



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1639569 B

(45) 授权公告日 2012.09.05

- (21) 申请号 02829284.7 *A61K 39/385* (2006.01)
(22) 申请日 2002.10.21 *A61K 39/09* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 39/02* (2006.01)
10/141, 508 2002.05.07 US *A01N 43/40* (2006.01)
A01N 25/00 (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 (56) 对比文件
2005.01.07 WO 0126676 A1, 2001.04.19, 全文.
(86) PCT申请的申请数据 WO 9712041 A1, 1997.04.03, 全文.
PCT/US2002/036206 2002.10.21 CN 1239510 A, 1999.12.22, 全文.
(87) PCT申请的公布数据 审查员 李珊
W02003/096017 EN 2003.11.20
(73) 专利权人 坎莫森特里斯克斯公司
地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 T·J·沙尔 缪振华
R·贝拉霍维奇 Z·魏 M·霍华德
B·普雷麦克
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001
代理人 郭广迅 刘玥
(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 33 页

(54) 发明名称
诱导免疫应答的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及免疫应答的增强。所述的免疫应答可通过给予疫苗来引发。本发明提供了诱导或增强对抗原的免疫应答的组合物和方法。本发明的组合物和方法可用于预防和治疗用途的疫苗的配制及抗体的产生。

1. 至少一种多肽和至少一种抗原在制备用于引发对抗原的免疫应答的药物中的用途，其中所述至少一种多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4。
2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的免疫应答是抗体介导的免疫应答。
3. 根据权利要求 2 的用途，其中所述药物将受试者体内的抗原特异性抗体的效价提高至少 2 倍。
4. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的免疫应答是细胞介导的免疫应答。
5. 根据权利要求 4 的用途，其中所述多肽吸引树突状细胞。
6. 根据权利要求 5 的用途，其中所述多肽吸引未成熟的树突状细胞。
7. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的多肽和抗原在使用药物前组合在组合物中。
8. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的多肽和抗原分别给予。
9. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物包含选自 SEQ ID NO :2 和 4 的至少两种多肽。
10. 根据权利要求 1 的用途，其中所述多肽是 SEQ ID NO :4。
11. 根据权利要求 1 的用途，其中所述多肽与用于使其在受试者中可持续释放的材料组合。
12. 根据权利要求 1 的用途，其中所述抗原来自病原体。
13. 根据权利要求 12 的用途，其中所述的病原体是肝炎或流感。
14. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的抗原是肿瘤抗原。
15. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物进一步包括佐剂。
16. 根据权利要求 15 的用途，其中所述的佐剂选自明矾、不完全弗氏佐剂，细菌荚膜多糖，葡聚糖，细菌 DNA，IL-12，GM-CSF，CD40 配体，IFN- γ ，IL-1，IL-2，IL-3，IL-4，IL-10，IL-13，和 IL-18。
17. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物进一步包括多价载体。
18. 根据权利要求 17 的用途，其中所述的多价载体与多肽、抗原或佐剂相连。
19. 根据权利要求 18 的用途，其中所述的多价载体选自细菌荚膜多糖，葡聚糖和多核苷酸载体。
20. 根据权利要求 19 的用途，其中所述的细菌荚膜多糖是肺炎球菌、链球菌或脑膜炎球菌多糖。
21. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物进一步包括药用载体。
22. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物适合于施用于实体肿瘤内。
23. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物适合于施用于实体肿瘤周围的组织内。
24. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物是在脂质体中的。
25. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物包含编码多肽的多核苷酸。
26. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物包含编码抗原的多核苷酸。
27. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的抗原是过敏原。
28. 至少一种多肽和至少一种抗原在制备用于在先前、伴随或随后施用抗原的患者中增强免疫应答的药物中的用途，其中所述至少一种多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4。
29. 一种用于增强对一种或多种抗原的免疫应答的组合物，其包括：
至少一种分离的多肽，其中所述多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4；和
至少一种抗原，

其中所述多肽增强对抗原的免疫应答。

30. 根据权利要求 29 的组合物,其包括至少两种多肽。

31. 根据权利要求 29 的组合物,其中所述所述组合物配制成用于可持续的释放。

32. 根据权利要求 29 的组合物,其进一步包括药学上可接受的载体。

33. 根据权利要求 32 的组合物,其中药学上可接受的载体是佐剂。

34. 根据权利要求 33 的组合物,其中药学上可接受的载体选自水,油,盐水,含水葡萄糖和甘油。

35. 一种组合物,其包括细胞,所述细胞外源表达编码多肽的至少一种序列,所述多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4。

36. 根据权利要求 35 的组合物,其中所述的细胞是异源的。

37. 根据权利要求 35 的组合物,其中所述的细胞是自体同源的。

38. 根据权利要求 35 的组合物,其进一步包括肿瘤相关抗原。

39. 根据权利要求 35 的组合物,其中所述的细胞是癌细胞。

40. 根据权利要求 39 的组合物,其中所述的癌细胞来自癌细胞系。

41. 根据权利要求 40 的组合物,其中所述的癌细胞系是人卵巢癌细胞系或人脑癌细胞系。

42. 根据权利要求 40 的组合物,其进一步包括肿瘤相关抗原。

43. 根据权利要求 42 的组合物,其中所述的肿瘤相关抗原来自自体同源细胞。

44. 一种组合物,其包括:

至少一种肿瘤细胞;和

至少一种细胞,其中所述细胞外源表达编码多肽的至少一种序列,所述多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4。

45. 根据权利要求 44 的组合物,其中所述肿瘤细胞是原发肿瘤细胞。

46. 根据权利要求 44 的组合物,其中所述的肿瘤细胞是自体同源的。

47. 根据权利要求 44 的组合物,其中所述的肿瘤细胞是神经胶质瘤,成胶质细胞瘤,神经胶质肉瘤,星形细胞瘤,黑色素瘤,乳腺癌细胞或卵巢癌细胞。

48. 根据权利要求 44 的组合物,其中所述的肿瘤细胞是癌细胞。

49. 根据权利要求 44 的组合物,其中外源表达所述序列的细胞是异源细胞。

50. 根据权利要求 44 的组合物,其中外源表达所述序列的细胞是静止的。

51. 一种试剂盒,其包括:

一种药物组合物,其中所述的药物组合物包括至少一种多肽,所述多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4,和药学可接受的载体;和

注射器。

52. 一种试剂盒,其包括:

一种药物组合物,其中所述的药物组合物包括编码多肽的至少一种多核苷酸,所述多肽选自 SEQ ID NO :2 和 4,和药学可接受的载体;和

注射器。

诱导免疫应答的方法和组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及增强或调控免疫应答的组合物和方法,如由接种疫苗所引发的免疫应答。本发明的组合物和方法除其他用途外,可用于具有预防和治疗用途的疫苗(免疫)的配制及有用抗体(如用于治疗或诊断用途的单克隆抗体)的产生。

[0002] 发明背景

[0003] 1979年,在将第一个天花疫苗(来自一个感染牛痘的挤奶少女)给予一个叫吉姆·菲普的小男孩后几乎200年以后,世界卫生组织才宣布天花已被征服。由于爱德华·詹纳发现,接触牛痘的挤奶妇几乎不被天花感染,因此,这个小男孩才从天花的感染中幸免遇难。这种偶然事件的发生是由于牛痘与天花具有相似的分子结构,在天花侵入时,菲普的免疫系统能够迅速产生一种特异性的应答,并很快除去这种入侵者。

[0004] 从那以后,已开发出多种疫苗来防止各种因子的侵染,如侵染性的微生物(细菌和病毒),毒素,甚至肿瘤。虽然从1790年后已取得了明显的进展,但由于没有有效的疫苗,侵染因子仍能够侵染易感者。目前的一个明显的例子就是人体免疫缺陷病毒(HIV),它在世界许多地区已给人们生活和经济造成了破坏性的影响。在疫苗确实存在的情况下,由于缺少多次施用所需的资金,技术专家和劳力,疫苗常不能被这些人和国家所获得。任何必要资源的减少,如提供保护所需施用次数的减少,都将推动更多的人群获得疫苗接种(免疫)。

[0005] 接种疫苗发动了免疫系统,其包括白细胞(WBCs:T和B淋巴细胞,单本本发明还提供了将含有SHAAGtide的组合物在多次施用的方法;当然,可在相同或不同位点施用。有时,是在除去多肽输送的靶位点外的位点施用、例如,可将包含SHAAGtides和抗原的脂质体及能够将脂质体靶位到特定组织或细胞的整合分子一起施用。

[0006] 另一方面,本发明提供了包含至少一种含SHAAGtides多肽或其片段及至少一种抗原的组合物。在某些方面,可使用两种不同的SHAAGtides多肽。所述的组合物可配制成为可持续释放的剂型。此外,本发明的组合物也可以包括药物上可接受的载体,在一些例子中,所述的载体可以是佐剂。其他的药学上可接受的载体包括水,油,盐水,含水葡萄糖和甘油。

[0007] 疫苗就是在宿主个体不受到诱导病理反应的外源因子(如病原体或肿瘤)攻击的情况下,产生相同类型的宿主保护性免疫应答。所述的免疫应答例如可以是细胞介导的和/或以抗体为基础的。

[0008] 在产生针对外源入侵物的获得的免疫应答中起关键作用的是抗原提呈细胞(APCs),如巨噬细胞,激活的B细胞和树突状细胞。树突状细胞在免疫应答中特别重要。未成熟或休眠的树突状细胞位于上皮层内,吞噬外源物质(称为抗原)。附近的巨噬细胞受到外源物质的刺激后,它所分泌的肿瘤坏死因子(TNF)就激活这些树突状细胞。这些树突状细胞携带外源抗原,穿过淋巴系统到达最近的淋巴结。淋巴结中静止的天然T细胞(未受到抗原的攻击)被激活,引发免疫系统采取行动,其中所述的T细胞的抗原特异性受体能够识别外源抗原。

[0009] 在接种疫苗时,可用失活的或死的侵染因子,最安全的接种是能够激起针对外源

因子表达的分离的抗原或抗原决定簇的免疫应答的接种。但是,多数这样的抗原自身的免疫原性很弱或不能引起很强的免疫应答。为了增强这些抗原的有效性,通常在疫苗组合物中加入佐剂。佐剂包括死亡细菌的油乳化弗氏完全佐剂,其他死的细菌(如副百日咳杆菌),细菌多糖,细菌热休克蛋白或细菌 DNA。虽然这些佐剂很有效,但许多佐剂可导致严重的炎症而不适宜用于人体。

[0010] 目前的免疫方法并不是对所有的抗原,所有的个体,或对引发所有类型的保护性免疫都是有效的。此外,可用的佐剂的数量也很少,且主要是针对抗体相关免疫的,而不是针对细胞介导的免疫。而且,从免疫到免疫系统为受试者提供保护之间的时间间隔也很长。改良的,能够诱导细胞介导和抗体介导的应答的疫苗组合物和/或有效的安全的佐剂能够大大地提高目前的疫苗的效果。

[0011] 发明概述

[0012] 一方面,本发明提供了在受试者,如人体内引发免疫应答的方法,其中,将包含序列 SEQ ID NO:1-6 或 13 的至少一部分的多肽(“SHAAGtides”)和一种抗原给予受试者。所述的免疫应答可以是抗体介导的,在施用后,抗原特异性抗体的效价至少提高 2 倍。另一方面,所述的免疫应答是细胞介导的,其中包含 SEQ ID NO:1-6 或 13 的至少一部分的多肽吸引和/或激活各种白细胞,包括树突状细胞。

[0013] 另一方面,本发明提供了通过将包含 SEQ ID NO:1-6 或 13 的至少一部分的多肽和一种抗原同时施用的方式来引发免疫应答的方法;另一方面,所述的抗原和多肽也可以分别施用。另外,一种以上的 SEQ ID NO:1-6 或 13 的多肽可分别,以多联体或融合蛋白的方式施用。在所有的例子中,均可使用 SEQ ID NO:1-6 或 13 的变异体。同样地,具有 SEQ ID NO:1-6 或 13 至少一部分序列的多肽可以多核苷酸(SEQ ID NO:7-12 或 14)形式施用,所述多核苷酸可操作连接,以便在施用时或施用后在受试者体内表达。同样,抗原也可以在施用后表达的多核苷酸形式施用。

[0014] 另一方面,给予的抗原是一种来自病原体的多肽,如肝炎,流感,肿瘤抗原或过敏原。

[0015] 本方法也提供了组合物的使用,所述组合物含有各种整合到可持续释放制剂中的 SHAAGtide 序列。此外,也提供了佐剂在施用的组合物中的使用。所述的佐剂包括明矾,不完全弗氏佐剂,细菌荚膜多糖,细菌 DNA,葡聚糖,IL-12,GM-CSF,CD40 配体,IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 或细胞因子,或其片段。

[0016] 本发明还提供了将多价载体和 SHAAGtide 及抗原分子一起施用的方法。将多价载体与 SHAAGtide 多肽,抗原或佐剂相连。多价载体包括细菌荚膜多糖(如肺炎球菌,链球菌或脑膜炎球菌多糖),葡聚糖和多核苷酸载体。

[0017] 另一方面,本发明还提供了将药学上可接受的载体和 SHAAGtide 及抗原分子一起施用的方法。

[0018] 在一些方面,施用位点包括实体肿瘤或所述肿瘤周围的组织。可通过任何途径施用,包括注射,吸入或口服。也可使用栓剂。

[0019] 本发明还提供了将含有 SHAAGtide 的组合物在多次施用的方法;当然,可在相同或不同位点施用。有时,是在除去多肽输送的靶位点外的位点施用、例如,可将包含 SHAAGtides 和抗原的脂质体及能够将脂质体靶位到特定组织或细胞的整合分子一起施用。

