)种胞质DNA监测分子活化的任一量。测量此活化的方法是本领域已知的。而且,技术人员将认识到,有效量将取决于对象的年龄、体重、物种和感染阶段以及本领域已知的其他因素。合适的有效量的范围可以为每个对象约0.1 μ g至1,000 μ g。在一些方面,所述有效量的范围可以为约0.1 μ g至约10 μ g、约0.1 μ g至约5 μ g、约0.5 μ g至约5 μ g、约0.25 μ g至约5 μ g、约0.05 μ g至约10 μ g、约5 μ g至约15 μ g、约10 μ g至约15 μ g、约10 μ g至约20 μ g、约20 μ g至约30 μ g、约30 μ g至约40 μ g、约40 μ g至约50 μ g、约50 μ g至约70 μ g、约70 μ g至约90 μ g、约50 μ g至约100 μ g、约100 μ g至约150 μ g、约150 μ g至约200 μ g、约200 μ g至约250 μ g、约250 μ g至约300 μ g、约300 μ g至约350 μ g、约350 μ g至约400 μ g、约400 μ g至约450 μ g、约450 μ g至约500 μ g、约500 μ g至约550 μ g、约550 μ g至约600 μ g、约600 μ g至约650 μ g、约

650 μg 至约700 μg 、约700 μg 至约750 μg 、约750 μg 至约800 μg 、约800 μg 至约850 μg 、约850 μg 至约900 μg 、约900 μg 至约950 μg 、约950 μg 至约1000 μg 。优选地,在一些方面,所述有效量范围为约0.5 μg 至约10 μg 。又优选地,在其它方面,所述有效量范围为约50 μg 至约100 μg 。并且优选地,在其它方面,所述有效量范围为约40 μg 至约70 μg 。

[0061] B. 调节免疫反应的方法

本文公开的免疫调节剂组合物尤其可用于调节接受对象产生的免疫反应。此类调节对象的免疫反应的方法包括向对象施用有效量的本文所述的免疫调节剂组合物、活化免疫监测受体,其活化参与调节免疫反应的信号传导途径。在一些方面,此类方法可用于刺激固有免疫反应。在一些方面,此类方法可用于刺激获得性免疫反应。在一些方面,此类方法可用于抑制炎症免疫反应。在一些方面,此类方法可用于抑制免疫反应期间的炎症。在一些方面,此类方法可用于刺激固有免疫反应和抑制固有免疫反应期间的炎症。在一些方面,此类方法可用于刺激获得性免疫反应和抑制获得性免疫反应期间的炎症。在一些方面,此类方法可用于刺激固有免疫反应和获得性免疫反应,同时还抑制炎症。

[0062] C. 使用条件

本发明的方法活化对象中的至少一(1)种胞质DNA监测分子,使得对象被保护免于易受引发免疫应答治疗的疾病。如本文所用,短语“保护免于疾病”是指减轻疾病的症状;减少疾病的发生;减轻疾病的临床或病理严重性;或者减少引起疾病的病原体的脱落。保护对象可以是指本发明的治疗组合物当向对象施用其预防疾病发生、治疗和/或减缓或减轻疾病症状、临床体征、病理学或病因的能力。因此,保护对象免于疾病涵盖防止疾病发生(预防性治疗)和治疗患有疾病的对象(治疗性治疗)。术语“疾病”是指对象的正常健康的任何偏离,并且包括当存在疾病症状时的状态以及其中已发生偏离(例如感染、基因突变、遗传缺陷等)、但症状未显现的状况。

[0063] 本发明的方法可以用于预防疾病、刺激针对疾病的效应细胞免疫、消除疾病、减缓疾病,和预防由原发性疾病的发生导致的继发性疾病。

[0064] 在一些方面,相比于施用疫苗本身,本文所述的方法与疫苗共同施用,可以用于改善对象的获得性免疫应答。由于需要时间来刺激获得性免疫,因此通常疫苗并非一经施用立即保护对象。术语“改善”在本发明中是指在对象中引发固有免疫应答,直到疫苗开始保护对象和/或通过由疫苗给予的获得性免疫来延长保护期间。

[0065] 在一些方面,本发明的方法包括施用组合物来提供针对广泛种类病原体的感染的保护。施用的组合物可以包含或不包含引发特异性应答的特异性抗原。设想了本发明的方法将保护接受对象免于由感染性微生物病原体导致的疾病,所述感染性微生物病原体包括而限于病毒、细菌、真菌和寄生虫。技术人员将认识和理解,本文所述的免疫调节剂组合物针对许多感染病原体(其太多而无法列举)是有效的。本文提供的感染病原体是出于示例性目的而提供,并且不限制使用范围而提供。

[0066] D. 施用

多种施用途径是可用的。选择的具体模式当然将取决于选择的具体生物剂、对象的年龄和总体健康状态、所治疗的具体状况和治疗效力所需的剂量。本发明的方法可以使用任何施用模式来实施,其产生有效水平的胞质DNA监测分子的活化而不引起临床上不可接受的副作用。所述组合物可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过本领域熟知的任何方法

制备。

[0067] 所述免疫调节剂组合物可以静脉内、肌内、乳房内、皮内、腹膜内、皮下、通过喷雾、通过羽囊法卵内、经口、眼内、气管内、鼻内、经粘膜、直肠内、经皮、通过浸没(施用于水生物种)或通过本领域中已知的其它方法来施用。在一个方面,皮下施用所述免疫调节剂。在另一个方面,可以肌内施用所述免疫调节剂。在另一个方面,作为喷雾施用所述免疫调节剂。在另一个方面,可以经口施用所述免疫调节剂。在另一个方面,可以皮下施用所述免疫调节剂。

[0068] 在一个方面,可以在攻击(或感染)之前向对象单独施用所述免疫调节剂。在另一个方面,可以在攻击(或感染)之后向对象单独施用所述免疫调节剂。在另一个方面,可以在攻击(或感染)的同时向对象单独施用所述免疫调节剂。

[0069] 在一些方面,可以在攻击之前,在疫苗接种的同时共同施用所述免疫调节剂组合物。在一些方面,可以在攻击(或感染)的同时,在疫苗接种的同时共同施用所述免疫调节剂组合物。在一些方面,共同施用可以包括在对象的相同惯用部位的彼此相邻的两个不同位点上(即在对象的颈部上彼此相邻地注射)、在对象的相同惯用部位的相对侧面上(即颈部每一侧上各一次)、或在相同对象的不同部位上施用疫苗和免疫调节剂。在一些方面,可以在疫苗接种和攻击之前施用所述免疫调节剂组合物。在一些方面,可以在疫苗接种之后、但在攻击之前施用所述免疫调节剂组合物。可以在攻击之后向已在攻击(或感染)之前疫苗接种的对象施用所述免疫调节剂组合物。

[0070] 技术人员将认识到,施用途径可以根据对象和对象的健康或状态而变化。出于示例性目的提供了禽类和牛科动物物种的施用途径,并且提供而不进行限制。

[0071] 可以在任何年龄进行禽类物种的疫苗接种。可以向18日龄胚胎(卵内)及以上施用活微生物的疫苗接种,向3周龄及以上施用灭活微生物或其它类型疫苗的疫苗接种。对于卵内疫苗接种,可以在发育的后1/4期间施用疫苗接种。可以皮下、通过羽囊法、通过喷雾、经口、眼内、气管内、鼻内、卵内或通过本领域中已知的其它方法施用疫苗。口服疫苗可以在饮水中施用。另外,设想了可以基于常规疫苗接种方案来使用本发明的方法。

[0072] 也可以皮下、通过羽囊法、通过喷雾、眼内、气管内、鼻内、卵内或通过本领域中已知的其它方法向禽类物种施用所述免疫调节剂组合物。例如,可以卵内施用所述免疫调节剂组合物。或者,可以作为喷雾施用所述免疫调节剂组合物。

[0073] 可以在禽类胚胎发育的后1/4期间向其卵内施用所述免疫调节剂组合物。例如,可以将所述免疫调节剂组合物卵内施用于18日龄或19日龄胚胎。向蛋的施用可以在攻击(或感染)之前或攻击之后。

[0074] 可以在攻击之前约1至约14天或者在攻击之后约1至约14天向禽类或牛科动物物种的动物施用所述免疫调节剂。例如,可以在攻击之前约1至约7天或者在攻击之后约1至约7天施用所述免疫调节剂。在攻击之前1、2、3、4、5、6、7天或攻击之后1、2、3、4、5、6、7天合适地施用所述免疫调节剂。

[0075] 可以在任何年龄进行牛科动物物种的疫苗接种。可以静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、通过喷雾、口服、眼内、气管内、鼻内、经粘膜、直肠内、经皮或通过本领域中已知的其它方法施用疫苗。另外,设想了可以基于常规疫苗接种方案使用本文所述的方法。

[0076] 其它递送系统可以包括定时释放、延迟释放或持续释放的递送系统。此类系统可

以避免组合物的反复施用,从而提高便利性。许多类型的释放递送系统是可用的,并且为本领域普通技术人员所知。它们包括基于聚合物的系统例如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己酸内酯、聚酰胺酯、聚正酯、聚羟基丁酸和聚酐。含有药物的上述聚合物的微胶囊描述在例如美国专利号5,075,109中。

[0077] 递送系统也包括非聚合物系统,其为脂质,包括甾醇诸如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪诸如单、双和三甘油酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡质包衣;使用常规结合剂和赋形剂的压制片剂;部分融合的植入物等。具体实例包括但不限于侵蚀系统(本发明的试剂以基质内形式包含其中,诸如描述于美国专利号4,452,775、4,675,189和5,736,152中的那些)和扩散系统(其中活性成分以受控速率从聚合物渗出,诸如描述于美国专利号3,854,480、5,133,974和5,407,686)。此外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适于植入。

[0078] 因为在不脱离本发明范围的情况下可以对上述组合物、产品和方法进行多种变化,所以预期上文描述和下文给出的实施例中包含的所有内容均应被解释为说明性而非限制性的涵义。

[0079] 定义

术语“有效量”是指必需或足以实现期望的生物效应的量。例如,用于治疗或预防感染性疾病的免疫调节剂的有效量是暴露于微生物后引起免疫应答的发生所必需的量,因而引起对象内微生物量的降低并且优选根除微生物。对于任何具体应用的有效量可以根据因素诸如所治疗的疾病或病状、对象的大小或疾病或病状的严重性而变化。本领域普通技术人员无需过度实验,通过经验就可以确定免疫调节剂的有效量。

[0080] 术语“细胞因子”是指增强免疫的蛋白家族。细胞因子家族包括造血生长因子、白介素、干扰素、免疫球蛋白超家族分子、肿瘤坏死因子(TNF)家族分子和趋化因子(即调节细胞、特别是吞噬细胞的迁移和活化的蛋白)。示例性细胞因子包括而限于白介素-2 (IL-2)、白介素-12 (IL12)、白介素-15 (IL-15)、白介素-18 (IL-18)、干扰素- α (IFN α)和干扰素- γ (IFN γ)。

[0081] 术语“引发”可以与术语活化、刺激、产生或上调互换使用。

[0082] 术语在对象中“引发免疫应答”是指特异性控制或影响免疫应答的活性,并且可以包括活化免疫应答、上调免疫应答、增强免疫应答和/或改变免疫应答(诸如通过引发一类免疫应答,其进而将对象中免疫应答的优势类型从有害或无效的类型转变为有益或保护性的类型)。

[0083] 术语“可操作连接”是指以这样的方式将核酸分子连接至转录控制序列,所述方式使得当被转染(即转化、转导或转染)入宿主细胞时所述分子能够被表达。转录控制序列是控制转录的起始、延伸和终止的序列。尤其重要的转录控制序列是控制转录起始的那些序列,诸如启动子、增强子、操纵子和抑制子序列。多种此类转录控制序列是本领域技术人员已知的。优选的转录控制序列包括在禽类、鱼类、哺乳动物、细菌、病毒、植物和昆虫细胞中发挥功能的那些。尽管任何转录控制序列都可以与本发明一起使用,但所述序列可包括天然存在的转录控制序列,其与编码免疫原或免疫刺激蛋白的序列天然缔合。

[0084] 术语“核酸分子”和“核酸序列”可以互换使用,并且包括DNA、RNA、或DNA或RNA的衍生物。该术语还包括寡核苷酸和更大的序列,诸如质粒,诸如本文所述的免疫刺激性质粒,

且包括编码蛋白或其片段的核酸分子以及包含调节区、内含子或其它非编码DNA或RNA的核酸分子。通常,寡核苷酸具有长度为约1到约500个核苷酸的核酸序列,并且更通常,长度为至少约5个核苷酸。核酸分子可以源自任何来源,包括哺乳动物、鱼类、细菌、昆虫、病毒、植物、合成来源或其组合。核酸分子可以通过本领域众所周知的方法来产生,诸如重组DNA技术(例如,聚合酶链式反应(PCR)、扩增、克隆)或化学合成。核酸分子包括天然核酸分子及其同源物,包括但不限于天然等位基因变体和经修饰的核酸分子(其中已经以这样的方式插入、缺失、置换或倒置核苷酸,所述方式使得此类修饰基本上不干扰核酸分子引发可用于本发明的方法的免疫应答的能力)。核酸同源物可以使用本领域技术人员已知的许多方法来产生(参见例如,Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989),其通过引用并入本文。

[0085] 术语“可选择的标记物”和“可选择的标记基因”是指编码产物的基因,所述产物保护其中表达所述基因的生物体免于通常会杀死该生物体或抑制其生长的选择剂(例如,抗生素)或病状的影响。最常用的可选择的标记基因是抗生素抗性基因(例如,卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因、氯霉素抗性基因、四环素抗性基因等)。因此,例如,当大肠杆菌细胞经受转化程序以引入编码卡那霉素抗性基因的质粒,然后在含有卡那霉素的培养基上或其中生长时,只有已经成功摄取质粒并表达卡那霉素抗性基因的大肠杆菌细胞才将存活。术语“可选择的标记物”和“可选择的标记基因”还包括编码参与对于生物体的生长所必需的化合物的合成的酶的基因。当被引入到不能合成必需化合物的营养缺陷型生物体时,此类基因允许生物体在已经补充有必需化合物的培养基中生长。例如,由于参与赖氨酸生物合成的酶中的突变或不存在所述酶而对于氨基酸赖氨酸营养缺陷的细菌细胞通常无法在尚未补充有赖氨酸的培养基中生长。当此类细菌经受转化程序以引入编码参与赖氨酸生物合成的酶的质粒时,已经成功摄取所述质粒并表达所述酶的细菌当在尚未补充有赖氨酸的培养基中生长时将存活。术语“可选择的标记物”和“可选择的标记基因”还包括允许毒物/解毒剂选择的基因。例如,*ccdB*基因编码结合DNA促旋酶(对于细胞分裂所必需的酶)的蛋白。结合DNA促旋酶之后,*ccdB*基因产物损害基因复制并诱导细胞死亡。因此,表达*ccdB*基因产物的细菌不能存活。*ccdA*基因编码充当*ccdB*基因产物的天然抑制剂的蛋白(“解毒剂”)。因此,当在其细菌基因组中具有*ccdB*基因的细菌经受转化程序以引入编码*ccdA*基因产物的质粒时,只有成功摄取所述质粒并表达*ccdA*基因的细胞才将存活。

[0086] 术语“可筛选的标记物”和“可筛选的标记基因”是指编码产物的基因,所述产物允许观察者区分表达可筛选的标记基因的细胞和不表达可筛选的标记基因的细胞。可筛选的标记基因系统是本领域中熟知的,并且包括,例如,*lacZ*基因和编码荧光蛋白的基因,所述荧光蛋白诸如绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、红色荧光蛋白(RFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)或青色荧光蛋白(CFP)。

[0087] 如本文所用,术语“对象”是指具有中枢神经系统的活生物体。具体而言,对象包括,但不限于,人类对象或患者和伴侣动物。示例性伴侣动物可以包括家养哺乳动物(例如,狗、猫、马)、具有显著商业价值的哺乳动物(例如,禽类物种、牛科动物物种、奶牛、肉牛、体育动物)、具有显著科学价值的哺乳动物(例如,濒危物种的俘获或自由样本)或具有其它价值的哺乳动物。合适的对象还包括:小鼠、大鼠、狗、猫、有蹄类动物(诸如牛、猪、绵羊、马和山羊)、兔类动物(诸如家兔和野兔)、其它啮齿动物和灵长类动物(诸如猴、黑猩猩和猿)。对

象可以是禽类物种的任何成员,无论是驯养的还是野生的,并且可以进行商业饲养用于繁殖、产肉或产蛋。示例性禽类物种包括,但不限于,鸡、火鸡、鹅、鸭、野鸡、鹌鹑、鸽子、鸵鸟、笼中鸟、动物园保藏中心和鸟类饲养场中的鸟类等。对象可以是牛科动物物种的任何成员,无论是驯养的还是野生的,并且可以进行商业饲养用于繁殖、产肉或产奶。示例性牛科动物物种包括,但不限于,羚羊、水牛、牦牛、牛、野牛等。牛的物种包括,但不限于,奶牛、公牛(bulls)、小公牛、小母牛、公牛(ox)、肉牛、奶牛等。对象可以是水产养殖物种的任何成员,包括但不限于,生活在淡水或咸水中的鱼类、甲壳类动物、软体动物的任何物种。在一些方面,对象可以被诊断为患有感染性疾病、可以具有感染性疾病的风险或者可以正在经历感染性疾病。对象可以是任何年龄的,包括在子宫内的、新生的、青春期的、成年的、中年的或老年的。

实施例

[0088] 提供了以下非限制性实施例以进一步举例说明本发明。

[0089] 实施例1:使用单核细胞细胞系用免疫调节剂组合物活化胞质DNA监测分子。

[0090] 使用本文所述的免疫调节剂组合物来活化干扰素调控因子3 (IRF-3,由DNA监测分子活化的转录因子)。使用源自急性单核细胞性白血病患者的人类巨噬细胞样(单核细胞)细胞系(THP-1)作为单核细胞功能的模型系统。通过稳定整合干扰素调控因子(IRF)-诱导型分泌性碱性磷酸酶(SEAP)报告子构建体(IRF-THP1细胞)来产生THP1-Blue ISG细胞(Invitrogen)。THP-1细胞内源地含有功能性STING (干扰素基因的刺激物)途径分子以及胞质DNA识别受体。STING接受来自胞质DNA监测分子的信号且其自身是通过IRF-3起作用的胞质DNA监测分子。STING的活化导致SEAP产生,其然后在培养物上清液中可检测。因此,IRF-3报告子SEAP构建体的活化与STING途径的活化相关联。

[0091] 通过作为不同IRF途径的通用活化剂IFN- α 1,测试稳定转染的IRF-THP-1细胞系的功能性。使IRF-THP-1细胞与作为阳性对照的人类干扰素 α 1 (IFN α 1)接触用于IRF-3活化。根据IFN- α 1给药来检测特异性SEAP信号且观察到明显剂量-反应关系。图4图示说明IRF-3的IFN α 1活化。IRF依赖性信号传导轴在IRF-THP-1细胞系中有功能。

[0092] 使用作为未配制的质粒和作为脂质体制配的质粒(图5,Seq No 2-F)的SEQ ID NO.2的最初实验表明,未配制的SEQ ID NO.2即使在非常高浓度(50 μ g/mL)下,也没有引发特异性信号。相比之下,Seq No 2-F在ng/mL范围内产生量级与IFN- α 1对照相当的SEAP信号(图5)。

[0093] 使IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物接触。免疫调节剂组合物包括未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、用脂质体(DOTIM/胆固醇)载体配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)、用脂质体(DOTIM/胆固醇)载体配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F)和PBS (阴性对照)。不含脂质体组分的单独DNA没有活化IRF-3 (图6)。DNA/脂质体组合物在最低浓度下活化IRF-3 (图6)。

[0094] 使IRF-THP-1细胞与本文所述的免疫调节剂组合物和对照接触。免疫调节剂组合物包括未配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2)、未配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1)、用脂质体(DOTIM)载体配制的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)和用脂质体(DOTIM)载体配制的SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F)。对照包括PBS (阴性对照)、脂质体组分(单独制剂)、HSV-60-Lyovec

(已知的胞质DNA识别活化剂)、VACV-Lyovec (已知的胞质DNA识别活化剂) 和Poly-(dA/dT)-Lyovec (已知的胞质DNA识别活化剂)。不含脂质体组分的单独DNA没有活化IRF-3 (图7和图8)。DNA/脂质体组合物活化IRF-3 (图7和图8)。脂质体组分自身对IRF3报告基因表达没有作用(图7和图8)。

[0095] 本文所述的免疫调节剂组合物对胞质DNA监测分子的活化类似于并在一些情况下好于通过已知胞质DNA识别活化剂的活化(图9和图10)。

[0096] 作为未配制的质粒和作为脂质体制配的质粒(Seq No 2-F)的SEQ ID NO.2的剂量-反应曲线确认,“裸”质粒(Seq No 2)在所考虑的整个浓度范围内与PBS稀释对照相同(图11;1.5625-50 μ g/ml),且因此不是刺激性的。相比之下,Seq No 2-F在最高稀释度(1.5625 μ g/ml和3.125 μ g/ml)下产生SEAP信号,而较高浓度导致SEAP分泌能力的损失,甚至低于PBS对照。显微镜检查表明,Seq No 2-F在较高浓度下的细胞毒性可以是该效应的原因。阳性对照干扰素- α 1导致剂量-依赖性反应。

[0097] 作为未配制的质粒和作为脂质体制配的质粒(Seq No 2-F、Seq No 1-F)的Seq No 2和Seq No 1的剂量-反应曲线证实,两种未配制的质粒在所考虑的整个浓度范围(0.39-25 μ g/ml)内没有显示特异性信号(图12)。相比之下,Seq No 2-F和Seq No 1-F在最高稀释度(0.39 μ g/ml、0.78 μ g/ml和1.5625 μ g/ml)下产生SEAP信号,而较高浓度产生SEAP分泌能力的损失,甚至低于PBS对照。显微镜检查表明,Seq No 2-F和Seq No 1-F在较高浓度下的细胞毒性可以是此效应的原因。

[0098] 作为未配制的质粒的Seq No 2和Seq No 1显示即使在25 μ g/ml,也没有超过PBS背景的特异性信号(图13)。相比之下,脂质体制配的质粒(Seq No 2-F、Seq No 1-F)在195ng/ml下显示显著刺激,而脂质体对照显示无信号。与涉及STING途径的标准配体HSV-60-LyoVec和VACV-70-LyoVec相比,Seq No 2-F和Seq No 1-F显示较强的刺激能力。涉及几种不同胞质识别途径的聚(dA/dT)/LyoVec在此测试系统中显示最强信号,即使在较高浓度下也是如此。

[0099] 作为未配制的质粒的Seq No 2和Seq No 1显示没有超过PBS背景的特异性信号。相比之下,脂质体制配的质粒(Seq No 2-F、Seq No 1-F)在相同浓度下显示显著刺激,而脂质体对照显示无信号(图14)。与涉及STING途径的标准配体HSV-60-LyoVec和VACV-70-LyoVec以及聚(dA/dT)/LyoVec相比,Seq No 2-F和Seq No 1-F在以相似浓度施加时显示较强的刺激能力。

[0100] 如图14中所显示,作为未配制的质粒的Seq No 2和Seq No 1显示没有超过PBS背景的特异性信号。相比之下,脂质体制配的质粒(Seq No 2-F、Seq No 1-F)在相同浓度下展现显著刺激,而脂质体对照显示无信号。与涉及STING途径的标准配体HSV-60-LyoVec以及聚(dA/dT)/LyoVec相比,Seq No 2-F和Seq No 1-F在以相似浓度施加时显示较强的刺激能力(图15)。转染剂LyoVec自身没有刺激IRF-THP-1细胞。当未配制的质粒Seq No 2和Seq No 1与LyoVec作为复合组分一起施加时,IRF途径的刺激是显而易见的。

[0101] 在亚 μ g/ml浓度范围内,产生在IRF-THP-1报告基因系统中作为未配制、脂质体制配形式(Seq No 2-F和Seq No 1-F)和作为LyoVec配制的形式的Seq No 2和Seq No 1的剂量反应曲线(图16)。未配制的质粒无活性,而脂质体制配的形式显示优于LyoVec制剂的剂量反应,这表明脂质体在低浓度范围内是优异的制剂。

[0102] 在亚 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内,产生在IRF-THP-1报告基因系统中作为未配制、转染剂配制(LyoVec (图17)、Mirus (图18)、X-tremeGen (图19))形式的Seq No 2和Seq No 1的剂量反应曲线。未配制的质粒无活性,而转染剂配制的形式显示IRF刺激信号以及明显的剂量反应。这进一步指示所述质粒对THP-1细胞的细胞质DNA识别机制的刺激潜能。

[0103] 实施例2:使用黑色素瘤细胞系用免疫调节剂组合物活化胞质DNA监测分子。

[0104] B16-BlueTM ISG细胞源自鼠B16 F1黑色素瘤细胞系。它们在I-ISG54启动子的控制下表达分泌性胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因,所述I-ISG54启动子包含由多聚ISRE增强的IFN诱导型ISG54启动子。用IFN、环状二核苷酸(例如cGAMP)或I型IFN诱导物(诸如转染的聚(dA:dT))刺激B16-BlueTM ISG细胞触发I-ISG54启动子的活化和SEAP的产生。

[0105] 通过作为不同IRF途径的通用活化剂IFN- α 1,测试B16-BlueTM ISG细胞系的功能性。根据IFN- α 1给药来检测特异性SEAP信号,且清楚的剂量-反应关系是显而易见的(图20)。该实验表明,IRF依赖性信号传导轴在该细胞系中有功能。

[0106] 通过625ng/ml的脂质体制配的质粒Seq No 2-F和Seq No 1-F来刺激B16-BlueTM ISG细胞,而未配制的质粒在高8倍的浓度(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)下显示与PBS对照相比无特异性信号(图21)。同样,单独脂质体制剂无刺激性。对照3',3'-cGAMP和聚-dA/dT显示预期的特异性信号。

[0107] 实施例3.使用STING敲除细胞系用免疫调节剂组合物活化胞质DNA监测分子。

[0108] 通过敲低STING基因表达,从THP1-BlueTM ISG细胞产生THP1-BlueTM ISG-KD-STING细胞。因此,THP1-BlueTM ISG-KD-STING细胞展示STING表达的显著降低。

[0109] 在比较实验中,使用干扰素- α 1 (IFN- α 1)作为对照,因为其至IRF的信号传导不依赖于STING。将其他测试化合物的信号针对设定为1的IFN- α 1信号均一化。在THP-1-BlueTM ISG中(图22)或在THP-1-BlueTM ISG-STING细胞中(图23),作为未配制质粒的Seq No 2和Seq No 1和单独脂质体制剂在5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下显示没有超过PBS背景的特异性信号。相比之下,脂质体制配的质粒(Seq No 2-F、Seq No 1-F)在312.5ng/ml下显示THP-1-BlueTM ISG细胞的显著刺激,而在THP-1-BlueTM ISG-STING中,该信号下调67% (Seq No 2-F)直至91% (Seq No 1-F)。这些结果表明,STING介导的途径是一种由本文所述的免疫调节剂活化的胞质DNA监测途径。

[0110] 实施例4:使用人类单核细胞细胞系和鼠黑色素瘤细胞系用免疫调节剂组合物活化胞质DNA识别。

[0111] 使用THP1-BlueTM 和B16-BlueTM 细胞系探索Seq No 2免疫调节剂的胞质DNA识别。用Seq No 2-F、未配制的Seq No 2或适当的对照组合物来处理细胞培养物。

[0112] 通过脂质体制配的Seq No 2-F刺激THP1-BlueTM 细胞系。Seq No 2-F处理的细胞的SEAP信号是用阳性对照处理以产生SEAP信号的细胞的约4倍。然而,用未配制的质粒处理的THP1-BlueTM 细胞在任一测试浓度下显示无特异性信号(图24A)。

[0113] 类似地,还通过Seq No 2-F处理来刺激B16-BlueTM 细胞系,但没有使用未配制的质粒刺激。用Seq No 2-F刺激在较低浓度下产生大于用阳性对照刺激的信号(图24B)。这些结果显示,Seq No 2-F是用于胞质DNA识别的有效的活化配体。

[0114] 实施例5:使用STING敲除和敲低细胞系用免疫调节剂组合物活化胞质DNA监测分子。

[0115] 通过稳定敲除STING基因,从B16-Blue™ ISG细胞系(鼠B16-F1黑色素瘤衍生的细胞系)产生B16-Blue™ ISG-KO-STING细胞。其在I-ISG54启动子的控制下表达分泌性胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因,所述I-ISG54启动子包含由多聚ISRE增强的IFN诱导型ISG54启动子。这些细胞对胞质DNA、DMXAA、典型和非典型CDN无反应,同时保留对I型和II型IFN反应的能力。IFN对这些细胞的刺激触发I-ISG54启动子的活化和SEAP的产生。

[0116] 比较用Seq No 2-F对THP-1-Blue™ ISG-KD-STING细胞和THP-1-Blue™ 细胞的处理。在敲低细胞中产生的SEAP信号是在THP-1-Blue™ 细胞中所产生信号的小于50% (图25A)。还比较用Seq No 2-F对B16-Blue™ ISG-KO-STING细胞的处理与用Seq No 2-F对B16-Blue™ 的处理。尽管B16-Blue™ 细胞的处理产生类似于阳性对照的SEAP信号(图25B),但敲除细胞的处理不产生超过PBS对照的信号(图25B)。

[0117] 这些结果表明,IRF途径的Seq No 2-F活化是STING依赖性的。

[0118] 实施例6:使用STING敲除细胞系和STING野生型细胞系,比较用免疫调节剂组合物的胞质DNA监测分子的活化。

[0119] 使用STING敲除细胞系和STING野生型细胞系来确定STING是否是Seq No 2-F和Seq No 1-F识别所必需的。

[0120] 首先通过与干扰素-β (IFN-β) (一种其信号转导途径不应受STING基因缺失影响的细胞因子)一起孵育来验证这些细胞系,这些是在我们的实验中所做的观察。参照图26,使用已知的STING途径活化剂:与LyoVec复合的单纯疱疹病毒DNA (HSV-LyoVec)和环状二核苷酸2',3'-cGAMP来验证细胞系性质。尽管两种药剂在亲代B16-Blue ISG细胞系中产生显著信号,但这些信号在B16-Blue ISG-KO-STING细胞中完全消除。

[0121] 在两种细胞系中,相对于PBS对照,施加未复合的Seq No 2或Seq No 1质粒给出无信号或仅少量信号。脂质体复合的SEQ ID NO.2 (Seq No 2-F)和SEQ ID NO.1 (Seq No 1-F)在亲代B16-Blue ISG细胞系中产生强信号,而在B16-Blue ISG-KO-STING细胞中未观察到信号。

[0122] 总之,数据表明,至少在具有干扰素-反应元件读出值的鼠B16黑色素瘤细胞中,STING途径是Seq No 2-F和Seq No 1-F识别所必需的。

[0123] 实施例7:猪中干扰素释放的离体诱导。

[0124] 该研究的目的是测定Seq No 2-F对从猪分离的外周血单核细胞(PMBC)中的干扰素产生的影响。

[0125] 采用水疱性口炎病毒(VSV)细胞裂解测定来检测分离的PMBC中的1型干扰素表达。对从三只单独猪分离的PMBC进行VSV测定。用具有和不具有共刺激物(UV失活的疱疹病毒)配制的Seq No 2-F两者处理PMBC。参照表1,在2天、4天和6天的时程内在不同Seq No 2浓度下进行分析。

表 1: 来自猪 PMBC 的干扰素释放

猪	Seq No 2-F	IFN	浓度 µg/ml													
			100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.56	0.78	0.4	0.2	0.1	0.01	-	-
测试 I	第 2 天	EU/ml	tox	tox	tox	160	640	1280	2560	2560	2560	2560	2560	320	0.05	0.012
		pg/ml	tox	tox	tox	3.25	13	26	52	52	52	52	52	6.5	0.025	0.003
	第 4 天	EU/ml	tox	tox	tox	40	320	640	1280	2560	2560	2560	2560	320	n.d.	n.d.
		pg/ml	tox	tox	tox	0.8	6.5	13	26	52	52	52	52	6.5	n.d.	n.d.
	第 6 天	EU/ml	tox	tox	tox	20	160	640	1280	2560	2560	2560	2560	1280	n.d.	n.d.
		pg/ml	tox	tox	tox	0.4	3.25	13	26	52	52	52	52	26	n.d.	n.d.
测试 II	第 2 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1280	5120	5120	5120	5120	1280	640	320	160
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26	104	104	104	52	26	13	6.5	3.25
	第 4 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2560	10240	10240	5120	5120	2560	1280	640	320
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52	208	208	104	104	52	26	13	6.5
	第 6 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1280	2560	5120	5120	5120	2560	1280	640	320
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26	52	104	104	52	52	26	13	6.5
测试 III	第 2 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2560	5120	10240	10240	10240	5120	2560	1280	640
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52	104	208	208	208	104	52	26	13
	第 4 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1280	2560	5120	5120	5120	2560	1280	640	320
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26	104	208	208	208	104	52	26	13
	第 6 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2560	5120	10240	10240	10240	5120	2560	1280	640
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52	104	208	208	208	104	52	26	13
测试 IV	第 2 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1280	2560	5120	5120	5120	2560	1280	640	320
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26	52	104	104	52	52	26	13	6.5
	第 4 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2560	5120	10240	10240	10240	5120	2560	1280	640
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52	104	208	208	208	104	52	26	13
	第 6 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2560	5120	10240	10240	10240	5120	2560	1280	640
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52	104	208	208	208	104	52	26	13

