



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102016023 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980112452. 6

C07H 21/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 04. 06

(30) 优先权数据

61/042, 674 2008. 04. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/039648 2009. 04. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02009/124309 EN 2009. 10. 08

(71) 申请人 宾夕法尼亚州立大学托管会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 D·B·韦纳 M·P·莫罗

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C12N 15/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 28 页 附图 14 页

(54) 发明名称

使用 IL-28 和组合物的疫苗和免疫治疗及其  
使用方法

(57) 摘要

本发明披露了组合物、重组疫苗和减毒活病  
原体,其包含一种或多种编码免疫原的分离的核  
酸分子及联合编码 IL-28 或其功能片段的分离的  
核酸分子。本发明披露了使用这种组合物来在个  
体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法。

1. 一种组合物，其包含：编码免疫原的分离的核酸分子；以及编码 IL-28 或其功能片段的分离的核酸分子。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述核酸分子为质粒。
3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述免疫原为病原体抗原、癌相关的抗原或与涉及自身免疫性疾病的细胞相关的抗原。
4. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所述免疫原为病原体抗原。
5. 一种组合物，其包含这样的分离的核酸分子，该分离的核酸分子包含：编码免疫原的核苷酸序列；以及编码 IL-28 或其功能片段的核苷酸序列。
6. 如权利要求 5 所述的组合物，其中所述核酸分子为质粒。
7. 如权利要求 5 所述的组合物，其中所述免疫原为病原体抗原、癌相关的抗原或与涉及自身免疫性疾病的细胞相关的抗原。
8. 如权利要求 7 所述的组合物，其中所述免疫原为病原体抗原。
9. 一种可注射的药物组合物，其包含如权利要求 1 所述的组合物。
10. 一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将如权利要求 1 所述的组合物给药于所述个体。
11. 一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将如权利要求 5 所述的组合物给药于所述个体。
12. 一种重组疫苗，其包含编码可操作地连接于调节元件的免疫原的核苷酸序列和编码 IL-28 或其功能片段的核苷酸序列。
13. 如权利要求 12 所述的重组疫苗，其中所述免疫原为病原体抗原、癌相关的抗原或与涉及自身免疫性疾病的细胞相关的抗原。
14. 如权利要求 13 所述的重组疫苗，其中所述免疫原为病原体抗原。
15. 如权利要求 14 所述的重组疫苗，其中所述重组疫苗为重组牛痘疫苗。
16. 一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将如权利要求 12 所述的重组疫苗给药于所述个体。
17. 一种减毒活病原体，其包含编码 IL-28 或其功能片段的核苷酸序列。
18. 一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将如权利要求 17 所述的减毒活病原体给药于所述个体。

## 使用 IL-28 和组合物的疫苗和免疫治疗及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及改进的疫苗、改进的用于预防性地和 / 或治疗性地赋予个体对免疫原的免疫力的方法以及改进的免疫治疗组合物和改进的免疫疗法。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求于 2008 年 4 月 4 日提交的美国临时申请 No.61/042,674 的优先权，其内容以引用方式并入本文。

[0004] 免疫治疗是指调节人的免疫应答以赋予有利的治疗效果。免疫治疗剂是指这样的组合物：当给药于个体时，其通过增加有利的免疫应答来调节个体的免疫系统至足以最大程度地减少与不利的免疫应答相关的症状或者足以最大程度地减轻症状。在一些情况下，免疫疗法是这样的接种方案的一部分，在该接种方法中，将一种疫苗给药于个体，该疫苗将个体暴露于免疫原，对于该免疫原，个体产生免疫应答，在这些情况下，免疫治疗增加免疫应答和 / 或选择性地增强免疫应答的一部分（例如，细胞性手臂或者体液性手臂），所述免疫应答有利于治疗或者预防特定的症状、感染或者疾病。

[0005] 以引用方式并入本文的美国专利 No.7,135,170 披露了人类 IL-28A 和人类 IL-28B 的核酸和氨基酸序列及将 IL-28A 或者 IL-28B 蛋白给药于感染病毒的个体。

[0006] 以引用方式并入本文的美国专利 No.7,491,391 披露了与 IL-23p19 结合的抗体。描述了包含该抗体的组合物和包括将该抗体与其他试剂联合给药的用途，其中包括将抗 -IL-23p19 抗体与包括 IL-28 在内的任一白细胞间介素蛋白联合。

[0007] 以引用方式并入本文的美国专利申请公开 No.20050037018 披露了将 HCV 疫苗与抗病毒剂联合以治疗感染 HCV 的个体。用于治疗感染 HCV 的个体的抗病毒化合物列表中包括 IL-28 蛋白，该 IL-28 蛋白与披露的 HCV 疫苗联合使用。

[0008] 以引用方式并入本文的美国专利申请公开 No.20060165668 披露了以编码两种或多种治疗蛋白的核酸分子转染的癌细胞和通过将这种癌细胞供给患癌的个体来对其进行治疗。所列的治疗蛋白中包括细胞因子，并且细胞因子列表中包括 IL-28。

[0009] 以引用方式并入本文的美国专利申请公开 No.20060263368 披露了包括癌细胞靶向部分和抗细胞增殖部分的抗癌化合物及使用这种化合物来治疗癌并预防或者逆转癌细胞的化学抗性的用途。所列的癌细胞靶向部分中包括激素，并且激素列表中包括 IL-28。

[0010] 以引用方式并入本文的美国专利申请公开 No.20070066552 披露了用于传递编码治疗蛋白的核酸分子的制剂。被描述为治疗蛋白的蛋白列表中包括 IL-28。

[0011] 可以通过传递调节人的免疫应答以诱导改进的免疫应答的试剂来改进疫苗方案。在一些接种方法（其中将一种疫苗给药于个体，该疫苗将个体暴露于免疫原，对于该免疫原，个体产生免疫应答）中，提供增加免疫应答和 / 或选择性地增强免疫应答的一部分（例如，细胞性手臂或者体液性手臂）的试剂，所述免疫应答有利于治疗或者预防特定的症状、感染或者疾病。

[0012] 疫苗有用于使个体对诸如变态反应原、病原体抗原或者与涉及人类疾病的细胞相关的抗原之类的靶抗原免疫。与涉及人类疾病的细胞相关的抗原包括与癌相关的肿瘤

抗原和与涉及自身免疫性疾病的细胞相关的抗原。

[0013] 在设计这种疫苗时，已经认识到，在已接种疫苗的个体的细胞中生产靶抗原的疫苗对于诱导免疫系统的细胞性手臂是有效的。具体地说，减毒活疫苗、使用无毒性载体的重组疫苗和 DNA 疫苗均造成在已接种疫苗的个体的细胞中生产抗原，这引起了诱导免疫系统的细胞性手臂。另一方面，仅包含蛋白的已杀死的疫苗或者灭活的疫苗和亚单位疫苗不会诱导有益的细胞免疫应答，尽管他们确实诱导了有效的体液应答。

[0014] 细胞免疫应答对于提供针对病原体感染的保护及提供对治疗病原体感染、癌或者自身免疫性疾病有效的免疫介导的疗法往往是必需的。因此，往往优选诸如减毒活疫苗、使用无毒性载体的重组疫苗和 DNA 疫苗之类的在已接种疫苗的个体的细胞中生产靶抗原的疫苗。

[0015] 尽管这种疫苗对于预防性地或者治疗性地赋予个体对病原体感染或者人类疾病的免疫力往往是有效的，但仍需要改进的疫苗。需要产生增强的免疫应答的组合物和方法。

[0016] 同样，尽管一些免疫疗法对于调节患者的免疫应答是有用的，但仍需要改进的免疫治疗剂组合物和方法。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明涉及一种组合物，该组合物包含编码免疫原的分离的核酸分子及编码 IL-28 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0019] 本发明还涉及一种组合物，该组合物包含既编码免疫原又编码 IL-28 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0020] 本发明涉及一种可注射的药物组合物，该可注射的药物组合物包含编码免疫原的分离的核酸分子及编码 IL-28 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0021] 本发明涉及一种可注射的药物组合物，该可注射的药物组合物包含既编码免疫原又编码 IL-28 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0022] 本发明还涉及一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将这样的组合物给药于所述个体，该组合物包含编码免疫原的分离的核酸分子及编码 IL-28 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0023] 本发明还涉及一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将这样的核酸分子给药于个体，该核酸分子编码免疫原，并且编码 IL-28 或其功能片段。

[0024] 本发明还涉及一种重组疫苗，该重组疫苗包含编码可操作地连接于调节元件的免疫原的核苷酸序列和编码 IL-28 或其功能片段的核苷酸序列；并且本发明还涉及一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将这种重组疫苗给药于个体。

[0025] 本发明还涉及一种减毒活病原体，其包含编码 IL-28 或其功能片段的核苷酸序列；并且本发明还涉及一种在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法，该方法包括将这种减毒活病原体给药于个体。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 示出测定小鼠脾细胞的  $\gamma$  干扰素应答试验的数据，并将其与采用 Gag 质粒在存在有 IL-2 共处理或不存在 IL-2 共处理的情况下免疫化的小鼠进行比较。

[0028] 图 2 示出在存在有 IL-2 处理或不存在 IL-2 处理的情况下使用流式细胞计量术对

脾细胞进行分析的数据。

[0029] 图 3 示出实施例 3 所描述的试验的数据。采用 3  $\mu$ g 恒河猴 IL-28B (macIL-28B) 或者空载体转染 RD 细胞。转染后 48 小时, 通过 ELISA 检测上清液以确定是否存在有猕猴 IL-28B (恒河猴 IL-28B)。

[0030] 图 4 示出实施例 3 所描述的试验的数据。单独采用编码 HIV Pol 的质粒或者组合使用编码 HIV Pol 的质粒与编码猕猴 IL-28B 的质粒将恒河猴免疫化 2 次。通过 IFN  $\gamma$  ELI 斑点检测时, macIL-28B 的加入将抗原的特异性免疫应答提高了约 3 倍。

[0031] 图 5A 和 5B 示出免疫日程表和质粒图。图 5A 显示, 在第 0 天和第 14 天采用多进化枝的 HIV Gag 构建物并使用或不使用佐剂对小鼠进行免疫化处理, 然后在每次免疫化处理之后使用 **CELLECTRA®** 适合性恒流设备进行电穿孔。在第 21 天, 杀死小鼠, 分离并分析淋巴细胞。图 5B 示出鼠科 IL-28B 和 IL-12 构建物的质粒图。

[0032] 图 6A 和 6B 示出鼠科 IL-12 和鼠科 IL-28B 的体外表达和分泌。图 6A 示出转染后 48 小时由 Western 印迹法得到的得自 HEK 293T 细胞溶解产物的鼠科 IL-12p40 和鼠科 IL-28 蛋白的数据。模拟转染的细胞接受空 pVAX 载体。图 6B 示出由 ELISA 得到的数据, 其示出活性 IL-12p35/p40 异源双体以及 IL-28 蛋白分泌物至转染的细胞的上清液中。

[0033] 图 7A 和 7B 示出分离的脾细胞中的 HIV Gag 特异性的 IFN  $\gamma$  和 IL-4ELI 斑点。图 7A 示出细胞因子佐剂对 Th1 应答的诱导的影响, 通过使用抗原特异性的 IFN  $\gamma$  ELI 斑点对分离的脾细胞进行测量。对采集自小鼠的脾细胞进行 ELI 斑点测量, 所述小鼠接受 IL-12 作为佐剂或者接受 IL-28B 作为佐剂 ( $n = 4$ ), 并且对 IFN  $\gamma$  成斑单元 (SFU) 进行计数。图 7B 示出细胞因子佐剂对 Th2 应答的诱导的影响, 通过使用 IL-4ELI 斑点以同样的方式进行测量。

[0034] 图 8A、8B 和 8C 示出已接种疫苗的动物的血清中 HIV Gag 特异性的 IgG。免疫化后一周通过 ELISA 检测来自对比例 (pVAX) 或者免疫的动物 ( $n = 4$ ) 的血清中是否存在 HIV Gag 特异性的抗体。(图 8A 示出总 IgG。图 8B 示出 IgG1。图 8C 示出 IgG2a。)

[0035] 图 9A 和 9B 示出免疫过程中对调节性的 T 细胞和 TGF  $\beta$  分泌物的不同诱导。从分离的脾细胞由所有组 ( $n = 4$ ) 通过流式细胞计量术检测调节性的 T 细胞 (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup>) 的存在 (图 9A)。流式细胞计量术的分析示出 TReg 群体的差异, 而对这些细胞的细胞因子分泌物的分析示出 TGF  $\beta$  释放的差异 (图 9B)。p 值反映仅采用 Gag4Y 接种的小鼠与采用 Gag4Y 和 IL-12 或者 IL-28B 接种的小鼠的比较。

[0036] 图 10A、10B 和 10C 示出 CD8<sup>+</sup>T 细胞数、粒度和脱粒的变化。通过流式细胞计量术对脾脏和肠系膜淋巴结中的 CD8<sup>+</sup>T 细胞 (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) 的百分率进行估计 (图 10A)。采用流式细胞计量术, 通过将未受激的细胞 (NP) 与使用 HIV Gag 肽 (Peptide) 刺激过的细胞进行比较, 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞中的穿孔素的抗原特异性的诱导进行分析。示出了单一试验的结果 (图 10B), 并图示了所有试验的平均值 (图 10C)。通过使用肽在存在有对于 CD107a 的抗体的情况下进行刺激, 然后通过流式细胞计量术分析, 测量了抗原特异性的溶细胞脱粒 (图 10C)。p 值反映仅采用 Gag4Y 接种的小鼠与采用 Gag4Y 和 IL-12 或者 IL-28B 接种的小鼠的比较。

[0037] 图 11A、11B 和 11C 示出在致命的流感攻击中免于死亡的保护。图 11A 示出

IL-12 和 IL-28B 对 Th1 应答的诱导的影响，通过使用抗原特异性的 IFN  $\gamma$  ELI 斑点对分离的脾细胞进行测量。图 11B 示出试验数据，在该试验中，在第 0 天和第 14 天采用流感 NP 构建物并使用或不使用佐剂对小鼠 ( $n = 8$ ) 进行免疫化处理，然后在每次免疫化处理之后使用 **CELLECTRA®** 适合性恒流设备进行电穿孔。在第 42 天，用 10LD50 的 A/PR/8/34 (一种 H1N1 流感菌株) 对小鼠经鼻攻击。在为期 14 天的过程中跟踪与流感感染相关的死亡率 (图 11B)。

[0038] 优选实施方案详述

[0039] 本文所用的术语“IL-28”指白细胞间介素 28 蛋白，它是一种干扰素  $\lambda$ ，包括干扰素  $\lambda$  的不同变种，例如，但不限于，IL-28A、IL-28B 和 IL-28C。

[0040] 本文所用的术语“功能片段”意指这样的 IL-28 片段，当将该片段和免疫原一起传递时，与没有该片段而传递免疫原时所诱导的免疫相比，该片段提供增加的免疫应答。该片段的长度通常为 10 个或者多个氨基酸。

[0041] 本文所用的术语“靶蛋白”意指由本发明的基因构建物编码的肽和蛋白，该肽和蛋白在免疫应答中起靶蛋白的作用。术语“靶蛋白”和“免疫原”可交换使用，均指可以引起免疫应答的蛋白。靶蛋白是免疫原性蛋白，它与病原体的蛋白或不利的细胞类型 (例如癌细胞) 的蛋白或涉及免疫应答需要抵御的自身免疫疾病的细胞的蛋白共用至少一个表位。针对靶蛋白的免疫应答会保护个体抵御和 / 或治疗该个体的与该靶蛋白相关的特定感染或疾病。在一些实施方案中，靶蛋白为来自 HCV 的病毒蛋白或其片段。在一些实施方案中，靶蛋白为来自除 HCV 以外的病毒蛋白或其片段。

[0042] 本文所用的术语“基因构建物”指 DNA 或 RNA 分子，该 DNA 或 RNA 分子包含编码靶蛋白或免疫调节蛋白的核苷酸序列。该编码序列包括可操作地连接于调节元件的起始和终止信号，包括能够指导个体细胞 (对该个体细胞施用有所述核酸分子) 中的表达的启动子和聚腺苷酸化信号。

[0043] 本文所用的术语“可表达形式”指基因构建物，其含有操作性连接于编码靶蛋白或免疫调节蛋白的编码序列的必需调节元件，使得当该编码序列存在于个体的细胞中时会被表达。

[0044] 本文所用的术语“共用一个表位”指蛋白含有与另一蛋白的一个表位相同或基本上相似的至少一个表位。

[0045] 本文所用的术语“基本上相似的表位”意指具有这样的结构的表位，该结构虽然与某一蛋白的表位不同，但能引起与该蛋白交叉反应的细胞或体液免疫应答。

[0046] 本文所用的术语“胞内病原体”意指病毒或病原生物体，它们的复制周期或生命周期的至少一部分在宿主细胞中，并能在宿主细胞中产生病原蛋白或导致病原蛋白的产生。

[0047] 本文所用的术语“过度增殖性疾病”意指以细胞过度增殖为特征的那些疾病和病症。

[0048] 本文所用的术语“过度增殖相关蛋白”意指与过度增殖性疾病相关的蛋白。

[0049] 本发明产生于这样的发现：当作为疫苗的一部分传递时，编码 IL-28 及其功能片段及它们的组合的核酸分子调节免疫应答。因此，编码 IL-28 及其功能片段及它们的组合的核酸分子可被作为免疫治疗剂传递，其与疫苗组合或者作为疫苗的成分。

[0050] 编码这种蛋白的 IL-28 蛋白和核酸分子披露于美国专利 No.7,135,170 和 No.7,157,559, 它们均以引用方式并入本文。此外, 美国专利 No.6,927,040 和 No.7,038,032 均以引用方式并入本文。类似干扰素的蛋白 Zcyto21 (Kotenko 等, Nat. Immunol.4(1): 69-77, 2003 和 Sheppard 等, Nat.Immunol.4(1): 63-68, 2003) 也以引用方式并入本文。

[0051] 人类 IL-28A 的蛋白序列的 GENBANK 登录号为 NP 742150 和 AAR24510, 它们均以引用方式并入本文。

[0052] 人类 IL-28B 的蛋白序列的 GENBANK 登录号为 NP 742151 和 AAR24509, 它们均以引用方式并入本文。

[0053] 人类 IL-28C 的蛋白序列的 GENBANK 登录号为 AAQ01561, 其以引用方式并入本文。

[0054] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 Q8IZJ0 是指白细胞间介素 -28A 前体 (IL-28A) (干扰素  $\lambda$ -2) (IFN- $\lambda$ -2) (细胞因子 ZCYTO20)。

[0055] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 Q8IZI9 是指白细胞间介素 -28B 前体 (IL-28B) (IL-28C) (干扰素  $\lambda$ -3) (IFN- $\lambda$ -3) (干扰素  $\lambda$ -4) (IFN-lambda-4) (细胞因子 ZCYTO22)。

[0056] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 NM\_173065 是指智人白细胞间介素 28 受体,  $\alpha$  (干扰素,  $\lambda$  受体) (IL28RA), 转录体变体 3, mRNA。

[0057] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 NM\_172138 是指智人白细胞间介素 28A (干扰素,  $\lambda$  2) (IL28A), mRNA。

