



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101679508 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 200880011285. 1

(22) 申请日 2008. 02. 01

(30) 优先权数据

60/888, 032 2007. 02. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 10. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/052850 2008. 02. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/097866 EN 2008. 08. 14

(73) 专利权人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯

(72) 发明人 G·祖拉夫斯基 J·F·班彻罗

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(56) 对比文件

Bates, E E M等. APCs Express DCIR, a Novel C-Type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. 《J Immunol》. 1999, 第 163 卷(第 4 期), 摘要, 第 1974 页右栏最后一段至第 1975 页右栏第 2 段.

Bates, E E M等. APCs Express DCIR,

a Novel C-Type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. 《J Immunol》. 1999, 第 163 卷(第 4 期), 摘要, 第 1974 页右栏最后一段至第 1975 页右栏第 2 段.

Bates, E E M等. APCs Express DCIR, a Novel C-Type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. 《J Immunol》. 1999, 第 163 卷(第 4 期), 摘要, 第 1974 页右栏最后一段至第 1975 页右栏第 2 段.

Wiley, K N等. The in-vitro inhibition of rat alloantigen presentation by immunotoxins-implications for allografting. 《Clin. Exp. Immunol. 》. 1989, 第 76 卷(第 1 期), 摘要, 第 132 页最后一段至第 133 页第 1 段, 第 133 页右栏, 第 136 页左栏最后一段.

Huang, X等. Cloning and Characterization of a Novel ITIM Containing Lectin-like Immunoreceptor LLIR and Its Two Transmembrane Region Deletion Variants. 《Biochem Biophys Res Commun. 》. 2001, 第 281 卷(第 1 期), 第 136 页最后一段至第 137 页第 1 段.

审查员 林峻凯

权利要求书2页 说明书28页
序列表46页 附图25页

(54) 发明名称

基于靶向抗原至抗原呈递细胞上表达的 DCIR 的疫苗

(57) 摘要

本发明包括用于使用 DCIR 特异性抗体或其片段(抗原与其结合形成抗体-抗原复合物, 其中该抗原通过与该抗体-抗原复合物接触的树突细胞加工和呈递)增加抗原呈递效力的组合物和方法。

1. 抗体 - 抗原复合物在制备用于增加表达树突细胞抑制性受体的抗原呈递细胞的抗原呈递效力的试剂中的用途,

其中所述的抗体 - 抗原复合物包括分离和纯化的树突细胞抑制性受体特异性抗体或其抗原结合部分,所述的抗体或其抗原结合部分的特征在于所述的抗体或其抗原结合部分能特异性地结合到树突细胞抑制性受体的胞外域;

所述的抗体或其抗原结合部分的特征还在于靶试剂与所述树突细胞抑制性受体特异性抗体或其抗原结合部分结合形成抗体 - 抗原复合物,该复合物被与该抗体复合物接触的抗原呈递细胞内在化,其中所述靶试剂选自肽、蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸及其组合。

2. 权利要求 1 的用途,其中抗原呈递细胞包括树突细胞。

3. 权利要求 1 的用途,其中树突细胞抑制性受体 - 特异性抗体或其抗原结合部分与黏结蛋白 /Dockerin 结合对的一个元件结合,而靶试剂与黏结蛋白 /Dockerin 结合对的互补性元件结合,形成复合物。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述靶试剂包括一种或多种细胞因子。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述靶试剂包括一种或多种细胞因子,所述细胞因子选自白细胞介素,转化生长因子 (TGF),结缔组织活化肽 (CTAP),成骨因子, B/T 细胞分化因子, B/T 细胞生长因子,促有丝分裂细胞因子,趋化细胞因子,集落刺激因子,血管生成因子, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , 瘦素,肌肉生长抑制素,巨噬细胞刺激蛋白, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL,人淋巴毒素- β , IP-10, PF4, GRO, 9E3,促红细胞生成素,内皮抑素,血管抑素, VEGF 和转化生长因子 (TGF) 超基因家族;骨形态发生蛋白、肝素结合生长因子、抑制素、生长分化因子以及活化素。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述的白细胞介素选自 IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL-1 α 和 IL1- β 。

7. 权利要求 5 的用途,其中所述的集落刺激因子选自 G-CSF、M-CSF 和 GM-CSF。

8. 权利要求 5 的用途,其中所述的转化生长因子 (TGF) 超基因家族包括 β 转化生长因子和血小板衍生生长因子 (PDGF)。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述的 β 转化生长因子是 TGF- β 1、TGF- β 2 或 TGF- β 3。

10. 权利要求 5 的用途,其中所述的骨形态发生蛋白是 BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8 或 BMP-9。

11. 权利要求 5 的用途,其中所述的肝素结合生长因子是成纤维细胞生长因子 (FGF),表皮生长因子 (EGF) 或胰岛素样生长因子 (IGF)。

12. 权利要求 5 的用途,其中所述的抑制素是抑制素 A 或抑制素 B。

13. 权利要求 5 的用途,其中所述的生长分化因子是 GDF-1。

14. 权利要求 5 的用途,其中所述的活化素是活化素 A、活化素 B 或活化素 AB。

15. 权利要求 1 的用途,其中所述的靶试剂包括细菌蛋白、病毒蛋白、真菌蛋白、原生动动物蛋白或癌蛋白。

16. 抗体 - 抗原复合物在制备用于增加树突细胞的抗原呈递效力的试剂中的用途,

其中所述的抗体 - 抗原复合物包括树突细胞抑制性受体特异性抗体或其抗原结合部分,所述的抗体或其抗原结合部分的特征在于所述的抗体或者其抗原结合部分能特异性地结合到树突细胞抑制性受体的胞外域;

所述的抗体或其抗原结合部分的特征还在于其结合抗原形成抗体-抗原复合物,其中已与所述抗体-抗原复合物接触的树突细胞加工并呈递该抗原。

基于靶向抗原至抗原呈递细胞上表达的 DCIR 的疫苗

[0001] 发明的技术领域

[0002] 一般而言,本发明涉及疫苗接种领域,更具体地,本发明涉及与基于靶向抗原至抗原呈递细胞上表达的 DCIR 的疫苗。

[0003] 发明背景

[0004] 不限制本发明的范围,描述与抗原呈递相关的本发明的背景。

[0005] 基于靶向树突细胞(DC)的人疫苗是建立在小鼠模型中引人注目的研究上的新构思。这里,由针对某些 DC 受体的抗体运送至 DC 的小剂量的相对弱的抗原可以引起有效且广泛的免疫反应。为开发用于人的此类疫苗,需要对确切哪种 DC 受体应该用于该抗原靶向应用有更好的理解。这是因为在小鼠和人免疫系统之间不总是精确的一致,以及还因为不是所有可能的 DC 受体都已经仔细地进行了针对该疫苗应用的检验。

[0006] 因此,已经启动了体外测试多种抗人 DC 受体标靶的研究,例如,在 HLA I 类和 II 类分子的情况下用与针对甘露糖受体活化 T 细胞的人 mAb 融合的黑色素瘤抗原 pmel17 靶向的 DC (Ramakrishna, Trembl 等,2004)。此外,通过人源化的抗 DC-SIGN mAb 使模式抗原 KLH 靶向 DC 有效地诱导了抗原特异性的初次反应以及剂量节约的记忆 T 细胞反应(Tacke, de Vries 等,2005)。除甘露糖受体和 DC-SIGN 之外,人 DC 表达已知与抗原捕获有关的其它受体。这些中许多是 C 型凝集素受体(CLR),包括 LOX-1、DEC205、DC-ASGPR、Langerin、DCIR、BDCA-2、DECTIN-1 和 CLEC-6。这些 CLR 由不同的 DC 亚型不同地表达,并且它们的表达可以随 DC 成熟状态而变化(Figdor, van Kooyk 等,2002;Geijtenbeek, van Vliet 等,2004)。

[0007] DC 亚型刺激不同的免疫反应,因此,通过差异表达的受体靶向抗原至

[0008] 这些亚型应该引起不同的免疫反应(Shortman 和 Liu 2002)。此外,在相同 DC 亚型上的不同受体可以指导抗原到单独的加工途径(Trombetta 和 Mellman 2005)。最后,这些受体中一些不是固有活化的(例如,DEC205 (Bonifaz, Bonnyay 等,2004)),而其它的可能是活化的(例如,LOX-1 (Delneste, Magistrelli 等,2002))或还没有被彻底研究。伴随抗原摄取的 DC 活化的重要性还未知。但是如果这是有益的,通过靶向性 mAb 的 DC 活化可能使靶向性疫苗的制剂简单化。

[0009] 发明概述

[0010] 在这些考虑的情况下,本发明的发明人已意识到对通过体外详细研究 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞初次及记忆反应确定对于需要的免疫结果最合适的人 DC 靶向性受体的系统比较的迫切需要。本申请描述特定的 DC 受体 - 树突细胞抑制性受体(DCIR) - 特殊且出乎意料特性,其显示它是对于靶向抗原至人 DC 以用于预防性和治疗性疫苗接种目的来说的理想受体。

[0011] 本发明包括用于制备和使用为引起针对抗原的有效且广泛的免疫反应的目的而特异性靶向(递送)该抗原至抗原呈递细胞的疫苗的组合和方法。该目的主要是引起针对抗原衍生于其的活性剂(agent)(病原体或癌)的保护性或治疗性免疫反应。

[0012] 更特别地,本发明包括组合物、方法以及用于设计和制备以受控的模块结构载有一个或多个抗原的靶特异性单一重组抗体(mAb)、活化蛋白或其它抗体的方法。可以使用本

发明的模块式 rAb 载体例如(通过针对内在化的人树突细胞受体的一个原发重组抗体)靶向多个抗原和 / 或抗原与活化的细胞因子至树突细胞(DC)。此外,本发明还提供以受控且确定的方式首尾相连地连接两种不同的重组 mAb 的方法。

[0013] 本发明包括用于通过分离和纯化 DCIR 特异性抗体或其片段增加表达 DCIR 的抗原呈递细胞的抗原呈递效力的组合物和方法,其中靶试剂(targeted agent)与所述 DCIR 特异性抗体或其片段结合形成抗体-抗原复合物,其中该活性剂通过已与该抗体-活性剂复合物接触的例如树突细胞加工并呈递。在一个实施方案中,抗原呈递细胞是树突细胞并且 DCIR 特异性抗体或其片段与黏结蛋白 /Dockerin(黏结蛋白 / 锚定素)对的一半结合。DCIR 特异性抗体或其片段还可与黏结蛋白 /Dockerin 对的一半结合而抗原与该黏结蛋白 /Dockerin 对的互补性一半(complementary half)结合,形成复合物。非限制的实例活性剂包括一种或多种肽、蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸及其组合。

[0014] 活性剂可以是一种或多种细胞因子,所述细胞因子选自白细胞介素,转化生长因子(TGF),成纤维细胞生长因子(FGF),血小板衍生生长因子(PDGF),表皮生长因子(EGF),结缔组织活性肽(CTAP),成骨因子,以及这些生长因子的生物活性类似物、片段和衍生物,B/T 细胞分化因子,B/T 细胞生长因子,促有丝分裂细胞因子,趋化细胞因子,集落刺激因子,血管生成因子,IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 等,瘦素(leptin),肌肉生长抑制素(myostatin),巨噬细胞刺激蛋白,血小板衍生生长因子, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL,人淋巴毒素- β , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL1- β , IP-10, PF4, GRO, 9E3, 促红细胞生成素,内皮抑素(endostatin),血管抑素(angiostatin), VEGF, 包括 β 转化生长因子(例如 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3)在内的转化生长因子(TGF)超基因家族;骨形态发生蛋白(例如 BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9);肝素结合生长因子(成纤维细胞生长因子(FGF),表皮生长因子(EGF),血小板衍生生长因子(PDGF),胰岛素样生长因子(IGF));抑制素(例如抑制素 A、抑制素 B);生长分化因子(例如 GDF-1);以及活化素(例如活化素 A、活化素 B、活化素 AB)。在另一个实施方案中,活性剂包括抗原,该抗原为细菌蛋白、病毒蛋白、真菌蛋白、原生动动物蛋白或癌蛋白。

[0015] 本发明还包括用于增加树突细胞的抗原呈递效力的组合物和方法,包括结合 DCIR 特异性抗体或其片段,其中抗原与该 DCIR 特异性抗体或其片段结合形成抗体-抗原复合物,其中该抗原通过已与该抗体-抗原复合物接触的树突细胞加工并呈递。另一个实施方案是针对 DCIR 的抗体或其它特异性结合分子用于递送抗原至抗原呈递细胞以引起保护性或治疗性免疫反应的用途。对 DCIR 特异的抗原靶向性试剂用于经皮肤的疫苗接种的用途;DCIR 特异的抗原靶向性试剂与共给药或连接的佐剂相结合用于疫苗接种或者能够作为重组抗原-抗体融合蛋白表达的特定抗原用于抗原靶向(疫苗接种)目的的用途。

[0016] 另一个实施方案包括通过以下用于增加树突细胞的效力的方法:分离患者的树突细胞;使所述树突细胞暴露于活化量的抗 DCIR 抗体或其片段和抗原,形成负载抗原的活化树突细胞;和将所述负载抗原的活化树突细胞再引入所述患者中。抗原可以是细菌蛋白、病毒蛋白、真菌蛋白、原生动动物蛋白或癌蛋白。本发明还包括从哺乳动物细胞分泌的抗 DCIR 免疫球蛋白或其部分以及与该免疫球蛋白结合的抗原。该免疫球蛋白与黏结蛋白 /dockerin 结构域的一半结合,或者它还可包括与同模块式 rAb 载体形成复合物的

抗原结合的黏结蛋白-dockerin 结合对的互补性一半,或与抗原构成融合蛋白的黏结蛋白-dockerin 结合对的互补性一半。抗原特异性结构域可以是全长抗体、抗体可变区结构域、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)2 片段、Fv 片段、Fabc 片段和/或具有部分 Fc 结构域的 Fab 片段。抗 DCIR 免疫球蛋白还可以与毒素结合,其中该毒素选自放射性同位素、金属、酶、肉毒杆菌毒素、破伤风、蓖麻毒素、霍乱、白喉、黄曲霉毒素、产气荚膜梭菌(perfringen)毒素、真菌毒素、志贺菌毒素、葡萄球菌肠毒素 B、T2、seguitoxin、蛤蚌毒素、相思豆毒素、cyanoginosin、 α 毒素、河豚毒素、aconotoxin、蛇毒和蜘蛛毒。抗原可以是与免疫球蛋白构成的融合蛋白或者化学共价结合或不是。

[0017] 另一个实施方案是具有 DCIR 特异性抗体或其片段的疫苗,其中抗原与该 DCIR 特异性抗体或其片段结合形成抗体-抗原复合物,其中该抗原通过已与该抗体-抗原复合物接触的树突细胞加工并呈递。

[0018] 本发明的新型抗体还能显示新的组织分布信息。由于它们的特异亲合力,发现本发明的抗 DCIR 抗体结合猴 DCIR,并且体内 [hu-小鼠] 使用抗 DCIR-Flu m1 靶向扩增 Flu m1 特异性的 CD8 细胞以及离体人皮肤细胞的体外靶向是有效的。此外,发现,DCIR 的碳水化合物配体复合物能被用作抗 DCIR 活性剂的替代品用于抗原递送。因此,本发明的另一个实施方案是 T 细胞抗原,其包括与聚糖的至少一部分结合的抗原性 T 细胞表位肽,该聚糖包括与 DCIR 特异性结合的 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12)。聚糖(及其衍生物)也能单独或组合使用以阻断 DCIR 结合。

[0019] 附图简述

[0020] 为了更完整地理解本发明的特征和优点,现在参考发明详述以及附图,在附图中:

[0021] 图 1 显示通过捕获 ELISA 的 mAb 与结合到板上的 DCIR 的高亲合力相互作用;

