



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **384**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **6 A61K 39/12**

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 97000475
(22) 29.11.1995
(31) 08/351,001
(32) 07.12.1994
(33) US
(46) Бюл. №34 (2), 2004
(72) РАЙЧАУДХУРИ Сиама (US), РЭСТЕТТЕР
Вилльям Х. (US)
(71)(73) АЙДЕК ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КОРПО-
РЕЙШН (US)
(56) 1. US 5234683, А 10.08.1993.
2. US 5114708, А, 19.05.1992.
3. Фонталин Л.Н., Певницкий Л.А. Иммуноло-
гическая толерантность. - М.: Медицина, 1978, с.
16-22.
(54) МИКРОФЛЮИДИЗИРОВАННАЯ КОМПО-
ЗИЦИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧНОГО

ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО Т-ЛИМФОЦИТНОГО
ИММУННОГО ОТВЕТА И ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(57) Изобретение относится к области иммуноло-
гии, в частности иммунотерапии. Для решения
данной задачи используют антиген папилломави-
руса, выбранного из группы антигенов HPV16 E6,
HPV16 E7, HPV18 E6, HPV18 E7, HPV6 E4, HPV6
L1, HPV11 E4 и HPV11 L1. Помимо антигена ком-
позиция может включать стабилизирующий детер-
гент, мицеллообразующий агент, биоразлагаемое и
биосовместимое масло. Композиция используется
для лечения цервикального рака, остроконечной
кондиломы. Использование композиции позволяет
повысить иммунный ответ на антиген папиллома-
вируса, 3 с, и 5 з.п.ф-лы. 6 табл., 19 ил.

Находящиеся на рассмотрении заявка США 08/919787, поданная 24 июля, 1992, и заявка США 07/735069, поданная 25 июля 1991, озаглавленные "Индукция цитотоксических Т-лимфоцитных иммунных ответов", Syamal Raychaudhuri и William H. Rastetter (в настоящее время аннулированные), включаются в качестве ссылки во всей их полноте в данное описание. Это изобретение относится к способам и композициям, полезным для индуцирования опосредованных цитотоксическими Т-клетками иммунных ответов у людей и домашних или сельскохозяйственных животных.

Считают, что цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛы) являются основным механизмом защитных сил организма в ответ на разнообразные вирусные инфекции и опухолевый или злокачественный рост. Эти клетки уничтожают инфицированные или трансформированные клетки распознаванием фрагментов антигенов в ассоциации с разнообразными молекулами (названы молекулами МНС класса 1) на инфицированных или трансформированных клетках. ЦТЛ можно индуцировать экспериментально цитоплазматической нагрузкой определенных растворимых антигенов в специфические клетки. Иммунизация только растворимым антигеном обычно недостаточна для индукции специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов.

Один способ, которым можно индуцировать иммунный ЦТЛ-ответ, включает использование способов рекомбинантной инженерии для введения критических компонентов рассматриваемого антигена в геном мягкого инфекционного агента. Целью такой стратегии является генерирование антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитных иммунных ответов на желаемый эпитоп путем введения хозяину слабой, самоограничивающейся инфекции. Были описаны химерные векторы с использованием коровьей оспы, вируса полиомиелита, адено- и ретровирусов, а также бактерий, например *Listeria* и БСЖ. Например, Takahashi et al., 85 Prog. Natl. Acad. Sci., USA 3105, 1988, описывают использование рекомбинантного вируса коровьей оспы, экспрессирующего ген белка в оболочке gr160 ВИЧ, в качестве возможного средства для индукции цитотоксических Т-лимфоцитов.

Второй способ, которым можно индуцировать опосредованный клетками иммунный ответ, включает использование адъювантов. Хотя в данной области знания продолжают дискуссии об использовании адъювантов, до сих пор неясно, были ли индуцирован иммунитет, опосредованный (медиированный) клетками, и включал ли такой медиированный клетками иммунитет цитотоксический Т-лимфоцитный иммунный ответ. Тем не менее, далее представляются разные публикации в этой области.

Stover et al. 361 Nature 456, 1991 (не допускается, чтобы эта работа была предшествующим уровнем данной заявки) описывает иммунный ЦТЛ-ответ на β -галактозидазу с использованием рекомбинантной бактерии БСЖ, содержащей ген β -

галактозидазы. Такой ответ не был обнаружен при использовании неполного адъюванта Фрейнда и β -галактозидазы.

Mitchell et al., 8 J. Clinical Oncology 856, 1990 (не допускается, чтобы эта работа рассматривалась как предшествующий уровень данной заявки) описывает лечение пациентов с метастатической меланомой адъювантом, названным "ДЕТОКС", и лизатами аллогенной меланомы, введенными пять раз в течение периода шести недель. У небольшой части пациентов наблюдали повышение цитотоксических Т-клеток. Авторы описывают потребность в повышении уровня продуцирования цитотоксических Т-лимфоцитов и предлагают комбинированную терапию адъювантом с интерлейкином-2, а также в качестве предварительного лечения циклофосфамидом для уменьшения уровня специфичных для опухоли Т-супрессорных клеток, которые могут иметь место. Детокс включает детоксицированный эндотоксин (монофосфориллипид А) из *Salmonella minnesota*, каркасы клеточных стенок *Mycobacterium phlei*, скваленное масло и эмульгатор.

Allison и Gregoriadis, 11, Immunology Today 427, 1990 (не допускается, чтобы эта работа была предшествующим уровнем данного изобретения) указывают, что единственным адъювантом, "разрешенным для использования" в вакцинах человека, являются алюминиевые соли (квасцы), которые не вызывают стойкого медиированного клетками иммунитета. Allison и Gregoriadis заявляют: "здесь имеется, следовательно, потребность в разработке адъювантов с эффективностью полного адъюванта Фрейнда, но без его различных побочных действий, например гранулем". Они продолжают заявлять, что существует три возможные стратегии, например использование липосом; использование адъювантов, названных иммуностимулирующими комплексами (ИСКОМы, которые включают сапонин или Квил А (Quil A) (тритерпеноид с двумя углеводными цепями), холестерин и фосфатидилхолин), которые авторизованы для использования в вакцине против гриппа для лошадей (Morein et al., Immunological Adjuvants and Vaccines, Plenum Press, 1953), и использование эмульсии (SAF) сквалена или сквалана (с плуроновым средством или без него) и мурамилдипептида (МДП). Говорят, что SAF вызывает медиированный клетками иммунитет у мышей, хотя "считали, что субъединичные антигены не могут вызывать цитотоксические Т-клеточные (ЦТЛ) иммунные реакции".

Takahashi et al., 344 Nature 873, 1990, описывают рестриктированный помощник (класса 11) и цитотоксическую Т-лимфоцитную индукцию путем использования ИСКОМов в однократной подкожной иммунизации у мышей. Они заявляют, что адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда и забуференный фосфатом соляной раствор не индуцируют цитотоксическую Т-лимфоцитную активность против мишеней, в которых они были заинтересованы. Они заявляют, что, в противополож-

ность результатам с другими формами экзогенного растворимого белкового антигена, ими показано, что возможно примировать антигенспецифические МНС (класса I)-рестриктированные CD8⁺ CD4⁻ ЦТЛ иммунизацией экзогенным интактным белком, используя ИСКОМЫ. Они заявляют также, что описанные эксперименты допускают, что возможно вызывать индукцию ЦТЛ человека использованием ИСКОМов, содержащих белки ВИЧ, и что с использованием вакцин на основе ИСКОМов можно достичь долго достигаемой цели, т.е. индукции как ЦТЛ, так и антител очищенным белком.

Byars и Allison. 5 Vaccines 223, 1987, описывают использование SAF-I, который включает твин 223, плуроник L121 и сквален или сквалан с мурамилдипептидом или без него, и предполагают, что их данные указывают на то, что композиция с мурамилдипептидом будет полезна для приготовления человеческих и ветеринарных вакцин. Бустер-инъекции адьюванта вводили без мурамилдипептида. Говорят, что мурамилдипептид значительно повышает продуцирование антител по сравнению с использованием адьюванта без мурамилдипептида. Медиированный клетками иммунитет измеряли как гиперчувствительность замедленного типа кожными тестами для определения индукции Т-клеток-хелперов. Такая гиперчувствительность была сильнее и более отсроченная, когда мурамилдипептид присутствовал в адьюванте. Аналогичные адьюванты описываются Allison et al., патент США 4770874 (где заявляется, что комбинация мурамилдипептида и плуронового полиола существенна для вызывания сильной медиированной клетками и гуморальной иммунной реакции против яичного альбумина); Allison et al., патент США 4772466; Murphy-Corb et al., 246, Science 1293, 1989 (где указано, что использование комбинированных адьювантов с мурамилдипептидом может повысить индукцию как гуморального, так и клеточного плеч иммунного ответа); Allison и Byars, 87, Vaccines 56, 1987 (где указано, что медиированный клетками иммунитет вызывается SAF (с мурамилдипептидом), как показано гиперчувствительностью замедленного типа, пролиферативными ответами Т-клеток на антиген, продуцированием интерлейкина-2 и специфическим генетически рестриктированным лизисом клеток-мишеней, несущих иммунизирующий антиген); Allison и Byars, Immynopharmacology of Infections Diseases: Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-Specific Resistance 191-201, 1987; Morgan et al., 29 J. Medical Virology 74, 1989; Kenney et al., 121 J. Immynological Methods 157, 1989; Allison и Byars, 95 J. Immynological Methods, 157, 1986 (где было показано, что эмульсии алюминиевых солей и минерального масла повышают образование антител, но не медиированный клетками иммунитет, и было показано, что композиции мурамилдипептида вызывают медиированный клетками иммунитет); Byars et al. 8 Vaccine 49, 1990 (не допускается, чтобы эта работа была предшествующим уровнем заявки), где указано, что их композиция адьюванта

заметно повышает гуморальный иммунный ответ и в меньшей степени усиливает медиированные клетками иммунные ответы на гемагглютининовый антиген гриппа); Allison and Byars, 28 Molecular Immynology 279, 1991 (не допускается, чтобы эта работа была предшествующим уровнем заявки); которые заявляют, что функцией мурамилдипептида является индуцирование экспрессии цитокинов и повышение экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), и что получали лучшие клеточные ответы и ответы антител, чем с другими адьювантами; и что они надеются выяснить, эффективна ли аналогичная стратегия для людей); Allison and Byars, Technology Advances in Vaccine Development 401. 1988 (которые описывают медиированный клетками иммунитет с использованием SAF); Epstein et al., 4 Advance Drug Delivery Reviews 223, 1990 (которые дают обзор разных адьювантов, используемых для получения вакцин); Allison and Byars, 95 J. Immynological Methods 157, 1986 (которые заявляют, что добавление мурамилдипептида к адьюванту заметно повышает медиированные клетками иммунные ответы на различные антигены, включая моноклональные иммуноглобулины и вирусные антигены); и Morgan et al., 29 J. Medical Virology 74, 1989 (которые описывают использование SAF-I для получения вакцины для вируса Эпштейн-Барра).

Kwak et al., Idiotypе Networks in Biology and Medicine. Elsevier Science Publisher, p. 163, 1990 (не допускается, чтобы эта работа была предшествующим уровнем заявки) описывают использование SAF без мурамилдипептида в качестве адьюванта для идиотипа В-клеточной лимфомы у человека. В частности, эмульсию плуроника 1-121, сквалана и 0,4% твина 80 в забуференном фосфатом солевом растворе вводили с идиотипом. Они заявляют, что "добавление адьюванта должно далее повышать... гуморальные иммунные ответы и, кроме того, может облегчить индукцию клеточных иммунных ответов".