[0058] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 NM\_172139 是指智人白细胞间介素 28B (干扰素,  $\lambda$  3) (IL28B), mRNA。

[0059] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 AY129153 是指智人白细胞间介素 28 受体 A 接合变体 3 (IL28RA) mRNA, 全 cds; 或者是剪接的。

[0060] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 AY129152 是指智人白细胞间介素 28 受体 A 接合变体 2 (IL28RA) mRNA, 全 cds; 或者是剪接的。

[0061] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 AY129152 是指智人白细胞间介素 28 受体 A 接合变体 2 (IL28RA) mRNA, 全 cds; 或者是剪接的。

[0062] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 AY129151 是指智人白细胞间介素 28 受体 A (IL28RA) mRNA, 全 cds; 或者是剪接的。

[0063] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 AY129149 是指智人白细胞间介素 28B (IL28B) mRNA, 全 cds。

[0064] 以引用方式并入本文的 GENBANK 登录号 AY129148 是指智人白细胞间介素 28A (IL28A) mRNA, 全 cds。

[0065] 根据本发明的一些实施方案, 编码 IL-28 或其功能片段的核酸序列的传递和与编码免疫原的核酸序列组合于个体增强了对免疫原的免疫应答。当编码转录因子的核酸分子被个体的细胞占据时, 编码 IL-28 或其功能片段和免疫原的核苷酸序列在细胞中得以被表达, 由此蛋白被传递至个体。本发明的一些方面提供在单一的核酸分子上传递蛋白的编码序列的方法、在不同核酸分子上的的传递蛋白的编码序列的方法、传递蛋白编码序

列作为重组疫苗的一部分和减毒疫苗的一部分方法。

[0066] 根据本发明的一些方面，提供用于预防性地和 / 或治疗性地赋予个体对病原体或者异常的、疾病相关的细胞的免疫力的组合物和方法。疫苗可以使任何类型的疫苗，例如，减毒活疫苗、重组疫苗或者核酸或 DNA 疫苗。通过传递编码免疫原和 IL-28 或其功能片段的核酸分子，可以调节由疫苗诱导的免疫应答。当通过表达的核酸分子（诸如，例如质粒的部分或者重组载体的基因组的部分或者减毒病原体的基因组的部分或者细胞的基因组的部分）传递时，IL-28 是尤其有用的。当预防性地传递以在未感染或者没有疾病的个体中诱导保护性的免疫应答时，IL-28 是尤其有用的。IL-28B 是 IL-28 的尤其有用的形式。当传递以在人类中诱导保护性的免疫应答时，IL-28 是尤其有用的。在一些实施方案中，在无细胞的组合物中传递编码 IL-28 的核酸分子。在一些实施方案中，在无癌细胞的组合物中传递编码 IL-28 的核酸分子。在一些实施方案中，在没有任何其他细胞因子的条件下施用 IL-28 或者编码 IL-28 的核酸分子。在一些实施方案中，提供 IL-28 或者编码 IL-28 的核酸分子，而并不向其中引入或连接上非 IL-28 的序列。编码免疫调节蛋白的分离的 cDNA 作为构建能够产生免疫调节蛋白的构建物的原料是有用的。可以使用标准的技术和现成的原料来制备编码免疫调节蛋白的核酸分子。

[0067] 本发明涉及用于传递免疫调节蛋白的组合物和使用该组合物的方法。本发明的一些方面涉及核酸分子，该核酸分子包含：编码 IL-28 或其功能片段、并且可操作地连接于调节元件的核苷酸序列；以及编码免疫原、并且可操作地连接于调节元件的核苷酸序列。本发明的一些方面涉及组合物，该组合物包含这样的核酸分子，该核酸分子包含：编码 IL-28 或其功能片段、并且可操作地连接于调节元件的核苷酸序列；以及编码免疫原、并且可操作地连接于调节元件的核苷酸序列。本发明还涉及包含这种核酸分子的可注射的药物组合物。

[0068] 可采用一些公知的技术中的任一种来传递所述核酸分子，这些公知的技术包括 DNA 注射（也称为 DNA 疫苗接种）、重组载体（例如，重组腺病毒、重组腺病毒相关病毒和重组牛痘病毒）。

[0069] 在美国专利 No.5,593,972、5,739,118、5,817,637、5,830,876、5,962,428、5,981,505、5,580,859、5,703,055、5,676,594 及其引用的优先权申请中描述了 DNA 疫苗，它们均以引用方式并入本文。除了那些申请中所述的传递方案外，美国专利 No.4,945,050 和 5,036,006 描述了传递 DNA 的其它方法，它们均以引用方式并入本文。

[0070] 给药途径包括但不限于：肌肉内、鼻内、腹膜内、真皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及局部、透皮、吸入或栓剂或传递给粘膜组织，例如通过灌注传递至阴道、直肠、尿道、口腔和舌下组织。优选的给药途径包括给予粘膜组织、肌肉内、腹膜内、真皮内和皮下注射。可通过以下方式，包括但不限于：常规注射器、无针注射装置或“微粒轰击基因枪”给予所述基因构建物。

[0071] 另一种给药途径包括如美国专利 No.5,273,525、5,439,440、5,702,359、5,810,762、5,993,434、6,014,584、6,055,453、6,068,650、6,110,161、6,120,493、6,135,990、6,181,964、6,216,034、6,233,482、6,241,701、6,347,247、6,418,341、6,451,002、6,516,223、6,567,694、6,569,149、6,610,044、6,654,636、6,678,556、6,697,669、6,763,264、6,778,853、6,865,416、6,939,862 和 6,958,060 所描述的那样使用电



穿孔以传递基因构建物，它们均以引用方式并入本文。

[0072] 优选有助于 DNA 疫苗传递的电穿孔设备和电穿孔方法的例子包括 Draghia-Akli 等的美国专利 No.7,245,963 所描述的那些、Smith 等提交的公开号为 2005/0052630 的美国专利，其内容以引用方式并入本文。还优选共同在审并共同拥有的序号为 No.11/874072 的美国专利申请（申请日为 2007 年 10 月 17 日，根据 35USC 119(e) 要求享有于 2006 年 10 月 17 日提交的美国临时申请 No.60/852,149 和 2007 年 10 月 10 日提交的美国临时申请 No.60/978,982 的优先权）提供的有助于 DNA 疫苗传递的电穿孔设备和电穿孔方法，这些文件均以引用方式并入本文。

[0073] 下面是使用电穿孔技术的实施方案的一个例子，并且更详细地讨论了所引用的以上讨论的专利文件：电穿孔设备可以配置为传递能量脉冲给哺乳动物的理想的组织，产生与用户输入的预置电流相似的恒流。电穿孔设备包括电穿孔组件、电极部件或处理部件。电穿孔组件可以包括和纳入电穿孔设备的各种元件（包括控制器、电流波形发生器、阻抗测试仪、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通讯端口、记忆体元件、电源和电源开关）的一种或多种。电穿孔组件可以作为电穿孔设备的一个元件，其他元件是与电穿孔组件相连的独立的元件（或组件）。在一些实施方案中，电穿孔组件可以作为电穿孔设备的多个元件，电穿孔组件还可以与电穿孔设备的除电穿孔组件之外的其他元件相连。使用电穿孔技术以传递 CD28 构建物并不受电穿孔设备的元件（其作为电动机设备或者机械设备的部件）的限制，由于这些元件作为一个设备或者作为相互连接的独立的元件。电穿孔设备能够传递能量脉冲并包括反馈机制，该能量脉冲在理想的组织产生恒流，给哺乳动物的产生与用户输入的预置电流相似的恒流。电极部件包括具有空间排布的多个电极的电极阵列，其中所述电极部件接收来自电穿孔组件的能量脉冲并通过电极将该能量脉冲传递至理想的组织。多个电极至少有一个在能量脉冲的传递中是中性的，其测量理想的组织的阻抗，并将该阻抗传至电穿孔组件。反馈机制可以接收测量的阻抗，还可以调节电穿孔组件传递的能量脉冲以维持恒流。

[0074] 在一些实施方案中，多个电极可以以分散化的样式传递能量脉冲。在一些实施方案中，多个电极可以通过电极控制按程序化的序列以分散化的样式传递能量脉冲，程序化的序列由用户输入到电穿孔组件。在一些实施方案中，程序化的序列包括按序列传递的多个脉冲，其中多个脉冲中的每个脉冲由至少两个活性电极传递，其中之一是测量阻抗的中性电极，并且其中多个脉冲中的继发脉冲由不同于至少两个活性电极（其中之一是测量阻抗的中性电极）的电极传递。

[0075] 在一些实施方案中，反馈机制由硬件或者软件进行。优选的是，反馈机制由类似闭合环路进行。优选的是，该反馈每 50  $\mu$ s、20  $\mu$ s、10  $\mu$ s 或者 1  $\mu$ s 发生一次，但还优选的是，实时反馈或者即时反馈（即，基本上通过现有的测定响应时间的技术测定时，为即时）。在一些实施方案中，中性电极测量理想的组织的阻抗并将该阻抗传至反馈机制，反馈机制响应阻抗并调节能量脉冲以维持恒流在与预设的电流值相似的值。在一些实施方案中，在能量脉冲的传递中反馈机制连续并即时保持恒流。

[0076] 当所述基因构建物被细胞摄取时，可作为功能性染色体外分子维持存在于细胞中。可将 DNA 以一种或多种质粒形式引入细胞，作为分离的遗传物质而维持在细胞中。或者，可将 RNA 引入细胞。也考虑了提供的基因构建物为含有着丝粒、端粒和复制起点

的线性小染色体。基因构建物可保留减毒活微生物或重组微生物载体在细胞内存活（所需）的遗传物质部分。基因构建物可以是重组病毒疫苗的基因组部分，此时所述遗传物质或整合入细胞染色体中，或维持存在于染色体外。基因构建物包含核酸分子基因表达所需的调控元件。这些元件包括：启动子、起始密码子、终止密码子和聚腺苷酸化信号。此外，为了基因表达编码靶蛋白或免疫调节蛋白的序列，常需要增强子。这些元件必须与所需蛋白的编码序列操作性相连，而且这些调控元件必须能在所给予的个体内可操作。

[0077] 起始密码子和终止密码子一般认为是所需蛋白的编码核苷酸序列的一部分。但是，这些元件在给予此基因构建物的个体内必须具有功能。起始密码子和终止密码子必须与编码序列同在框内。

[0078] 所用的启动子和聚腺苷酸化信号在个体的细胞内必须具有功能。

[0079] 用于实施本发明，尤其是用于产生人用基因疫苗的启动子例子包括但不限于：猿病毒 40 (SV40) 的启动子、小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV) 启动子、人免疫缺陷病毒 (MV) 的启动子（如 BIV 长末端重复序列 (LTR) 启动子）、莫洛尼病毒启动子、ALV 启动子、巨细胞病毒 (CMV) 的启动子（例如，CMV 立即早期启动子）、EB 病毒 (EBV) 启动子、罗斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子以及例如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和人金属硫蛋白等人基因的启动子。

[0080] 用于实施本发明，尤其是用于产生人用基因疫苗的聚腺苷酸化信号的例子包括但不限于；SV40 聚腺苷酸化信号、牛生长激素聚腺苷酸化 (bgh-PolyA) 信号和 LTR 聚腺苷酸化信号。具体地说，可采用加利福尼亚州圣迭戈市 Invitrogen 公司的 pCEP4 质粒中的 SV40 聚腺苷酸化信号，称为 SV40 聚腺苷酸化信号。

[0081] 除了 DNA 表达所需的调控元件外，DNA 分子中还可包含其它元件。这些其它元件包括增强子。增强子可选自但不限于：人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和诸如 CMV、RSV 和 EBV 等病毒的增强子。

[0082] 为了使所述构建物维持存在于染色体外并在细胞内产生该构建物的多个拷贝，可提供含哺乳动物复制起点的基因构建物。加利福尼亚州圣迭戈市 Invitrogen 公司的质粒 pVAX 1、pCEP4 和 pREP4 含有 EB 病毒复制起点和核抗原 EBNA-1 编码区，它们能产生高拷贝附加型复制产物而不整合。

[0083] 在涉及免疫应用的一些优选实施方案中，传递的核酸分子包含编码靶蛋白、免疫调节蛋白的核苷酸序列，还包含能进一步增强对这些靶蛋白的免疫应答反应的蛋白（编码）基因。这些基因的例子是编码其它细胞因子和淋巴因子，例如  $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素、血小板衍生生长因子 (PDGF)、TNF、GM-CSF、上皮生长因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 和 IL-15，包括删除了信号序列而可任选地包含 IgE 信号肽的 IL-15 的基因。

[0084] 该方法中所用的组合物可以进一步包含一种或多种下述蛋白和 / 或编码这种蛋白的核酸分子，所述蛋白如美国序列号 No.10/139,423（其对应于美国专利公开 No.20030176378，该专利文件以引用方式并入本文）中所提出的那些：主要组织相容性复合体抗原，包括主要组织相容性复合体 Class I 抗原或者主要组织相容性复合体 Class II 抗原；死亡结构域受体，包括但不限于 Apo-1、Fas、TNFR-1、p55、WSL-1、DR3、

TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2 和 DR6；死亡信号，即，与死亡结构域受体相互作用的蛋白，包括但不限于 FADD、FAP-1、TRADD、RIP、FLICE 和 RAIDD；或者包括配体的死亡信号，该配体与死亡结构域受体结合并引发凋亡，包括但不限于 FAS-L 和 TNF；以及，与死亡结构域受体相互作用的介体，包括但不限于 FADD、MORT1 和 MyD88；毒素，包括杀死细胞的蛋白，例如、但不限于昆虫毒液和蛇毒、细菌内毒素（例如，*Psuedomonous* 假单胞菌内毒素）、双链核酸糖小体钝化蛋白（例如，蓖麻毒素，包括单链的毒素和白树毒素）。

[0085] 该方法中所用的组合物可以进一步包含一种或多种下述的蛋白和 / 或编码这种蛋白的核酸分子，所述蛋白如美国序列号 No.10/560,650（其对应于美国专利公开 No.20070041941，该专利文件以引用方式并入本文）中所提出的那些：包括融合蛋白的 IL-15，所述融合蛋白包含连接于 IL-15 蛋白序列的非 IL-15 信号肽，例如，包含连接于 IL-15 蛋白序列的 IgE 信号肽的融合蛋白、CD40L、TRAIL；TRAILrecDRC5、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40LIGAND、NKG2D、F461811 或者 MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、CD30、CD153(CD30L)、Fos、c-jun、Sp-1、Ap1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、Ikb、NIK、SAP K、SAP1、JNK2、JNK1B2、JNK1B1、JNK2B2、JNK2B1、JNK1A2、JNK2A1、JNK3A1、JNK3A2、NF- $\kappa$ -B2、p49 剪接型、NF- $\kappa$ -B2、p100 剪接型、NF- $\kappa$ -B2、p105 剪接型、NF- $\kappa$ -B 50K 链前体、NFkB p50、人 IL-1 $\alpha$ 、人 IL-2、人 IL-4、鼠 IL-4、人 IL-5、人 IL-10、人 IL-15、人 IL-18、人 TNF- $\alpha$ 、人 TNF- $\beta$ 、人白细胞间介素 12、MadCAM-1、NGF IL-7、VEGF、TNF-R、Fas、CD40L、IL-4、CSF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、LFA-3、ICAM-3、ICAM-2、ICAM-1、PECAM、P150.95、Mac-1、LFA-1、CD34、RANTES、IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、E-选择子、CD2、MCP-1、L-选择子(selecton)、P-选择子、FLT、Apo-1、Fas、TNFR-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4(TRAIL)、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、ICE、VLA-1 和 CD86(B7.2)。

[0086] 该方法中所用的组合物可以进一步包含一种或多种下述的蛋白和 / 或编码这种蛋白的核酸分子，所述蛋白如美国序列号 No.10/560,653（其对应于美国专利公开 No.20070104686，该专利文件以引用方式并入本文）中所提出的那些：Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、Ikb、灭活的 NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素应答基因、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1 和 TAP2。

[0087] 如果因为任何原因需要清除接受了所述基因构建物的细胞，可以加入用作细胞摧毁靶标的其它元件。可在此基因构建物中加入可表达形式的疱疹（病毒）胸苷激酶(tk)基因。可给予个体药物更昔洛韦，该药物可选择性杀伤产生 tk 的任何细胞，从而提供了选择性破坏含该基因构建物细胞的工具。

[0088] 为了最大程度产生蛋白，可选择调控序列使其充分适合于在给予该构建物的细

胞内表达基因。此外，可选择能在细胞内最有效转录的密码子。本领域普通技术人员能够制备在细胞内具有功能的 DNA 构建物。

[0089] 在一些实施方案中，可提供基因构建物以产生连接有 IgE 信号肽的本文所述免疫调节蛋白的编码序列。

[0090] 本发明的一种方法包括通过以下途径给予核酸分子的步骤：肌肉内、鼻内、腹膜内、皮下、真皮内或局部给予，或通过灌洗给予选自呼吸道、阴道、直肠、尿道、口腔和舌下的粘膜组织。

[0091] 在一些实施方案中，将所述核酸分子与多核苷酸功能增强剂或基因疫苗促进剂一起传递给细胞。多核苷酸功能增强剂的描述可参见美国专利 No.5,593,972 和 No.5,962,428，它们均以引用方式并入本文。基因疫苗促进剂的描述可参见美国专利 No.5,739,118，其以引用方式并入本文。与核酸分子联合给予的辅助剂可以与该核酸分子混合给予，或者在给予核酸分子的同时分别给予，或在此之前或之后给予。此外，也可以将以下物质与该基因构建物联合给予：功能为转染剂和 / 或复制剂和 / 或促炎剂并能与核苷酸功能增强剂共同给予的其它制剂包括生长因子、细胞因子和淋巴因子，例如  $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素、GM-CSF、血小板衍生长因子 (PDGF)、TNF、上皮生长因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 和 IL-15 以及成纤维细胞生长因子；表面活性剂，例如，免疫刺激性复合物 (ISCOMS)、LPS 类似物（包括单磷酸脂质 A (WL)、胞壁酰肽、醌类似物和诸如角鲨烯和角鲨烯类囊泡和透明质酸。在一些实施方案中，免疫调节蛋白可用作核苷酸功能增强剂。在一些实施方案中，所述核酸分子与聚（丙交酯-co-乙交酯）(PLG) 联合提供以增强传递 / 摄取。

[0092] 本发明的药物组合物含有约 1 纳克至约 2000 微克的 DNA。在一些优选实施方案中，本发明的药物组合物含有约 5 纳克至约 1000 微克的 DNA。在一些优选实施方案中，该药物组合物含有约 10 纳克至约 800 微克的 DNA。在一些优选实施方案中，该药物组合物含有约 0.1 微克至约 500 微克的 DNA。在一些优选实施方案中，该药物组合物含有约 1 微克至约 350 微克的 DNA。在一些优选实施方案中，该药物组合物含有约 25 微克至约 250 微克的 DNA。在一些优选实施方案中，该药物组合物含有约 100 微克至约 200 微克的 DNA。

[0093] 可根据所采用的给药方式配制本发明的药物组合物。如果药物组合物是可注射的药物组合物，它们是无菌、无热原和不含颗粒的。优选采用等渗制剂。等渗添加剂一般包括氯化钠、葡萄糖、甘露糖、山梨糖和乳糖。在一些情况下，优选等渗溶液，如磷酸缓冲盐水。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实施方案中，在所述制剂中加入血管收缩剂。

