

1. 一种免疫增强剂,其特征在于,所述免疫增强剂至少包括干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

2. 根据权利要求1所述的免疫增强剂,其特征在于,所述免疫增强剂中,所述干扰素和所述粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 $0.1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ IU的干扰素:1~200 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

3. 根据权利要求1所述的免疫增强剂,其特征在于,所述免疫增强剂中,所述干扰素和所述粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ IU的干扰素:5~50 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫增强剂,其特征在于,所述干扰素为干扰素 α 。

5. 一种免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述免疫治疗药物组合物至少包括抗原和根据权利要求1-3中任一项所述的免疫增强剂。

6. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述干扰素为干扰素 α 。

7. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述抗原包括蛋白质抗原。

8. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述免疫治疗药物组合物中,所述干扰素和所述粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ IU的干扰素:5~20 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

9. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述免疫治疗药物组合物中所述免疫治疗药物组合物中,所述干扰素和所述粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 1×10^4 IU的干扰素:10 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

10. 根据权利要求7所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述蛋白质抗原为病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原和肿瘤抗原中的至少一种。

11. 根据权利要求10所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述病毒抗原包括HBV病毒抗原、疱疹病毒抗原、HPV病毒抗原、HIV病毒抗原、Merkel细胞病毒抗原、流感病毒抗原和RSV病毒抗原中的至少一种。

12. 根据权利要求7所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述蛋白质抗原为灭活疫苗抗原,减毒疫苗抗原或亚单位疫苗抗原。

13. 根据权利要求7所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述蛋白质抗原为基因工程疫苗抗原。

14. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物,其特征在于,所述免疫治疗药物组合物还包括药学上或免疫学上可接受的载体或辅料。

15. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:在无菌条件下混合所述抗原、所述干扰素和所述粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,以及药学上或免疫学上可接受的载体或辅料,从而制得所述免疫治疗药物组合物。

16. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫增强剂的用途,其特征在于,所述用途包括在向待免疫对象施用抗原前或施用抗原的同时,施用安全有效量的所述免疫增强剂。

17. 根据权利要求16所述的用途,其特征在于,所述施用至少包括黏膜给药或注射给药。

18. 根据权利要求16所述的用途,其特征在于,所述待免疫对象为哺乳动物。

19. 根据权利要求5所述的免疫治疗药物组合物在制备免疫治疗药物中的用途,其特征
在于,所述用途包括:

- (1) 促进单核细胞的产生;
- (2) 促进单核细胞CCR2的表达;
- (3) 促进Ly6C^{hi}CCR2⁺单核细胞分化为CD11b⁺CD11c⁺DC;
- (4) 提高机体细胞免疫水平和CTL杀伤力;
- (5) 促进机体体液免疫和保护性抗体的生成中的一种或几种。

20. 根据权利要求19所述的用途,其特征
在于,所述用途包括预防或治疗病毒感染、细菌感
染、真菌感染、寄生虫感染和肿瘤中的一种或几
种。

21. 根据权利要求20所述的用途,其特征
在于,所述病毒感染包括HBV病毒感染、疱疹病
毒感染、HPV病毒感染、HIV病毒感染、Merkel
细胞病毒感染、流感病毒感染和RSV病毒感染中
的一种或几种。

22. 根据权利要求20所述的用途,其特征
在于,所述病毒感染为慢性乙型肝炎。

23. 根据权利要求19所述的用途,其特征
在于,当所述抗原为乙肝表面抗原时,所述免
疫治疗药物组合物能打破机体的免疫耐受状态,
并且清除感染的肝细胞、HBeAg和HBsAg,同
时伴有HBsAb的生成。

24. 根据权利要求19所述的用途,其特征
在于,当所述抗原为肿瘤抗原时,所述免疫治
疗药物组合物诱导产生抗肿瘤的免疫反应。

25. 根据权利要求24所述的用途,其特征
在于,所述肿瘤抗原包括前列腺癌抗原表位
肽、乳腺癌抗原表位肽、结直肠癌抗原表位
肽、宫颈癌抗原表位肽、肝癌抗原表位肽、
多发性骨髓瘤抗原表位肽和肾细胞癌抗原表
位肽中的至少一种。

26. 根据权利要求19所述的用途,其特征
在于,当所述抗原为链球菌抗原时,所述免疫
治疗药物组合物诱导产生抗菌感染的免疫反
应。

27. 根据权利要求26所述的用途,其特征
在于,所述链球菌抗原为A型链球菌抗原表
位肽。

28. 根据权利要求19所述的用途,其特征
在于,当所述抗原为HIV抗原时,所述免疫治
疗药物组合物诱导产生抗HIV感染的免疫反
应。

29. 根据权利要求28所述的用途,其特征
在于,所述HIV抗原为HIV抗原表位肽。

30. 根据权利要求19所述的用途,其特征
在于,当所述抗原为Merkel细胞病毒抗原时,
所述免疫治疗药物组合物诱导产生抗Merkel
细胞病毒感染的免疫反应。

31. 根据权利要求30所述的用途,其特征
在于,所述Merkel细胞病毒抗原为Merkel
细胞病毒重组蛋白质。

32. 根据权利要求19-31中任一项所述
的用途,其特征
在于,所述用途包括向待免疫对
象施用安全有效量的所述免疫治疗药物组
合物。

33. 根据权利要求32所述的用途,其特征
在于,所述待免疫对象为哺乳动物。

一种免疫增强剂、免疫治疗药物组合物及其制备与用途

[0001] 本申请要求于2017年3月13日提交中国专利局、申请号为201710021679.6、发明名称为“一种免疫治疗药物组合物及其用途”的中国专利申请的优先权,其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种免疫增强剂、免疫治疗药物组合物及其制备与用途。

背景技术

[0003] 随着人民营养状况、卫生条件和医疗水平大幅改善,人均预期寿命稳步上升。除了感染性疾病如乙肝、艾滋、结核和HPV等重大传染性疾病,以及其它病原微生物引起的持续性感染疾病和肿瘤已成为危害人民健康的主要问题。由病毒和细菌的持续性感染造成的乙肝、艾滋、结核和HPV是国际上的重大传染病。据2008年卫生部统计报告,我国有乙肝病毒感染者9300万人,占全球总量的1/3,其中部分病人需要接受临床治疗。我国艾滋病死亡人数呈大幅度增加趋势,连续4年居于传染病死亡榜首。并且艾滋病感染已呈现从高危人群向一般人群扩散的趋势。结核病治疗中的多重耐药、广泛耐药问题日趋严重,结核病耐药率在我国高达28%。此外还有大量难治愈的慢性细菌感染,如慢性尿路感染、肺部感染等,不仅反复发作对患者造成痛苦,也是耐药性产生的根源。

[0004] 国家肿瘤统计中心的权威数据显示,中国2009年死于癌症的人数为657万人,占该年全国总死亡人数的26%,而且肿瘤发病率呈明显上升和年轻化趋势。癌症成为农民因病致贫及因病转贫的重要原因。同时需要指出的是,中国的肝癌发病率为十万分之二十七,其中90%与乙肝病毒的持续性感染相关。

[0005] 所以,持续性感染和肿瘤带来的经济和社会负担急剧增加,已成为人类健康的重大障碍。

[0006] 其中,乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus,HBV)感染是严重危害人类健康的重大传染病,全球约有20亿人口感染过HBV,其中约2.4亿为慢性感染者,每年约有65万人死于HBV感染导致的肝衰竭、肝硬化和肝癌。在中国约有HBV慢性感染者9300万,其中慢性乙肝(Chronic hepatitis B,CHB)患者约2000。持续而有效地抑制HBV复制以及乙肝核心抗原(Hepatitis B e antigen,HBeAg)血清学转换被认为是临床治疗CHB的满意终点。

[0007] 乙肝表面抗原(Hepatitis B s antigen,HBsAg)消失,HBsAg血清学转换被认为是乙肝临床治疗理想终点。因此,尝试在HBeAg发生血清学转换的CHB患者中实现乙肝临床治愈。自然情况下,HBsAg血清学转换率每年在1-2%之间一项双盲随机对照临床队列研究中,用替诺福韦酯治疗HBeAg阳性CHB患者1年后,有3%的患者发生HBsAg清除。一项随机对照临床研究中,HBeAg阳性CHB患者用恩替卡韦序贯聚乙二醇 α 干扰素治疗3-4年后,8.5%的患者HBsAg消失。在另一项临床随机对照试验中,用聚乙二醇 α 干扰素治疗HBeAg阴性CHB患者1年,在治疗结束后3年随访发现8.7%的患者清除HBsAg。由此可见在CHB患者中HBsAg清除依

然是一个较难实现的目标。因此,亟需研发新型药物及治疗方法来彻底治愈乙肝。

[0008] CHB患者中HBV特异的细胞免疫功能缺失或耗竭导致的机体免疫耐受状态是乙肝无法治愈的首要原因。乙肝治疗性疫苗是一种新的乙肝治疗方法,通过打破HBV感染者免疫耐受状态,重塑或激发机体产生中和抗体和细胞免疫,达到清除机体HBV的目的。目前,在研的乙肝治疗性疫苗主要有DNA疫苗、DC疫苗、基因工程蛋白疫苗,以及抗原抗体复合物等。该类疫苗疗效的评价大多处于动物模型和临床试验阶段。值得注意的是,以上几种治疗性疫苗均存在一些问题,如DNA疫苗接种后存在免疫原性差,DC疫苗的制备需要在体外负载抗原,然后再回输至体内,制备有技术难关,质量控制不易,成本极高,蛋白疫苗从临床试验研究结果来看,随着免疫次数的增加,不仅没有提高机体的免疫应答,反而造成机体免疫耐受能力上升。

[0009] 因此,本领域迫切需要开发一种能够打破免疫耐受性的免疫治疗药物,以有效治疗微生物感染(如乙肝持续性病毒感染)或肿瘤等疾病。

[0010] 传统意义上的疫苗泛指用减毒、灭活或基因工程手段制备的病原生物(细菌、病毒等)或其抗原组份制成的,用于正常人群预防接种的生物制品。疫苗的预防接种不但保护了个体免受传染病病原体的侵袭,而且也在群体中限制了传染病病原体的传播。疫苗是通过激活人体免疫系统,并最终产生特异性的免疫记忆,这些免疫记忆在遇到相应的病原体时就会迅速地反应,将病原体清除,从而达到长期预防的作用。治疗性疫苗具备了预防性疫苗这一长期有效的特点。与预防性疫苗应用于健康人体不同,治疗性疫苗的应用对象是疾病患者,通过修复患者体内的免疫系统,达到治疗的目的。现阶段,治疗性疫苗的研究主要集中在一些尚无有效治疗药物的重大慢性疾病上,如恶性肿瘤和持续性感染疾病等。如前所述,这些疾病在我国有数量庞大的患者人群,推进针对这些慢性疾病的治疗性疫苗的研发进展,不仅可以达到小分子药物无法治疗的难题,更为重要的是副作用小,药效长,特异性好。

[0011] 治疗性疫苗越来越离不开佐剂的作用,尤其是以基因工程产物为特征的抗原必须辅佐佐剂才能达到良好的免疫治疗效果。佐剂是能够增强机体针对抗原的适应性免疫应答,打破免疫耐受反应,延长疫苗保护时间,诱导特定免疫反应类型的制剂。但佐剂的研发也存在着许多困难,其中之一是佐剂的毒副作用,其二是佐剂的有效性,其三是佐剂有效提高抗原的免疫应答反应与其量效关系问题。

发明内容

[0012] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本发明提供了一种免疫增强剂和一种免疫治疗药物组合物,还公开了该免疫治疗药物组合物的制备方法,以及上述免疫增强剂和免疫治疗药物组合物的用途。本发明的具体技术方案如下:

[0013] 本发明在第一方面提供了一种免疫增强剂,其至少包括干扰素(IFN)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0014] 优选地,上述免疫增强剂中,干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 $0.1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ IU的干扰素:1~200 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0015] 更优选地,干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ IU的干扰素:5~50 μ g。

[0016] 更优选地,干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 $0.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ IU的干扰素:5~50 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0017] 最优选地,干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为 1×10^4 IU的干扰素:10 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0018] 在较优实施例中,上述免疫增强剂中,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量为1~100 μ g;优选地为5~50 μ g;更优选地为5~20 μ g;最优选地为约10 μ g。

[0019] 在较优实施例中,上述免疫增强剂中,干扰素的含量为 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^6$ IU;优选地为 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ IU;更优选地为 $8 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ IU;最优选地为约 $0.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ IU,如 1×10^4 IU。

[0020] 在较优实施例中,上述免疫增强剂还可包括铝佐剂,例如氢氧化铝和/或磷酸铝。

[0021] 在一个实施例中,铝佐剂的含量为0.5-10mg;优选为1-3mg;更优选为1.25-2.5mg。在另一个实施例中,铝佐剂的含量为0.1-3mg;优选为0.8-2mg;最优选为1.25mg。在又一个实施例中,铝佐剂的含量为0.01-3mg;优选为0.05-2mg;最优选为0.1-0.5mg,如0.125mg。

[0022] 在一个实施例中,铝佐剂和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的重量比为:0.01~1mg:1~200 μ g;优选地重量比为0.05~0.5mg:5~150 μ g;更优选地重量比为0.1-0.25mg:5~50 μ g;最优选地重量比为0.125mg:10 μ g。在另一个实施例中,铝佐剂和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的重量比为:0.1~10mg:1~300 μ g;优选地重量比为0.5~5mg:2~200 μ g;更优选地重量比为1.5-3mg:5~100 μ g;最优选地重量比为1~2mg:10~75 μ g。

[0023] 优选地,上述干扰素为干扰素 α (IFN- α)。

[0024] 更优选地,上述干扰素为干扰素 α (IFN- α -2a)。

[0025] 本发明在第二方面提供了一种免疫治疗药物组合物,其至少包括抗原和上述免疫增强剂。

[0026] 在较优实施例中,免疫治疗药物组合物中的干扰素为干扰素 α 。

[0027] 在较优实施例中,免疫治疗药物组合物中的抗原包括蛋白质抗原。

[0028] 优选地,上述蛋白质抗原为病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原和肿瘤抗原中的至少一种。

[0029] 更优选地,上述病毒抗原包括HBV病毒抗原、疱疹病毒抗原、HPV病毒抗原、HIV病毒抗原、Merkel细胞病毒抗原、流感病毒抗原和RSV病毒抗原中的至少一种。

[0030] 在较优实施例中,上述蛋白质抗原为灭活疫苗抗原,减毒疫苗抗原或亚单位疫苗抗原。

[0031] 在较优实施例中,上述蛋白质抗原为基因工程疫苗抗原。

[0032] 在较优实施例中,上述免疫治疗药物组合物还包括药学上或免疫学上可接受的载体或辅料。

[0033] 优选地,上述免疫治疗药物组合物中,干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量之比为: $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ IU的干扰素:5~20 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;优选地含量比为 1×10^4 IU的干扰素:10 μ g的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0034] 优选地,上述免疫治疗药物组合物中,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的含量为1~200 μ g;优选地为5~50 μ g;更优选地为5~20 μ g;最优选地为约10 μ g。

[0035] 优选地,上述免疫治疗药物组合物中,干扰素的含量为 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^5$ IU;优选地

为 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ IU;更优选地为 $8 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ IU;最优选地为约 $0.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ IU,如 1×10^4 IU。

[0036] 优选地,上述免疫治疗药物组合物中,抗原和GM-CSF的含量比为:0.1~10 μ g抗原:1~100 μ g粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;优选为0.5~5 μ g抗原:5~50 μ g粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;更优选为1~5 μ g抗原:5~25 μ g粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;最优选为1 μ g抗原:10 μ g粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0037] 本发明在第三方面提供了上述免疫治疗药物组合物的制备方法,包括以下步骤:在无菌条件下混合上述抗原、上述干扰素和上述粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,以及药学上或免疫学上可接受的载体或辅料,从而制得上述免疫治疗药物组合物。

[0038] 在较优实施例中,将粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、干扰素和抗原(疫苗)混合,于4-10 $^{\circ}$ C,优选为4 $^{\circ}$ C放置6h以上,更优选地放置10h以上,最优选地放置12h以上,如46h以上的长期放置。

[0039] 本发明在第四方面提供了上述免疫增强剂的用途,包括在向待免疫对象施用抗原前或施用抗原的同时,施用安全有效量的上述免疫增强剂。

[0040] 优选地,上述施用至少包括黏膜给药或注射给药,更优选地为局部注射给药。

[0041] 优选地,上述待免疫对象为哺乳动物,包括人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括啮齿动物,如小鼠和大鼠,兔,猫,狗,猪和牛。

[0042] 本发明在第五方面提供了上述免疫治疗药物组合物在制备免疫治疗药物中的用途,包括:

[0043] (1) 促进单核细胞的产生;

[0044] (2) 促进单核细胞CCR2的表达;

[0045] (3) 促进Ly6C^{hi}CCR2⁺单核细胞分化为CD11b⁺CD11c⁺DC;

[0046] (4) 提高机体细胞免疫水平和CTL杀伤力;

[0047] (5) 促进机体体液免疫和保护性抗体的生成

[0048] 中的一种或几种。

[0049] 优选地,上述用途包括预防或治疗病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染和肿瘤中的一种或几种。

[0050] 更优选地,上述病毒感染包括HBV病毒感染、疱疹病毒感染、HPV病毒感染、HIV病毒感染、Merkel细胞病毒,流感病毒感染和RSV病毒感染中的一种或几种。

[0051] 在较优实施例中,上述病毒感染为慢性乙型肝炎。

[0052] 在较优实施例中,当上述抗原为乙肝表面抗原时,免疫治疗药物组合物能打破机体的免疫耐受状态,并且清除感染的肝细胞、HBeAg和HBsAg,同时伴有HBsAb的生成。

[0053] 在较优实施例中,当上述抗原为preS1和乙肝表面抗原时,免疫治疗药物组合物能打破机体的免疫耐受状态,并且清除感染的肝细胞、HBeAg和HBsAg,同时伴有HBsAb的生成。

[0054] 在较优实施例中,当上述抗原为肿瘤抗原时,免疫治疗药物组合物诱导产生抗肿瘤免疫反应。

[0055] 在较优实施例中,上述肿瘤抗原包括前列腺癌抗原表位肽、乳腺癌抗原表位肽、结肠直肠癌抗原表位肽、宫颈癌抗原表位肽、肝癌抗原表位肽、多发性骨髓瘤抗原表位肽和肾细胞癌抗原表位肽中的至少一种。

[0056] 在较优实施例中,当上述抗原为链球菌抗原时,免疫治疗药物组合物诱导产生抗细菌感染的免疫反应。

[0057] 在较优实施例中,上述链球菌抗原为A型链球菌抗原表位肽。

[0058] 在较优实施例中,当上述抗原为HIV抗原时,免疫治疗药物组合物诱导产生抗HIV感染的免疫反应。

[0059] 在较优实施例中,上述HIV抗原为HIV抗原表位肽。

[0060] 优选地,上述用途包括向待免疫对象施用安全有效量的上述免疫治疗药物组合物。

[0061] 更优选地,上述待免疫对象为哺乳动物,包括人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括啮齿动物、兔、猫、狗、猪和牛。

[0062] 本发明的免疫增强剂与现有技术相比,具有以下优点:

[0063] (1) 本发明利用包含优化配比下的GM-CSF和IFN- α 的混合物作为免疫增强剂能够显著提高机体的免疫能力,提高机体抗原提呈效率,有效打破机体免疫耐受,使机体建立有效的免疫激活和应答;产生较强的抗体和细胞免疫保护反应;

[0064] (2) 本发明所述的包含优化配比下的GM-CSF和IFN- α 的混合物作为免疫增强剂,能更有效地激活机体的体液和细胞免疫水平,显著增强了免疫效果;

[0065] (3) 将本发明的免疫增强剂和乙肝疫苗混合,成功打破乙肝模型小鼠的免疫耐受状态,而且可以清除HBsAg,同时伴有HBsAb的生成;

[0066] (4) 将本发明的免疫增强剂和肿瘤抗原混合,可诱导产生抗肿瘤的免疫反应;

[0067] (5) 将本发明的免疫增强剂和链球菌抗原混合,可诱导产生抗细菌感染的免疫反应;

[0068] (6) 将本发明的免疫增强剂和HIV抗原混合,可诱导产生抗HIV感染的免疫反应;

[0069] (7) 本发明的免疫增强剂使用方便,成本低,副作用小,易于推广。

[0070] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。所以凡是不脱离本发明所公开的原理下完成的等效或修改,都落入本发明保护的范围。

[0071] 以下将结合附图对本发明作进一步说明,以充分说明本发明的目的、技术特征和技术效果。

附图说明

[0072] 图1示出了本发明较优实施例中GM-CSF、IFN- α 、HBV vaccine混合剂量实验。将GM-CSF 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g; IFN- α 100IU, 1 000IU, 10 000IU两两组合后分别与HBV vaccine 1 μ g混合,免疫C57B/L6小鼠,0天,14天分别免疫1次。(A) 免疫后第3天,外周血CD11b+CD11c+DC比例。免疫后21天,在小鼠左脚垫注射10 μ gHBsAg,右脚垫注射PBS作为对照,分别与注射后24h, 48h, 72h检测足垫肿胀情况, (B) 为24h结果统计图。(C) 为免疫后21天,采集外周血,分离血清,用ELISA法检测anti-HBsAg水平。结果用mean \pm SEM表示,*表示P<0.05;**表示P<0.01;***表示P<0.001。

[0073] 图2示出了本发明较优实施例中GM-CSF、IFN- α 、HBV vaccine混合剂量实验。将GM-CSF5 μ g, 10 μ g, 20 μ g; IFN- α 1000IU, 1 0000IU, 10 0000IU两两组合后分别与HBV vaccine 1 μ

g混合,免疫C57B/L6小鼠,0天,14天分别免疫1次。(A)免疫后第3天,外周血CD11b⁺CD11c⁺DC比例。免疫后21天,在小鼠左脚垫注射10 μ gHBsAg,右脚垫注射PBS作为对照,分别与注射后24h,48h,72h检测足垫肿胀情况,(B)为24h结果统计图。(C)为免疫后21天,采集外周血,分离血清,用ELISA法检测anti-HBsAg水平。结果用mean \pm SEM表示,*表示P<0.05;**表示P<0.01。

[0074] 图3两种预混方式免疫动物后外周血、淋巴结CD11b⁺CD11c⁺DC变化情况与anti-HBsAg水平。(A)为免疫后第3天,小鼠外周血CD11b⁺CD11c⁺DC比例。(B)为免疫后第3天,小鼠淋巴结CD11b⁺CD11c⁺DC比例。(C)为21天,小鼠血清中anti-HBsAg水平。结果用mean \pm SEM表示,ns表示P>0.05;*表示P<0.05;**表示P<0.01。

[0075] 图4示出了本发明较优实施例中不同药物组合免疫野生型小鼠的DTH结果:

[0076] (A)为本实验不同实验组免疫策略。(B)为第二次免疫后第7天,在不同实验组小鼠左脚垫注射10 μ g HBsAg抗原,右脚垫注射PBS作为阴性对照,24h后脚垫的肿胀情况。(C)为小鼠脚垫注射HBsAg抗原后24h、48h、72h的肿胀程度。ns (P>0.05)表示无统计学差异,* (P<0.05)表示有统计学差异,** (P<0.01)表示有显著统计学差异。

[0077] 图5示出了本发明较优实施例中野生型小鼠产生HBsAg特异性HBsAb、IgG1、IgG2a的浓度:

[0078] (A)为不同药物免疫组ELISA方法检测HBsAb的结果。(B)为第二次免疫后第7天,ELISA法检测不同免疫组HBsAg特异性IgG1与IgG2a浓度。(C)为第二次免疫后第7天,ELISA法检测HBsAg特异性IgG2a与IgG1比值。ns (P>0.05)表示无统计学差异,** (P<0.01)表示有显著统计学差异。

[0079] 图6示出了本发明较优实施例中不同药物组合免疫野生型小鼠T细胞分泌细胞因子的结果:

[0080] 第二次免疫后7天,取小鼠脾细胞,用HBsAg (10 μ g/L) 刺激18h,最后6h加入BFA进行封闭,流式术检测CD4⁺T细胞分泌IFN- γ (A)、IL4 (B)、IL17A (C)和CD8⁺T细胞分泌IFN- γ (D)的水平。ns (P>0.05)表示无统计学差异,* (P<0.05)表示有统计学差异,** (P<0.01)表示有显著统计学差异。