[0022] 图 2 显示通过直接 ELISA 的 mAb 与结合到板上的 DCIR 的高亲合力相互作用;

[0023] 图 3 显示用于 FACS 的高亲合抗体的结合;

[0024] 图 4 显示 DCIR 也在从人皮肤直接分离出的三种人 DC 亚型中表达;

[0025] 图 5 显示人扁桃腺中生发中心周围的一群细胞的 DCIR 特异性染色;

[0026] 图 6 显示交联-Flu M1 蛋白和 DCIR 的 mAb 的实例;

[0027] 图 7 显示 Coh. Flu M1 与抗 DCIR_2C9 mAb 的交联;

[0028] 图 8 显示与抗 DCIR mAb 交联的 Flu M1 比没有与 mAb 连接的 Flu M1 蛋白质更有效地诱导 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞的扩增;

[0029] 图 9 显示与抗 DCIR mAb 交联的 Flu M1 通过 LC 比 Int-DC 更有效地诱导 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞的扩增;

[0030] 图 10 显示编码嵌合小鼠-人 rAb 的 H+L 链载体,该嵌合小鼠-人 rAb 相当于许多不同的抗 DCIR mAb 共转染入 293 细胞中,通过抗人 FC ELISA 测定分泌入培养物上清液的 rAb;

[0031] 图 11 显示与抗 DCIR. Doc rAb 连接的 Coh. Flu M1 特异性地与 GM/IL-15 人 DC 结合;

[0032] 图 12 显示与抗 DC-SIGN/L. Doc 或抗 DCIR. Doc rAb 连接的 Coh. Flu M1 结合并内在

化入 GM-CSF/IL-4 人 DC；

[0033] 图 13 显示抗 DCIR. Doc:Coh. Flu 复合物比其它 [抗 DC 受体 rAb. Doc:Coh. Flu M1] 复合物更有效地扩增 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞；

[0034] 图 14 显示给药 1 天的抗 DCIR. Doc:Coh. Flu 复合物比其它 [抗 DC 受体 rAb. Doc:Coh. Flu M1] 复合物更有效地扩增 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞；

[0035] 图 15 显示以与 rAb H 链的 C 末端的融合体表达的多种抗原对 rAb. 抗原的分泌有固有的影响；

[0036] 图 16 显示抗 DCIR. Flu HA5rAb 取决于可变区的性质以不同的效率分泌；

[0037] 图 17 显示抗 DCIR mAb 增强 HIV 抗原特异性 CD8+ 细胞的启动；

[0038] 图 18 显示抗 DCIR mAb 增强 HIV 抗原特异性 CD8+ 细胞的启动；

[0039] 图 19 显示在人上皮层中 DCIR 分布的免疫组织化学分析；

[0040] 图 20A-20D 显示 DCIR 抗原的单克隆抗体对 DCIR 的特异性亲和力；

[0041] 图 21 显示抗 DCIR mAb 与恒河猴 (Rhesus macaque) DCIR 的交叉反应性；

[0042] 图 22 是显示 DCIR 胞外结构域与特定聚糖结构的结合的图表；

[0043] 图 23A 至 23C 显示 DCIR 是对于所有血液 DC 亚型的普遍标靶；以及

[0044] 图 24 显示表明用 DCIR-FluM1 疫苗接种允许产生 FluM1 特异的记忆 CD8+T 细胞免疫性。

[0045] 发明详述

[0046] 当以下详细讨论本发明的多种实施方案的制备及使用时,应该理解本发明提供了许多可以在多种特定情况下具体实施的可应用的发明构思。本文讨论的特定实施方案仅仅是说明制备和使用本发明的特定方法,而不限定本发明的范围。

[0047] 为便于理解本发明,许多术语定义如下。本文定义的术语具有与本发明相关的领域中的普通技术人员通常理解的含义。术语诸如“一个”、“一种”、“该”等不意欲仅仅指单数实体,而是包括其中特定实例可以用于例证的总的类别。本文术语用于描述本发明的特定实施方案,但是它们的用法并不限制本发明,除非在权利要求中概述的。

[0048] 树突细胞(DC)是在调控抗原特异性免疫中起关键作用的抗原呈递细胞(Mellman 和 Steinman 2001), (Banchereau, Briere 等, 2000), (Cella, Sallusto 等, 1997)。DC 捕获抗原,把它们加工成肽,并将它们呈递给 T 细胞。因此将抗原直接递送到 DC 是改良疫苗的焦点领域。一个这样的实施例是使用离体抗原负载然后再给予患者的自体 DC 开发基于 DC 的疫苗(Banchereau, Schuler-Thurner 等, 2001), (Steinman 和 Dhodapkar 2001)。另一个改良疫苗效力的策略是将与针对内在化 DC 特异性受体的抗体结合的抗原特异性靶向 DC。通过关键的小鼠研究突出了对于疫苗接种靶向 DC 的可能性。在体内,用与卵清蛋白(OVA) 偶联的抗 LOX-1mAb 靶向通过向 MHC I 类途径的外源性抗原交叉呈递诱导保护性 CD8+T 细胞反应(Delneste, Magistrelli 等 2002)。此外,与抗 DEC205mAb 结合的 OVA 和 CD40L 成熟刺激物组合在体内增强通过 DC 的 MHC I 类限制性呈递并引起效应器记忆 CD8+T 细胞持久的生成(Bonifaz, Bonnyay 等 2004)。这两个研究均显示显著的剂量节约(即以非常低的抗原剂量产生强的免疫反应)并提示比通常用其它种类 OVA 免疫更广泛的反应。最近通过 DEC205 使 HIV gag 抗原靶向 DC 的工作把这些构思扩展到临床相关抗原并证实使抗原靶向 DC 的宗旨—来自单一疫苗接种的显著的剂量节约的保护性反应,以及在 CD8 和 CD4 两区室中抗原

特异性 T 细胞的扩增(Trumpfheller, Finke 等 2006)。

[0049] 本发明提供以受控的、多变量的方式将多个抗原或蛋白质(独立地从原发 mAb 工程化、表达和纯化)与单一原发重组 mAb 复合。目前,有工程化位点特异的生物素酰化位点以提供将不同的蛋白质(工程化的各个独立地与链霉抗生物素连接)加入该唯一原发 mAb 的方法。然而,本发明提供将单独工程化的蛋白质的多组合以固定的等摩尔比值和位置加入原发 mAb。

[0050] 如本文所用,术语“模块式 rAb 载体”用于描述重组抗体系统,该系统被工程化以提供不同的抗原、活化蛋白质或其它抗体以受控的模块式方式加入单一重组单克隆抗体(mAb)。rAb 可以是使用标准杂交瘤技术、重组抗体展示、人源化单克隆抗体等制备的单克隆抗体。模块式 rAb 载体可用于,例如,(通过一种针对例如人树突细胞受体的内在化受体的原发重组抗体)靶向多个抗原和/或抗原与活化的细胞因子至树突细胞(DC)。模块式 rAb 载体还可以用于以受控且确定的方式首尾相连地连接两种不同的重组 mAb。

[0051] “模块式 rAb 载体”的抗原结合部分可以是一种或多种可变结构域、一种或多种可变结构域与第一恒定结构域, Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段和 Fv 片段,以及 Fabc 片段和/或具有部分 Fc 结构域的 Fab 片段,同源的模块式结合部分添加到氨基酸序列和/或与其结合。模块式 rAb 载体中使用的抗体可以是任何同种型或类别、亚类或者来自任何来源(动物和/或重组体)。

[0052] 在一个非限制性实施例中,模块式 rAb 载体被工程化为具有一种或多种模块式黏结蛋白-dockerin 蛋白质结构域,用于制备在工程化的重组 mAb 情况下的特异且明确的蛋白质复合物。mAb 是包括一种或多种来自 mAb 的抗原结合结构域的模块式黏结蛋白-dockerin 蛋白质结构域羧基的融合蛋白的一部分。黏结蛋白-dockerin 蛋白质结构域甚至可以在翻译后,例如使用化学交联剂和/或二硫键连接。

[0053] 本文使用的术语“抗原”指的是可以在该抗原的接受者中启动体液和/或细胞免疫反应的分子。抗原可以用于本发明的两种不同情况中:作为抗体或 rAb 的其它抗原识别结构域的标靶或者作为分子,该分子通过模块式 rAb 载体的 dockerin/黏结蛋白-分子补体的一部分的 rAb 运送到和/或进入细胞或标靶。抗原通常是引起疾病的活性剂,对于该疾病,疫苗接种可能是有益的治疗。当抗原被呈递在 MHC 上时,该肽通常是约 8 到约 25 个氨基酸。抗原包括任何类型的生物分子,包括,例如,简单的中间代谢物、糖、脂质和激素以及大分子诸如复合碳水化合物、磷脂、核酸和蛋白质。抗原的常见种类包括但不限于病毒抗原,细菌抗原,真菌抗原,原生动物及其他寄生虫抗原,肿瘤抗原,自身免疫性疾病、过敏症和移植排斥中涉及的抗原,及其他各种抗原。

[0054] 模块式 rAb 载体能够运载许多活化剂,例如抗生素、抗感染药、抗病毒药、抗肿瘤药、解热药、镇痛药、抗炎药、骨质疏松症的治疗剂、酶、细胞因子、抗凝血药、多糖、胶原、细胞及两种或更多前述活化剂的组合。使用本发明递送的抗生素的实例无限制地包括四环素、氨基糖苷类、青霉素、头孢菌素、磺胺类药物、氯霉素琥珀酸钠、红霉素、万古霉素、林可霉素、克林霉素、制霉菌素、两性霉素 B、金刚烷胺、碘苷、对氨基水杨酸、异烟肼、利福平、放线菌素 D、光辉霉素、道诺霉素、阿霉素、博来霉素、长春碱、长春新碱、甲基苄肼、咪唑甲酰胺等等。

[0055] 使用本发明递送的抗肿瘤药的实例无限制地包括阿霉素、柔红菌素、紫杉醇、氨甲

喋呤等等。解热药和镇痛药的实例包括阿司匹林、美林 (Motrin®) 布洛芬 (Ibuprofen®)、萘普生、醋氨酚等等。

[0056] 使用本发明递送的抗炎药的实例无限制地包括 NSAIDS、阿司匹林、甾族化合物、地塞米松、氢化可的松、泼尼松龙、双氯芬酸钠等等。

[0057] 使用本发明递送的治疗骨质疏松症的治疗剂和作用于骨和骨骼的其它因子的实例无限制地包括钙, 阿仑膦酸盐, 骨 GLa 肽, 甲状旁腺激素及其活性片段, 组蛋白 H4 相关骨形成和增殖肽及其突变体、衍生物和类似物。

[0058] 使用本发明递送的酶和酶辅因子的实例无限制地包括胰酶 (pancrease)、L- 天冬酰胺酶、透明质酸酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、tPA、链激酶、尿激酶、胰酶制剂、胶原酶、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、血纤维蛋白溶酶原、链激酶、腺苷酸环化酶、过氧化物歧化酶 (SOD) 等等。

[0059] 使用本发明递送的细胞因子的实例无限制地包括白细胞介素, 转化生长因子 (TGF), 成纤维细胞生长因子 (FGF), 血小板衍生生长因子 (PDGF), 表皮生长因子 (EGF), 结缔组织活化肽 (CTAP), 成骨因子及这些生长因子的生物活性类似物、片段和衍生物。细胞因子可以是 B/T 细胞分化因子、B/T 细胞生长因子、促有丝分裂细胞因子、趋化细胞因子、集落刺激因子、血管生成因子、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18 等、瘦素、肌肉生长抑制素、巨噬细胞刺激蛋白、血小板衍生生长因子、TNF- α 、TNF- β 、NGF、CD40L、CD137L/4-1BBL、人淋巴瘤毒素- β 、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、PDGF、IL-1 α 、IL1- β 、IP-10、PF4、GRO、9E3、促红细胞生成素、内皮抑素、血管抑素、VEGF 或其任何片段或组合。其它细胞因子包括转化生长因子 (TGF) 超基因家族成员, 包括 β 转化生长因子 (例如 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3); 骨形态发生蛋白质 (例如, BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9); 肝素结合生长因子 (例如成纤维细胞生长因子 (FGF)、表皮生长因子 (EGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)); 抑制素 (例如, 抑制素 A、抑制素 B); 生长分化因子 (例如, GDF-1); 以及活化素 (例如, 活化素 A、活化素 B、活化素 AB)。

[0060] 使用本发明递送的生长因子的实例无限制地包括可以从天然或自然的来源诸如从哺乳动物细胞分离的, 或可以合成地制备诸如通过重组 DNA 技术或通过多种化学方法制备的生长因子。此外, 可以使用这些因子的类似物、片段或衍生物, 只要它们显示天然分子的至少一些生物活性。例如, 可以通过表达位点特异性突变或其它遗传工程技术改变的基因来制备类似物。

[0061] 使用本发明递送的抗凝血药的实例无限制地包括华法林、肝素、水蛭素等等。使用本发明递送的作用于免疫系统的因子的实例无限制地包括控制炎症和恶性赘生物的因子以及攻击感染性微生物的因子, 诸如趋化肽和缓激肽。

[0062] 病毒抗原的实例包括但不限于, 例如, 逆转录病毒抗原, 诸如来自人免疫缺陷病毒 (HIV) 的逆转录病毒抗原, 诸如 gag、pol 和 env 基因的基因产物, Nef 蛋白, 逆转录酶及其他 HIV 元件; 肝炎病毒抗原, 诸如乙型肝炎病毒的 S、M 和 L 蛋白, 乙型肝炎病毒和其它肝炎例如甲、乙和丙型肝炎病毒的 pre-S 抗原, 病毒元件诸如丙型肝炎病毒 RNA; 流感病毒抗原, 诸如血球凝集素和神经氨酸酶及其他流感病毒元件; 麻疹病毒抗原, 诸如麻疹病毒融合蛋白及其他麻疹病毒元件; 风疹病毒抗原, 诸如蛋白 E1 和 E2 及其他风疹病毒元件; 轮状病毒抗

原,诸如 VP7sc 及其他轮状病毒元件;巨细胞病毒抗原,诸如包膜糖蛋白 B 及其他巨细胞病毒抗原元件;呼吸道合胞体病毒抗原,诸如 RSV 融合蛋白、M2 蛋白及其他呼吸道合胞体病毒抗原元件;单纯性疱疹病毒抗原,诸如立即早期蛋白质、糖蛋白 D 及其他单纯性疱疹病毒抗原元件;水痘带状疱疹病毒抗原,诸如 gpI、gpII 及其他水痘带状疱疹病毒抗原元件;日本脑炎病毒抗原,诸如蛋白 E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2A、80%E 及其他日本脑炎病毒抗原元件;狂犬病病毒抗原,诸如狂犬病糖蛋白、狂犬病核蛋白及其他狂犬病病毒抗原元件。关于病毒抗原的其他实例,参见 *Fundamental Virology*, 第二版, 编著 Fields, B. N. 和 Knipe, D. M. (Raven Press, New York, 1991)。

[0063] 可以使用本发明的 rAb-DC/DC- 抗原疫苗递送的抗原标靶包括编码抗原诸如病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原的基因。病毒包括微小核糖核酸病毒、冠状病毒、披盖病毒、黄病毒、杆状病毒、副粘病毒、正粘病毒、布尼亚病毒、沙粒病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、痘病毒、嗜肝 DNA 病毒和海绵状病毒。其它病毒标靶包括流感、单纯疱疹病毒 1 和 2、麻疹、登革热、天花、脊髓灰质炎或 HIV。病原体包括锥虫、绦虫、蛔虫、蠕虫、疟疾。肿瘤标记物诸如胚胎抗原或前列腺特异性抗原可以以这个方法靶向。其它实例包括:HIV env 蛋白和乙型肝炎表面抗原。根据本发明用于疫苗接种目的的载体的给予可能要求载体结合的抗原是足够非免疫原性的以使得转基因能够长期表达,对此可期望强烈的免疫反应。在一些情况下,个体的疫苗接种可仅是不经常地需要,诸如每年或每两年一次,并提供对传染物的长期免疫保护。本发明用于载体中并最终作为抗原的生物体、过敏原及核酸和氨基酸序列的特定实例可以在美国专利 6,541,011 中找到,该专利的相关部分引入本文作为参考,尤其是可以用于本发明的匹配生物体和特定序列的表格。