Другие иммунологические препараты включают липосомы (Allison et al., патенты США 4053585 и 4117113); Циклические пептиды (Dreesman et al., патент США 4778784); полный адьювант Фрейнда (Asherson et al., 22 Immynology 465, 1972; Berman et al., 2 International J. Cancer 539, 1967; Allison, 18 Immynopotiation 73, 1973; and Allison, Non specific Factors Influencing Host Resistance 247, 1973); ИСКОМЫ (Letvin et al., 87 Vaccines 209. 1987); адьюванты, содержащие не-ионные блок-сополимерные агенты, образованные с минеральным маслом, поверхностно-активное вещество и твин 80 (Hunter and Bennett, 133 J. Immunology 3167, 1984; and Hunter et al., 127 J. Immunology 1244, 1981); адьюванты, составленные из минерального масла и эмульгирующего средства с убитыми микобактериями или без них (Sanchez-Pescador et al., 141 J. Immunology 1720, 1988) и другие адьюванты, такие как липофильное производное мурамилтрипептида и мурамилдипептида,

ковалентно конъюгированный с рекомбинантным белком (id.).

Краткое изложение существа изобретения

Заявитель обнаружил безопасный и выгодный способ и композиции, которыми у людей и домашних или важных для сельского хозяйства животных можно индуцировать иммунный ЦТЛ-ответ. Способ включает использование антигенной композиции, которая слаботоксична или нетоксична для животных и не содержит иммуностимулирующего пептида (например мурамилдипептида), присутствие которого будет понижать желаемый клеточный иммунный ответ. Кроме того, эта методология проста в использовании и не требует экстенсивной работы *in vivo* для изменения существующих клеточными способами рекомбинантной ДНК, чтобы сделать их более антигенными. Это открытие неожиданное, поскольку не ожидали, что такие иммунные ЦТЛ-ответы могут быть индуцированы путем использования такой антигенной композиции, не содержащей иммуностимулирующих пептидов или их эквивалентов. Открытие заявителя позволяет использовать такие антигенные композиции при болезненных состояниях широкого спектра или в качестве профилактического средства. Введение такой антигенной композиции можно использовать, например, для лечения вирусных болезней, в которых важен иммунный ЦТЛ-ответ, например при лечении инфекции ВИЧ или гриппа; использование ее можно также расширить до использования при лечении бактериальных инфекций, рака, паразитарных инфекций и тому подобных. В качестве профилактического средства антигенная композиция, комбинированная с подходящим антигеном, полезна для предупреждения инфекции вирусами, ответственными за вышеуказанные вирусные болезни, в частности профилактики ВИЧ-инфекции, а также для профилактики пациентов с риском рака, например после резекции первичной опухоли.

Таким образом, первым аспектом изобретения является представление способа индукции иммунного ЦТЛ-ответа у человека или домашнего (например кошки или собаки) или важного для сельского хозяйства животного (например козы, коровы или свиньи) к антигену, отличному от антигена В-клеточной лимфомы или яичного альбумина. Способ включает стадии получения антигена, для которого желателен иммунный ЦТЛ-ответ, и получения нетоксичной антигенной композиции, которая включает стабилизирующий детергент, мицеллообразующий агент и биоразрушаемое и биосовместимое масло или состоит или по существу состоит из этих компонентов. Эта антигенная композиция предпочтительно не содержит иммуностимулирующий пептидный компонент или имеет достаточно низкий уровень такого компонента, чтобы не уменьшился требуемый клеточный иммунный ответ. Эту композицию предпочтительно предоставляют в виде стабильной эмульсии типа масло-в-воде. То есть каждый из различных компонентов выбирают так, чтобы эта эмульсия оставалась

в состоянии эмульсии в течение периода по меньшей мере одного месяца, предпочтительно в течение более чем одного года, без разделения фаз. В этом способе антиген и антигенную композицию смешивают для образования смеси (предпочтительно микрофлюидизацией) и эту смесь вводят животному в количестве, достаточном для индуцирования иммунного ЦТЛ-ответа у этого животного. Такое введение требуется проводить только один раз.

Термин “стабилизирующий детергент” означает детергент, который позволяет компонентам эмульсии сохраняться в виде стабильной эмульсии. Такие детергенты включают полисорбат, твин 80 (сорбитам-моно-9-октадеканеат-поли(окси-1,2-этандинил; производимый ICI Americas, Wilmington, DE), твин 40, твин 20, твин 60, цвиттергент 3-12, типол HB7 и спан 85. Эти детергенты обычно применяют в количестве приблизительно 0,05-0,5%, предпочтительно около 0,2%.

Термин “мицеллообразующий агент” обозначает агент, который способен стабилизировать эмульсию, образованную с другими компонентами, так чтобы образовывалась мицеллоподобная структура. Такие агенты предпочтительно вызывают некоторое раздражение в месте инъекции, чтобы привлечь макрофаги для повышения клеточного иммунного ответа. Примеры таких агентов включают полимерные поверхностно-активные вещества, описанные в публикациях BASF Wyadotte, например Schmolka, 54 J. Am. Oil. Chem. Soc., 110, 1977, и Hunter et al. 129 J. Immunol. 1244, 1981, причем обе эти публикации включены в качестве ссылки, плуроник L62LF, Lid и L64, ПЭГ1000 и тетроник 1501, 150R1, 701, 901 1301 и 130R1. Химические структуры таких агентов хорошо известны в данной области. Предпочтительно выбирают агент, который имеет гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) между 0 и 2, как определено Hunter and Bennett, 133 Journal of Immunology 3167, 1984. Этот агент предпочтительно применяют в количестве от 0,5 до 10%, предпочтительно в количестве от 1,25 до 5%.

Выбирают масло, которое промотирует удержание антигена в эмульсии масло-в-воде, то есть обеспечивает носитель для требуемого антигена, и предпочтительно имеет температуру плавления менее чем 65 °C. так что эмульсия образуется либо при комнатной температуре (около от 20 до 25 °C), либо один раз температуру эмульсии снижают до комнатной температуры. Примеры таких масел включают сквален, сквалан, эйкозан, тетратетракантан, глицерин и арахисовое масло или другие растительные масла. Масло предпочтительно применяют в количестве от 1 до 10%, наиболее предпочтительно от 2,5 до 5%. Важно, чтобы масло было биоразлагаемым и биосовместимым, так чтобы организм мог разрушать масло в течение некоторого времени и чтобы при использовании такого масла не были очевидными отрицательные действия, например гранулемы.

В указанной выше композиции важно, чтобы в ней не содержался пептидный компонент, в особенности мурамилдипептид (МДП). Такой пептид будет мешать индукции иммунного ЦТЛ-ответа, если он присутствует в количестве, большем, чем около 20 микрограмм, на одно обычное введение композиции человеку. Предпочтительно, чтобы такие пептиды полностью отсутствовали в антигенной композиции, несмотря на их очевидную стимуляцию гуморального компартмента иммунной системы. То есть заявитель нашел, что, хотя такие пептиды могут усиливать гуморальную иммунную реакцию, они невыгодны, когда требуется цитотоксический Т-лимфоцитный иммунный ответ.

Другие связанные аспекты изобретения заключаются в том, что антигенную композицию образуют только из двух из указанных выше трех компонентов и используют с любым требуемым антигеном (этот термин включает белки, полипептиды и их фрагменты, которые иммуногенные), за исключением яичного альбумина (или других альбуминов, например человеческого сывороточного альбумина (HSA), бычьего сывороточного альбумина (BSA) и овальбумина (OVA), для индукции иммунного ЦТЛ-ответа у указанных выше животных или людей.

Заявитель считает, что указанные выше композиции значительно выгоднее, чем предшествующие композиции (включая ИС-КОМЫ, детокс и SAF) для использования для людей. В отличие от таких композиций данная композиция как включает мицеллообразующий агент, так и не имеет пептидов, каркасов клеточных стенок или компонентов бактериальных клеток. Данная композиция также индуцирует иммунный ЦТЛ-ответ, который либо не имеет место при использовании предшествующих композиций, либо значительно повышается по сравнению с этими композициями.

Термин "нетоксичный" означает, что наблюдается слабое побочное действие антигенной композиции или не наблюдается такого действия у обработанного такой композицией животного или человека. Обычные специалисты в области медицины или ветеринарии должны признать, что этот термин имеет широкое значение. Например, по существу, у здорового животного или человека может допускаться только слабая токсичность, тогда как у человека, страдающего от иммунной болезни, может допускаться значительно более высокая токсичность.

В предпочтительных воплощениях антигенная композиция состоит, по существу, из двух или трех компонентов: детергента, агента и масла, и способ состоит, по существу, в однократном введении смеси (антиген плюс антигенная композиция) человеку или животному, человека или животного инфицируют вирусом и он страдает от одного или нескольких симптомов (обычно определяемых врачами в соответствующей области) инфекции вирусом, и антигенная композиция нетоксична для человека или животного.

В других предпочтительных воплощениях антиген выбирают из антигенных частей ВИЧ-антигенов: gp160, gag, pol, Nef, Tat и Rev; антигенов малярии: белка спорозойта (CS) и поверхностного белка 2 спорозойта; поверхностных антигенов гепатита В: Pre-S1, Pre-S2, HBe Ag и HBe Ag, антигенов гриппа: HA, NP и NA; поверхностных антигенов гепатита А, антигенов вируса герпеса: gp340 EBV, gp85 EBV, gB HSV, gD HSV, gH HSV, раннего белкового продукта HSV, антигенов вируса папилломы человека (например HPV-антигенов, таких как антигены L1, E4, E6, E7, в частности антигенов E6 и E7 из HPV16 и 18, двух наиболее обычных типов HPV, связанных с цервикальной карциномой. E4 и L1, полученных из HPV6 и HPV11, двух наиболее обычных типов HPV, связанных с остроконечной кондиломой; антигена предстательной железы, gB цитомегаловируса, gH цитомегаловируса и белка gP72 IE; антигенов респираторно-синцитиального вируса: белка F, белка G и белка N; и опухолевых антигенов карциномы СЕА, связанной с муцином карциномы, P21 карциномы, P53 карциномы, MPG меланомы, p97 меланомы и онкогенного продукта Neu карциномы, продукта гена p53 карциномы, антигена меланомы, названного MAGE и мутированного белка p21 ras, присутствующего в различных злокачественных опухолях.

В другом аспекте изобретение характеризуется композицией, содержащей, состоящей или по существу состоящей из антигена, смешанного с описанной выше композицией, и антиген выбирают из перечисленных антигенных частей.

В другом близком аспекте изобретение характеризуется способами лечения пациента, инфицированного ВИЧ-вирусом, страдающего малярией, страдающего гриппом, страдающего гепатитом, страдающего раком, инфицированного вирусом герпеса, страдающего цервикальным раком, страдающего остроконечной кондиломой (остроконечные бородавки) или инфицированного респираторно-синцитиальным вирусом, введением композиции, включающей подходящий антиген (например, выбранный из перечисленных выше антигенов), смешанный с одной из выше указанных композиций антигена. Эти антигены и способы лечения с их использованием являются только примерными антигенами, которые можно использовать в антигенных композициях-объектах данного изобретения.

Другие признаки и преимущества данного изобретения будут очевидными из следующего описания предпочтительных воплощений его и из формулы изобретения.

Описание предпочтительных воплощений

Сначала будут кратко описаны чертежи.

Фиг. 1a-1c и 4a-4c являются графическими представлениями данных, сравнивающих индукцию ЦТЛ различными композициями овальбумина; Е:Т представляет отношение эффектора к мишени на всех чертежах.

Фиг. 2а и 2б являются графическими представлениями данных, сравнивающих индукцию ЦТЛ разными композициями р-галактозидазы.

Фиг. 3 является графическим представлением данных, сравнивающих индукцию ЦТЛ овальбумином в липосоме и в антигенной композиции.

Фиг. 5 и 6 являются графическими представлениями данных, показывающих влияние истощения клеток CD4 и CD8 на индукцию ЦТЛ.

Фиг. 7 является графическим представлением данных, показывающих индукцию ЦТЛ белком gp120.

Фиг. 8 является графическим представлением данных, показывающих индукцию ЦТЛ смесью плуроника и твина и антигена.

Фиг. 9 является графическим представлением данных, показывающих индукцию ЦТЛ смесью сквалана и плуроника и антигена.

Фиг. 11 является графическим представлением влияния овальбумина (ова) с разными антигенными композициями на иммунный ЦТЛ-ответ.