[0020] 另一方面,本发明提供了包含至少一种含 SHAAGtides 多肽或其片段及至少一种抗

原的组合物。在某些方面,可使用两种不同的 SHAAGtides 多肽。所述的组合物可配制成可持续释放的剂型。此外,本发明的组合物也可以包括药物上可接受的载体,在一些例子中,所述的载体可以是佐剂。其他的药学上可接受的载体包括水,油,盐水,含水葡萄糖和甘油。

[0021] 在其他方面,所述组合物可以包括一种细胞,表达多核苷酸的微生物载体或病毒载体,如可编码 SHAAGtide 序列的载体。细胞可以是异源或自体同源的。另一方面,所述组合物也可包括肿瘤相关抗原(可来自同源细胞),癌细胞,来自癌细胞系(如人卵巢癌或人脑癌)的细胞。

[0022] 另一方面,本发明提供了用至少一种肿瘤细胞和至少一种外源表达至少一种 SHAAGtide 多肽序列的细胞相配制而成的组合物。其中,肿瘤细胞可以是原发的,异源的或同源的。肿瘤细胞可以是神经胶质瘤,成胶质细胞瘤,胶质肉瘤,星形细胞瘤,黑色素瘤,乳腺癌细胞或卵巢癌细胞。在其他方面,肿瘤细胞是癌细胞。

[0023] 最后,本发明提供了包含药物组合物的试剂盒,其中所述药物组合物包括至少一种 SHAAGtide 分子(多肽和/或多核苷酸)和注射器。

[0024] 发明详述

[0025] 本申请发明人发现了一类新的肽(SHAAGtides),它是 CC 趋化因子 CCL23,CK β 8-1 的剪接变体的截短的突变体,该多肽可在体内或体外调控和/或增强免疫应答。调控免疫应答是为了影响所产生的免疫球蛋白(Ig's)的种类和亚型以及位于侵染点的细胞的数量和类型(如细胞毒性 T 细胞,嗜酸性粒细胞和肥大细胞)。由于 SHAAGtides 多肽的加入可导致白细胞中钙的流出,因此 SHAAGtides 可作为受体的配体。SHAAGtides 可有效地吸引单核细胞,嗜中性粒细胞,成熟的树突状细胞(mDCs)和未成熟的树突状细胞(iDCs)。CK β 8(CCL23,也称为骨髓祖先抑制因子 1 或 MPIF-1,99 个氨基酸)是一种 CK β -1 的相关因子,可吸引单核细胞,树突状细胞和休眠的淋巴细胞(Forssmann et al.,1997),但缺少编码 SHAAGtide 序列的可剪切外显子。CK β 8-1(残基 1-116)是一种 CK β 8 的可剪切型,同 CK β 8 一样,是 CCR1 受体的功能性配体(Young et al.,1998)。但 CK β 8-1(1-116)并不通过 SHAAGtide 序列表现其功能。综上可知,SHAAGtide 序列是隐蔽功能的肽,因而可有效地作为佐剂和免疫调节剂。

[0026] 不限于特定的机制,SHAAGtide 多肽通过将 APCs 聚集到施用位点而提供了对免疫原的免疫反应。免疫原(抗原)被 APCs 所吞噬而部分降解。随后,降解的抗原的一部分与位于 APC 表面的 MHCI 或 II 类分子一起提呈给等待在附近淋巴结中的 T 细胞,刺激细胞毒性 T 细胞或辅助 T 细胞的增殖,或激活 B 细胞产生和分泌抗体。

[0027] 由于 SHAAGtides 可作为吸引免疫系统细胞的有效分子信标,因而免疫应答被增强和/或调控。在疫苗中使用时,SHAAGtides 可增强免疫应答,因此通常不能引发(或微弱地引发)该应答的疫苗能够引发应答;SHAAGtides 的使用也可降低随后对增强注射的需求。SHAAGtides 也能够改变所产生的免疫应答的类型。

[0028] 本发明还包括含有 SHAAGtide 或编码 SHAAGtides 的核酸的组合物及其预防应用,及治疗病症。在表 1 和表 3 中列出了 SHAAGtide 多肽序列(SEQ ID NO:1)和一些活性变异体(SEQ ID NO:2-6);表 2 中列出了分别编码 SEQ ID NO:1-6 的多核苷酸序列(SEQ ID NO:7-12)。

[0029] 表 1 人 SHAAGtide 多肽序列和一些活性变异体

[0030]

序列号	标注	氨基酸序列
1	天然序列; 高活性	Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr Leu Ser His Ala 1 5 10 15 Ala Gly 18
2	高活性	Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr Leu Ser His 1 5 10 15
3	中等活性	Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr 1 5 10
4	可有效地 作为佐剂; 高活性	Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr Leu Ser His Ala 1 5 10 15 Ala Tyr 18
5	中等活性	Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met 1 5 10
6	中等活性	Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr Leu Ser His 1 5 10

[0031] 表 2 人 SHAAGtide 多核苷酸序列 (SEQ ID NO :2)

[0032]

序 列 号	多核苷酸序列
7	atgctctgga ggagaaagat tggctctcag atgaccttt ctcattgctgcagga 54
8	atgctctgga ggagaaagat tggctctcag atgaccttt ctcatt 45
9	atgctctgga ggagaaagat tggctctcag atgacc 36
10	atgctctgga ggagaaagat tggctctcag atgaccttt ctcattgctgc atat 54
11	atgctctgga ggagaaagat tggctctcag atg 33
12	ctctggagga gaaagattgg tctcagatg acctttctc at 42

[0033] 表 3 列出了具有类似 SHAAGtide 活性的 CK β 8-1 的另一个衍生物 (CK β 8-1 (25-116 ;SEQ ID NO :13) ;表 4 列出了编码 SEQ ID NO :13 的核苷酸序列。下划线表示与 SEQ ID NO :1 和 7 相应的序列。

[0034] 表 3CK β 8-1 (25-116) 的多肽序列 (SEQ ID NO :13)

[0035]

Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr Leu Ser His Ala	1	5	10	15	Ala Gly Phe His Ala Thr Ser
Ala Asp Cys Cys Ile Ser Tyr Thr Pro	20	25	30	Arg Ser Ile Pro Cys Ser Leu Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Thr Asn Ser	60
35	40	45	Glu Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Lys Gly Arg Arg	50	55
Phe Cys Ala Asn Pro Ser Asp Lys Gln Val Gln Val Cys Met Arg Met	65	70	75	80	Leu Lys Leu Asp Thr Arg Ile
Lys Thr Arg Lys Asn	85	90			

[0036] [0034] 表 4CK β 8-1 (25-116) 的多核苷酸序列 (SEQ ID NO :14)

[0037]

atgctctgga ggagaaagat tggctctcag atgaccttt ctcattgctgc aggatccat	60	gctactagtg ctgactgtg catctectac accccacgaa gcatccgtg ttcactctg	120
gagagttact ttgaaacgaa cagcgagtc tccaagcgg gtgtcatett ctcaccaag	180	aagggcgac gtttctgtgc caaccacgt gataagcaag ttcaggttg catgagaatg	240
ctgaagctgg acacacggat caagaccagg aagaattga	279		

[0038] 表 5 (SEQ ID NO :15, CK β 8-1 多肽) 和表 6 (SEQ ID NO :16, CK β 8-1 多核苷酸) 列出了 SEQ ID NO :1-14 的母序列。下划线表示 SHAAGtide 序列。值得注意的是, 含有 SHAAGtide 序列 (SEQ ID NO :1) 的 CK β 8-1 并不具有与 SEQ ID NO :1 自身相同的活性。

[0039] 表 5CK β 8-1 的多肽序列 (SEQ ID NO :15)

[0040]

Met	Lys	Val	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Ser	Cys	Leu	Met	Leu	Val	Thr	Ala	1	5	10	15	Leu	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg									
Val	Thr	Lys	Asp	Ala	Glu	Thr	Glu	Phe	Met							20	25	30	Met	Ser	Lys	Leu	Pro	Leu	Glu	Asn	Pro	Val	Leu	Leu	Asp	Met		
Leu	Trp								40					45	Arg	Arg	Lys	Ile	Gly	Pro	Gln	Met	Thr	Leu	Ser	His	Ala	Ala	Gly	Phe	50	55		
60	His	Ala	Thr	Ser	Ala	Asp	Cys	Cys	Ile	Ser	Tyr	Thr	Pro	Arg	Ser	Ile	65	70	75	80	Pro	Cys	Ser	Leu	Leu									
Glu	Ser	Tyr	Phe	Glu	Thr	Asn	Ser	Glu	Cys	Ser						85	90	95	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg				
Arg	Phe	Cys	Ala						100					105			110	Asn	Pro	Ser	Asp	Lys	Gln	Val	Gln	Val	Cys	Met	Arg	Met	Leu	Lys	Leu	115
120						125	Asp	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Arg	Lys	Asn	130	135																	

[0041] [0039] 表 6CK β 8-1 的多核苷酸序列 (SEQ ID NO :16)

[0042]

atgaagttct	ccgtggctgc	cctctctctgc	ctcatgttg	ttactgcect	tggaatccag	60	gcccggtca	caaaagatgc	agagacagag	ttcatgatgt	caaagcttcc	attggaaaat	120
ccagtacttc	tggaatgct	ctggaggaga	aagattggtc	ctcagatgac	cttttctcat	180	gtgcaggat	tecatgctac	tagtgetgac	tgetgcatct	cctacacccc	acgaagcacc	240
ccgtgttcc	tctggagag	ttactttgaa	acgaacagcg	agtgtccaa	gccgggtgtc	300	atcttctcca	ccaagaagg	gcgacgttcc	tggtccaacc	ccagtataa	gcaagttcag	360
gtttgcata	gaatgtgaa	gtggacaca	cggatcaaga	ccaggagaa	ttga	414							

[0043] 包含 SHAAGtide 多肽或多核苷酸的组合物包括那些适于给予受试者以增强免疫应答,如对接种所产生的反应的组合物。也包括那些含有 SHAAGtide 多肽和 / 或 SHAAGtide 核酸的试剂盒。所述的试剂盒配置成适于施用,如药物组合物。

[0044] 本发明涉及将 SHAAGtide (SEQ ID NO :1-6,13) 或 SHAAGtide 核酸 (SEQ ID NO : 7-12,14) 组合物给予受试者的方法。

[0045] 在用于增强或调控免疫应答时,SHAAGtides 作为可在体内表达的多肽或多核苷酸施用。为进一步促进该方法,SHAAGtide 多肽可与目的抗原相连 (共价或非共价)。在有些情况下,SHAAGtides 可在所述抗原施用前或施用后给予。当 SHAAGtide 组合物和抗原 (免疫原) 组合物分别施用时,所述组合物在受试者的相同位点施用。

[0046] 在增强,引发或调控免疫应答时,本发明的方法包括用含有目的免疫原的 SHAAGtide 组合物施用。在其他情况下,SHAAGtide 组合物可在缺少免疫原的情况下施用。例如,先给予 SHAAGtide 组合物,再给予含有或不含有 SHAAGtide 多肽的免疫原。在一些情况下,先给予含有免疫原的组合物,再给予含有 SHAAGtide 的组合物。不同的组合物可以同时施用,紧接着施用,或间隔一段时间施用,如间隔 1 小时到 2 周或更长时间。

[0047] 为提高和 / 或调控对肿瘤和癌症的免疫应答,在非正常生长的部位 给予 SHAAGtide 组合物,或直接导入到组织中 (如肿瘤)。然后肿瘤或癌症抗原被 SHAAGtide 聚集的或激活的白细胞,如树突状细胞检测到。通过激发对这些抗原的免疫应答,机体攻击肿瘤和癌症,进而将其减少或根除。这些方法适于治疗无法控制或非正常的细胞生长,如肿瘤和癌症。通过给予分离的多肽肿瘤抗原和 SHAAGtides,也可以提高和 / 或调控对肿瘤和癌症的免疫应答。SHAAGtides 可与抗原结合或不结合。

[0048] 还提出了进行免疫预防和治疗 (如适应性的和 / 或固有的免疫应答的预防激发,增强,强化或调节) 的新的方法和试剂。其较以前的免疫方法有下列优势:

- [0049] (1) 在给予免疫原后加速免疫应答;
- [0050] (2) 对小量的免疫原 (如毒素或病原体) 或抗原更敏感,而这些免疫原或抗原通常不激发很强的免疫应答,和
- [0051] (3) 更有效的抗肿瘤治疗。

[0052] 虽然目前的疫苗可有效地抗多种病原因子,一些危险病原体 (如 HIV,肿瘤和癌细胞) 还没有适宜的疫苗。在一些情况下,困难部分来自于候选外源抗原的特性,如 HIV 糖蛋

白（如 gp120）的不可溶性或肿瘤抗原的弱免疫原性。因此，可增加和 / 或调控免疫应答的组合物可有助于制备新的有效的疫苗。

[0053] SHAAGtide 多肽是 CK β 8-1 趋化因子的剪接变异体的截短形式。趋化因子作为聚集和激活 T 淋巴细胞，嗜中性粒细胞，单核细胞和巨噬细胞的分子信标，可标记病原体的感染范围。趋化因子是一组大于 40 的小肽（7-10kD），与在 WBCs 上表达的受体相连，使信号通过与 G 蛋白偶联的信号级联放大来介导白细胞的化学趋化和化学刺激功能。受体可结合多种配体，例如，受体 CCR1 与 RANTES（调控表达的正常的 T 细胞的活化），MIP-1 α （巨噬细胞炎性蛋白）和 MIP-1 β 趋化因子连接。到目前为止，已知的趋化因子受体有 24 种。趋化因子，多配体结合受体的数量和受体在 WBCs 上的不同作用模式使得严格控制的和特异性的免疫应答成为可能（Rossi and Zlotnik, 2000）。通过调控趋化因子相应受体可以调控趋化因子的活性，可用于治疗相关的炎性和免疫学疾病及进行器官和组织的移植。