[0064] 用于本文公开的 rAb 疫苗的细菌抗原包括但不限于,例如,细菌抗原,诸如百日咳毒素、丝状血球凝集素、百日咳杆菌粘附素、FIM2、FIM3、腺苷酸环化酶及其他百日咳细菌抗原元件;白喉细菌抗原,诸如白喉毒素或类毒素及其他白喉细菌抗原元件;破伤风细菌抗原,诸如破伤风毒素或类毒素及其他破伤风细菌抗原元件;链球菌细菌抗原,诸如 M 蛋白及其他链球菌细菌抗原元件;革兰氏阴性杆菌细菌抗原,诸如脂多糖及其他革兰氏阴性细菌抗原元件;结核分枝杆菌细菌抗原,诸如霉菌酸、热休克蛋白 65 (HSP65)、30kDa 主要分泌性蛋白、抗原 85A 及其他分枝杆菌抗原元件;幽门螺杆菌细菌抗原元件;肺炎球菌细菌抗原,诸如肺炎球菌溶血素、肺炎球菌荚膜多糖及其他肺炎球菌细菌抗原元件;流感嗜血杆菌细菌抗原,诸如荚膜多糖及其他流感嗜血杆菌细菌抗原元件;炭疽细菌抗原,诸如炭疽保护性抗原及其他炭疽细菌抗原元件;立克次氏体细菌抗原,诸如 rompA 及其他立克次氏体细菌抗原元件。本文描述的细菌抗原还包括任何其它细菌、分枝杆菌、支原体、立克次体或衣原体抗原。部分或完整的病原体还可以是:流感嗜血杆菌;镰状疟原虫;脑膜炎奈瑟氏球菌;肺炎链球菌;淋病奈瑟氏菌;伤寒沙门氏菌血清型;志贺氏菌;霍乱弧菌;登革热;脑炎;日本脑炎;莱姆病;鼠疫耶尔森氏菌;西尼罗河病毒;黄热病;兔热病;肝炎(病毒性;细菌性);RSV (呼吸道合胞病毒);HPiV 1 和 HPiV 3;腺病毒;天花;过敏物和癌症物质。

[0065] 用于本发明的组合物和方法的真菌抗原包括但不限于,例如,念珠菌属真菌抗原元件;组织胞浆菌属真菌抗原,诸如热休克蛋白 60 (HSP60) 及其他组织胞浆菌属真菌抗原元件;隐球菌真菌抗原,诸如荚膜多糖及其他隐球菌真菌抗原元件;球孢子菌真菌抗原,诸如小球体抗原及其他球孢子菌真菌抗原元件;以及癣真菌抗原,诸如发癣菌素及其他球孢

子菌真菌抗原元件。

[0066] 原生动物及其他寄生虫抗原的实例包括但不限于,例如,恶性疟原虫抗原,诸如裂殖子表面抗原、子孢子表面抗原、环子孢子抗原、配子母细胞 / 配子表面抗原、红内期抗原 pf155/RESA 及其他疟原虫抗原元件;弓形体属抗原,诸如 SAG-1、p30 及其他弓形体属抗原元件;血吸虫属抗原,诸如谷胱甘肽-S 转移酶、副肌球蛋白及其他血吸虫属抗原元件;利什曼原虫主要及其他利什曼原虫抗原,诸如 gp63、磷脂聚糖及与其相关的蛋白质及其他利什曼原虫抗原元件;以及克氏锥虫抗原,诸如 75-77kDa 抗原、56kDa 抗原及其他锥虫抗原元件。

[0067] 可以使用本发明的 rAb 靶向的抗原通常基于许多因素选择,所述因素包括:内在化的可能性、免疫细胞特异性的水平、靶向的免疫细胞种类、免疫细胞成熟的水平和 / 或活化等等。用于树突细胞的细胞表面标记物的实例包括但不限于, MHC I 类、MHC II 类、B7-2、CD18、CD29、CD31、CD43、CD44、CD45、CD54、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR 和 / 或 ASPGR 等等;而在一些情况下还缺失 CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD 19、CD20、CD56 和 / 或 CD57。抗原呈递细胞的细胞表面标记物的实例包括但不限于, MHC I 类、MHC II 类、CD40、CD45、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体及 IL-2 受体、ICAM-1 和 / 或 Fc γ 受体。用于 T 细胞的细胞表面标记物的实例包括但不限于, CD3、CD4、CD8、CD14、CD20、CD11b、CD16、CD45 和 HLA-DR。

[0068] 用于递送的细胞表面上的靶抗原包括通常来源于肿瘤组织细胞的细胞表面、细胞质、细胞核、细胞器等肿瘤抗原特征性的那些抗原。用于本发明的抗体部分的肿瘤标靶的实例无限制地包括血液癌诸如白血病和淋巴瘤;神经肿瘤诸如星形细胞瘤或恶性胶质瘤;黑色素瘤;乳癌;肺癌;头和颈癌;胃肠肿瘤诸如胃或结肠癌;肝癌;胰腺癌;泌尿生殖器肿瘤诸如宫颈、子宫、卵巢癌,阴道癌,睾丸癌,前列腺癌或阴茎癌;骨肿瘤;血管肿瘤;或唇、鼻咽、咽和口腔、食道、直肠、胆囊、胆道、喉、肺和支气管、膀胱、肾、脑及神经系统的其他部分、甲状腺的癌症;霍奇金氏病;非霍奇金氏淋巴瘤;多发性骨髓瘤和白血病。

[0069] 可以使用本发明单独或组合地递送至免疫细胞用于抗原呈递的抗原的实例包括肿瘤蛋白,例如突变的癌基因;与肿瘤相关的病毒蛋白;以及肿瘤粘蛋白和糖脂。抗原可以是与肿瘤相关的病毒蛋白,其可以是来自上文指出的各类别病毒的病毒蛋白。某些抗原可以是肿瘤特征性的(一个亚集,是肿瘤前体细胞通常不表达的蛋白质),或者可以是肿瘤前体细胞中通常表达的蛋白质,但是具有肿瘤特征性的突变。其它抗原包括具有改变的活性或亚细胞分布的正常蛋白质的突变型变体,例如,产生肿瘤抗原的基因突变。

[0070] 肿瘤抗原的特定的非限制性实例包括:CEA, 前列腺特异性抗原(PSA), HER-2/neu, BAGE, GAGE, MAGE 1-4、6 和 12, MUC (粘蛋白)(例如 MUC-1、MUC-2 等), GM2 和 GD2 神经节苷脂, ras, myc, 酪氨酸酶, MART (黑色素瘤抗原), Pmel 17 (gp100), GnT-V 内含子 V 序列(N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 V 内含子 V 序列), 前列腺 Ca psm, PRAME (黑色素瘤抗原), β -连环蛋白, MUM-1-B (黑色素瘤遍在突变基因产物), GAGE (黑色素瘤抗原) 1, BAGE (黑色素瘤抗原) 2-10, c-ERB2 (Her2/neu), EBNA (EB 病毒核抗原) 1-6, gp75, 人乳头瘤病毒(HPV) E6 和 E7, p53, 肺抗性蛋白(LRP), Bcl-2, 以及 Ki-67。此外,免疫原性分子可以是自身免疫性疾病的起始和 / 或进展中涉及的自身抗原,该自身免疫性疾病的病理学主要是由于相关靶器官、组织或细胞表达的分子特异性的抗体的活性所引起,例如 SLE 或 MG。在这些疾病中,可

能期望将进行中的针对相关自身抗原的抗体介导的(即 Th2 型)免疫反应指向细胞(即 Th1 型)免疫反应。或者,可能期望在没有感染,但是疑似易感染相关自身免疫性疾病的受试者中通过预防性诱导针对适当的自身抗原的 Th1 反应来防止针对自身抗原的 Th2 反应的起始或降低其水平。标靶自身抗原无限制地包括:(a) 对于 SLE, Smith 蛋白、RNP 核糖核蛋白、及 SS-A 和 SS-B 蛋白;以及 (b) 对于 MG, 乙酰胆碱受体的抗原。在一种或多种类型的自身免疫反应中涉及的其它各种抗原的实例包括,例如,内源性激素,诸如黄体生成素、卵泡刺激素、睾丸激素、生长激素、催乳素及其他激素。

[0071] 在自身免疫疾病、过敏症和移植排斥中涉及的抗原可被用于本发明的组合物和方法。例如,在任何一种或多种下列自身免疫疾病或障碍中涉及的抗原可被用于本发明:糖尿病(diabetes、diabetes mellitus),关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎),多发性硬化,重症肌无力,系统性红斑狼疮,自身免疫性甲状腺炎,皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎),银屑病,斯耶格伦氏综合征,包括继发于斯耶格伦氏综合征的干燥性角膜结膜炎,斑秃,由于节肢动物叮咬反应的过敏反应,克罗恩氏病,口疮性溃疡,虹膜炎,结膜炎,角膜结膜炎,溃疡性结肠炎,哮喘,过敏性哮喘,皮肤红斑狼疮,硬皮病,阴道炎,直肠炎,药疹,麻疯病逆向反应,麻风结节性红斑,自身免疫性葡萄膜炎,过敏性脑脊髓炎,急性坏死性出血性脑病,特发性双侧累进性感觉神经性听力丧失,再生障碍性贫血,单纯性红细胞贫血,特发性血小板减少,多软骨炎,韦格纳氏肉芽肿病,慢性活动型肝炎,斯-约二氏综合征,自发性口炎性腹泻,扁平苔癣,克罗恩氏病,格雷夫斯眼病,结节病,原发性胆汁性肝硬化,后葡萄膜炎和间质性肺纤维化。在自身免疫性疾病中涉及的抗原的实例包括谷氨酸脱羧酶 65 (GAD 65)、天然 DNA、髓磷脂碱蛋白、髓磷脂蛋白脂质蛋白、乙酰胆碱受体元件、甲状腺球蛋白和促甲状腺激素(TSH)受体。在过敏症中涉及的抗原的实例包括花粉抗原诸如日本柳杉花粉抗原、豚草花粉抗原、黑麦草花粉抗原,动物来源的抗原诸如灰尘螨抗原和猫科抗原,组织相容性抗原和青霉素及其他治疗性药物。在移植排斥中涉及的抗原的实例包括移植入移植物接受者的移植物的抗原性元件,诸如心脏、肺、肝脏、胰、肾和神经的移植物元件。抗原可以是对治疗自身免疫性疾病有用的改变的肽配体。

[0072] 如同本文使用的,术语“表位”指的是包括与位于由病原体 DNA 或 RNA 编码的多种病原体多肽之任何一种中的表位相似的一级、二级或三级结构的肽或蛋白质抗原。相似性的水平通常达到这样的程度,即针对上述多肽的单克隆或多克隆抗体也会与该肽或蛋白质抗原结合、反应或识别该肽或蛋白质抗原。多种免疫测定方法可以和上述抗体一起使用,例如蛋白质印迹法、ELISA、RIA 等,所有这些都为本领域技术人员所知。适于在疫苗中使用的病原体表位和/或它们的功能等价物的鉴定是本发明的一部分。一旦分离和鉴定,可以容易地获得功能等价物。例如,可以使用如美国专利号 4,554,101 中讲授的 Hopp 的方法,其教导根据亲水性从氨基酸序列鉴定和制备表位,该文献引入本文作为参考。其它一些论文中描述的方法及基于其的软件程序也可以用于鉴定表位核心序列(参见,例如,Jameson 和 Wolf,1988;Wolf 等,1988;美国专利号 4,554,101)。然后可以容易地通过运用肽合成或重组技术把这些“表位核心序列”的氨基酸序列引入肽中。

[0073] 可以把包含编码本发明的抗原的核酸作为活性成分的疫苗组合物制剂制备为注射剂,为液体溶液或悬浮液;也可以制备适于在注射之前溶解或悬浮于液体中的固体形式。

可以把制剂乳化,包封在脂质体中。通常把活性免疫原性成分与药学上可接受并与活性成分相容的载体混合。

[0074] 术语“药学上可接受的载体”指的是在给予的受试者中不引起过敏反应或其它副作用的载体。合适的药学上可接受的载体包括,例如,水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。此外,如果需要,疫苗可以包含少量的辅助性物质,诸如润湿或乳化剂、pH 缓冲剂和 / 或增强疫苗效力的佐剂。可能有效的佐剂的实例包括但不限于:氢氧化铝、N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-nor-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺、MTP-PE 和 RIBI,其包含在 2% 鲨烯 / Tween 80 乳剂中的三种细菌提取成分,单磷酸脂质 A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)。佐剂的其它实例包括 DDA (溴化二甲基双十八烷基铵)、弗氏完全和不完全佐剂以及 QuilA。此外,免疫调节物质,诸如淋巴因子(例如,IFN- γ 、IL-2 和 IL-12)或合成的 IFN- γ 诱导物(诸如聚 I:C)可以和本文描述的佐剂联合使用。

[0075] 如本发明所描述的,药品可以包括具有单一或多拷贝的特定核苷酸序列的裸多核苷酸,该特定核苷酸序列与存在于血浆脂蛋白上的载脂蛋白的特定 DNA 结合位点结合。多核苷酸可以编码生物活性肽、反义 RNA 或核酶并以生理学上可接受的可给药形式提供。可来自本发明的另一种药品以生理学上可接受的可给药形式包括根据本文描述的方法从患者血液或其它来源分离的高度纯化的血浆脂蛋白部分和预先结合到纯化的脂蛋白部分的、包含与存在于血浆脂蛋白上的载脂蛋白的特定 DNA 结合位点结合的单一或多拷贝的特定核苷酸序列的多核苷酸。

[0076] 另一种药品以生理学上可接受的可给药形式包括高度纯化的血浆脂蛋白部分,该血浆脂蛋白部分包括含有单一或多拷贝的特定 DNA 结合基序的重组载脂蛋白片段,其预先结合到包括单一或多拷贝的特定核苷酸序列的多核苷酸上。另一种药品以生理学上可接受的可给药形式包括高度纯化的血浆脂蛋白部分,该血浆脂蛋白部分包括含有单一或多拷贝的特定 DNA 结合基序的重组载脂蛋白片段,其预先结合到包括单一或多拷贝的特定核苷酸序列的多核苷酸上。

[0077] 给药剂量在很大程度上取决于治疗的受试者的体重和身体健康状态以及给药途径和治疗频率。包括预先结合到高度纯化的脂蛋白部分的裸多核苷酸的药物组合物可以按 1 μ g 到 1mg 多核苷酸和 1 μ g 到 100mg 蛋白质的量给药。

[0078] rAb 和 rAb 复合物给予患者可以遵循用于化学疗法给药的一般方案,如果有的话,考虑载体的毒性。预料根据需要重复治疗周期。还考虑,多种标准治疗以及外科手术可以与所述的基因治疗联合施用。

[0079] 在考虑基因治疗临床应用的情况下,需要制备复合物作为适于目的应用的药物组合物。通常这需要制备基本上不含热原以及任何其它对人或动物有害的杂质的药物组合物。通常还期望使用适当的盐和缓冲液以使复合物稳定和允许复合物被靶细胞摄取。

[0080] 本发明的水性组合物可以包括有效量的化合物,其溶解或分散在药学上可接受的载体或水介质中。这些组合物也可以称作接种物。用于药物活性物质的介质和试剂的使用在本领域中为大家所熟知。任何常规介质或试剂除非与活性成分不相容,否则其在治疗组合物中的使用被考虑。补充性活性成分也可以加入组合物中。本发明的组合物可以包括典型的药物制剂。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油类中制备分散体。在通