[0094] 根据本发明的一些实施方案，诱导抵御某免疫原的免疫应答反应的方法是将免疫原和 IL-28 或其功能片段的组合物给予个体。所述疫苗可以是减毒活疫苗、重组疫苗或者核酸或者 DNA 疫苗。

[0095] 本发明有用于引起针对靶蛋白（即，具体与病原体、变态反应原或者个体自身的“异常的”细胞相关的蛋白）的增强的免疫应答。本发明有用于使个体对病原剂和病原生物体免疫，使得针对病原体蛋白的免疫应答提供针对病原体的保护性的免疫性。通过引起针对靶蛋白（其具体与过度增殖性细胞相关）的免疫应答，本发明有用于克服过度

增殖性疾病和病症，例如，癌。通过引起针对靶蛋白（其具体与涉及自身免疫情况的细胞相关）的免疫应答，本发明有用于克服自身免疫性疾病和病症。

[0096] 根据本发明的一些方面，将编码靶蛋白和免疫调节蛋白的 DNA 或 RNA 导入个体组织的细胞中表达从而产生其编码蛋白。可将编码靶蛋白和免疫调节蛋白的 DNA 或 RNA 序列与在个体细胞内表达所需的调控元件相连接。DNA 表达的调控元件包括启动子和聚腺苷酸化信号。此外，所述基因构建物中还可包含诸如 Kozak 区等其它元件。

[0097] 在一些实施方案中，发现编码靶蛋白的可表达形式的序列和编码两种免疫调节蛋白的可表达形式的序列位于同一核酸分子上，而将该核酸分子传递给个体。

[0098] 在一些实施方案中，编码靶蛋白的可表达形式的序列位于与含有编码免疫调节蛋白的可表达形式的序列的核酸分子不同的核酸分子上。在一些实施方案中，编码靶蛋白的可表达形式的序列与编码一种或多种免疫调节蛋白的可表达形式的序列位于与含有编码免疫调节蛋白的可表达形式的序列的核酸分子不同的一个核酸分子上。根据本发明可生产并传递多种不同的核酸分子。

[0099] 可以作为质粒 DNA、重组载体的核酸分子或者减毒疫苗中提供的遗传物质的部分来提供这些核酸分子。或者，在一些实施方案中，除了编码靶蛋白和免疫调节蛋白的核酸分子外，还可将靶蛋白和免疫调节蛋白作为蛋白传递，或者代之以编码它们的核酸分子传递。

[0100] 所述基因构建物可以含有可操作地连接于基因表达所需的调节元件的编码靶蛋白或免疫调节蛋白的核苷酸序列。根据本发明，提供的基因构建物的组合包括含有编码靶蛋白的可表达形式的核苷酸序列的构建物和含有编码免疫调节蛋白的可表达形式的核苷酸序列的构建物。将含有基因构建物的组合的 DNA 或 RNA 分子传递入活细胞中可导致该 DNA 或 RNA 表达，而产生靶蛋白及一种或多种免疫调节蛋白。结果增强了针对该靶蛋白的免疫应答。

[0101] 可采用本发明来使个体对于病原体（例如，病毒、原核生物和致病性真核生物（如，单细胞致病生物和多细胞寄生虫））免疫。本发明特别有用于使个体对于感染细胞和无衣壳的那些病原体（例如，病毒和病原体（例如，淋球菌、李斯特菌属和志贺菌属））免疫。此外，本发明还有用于使个体对于原生动植物病原体免疫，所述原生动植物病原体在其生活周期中的某一阶段为胞内病原体。表 1 提供了可用于制备本发明疫苗的一些病毒家族和种属的名单。疫苗中可采用含有编码各肽的 DNA 序列的 DNA 构建物，所述肽含有至少一个与例如表中所列那些病原体抗原所展示表位相同的或基本上相似的表位。此外，本发明还可用于免疫接种个体以抵御其他病原体，包括如表 2 所列的原核病原体和真核原生动植物病原体以及多细胞寄生虫。

[0102] 表格

[0103] 表 1- 病毒

[0104] 小 RNA 病毒科

[0105] 属：

[0106] 鼻病毒属：（医学）引起 50% 普通感冒病例。

[0107] 肠病毒 (Eteroviruses)：（医学）包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、艾柯病毒、人肠道病毒如甲肝病毒。

- [0108] 口疮病毒 (Aphoviruses) : (兽医学) 这些是口蹄疫病毒。
- [0109] 靶抗原: VP1、VP2、VP3、VP4、VPG
- [0110] 杯状病毒科
- [0111] 属:
- [0112] 诺瓦克群病毒属: (医学) 这些病毒是流行性胃肠炎的重要病原体。
- [0113] 披膜病毒科
- [0114] 属:
- [0115]  $\alpha$  病毒属: (医学和兽医学) 例子包括 Senilis 病毒、罗斯河病毒 (RossRivervirus) 和东方和西方马脑炎病毒。
- [0116] 呼肠孤病毒属: (医学) 风疹病毒。
- [0117] 黄病毒科
- [0118] 例子包括: (医学) 登革热病毒、黄热病毒、日本脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒和虱传脑炎病毒。西尼罗病毒 (Genbank NC001563、AF533540、AF404757、AF404756、AF404755、AF404754、AF404753、AF481864、M 12294、AF317203、AF196835、AF260969、AF260968、AF260967、AF206518 和 AF202541)
- [0119] 代表性靶抗原: E NS5 C
- [0120] 丙肝病毒: (医学) 这些病毒不属于任何科, 但据信是披膜病毒或黄病毒。大部分类似于披膜病毒科。
- [0121] 冠状病毒科: (医学和兽医学)
- [0122] 传染性支气管炎病毒 (禽类)
- [0123] 猪可传播性胃肠炎病毒 (猪)
- [0124] 猪凝血性脑脊髓炎病毒 (猪)
- [0125] 猫传染性腹膜炎病毒 (猫)
- [0126] 猫小肠冠状病毒 (猫)
- [0127] 狗冠状病毒 (狗)
- [0128] SARS 相关冠状病毒
- [0129] 人呼吸道冠状病毒引起约 40% 普通感冒。 EX.224E, OC43。注意 - 冠状病毒可引起非甲、非乙和非丙型肝炎。
- [0130] 靶抗原:
- [0131] E1- 也称为 M 蛋白或基质蛋白
- [0132] E2- 也称为 S 蛋白或刺突蛋白
- [0133] E3- 也称为 HE 或血凝素 -eltero 糖蛋白 (并不存在于所有冠状病毒中)
- [0134] N- 核衣壳
- [0135] 弹状病毒科
- [0136] 属:
- [0137] 水疱病毒 (Vesiliovirus)、狂犬病病毒: (医学和兽医学) 狂犬病
- [0138] 靶抗原: G 蛋白、N 蛋白
- [0139] 线状病毒科: (医学)
- [0140] 出血热病毒, 例如马堡病毒和埃博拉病毒

- [0141] 副粘病毒科：
- [0142] 属：
- [0143] 副粘病毒属：（医学和兽医学）
- [0144] 腮腺炎病毒，新城疫病毒（重要的鸡致病原）
- [0145] 麻疹病毒属：（医学和兽医学）
- [0146] 麻疹病毒、狗瘟热
- [0147] 肺病毒：（医学或兽医学）
- [0148] 呼吸道合胞病毒
- [0149] 正粘液病毒科（医学）流感病毒
- [0150] 布尼亚病毒科（Bungavirus）
- [0151] 属：
- [0152] 布尼亚病毒属：（医学）加利福尼亚脑炎，LA Crosse
- [0153] 白岭热病毒属：（医学）里夫特山谷热病
- [0154] 汉坦病毒属：Puremala 是一种 hemahagin 热病毒
- [0155] 内罗毕病毒属：（兽医学）内罗毕绵羊病
- [0156] 还有许多未分类的布尼亚病毒属
- [0157] 沙粒病毒科（医学）LCM，拉沙热病毒
- [0158] 呼肠孤病毒科
- [0159] 属：
- [0160] 呼肠孤病毒属：可能是一种人病原体
- [0161] 轮状病毒：儿童急性胃肠道炎
- [0162] 环状病毒属：（医学和兽医学）
- [0163] 科罗拉多虱传热病毒、Lebombo（人）马脑炎病毒、蓝舌病毒
- [0164] 逆转录病毒科
- [0165] 亚科：
- [0166] 致癌病毒亚科（Oncorivirinal）：（兽医学）（医学）猫白血病病毒、HTLV I 和 HTLV II
- [0167] 慢病毒亚科：（医学和兽医学）HIV、猫免疫缺陷病毒、马传染性贫血病毒，泡沫病毒
- [0168] 乳多空病毒科
- [0169] 亚科：
- [0170] 多瘤病毒亚科：（医学）BKU 和 JCU 病毒
- [0171] 亚科：
- [0172] 乳头瘤病毒亚科：（医学）与癌症或乳头瘤的恶性进展有关的许多种病毒
- [0173] 腺病毒（医学）
- [0174] EXAD7、ARD., O.B- 引起呼吸道疾病 - 一些腺病毒，例如 275，引起肠炎
- [0175] 细小病毒科（兽医学）
- [0176] 猫细小病毒：引起猫肠炎
- [0177] 猫瘟病毒

- [0178] 狗细小病毒
- [0179] 猪细小病毒
- [0180] 疱疹病毒科
- [0181] 亚科：
- [0182]  $\alpha$  疱疹病毒亚科
- [0183] 属：
- [0184] 单纯疱疹病毒属：（医学）
- [0185] HSVI(Genbank X 14112、NC001806)、HSVII(NC001798)
- [0186] 水痘病毒属：（医学和兽医学）
- [0187] 假狂犬病
- [0188] 水痘带状疱疹病毒
- [0189] 亚科
- [0190]  $\beta$  疱疹病毒亚科
- [0191] 属：
- [0192] 巨细胞病毒属：（医学）
- [0193] HCMV
- [0194] 鼠巨细胞病毒 (Muromegalovirus)
- [0195] 亚科
- [0196]  $\gamma$  疱疹病毒亚科
- [0197] 属：
- [0198] 淋巴隐病毒属（医学）
- [0199] EBV-(伯基特淋巴瘤 (Burkitt' s lymphoma))
- [0200] 痘病毒科
- [0201] 亚科：
- [0202] 带状疱疹病毒亚科（医学 - 兽医学）
- [0203] 属：
- [0204] 天花病毒属（天花病毒）
- [0205] 牛痘属（牛痘病毒）
- [0206] 副痘病毒属 - 兽医学
- [0207] 禽痘病毒 (Auiopoxvirus) - 兽医学
- [0208] 山羊痘病毒属
- [0209] 兔痘病毒属
- [0210] 猪痘病毒属
- [0211] 亚科：
- [0212] 昆虫痘病毒 (Entemopoxviridae)
- [0213] 肝 DNA 病毒科
- [0214] 乙型肝炎病毒
- [0215] 未分类的  $\delta$  肝炎病毒
- [0216] 表 2



[0217] 细菌病原体

[0218] 病原性革兰阳性球菌包括：肺炎球菌、葡萄球菌和链球菌。

[0219] 病原性革兰阴性球菌包括：脑膜炎球菌和淋球菌。

[0220] 病原性革兰阴性肠道杆菌包括：肠杆菌、假单胞菌、不动细菌和艾肯菌、类鼻疽、沙门菌、志贺菌、嗜血杆菌、软性下疮、布鲁菌、土拉菌、耶尔森（巴斯德）菌、念珠状链杆菌和螺菌、单核细胞增生李斯特菌、猪红斑丹毒丝菌、白喉杆菌、霍乱杆菌、炭疽杆菌、杜诺万菌（性病性肉芽肿）和巴尔通氏体。

[0221] 病原性厌氧菌包括：破伤风杆菌、肉毒菌和其它梭菌、结核杆菌、麻风杆菌和其它分枝杆菌。

[0222] 病原性螺旋体病包括：梅毒、密螺旋体病、热带肉芽肿、品它病和地方流行性梅毒和钩端螺旋体病。

[0223] 由较高级病原菌和病原性真菌引起的其它感染包括：放线菌病、诺卡菌病、隐球菌病，酵母病，组织胞浆菌病和球孢子菌病、念珠菌病，曲霉病，和毛霉菌病、孢子丝菌病，巴西芽生菌病，霉样真菌病 (petriellidosis) 球拟酵母菌病，足分枝菌病和着色芽生菌病和皮肤真菌病。

[0224] 立克次体感染包括立克次体的（感染）和立克次体病。

[0225] 支原体和衣原体感染的病例包括：支原体肺炎、性病性淋巴肉芽肿、鹦鹉热和产期衣原体感染。

[0226] 病原性真核细胞

[0227] 由病原性原虫和蠕虫引起的感染包括：阿米巴病、疟疾、利什曼病、锥虫病、弓形体病、卡氏肺囊虫病、巴贝虫病、贾第鞭毛虫病、旋毛虫病、丝虫病、血吸虫病、线虫病、吸虫病和绦虫感染。

[0228] 为制备基因疫苗以提供保护力免遭病原体感染，必须在基因构建物中包括编码免疫原性蛋白的基因物质（例如，靶蛋白的编码序列），以引发对其的保护性免疫应答。不论病原体是胞内感染（本发明尤其适用）或胞外感染病原体，不是所有的病原体抗原都能引发保护性应答。因为 DNA 和 RNA 均较小，而制备比较容易，本发明还提供了采用多种病原体抗原进行疫苗接种的额外优点。用于基因疫苗的基因构建物可包含编码多种病原体抗原的基因物质。例如，一个构建物中可包含数种病毒基因，从而提供多种靶抗原。

[0229] 表 1 和表 2 包括一些致病因子和生物的名单，可以制备它们的基因疫苗以保护个体免遭其感染。在一些优选的实施方式中，免疫接种个体抵御病原体的方法针对人体免疫缺损病毒 (HIV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、丙肝病毒 (HCV)、西尼罗病毒 (WNV) 或者乙肝病毒 (HBV)。

[0230] 本发明另一方面，提供了赋予抵御过度增殖性疾病特征性的过度增殖性细胞的保护性免疫应答的方法，以及治疗患过度增殖性疾病个体的方法。过度增殖性疾病的例子包括所有形式的癌症和银屑病。

[0231] 已经发现，将包含编码免疫原性“过度增殖细胞”相关蛋白的核苷酸序列的基因构建物引入个体细胞中能导致在个体的疫苗接种细胞内产生这些蛋白。为了免疫接种以抵御过度增殖性疾病，可给予个体包含编码过度增殖性疾病相关蛋白的核苷酸序列的

基因构建物。

[0232] 为使过度增殖相关蛋白成为有效的靶免疫原，其必须是只产生在过度增殖细胞内，或在过度增殖细胞内产生的水平高于正常细胞。靶抗原包括这样的蛋白、其片段和肽，它们包含在上述蛋白中发现的至少一个表位。在一些情况中，过度增殖相关蛋白是编码某蛋白的基团发生突变的产物。突变基因编码的蛋白与正常蛋白几乎相同，除了其氨基酸序列略有不同因而产生了正常蛋白上没有的不同表位。这类靶蛋白包括由例如 *myb*、*myc*、*fyn* 等原癌基因和转座基因 *bcr/abl*、*ras*、*src*、*P53*、*neu*、*trk* 和 *EGRF* 编码的那些蛋白。除了作为靶抗原的原癌基因产物外，用于抗癌治疗和保护性方案的靶蛋白还包括 B 细胞淋巴瘤所产生抗体的可变区和 T 细胞淋巴瘤的 T 细胞受体可变区，在一些实施方案中，它们也可用作自身免疫疾病的靶抗原。还可采用其它肿瘤相关蛋白作为靶蛋白，例如发现的肿瘤细胞内含量较高的蛋白，包括单克隆抗体 17-IA 所识别的蛋白和叶酸结合蛋白或 PSA。

[0233] 虽然可采用本发明来免疫接种个体以抵御几种癌症形式中的一种或多种，但本发明尤其适用于预防性免疫接种易患某种特定癌症或曾患癌症因而易复发的个体。遗传学和技术以及流行病学的发展已能测定和评估个体发生癌症的几率和风险。可利用基因筛检和 / 或家族健康史来预测某特定个体患几种癌症中任何一种的可能性。

[0234] 类似地，那些曾患癌症和已接受治疗切除癌瘤或处于缓解中的个体尤其易复发。作为治疗方案的一部分，可以针对已诊断（明确）的癌症给予这种个体免疫接种以抵御复发。因此，一旦得知某个体曾患有某类癌症并有复发危险时，可免疫接种他们，使其免疫系统作好准备以抵御任何将出现的癌症。

[0235] 本发明提供治疗患过度增殖性疾病个体的方法。在这些方法中，引入的基因构建物用作免疫治疗剂，以指导和促进个体的免疫系统抵御产生靶蛋白的过度增殖细胞。

[0236] 在治疗或者预防癌中，不含细胞的实施方案是尤其有用的。

[0237] 本发明提供了治疗自身免疫疾病和病症个体患者的方法，该方法可赋予对抗自身免疫相关靶抗原，包括细胞受体和能产生针对“自身抗原”的抗体细胞的广泛保护性基础免疫应答。

[0238] T 细胞介导的自身免疫疾病包括类风湿关节炎 (RA)、多发性硬化症 (MS)、斯耶格伦综合征 (Sjogren syndrome)、肉样瘤病、胰岛素依赖性糖尿病 ((IDDM)、自身免疫甲状腺炎、反应性关节炎、强直性脊柱炎、硬皮病、多肌炎、皮炎、银屑病、脉管炎、韦格纳氏肉芽肿病、克罗恩病和溃疡性结肠炎。上述各种疾病的特征是 T 细胞受体结合内源性抗原，进而引发自身免疫疾病相关的炎性级联反应。针对 T 细胞（受体）可变区的疫苗接种将引发包括 CTL 在内的免疫应答而消除那些 T 细胞。

[0239] 在 RA 中，已特征鉴定到参与该疾病的 T 细胞受体 (TCR) 的几个特异性可变区。这些 TCR 包括  $V\beta-3$ 、 $V\beta-14$ 、 $20V\beta-17$  和  $V\alpha-17$ 。因此，可用编码这些蛋白中至少一种的 DNA 构建物作为疫苗接种，以引发靶向参与 RA 的 T 细胞的免疫应答。参见文献：Howell, M.D. 等，1991Proc.Nat.Acad.Sci.USA 88：10921-10925；Piliard, X. 等，1991Science 253：325-329；Williams, W.V. 等，1992J Clin.Invest.90：326-333，这些文献以引用方式并入本文。在多发性硬化症 (MS) 中，已特征鉴定到参与该疾病的 TCR 的几个特异性可变区。这些 TCR 包括  $V\beta P$  和  $V\alpha-10$ 。因此，可用编码这些蛋白中至少一

种的 DNA 构建物作为疫苗接种，以引发靶向参与 MS 的 T 细胞的免疫应答。参见文献：Wucherpfennig, K.W. 等, 1990 *Science* 248 : 1016-1019 ; Oksenberg, J.R. 等, 1990 *Nature* 345 : 344-346, 这些文献以引用方式并入本文。