[0054] 运用 SHAAGtide 多肽的活性，可增强和 / 或调控在接种过程中引发的免疫应答。即可提高免疫应答的活性和 / 或数量和 / 或质量。如，免疫应答出现得早和 / 或高效价和 / 或抗原特异性抗体的亲合性提高表明免疫应答活跃。与传统的接种方法相比，免疫应答的数量增大至少 2-10 倍，甚至几百倍。免疫应答的质量的增强或调控包括产生与所述免疫原具有高亲和力的抗体和 / 或产生更高浓度的优选的免疫球蛋白类别，如 IgG。免疫应答的质量的调控还包括诱导不同类型的 T 淋巴细胞，其产生的细胞因子和 / 或趋化因子和 / 或共刺激分子不同。免疫应答的质量的调控还包括诱导抗原特异性的细胞毒性 T 细胞和 / 或不同型的抗体。

[0055] 为区分基因（和相关的核苷酸）和其所编码的蛋白，用斜体（或下划线）来表示基因的缩写，而蛋白的缩写不用斜体表示。因此，SHAAGtide 或 SHAAGtide 表示编码 SHAAGtide 的核苷酸序列。

[0056] “调控序列”是指可使可操作连接的编码序列在特定的宿主生物中表达的 DNA 序列。原核调控序列包括启动子，操作序列和核糖体结合位点。真核细胞使用启动子，多聚腺苷酸信号和增强子。

[0057] 当核酸与另一核酸序列功能相连时，该核酸就是“可操作连接”。例如，如果启动子或增强子影响了编码序列的转录，则该启动子或增强子与该序列是可操作连接的，或者如果核糖体结合位点位于有助于翻译的部位，则该核糖体结合位点与编码序列是可操作连接的。

[0058] 一种“分离”的核酸分子是指从自然存在的位点纯化出来和从至少一种污染核酸分子中分离出来的核酸分子。分离的 SHAAGtide 分子与在细胞中存在的特异性 SHAAGtide 分子是有区别的。

[0059] 分离的 SHAAGtide 核酸分子包括与 SEQ ID NO :7-12, 14 或其一部分互补的核酸分子。“互补的核酸分子”是指能够与一种序列，如 SEQ ID NO :7-12 足够互补的核酸分子，因此几乎无错配形成氢键，从而形成稳定的二聚体。“互补的”是指核苷酸之间的 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基对。

[0060] “衍生物”是指从天然化合物直接或通过改变或部分取代而形成的核酸序列（或氨基酸序列）。“类似物”是指具有与天然化合物相类似，但不相同的结构，在某种成分或侧链上有区别的核酸序列或氨基酸序列。类似物可以是合成的，或具有不同的进化来源。同系物是指来源于不同种的特定基因的核酸序列或氨基酸序列。

[0061] 如果衍生物或类似物包含改变的核酸或氨基酸，则衍生物和类似物可以是全长或

不是全长。SHAAGtide 的核酸或蛋白衍生物或类似物包括,但不限于在与相同大小的核酸或氨基酸序列相比或与通过同源运算法则进行比对的比对序列相比,包含与 SHAAGtide 核酸或蛋白具有至少约 70%,80%或 95%同一性的区域的分子或其编码序列能够在严谨,中度严谨或低严谨条件下与编码上述蛋白的序列互补杂交的序列 (Ausubel et al.,1987)。

[0062] “同源的”核苷酸序列是指编码那些编码同型 SHAAGtide 的序列的核苷酸序列。对 SHAAGtide 而言,同源核苷酸序列包括编码除人以外的物种的 SHAAGtide 的核苷酸序列,如脊椎动物,包括青蛙,小鼠,大鼠,兔子,狗,猫,牛和马。同源的核苷酸序列也包括自然发生的核苷酸序列的等位变异体和突变体。但同源的核苷酸序列不包括编码人 SHAAGtide 的精确的核苷酸序列。同源核酸序列包括编码保守氨基酸取代和具有 SHAAGtide 生物活性的多肽的核酸序列。

[0063] 除了 SEQ ID NO :7-12,14 所列出的 SHAAGtide 序列外,改变 SHAAGtide 氨基酸的 DNA 序列多态性也包括在内。例如,在个体之间存在的等位变异体在 SHAAGtide 中也存在遗传多态性。“基因”和“重组基因”指包括编码 SHAAGtide 的开放阅读框 (ORF) 的核酸分子,所述的 SHAAGtide 优选是脊椎动物 SHAAGtide。自然发生的等位变异体可在 SHAAGtide 中造成 1-5%的变异。“SHAAGtide 变异体多核苷酸”或“SHAAGtide 变异体核酸序列”是指编码活性 SHAAGtide 的核酸分子,所述的 SHAAGtide (1) 与编码全长天然 SHAAGtide 的核苷酸序列具有至少约 80%的核酸序列同一性;(2) 全长天然 SHAAGtide 缺少信号肽;或 (3) 全长 SHAAGtide 的任何其他片段。通常,SHAAGtide 变异体多核苷酸与编码全长天然 SHAAGtide 的核苷酸序列相比,具有至少约 80%的序列同一性,更优选,具有至少约 81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%的序列同一性,更优选,具有至少约 99%的序列同一性。SHAAGtide 变异体多核苷酸可编码缺少信号肽的全长天然 SHAAGtide,或全长天然 SHAAGtide 的任何片段。变异体不包括天然的核苷酸序列。

[0064] 通常,SHAAGtide 变异体多核苷酸在长度上具有至少约 30 个核苷酸,经常至少约 60,90,120,150,180,210,240,270,300,450,600 个核苷酸,更经常至少约 900 个核苷酸或更长。

[0065] 这里所指的编码 SHAAGtide 的核酸序列的“核酸序列同一性百分比(%)”是指 SHAAGtide 中与候选目的序列中相同的核苷酸所占的百分比,为获得最大百分比的序列同一性,如果必要,在将序列比对后引入缺口。为确定核苷酸序列同一性百分比所进行的比对可用本领域已知的各种方法获得,例如,用公众可获得的计算机软件,如 BLAST,BLAST-2,ALIGN 或 Megalign (DANASTAR) 软件。本领域的普通技术人员可确定用于衡量比对的适宜参数,包括用于获得被比较序列全长最大比对的运算法则。

[0066] 进行核苷酸序列比对时,给定序列 C 与另一给定序列 D 的核苷酸序列同一性(也可表述为:给定核苷酸序列 C 与给定核酸序列 D 相比,具有的或包含的一定百分比的核酸序列同一性)可用下式来计算:

[0067] 核酸序列同一性百分比 = $W/Z \cdot 100$,

[0068] 其中:W 是通过序列比对程序或计算程序对 A 和 B 进行比对时记做相同配对的核苷酸的数量;Z 是 D 中的核苷酸的总数。

[0069] 在核酸序列 C 的长度与核酸序列 D 的长度不等时,C 比 D 的核酸序列同一性百分比与 D 比 C 的核酸序列同一性的百分比不等。

[0070] 严谨性

[0071] 以特定的人序列的全长或一部分作为探针,采用本领域用于核酸杂交和克隆的常规方法,通过低严谨,中度严谨或高严谨杂交可获得同系物(如来源于人以外的物种的编码 SHAAGtide 的核酸)或其他相关的序列(如进化同源物)。

[0072] 单链 DNA 与杂交互补片段的特异性可通过反应条件的“严谨性”来确定。杂交严谨性随着 DNA 二聚体形成趋势的降低而提高。在核酸杂交反应中,可根据需要来选择严谨性,如有利于特异性杂交(高严谨时)可用于从文库中鉴定全长克隆。低特异性杂交(低严谨性)可用于鉴定相关的 DNA 分子(同源但不相同)或片段。

[0073] DNA 二聚体通过下列方式而稳定:(1) 互补碱基对的数量;(2) 碱基对的类型;(3) 反应混合物中盐的浓度(离子强度);(4) 反应温度;(5) 存在某种有机溶剂,如降低 DNA 二聚体稳定性的甲酰胺。通常,探针越长,退火所需的温度越高。通常的作法是改变反应温度;相对温度越高,反应条件越严谨。Ausubel 等(1987)对杂交反应的严谨性给出了很好的解释。

[0074] “严谨条件下”杂交可描述为进行杂交的核苷酸序列之间具有至少 60% 的同源性。一般而言,在一定的离子强度和 pH 下,对特定的序列而言,严谨条件是指低于热熔解点(T_m)约 5°C。 T_m 是指平衡时 50% 的探针与靶序列互补杂交时的温度。由于靶序列通常是过量的,因而,在 T_m ,平衡时 50% 的探针被使用。

[0075] (a) 高严谨条件

[0076] “严谨杂交条件”是使探针,引物或寡核苷酸只与靶序列杂交的条件。严谨条件根据序列的不同而不同。严谨条件包括:(1) 低离子强度和高温度的洗涤(如 15mM 氯化钠,1.5mM 柠檬酸钠,0.1% 十二烷基硫酸钠,50°C);(2) 杂交过程中的变性剂(如 50% (v/v) 甲酰胺,0.1% 牛血清白蛋白,0.1% 菲可,0.1% 聚乙烯吡咯烷酮,50mM 磷酸钠缓冲液(pH6.5; 750mM 氯化钠,75mM 柠檬酸钠,42°C);或(3) 50% 甲酰胺。常用的洗涤液包括 5X SSC(0.75M NaCl,75mM 柠檬酸钠),50mM 磷酸钠(pH6.8),0.1% 焦磷酸钠,5x Denhardt's 溶液,超声降解的鲑精 DNA(50 μ g/ml),0.1% SDS,和 10% 硫酸葡聚糖,42°C。在 42°C 下,在 0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)和在 55°C 下 50% 甲酰胺中洗涤,然后在高严谨条件下洗涤,所述高严谨条件包括在 55°C 下,含有 EDTA 的 0.1x SSC。更优选地,所述条件是具有约 65%,70%,75%,85%,90%,95%,98% 或 99% 同源性的序列仍保持杂交状态的条件。这些条件在实施例进行了描述,但不限于实施例。

[0077] (b) 中度严谨条件

[0078] “中度严谨条件”是指更低严谨性的洗涤和杂交条件(Sambrook,1989),以便多核苷酸可与 SEQ ID NO:7-12,14 的全长,片段,衍生物或类似物杂交。例子包括在 55°C 下,在 6X SSC,5X Denhardt's 溶液,0.5% SDS 和 100mg/ml 变性鲑精 DNA 中杂交,然后在 37°C 下,在 1X SSC,0.1% SDS 中洗涤一次或数次。根据试验条件,如探针长度,可调节温度,离子强度等。其他的中度严谨条件也有描述(Ausubel et al.,1987;Kriegler,1990)。

[0079] (c) 低严谨条件

[0080] “低严谨条件”是指比中度严谨条件更低严谨性的洗涤和杂交条件(Sambrook,1989),以便多核苷酸可与 SEQ ID NO:7-12,14 的全长,片段,衍生物或类似物杂交。低严谨杂交条件的一个非限制性的例子是:在 40°C 下,在 35% 甲酰胺,5X SSC,50mM Tris-HCl(pH7.5),5mM EDTA,0.02% PVP,0.02% Ficoll,0.2% BSA,100mg/ml 变性鲑精

DAN, 10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖中杂交, 然后在 50℃ 下, 在 2X SSC, 25mM Tris-HCl (pH7.4), 5mM EDTA 和 0.1% SDS 中洗涤一次或数次。其他的低严谨条件, 如用于种间杂交的条件已有描述 (Ausubek et al., 1987; Kriegler, 1990; Shilo and Weinberg, 1981)。

[0081] 除了自然发生的 SHAAGtide 等位变异体外, 也可通过突变在 SEQ ID NO: 7-12, 14 中引入突变, 这种突变导致被编码的 SHAAGtide 氨基酸序列发生变化, 但并不改变 SHAAGtide 的功能。例如, 在 SEQ ID NO: 3 或 4 中核苷酸的取代导致“非必需”氨基酸残基的取代。“非必需”氨基酸残基是指改变 SHAAGtide 的野生型序列但不改变其生物学活性的残基, 而“必需”氨基酸残基则是其生物学活性所必需的。例如, 在本发明的 SHAAGtide 中保守的氨基酸残基是不可改变的。能进行保守取代的氨基酸是本领域技术人员所熟知的。

[0082] 表 A 中列出了有用的和优选的保守取代。保守取代是指一种类型的氨基酸被同一类型的另一种氨基酸所取代, 只要这种取代从本质上不改变化合物的生物活性, 就都落入到本发明的保护范围内。如果取代引起了生物学活性的改变, 则这样的取代是本质上的改变, 需要对产物进行 SHAAGtide 多肽生物学活性的筛选, 表 B 列出了这样的实例。

[0083] 表 A 优选的取代

[0084]

原残基	示例性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucine	Leu

[0085] 影响 (1) 多肽主链的结构, 如 β -片层或 α -螺旋构象, (2) 电荷, (3) 疏水性或 (4) 靶位点的侧链的大小的非保守性取代能改变 SHAAGtide 多肽功能。根据表 B 中列出的共同侧链的特性, 可将残基分成几组。非保守性的取代需要从这些类型中的一种改变为另一种。取代可引入到保守性的取代位点或更优选地引入到非保守性的位点。

[0086] 表 B 氨基酸类别

[0087]

类别	Amino acids
疏水性	Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile
中性亲水性	Cys, Ser, Thr