[0081] 图7示出了本发明较优实施例中不同药物组合免疫野生型小鼠T细胞增殖情况:

[0082] 第二次免疫后7天,取小鼠脾细胞,1 μ M CFSE染色,用HBsAg (10 μ g/mL) 刺激72h,流式术检测CD4⁺T细胞增殖 (A)和CD8⁺T细胞增殖 (B)情况。ns (P>0.05)表示无统计学差异,* (P<0.05)表示有统计学差异,** (P<0.01)表示有显著统计学差异。

[0083] 图8示出了本发明较优实施例中不同药物组合免疫野生型小鼠体外CTL结果:

[0084] 分离免疫后小鼠脾细胞,用HBV CTL多肽S₂₀₈₋₂₁₅ (10 μ g/mL) 培养3天后收集细胞作为效应细胞,OVACTL多肽OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 μ g/mL) 为无关抗原对照;将野生型小鼠脾细胞,用HBV CTL多肽 (10 μ g/mL) 37 $^{\circ}$ C孵育1h,收集后用CFSE染色,作为靶细胞;将效应细胞:靶细胞=20:1混合后培养6小时,用PI染色15min,流式检测CTL细胞对靶细胞杀伤情况。(A)为流式数据圈图策略。(B)为不同免疫组的CTL流式结果。(C)为不同免疫组HBV特异的CTL杀伤率统计结果。ns (P>0.05)表示无统计学差异,** (P<0.01)表示有显著统计学差异。

[0085] 图9示出了本发明较优实施例中不同药物对DC2.4细胞IL12分泌水平及野生型小鼠血清IL12浓度的影响:

[0086] 分别用GM-CSF (1 μ g/mL)、IFN- α (20IU/mL) 和LPS (1 μ g/mL) 处理DC2.4细胞,培养72h, (A) 和 (B) 分别为流式细胞仪检测DC2.4细胞IL12表达水平及统计结果。免疫后第3、7、14、21天分别采血用ELISA检测血清中IL12浓度, (C) 第21d血清中IL12检测结果。ns (P>0.05) 表示无统计学差异,* (P<0.05) 表示有统计学差异,** (P<0.01) 表示有显著统计学差异。

[0087] 图10示出了本发明较优实施例中不同药物对野生型小鼠血液DC细胞数量及功能的影响:

[0088] (A) 为不同药物处理组小鼠血液中CD11b⁺CD11c⁺DC细胞的流式细胞术检测结果。(B) (C) 分别为小鼠血液中CD11b⁺CD11c⁺DC的百分比及数量。(D) 为CD11b⁺CD11c⁺DC细胞CD80表达水平。(E) 为CD11b⁺CD11c⁺DC细胞MHC-II表达水平。ns (P>0.05) 表示无统计学差异,* (P<0.05) 表示有统计学差异,** (P<0.01) 表示有显著统计学差异。

[0089] 图11示出了本发明较优实施例中不同药物对野生型小鼠血液单核细胞数量及功能的影响:

[0090] (A) 和 (B) 分别为不同药物处理组小鼠血液中CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞的流式细胞术检测圈图策略及结果。(C) 和 (D) 分别为小鼠血液中CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞的百分比及数量。(E) 为CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞MHC-II表达水平。(F) 为免疫后21天ELISA法检测小鼠血清中MCP-1浓度水平。ns (P>0.05) 表示无统计学差异,* (P<0.05) 表示有统计学差异,** (P<0.01) 表示有显著统计学差异。

[0091] 图12示出了本发明较优实施例中rAAV8-1.3HBV小鼠模型验证:

[0092] (A) 选用6-8周雄性C57B/L6小鼠,通过尾静脉注射rAAV-1.3HBV病毒,每只小鼠1 \times 1010vg/100 μ L,注射后14天,验证模型。(D)、(E)、(C) 和 (G) 分别为小鼠血清中HBeAg、HBsAg、HBV-DNA和ALT含量。(B) 分别为肝脏、心脏和肾脏HBcAg免疫组化结果,箭头所指细胞为HBcAg阳性细胞。(F) 分别为肝脏、心脏和肾脏HBcAg苏木素-伊红染色结果。ns (P>0.05) 表示无统计学差异,P<0.0001表示有显著统计学差异,Bar=200 μ m。

[0093] 图13示出了本发明较优实施例中rAAV8-1.3HBV小鼠模型监测:

[0094] C57B/L6小鼠感染rAAV-1.3HBV病毒后,进行模型监测。(A)、(B)、(C) 分别为感染后0周到12周小鼠血清中HBsAg、HBV-DNA和ALT含量持续监测。

[0095] 图14示出了本发明较优实施例中不同药物组合免疫乙肝小鼠血清HBsAg和HBeAg变化情况:

[0096] 从病毒感染小鼠后第21天开始免疫,每隔2周免疫一次,每次免疫前采血检测血清HBsAg和HBeAg浓度。(A) 为9个实验组不同时间点血清HBsAg浓度变化情况。(B) 为9个实验组不同时间点血清HBeAg变化情况,虚线为S/C0=1。ns (P>0.05) 表示无统计学差异,* (P<0.05) 表示有统计学差异,** (P<0.01) 表示有显著统计学差异。

[0097] 图15示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫对rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠血液中CD11b⁺CD11c⁺树突状细胞的影响:

[0098] 乙肝小鼠免疫疫苗后第3天,取小鼠静脉血,裂解红细胞后检测血液中CD11b⁺CD11c⁺DC水平。(A) 为检测血液中CD11b⁺CD11c⁺DC的圈图策略。(B) 为不同免疫组血液中CD11b⁺CD11c⁺DC比例。(C) 为不同免疫组血液中CD11b⁺CD11c⁺DC统计结果。(D) 和 (E) 为不同免疫组血液中CD11b⁺CD11c⁺DC表面分子CD80、CD86、MHC-I和MHC-II表达情况及统计结果。ns

($P>0.05$)表示无统计学差异,*($P<0.05$)表示有统计学差异,**($P<0.01$)表示有显著统计学差异。

[0099] 图16示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫对rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠血液中单核细胞的影响:

[0100] 乙肝小鼠免疫疫苗后第3天,取小鼠静脉血,裂解红细胞后检测血液中单核细胞水平。(A)为检测血液中单核细胞的圈图策略。(B)为不同免疫组血液中CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺粒细胞、CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}单核细胞和CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{lo}单核细胞比例。(C)为不同免疫组血液中CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺粒细胞、CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}单核细胞和CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{lo}单核细胞统计结果。(D)为不同免疫组血液中CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺粒细胞、CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}单核细胞和CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{lo}单核细胞CCR2表达统计结果。ns($P>0.05$)表示无统计学差异,*($P<0.05$)表示有统计学差异,**($P<0.01$)表示有显著统计学差异。

[0101] 图17示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫促进rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠细胞免疫:

[0102] (A)第4次免疫后7天,将HBsAg(10 μ g/10 μ L)抗原注射入小鼠左脚垫,右脚垫注射PBS作为对照,24h,48h后用游标卡尺测量脚垫厚度,脚垫肿胀厚度=左脚垫厚度-右脚垫厚度。(B)为不同免疫组CD8⁺T细胞增殖统计结果,CD3(1 μ g/mL)和CD28(100ng/mL)为阳性对照。(C)和(D)分别为不同免疫组脾脏IFN- γ ⁺CD4⁺T细胞和IL-4⁺CD4⁺T细胞统计结果。(E)为不同免疫组脾脏IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞流式图,离子霉素(1 μ g/mL)和PMA(100ng/mL)为阳性对照。(F)为不同免疫组脾脏IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞结果统计图。(G)为不同免疫组肝脏切片CD8免疫组化染色照片,Bar=100 μ m。(H)和(I)不同免疫组体内CTL试验流式图(左)和统计结果(右)。ns($P>0.05$)表示无统计学差异,*($P<0.05$)表示有统计学差异,**($P<0.01$)表示有显著统计学差异。

[0103] 图18示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫促进rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠体液免疫:

[0104] 第4次免疫后14天,取小鼠外周血,分离血清,(A)为血清HBeAg结果。(B)为血清HBsAg结果。(C)为血清HBV-DNA结果,虚线为试剂盒检测下限30IU/mL。(D)为血清ALT结果。(E)为肝脏组织HBcAg免疫组化结果,bar=50 μ m。(F)为血清anti-HBsAg结果。(G)为血清IgG2a/IgG1结果。ns($P>0.05$)表示无统计学差异,*($P<0.05$)表示有统计学差异,**($P<0.01$)表示有显著统计学差异。

[0105] 图19示出了本发明较优实施例中阻断CCR2对GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组疗效的影响:

[0106] 用CCR2阻断剂INCB 3344,按照30 μ g/kg,分别于注射GM-CSF/IFN- α /VACCINE前1h,注射后24h,48h,注射3针。(A)和(B)分别为3天后外周血中CD11b⁺Ly6C^{hi}CCR2^{hi}单核细胞流式图和统计结果。(C)为外周血中CD11b⁺CD11c⁺DC比例统计结果。(D)为脾脏中IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞比例统计结果。(E)、(F)和(G)分别为血清中ALT、HBsAg和HBV-DNA统计结果。(H)为肝脏HBcAg免疫组化结果,Bar=50 μ m。ns($P>0.05$)表示无统计学差异,*($P<0.05$)表示有统计学差异,**($P<0.01$)表示有显著统计学差异。

[0107] 图20示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强前列腺癌肽疫苗免疫效果,其中图20A示出了小鼠体液免疫结果,图20B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0108] 图21示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强乳腺癌肽疫苗免疫效果,其中图21A示出了小鼠体液免疫结果,图21B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0109] 图22示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强结直肠癌肽疫苗免疫效果,其中图22A示出了小鼠体液免疫结果,图22B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0110] 图23示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强宫颈癌肽疫苗免疫效果,其中图23A示出了小鼠体液免疫结果,图23B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0111] 图24示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强肝癌肽疫苗免疫效果,其中图24A示出了小鼠体液免疫结果,图24B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0112] 图25示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强多发性骨髓瘤肽疫苗免疫效果,其中图25A示出了小鼠体液免疫结果,图25B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0113] 图26示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强肾细胞癌肽疫苗免疫效果,其中图26A示出了小鼠体液免疫结果,图26B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0114] 图27示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2b增强A型链球菌肽疫苗免疫效果,其中图27A示出了小鼠体液免疫结果,图27B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0115] 图28示出了本发明较优实施例中GM-CSF/IFN α -2bHIV肽疫苗免疫效果,其中图28A示出了小鼠体液免疫结果,图28B示出了小鼠脚掌肿胀大小测量结果。

[0116] 图29示出了本发明较优实施例中GM-CSF、IFN α -2b与HBV PreS或HBV PreS1抗原混合对小鼠免疫后的抗体水平。

具体实施方式

[0117] 在描述本发明之前,应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案,并且不意图是限制性的,本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

[0118] 本发明人经过深入的研究,首次意外地发现了GM-CSF和IFN- α 的混合物作为免疫增强剂能够显著的提高机体的免疫能力,提高机体抗原提呈效率,使机体建立有效的免疫激活和应答;产生较强的抗体和细胞免疫保护反应,达到预防和治疗疾病的目的。将本发明的免疫增强剂和乙肝疫苗混合,成功打破乙肝模型小鼠的免疫耐受状态,而且可以清除HBsAg,同时伴有HBsAb的生成。

[0119] 本发明的目的是提供一种新的免疫治疗药物组合物,尤其涉及一种用于乙肝持续性病毒感染的免疫治疗药物组合物。本发明的药物组合物可为治疗乙肝提供新的免疫治疗药物。

[0120] 本发明的药物组合物由干扰素,免疫佐剂和重组乙肝疫苗经过按一定比例混合后组成。

[0121] 本发明的药物组合物用于治疗乙肝,尤其适合治疗慢性乙型肝炎,所述的药物组合物中,干扰素为IFN- α ,免疫佐剂为GM-CSF和蛋白质抗原或疫苗以优化的比例和剂量进行混合后制备成为药物制剂。此药物制剂抗原通过传统注射方式在皮下、肌肉、黏膜等部位注射到机体内,也可以通过滴鼻、滴眼等途径给药。给药后,机体的单核细胞有效地转化为未成熟DC再转化为成熟的DC细胞,从而提高抗原提呈效率大幅度提高,有效打破病毒引起的机体免疫耐受反应,使机体建立有效的免疫激活和清除病毒应答;产生较强的抗体和细胞

免疫保护反应,防止病毒复发,甚至达到清除病毒的目的,以及预防HBV再次感染。

[0122] 本发明中,所述抗原可以是来源于微生物,如病毒、细菌、真菌、寄生虫等。

[0123] 本发明中,所述病毒抗原可以是乙肝病毒的表面抗原或乙肝疫苗为基因工程乙肝疫苗,如亚单位蛋白质疫苗;其中,所述的乙肝亚单位疫苗,是通过基因工程技术将病毒抗原基因在酵母系统中或哺乳动物细胞中表达出蛋白质,提取纯化后与佐剂配伍而制成。

[0124] 所述病毒抗原可以来源于疱疹病毒、HPV病毒、HIV病毒、Merkel细胞病毒、流感病毒、RSV病毒;或者是病毒各家族,包括但不限于:腺病毒科(Adenoviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、纤丝病毒科(Filoviridae)、肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、乳头多瘤空泡病毒科(Papovaviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、微小病毒科(Parvoviridae)、小RNA病毒科(Picornaviridae)、痘病毒科(Poxviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)或披膜病毒科(Togaviridae)。其中还包含了引起动物疾病的微生物,如:猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒(PCV)、口蹄疫病毒(FMDV)、狂犬病毒(Rabies、流感病毒(influenza)。

[0125] 所述肿瘤抗原可以来源于以下肿瘤:口腔癌、食道癌、胃癌、十二指肠癌、小肠癌、结肠癌、肛门癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、壶腹癌、鼻咽癌、肺癌、皮肤癌(黑色素瘤)、骨癌、骨髓癌、T及B细胞淋巴瘤、白血病、何杰金氏瘤、非何杰金氏瘤、卡波氏肉瘤、头颈部肿瘤、脑瘤、神经胶质瘤、甲状腺癌、胸腺癌、肾癌、输尿管癌、膀胱癌、睾丸癌、前列腺癌、阴茎癌、子宫癌、子宫颈癌、卵巢癌、输卵管癌、阴道癌。

[0126] 本发明中,所述的动物病毒抗原,主要是来源于动物疫苗,如灭活疫苗、减毒疫苗以及亚单位疫苗。

[0127] 本发明中,所述抗原可以是来源于肿瘤的特异性和相关性抗原。

[0128] 本发明提供了GM-CSF联合干扰素 α 作为疫苗的佐剂和用于疫苗复合物的用途及其制备方法,但本领域技术人员在具体实施过程中,可使用现有技术中任何已知的疫苗,如由重组的rHBsAg抗原制备的乙肝亚单位疫苗;

[0129] 本发明经实验还证实,所述的GM-CSF佐剂的质量为每剂1-200ug时,效果最为明显,其中优选为每剂20-150ug,再优选为每剂50-100ug。

[0130] 本发明经实验还证实,IFN- α 佐剂的活性单位为1000-50,000(IU)单位时,效果最为明显,其中优选为每剂2000-30000(IU),再优选为每剂5000-20000(IU)。

[0131] 本发明采用下述技术实施方案,通过基因工程技术将干扰素基因在大肠杆菌或酵母系统中表达出蛋白质,提取纯化后与辅料配伍制成抗病毒药物IFN- α (一型干扰素),通过基因工程技术将人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子基因在大肠杆菌或酵母系统中进行表达出蛋白质,提取纯化后与辅料配伍制成免疫调节药物为rhGM-CSF(重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子),通过基因工程技术将人乙肝抗原基因在酵母系统或CHO细胞中进行表达出蛋白质,提取纯化后与佐剂(如铝佐剂)配伍制成重组乙肝表面抗原疫苗。

[0132] 本发明的组合物中的IFN- α 、GM-CSF、抗原(疫苗)等均可通过本领域常规的方法进行制备或通过市场购买获得。

[0133] 本发明的组合物中,基因工程乙型肝炎疫苗与重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因

子的质量配比为1:1~100,优选为1:1~80;更优选为1:1~30(如1:7.5)。重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子与干扰素和/或铝佐剂的含量配比如上所述。

[0134] 免疫增强剂

[0135] 免疫增强剂,也称为佐剂,又称非特异性免疫增强剂,本身不具抗原性,是一类先于抗原或与抗原同时作用,能非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答的一种物质,即同抗原一起或预先注射到机体内能增强免疫原性或改变免疫反应类型。除传统铝佐剂外,细胞因子等物质也可以成为重要的佐剂。如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是一种具有多项潜能的造血细胞重要生长因子,对各种原因引起的白细胞减少症有明显的疗效。它不仅能够促进造血前体细胞的增殖、分化和成熟,而且对其他细胞,如抗原递呈细胞(APC)、成纤维细胞、角质细胞、皮肤黏膜细胞等均有不同程度的刺激作用。

[0136] 本发明人在前期试验中发现,乙肝疫苗与GM-CSF合用可以起到增强哺乳动物免疫反应的效果,但这种增强的程度有限。进一步发现,如果提前注射GM-CSF,每天一次,一共注射3次后,再在同一位点注射疫苗抗原,将大大提高机体的免疫应答水平,尤其是T细胞水平的应答。其中的机理也进行了深入的研究,发现GM-CSF提前注射主要是提高富集和转化单核细胞,使其增加抗原提呈细胞(DC)的数量、DC提呈抗原能力和活力,DC在第3天大幅度提高,DC接触抗原时才能够有效提呈给T细胞,从而增强了细胞免疫的应答。由此研究可以看出,GM-CSF和疫苗抗原的给药方式不同会产生不同的免疫效果。但是,此技术明显地带来了一个使用非常不方便的问题,即,需要接种者每天接受GM-CSF的注射一共三天后,再给疫苗的注射。这样的方式给接种者带来极大不便,在临床试验中也发现,由于接种次数较多,存在患者依从性差及中止试验的问题。所以急需改进。

[0137] IFN- α 在较高剂量给药后不仅可以通过激活相邻细胞产生抗病毒蛋白从而抑制病毒的复制,并予以清除病毒感染,同时还可以增强自然杀伤细胞(NK细胞),单核细胞,巨噬细胞和T淋巴细胞的活性发挥免疫调节作用并增强抗病毒反应。已经证据显示IFN- α 诱导树突细胞分化并增强树突细胞交叉呈递(J. Immunol 2012,188:3116-3126;Blood 2012,119:1407-1417)。在一定浓度下,IFN- α 和GM-CSF在体外系统中一起可将外周血单核细胞分化成有效的抗原呈递细胞(Journal of Leukocyte Biology 1998,64:358-367)。然而,还没有研究证明如何使得蛋白质抗原与IFN- α 和GM-CSF配合在此发明发现的最佳剂量比一起提供体内增强的免疫应答,特别是不知道增强的免疫应答是否通过激活分化来介导Ly6C^{hi}CCR2⁺单核细胞并将其增强到CD11b⁺CD11c⁺树突细胞中。由于其他类型的单核细胞如Ly6C⁻单核细胞,Ly6C^{hi}CCR2⁺单核细胞向CD11b⁺CD11c⁺树突细胞的分化对潜在的细胞介导的免疫非常重要。

[0138] 已经在小鼠和人中报道了这两种主要类型的单核细胞(Immunity 2003,19:71-82)。最显著的区别在于表达高水平Ly6C的炎性单核细胞和缺少Ly6C的单核细胞。本发明描述的处于最佳制剂的免疫治疗药物组合物可以诱导高水平的Ly6C^{hi}CCR2⁺单核细胞并随后导致治疗效果。

[0139] 组合物

[0140] 本发明提供了一种免疫治疗药物组合物。

[0141] 本发明的药物组合物,包括药学上可接受的载体和有效量活性成分。

[0142] 如本文所用,术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性

的且可被人和/或动物所接受的量。

[0143] 如本文所用,“药学上可接受的载体”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良副反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0144] 本发明的药物组合物含有安全有效量的本发明的活性成分以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但并不限于):生理盐水、缓冲液、葡萄糖、甘油、甘露醇、海藻糖、环糊精、铝佐剂、尿素及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配,本发明的药物组合物的剂型为注射剂、口服制剂(片剂、胶囊、口服液)、透皮剂、缓释剂。例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。

[0145] 本发明所述的活性成分的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。通常,当本发明的活性成分每天以约0.00001mg-50mg/kg动物体重(较佳的0.0001mg-10mg/kg动物体重)的剂量给予,能得到令人满意的效果。例如,由治疗状况的迫切要求,可每周给予若干次分开的剂量,或将剂量按比例地减少。

[0146] 本发明所述的药学上可接受的载体包括(但并不限于):葡萄糖、甘油、甘露醇、海藻糖、环糊精、铝佐剂、尿素、油、脂质体、脂质、蛋白、蛋白-抗体缀合物、肽类物质、纤维素、纳米凝胶、或其组合。载体的选择应与给药方式相匹配,这些都是本领域的普通技术人员所熟知的。

[0147] 本发明还提供了所述药物组合物的用途,用于预防和/或治疗微生物感染(如病毒感染)或肿瘤等疾病。

[0148] 疫苗组合物

[0149] 本发明的疫苗组合物可以是预防性的(即预防感染),也可以是治疗性的。所述的疫苗组合物包含免疫性抗原(如蛋白质抗原),并且通常与“药学上可接受的载体”组合,这些载体包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体通常是大的、代谢缓慢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、氨基酸聚合物、氨基酸共聚物、脂质凝集物(如油滴或脂质体)等。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。另外,这些载体可起免疫刺激剂(“佐剂”)作用。另外,抗原还可以与细菌毒素(类毒素,如白喉,破伤风,霍乱,白喉CRM197)或载体蛋白(来自HPV16或HPV18的L1,来自Merkel's细胞病毒的VP1,卵白蛋白,匙孔血蓝蛋白KLH)偶联。

[0150] 除了本发明前述提到的免疫增强剂,还可以在疫苗组合物中添加其他增强免疫组合物效果的佐剂,包括但不限于:(1)铝盐(alum),如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等;(2)水包油型乳剂配方,例如,(a)MF59(参见W090/14837),(b)SAF,和(c)RibiTM佐剂系统(RAS)(RibiImmunochem,Hamilton,MT),(3)皂素佐剂;(4)Freund完全佐剂(CFA)和Freund不完全佐剂(IFA);(5)TLR激动剂,如CpG、MPL、poly I:C、Pam3Cys、flagellin、resiquimod;(6)细胞因子,如白介素(如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、肿瘤坏死因子(TNF)等;(7)细菌ADP-核糖基化毒素(如霍乱毒素CT,百日咳毒素PT或大肠杆菌热不稳定毒素LT)的脱毒变异体,参见例如W093/13302和W092/19265;以及(7)作为免疫刺激剂来增强组合物效

果的其它物质。

[0151] 包括免疫原性组合物在内的疫苗组合物(例如,可包括抗原、药学上可接受的载体以及佐剂),通常含有稀释剂,如水,盐水,甘油,乙醇等。另外,辅助性物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等可存在于这类运载体中。

[0152] 更具体地,包括免疫原性组合物在内的疫苗,包含免疫学有效量的免疫原性多肽,以及上述其它所需的组分。“免疫学有效量”指以单剂或连续剂一部分给予个体的量对治疗或预防是有效的。该用量可根据所治疗个体的健康状况和生理状况、所治疗个体的类别(如人)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗的配制、治疗医师对医疗状况的评估、及其它的相关因素而定。预计该用量将在相对较宽的范围内,可通过常规实验来确定。

[0153] 通常,可将疫苗组合物或免疫原性组合物制成可注射剂,例如液体溶液或悬液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液、液体赋形剂的固体形式。该制剂还可乳化或包封在脂质体中,以增强佐剂效果。

[0154] 此外,本发明的疫苗组合物可以是单价的,也可以是多价的。

[0155] 给药途径和剂量

[0156] 所述组合物可以直接给予对象。对象可以是人或非人哺乳动物,较佳地为人。当用作疫苗时,可用已知的方法将本发明的组合物直接施用于个体。通常采用与常规疫苗相同的施用途径和/或模拟病原体感染路径施用这些疫苗。