Фиг. 12 является графическим представлением индукции антител против gp120mb у обезьян различными антигенными композициями.

Фиг. 13 изображает противоопухолевую активность клеток НОРЕ2 через десять дней после одной иммунизации растворимым белком Е7 в адьюванте.

Фиг. 14 изображает противоопухолевую активность клеток НОРЕ2 на 10, 19 день после двух иммунизаций растворимым белком Е7 в адьюванте.

Антигенная композиция

Антигенные композиции, полезные в этом изобретении, в общих чертах описываются выше. Специалисты в данной области должны признать, что эквивалентные композиции легко получаются и, как можно ожидать, имеют эквивалентные свойства в индукции иммунного ЦТЛ-ответа. Такие композиции легко испытывать на их свойства с использованием методик, эквивалентных методикам, описанным в приведенных ниже примерах.

Здесь даются примеры изобретения с использованием антигенной композиции (АК), состоящей из около 2,5% сквалана, 5% плуроновой кислоты и твина 80 в забуференном фосфатом солевом растворе. В частности, эмульсия АК включала: 15 мг сквалана, 37,5 мг полоксамера 401 (плуроник L121), 6 мг полисорбата 80 (твин 80), 0,184 мг хлорида калия, 0,552 мг первичного кислого фосфата калия, 7,36 мг хлорида натрия, 3,3 мг вторичного кислого фосфата натрия (безводного) на 1 мл воды, рН 7,4. Эту эмульсию микрофлюидизировали, используя стандартные способы (модель M110F Microfluidics) с модулем обратного давления при 0,773-0,984 атм с постепенным возвращением к атмосферному давлению, охлаждение и упаковку в мокрый лед.

В других примерах антиген смешивали с микрофлюидизированной смесью сквалана (С), плуроника (П) и твина 80 (Т) для достижения конечной концентрации 0,2% твина 80, 1,25% плуроника и

5% сквалана соответственно. Для определения субкомпонентов, необходимых для индукции антигенспецифичного иммунного ответа, получали смеси сквалан-твин 80, плуроник-твин 80 или сквалан-плуроник с такой же концентрацией, как и для трехкомпонентной смеси. Плуроник, сквалан или твин 80 готовили также индивидуально для определения влияния индивидуального компонента на индукцию ЦТЛ. Проводили также замену твина 20, твина 40 или цвиттергента на твин 80 для определения влияния разных производных твина на индукцию ЦТЛ в ова-системе. Сквалан в трехкомпонентной композиции заменяли на эйкозан или триаконтан и сополимерный плуроник в такой же трехкомпонентной системе заменяли на ПЭГ- 1000, плуроник L62LF и тетроники 1501 и 150R1. В качестве двухкомпонентных композиций разные аналоги в разных комбинациях смешивали и испытывали на ова-специфическую индукцию ЦТЛ. Они являются смесью холестерин-твин 80, сквалан-твин 20, пристан-твин 80 или оливковое масло-твин 80. Для изучения стабилизации микрофлюидизированную смесь сквалан-твин 80 смешивали с декстрозой до конечной концентрации 5%. Во всех случаях комбинации наполнителей смешивали в микрофлюидизаторе для получения стабильной эмульсии. В некоторых экспериментах двухкомпонентные композиции смешивали с разными концентрациями МДП для индукции иммунного ЦТЛ-ответа и гуморального иммунного ответа. В таблице 1 приводится исчерпывающий список различных композиций, используемых в этом исследовании.

Композицию адьюванта синтекс (микрофлюидизированная; SAFm) использовали в качестве адьювантного контроля, она состоит из двух частей. Часть I состоит из забуференного фосфатом солевого раствора, содержащего как конечную концентрацию 5% сквалана, 1,25% плуроника и 0,2% твина 80 (наполнитель или I-SAF). Часть II состоит из N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамина (Thr-МДП), производного компонента стенок клеток микобактерий. Для целей иммунизации антиген смешивают с микрофлюидизированным наполнителем (часть I) для получения гомогенной эмульсии. В приготовленную микрофлюидизированную композицию адьюванта синтекс (SAFm) добавляют МДП и смесь недолго интенсивно перемешивают. Концентрацию МДП в смеси изменяют для определения, была ли достигнута оптимальная его концентрация для ЦТЛ-индукции. В качестве адьювантного контроля мышей также иммунизировали растворимыми антигенами, смешанными с квасцами в соответствии с инструкцией производителя (Pierce Chemical, Rockford, IL) или с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ).

Эту композицию антигена используют для индукции цитотоксического Т-лимфоцитного иммунного ответа у мышей. Обычные специалисты в данной области должны признать, что такая мышинная модель является показателем того, что эквивалентные эксперименты или способы лечения будут подобным образом индуцировать цитотоксический

Т-лимфоцитный иммунный ответ у людей, домашних или сельскохозяйственных животных. Количество композиции антигена и антигена, полезное для продуцирования желательной клеточного иммунного ответа можно определить эмпирически стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области, без дополнительного экспериментирования. Таким образом, если желательно снизить до минимума побочное действие при лечении такой смесью, специалисты в данной области могут определить минимальный уровень такой смеси для введения человеку, домашнему или сельскохозяйственному животному для вызывания иммунного ЦТЛ-ответа и, таким образом, индуцирования иммунитета к желаемому антигену. При обычном использовании такую смесь нужно инъектировать любым одним из ряда стандартных методов, но, в частности, предпочтительна локальная внутримышечная инъекция, которая позволит эмульсии оставаться в стабильной форме в течение периода нескольких дней или нескольких недель.

Способы

В представленных ниже примерах использовали следующие материалы и способы, если нет других указаний:

Мыши

Самок мышей C57B/6 (H-2^d) и BALB/c (H-2^d) покупали у Harlan Sprague (San Diego, California).

Антигены

Овальбумин (ова, сорт VII, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) использовали в нативной форме, β-галактозидазу (β-гал, сорт VIII; BRL) использовали в нативной форме и после кипячения в 1 М NaOH в течение 2 мин для проведения щелочного гидролиза. Рекомбинантный gp120 покупали у American Biotechnology.

Опухолевые клетки и трансфектанты

Использованные опухолевые клетки были Ia-линиями EL4 (C57BL/6, тимомы H-2^b) и P815 (DBA/2, мастоцита H-2^d). Получение производного ова-продуцирующего трансфектанта EL4, EG7-ова, описано ранее Moore et al., 54 Cell 777, 1988.

β-Гал-продуцирующий трансфектант, P13.1, получали электропорацией 10⁷ P815-клеток в 1 мл забуференного фосфатом соляного раствора с 10 мг линеаризованного при помощи PstI pCH110 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) и 1 мг линеаризованного при помощи PvuII pSV2 neo (Southern et al. 1 J. Mol. Appl. Genet. 327, 1982) с последующей селекцией в 400 мкг/мл антибиотика G418. C3-4-Трансфектант получали из гибридомы IgM 662 BALB/c трансфекцией плазмидой, кодирующей ген β-гал, слитый с третьим и четвертым экзоном тяжелой цепи IgM (Rammensee et al., 30 Immunogenetics 296, 1989). Фибробласт 3T3, экспрессирующий gp160IIb, 15-12, был получен Dr. Germain NIH (Bethesda, MD). К^b-трансфектированная L-клеточная линия была

предоставлена Dr. Carbone, Monash University, Australia. D^d и L^d-трансфектированные L-клеточные линии были предоставлены Dr. Ted Hensen, Washington University, St. Louis.

Иммунизация

Мышей иммунизировали внутривенно 200 мкл суспензии 25•10⁶ спленоцитов после цитоплазматической загрузки, как описано Moore et al., смотри выше, и Carbone et al. J. Exp. Med. 169:603, 1989). Для иммунизации композицией ова-антиген или композицией β-гал-антиген 30 мкг каждого белкового антигена инъектировали каждой мышке подкожно в подушечку лапы и основу хвоста. Каждая инъекция состояла из 67 мкл микрофлюидизированной антигенной композиции (приготовлена в соответствии со стандартными способами) и 30 мкг белкового антигена в конечном объеме 200 мкл. Конечный объем устанавливали при помощи CCPX (сбалансированный солевой раствор Хенка), смотри руководство Whittaker (Welkersville, MD). МДП вводили в концентрациях от 0 до 300 мкг. Там, где сообщается, мышей иммунизировали растворимыми антигенами в ПАФ или квасцах в общем объеме 200 мкл.

Стимуляция *in vitro* популяций клеток-эффекторов

Клетки селезенки (30•10⁶) нормальных или иммунизированных мышей, которые были примированы по меньшей мере за 14 дней ранее, инкубировали с 1,5•10⁶ EG7-ова (облученные 20000 рад) для ова-иммунных ответов или с 1,5•10⁶ C3-4-клетками (облученные 20000 рад) для иммунного β-гал-ответа в планшетах на 24 лунки при 37°C в среде 7% CO₂/воздух. Все культивирования тканей выполняли в полной среде, состоящей из среды Дульбенко, модифицированной по способу Исков (IMDM), смотри Whittaker Manual (Welkersville, MD), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FSC), 2 mM глутамина, гентамицином и 2•10⁻⁵ М 2-меркаптоэтанола. Для экспериментов с истощением *in vitro* праймированные *in vivo* или стимулированные *in vitro* клетки селезенки обрабатывали моноклональными антителами (mAbs) RL.172 (анти-CD4) или mAbs 3,168 (анти-CD8) для удаления CD4⁺ или CD4⁺-Т-клеток (Sarmiento et al., 125 J. Immunol. 2665, 1980, and Ceredig et al., 314 Nature 98, 1985). mAb RL.172 и mAb 3,168 получали от Dr. Jonathan Sprent et Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA.

Клетки селезенки (30•10⁶) нормальных или иммунизированных мышей, которые были праймированы по меньшей мере за 21 дней ранее, инкубировали с 1,5•10⁶ клетками 15-12 (обработанные 200 мкг митомицина С в течение 45 минут на 10⁸ клеток) или с

500 мкг пептида 18Пb, содержащего доминантный эпитоп ЦТЛ в мышцах Balb/c, в полной IMDM-среде (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), содержащей 10% предварительно подвергнутой скринингу FCS (ICN Flow; ICN Biochemicals, Inc., Costa Mesa, CA), 2 mM глутамина, гентамицина и

$2 \cdot 10^5$ М 2-меркаптоэтанола. Для стимуляции *in vitro* пептидами клетки селезенки культивировали в полной IMDM-среде, содержащей 5% супернатанта конканавалина А (ConA).

Для экспериментов с истощением праймированные *in vitro* или стимулированные *in vitro* клетки селезенки обрабатывали mAbs RL.172 (анти-CD4) или mAbs 3.168 (анти-CD8) в присутствии малотоксичного кроличьего комплемента (Cederlane Laboratories, Ltd., Hornby Ontario, Canada) для удаления CD4⁺ или CD8⁺-Т-клеток (22, 23). (mAbs) RL.172 и mAbs 3.168 были подарены Dr. Jonathan Sprent et Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA).

Испытания на цитотоксичность

Клетки-мишени ($1 \cdot 10^6$) метили 100 мкКи [⁵¹Cr]-хромата натрия в течение 60 мин. Для “обученных” пептидом мишеней (комитированных лимфоцитов) во время мечения мишеней ⁵¹Cr добавляли 50 мкл пептидного раствора 1 мг/мл в ССРХ. После промывания 10^4 меченых мишеней и продукты серийного разведения клеток-эффекторов инкубировали в 200 мкл RP10 в течение 4 ч при 37°C. Собирали 100 мкл супернатанта и специфический лизис определяли следующим образом: Процент специфического лизиса = $100 \times \{(\text{выделение посредством ЦТЛ самопроизвольное выделение}) / (\text{максимальное выделение самопроизвольное выделение})\}$. Самопроизвольное выделение в отсутствие цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) было <25% максимального выделения детергентом во всех экспериментах.

Определение гуморального иммунного ответа у мышей и обезьян.