测试 IV 编号 2008 冷冻	第 2 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	160	640	320	160	160	80	40	20	0	0	0
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.75	13	6.5	3.25	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0	0
		EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	80	640	640	320	160	80	40	20	0	0	0
	第 4 天	pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.6	13	13	6.5	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0	0
		EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40	640	640	320	160	160	80	40	20	0	0
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.8	13	13	6.5	3.25	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0
	第 6 天	EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	160	640	320	160	160	80	40	20	0	0	0
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.8	13	13	6.5	3.25	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0
		EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	160	640	320	160	160	80	40	20	0	0	0
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.8	13	13	6.5	3.25	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0
		EU/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	160	640	320	160	160	80	40	20	0	0	0
		pg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.8	13	13	6.5	3.25	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0

[0126] 为了比较新鲜分离的PMBC针对冷冻保藏的细胞的刺激行为,使用冷冻的猪PBMC进行另一VSV测定(测试IV)。为此,使用猪编号2008的新鲜和冷冻保藏的细胞进行直接比较。

[0127] 结果

发现Seq No 2-F是PMBC中的干扰素释放的高度有效的刺激物。其他共刺激物没有导致

干扰素释放进一步增加,因为无法检测到累加效应。根据实验单位(EU),描述所释放干扰素的生物活性。实验单位通过50% CPE来定义。通过式: $2x \times 10 = EU / ml$ 来进行EU单位(ml)的计算。

[0128] 毒性/不耐受性

参照表1,SEQ ID NO.2的最高浓度100-25 μ g/ml产生免疫调节剂相关的不耐受性和缺乏或减少的干扰素释放。细胞的显微镜分析检测到形态变化,这表明毒性。还使用范围为3 μ g/ml至0.003 μ g/ml的较低浓度的SEQ ID NO.2来进行干扰素释放的测定。较低浓度无一展现与较高浓度中所见类似的毒性。

[0129] 干扰素释放

施用Seq No 2-F导致干扰素释放。在所有3只猪(测试I、II和III)中,Seq No 2-F以剂量依赖性方式诱导IFN释放(图27A-C)。所释放IFN的量在各自动物中个别地不同。

[0130] 用Seq No 2-F处理的冷冻保藏的PBMC释放IFN;然而,所释放IFN的平均量是从新鲜分离的细胞释放的IFN的约1/4(参见表1,测试I和测试IV)。

[0131] 实施例8:牛中IFN释放的离体诱导。

[0132] 该研究的目的是测定配制的Seq No 2对从牛分离的外周血单核细胞(PBMC)中的干扰素产生的影响。

[0133] 采用水疱性口炎病毒(VSV)细胞裂解测定来检测1型干扰素表达。对从三只单独牛分离的PBMC进行VSV测定(测试I、II和III)。用具有和不具有共刺激物(UV失活的疱疹病毒)配制的Seq No 2-F两者治疗PBMC。参照表2,在2天和4天的时程内在不同Seq No 2-F浓度(3 μ g/ml至0.003 μ g/ml)下进行分析。

表 2: 来自牛 PMBC 的干扰素释放

牛	Seq No 2-F	IFN	浓度(μg/ml)										
			3	1.5	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012	0.006	0.003
测试 I	2 天	EU/ml	1280	640	320	160	80	40	20	0	0	0	0
		pg/ml	26	13	6.5	3.25	1.6	0.8	0.4	0	0	0	0
	4 天	EU/ml	1280	960	320	240	120	40	20	10	0	0	0
		pg/ml	26	19.5	6.5	4.87	2.42	0.8	0.4	0.2	0	0	0
测试 II	2 天	EU/ml	160	160	240	80	40	20	0	0	0	0	0
		pg/ml	3.25	3.25	4.87	1.6	0.8	0.4	0	0	0	0	0
	4 天	EU/ml	320	160	160	120	60	20	0	0	0	0	0
		pg/ml	6.5	3.25	3.25	2.42	1.2	0.4	0	0	0	0	0
测试 III	2 天	EU/ml	320	160	80	80	40	40	10	0	0	0	0
		pg/ml	6.5	3.25	1.6	1.6	0.8	0.8	0.2	0	0	0	0
	4 天	EU/ml	480	240	80	80	80	60	40	0	0	0	0
		pg/ml	9.75	4.87	1.6	1.6	1.6	1.2	0.8	0	0	0	0
测试 IV	2 天	EU/ml	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
		pg/ml	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	4 天	EU/ml	240	80	40	10	0	0	0	0	0	0	0
		pg/ml	4.87	1.6	0.8	0.2	0	0	0	0	0	0	0

[0134] 为了比较新鲜分离的PMBC针对冷冻保藏的细胞的刺激行为,用来自测试I中所用的牛的冷冻的PBMC进行VSV测定(测试IV),从而直接比较冷冻保藏的细胞和从牛新鲜分离的细胞。

[0135] 发现Seq No 2-F是PMBC中的干扰素释放的高度有效的刺激物。其他共刺激物没有导致干扰素释放进一步增加,因为无法检测到累加效应。施用Seq No 2-F导致IFN释放。在所有3只牛(测试I、II和III)中,Seq No2-F以剂量依赖性方式诱导IFN释放,如图28A-C中所示。所释放IFN的量在各自动物中个别地不同。用Seq No 2-F处理的冷冻保藏的PBMC释放IFN;然而,所释放IFN的平均量是从新鲜分离的细胞释放的IFN的约1/5(参见表2,测试I和测试IV)。

[0136] 实施例9:免疫调节剂剂量和施用途径的交叉研究

进行交叉研究以比较免疫调节剂剂量量和施用方法对猪中的细胞因子表达具有的影响。

[0137] 每周一次(7天间隔),以高或低剂量皮下或以高或低剂量肌内给予Seq No 2-F,持续4周的时段。在两只猪中,在第5周以高或低剂量静脉内缓慢施用测试物质。根据拉丁方(Latin Square)设计的时间表描绘于表3中。

[0138] 用皮下或肌内施用的高或低剂量的Seq No 2-F来治疗猪。在治疗前1小时和治疗后2小时、6小时、24小时和48小时,收集血清和全血细胞以研究循环血细胞中的血清细胞因子水平和细胞因子的mRNA表达。如表3中所显示在交替动物中将治疗重复4次。治疗之间的间隔为7天。

[0139] 表3:治疗分配的时间表(施用的剂量/途径)

治疗(日期)	动物					
	8053	7934	7840	7868	7773	7675
1 (08年11月04日)	sc 低	sc 低	im 高	im 低	im 低	sc 高
2 (08年11月04日)	sc 高	im 高	im 低	sc 低	sc 高	im 高
3 (08年11月04日)	im 低	im 低	sc 高	im 高	sc 低	sc 低
4 (08年11月04日)	im 高	sc 高	sc 低	sc 高	im 高	im 低

sc (皮下) im(肌内)。

[0140] 在最后一次测试产物施用后两天,将猪安乐死并检查整体病理学期间的注射部位。将注射位点的组织样本取样用于组织学检查。

[0141] 动物

猪源自高度健康的猪群(VOF G. v. Beek, Runderweg 10, 8219 Lelystad),其不含猪生殖和呼吸综合征病毒、断奶后多系统性消耗性综合征、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。到达时的兽医检查揭示猪没有肺炎、腹泻、皮肤或尾巴的炎性变化或其他疾病体征。

[0142] 给药方案、频率和持续时间

根据治疗时间表一次性施用Seq No 2-F。用于肌内或皮下施用的高剂量为205 μ g且低剂量为20 μ g,体积为2ml。用于静脉内施用的高剂量为5ml中的50 μ g,且低剂量为5ml体积中的10 μ g。

[0143] 观察

在免疫调节剂施用前第-1天和施用后6小时、24小时和48小时记录体温。分别在手术前第-7天和验尸前第23天(四只猪)或第30天(两只猪)记录体重。

[0144] 分析方法

血液学:通过标准实验室技术来评价WBC计数、差异血细胞组成(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)、红血细胞计数、血红蛋白、血细胞比容、平均血球值。

[0145] 血清细胞因子分析:通过蛋白阵列技术(Pierce, Search light®)测量以下猪细胞因子:IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IFN γ 、TNF α 。Pierce SearchLight Proteome阵列是测量至多16种蛋白/孔的多路复用测定。SearchLight阵列通过将不同的单

克隆抗体点至96孔板的每一孔中来产生。

[0146] 细胞因子mRNA分析:通过qPCR技术 (Applied Biosystems) 评价IL-1、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12的表达。根据制造商的说明书使用TRIzol试剂 (Invitrogen, Breda, The Netherlands) 来分离总RNA。将剩余RNA溶解于50 μ l不含RNase的水中且使用Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Sciences, IJsselstein, The Netherlands) 来分光光度定量。根据标准实验室程序进行cDNA合成和Q-PCR条件。关于所用引物的信息描绘于表4中。为了降低痕量基因组DNA的扩增,使引物位于不同外显子中。利用免费获得的GeNorm程序 (<http://medgen.ugent.be/jvdsomp/genorm>) 进行计算以估计表达稳定性和成对变异。

[0147] 将所有细胞因子mRNA表达与肌动蛋白B (ACTB) 的表达进行比较,且通过计算细胞因子mRNA的量/ACTB mRNA的量来表示为相对量。

表 4. 细胞因子 mRNA 分析					
猪细胞因子	登录号	正向引物 5' $\rightarrow$ 3'	反向引物 5' $\rightarrow$ 3'	产物长度 (bp)	T _m (C°)
IL-1 β	NM_001005149	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	70	59
IL-2	NM_213861	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	70	59
IL-6	AF518322	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	68	59
IL-10	NM_214041	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	69	59
IL-12p40	AY388985	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	88	59

[0148] 统计学分析

进行描述性分析。通过进行双因素ANOVA分析 (时间; 治疗) 来进行细胞因子mRNA表达的初步推论性统计学分析。用用于Windows的GraphPad Prism第4版 (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA) 来分析所有统计学数据。

[0149] 结果

在施用测试物质免疫调节剂后未观察到临床反应。直肠体温描绘于图29中。体温在猪的正常温度范围内。一只动物 (编号7840) 在第三个治疗日展现增加至接近发热温度,但温度增加与治疗无关。

[0150] 在测试时段期间未见猪的体重增加之间的差别 (图30A和30B)。

[0151] 血液学数据呈现于图31A-F、32A-F和33A-H中。通常,发现治疗之前和之后的血液学数据处于正常范围内。治疗后红血细胞 (RBC)、血红蛋白 (HB) 和血细胞比容的平均值的显著降低,但平均值停留在生理学范围内。平均血球体积 (MCV)、血小板、淋巴细胞和单核细胞/粒细胞计数几乎保持恒定。

[0152] 来自血清细胞因子蛋白阵列的数据显示于表5 (来自部分12) 中。对于平均值的计算和图表展示,将“在检测限值下”的所有值转变成0.2pg/ml的最低可检测水平。在血清中并不一致地检测到某些细胞因子,即多于2/3的猪中检测到IL-1、IL-4、IL-10、IFN γ 和TNF,而在 $\frac{1}{2}$ 的猪中仅检测到IL-2和IL-12且未检测到IL-6,一个除外 (猪编号7840,在治疗第4天)。关于重复测量 (高剂量、低剂量,肌内、皮下) 的结果图示展示于图34A-D、35A-D、36A-D、37A-D以及38A和B中,且关于静脉内施用后单次测量的结果展示于图39A-F、40A-F和41A-H中。所述图显示施用测试物质后不同细胞因子的平均含量以及细胞因子含量的比例变化。与治疗前测量相比,未观察到IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IFN γ 和TNF的显著变化。对于IL-1观察到在肌内施用高剂量的测试物质免疫调节剂后平均值增加多于两倍,且对于IL-2

观察到在用高剂量的测试物质免疫调节剂肌内和皮下治疗后平均值增加多于两倍。

[0153] 表5:通过细胞因子蛋白阵列测量的治疗前后的血清细胞因子含量

研究	治疗	动物 ID	细胞因子 施用日	细胞因子										IFN γ	TNF α
				IL-1 β	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-12p70	IFN γ		
研究中的 动物数				pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
1	pre-treat	7675	4-11-2008	1	81.8	0.2	25	0.2	7.4	9.7	4.2	134.1	35.9		
2	pre-treat	7675	4-11-2008	2	72	0.2	27.2	0.2	6.2	21.1	5.4	152.5	32.8		
3	pre-treat	7675	4-11-2008	5	79.9	0.2	30.2	0.2	5.3	4.8	2.8	128.6	28.7		
4	pre-treat	7675	4-11-2008	24	68.6	0.2	18.6	0.2	8.9	0.2	1.5	85.5	22.5		
5	pre-treat	7675	4-11-2008	48	27.6	0.2	16.9	0.2	4.1	0.2	0.6	54.9	21.6		
6	pre-treat	7773	11-11-2008	1	0.2	0.2	4.2	0.2	0.2	17.6	0.2	19.0	3.1		
7	pre-treat	7773	11-11-2008	2	0.2	0.2	2.8	0.2	3.2	24.4	0.2	12.4	4.2		
8	pre-treat	7773	11-11-2008	5	39.8	0.2	11.5	0.2	4.6	25.6	0.2	80.4	15.8		
9	pre-treat	7773	11-11-2008	24	38.5	0.2	14	0.2	13	24	0.2	52.2	18.2		
10	pre-treat	7773	11-11-2008	48	24.4	163.7	36.6	0.2	9.5	84.9	0.2	135.8	27.3		
11	pre-treat	7845	11-11-2008	1	0.2	116.4	83.3	0.2	34.2	79.5	10.8	142.3	59		
12	pre-treat	7845	11-11-2008	2	3.7	0.2	47.2	0.2	1.2	26.6	4.4	61.2	38.1		
13	pre-treat	7845	11-11-2008	5	8.9	0.2	58	0.2	15.2	43.3	7.3	155.4	38		
14	pre-treat	7845	11-11-2008	24	0.2	297.9	72.6	0.2	11.1	37.3	9.3	38.4	32.8		
15	pre-treat	7845	11-11-2008	48	36	124	78.2	0.2	68.6	37.6	11.2	86.6	28.2		
16	pre-treat	7868	11-11-2008	1	1.2	0.2	4.4	0.2	16.3	0.2	14.5	0.2			
17	pre-treat	7868	11-11-2008	2	8.2	0.2	5.5	0.2	25	0.2	1.2	0.2	0.2		
18	pre-treat	7868	11-11-2008	5	0.2	0.2	11.8	0.2	18.9	0.2	0.2	0.2	0.2		
19	pre-treat	7868	11-11-2008	24	2.3	0.2	8.4	0.2	15.5	0.2	1	2.9	5.7		
20	pre-treat	7868	11-11-2008	48	65.8	0.2	23.7	0.2	22.5	26.8	4.7	94.3	20.6		
21	pre-treat	7934	11-11-2008	1	45.9	0.2	44.2	0.2	50.9	28.9	6.5	39.3	28.2		
22	pre-treat	7934	11-11-2008	2	61	0.2	45.1	0.2	36.3	34.9	8.3	71.5	35.4		
23	pre-treat	7934	11-11-2008	5	44.8	221.8	43.5	0.2	11.2	25.8	4.5	63.1	41.7		
24	pre-treat	7934	11-11-2008	24	52.7	0.2	38.2	0.2	26.5	27	3.2	24.2	45.8		
25	pre-treat	7934	11-11-2008	48	38.1	0.2	15.2	0.2	19	39	4.8	128.2	40.5		
26	pre-treat	8053	11-11-2008	1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	13.9	6.2		
27	pre-treat	8053	11-11-2008	2	0.2	0.2	0.2	0.2	12.5	0.2	0.2	0.2	0.2		
28	pre-treat	8053	11-11-2008	5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	18.4	7		
29	pre-treat	8053	11-11-2008	24	0.2	0.2	0.2	0.2	23.5	0.2	0.2	0.2	0.2		
30	pre-treat	8053	11-11-2008	48	0.2	0.2	0.2	0.2	31.1	0.2	0.2	0.2	0.2		

研究	治疗	动物 ID	细胞因子 施用日	细胞因子										IFN γ	TNF α
				IL-1 β	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-12p70	IFN γ		
研究中的 动物数				pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
1	pre-treat	7675	11-11-2008	1	0.2	0.2	2.3	0.2	44.7	0.2	0.2	0.2	0.2	6.3	
2	pre-treat	7675	11-11-2008	2	0.2	0.2	0.8	0.2	2.9	0.2	0.2	0.2	0.2	9	
3	pre-treat	7675	11-11-2008	5	0.2	0.2	0.2	0.2	5.4	0.2	0.2	0.2	0.2	4.3	
4	pre-treat	7675	11-11-2008	24	0.2	0.2	0.2	0.2	11.9	0.2	0.2	0.2	0.2	4	
5	pre-treat	7675	11-11-2008	48	0.2	0.2	0.2	0.2	23.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
6	pre-treat	7773	11-11-2008	1	0.2	111.8	18.6	0.2	21.3	83	0.2	203.1	39.6		
7	pre-treat	7773	11-11-2008	2	1	0.2	7.5	0.2	1.4	87.5	0.2	111.4	10		
8	pre-treat	7773	11-11-2008	5	0.2	0.2	8.5	0.2	8	87.3	0.2	132.9	5.8		
9	pre-treat	7773	11-11-2008	24	0.2	0.2	8.6	0.2	12.2	82.8	0.2	107	5.5		
10	pre-treat	7773	11-11-2008	48	0.2	89.9	8	0.2	13.9	48.4	0.2	78.5	10.4		
11	pre-treat	7868	11-11-2008	1	35.1	1784.1	307	1683.1	3.9	129	64.4	32.9	32.3		
12	pre-treat	7868	11-11-2008	2	149.6	1403.9	268.9	1713	1.3	166.2	74.5	55.6	35.4		
13	pre-treat	7868	11-11-2008	5	59.3	1266.3	212.5	1256.4	4.3	132	58.2	7.8	42.6		
14	pre-treat	7868	11-11-2008	24	0.2	811.7	105.3	831	1.9	494.2	27.6	6.2	36.1		
15	pre-treat	7868	11-11-2008	48	1.5	536.7	38.1	524.9	0.8	85.6	23.2	6.2	24		
16	pre-treat	7868	11-11-2008	1	0.1	0.2	21.5	0.2	7.7	0.2	0.5	23.9	10.5		
17	pre-treat	7868	11-11-2008	2	13.1	0.2	18.4	0.2	6.2	1.2	0.1	16.6	9.1		
18	pre-treat	7868	11-11-2008	5	0.2	0.2	13.8	0.2	3.6	0.2	0.2	10.9	0.2		
19	pre-treat	7868	11-11-2008	24	0.2	0.2	11.5	0.2	21.6	0.2	0.2	3.1	0.2		
20	pre-treat	7868	11-11-2008	48	0.2	0.2	14.2	0.2	13.1	0.2	0.4	4.4	3.5		
21	pre-treat	7868	4-11-2008	1	97.3	364.5	36.8	0.2	102.6	253.7	18.5	273.2	47.6		
22	pre-treat	7868	4-11-2008	2	57.8	346.7	36.4	0.2	43	215.2	15.3	208.2	42.4		
23	pre-treat	7868	4-11-2008	5	55.3	488.4	128.6	0.2	57.9	182.2	22.5	239.4	57.6		
24	pre-treat	7868	4-11-2008	24	133.7	542.3	191.4	0.2	35.8	256	34.5	322.5	48.9		
25	pre-treat	7868	4-11-2008	48	149.8	933.5	156.6	0.2	39	182.3	46.7	213.3	21.4		
26	pre-treat	8053	4-11-2008	1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2	7.5	0.2		
27	pre-treat	8053	4-11-2008	2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
28	pre-treat	8053	4-11-2008	5	0.2	0.2	0.2	0.2	1.3	0.2	0.2	0.2	0.2		
29	pre-treat	8053	4-11-2008	24	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2		
30	pre-treat	8053	4-11-2008	48	0.2	0.2	0.2	0.2	4.8	0.2	0.2	0.2	0.2		

亡率(图50B),这表明在暴露于溶血曼海姆菌和暴露后一天的第二次暴露之前的首先治疗具有针对肺病灶和疾病的保护效应。

[0162] 实施例11:用于被诊断患有BRD的牛的组合疗法

该研究的目的是比较用Seq No 2-F、抗生素和包含Seq No 2-F和抗生素的组合疗法的牛的BRD治疗的效力和净回报。

[0163] 研究群体

选择212只被认为具有高BRD风险的平均称重在400lb和500lb之间的刚断奶小母牛来参与。将小母牛分成三个治疗组。诊断后,第一组(n=78)接受皮下注射的5.7ml/cwt Baytril® 100(恩诺沙星)。Baytril® 100是用于治疗BRD的抗微生物剂。第二组(n=77)接受肌肉递送的2mL Seq No 2-F。第三组(n=57)接受皮下递送的5.7ml/cwt Baytril® 100和肌肉递送的2ml Seq No 2-F。在诊断后三天暂停后,观察小母牛,直至诊断后第60天。

[0164] 如果在三天暂停后的任一时间,小牛仍满足BRD诊断的临床要求,则将从研究拉出小牛并施用Draxxin®(土拉霉素(tulathromycin))。如果小牛对该第二次治疗无反应,则将再拉出小牛并用Bio-Mycin® 200(氧四环素)治疗第三次。在三次治疗后,小牛将被视为具有慢性BRD且停止治疗。

[0165] 结果

参照表6,与单独Seq No 2-F或单独Baytril® 100相比,Seq No 2-F和Baytril® 100的组合显著降低BRD病例死亡的百分比。接受组合疗法的小母牛的平均增重也显著超过比较单一疗法组。与仅接受Seq No 2-F的组相比,接受组合疗法和单独Baytril® 100治疗的组具有较低的再拉出进行后续治疗的牛的百分比。与其他组相比,接受组合疗法的组也具有较低的慢性BRD百分比。尽管差异在统计学上不显著,但在组合疗法组中仅18.9%的牛发展慢性BRD,而38.7%的接受单独Seq No 2-F的牛发展慢性BRD。

[0166] 表6:个别和组合疗法比较

参数	Baytril 100 (n=78)	Baytril 100 + Seq No 2-F (n=77)	Seq No 2-F (n=57)
BRD再拉出	44.8%	46.5%	73.9
BRD慢性	22.10%	18.9%	38.7
BRD病例死亡率	10.0%	4.4%	22.3%
ADG (不计死亡例) lbs/天	1.8	1.7	1.4
平均增重(计入死亡例) lbs	24.3	61.80	-103.9
平均增重(不计死亡例) lbs	87.00	94.30	24.6

[0167] 这些结果显示,组合本发明免疫调节剂与有效地针对BRD的抗生素可改善畜群健康。另外,显示这些改善具有每头约\$110的经济优势,因此为生产者提供成本有效的稳健的组合疗法。

[0168] 实施例12:具有中等BRD风险的牛的补救预防

该研究的目的是确定Seq No 2-F在被施用以控制饲养场牛中的BRD时是否劣于市售抗生素Micotil。

[0169] 研究群体

选择平均体重为590lb且被测定具有中等BRD风险的断奶肉牛用于该研究。在诊断时,向第一组(n=1002)施用2ml/cwt Micotil,且向第二组(n=1002)施用2ml Seq No 2-F。包括三天暂停,观察牛达56天。

[0170] 结果

测量并比较研究组之间的发病率、死亡率、平均日增量 (ADG)、干物质采食量 (DMI) 和进食:增重比。如果被视为较差,则要求两组之间的BRD发病率相差10%。接受Seq No 2-F的组和接受Micotil的组之间的BRD发病率的累积发生率的差异为约6%,且误差范围小于±1.3%。参照表7,测量的几乎所有其他临床参数也没有显著性差异。一个例外在于,至BRD治疗的时间在接受Seq No 2-F的组中比接受Micotil的组显著较短。

[0171] 表7:劣性分析结果

参数	Micotil	Seq No 2-F	p-值
至BRD Dx的时间	28.1	22.6	<0.0001
BRD再拉出	17.9%	11.1%	0.5929
BRD慢性	27.90%	29.1%	0.9942
总体BRD死亡率	0.44%	0.50%	0.7643
BRD病例死亡率	3.95%	2.99%	0.7287
ADG	2.96	2.91	0.6759
DMI	12.96	12.81	0.3768
进食:增重	4.50	4.55	0.7302

[0172] 该研究显示,免疫调节剂Seq No 2-F被确定为不劣于抗生素Micotil。因为对抗生素疗法的抗性是对畜群健康和家畜操作的持续性的潜在风险,所以有效的非抗生素抗微生物疗法是对于生产者有价值的选择。

[0173] 实施例13:用于被诊断患有BRD的牛的组合疗法

该研究的目的是比较Draxxin®、Draxxin®和Seq No 2-F或单独Seq No 2-F在被诊断患有BRD的牛中的有效性。

[0174] 研究组

对于该研究,将平均体重为625lb的断奶肉牛分成三个治疗组。在诊断时,向第一组皮下施用1.1ml/cwt Draxxin®。向第二组施用皮下1.1ml/cwt Draxxin®且肌肉施用2ml Seq No 2-F,且向第三组肌肉施用2ml Seq No 2-F。在治疗后暂停3天,并在诊断后56天结束研究。

[0175] 结果

参照表8,Seq No 2-F和Draxxin®的组合与用单独Seq No 2-F治疗相比显著降低BRD发病率(分别为21.8%和45.8%)。组合疗法还导致与用单独Draxxin®治疗相比较低的BRD发病率(分别为21.8%和29.2%)。组合疗法(2.9%)的患有慢性BRD的牛的百分比低于单独Seq No 2-F疗法(8.9%)或单独Draxxin®疗法(4.0%)。在接受组合疗法的组中由于BRD导致的死亡率与用单独Seq No 2-F治疗或用单独Draxxin®治疗相比也降低。

[0176] 组合疗法也与比单一治疗方法更高的生产相关。组合疗法的平均日增量和平均增重较高,其导致与单独Draxxin®治疗相比约\$34/头的经济优势。

[0177] 表8:个别和组合疗法

参数	Draxxin	Draxxin + Seq No 2-F	Seq No 2-F
至BRD Dx的时间(天)	18.8	19.2	14.6
BRD发病率 (%)	29.2	21.8	45.8

BRD再拉出 (%)	37.2	43.9	48.2
BRD慢性 (%)	4.0	2.9	8.9
BRD病例死亡率 (%)	1.3	0.7	2.7
ADG (计入死亡例) lbs/天	3.2	3.3	2.8
ADG (不计死亡例) lbs/天	3.3	3.5	2.9
平均增重 (计入死亡例) lbs	181.1	189.9	156.3
平均增重 (不计死亡例) lbs	187.0	194.1	164.6

[0178] 当介绍本发明或其优选实施方案的要素时,冠词“一(a, an)”、“该(the)”和“所述(said)”意指存在所述要素中的一者或多者。术语“包含(comprising)”、“包括(including)”和“具有(having)”旨在是包括性的,并且意指可以存在除了列出的要素以外的另外的要素。

[0179] 鉴于上述内容,将看到,实现了本发明的若干个目标,并且得到了其它有利的结果。

[0180] 因为在不背离本发明范围的情况下可以对上述产品、组合物和方法进行多种变化,所以预期上文描述中含有和附图中显示的所有内容均应被解释为说明性而非限制性的涵义。