[0157] 给予本发明药物组合物或疫苗组合物的途径包括(但并不限于):肌内、皮下、皮内、肺内、静脉内、经鼻、阴道内、经口服或其它肠胃外给药途径。如果需要,可以组合给药途径,或根据疾病情况进行调节。疫苗组合物可以单剂量或多剂量给予,且可以包括给予加强剂量以引发和/或维持免疫力。

[0158] 应以“有效量”给予疫苗,即疫苗的量在所选用的给药路径中足以引发免疫应答,能有效促使保护宿主抵抗病毒感染。

[0159] 在各疫苗剂份中所选用的抗原的量,是按可引发免疫保护性应答而无明显的副作用的量而定。通常,在感染宿主细胞后,各剂的疫苗足以含有约0.1 μ g-10000 μ g,较佳地为1 μ g-100 μ g,更佳地10 μ g-50 μ g蛋白质抗原。可用包括观察对象中的抗体滴定度和其它反应的标准研究方法来确定具体疫苗的最佳用量。可通过监控疫苗提供的免疫力水平来确定是否需要增强剂量。在评估了血清中的抗体滴定度后,可能需要选用增强剂量免疫接种。施用佐剂和/或免疫刺激剂就可提高对本发明的蛋白质的免疫应答。优选方法是从皮下或肌内途径通过注射给予免疫原性组合物。

[0160] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0161] 材料与方法

[0162] 1.实验动物及细胞株

[0163] 本实验中所使用的野生型C57BL/6小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司(HFK

Bioscience Co.,LTD,Beijing),小鼠规格为雄性,15-20g,6-8周龄。所有实验小鼠均用无病原污染的水及饲料饲养,5只一笼,每笼有独立通风设备,操作按照实验动物保护指导条例进行。

[0164] DC2.4细胞为C57BL/6骨髓来源的树突状细胞。

[0165] 2. 主要试剂

[0166] 本发明实施例中所用主要试剂见表1。

[0167] 表1

[0168]

名称	货号	规格	制造商
人干扰素 α -2b	S20030030	500 万 IU/支	北京凯因益生
人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子	S19980020	150 μ g/支	华北制药金坦生物
CHO 重组乙型肝炎疫苗	S20113004	10 μ g/支	华北制药金坦生物
血源性 HBsAg	GK-001	1mg/mL	上海桂康生物
HBsAb ELISA 标准品	GBW(E)090187	80 mIU/mL	北京金豪制药
HBsAg ELISA 标准品	GBW(E)090174	2 IU/mL	北京金豪制药
小鼠干扰素 α	50525-M01H	10 μ g/支	北京义翘神州
小鼠 IL-4	111249	10 μ g/支	Peprotech
小鼠 GM-CSF	021455	10 μ g/支	Peprotech
HRP 标记羊抗鼠 IgG1	1071-05	1mL/支	Southern Biotech
HRP 标记羊抗鼠 IgG2a	1081-05	1mL/支	Southern Biotech
乙肝表面抗原 CTL 表位多肽	S ₂₀₈₋₂₁₅ : ILSPFLPL	纯度 95%	上海科肽生物
鸡卵清蛋白 CTL 表位多肽	O ₂₅₇₋₂₆₄ : SIINFEKL	纯度 95%	上海科肽生物

[0169]

DMEM 培养基	12491-015	500 mL/瓶	Gibco
RPMI1640 培养基	11875-093	500 mL/瓶	Gibco
胎牛血清	10100-147	500 mL/瓶	Gibco
双抗 (青霉素+链霉素)	BL505A	100 mL/瓶	南京沃宏
佛波醇酯	P1585	1 mg/瓶	Sigma
离子霉素	10634	10634	Sigma
布雷菲德菌素 A(1000×)	420601	420601	BioLegend
CD8 T 细胞分选试剂盒	480008	100 test	BioLegend
小鼠单核细胞富集试剂盒	19761	10 ⁹ 细胞	Stemcell
磷酸盐缓冲液	SH30256.01	500 mL/瓶	Hyclone
无血清细胞冻存液	C40100	100 mL/瓶	苏州新赛美生物
4%多聚甲醛	G1101	500 mL/瓶	武汉谷歌生物
鼠 MCP-1 ELISA 检测试剂盒	88-7391-22	2×96 test	eBioscience
鼠 IL12p70 ELISA 检测试剂盒	BMS6004	96 test	eBioscience
小鼠功能抗体 anti-CD3	16-0032-85	500 µg/支	eBioscience
小鼠功能抗体 anti-CD28	16-0281-85	500 µg/支	eBioscience
细胞破膜剂(10×)	00-8333-56	100 mL/瓶	eBioscience
CFSE	65-0850	500 µg/支	eBioscience
CCR2 抑制剂(INCB 3344)	HY50674	30mg	Medchemexpress

[0170] 3. 流式抗体

[0171] 本发明实施例中所用抗体信息见表2。

[0172] 表2

[0173]

名称	克隆号	同型对照	生产商
APC/Cy7 Anti-mouse CD3	17A2	Rat IgG2b, κ	BioLegend
PE/Cy7 Anti-mouse CD4	RM4-5	Rat IgG2a, κ	BioLegend
FITC Anti-mouse CD8	53-6.7	Rat IgG2a, κ	eBioscience
APC Anti-mouse IFN-γ	XMG1.2	Rat IgG1, κ	BioLegend
Brilliant Violet 421™ Anti-mouse IL-4	11B11	Rat IgG1, κ	BioLegend
PE Anti-mouse IL-17A	TC11-18H10 .1	Rat IgG1, κ	BioLegend
Brilliant Violet 421™	M1/70	Rat IgG2b, κ	BioLegend

[0174]

Anti-mouse CD11b			
FITC Anti-mouse CD11c	HL3	Hamater IgG	BD
PE Anti-mouse Ly6G	RB6-8C5	Rat IgG2b, κ	eBioscience
FITC Anti-mouse Ly6C	HK1.4		BioLegend
Alexa Fluor® 647 Anti-mouse CCR2	SA203G11	Rat IgG2b, κ	BioLegend
FITC Anti-mouse F4/80	BM8	Rat IgG2a, κ	eBioscience
APC Anti-mouse CD80	16-10A1	Hamater IgG	eBioscience
Brilliant Violet 510™ Anti-mouse CD86	GL-1	Rat IgG2b, κ	BioLegend
PE Anti-mouse MHC-I	AF6.88.5.5.3	Rat IgG2b, κ	eBioscience
eVolve™ 655 Anti-mouse MHCII	M5/114.15.2	Rat IgG2b, κ	eBioscience
PE Anti-mouse IL-12	C17.8	Rat IgG2a, κ	eBioscience
PE Anti-mouse PDCA-1	eBio927	Rat IgG2b, κ	eBioscience
PE Anti-mouse Ki67	SolA15	Rat IgG2a, κ	eBioscience

[0175] 4. 动物分组及免疫策略, 见表3。

[0176] 表3

分组(n=5)	剂量配比
①PBS	-
②GM-CSF	10 μ g
③IFN- α	10000 IU
④VACCINE	1 μ g
[0177] ⑤GM-CSF/IFN- α	10 μ g/10000IU
⑥GM-CSF/VACCINE	10 μ g/1 μ g
⑦IFN- α /VACCINE	10000IU/1 μ g
⑧GM-CSF/IFN- α /VACCINE	10 μ g/10000IU/1 μ g
⑨3 \times GM-CSF+VACCINE	10 μ g(每天一次,共3次)+1 μ g

[0178] 备注: VACCINE即为上述表1中的CHO重组乙型肝炎疫苗或酵母表达的重组乙肝疫苗, 其中每剂VACCINE中, 抗原的含量为1 μ g, 铝佐剂的含量为0.125mg (VACCINE的剂量配比是以总质量计)。其中分组⑤、⑥、⑦、⑧中, 将表3中所示量的各组分称量后混合均匀后放置4 $^{\circ}$ C (2小时以上) 直到使用。

[0179] 5. 小鼠血液采集及血清制备

[0180] 采用眼眶静脉丛采血法采集小鼠血液。采血量约200 μ L。将采集好的全血置于37 $^{\circ}$ C恒温箱中孵育40min,取血清。置于离心机中3000rpm,4 $^{\circ}$ C离心30min,收集血清,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0181] 6. ELISA法特异性抗体滴度检测

[0182] 使用抗原包被液将抗原稀释到2 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被孵育过夜。将待测小鼠血清用2%小牛血清做10倍梯度稀释,每孔加入待测稀释血清100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h。加入稀释好的HRP标记二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1h。(TMB)显色。根据待测样本OD值,使用标准曲线公式计算小鼠血清中抗原特异IgG的滴度。

[0183] 7. 迟发型超敏反应(DTH)检测

[0184] 小鼠背部皮下注射100 μ L相应的药物。末次免疫后第7天,使用微量注射器向小鼠左脚足垫注射抗原HBsAg(10 μ g体积10 μ L),右脚足垫注射10 μ L的磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照。注射后使用游标卡尺分别于24h、48h和72h测量小鼠足垫厚度,同一部位测量三次,取平均值。DTH计算公式:DTH肿胀厚度(mm)=左脚足垫厚度(mm)-右脚足垫厚度(mm)。

[0185] 8. 流式细胞术细胞因子检测

[0186] 无菌取出小鼠脾脏,制备成单细胞悬液。将滤过的细胞悬液调整浓度为 1×10^7 细胞/mL。用HBsAg(终浓度为10 μ g/mL)刺激细胞,阳性对照孔加佛波醇酯(PMA)和离子霉素(Ionomycin)(终浓度分别为100ng/mL和1 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C培养18h,在最后6h加入布雷菲德菌素A(BFA)进行封闭,以阻断细胞因子分泌。在50 μ L抗体染色体系内加入适量待测的细胞因子流式荧光抗体,细胞表面抗体染色4 $^{\circ}$ C孵育30min;胞内细胞因子抗体染色为4 $^{\circ}$ C孵育1.5h。用BD流式细胞仪进行检测,结果用FlowJo7.6软件进行分析。

[0187] 9. 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)法T细胞增殖检测

[0188] 无菌取出小鼠脾脏,制备成单细胞悬液。调整细胞浓度为 1×10^7 /mL。将1 μ L 1mM的CFSE溶液加入细胞中,37 $^{\circ}$ C避光染色10min。加入刺激物:阳性对照孔anti-CD3终浓度为1 μ g/mL,anti-CD28终浓度为100ng/mL,HBsAg终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C培养72h。细胞表面染CD3、CD4、CD8,流式细胞仪检测T细胞增殖情况,结果用FlowJo7.6软件进行分析。

[0189] 10. DC2.4细胞检测

[0190] 1×10^5 cell/孔DC2.4细胞铺于6孔板,添加4种刺激物,LPS(1 μ g/mL)、GM-CSF(1 μ g/mL)、IFN- α (100IU/mL)、GM-CSF/IFN- α ,LPS为阳性对照,37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养72h,在最后6h,加入2 μ L BFA(1000 \times)进行阻断细胞因子分泌。培养72h后收集DC2.4细胞,细胞表面分子CD11b、CD80、CD86、MHC-I、MHC-II,胞内细胞因子IL12,用相应抗体及同型对照抗体染色后,用流式细胞仪进行检测。

[0191] 11. 体外细胞毒T淋巴细胞(CTL)检测

[0192] 无菌取出小鼠脾脏,制备成单细胞悬液。效应细胞用10 μ g/mL HBsAg的CTL肽富集3天。靶细胞在10 μ g/mL HBsAg的CTL肽刺激1h后,用2mM的CFSE染色。效应细胞与靶细胞的以50:1的比例混合作作用6h。作用完毕后,PI染色。流式细胞仪检测,结果用FlowJo7.6软件进行分析。

[0193] 12. 体内细胞毒T淋巴细胞(CTL)检测

[0194] 来自C57BL/6供体小鼠的脾细胞用15mM CFSE标记并用1mg/mL的S208-215孵育,定

义为CFSE_{high}靶细胞。将等量的脾细胞用1mM的CFSE标记,并用1mg/mL的OVA257-264孵育作为对照,定义为CFSE_{low}靶细胞。在第四次接种后的第14天,将CFSE_{high}和CFSE_{low}细胞以1:1的比例的混合物静脉内过继转移到免疫接受者中,每只小鼠 2×10^7 个细胞。8小时后,从受体分离脾细胞,分析CFSE荧光强度。

[0195] 13. 免疫组织化学检测

[0196] 在第四次免疫后的第14天,收集解剖的肝脏样品,并在4%多聚甲醛中固定3天,然后包埋在石蜡中,并切成5至10mm厚的切片。将肝切片用苏木精-伊红染色进行组织学分析,并与多克隆兔抗体孵育以进行IHC分析。

[0197] 14. 统计学方法

[0198] 统计分析使用Student's t-检验,双侧 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0199] 实施例1、IFN- α /GM-CSF/VACCINE触发野生型小鼠体液免疫和细胞免疫

[0200] 1.1 GM-CSF、IFN- α 与VACCINE三者剂量最优剂量配比

[0201] 为了验证GM-CSF、IFN- α 与VACCINE三者混合达到与注射乙肝疫苗前提前3天注射GM-CSF ($3 \times$ GM-CSF+VACCINE)一样的效果,对GM-CSF、IFN- α 与VACCINE混合的最优剂量配比进行了实验。我们发现 $10 \mu\text{g}$ GM-CSF和10000IU IFN- α 与 $1 \mu\text{g}$ VACCINE三者混合时,在普通小鼠上引起的DTH反应与 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE之间无差异,而明显高于其他剂量组合。同时,我们也看到, $10 \mu\text{g}$ GM-CSF和10000IU IFN- α 与 $1 \mu\text{g}$ VACCINE三者混合免疫及 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE免疫后,普通小鼠产生的anti-HBsAg最高,二者无明显统计学差异,其他剂量组合组产生的anti-HBsAg要明显低于GM-CSF ($10 \mu\text{g}$)和IFN- α (10000IU)与VACCINE ($1 \mu\text{g}$)三者混合组,说明GM-CSF ($10 \mu\text{g}$)、IFN- α (10000IU)与VACCINE ($1 \mu\text{g}$)为最优剂量配比。

[0202] 具体的,本实施例选用雄性普通C57B/L6小鼠,6-8周龄。

[0203] 首次实验,使用的GM-CSF选择了3个剂量,分别为 $10 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$; IFN- α 选择了3个剂量,分别为100IU, 1000IU, 10000IU与HBV vaccine $1 \mu\text{g}$ 三者混合后免疫小鼠,0天和14天分别免疫1次,于免疫后1天,2天,3天采集外周血,检测DC细胞变化情况,21天检测DTH以及HBsAb水平,结果见图1。实验结果表明,GM-CSF ($10 \mu\text{g}$)与IFN- α (10000IU)与HBV vaccine ($1 \mu\text{g}$)混合免疫小鼠比其他剂量配比能显著提高外周血中CD11b⁺CD11c⁺DC的比例,同时显著增强DTH反应和anti-HBsAg抗体水平。

[0204] 由于GM-CSF ($10 \mu\text{g}$)为实验选用的低值,而更低剂量的GM-CSF未选用,因此,在第二次剂量探索实验中,加入GM-CSF ($5 \mu\text{g}$)组;同样地,IFN- α (10000IU)为实验选用的高值,更高剂量的IFN- α 是否更有效不得而知,因此,在接下来的剂量探索实验中,加入IFN- α (100000IU)组,小鼠免疫方式同前,检测指标也同前,结果见图2。实验结果表明,GM-CSF ($5 \mu\text{g}$)组与其他剂量IFN- α 组合后,无论机体产生CD11b⁺CD11c⁺DC的比例,还是DTH反应、anti-HBsAg水平均低于GM-CSF ($10 \mu\text{g}$)组;而IFN- α (100000IU)组与其他剂量GM-CSF联合后,该剂量产生了明显的骨髓抑制,外周血中的CD11b⁺CD11c⁺DC不增反降,对于DTH和anti-HBsAg水平显著低于IFN- α (10000IU)组。

[0205] 1.2比较GM-CSF、IFN- α 、HBV vaccine两种预混方式

[0206] 方案A:注射前将三者预混;方案B:将三者预混,4℃过夜12h,旋转混匀器室温混匀30min,然后注射。实验中设立3组,①组注射PBS;②组按方案A;③组按方案B。每组5只普通C57B/L6小鼠(雄性,6-8周龄),于0天和14天分别免疫1次,免疫后1天,2天,3天检测外周血

DC,淋巴结中DC变化情况,第21天检测anti-HBsAg水平。结果如图3所示,①方案A和方案B外周血中的CD11b⁺CD11c⁺DC比例均显著高于对照PBS组($P<0.01$),但是方案B比方案A要更高。②同时,在检测淋巴结中的DC时,发现方案A并未明显增加CD11b⁺CD11c⁺DC比例,但是方案B依然显著增加了局部淋巴结中CD11b⁺CD11c⁺DC比例。③此外,在对anti-HBsAg检测中也发现,方案A对anti-HBsAg的促进能力不及方案B($2136\pm 165.2\text{mIU/mL}$ v.s $3094\pm 126.6\text{mIU/mL}$, $P<0.01$)。

[0207] 1.3 小鼠免疫后DTH反应

[0208] 乙肝治疗中,细胞免疫发挥了重要作用,因为细胞免疫水平的高低与机体清除乙型肝炎病毒的能力正相关。DTH试验是最便捷,同时也是最直接反应机体细胞免疫水平的实验。在本研究中,根据(图4A)的免疫策略,我们对不同药物免疫后的野生型小鼠脚掌注射HBsAg时的DTH反应情况进行检测(图4B)。结果表明,单独注射VACCINE(CHO重组乙型肝炎疫苗)组、IFN- α (人干扰素 α -2b)/VACCINE组、GM-CSF(人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)/VACCINE组、 $3\times$ GM-CSF+VACCINE组、IFN- α /GM-CSF/VACCINE组均能引起DTH, $3\times$ GM-CSF+VACCINE组与IFN- α /GM-CSF/VACCINE组中小鼠脚垫较其他组肿胀更加明显。通过对不同药物免疫组小鼠脚垫肿胀厚度数据进行统计分析(图4C),发现24h时,DTH反应最为强烈, $3\times$ GM-CSF+VACCINE组与IFN- α /GM-CSF/VACCINE组小鼠脚垫肿胀厚度跟其他组比较均有显著统计学差异($P<0.01$),而两组间比较无统计学差异($P>0.05$)。

[0209] 1.4 IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合对机体体液免疫的影响

[0210] 保护性抗体的产生一直被认为是评价疫苗免疫效率的金指标。注射乙肝疫苗后,人体产生的抗-HBsAg可以及时将入侵的乙型肝炎病毒颗粒清除,从而避免乙型肝炎病毒的感染。

[0211] 基于乙肝表面抗体(HBsAb)检测的便捷性,我们首先对不同药物与乙肝疫苗组合免疫后的小鼠抗体产生水平进行测试。结果(图5A)显示,naïve组、GM-CSF组、IFN- α 组和IFN- α /GM-CSF组均无HBsAb产生,而VACCINE组、GM-CSF/VACCINE组、IFN- α /VACCINE组、IFN- α /GM-CSF/VACCINE组和 $3\times$ GM-CSF+VACCINE均有HBsAb产生。IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合组($2749\pm 238.9\text{IU/L}$)比 $3\times$ GM-CSF+VACCINE组($3016\pm 196.2\text{IU/L}$)产生的HBsAb含量略低,但无统计学差异($P>0.05$),分别与单用乙肝疫苗组($918.4\pm 43.28\text{IU/L}$)、GM-CSF/VACCINE组($1665\pm 45.94\text{IU/L}$)和IFN- α /VACCINE组($1902\pm 76.93\text{IU/L}$)相比,产生的HBsAb量明显增加,且具有显著统计学差异($P<0.01$)。此外,数据也显示,GM-CSF/VACCINE组和IFN- α /VACCINE组比单用VACCINE组能产生更高的HBsAb,且存在显著统计学差异($P<0.01$),说明这两种免疫方式均能较好地引发机体产生保护性HBsAb。

[0212] 抗原特异的IgG2a/IgG1可以从抗体角度来评价不同免疫方式促进机体细胞免疫朝Th1或Th2方向极化。结果(图5B、5C)显示,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合组和 $3\times$ GM-CSF+VACCINE组较其他免疫组提高了IgG2a/IgG1比值,差异有统计学意义($P<0.05$),说明IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合组和 $3\times$ GM-CSF+VACCINE组触发的细胞免疫更倾向Th1型。

[0213] 1.5 小鼠免疫后特异性细胞免疫

[0214] 在前面的HBsAg特异的DTH试验及IgG1/IgG2a检测中,我们发现IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合组和 $3\times$ GM-CSF+VACCINE组均能更好地促进野生型小鼠细胞免疫水平,而机体细胞免疫的激活在清除病毒感染过程中发挥了重要作用。

[0215] 接下来,我们检测了不同免疫组小鼠针对HBsAg特异性的细胞免疫水平。结果(图6)表明,IFN- α /GM-CSF/VACCINE组相比3 \times GM-CSF+VACCINE组,在CD4⁺T细胞产生IFN- γ 、IL4及IL17(图6C)水平上与CD8⁺T细胞产生IFN- γ (图6D)水平上均无显著性差异($P>0.05$),说明三药联合组能在细胞免疫达到与3 \times GM-CSF+VACCINE组相同的水平。

[0216] 接下来,就CD4⁺T细胞产生IFN- γ (图6A)、IL17(图6C)而言,三药联合免疫组与IFN- α /GM-CSF组、GM-CSF/VACCINE组、IFN- α /VACCINE组相比,均无统计学差异($P>0.05$)。三药联合组与GM-CSF/VACCINE组和IFN- α /VACCINE组的CD4⁺IL4⁺T细胞(图6B)无统计学差异($P>0.05$)。另外,特别是在促进CD8⁺T细胞分泌IFN- γ (图6D)能力方面,三药联合组与IFN- α /VACCINE组也无差异($P>0.05$),与IFN- α /GM-CSF组有统计学差异($P<0.05$),与其他组相比存在显著差异($P<0.01$)。

[0217] 1.6小鼠免疫后T细胞增殖

[0218] T淋巴细胞增殖是机体细胞免疫应答的重要阶段,特异性的T细胞增殖水平反映了机体对抗原的反应性以及保护机体免受该抗原再次来袭的能力。本研究中,我们采用掺入CFSE法,检测不同药物组合免疫小鼠对HBsAg的反应性。

[0219] 数据(图7A)显示,就CD4⁺T细胞增殖水平而言,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合组分别与3 \times GM-CSF+VACCINE和IFN- α /GM-CSF相比,均无统计学差异($P>0.05$),高于GM-CSF/VACCINE组和IFN- α /VACCINE组,且存在统计学差异($P<0.05$),显著高于其他组($P<0.01$)。而对于CD8⁺T淋巴细胞增殖水平(图7B),IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合组分别与3 \times GM-CSF+VACCINE、IFN- α /GM-CSF、IFN- α /VACCINE相比,均无统计学意义($P>0.05$),比GM-CSF/VACCINE组、GM-CSF组、VACCINE组能提高CD8⁺T淋巴细胞增殖水平,差异有统计学意义($P<0.05$),而显著高于naïve组和IFN- α 组($P<0.01$)。由此可见,将IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合后也可以明显促进机体T淋巴细胞增殖。

[0220] 1.7体外CTL实验

[0221] 除了机体产生的anti-HBsAg外,机体的CTL杀伤力的高低也是评价治疗性乙肝疫苗更为重要的指标。CD8⁺效应T细胞诱导的HBV抗原特异CTL在清除乙肝病毒过程中发挥了重要作用。CTL试验是对效应T淋巴细胞进行定量的较好方法。在本研究中,我们采用体外CTL方法,对不同处理组CD8效应T淋巴细胞的杀伤能力进行测试。结果见图8,IFN- α /GM-CSF/VACCINE和3 \times GM-CSF+VACCINE两种免疫策略CTL的作用力达到20%,明显高于其他方式免疫组($P<0.01$)。

[0222] 1.8抗原递呈细胞(APC)数量及功能检测

[0223] 在前面的实验中,我们发现IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫可以较好地激发机体的体液免疫和细胞免疫水平,那到底IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合后是如何激发机体的免疫还不得而知。APC,尤其是树突状细胞(DC)在联系非特异性免疫和特异性免疫过程中发挥了纽带作用。于是我们提出假设,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫后对该群细胞的数量及功能都有影响。