[0240] 在硬皮病中, 已特征鉴定到参与该疾病的 TCR 的几个特异性可变区。这些 TCR 包括:  $V\beta-6$ 、 $V\beta-8$ 、 $V\beta-14$  以及  $V\alpha-16$ 、 $V\alpha-3C$ 、 $V\alpha-7$ 、 $V\alpha-14$ 、 $V\alpha-15$ 、 $V\alpha-16$ 、 $V\alpha-28$  和  $V\alpha-12$ 。因此, 可用编码这些蛋白中至少一种的 DNA 构建物作为疫苗接种, 以引发靶向参与硬皮病的 T 细胞的免疫应答。

[0241] 为治疗 T 细胞介导的自身免疫疾病患者, 尤其是 TCR 可变区尚未特征鉴定的患者, 可以进行滑膜活检。可提取含 T 细胞的样品, 用标准技术鉴定那些 TCR 的可变区。利用这些信息制备基因疫苗。

[0242] B 细胞介导的自身免疫疾病包括狼疮 (SLE)、格雷夫斯病、重症肌无力、自身免疫溶血性贫血、自身免疫血小板减少症、哮喘、冷球蛋白血症、原发性胆管纤维硬化 (primary biliary sclerosis) 和恶性贫血。这些疾病各自的特征是抗体结合内源性抗原, 进而引发自身免疫疾病相关的炎性级联反应。针对抗体的这种可变区的疫苗接种, 可引发包括 CTL 在内的免疫应答以消除产生这种抗体的 B 细胞。

[0243] 为治疗 B 细胞介导的自身免疫疾病患者, 必须鉴定参与自身免疫活动的抗体的可变区。可进行活检, 提取炎症部位存在的抗体样品。用标准技术鉴定那些抗体的可变区。利用该信息制备基因疫苗。

[0244] 在 SLE 病例中, 认为一种抗原是 DNA。因此, 可以筛检待免疫接种以抵御 SLE 的患者血清中的抗 DAN 抗体, 制备包含编码在其血清中发现的抗 DNA 抗体可变区的 DNA 构建物的疫苗。

[0245] TCR 和抗体可变区的共同结构特征是公知的。通常可用以下公知的方法发现编码特定 TCR 或抗体的 DNA 序列, 例如以引用方式并入本文的文献: Kabat 等, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, U.S.Department of Health and Human Services, 1987, 贝塞斯达市 (Bethesda), 马里兰州所述的方法。此外, 克隆抗体的功能性可变区的通用方法可参见以引用方式并入本文的文献: Chaudhary, V.K. 等, *Proc.Natl.Acad Sci.USA* 87 : 1066, 1990。

[0246] 除外使用可表达形式的免疫调节蛋白编码序列来改进基因疫苗, 本发明涉及改进的减毒活疫苗和改进的疫苗, 它们使用重组载体以传递编码抗原的异体基因。减毒活疫苗和那些使用重组载体以传递异体基因的例子描述于美国专利号为 4,722,848、5,017,487、5,077,044、5,110,587、5,112,749、5,174,993、5,223,424、5,225,336、5,240,703、5,242,829、5,294,441、5,294,548、5,310,668、5,387,744、5,389,368、5,424,065、5,451,499、5,453,364、5,462,734、5,470,734 和 5,482,713, 它们均以引用方式并入本文。提供基因构建物, 其包括编码 IL-28 或其功能片段的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列可操作地连接于调节性的序列, 该调节性的序列可以用于疫苗以影响表达。将基因构建物引入减毒活疫苗和重组疫苗以生产根据本发明的改进的疫苗。

[0247] 本发明提供了改进的使个体免疫的方法, 该方法包括: 将基因构建物作为疫苗组合物的部分传递至个体的细胞的步骤, 该疫苗组合物包括 DNA 疫苗、减毒活疫苗和重组疫苗。基因构建物包含编码 IL-28 或者 IL-28 的功能片段的核苷酸序列, 该核苷酸序

列可操作地连接于调节性的序列，该调节性的序列能够在疫苗中起作用而影响表达。该改进的疫苗导致增强的细胞免疫应答。

## 实施例

### [0248] 实施例 1

[0249] IL-28 是最新一类的干扰素（干扰素  $\lambda$ ）之一，它具有包含 IL-28R  $\alpha$  和 IL-10R  $\beta$  的异源双体的受体。由于 IL-10R  $\beta$  链也是 IL-10 受体的一部分，在接种研究中采用 IL-28 以期阻滞 IL-10 与其靶受体的结合。

[0250] 与采用其中唯一的质粒仅是 Gag 质粒的组合物进行免疫的小鼠相比，采用质粒 HIV Gag 构建物来引入质粒 IL-28 显著增强小鼠脾细胞的干扰素  $\gamma$  应答。使用空载体（pVAX）、多进化枝 HIV Gag 构建物（HIV Gag- 将质粒 HIV Gag 10  $\mu$ g DNA 混合于 30  $\mu$ l 柠檬酸钠布比卡因水溶液而得到）或者具有 IL-28 质粒的 HIV Gag 构建物（HIV Gag IL-28- 将质粒 HIV Gag 10  $\mu$ g DNA+ 质粒 IL-28 5  $\mu$ g DNA 混合于 30  $\mu$ l 柠檬酸钠布比卡因水溶液而得到）对小鼠进行免疫。如图 1 中的数据所示，与仅采用 HIV Gag 的情况相比，IL-28 将 ELI 斑点数目增加了大于 7 倍。

[0251] 另外惊奇的是，使用流式细胞计量术对脾细胞进行的分析表明 IL-28 增加了脾脏 CD8T 细胞。按上述方法对小鼠进行免疫，并通过流式细胞计量术对 CD8T 细胞的百分率进行分析。如图 2 中的数据所示，与仅采用 pVAX 进行免疫的情况相比，加入 IL-28 将 CD8T 细胞的百分率增加了 4.72%，这个提高为 CD8 总量的约 20%。与仅采用 pVAX 进行免疫的小鼠相比，仅使用 HIV Gag 构建物进行免疫的小鼠的 CD8T 细胞的百分率增加了仅 0.48%，这个提高为 CD8 总量的约 2%。（白条表示相对于 pVAX 比较例，CD8 增加的百分率）

[0252] 因此，虽然之前采用干扰素作为接种中的佐剂显示出令人失望的结果，本文的结果表明，IL-28 在接种（特别是，DNA 接种）中是一种有效的佐剂。

### [0253] 实施例 2

[0254] 使用空载体 1) HIV Gag 构建物（HIV Gag- 将质粒 HIV Gag 10  $\mu$ g DNA 混合于 30  $\mu$ l 柠檬酸钠布比卡因水溶液而得到）或者 2) 具有 IL-28 质粒的 HIV Gag 构建物（HIV Gag IL-28- 将质粒 HIV Gag 10  $\mu$ g DNA+ 质粒 IL-28 3  $\mu$ g DNA 混合于 30  $\mu$ l 柠檬酸钠布比卡因水溶液而得到）或者具有 IL-28 蛋白的 HIV Gag 构建物（HIV Gag IL-28- 将质粒 HIV Gag 10  $\mu$ g DNA+40ng IL-28 蛋白混合于 30  $\mu$ l 柠檬酸钠布比卡因水溶液而得到）或者 4) 具有干扰素  $\gamma$  蛋白的 HIV Gag 构建物（HIV Gag IL-28- 将质粒 HIV Gag 10  $\mu$ g DNA+40ng 干扰素  $\gamma$  蛋白混合于 30  $\mu$ l 柠檬酸钠布比卡因水溶液而得到）对小鼠进行免疫。

[0255] 使用 ELI 斑点，与仅采用 HIV Gag 的情况相比，接受质粒 IL-28 的小鼠显示出增加的抗 Gag 免疫应答。与仅采用 HIV Gag 的情况相比，IL-28 蛋白和干扰素  $\gamma$  蛋白均不增加抗 Gag 免疫应答。

### [0256] 实施例 3

[0257] 尽管已建议在小鼠的 DNA 接种研究中使用 IL-28B (IFN  $\lambda$  3) 作为有效的佐剂，但是在较大的动物（如，非人类灵长类动物）中，关于它在增强抗原特异性免疫方面的有效性，仍没有研究。我们想要在针对 HIV 抗原作为免疫佐剂这些动物中测试密码子和

RNA 优化的质粒编码恒河猴 IL-28B。在该方法中，佐剂质粒的优化不仅提高了编码的基因的表达并稳定所获的 RNA 的结构，而且还降低了整合到宿主基因组的潜力并消除任何可能有被通过该基因编码的微 RNA，造成了高安全性特性。通过采用 macIL-28B 或者空载体对横纹肌肉瘤 (RD) 细胞系进行体外转染来对猕猴 IL-28B (macIL-28B) 的表达进行分析。转染 48 小时后通过 ELISA 法检测时，采集自采用 macIL-28B 而没采用空载体转染的细胞的上清液显示出存在有大量的猕猴 macIL-28B 质粒，表明高度的质粒表达 (图 3)。

[0258] 当看到高度的体外表达后，我们决定将 macIL-28B 加入针对恒河猴的 HIV Pol 的免疫疗法中。免疫 2 次后，采用 ELI 斑点计量，IL-28B 的加入造成 HIV Pol 特异性的 IFN  $\gamma$  释放量增加约 3 倍 (图 4)。这些数据表明，macIL-28B 质粒是一种新颖的表达高水平的 IL-28B 的方法，可用作 DNA 接种的非人类灵长类动物模型的有效免疫佐剂。

[0259] 实施例 4

[0260] 提高免疫应答的效能在关于致命的病原体的疫苗的问题中是最重要的。IL-28B 属于新描述的干扰素 Lambda (干扰素  $\lambda$ ) 细胞因子家族，尚未评估其影响适应性的免疫应答或作为疫苗佐剂的潜在能力。在 DNA 接种中，我们比较了质粒编码的 IL-28B 与 IL-12 的刺激对于多进化枝共有序列 HIV Gag 质粒的免疫应答的能力。我们在这里示出了：如 IL-12，IL-28B 能够显著增强适合性的免疫性。此外，我们第一次描述了在 DNA 接种中 IL-28B 如何减少调节性的 T 细胞数，而 IL-12 增加该细胞子集。我们还示出了：不同于 IL-12，IL-28B 能够增加已接种疫苗的动物的脾的 CD8+T 细胞的百分率，而这些细胞是更细化的，与取自接受 IL-12 作为佐剂的动物的细胞相比，具有较高的抗原特异性溶细胞脱粒。最后，我们报道了在致命的流感攻击后，IL-28B 可诱导对于死亡的 100% 的保障。这些数据表明，IL-28B 是一种用于进一步研究疫苗或免疫疗法方案的强大的候选项。

[0261] 引言

[0262] 对免疫系统及其组成部分有一个全面的理解，不仅对于理解感染过程中宿主 - 病原体的相互作用而且对于疫苗开发和设计都是关键的。对于免疫相关的信号化合物 (例如，如细胞因子)，接种的研究还可给我们一种研究这些分子如何影响抗原特异性免疫应答的手段。

[0263] DNA 接种是一种体内诱导抗原特异性的免疫应答的安全而有效的方法<sup>1-3</sup>，其提供自身于免疫调节剂的引入。其易于将质粒编码细胞因子添加到 DNA 接种平台的能力使得能够同时评估细胞因子如何影响适应性免疫应答并确定其作为疫苗佐剂的潜在价值。此外，具有优化的 DNA 配方的非人灵长类动物的最近数据显示出更理想的免疫特性。对这些令人鼓舞的结果进行提高，是一个重要的目标。

[0264] 干扰素  $\lambda$  系列包括三个最近发现细胞因子：IL-29、IL-28A 和 IL-28B (分别为 IFN  $\lambda$  1、2 和 3)<sup>4-7</sup>。所有 3 种细胞因子已被证实对在体外病毒感染的应答中被表达，并主要通过树状细胞和巨噬细胞分泌<sup>4-7</sup>。此外，将所有 3 种细胞因子列为干扰素是由于这一事实：由于通过 IL-28 受体的 STAT、IRF 和 ISGF 活化，采用这些细胞因子治疗细胞可诱导抗病毒的状态，该状态抑制病毒在培养体中复制<sup>4-7</sup>。尽管在各种白细胞 (包括 T 淋巴细胞) 上已显示受体表达<sup>8</sup>，对于 IL-28 的形成抗原特异性的适合性免疫应答的相对能

力，并没有被广泛地研究到这种程度。

[0265] 在本研究中，我们分析了 IL-28B 在 DNA 接种设置中作为佐剂的能力，并比较其和 IL-12 的加强免疫应答的能力，IL-12 为有效的、也许是目前最好的 DNA 免疫佐剂<sup>9-13</sup>。为此，我们表征了 IL-28B 对于抗原特异性的适合性的免疫应答的影响，人们尚未对这种影响进行研究。通过 IFN  $\gamma$  ELI 斑点进行计量并通过流式细胞计量术对穿孔素进行检测，发现引入质粒编码的 IL-28B 或者 IL-12 导致抗原特异性的细胞免疫应答相对于仅使用抗原接种的情况有所增加。IL-28B 还进一步提高抗原特异性 IgG2a、抗原特异性的溶细胞脱粒及脾中发现的 CD8<sup>+</sup>T 细胞的百分率，而 IL-12 却不能。此外，我们发现，IL-28B 佐剂减少已接种疫苗的动物的脾中发现的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup>(Treg) 细胞的数量，而 IL-12 增加这个数量。最后，我们在这里示出，当用作对小鼠接种的佐剂时，IL-28B 能增强这种形式的免疫应答，从而在致命的流感攻击后，导致避免死亡的 100% 保护。本研究表明，IL-28B 可以作为体内细胞免疫的有效的佐剂，是本研究第一次描述了 IL-28B 和 IL-12 对于 Treg 群体在 DNA 接种后的不同影响。这构成了对于 IL-28B 在体内形成适应性的免疫应答能力的第一个主要分析。

[0266] 材料和方法

[0267] 质粒描述了编码鼠科 p35 和 p40 蛋白的 IL-12 质粒<sup>11, 14</sup>。鼠科 IL-28B 具有添加到该基因的 5' 端的高效的引导序列、并被合成、密码子优化、随后由 GeneArt (Renensberg, 德国) 克隆到 pVAX1 主链。按照现有的说明<sup>15</sup>，制备表达 HIV-1Gag (Gag4Y) 的质粒。

[0268] 动物将所有动物安置在宾夕法尼亚大学的温度控制、光循环的设施中，并根据美国国家卫生局 (National Institutes of Health) 和宾夕法尼亚大学的指南进行照顾。所有的动物试验按照美国国家卫生局的动物照护指南进行，并获得了宾夕法尼亚大学审查委员会 (the Institutional Review Board of the University of Pennsylvania) 的批准。

[0269] 小鼠的免疫按照现有的说明<sup>16</sup>，将 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 (杰克逊实验室) 的股四头肌注射 2 次 (之间间隔 2 周)，并使用 CELLECTRA<sup>®</sup> 适合性恒流设备 (VGX Pharmaceuticals 公司, The Woodlands 市, 德克萨斯州) 电穿孔。对于小鼠试验，根据试验使用 10  $\mu$ g 的 pVAX1 或者 10  $\mu$ g 的 HIV-1Gag (Gag4Y) 或者仅 Influenza NP (NP) 或者各种量的鼠科 IL-12 或者鼠科 IL-28B 质粒。各种基因质粒的联合给药涉及在注射 0.25% 布比卡因 - 盐酸 (Sigma 公司) 等渗柠檬酸缓冲液至 30  $\mu$ l 的最终体积后，混合指定的 DNA 质粒。

[0270] ELI 斑点对 IFN-  $\gamma$  和 IL-4 均进行 ELI 斑点以检测免疫小鼠分泌的抗原特异性细胞因子。对每个生产方案 (R&D Systems) 使用 96 孔板 (Millipore) 进行 ELI 斑点。将 2x10<sup>5</sup> 免疫小鼠的脾细胞添加到孔板的每个孔中，在 37°C、5% CO<sub>2</sub>、并存在 R10 的 (阴性对比例)、刀豆蛋白 A (阳性对比例) 或特异性的肽 (HIV-1Gag) 抗原 (10  $\mu$ g/ml) 的条件下受激一夜。由文献 AIDS Reagent and Reference Repository (Frederick, MD) 获得了覆盖了整个蛋白、并重叠 11 个氨基酸的 HIV-1 Consensus Gag Clade C 十五肽。

[0271] 细胞培养和流式细胞计量术染色流洗涤采集自免疫小鼠的脾细胞，然后使用 R10 介质进行至最终浓度为 10<sup>7</sup> 细胞/ml。将细胞分别接种到 96 孔板中 (容积为 100  $\mu$ l)，然后加入另外的 100  $\mu$ l 介质 (阴性对比例)、含有 HIV-1 Consensus Gag Clade C 肽的介

质或含有 PMA 和离子霉素的介质（阳性对比例），将孔板置于 37°C。此时，在用来测量脱粒的培养物中，加入抗 CD107a PE 作为增强的污斑。在用来测量细胞内穿孔素的水平的培养物中，没有加入该抗体。对于这些培养物，在加入介质 10 分钟后，在这些培养物中加入肽或者 PMA/离子霉素、Mg<sup>+2</sup> 和 EGTA 至最终浓度分别为 6mM 和 8mM，从而抑制钙依赖性溶细胞脱粒<sup>17</sup>。将所有培养物在 37°C 孵育 6 小时。在孵育期的最后，将孔板剥离，用 PBS 洗涤两次。然后，在 37°C 下用紫染料（LIVE/DEAD Violet Viability Dye, Invitrogen 公司）染色 10 分钟以检验成活力。在用 PBS 进行如上洗涤后，在 4°C 下使用抗 CD4PerCPCy5.5 (BD Bioscience 公司) 和抗 CD8APCCy7 (BD Bioscience 公司) 将细胞染色，然后固定并透化 (Cytofix/Cytoperm Kit, BD Bioscience 公司)。加入抗 CD3PE-Cy5 (BD Bioscience 公司) 和抗穿孔素 APC (eBioscience 公司)，将细胞再次 4°C 下孵育。用 PBS 对细胞进行最后一次洗涤，并固定在 PFA 中（最终浓度为 1%）。对于涉及 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup> 细胞的流式细胞计量术，使用小鼠调节性的 T 细胞染色试剂盒 (eBioscience 公司)。使用抗 CD4FITC 和抗 CD25APC 按照上述方法进行外部染色。使用抗 FoxP3PE 按照上述方法进行固定、透化和内部染色。

[0272] 流感攻击免疫后 28 天，将麻醉小鼠滴鼻接种 10LD50 的 A/PuertoRico/8/34 的 30  $\mu$  l PBS 混合液<sup>16</sup>。所有小鼠攻击组每组均有 8 只小鼠。攻击后，记录 14 天的临床症状和死亡率，每天记录。

[0273] 统计给出的数据为从至少三个独立试验收集的数据计算出的平均值 (SE)，以平均值  $\pm$  标准差的形式给出。如果适当，在免疫组之间，使用配对 Student' s t 检验估计统计学的差，对每个试验组产生一个具体的 p 值。认为 p 值 < 0.05 的样本之间的比较在统计学上是不同的，因此显著。