酸性	Asp, Glu
碱性	Asn, Gln, His, Lys, Arg
破坏链构象	Gly, Pro
芳香族	Trp, Tyr, Phe

[0088] 用本领域已知的方法,如寡核苷酸介导的(点)突变,丙氨酸扫描和PCR突变来获得变异体多肽。在克隆的DNA上进行点诱变(Carter,1986;Zoller and Smith,1987),盒式诱变,限制性选择诱变(Wellset al.,1985)或其他已知的技术可产生SHAAGtide变异体DNA(Ausubel et al.,1987;Sambrook,1989)。

[0089] “分离的”或“纯化的”多肽,蛋白或生物活性片段是指从天然环境的成分中分离和/或获得的,分离的多肽包括从遗传工程细胞中异源表达的或体外表达的。

[0090] 污染成分包括那些可干扰多肽用于诊断或治疗应用的成分。为进行随后的分离,制备物中非SHAAGtide的物质(污染物)所占的干重比应小于30%,优选小于20%,10%,最优选小于5%。

[0091] 可通过本领域任何已知的方法产生目的多肽和片段,如通过细菌,病毒和真核细胞等载体表达。此外,也可通过体外合成来获得,如肽合成。

[0092] “活性”多肽或多肽片段是指保持与表1和表3中所列出的SHAAGtide多肽相似的,但不必相同的生物学和/或免疫学活性的多肽。这里所指的免疫学活性不是SHAAGtide在引发或增强免疫应答中的实际的生物学作用,而是指SHAAGtide多肽的一方面作用,即抗SHAAGtide抗原表位的特异性抗体与SHAAGtide结合。生物学活性是指由天然SHAAGtide多肽所导致的抑制或刺激功能。SHAAGtide多肽的生物学活性包括趋化性,诱导,增强或有助于免疫应答。依赖或不依赖于剂量的特定生物学检测(参见实施例)可用于确定SHAAGtide活性。通过分离编码具有SHAAGtide生物学活性的多肽的多核苷酸序列,表达SHAAGtide的编码区(如通过体外重组表达)并分析SHAAGtide多肽编码部分的活性,可制备编码SHAAGtide的生物学活性部分的核酸片段。

[0093] 一般而言,具有SHAAGtide多肽类似功能的SHAAGtide多肽变异体包括序列中特定残基被其他氨基酸所取代的任何变异体,进一步包括在母蛋白的两个残基之间插入额外的残基及从母序列中缺失一个或多个残基。本发明包括任何氨基酸的取代,插入或缺失。适宜地,所述的取代是上面所定义的保守取代。

[0094] “SHAAGtide多肽变异体”是指SHAAGtide活性多肽,具有至少:(1)与全长SHAAGtide序列具有约70%氨基酸序列同一性;或(2)全长SHAAGtide序列的任何片段。例如,SHAAGtide变异体包括在序列SEQ ID NO:1-6,13的N或C末端加入或缺少一个或多个氨基酸残基的SHAAGtide多肽。SHAAGtide多肽变异体与SHAAGtide多肽序列相比,具有至少约70%的序列同一性,优选至少约71%的序列同一性,更优选具有至少约72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%的序列同一性,最优选具有至少约99%的序列同一性。

[0095] “氨基酸序列同一性百分比(%)”是指将SHAAGtide序列与候选序列比对后;两个序列中相同的氨基酸所占的百分比。为获得最大百分比的序列同一性,如果必要,在将序列比对后引入缺口。在计算序列同一性时,不考虑保守取代。为确定氨基酸序列同一性百分比所进行的比对可用本领域已知的各种方法获得,例如,用公众可获得的计算机软件,如

BLAST, BLAST-2, ALIGN2 或 Megalign (DANASTAR) 软件。本领域的普通技术人员可确定用于衡量比对的适宜参数, 包括用于获得被比较序列全长最大比对的计算程序。

[0096] 当对氨基酸序列进行比对时, 给定氨基酸序列 A 与另一给定序列 B 的氨基酸序列同一性 (也可表述为: 给定核苷酸序列 A 与给定氨基酸序列 B 相比, 具有的或包含的一定百分比的氨基酸序列同一性) 可用下式来计算:

[0097] 氨基酸序列同一性百分比 = $X/Y \cdot 100$,

[0098] 其中: X 是通过序列比对程序或计算程序对 A 和 B 进行比对时, 记做相同配对的氨基酸的数量; Y 是 B 中的氨基酸的总数。

[0099] 在氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不等时, A 比 B 的氨基酸序列同一性百分比与 B 比 A 的氨基酸序列同一性的百分比不等。

[0100] 嵌合和融合多肽

[0101] 融合多肽可用于表达研究, 细胞定位, 生物检测, SHAAGtide 纯化及在目的抗原与该多肽融合时作为佐剂。SHAAGtide “嵌合多肽” 或 “融合多肽” 包括 SHAAGtide 与非 SHAAGtide 多肽融合。非 SHAAGtide 多肽与 SHAAGtide (SEQ ID NO: 1-6, 13) 基本不同源。SHAAGtide 融合多肽可包括完整 SHAAGtide 的任何部分, 包括任何生物活性部分。在一些宿主细胞中, 与异源信号序列融合可改进 SHAAGtide 的表达和 / 或分泌。

[0102] 融合配对物可根据 SHAAGtide 的治疗用途来调整。SHAAGtide-Ig 融合多肽可作为免疫原在受试者体内产生 SHAAGtide Abs, 纯化配体和筛选可抑制 SHAAGtide 与其他分子相互作用的分子。此外, 与目的抗原融合可有助于疫苗接种 / 免疫。

[0103] 用重组的方法可容易地产生融合多肽。编码 SHAAGtide 的核酸可与非 SHAAGtide 编码核酸按照阅读框相融合, 如, 抗原与 SHAAGtide 的 NH_2 - 或 COO - 端或在中间融合用于免疫。也可通过常规技术合成融合基因, 包括用自动 DNA 合成仪合成。采用锚定引物进行 PCR 扩增, 可产生互补重叠的两个连续的基因片段, 然后将其退火, 再扩增产生嵌合基因序列 (Ausubel et al., 1987)。市售的许多载体可有助于 SHAAGtide 与融合部分的亚克隆。

[0104] 模拟物

[0105] 也可使用 SHAAGtide 的多肽模拟物。“模拟物” 和 “肽模拟物” 是指合成的基本上与 SHAAGtide 多肽具有基本相同的结构和 / 或功能的化合物。模拟物可完全由合成的, 非天然的氨基酸类似物组成, 或是部分天然肽氨基酸和部分非天然的氨基酸类似物的嵌合分子。模拟物也可包括任何数量的天然氨基酸的保守取代。多肽模拟组合物可包括与任何非天然结构成分的结合, 典型的非天然结构成分包括 3 组结构基团: (a) 残基连接基团, 而不是天然的酰胺键 (肽键) 连接; (b) 非自然残基代替自然发生的氨基酸残基; 或 (c) 诱导次级结构模拟的残基, 如诱导或稳定次级结构, 如 α β 旋转, γ 旋转, β 片层, α 螺旋构象或相类似的结构。

[0106] 当多肽的全部或部分残基以化学方式而不是天然的肽键形式相连接时, 该多肽可作为模拟物。单个多肽模拟物残基可通过肽键, 其他的化学键或结合方式相连, 如, 戊二醛, N-羟基琥珀酰亚胺酯, 双功能马来酰亚胺, N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 或 N, N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC)。可替代传统的酰胺键 (肽键) 的连接基团包括: 酮亚甲基 (如 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{for}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$), 氨亚甲基 (CH_2-NH), 乙烯基, 炔基 ($\text{CH}=\text{CH}$), 二乙醚 (CH_2-O), 硫醚 (CH_2-S), 四唑 (CN_4-), 噻唑, 逆酰胺, 硫代酰胺, 或酯 (Spatola (1983) in Chemistry

and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, NY)。

[0107] 包含全部或部分非自然残基替代自然发生的氨基酸残基的多肽也可作为模拟物。非自然的残基及每种类型的氨基酸(表 B)的适宜取代是本领域所熟知的。例如,通过用 D- 或 L-naphyl 丙氨酸, D- 或 L- 苯基氨基酸, D- 或 L-2 噻吩丙氨酸, D- 或 L-1, -2, -3 或 4-pyrenyl 丙氨酸等取代可产生芳香族氨基酸的模拟物。

[0108] 其他的模拟物包括通过脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基基团的磷酸化,赖氨酸,精氨酸和组氨酸的 α -氨基基团的甲基化, N- 末端胺的乙酰化,主链酰胺残基的甲基化或用 N- 甲基氨基酸的取代,或 C- 末端羧基基团的酰胺化来产生。也可用相反手性的氨基酸或多肽模拟物残基替代天然多肽中的组分。

[0109] 模拟物也可包括含有结构模拟残基的组合物,特别是诱导或模拟次级结构,如 β 旋转, β 片层, α 螺旋, γ 旋转和其他类似构象的残基。例如,用 D- 氨基酸, N- α - 甲基氨基酸, C- α - 甲基氨基酸或多肽中的脱氢氨基酸取代自然的氨基酸残基可诱导或稳定 β 旋转, γ 旋转, β 片层或 α 螺旋构象。

[0110] 环肽

[0111] 在有些情况下,环 SHAAGtide 肽是有优势的。为使 SHAAGtide 环化,可将肽中的半胱氨酸残基氧化以形成 S-S 二聚体或通过氧化形成更大的多聚体(三聚体等)。在肽中,相距较远的两个半胱氨酸可氧化来制备含有一种或多种功能氨基酸序列的环肽。

[0112] 实施发明

[0113] SHAAGtide 活性检测

[0114] (a) 体外检测

[0115] 在 SHAAGtide 作为佐剂使用时,其具有某些特性,即增强,引发或调控免疫应答。SHAAGtide 的其他活性是已知的,包括诱导对某种细胞的趋化性,所述细胞包括表达甲酰-肽受体一样-1 (FPR1) 受体的细胞。体外趋化性(细胞迁移)检测可用于鉴定 SHAAGtide 的化学趋化性。所述检测可用于从候选化学引诱物中将细胞分离出来,所述检测使用多孔膜,检测到细胞从膜的一端移动到另一端,则表明细胞发生了迁移。作为一个实例,可采用常规的细胞迁移检测,如 ChemoTx 系统 (NeuroProbe, Rockville, MD; (Goodwin, US Patent 5,284,753,1994)) 或其他任何适宜的装置或系统 (Bacon et al., 1988; Penfold et al., 1999)。收集表达靶受体的细胞。通常在缓冲液中连续稀释一系列浓度可制备候选化合物,如多肽或其他趋化因子/趋化因子类似化合物。典型的浓度范围为 0.1mM-10mM,但也根据待检测的化合物的不同而有所不同。

[0116] 在开始细胞迁移检测时,将各种浓度的候选化合物溶液加入到细胞迁移装置的下部腔室中,将细胞悬浮液加入到用多孔膜(约 3-5 μ m,根据细胞类型和细胞大小而定)分隔的上部腔室中。在培养条件(对人细胞,约 37°C)下,在潮湿的组织培养箱中培养细胞 60-180 分钟。培养的时间根据细胞的类型而定,如果需要,可根据经验来确定。

[0117] 停止检测后,用橡胶刮刀或其他手工的方法,酶法或化学法,如用 EDTA 和 EGTA 溶液将装置上部腔室中未迁移的细胞除去。然后除去分隔两个腔室的膜,用 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) 或水漂洗膜。然后确定迁移到下部腔室中的细胞的数量。细胞迁移水平高于背景(无趋化的或候选的化合物),表明候选化合物对检测的细胞具有趋化性。

[0118] 如果在约 1pM-1 μ M (如在约 1-500nM, 例如 1nM, 约 10nM, 约 100nM, 或约 1pg/ml-10 μ g/ml 之间, 如约 1ng-1 μ g/ml 之间, 例如约 10ng/ml, 约 100ng/ml 或约 1 μ g/ml,) 的浓度下吸引细胞超过阴性对照至少 2-8 倍或更多, 则表明候选化合物对特定类型的细胞具有趋化性。

[0119] (b) 体内检测

[0120] 可在动物, 如非人灵长类哺乳动物和小鼠中确定一种化合物的趋化性。在体内检测时, 通过皮内注射将候选化合物 (如 2-20 μ g, 溶于 PBS 中) 导入。大约 24-96 小时或更长长时间后, 用常规的组织学技术检测是否有细胞的浸润。如果存在细胞浸润, 再鉴定细胞的类型 (单核细胞, 嗜中性粒细胞, 树突状细胞等) 和数量。

[0121] SHAAGtide 的治疗应用

[0122] SHAAGtide 组合物

[0123] SHAAGtide 多肽 (SEQ ID NO: 1-6, 13) 或其衍生物, 类似物等可以组合物形式施用, 如用于引发, 增强或调控免疫应答的组合物; 可包括一种或多种 SHAAGtide 多肽 (SEQ ID NO: 1-6, 13)。组合物也可包括目的抗原, 但 SHAAGtide 多肽自身也可施用。在某些实施方案中, 多肽和包含其他分子, 如多肽或多糖免疫原的其他物质顺序施用。

[0124] 一方面, 本发明的方法包括除了 SHAAGtide 组合物外, 还给予免疫原。这些组合物在受试者的相同位点施用。例如, 免疫原可与 SHAAGtide 组合物结合, 然后将混合物一起施用 (如注射)。备选地, 所述组合物和抗原可在受试者的同一部位分别施用 (如注射到同一位点, 局部应用到相同的位点等)。不同的组合物在不同的时间施用。

[0125] SHAAGtide 组合物也可以不和抗原一起施用 (如注射到实体肿瘤中以引发对癌细胞的免疫应答, 或注射到实体肿瘤周围的组织中, 如实体肿瘤周围 2 厘米范围内)。不局限于特定的机制, SHAAGtide 通过聚集 APCs 到达施用位点而提高了对内源抗原 (如肿瘤) 的免疫应答。