[0224] 首先,我们在体外对小鼠骨髓来源的DC2.4细胞进行试验,见图9,发现IFN- α /GM-CSF联合后比单独使用,可以明显促进DC分泌IL12的能力。体内实验中,也发现免疫后21天小鼠血清中IL12浓度明显升高,其他时间点(第3、7、14天无差异)。

[0225] 接着,在野生型小鼠体内实验中发现将IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合后与3 \times GM-

CSF+VACCINE免疫组比较,两者产生的CD11b⁺CD11c⁺DC数量没有明显差异,明显高于IFN- α /GM-CSF联合免疫组 ($P<0.05$),同时,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫组与3 \times GM-CSF+VACCINE较其他免疫方式能显著增加DC表面分子CD80、和MHC-II的表达 ($P<0.05$),结果见图10。

[0226] 1.9体内单核细胞检测

[0227] 根据之前的结果,我们得知,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫与3 \times GM-CSF+VACCINE免疫组显著增加了DC的数量及功能。自然情况下,体内DC数量始终保持稳定,这群增多的CD11b⁺CD11c⁺DC来源是我们需要解决的下个问题。体内单核细胞不是一群终末分化细胞,在不同细胞因子介导下可以继续向巨噬细胞或树突状细胞方向分化。因此,我们对体内单核细胞进行检测。

[0228] 结果见图11,数据表明,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫与3 \times GM-CSF+VACCINE免疫组外周血中CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞数量较其他免疫组明显增加 ($P<0.05$),同时发现单核细胞表面CD80、MHC-II表达显著增加。此外,ELISA结果表明,免疫后21天IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫与3 \times GM-CSF+VACCINE免疫组血清中MCP-1浓度明显高于其他免疫组 ($P<0.05$)。

[0229] 1.10小结

[0230] 以上实验数据表明,IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫方案在激发机体体液免疫和细胞免疫,尤其是HBV特异的CD8⁺效应T细胞上与3 \times GM-CSF+VACCINE方案有着相同的作用。此方案是可行的,优化后的方案IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫方式可作为3 \times GM-CSF+VACCINE的替代免疫方式,同时也有望成为乙肝治疗性疫苗的更优方案。

[0231] 实施例2、IFN- α /GM-CSF/VACCINE打破rAAV-1.3HBV小鼠免疫耐受

[0232] 在实施例1中,我们发现IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫与3 \times GM-CSF+VACCINE在野生型小鼠上均能激发机体体液免疫和细胞免疫,特别是能显著提高HBV特异CD8⁺效应T细胞的CTL杀伤能力。慢性乙肝难以治疗的关键问题在于HBV造成的机体免疫耐受,机体靠自身无法完成对HBV的清除。在先前试验中,我们发现3 \times GM-CSF+VACCINE成功打破HBV-sAg转基因小鼠的免疫耐受,促进HBsAg的清除以及anti-HBsAg的产生。在本次实验中,我们建立了腺病毒与乙肝病毒重组病毒(rAAV8-1.3HBV)感染小鼠的乙肝模型,利用该模型来评价优化后的IFN- α /GM-CSF/VACCINE联合免疫方案的免疫效果。

[0233] 2.1 rAAV-1.3HBV小鼠模型建立及验证

[0234] 为了验证rAAV-1.3HBV重组病毒能否感染C57B/L6小鼠,本实验通过尾静脉注射病毒进行模型建立,结果见图12。数据表明,rAAV-1.3HBV重组病毒感染小鼠后,血清HBeAg为阳性 ($S/CO>1$),HBsAg为 667.9 ± 80.39 IU/mL,血清HBV-DNA为 205.6 ± 28.92 copies/mL,三者与PBS对照组比较均存在明显统计学差异 ($P<0.0001$),ALT为 20.81 ± 1.72 U/L,与PBS对照组 (22.01 ± 1.47 U/L) 比较无统计学差异。HBcAg免疫组化(IHC)结果表明,只有肝脏细胞被rAAV-1.3HBV重组病毒感染,心脏和肾脏中未发现HBcAg阳性细胞。HE染色结果表明,rAAV-1.3HBV感染的肝脏细胞胞体变大,而心肌细胞和肾细胞未见明显变化。

[0235] 2.2 rAAV-1.3HBV小鼠模型监测

[0236] 在前一步骤中,我们证明rAAV-1.3HBV重组病毒能够在小鼠体内造成感染,但不知道该感染状态是急性感染还是持续性感染,因此我们对感染病毒后小鼠进行了持续的监

测,结果见图13,数据表明,rAAV-1.3HBV重组病毒感染小鼠2月内,HBsAg始终保持在稳定水平,无明显降低,此外,血清ALT与PBS组比较无明显差异,说明rAAV-1.3HBV可以在C57B/L6小鼠体内造成持续性感染。

[0237] 2.3 GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对乙肝小鼠的治疗效果

[0238] 在前面的实验中,已经证实rAAV-1.3HBV可以在小鼠体内造成持续性的感染,接下来,我们将优化后的免疫策略GM-CSF/IFN- α /VACCINE应用于rAAV8-1.3HBV小鼠,检验该免疫策略能否治愈乙肝小鼠。结果见图14,数据表明,乙肝小鼠经过两次免疫后,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和3 \times GM-CSF+VACCINE组血清HBsAg均降低,二者无统计学差异,与GM-CSF/IFN- α 组相比较具有统计学差异($P < 0.05$),而与其他免疫组相比均存在显著统计学差异($P < 0.01$);对于HBeAg而言,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组与3 \times GM-CSF+VACCINE组,血清HBeAg转阴($S/CO < 1$),其他对照免疫组HBeAg未转化,具有显著统计学差异($P < 0.01$)。

[0239] 2.4 GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对乙肝小鼠树突状细胞的影响

[0240] 由于DC细胞在促进机体特异性细胞免疫中发挥了重要作用,同时,在野生型小鼠体内发现GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合可以明显促进机体产生CD11b⁺CD11c⁺DC细胞,所以,我们首先来验证GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对rAAV-1.3HBV乙肝小鼠产生DC的影响。

[0241] 结果如下,在rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠上,图15(A)、(B)和(C)表明GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和3 \times GM-CSF+VACCINE免疫组均能明显促进CD11b⁺CD11c⁺DC细胞的生成,且两者相比无统计学差异($P > 0.05$),高于GM-CSF/IFN- α 免疫组($P < 0.05$),同时也高于其他免疫组,差异存在统计学意义($P < 0.01$);此外,从图15(D)和(E)可以看出,GM-CSF/IFN- α /VACCINE在促进CD11b⁺CD11c⁺DC表明共刺激分子(CD80、CD86)和抗原递呈分子(MHC-I、MHC-II)能力上均高于其他免疫组,由此可见,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合治疗rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠不仅可以诱导CD11b⁺CD11c⁺DC的生成,同时也可以增强DC处理抗原的能力。

[0242] 2.5 GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对乙肝小鼠单核细胞的影响

[0243] 在野生型小鼠体内,发现GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合可以明显促进机体产生CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞,因此,接下来进一步验证GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对rAAV-1.3HBV乙肝小鼠产生单核细胞的影响。

[0244] 结果见图16,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和3 \times GM-CSF+VACCINE免疫组相比,在促进CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}和CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{lo}两群单核细胞的生成上,无明显差异($P > 0.05$),高于GM-CSF、IFN- α 、GM-CSF/IFN- α 、GM-CSF/VACCINE和IFN- α /VACCINE组($P < 0.05$),显著高于PBS组和VACCINE单用组($P < 0.01$),在CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺粒细胞生成上,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和3 \times GM-CSF+VACCINE组虽高于其他免疫组,但是无统计学差异($P > 0.05$)。在进一步研究中发现CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}单核细胞为一群CCR2^{hi}的炎性单核细胞,而CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{lo}单核细胞为一群CCR2^{lo}的循环单核细胞。

[0245] 2.6 GM-CSF/IFN- α 联合对单核细胞向树突状细胞分化的影响

[0246] 在前面的实验中,我们已经证实GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合可以促进机体DC和单核细胞的生成,但是DC和单核细胞直接是否存在关联,此群CD11b⁺CD11c⁺DC是否为单核细胞来源的DC(MoDC)还不得而知,因此我们假设此群增多的CD11b⁺CD11c⁺DC来源于单核细胞,接下来首先用体外实验验证,用磁珠分选法将健康人外周血PBMC中CD14⁺单核细胞分选出来,分别用GM-CSF、IFN- α 、GM-CSF/IFN- α 和LPS刺激,结果表明单独使用GM-CSF、IFN- α 均能促进

CD14⁺单核细胞向CD11c⁺DC转化,二者联用比单独使用效果更明显。GM-CSF与IFN- α 联合后对DC表面活化分子(CD80、CD86)和抗原递呈能力(HLA-A2、HLA-DR)表达明显高于二者单独使用组。由此可见,GM-CSF/IFN- α 联合不仅可以促进单核细胞向DC的转化,更重要的是促进了DC功能的增强。

[0247] 2.7 GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对乙肝小鼠细胞免疫的影响

[0248] 在前面实验中,我们已经证实了GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合可以促进CD11b⁺CD11c⁺DC的生成,而且也证明了该群DC来源于外周血单核细胞。HBV清除的关键在于机体强有力的细胞免疫,尤其是IFN- γ 和CTL反应。接下来,我们想看看,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫后产生的DC细胞能否真正激发rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠的细胞免疫。

[0249] 结果见图17,DTH试验是反映机体细胞免疫最便捷的方式,因此,我们首先检测不同药物组合免疫rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠后的DTH反应,从图17(A)可以看出,

[0250] GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组与3 \times GM-CSF+VACCINE组均能明显促进小鼠DTH反应,且在24h反应最为强烈,虽然GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组较3 \times GM-CSF+VACCINE组的DTH略低,但是无统计学差异($P>0.05$),而明显高于其他对照组,且差异具有统计学意义($P<0.01$)。

[0251] 其次,我们检测了不同免疫组脾脏中T细胞增殖能力。结果见图17(B),发现除了与3 \times GM-CSF+VACCINE组T细胞增殖率无差异外,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组所引起的T细胞增殖率均高于其他对照组,且差异具有统计学意义($P<0.01$)。

[0252] 接下来,我们分别对不同免疫组所激发的Th1、Th2和Tc1型细胞免疫进行检测。结果见图17(C-F),与其他对照免疫组相比,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组与3 \times GM-CSF+VACCINE组均能促进CD4⁺T细胞(Th1)和CD8⁺T细胞(Tc1)产生更高的IFN- γ ,且差异具有统计学意义($P<0.01$);对CD4⁺T细胞产生IL-4方面,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组与3 \times GM-CSF+VACCINE组明显高于其他对照组($P<0.01$)。有意思的是,我们也发现了GM-CSF、IFN- α 和VACCINE两两联合组比单独使用组产生更多的IFN- γ ⁺CD4⁺T细胞和IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞,差异均具有统计学意义;但是在产生IL-4⁺CD4⁺T细胞上,GM-CSF、IFN- α 和VACCINE两两联合组并未比单独使用组产生的更多($P>0.05$)。通过肝脏组织CD8细胞免疫组化染色(图17(G)),我们可以看出,GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组与3 \times GM-CSF+VACCINE组均有更多的CD8⁺T细胞浸润,而其他组则较少,尤其在单独药物免疫组,几乎看不到CD8⁺T细胞浸润。

[0253] 此外,我们还进行了体内CTL试验来进一步评价机体的细胞免疫水平。结果见图17(H-I),GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫组与3 \times GM-CSF+VACCINE组CTL杀伤率均在45%左右,而其他对照免疫组几乎没有能激发机体的CTL能力。

[0254] 2.8 GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合对乙肝小鼠体液免疫的影响

[0255] 在前面的实验中,我们已经证实GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合可以促进机体细胞免疫,到底GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫能否促进HBsAg和HBV的清除还不得而知,因此,接下来,我们将继续考察GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合免疫对rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠体液免疫的影响及其对HBsAg和HBV的影响。

[0256] 结果见图18,经过4次GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合或4次3 \times GM-CSF+VACCINE免疫后,血清HBeAg(图18A)转阴,其他免疫组未转阴;血清HBsAg(图18B)转阴,其他免疫组未转阴;血清HBV-DNA处于检测限(图18C)以下,其他免疫组依然可以检测到;血清ALT,GM-CSF/

IFN- α /VACCINE联合或 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE免疫较其他对照免疫组升高约3倍,且差异具有统计学意义($P < 0.01$),同时也注意到,GM-CSF、IFN- α 和VACCINE两两联合组比单独使用组产生更高的ALT,尤其是GM-CSF/IFN- α 联合组ALT约为PBS组的2倍。通过肝脏HBcAg免疫组化结果(图18E),可以看到GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合或 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE免疫后,肝脏中HBcAg阳性细胞比其他免疫方式组明显减少。此外,我们对不同免疫组合情况下HBsAg血清学转化能力做了检测,发现只有GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE免疫组能够产生anti-HBsAg,而其他组则不能产生抗体。进一步对抗体亚型进行检测,发现GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE免疫组IgG2a/IgG1 >1 ,这也印证了之前GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组和 $3 \times$ GM-CSF+VACCINE免疫组可以诱导机体产生较强细胞免疫的结果。

[0257] 2.9敲除Ly6C^{hi}CCR2^{hi}单核细胞对GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组疗效的影响

[0258] 根据前面的实验结果,我们知道GM-CSF/IFN- α /VACCINE联合组不仅能促进rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠外周血中CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}CCR2^{hi}单核细胞的生成,进而促进单核细胞向DC方向极化,而且能促进机体产生强有力的细胞免疫和体液免疫,最终促进HBsAg转化和HBV的清除,在这个过程中,我们发现Ly6C^{hi}CCR2^{hi}单核细胞尤为重要,为了进一步证明该群细胞的重要性,我们将Ly6C^{hi}CCR2^{hi}单核细胞进行选择性地敲除。

[0259] 结果见图19,通过用CCR2抑制剂(INCB3344)进行体内阻断实验,我们首先发现,阻断CCR2后,rAAV8-1.3HBV乙肝小鼠外周血CD11b⁺Ly6C^{hi}CCR2^{hi}单核细胞比例明显低于未阻断组(图19A-B)。不仅如此,CCR2阻断后,CD11b⁺CD11c⁺DC的生成也低于未阻断组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);同时,CCR2阻断组产生的IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞和血清ALT都明显低于未阻断组;进而,我们也看到,CCR2未阻断组血清HBsAg转阴,而CCR2阻断组和PBS对照组HBsAg基本无太大变化;对于血清中HBV-DNA也有同样现象,CCR2未阻断组血清HBV-DNA低于检测下限,而CCR2阻断组和PBS对照组HBV-DNA基本无太大变化;最后,肝脏免疫组化结果也可以看出,用INCB3344将Ly6G⁻Ly6C^{hi}单核细胞敲除后,影响到了HBcAg阳性细胞的清除。

[0260] 实施例3

[0261] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用前列腺癌抗原表位肽(PAP,其序列为:CMSAMTNLAALFPPEG,如SEQ ID NO.1所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图20A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图20B所示。

[0262] 实施例4

[0263] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用乳腺癌抗原表位肽(WT1,其序列为:CYTWNQMNL SLGEEQQYSV,如SEQ ID NO.2所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮

下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图21A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图21B所示。

[0264] 实施例5

[0265] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用结直肠癌抗原表位肽(CEA,其序列为:YLSGADLNLC,如SEQ ID NO.3所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图22A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图22B所示。

[0266] 实施例6

[0267] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用宫颈癌抗原表位肽(E6,其序列为:DKKQRFHNIRGRWTGRMSSCRSSRTRRETQLC,如SEQ ID NO.4所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图23A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图23B所示。

[0268] 实施例7

[0269] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用肝癌抗原表位肽(Trp,其序列为:CRPGWRAACNQKIL,如SEQ ID NO.5所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图24A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图24B所示。

[0270] 实施例8

[0271] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用多发性骨髓瘤抗原表位肽(MAGE-A3,其序列为:

KVAELVHFLFLWGPRLVC,如SEQ ID NO.6所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后激发出明显的抗体水平,结果如图25A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图25B所示。

[0272] 实施例9

[0273] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与肿瘤抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用肾细胞癌抗原表位肽(hTERT,其序列为:EARPALLTSRLRFIPKC,如SEQ ID NO.7所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图26A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图26B所示。

[0274] 实施例10

[0275] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与A型链球菌抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用A型链球菌抗原表位肽(J8,其序列为:QAEDKVKQSREAKKQVEKALKQLEDKVQC,如SEQ ID NO.8所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂或单独将偶联后抗原肽混合铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后激发出明显的抗体水平,结果如图27A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组明显高于表位肽免疫组,结果如图27B所示。

[0276] 实施例11

[0277] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与HIV抗原多肽或蛋白质疫苗三者混合达到免疫激活应答反应,首先我们选用HIV抗原表位肽(C4-V3,其序列为:KQIINMWQEVGKAMYARPCNTRKSIHIGPGRFYTTGEIIC,如SEQ ID NO.9所示),使用多肽与载体蛋白质(KLH)偶联方式进行偶联。纯化后,将偶联后的疫苗50 μ g与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂,在普通BALB/C小鼠进行皮下免疫,每次间隔2周,共2次,而偶联后抗原肽50 μ g混合铝佐剂组为对照,免疫程序一致。免疫后2周取小鼠血清进行ELISA检测体液免疫水平。之后对脚掌进行10 μ g多肽偶联BSA刺激与刺激后连续三天对其脚掌肿胀大小进行测量,以确认其DTH的细胞免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过2次免疫后的抗体水平明显高于表位肽组,结果如图28A所示。脚掌的DTH反应显示混合免疫组

明显高于表位肽免疫组,结果如图28B所示。

[0278] 实施例12

[0279] 为了验证GM-CSF、IFN α -2b与HBV PreS (PreS,其蛋白质序列如SEQ ID NO.10所示,其核酸序列如SEQ ID NO.11所示)或HBV PreS1 (PreS1,其蛋白质序列如SEQ ID NO.12所示)抗原混合达到免疫激活应答反应,我们将1 μ g PreS (40ug/ml)或1 μ g PreS1 (40ug/ml)与10 μ g GM-CSF和10000IU IFN α -2b三者混和并辅以铝佐剂。选用6-8周雌性Balb/c小鼠,皮下注射GM-CSF/IFN- α -2b/PreS或GM-CSF/IFN- α -2b/PreS1,对照组是单独免疫PreS或PreS1小鼠,每隔2周免疫一次,共3次。每次免疫前、后采血ELISA检测体液免疫水平。从特异性抗体水平可以看出,小鼠经过3次免疫后的抗体水平明显高于或相当于疫苗单独免疫组,结果如图29所示。

[0280] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

序列表

<110> 复旦大学

<120> 一种免疫增强剂、免疫治疗药物组合物及其制备与用途

<130> 2018

<160> 12

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 1

Cys Met Ser Ala Met Thr Asn Leu Ala Ala Leu Phe Pro Pro Glu Gly

1 5 10 15

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 2

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr

1 5 10 15

Ser Val

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 3

Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Leu Asn Leu Cys

1 5 10

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 4

Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg

1 5 10 15

Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu

 20 25 30

Cys

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 5

Cys Arg Pro Gly Trp Arg Ala Ala Cys Asn Gln Lys Ile Leu

1 5 10

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 6

Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala

1 5 10 15

Leu Val Cys

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 7

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10 15

Cys

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 8

Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Gln Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val

1 5 10 15

Glu Lys Ala Leu Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Gln Cys

20 25

<210> 9

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 9

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala

1 5 10 15

Arg Pro Asn Cys Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
 20 25 30
 Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Glu Ile Ile Cys
 35 40
 <210> 10
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> 人工序列()
 <400> 10
 Met Glu Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30
 Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Glu Ala Pro Lys Cys
 35 40 45
 Pro Gly Gln Asn Leu Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
 50 55 60
 Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
 100 105 110
 Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg
 145 150 155 160
 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
 165 170 175
 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
 180 185 190
 Ser Val Ile Leu Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile
 195 200 205
 Leu Arg Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
 210 215 220
 Trp Gly Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe
 225 230 235 240

Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Ser Ser
 245 250 255

<210> 11

<211> 768

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 11

atggagagca ccacatctgg cttcctggga ccaactgetgg tgctgcagge tggcttcttt 60
 ctgctgacca ggatcctgac aatecctcag tcctggaca gctggtggac ctccctgaac 120
 tttctgggcg aggctcctaa gtgtccagge cagaacctgc agtctccaac atccaatcac 180
 agccccacct cttgtceccc tacatgccect ggctacagat ggatgtgect gaggcggttc 240
 atcatcttcc tgtttatect getgetgtgc ctgatcttctc tgctggtgct gctggactat 300
 cagggaatgc tgcccgtgtg cctctgetgt ccaggcaect ccaccacaag cacaggcccc 360
 tgtaagacct gcacaatccc tgcccaggge accageatgt tcccatcttg ctgttgceacc 420
 aagccctctg atggcaactg tacatgeate ccaatceect ccagctgggc cttegetaga 480
 tttctgtggg agtgggcttc cgtgcgettt tcttggetgt cctgctggt gcctttcgtg 540
 cagtggtttg tgggectgtc cccaaccgtg tggetgagcg tgatcctgat gatgtggtac 600
 tggggcccaa gcctgtataa tatcctgagg cccttctctgc ctctgetgce aatcttcttt 660
 tgtctgtggg tgtggggccc cctgggettc tttctgacc atcagctgga tcccgccttc 720
 ggcgctaact ctaacaatcc tgactgggac ttcaacccat cttctctga 768

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列()

<400> 12

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
 20 25 30
 Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
 35 40 45
 Lys Asp His Trp Pro Glu Ala His Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly
 50 55 60
 Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Val Ala Pro Pro Pro Ala Ser
 85 90 95
 Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
 100 105 110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala

115

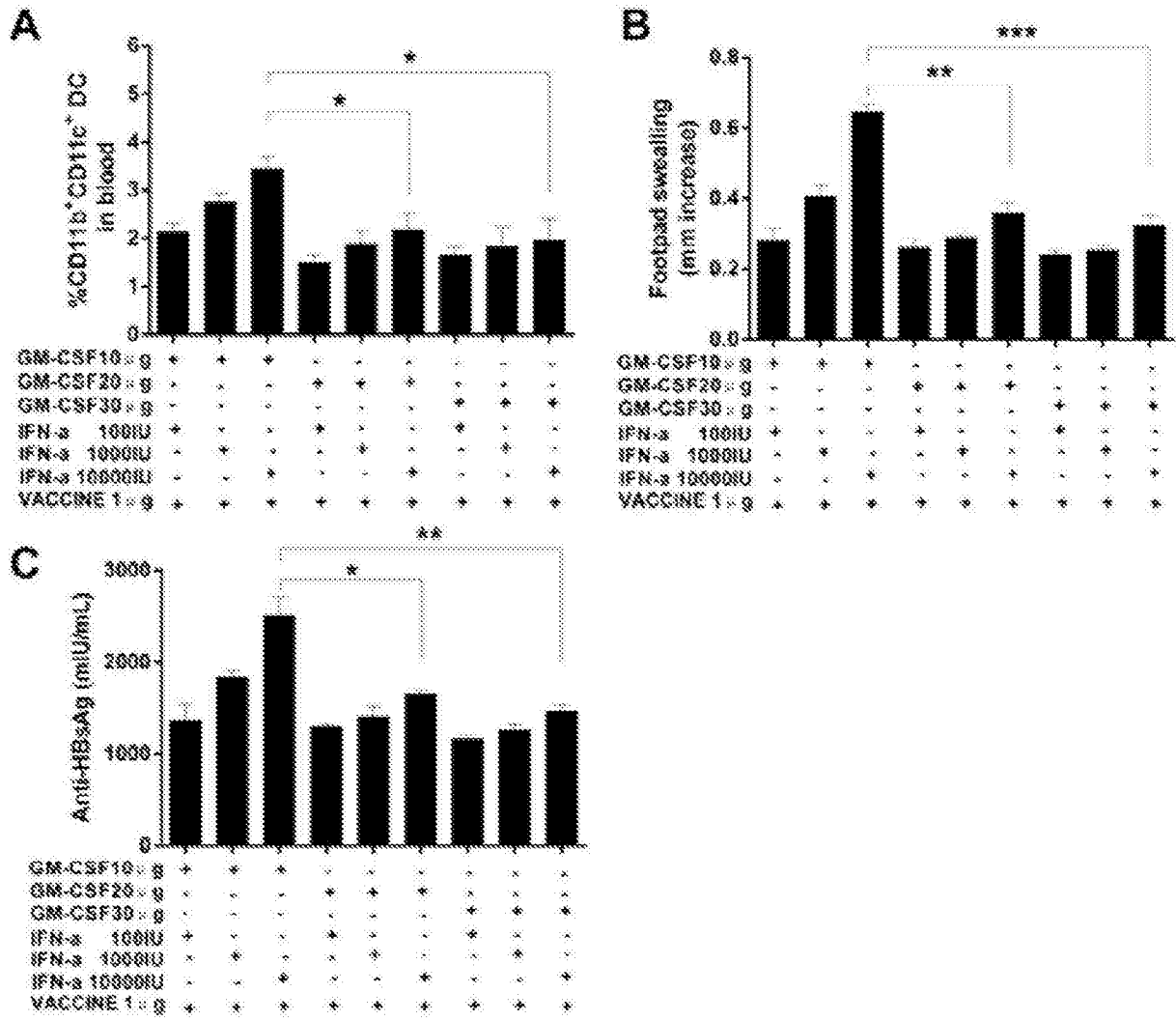


图1

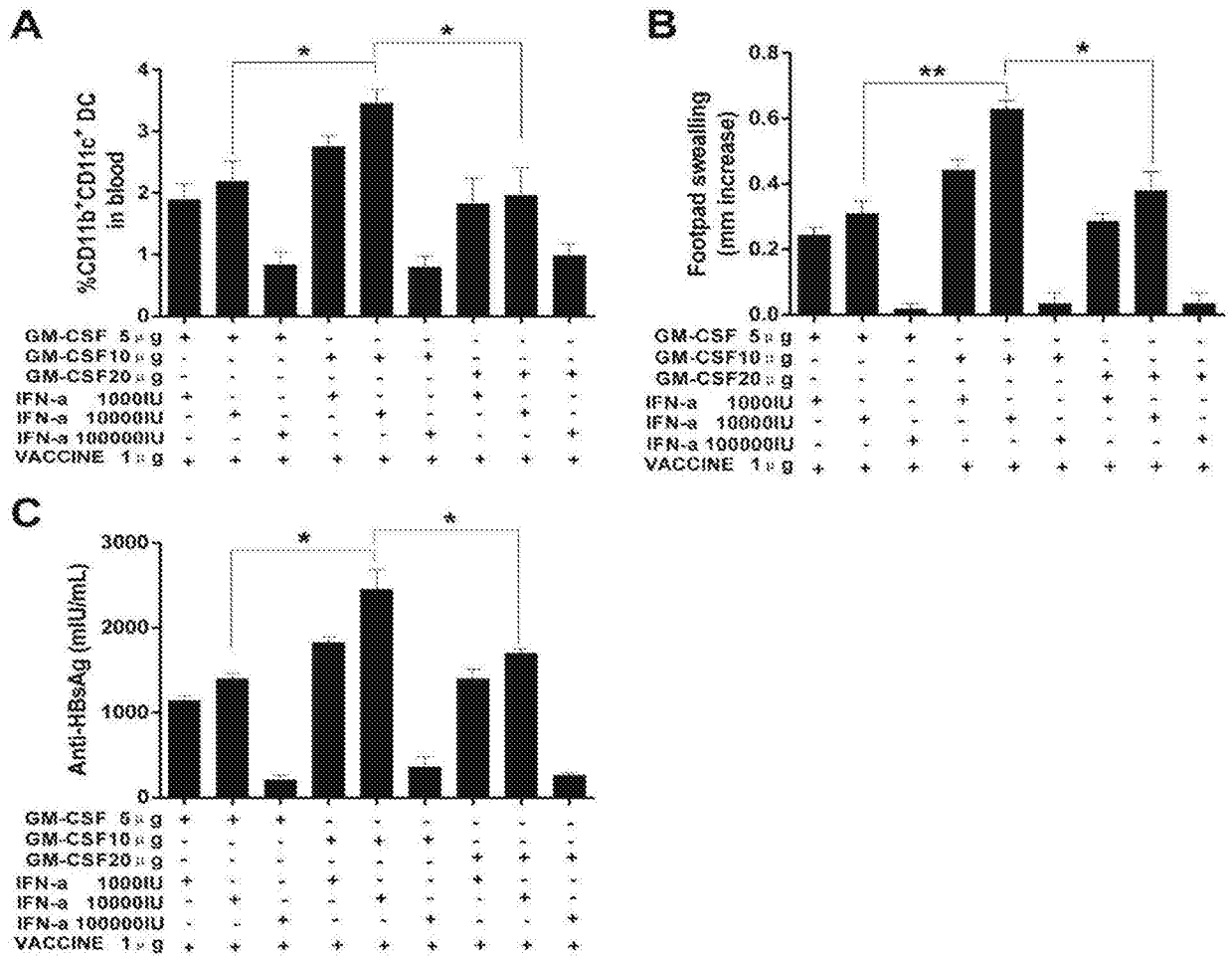


图2

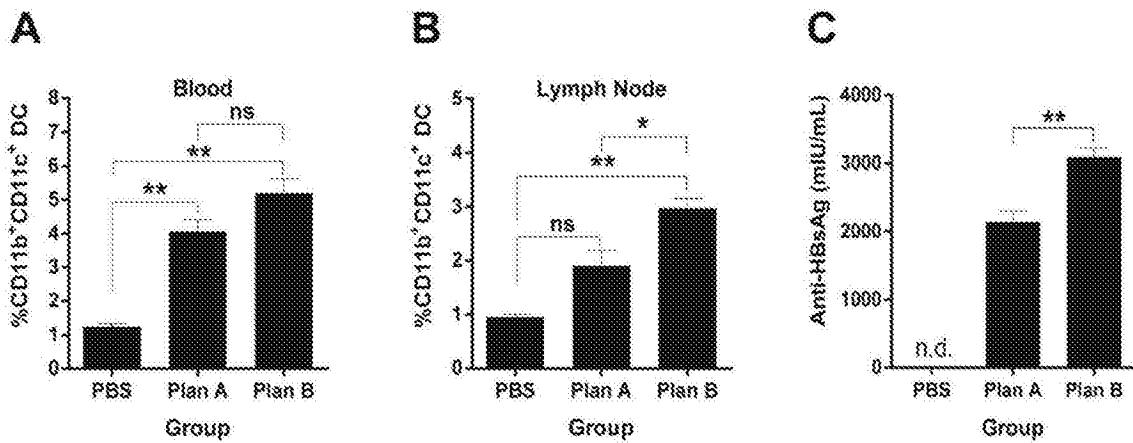


图3

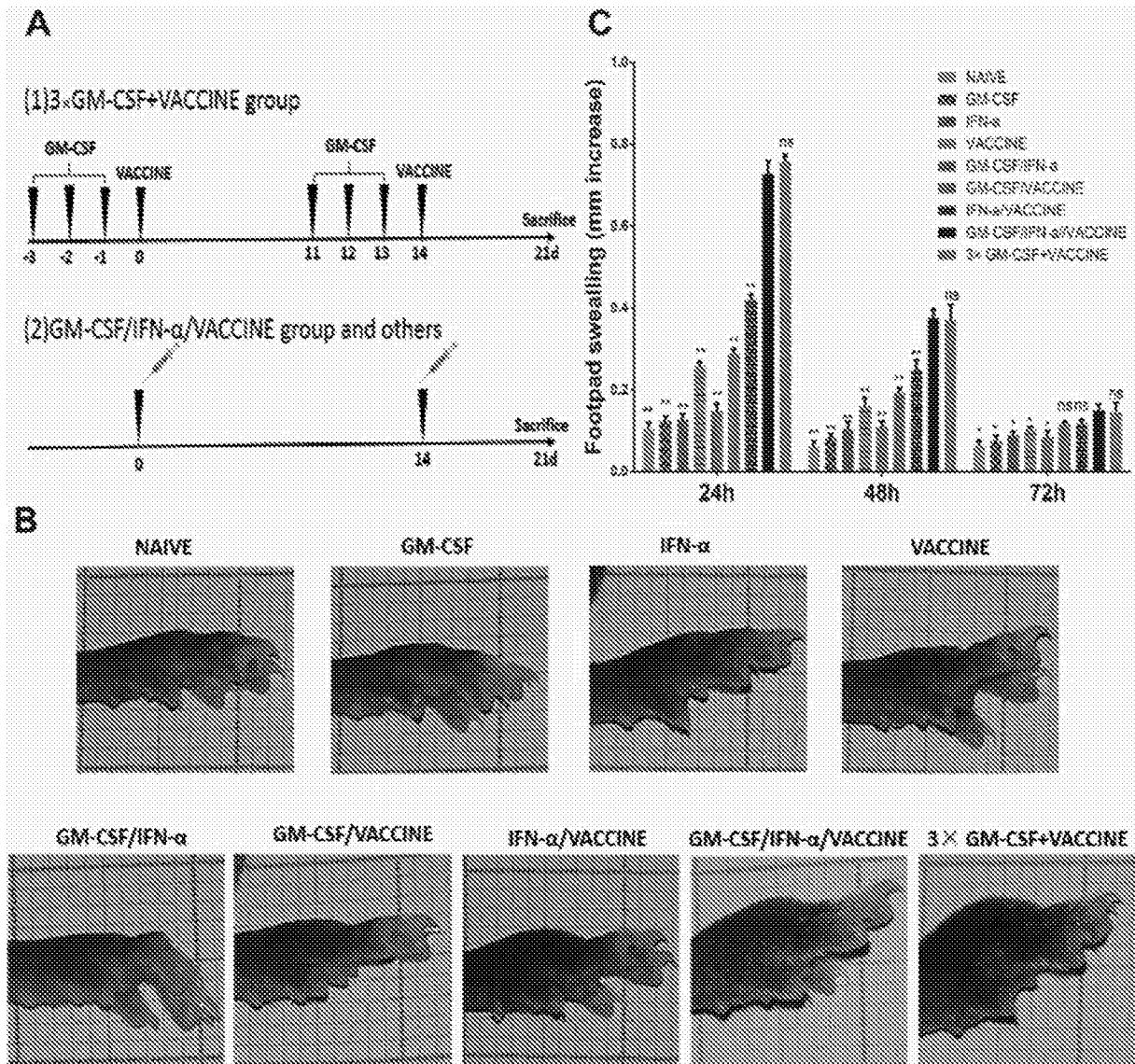


图4

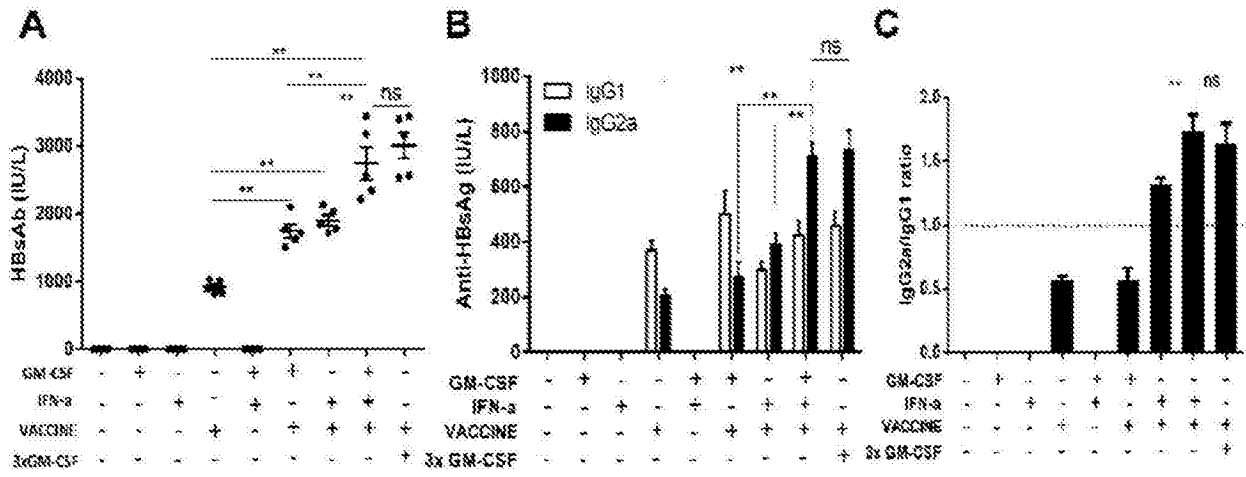
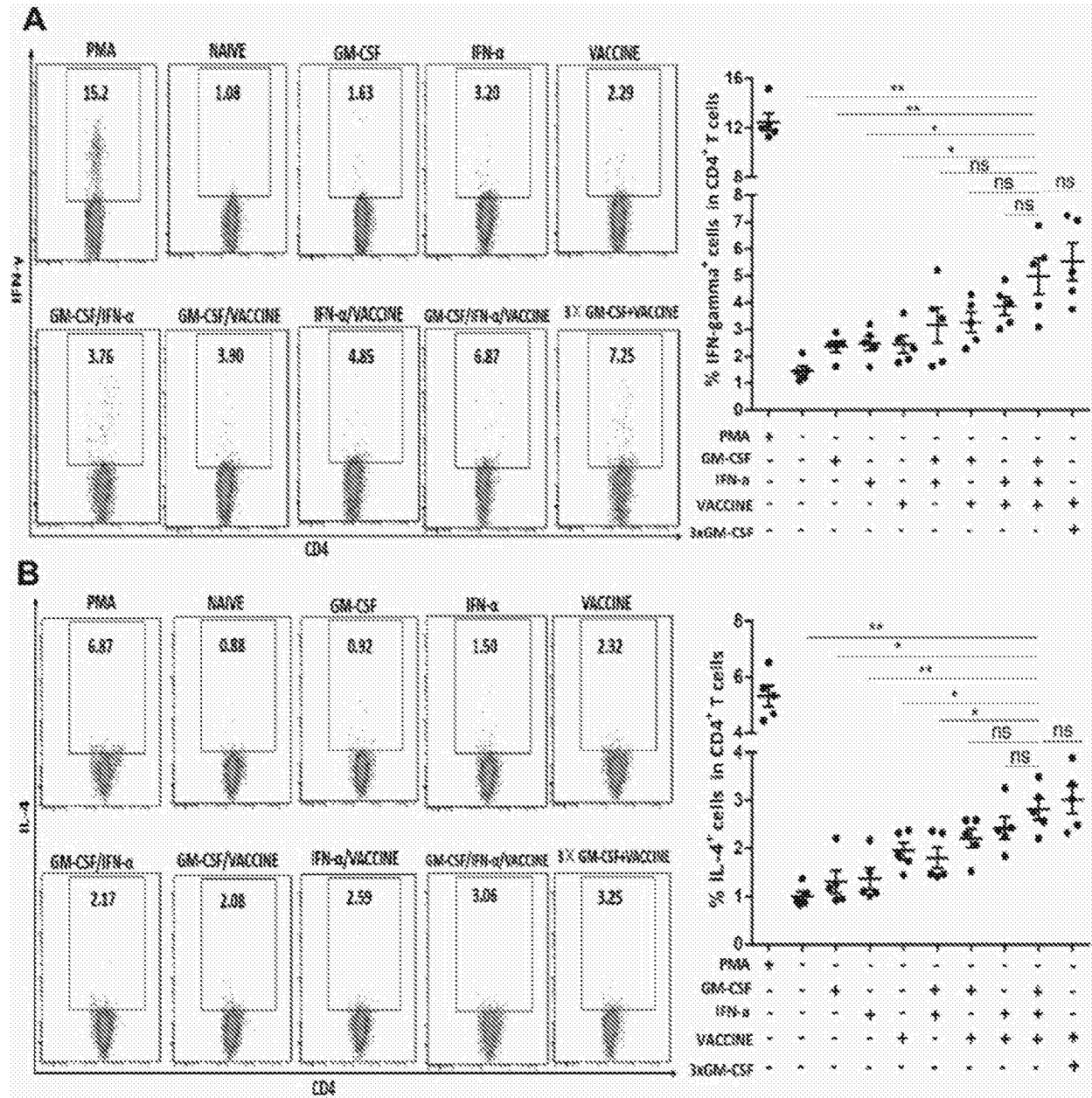