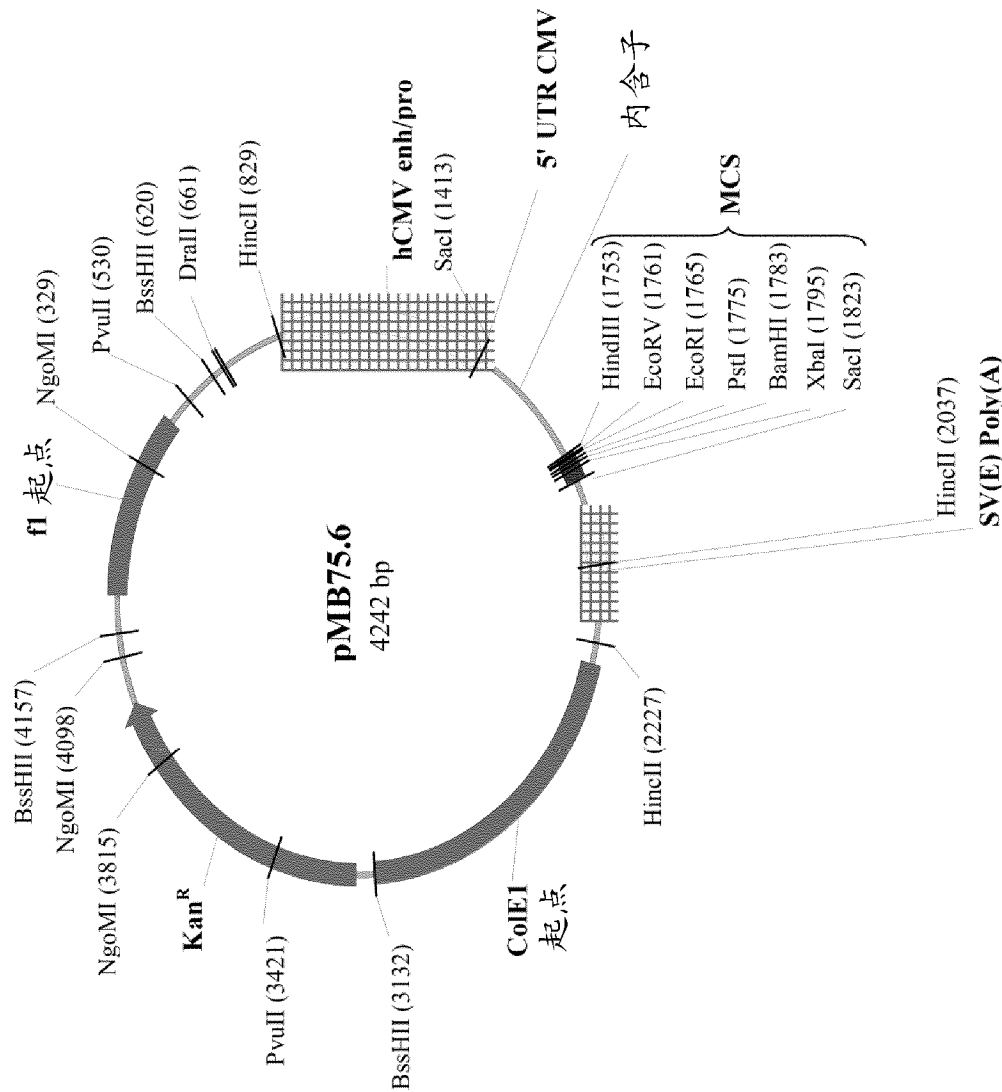


图 1

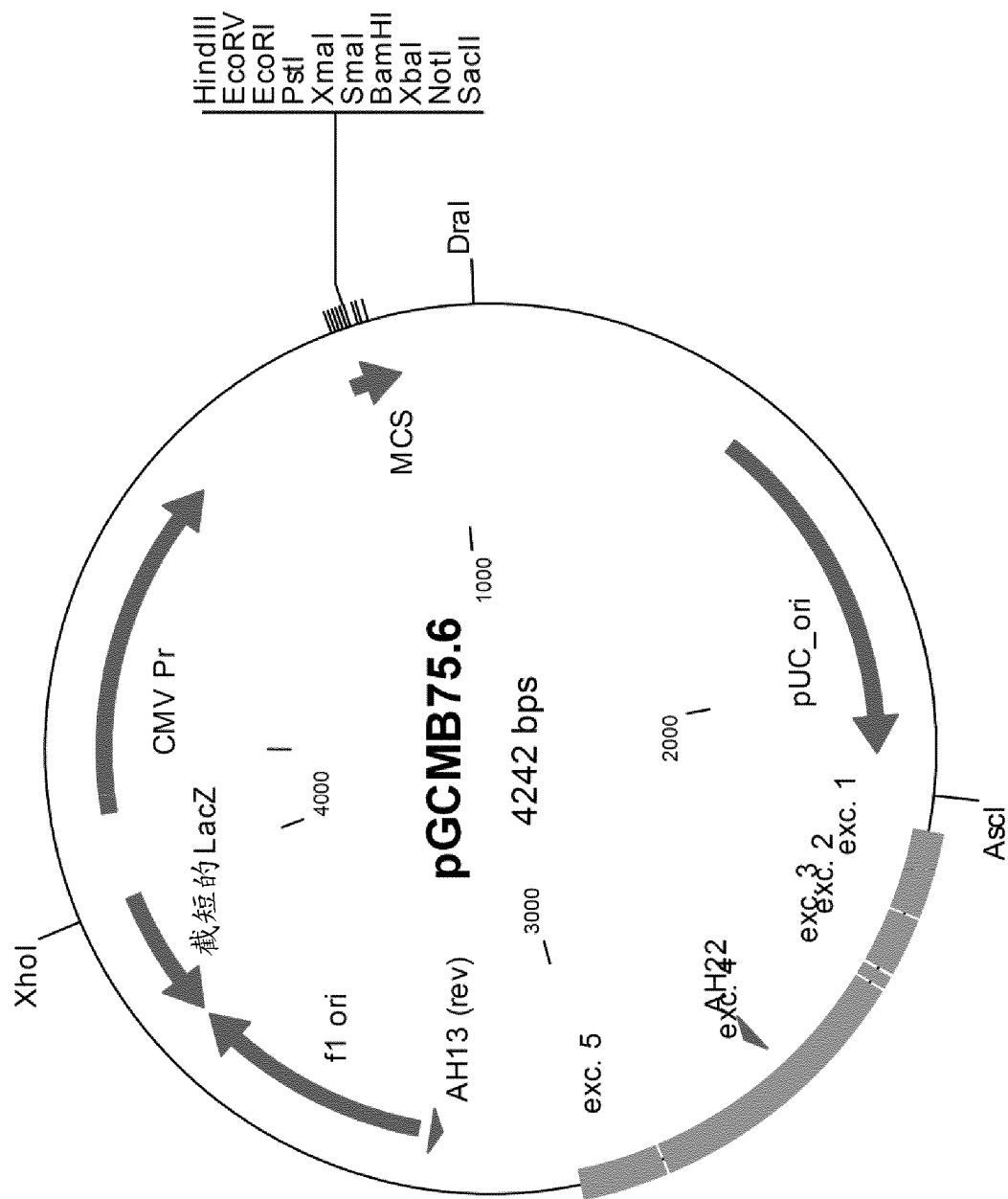


图 2

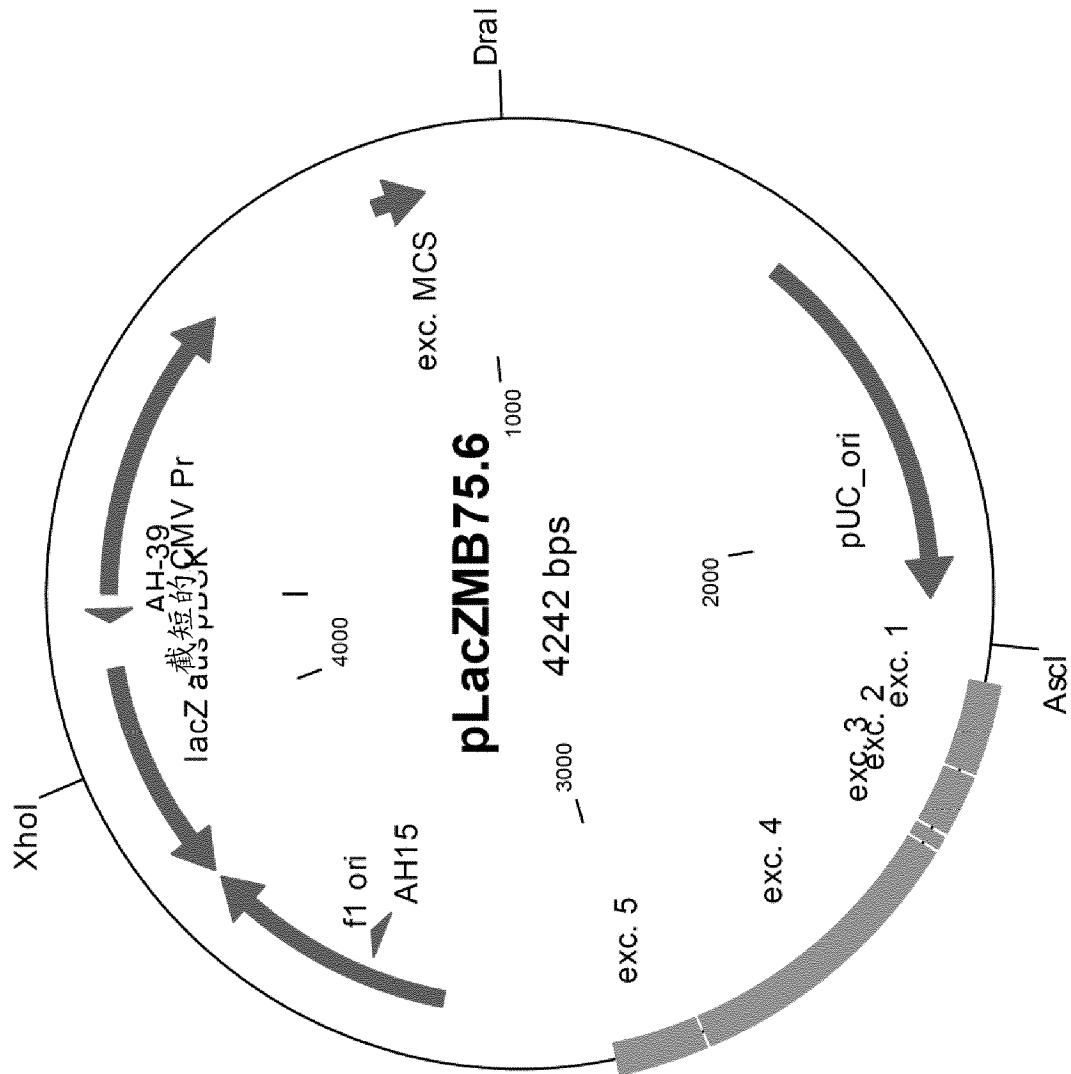


图 3

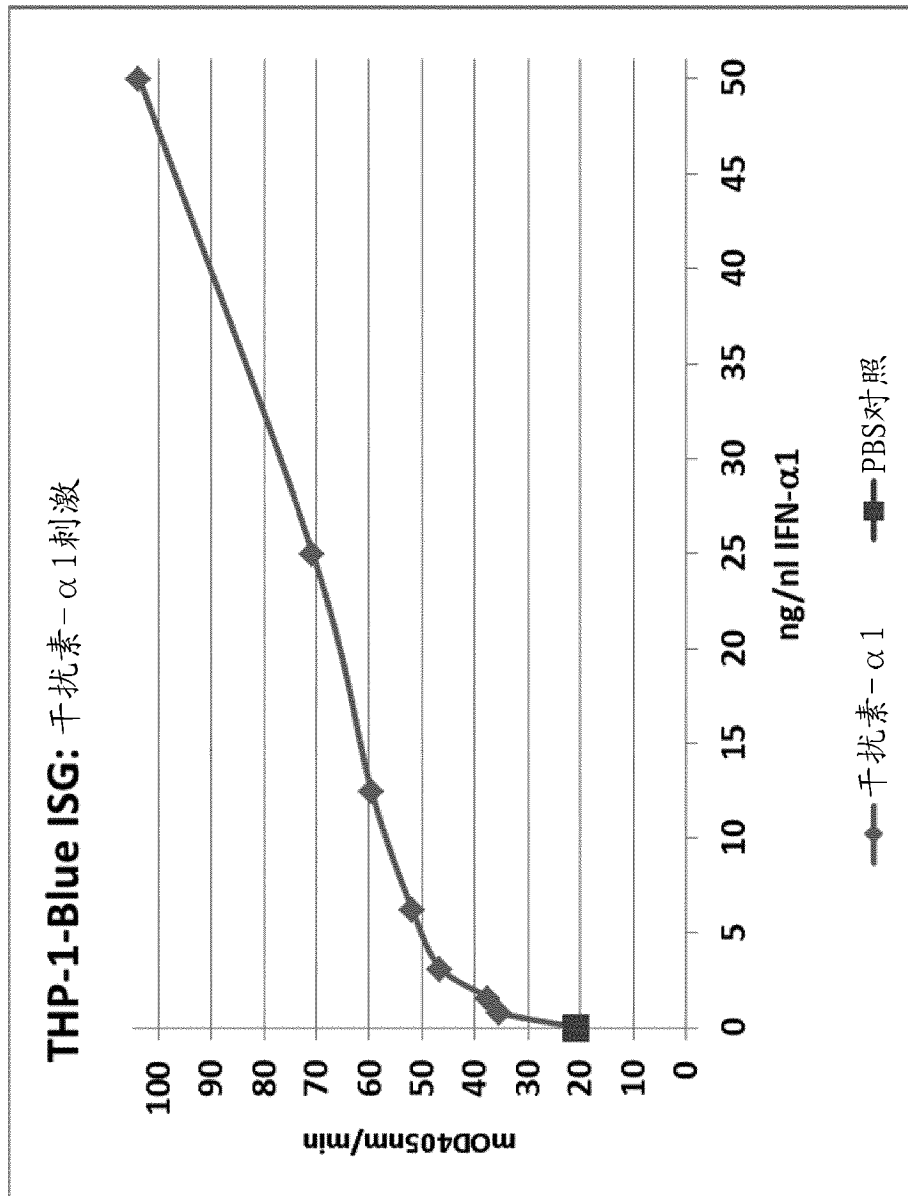


图 4

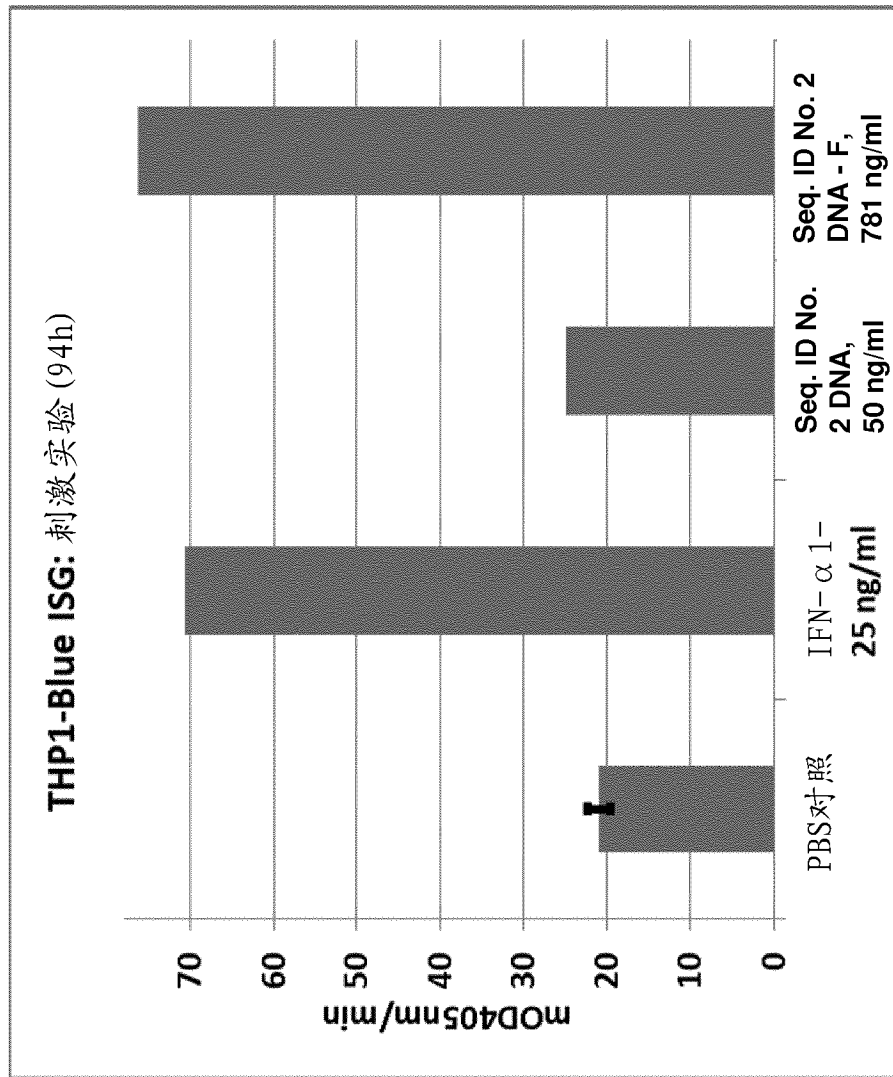


图 5

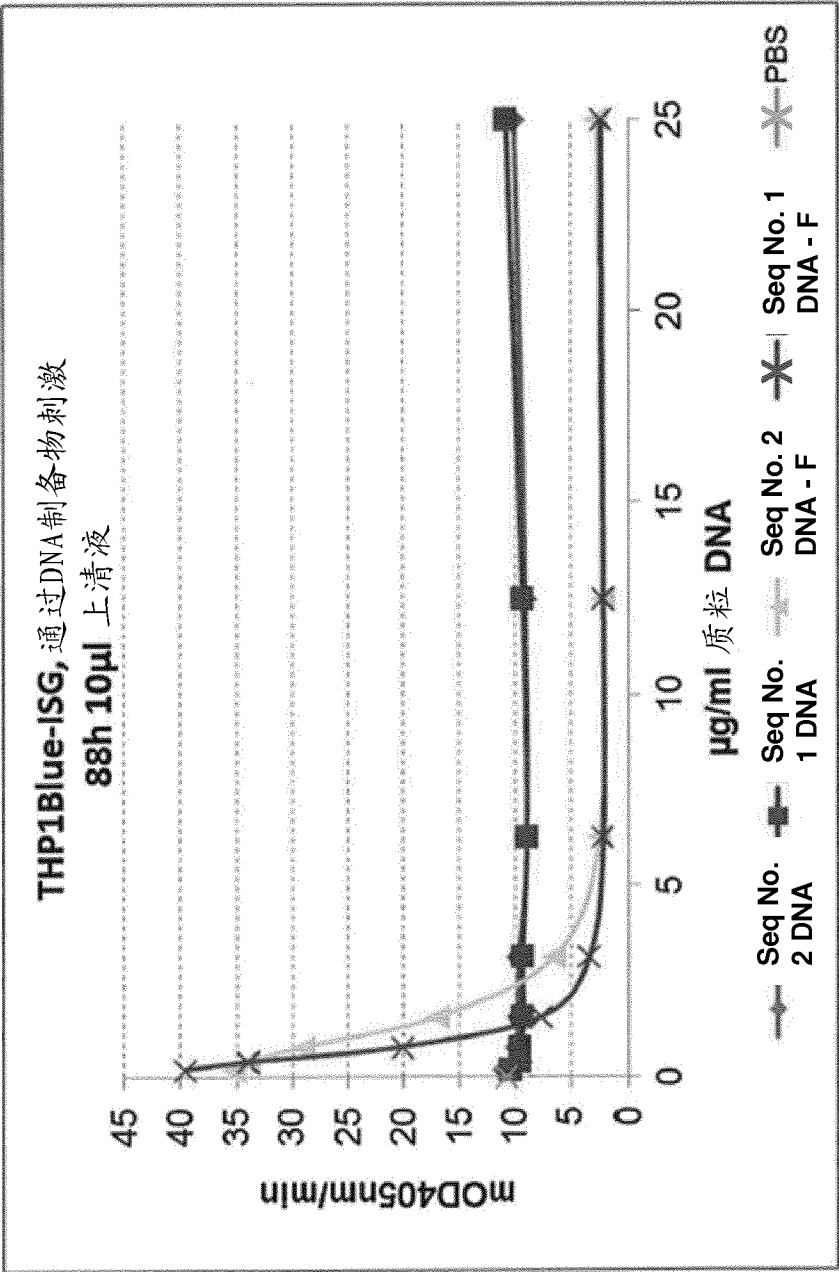


图 6

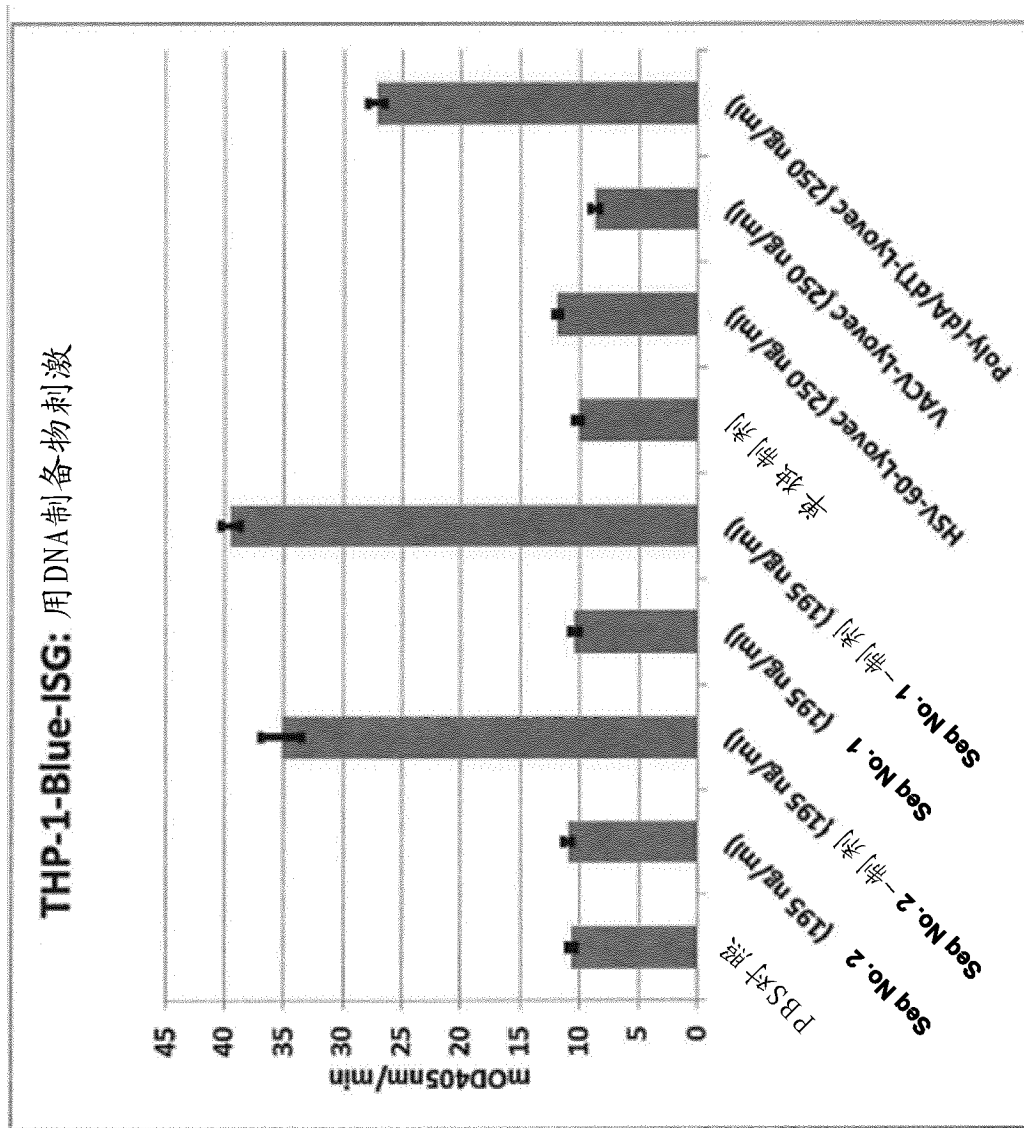


图 7

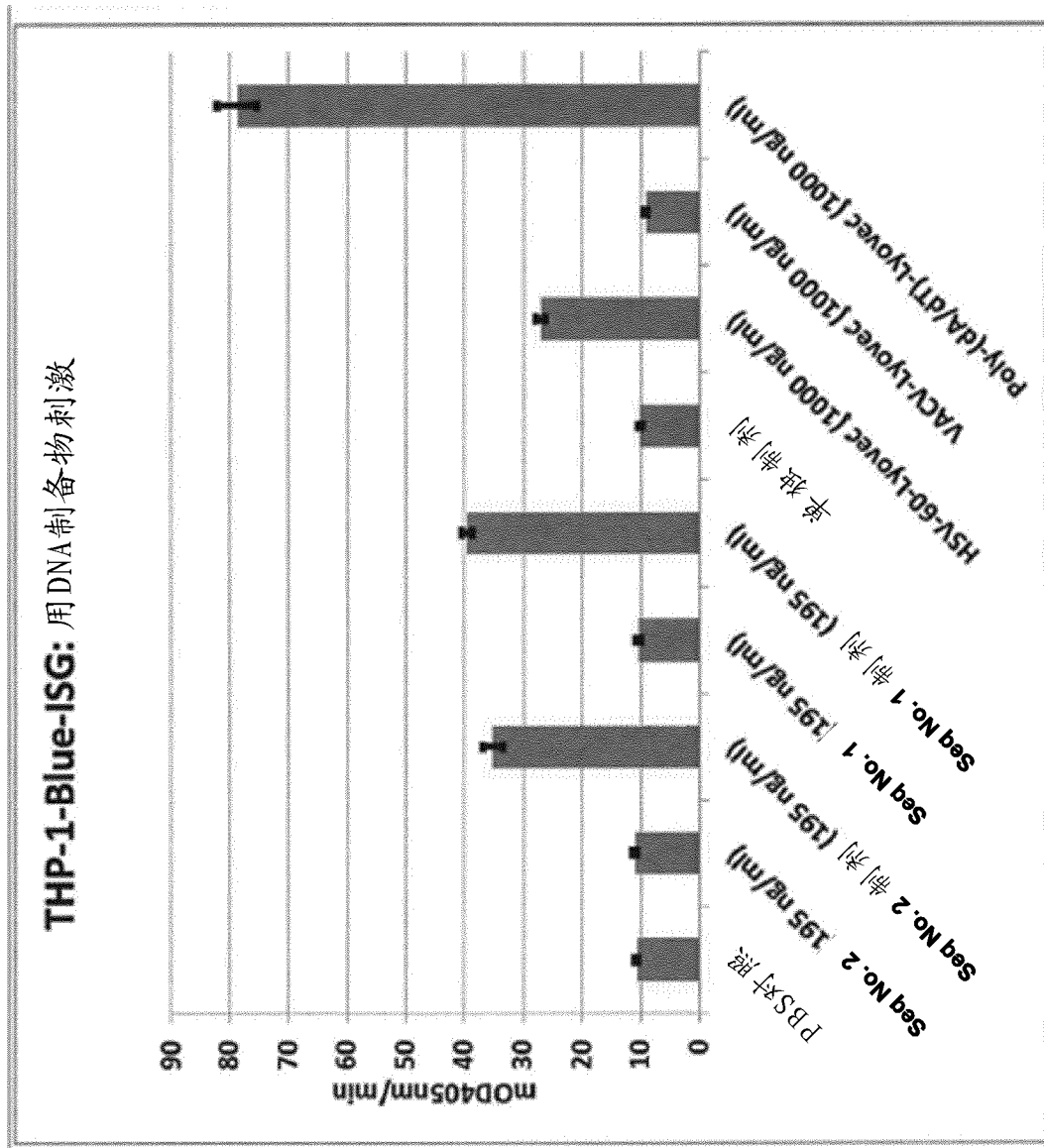


图 8

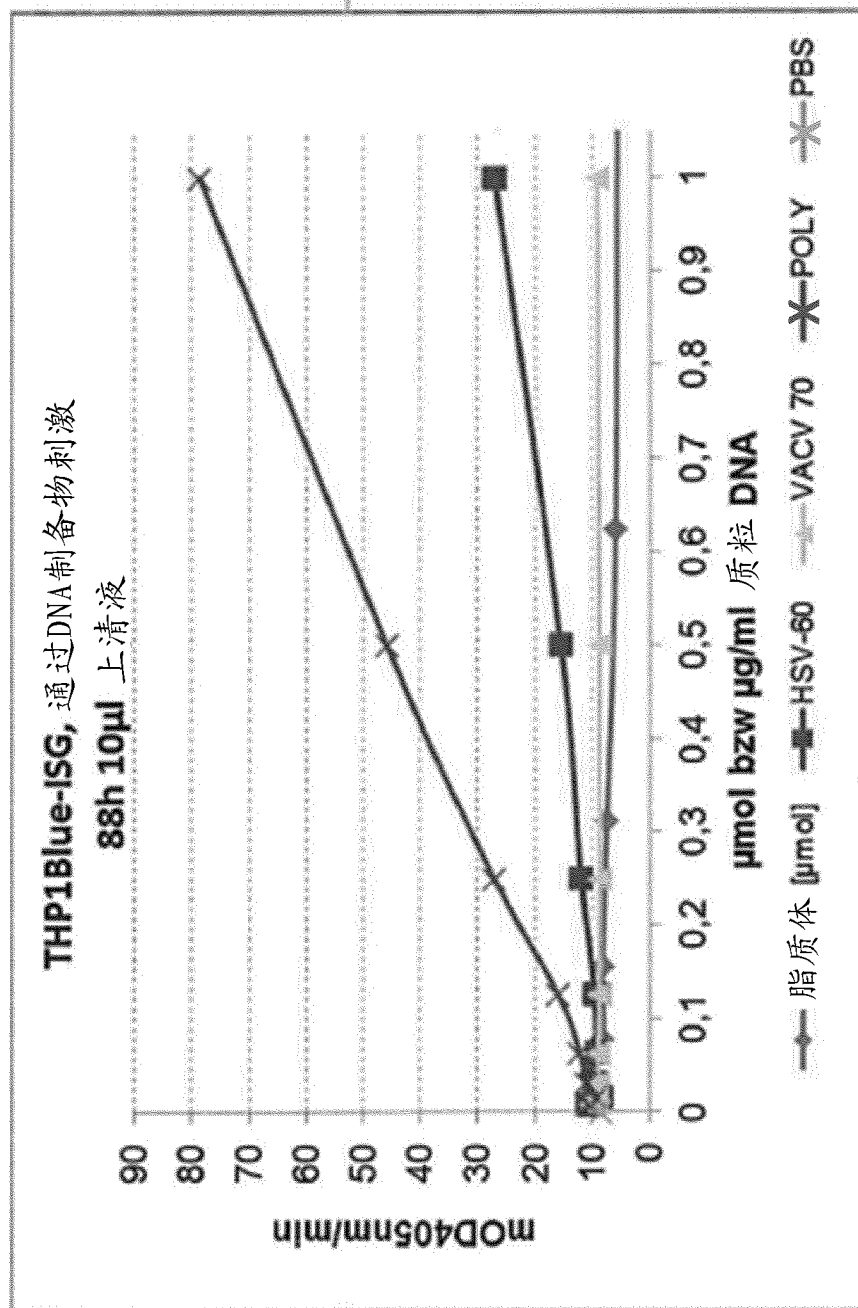


图 9

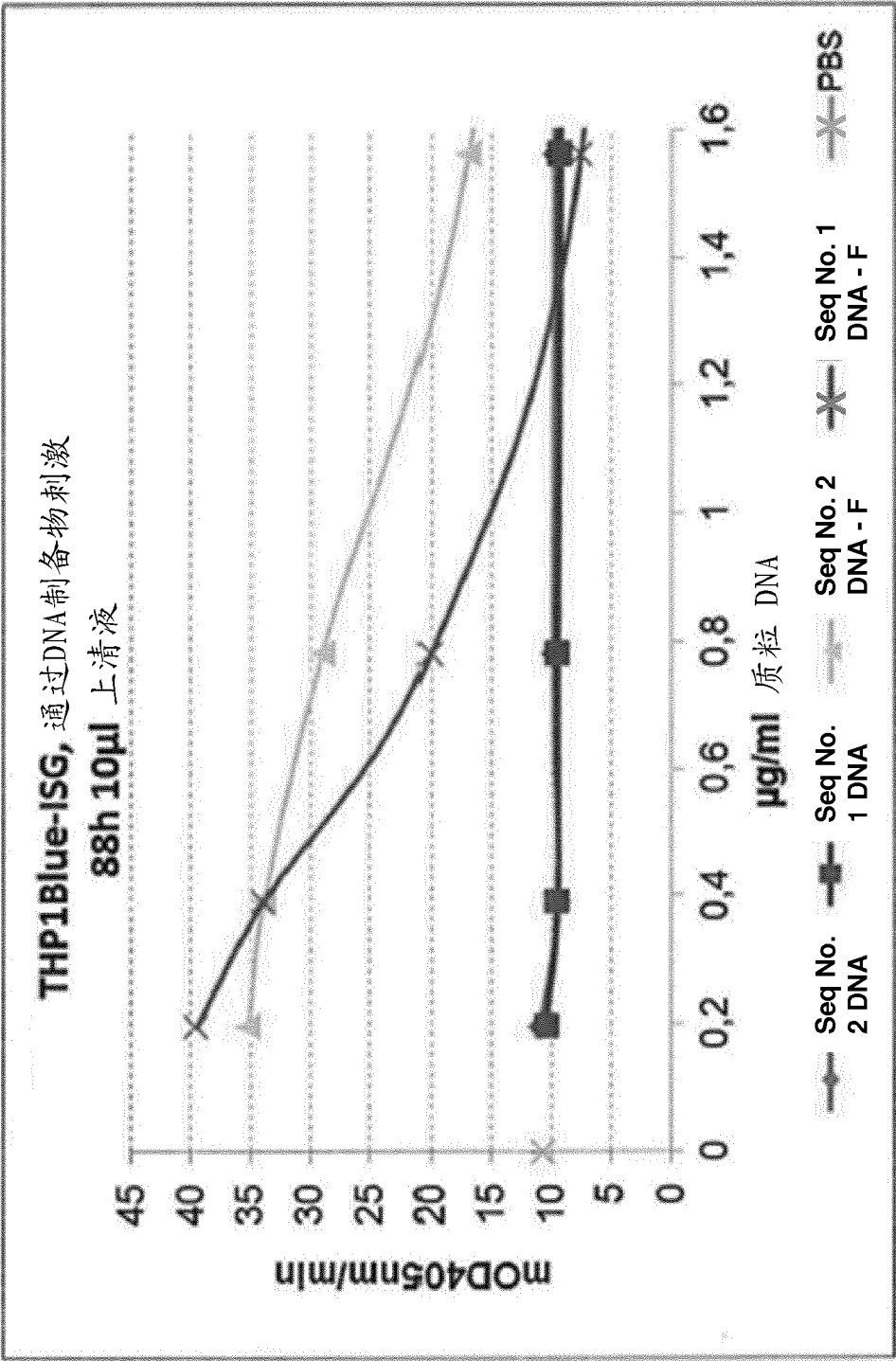


图 10

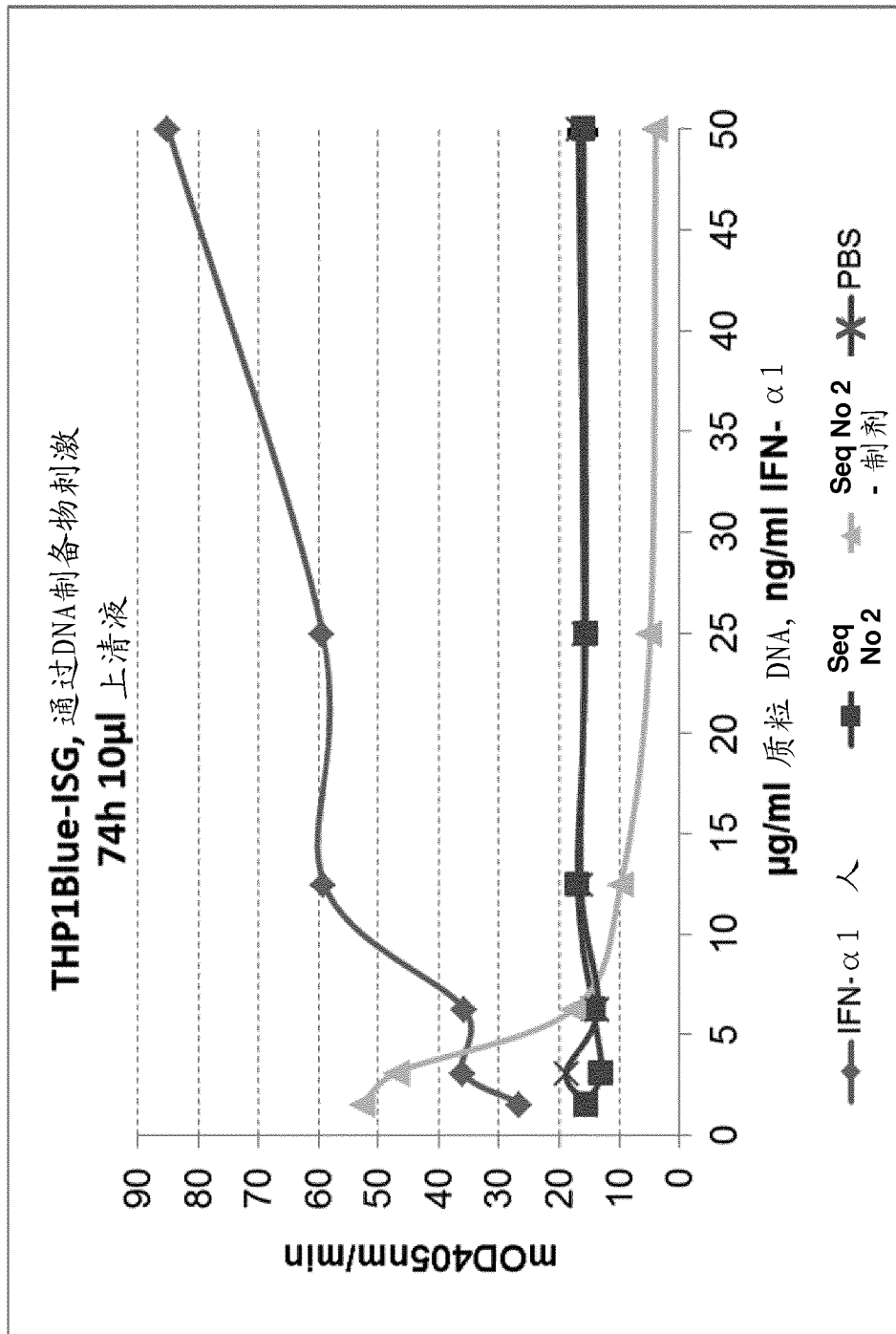


图 11

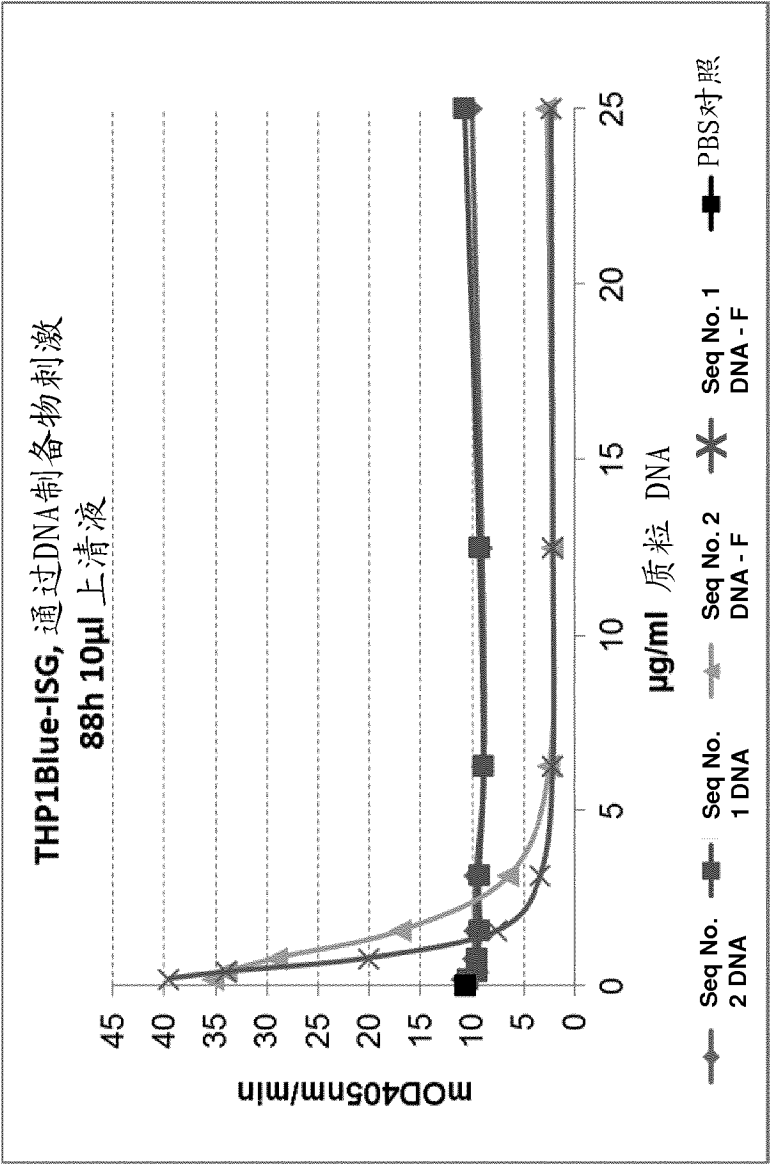


图 12