常的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0081] 疾病状态。取决于要治疗的特定疾病,根据本发明的治疗组合物的给予可以经任何常规途径进行,只要经该途径可达到靶组织以使最大化递送抗原到位点来达到最大的(或在一些情况下最小的)免疫反应。通常可以经原位、皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射给药。递送的其它部位包括:口、鼻、颊、直肠、阴道或局部的。局部给药对于皮肤癌的治疗可能是特别有益的。所述组合物通常作为包括生理学上可接受的载体、缓冲液或其它赋形剂的药学上可接受的组合物给药。

[0082] 本发明的疫苗或治疗组合物可以经注射胃肠外例如皮下或肌内给予。适于其它给药方式的另外的制剂包括栓剂,以及在一些情况下口服制剂或适于分配的制剂如气雾剂。对于口服制剂,使用佐剂的 T 细胞亚型操作,抗原包装或添加单独的细胞因子到多种制剂中产生具有最佳化免疫反应的改良口服疫苗。对于栓剂,常规的粘合剂和载体可以包括,例如,聚亚烷基二醇或甘油三脂;这些栓剂可以由包含 0.5% 到 10%,优选 1%-2% 范围内的活性成分的混合物形成。口服制剂包括通常使用的赋形剂,例如药物级的甘露糖醇、乳糖、淀粉硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或散剂的形式并且包含 10%-95% 的活性成分,优选 25-70%。

[0083] 本发明的编码抗原的核酸可以作为中性的或盐的形式配制入疫苗或治疗组合物中。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与肽的游离氨基形成的),其为与无机酸例如盐酸或磷酸或与有机酸诸如醋酸、草酸、酒石酸、马来酸等形成的盐。与游离羧基形成的盐也可以源自于无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁和有机碱诸如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0084] 疫苗或治疗组合物以与给药制剂相容的方式,以及以预防和/或治疗有效的量给予。要给予的量取决于要治疗的受试者,包括例如受试者的免疫系统对合成抗体的容量,以及期望保护或治疗的程度。合适的剂量范围为每次疫苗接种具有约几百微克级的活性成分,范围为约 0.1mg 到 1000mg,诸如约 1mg 到 300mg 的范围,以及优选约 10mg 到 50mg 的范围。合适的初始给药和强化注射方案也是变化的,但是典型的是初始给药然后是后续的接种或其他给药。给药要求的活性成分的精确定量取决于医师的判断且可能为每个受试者所特有。本领域技术人员清楚,本发明的核酸分子或融合多肽的治疗有效量尤其取决于给药方案,给药抗原的单位剂量,核酸分子或融合多肽是否和其它治疗剂联合给药,接受者的免疫状态和健康状态,以及特定核酸分子或融合多肽的治疗活性。

[0085] 组合物可以以单一剂量方案或以多次剂量方案提供。多次剂量方案中疫苗接种的初始时程可以包括,例如 1-10 个单独的剂量,随后在以维持和或加强免疫反应要求的后续时间间隔给予其它剂量,例如在 1-4 个月给予第二剂量,以及如果需要在数月之后给予后续剂量。需要每隔 1-5 年,通常 3 年的定期加强剂量来维持需要的保护性免疫水平。免疫时程可以继之以与 ESAT6 或 ST-CF 共培养的外周血淋巴细胞(PBL)的体外增殖测定,以及测量致敏淋巴细胞释放的 IFN- γ 水平。可以使用常规的标记物诸如放射性同位素、酶、荧光标记物等进行测定。这些技术为本领域技术人员所知并且可以在美国专利号 3,791,932、4,174,384 和 3,949,064 中找到,这些文献的相关部分通过引用并入本文。

[0086] 模块式 rAb 载体和/或结合的 rAb 载体-(黏结蛋白/dockerin 和/或 dockerin-黏结蛋白)-抗原复合物(rAb-DC/DC-抗原疫苗)可以以一种或多种“单位剂量”提供,这取

决于是否使用核酸载体,最终纯化的蛋白质,或使用的最终的疫苗形式。把单位剂量定义为包含计算以产生与该治疗组合物给药即适当的途径和治疗方式相关的期望反应的预定量的治疗组合物。给药量以及特定的途径和制剂在临床领域技术人员范围之内。还可以评估待治疗的受试者,尤其是,受试者免疫系统的状态和需要的保护。单位剂量不需要以单一注射给药,而是可以包括经设定的一段时间内的连续输注。本发明的单位剂量可以方便地用 DNA/kg (或蛋白质 /Kg) 体重来描述,以约 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.5、1、10、50、100、1,000 或更多 mg/DNA 或蛋白质 /kg 体重的范围给药。同样地,递送的 rAb-DC/DC- 抗原疫苗的量可以从约 0.2 到约 8.0mg/kg 体重变化。因此,在特定实施方案中,可以把 0.4mg、0.5mg、0.8mg、1.0mg、1.5mg、2.0mg、2.5mg、3.0mg、4.0mg、5.0mg、5.5mg、6.0mg、6.5mg、7.0mg 和 7.5mg 的疫苗递送到个体体内。给药的 rAb-DC/DC- 抗原疫苗的剂量在很大程度上取决于治疗的受试者的体重和身体健康状态以及给药途径和治疗频率。包括预先结合到脂质体或病毒递送载体上的裸多核苷酸的药物组合物可以按从 1 μg 到 1mg 多核苷酸到 1 μg 到 100mg 蛋白质的量给药。因此,特定组合物可以包括在约 1 μg、5 μg、10 μg、20 μg、30 μg、40 μg、50 μg、60 μg、70 μg、80 μg、100 μg、150 μg、200 μg、250 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg 或 1,000 μg 之间的多核苷酸或蛋白质,该多核苷酸或蛋白质独立地与 1 μg、5 μg、10 μg、20 μg、3.0 μg、40 μg、50 μg、60 μg、70 μg、80 μg、100 μg、150 μg、200 μg、250 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1mg、1.5mg、5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg 或 100mg 载体结合。

[0087] 在体外细胞系统中测试本发明,该体外细胞系统测量 Flu 抗原靶向的树突细胞对人 Flu 特异性 T 细胞的免疫刺激。本文显示的结果证明在该系统中单独使用无效的抗原剂量下这些抗原特异性细胞的特异性扩增。

[0088] 本发明还可以用于制备模块式 rAb 载体,该模块式 rAb 载体例如是与来自蓖麻毒素、炭疽毒素和葡萄球菌 B 肠毒素的保护性抗原复合的重组人源化 mAb (抗特异性人树突细胞受体)。该实体的潜在市场是所有军事人员的疫苗接种和储备待用给大居民点服药以应对任何与这些试剂相关的生物威胁的存储疫苗。本发明对通常用于人和动物两者的疫苗设计具有广泛的应用。感兴趣的工业包括制药和生物技术工业。

[0089] 一般方法—限制性和 DNA 修饰酶来自于 NEB。质粒和 DNA 片段纯化利用 Qiagen 产品。通过 Simply Blue (Invitrogen) 染色的 4-12%Bis-Tris 凝胶进行 SDS-PAGE。层析柱和树脂来自于 GE Healthcare。通过 DNA 测序 (MCLAB) 确认质粒构建体。DNA 引物来自于 Operon 或 Midland Certified Reagent Company。通过测序仪 (Gene Codes) 进行序列分析。通过 UV 吸收 (NanoDrop ND-1000) 测量基于通过 ProtParam 工具 (2005) 预测所计算的消光系数的蛋白质浓度。序列在序列表 SEQ ID NO. :1-39 中提供,该序列表引入本文作为参考,其比对抗 DCIR mAb 的重链 (SEQ ID NO. :1-17) 和轻链的信号肽和可变区序列 (SEQ ID NO. :18-39)。使用测序仪确定预测的 N-末端信号肽区域,变体之间或紧密相关的序列之间的序列差异。

[0090] C-末端序列延伸到黏结蛋白 -Flex-hMART-1-肽 A-6×His 蛋白质的黏结蛋白结构域。免疫显性肽序列肽加下划线并且结合肽的粗体残基是天然的抗原序列。C-末端 His 标签便于通过 Ni⁺⁺ 亲和层析法纯化。C 186 黏结蛋白 -Flex-hMART-1-肽 A-6×His:

[0091] ASDTTEARHPPVTTPTRRRKGT **TAE** ELAGIGILTV **ILG** GKRTNNSTPTKGEFCRYP

WRPLEHHHHHHH(SEQ ID NO. :40)。

[0092] 抗原表达构建体—PCR用于扩增流感A/波多黎各/8/34/西奈山(H1N1)M1蛋白质的ORF,同时在起始密码子远端加入Nhe I位点并在终止密码子远端加入Not I位点。把消化的片段克隆入pET-28b(+)(Novagen)中,在M1 ORF框内放入His6标签,从而编码His. Flu M1蛋白。把Flu M1 ORF放入类似的载体中,该载体在Nco I位点的远端编码N-末端G蛋白前体B2结构域残基298-352(gi|124267|),继之以编码GGSGGSGGSLD(SEQ ID NO. :41)的接头残基。该载体表达具有Q246E替换的ProG. Flu M1蛋白。编码在Nco I和Nhe I位点之间插入的来自热纤梭菌(*C. thermocellum*)的N-末端169残基黏结蛋白结构域的pET28b(+)-衍生物表达Coh. His。为了表达Coh. Flu M1. His,在上述衍生物的Nhe I和Xho I位点之间插入Flu M1 ORF。类似地制备Coh. PEP. His表达构建体,除了它们使用编码需要的序列的合成DNA之外。在大肠杆菌(*E. coli*)菌株BL21(DE3)(Novagen)或T7 Express(NEB)中表达蛋白质,在37°C下培养,以卡那霉素抗性(40 μg/ml)选择并以200转/min振荡,直至生长到对数中期,同时添加120mg/L IPTG。3小时之后,通过离心收获细胞并存储于-80°C。通过加入Sal I位点代替起始密码子并添加远端Xho I位点以用于在载体Xho I位点处的插入,在上述AP融合分泌载体中用ProG和黏结蛋白片段替换胞外结构域片段。通过删去胞外结构域片段制备'空'AP载体。相应地,这些构建体指导ProG. AP、Coh. AP和AP的分泌。

[0093] 重组蛋白的表达和纯化—将来自各1L发酵物的大肠杆菌细胞重悬在含有0.1ml蛋白酶抑制剂Cocktail II(Calbiochem)的30ml冰冷的0.1M NaPO₄(pH 7.4)(缓冲液A,用于ProG. Flu M1)或50mM Tris、1mM EDTA(pH 8.0)(缓冲液B,用于其它所有蛋白质)中。在冰上以设置18(Fisher Sonic Dismembrator 60)超声处理细胞2×5min,其中有5min休息期,然后在4°C以17,000r.p.m.离心(Sorvall SA-600)20min。对于ProG. Flu M1,使上清液通过5ml在缓冲液A中平衡的Q琼脂糖,然后添加5ml hIgG小珠到Q流过液中并在4°C混合孵育1h。用50ml冷的PBS洗涤小珠结合的蛋白质并用2×10ml 0.1M甘氨酸(pH 2.7)洗脱。用0.1M MES(pH 5.0)缓冲液使合并的洗脱物达到pH 5并且在1ml用50mM MES(pH 5.0)(缓冲液C)平衡的HiTrap S柱上流动。用缓冲液C广泛地洗涤柱结合的蛋白质并用在缓冲液C中的0-1M NaCl梯度洗脱。合并峰级分。对于His. Flu M1纯化,使50ml细胞溶胞产物上清液部分通过5ml Q琼脂糖小珠并把6.25ml 160mM Tris、40mM咪唑、4M NaCl(pH 7.9)添加到琼脂糖流过液中。将其以4ml/min上样到5ml带有Ni²⁺的HiTrap螯合HP柱上。用20mM NaPO₄、300mM NaCl(pH 7.6)(缓冲液D)洗涤柱结合的蛋白质,随后用100mM H₃COONa(pH 4.0)再次洗涤。结合的蛋白质用从100mM到1M H₃COONa(pH 4.0)梯度洗脱。合并峰级分并以4ml/min上样到5ml用100mM H₃COONa(pH 4.0)平衡的HiTrap S柱上,用平衡缓冲液洗涤,随后用50mM NaPO₄(pH 7.5)再次洗涤。用在50mM NaPO₄(pH 7.5)中的0-1M NaCl梯度洗脱结合的蛋白质。合并在大约500mM NaCl下洗脱的峰级分。His. Flu M1制备物具有变量的非全长产品,推测缺失C-末端部分。对于Coh. Flu M1. His纯化,如上超声处理来自2L培养物的细胞,不过在缓冲液B中。离心后,将2.5ml Triton X114添加到上清液中,在冰上孵育5min。在25°C再孵育5min后,在25°C离心之后将上清液与Triton X114分离。重复萃取,使上清液通过5ml Q琼脂糖小珠并将6.25ml 160mM Tris、40mM咪唑、4M NaCl(pH 7.9)添加到琼脂糖流过液中。然后通过如上所述的Ni²⁺螯合层析法纯化蛋白

质并用缓冲液 D 中的 0-500mM 咪唑洗脱。

[0094] 嵌合小鼠 / 人 mAb 的 cDNA 克隆和表达—从杂交瘤细胞制备总 RNA (RNeasy 试剂盒, Qiagen) 并使用提供的 5' 引物和基因特异性 3' 引物用于 cDNA 合成和 PCR (SMART RACE 试剂盒, BD Biosciences):

[0095] mIgG κ , 5' ggatggtgggaagatggatacagttggtgcagcatc3' ; (SEQ ID NO. :42)

[0096] mIgG λ , 5' ctaggacagtcagcacgggacaaactcttctccacagtgtgaccttc3' ; (SEQ ID NO. :43)

[0097] mIgG 1, 5' gtcactggctcagggaaatagcccttgaccaggcatc3' ; (SEQ ID NO. :44)

[0098] mIgG2a, 5' ccaggcatcctagagtcaccgaggagccagt3' ; (SEQ ID NO. :45)

[0099] 和 mIgG2b, 5' ggtgctggaggggacagtcactgagctgctcatagtgt3' . (SEQ ID NO. :46)

[0100] 克隆 (pCR2. 1TA 试剂盒, Invitrogen) PCR 产物并通过 DNA 测序鉴定。使用小鼠 H 和 L 链 V 区 cDNA 的衍生序列, 用特异性引物 PCR 扩增信号肽和 V 区, 同时加入侧面的限制性位点以克隆入编码下游人 IgG κ 或 IgG4H 区的表达载体。通过扩增以 Xho I 和 NotI 位点侧翼的残基 401-731 (gi|63101937|) 并将其插入 pIRES2-DsRed2 (BD Biosciences) 的 Xho I-NotI 间隙中来构建用于表达嵌合 mV κ -hIg κ 的载体。用 PCR 扩增 mAb V κ 区, 从起始密码子开始, 附加 Nhe I 或 Spe I 位点然后是 CACC, 到编码 (例如, gi|76779294| 的残基 126) 区域, 附加 Xho I 位点。然后将 PCR 片段克隆进上述载体的 Nhe I-Not I 间隙。通过将序列