图5



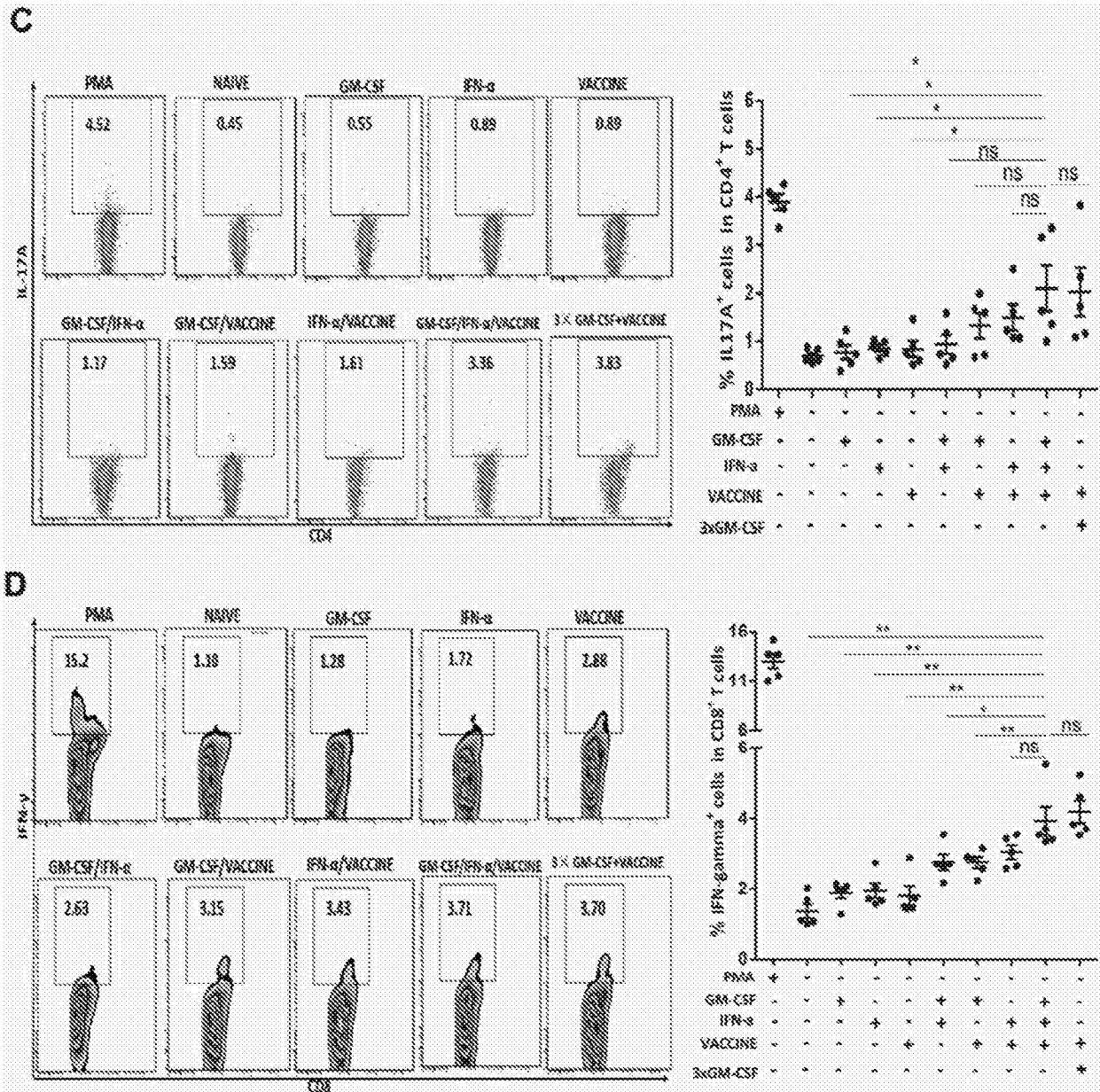


图6

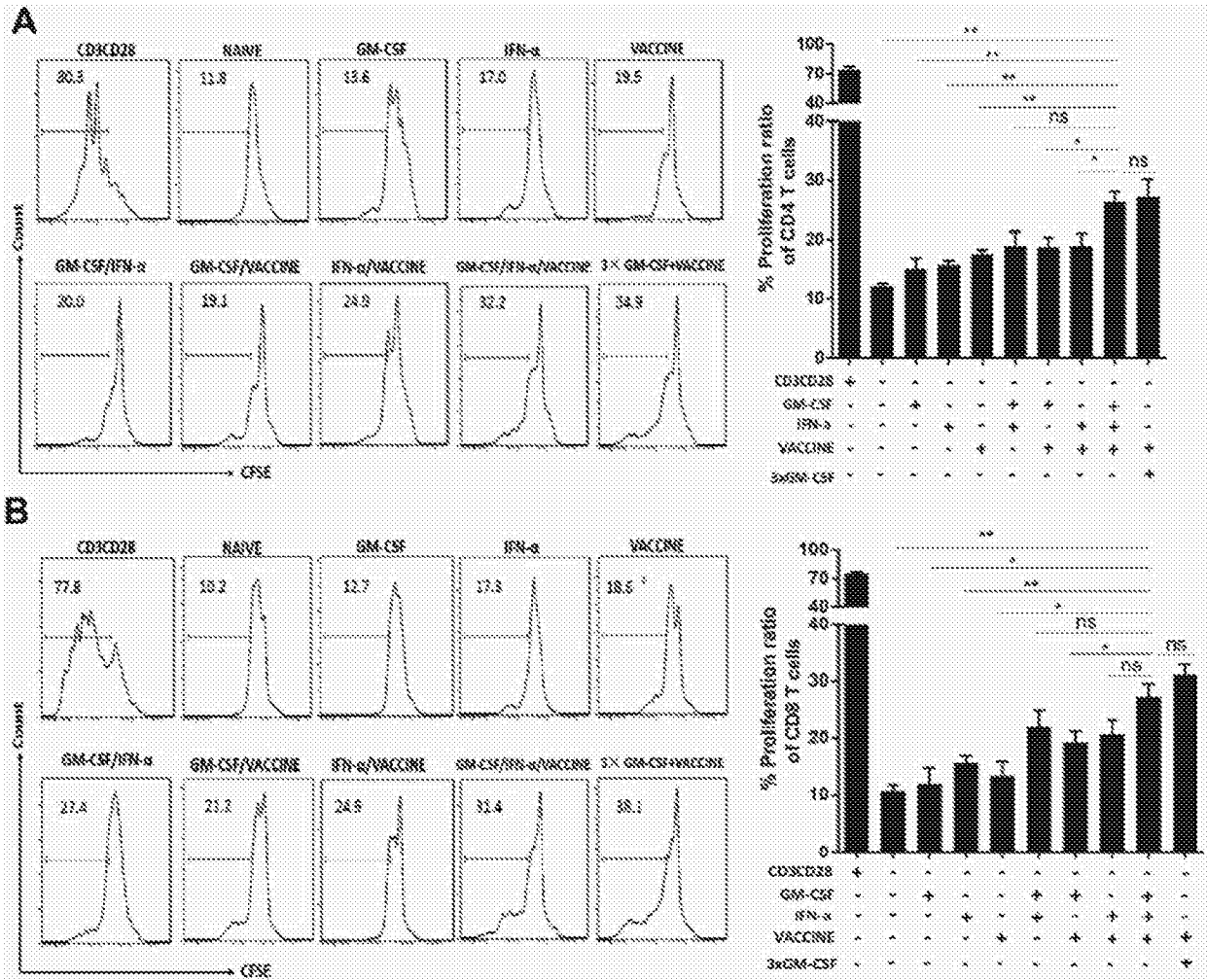


图7

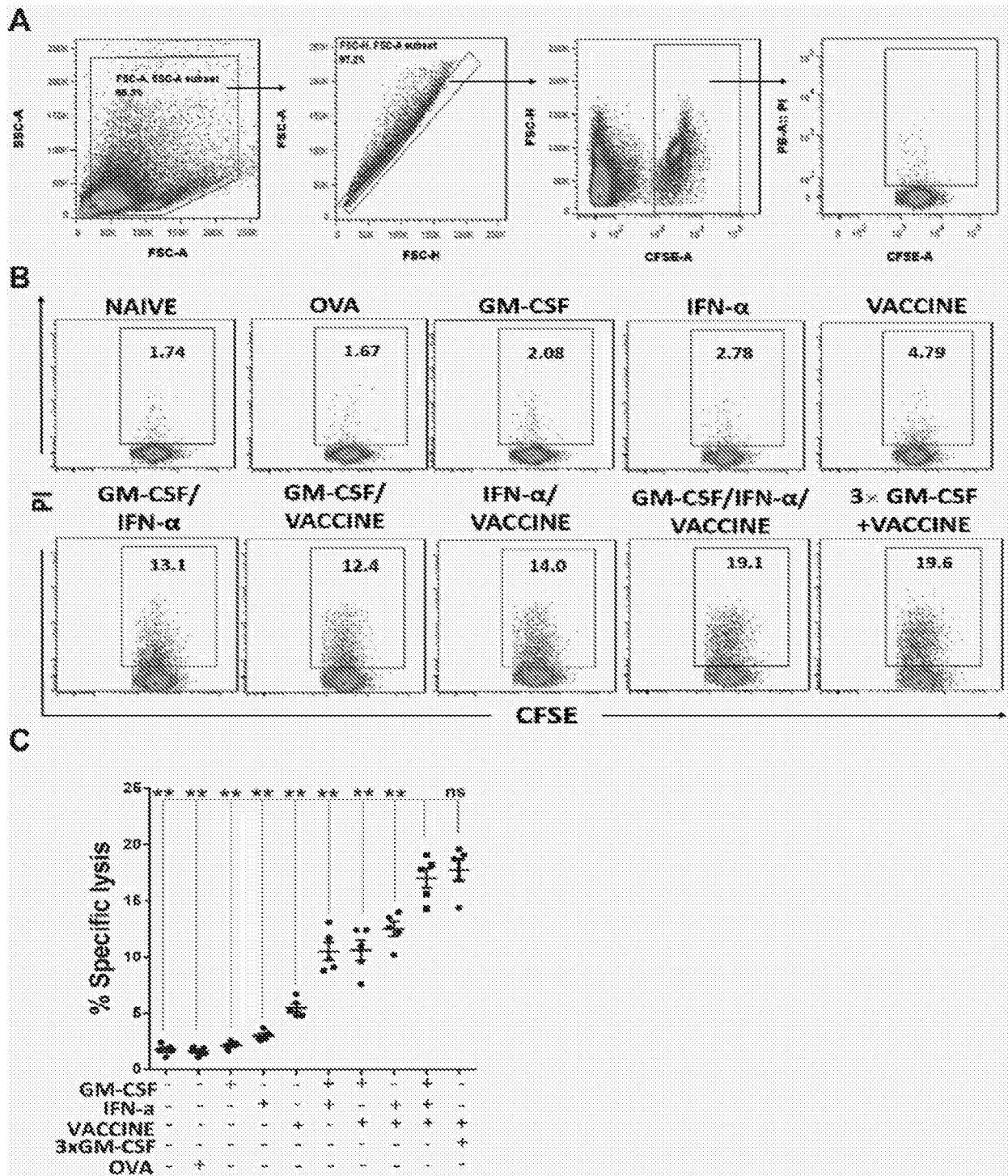


图8

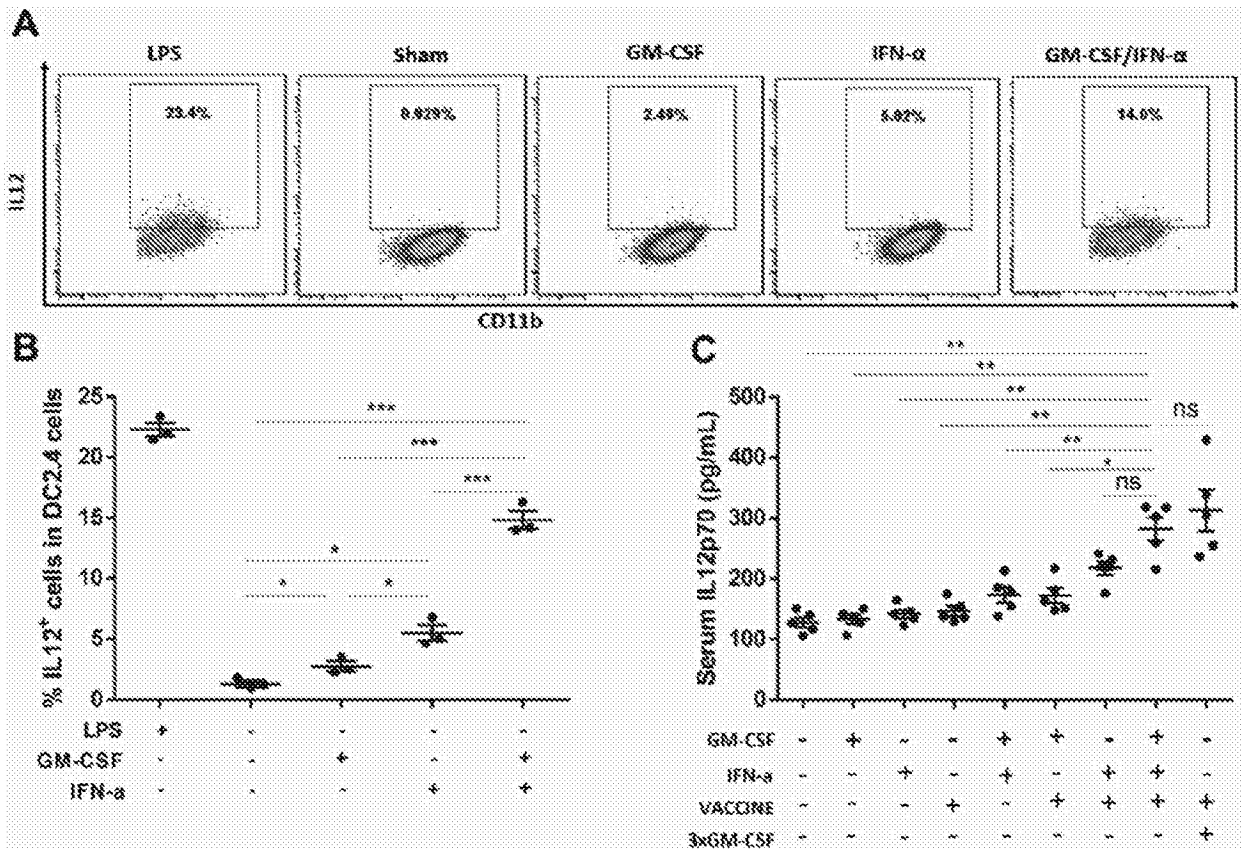


图9

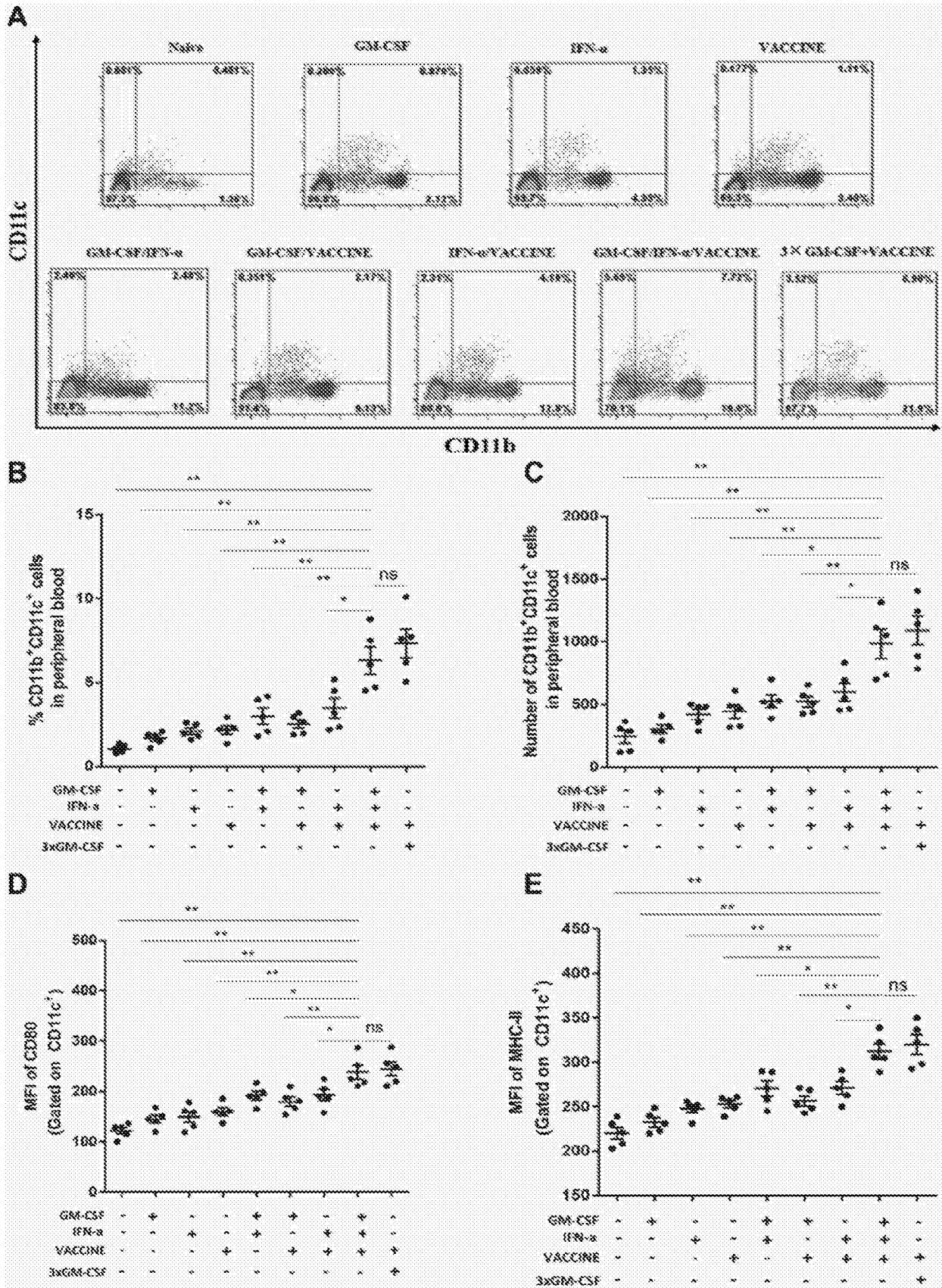
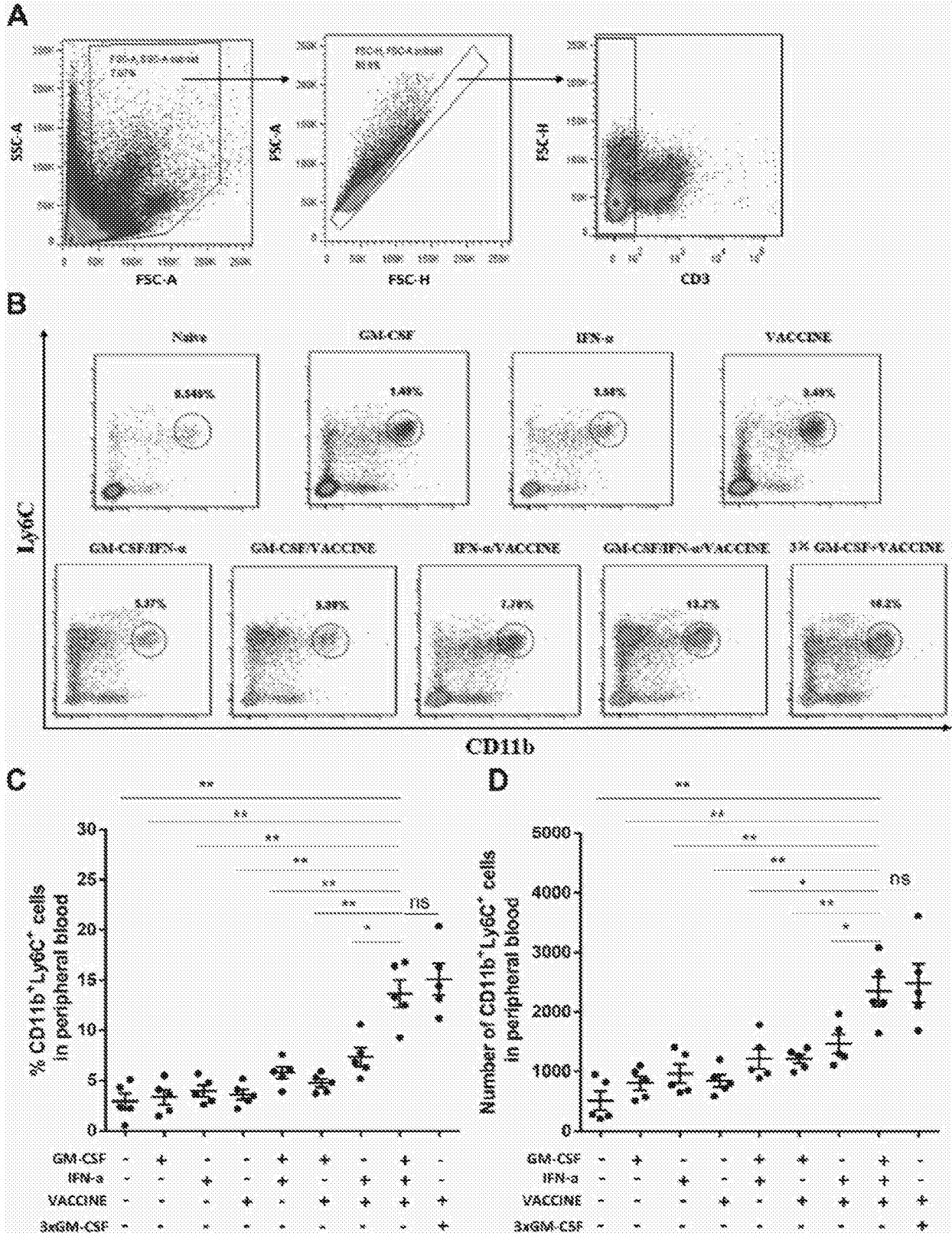