[0274] 结果

[0275] 编码小鼠 IL-12 和 IL-28B 的质粒表达和分泌蛋白

[0276] 对于发现新的和改进的用于针对各种病毒性病原体接种的佐剂，有恒定的需要。过去，在用于接种研究时，IL-12 已被证明是一种有效的佐剂<sup>9-13</sup>。IL-28B 尚未被用于该目的。为了比较这些细胞因子增强抗原特异性免疫应答的相对能力，我们构建质粒编码小鼠 IL-12<sup>11</sup> 和小鼠 IL-28B 以用于 DNA 接种研究（图 5A 和 5B）。为了确认这些构建物是否表达 IL-12 和 IL-28B，我们采用 3  $\mu$  g 质粒通过 HEK 293T 细胞转染对它们进行体外测试。随后将细胞裂解和裂解产物用于 Western 印迹法，以测试蛋白的表达。鼠科 IL-12p40 和鼠科 IL-28B 蛋白示出两种构建物均体外表达良好（图 6A）。为了研究细胞因子的分泌到细胞外环境，转染后 48 小时，获得细胞上清液。进行 ELISAs 以从转染细胞培养物上清液检测 IL-12p35/p40 异源双体和 the IL-28B 蛋白的活性。如图 6B 所示，在转染细胞培养物上清液中，观察到 IL-12 和 IL-28B 均以大约 10,000pg/ml 的浓度存在。确认细胞因子从转染细胞的表达和释放后，我们开始接种研究，以测试这些细胞因子的佐剂抗原特异性免疫应答的能力。

[0277] 接种后 IL-28B 佐剂 HIV Gag- 特异性的 IFN  $\gamma$  释放

[0278] 为了确定 IL-28B 是否有可能用作免疫佐剂，我们在 DNA 接种研究中，将其与编码多进化枝共有序列 HIV-1Gag 蛋白 (Gag4Y) 组合作为我们的靶抗原。为了拥有一种比较 IL-28B 的佐剂效力的措施，我们将其与作为接种中常用佐剂的细胞因子 IL-12 进行比

较，这是基于这样的事实：现有技术中已证明 IL-12 具有非常有效的免疫佐剂效果<sup>9-13</sup>。为此，对 8 周龄的 BALB/c 小鼠组（每组 n = 4）的右后侧股四头肌肌肉注射 10 μg 的空 pVAX 载体（对比例）或者仅 10 μg 的 HIV Gag4Y 构建物，然后电穿孔。其他组接受 10 μg 的 HIV Gag4Y 与不同剂量的 IL-28B 或者 IL-12 的组合，然后也电穿孔。IFN γ ELI 斑点检测结果表明，虽然仅使用 Gag4Y 的免疫也能诱导小鼠中的细胞免疫应答（每百万脾细胞约 400SFU），引入 IL-28B 能够进一步提高所有剂量下的 Gag-特异性的 IFN γ 释放，测试若干倍（图 7A）。在 7 至 9 μg，IL-28B 示出最佳的佐剂效果（超出仅使用 Gag4Y 的效果 3 至 4 倍）（图 7A），导致我们使用该剂量进行进一步试验。在该检测中，在与 IL-28B 相同的剂量下，IL-12 也增加了 Gag-特异性的 IFN γ 释放，增加量超出仅使用 Gag4Y 的效果 3 倍（图 7A）。每个检测的分析显示，应答主要由 CD8+T 细胞介导（> 85% 的总应答），该特性并不受接种过程中是否存在佐剂的影响（数据未示出）。这些结果表明，IL-28B 实际上可以被用来在接种过程中增强抗原特异性免疫应答，并且其 IFN γ 释放量与 IL-12 的 IFN γ 释放量相当或比 IL-12 的 IFN γ 释放量更大，IL-12 是目前有效的免疫佐剂。

[0279] 经确认，IL-28B 可用于通过增加与 Th1 相关的细胞因子 IFN γ 的释放量来增加细胞免疫应答，我们接下来努力确定该佐剂是否会影响原型的 Th2 细胞因子的释放。因此，我们采用 IL-4ELI 斑点以与上述相同的方式来观察 IL-28B 如何影响这种 Th2 相关的细胞因子的释放。有趣的是，接种中引入 IL-12 使得所有剂量下的 Gag-特异性的 IL-4 释放得以增加，增加量为约 200 至约 600SFU（图 7B）。IFN γ ELI 斑点检测中 IL-12 的最佳剂量在 IL-4ELI 斑点检测中取得约 400 至约 450SFU 的增加量，而引入 IL-28B 并没有显示这种类型的影响。相反，接种中引入 IL-28B 取得的 IL-4 释放量与仅使用 HIV Gag4Y 构建物的 IL-4 释放量相当类似（图 7B），这表明了在这些剂量下，IL-28B 不会增加 IL-4 释放量而会增加 IFN γ 的释放量。因此，可认为，与 IL-12 相比，IL-28B 在接种中诱导更“纯粹”的 Th1 相关的细胞因子特性，因为 IL-28B 诱导 IFN γ（Th1 相关的）的释放但不诱导 IL-4（Th2 相关的）的释放

[0280] IL-28B 增加 HIV Gag 特异性的 IgG2a，而 IL-12 不会

[0281] 作为针对病毒性病原体的有效接种，可能既需要细胞免疫应答、又需要体液免疫应答，我们决定考察 IL-28B 和 IL-12 在接种中作为佐剂对于加强循环 HIV Gag-特异性的抗体水平的相对能力。为了实现这一目标，我们在抗原特异性的 ELISAs 测试中检测了取自免疫小鼠的血清。如图 8 所示，将 IL-12 或 IL-28B 和 HIV Gag4Y 构建物一起引入，得到了明显不同的抗体应答。关于总 Gag-特异性的 IgG，采用 Gag4Y 构建物与 IL-28B 构建物共同进行免疫，与仅采用 Gag4Y（在测试的最低稀释率下（1 : 25））的情况相比，抗原特异性的抗体水平略有增加（图 8A）。然而，采用 Gag4Y 免疫引入 IL-12 积极抑制抗原特异性的 IgG，其值与对比例（pVAX）小鼠的值非常接近。IL-12 的这一影响是在 DNA 接种中已报告过一种现象<sup>14</sup>，在当前的研究中对其也有支持。我们接下来考察不同亚型的 IgG（包括 IgG1 和 IgG2a），以确定对免疫极化的其他影响。IgG1 同种型与小鼠的 Th2 偏移相关，而 IgG2a 与 Th1 偏移相关<sup>18</sup>。不论是否引入佐剂，在我们的检测中，DNA 接种似乎都没有提高 Gag-特异性的 IgG1 抗体水平（图 8B）。然而，在接种中引入 IL-28B，与仅采用 HIV Gag4Y 进行接种疫苗的小鼠的血清相比，引起 IgG2a 增加了



大于 2 倍 (图 8C)。此外,在该检测中,IL-12 继续抑制抗体应答,这由以下事实证实:与对比组 (pVAX 组) 相比,IL-12 组中看不到 IgG2a 的增加。因此,IL-28B 似乎能够增加严重偏 Th1 型的抗原特异性的体液免疫应答,这与其对于细胞免疫应答的影响相符 (图 7A 和 7B)。

[0282] IL-28B 减少脾的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup> 细胞,而 IL-12 增加脾的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup> 细胞

[0283] IL-28B 是最近描述的 IFN  $\lambda$  家族的一员,因此也被称为 IFN  $\lambda$  3<sup>18-21</sup>。IFN  $\lambda$  家族的其他成员包括 IL-28A (IFN  $\lambda$  2) 和 IL-29 (IFN  $\lambda$  1)<sup>18-21</sup>。先前的研究显示,IL-29 可能参与免疫抑制和免疫耐受,这是因为:它可以驱使树状细胞在应答 IL-2 中专门诱导 CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞 (Treg 细胞) 增殖<sup>5</sup>。诱导或 Treg 细胞的扩大可以被认为是接种策略在一定设置范围内的缺点,并且此前人们还没有对 IL-28B 的影响该 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群的能力进行研究。由于 IL-28B 和 IL-29 属于同一个 IFN 家族,我们关注了它可能对 Treg 细胞数产生类似的影响的可能性。此外,我们研究了 IL-12 在这种类型的接种设置中对于 Treg 细胞的影响,该影响此前并没有被考察过。

[0284] 通过利用流式细胞计量术对 CD4、CD25 和 FOXP3 的表达进行观察 (图 9A),我们能够研究使用和不使用细胞因子佐剂进行接种对免疫小鼠的 Treg 细胞数的影响。该分析的结果表明,仅使用 HIV Gag4Y 构建物进行的免疫导致已接种疫苗的小鼠的脾 Treg 细胞的百分率出现小的、统计学上不显著的降低 (图 10B)。该结果与之前的报道相符,在所述报道中描述了接种后 Treg 细胞数发生类似的变化<sup>20</sup>。在接种中引入细胞因子佐剂以各种形式大大改变 Treg 细胞数。有趣的是,与仅使用 HIV Gag4Y 构建物进行免疫的小鼠相比,采用 IL-12 作为免疫佐剂显著增加已接种疫苗的小鼠的脾 Treg 细胞数 (图 9B)。这是这种现象在接种设置中的首次报道,并可能构成 IL-12 作为用于免疫的佐剂的一种以前未实现的显型。另外引起很大兴趣的是这样的事实:与仅使用 HIV Gag4Y 构建物进行免疫的小鼠相比,引入 IL-28B 作为用于接种的免疫佐剂显著鲜少了脾 Treg 细胞数 (图 9B)。这是 IL-28B 的这种能力的首次描述,并在用作用于接种的佐剂时,可能被看做这种细胞因子的重要的益处。此外,它表明了这样的可能性:虽然 IL-28B 和 IL-29 属于同一个 IFN 家族,它们之间仍可能有关键的差异。

[0285] 接受 IL-28B 的小鼠的脾细胞分泌更少的 TGF  $\beta$

[0286] 我们推断,有可能在接种中引入 IL-12 或 IL-28B 会显性地改变正常的 CD4<sup>+</sup>T 细胞使其看似 Treg 细胞,而不是诱导全功能性的 T 调节性的细胞的扩大。因此,为了确定这些细胞是否除了显性类似 Treg 细胞之外,还具有与 Treg 细胞一样的功能性,我们测量了来自已接种疫苗的小鼠的脾细胞的生产 TGF  $\beta$  的能力,这被认为是基于 Treg 细胞的非接触免疫抑制的主要中介物之一<sup>21</sup>。为了完成这点,我们使用 PMA 和离子霉素组合从每组小鼠培养脾细胞 48 小时,以确定 TGF  $\beta$  从活化细胞中释放。这段时期结束时,从细胞培养物中取出上清液,并将其用于 ELISAs 以检测 TGF  $\beta$ 。如图 9B 所示,对从接受 IL-12 作为佐剂的小鼠分离的脾细胞进行活化,与仅接受 Gag4Y 的小鼠相比,TGF  $\beta$  的生产显著增加 (图 9B)。该结果表明,通过流式细胞计量术观察,接受 IL-12 的小鼠和仅接受 HIV Gag4Y 的小鼠在 Treg 细胞数上的差异正确地识别了 Treg 细胞数。此外,当使用 PMA 和离子霉素活化时,从接受 IL-28B 作为佐剂的小鼠分离的脾细胞产生显著减

少的 TGF  $\beta$  (图 9B)。这再次支持了流式细胞计量术的数据, 该数据表明接受 IL-28B 的小鼠和仅接受 HIV Gag4Y 的小鼠在 Treg 细胞数上有差异。

[0287] 由于 IL-2 是诱导和扩大 Treg 细胞的关键细胞因子<sup>21</sup>, 我们推断, 已接种疫苗的组的 Treg 细胞数上的差异可能是由于 IL-2 产量的差异。为了测试这种可能性, 我们再次测量了细胞因子从各组分离的活化的脾细胞中的释放。IL-2 的从这些细胞产量显示在各组之间没有显著差异(数据未示出), 这表明在 DNA 接种后看出的 Treg 细胞数上的差异与其他机理有关。

[0288] IL-28B 增加脾的 CD8+T 细胞, 而 IL-12 不会

[0289] 一旦确定了 IL-28B 可能会影响脾的 Treg 细胞量, 我们决定调查是否该佐剂对于接种后其他类型的细胞的有类似的影响。为此, 对得自对比例和已接种疫苗的小鼠的脾细胞通过流式细胞计量术进行分析, 确定是否存在 CD8T 细胞 (CD3+/CD8+)。如图 10A 所示, 在对比例 (pVAX) 小鼠的脾脏中的 CD8T 细胞的百分率与仅接受 Gag4Y 构建物的小鼠或是接受 Gag4Y 构建物和 IL-12 佐剂的小鼠并没有显著不同。然而, 与所有其他组相比, 接受 IL-28B 作为佐剂的小鼠在脾脏中示出显著提高的 CD8T 细胞百分率, 这表明 IL-28B 能够扩大接种后脾的 CD8+T 细胞数。为了确定 IL-28B 的这种影响是否仅限于脾脏或可能出现在其他淋巴器官及周围血液中, 我们接下来分析了分离自每组小鼠的肠系膜淋巴结 (MLN) 以及循环 PBMC 的淋巴细胞。与对比例的小鼠相比, 仅使用 HIV Gag4Y 构建物进行免疫的小鼠, 其 MLN 中发现的 CD8+T 细胞数示出小的、统计学上不显著的增加。与仅接受 Gag4Y 的小鼠相比, 接受 IL-12 作为佐剂的小鼠, 其 MLN 中发现的 CD8+T 细胞数示出增加, 这个增加能够达到统计学上显著的水平(图 10A)。在免疫期间接受 IL-28B 和 HIV Gag4Y 构建物的小鼠, 其 CD8+T 细胞百分率的增加略高, 这个增加达到统计学上十分显著的水平 ( $p < .005$ )。周围血液中分离的淋巴细胞显示, 只有接受 IL-28B 作为佐剂的组发生 CD8+T 细胞数的增加, 这与脾脏出现的模式类似(图 10A)。这些结果表明, IL-28B 增加了免疫小鼠的脾脏及周围血液中的 CD8+T 细胞数的大小, 而两种佐剂均可以增加 MLN 种的 CD8+T 细胞。

[0290] IL-28B 显著增加 HIV Gag 特异性的 CD8+T 细胞穿孔素诱导和脱粒

[0291] 一旦确定了 IL-28B 对接种后的脾 CD8+T 细胞的百分率有重大影响, 我们决定对该细胞亚群进行进一步分析。之前曾表明, IL-12 可能影响 CD8+T 细胞的粒度<sup>19</sup>。如我们先前的试验所示, IL-28B (通过 IFN  $\gamma$  释放) 对细胞免疫性有强烈影响, 这个影响等于或大于 IL-12 的影响(图 7A), 我们疑问 IL-28B 是否以与 IL-12 同样的方式影响细胞粒度。因此, 我们设计试验来测量分离自每组小鼠的脾脏的 CD8+T 细胞中的穿孔素的抗原特异性的诱导。为了确定抗原特异性的上调量, 我们通过介质控制或一套重叠 HIVGag Clade C 肽培养了分离的脾细胞 6 小时, 然后对胞外和胞内染色以进行细胞标记和穿孔, 然后通过流式细胞计量术进行分析(图 10B)。为了防止溶细胞脱粒, 按照文献方法的描述向培养物中添加 EGTA 和  $Mg^{+2}$ <sup>17</sup>。这种刺激的结果列于图 10C。仅使用介质培养的来自各组的脾细胞中的 CD8+T 细胞示出大致相当量的穿孔素, 这表明无论使用或不使用佐剂, 接种疫苗对该体系的基础 CD8+T 细胞粒度没有明显的影响。使用重叠 HIVGag 肽刺激脾细胞则示出不同的结果。与比较例的小鼠相比, 仅使用 HIVGag4Y 构建物进行免疫的小鼠的脾细胞中的 CD8+T 细胞示出细胞百分率的适度增加, 该增加落入 Perforin<sup>hi</sup> 门范围(图

10B)。然而，从接受 IL-12 或者 IL-28B 的小鼠中获得的 CD8<sup>+</sup>T 细胞示出 Perforin<sup>hi</sup> cell 的增加，该增加明显高于仅接受 Gag4Y 构建物的小鼠中获得的增加（图 10C）。该结果与之前的 IL-12 可能会增加淋巴细胞的穿孔素的含量的报道是一致的<sup>22</sup>，并且是 IL-28B 的这种影响的第一次报道。

[0292] 由于已知 IL-28B 可能影响 CD8<sup>+</sup>T 细胞的穿孔素的含量，我们考查这种细胞因子佐剂是否也可能会影响抗原特异性脱粒。为了检验这点，我们以与测量穿孔素诱导同样的方式培养细胞，但是不向培养物中添加 EGTA 和 Mg<sup>+2</sup>，并且作为代替，在肽刺激的同时，添加 CD107a 的抗体（一种脱粒标记物）作为增强染色。再次将细胞染色作为细胞标记物，然后通过流式细胞计量术进行分析。我们观察到从仅接受 Gag4Y 构建物的小鼠中获得的 CD8<sup>+</sup>T 细胞显示低水平的抗原特异性的脱粒（图 10C）。与仅接受 Gag 构建物的小鼠相比，从接受 IL-12 和 HIV Gag4Y 构建物的小鼠中获得的 CD8<sup>+</sup>T 细胞显示出适度增加的抗原特异性的脱粒，但是该差别还达不到统计学上显著的水平。但是，没有接受佐剂的小鼠相比，在接种中接受 IL-28B 质粒作为佐剂的小鼠中获得的 CD8<sup>+</sup>T 细胞显示出显著增加的抗原特异性的脱粒（图 10C）。结果表明，在 DNA 接种中当使用 IL-28B 质粒作为佐剂时，IL-28B 引起重大而统计学上显著的 CD8<sup>+</sup>T 细胞脱粒。

[0293] IL-28B 保护体内免受致命的流感攻击

[0294] 由于我们对细胞免疫应答的检测显示，IL-28B 有可能作为 Th1 倾向性的细胞免疫辅的强力的佐剂，我们决定测试该细胞因子在体内保护免受致命的病毒攻击的能力。为了完成此测试，我们以上述方式对额外 4 套小鼠（每组 n = 8）进行免疫，然后电穿孔。对比例小鼠接受 10 μg 的空 pVAX 载体，而其他组小鼠接受 10 μg 的仅编码流感核蛋白 (NP) 的质粒或编码流感核蛋白 (NP) 以及 IL-12 或 IL-28B 的质粒。流感核蛋白是一种内部结构蛋白，没有暴露于病毒颗粒外。因此，免疫流感感染（其目标为 NP 蛋白）是细胞的，这与体液免疫性并列<sup>16</sup>。通过 IFN γ ELI 斑点对已接种疫苗的小鼠的细胞免疫性进行分析，结果表明，IL-12 和 IL-28B 佐剂以与增强对 HIV Gag4Y 构建物的应答基本相同的方式诱导增加的对于流感 NP 抗原的应答（图 11A）。免疫后经过 4 周的休息时间（图 11B），用 10LD50 的 H1N1 流感菌株对各组小鼠经鼻攻击：A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34)。在接下来的 14 天的整个过程中对小鼠进行监测，获得与病毒感染有关的死亡率。该试验结果显示，对照小鼠的攻击导致感染后 8 天 100% 死亡（图 11C）。接受 10 μg 的 NP 构建物的小鼠在接下来的 14 天的死亡率在 50%，这表明仅 NP 构建物不完全是足以起到保护作用。IL-12 在作为佐剂的攻击研究中，已被证明能够诱导对于病毒感染有关的死亡率的显著保护<sup>13, 14</sup>。本研究中也是如此，如事实所表现的那样：接受 IL-12 作为 NP 的佐剂的小鼠显示出对于感染导致的死亡的 100% 保护。此外，与我们以前的试验（其表明 IL-28B 可诱导有效的细胞免疫应答）一致，接受 IL-28B 作为 NP 的佐剂的小鼠在病毒攻击后显示出 100% 的生存率。该试验的结果表明，在 DNA 接种中当使用 IL-28B 作为佐剂时，能够诱导对于病毒感染有关的死亡率的体内 100% 的保护。