[0101] 5' ctagttgctggctaattggaccccaaaggctcccttttctggagaatacttctgtttctctccctggcttttgagttgtcgtacggattaattaa gggcccactcgag3' (SEQ ID NO. :47) 插入上述载体的 Nhe I-Xho I 间隙中来构建使用 mSLAM 前导序列的嵌合 mV κ -hIg κ 载体。用 PCR 来扩增在预测的成熟 N- 末端密码子 (使用 SignalP 3.0 服务器确定) (Bendtsen, Nielsen 等 2004) 和 mV κ 区的末尾 (如上所确定) 之间的间隔, 同时附加 5' tcgtacgga3'。将用 Bsi WI 和 Xho I 消化的片段插入上述载体的相应位点中。对照 hIg κ 序列相应于 gi|49257887| 残基 26-85 和 gi|21669402| 残基 67-709。对照 hIgG4H 载体相应于 gi|19684072| 的残基 12-1473, 其带有 S229P 和 L236E 取代, 使二硫键稳定并取消残余的 FcR 结合 (Reddy, Kinney 等 2000), 该片段插入 pIRES2-DsRed2 载体 BgI II 和 Not I 位点之间, 同时添加序列 5' gctagctgattaattaa3' 代替终止密码子。用 PCR 来扩增 mAb VH 区, 从起始密码子, 附加 CACC 然后是 BgI II 位点, 直到编码 gi|19684072| 残基 473 的区域。然后将 PCR 片段克隆入上述载体的 BgI II-Apa I 间隙。通过将序列 5' ctagttgctggctaattggaccccaaaggctcccttttctggagaatacttctgtttctctccctggcttttgagttgtcgtacggattaattaagggcc3' (SEQ ID NO. :48) 插入上述载体的 Nhe I-Apa I 间隙来构建使用 mSLAM 前导序列的用于嵌合 mVH-hIgG4 序列的载体。用 PCR 来扩增预测的成熟 N- 末端密码子和 mV κ 区域的末尾之间的间隔, 同时附加 5' tcgtacgga3'。将用 Bsi WI 和 Apa I 消化的片段插入上述载体的相应位点中。

[0102] 将以近端的 Nhe I 位点和远端在终止密码子之后的 Not I 位点侧翼的多种抗原编码序列插入 H 链载体的 Nhe I-Pac I-Not I 间隔中。由带有近端的 5' gctagcgatacaacagaacctgcaacacctacaacacctgtaacaa3' (SEQ ID NO. :49) 序列 (Nhe I 位点后面是编码 cipA 黏结蛋白 - 黏结蛋白接头残基的序列) 和远端的 5' caccatcaccatcaccattgagcggccgc3'

(SEQ ID NO. :50)序列(编码 His6、终止密码子和 Not I 位点)的甲型流感病毒(A/波多黎各/8/34(H1N1))血球凝集素 gi|216931681 残基 82-1025(带有 C982T 替换)编码 Flu HA1-1。以与 Flu HA1-1 相同的序列结合的 gi|50296052| 甲型流感病毒(A/越南/1203/2004(H5N1))血球凝集素残基 49-990 编码 Flu HA5-1。由带有近端的 Nhe I 和远端的 Not I 位点的 gi|40671|ce1D 残基 1923-2150 编码 Doc。由带有近端的序列 5' gctagc gatacaacagaacc tgcaacacctacaacacctgtaacaacaccgacaacaacacttctagcgc3' (SEQ ID NO. :51) (Nhe I 位点和 cipA 间隔区)和远端的 Not I 位点的 gi|34784812| 前列腺特异性抗原残基 101-832 编码 PSA。由 5' gctagc cccattctgagccccctgaccaaaggcattctgggctttgtgtttaccctgaccgtg cccagcgaacgca aggtataacttgattcgttttcacacttacttaagcggccgc3' (SEQ ID NO. :52) 编码 Flu M1-PEP。通过带有适合克隆进 Nhe I 和 Not I 限制性 H 链载体或 Nhe I-Xho I 限制性 Coh. His 载体的末端的互补合成 DNA 片段混合物产生这个和所有其它肽编码序列。始终使用优选的人密码子,除其中需要加入限制性位点或在 CipA 间隔区序列中之外。

[0103] 使用 L-链和 H 链构建体各 ~ 2.5 μ g 和上述操作流程在 5ml 瞬时转染物中测试 rAb 表达构建体的生产水平。通过抗 hIgG ELISA (AffmiPure 山羊抗人 IgG(H+L), Jackson ImmunoResearch)分析上清液。该操作流程的测试中,对于 ~ 2 倍范围各 DNA 浓度(即,该系统是 DNA 饱和的),分泌的 rAb 的产生与 H 链和 L 链载体浓度无关。

[0104] CD34-DC 的产生—从正常的健康供给者的外周血动员 -CD34+HPC 并收集,该供给者皮下接受 10U/kg/天的重组 G-CSF (Neupogen) 5 天。用 CEPRATE SC 干细胞浓缩系统 (ISOLEX)获得 CD34+HPC。通过在补充有 5% 自体血清、50 μ M 2- β -巯基乙醇、1%L-谷氨酰胺、1%青霉素/链霉素和细胞因子;GM-CSF (50ng/ml; Immunex Corp.)、FLT3-L (100ng/ml; R&D)和 TNF- α (10ng/ml; R&D)的 Yssel' s 培养基 (Irvine Scientific, CA)中以 0.5×10^6 /ml 的密度培养产生 CD34-DC。在培养的第 5 天将细胞转入补充有细胞因子的新鲜培养基中,在第 9 天收获细胞。

[0105] CD34-DC 的分选—收获培养的第 9 天的 CD34 衍生的 DC 并用抗 CD1a FITC (Biosource International)和抗 CD14PE (BD Biosciences)染色。用 FACS Vantage (BD Biosciences)分选 CD1a⁺CD14⁻LC 和 CD1a⁻CD14⁺-intDC。纯度常规为 95-99%。

[0106] 自体 CD8⁺T 细胞的纯化—从获自相同供给者的 PBMC 通过用 CD14、CD19、CD16、CD56 和 CD4 小珠排除后使用 CD8 磁珠 (Miltenyi) 来阳性地挑选自体 CD8⁺T 细胞。在一些实验中,记忆 CD8⁺T 细胞分选作 CD8+CCR7-CD45RA-。

[0107] Flu M1 蛋白通过 CD34-DC 亚型交叉呈递给 CD8⁺T 细胞—来自 HLA-A2 供给者的散堆 (bulk) 或分选的 CD34+DC 亚型, CD1a+LC 或 CD14+IntDC (5×10^4 细胞/ml) 与纯化的自体 CD8⁺T 细胞 (1×10^6 细胞/ml) 一起在 Yssel' s 培养基中培养,该培养基补充有 10% 热灭活的合并的 AB 人血清、10U/ml IL-7 (R&D) 和减少剂量的与抗 DC 抗体交联的 Flu M1。24h 后在培养物中添加 CD40L, 3 天后添加 IL-2。8 或 10 天后,通过使用特异性 Flu M1、HLA-A201/pMI、藻红蛋白结合的 iTAg MHC 四聚体 (Beckman Coulter) 分析抗原特异性 CD8⁺T 细胞的增殖水平来评价交叉呈递效率。

[0108] 抗人 DCIR 单克隆抗体的开发—生产受体胞外结构域.hIgG (人 IgG1Fc) 和 HRP (辣根过氧化物酶) 融合蛋白以分别用于小鼠免疫和 mAb 筛选。表达 hDCIR 胞外结构域.IgG 的构建体以前已经描述 (Bates, Fournier 等 1999), 并使用小鼠 SLAM (mSLAM) 信号肽指导

分泌(Bendtsen, Nielsen 等 2004)。使用 PCR 扩增 AP 残基 133-1581 (gb|BC009647|)同时添加近端框内的 Xho I 位点和远端的 TGA 终止密码子与 Not I 位点来产生 hDCIR 胞外结构域 . AP 表达载体。该 Xho I-Not I 片段替换上述 hDCIR 胞外结构域 . IgG 载体中的 IgG 编码序列。通过克隆如上定义的 DCIR 胞外结构域 - 编码区远端的 gi|208493| 残基 14-940 产生 DCIR. HRP 融合蛋白载体。

[0109] 哺乳动物细胞分泌的重组蛋白的表达和纯化—根据厂商的操作流程(1mg 总质粒 DNA 与 1.3ml 293Fectin 试剂 /L 转染)使用 FreeStyle™293 表达系统(Invitrogen)生产融合蛋白。对于重组抗体(rAb)生产,共转染等量的编码 H 和 L 链的载体。培养转染的细胞 3 天,收获培养物上清液并添加新鲜的培养基,继续培养 2 天。通过过滤使合并的上清液澄清。通过 HiTrapA 蛋白亲和层析法以 0.1M 甘氨酸 pH 2.7 洗脱然后对 PBS 透析来纯化受体胞外结构域 . hIgG。通过使用 HiTrap MabSelect™ 柱类似地纯化 rAb。

[0110] 单克隆抗体的产生—通过常规的细胞融合技术产生小鼠 mAb。简要地,用 20 μg 受体胞外结构域 . hIgGFc 融合蛋白与 Ribi 佐剂腹膜内免疫 6 周大的 BALB/c 小鼠,然后以 20 μg 抗原 10 天和 15 天后加强。3 个月后,在取出脾之前 3 天再次加强免疫小鼠。或者,在 30-40 天的周期内用在 Ribi 佐剂中的 1-10 μg 抗原每 3-4 天注射小鼠足垫中一次。最后的加强后 3-4 天,收获引流的淋巴结。使用常规技术将来自脾或淋巴结细胞的 B 细胞与 SP2/O-Ag 14 细胞(Shulman, Wilde 等 1978)融合。对照单独的融合伴侣,或对照融合到 AP 的受体胞外结构域(Bates, Fournier 等 1999),用 ELISA 来筛选受体胞外结构域融合蛋白杂交瘤上清液。然后使用编码全长受体 cDNA 的表达质粒瞬时转染的 293F 细胞在 FACS 中筛选阳性孔。

[0111] 对于抗 DCIR mAb 的开发,来自 1000 个杂交瘤克隆的上清液筛选:

[0112] 90 个在 DCIR. Ig 对 Ig ELISA 上是 +

[0113] 64 个在通过 FACS 的 DCIR-293 细胞上是 +

[0114] 62 个 FACS+ 是 ELISA+

[0115] 2 个是 293+ (并且由此对 DCIR 不是特异的)

[0116] 刺激人 DC 细胞因子产生的抗 DCIR mAb 的生物筛选—对于 DC 靶向目的,可能期望具有递送抗原至 DC 的抗体并伴随地活化 DC 以刺激针对递送的抗原产生免疫反应。因此,我们对直接用于 DC 刺激活性的 62 个 FACS 阳性的抗 DCIR 杂交瘤上清液组进行筛选。CD34+ 衍生的人 DC 与杂交瘤上清液一起培养 24 小时并且 24 小时后测定 DC 培养物上清液中趋化因子 MCP-1 的存在。下面的图显示,与对照相比,许多但不是所有杂交瘤上清液引起 MCP-1 的特异性产生。

[0117] 单细胞克隆上图中以星号标记的选择的杂交瘤(大多数,但是所有刺激 MCP-1 产生)并且在 CELLline 烧瓶(Integra)中扩增。将杂交瘤上清液与相等体积的 1.5M 甘氨酸、3M NaCl、1×PBS (pH 7.8)混合并且与 MabSelect 树脂一起翻转。用结合缓冲液洗涤树脂并用 0.1M 甘氨酸(pH 2.7)洗脱。在用 2M Tris 中和之后,对 PBS 透析 mAb。

[0118] 纯的抗 DCIR mAb 的表征—首先通过 ELISA(DCIR. Ig 与板相结合,用 HRP 结合的抗人 Fc 试剂显影)和通过 DCIR. HRP 捕获测定(mAb 与板相结合,用 DCIR. HRP 融合蛋白显影)测试纯的 mAb。图 1 和 2 显示典型的测定结果,其显示 mAb 与结合板的 DCIR 的高亲和力相互作用,分别通过捕获和直接 ELISA 进行(表明结合特异性的对照没有显示)。在 DCIR. HRP

捕获测定中,一些(但不是所有)mAb 能够捕获可溶的 DCIR. HRP 至板表面。这些数据显示选择的抗 DCIR mAb 组具有大范围的 DCIR 结合亲和力性质。

[0119] 还对纯的 mAb 测试 FACS 反应性,首先测试针对用编码全长 DCIR 的表达质粒瞬时转染的 293 细胞的 FACS 反应性,然后测试针对多种类型的培养和离体的人 DC 的 FACS 反应性。下图显示在 FACS 分析中对 DCIR 293 细胞滴定的一组典型的 mAb(对照细胞是阴性)。

[0120] 图 3 显示 CD14⁺ 和 CD1a⁺ 亚型的 CD34 衍生的人 DC 表达细胞表面 DCIR。这两种 DC 亚型在指导体液对溶细胞性免疫反应中具有完全不同的角色—因此 DCIR 在两亚型上均存在表明通过 DCIR 靶向人 DC 的抗原应该引起两种类型的免疫性—直接针对例如病毒感染的疫苗的重要特征。

[0121] 图 4 显示 DCIR 还在从人皮肤直接分离的 3 种人 DC 亚型上表达。该观察显示对于 DCIR 抗原靶向疫苗,给药进皮肤应该是有益的,因为这些 DC 类型都表达该受体。已知,关于它们的免疫指导性质,这些 DC 类型类似于以上培养的人 DC,因此靶向抗原通过带有 DCIR 的皮肤 DC 对于引起期望的混合免疫反应应该是有益的。

[0122] 从正常人皮肤样品纯化真皮 DC 和 LC。于 4°C 在细菌蛋白酶分散酶 2 型中孵育样品 18h,然后于 37°C 2h。然后将表皮和真皮层分开,切成小块(~ 1-10mm) 并放入补充有 10% 胎牛血清(FBS) 的 RPMI 1640 中。2 天后,收集迁移进培养基中的细胞并使用聚蔗糖(Ficoll) - 泛影葡胺(diatrizoate) 梯度(1.077g/dl) 进一步富集。用抗 CD1a FITC 和抗 CD14 APC mAb 染色后通过细胞分选纯化 DC。

[0123] DCIR 在其它人组织中的存在。图 5 显示在人扁桃腺内围绕一个生发中心的一群细胞的 DCIR 特异性染色。这些细胞可能是常住的 DC 或者例如装载外来抗原并活化后最近迁移到该位点的 DC。染色显示通过除皮肤以外的允许通向产生免疫性的器官的途径的 DCIR 靶向疫苗的给予对于引起免疫反应应该也是有益的。

[0124] 使用抗 DCIR mAb 靶向抗原至人 DC。根据厂商的操作流程使用磺基琥珀酰亚胺基 6-[3' (2-吡啶基二硫)-丙酰胺基]己酸(sulfo-LC-SPDP;Pierce)将 Flu M1 蛋白化学交联至 mAb。该多步操作流程包括在室温下通过经 SPDP 的 NHS 酯基修饰其胺活化 mAb 30min,随后进行对 PBS 的透析。随后,添加含有两个游离的巯基的流感 M1 蛋白并在室温下孵育过夜。通过将 mAb 反应前 Flu M1 蛋白的量与交联后的 mAb/Flu M1 比值相比较评价交联反应的效率。我们计算,平均 50% 的 mAb 与一个 Flu M1 分子起反应。图 6 和 7 显示交叉的 Flu M1 蛋白和 DCIR mAb 的实例。经还原 SDS-PAGE 的分析基于染色的 Flu M1/H 链的比例鉴定产物每个 mAb 有 1-2 个 Flu M1,并且这些制备物用于体外研究。非还原 SDS-PAGE 分析(下面的第二张图)显示复合物主要在 Flu M1 和单一 mAb 之间,这由低百分数的非常大的复合物所证实。

[0125] 图 6 显示 Coh. Flu M1 与抗 DCIR_2C9 mAb 的交联。通过 G 蛋白琼脂糖亲和性纯化的交联产物的还原 SDS-PAGE 分析。从左至右是 2.5 μ g、1 μ g Coh. Flu M1, Coh. Flu M1 与 mAb 以 1:1、2:1、4:1 的比例反应的 10 μ g 产物。

[0126] 图 7 显示 His. Flu M1 与 mAb 的交联。通过 G 蛋白琼脂糖亲和性纯化的交联产物的非还原 SDS-PAGE 分析。从左至右是 5 μ g His. Flu M1,接着是成对的 5 μ g mAb (抗 CD1a_OKT6、抗 LANG_2G3、抗 DCIR_2C9) 和 5 μ g 与 5 μ g His. Flu M1 反应的 mAb。