[0126] SHAAGtide 组合物可另外含有赋形剂或载体。SHAAGtide 组合物也可以包括一种或多种免疫原 (抗原, 如预计诱导, 增强或调控对该抗原的免疫应答的抗原)。

[0127] SHAAGtide 组合物可包含常规的佐剂。常规佐剂可将可溶性的蛋白抗原转化为颗粒状物质。常规的佐剂包括弗氏不完全佐剂, 弗氏完全佐剂, Merck65, AS-2, 明矾, 硫酸铝, 矿物胶如氢氧化铝, 和表面活性物质, 如溶血卵磷脂, 多聚醇, 聚阴离子, 肽, 油乳剂, 匙孔血蓝蛋白和二硝基酚。其他有用的佐剂包括但不限于细菌荚膜多糖, 葡聚糖, IL-12, GM-CSF, CD40 配体, IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 或任何细胞因子或细菌 DNA 片段。

[0128] 抗原

[0129] 一方面, 本发明提供了引发或增强对某种抗原的免疫应答的方法, 所述抗原如预定的或特定的抗原。抗原是与抗体反应的分子。在某些实施方案中, 抗原是免疫原。在有些情况下, 抗原与蛋白载体相连。例如, SHAAGtide 和抗原可物理连接, 如通过融合蛋白, 化学交叉连接或通过生物素和链霉亲和素的复合体连接。

[0130] 典型的抗原 (免疫原) 是肽, 多肽, 化合物, 微生物病原体, 细菌 (如活的, 减毒的活失活的细菌), 病毒 (包括失活的病毒颗粒, 改进的活病毒颗粒和重组病毒颗粒), 重组细胞, 糖蛋白, 脂蛋白, 糖肽, 脂肽, 类毒素, 碳水化合物, 肿瘤特异性抗原, 和其他病原体的免

疫组分。可使用两种或多种抗原的混合物。抗原可以是纯化的。在某些情况下,抗原可与 SHAAGtide 多肽联合(共价或非共价)。

[0131] 本发明可用于在受到外源侵染性病原因子的攻击之前提供保护。此外,本发明也可提供对外源病原体侵染的治疗,其中受试者已经受到外源病原体的攻击或已经呈现出病理症状。本发明也可用于治疗癌症,包括但不限于黑色素瘤,肺癌,甲状腺癌,乳腺癌,肾细胞癌,鳞状细胞癌,脑肿瘤和皮肤癌。例如,抗原可以是肿瘤相关抗原(肿瘤特异性抗原)。肿瘤抗原是在肿瘤细胞和非肿瘤组织中差异表达的分子,特别是细胞表面蛋白。

[0132] 作为预防应用,可将包含 SHAAGtide 的组合物给予(如与免疫原联合给予)受试者。作为治疗应用,可在疾病检测,诊断或治疗,如外科切除肿瘤后的治疗中给予受试者包含 SHAAGtide 的组合物。

[0133] 本发明的代表性的抗原或疫苗成分包括来源于微生物病原体,如细菌(如百日咳(*Bordetella pertussis*, 灭活的全微生物),霍乱(*Vibrio cholerae*, 死亡的全微生物),脑膜炎(*Neisseria meningitidis*, 来自微生物的多糖),Lyme 疏螺旋体病(*Borrelia burgdorferi*, 脂蛋白 OspA),流感嗜血杆菌 B(*Haemophilus influenzae*, 多糖,破伤风偶联物或 OmpC),肺炎(*Streptococcus pneumoniae* 荚膜多糖),伤寒症(*Salmonella typhi* 多糖疫苗,死亡的全微生物),),包含失活病毒颗粒的病毒,改进的活病毒颗粒,和与流行性感胃病毒重组的病毒颗粒,肝炎 A,肝炎 B,肝炎 C,麻疹,风疹病毒,腮腺炎,狂犬病,脊髓灰质炎病毒,日本脑炎病毒,轮状病毒,水痘,白喉(*Corynebacterium diphtheriae*)和破伤风(*Clostridium tetani*)。

[0134] 多核苷酸趋化组合物

[0135] SHAAGtide, 抗原或二者均可以多核苷酸形式运载,因而可在原位产生多肽。对于裸多核苷酸可通过将其包装到载体上来提高细胞对其的吸收,所述载体例如可有效地转移到细胞中的可生物降解的珠子。在该疫苗中,多核苷酸可在各种运载系统中存在,包括核酸表达系统,细菌和病毒表达系统。

[0136] 用于将遗传物质从一种有机体传递到另一种有机体中的载体可分为两类:克隆载体是复制型的质粒或噬菌体,其具有对其在适宜宿主细胞中繁殖所非必需的区域,在该区域可插入外源 DNA;外源 DNA 作为该载体的成分被复制和繁殖。表达载体(如质粒,酵母或动物病毒基因组)用于将外源遗传物质导入到宿主细胞或组织中以转录和翻译外源 DNA,如 SHAAGtide。在表达载体中,导入的 DNA 与启动子等成分可操作连接,这些成分给宿主细胞提供信号以转录插入的 DNA。也可使用诱导型的启动子针对特异性的因素来调控基因的转录。与诱导型启动子可操作连接的 SHAAGtide 和/或抗原多核苷酸可调控 SHAAGtide 和/或抗原多肽或片段的表达。典型的诱导型启动子包括那些对 α -干扰素,热休克蛋白,重金属离子和类固醇,如肾上腺皮质激素(Kaufman, 1990)和四环素作出反应的启动子。其他的诱导型启动子包括那些对外源给予的诱导因子作出反应的启动子。通常,可用的表达载体是质粒。但也可用其他类型的表达载体,如病毒载体(如复制缺陷型逆转录病毒,腺病毒和腺相关病毒)。

[0137] 根据所使用的有机体或细胞及载体的期望特性来选择载体。载体可在靶细胞中复制一次,或可以是“自杀型”的载体。通常,载体包括信号序列,复制起点,标记基因,增强序列,启动子和转录终止序列。

[0138] SHAAGtide 和免疫原（抗原）的给予

[0139] SHAAGtide 组合物可包含一种或多种抗原或编码抗原的多核苷酸。抗原可与 SHAAGtide 联合（如在相同的混合物中）施用。另一方面，它们也可分别施用。一方面，本发明提供了将一种或多种抗原（或编码抗原的多核苷酸）和一种或多种 SHAAGtide（或编码 SHAAGtide 的多核苷酸）联合给予受试者的免疫方法。抗原或 SHAAGtide 可包含在运载工具中给予，所述运载工具如生理上可接受的赋形剂。

[0140] 抗原可以和 SHAAGtide 组合物同时施用，或抗原和 SHAAGtide 组合物在不同时间施用，通常在同一位点施用。例如，趋化组合物（无抗原）可在给予抗原前约 15 分钟到 96 小时施用，经常在给予抗原前 15 分钟到 48 小时之间，更经常是在 24-96 小时，更经常是在 48-72 小时之间或 72-96 小时之间。

[0141] 当 SHAAGtide 组合物和抗原组合物在受试者的同一位点注射时，优选注射点相互之间在身体的二维表面上位于 2 厘米之内，更优选位于 1 厘米之内，更优选位于 0.5 厘米之内。施用也应在相似的深度和相同的组织层内。对肌肉注射而言，深度应更精确，在三维空间上 SHAAGtide 和抗原位于 2 厘米范围内，优选在 1 厘米范围内，更优选在 0.5 厘米范围内。注射点可用抹不掉的墨水标记来帮助医生标记。

[0142] 可以给予一种剂量的组合物。但在第一次施用后也随后进行加强施用。例如，SHAAGtide 组合物以多剂量给予时，经常与抗原联合（如共同施用）。SHAAGtide 组合物（任选地包括抗原）可以施用一次，两次，三次或更多次。根据抗原不同，疾病程度和受试者对 SHAAGtide 组合物的反应来确定施用剂量。在本发明中，适宜的剂量包括可使动物对预期抗原产生免疫的任何所需的剂量。

[0143] 在第一次施用后约 7 天到 1 年内，可第二次给予（加强）SHAAGtide 组合物和抗原。第一次施用和第二次施用之间的时间间隔可以是 14 天到 6 个月，21 天和 3 个月，经常在初次施用后 28 天到 2 个月。第三次施用（第二次加强）可在第一次施用后约 14 天和 10 年之间，如在第一次施用后 14 天和 3 年之间，经常在约 21 天和 1 年之间，更经常是在 28 天和 6 个月之间。随后的加强可在间隔 2 周，或 1 个月，3 个月或 6 个月到 10 年之间进行。

[0144] 施用的疫苗的剂量和方案是很容易确定的。本领域普通技术人员可根据其公知常识来确定本发明的 SHAAGtide，抗原或 SHAAGtide 和抗原的联合的施用的有效量和次数。

[0145] 有效剂量

[0146] 一般而言，给予受试者的 SHAAGtide 和抗原的量应足以能够免疫动物抗某种抗原（即“免疫学上有效剂量”或“治疗有效剂量”）。能够达到“免疫学上有效剂量”部分依赖于 SHAAGtide 和抗原组合物，施用方式，待治疗疾病阶段和严重度，受试者的体重和健康状况，医生或其他相关人员的判断。

[0147] 可在获得免疫应答诱导的动物模型中确定抗原和 SHAAGtide 的有效剂量。根据从动物上获得的资料可使对人的施用更适宜（参见实施例）。当 SHAAGtide 是多肽时，常规的剂量约为 1fg 和约 100 μ g，经常为 1pg 和约 100 μ g，更经常为约 1ng 和约 50 μ g 之间，通常在 100ng 和约 50 μ g 之间。在一些情况下，剂量约为 1fg 和约 100 μ g/kg 受试者体重之间，经常为约 1pg 和约 100 μ g 之间，更经常为约 1ng 和约 50 μ g 之间，通常在约 100ng 和约 50 μ g 之间。

[0148] 抗原的量根据抗原的特征和特性而不同。SHAAGtide 组合物可包含一种或多种抗

原和一种或多种 SHAAGtide, SHAAGtide 与抗原的摩尔或重量比约为 1 : 1000 或更大。其他有用的比例为约 1 : 10 到 1 : 1000 之间或超过 1 : 1000。组合物中抗原与 SHAAGtide 的比例可在 1 : 10 和 10 : 1 之间。

[0149] 载体, 赋形剂, 常规佐剂, 施用方式

[0150] 本发明含有 SHAAGtide 的组合物可以各种方式和以各种形式施用。SHAAGtide 组合物可包括载体和赋形剂, 如缓冲液, 碳水化合物, 甘露醇, 蛋白质, 多肽或氨基酸, 如甘氨酸, 抗氧化剂, 抑菌剂, 整合剂, 悬浮剂, 变浓剂和 / 或防腐剂; 水, 油, 盐溶液, 含水葡萄糖和甘油溶液, 其他的药学上可接受的辅助物质要求接近于生理条件, 如缓冲剂, 张力调整剂, 湿化剂等。常规的佐剂也可包含在组合物中。

[0151] 虽然任何适宜的载体均可用于本发明的组合物的施用, 但载体的类型是根据施用方式的不同而变化的。组合物也可包围在脂质体中。在一些情况下, 可生物降解的微环境作为载体是很方便的, 如在美国专利 5, 942, 252 中所描述的 (Tice et al., 1999)。

[0152] 组合物需要灭菌, 如可采用常规技术或过滤灭菌。所获得的水溶液可包装起来使用或冻干。

[0153] 本发明的 SHAAGtide 组合物可以各种方式施用, 包括注射 (如皮内, 皮下, 肌肉, 腹膜内等), 吸入, 局部施用, 栓剂, 透皮片或经口。

[0154] 在注射施用时, 组合物可配制成水溶液, 优选溶于生理上相容的缓冲液中, 如 Hanks 溶液, Ringer's 溶液或生理盐缓冲液。溶液中可包含配制剂, 如悬浮, 稳定和 / 或分散剂。另一方面, 趋化组合物也可是粉剂, 在使用前与适宜的载体配制, 如无菌的无热原水。以吸入方式运载的组合物可以是来自密封包装和带有适宜推进物的喷雾器的气雾剂, 所述的适宜推进物如二氯二氟甲烷, 三氯氟甲烷, 二氧化碳或其他适宜的气体。在压缩的气雾剂的例子中, 可通过提供一个调节量度表的阀门来确定剂量。在吸入器中使用的例如, 明胶可用于配制含蛋白和适宜粉状基的粉状混合物的胶囊和弹药筒, 其中所述的粉状基如乳糖或淀粉。对于局部施用而言, 组合物可配制成溶液, 凝胶, 药膏, 膏状物, 悬浮液和本领域已知的类似结构。一方面, 本发明的组合物可经透皮片施用。栓剂也可配制成含有常规的栓剂基。

[0155] 在口服施用时, 通过将组合物与药学上可接受的载体结合很容易配制组合物。固体载体包括甘露醇, 乳糖, 硬脂酸镁等, 这些载体可配制成片剂, 丸剂, 糖衣剂, 胶囊, 液体, 凝胶体, 糖浆, 浆液, 悬浮液等用于口服。这些剂型可以是粉剂, 胶囊和片剂; 适宜的赋形剂包括填充料, 如糖, 纤维素, 成粒剂和粘结剂。