[0295] 讨论

[0296] 本研究显示，在 DNA 接种中当使用质粒编码的 IL-28B 作为佐剂时，能够有效诱导抗原特异性的免疫应答。IL-28B 能够以 Th1 倾向性的方式增强对于多进化枝 HIV Gag 抗原的抗原特异性的免疫应答，这由进行抗原特异性的 ELI 斑点检测时大大增强的 IFN γ

释放及在已接种疫苗的小鼠血清中检测到的提高的 Gag 特异性 IgG2a 的水平证明。此外，这是第一份描述 IL-28B 在 DNA 接种后减少脾 Treg 细胞数的能力的报告，该能力是该细胞因子的一个大的潜在益处。本文也显示了 IL-28B 能够提高脾 CD8+T 细胞数，而这些细胞在对同源抗原的应答中显示出增加的穿孔素诱导和脱粒。IL-28B 能够加强对小鼠在致命的病毒攻击模型中的保护的事实，形成了一个强有力的继续测试该细胞因子作为接种中的佐剂的条件。

[0297] 对比 IL-12 测定了 IL-28B 的影响，这是由于，已知 IL-12 是一种常常作为接种研究中的佐剂的非常有效的细胞因子<sup>9-13</sup>。这个比较的分析表明，IL-28B 在一些检测中（如果不是更好）至少和 IL-12 一样有效。此外，IL-28B 对接种提供了 IL-12 所不能提供的额外的益处，包括增加抗原特异性抗体的滴度，并增加脾 CD8+T 细胞数，能够更高度地抗原特异性的溶细胞脱粒。IL-28B 和 IL-12 对于 Treg 细胞数的影响有显著差异。这是第一份对 DNA 接种中诱导 Treg 细胞对 IL-12 应答的研究，也是第一次报导这种佐剂增加了所述细胞数。虽然该发现的影响尚不清楚，该结果可能支持 IL-28B 在特定的情况（细胞免疫性是最重要的情况）下更好。虽然最近的一份报告突出了 IL-12 受体对于在体内产生 Treg 细胞的重要性，但是接受 IL-12 的小鼠具有更大的 Treg 细胞数的特定机理仍不清楚，提示该细胞因子和 Treg 细胞数的诱导和扩大可能有关。IL-28B 减少 Treg 细胞数的能力似乎更可能是有针对性的机理，因为它能够增加 T 细胞的一些亚群 (CD8)，同时降低其他的 (Treg)。可能这也是通过 IL-28 受体介导的，尽管需要其他的对于具体机理的研究以验证。

[0298] 本文的结果包括构建对于 IL-28B 的体内功能的重要分析，并有助于我们开始认识 IL-28B 如何影响免疫应答。本文的数据表明，除了干扰素类功能，IL-28B 可以是适合性的免疫应答的调节剂，并且这种影响似乎主要注重 CD8+T 细胞的数量和细胞功能。IL-28B 除了能够形成抗原特异性的免疫应答之外还诱导抗病毒的状态这一事实表明，它具有独特的能力以补先天免疫和适应性免疫之间的差距。此外，相对于具体佐剂设置中的 IL-12，IL-28B 在免疫治疗方法中可能具有独特的作用。特别是作为肿瘤的免疫（其中耐受性尤其成为问题）中的佐剂，IL-28B 可能非常有用。需要进一步研究，以便合适地验证该点。

[0299] 参考文献

[0300] 1.Greenland JR, Letvin NL., 用于质粒 DNA 疫苗的佐剂 (Chemicaladjuvants for plasmid DNA vaccines), Vaccine, 2007 ; 25 : 3731-3741.

[0301] 2.Hokey DA, Weiner DB., HIV 用 DNA 疫苗：挑战和机会 (DNA vaccines for HIV : challenges and opportunities), Springer Semin Immunopathol., 2006 ; 28 : 267-279.

[0302] 3.Schoenly KA, Weiner DB., 人免疫缺陷型 1 型病毒疫苗开发：细胞毒性 T 淋巴细胞平台“多斑点事务”的最新进展 (Human immunodeficiencyvirus type 1 vaccine development : recent advances in the cytotoxic T-lymphocyte platform " spotty business" ), J Virol.2008 ; 82 : 3166-3180.

[0303] 4.Ank N, West H, Paludan SR., IFN- $\lambda$  : 新的抗病毒细胞因子 (IFN-lambda : novel antiviral cytokines), J Interferon Cytokine Res.2006 ; 26 : 373-379.

[0304] 5.Mennechet FJ, Uze G., 干扰素 - $\lambda$  处理的树突细胞特异性诱导 FOXP-3 表达

抑制 T 细胞的增殖 (Interferon- $\lambda$ -treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells), *Blood*.2006 ; 107 : 4417-4423.

[0305] 6. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W 等, IL-28、IL-29 和它们的 II 类细胞因子受体 IL-28R (IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R), *Nat Immunol*.2003 ; 4 : 63-68.

[0306] 7. Uze G, Monneron D., IL-28 和 IL-29 : 干扰素家族的新成员 (IL-28 and IL-29 : newcomers to the interferon family). *Biochimie*.2007 ; 89 : 729-734.

[0307] 8. Siebler J, Wirtz S, Weigmann B 等, IL-28A 是通过 T-盒转录因子 T-bet 进行的 T 细胞介导的肝损伤的关键调节子 (IL-28A is a key regulator of T-cell-mediated liver injury via the T-box transcription factor T-bet). *Gastroenterology*.2007 ; 132 : 358-371.

[0308] 9. Boyer JD, Robinson TM, Kutzler MA 等, SIV DNA 疫苗与 IL-12 表达质粒共给予提高了猕猴中的 CD8 SIV 细胞免疫应答 (SIV DNA vaccine co-administered with IL-12 expression plasmid enhances CD8 SIV cellular immune responses in cynomolgus macaques), *J Med Primatol*.2005 ; 34 : 262-270.

[0309] 10. Chong SY, Egan MA, Kutzler MA 等, 质粒 IL-12 和 IL-15 增强 SIV gag 质粒 DNA 疫苗引起的细胞免疫应答和体液免疫应答和改变猕猴中 SHIV (89.6P) 刺激后的疾病进展的能力比较 (Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIV gag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV (89.6P) challenge in rhesus macaques), *Vaccine*.2007 ; 25 : 4967-4982.

[0310] 11. Kim JJ, Maguire HC, Jr., Nottingham LK 等, 共给予 IL-12 或 IL-10 表达盒驱动免疫应答为 Th1 表型 (Co-administration of IL-12 or IL-10 expression cassettes drives immune responses toward a Th1 phenotype), *J Interferon Cytokine Res*.1998 ; 18 : 537-547.

[0311] 12. Morrow MP, Weiner DB. 细胞因子作为佐剂用于改善抗 HIV 应答 (Cytokines as adjuvants for improving anti-HIV responses), *AIDS*.2008 ; 22 : 333-338.

[0312] 13. Schadeck EB, Sidhu M, Egan MA 等, 猕猴中编码 IL-12 佐剂的质粒对 SIV gag 质粒 DNA 疫苗的剂量节约效果 (A dose sparing effect by plasmid encoded IL-12 adjuvant on a SIV gag-plasmid DNA vaccine in rhesus macaques), *Vaccine*.2006 ; 24 : 4677-4687.

[0313] 14. Sin JJ, Kim JJ, Arnold RL 等, IL-12 基因作为疱疹小鼠模型中的 DNA 疫苗佐剂 : IL-12 增强 Th1 型 CD4+T 细胞介导的针对单纯疱疹病毒-2 的刺激的保护性免疫 (IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model : IL-12 enhances Th1-type CD4+T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge), *J Immunol*.1999 ; 162 : 2912-2921.

[0314] 15. Hirao LA, Wu L, Khan AS, Satishchandran A, Draghia-Akli R, Weiner DB, 经由电穿孔的皮内 / 皮下免疫增强了质粒疫苗在猪和猕猴中的递送和效力 (Intradermal / subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques), *Vaccine*.2008 ; 26 : 440-448.

[0315] 16. Laddy DJ, Yan J, Kutzler M 等, 通过体内电穿孔合成的共有 DNA 抗原对

致病性人和禽类流感病毒的异亚型保护 (Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens), PLoS ONE.2008 ; 3 : e2517.

[0316] 17.Wilson JL, Heffler LC, Charo J, Scheynius A, Bejarano MT, Ljunggren HG, 通过自体同源的NK细胞实现人树突细胞的靶向 (Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells), J Immunol.1999 ; 163 : 6365-6370.

[0317] 18.DeKruyff RH, Rizzo LV, Umetsu DT, 通过 CD4+T 细胞克隆诱导免疫球蛋白合成 (Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+T cell clones), Semin Immunol.1993 ; 5 : 421-430.

[0318] 19.McFarland EJ, Harding PA, MaWhinney S, Schooley RT, Kuritzkes DR, IL-12 对来自 HIV 感染的儿童的 HIV 特异性 CTL 系的体外效果 (In vitro effects of IL-12 on HIV-1-specific CTL lines from HIV-1-infected children), J Immunol.1998 ; 161 : 513-519.

[0319] 20.Moore AC, Gallimore A, Draper SJ, Watkins KR, Gilbert SC, Hill AV, 抗 CD25 抗体增强疫苗诱导的免疫原性: 增加的持久的细胞免疫性和降低的免疫显性 (Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance) J Immunol.2005 ; 175 : 7264-7273.

[0320] 21.Tang Q, Bluestone JA. T<sub>H</sub>3 调节性 T 细胞: 所有交易的支持物、调节的主导者 (The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation), Nat Immunol.2008 ; 9 : 239-244.

[0321] 22.Rubio V, Stuge TB, Singh N 等, 肿瘤-细胞毒性 T 细胞的离体鉴定、分离和分析 (Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells), Nat Med.2003 ; 9 : 1377-1382.

[0322] 23.Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD 等, HIV-1 肽疫苗的粘膜免疫在小鼠中诱导针对直肠内重组 HIV-1 刺激和全身细胞毒性 T 淋巴细胞和保护性免疫 (Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-1 challenge), Proc Natl Acad Sci USA.1998 ; 95 : 1709-1714.

[0323] 24.Zhao Z, Yu S, Fitzgerald DC 等, IL-12R $\beta$ 2 促进 CD4<sub>+</sub>CD25<sub>+</sub> 调节性 T 细胞的发育 (IL-12R $\beta$ 2 promotes the development of CD4<sub>+</sub>CD25<sub>+</sub> regulatory T cells), J Immunol.2008 ; 181 : 3870-3876.

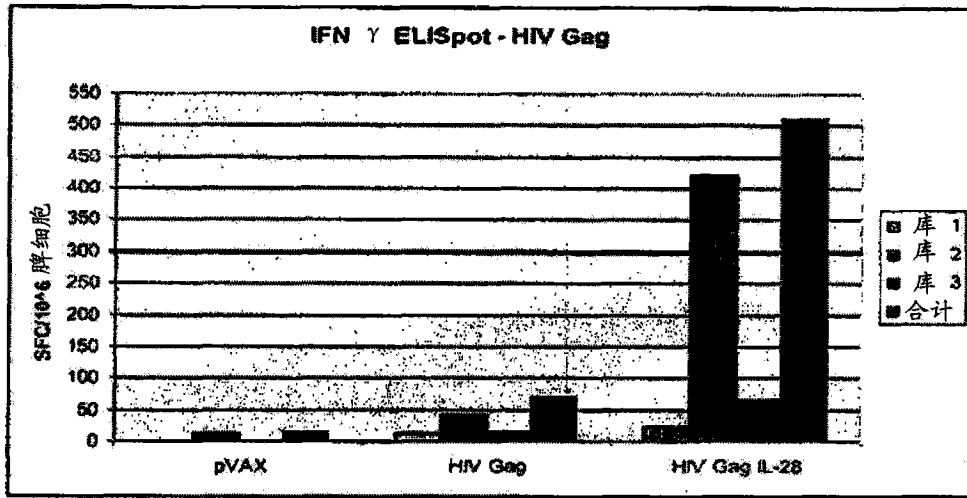


图 1

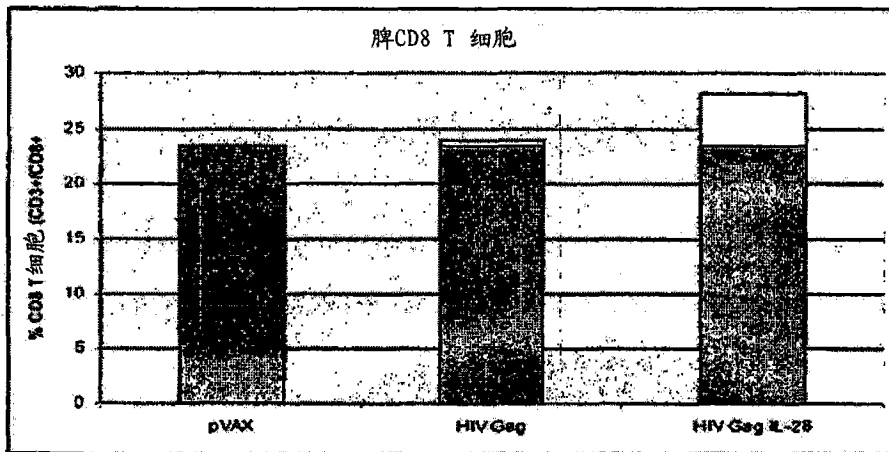


图 2

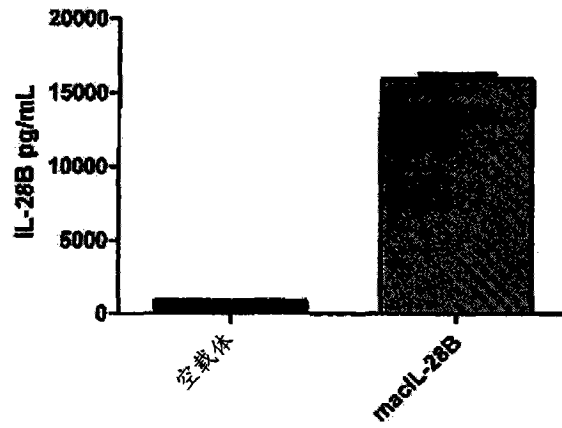


图 3

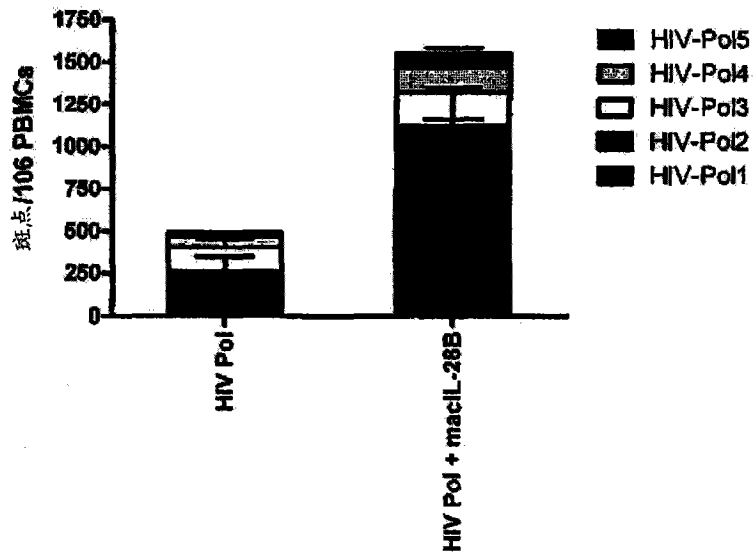


图 4



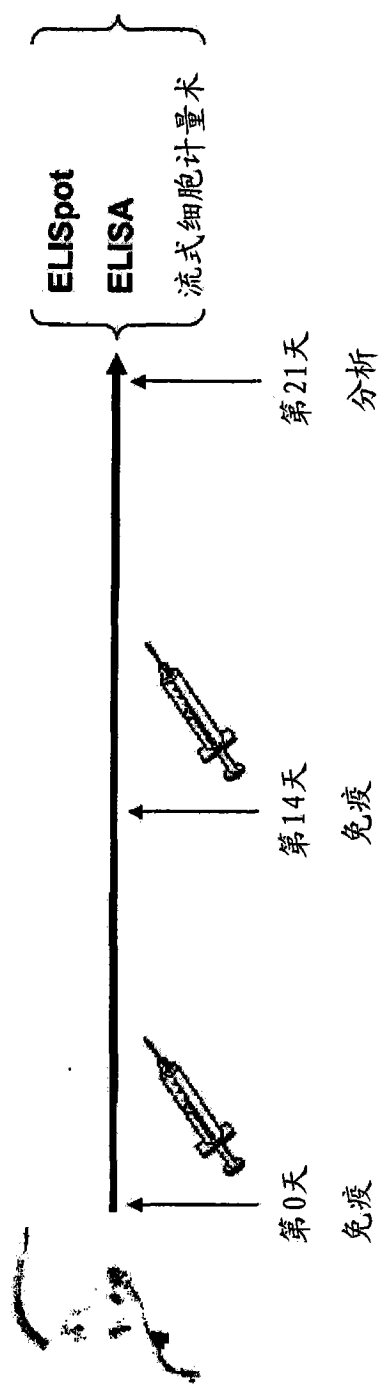


图 5A

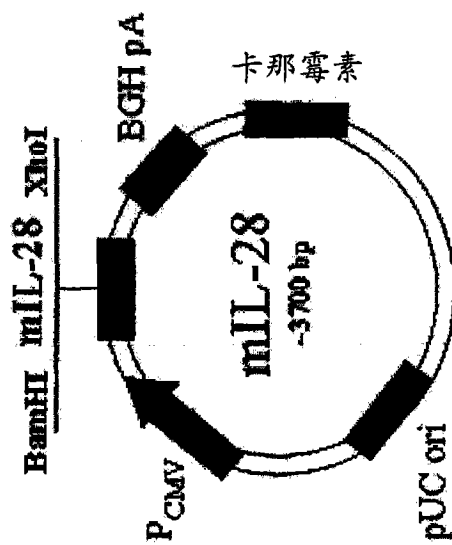
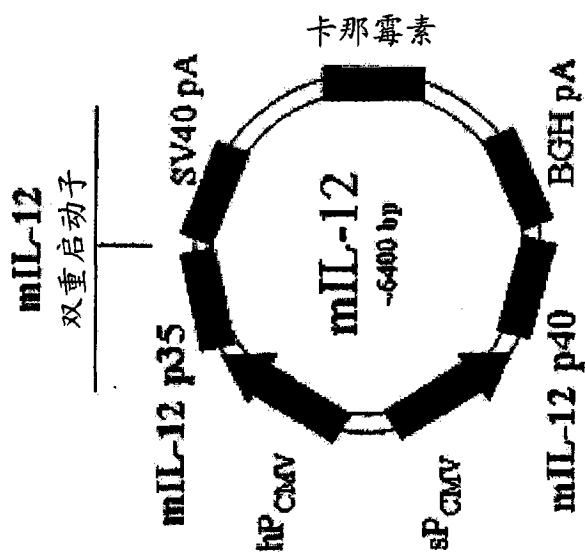