[0127] 与 Flu M1 蛋白交联的抗 DC 受体 mAb 有效地靶向抗原至人 DC—将抗 DC 受体 mAb

化学交联至 Flu M1 蛋白,并且将多种剂量添加到人 CD34 衍生的 CD1a+DC 与自体 CD8+T 细胞的共培养物中。24h 后将 CD40L 添加至该培养物中用于 DC 活化,随后在第 3 天添加 IL-2 用于 T 细胞增殖。8-10 天后,通过 MHC 四聚体分析来评价对 Flu M1 肽 GILGFVFTL (SEQ ID NO. :53) 特异性的 T 细胞。图 8 显示交联至抗 DCIR mAb 的 Flu M1 引起 Flu M1 特异性细胞的增殖,同时对于类似剂量的非交联 Flu M1 和 mAb 观察到显著更少的 Flu M1 特异性细胞的增殖。剂量范围显示交联的 mAb 比游离的 Flu M1 至少 50 倍更有效地引起反应。该数据证明抗原靶向,即免疫反应的增强—在这种情况下具有特定的 Flu M1 表位的记忆的 T 细胞回忆。将 CD34-DC 分选为 CD1a+LC 或 CD14+IntDC 亚型。图 9 显示抗 DCIR 靶向的 CD1a+LC 在指导 Flu M1 特异性 CD8+ 细胞的扩增上远更有效,尽管在全部两种细胞类型上具有类似的 DCIR 表达水平。

[0128] 图 8 显示与抗 DCIR mAb 交联的 Flu M1 比没有与 mAb 连接的 Flu M1 蛋白更有效地诱导 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞的扩增。将 CD34 衍生的 CD1a+DC 与 CD8+T 细胞和标明浓度的交联至 His. Flu M1 的抗 DCIR_2C9mAb 或与未连接的 mAb 一起孵育。然后对 CD8+T 细胞分析 Flu M1 特异性扩增。内部的方框标明四聚体特异性 CD8+T 细胞的百分数。

[0129] 图 9 显示与抗 DCIR mAb 交联的 Flu M1 通过 LC 比 Int-DC 更有效地诱导 Flu M1 特异性 CD9+T 细胞的扩增。将来自 HLA-A2 供给者的 LC 或 Int-DC 和自体 CD8+T 细胞与标明浓度的与 His. Flu M1 交联的抗 DCIR_2C9 mAb 共培养。通过 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞的频率评价交叉呈递效率,用 HLA-A201/pMI 四聚体分析。内部的方框标明四聚体特异性 CD8+T 细胞的百分数。

[0130] 开发重组抗 DCIR mAb (rAb)作为原型抗原靶向疫苗。开发载体用于在瞬时转染的哺乳动物细胞中分泌的抗 DC 受体 rAb 的表达,该抗 DC 受体 rAb 是小鼠杂交瘤编码的 H 和 L 链可变(V)区以及人 Ig κ 或人 IgG4H 恒定(C)区的嵌合体。将具有不同特异性的抗 DC 受体 mAb (即来自不同的抗 DCIR 杂交瘤)的 L 和 H 链的可变区进行 cDNA 克隆,通过 DNA 序列分析表征,并工程化入这些载体中。图 10 显示编码嵌合小鼠-人 rAb (相当于共转染入 293 细胞的许多不同的抗 DCIR mAb)的 H+L 链载体以及通过抗人 FC ELISA 测定分泌入培养物上清液的 rAb。

[0131] 抗 DCIR rAb 编码~9.5kDa 的 dockerin 结构域,在框内带有 rAb H 链。dockerin 结构域(称为 rAb.Doc)的目的是允许特异性 [rAb.Doc:Coh. 抗原]复合物的装配。在这种情况下,Coh. 抗原指的是在~17.5kDa 黏结蛋白结构域和抗原之间的融合蛋白。用在黏结蛋白和 dockerin 之间的高亲和力相互作用来装配确定的复合物,我们已经证明该复合物递送抗原至具有受体特异性的 DC 的表面。例如,下图显示与人 DC 表面结合的 [抗 DCIR.Doc:Coh. Flu M1] 复合物(这里 Coh. Flu M1 是生物素酰化的并且洗涤步骤后在细胞表面上检测)。对照 rAb.Doc:Coh. Flu M1 复合物(在下图中用红色显示)不比单独的检测链霉抗生物素-PE 试剂结合的多。

[0132] DCIR 慢动力学地使抗原内在化,这使它不同于其它 DC 受体。DC 受体诸如 DC-SIGN 具有快速的内在化动力学特性。例如,图 11 显示抗 DC-SIGN/L.Doc 使 Alexa 标记的 Coh. Flu M1 快速内在化进入 GM-CSF/IFN 培养的人 DC 中—在 15min 之内大部分标记进入细胞内部。相反,抗 DCIR.Doc 非常缓慢地使 Coh. Flu M1 内在化—在 3 小时时内部抗原和细胞表面抗原两者都有显著的数量。该结果鉴别 DCIR 为慢内在化 DC 受体,这与 Bates 等的结论

相反, Bates 等提示“在交联之后, 与 MMR 观察到的快速动力学相反(数据未显示), DCIR 仅在单核细胞和 CD34 衍生的 DC 中缓慢地和微弱地内在化。该发现表明通过受体介导的胞吞作用捕获 Ag 不是 DCIR 的主要功能”。

[0133] 图 11 显示与抗 DCIR. Doc rAb 连接的 Coh. Flu M1 特异性与 GM-CSF/IL-15 人 DC 结合。将单核细胞衍生的 GM-CSF/IL-15 培养的人 DC 跟与 4 倍摩尔过量的生物素酰化 Coh. Flu M1 预混合 1 小时的指明浓度的抗 DCIR. Doc rAb 一起孵育。1 小时后, 洗涤细胞并与链霉抗生物素-PE 一起孵育。再次洗涤后, 通过 FACS 分析细胞以检测细胞结合的 PE。绿色曲线是抗 DCIR. Doc rAb, 红色曲线是对照 IgG4. Doc 复合物。

[0134] 图 12 显示与抗 DC-SIGN/L. Doc 或抗 DCIR. Doc rAb 连接的 Coh. Flu M1 结合 GM-CSF/IL-4 人 DC 并内在化入 GM-CSF/IL-4 人 DC 中。将单核细胞衍生的 GM-CSF/IL-4 培养的人 DC 跟与 4 倍摩尔过量的 Alexa 标记的 Coh. Flu M1 预混合 1 小时的抗 DCIR. Doc 或抗 DC-SIGN/L. Doc rAb 一起孵育。在冰上 1 小时后, 洗涤细胞并置于 37°C。用共聚焦显微镜来分析细胞结合的抗原的细胞定位(用红色显示)。绿色标记细胞膜结合的肌动蛋白。

[0135] 使 Coh. Flu M1 经 DCIR. Doc 靶向人 DC 鉴定 DCIR 为用于疫苗开发目的优异受体。将 Flu M1 抗原经慢内在化 DCIR 受体靶向人 DC 与经快内在化 ASGPR 和 LOX-1 受体靶向相比。监控的免疫反应是 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞的扩增。结果显示通过 DCIR 的靶向比经 LOX-1 或 ASGPR 显著地更有效。在一个类似的实验中, 当与 CD8+T 细胞一起培养之前洗涤 DC 不含残余的 [rAb. Doc:Coh. 抗原] 时, 经 DCIR 的靶向的优异性甚至更明显。该情况可能更接近体内情况, 其中靶向的 DC 可以离开残余的给予抗原以在引流淋巴结中遇到 T 细胞。

[0136] 图 13 显示抗 DCIR. Doc:Coh. Flu 复合物比其它 [抗 DC 受体 rAb. Doc:Coh. Flu M1] 复合物更有效地扩增 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞。CD34 衍生的 CD1a+DC 与 CD8+T 细胞和 8nM (顶组) 或 0.8nM (下组) 各与 Coh. Flu M1 复合的 [抗 DCIR_2C9. Doc:Coh. Flu M1]、抗 LOX1_15C4. Doc、抗 ASGPR_49C11. Doc 或 IgG4. Doc 对照 rAb 共培养。然后对于 CD8+T 细胞分析 Flu M1 特异性扩增。内部的方框表示四聚体特异性 CD8+T 细胞的百分数。

[0137] 图 14 显示给予 1 天的抗 DCIR. Doc:Coh. Flu 复合物比其它 [抗 DC 受体 rAb. Doc:Coh. Flu M1] 复合物更有效地扩增 Flu M1 特异性 CD8+T 细胞。除了在添加自体 CD8+T 细胞之前 1 天洗涤 DC 之外, 研究条件与上图一样。一些抗 DCIR 可变区对融合在 rAb H 链 C 末端的重要抗原的分泌是特别有利的。

[0138] 图 15 显示以与 rAb H 链的 C 末端融合的融合物表达的多种抗原对 rAb. 抗原的分泌有固有的影响。这里在具有两个不同的小鼠可变区特异性的嵌合 hIgG4 rAb 上工程化相同的抗原编码区。将这些表达构建体与适当的 L 链小鼠 V 区-hIgk 构建体共转染入 293F 细胞中并在 3 天后评价 rAb 的分泌。一些 rAb 抗原表达良好, 其它的(包括 Flu HA5-1)非常贫乏。预期每种抗原具有在 rAb 情况下影响分泌的固有生化特性。实际上, 在测试的两种 V 区特异性的情况下, 对表达有引人注目的平行效应。

[0139] Flu HA5 是在针对禽流感的疫苗开发中重要考虑的抗原。图 16 显示出乎意料的发现, 即不同的抗 DCIR V 区(来源于不同的抗 DCIR mAb) 大大影响需要的抗 DCIR. Flu HA5 疫苗的分泌。在下面显示的实施例中, 当与其它 DCIR V 区相比时, DCIR_25A4 对于这种类型的疫苗的分泌是特别有利的。

[0140] 图 16 显示抗 DCIR. Flu HA5 rAb 取决于可变区的性质以不同效率分泌。将编码经

H 链 C 末端与 Doc (蓝色圆形) 或 HA5-1 (红色三角形) 融合的嵌合小鼠 V 区和人 C 区的 H 和 L 链表达质粒共转染入 293 细胞中并且在 3 天以后对于上清液的稀释物通过 ELISA 测定 IgGFc。除了 DCIR_2C9, rAb. Doc 通常表达良好。然而, rAb. HA5-1 的表达变化很大。

[0141] 抗 DCIR 25A4V 区偏爱 rAb. HA5-1 的分泌的独特性质例示了权利要求 5 的应用。其是基于发明人关于特定 V 区可以影响 rAb. 抗原分泌的发明。这意味着在 rAb 融合蛋白的情况下特定抗原固有的贫乏分泌可以通过筛选对于分泌有利的具有需要的结合特异性的不同 V 区来克服。断定这对于任何分泌的 rAb. 融合蛋白作为一条新的一般原理。

[0142] 抗 DCIR 增强 HIV 特异性 CD8+T 细胞的启动。图 17 显示抗 DCIR mAb 对树突细胞具有特别的作用, 即增强启动一肽的摄取及它在表面 MHC 上呈递到对该肽抗原特异的 T 细胞上。该实施例显示用抗 DCIR mAb 与 CD40L 一起刺激 DC 产生大大增加数量的对添加到 DC 培养物中的免疫显性 HIV gag 肽特异的 CD8+T 细胞, CD40L 是一种已知的通常通过同源 T 细胞递送的 DC 活化信号。这个性质对于成功的经抗 DC 受体 rAb 疫苗靶向的抗原是高度预言性的并且表明抗 DCIR 抗原疫苗是优异的。

[0143] 图 17 显示抗 DCIR mAb 增强 HIV 抗原特异性 CD8+ 细胞的启动。用自体 IFN- γ -DC (1×10^5 个细胞 / 孔) 以及 HLA-A201 限制性 HIV 肽 pol (pol₄₇₆₋₄₈₄ ILKEPVHGV (SEQ ID NO. :54)、pol₂₉₃₋₃₀₂ KYTAFTIPSI (SEQ ID NO. :55)) 和 gag (gag₇₇₋₈₅, SLYNTVATL (SEQ ID NO. :56)、gag₁₅₁₋₁₅₉, TLNAWVKVV (SEQ ID NO. :57)) ($5 \mu\text{M}$) 刺激纯化的总 CD8+T 细胞 (2×10^6 个细胞 / 孔)。在 24 孔板中培养细胞 9 天, 该 24 孔板在 4c 用 5ug / 孔于 PBS (pH 9.6) 中稀释的抗 DCIR mAb 或对照单克隆抗体预涂敷过夜并广泛地洗涤。在补充有 10% 人 AB 血清、10U/ml IL-7 (R&D) 和 100ng/ml CD40L (R&D) 的 Yssel' s 培养基中培养细胞。在第 3 天添加 10U/ml IL-2。通过在培养期末计算结合肽 / HLA-A201 四聚体 (Beckman Coulter) 的细胞数目确定肽特异性 CD8+T 细胞的扩增。

[0144] 抗 DCIR mAb 增强交叉启动。图 18 显示抗 DCIR mAb 对树突细胞具有特别的作用, 即增强交叉启动一蛋白质的摄取以及它的正确加工和在表面 MHC 上的呈递, 其通过对该抗原衍生的肽特异的 T 细胞的扩增来测定。该实施例显示用抗 DCIR mAb 与 CD40L 一起刺激 DC 产生大大增加数量的对来自添加到 DC 培养物中的黏结蛋白 -MART-1 融合蛋白的免疫显性 MART-1 表位特异的 CD8+T 细胞, CD40L 是一种已知的通常通过同源 T 细胞递送的 DC 活化信号。这个性质对于经抗 DC 受体 rAb 疫苗靶向的抗原是高度期望的并且表明抗 DCIR 抗原疫苗是优异的。

[0145] 图 18 显示抗 DCIR mAb 增强 HIV 抗原特异性 CD8+ 细胞的启动。除了 coh. MART-1 肽融合蛋白替换肽外, 上图方法与前面的图一样。

[0146] 预期, 在本申请中所讨论的任何实施方案可用本发明的任何方法、试剂盒、试剂或组合物实施, 反之亦然。此外, 本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

[0147] 图 19 显示在人上皮层中 DCIR 分布的免疫组织化学分析。绿色显示 DR-FITC 染色而红色显示 PAB269 (DCIR)-568。右上方图片显示重合的图像。蓝色染色是针对细胞核的 DAPI。数字图像 @40 \times 。该细胞形态学和 DR 染色是表皮郎格罕氏细胞的特征—因此, 该分析显示在郎格罕氏细胞上的 DCIR 表达—指出 DCIR 用于摄取施加到例如划破的皮肤上的抗 DCIR. 抗体结合物的应用。因此, 这些数据表明郎格罕氏细胞摄取与经佐剂的 DC 活化相关的抗原可能产生有效的针对靶向的抗原的细胞反应。

[0148] 图 20A-20D 显示 DCIR 抗原的单克隆抗体对 DCIR 的特异性亲合力。

[0149] DCIR 抗原的固定:通过伯胺(50ug. mL⁻¹, 在 10mM 乙酸钠, pH 5.5 中)将 DCIR 抗原固定到 AKT_iv 共价传感器表面上。使用 EDC 和 NHS 的混合物活化羧化物表面并将 DCIR 与所有四个通道偶联。最后,使用专利阻断剂使全部剩余的羧化物基团失活。

[0150] 四种抗 DCIR 抗体在 HBS 中的亲合力的测定:为确定四种抗 DCIR 抗体的亲合力,从 10 到 0.3125 μg mL⁻¹ 制备每种抗体的稀释物系列并且在固定的 DCIR 抗原上平行注射 180s。在样品注射之间使用 100mM 盐酸的两次 60s 注射再生表面。在 Akubio 声学生物传感器上进行生物传感器测量。

[0151] 表 1. 由四种单克隆抗体与固定的 DCIR 抗原的相互作用计算的动力学参数。

[0152]