[0156] 编码 SHAAGtide 的核酸分子可插入到载体中, 作为基因治疗的载体。基因治疗技术目前已成为相当有用的技术, 并且正在取得令人羡慕的成就 (Meikle, 2002)。基因治疗载体可通过静脉注射, 局部施用 (Nabel and Nabel, US Patent No. 5, 328, 470, 1994) 或通过立体定位注射等运载到受试者体内。基因治疗载体的药物制备包括可接受的稀释液和可缓慢释放的基质, 其中基因运载载体就埋在该基质中。另一方面, 可从重组细胞中产生完整的基因运载载体, 如腺病毒载体, 其药学制备可包括能产生基因运载系统的一个或多个细胞。

[0157] 其他的便利的载体包括多价载体, 如细菌荚膜多糖, 葡聚糖或基因工程载体。此外, 包含 SHAAGtide 分子和 / 或抗原的可持续释放的剂型使得 SHAAGtide 和 / 或抗原的释放持续很长时间。如果没有持续释放剂型, SHAAGtide 和 / 或抗原将从受试者的系统中被清除或被降解。

[0158] 制备单克隆和多克隆抗体的接种

[0159] 制备多克隆和单克隆抗体,包括结合片段(如 $F_{(ab)2}$)和其单链的方法是已知的。但多数抗原不能引发足够的抗体应答。作为一个实例,将包含本发明的 SHAAGtide 和一种抗原的组合物给予一种动物,因此在动物体内诱导和增强免疫应答。随后,用常规的方法制备多克隆或单克隆抗体。

[0160] 固有的免疫应答的刺激

[0161] 一方面,将本发明的组合物给予受试者以刺激固有的免疫应答。固有的免疫应答是机体抵抗病原体的最初防卫,可被包括 APCs 在内的各种细胞所引发。这些细胞表达可识别外源分子(如细菌和病毒核酸,蛋白质,碳水化合物)的表面和细胞质受体。在检测到这些信号时,树突状细胞和巨噬细胞引发包括释放细胞因子(包括干扰素, $TNF-\alpha$ 和 IL-12)和趋化因子的防卫性应答,所述的细胞因子和趋化因子吸引细胞到攻击位点,其中所述的细胞如不成熟的树突状细胞,巨噬细胞, NK 细胞和粒细胞。

[0162] 本发明的组合物不仅可用于将树突状细胞和其他细胞吸引到施用位点,还可刺激这些细胞引发固有的免疫应答以产生非特异性的保护,同时机体可产生适宜的应答。例如,在预期的侵染攻击之前或之后给予 SHAAGtide 组合物(无抗原),所述的侵染包括在生物恐怖主义中所使用的有害侵染。另一方面,可与外源分子(如细菌和病毒核酸,蛋白,碳水化合物,和合成的这些成分的模拟物)一起施用。

[0163] 试剂盒

[0164] 一方面,本发明提供了在包装或容器中含有下列一或多种物质的试剂盒;(1) 本发明的 SHAAGtide 组合物;(2) 药学上可接受的佐剂或赋形剂;(3) 抗原(如生物学纯化抗原)(4) 施用工具,如注射器;(5) 施用说明。

[0165] 在使用试剂盒时,组合物中的不同成分可分别包装,在使用前再混合。这样不同成分的分别包装可保存很长时间而不丧失活性。

[0166] 试剂盒中包含的试剂可保存在任何种类的容器中,保证不同成分的活力不被容器的材料所吸收或改变。例如,密封玻璃安瓿可包含冻干的 SHAAGtide 多肽或多核苷酸或缓冲液,后者在中性非反应性气体如氮气下包装。安瓿可由任何适宜的材料所组成,例如玻璃,有机聚合物,如聚碳酸酯,聚苯乙烯等,陶瓷,金属或任何其他用于盛装相似试剂的材料。其他的适宜容器的例子包括用与安瓿相类似的物质所制作的小瓶,以及内部可包括箔的包装,如铝或合金。其他的容器包括试管,小瓶,长颈瓶,瓶子,注射器或类似容器。容器可具有一个无菌的入口,如具有可被皮下注射用的注射针穿过的塞子的瓶子。其他的容器可具有由可除去的膜分开的两部分,在该膜去除后,可允许其成分进行混合。可除去的膜可以是玻璃,塑料,橡胶等。

[0167] 试剂盒也可包括说明材料。说明可印在纸或其他物质上,和/或以可读的电子介质形式,如软盘, CD-ROM, DVD-ROM, 压缩盘, 录像带, 录音磁带等。详细的说明可不必与试剂盒相连。使用者可直接登陆生产者和试剂盒发行人所建立的网站和以电子邮件的形式供给。

[0168] 下面的实施例用于阐述本发明,但不限于这些实施例。

[0169] 实施例

[0170] 实施例 1 方法

[0171] 除非另有说明,所述试剂均来自 Sigma 化学公司 (St. Louis, MO)。

[0172] SHAAYtide 多肽 (SEQ ID NO:4) 的制备:化学合成并纯化 SEQ IDNO:4 的多肽,“SHAAYtide”(Phoenix Pharmaceuticals;Belmont, CA)。将所述物质以约 1mg/ml 的浓度悬浮在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中,贮存在 -20℃ 下。

[0173] 酶联免疫吸附实验 (ELISAs):首先,用每孔中 100 μ l PBS 中含 1 μ g 的卵清蛋白 (OVA) 覆盖 96 孔 U 型底的塑料板,过夜。第二天,用 PBS 漂洗该板,用含有 5% 胎牛血清 (FBS) 的 PBS 封闭,再用 PBS 漂洗。将来自试验动物的血浆样品 (见下) 稀释 10^2 - 10^5 倍,然后加到盘中反应 2 小时,然后再次用 PBS 漂洗板。然后,将该板与生物素化的山羊抗猴 IgG 检测抗体一起培养,然后用 PBS 漂洗,与链霉亲和素连接的辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 一起培养。用 PBS 最后一次漂洗后,加入 HRP 的底物 2,2'-连氮 [3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]-磷酸氢二铵盐。用 ELISA 读板机在 405nm 下测量颜色的形成,然后将光密度 (OD) 单位转换为任意的“抗体单位”,其中,一个单位定义为在标准曲线中产生最大应答 50% 的血浆稀释液转换,所述的标准曲线是通过从注射 OVA 的小鼠收集到的和含有 OVA 特异性抗体的腹水进行一系列稀释而获得的。

[0174] 树突状细胞的纯化:随后可制备基本纯化的树突状细胞 (包括成熟或不成熟细胞的亚群)。树突状细胞的亚群包括:(1) 不成熟的外周血单核来源细胞;(2) 成熟的外周血单核来源细胞;和 (3) 从 CD34 表达前体来源的细胞。

[0175] 用特异的细胞因子,从 CD14 表达血祖细胞的培养物中可产生各种阶段的人或短尾猿树突状细胞。树突状细胞的分离品系可与来自脐带血和骨髓的 CD34 表达前体区分开。最后,可产生来自外周血单核细胞 (PMBCs) 的未成熟和成熟的树突状细胞 (Bender et al.,1996)。用巨噬细胞条件化培养基和双链 RNA-ploy(I:C) 刺激可制备成熟的树突状细胞 (Cella et al.,1999;Romani et al.,1996;Verdijket al.,1999)。

[0176] 为证实已分离到了树突状细胞群,通过在树突状细胞成熟过程中趋化因子受体表达的变化可鉴定并证实细胞的发育阶段 (Campbell et al.,1998;Chan et al.,1999;Dieu et al.,1998;Kellermann et al.,1999)。例如,通过使用细胞标记和荧光激活的细胞分选 (FACS) 可鉴定产生的成熟的树突状细胞。产生的树突状细胞与未成熟的树突状细胞相比,可在细胞表面表达更高水平的 MHCII 类。CD80, CD83 和 CD86 的表达也上调。在成熟过程中,趋化因子受体的表达也发生明显的变化。在成熟细胞中,CCR1 和 CCR5 下调,而 CCR7 上调。也可根据功能特性来证实细胞的类型,例如,成熟的树突状细胞不能有效地摄取抗原,但获得了刺激天然 T 细胞和 B 细胞增殖的能力。成熟的树突状细胞也改变了其迁移行为,对 CCR1, CCR2 和 CCR5 配体无反应,但对 CCR7 配体则有新的反应。

[0177] 实施例 2 SHAAGtide 变异体 (SEQ ID NO:2) 吸引树突状细胞

[0178] 本实施例描述了体内检测几种趋化因子和 SHAAGtide (SEQ IDNO:2) 吸引树突状细胞的能力。

[0179] 下面的趋化因子来自 R&D 系统 (Minneapolis, MN):vMCK-2, mC10 和 GM-CSF。下面的肽在 Phoenix Pharmaceuticals 合成 (San Carlos, CA):SHAAYtide (SEQ ID NO:4), SHAAGtide 变异体 (SEQ ID NO:) 的几种结构改变的肽 (即用 MPR-Cys 联接环化进行的环化),对照肽 (SEQ ID NO:17, Gly Ala Ala His Ser Leu Thr Met Gln Pro Gly Ile Lys Arg Arg Trp Leu Met),与 OVA 以 1:1 或 1:4 的比例随机连接 (通过 MBS 结合法),与 OVA 在 C-末端连接 (C-末端,通过加入半胱氨酸来制备),和 SHAAGtide 变异体 (SEQ ID

NO:2)。在 3 个独立的试验中,将趋化因子和肽 (在 PBS 中含 $2\mu\text{g}$ 或 $20\mu\text{g}$) 经皮内注射到 BALB/c 或 C57B1/6 小鼠中 (Jackson Laboratory;Bar Harbor, Maine)。在每个试验中,只注射 PBS 的小鼠作为阴性对照。在注射后不同时间内使小鼠安乐死,切除注射点周围的组织并进行免疫组织学。用识别树突状细胞特异性分子的抗 -DEC-205 抗体 (Bio-Whittaker Molecular Applications;Rockland, ME) 对冷冻切片进行染色 (Kraal et al.,1986)。相对的染色数记为 0-5 (0,无染色;1,轻微染色;2,微染色;3,中等染色;4,严重染色)。结果在表 7,8 和 9 中列出。

[0180] 从表 7,8 和 9 中可见, vMCK-2, C10, GM-CSF, SHAAytide (SEQ ID NO:4) 和所有施用的 SHAAgtide 均表现出明显的 DEC-205 标记的细胞的浸润。

[0181] 表 7 在 C57B1/6 小鼠中树突状细胞的浸润 ($2\mu\text{g}$ 剂量)

[0182]

多肽	时间 (小时)	记分	多肽	时间 (小时)	记分
盐水	6	0	mC10	6	1
		1			1
	30	0			2
		0		30	1
	51	1			2
		0			2
vMCK-2	6	3	SHAAytide (SEQ ID NO:4)	51	0
		3			0
		2			0
	30	3		6	1
		1			1
		3			1
	51	0		30	0
		3			0
		3			0
		3			0
	51	0		51	0
		3			0
		3			0
		3			0

[0183] 表 8 在 BALBc 小鼠中树突状细胞的浸润 (各种剂量)

[0184]

多肽	剂量	时间 (小时)	记分	多肽	剂量	时间 (小时)	记分
盐水	0 μ g	6	0	mC10	2 μ g	6	2
			1				2
			0				2
		30	2			30	2
			1				2
			2				3
vMCK-2	2 μ g	6	2		20 μ g	6	2
			2				2
			2				2
		30	3			30	3
			2				1
			2				1
	20 μ g	6	2	SHAA Ytide (SEQ ID NO:4)	2 μ g	6	2
			3				2
			3				3
		30	3			30	3
			2				2
			3				3
		6	2		20 μ g	6	2
			2				2
			3				3
		30	3			30	3
			2				0
			3				1

[0185] 表 9 在 BALBc 小鼠中的浸润, 各种剂量

[0186]

多肽	时间(小时)	记分
盐水	6	1
		2
		1
vMCK-2	6	3
		0
		2
GM-CSF	6	2
		1
		1
盐水	30	1
		1
		1
GM-CSF	30	1
		1
		1
SHAAGtide variant (SEQ ID NO:2)-15mer	30	3
		2
		1
SHAAGtide (SEQ ID NO:4)	30	0
		2
		2
SHAAytide (SEQ ID NO:4), 环化的	30	1
		2
		2
SHAAytide (SEQ ID NO:4) 和 OVA	30	3
		3
		1
OVA-SHAAytide (SEQ ID NO:4) C-端	30	2
		2
		2
OVA-SHAAytide (SEQ ID NO:4) 1:1	30	4
		4
		3
OVA-SHAAytide (SEQ ID NO:4) 1:4	30	3
		3
		4
对照肽 (SEQ ID NO:17)	30	1
		0
		2

[0187] 实施例 3 SHAAYtide (SEQ ID NO:4) 施用于恒河猴

[0188] 恒河猴在麻醉状态下,用不同的多肽(见表 10)以不同的量(在 100 μ l PBS 中含 8, 20 或 60 μ g)经皮内进行注射。24 和 48 小时后,采用无菌技术取 6mm 皮肤钻孔活组织并将其分割。将一部分活组织埋入 OCT 化合物中,迅速在液氮中冷冻并在 -70℃ 下贮存。其他的活组织浸泡在福尔马林中,随后埋入到石蜡中,用苏木精和曙红对切片机切下的薄片进行染色,然后在显微镜下观察细胞向真皮的浸润(表 10)。用不含多肽的 PBS 注射猴子作为阴性对照。

[0189] 单核细胞的浸润记为 0-5;0 表示真皮层可见非常轻微的血管外单核细胞炎性浸

润 ;1 表示真皮层可见轻微的血管外单核细胞炎性浸润 ;2 表示真皮层可见轻微 / 中等程度的血管外单核细胞炎性浸润 ;3 表示真皮层可见中等程度的血管外单核细胞炎性浸润 ;4 表示真皮层可见广泛的血管外单核细胞炎性浸润 ;5 表示真皮层可见红色的血管外单核细胞炎性浸润。位于中间的可记为 :如 2/3 表示记分在 2 和 3 之间。