图10



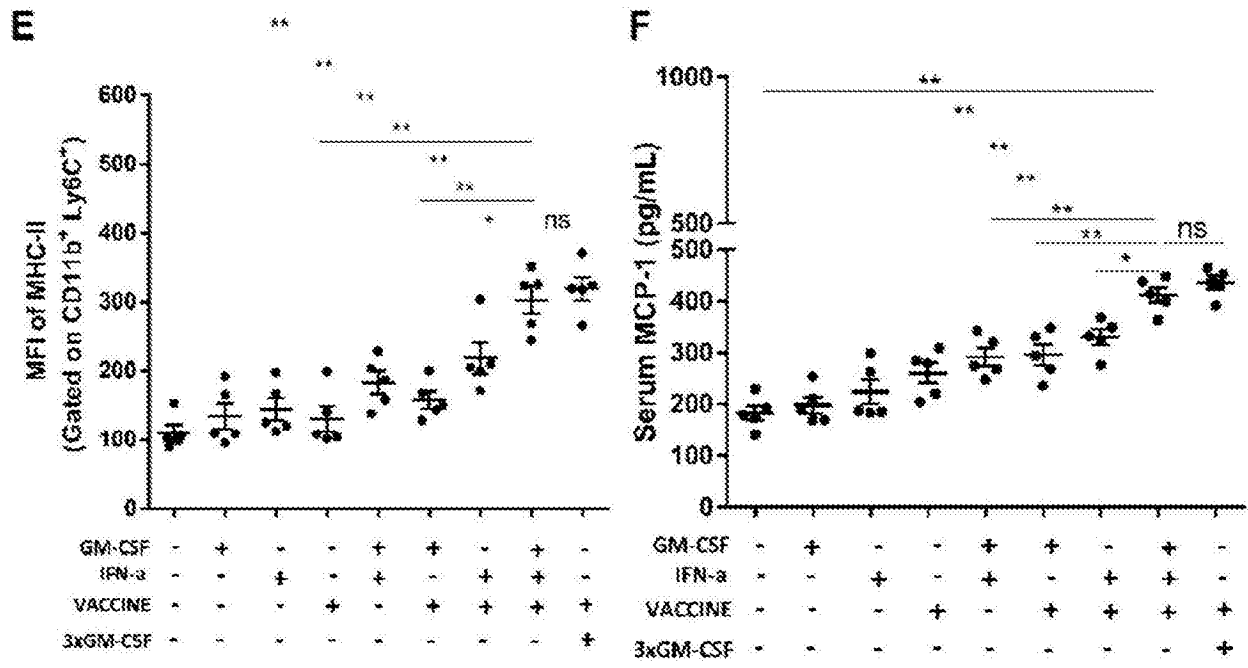


图11

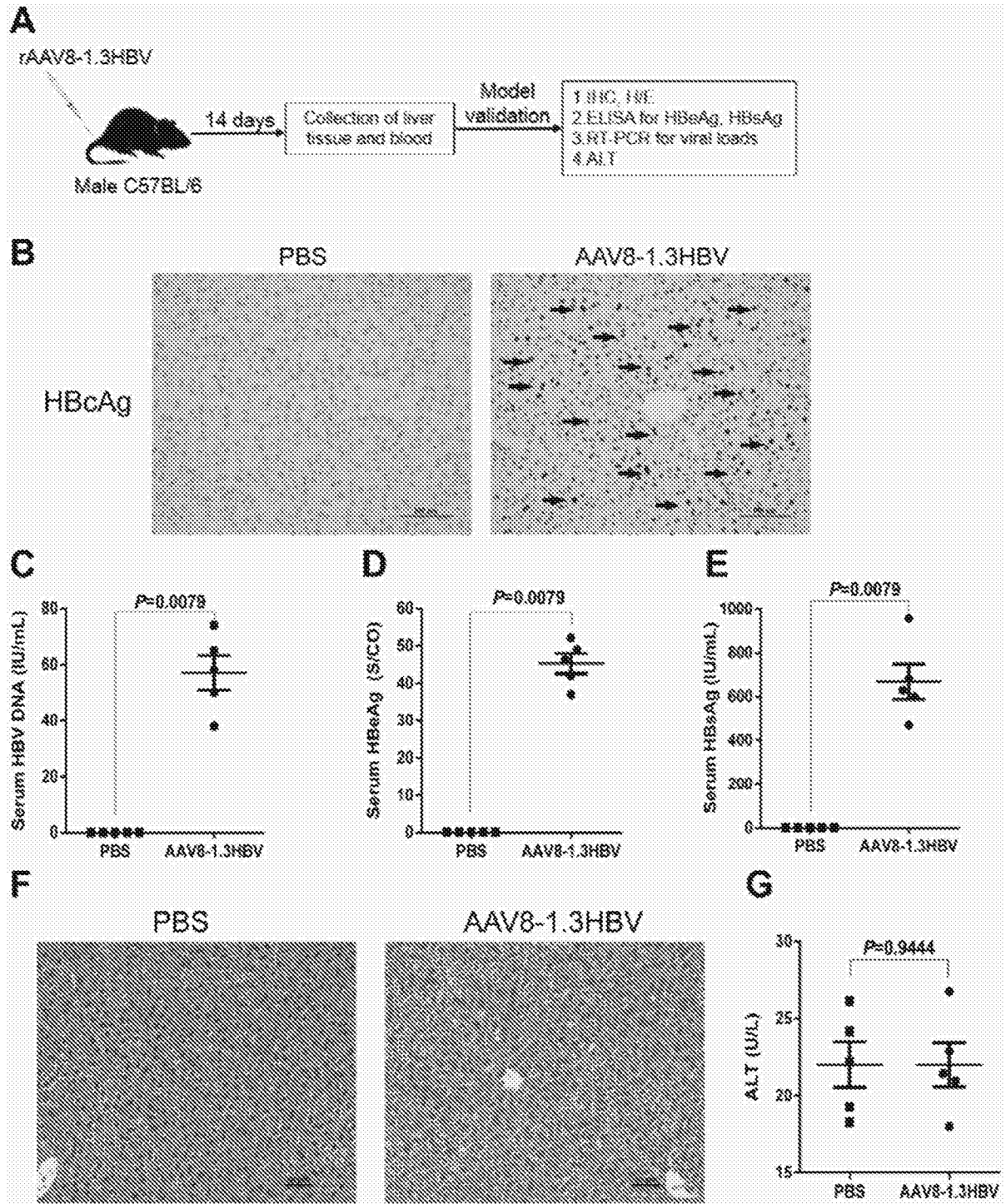


图12

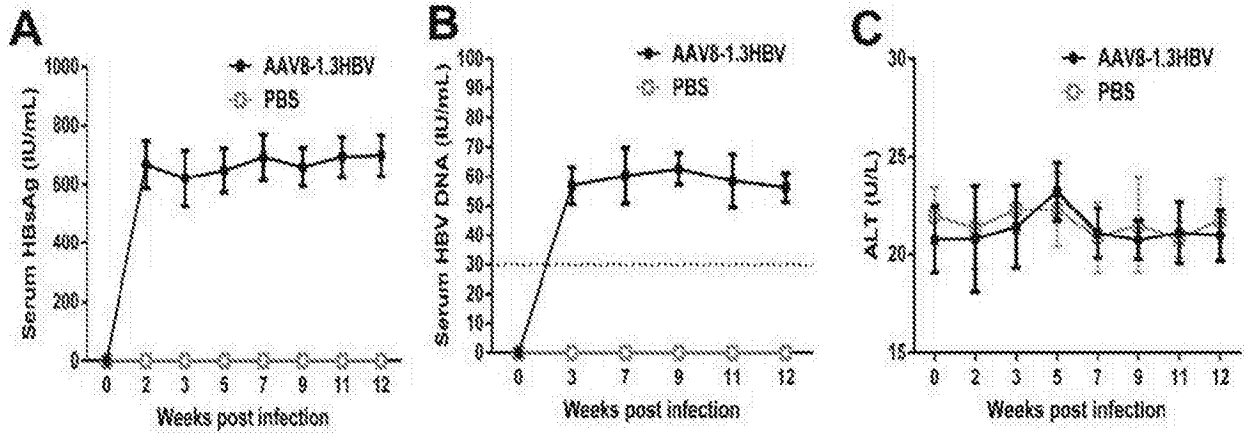


图13

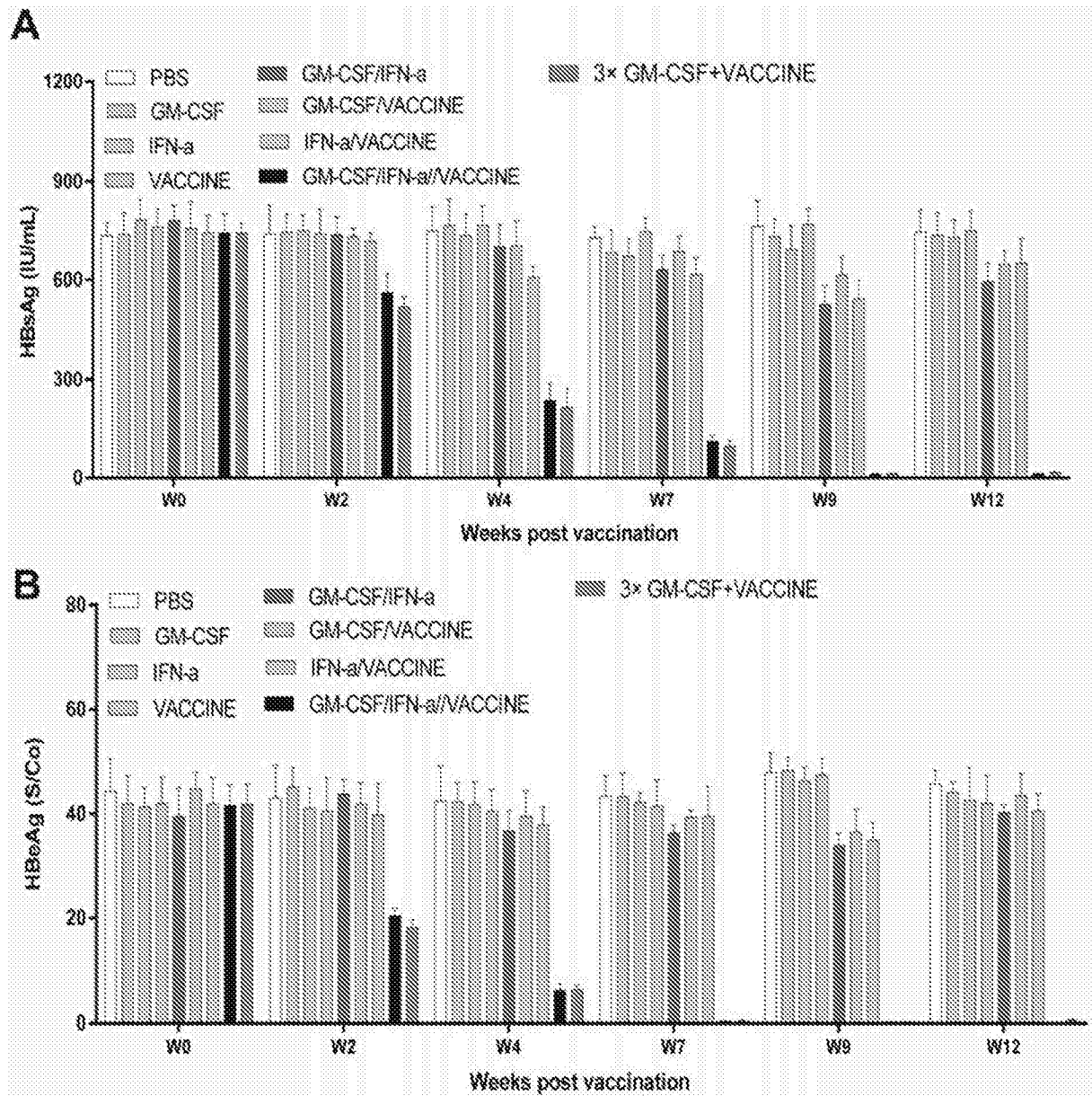
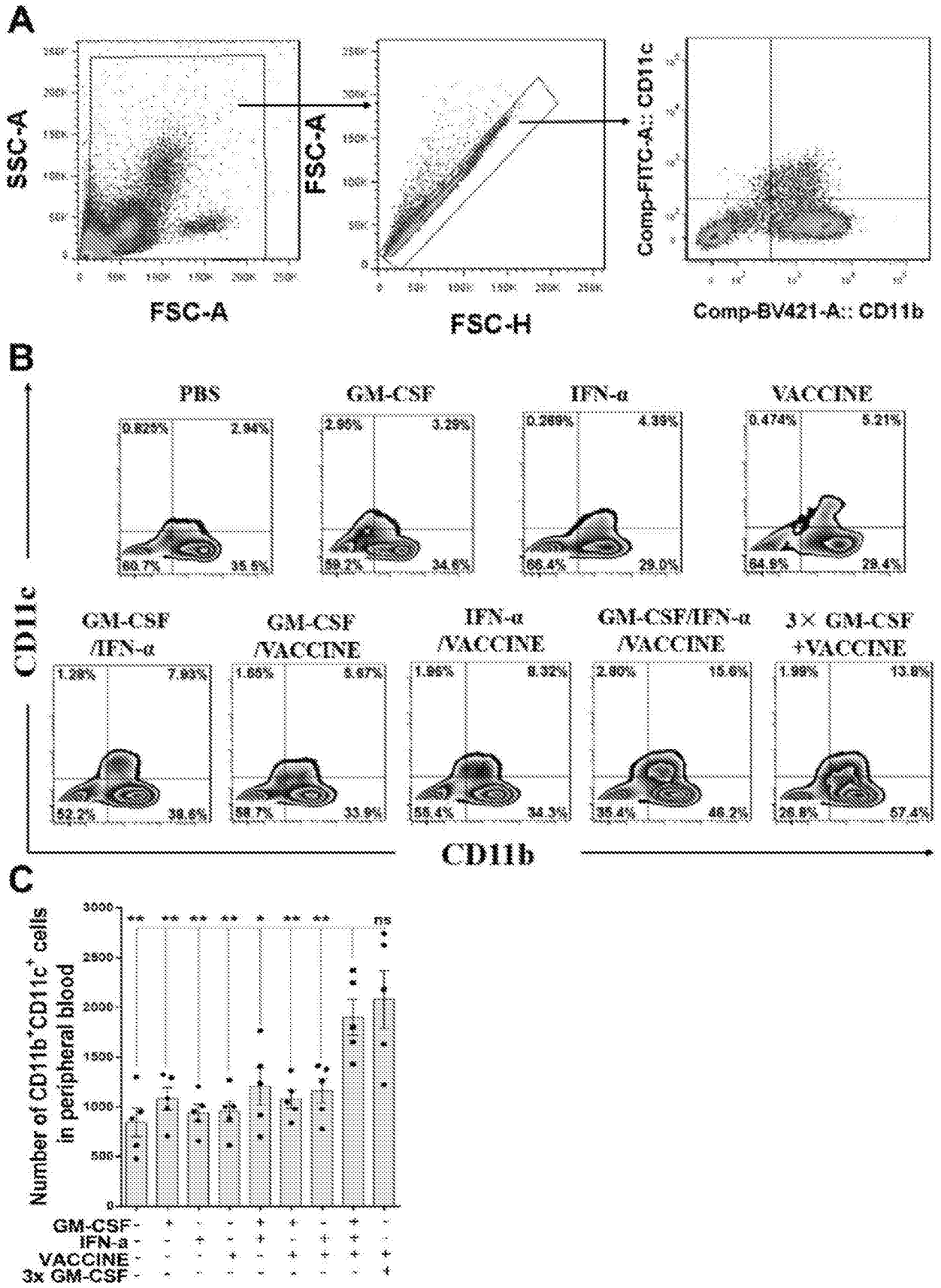


图14



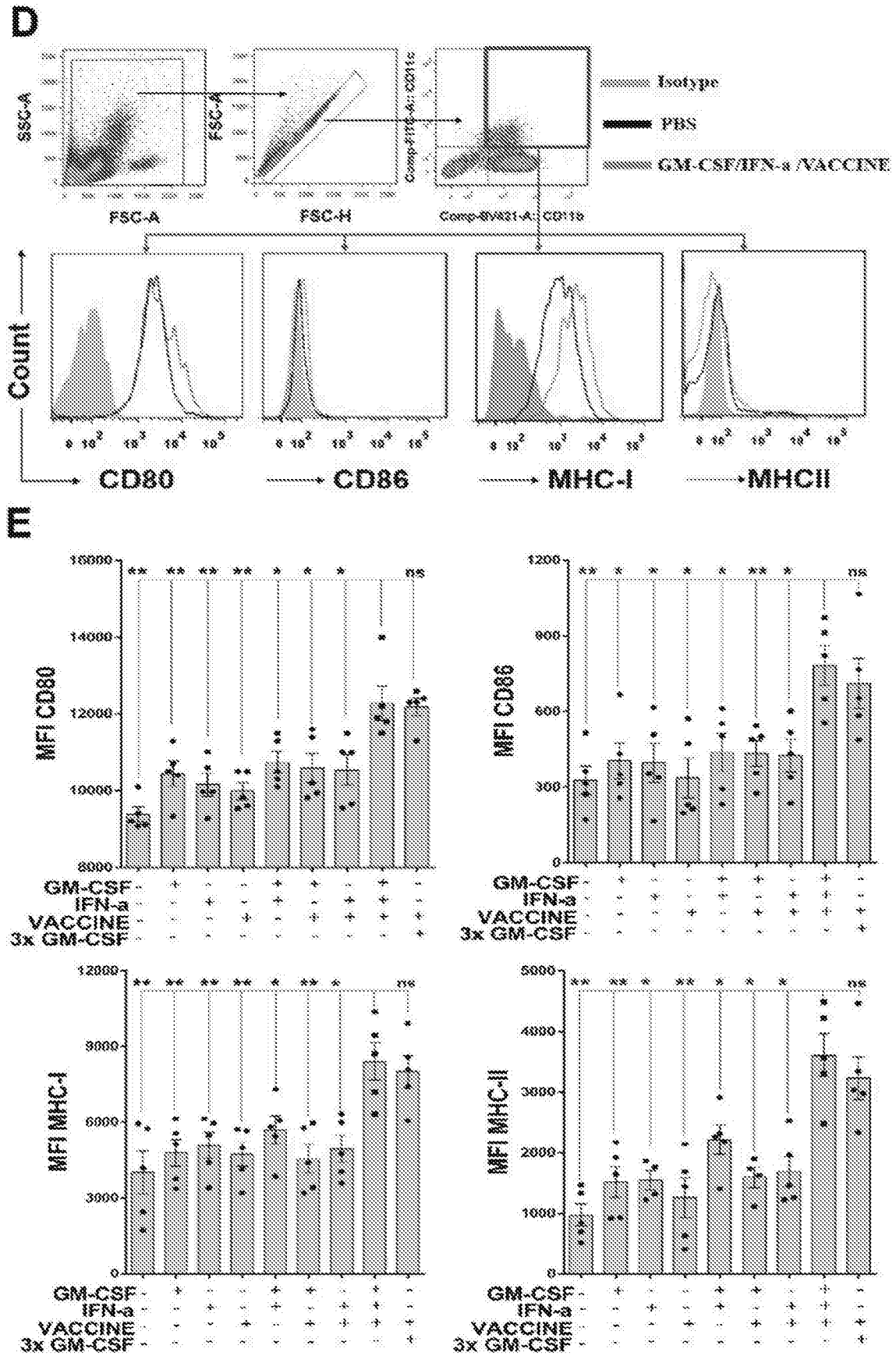
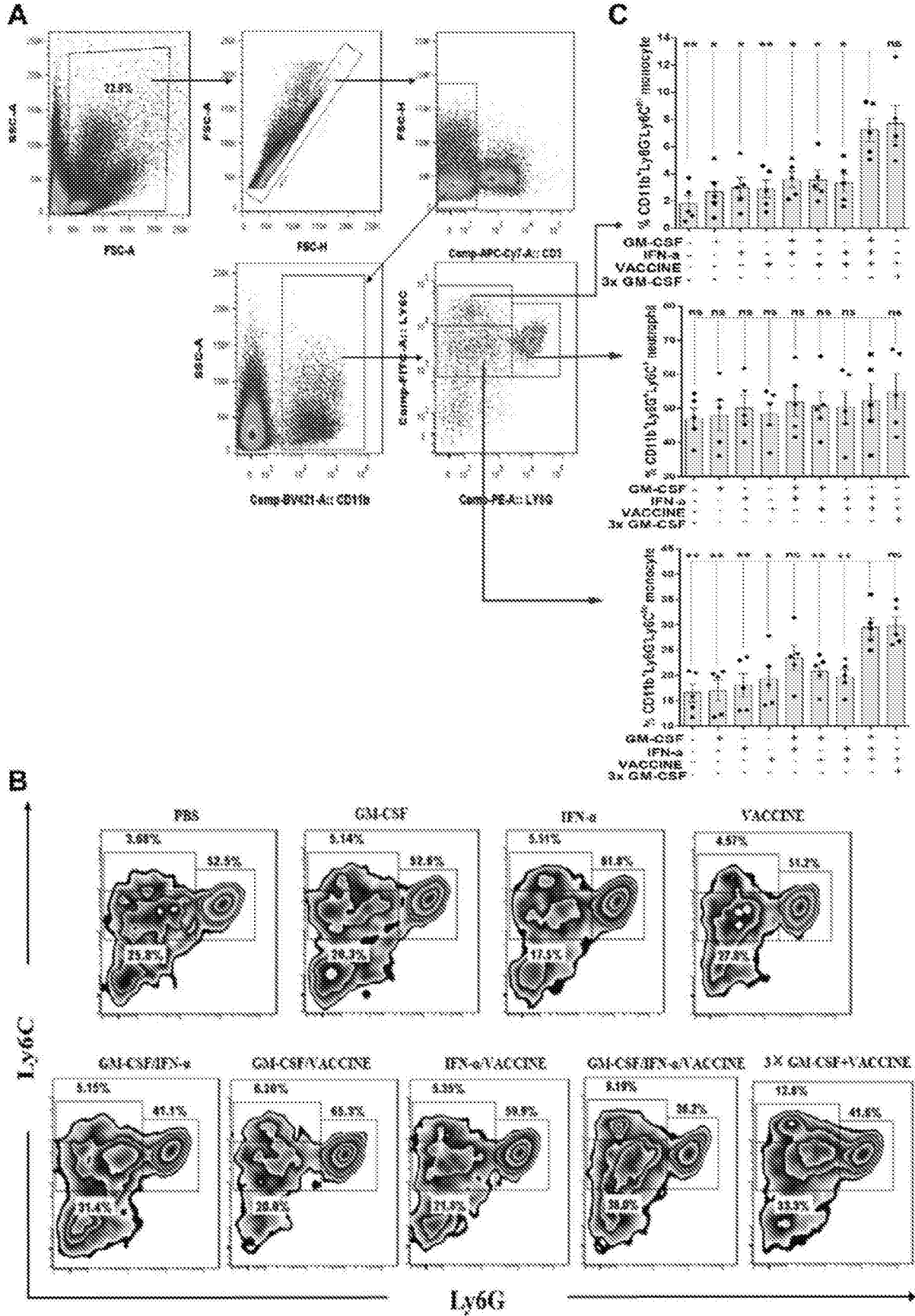