Каждую лунку планшетов на 96 лунок с U-образным дном (Costar, Cambridge, MA) покрывали 150 нг ова или gp120 в 50 мкл ССРХ и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Для определения гуморальных иммунных ответов против gp120 и против ова у мышей планшеты блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином BSA в течение 1 часа. Серийно разведенные сыворотки добавляли в объеме 25 мкл на лунку и инкубировали в течение 2 часов. Планшеты промывали и добавляли на лунку 50 мкл разведенного 1:1000 антимишного козляного IgG, конъюгированного с HRPO (SBT, Alabama), в 1% BSA. После 1 часа инкубирования планшеты промывали и на лунку добавляли 100 мкл субстрата. OD₄₀₅ проводили через 10-15 минут. Для определения гуморального иммунного ответа как образование обезьяньих антител против gp120 все указанные стадии, за исключением как блокирования планшетов, так и разбавления сыворотки, проводили в 5% нормальной козьей сыворотке в сбалансированном солевом растворе Хэнкса.

Синтез пептидов

Синтетические пептиды, соответствующие аминокислотным последовательностям 253-276 (Последовательность 1: EQLESIIINFEKLTETWSSNVMEER; где стандартный однобуквенный код используют для обозначения

каждой аминокислоты) овальбумина (ova 253-276), аминокислотным последовательностям 84-102 миелинового базового белка (MBP 84-102) (Последовательность 2: DENPVVHFFKNIVTPRTPP) и синтетические пептиды, соответствующие аминокислотным последовательностям 308-322 (18IIIb-последовательность) gp120IIIb, были “собраны” твердофазным пептидным синтезом с использованием синтезатора Applied Biosystems 430A. Аминокислоты связывали через предварительно образованные симметричные ангидриды, за исключением аспарагина, глутамина и аргинина, которые связывали в виде сложных эфиров гидроксibenзотриазола. Эффективность связывания контролировали нингидриновой реакцией по методу Kaiser et al., 34 Anal. Biochim. 595, 1970. Пептиды выделяли из подложки при помощи HF после процедуры “низкий-высокий”, описанной Tam, et al., 21 J. Am. Chem. Soc. 6442, 1983, и экстрагировали из смолы 10% уксусной кислотой. После лиофилизации пептиды обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и пробы пептидов затем очищали ЖХВР хроматографией с обращенной фазой на препаративной колонке C-18 Vydac. Очищенные пептиды (98%) растворяли в ССРХ при конечной концентрации 10 мг/мл и разбавляли до желаемой концентрации в полной среде.

Гидролиз CNBr

Пробы белка (например, β-галактозидазы) обрабатывали 100-кратным молярным избытком бромида циана в растворе 100 mM трифторуксусной кислоты. Реакцию проводили в течение 18 часов при комнатной (около 20°C) температуре при перемешивании. После прохождения предписанного времени реакции пептидные фрагменты отделяли от реагента, используя аппаратуру SEP-PAK C-18 (Waters), элюировали 95% ацетонитрилом и лиофилизовали.

Гидролиз щелочью

Образцы белков

(например, β-галактозидазы) обрабатывали 1 N NaOH и кипятили в течение 2 минут и получаемые пептидные фрагменты отделяли от реагентов, используя аппаратуру C-18 SEP-PAK (Waters), и элюировали 95% ацетонитрилом и лиофилизовали.

Пример 1: Примирование рестриктированных (по классу) I ЦТЛ

Moore et al., 113 UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 1989 and Carbone and Bevan. 171 J. Exp. Medicine 377, 1990, показывают, что мыши, иммунизированные клетками селезенки, заполненными цитоплазматически растворимым овальбуцином, были праймированы для ова-специфического иммунного ответа в виде рестриктированных по классу I ЦТЛ. Ова-экспрессирующий EL4-трансфектант EG7-ова использовали для стимуляции *in vitro* примированных *in vivo* лимфоцитов селезенки и использовали также в качестве мишени для ова-специфического ЦТЛ-медирированного клонинга. Это исследование показывает также, что CD8⁺-эффекторы, индуцированные EG7-ова-трансфектантом или клетками

селезенки, цитоплазматически загруженными ова, распознают детерминанту, картированную пептидом ова 258-276 в контексте H-2K^b, лизируют EG7-ова и нейтрализуют также клетки EL4, покрытые ова 258-276. Таким образом, чтобы оценить, может ли эндогенный путь по рестриктированным (по классу I) CD8⁺-Т-клеткам быть индуцирован растворимым антигеном, указанную выше систему использовали для определения, можно ли обычные антигенные композиции использовать для введения растворимого антигена в рестриктированный путь класса I.

а) ова(ова)

Мышей C57BL иммунизировали один раз различными количествами ова (30 мкг - 1 мг на мышь) с использованием антигенной композиции или без нее. Мышей инъектировали подкожно и в основание хвоста. Клетки селезенки отбирали у иммунизированных мышей по меньшей мере через две недели после иммунизации и *in vitro* стимулировали трансфектантами EG7-ова. Концентрация до 30 мкг была так же эффективна, как доза 1 мг. Поэтому исследования ЦТЛ, как обычно, проводили с клетками селезенки мышей, примированных от 30 мкг ова. После культивирования с EG7-ова *in vitro* в течение пяти дней примирование оценивали по присутствию ова-специфических эффекторов, способных лизировать EG7-ова.

Мыши, инъектированные растворимым ова в ССРХ вплоть до 1 мг, не продемонстрировали доказательств примирования ЦТЛ (фиг.1а). Однако мыши, иммунизированные 30 мкг ова в антигенной композиции, описанной выше (на фигурах показана как АК), показали значительный трансфектант-специфический иммунный ЦТЛ-ответ (фиг.1с). Кроме того, степень киллинга EG7-ова клетками селезенки, иммунизированными ова-АК, была сравнима со степенью киллинга ова-наполненными клетками селезенки иммунизированных мышей (фиг.1б).

То что специфичность ЦТЛ-примирования *in vivo* была антиген-специфичной, было показано неспособностью клеток селезенки иммунизированных β-галактозидазой мышей проявлять вторичный иммунный ЦТЛ-ответ *in vitro* при стимуляции EG7-ова. Не наблюдали индукцию ова-специфических ЦТЛ.

б) β-галактозидаза

Похожие результаты получали с использованием другого растворимого белкового антигена, β-гал. Для анализа β-гал-специфичного иммунного ЦТЛ-ответа используемой мишенью был полученный из мышей BALB/c β-гал-экспрессирующий СЗ-4-трансфектант. Иммунизация мышей BALB/c растворимым β-гал давал фоновый иммунный ЦТЛ-ответ. Поэтому для определения специфического иммунного ЦТЛ-ответа сбор был отсрочен по меньшей мере на восемь недель до того, как лимфоциты селезенки были собраны и культивированы в течение пяти дней в присутствии облученных СЗ-4-трансфектантов.

Фиг. 2b показывает, что 30 мкг β-галактозидазы в АК индуцировали сильный специфический иммунный ЦТЛ-ответ против трансфектанта. При отношении эффектора к мишени (Э:М) 3:1 иммунизированные β-гал-АК мыши показали около 80% специфического киллинга СЗ-4. Тем не менее, только 20% киллинга той же мишени достигали эффекторами, выделенными из мышей, иммунизированных β-гал в ССРХ, при таком же отношении Э:М (фиг.2а). Поскольку ни EL4, ни Р815 не экспрессируют продукты гена МНС класса II и лизис показывает сингенную рестрикцию, эти ова-и β-гал-специфические эффекторы являются рестриктированными ГКГ класса I.

Для демонстрации полезности антигенной композиции мышей иммунизировали растворимым ова, капсулированным в два типа липосом, один из которых был рН-чувствительной липосомой. Через одну неделю клетки селезенки стимулировали *in vitro*, как описано выше, и испытывали по сравнению с ⁵¹Cr-меченым EG7-ова или EL4. Фиг.3 показывает характерный результат, демонстрирующий, что ова в липосоме не может примировать мышей для заметной индукции иммунного ЦТЛ-ответа. Похожие результаты наблюдали, когда для иммунизации использовали ова в квасцах.

Пример 2: Распознавание эпитопа ЦТЛ

Carbone and Bevan, смотри выше, показали, что ЦТЛ, индуцированные в мышах C57BL/6 трансфектантом EG7-ова и цитоплазматически ова-нагруженными спленоцитами, распознают клетки EL4, покрытые пептидом ова 258-276. Для определения того, индуцирует ли растворимый овальбумин в АК похожие иммунные ЦТЛ-ответы, клетки селезенки получали от иммунизированных мышей и стимулировали *in vitro* EG7-ова. Эффекторы испытывали против клеток EL4, покрытых пептидом 253-276 ова или контрольным пептидом, полученным из базального белка миеллина (ББМ 84-102). Результаты показывают, что ова-АК праймировали ЦТЛ со специфичностью, подобной специфичности ЦТЛ, праймированных трансфектантами, или цитоплазматически наполненными ова (фиг.1а, 1б и 1с). Клетки-эффекторы, праймированные ова-АК, эффективно лизировали EG7-ова и нетрансфектированные EL4-клетки, покрытые 50 мкг/10⁸ клеток ова-пептида, но не лизировали EL4-клетки, покрытые 50 мкг/10⁸ клеток ББМ-пептида.

Carbone and Bevan, смотри выше, указывали, что в β-галактозидазной системе β-гал-экспрессирующий трансфектант и спленоциты, цитоплазматически нагруженные растворимой.

β-галактозидазой, индуцировали ЦТЛ, которые лизировали β-гал-экспрессирующий трансфектант и нетрансфектантные клетки Р815, покрытые гидролизованной щелочью β-галактозидазой. Растворимая β-галактозидаза индуцирует ЦТЛ, имеющие специфичность, схожую со специфичностью ЦТЛ при иммунизации в АК (фиг.2).

Пример 3: Эффекторы ЦТЛ являются CD8⁺-Т-клетками.

То что растворимые белковые антигены в АК индуцируют CD8⁺-эффекторы-Т-клетки, было показано следующим образом. Спленоциты от иммунизированных мышей культивировали в течение пяти дней с облученными трансфектантами *in vitro*. После этого времени клетки собирали и истощали на CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетки, используя моноклональные антитела против CD4 или CD8 плюс комплемент. Истощенные популяции испытывали по сравнению с ⁵¹Cr-EG7-ова в ова-системе или ⁵¹Cr-P13.1 в β-гал-системе. Данные, показанные на фиг.4, указывают, что в ова-системе истощение Т-клеток на CD8⁺ отменяет цитотоксическую активность, присвоенную всей популяцией клеток-эффекторов. Тем не менее, истощение популяции Т-клеток на CD4⁺ не оказывает действия на лизис EG7-ова.

Аналогично в β-гал-системе обеднение Т-клеток на CD8⁺ отменяет цитолитическую активность клеток селезенки, иммунизированных β-гал-антигенной композицией.

Пример 4: Растворимый ова в AF примирует CD8⁺-Т-клетки

Для демонстрации того, что система ова-АК примирует популяции CD8⁺-Т-клеток *in vivo* и что она критическая для вторичной иммунной реакции *in vitro*, селезенки иммунизированных ова-АК мышей и нативных мышей истощали на популяции CD4⁺ и CD8⁺. Эти обработанные популяции затем стимулировали *in vitro* только EG7-ова или EG7-ова в комбинации с CD4⁺ и CD8⁺-Т-клетками мышей, иммунизированных ова-АК, или с различными комбинациями CD4⁺ и CD8⁺-Т-клеток мышей, иммунизированных ова-АК, с CD4⁺ и CD8⁺-клетками нативных мышей. Фиг. 5 показывает, что праймированные CD8⁺-клетки важны для проявления вторичного иммунного ЦТЛ-ответа *in vitro*. Эти данные показывают также, что для эффективного вторичного иммунного ЦТЛ-ответа *in vitro* требуются CD4⁺-Т-клетки. CD4⁺-Т-клетки не нужны для примирования. Аналогично, CD8⁺-Т-клетки были нужны для демонстрации β-гал-специфического вторичного иммунного ЦТЛ-ответа *in vitro*.