[0190] 如表 10 所示,20 μ g 的 SHAAytide (SEQ ID NO:4) 可在两只动物中的其中一只上导致中等程度的浸润。vMCK-2 导致明显的细胞浸润。施用 20 μ g 可比施用 60 μ g 和 8 μ g 造成更明显的浸润。vMIP-1 在所有的检测剂量中均导致轻微的浸润。与所用细胞因子浓度较低的类似实验相对比,本实验中 mC10 很少或不导致浸润。VKB8-1 不导致浸润。

[0191] 表 10 单核细胞浸润

[0192]

多肽	剂量	24 小时		48 小时	
		猴 1	猴 2	猴 3	猴 4
vMIP-1	60 μ g	1	-	1	-
	20 μ g	-	1	-	0
	8 μ g	0	-	0	-
C10	60 μ g	0	-	0	-
	20 μ g	-	0	-	0
	8 μ g	-	1	-	0
vMCK-2	60 μ g	3	-	3	-
	20 μ g	-	4	-	2
	8 μ g	-	3	-	1
SHAAytide (SEQ ID NO:4)	60 μ g	0		0	
	20 μ g		2*		0
	8 μ g	0		0	
CK β 8-1 (residues 25-116)	60 μ g	0		0	
	20 μ g		0		0
	8 μ g	-	-	-	-
盐水		0	1	0	0

[0193] * 表示一些簇细胞而非散开的浸润

[0194] 实施例 4 浸润细胞的鉴定

[0195] 为了更好地确定在实施例 3 (表 10) 中所见到的浸润细胞的身份,用针对不同细胞类型的特异性抗体采用免疫组织学方法分析同一样本。这些抗体包括:CD68 (在巨噬细胞,嗜中性粒细胞和树突状细胞上表达),MHCII (抗原提呈细胞,例如巨噬细胞和树突状细胞),HAM-56 (巨噬细胞),fascin (树突状细胞,内皮细胞和上皮细胞),弹性蛋白酶 (嗜中性粒细胞),细胞角蛋白 (上皮细胞),CD3 (T 细胞),CD20 (B 细胞) 和 CD1a (朗格羊氏细胞)。

[0196] 注射 vMCK-2 的皮肤样本含有初始的嗜中性粒细胞和抗原提呈细胞,包括巨噬细胞和树突状细胞。注射 mC10 的皮肤样本含有初始的抗原提呈细胞,包括巨噬细胞和树突状细胞,但几乎无嗜中性粒细胞。注射 vMIP-1 的皮肤样本含有初始的嗜中性粒细胞和巨噬细胞,但几乎无树突状细胞。在注射上述 3 种趋化因子的皮肤样本中几乎无 T 细胞,未发现 B 细胞。

[0197] 实施例 5 在恒河猴中的 SHAAytide (SEQ ID NO:4) 佐剂活性

[0198] 由于 SHAAytide (SEQ ID NO:4) 和趋化因子 mC10 和 vMCK-2 可将 APCs (包括树突细胞) 聚集到注射位点,因此这些多肽可作为增强对共注射的外源抗原产生免疫应答的免疫佐剂。将猴子分成 5 组,每组 3 只,用鸡卵清蛋白 (OVA) 作为抗原经皮内对其进行注射。第一组猴子只注射 OVA,第二组猴子注射以 1:1 的比例用常规的不完全弗氏佐剂 (IFA) 乳化的 OVA,第三组猴子注射 OVA, IFA 和 vMCK-2,第四组猴子注射 OVA, IFA 和 mC10,第五组猴子注射 OVA, IFA 和 SEQ ID NO:4。所述制剂 (含 2mg OVA 和 16 μ g 多肽) 经皮内注射 100 μ l。每周 2 次从每只猴子中采集 10ml 外周血,采集 3 周。然后将采集的血样与 Ficoll 一起离心以除去红细胞和粒细胞。用三明治 ELISA 分析血浆上清液,采用 OVA 包被的塑料板和生物素化的抗猴 IgG 检测抗体来确定抗 OVA 的抗体水平。以“抗体单位”(参见实施例 1) 来表示的结果见表 11。报道的数值表示在 15 只猴子的血浆中 OVA 特异性 IgG 水平,以抗体单位/ml 表示。每一行表示单个猴子在免疫后的应答。

[0199] 表 11 猴子中抗-OVA 抗体的诱导

[0200]

制剂	N	第0天	第5天	第9天	第12天	第16天	第19天
OVA	1	428	393	445	814	941	1,116
	2	4,577	4,073	4,228	4,475	8232	3,740
	3	243	248	255	279	280	202
OVA+IFA	1	114	118	368	11,987	36,435	44,781
	2	370	325	156	29,670	76,084	76,240
	3	299	210	221	21,353	50,374	59,184
OVA+IFA+vMCK2	1	249	242	261	4,205	6,097	10,827
	2	294	263	360	26,985	44,230	53,383
	3	310	262	263	40,264	109,919	135,608
OVA+IFA+mC10	1	323	294	430	55,498	96,905	114,818
	2	267	252	451	88,997	98,075	97,376
	3	390	356	465	50,940	81,888	109,445
OVA+IFA + SHAAytide (SEQ ID NO:4)	1	112	123	353	85,503	248,798	155,614
	2	449	389	469	43,543	93,760	119,176
	3	163	161	201	62,188	118,359	118,618

[0201] 如表 11 所示,用 OVA 和 IFA 注射的猴子表现出明显的对 OVA 的抗体应答,如在第

12天开始的循环抗OVA IgG的形成所示。与之相比,用OVA, mC10和IFA或OVA, shaag和IFA注射的猴子中OVA特异性IgG的水平分别比未注射mC10或SEQ ID NO:4的猴子中的水平高得多。

[0202] 实施例6 在小鼠中的SHAAYtide(SEQ ID NO:4)佐剂活性

[0203] 除了用在100 μ l制剂中含10 μ g(表12)或500 μ g(表13)的OVA给予BALB/c小鼠,不使用IFA外,其他试验步骤如实施例5中所述。

[0204] 将含有或不含有SHAAYtide(SEQ ID NO:4)的OVA在0天和21天(表12)经腹膜内或在0天和14天(表13)经皮下给予BALB/c小鼠。在预定的时间点采集血样。以抗体单位表示的结果见表12和13,表示IgG的水平。

[0205]

表12 小鼠抗-V0A抗体的诱导 (10 μ g OVA)

制剂	n	0 day (d)	10 d	15 d	27 d	31 d	36 d
OVA	1	47	7	1,225	19,258	22,449	24,656
	2	51	7	672	3,725	6,710	6,084
	3	186	47	57	9,928	16,094	18,524
	4	24	28	125	1,970	8,766	9,796
	5	17	17	0	3,789	10,710	12,419
	平均	65	21	416	7,734	12,946	14,296
OVA 和 2 μ g SHAAYtide (SEQ ID NO:4)	从0天开始增加		0	351	7,669	12,881	14,231
	1	10	56	281	14,609	17,134	18,119
	2	4	120	142	13,572	15,917	18,201
	3	10	7	0	6,672	10,933	12,047
	4	2	267	185	22,843	22,390	23,180
	5	91	51	0	203	5,060	7,547
OVA 和 20 μ g SHAAYtide (SEQ ID NO:4)	平均	23	100	122	11,580	14,287	15,819
	从0天开始增加		77	98	11,556	14,263	15,795
	1	14	734	3,116	557,000	951,900	943,800
	2	0	14	220	589,300	861,200	807,400
	3	10	87	24	893	1,016	1,187
	4	10	24	99	17,326	21,714	20,529
2 μ g SHAAYtide (SEQ ID NO:4)	5	56	101	645	194,100	132,910	428,400
	平均	18	192	821	271,724	393,748	440,263
	从0天开始增加		174	803	271,706	393,730	440,245
	1	7	0	0	47	47	60

[0206]

制剂	n	0 day (d)	10 d	15 d	27 d	31 d	36 d
	2	7	273	0	47	17	46
	3	14	0	0		12	60
	4	24	0	0	58	0	0
	平均	13	68	0	51	19	42
	从0天开始增加		55	0	38	6	29
20 µg SHAAYide (SEQ ID NO:4)	1		31	0	0	122	12
	2		47	0	0	110	32
	3		139	40	0	136	69
	4		64	592	168	98	47
	平均		70	158	42	112	40
	从0天开始增加			88	0	41	0

[0207]

表13 小鼠抗-V0A抗体的诱导 (500 µg OVA)

制剂	n	0天(d)	7d	10d	14d	17d	21d	24d	28d
OVA	1	98	522	7,380	17,010	43,418	530,680	944,980	942,870
	2	56	954	10,149	36,041	65,810	1,115,660		1,277,790
	3	62	393	2,553	25,490	79,466	723,950	1,158,540	1,223,230
	4	37	179	2,316	8,725	34,167	398,560	682,620	511,990
	5	37	311	4,964	23,491	41,107	545,370	779,110	972,210
	平均	58	472	5,472	22,151	52,794	662,844	891,313	985,618
	从0天开始增加		414	5,414	22,093	52,736	662,786	891,255	985,560
OVA and SEAAYtide (SEQ ID NO:4)	1	46	5,443	14,590	75,541	152,634	1,722,880	1,943,050	1,845,900
	2	62	15,920	39,148	152,684	372,177	3,736,828	5,170,740	3,721,768
	3	46	12,385	18,278	87,000	144,402	1,237,090	2,198,920	1,959,610
	4	43	4,978	18,324	113,288	184,545	1,991,710	2,473,640	2,048,190
	5	37	8,276	18,164	147,302	430,918	3,309,069	4,420,730	3,572,379
	平均	47	9,400	21,701	115,163	256,935	2,399,515	3,241,416	2,629,709
	从0天开始增加		9,354	21,654	115,116	256,888	2,399,469	3,241,369	2,629,663

[0208] 实施例7 SHAAYtide(SEQ ID NO:4)对恒河猴中产生的不同类型的免疫应答呈现不同的调控效果

[0209] 通过改变参数,可在哺乳动物中诱导不同类型的免疫应答,其中所述参数包括抗原剂量,剂型,施用途径和佐剂类型。例如,在人和试验动物的疫苗接种中使用明矾佐剂,所产生的免疫应答以IgG1和IgGE类型的抗体为主,而很少产生细胞毒性T细胞,并表现嗜酸性粒细胞和肥大细胞的增加。相反,当使用更强的佐剂,如完全或不完全弗氏佐

剂时,可观察到更广谱的免疫应答,包括细胞毒性 T 细胞和 IgG2 抗体的出现。为了确定是否 SHAAYtide (SEQ ID NO :4) 以不同的方式影响免疫应答的不同类型,用含有或不含有 SHAAYtide (SEQ ID NO :4) (与 OVA 不结合或直接结合),与 IFA 佐剂或明矾佐剂相配制的 OVA 免疫恒河猴。以抗体单位表示的结果如表 14 所示。

[0210]

表14 对猴子中VOA-特异性抗体应答的影响, 用IFA佐剂或明矾

制剂	n	0 天 (d)	5 d	8 d	12 d	15 d	19 d	22 d	26 d	30 d	34 d	37 d
OVA	1	6,491	7,738	5,956	6,501	19,661	31,138	46,462	120,111	271,183	224,626	244,479
	2	4,008	3,187	4,910	6,538	10,390	10,815	10,961	12,511	10,248	12,212	11,806
	3	28,442	19,924	21,147	46,872	80,612	135,978	184,220	495,330	1,008,627	871,569	977,820
	平均	12,980	10,283	10,671	19,971	36,888	59,310	80,548	209,317	430,019	369,469	411,368
	从0天开始增加		0	0	6,990	23,907	46,330	67,567	196,337	417,039	356,489	398,388
OVA和IFA	1	7,153	6,013	6,649	1,115,400	4,757,400	1,339,900	1,239,800	1,616,100	6,688,100	5,192,800	3,997,800
	2	6,195	5,707	6,483	1,635,840	4,549,100	2,096,500	2,595,900	3,629,900	14,280,600	12,801,700	9,471,900
	3	6,810	6,379	5,671	31,200	110,290	464,200	776,800	719,100	1,705,300	1,730,100	1,640,600
	平均	6,719	6,033	6,268	977,480	3,138,930	1,300,200	1,537,500	1,988,367	7,558,000	6,574,867	5,036,767
	从0天开始增加		0	0	920,761	3,132,211	1,293,481	1,530,781	1,981,647	7,551,281	6,568,147	5,030,047
OVA, IFA 和 SHAA Ytide (SEQ ID NO.4)	1	10,911	10,845	19,733	2,626,680	8,155,800	2,453,900	2,167,900	1,752,400	6,539,100	5,953,300	3,884,600
	2	5,761	5,761	5,636	226,440	1,129,700	1,641,100	3,504,600	4,800,100	14,210,200	13,281,600	11,330,700
	3	5,113	4,541	4,072	102,050	979,800	777,500	1,096,100	2,289,700	7,837,300	9,869,200	6,649,100
	平均	7,262	7,049	9,814	985,057	3,421,767	1,622,500	2,256,200	2,947,400	9,528,867	9,701,367	7,288,133
	从0天开始增加		0	2,552	977,795	3,414,505	1,615,238	2,248,938	2,940,138	9,521,605	9,694,105	7,280,872
OVA 和明矾	1	12,972	11,972	42,808	3,111,610	10,305,900	2,733,400	2,624,300	2,194,800	9,286,200	6,262,500	7,581,600
	2	10,317	7,699	6,100	38,710	90,470	106,020	106,820	214,570	1,346,300	1,078,300	767,100
	3	4,623	4,426	5,252	870,190	1,516,100	931,300	826,000	2,469,200	14,421,700	12,237,300	7,778,500
	平均	9,304	8,032	18,053	1,340,170	3,970,823	1,256,907	1,185,707	1,626,190	8,351,400	6,526,033	5,375,733
	从0天开始增加		0	8,749	1,330,866	3,961,519	1,247,603	1,176,403	1,616,886	8,342,096	6,516,729	5,366,429