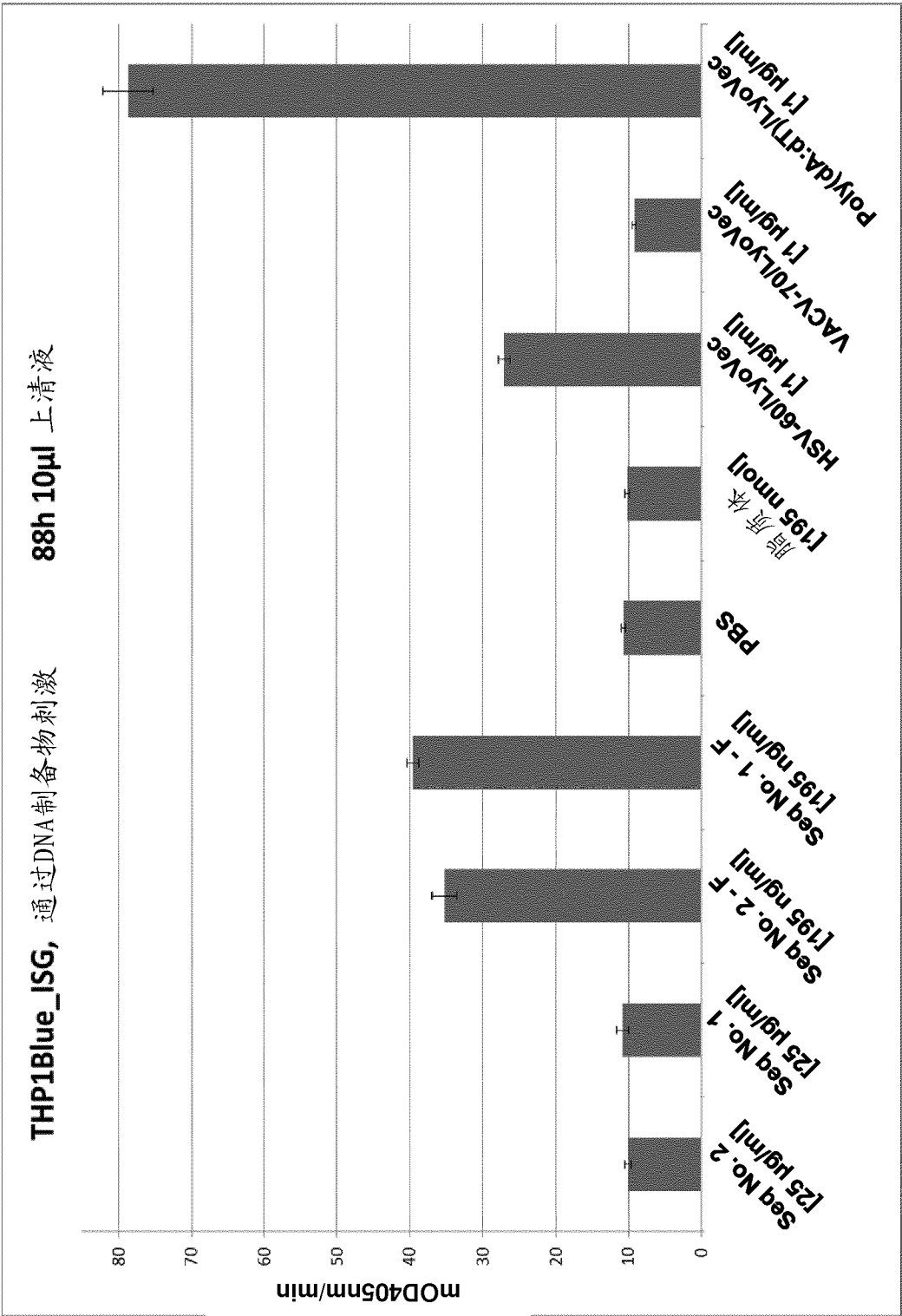


图 13

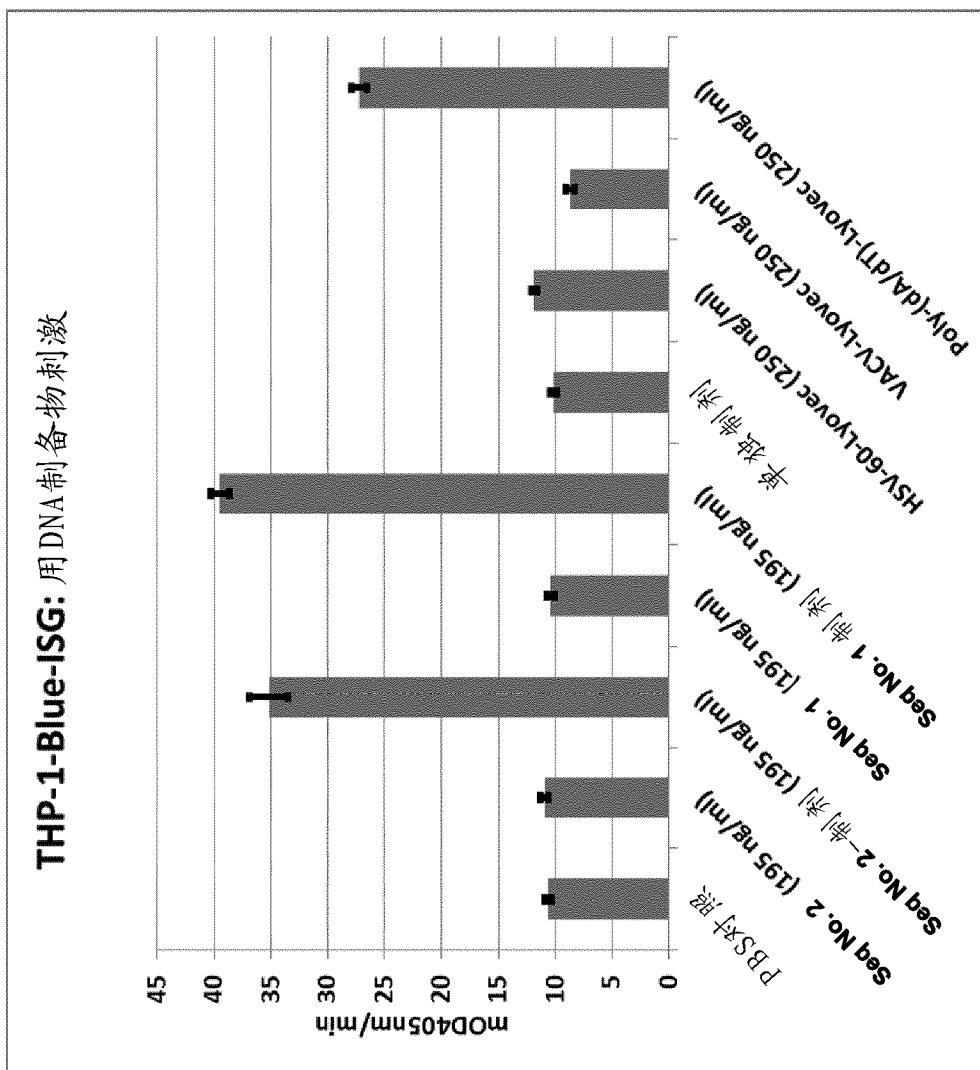


图 14

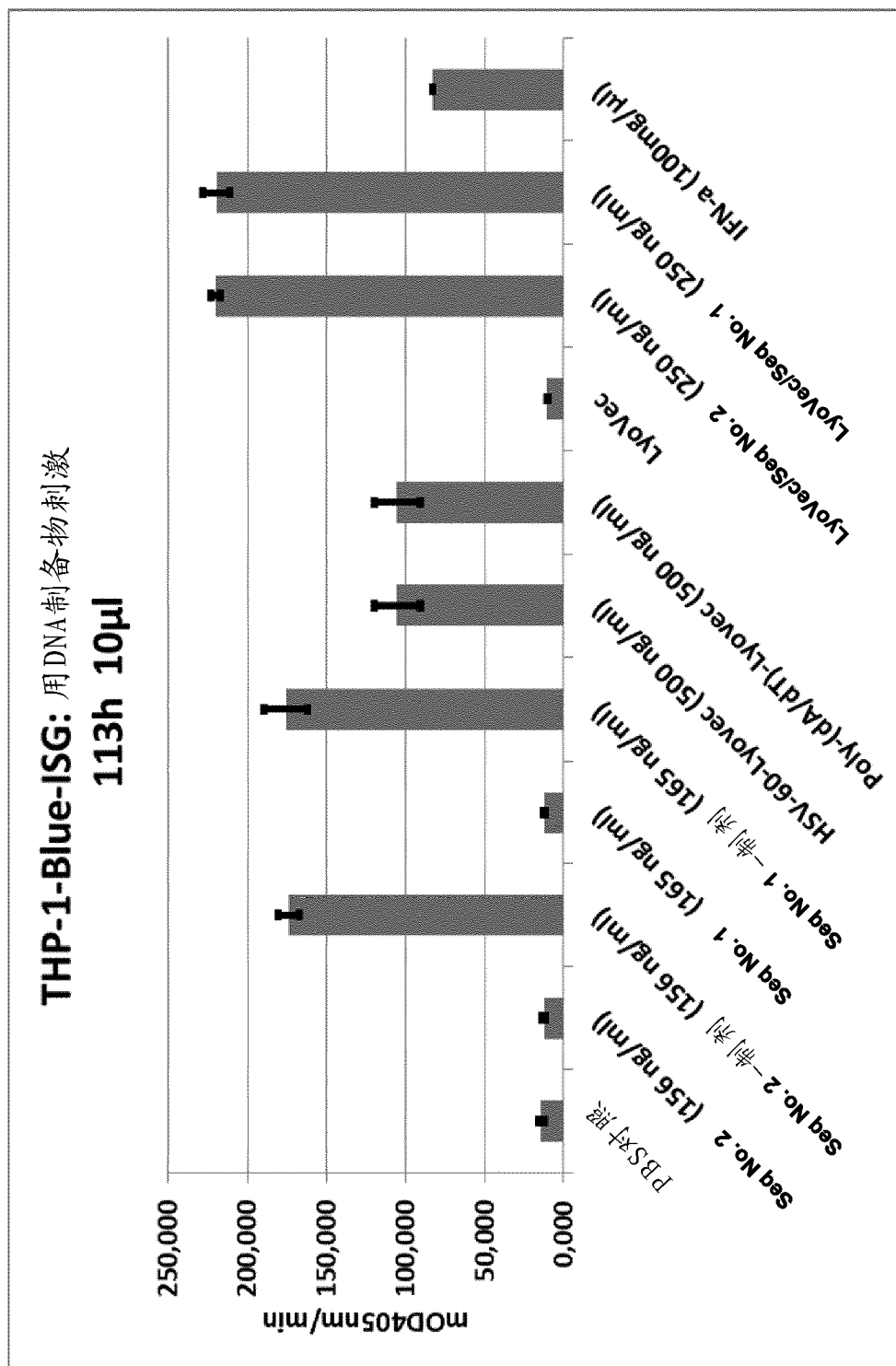


图 15

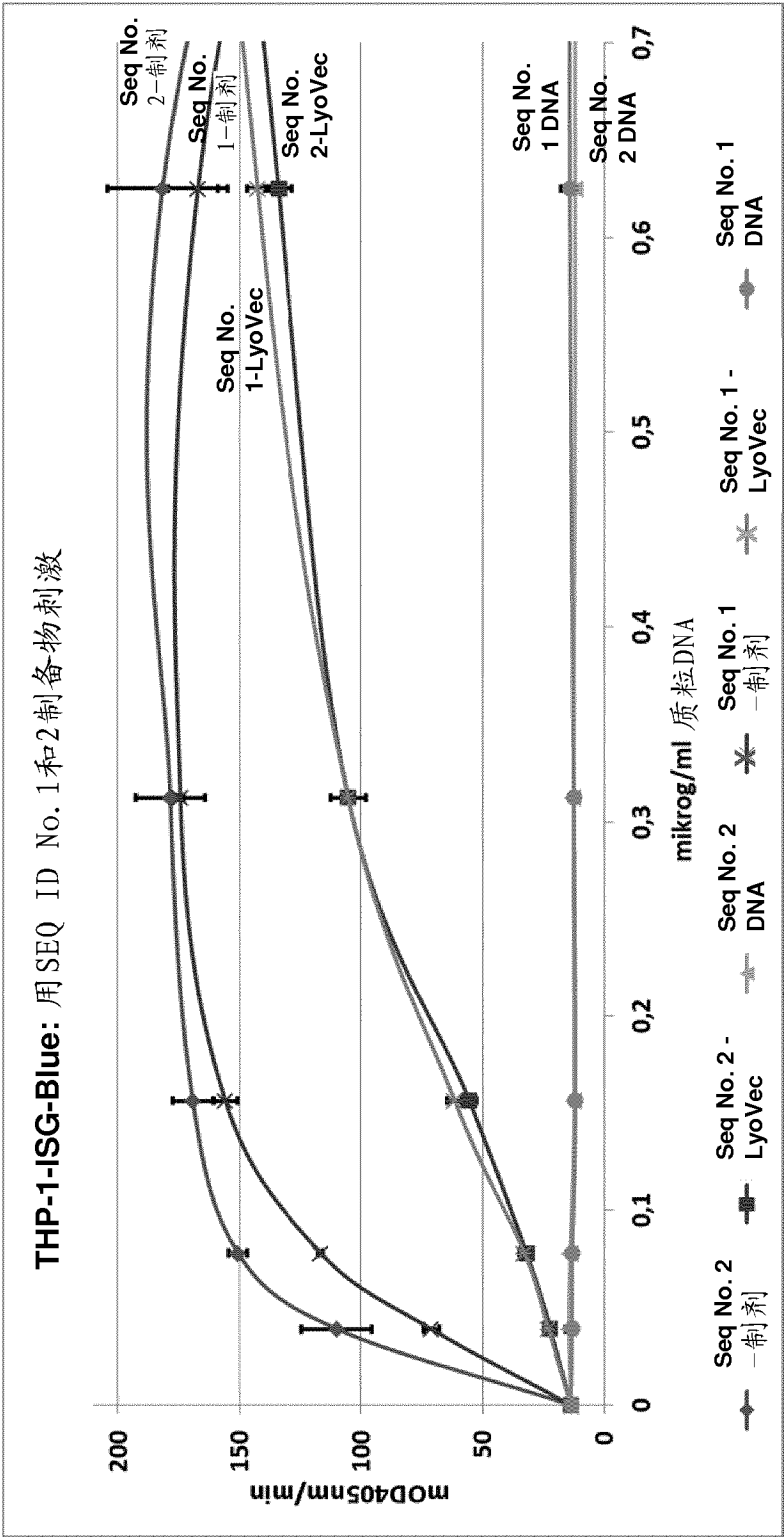


图 16

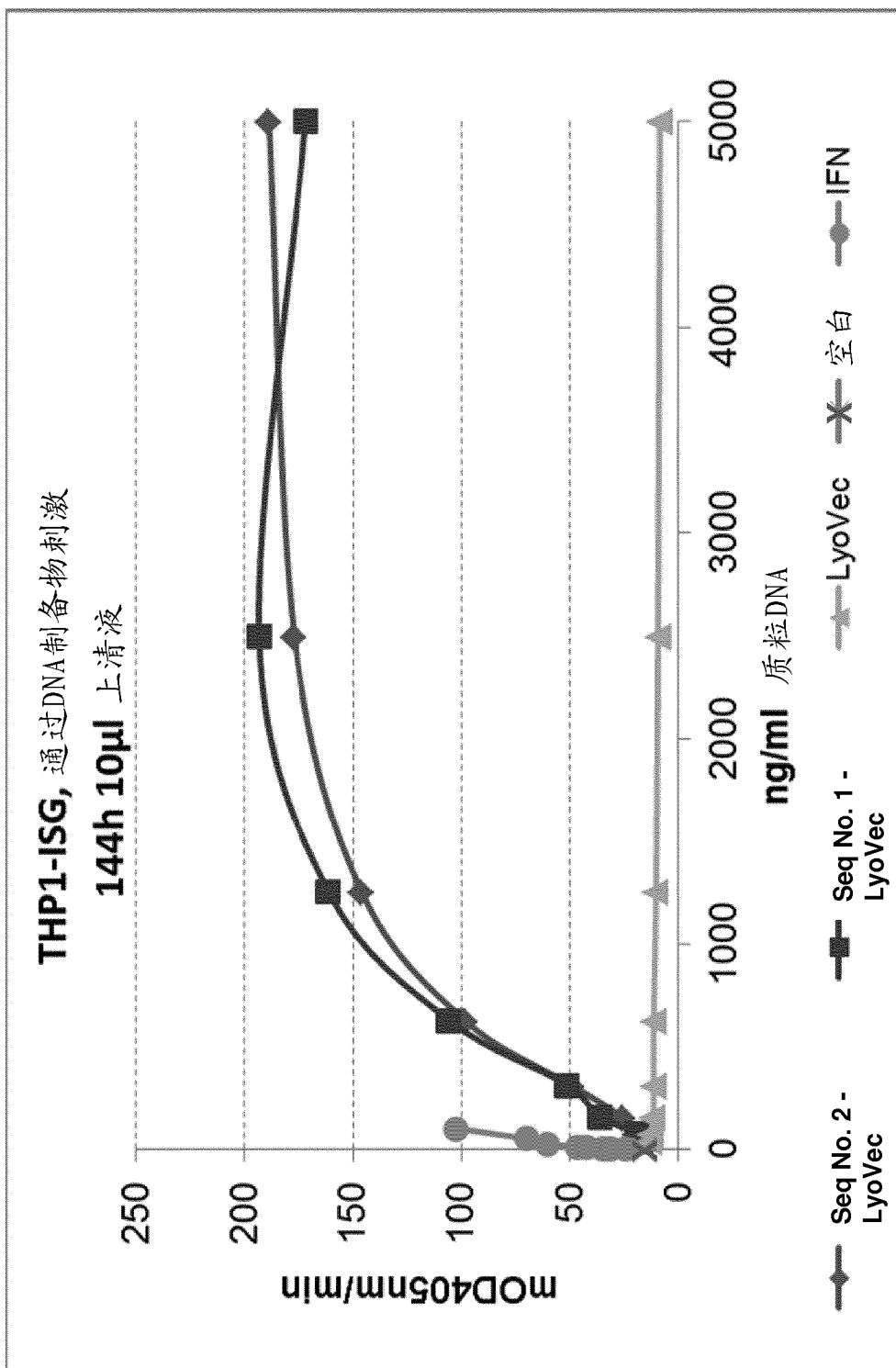


图 17

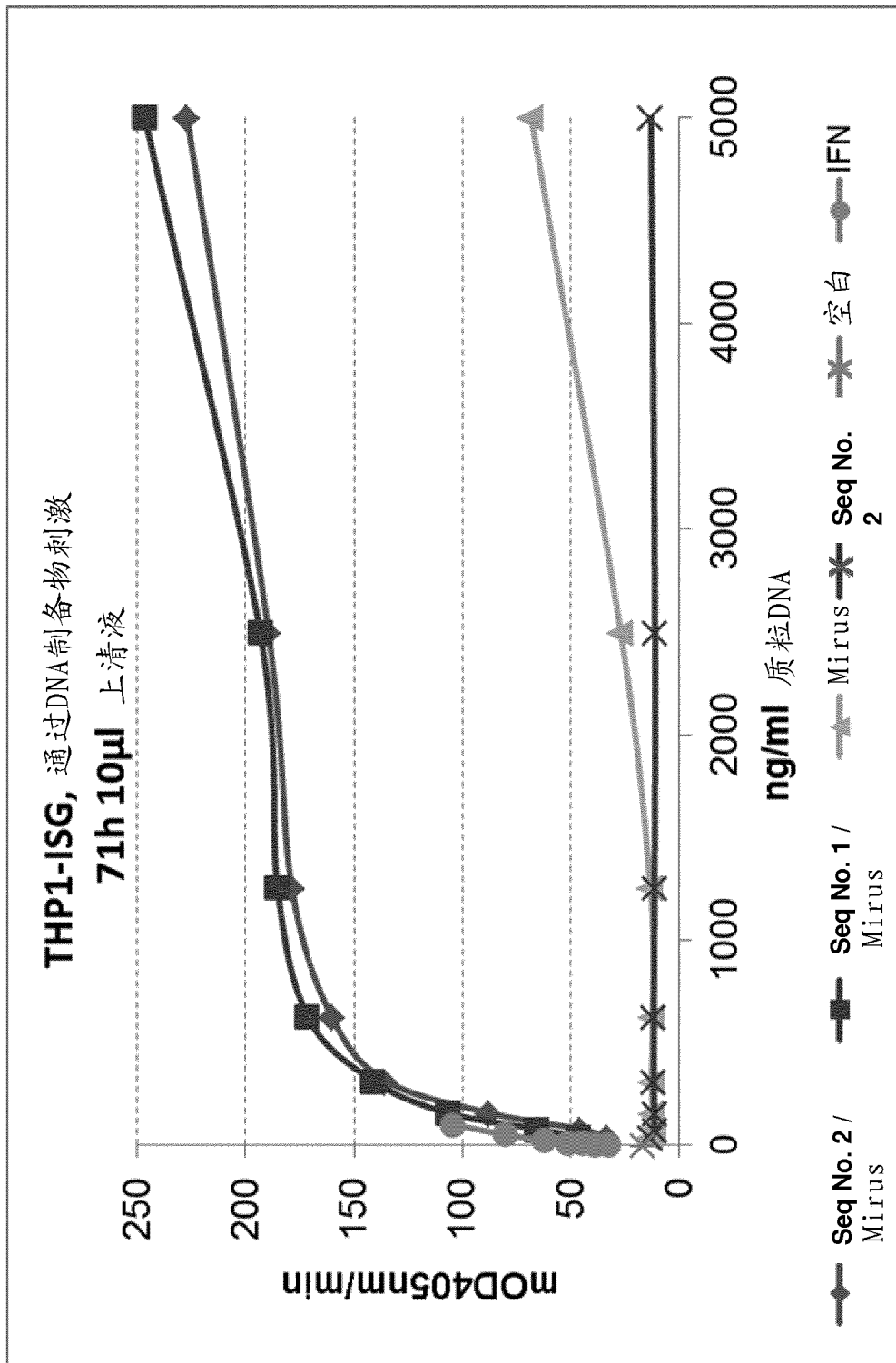


图 18

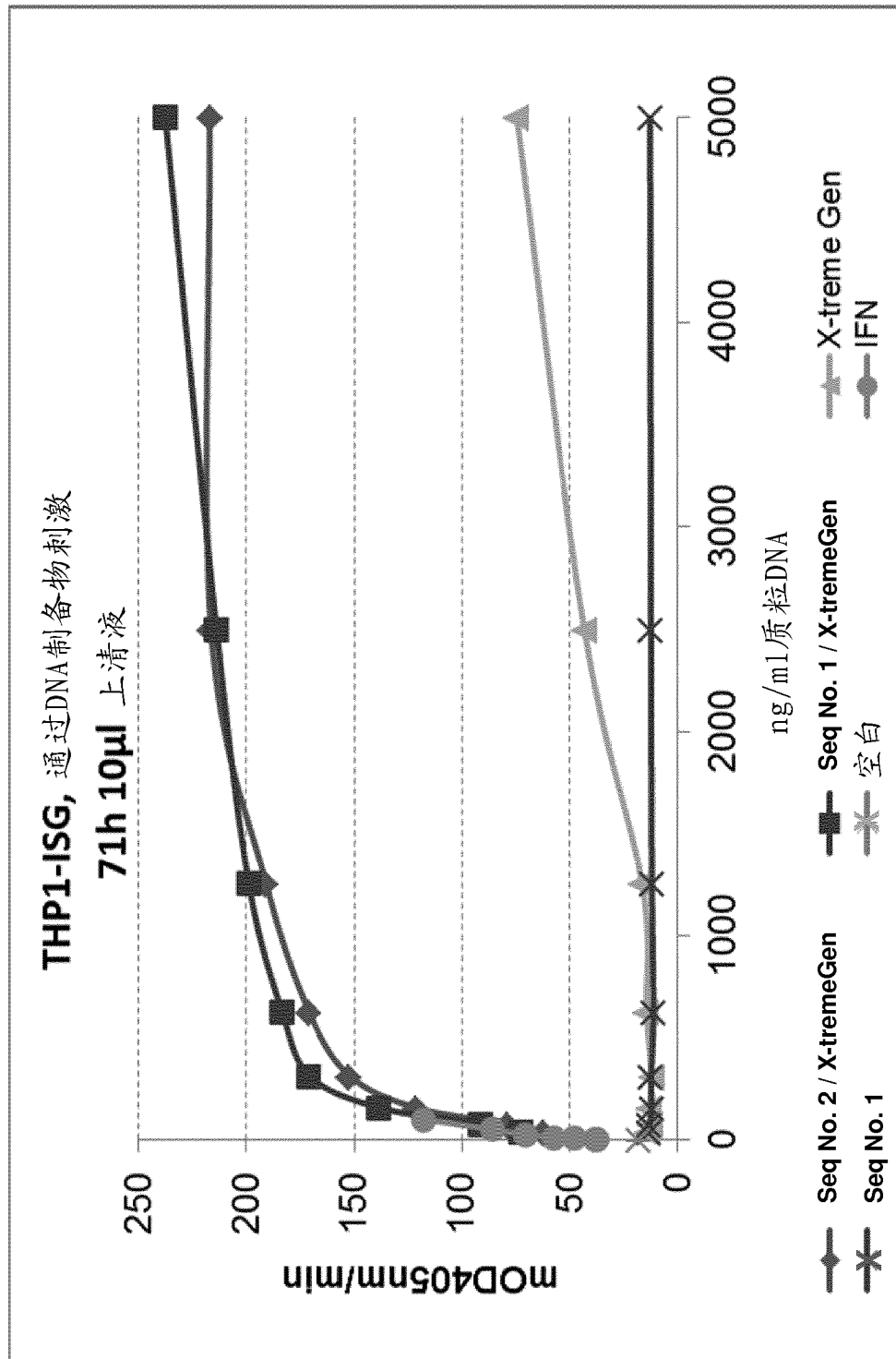


图 19

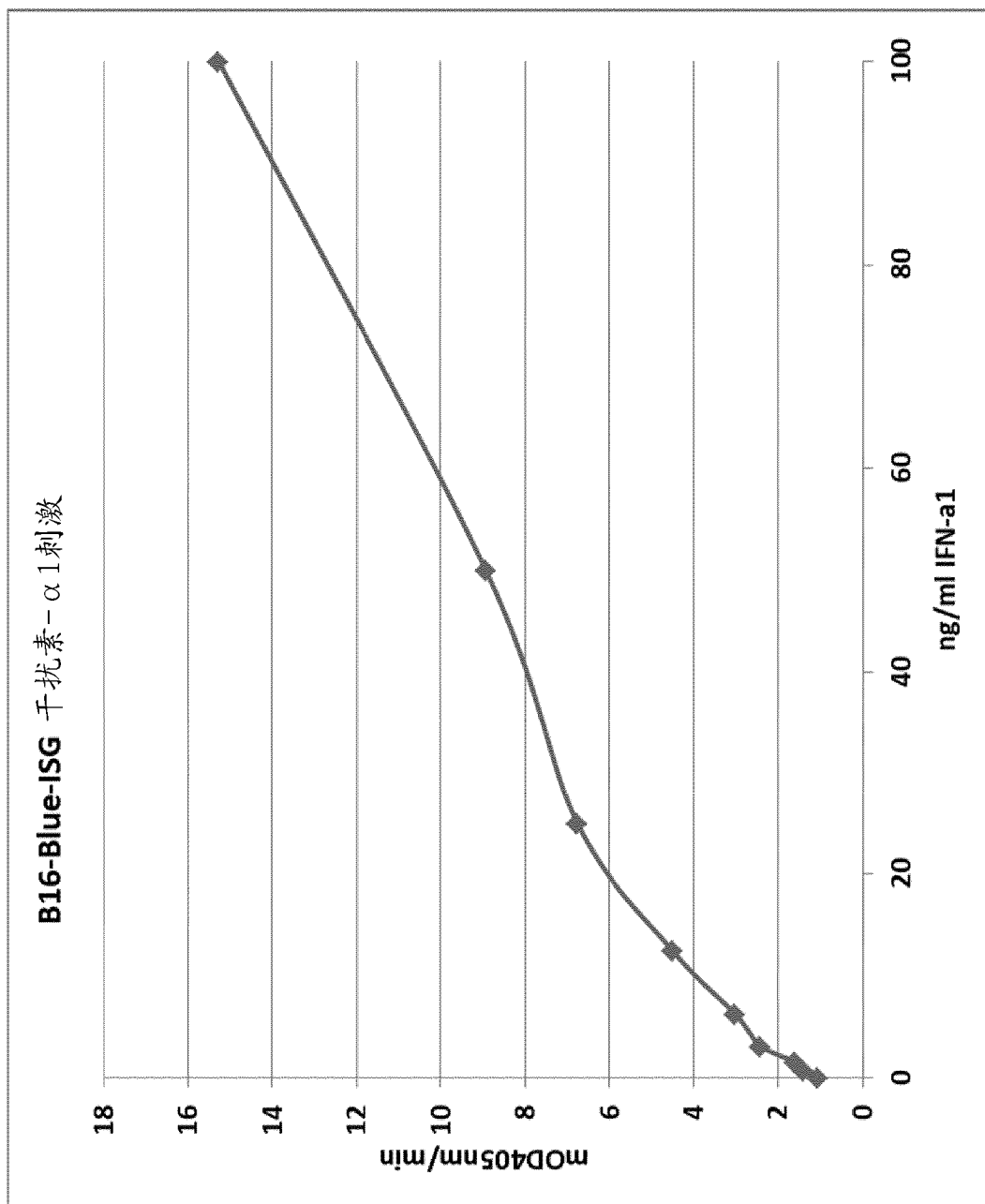


图 20

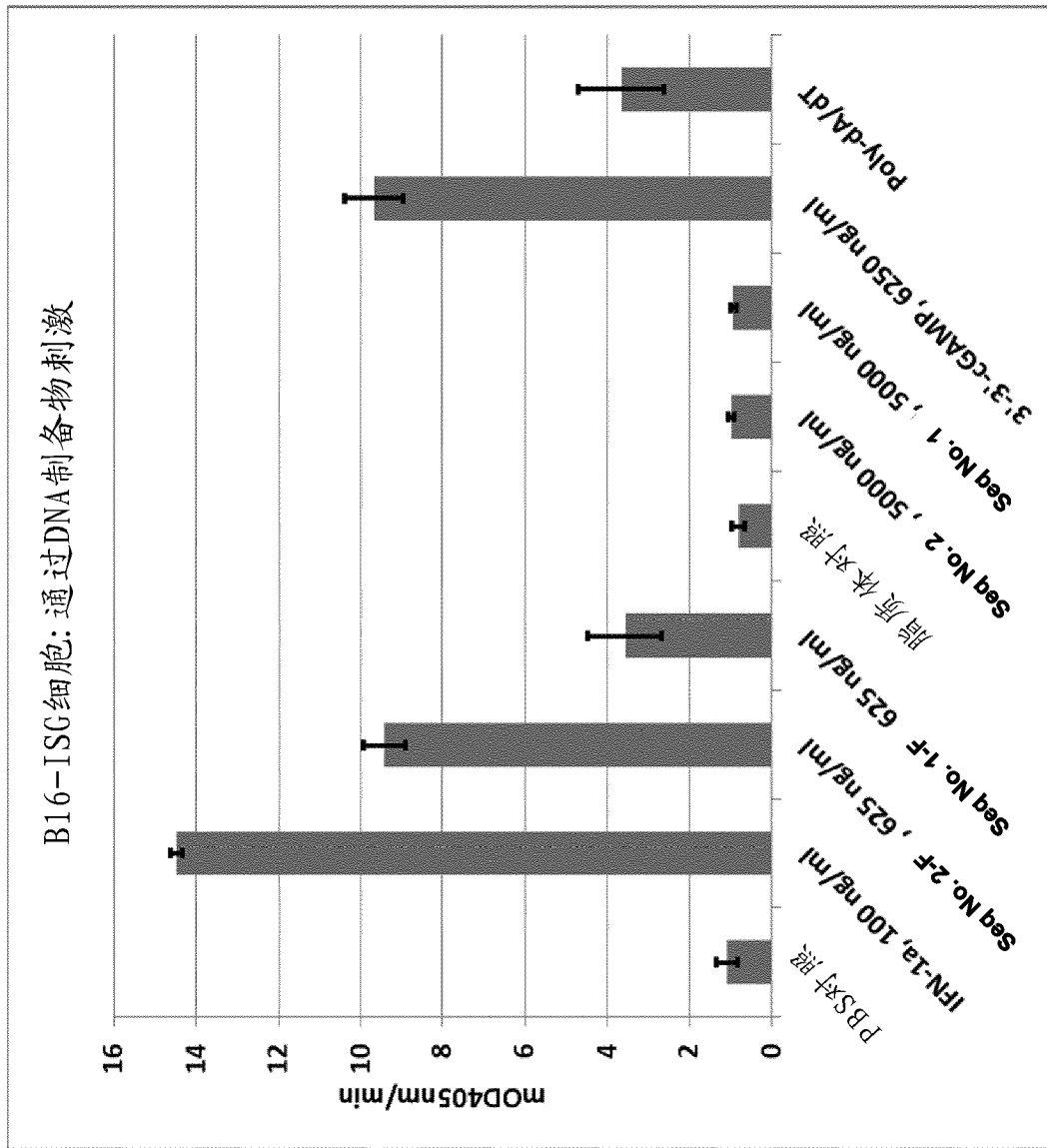


图 21

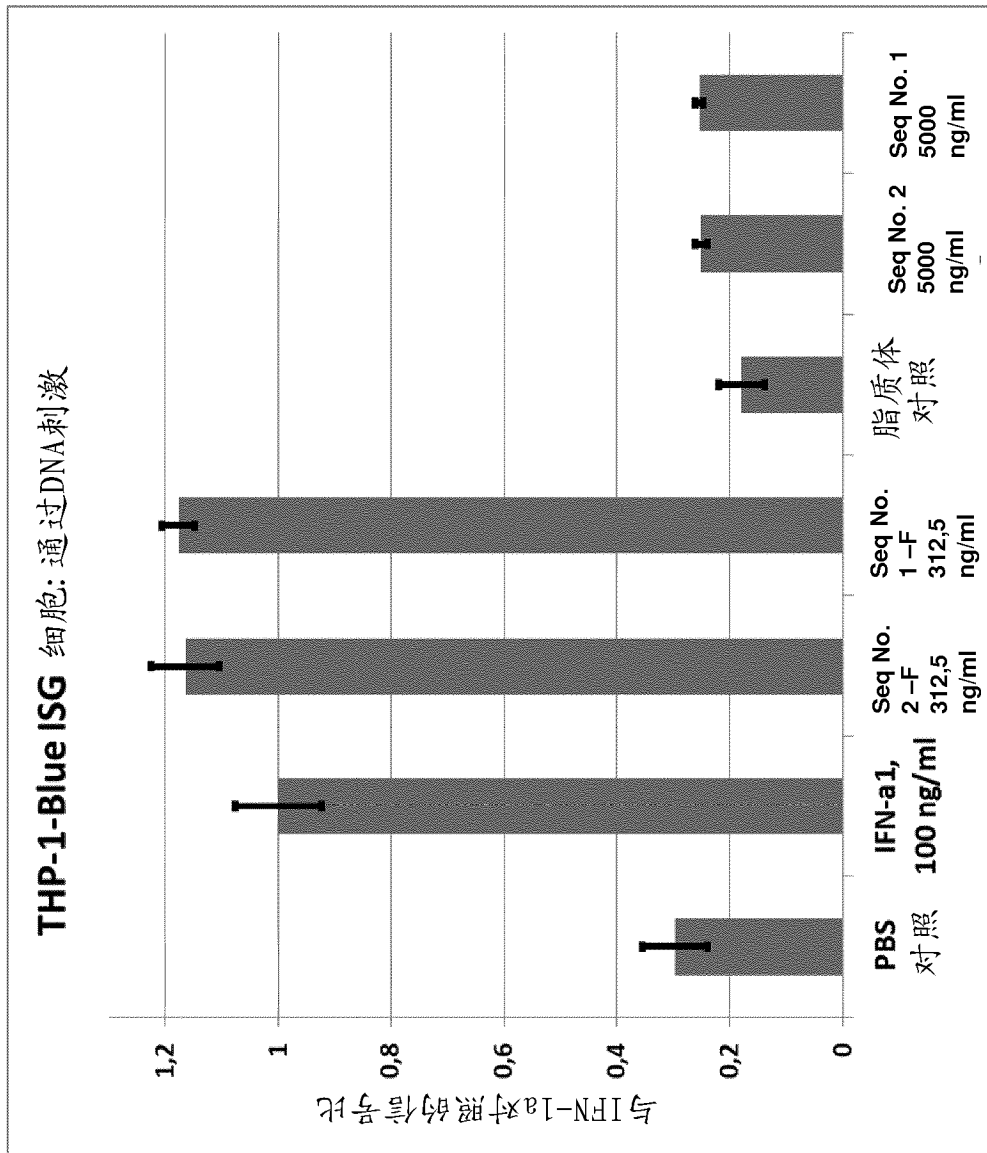


图 22

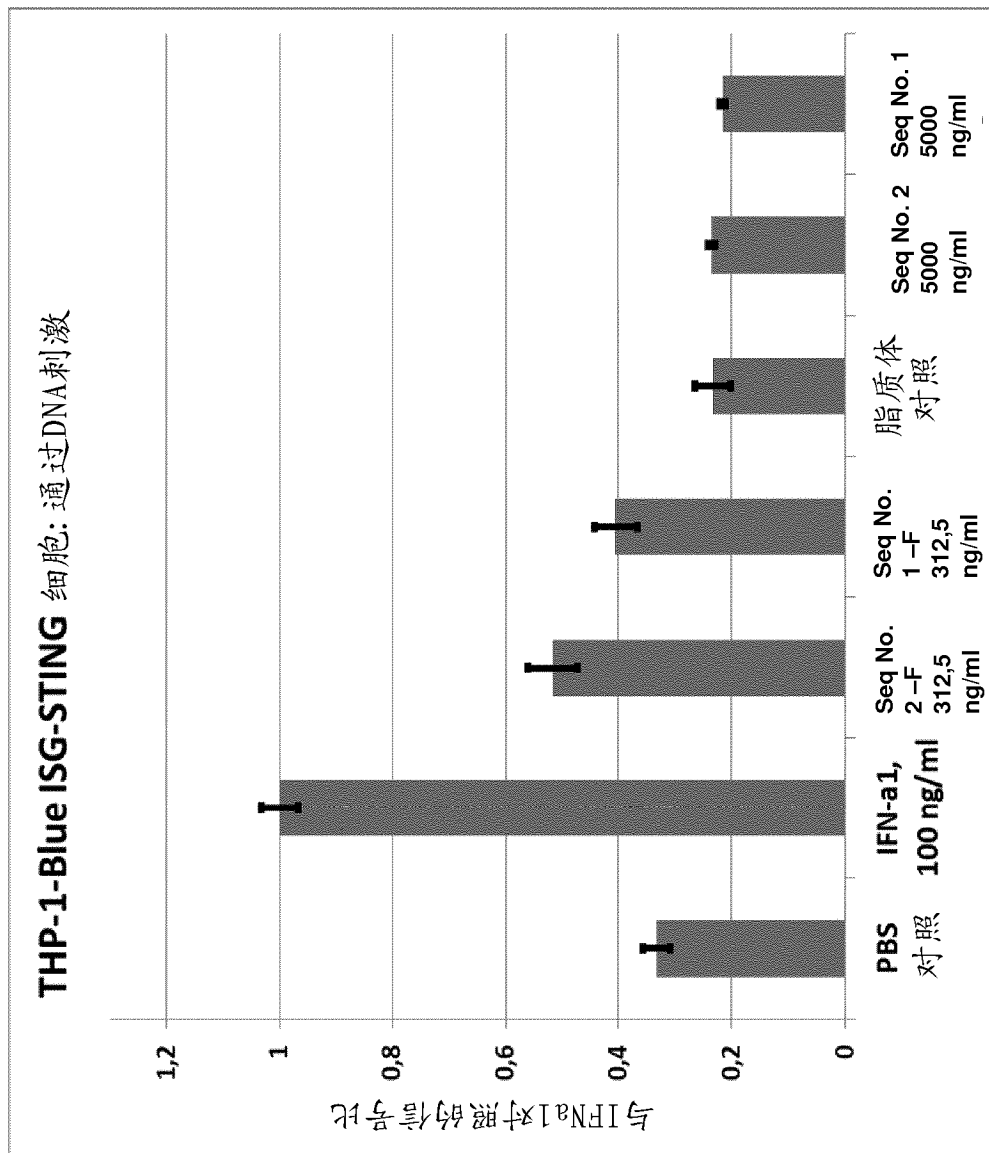


图 23

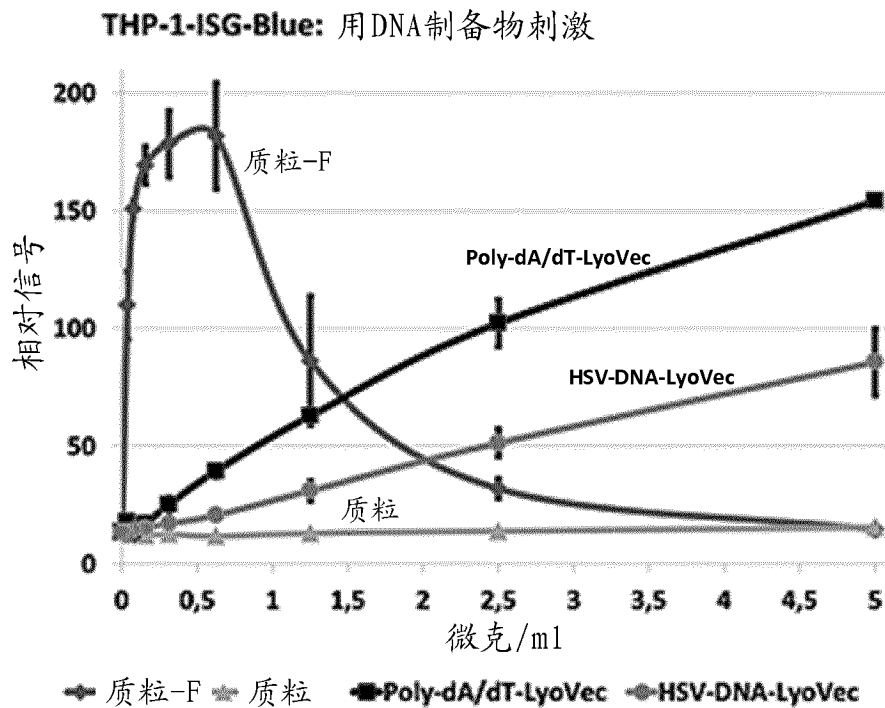