Приведенные выше примеры показывают влияние антигенной композиции на индукцию иммунного ответа в виде рестриктированных по классу I ЦТЛ против растворимых белковых антигенов. Медирированный антигенной композицией растворимый антиген индуцировал примирование ЦТЛ и оно сходно по активности с примированием, индуцированным трансфектантами и спленоцитами, цитоплазматически нагруженными растворимым ова или β-гал. В овалбуминовой системе, EG7-ова, цитоплазматически нагруженные ова спленоциты и ова-АК индуцировали: (а) рестриктированные CD8⁺-ЦТЛ класса I; (б) ЦТЛ, которые распознают мишень, сенсibilизированную синтетическим

пептидом ова 253-276, и (с) долгоживущие ЦТЛ только после одной иммунизации. В β-галактозидазной системе β-гал-АК индуцировал ЦТЛ, которые распознают β-гал-экспрессирующий трансфектант С3-4 и также нетрансфectedированные клетки Р815, сенсibilизированные β-гал, гидролизованный щелочью. То есть аналогично тому, что наблюдали с ЦТЛ, индуцированными иммунизацией клетками селезенки, цитоплазматически нагруженными β-галактозидазой. Индукция ова-специфических ЦТЛ антигенной композицией необычна, поскольку ни ова, капсулированный в pH-чувствительную липосому, ни квасцы не могут индуцировать примирование ЦТЛ *in vivo*.

Эти примеры показывают, что используемая выше антигенная композиция и ее эквиваленты, полезные в терапии человека и в разработке вакцин для индукции ЦТЛ в разных видах рака и вирусных болезнях.

Пример 5

Это специфический пример для показа использования вышеуказанной АК для продуцирования рестриктированных ЦТЛ класса I, праймируемых растворимым gp120 из ВИЧ.

Экспрессирующая gp120 ПИВ-клеточная линия (15-12) была продуцирована в полученной из фибробластов мышей Balb/c клеточной линии 3T3. Ее получали от Drs. Ron Germain and Jay Berzofsky, National Institute of Health, Bethesda, M. D. Экспрессирующую gp160 клеточную линию использовали для стимуляции *in vitro* примированных *in vivo* лимфоцитов селезенки и использовали также в качестве мишени для индукции gp160-специфических ЦТЛ. Мышей Balb/c иммунизировали один раз 10 мкг gp160 на мышь с АК или без нее. Мышей инъецировали в подушечки лапок и основание хвоста подкожно. Клетки селезенки брали у иммунизированных мышей через две недели после иммунизации и стимулировали *in vitro* облученными gp160-трансфектантами. После пяти дней культивирования *in vitro* примировали оценивали по присутствию специфических эффекторов, способных лизировать gp160-трансфектанты, но не нетрансфectedированные клеточные линии. Результаты приводятся на фиг.7, где иммунные ЦТЛ-ответы потенцировали АК и gp120.

Следующий пример демонстрирует использование антигенных композиций этого изобретения с использованием только одного или двух компонентов. Эти примеры показывают, что иммунные ЦТЛ-ответы можно индуцировать только двумя из указанных выше трех компонентов.

Пример 6: Определение критических компонентов, необходимых для индукции ЦТЛ

Для определения того, все ли указанные выше компоненты необходимы для индукции антиген-специфических ЦТЛ, мышей иммунизировали овалбумином в микрофлюидизированной композиции различных комбинаций двух из трех компо-

нентов, присутствующих в указанных выше АК. Используемые комбинации двух компонентов были следующими: сквалан/твин в PBS, сквалан/плуроник в PBS или плуроник/твин в фосфатно-буферном растворе. Включали другую серию групп, где мышей иммунизировали ова в однокомпонентной композиции, т.е. композиции только сквалана в фосфатно-буферном растворе, плурионика в PBS или твина в фосфатно-буферном растворе. Указанную выше трехкомпонентную антигенную композицию модифицировали для исключения одного компонента, одновременно заменяя его на фосфатно-буферный раствор.

Указанные выше антигенные композиции состоят из:

0,300 г твина 80 (Aldrich, WI). 1,875 г плурионика L121 (BASF, NJ) и 7,5 г сквалана (Aldrich, WI), объем композиции доводили до 50 мл добавлением фосфатно-буферного раствора.

Двухкомпонентные композиции были:

Сквалан/твин: 0,300 г твина 80 и 7,5 г сквалана, объем композиции доводили до 50 мл добавлением фосфатно-буферного раствора.

Плурионик/твин: 1,875 г плурионика L121 и 0,300 г твина 80, объем композиции доводили до 50 мл добавлением фосфатно-буферного раствора.

Плурионик/сквалан: 1,875 г плурионика L121 и 7,5 г сквалана, объем композиции доводили до 50 мл добавлением фосфатно-буферного раствора.

Образцы затем пропускали через микрофлюидизатор, модель 110T, Microfluidics corp., разливали по сосудам и хранили при 4 °C до использования.

Овальбумин (Sigma, MO) взвешивали и получали раствор его концентрации 0,3 мг/мл в CCRX (Whittaker, смотри выше). Исходный раствор 0,3 мг/мл комбинировали с двухкомпонентной композицией в следующих количествах: 5 частей раствора овальбумина концентрации 0,3 мг/мл, 3,3 части двухкомпонентной композиции и 1,7 части CCRX.

Композицию интенсивно перемешивали и выдерживали на льду до инъектирования. Все растворы смешивали непосредственно перед инъекцией.

Каждая мышь получала 200 мкл одной композиции, содержащей 30 мкл ова, инъекцией в подушечки обеих задних лап и любое оставшееся количество раствора инъектировали подкожно в основание хвоста. Мышей оставляли для отдыха в течение от двух до четырех недель до отбора клеток селезенки.

Через две недели после иммунизации получали клетки селезенки и стимулировали *in vitro* облученным EG7-ова. Через пять дней после культивирования присутствие ова-специфических ЦТЛ измеряли испытанием по сравнению с ⁵¹Cr-EG7-ова или

⁵¹Cr-EL4 в 4-часовом анализе на выделение ⁵¹Cr. Результаты, показанные на фиг.8-10, демонстрируют, что овальбумин в композиции микрофлюидизированной двухкомпонентной системы может примировать ова-специфические ЦТЛ *in vivo*.

Мы далее оценивали относительный вклад индивидуальных компонентов в их способность индуцировать ЦТЛ при комбинировании с белковыми антигенами. Для целей иммунизации растворимый антиген смешивали с микрофлюидизированными наполнителями для получения стабильной гомогенной эмульсии с пределами размера частиц 250-300 нм. Для дальнейшего определения компонентов композиции сквалан-твин 80-плуроник (СТП), ответственных за индукцию ЦТЛ, иммунизировали мышей ова в смеси сквалан-твин 80 (СТ), смеси плуроник-твин 80 (ПТ) или смеси сквалан-плуроник (СП) и в качестве контроля в сквалане (С), твине 80 (Т) или плурионике (П). Мышей также иммунизировали ова-SAFm (содержал 70 мг МДП) или ова-квасцы в качестве адьювантного контроля. Для положительного контроля мышей иммунизировали клетками селезенки, цитоплазматически наполненными растворимым ова. Использовали также другие комбинации и замещения, результаты приводятся в таблице 1.

Для определения примирования ЦТЛ мышей иммунизировали один раз. Через две недели после иммунизации клетки смешивали с облученными EG7-ова (ова-экспрессирующими EL4-клетками) в течение пяти дней и тестировали по сравнению с ⁵¹Cr-EG7-ова или ⁵¹Cr-EL4-клетками. Результаты (фиг.11) показывают, что 30 мкг ова в комбинации с СТП или СТ примировывают иммунный ответ рестриктивных по классу 1 ЦТЛ в мышцах. Примирование ова-специфических ЦТЛ ова в СТП или ова в СТ, по-видимому, лучше, чем примирование, индуцированное клетками селезенки, цитоплазматически нагруженными растворимым ова. Ова в ПТ или в СП может индуцировать ова-специфичный иммунный ЦТЛ-ответ у мышей, но ответ нестойкий и недостаточный. Подобно SAFm, добавление МДП в композицию СТ не компрометирует ова-специфическую индукцию ЦТЛ у мышей (таблица 2). Никакой ова-специфической индукции ЦТЛ не было, когда мышей индуцировали ова в смеси с индивидуальными компонентами С, П или Т, ни когда мышей иммунизировали ова-SAFm или ова-квасцы. Мыши, иммунизированные вплоть до 1 мг ова в (а) CCRX, в (b) SAFm или (с) адсорбированного на квасцах, не примировали ова-специфичные ЦТЛ.

Пример 7: Компоненты, необходимые для продуцирования ова-специфических антител

Мыши были иммунизированы три раза с интервалами две недели 30 мкг ова в CCRX, СТП, СТ, ПТ или СП. В качестве положительного контроля мыши были иммунизированы ова-SAFm, так как известно, что SAFm индуцирует сильный гуморальный иммунный ответ. Через семь дней после второй и третьей иммунизации мышам делали кровопускание и сыворотку испытывали на ова-специфичный гуморальный иммунный ответ. Результаты приводятся в таблице 3. Они показывают, что мыши, иммунизированные ова в СТП, СП или в

SAFm, показывают похожие гуморальные иммунные ответы против ова после двух иммунизаций.

Пример 8: Индукция ЦТЛ, специфических для gp120 ВИЧ

Gp120 ПВ ВИЧ использовали в качестве второй антигенной системы для определения индукции ЦТЛ в СТП, СТ или в МП-Т. Мыши были иммунизированы 1 мкг gp120 ПВ в ССРХ, СТП, РТ или в СТ. В качестве контрольных опытов мыши были иммунизированы 1 мкг gp120 ПВ в SAFm или ПАФ (полный адъювант Фрейнда) или в RIBI-адъювантной системе, содержащей МФЛ (монофосфориллипид А) и ДМТ (димиколит трегалозы). Через три недели после иммунизации приготавливали клетки селезенки и стимулировали *in vitro* обработанными митомицином клеткам и-трансфектантам и 15-12 или пептидом 18ПВ. После пятидневного культивирования получаемые клетки-эффекторы испытывали по сравнению с коровьей оспой: gp160 ПВ или родоначальными инфицированными коровьей оспой клетками P815 в качестве мишеней. Результаты показывают, что композиция gp120-скалан-твин 80 и композиция не gp120-скалан-твин 80-плуроник или gp120-ССРХ индуцировали gp120-специфический иммунный ЦТЛ-ответ у мышей (таблица 4).

Пример 9: Индукция gp120-специфического гуморального иммунного ответа у мышей

Для индукции gp12-специфических гуморальных иммунных ответов мыши были иммунизированы 1 мкг gp120ПВ три раза с интервалами две недели. Животным пускали кровь и испытывали на присутствие антител IgG, детектирующих gp120ПВ, анализом ELISA. Результаты показывают, что gp120-СТ является лучшим иммуногеном, чем gp120-ССРХ, gp120-SAFm (таблица 5) или gp120-СТП.

Пример 10: gp120-специфические гуморальные иммунные ответы у обезьян

Обезьяны (две на группу) были иммунизированы gp120-SAFm, gp120-СТП, gp120-СТ или gp120-ССРХ. В качестве контроля группу обезьян иммунизировали рекомбинантной коровьей оспой, содержащей gp160 ПВ. Обезьян иммунизировали с интервалами две недели и кровь отбирали через две недели и три недели после второй иммунизации. Пре- и иммунную сыворотку каждой обезьяны серийно разбавляли и анализировали на активность против gp120 по ELISA, как описано в материалах и способах. Данные (фиг.12) показывают, что обезьяны, иммунизированные gp120-СТП или gp120-SAFm, индуцировали схожие иммунные ответы. Одна обезьяна, иммунизированная gp120-СТ, индуцировала гуморальный иммунный ответ против gp120, похожий на ответ группы, иммунизированной gp120-SAFm или gp120-СТП. Одна обезьяна, иммунизированная gp120-СТ, индуцировала сильный гуморальный иммунный ответ против gp120 после двух иммунизаций.