图15



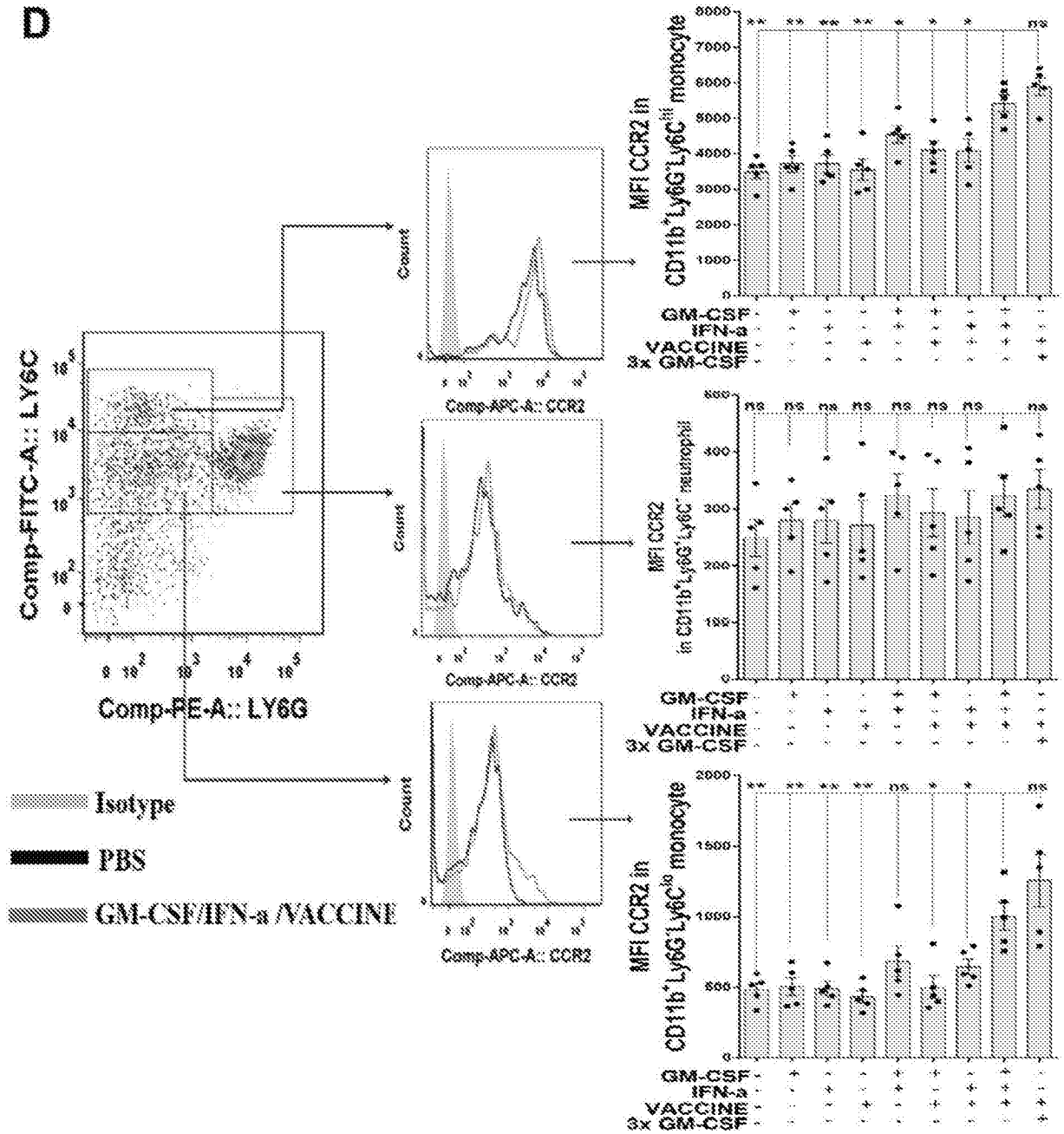


图16

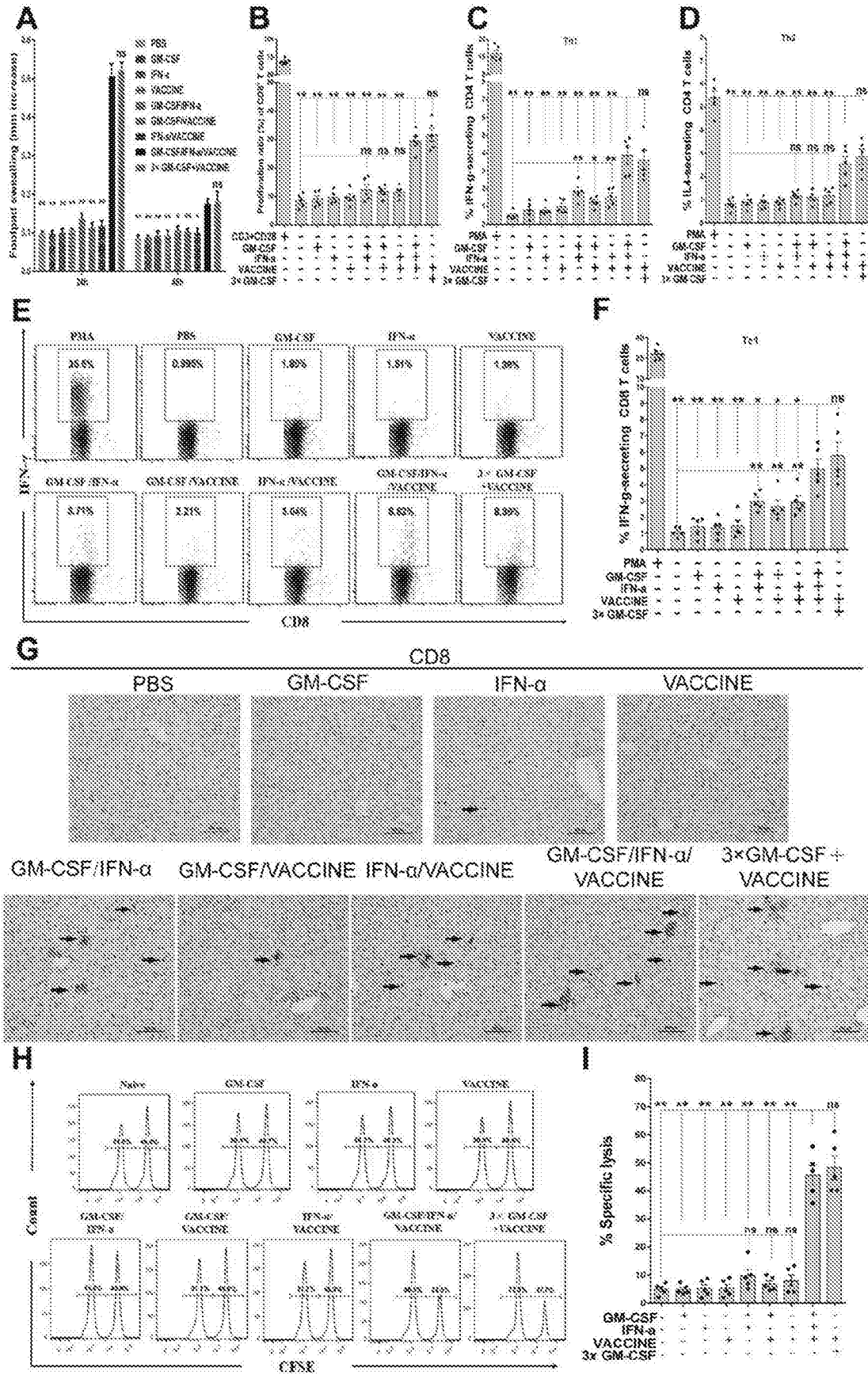


图17

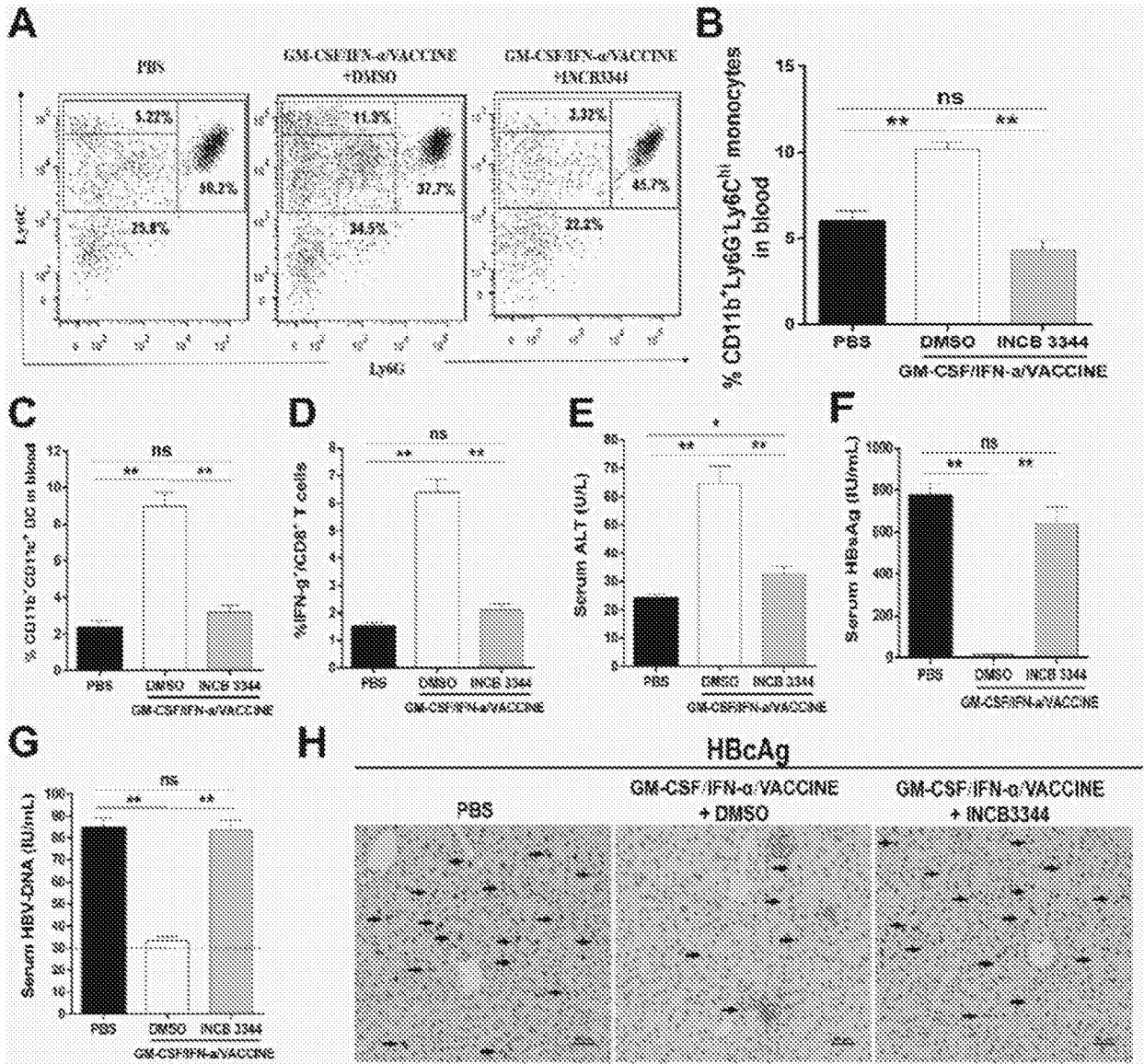


图19

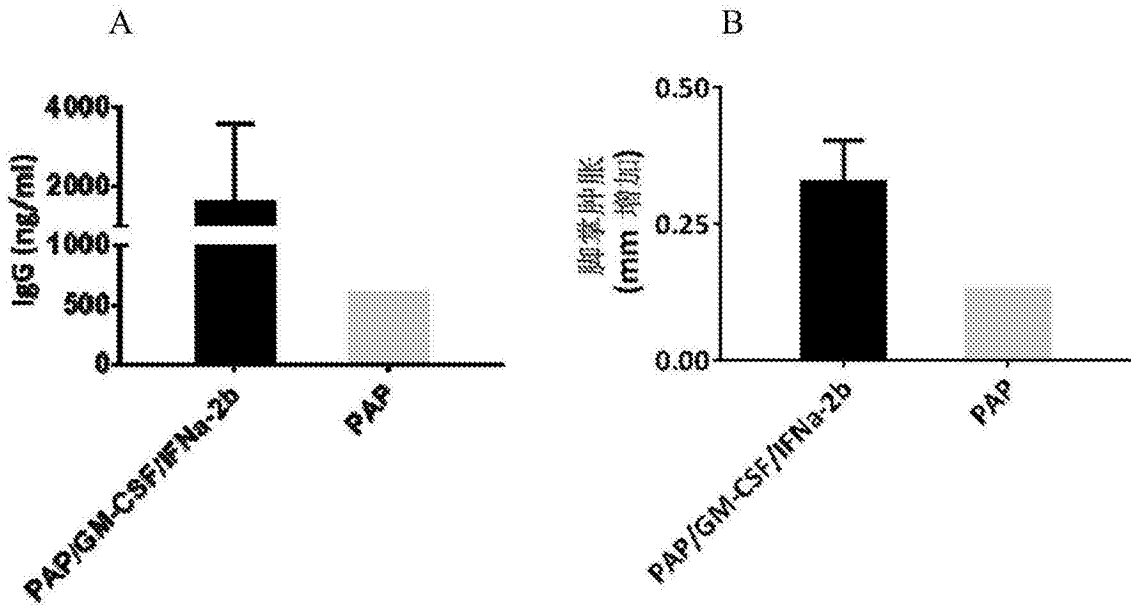


图20

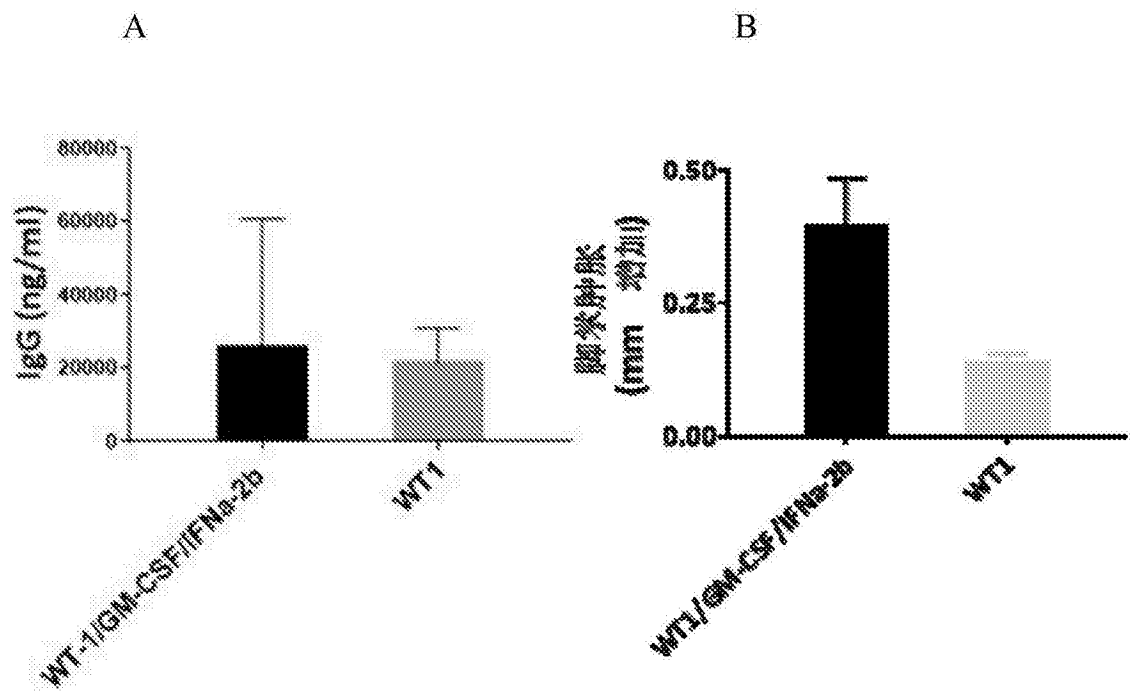


图21

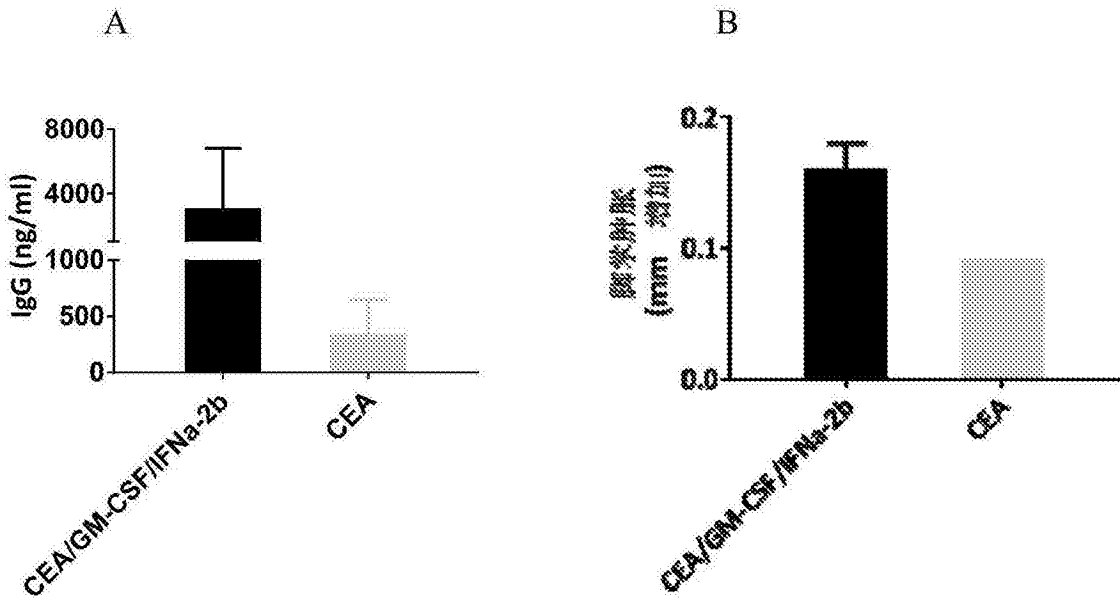


图22

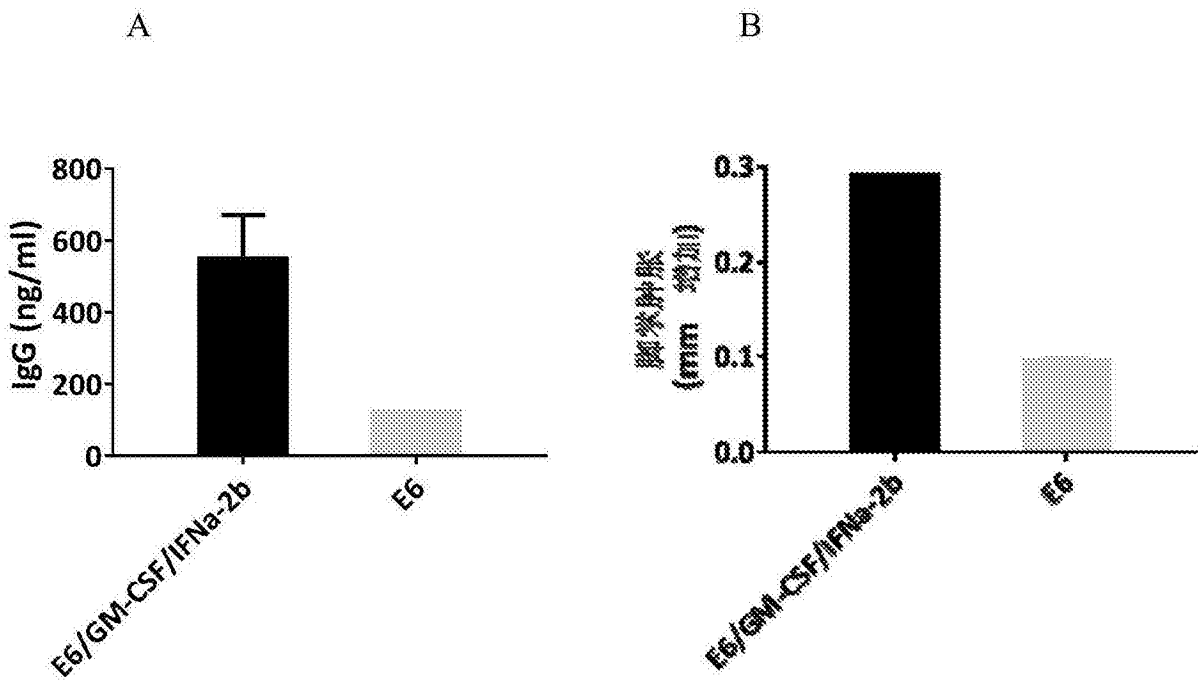


图23

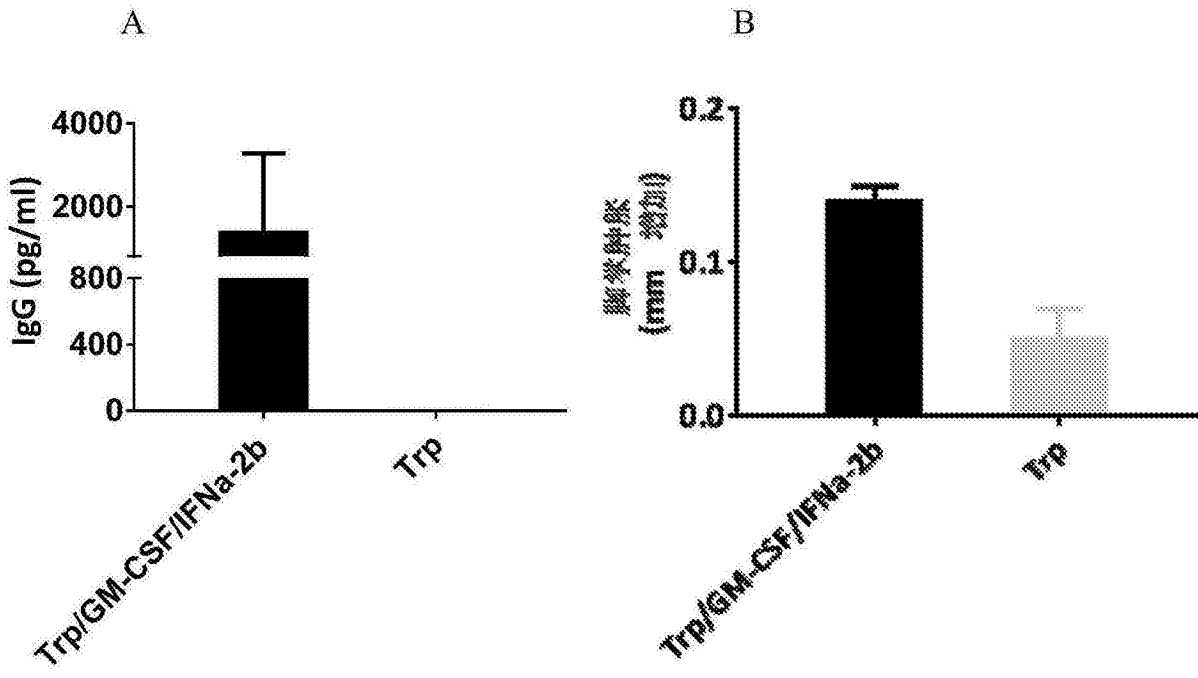


图24

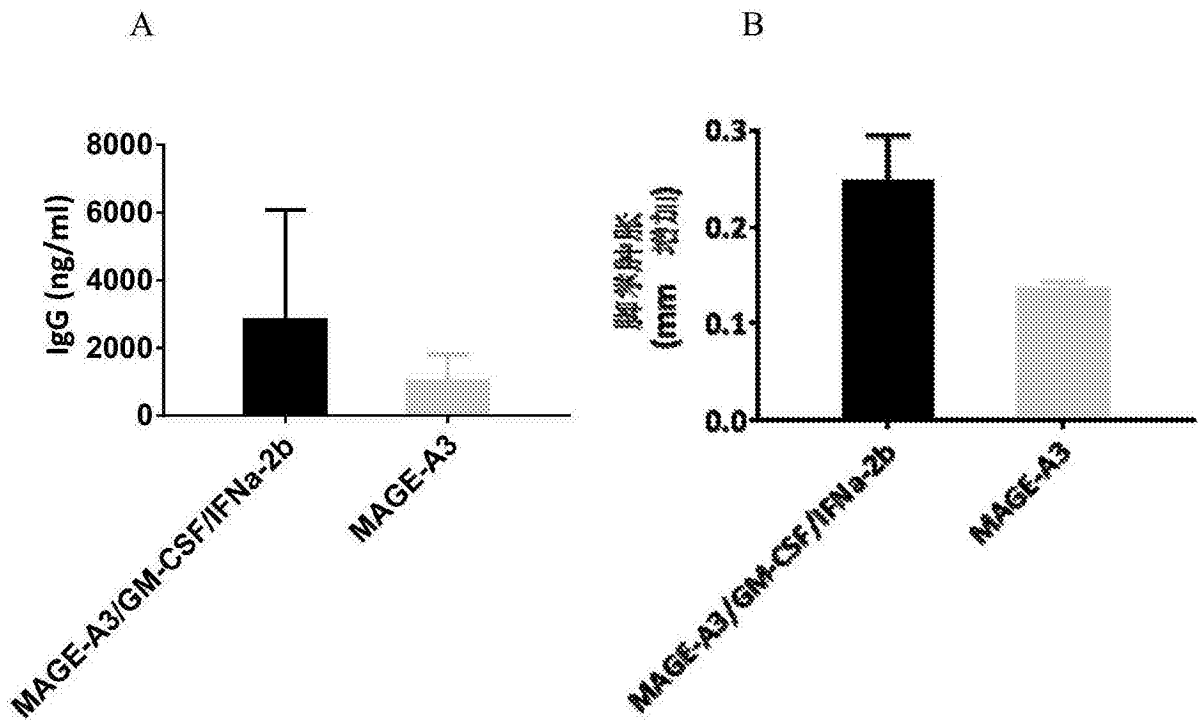


图25

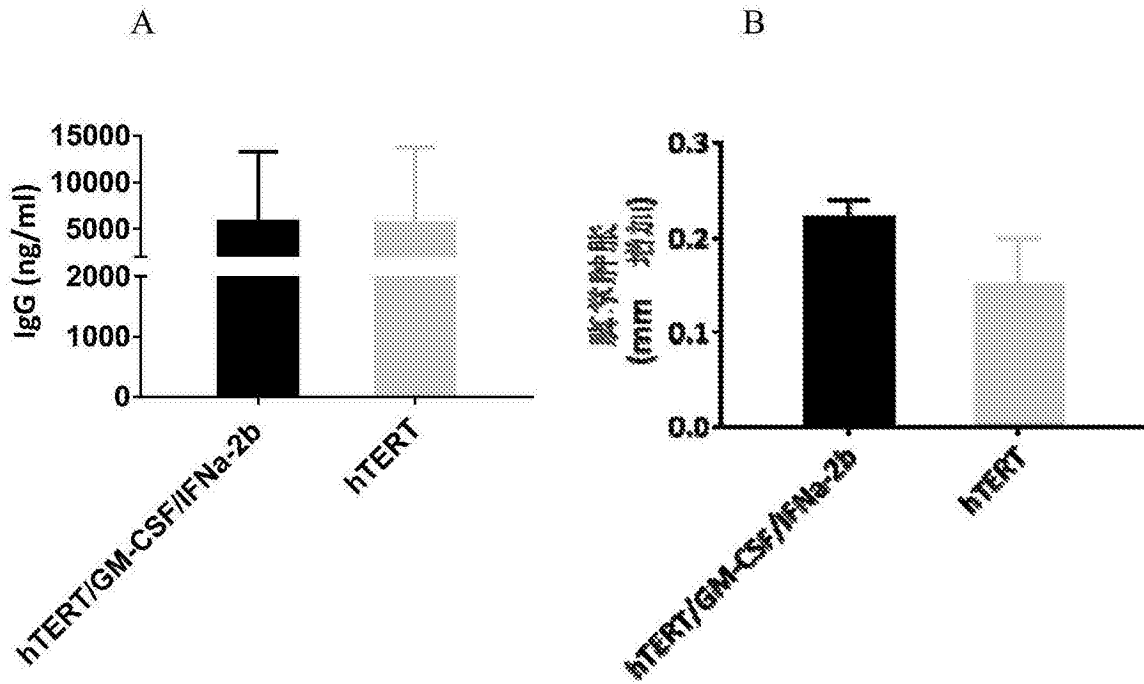


图26

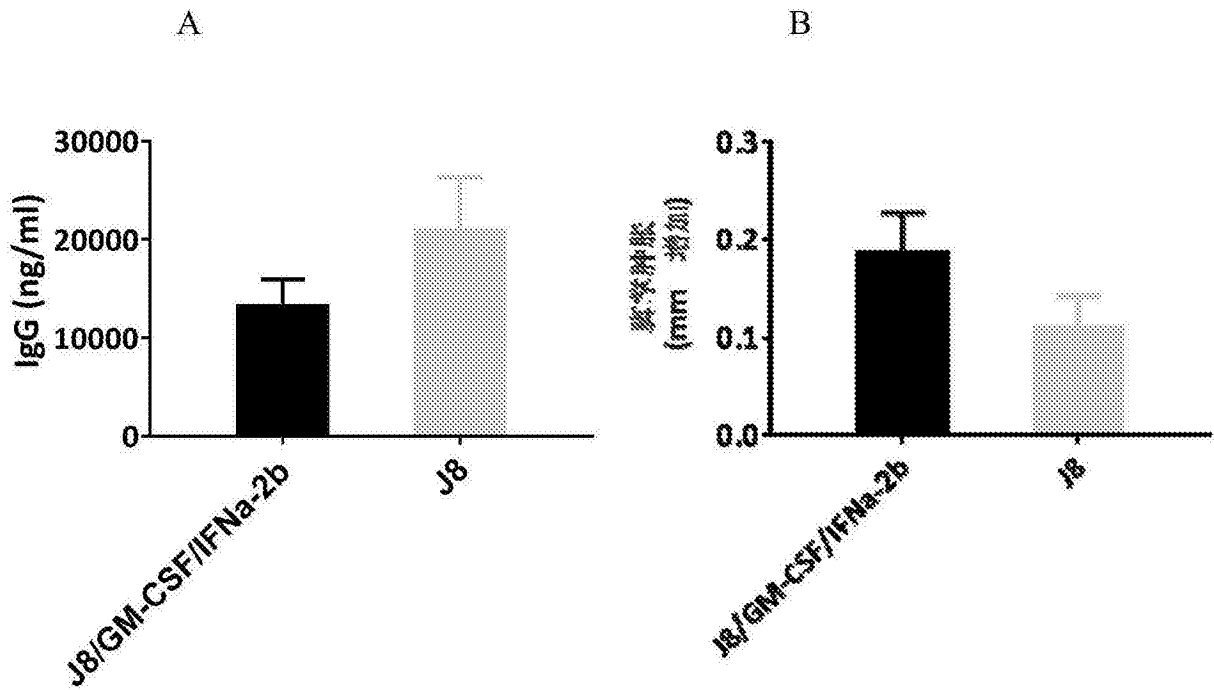


图27

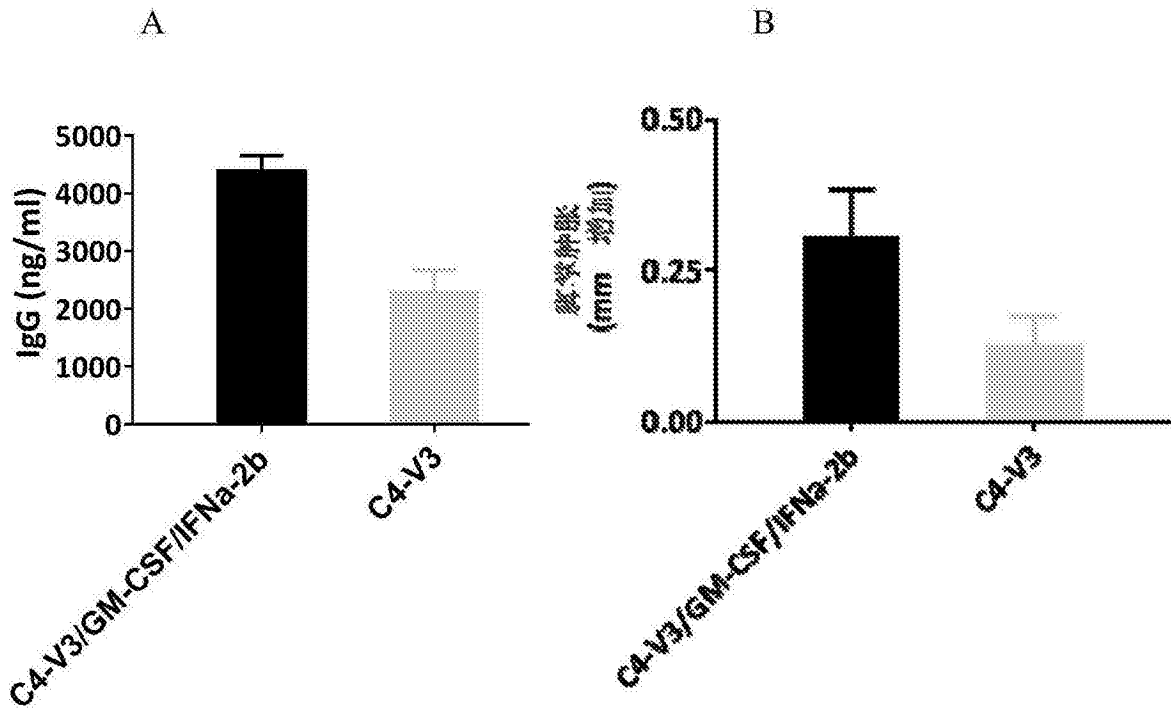


图28

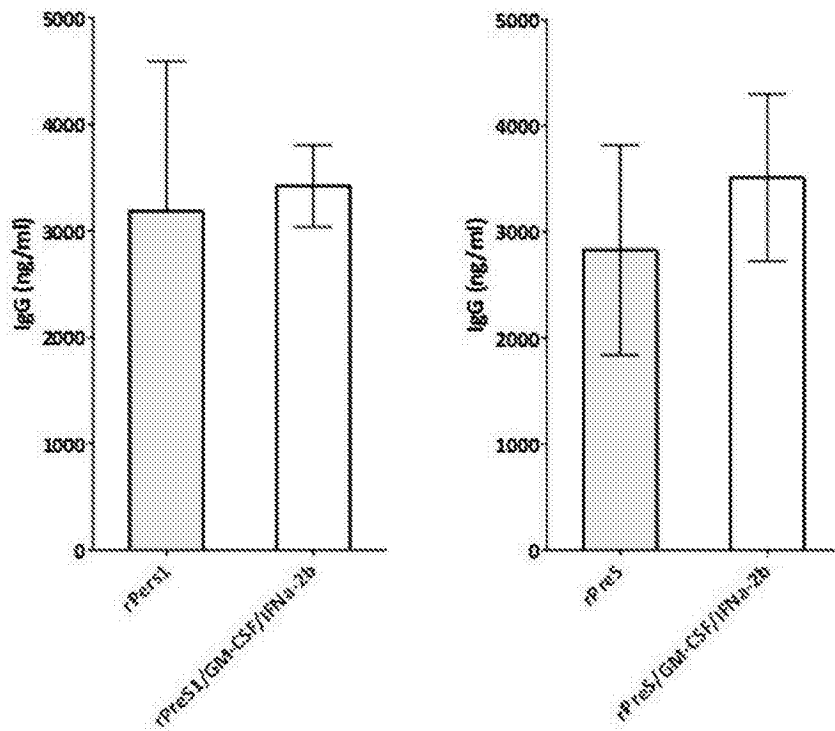


图29