图 24A

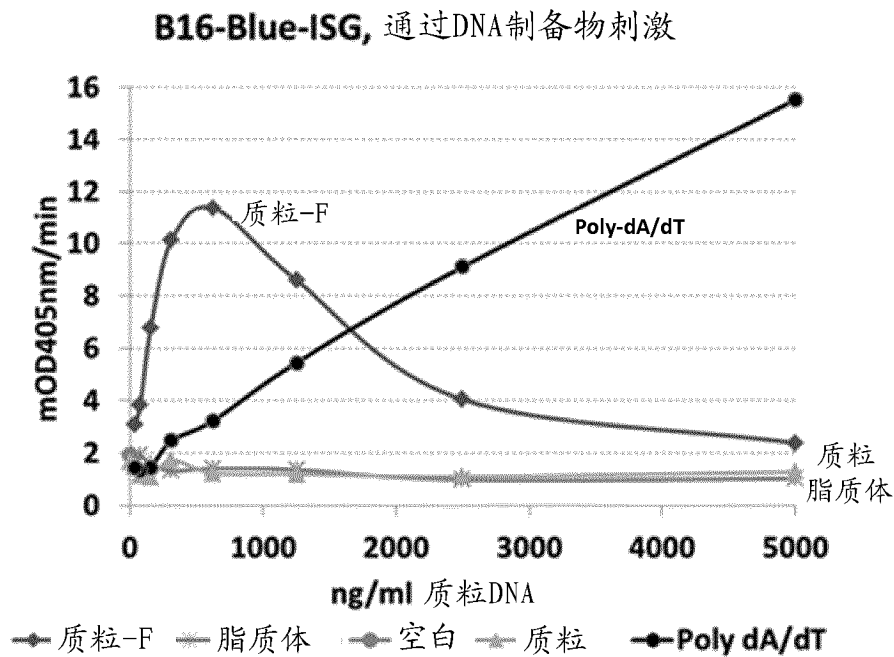


图 24B

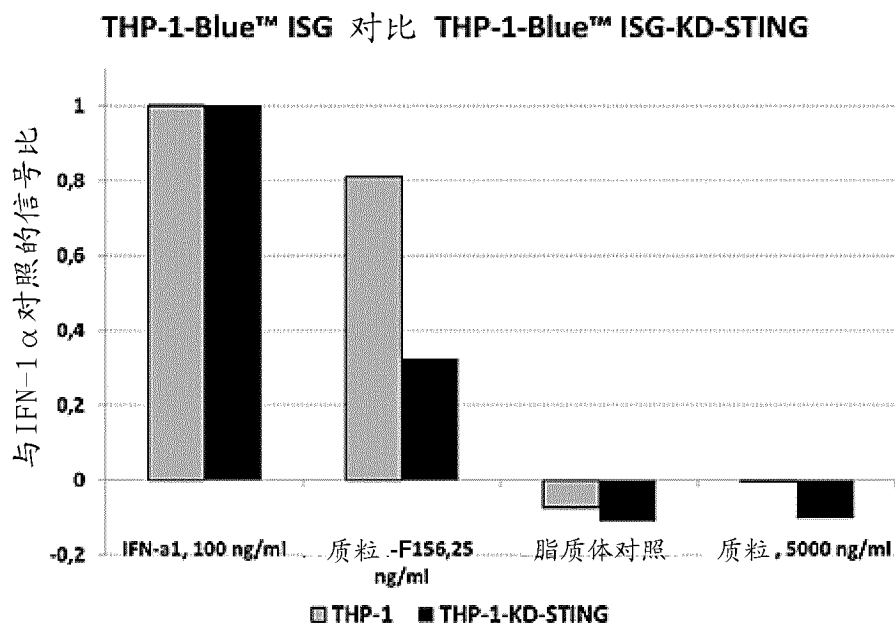


图 25A

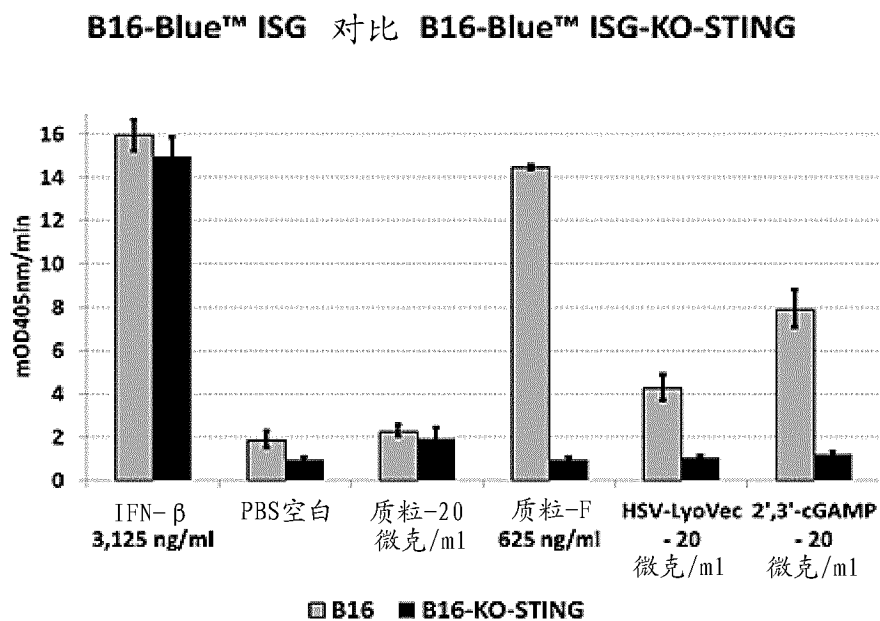


图 25B

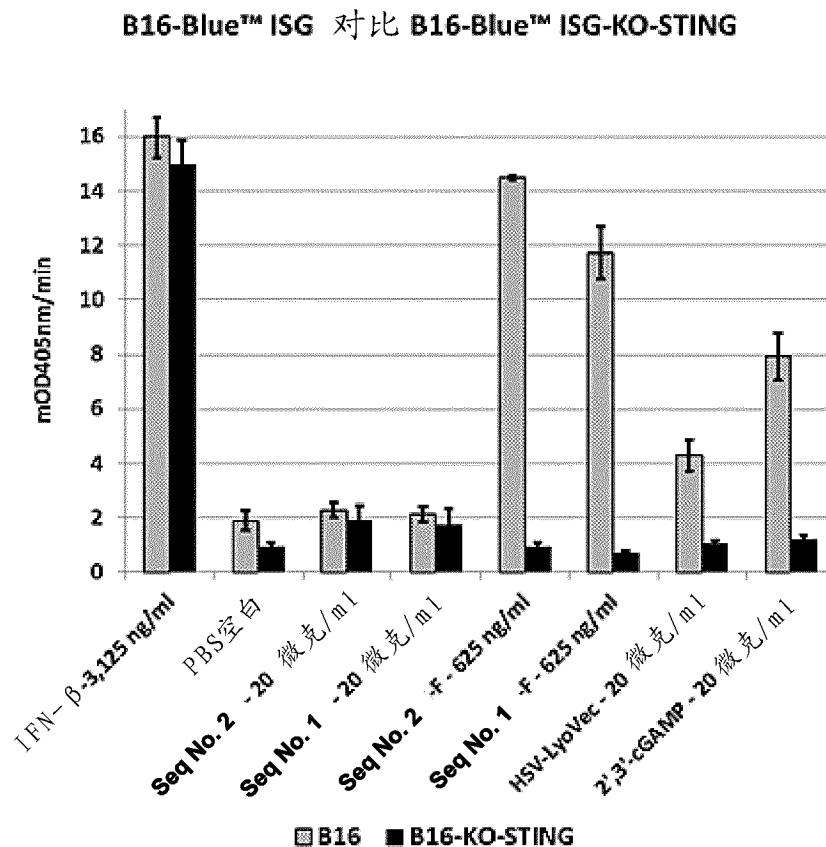


图 26

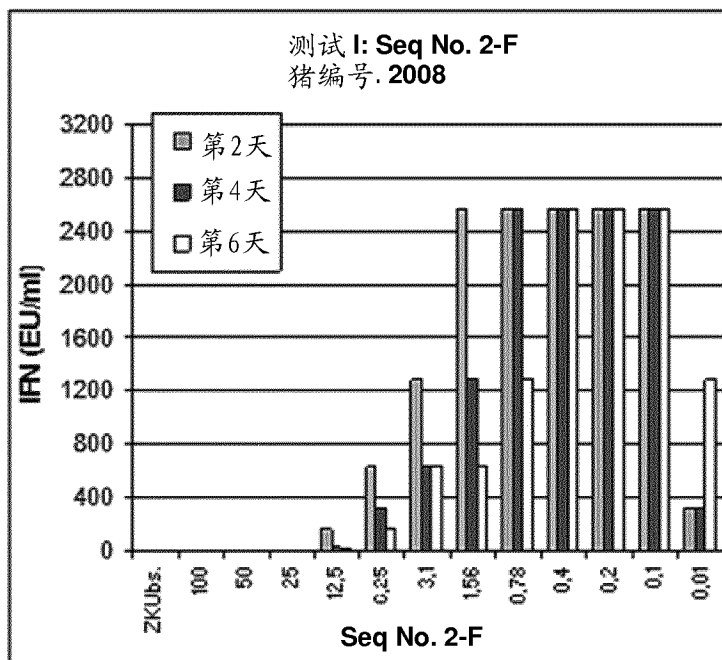


图 27A

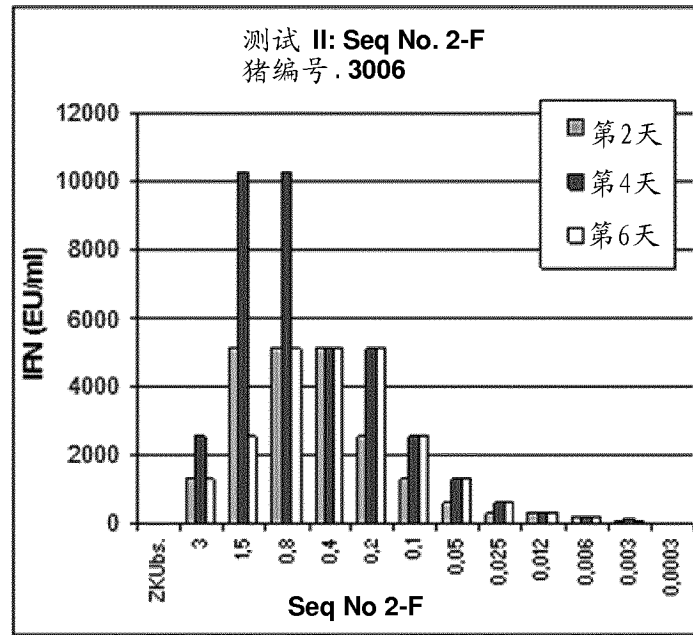


图 27B

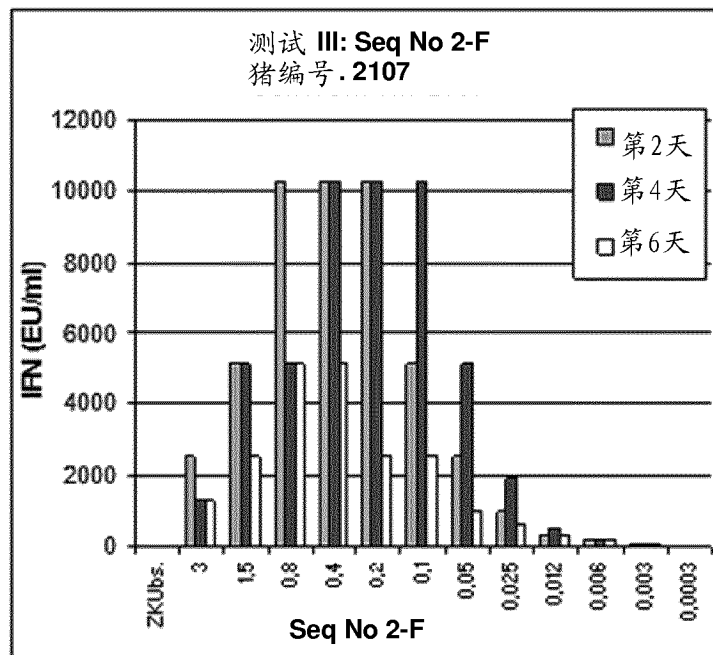


图 27C

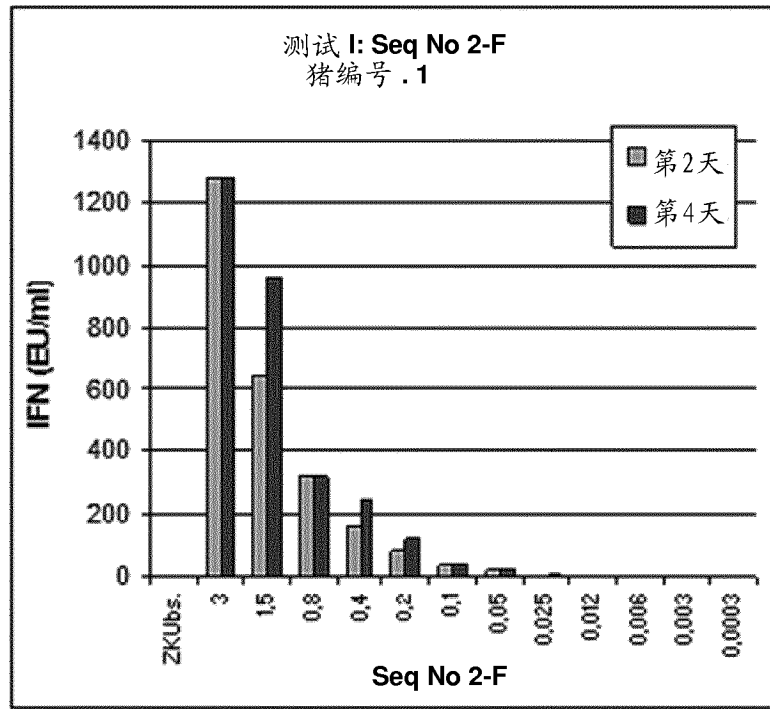


图 28A

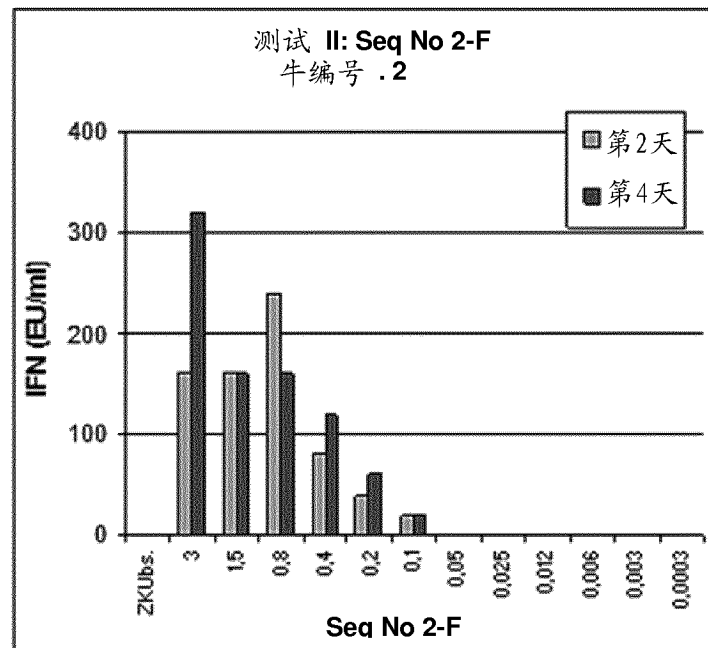


图 28B

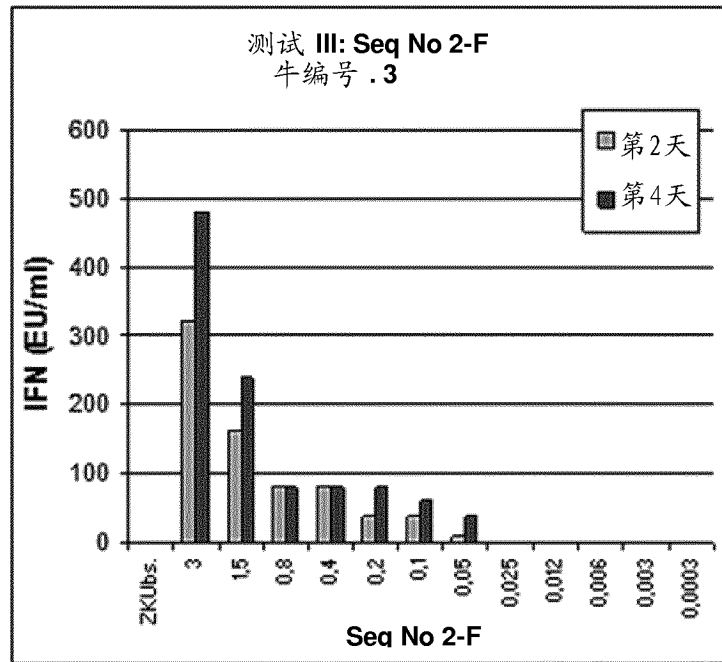


图 28C

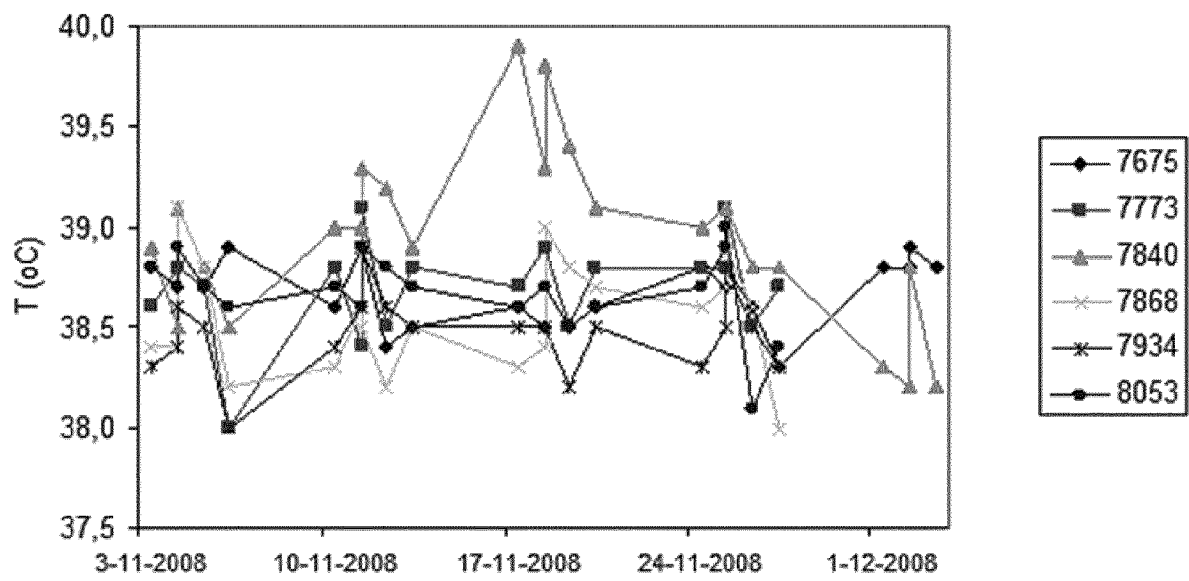


图 29

重量(平均值+std)