Пример 11: Активность АК *in vivo* в комбинации с белком Е7 16 ВИЧ

1. Генерация рекомбинантного белка Е7 16 ВИЧ для иммунизации

а) PCR и клонирование гена Е7

Ген Е7 16 ВИЧ клонировали из плазмиды, полученной от Dr. Raren Vousden (Ludwig Institute), кодирующей ген Е7, полученной из клеточной линии карциномы CaSki. Кодировочные области были амплифицированы PCR с использованием праймеров, которые кодируют 5'- и 3'-концы генов, фланкированных клонирующими сайтами Bam HI и Sal I. Продукт Е7 PCR лигировали в экспрессирующий вектор pGEX - 4T-1 (Pharmacia Biotech), получая экспрессирующую плазмиду pGEX. Е7. Штамм E. Coli XLI - голубой (стратаген) трансфектировали экспрессирующей плазмидой pGEX. Е7. Последовательность Е7 получали из плазмид образующихся колоний, она была идентична последовательности Е7, полученной из клеток CaSki.

б) Получение и очистка бактериально экспрессированного Е7

Бактериальная экспрессирующая плаزمида pGEX. Е7 кодирует слитый белок глутатион-S-трансферазы (GST), состоящий из GST у аминоконца, сайта расщепления тромбинпротеазы и белка Е7 у карбоксиконца. Белок Е7 получали и очищали, как описано в информационной литературе к продукту от производителя вектора pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech). Говоря кратко, бактерии, содержащие вектор экспрессии pGEX. Е7, индуцировали для экспрессии слитого белка добавлением в культуральную среду изопропил-β-D-тиогалактозидазы. Клетки собирали и лизировали мялкой ультразвуковой обработкой. Лизат вводили в глутатионсефарозу 4B (Pharmacia Biotech). После связывания слитого белка с матрицей смолу промывали для удаления неспецифически связанных белков. Связанный слитый белок гидролизировали тромбином для выделения белка Е7 из слитого белка глутатион-S-трансферазы (GST).

Препарат белка Е7 анализировали SDS-PAGE и концентрацию белка Е7 определяли анализом Bradforda (BioRad). На литр бактериальной культуры получали 9 мг растворимого белка Е7.

2. Генерация трансфектанта Е7 Х21

Кодирующие последовательности для белка HPV16 Е7 (смотри выше) были встроены в патентованную IDEC эукариотическую экспрессирующую плазмиду INPEP4. В пределах этого вектора экспрессия Е7 контролировалась промотор/энхансерными транскрипционными элементами цитомегаловируса. Кроме того, первые три нуклеотида кодирующей последовательности Е7 были удалены и заменены лидерной последовательностью легкой цепи иммуноглобулина, помещенной непосредственно против входа (слева) и в рамки считывания с кодирующим районом Е7. После трансфекции в мышиную клеточную линию Х21 отдельные G418-резистентные клоны испытывали при помощи нозерн-блоттингов на образова-

ние матрицы Е7. Каждый клон обнаруживал детектируемую матрицу Е7. Затем выполняли вестерн-блоттинг клеточных лизатов двух из этих клонов, 4Е7 и 1С7 (НОРЕ1 и НОРЕ2 соответственно) и показали образование белка Е7.

3. Активность *in vivo* иммунизации растворимым антигеном Е7/АК

В этих исследованиях использовали самок мышей фона СЗН (Н²^{к/к}, Harlan Sprague Dawley). Животных содержали в соответствии с "Руководством для наблюдения за лабораторными животными и их использованию" (DHHS Publication No. NIH 86-23, Bethesda, MD:NIH, 1985), они получали корм и воду по потребности. В этих исследованиях использовали трансфекцированную Е7 клеточную линию (НОРЕ2 Н²^{к/к}). Опухолевую клеточную линию сохраняли серийным пассированием *in vitro*.

Было показано, что эта клеточная линия сохраняет Е7-цитоплазматическую антигенную экспрессию, определяемую анализом вестерн-блоттингом, после повторения пассивирования *in vitro*. Опухоли инициировали у сингенных мышей СЗН подкожной инъекцией 150000 пассированных *in vitro* клеток.

Опухоли измеряли в двух перпендикулярных направлениях с интервалами в две недели. Объем опухоли (V) рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$V(\text{мм}^3) = (L \times W^2), \text{ деленная на } 2,$$

где L - длина самой длинной оси, измеренной в мм; W - длина перпендикулярной оси (мм).

Данные в таблице 6 представляют как опухолевые мыши (число имеющих опухоли животных по сравнению с общим числом инъецированных животных). Данные на фиг.13 и 14 представляют как средний размер опухоли (мм³) каждой обработанной или контрольной группы. Каждую обработанную группу сравнивали с контрольной группой, которая не получала лечения. Терапию начинали через 10 дней после инокуляции клеток НОРЕ2, когда основная часть опухолей была пальпируемой (приблизительно 50-75 мм²). Терапию инициировали иммунизацией мышей растворимым белком Е7 в АК или квасцах-адьювантах (подкожно при общем объеме 0,2 мл). Непосредственно перед иммунизацией АК смешивали в течение 60 секунд с белком

Е7 в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (ССРХ), так чтобы каждая мышь получала либо 30 мкг, либо 90 мкг белка Е7 в 0,2 мл. Квасцы (Pierce Chemical Co.) смешивали с белком Е7 в соответствии с инструкциями по приготовлению, так чтобы каждое животное получало 90 мкг белка Е7 в 0,2 мл. Животные в группе второй обработки получали вторую иммунизацию через 9 дней (19 дней после инокуляции опухолевых клеток). Бустер-иммунизацию проводили непосредственно перед инокуляцией, как описано выше.

В этом примере (таблица 6: Хр #233) через 41 день после инокуляции опухолевых клеток только 4/8 и 5/8 мышей, получивших одну инъекцию растворимого Е7 в АК (30 мкг или 90 мкг соответственно), имели измеримые опухоли. Напротив, все из мышей, иммунизированных белком Е7 в квасцах (8/8) имели активно растущие опухоли. Дополнительно, как показано на фиг.13, значительное ингибирование роста опухоли наблюдали только в группах обработки, иммунизированных белком Е7 в АК, по сравнению с контрольными (необработанными) или обработанными квасцами группами. Ингибирование роста опухоли (фиг. 13) или повышенные скорости регресса опухоли (таблица 6) не наблюдали у мышей, которые получали одну инъекцию Е7 в квасцах.

Похожие результаты наблюдали также, используя группы обработки, которые получали две иммунизации, на 10 и 19 день после контрольного заражения опухолью (таблица 6 и фиг. 14), хотя некоторое замедление роста опухоли наблюдали у мышей, получивших две инъекции Е7 в квасцах.

Результаты показывают, что значительную противоопухолевую активность, измеряемую пониженным числом имеющих опухоли мышей, и ингибирование роста опухоли наблюдали после иммунизации растворимым Е7 в АК. Наоборот, все животные, иммунизированные одной или двумя инъекциями растворимого белка Е7 в квасцах, имели растущие опухоли. Говоря кратко, иммунизация растворимым белком Е7 в АК привела к значительному ингибированию роста опухолевых клеток, что не наблюдали при использовании иммунизации растворимым Е7 в квасцах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микрофлюидизированная композиция для индукции специфичного цитотоксического Т-лимфоцитного иммунного ответа против антигена папилломавируса, отличающаяся тем, что включает антиген папилломавируса, выбранный из группы, состоящей из антигена HPV16 Е6, антигена HPV16 Е7, антигена HPV18 Е6, антигена HPV18 Е7, антигена HPV6 Е4, антигена HPV6 L1, антигена HPV11 Е4 и антигена HPV11 L1, по меньшей мере один стабилизирующий детергент, мицеллообразующий агент и биоразлагаемое и биосовместимое масло.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что детергент выбирают из группы, состоящей из твина 20, твина 40 и твина 80 и масло выбирают из группы, состоящей из сквалана, эйкозана и пристана и мицеллообразующий агент выбирают из группы, состоящей из плуроника L62LF и полиоксамера 401.

3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что детергентом является полисорбат 80 и мицеллообразующим агентом является полиоксамер 401.

4. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что детергент выбирают из группы, состоящей из поли-

сорбата 80, твина 20, твина 40, твина 60, цвиттергента 3-12, типа НВ7 и спана 85.

5. Композиция по п. 1, *отличающаяся* тем, что мицеллообразующий агент выбирают из группы, состоящей из полиоксамера 401, плуроника L62LF, плуроника L101, плуроника L64, EG 1000, тетроника 1501, тетроника 150R1, тетроника 701, тетроника 901, тетроника 1301 и тетроника 130R1.

6. Композиция по п. 1, *отличающаяся* тем, что размер частиц композиции составляет от 250 до 300 нм.

7. Способ лечения цервикального рака, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции по п. 1.

8. Способ лечения остроконечной кондиломы, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции по п. 1.

Таблица 1
Влияние разных замен в двух- или трехкомпонентных системах

Замена в трехкомпонентных композициях	Процент киллинга при Е:Т 100:1
СТП	84
Твин 40(Т)	66
Твин 20(Т)	48
Т1501 (П)	0
Т150R1 (П)	0
Плуроник L62LF(П)	47
Эйкозан (С)	*
ПЭГ1000(П)	*
Триаконтан (С)	*
Цвиттергент (Т)	*
<u>Замена в двухкомпонентных композициях</u>	
СТ	76
ПТ	45
СП	26
Холестерин(С) + твин 80	0
Сквалан + твин 29 (Т)	65
Пристан (С) + твин 80	42
Оливковое масло (С) + твин 80	69
<u>Однокомпонентная композиция</u>	
Плуроник L121	0
Сквалан	0
Твин 80	0
Сквалан + твин 80 + 5% декстроза	86

* ЦТЛ-испытание повторяли

Таблица 2
Индукция ова-специфичного иммунного ЦТЛ-ответа не блокируется СТ + МДП

% цитотоксичности в мышах, иммунизированных*						
Стимулятор	Мишень**	С-М	ова-СТ	ова-СТ	ова-СТ-МДП 300 мг/мышь	ова-СТ-МДП 72 мг/мышь
EG7-ова	EG7-ова	100:1	0	100	82	76
		33:1	0	86	67	62
		11:1	0	33	39	25
		3:1	0	6	13	3
		1:1	0	0	0	0
		3:1	0	0	0	0

* Мышей иммунизировали 30 мкг ова в различных композициях

** Процент цитотоксичности рассчитывали с учетом процентного киллинга по сравнению с неэкспрессирующими антиген клеточными линиями.

Таблица 3

Индукция гуморального иммунного ответа против ова

Композиция 30 мкг ова/животное	Число мышей реагирующих/ число мышей инъецирован-ных	1/разбавление (титр) сыворотки
ССРХ	0/3	<1/20, <1/20, <1/20
СТП	3/3	<1/4860, >1/4860, <1/4860
СТ	3/3	>1/4860, >1/4860, >1/4860
ПТ	НД	НД, НД, НД
СП	НД4	НД, НД, НД
SAF-m	3/3	1/4860, 1/4860, 1/4860

Таблица 4

Индукция gp 120-специфического иммунного ЦТЛ-ответа у мышей

% цитотоксичности у мышей, иммунизированных*					
Стимулятор	Мишень**	С-М	gr120-ССРХ	gp120-СТ	gp120-СТП
18Пб/IL-2	вак.:gp120	100:1	23	42	НД***
		33:1	23	38	НД
		11:1	0	0	НД
		3:1	0	35	НД
18Пб/IL-2	15-12	100:1	0	50	0
		33:1	0	35	0
		11:1	0	27	0
		3:1	0	18	0
18Пб/IL-2	3ТЗ+18Пб	100:1	0	59	13
		33:1	0	59	2
		11:1	0	57	0
		3:1	0	29	0
15-12	вак:gp120	100:1	35	84	НД
		33:1	19	65	НД
		11:1	12	37	НД
		3:1	0	22	НД
		1:1	0	0	НД

* Мыши были иммунизированы 1 мкг gp120П в разных композициях.