图 5B

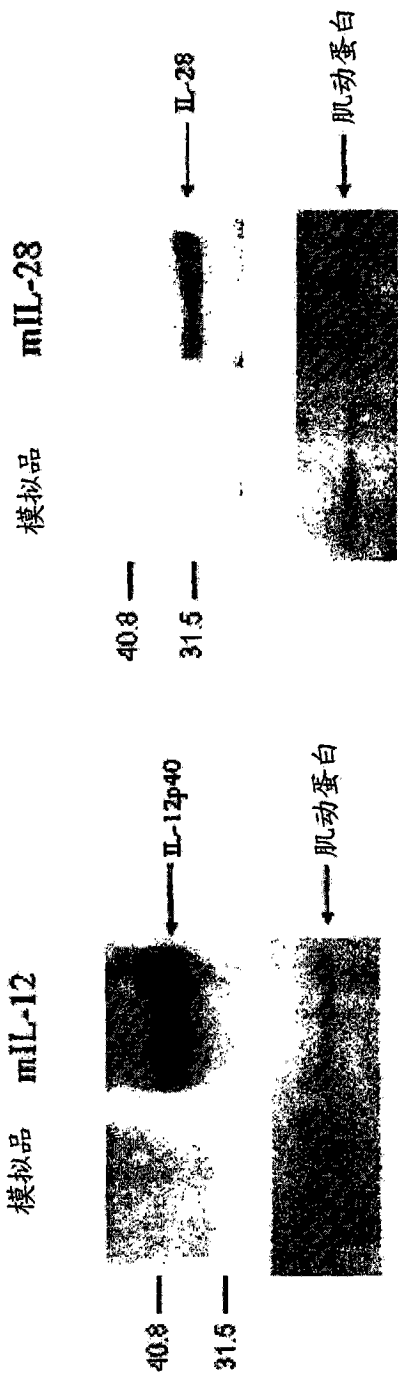


图 6A

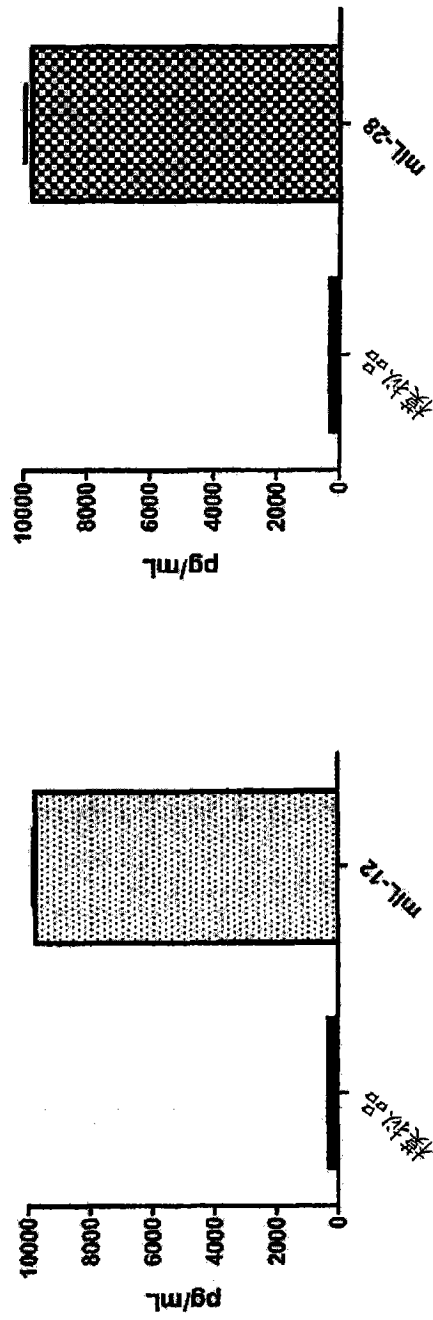


图 6B

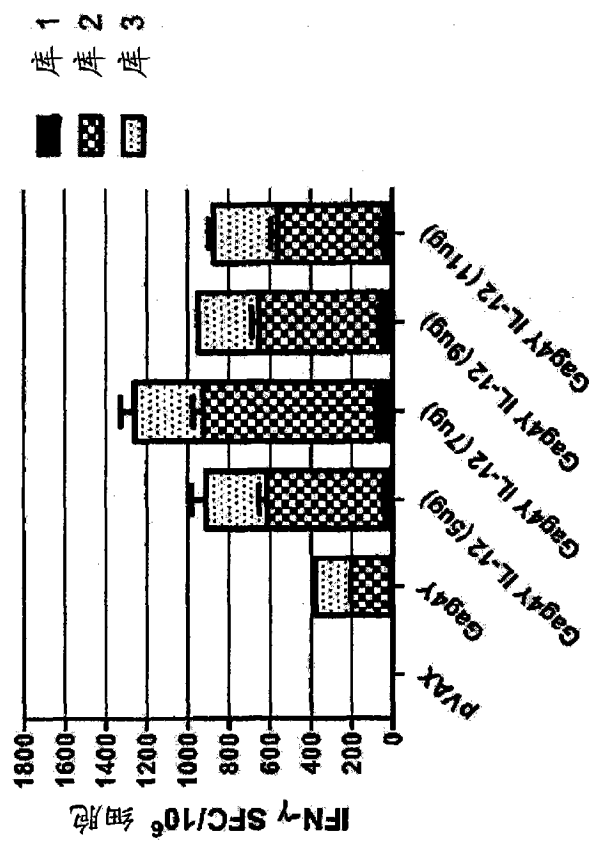
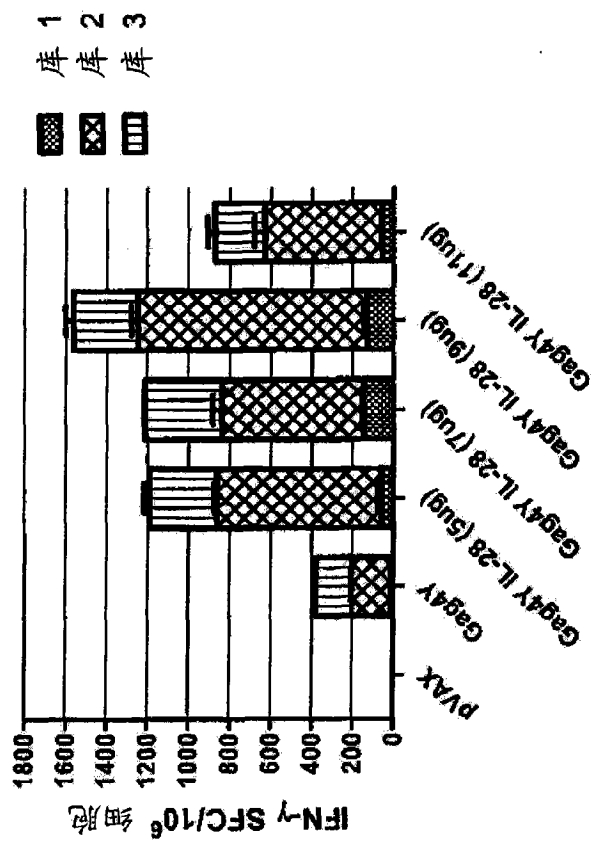


图 7A

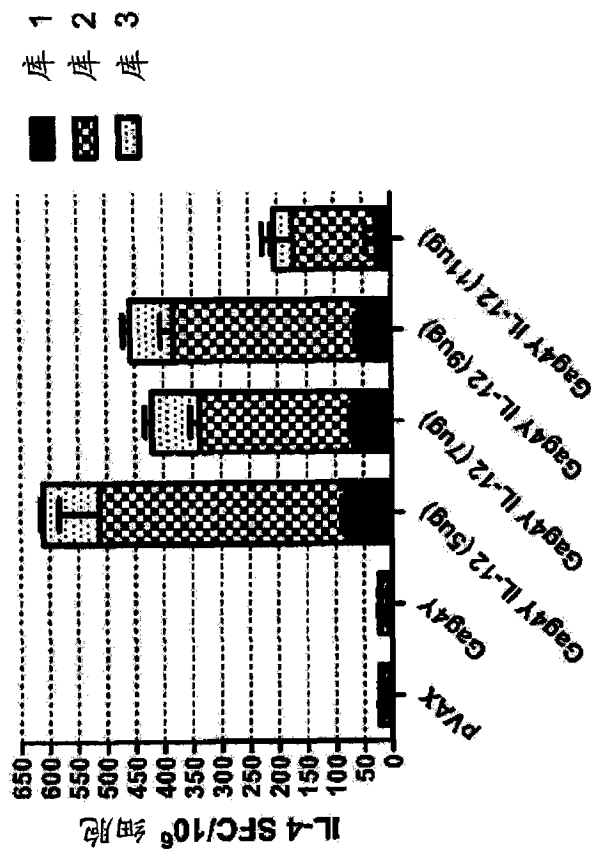
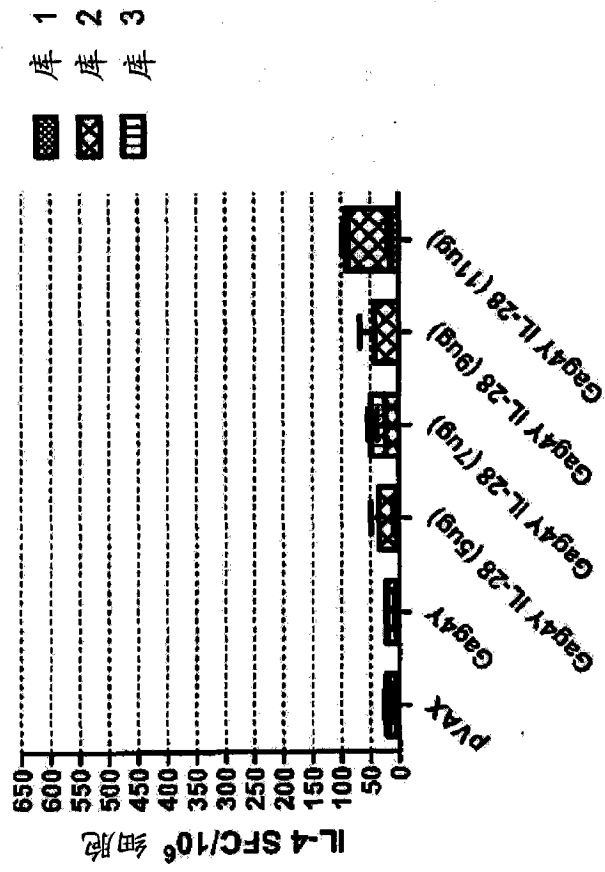