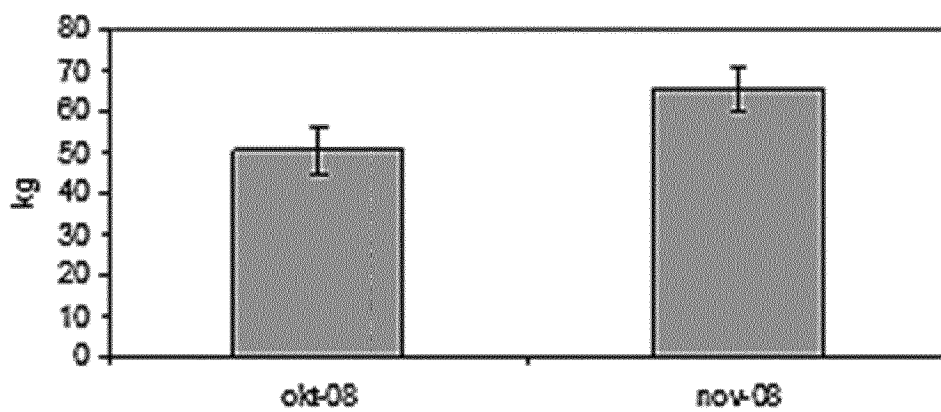


图 30A

重量

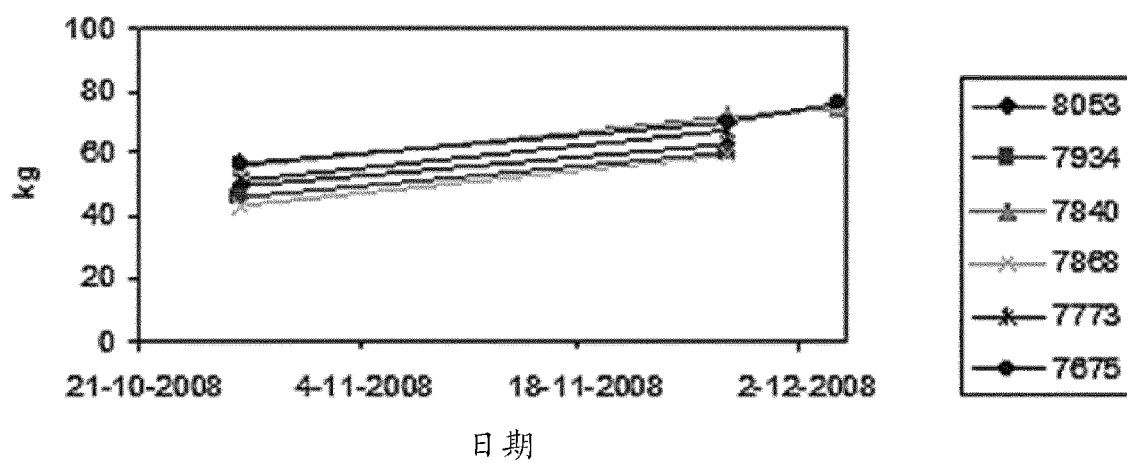


图 30B

白血细胞

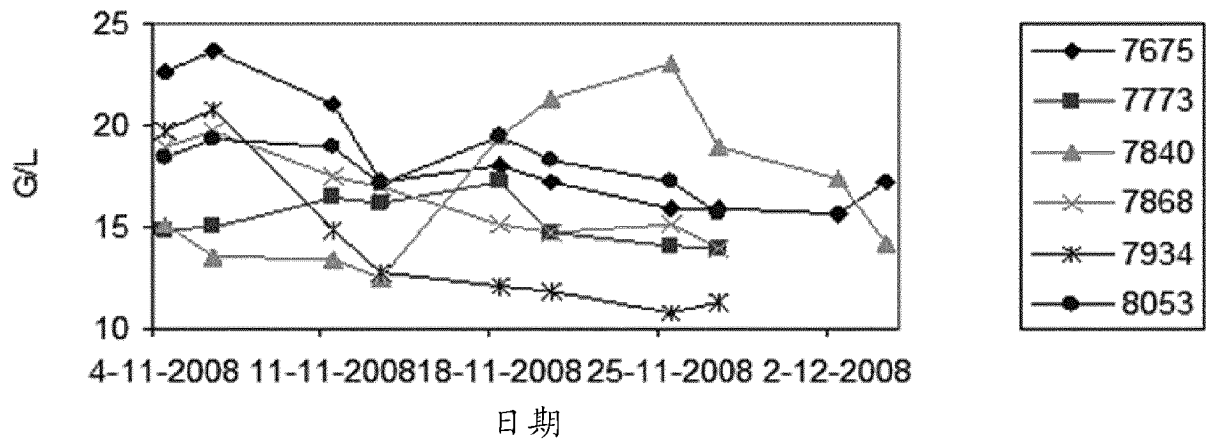


图 31A

白血细胞

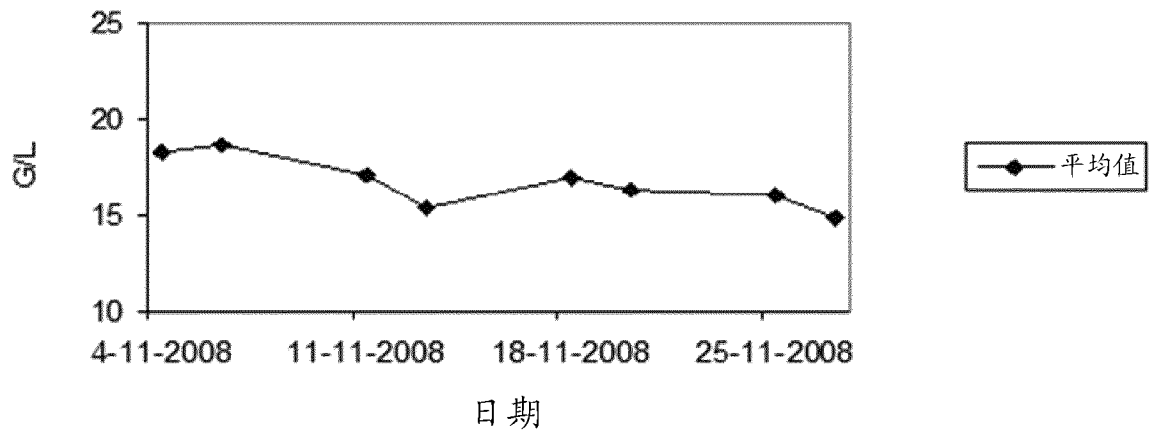


图 31B

红血细胞

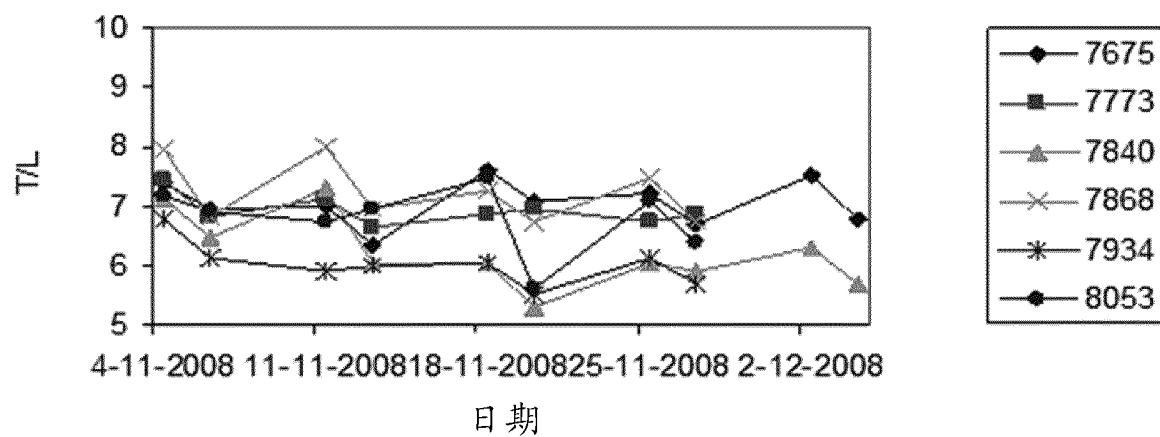


图 31C

红血细胞

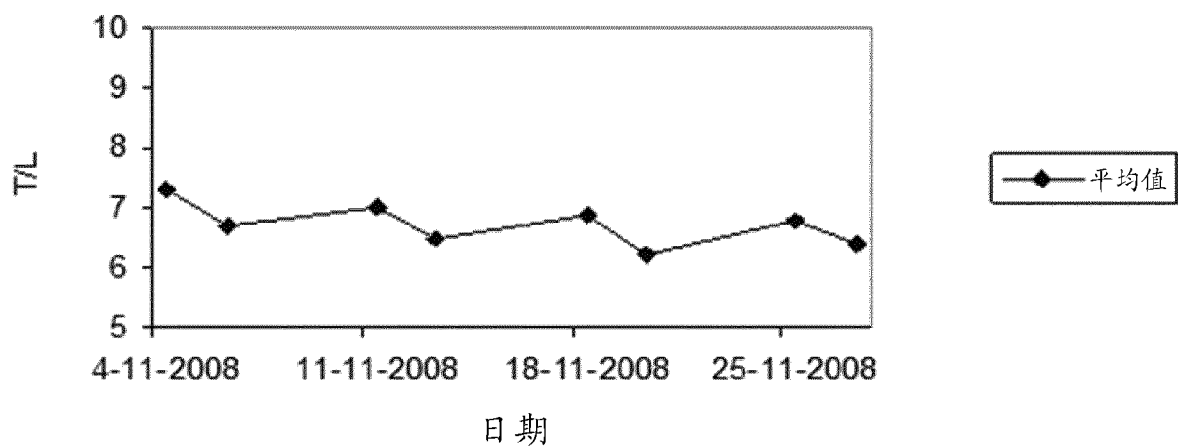


图 31D

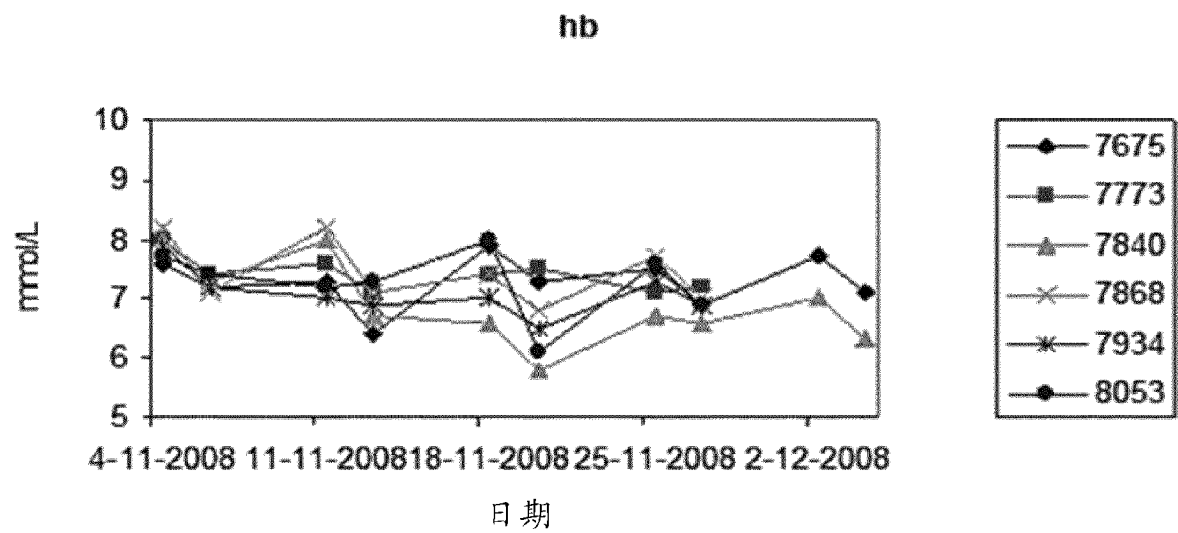


图 31E

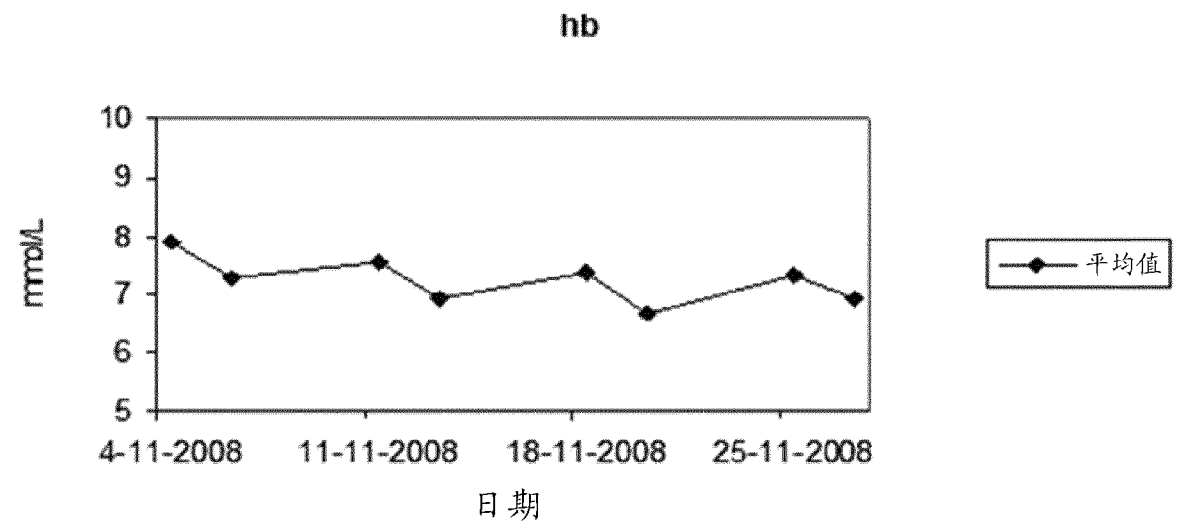


图 31F

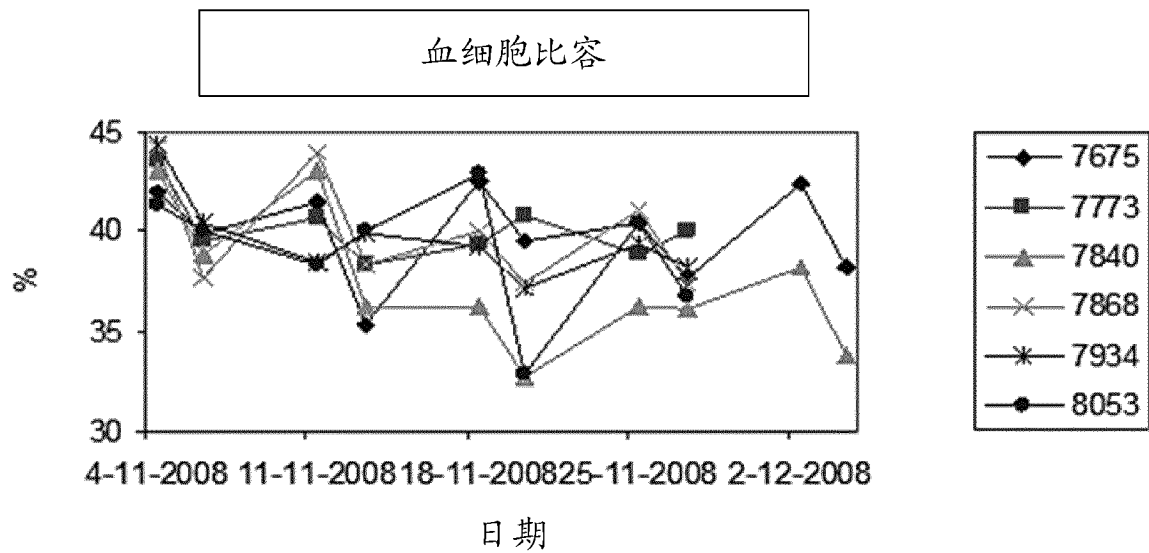


图 32A

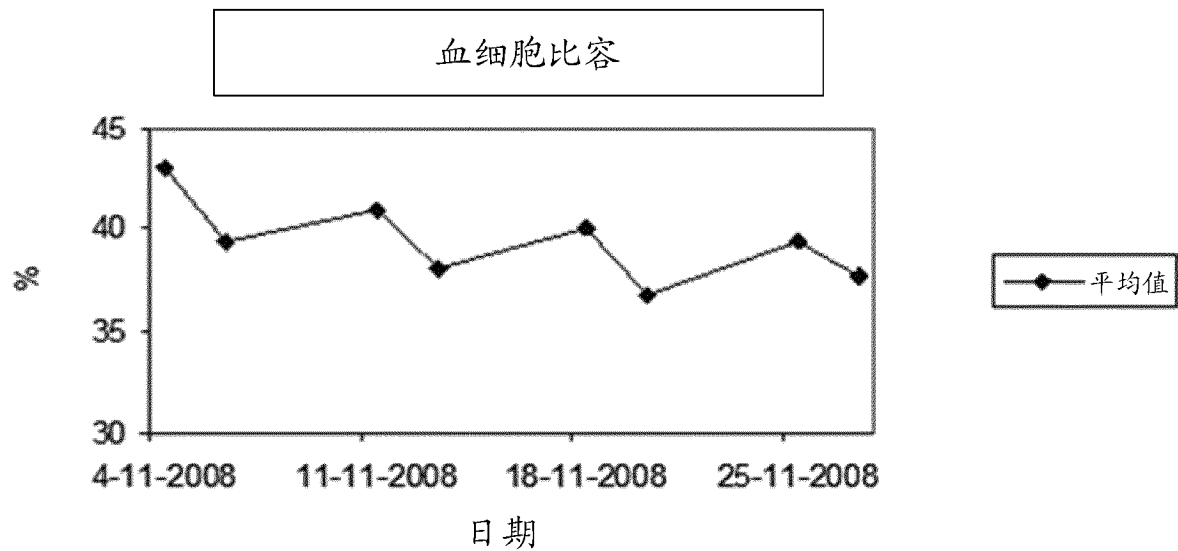


图 32B

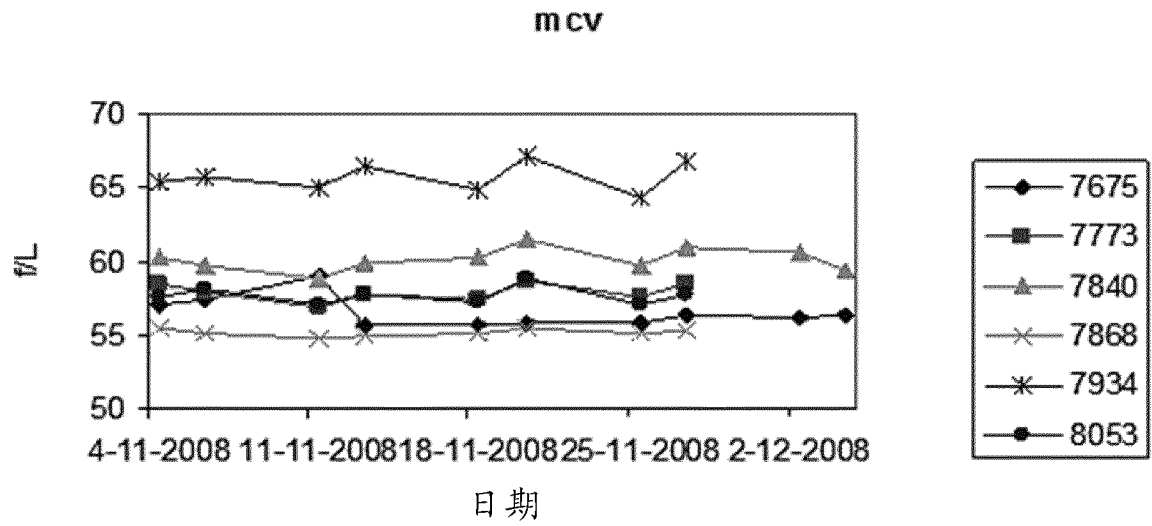


图 32C

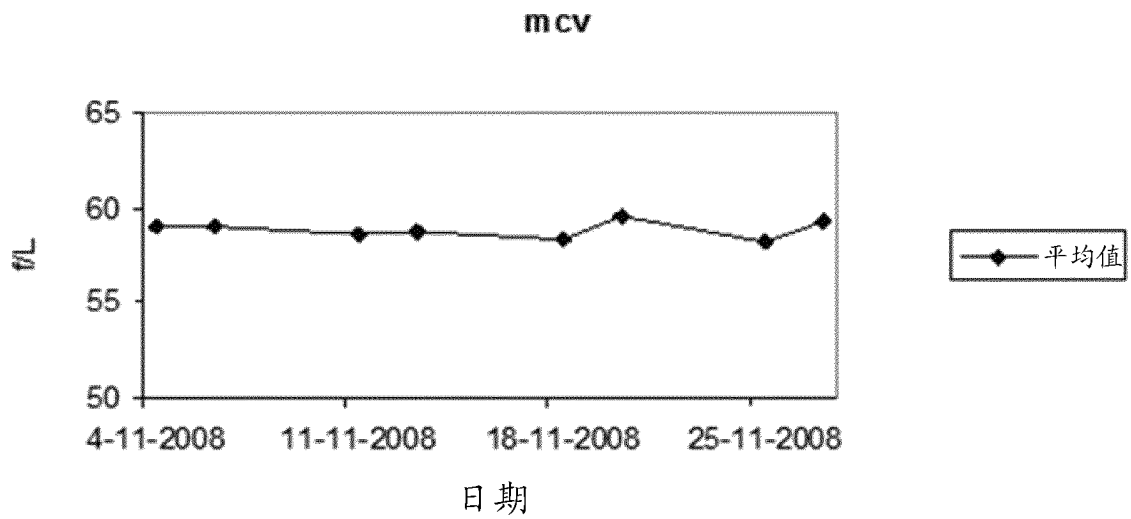


图 32D

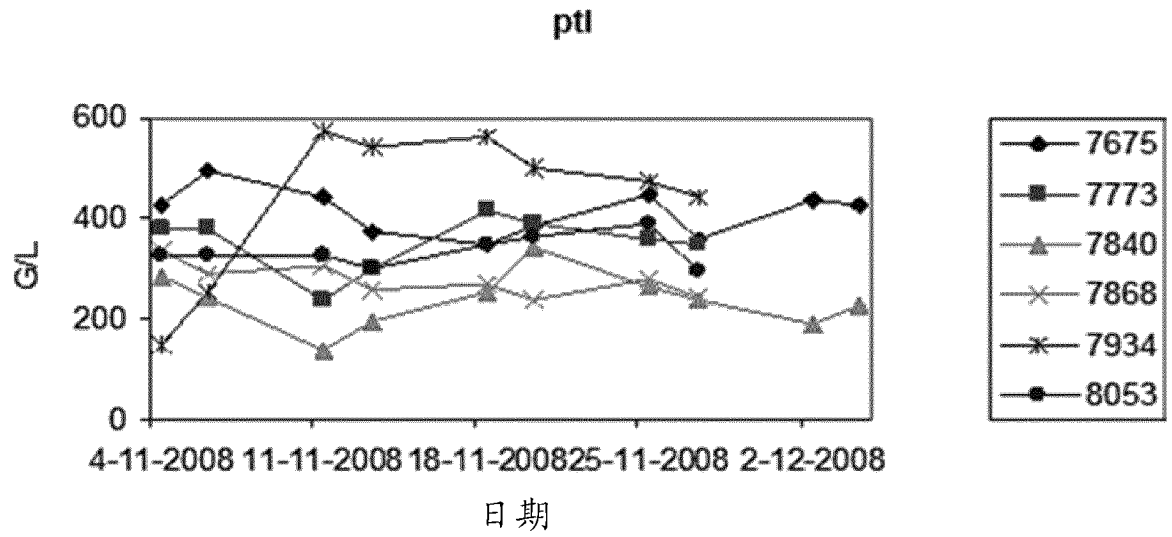


图 32E

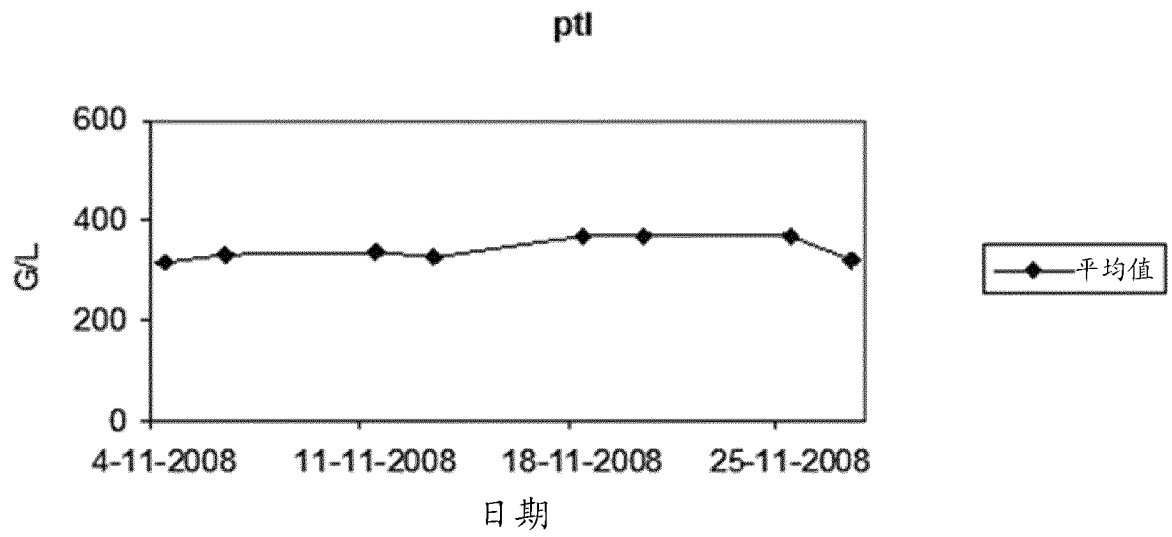


图 32F

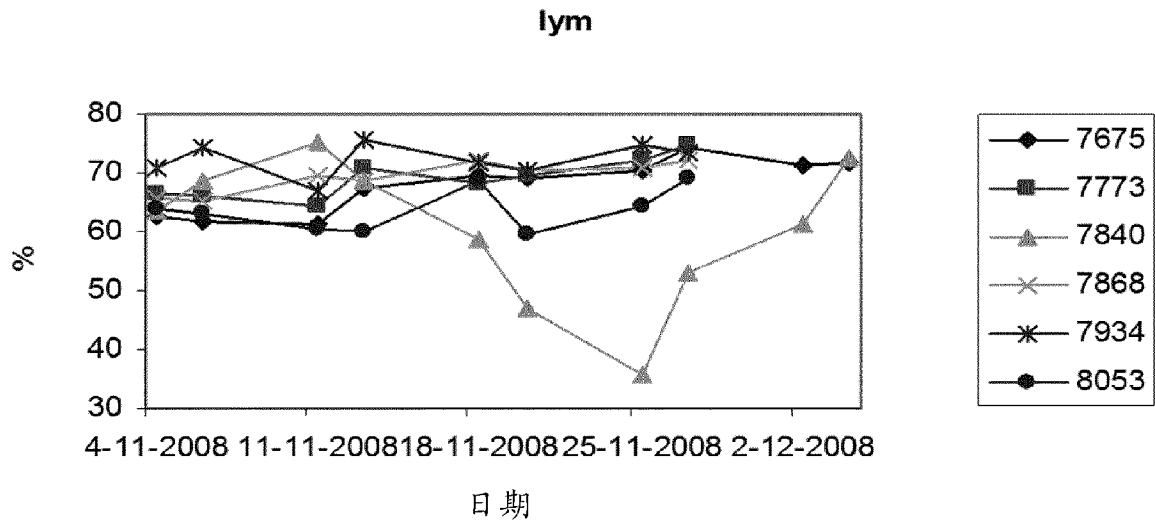


图 33A

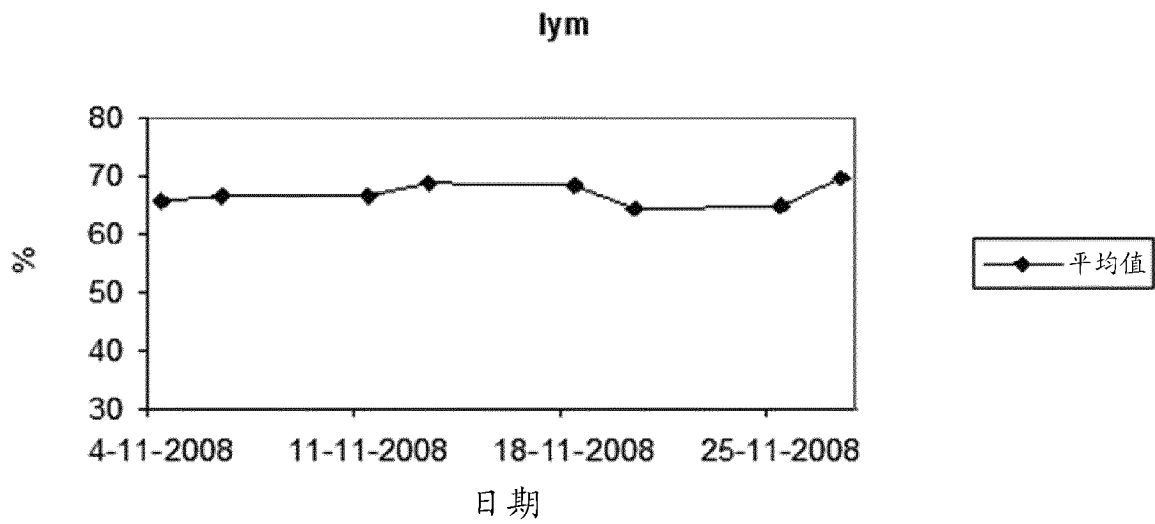
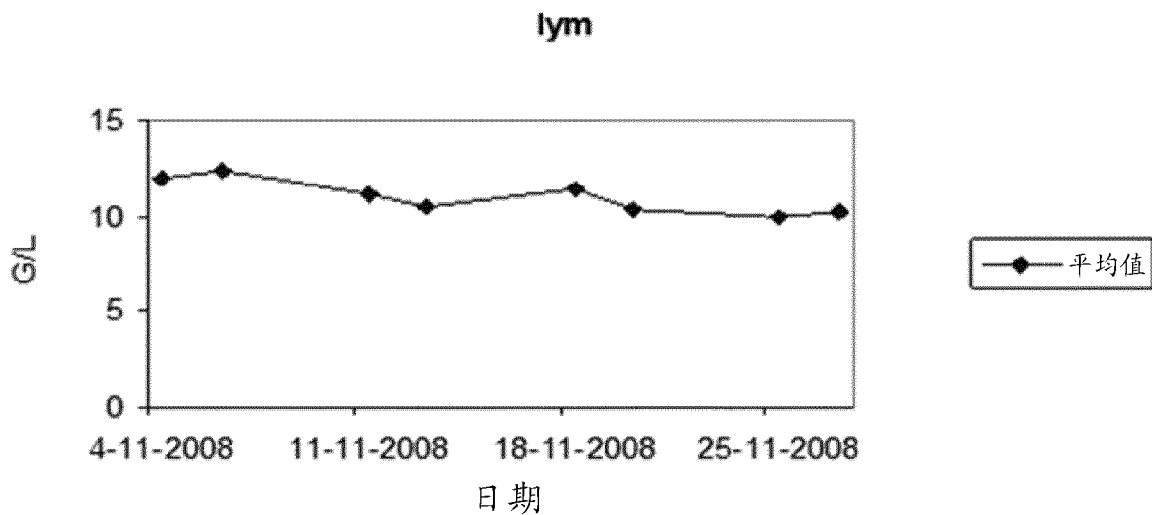
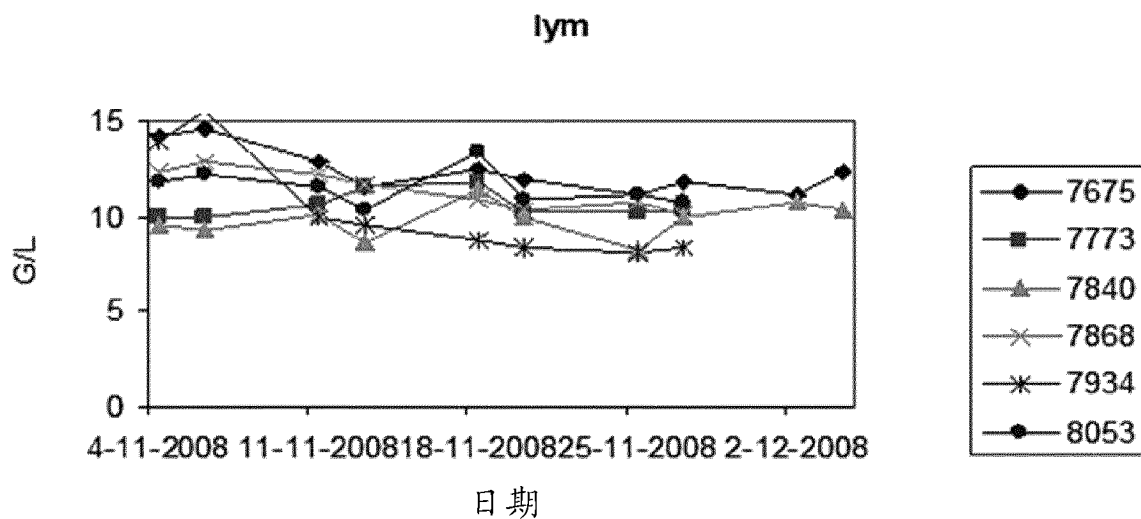