抗体	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹ x10 ⁵)	k_d (s ⁻¹ x10 ⁻⁴)	K_D (pM)
杂交瘤 抗 DCIR24A5.4A5	2.07	1.15	560
rAb 抗 DCIR24A5.4A5.DocVar1 C377	2.38	3.26	1370
杂交瘤 抗 DCIR29E9.2E2	5.56	4.70	850
rAb 抗 DCIR29E9.2E2.DocVar1 C409	1.50	2.90	1940

[0153] 表 1 显示两种优选的抗 DCIR 单克隆抗体 24A5 和 9E8 的高亲合力 DCIR 胞外结构域结合性质,并证明当嫁接到人 IgG4 主体上时衍生的小鼠可变区基本上保留高亲合力结合性质。考虑与人 DCIR 相结合的应用,该数据支持对这些可变区的序列 [以及它们的 ' 人源化 ' 衍生物] 的特定权利要求。

[0154] 抗 DCIR mAb 与恒河猴 DCIR 的交叉反应性。为测试抗人 DCIR mAb 与恒河猴 DCIR 的交叉反应性,用设置入哺乳动物表达载体中的恒河猴 DCIR cDNA 转染 293F 细胞。对于抗人 DCIR 抗体组通过 FACS 测试与猴 DCIR 的结合,与未转染的 293F 细胞以及用相同的指导人 DCIR 表达的载体转染的 293F 细胞相比。人和猴 DCIR 序列之间的比较显示如下。那些显示在人和猴 DCIR 之间具有交叉反应性的抗体是特别优选的,因为当设置例如作为重组人源化抗 DCIR 抗原疫苗,作为治疗剂时, NHP 毒性研究也可以解决基于机制的问题 [即, 这些测试也可以解决相对于毒性而言的效力]。

[0155] 人对猴 DCIR。基本的序列显示人,在猴 DCIR 中看到的替换显示于人序列下面。推定的跨膜区用下划线强调。非保守替换用粗体强调显示。

[0156] MTSEITYAEVRFKNEFKSSGINTASSAASKERTAPHKSN**T**GFPKLLCASLLIFLLLLAISFFIAFVIFVFFQKYSQLEKKT (SEQ ID NO. :58)

[0157] MTSEITYAEVR **Q** NESKSSGI **D** SASSAASKR**T**APHKSN**T**GFSKLLCASLMIFLLLLAISFF**E**AF**E**IFFQKYSQLEK **M** **T** (SEQ IDNO. :59)

[0158] TKELVHTTLECVKKNMPVEETAWSCCPKNWKSFSSNCYFISTESASWQDSEKDCARMEAHLLVINTQEE
QDFIFQNLQEE (SEQ ID NO. :60)

[0159] TKDLVHTTLECVKKNMTTEETAWSCCPKNWKPFSSNCYFISTESASWQ **K** SEKDCARMEAHLLVINT
R EEQDFIFQNLQEE (SEQ ID NO. :61)

[0160] SAYFVGLSDPEGQRHWQWVDQTPYNESSTFWHPREPSDPNERCWLNFRKSPKRWGWNDVNCLGPQRSVC
EMMKIHL (SEQ ID NO. :62)

[0161] SAYFVGLSDPEGQRHWQWVDQTPYNESSTFWHPHEPSDP **D** ERCWLNFRKTPKRWGWNDV **H**
CIVPQRSVC EMMKIHL (SEQ ID NO. :63)

[0162] 图 21 显示抗 DCIR mAb 与恒河猴 DCIR 的交叉反应性。一个样品 FACS 分析显示在下面。绿色曲线显示对照 IgG4. gag 重组蛋白的背景结合。红色曲线是通过抗 DCIR. gag 蛋白的结合 [二抗是 PE 标记的抗人 IgGFc]。结果显示在用人 DCIR 表达质粒转染的 293F 细胞上的 9E8 和 24A5mAb 具有相当的结合—在用猴 DCIR 表达质粒转染的 293F 细胞上 9E8 结合而不是 24A5 结合。在一个类似的分析中, mAb 9E8、29G10、31A6、3C2 与猴 DCIR 结合良好, 但是 mAb 24A5、6C8、24E7、5F9、29E9 不结合。

[0163] 图 22 是显示 DCIR 胞外结构域与特定聚糖结构的结合的图表。DCIR 胞外结构域作为从 293F 细胞分泌的 hIgGFc 融合蛋白表达并通过 A 蛋白亲和层析法纯化。对于蛋白质使用 3.0 版的来自 Consortium for Functional Glycomics 的印刷阵列测试特定聚糖的结合—该阵列由 320 个聚糖(或糖形)6 次重复组成。下面显示的 Excel 棋盘式对照表在栏 A-F 中分别代表聚糖数目、结构或名称、6 次重复的平均 RFU 值、标准差、平均值的标准误(用于上面的图表中的误差棒, 其代表全部数据集)和 %CV。栏 C-Y 包括聚糖数目对平均 RFU 的图表, 栏 Z-AE 是来自通过 RFU (高到低)分类以提供具有最高强度结合的聚糖列表的 A-F 的数据。除去每组 6 次重复的最高和最低点, 因此平均值是 4 个值而不是 6 个值的平均值。这除去一些包括单个很高点的假命中。因此, 具有高 %CV 的点应该被认为是可疑的。使用以藻红蛋白标记的抗人 IgG-Fc 的检测完成分析。使用含 2mM Ca 和 Mg、1%BSA 和 0.05%Tween 20 的 Tris- 盐水结合缓冲液在 PBS 中稀释 DCIR. IgFc 至 200 μ g/ml。

[0164] 与 Functional Glycomics Consortium 合作产生该数据。Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12 是最紧密结合 DCIR 胞外结构域的聚糖。测试的其它 hIgGFc 融合蛋白不显示对该聚糖的偏爱, 该聚糖是在一些人血清蛋白上发现的很复杂的碳水化合物。

[0165] 因此, 用聚糖 143 或从一组相关结构中筛选的较高亲合力的衍生物装饰的抗原应该磨练抗原到 DCIR 并作为 DC 靶向疫苗或其它 DCIR 靶向活性剂的抗 DCIR 元件的代用品。在疫苗制造和存储中这可以具有成本效益。

[0166] 表 2.

[0167]



[0168] *** 聚糖 #143 是 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12。

[0169] 图 23A 到 23C 显示 DCIR 是对于所有血液 DC 亚型普遍的标靶。在血液中鉴定了两种 DC 亚型 :CD11c⁺mDC 和 BDCA2⁺pDC。DCIR 是在两种 DC 亚型上都发现的稀有凝集素型受体之一。从细胞分离术纯化 mDC 和 pDC, 并且将各 DC 亚型与自体纯化的 CD8T 细胞和减少浓度的 F1u-MP 的四种重组形式一起培养, 所述 F1u-MP 的四种重组形式为 F1u-MP、与 IgG4 融合的 F1u-MP 以及与两种不同的重组抗 DCIR 抗体 :24A5 和 9E8 融合的 F1u-MP。

[0170] 显示于下面图 23A 中的结果表明两种重组 DCIR-F1u-MP 融合蛋白都能够使 F1u-MP 有效靶向 mDC, 因为这两种蛋白能够在低至 80pM 的浓度下诱导 1.78% 至 2.18% 的四聚体阳性细胞, 在 80pM 的浓度下 F1u-MP 本身和 IgG4-F1u-MP 不能诱导抗原特异性 T 细胞的扩增。pDC 也能在 8nM 下交叉呈递重组 F1u-MP 的四种形式。在 0.8nM 和 80pM 下, 两种 DCIR-F1u-MP 构建体被交叉呈递而两种其它 F1u-MP 构建体未被(下面的图 B)。

[0171] 总之, 这些数据表明 DCIR 有效靶向蛋白质用于通过两种血液 mDC 和 pDC 的交叉呈递。在人中 LC 和 IntDC 能够优先地、分别地启动细胞免疫和体液免疫。靶向抗原至 pan-DC 分子如 DCIR 可能通过靶向多种 DC 亚型诱导广泛的体液和细胞免疫反应。这与亚型特异性抗原递送载体诸如抗 Langerin 相反。

[0172] 图 23A 显示用各 8nM、0.8nM 或 80pM 的 aDCIR-Flu-MP (a#24A5 和 b#9E8)、IgG4-Flu-MP 或 Flu-MP 靶向来自 HLA-A2 供给者的血液衍生的 mDC,用 CD40L 使其成熟并与自体 CD8⁺T 细胞共培养。10d 之后,通过特异性 HLA-A2-M1 四聚体染色 [纵轴] 评估 T 细胞扩增。

[0173] 图 23B 显示用各 8nM、0.8nM 或 80pM 的 aDCIR-Flu-MP (a#24A5 和 b#9E8)、IgG4:Flu-MP 或 Flu-MP 靶向来自 HLA-A2 供给者的血液衍生的 pDC,用 CD40L 使其成熟并与自体 CD8⁺T 细胞共培养。10d 之后,通过特异性 HLA-A2-M1 四聚体染色 [纵轴] 评估 T 细胞扩增。

[0174] 图 23C 显示 DCIR 允许蛋白质通过 LC 和真皮 CD14+DC 的交叉呈递。用各 8nM 的抗 DCIR:Flu-MP、抗 Langerin:Flu-MP 或 IgG4:Flu-MP 靶向来自 HLA-A2 供给者的皮肤衍生的 DC,用 CD40L 使其成熟并与自体 CD8⁺T 细胞共培养。10d 之后,通过特异性 HLA-A2-M1 四聚体染色 [纵轴] 评估 T 细胞扩增。

[0175] 图 24 显示证实用 DCIR-FluM1 疫苗接种允许产生 FluM1 特异的记忆 CD8⁺T 细胞免疫性的结果。用来自 HLA-A*0201+ 健康供给者的 3×10^6 CD34+HPC 移植亚致死量照射的 NOD/SCID β 2m^{-/-} 免疫缺陷小鼠,并在移植后 4-8 星期通过 20×10^6 自体 T 细胞的过继转移重建。小鼠用 5 倍剂量的人重组 FLT3 配体 (FLT3-L) 预处理 10 天以动员 DC。于两个时间点即第 1 天和第 7 天经两个部位 :i. p. 和 i. v. 以 50mcg/ 小鼠聚 IC 作为佐剂递送总共 30mcgDCIR-FluM1 疫苗。通过用基质蛋白 1:FluM158-66 (GILGFVFTL) (SEQ ID NO. :64) 肽负载的四聚体染色血液和组织来评价流感特异性免疫应答的诱导。如图 1 所示,4/5 的用 DCIR-FluM1 接种的小鼠证明,在疫苗接种后第 11 天,结合 FluM1 四聚体的循环人 CD8⁺T 细胞 :0.63%、0.34%、0.21% 和 0.62%。用负载 HIV gag 肽的对照四聚体染色几乎是阴性的。在独立的小鼠组中确认了这些初步结果并且在总共 9/12 接种的小鼠中观察到高亲和力 FluM1 四聚体结合的 CD8⁺T 细胞的扩增。这些结果证明用 DCIR-FluM1 疫苗接种允许产生 FluM1 特异的记忆 CD8⁺T 细胞免疫性。

[0176] 应理解,本文描述的特定实施方案以例证的方式显示而不作为本发明的限制。不背离本发明的范围的前提下,可以在多种实施方案中使用本发明的基本特征。本领域技术人员将识别或仅使用常规实验能够确定本文描述的特定操作的许多等价物。这样的等价物被认为是在本发明的范围之内并被权利要求书所覆盖。

[0177] 在说明书中提到的所有出版物和专利申请指示了本发明所属领域技术人员的技能水平。所有出版物和专利申请均引入本文作为参考,其程度如同各单个出版物或专利申请特别且单独地指出引入本文作为参考一样。

[0178] 词语“一”当和术语“包括”、“包含”、“含有”在权利要求书和/或说明书中一起使用时可以表示“一个(种)”,但是也与“一个(种)或多个(种)”、“至少一个(种)”和“一个(种)或一个(种)以上”的意思一致。在权利要求书中术语“或”的使用用于表示“和/或”,除非尽管公开的内容支持指代唯一的替换物以及“和/或”的定义,但是权利要求书中明确指出指的是唯一的替换物或替换物是相互排斥的。贯穿本申请,术语“大约”用于表示数值包括装置、使用来测定该值的方法的固有误差变异,或存在于研究受试者之中的变化。

[0179] 如本说明书和权利要求书中所用,词语“包括”(及其任何形式)、“具有”(及

其任何形式)、"包含"(及其任何形式)或"含有"(及其任何形式)是包含的或开放的并且不排除另外的、未列举的元件或方法步骤。

[0180] 本文使用的术语"或其组合"指在该术语之前列举的项目的所有排列与组合。例如,"A、B、C或其组合"意指包含A、B、C、AB、AC、BC或ABC至少一个,以及如果在特定的情况下顺序是重要的,还包含BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC或CAB。继续这个例子,明确包括的是包含一个或多个项目或术语的重复的组合,诸如BB、AAA、MB、BBC、AAABCCCC、CBAAAA、CABABB等等。熟练的技术人员可以理解在任何组合中通常没有对项目或术语数目的限制,除非从上下文中是显然的。

[0181] 按照本申请公开的内容而不需要过度的实验,能够制备及实施本文公开及请求保护的所有组合物和/或方法。虽然本发明的组合物和方法已经就优选的实施方案进行了描述,但是本领域技术人员清楚,在不背离本发明的构思、精神及范围的前提下,可以将变化应用于本文所描述的组合物和/或方法以及本文所描述的方法的步骤中或步骤的序列中。所有这样的对本领域技术人员而言显而易见的类似替代和修改被认为在所附的权利要求书所定义的本发明的精神、范围及构思的范围之内。

[0182] 参考文献

[0183] Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18 :767-811.

[0184] Banchereau, J., A. K. Palucka, et al. (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." *Cancer Res* 61 (17) :6451-8.

[0185] Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, et al. (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." *Cell* 106 (3) :271-4.

[0186] Bates, E. E., N. Fournier, et al. (1999). "APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif." *J Immunol* 163 (4) :1973-83.

[0187] Bendtsen, J. D., H. Nielsen, et al. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol* 340 (4) :783-95.

[0188] Berard, F., P. Blanco, et al. (2000). "Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells." *J Exp Med* 192 (11) :1535-44.

[0189] Bonifaz, L. C., D. P. Bonnyay, et al. (2004). "In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination." *J Exp Med* 199 (6) :815-24.

[0190] Carvalho, A. L., F. M. Dias, et al. (2003). "Cellulosome assembly revealed by the crystal structure of the cohesin-dockerin complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (24) :13809-14.

[0191] Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." *Curr Opin Immunol* 9 (1) :10-6.

[0192] Delneste, Y., G. Magistrelli, et al. (2002). "Involvement of LOX-1 in

- dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. " *Immunity* 17(3) :353-62.
- [0193] Figdor, C. G., Y. van Kooyk, et al. (2002). " C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. " *Nat Rev Immunol* 2(2) :77-84.
- [0194] Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, et al. (2004). " Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. " *Annu Rev Immunol* 22 : 33-54.
- [0195] Gerwig, G. J., J. P. Kamerling, et al. (1993). " The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. " *J Biol Chem* 268(36) : 26956-60.
- [0196] Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). " Dendritic cells : specialized and regulated antigen processing machines. " *Cell* 106(3) :255-8.
- [0197] Neidhardt-Berard, E. M., F. Berard, et al. (2004). " Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. " *Breast Cancer Res* 6(4) :R322-8.
- [0198] Orban, J., P. Alexander, et al. (1992). " Sequence-specific 1H NMR assignments and secondary structure of the streptococcal protein G B2-domain. " *Biochemistry* 31(14) :3604-11.
- [0199] Palucka, A. K., J. Gatlin, et al. (2003). " Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+ hematopoietic progenitors. " *Blood* 102(9) :3302-10.
- [0200] Ramakrishna, V., J. F. Treml, et al. (2004). " Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. " *J Immunol* 172(5) :2845-52.
- [0201] Reddy, M. P., C. A. Kinney, et al. (2000). " Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. " *J Immunol* 164(4) :1925-33.
- [0202] Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). " Mouse and human dendritic cell subtypes. " *Nat Rev Immunol* 2(3) :151-61.
- [0203] Shulman, M., C. D. Wilde, et al. (1978). " A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. " *Nature* 276(5685) :269-70.
- [0204] Steinman, R. M. and M. Dhodapkar (2001). " Active immunization against cancer with dendritic cells : the near future. " *Int J Cancer* 94(4) :459-73.
- [0205] Tacke, P. J., I. J. de Vries, et al. (2005). " Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. " *Blood* 106(4) :1278-85.
- [0206] Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). " Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. " *Annu Rev Immunol* 23 :975-1028.
- [0207] Trumpfheller, C., J. S. Finke, et al. (2006). " Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody

vaccine. " J Exp Med 203(3) :607-17.