** % цитотоксичность рассчитывали с учетом процента киллинга по сравнению с неэкспрессирующими антиген клеточными линиями.

*** НД - недоступен.

Таблица 5

Индукция гуморального иммунного ответа против gp120

Композиция 1 мкг др 120/животное	Число мышей реагирующих/ число мышей инъецированных	1/разбавление (титр) сыворотки
HBSS	0/3	<1/20, <1/20, <1/20

СТП	1/3	<120, >1/4860, <1/20
СТ	3/3	>1/4860, >1/4860, >1/4860
ПТ	3/3	>1/4860, >1/4860, >1/4860
СП	2/3	1/20, 1/540, 1/540
SAF-m	2/3	1/180, >1/4860, 1/540

Таблица 6

Противоопухолевая активность иммунизации растворимым E7 в адьюванте

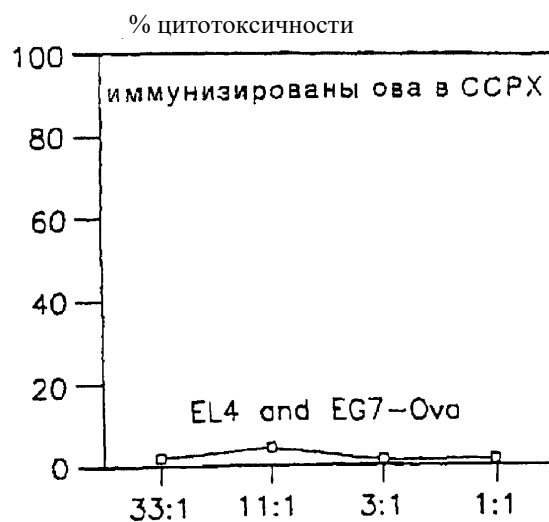
№ эксперимен.	Обработка	Доза (мкг/мышь)	Опухолевые животные ^a , 41 день
223	Контрол.	-	7/8
223	E7 в АК	30 мкг x 1 ^b	4/8
223	E7 в АК	90 мкг x 1	5/8
223	E7 в квасц.	90 мкг x 1	8/8
223	E7 в АК	30 мкг x 2 ^c	3/8
223	E7 в АК	90 мкг x 2	1/4
223	E7 в квасц.	90 мкг x 2	8/8

а. Число имеющих опухоли мышей/общее число инокулированных мышей.

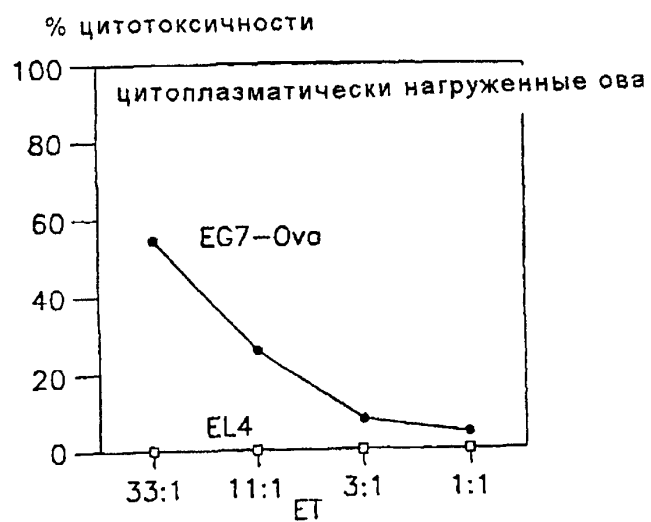
б. Все иммунизации начинали на 10 день после имплантации.

с. Вторая иммунизация (x 2) на 19 день после имплантации.