图 33B



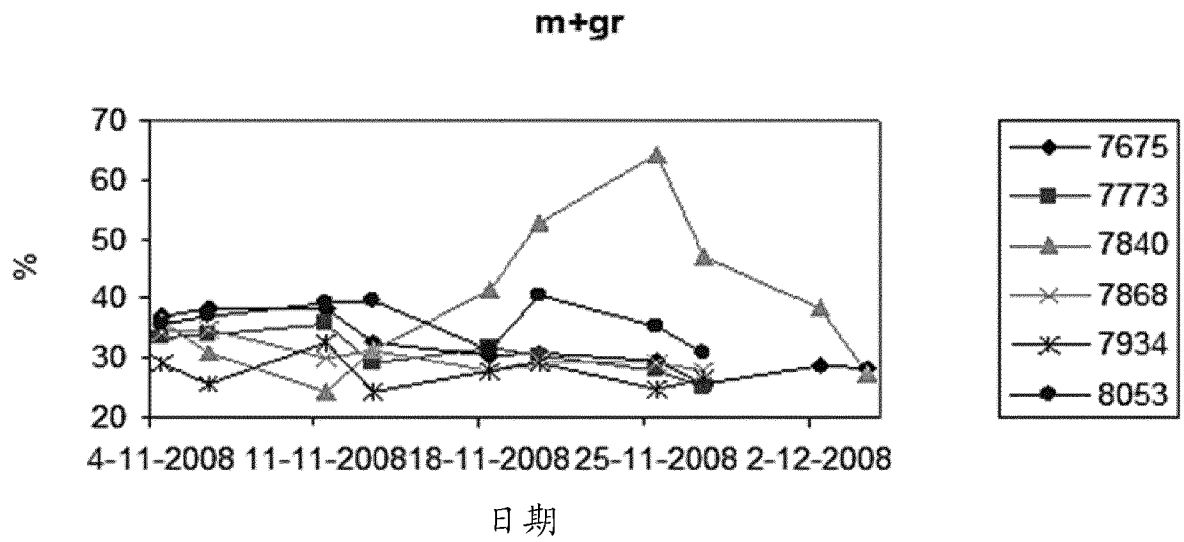


图 33E

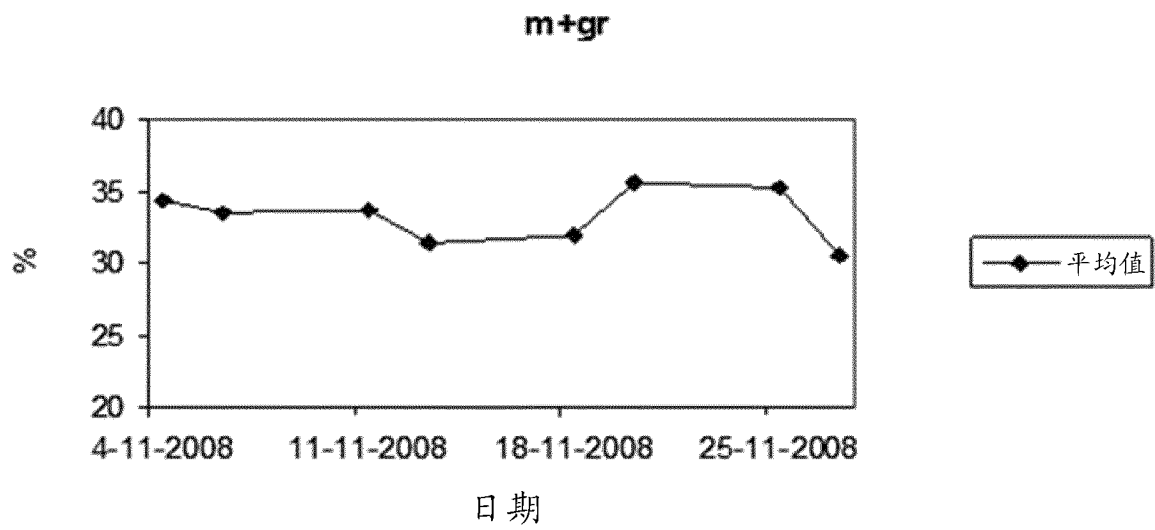


图 33F

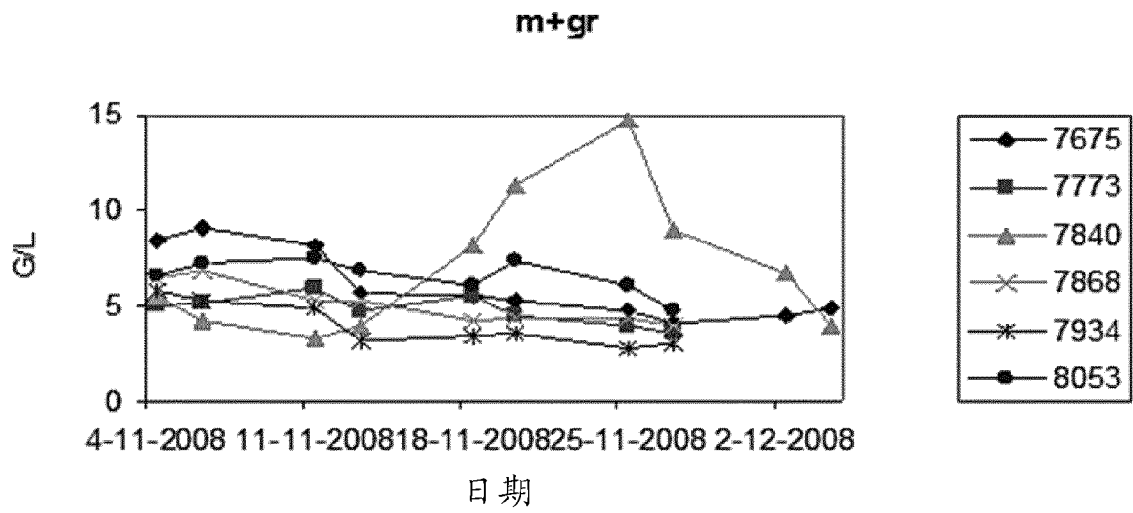


图 33G

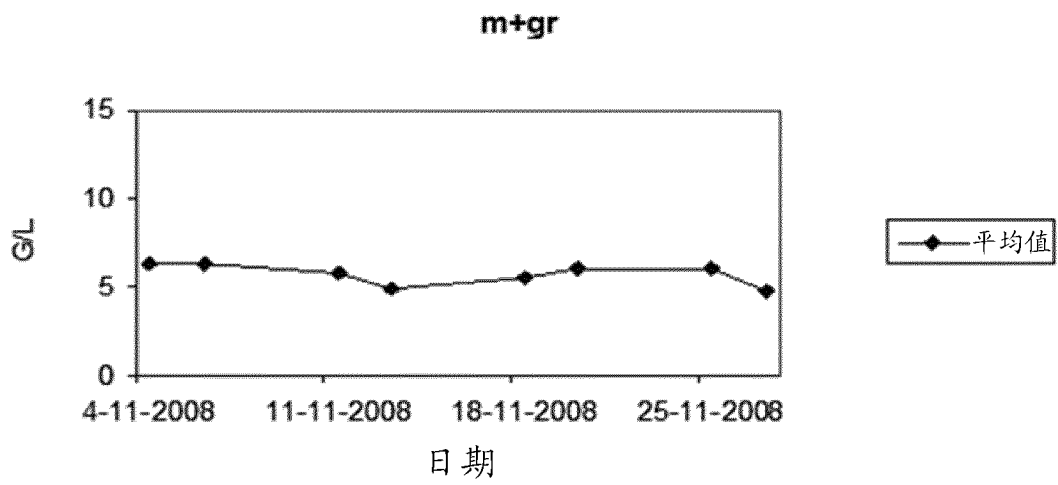


图 33H

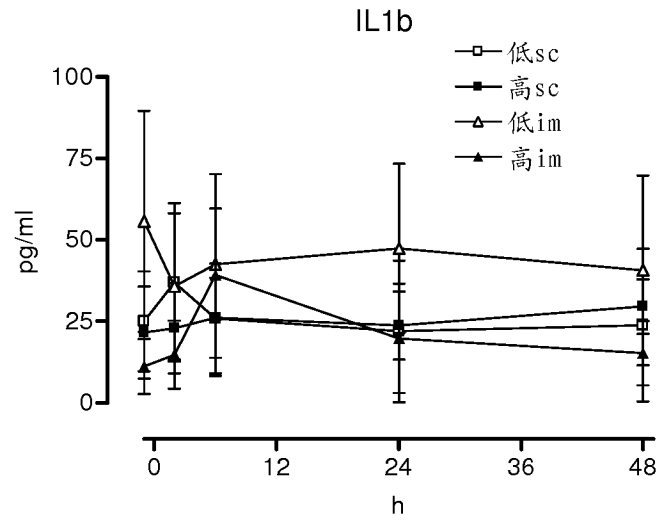


图 34A

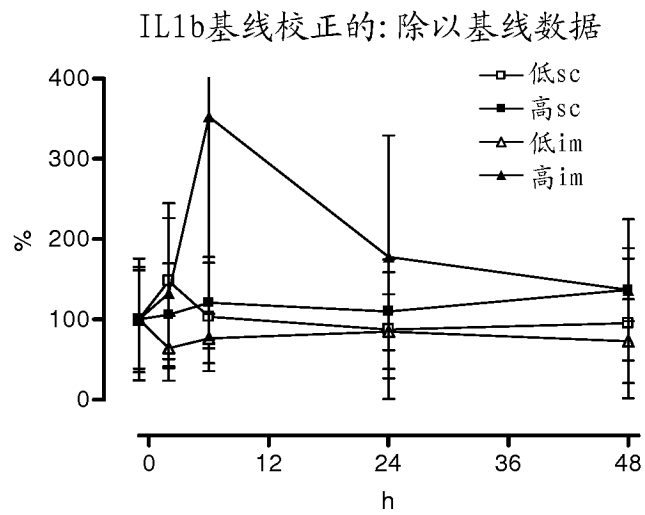


图 34B

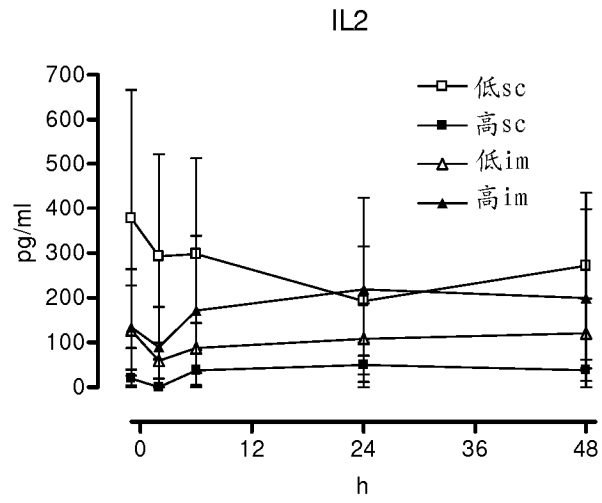


图 34C

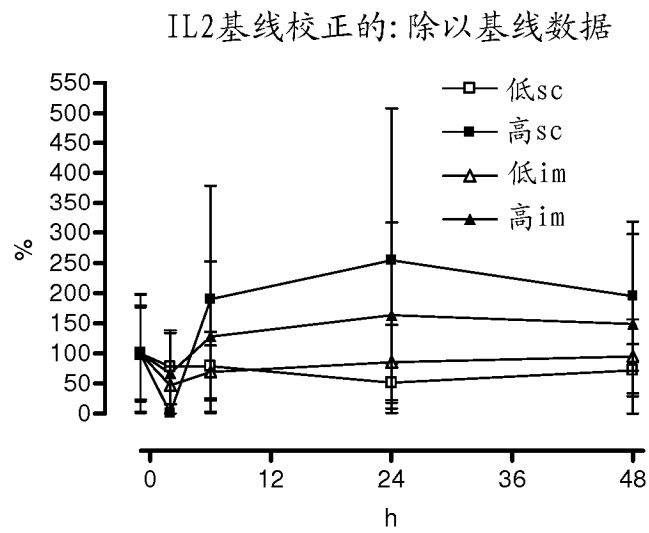


图 34D

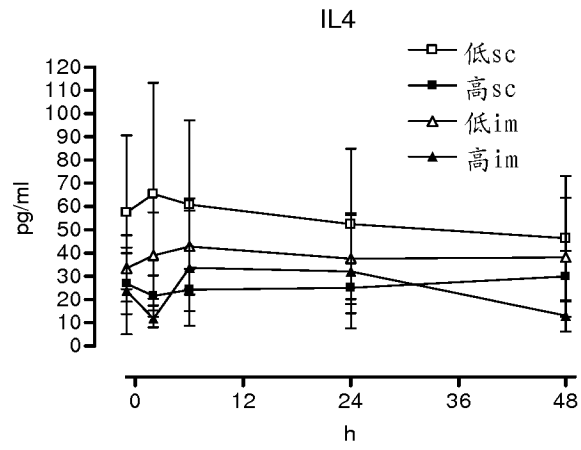


图 35A

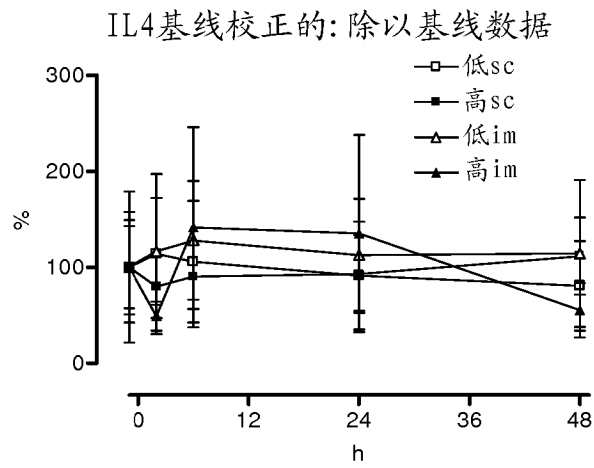


图 35B

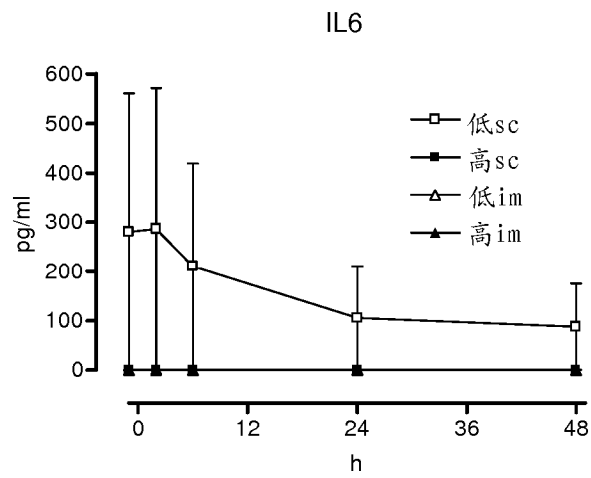


图 35C

IL6基线校正的: 除以基线数据

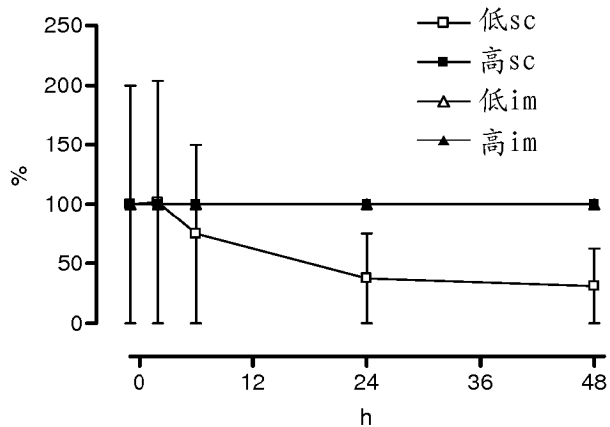


图 35D

IL8

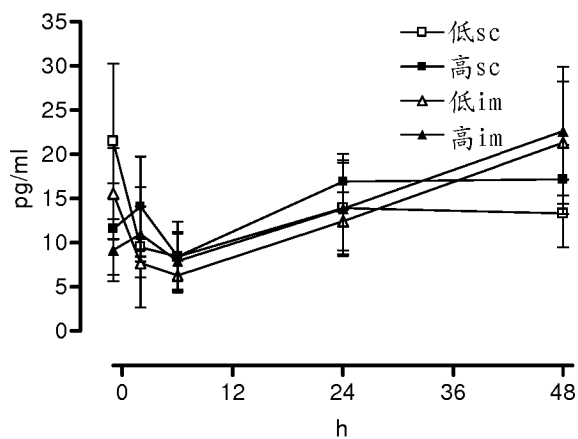


图 36A

IL8基线校正的: 除以基线数据

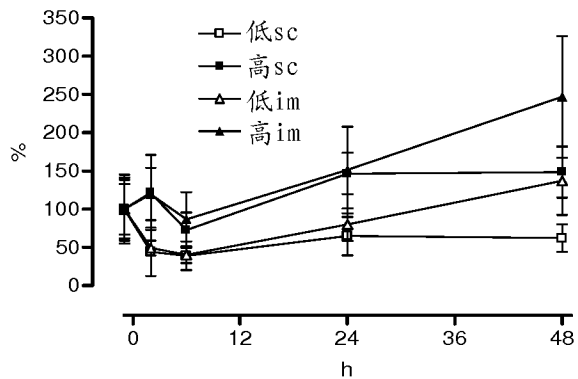


图 36B

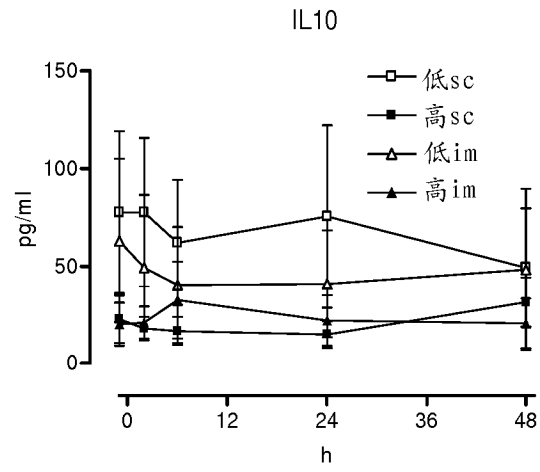


图 36C

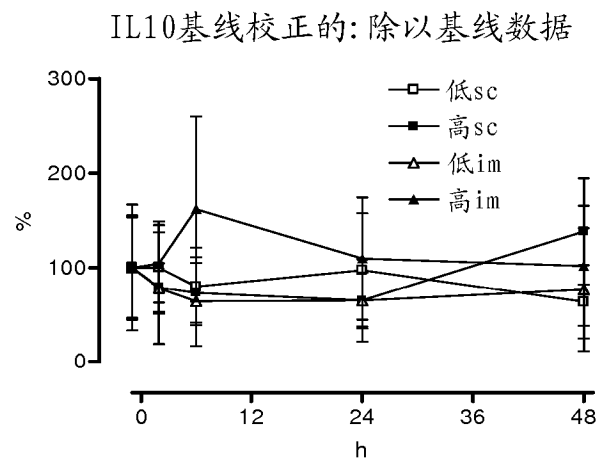


图 36D

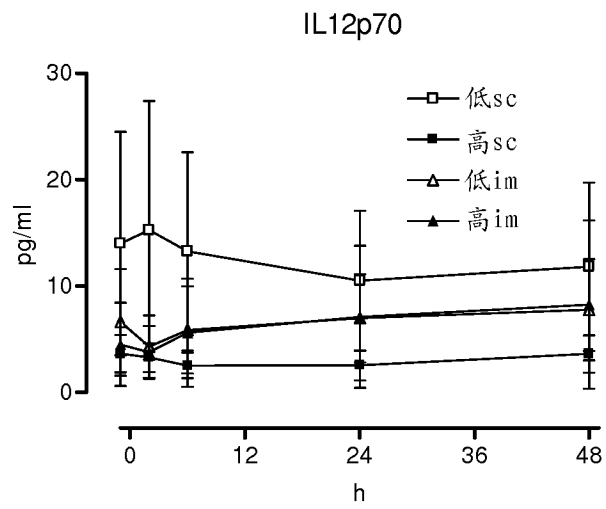


图 37A

IL12p70基线校正的: 除以基线数据

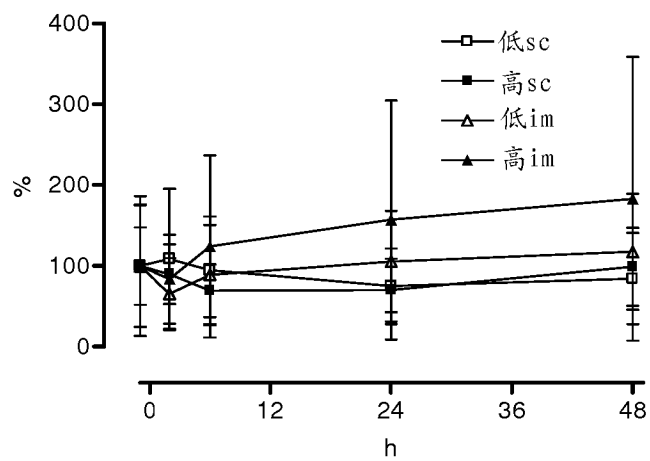


图 37B

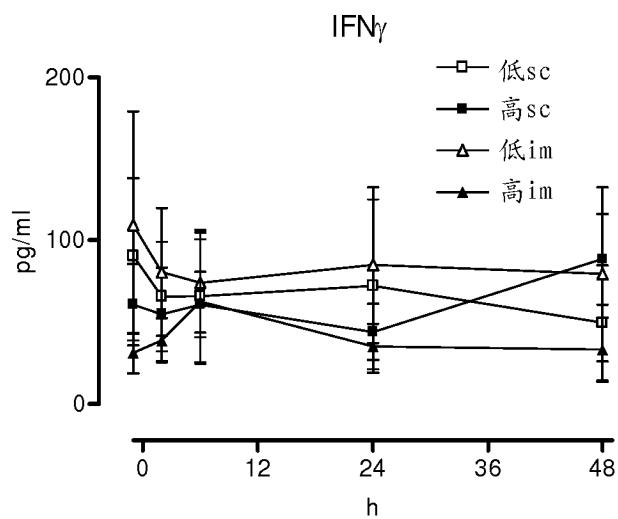


图 37C

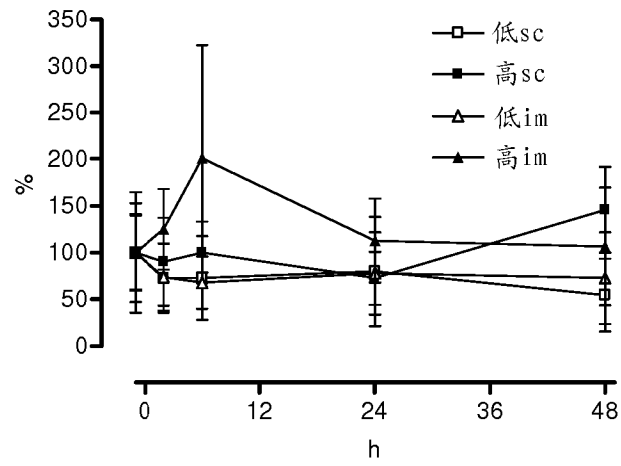
IFN γ 基线校正的: 除以基线数据

图 37D

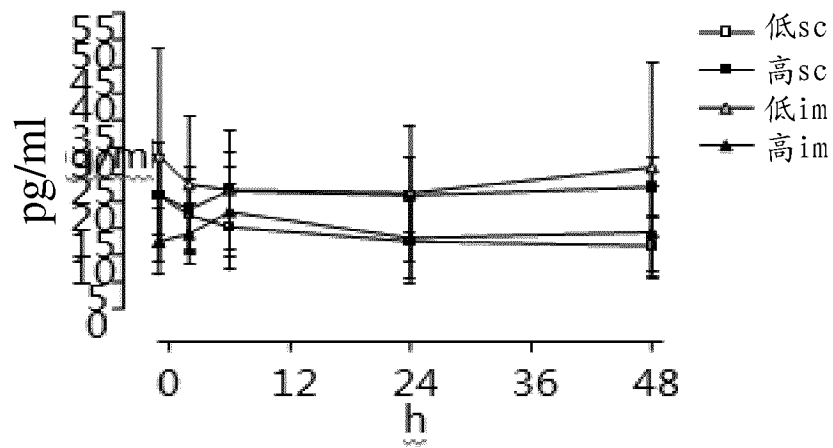
TNF α 

图 38A

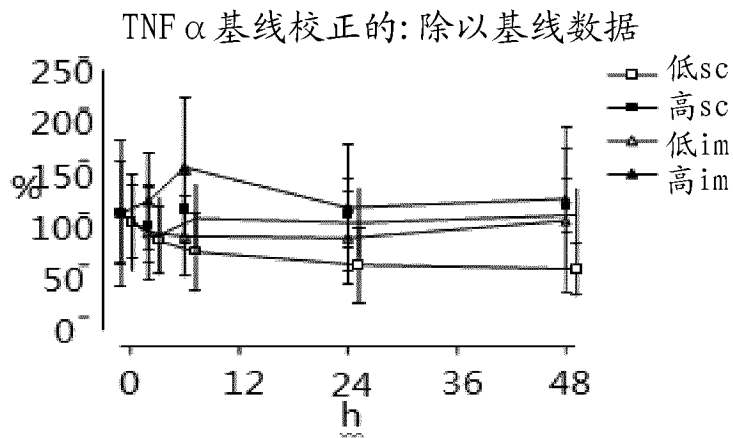


图 38B

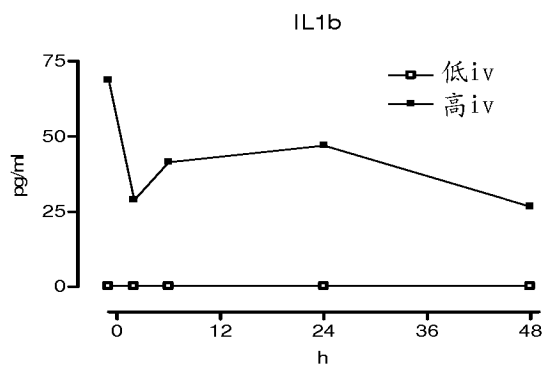


图 39A

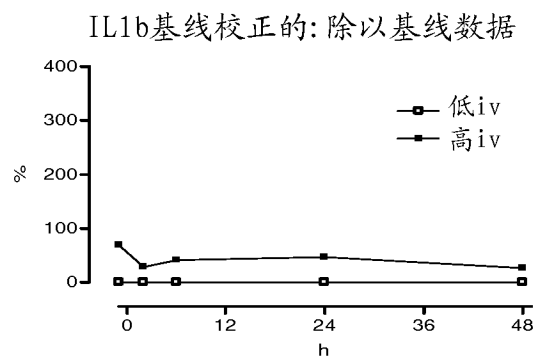


图 39B

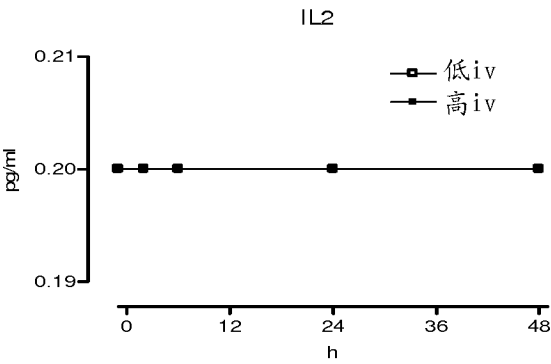


图 39C

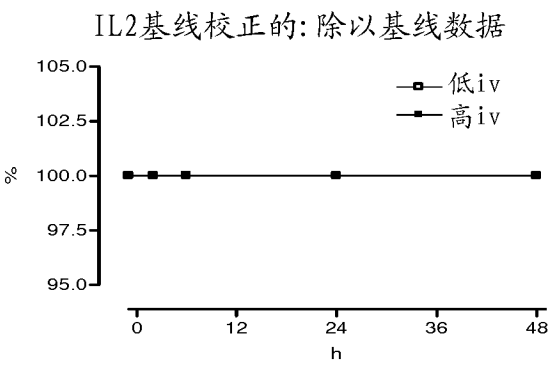


图 39D

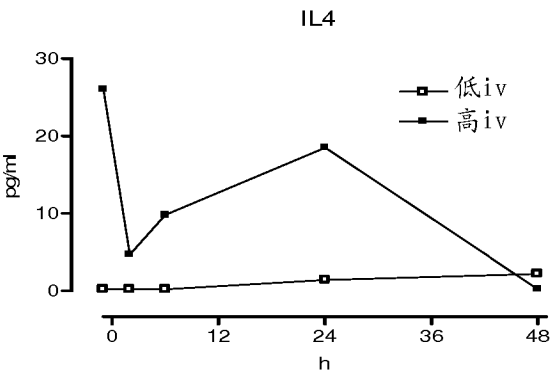


图 39E

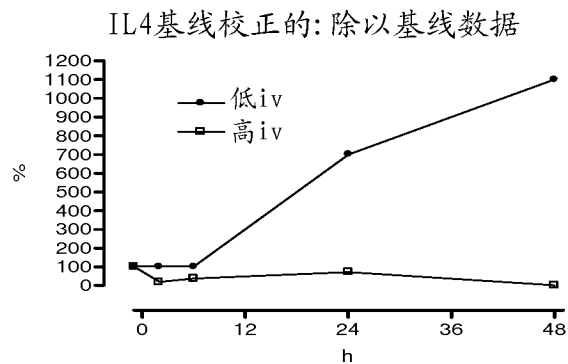


图 39F

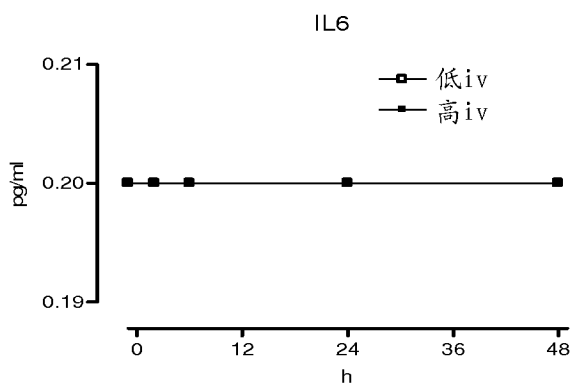


图 40A

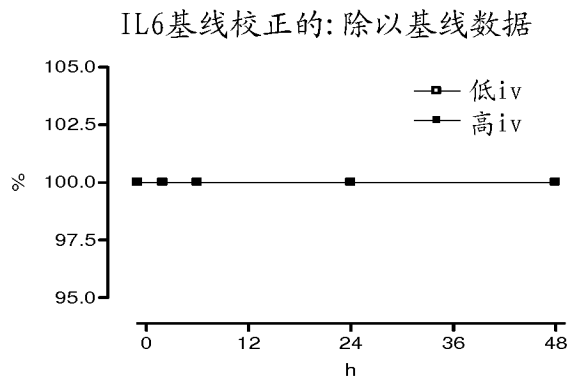


图 40B

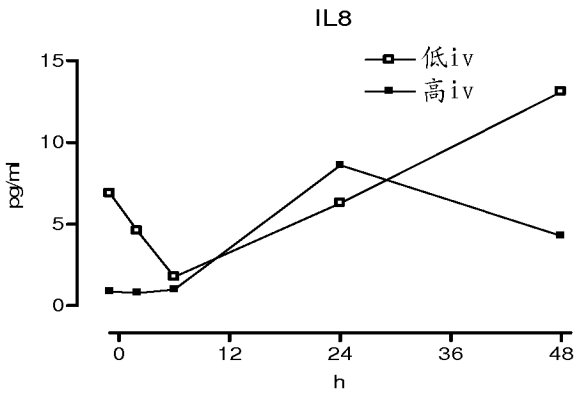


图 40C

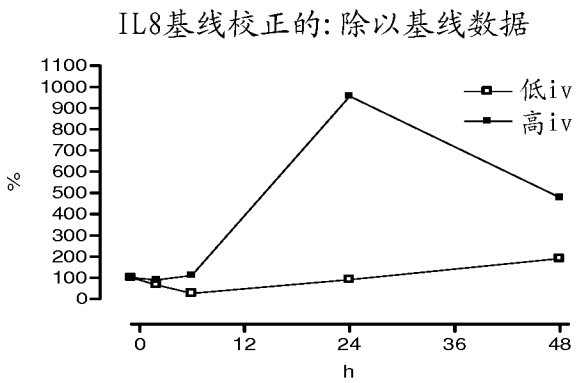


图 40D

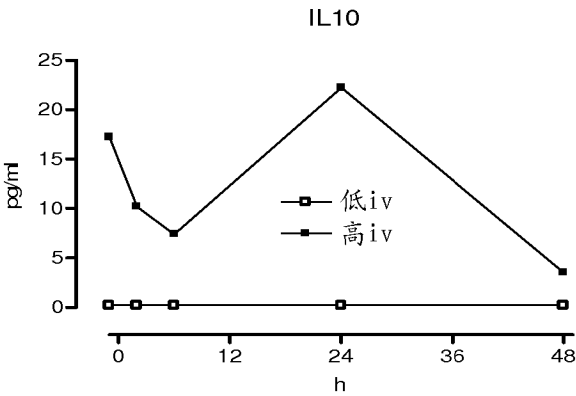


图 40E

IL10基线校正的: 除以基线数据

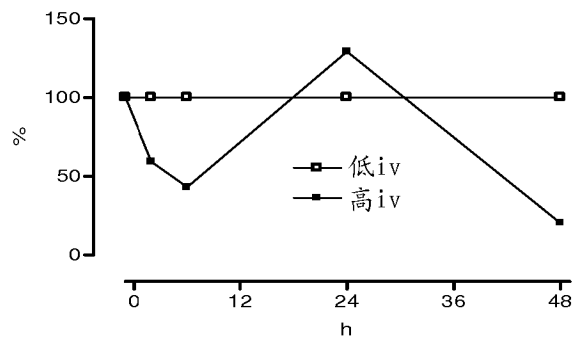


图 40F

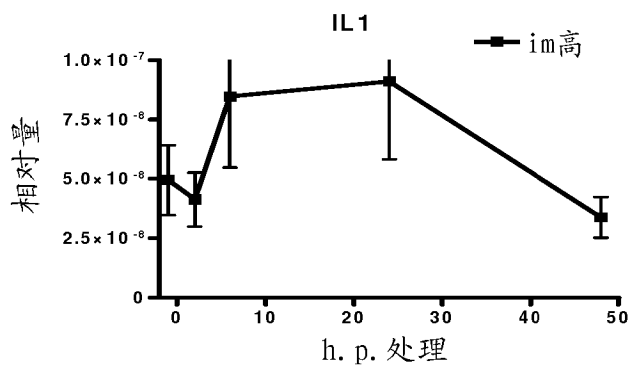


图 41A

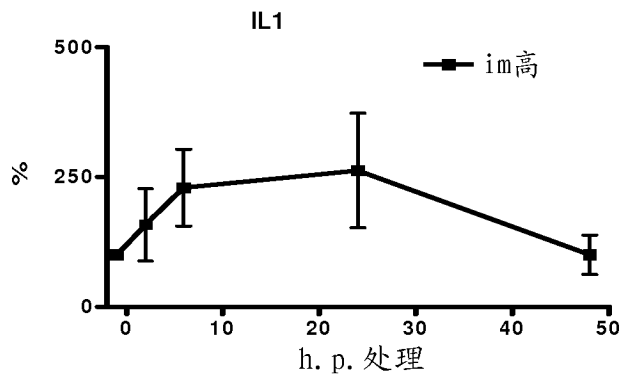


图 41B

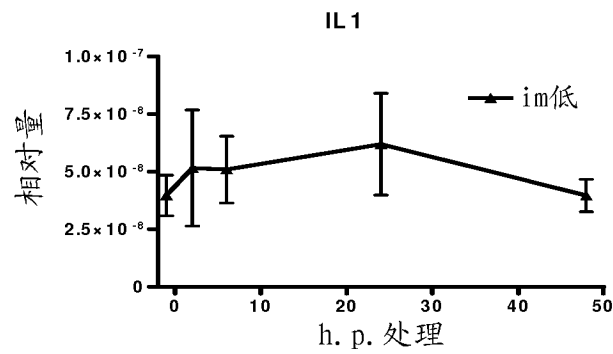


图 41C

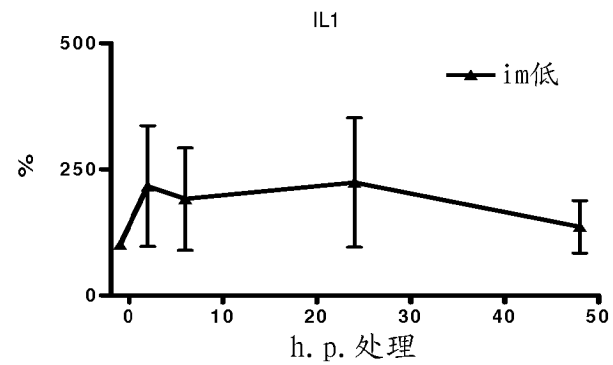


图 41D

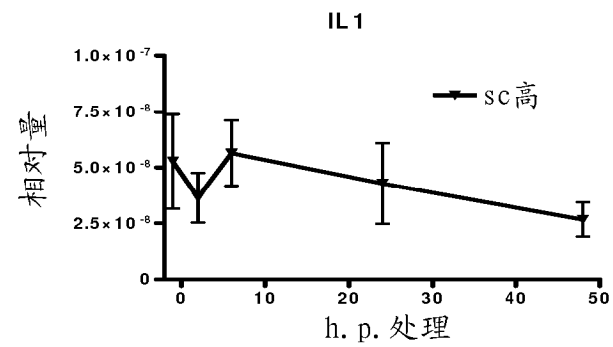


图 41E

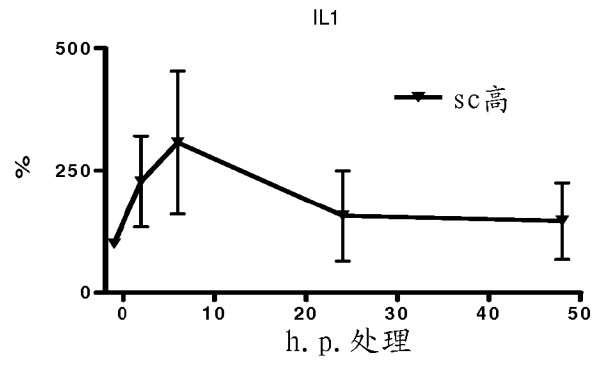


图 41F

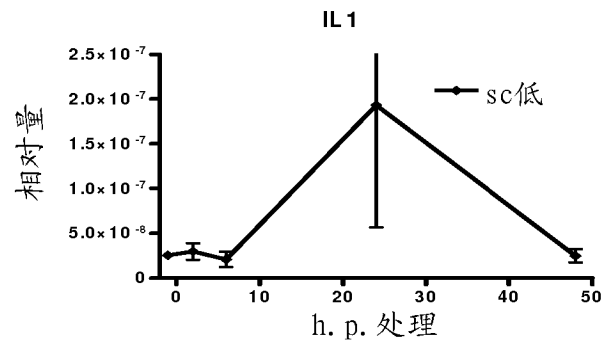


图 41G

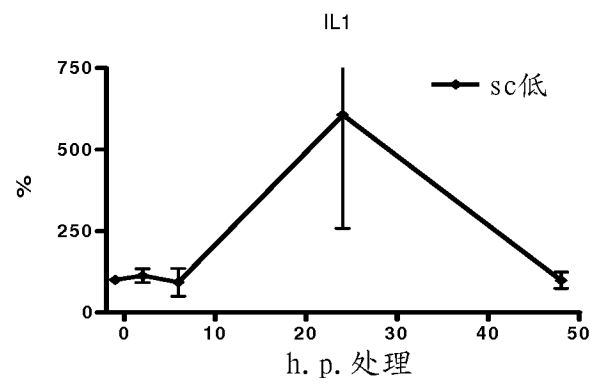


图 41H

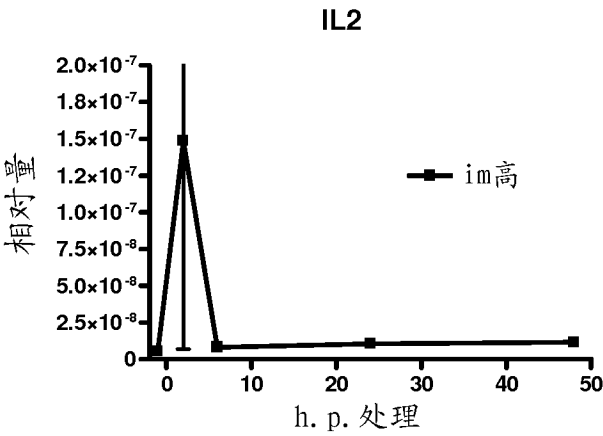


图 42A

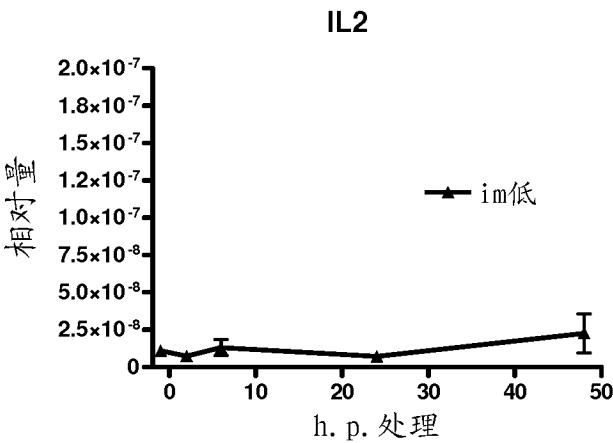


图 42B

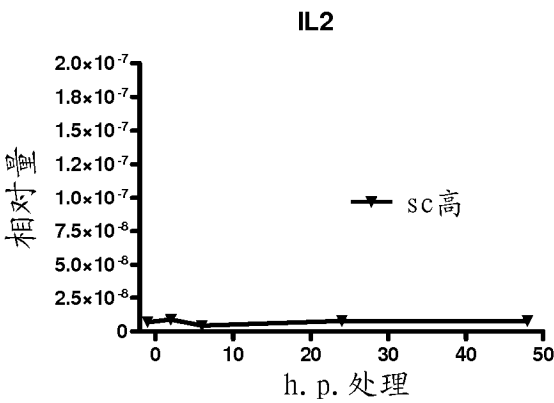


图 42C