[0211]

制剂	n	0 天 (d)	5 d	8 d	12 d	15 d	19 d	22 d	26 d	30 d	34 d	37 d
OVA + 明矾和 SHAAYtide (SEQ ID NO:4)	1	8,563	6,603	6,227	29,760	44,610	65,680	78,660	130,850	819,100	789,500	555,900
	2	3,231	3,290	3,284	31,930	159,320	172,250	163,670	406,770	1,607,100	1,780,100	1,619,300
	3	7,527	6,031	6,649	22,220	52,970	66,580	69,310	61,240	1,110,800	982,500	750,500
	平均	6,374	5,308	5,387	27,970	85,633	101,503	103,880	199,620	1,179,000	1,184,033	975,233
	从 0 天开始增加		0	0	21,596	79,260	95,130	97,506	193,246	1,172,626	1,177,660	968,860
OVA-PDx-S + 明矾	1	14,314	12,179	10,380	57,740	91,480	103,660	75,810	99,510	711,090	582,600	547,100
	2	5,941	4,959	4,526	17,180	13,790	15,830	15,270	26,290	91,380	89,380	96,440
	3	4,024	3,820	4,428	16,580	22,400	28,990	31,070	129,720	1,056,800	1,266,300	1,035,400
	平均	8,093	6,986	6,445	30,500	42,557	49,493	40,717	85,173	619,757	646,093	559,647
	从 0 天开始增加		0	0	22,407	34,464	41,400	32,624	77,080	611,664	638,000	551,554

[0212] 虽然与SHAAYtide (SEQ ID NO:4) 一起施用并不减少由OVA和IFA所引起的免疫应答,但可明显降低由OVA和明矾共施用所诱导的IgG应答。这些结果表明,SHAAYtide (SEQ

ID NO :4) 能够下调对在明矾佐剂中给予的抗原的免疫应答,而对在 IFA 佐剂中给予的相同抗原无影响。因此,SHAAYtide (SEQ ID NO :4) 可用作免疫调节剂。

[0213] 实施例 8(预期) 确定候选分子的趋化特性的方法

[0214] 为了进行趋化性检测,将 $29 \mu\text{l}$ 针对特定类型细胞,如树突状细胞(未成熟的或成熟的)的候选或已知趋化因子以 0,1,10 和 100mM 的量加入到 96 孔趋化因子腔室的下部腔室的孔中 (Neuroprobe ;Gaithersburg, MD)。第 7 天收集未成熟树突状细胞,用趋化因子缓冲液(在 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS ;Invitrogen, Carlsbad, CA) 中含 0.1% BSA,含有 Ca^{++} 和 Mg^{++}) 漂洗一次,以 5×10^6 细胞 /ml 重新悬浮于趋化因子缓冲液中。将 $20 \mu\text{l}$ 的细胞放置到滤膜上。所述腔室在 37°C 下培养 90 分钟。在迁移终止时,用橡胶刮刀除去滤膜上未迁移的细胞。去除滤膜后,用 Dulbecco's 磷酸缓冲盐溶液 (DPBS ;Hyclone, Darra, Queensland, Australia) 进行漂洗,用细胞染色对已迁移的细胞进行定量,例如 Hema3 染色试剂盒 (Fisher Scientific ;Tustin, CA) 或 CyQuant 检测 (Molecular Probes ;Eugene, OR),后者为荧光染料法,可测量核酸含量和显微观察。用显微镜对下部腔室进行观察以确定是否有细胞迁移到孔中。如果在孔中存在大量的细胞,对孔中和滤膜上的细胞进行定量。根据含有化学引诱剂的孔和只含有趋化性缓冲液的孔的吸收的比率来计算迁移的数量。

[0215] 实施例 9(预期) 评价 APC 趋化因子在增强或调控对感染性疾病的系统和 / 或粘膜免疫应答的方法

[0216] 用待研究的各种剂量的病毒,细菌或寄生物以皮下,皮内,鼻内或任何其他方式注射几组小鼠,采用的是常规的免疫方法,如在 0,7 和 14 天时,在给予微生物的同时,在剂型中可含有或不含有 APC 趋化因子,剂型中可包含佐剂。在 -7,0,7,14,21,28 和 35 天时采集血清和 / 或粘膜分泌物,用 ELISA 进行抗原特异性抗体分析。在不同的时间间隔杀死小鼠(如在最后一次免疫后),用常规的方法,来定量免疫腔隙中出现的抗原特异性抗体形成细胞和抗原特异性 T 细胞应答(包括细胞毒性和辅助 T 细胞)。

[0217] 实施例 10(预期) 评估 APC 趋化因子在癌症免疫治疗中增强或调控抗肿瘤免疫的方法

[0218] 虽然许多肿瘤细胞均可表达独特的肿瘤相关抗原,但这些抗原是很弱的免疫原,在肿瘤进展过程中不能产生有力的抗肿瘤免疫。用小鼠中的癌症免疫治疗模型系统 (REF ?) 可评估 APC 趋化因子,如 SHAAYtide (SEQ ID NO :4),增强保护性抗肿瘤免疫的能力。在该模型中,将同源胸腺瘤 (EL4 细胞 ;America Type TissueCollection (ATCC) ; Manassas, VA, no. TIB-39) 移植小鼠,其中该小鼠已事先转染了实验蛋白抗原 OVA (ATTC ; no. CRL-2113 (鸡 OVAEL4 转染体))。不进行进一步的干预,肿瘤进行生长,然后杀死小鼠。用与佐剂相配制的 OVA 接种的动物通过诱导直接抗 OVA- 转染的胸腺瘤细胞的抗原特异性免疫应答而至少部分地得到保护。该模型可有效地评估佐剂在增强或调控保护性抗肿瘤免疫中的相对效果。在该模型中,阳性对照包括下面的佐剂 :CFA, IFA, 明矾和 GM-CSF。通过与这些已知佐剂进行比较,可评估 APC 趋化因子在增强癌症免疫治疗中的能力。

[0219] 实施例 11(预期) 评估 APC 趋化因子调控过敏原特异性免疫应答以降低过敏原诱导的病害的能力的方法

[0220] 采用常规的免疫,用试验抗原(如 OVA) 致敏啮齿动物,然后通过雾化在该动物的肺中导入相同的抗原可诱导产生哮喘动物模型。将啮齿类动物分为 3 组,每组 10 只动物,在

0 天用溶于磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中的 100 μ g OVA 和 IgE 选择性佐剂,如氢氧化铝 (明矾佐剂) 经单次腹膜内注射使动物致敏。致敏后第 11 天,在 IgE 应答的高峰期,将动物放置在 Plexiglas 腔室中,采用超声喷雾器用雾化的 OVA(1%) 攻击动物 30 分钟 (De Vilbliss Co. ;Somerset, Pennsylvania)。一组小鼠在最初致敏到用雾化的 OVA 攻击前,还在不同的时间注射不同剂量的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 和 0.5% 的 Tween。第二组小鼠在最初致敏到用雾化的 OVA 攻击前,在不同的时间以腹膜内,静脉内,皮下,肌肉,口服或其他任何施用途径接受不同剂量的 APC 趋化因子。第三组小鼠作为阳性对照,在最初致敏到用雾化的 OVA 攻击前,在不同的时间以腹膜内注射小鼠 IL-10,抗 IL4 抗体或抗 IL5 抗体。

[0221] 在用雾化的 OVA 攻击动物后,在不同的时间点对动物作如下方面的检测:肺功能,支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中的细胞浸润,肺的组织学检查和血清 OVA- 特异性 IgE 效价检测。

[0222] 参考文献

[0223] Ausubel, F. M. , R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, et al. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley&Sons, New York.

[0224] Bacon, K. B. , R. D. Camp, F. M. Cunningham, and P. M. Woollard. 1988. Contrasting in vitro lymphocyte chemotactic activity of the hydroxyl, enantiomers of 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. Br J Pharmacol. 95 :966-74.

[0225] Bender, A. , M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman, et al. 1996, Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J Immunol Methods. 196 :121-35.

[0226] Campbell, J. J. , E. P. Bowman, K. Murphy, K. R. Youngman, et al. 1998. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3 β receptor CCR7. J Cell Biol. 141 :1053-9.

[0227] Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. Biochem J. 237 :1-7.

[0228] Cella, M. , M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, et al. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. J Exp Med. 189 :821-9.

[0229] Chan, V. W. , S. Kothakota, M. C. Roban, L. Panganiban-Lustan, et al. 1999. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. Blood. 93 :3610-6.

[0230] Chen, S. H. , H. D. Shine, J. C. Goodman, R. G. Grossman, et al. 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 91 :3054-7.

[0231] Dieu, M. C. , B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, et al. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med. 188 :373-86.

[0232] Forssmann, U. , M. B. Delgado, M. Ugucioni, P. Loetscher, et al. 1997. CK β 8, a novel CC chemokine that predominantly acts on monocytes, FEBS Lett.

408 :211-6.

[0233] Goodwin, J. , RH. US Patent 5, 284, 753. 1994. Multiple-site chemotactic test apparatus and method.

[0234] Kaufman, R. J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells : Methods Enzymol. 185 :487-511.

[0235] Kellermann, S. A. , S. Hudak, E. R. Oldham, Y. J. Liu, et al. 1999. The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 β are potent chemoattractants for in vitro-and in vivo-derived dendritic cells. J Immunol. 162 :3859-64.

[0236] Kraal, G. , M. Breel, M. Janse, and G. Bruin. 1986. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. J Exp Med. 163 :981-97.

[0237] Kriegler, M. 1990. Gene transfer and expression :A laboratory manual. Stockton Press, New York. 242 pp.

[0238] Meikle, J. 2002. Pioneering gene treatment gives frail toddler a new lease of life. In The Guardian, London.

[0239] Nabel, E. G. , and G. J. Nabel. US Patent No. 5, 328, 470. 1994. Treatment of diseases by site-specific instillation of cells or site-specific transformation of cells and kits therefor.

[0240] Penfold, M. E. , D. J. Dairaghi, G. M. Duke, N. Saederup, et al. 1999. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. Proc Natl Acad Sci USA. 96 : 9839-44.

[0241] Romani, N. , D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, et al. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. J Immunol Methods. 196 :137-51.

[0242] Rossi, D. , and A. Zlotnik. 2000. The Biology of Chemokines and their Receptors. Annu. Rev. Immunol. 18 :217-242.

[0243] Sambrook, J. 1989. Molecular cloning :a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

[0244] Shilo, B. Z. , and R. A. Weinberg. 1981. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA. 78 :6789-92.

[0245] Tice, T. , R. Gilley, J. Eldridge, and J. Staas. US Patent 5, 942, 252. 1999. Method for delivering bioactive agents into and through the mucosally-associated lymphoid tissues and controlling their release.

[0246] Verdijk, R. M. , T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, et al. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid(poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. J Immunol. 163 :57-61.

[0247] Wells, J. A. , M. Vasser, and D. B. Powers. 1985. Cassette mutagenesis :an

efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*. 34 : 315-23.

[0248] Youn, B. S. , S. M. Zhang, H. E. Broxmeyer, S. Cooper, et al. 1998. Characterization of CK β 8 and CK β 8-1 : two alternatively spliced forms of human β -chemokine, chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and potent agonists at CC chemokine receptor 1. *Blood*. 91 : 3118-26.

[0249] Zoller, M. J. , and M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis : a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol*. 154 : 329-50.

专利名称(译)	诱导免疫应答的方法和组合物		
公开(公告)号	CN1639569B	公开(公告)日	2012-09-05
申请号	CN02829284.7	申请日	2002-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	坎莫森特里斯公司		
申请(专利权)人(译)	坎莫森特里斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	坎莫森特里斯公司		
[标]发明人	TJ沙尔 缪振华 R 贝拉霍维奇 M霍瓦德 B普雷麦克		
发明人	T·J·沙尔 缪振华 R·贝拉霍维奇 Z·魏 M·霍瓦德 B·普雷麦克		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61K39/385 A61K39/09 A61K39/02 A01N43/40 A01N25/00 C12N15/09 A61K9/127 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/145 A61K39/29 A61K39/39 A61K47/04 A61K47/10 A61K47/34 A61K47/36 A61K47/46 A61K47/48 A61K48/00 A61P31/04 A61P31/14 A61P31/16 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K7/00 C07K14/00		
CPC分类号	A61K2039/55522 A61K38/19 C07K14/523 A61K35/12 A61K38/00 A61K39/39 A61P31/04 A61P31/14 A61P31/16 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P43/00 Y02A50/39 Y02A50/401 Y02A50/466 Y02A50/484		
代理人(译)	刘玥		
审查员(译)	李珊		
优先权	10/141508 2002-05-07 US		
其他公开文献	CN1639569A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫应答的增强。所述的免疫应答可通过给予疫苗来引发。本发明提供了诱导或增强对抗原的免疫应答的组合物和方法。本发明的组合物和方法可用于预防和治疗用途的疫苗的配制及抗体的产生。

<110> Schall, Thomas J
Talbot, Dale
Berkowitz, Robert
Zhong, Wei
Howard, Maureen
Premack, Brett
.
<120> 诱导免疫应答的方法和组合物
<130> 10709/86
<160> 17
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> 人
<400> 1
.
Met Leu Trp Arg Arg Lys Ile Gly Pro Gln Met Thr Leu Ser His Ala
1 5 10 15

Ala Gly

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>