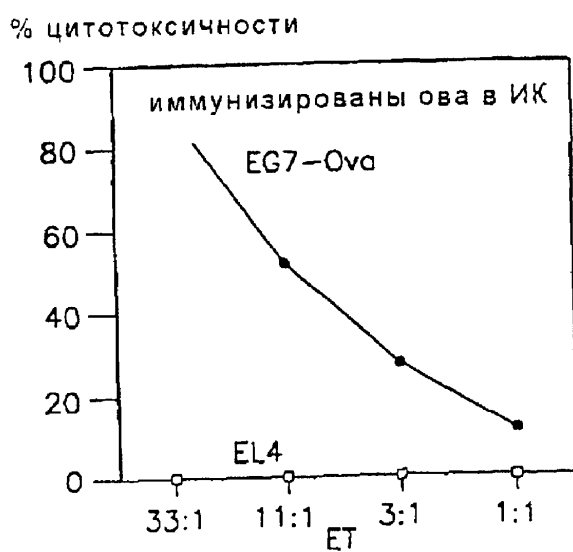
384



Фиг. 1а

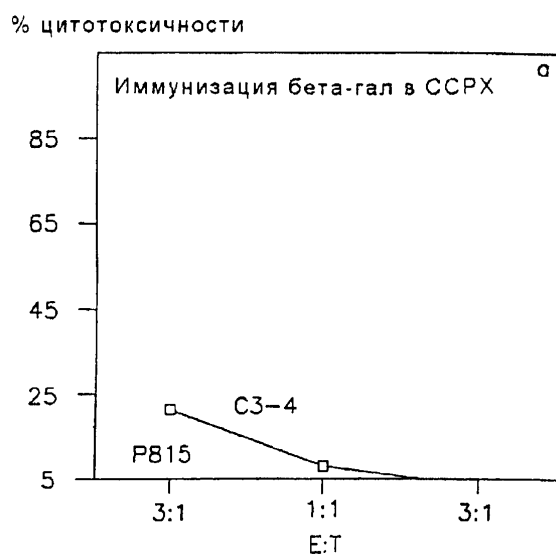


Фиг. 1b



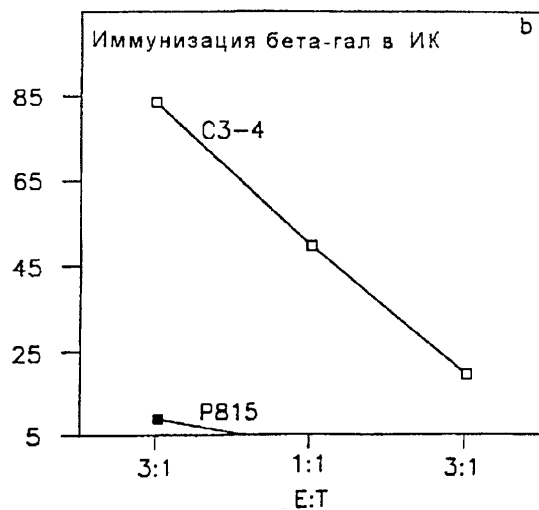
Фиг. 2с

384



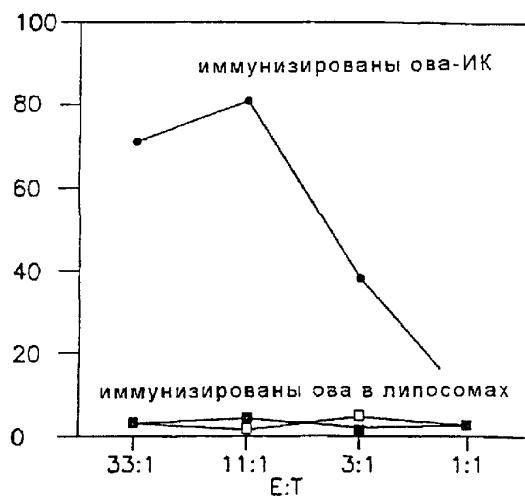
Фиг. 2а

% цитотоксичности



Фиг. 2b

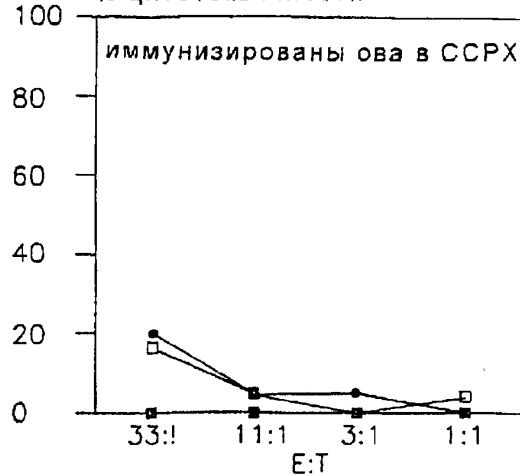
% цитотоксичности



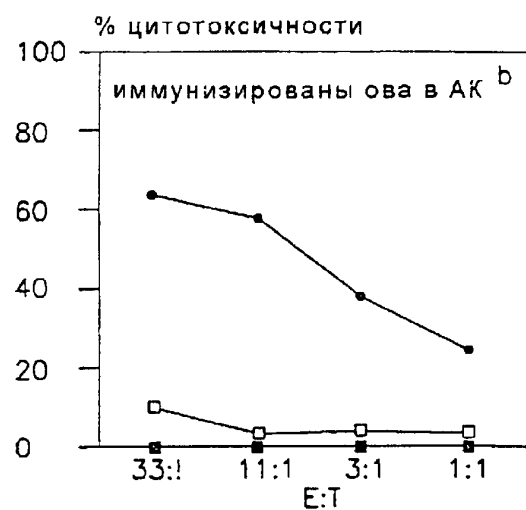
Фиг. 3

384

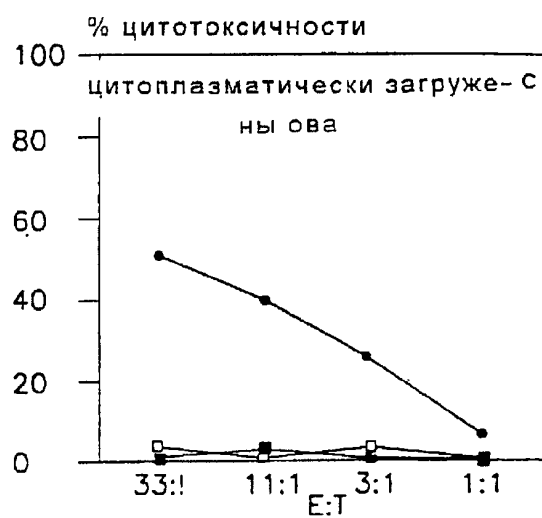
% цитотоксичности



Фиг. 4a



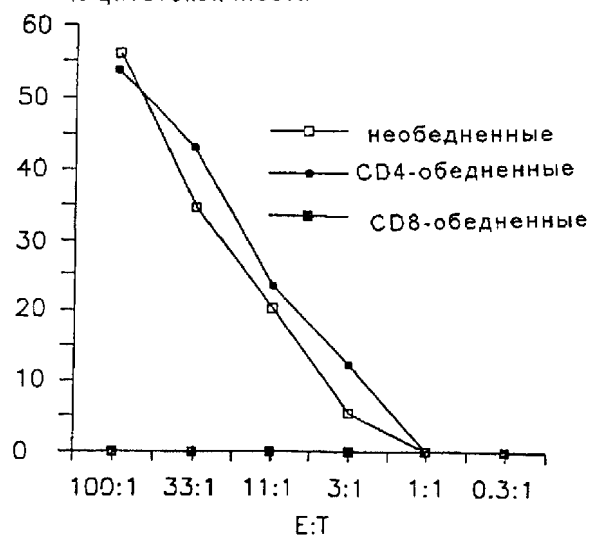
Фиг. 4b



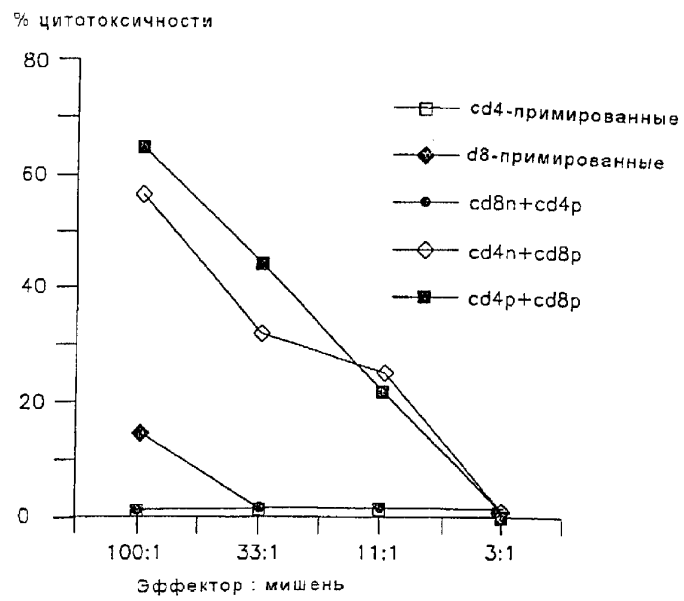
Фиг. 4с

384

CD8 + T- клетки являются клетками-эффекторами
% цитотоксичности



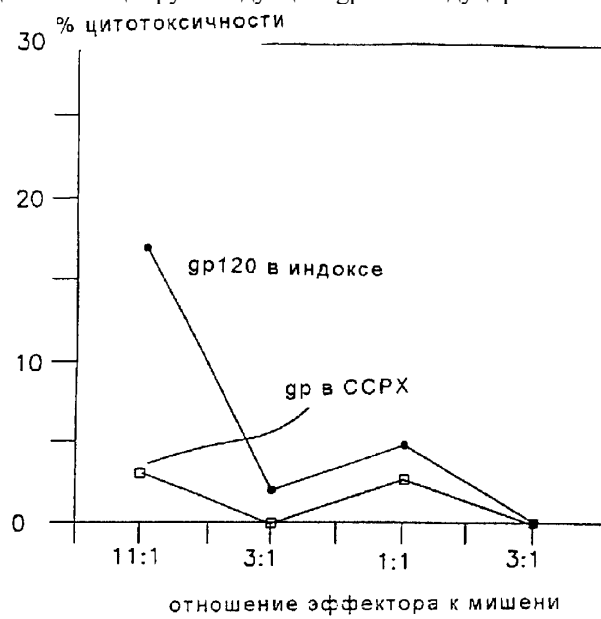
Фиг. 5



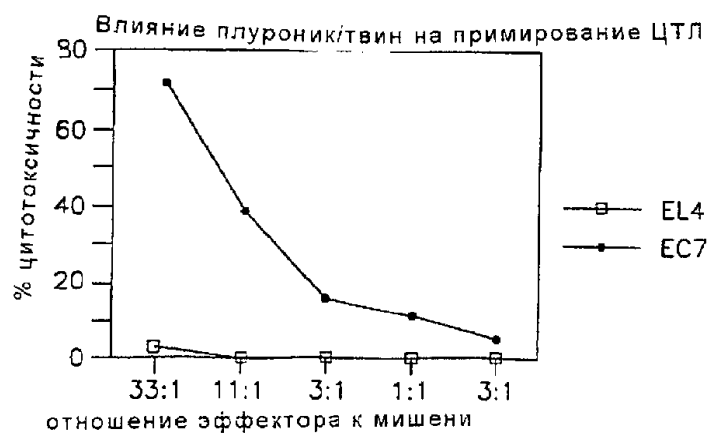
Фиг. 6

384

Индекс потенцирует индукцию gr 120-индуцированных ЦТЛ

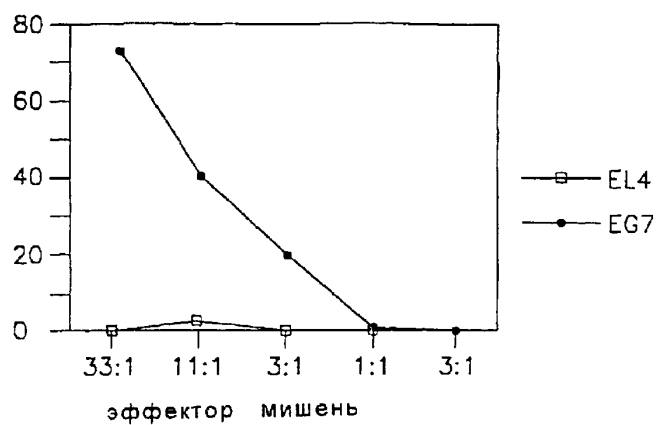


Фиг. 7



Фиг. 8

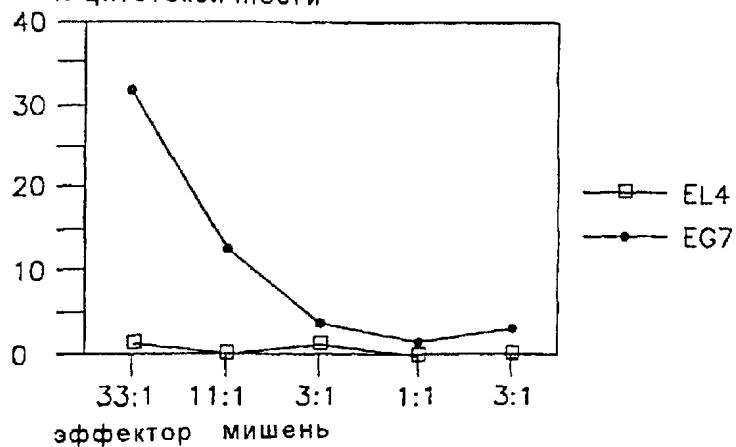
Влияние сквалан/твин на примирование ЦТЛ
% цитотоксичности



Фиг. 9

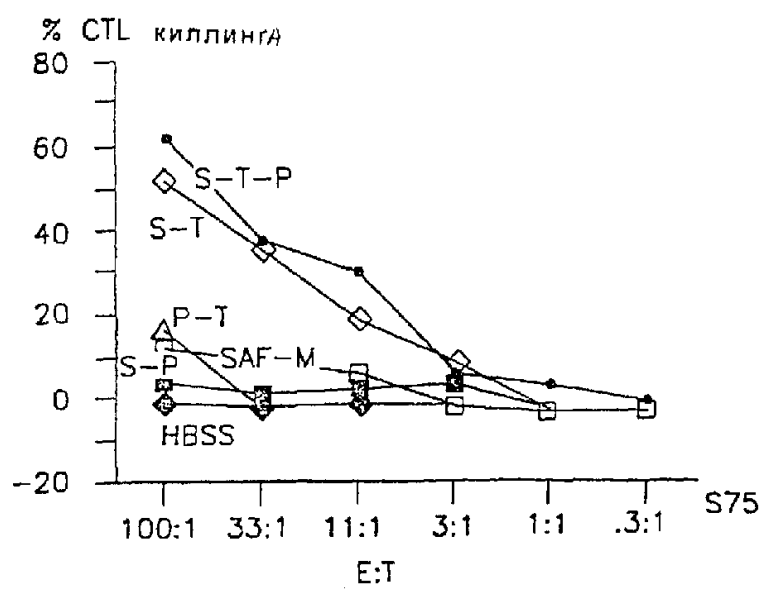
384

Влияние сквалан/плуроник на примирование
% цитотоксичности

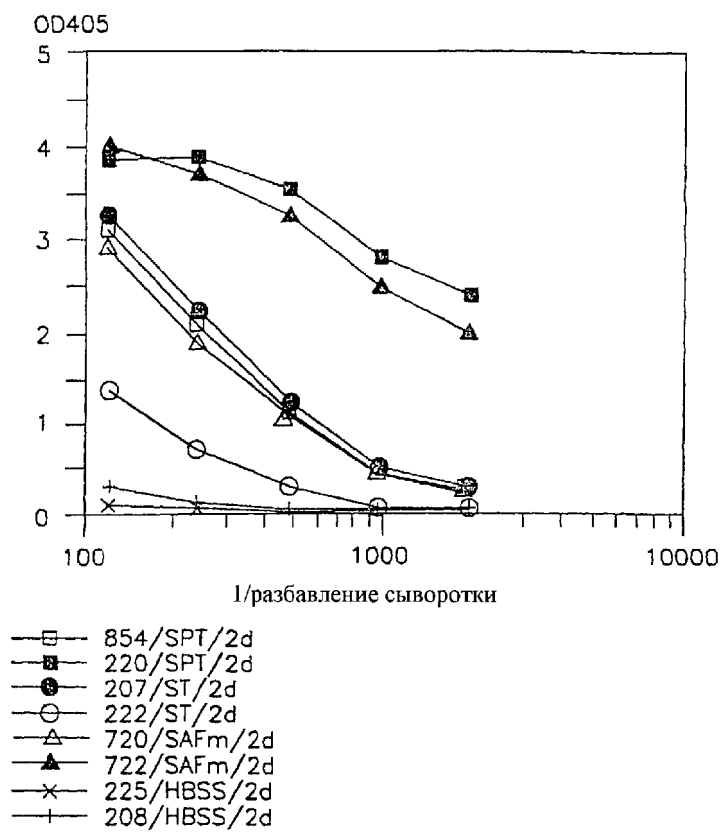


Фиг. 10

Сравнение введений 30 мкг ова в обычных 3- или 2-компонентных адьювантах

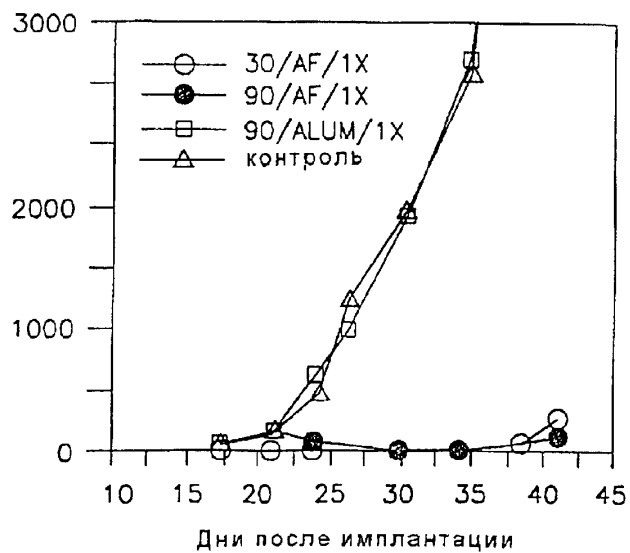


Фиг. 11



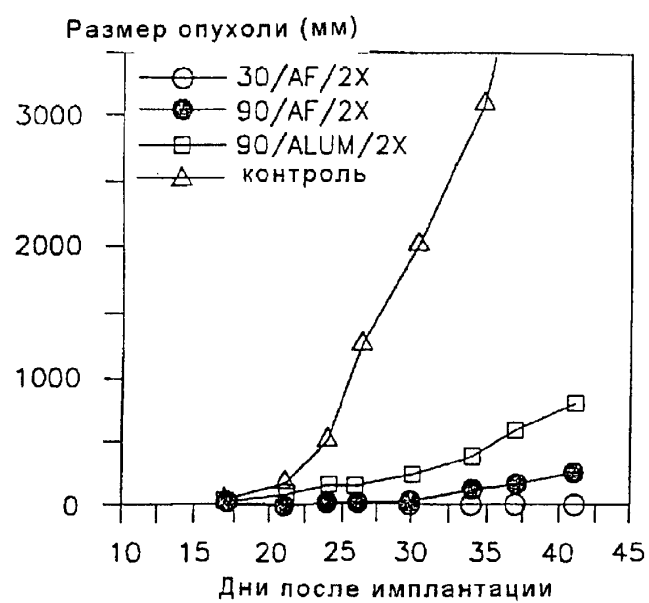
Фиг. 12

Противоопухолевая активность клеток НОРЕ2 после одной иммунизации (10 дней)
растворимым белком Е7 в адьюванте
Размер опухоли (мм)



Фиг. 13

Противоопухолевая активность клеток НОРЕ2 после двух иммунизаций
(10 и 19 день) растворимым белком Е7 в адьюванте



Фиг. 14