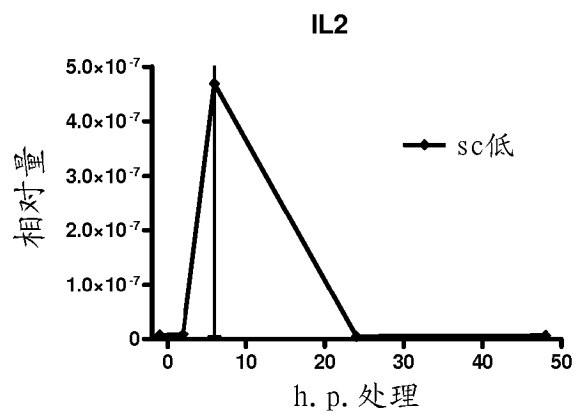


图 42D

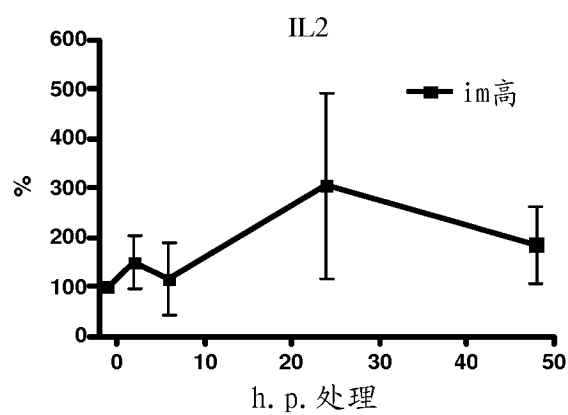


图 43A

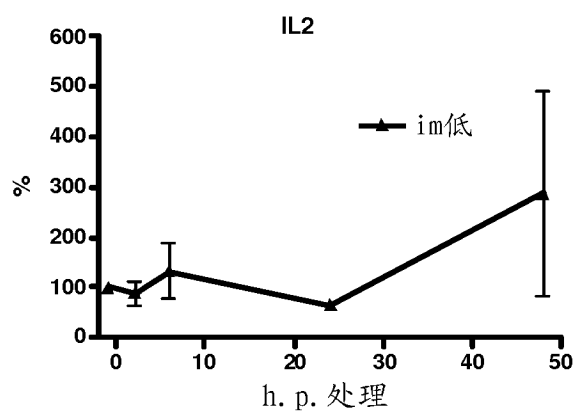


图 43B

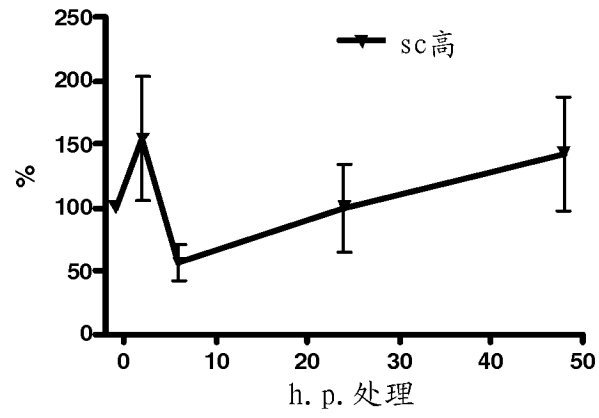


图 43C

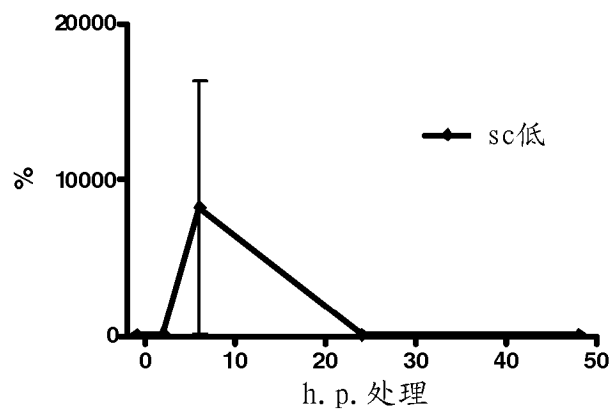


图 43D

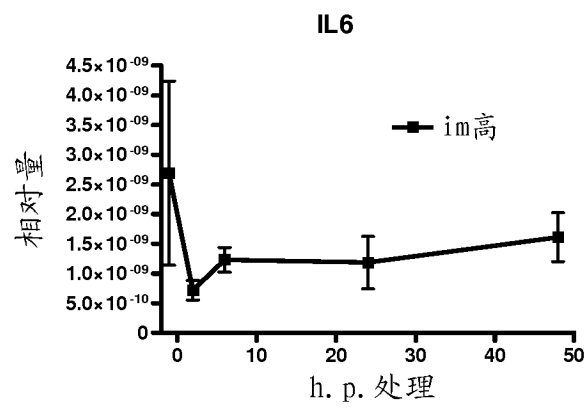


图 44A

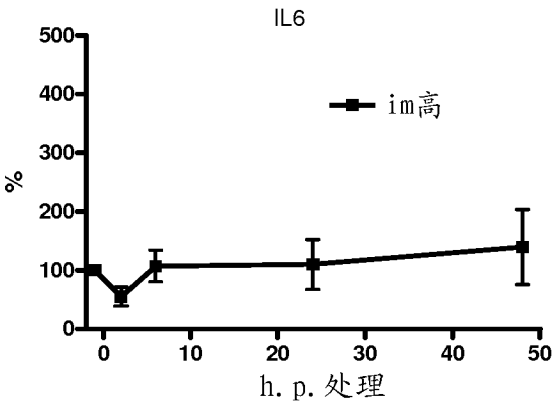


图 44B

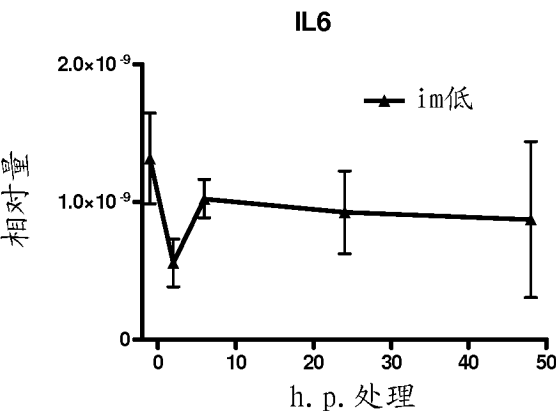


图 44C

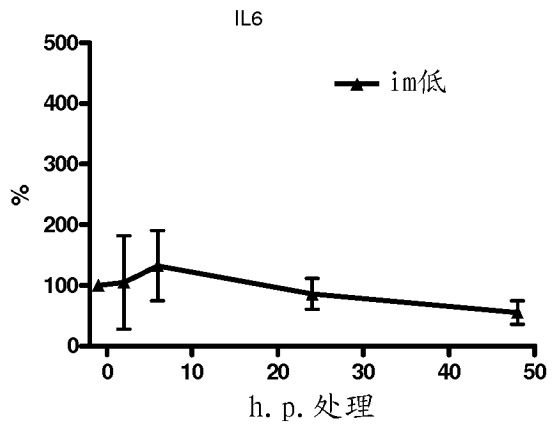


图 44D

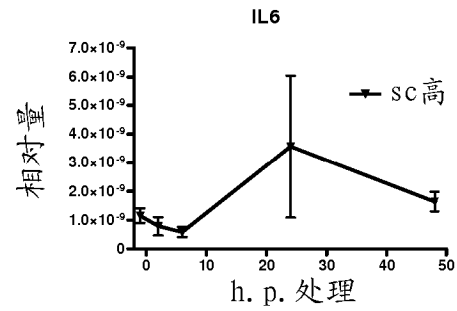


图 44E

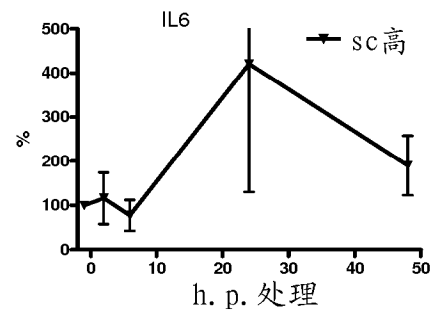


图 44F

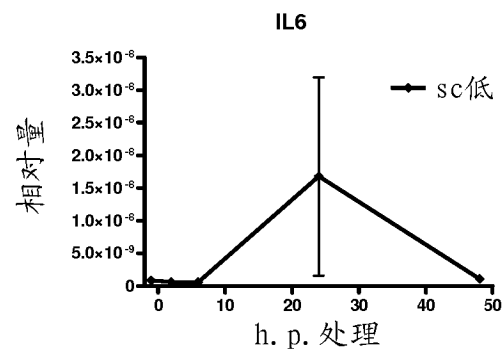


图 44G

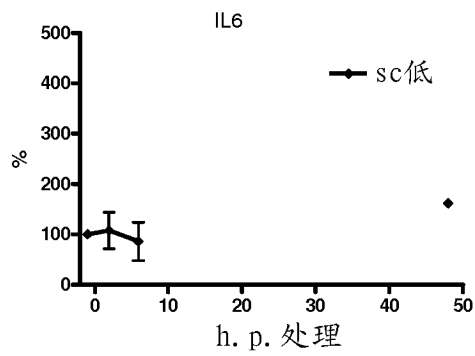


图 44H

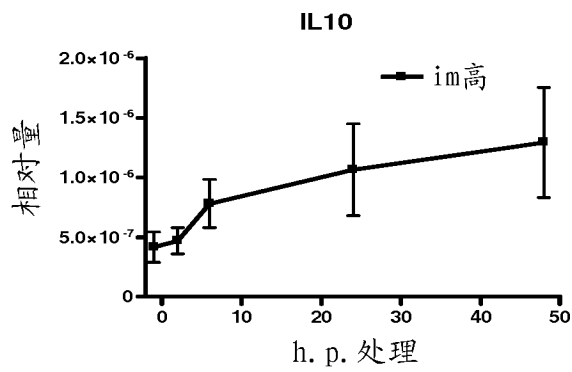


图 45A

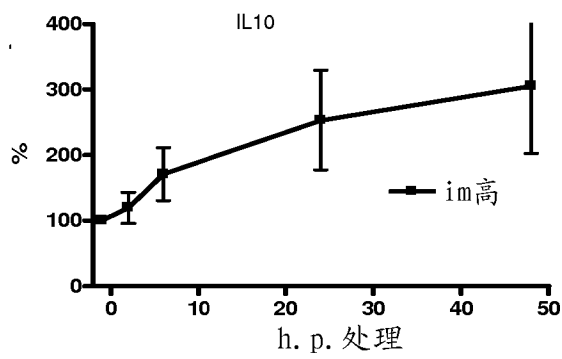


图 45B

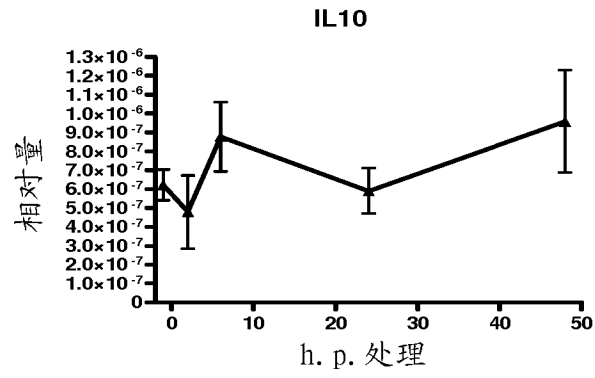


图 45C

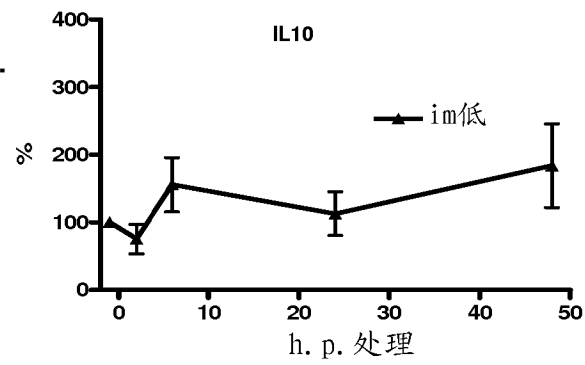


图 45D

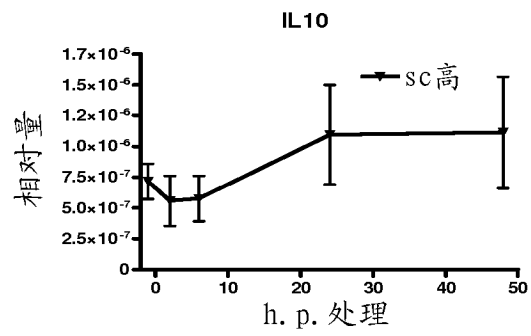


图 45E

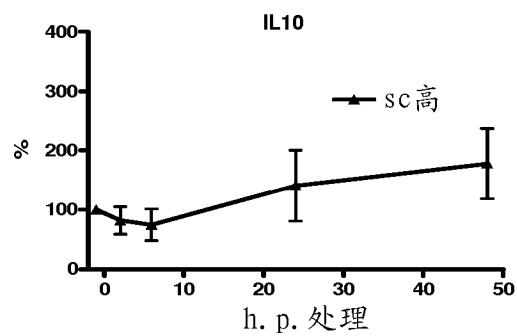


图 45F

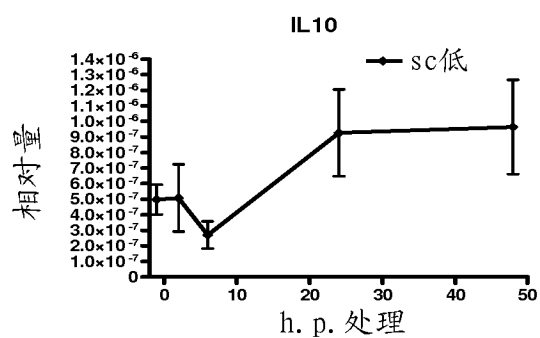


图 45G

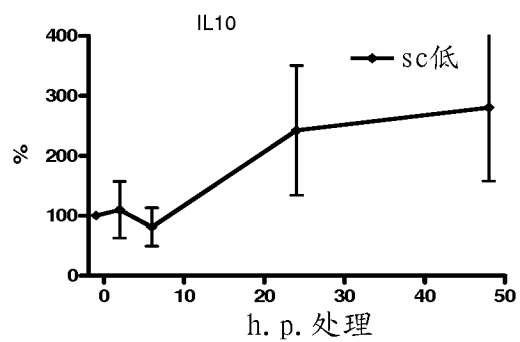


图 45H

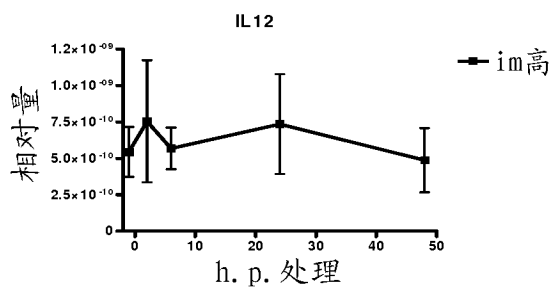


图 46A

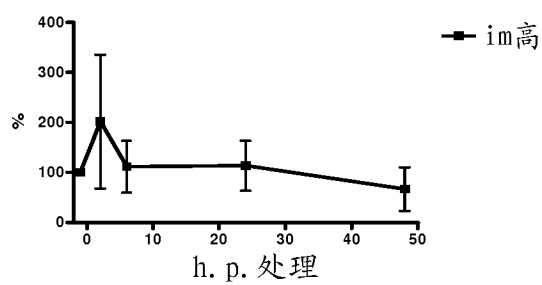


图 46B

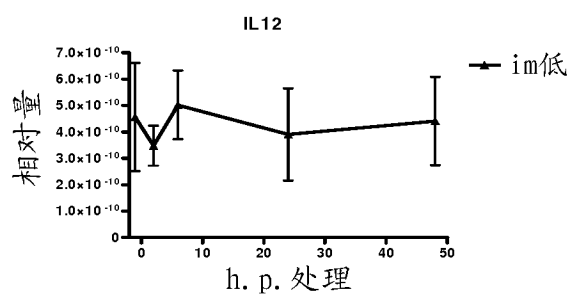


图 46C

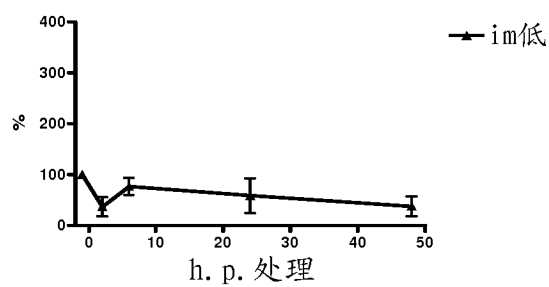


图 46D

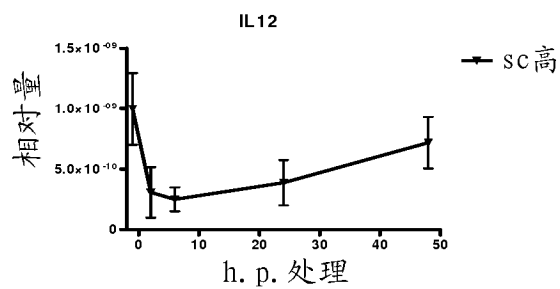


图 46E

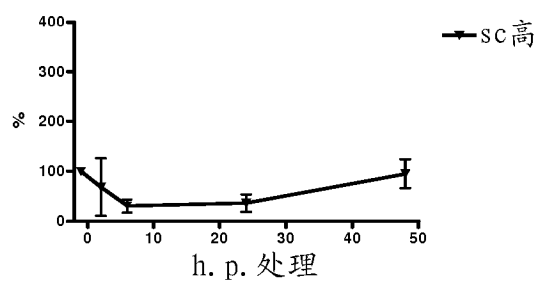


图 46F

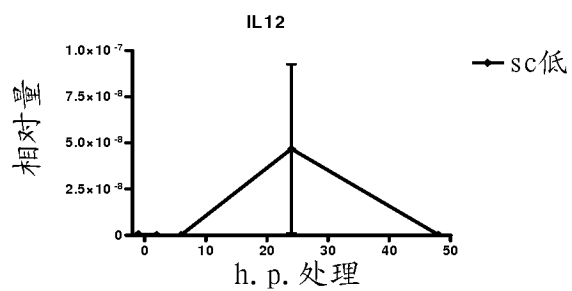


图 46G

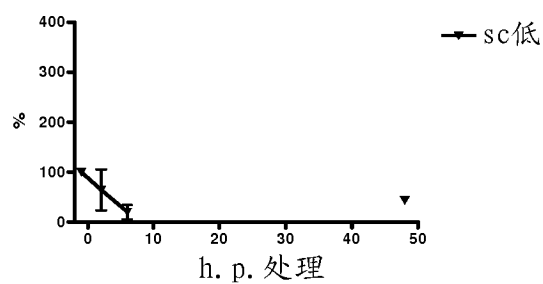


图 46H

基线校正的IL1 所有高剂量处理

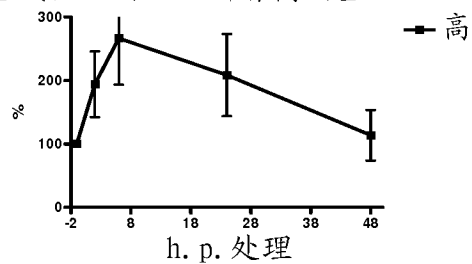


图 47A

基线校正的IL10 所有高剂量处理

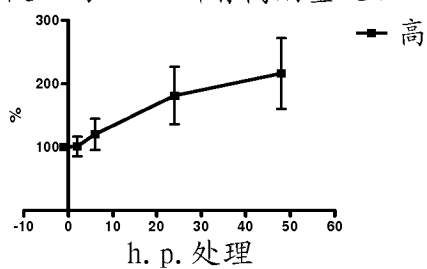


图 47B

基线校正的IL2 所有高剂量处理

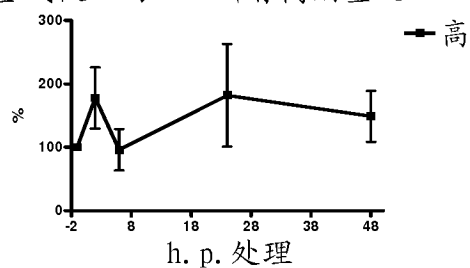


图 47C

基线校正的IL12 所有高剂量处理

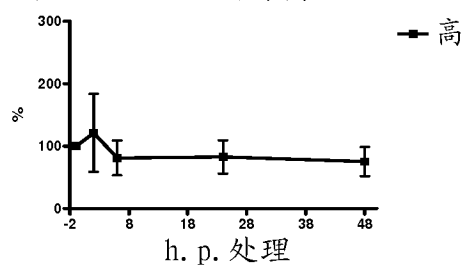


图 47D

基线校正的IL6 所有高剂量处理

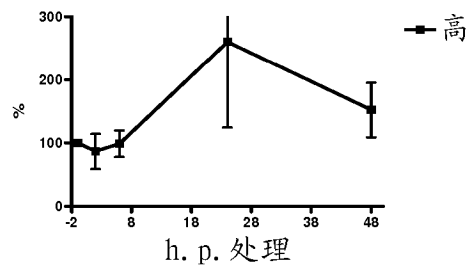


图 47E

基线校正的IL1 所有低剂量处理

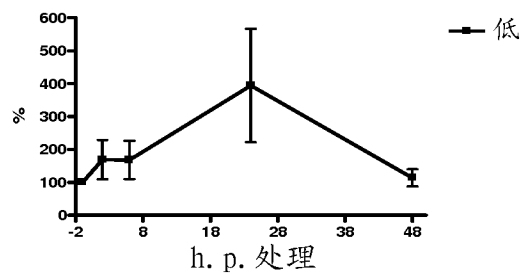


图 48A

基线校正的IL10 所有低剂量处理

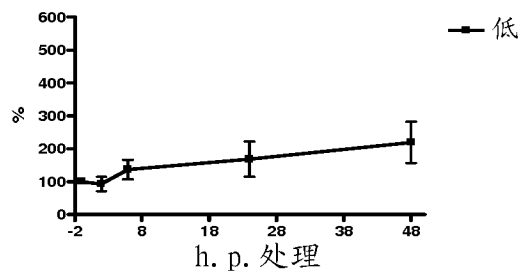


图 48B

基线校正的IL2 所有低剂量处理

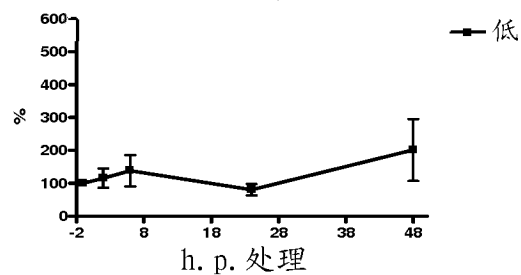


图 48C

基线校正的IL12 所有低剂量处理

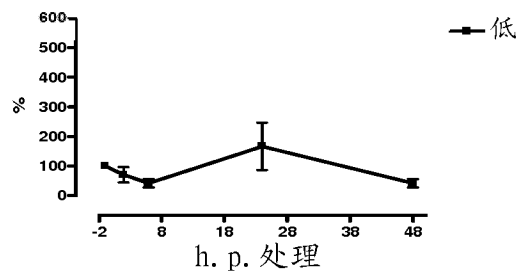


图 48D

基线校正的IL6 所有低剂量处理

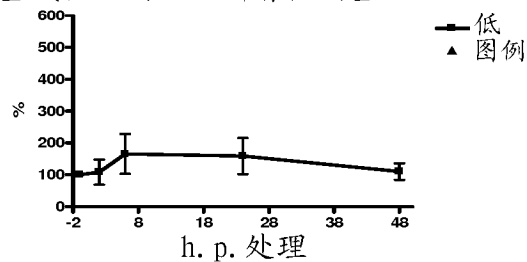


图 48E

高剂量的测试物质的静脉内施用

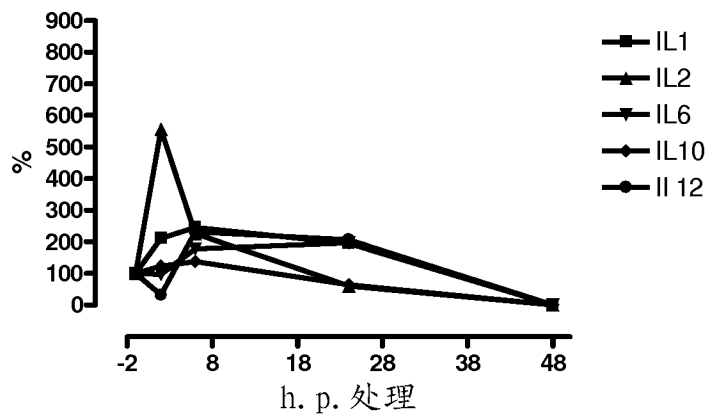


图 49A

低剂量的测试物质的静脉内施用

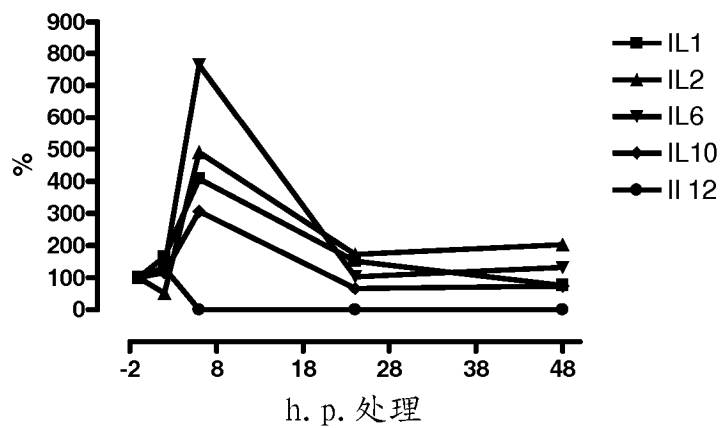


图 49B

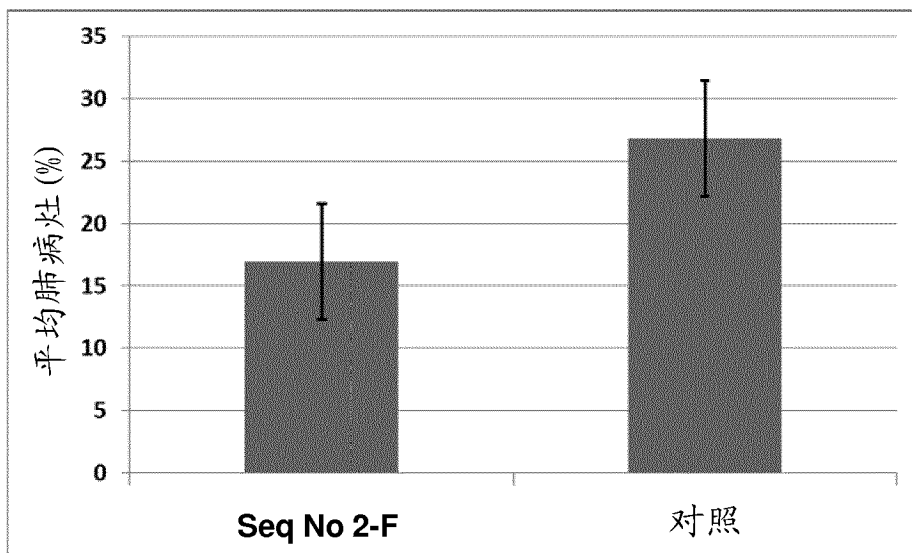


图 50A

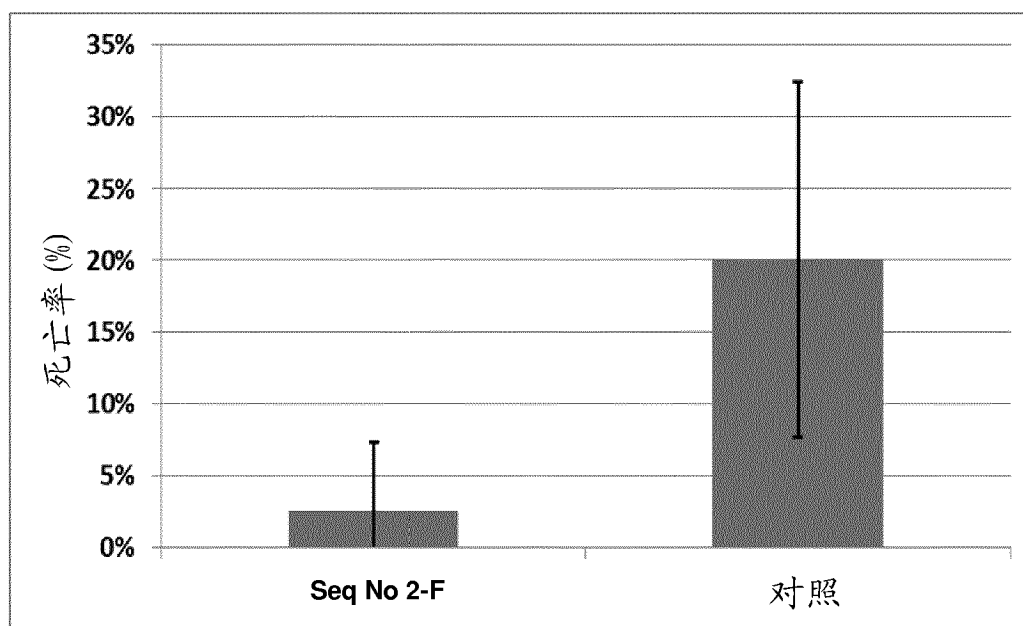


图 50B