图 7B

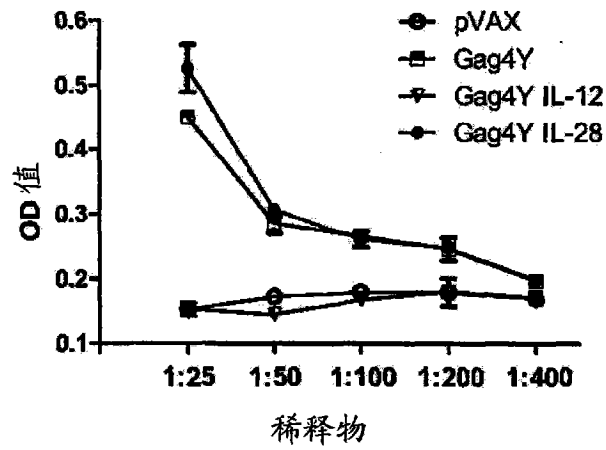


图 8A

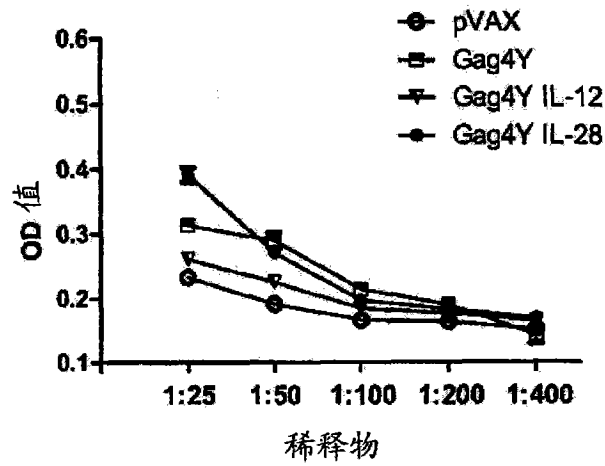


图 8B

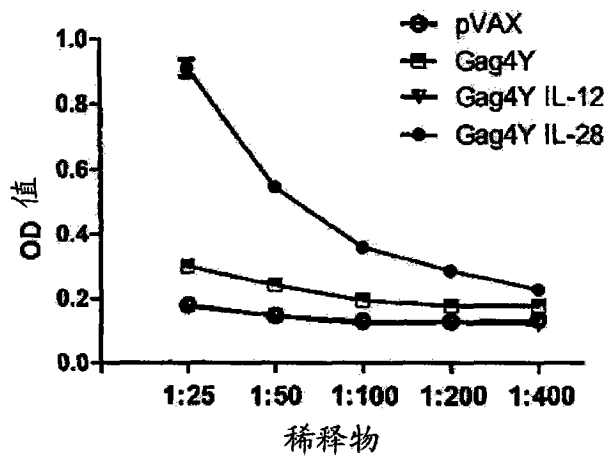


图 8C

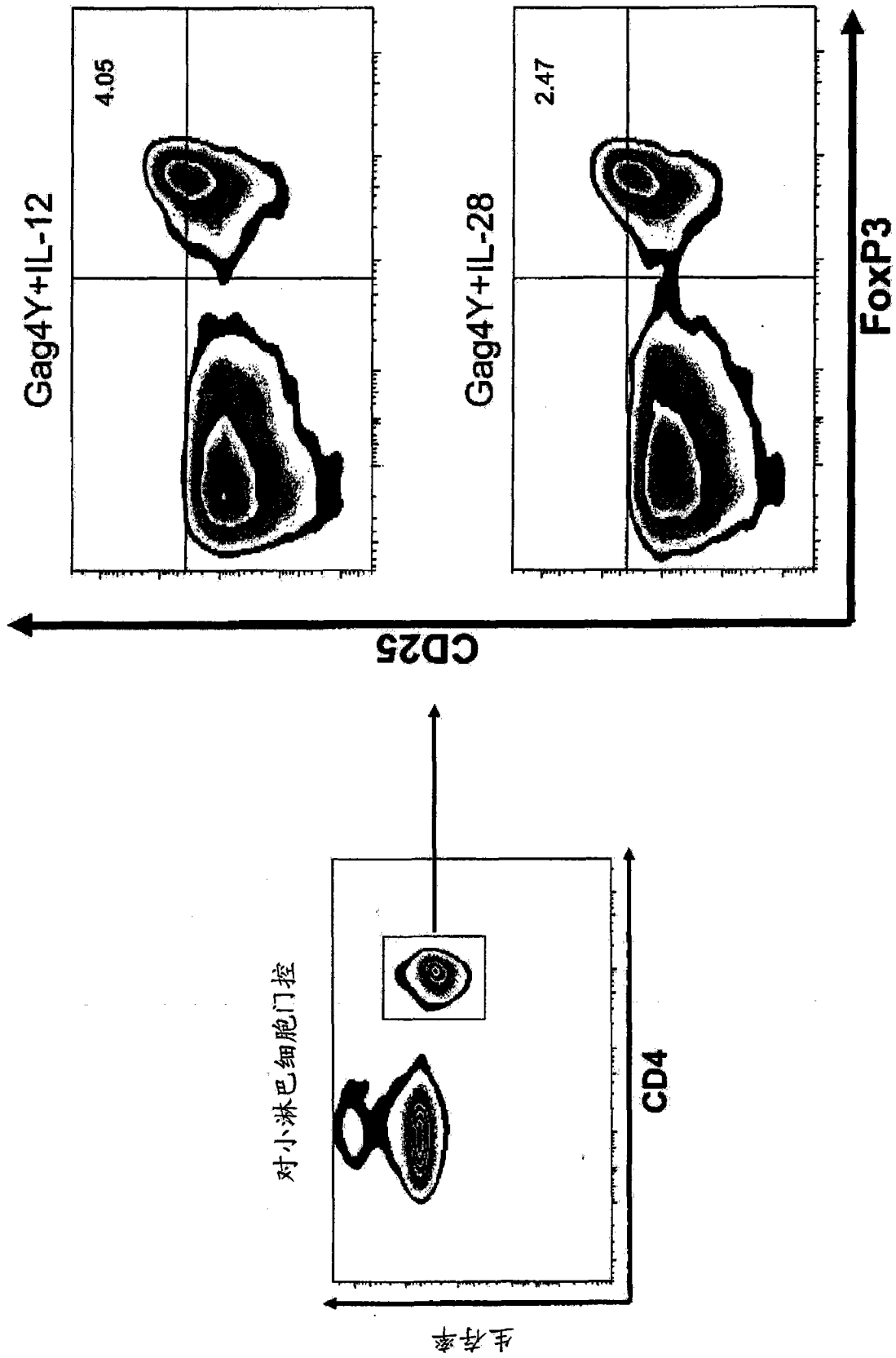


图 9A

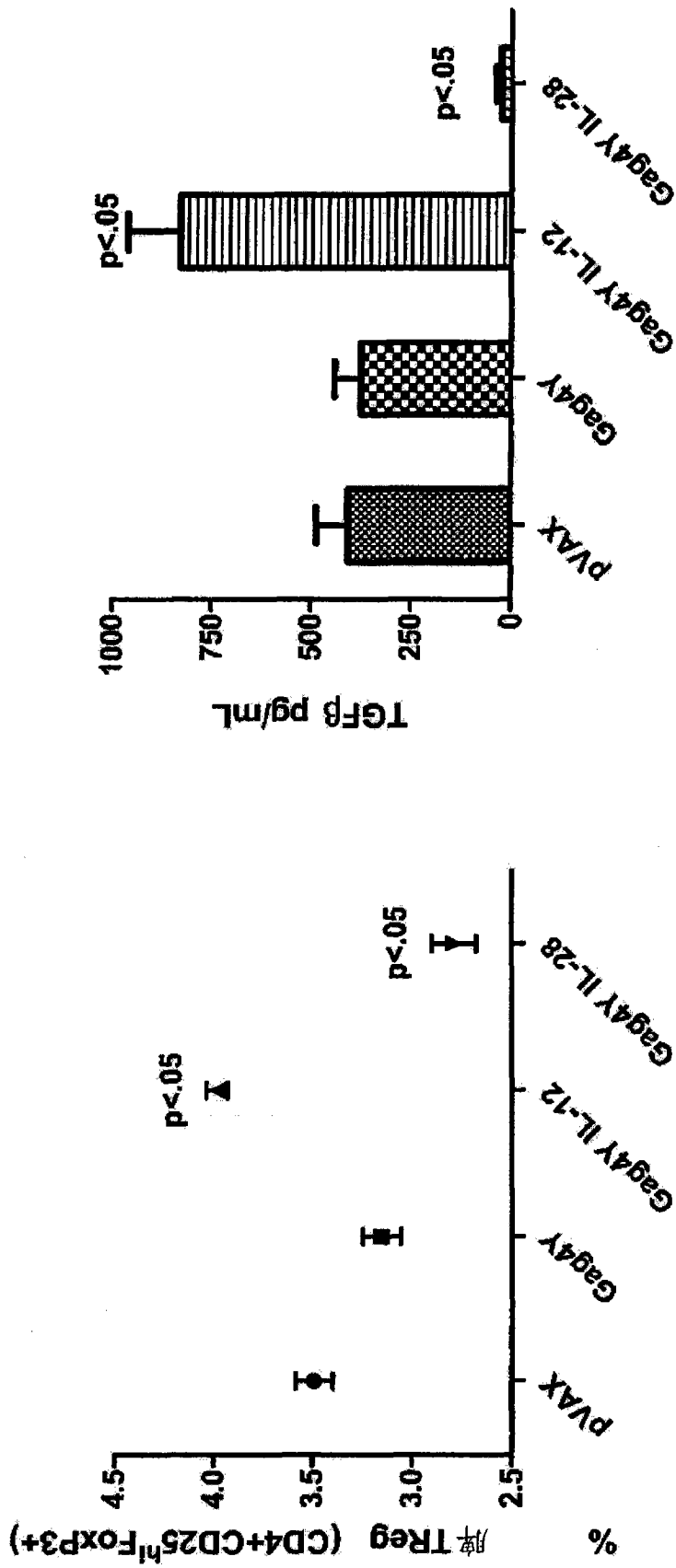


图 9B

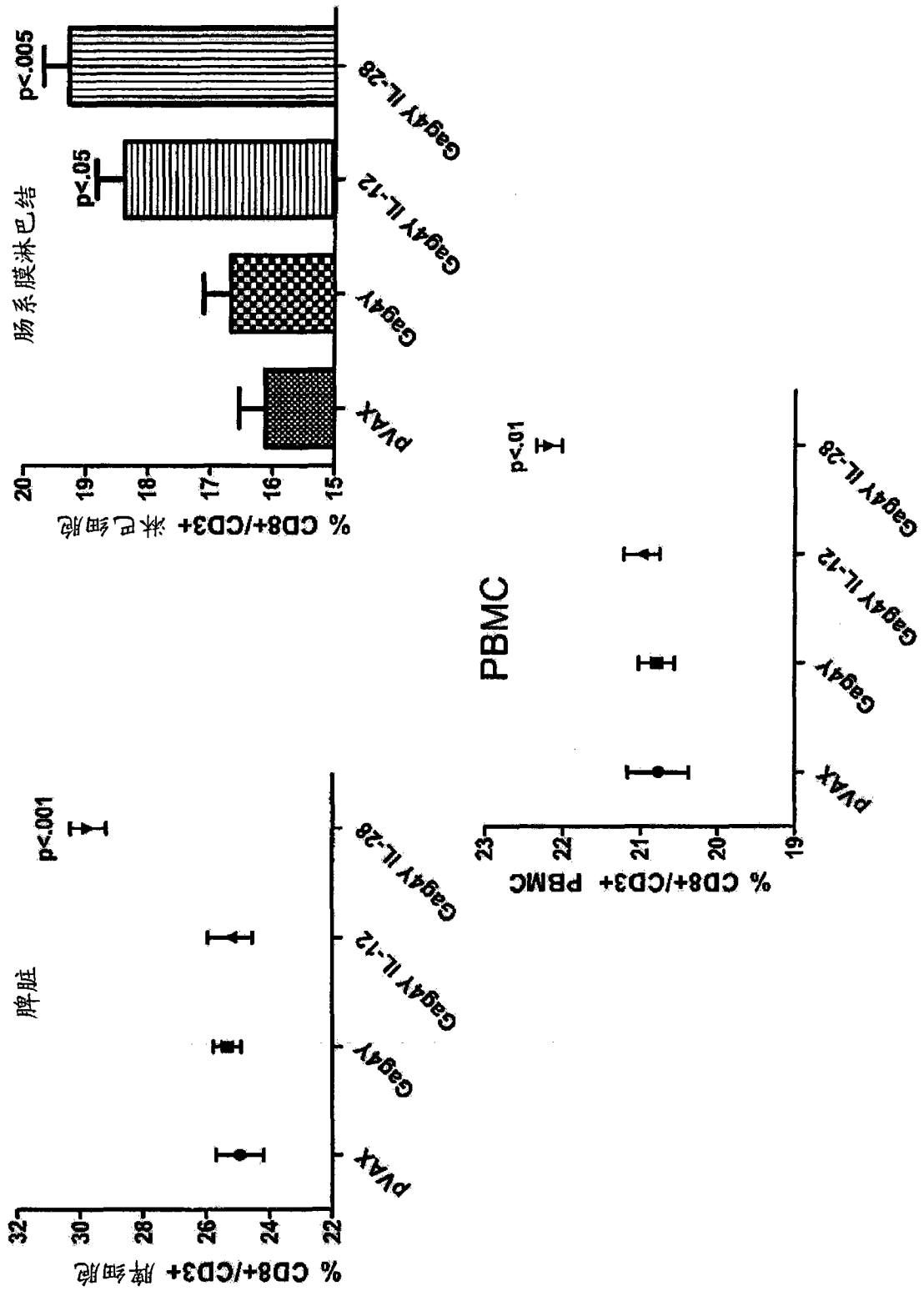


图 10A



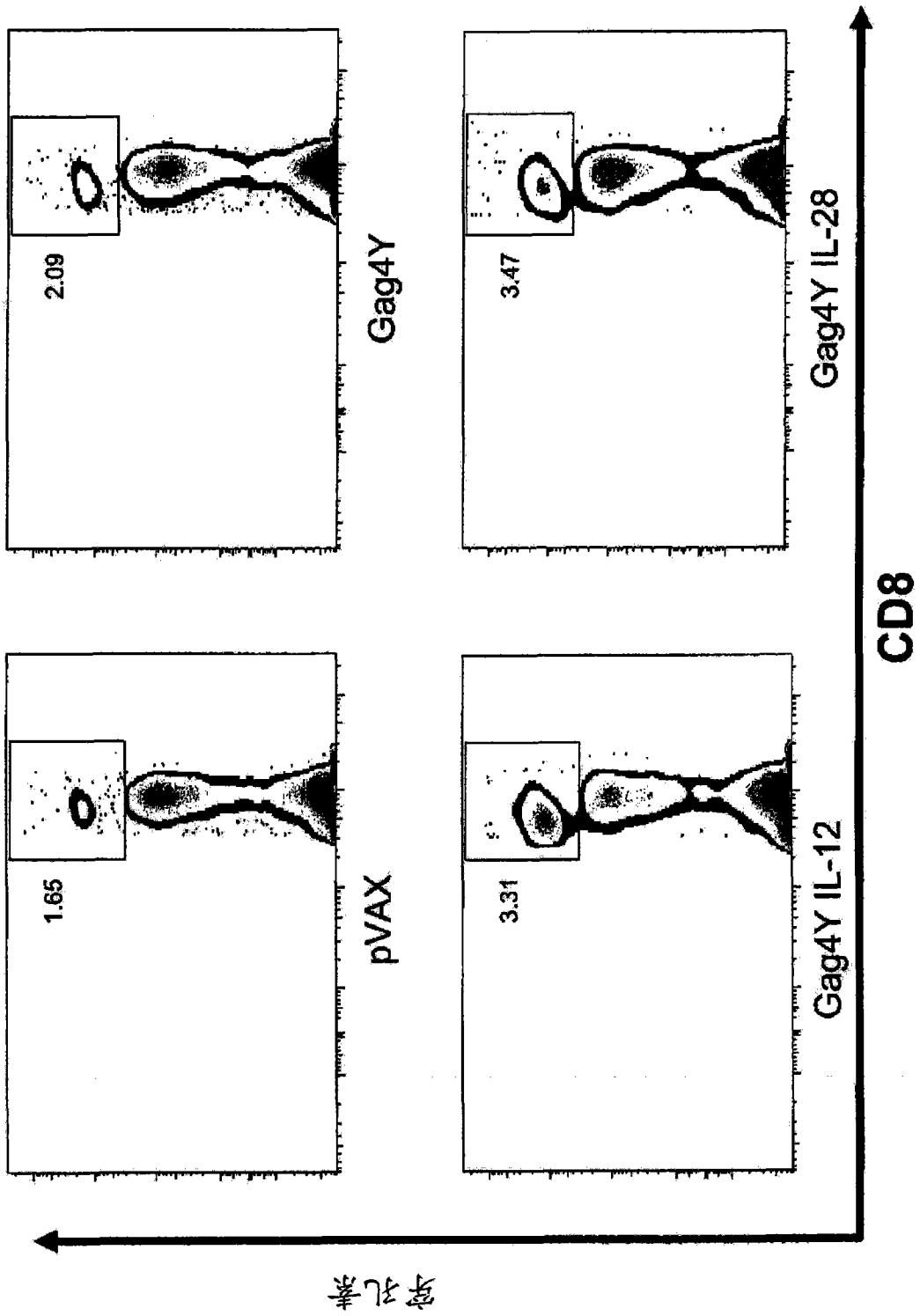


图 10B

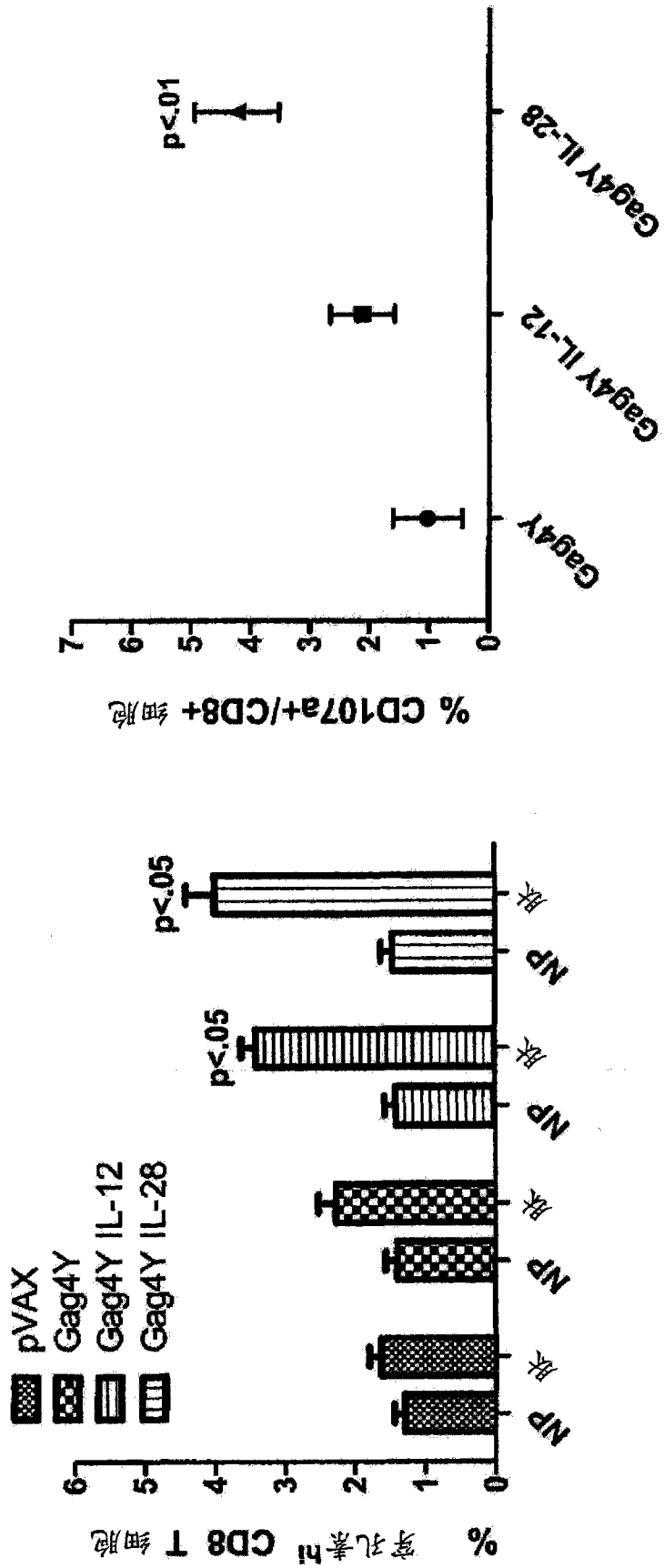


图 10C

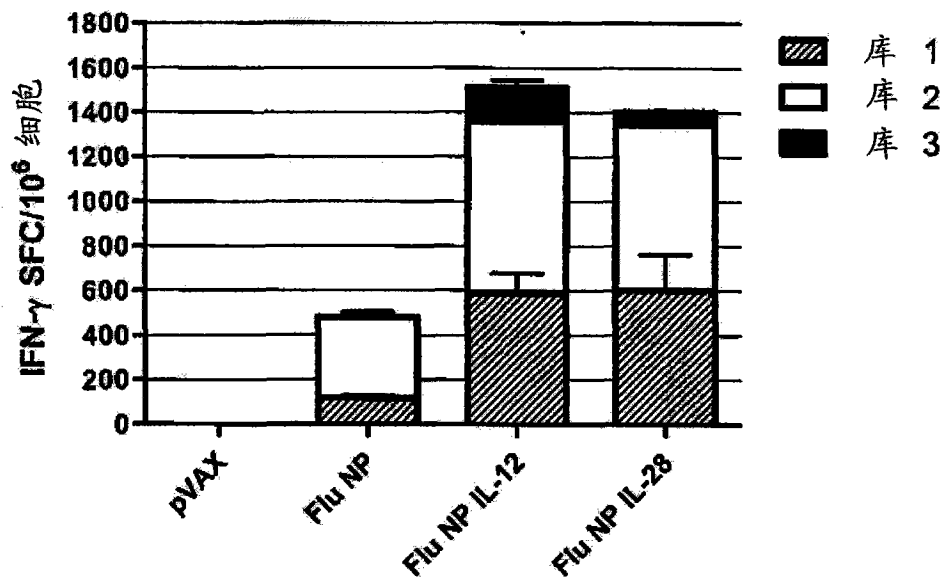


图 11A

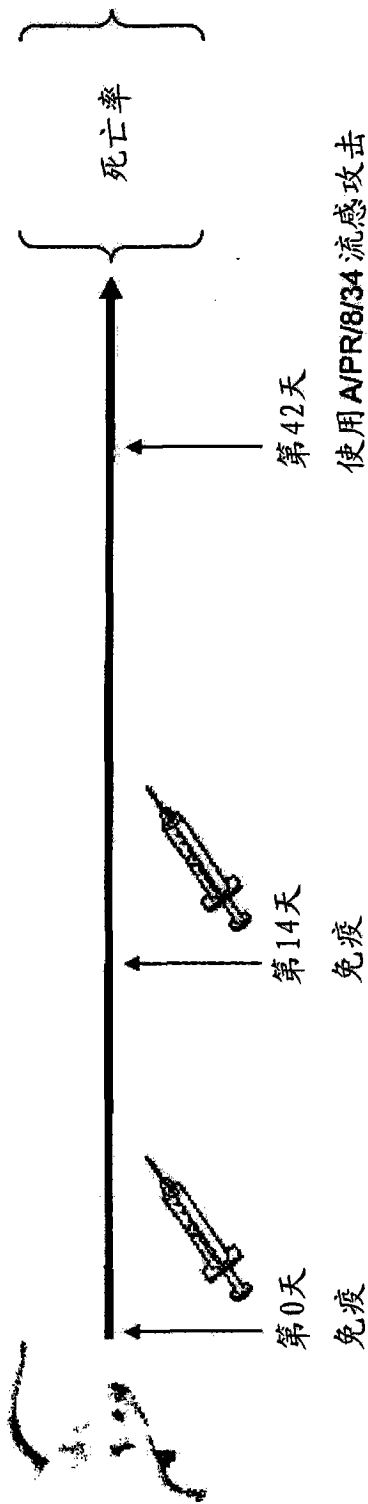


图 11B

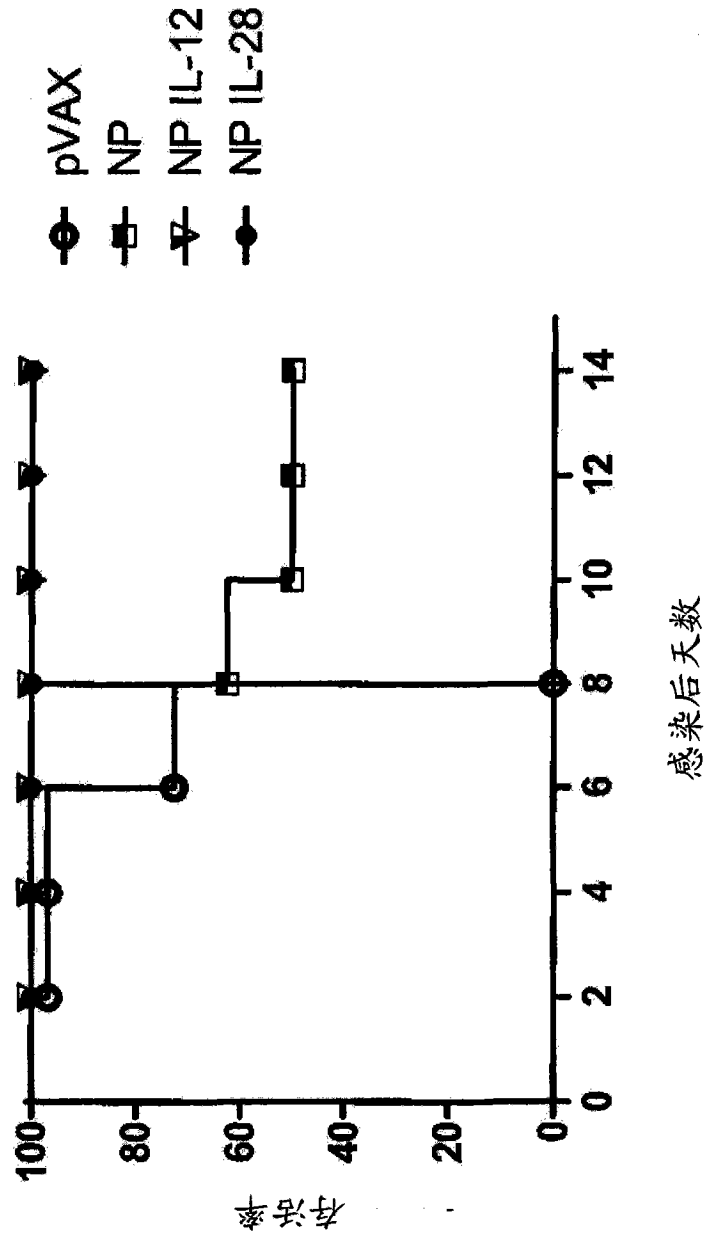


图 11C