[0208] Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). " Immunobiology of dendritic cells. " Annu Rev Immunol 18 :767-811.

[0209] Banchereau, J., A. K. Palucka, et al. (2001). " Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. " Cancer Res 61(17) :6451-8.

[0210] Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, et al. (2001). " Dendritic cells as vectors for therapy. " Cell 106(3) :271-4.

[0211] Bates, E. E., N. Fournier, et al. (1999). " APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. " J Immunol 163(4) :1973-83.

[0212] Bendtsen, J. D., H. Nielsen, et al. (2004). " Improved prediction of signal peptides : SignalP 3.0. " J Mol Biol 340(4) :783-95.

[0213] Berard, F., P. Blanco, et al. (2000). " Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. " J Exp Med 192(11) :1535-44.

[0214] Bonifaz, L. C., D. P. Bonnyay, et al. (2004). " In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. " J Exp Med 199(6) :815-24.

[0215] Carvalho, A. L., F. M. Dias, et al. (2003). " Cellulosome assembly revealed by the crystal structure of the cohesin-dockerin complex. " Proc Natl Acad Sci U S A 100(24) :13809-14.

[0216] Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). " Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. " Curr Opin Immunol 9(1) :10-6.

[0217] Delneste, Y., G. Magistrelli, et al. (2002). " Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. " Immunity 17(3) :353-62.

[0218] Figdor, C. G., Y. van Kooyk, et al. (2002). " C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. " Nat Rev Immunol 2(2) :77-84.

[0219] Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, et al. (2004). " Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. " Annu Rev Immunol 22 :33-54.

[0220] Gerwig, G. J., J. P. Kamerling, et al. (1993). " The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. " J Biol Chem 268(36) :26956-60.

[0221] Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). " Dendritic cells : specialized and regulated antigen processing machines. " Cell 106(3) :255-8.

[0222] Neidhardt-Berard, E. M., F. Berard, et al. (2004). " Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic

Tlymphocytes. " Breast Cancer Res 6(4) :R322-8.

[0223] Orban, J. , P. Alexander, et al. (1992). " Sequence-specific 1H NMR assignments and secondary structure of the streptococcal protein G B2-domain. " Biochemistry 31(14) :3604-11.

[0224] Palucka, A. K. , J. Gatlin, et al. (2003). " Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+hematopoietic progenitors. " Blood 102(9) :3302-10.

[0225] Ramakrishna, V. , J. F. Treml, et al. (2004). " Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. " J Immunol 172(5) :2845-52.

[0226] Reddy, M. P. , C. A. Kinney, et al. (2000). " Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. " J Immunol 164(4) :1925-33.

[0227] Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). " Mouse and human dendritic cell subtypes. " Nat Rev Immunol 2(3) :151-61.

[0228] Shulman, M. , C. D. Wilde, et al. (1978). " A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. " Nature 276(5685) :269-70.

[0229] Steinman, R. M. and M. Dhodapkar (2001). " Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. " Int J Cancer 94(4) :459-73.

[0230] Tacke, P. J. , I. J. de Vries, et al. (2005). " Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. " Blood 106(4) :1278-85.

[0231] Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). " Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. " Annu Rev Immunol 23 :975-1028.

[0232] Trumpfheller, C. , J. S. Finke, et al. (2006). " Intensified and protective CD4+T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. " J Exp Med 203(3) :607-17.

[0001]

序列表

<110> 贝勒研究院
G·祖拉夫斯基
J·F·班彻罗

<120> 基于靶向抗原至抗原呈递细胞上表达的 DCIR 的疫苗

<130> BHCS:2096

<150> US 60/888,032

<151> 2007-02-02

<160> 64

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 1

Met	Glu	Trp	Thr	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Gly
1				5					10					15	

Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Lys
			20					25						30	

[0002]

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly
 65 70

<210> 2

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 2

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Met Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

[0003]

Ser Thr Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly
 65 70

<210> 3
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 3

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser

[0004]

65 70

<210> 4

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 4

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly
1 5 10 15

Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Asn Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Val Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Lys
65 70

<210> 5

<211> 73

[0005]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 5

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

 20 25 30

Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

 35 40 45

Asn Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

 50 55 60

Glu Arg Ile Gly Trp Ile Asp Pro Asp

65 70

<210> 6

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

[0006]

<400> 6

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr
 65 70

<210> 7

<211> 75

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 7

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

[0007]

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp
 65 70 75

<210> 8
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 8

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30

[0008]

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp
 65 70 75

<210> 9

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 9

Ser Gly Arg Thr Asn Asp Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe
 1 5 10 15

Thr Ala Asp Thr Ser Ser Lys Lys Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Tyr
 35 40 45

[0009]

Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 50 55 60

Lys Thr Lys Gly
 65

<210> 10

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 10

Ser Gly Arg Thr Asn Asp Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile
 1 5 10 15

Thr Ala Asp Thr Ser Ser Lys Lys Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Tyr
 35 40 45

Ser Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ala Ala
 50 55 60

Lys Thr Lys Gly

[0010]

65

<210> 11
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 11

Tyr Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Val Ala Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr
 35 40 45

Gly Ser Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 50 55 60

Ala Ala Lys Thr Lys Gly
 65 70

<210> 12
 <211> 68

[0011]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 12

Asn	Ser	Arg	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu
1				5				10						15	

Thr	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu
			20					25						30	

Thr	Asn	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Pro	His	Tyr	Asp
		35						40						45	

Leu	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala
	50					55								60	

Lys	Thr	Lys	Gly
65			

<210> 13

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

[0012]

<400> 13

Asn Ser Arg Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Leu
1 5 10 15

Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
20 25 30

Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro His Tyr Asp
35 40 45

Ser Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Gly
65

<210> 14

<211> 72

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 14

Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile
1 5 10 15

[0013]

Thr Ala Asp Thr Ser Pro Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu
 20 25 30

Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Ser Pro
 35 40 45

Met Val Thr Thr Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Thr
 50 55 60

Val Ser Ala Ala Lys Thr Lys Gly
 65 70

<210> 15
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 15

Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe
 1 5 10 15

Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu
 20 25 30

[0014]

Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp Phe Arg
 35 40 45

Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Gly Ser
 50 55 60

Ser Ala Lys Thr Lys Gly
 65 70

<210> 16

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 16

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Phe
 1 5 10 15

Lys Asp Pro Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Arg Ile Thr Ser Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Ser His Tyr Tyr
 35 40 45

[0015]

Gly Ser Thr Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 50 55 60

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly
 65 70

<210> 17
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 17

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ile Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser His Tyr Tyr
 35 40 45

Gly Tyr Gly Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 50 55 60

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly

[0016]

65 70

<210> 18
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化学合成肽

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

<210> 19
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工

<220>

[0017]

<223> 化学合成肽

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Asp Ser Tyr Val Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

<210> 20

<211> 62

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 20

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Gly Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Phe Thr

[0018]

20

25

30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser

35

40

45

Val His Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln

50

55

60

<210> 21

<211> 62

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 21

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Gly Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala

20

25

30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser

35

40

45

Ile His Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln

50

55

60

[0019]

<210> 22
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 22

Met Asp Phe Arg Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Met Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45

Ser Asn Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
 50 55

<210> 23
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

[0020]

<400> 23

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Met Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45

Ser Asn Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
 50 55

<210> 24

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 24

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

[0021]

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn
 35 40 45

Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu
 50 55

<210> 25

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 25

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gly Asn
 35 40 45

Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55

[0022]

- <210> 26
- <211> 60
- <212> PRT
- <213> 人工

- <220>
- <223> 化学合成肽

<400> 26

Met Thr Met Phe Ser Leu Ala Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Val Ser Asp Ser Arg Ala Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 20 25 30

Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Val Thr Ser
 35 40 45

Thr Asp Ile Asp Asp Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

- <210> 27
- <211> 60
- <212> PRT
- <213> 人工

- <220>
- <223> 化学合成肽

[0023]

<400> 27

Met Thr Met Phe Ser Leu Ala Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15

Val Ser Asp Ser Arg Ala Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser

 20 25 30

Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Val Thr Ser

 35 40 45

Thr Asp Ile Asp Asp Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln

 50 55 60

<210> 28

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 28

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Gln

1 5 10 15

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp

 20 25 30

[0024]

Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 29

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 29

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Gln
 1 5 10 15

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp
 20 25 30

Phe Thr Pro Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
 35 40 45

[0025]

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 30
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 30

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu
 1 5 10 15

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp
 20 25 30

Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu

[0026]

65

<210> 31
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 31

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Val
 1 5 10 15

Glu Ser Gly Val Pro Ala Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp
 20 25 30

Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Gln Gln Asn Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 32
 <211> 66

[0027]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 32

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Val

1 5 10 15

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp

20 25 30

Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr

35 40 45

Tyr Cys Gln Gln Asn Ser Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr

50 55 60

Lys Leu

65

<210> 33

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

[0028]

<400> 33

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu
 1 5 10 15

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp
 20 25 30

Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 34

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 34

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
 1 5 10 15

[0029]

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 20 25 30

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 35
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 35

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 20 25 30

[0030]

Tyr Ser Leu Thr Thr Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 35 40 45

Cys Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 36

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 36

Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu
 1 5 10 15

Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln
 20 25 30

Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr
 35 40 45

[0031]

Tyr Cys Gln His Phe Trp Asp Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 50 55 60

Leu
 65

<210> 37
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 37

Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu
 1 5 10 15

Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln
 20 25 30

Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu

[0032]

65

<210> 38
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 38

Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp
 20 25 30

Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Leu Gln Ser Gly Asn Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
 65

<210> 39
 <211> 66

[0033]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 39

Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu
1 5 10 15

Arg Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp
 20 25 30

Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr
 35 40 45

Tyr Cys Leu Gln Ser Gly Asn Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 50 55 60

Lys Leu
65

<210> 40

<211> 71

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

[0034]

<400> 40

Ala Ser Asp Thr Thr Glu Ala Arg His Pro His Pro Pro Val Thr Thr
1 5 10 15

Pro Thr Thr Asp Arg Lys Gly Thr Thr Ala Glu Glu Leu Ala Gly Ile
 20 25 30

Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Gly Lys Arg Thr Asn Asn Ser Thr
 35 40 45

Pro Thr Lys Gly Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ser His Trp Arg Pro Leu
 50 55 60

Glu His His His His His His
65 70

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 41

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Asp
1 5 10

[0035]

<210> 42

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 42

ggatggtggg aagatggata cagttggtgc agcatc

36

<210> 43

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 43

ctaggaacag tcagcacggg acaaactctt ctccacagtg tgaccttc

48

<210> 44

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 44

[0036]

gtcactggct cagggaaata gcccttgacc aggcac

37

<210> 45

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 45

ccaggcatcc tagagtcacc gaggagccag t

31

<210> 46

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 46

ggtgctggag gggacagtca ctgagctgct catagtgt

38

<210> 47

<211> 107

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

[0037]

<400> 47	
ctagttgctg gctaattggac cccaaaggct ccctttcctg gagaatactt ctgtttctct	60
ccctggcttt tgagttgtcg tacggattaa ttaagggccc actcgag	107
<210> 48	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 化学合成寡核苷酸	
<400> 48	
ctagttgctg gctaattggac cccaaaggct ccctttcctg gagaatactt ctgtttctct	60
ccctggcttt tgagttgtcg tacggattaa ttaagggccc	100
<210> 49	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 化学合成寡核苷酸	
<400> 49	
gctagcgata caacagaacc tgcaaacacct acaaacacctg taacaa	46
<210> 50	
<211> 29	
<212> DNA	

[0038]

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 50

caccatcacc atcaccattg agcggccgc

29

<210> 51

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 51

gctagcgata caacagaacc tgcaaacacct acaaacctg taacaacacc gacaacaaca 60

cttctagcgc

70

<210> 52

<211> 119

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成寡核苷酸

<400> 52

gctagcccca ttctgagccc cctgacaaa ggcattctgg gctttgtgtt taccctgacc 60

gtgccagcg aacgcaaggg tatacttgga ttcgtttca cactactta agcggccgc 119

[0039]

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化学合成肽

<400> 53

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化学合成肽

<400> 54

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

[0040]

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 55

Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile

1 5 10

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 56

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 57

Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val

1 5

[0041]

<210> 58
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 58

Met Thr Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Phe Lys Asn Glu Phe
 1 5 10 15

Lys Ser Ser Gly Ile Asn Thr Ala Ser Ser Ala Ala Ser Lys Glu Arg
 20 25 30

Thr Ala Pro His Lys Ser Asn Thr Gly Phe Pro Lys Leu Leu Cys Ala
 35 40 45

Ser Leu Leu Ile Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ile Ser Phe Phe Ile Ala
 50 55 60

Phe Val Ile Phe Phe Gln Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Lys Lys Thr
 65 70 75 80

<210> 59
 <211> 79
 <212> PRT

[0042]

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 59

Met Thr Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Gln Asn Glu Ser Lys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Ile Asp Ser Ala Ser Ser Ala Ala Ser Lys Lys Arg Thr
 20 25 30

Ala Pro His Lys Ser Asn Thr Gly Phe Ser Lys Leu Leu Cys Ala Ser
 35 40 45

Leu Met Ile Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ile Ser Phe Phe Phe Ala Phe
 50 55 60

Phe Ile Phe Phe Gln Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Lys Met Thr
65 70 75

<210> 60

<211> 80

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

[0043]

Thr Thr Glu Glu Thr Ala Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asn Trp Lys Pro
 20 25 30

Phe Ser Ser Asn Cys Tyr Phe Ile Ser Thr Glu Ser Ala Ser Trp Gln
 35 40 45

Lys Ser Glu Lys Asp Cys Ala Arg Met Glu Ala His Leu Leu Val Ile
 50 55 60

Asn Thr Arg Glu Glu Gln Asp Phe Ile Phe Gln Asn Leu Gln Glu Glu
 65 70 75 80

<210> 62

<211> 77

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 62

Ser Ala Tyr Phe Val Gly Leu Ser Asp Pro Glu Gly Gln Arg His Trp
 1 5 10 15

Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Glu Ser Ser Thr Phe Trp His
 20 25 30

[0045]

Pro Arg Glu Pro Ser Asp Pro Asn Glu Arg Cys Val Val Leu Asn Phe
 35 40 45

Arg Lys Ser Pro Lys Arg Trp Gly Trp Asn Asp Val Asn Cys Leu Gly
 50 55 60

Pro Gln Arg Ser Val Cys Glu Met Met Lys Ile His Leu
 65 70 75

<210> 63
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 化学合成肽

<400> 63

Ser Ala Tyr Phe Val Gly Leu Ser Asp Pro Glu Gly Gln Arg His Trp
 1 5 10 15

Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Glu Ser Ser Thr Phe Trp His
 20 25 30

Pro His Glu Pro Ser Asp Pro Asp Glu Arg Cys Val Val Leu Asn Phe
 35 40 45

Arg Lys Thr Pro Lys Arg Trp Gly Trp Asn Asp Val His Cys Ile Val

[0046]

50

55

60

Pro Gln Arg Ser Val Cys Glu Met Met Lys Ile His Leu

65

70

75

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化学合成肽

<400> 64

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

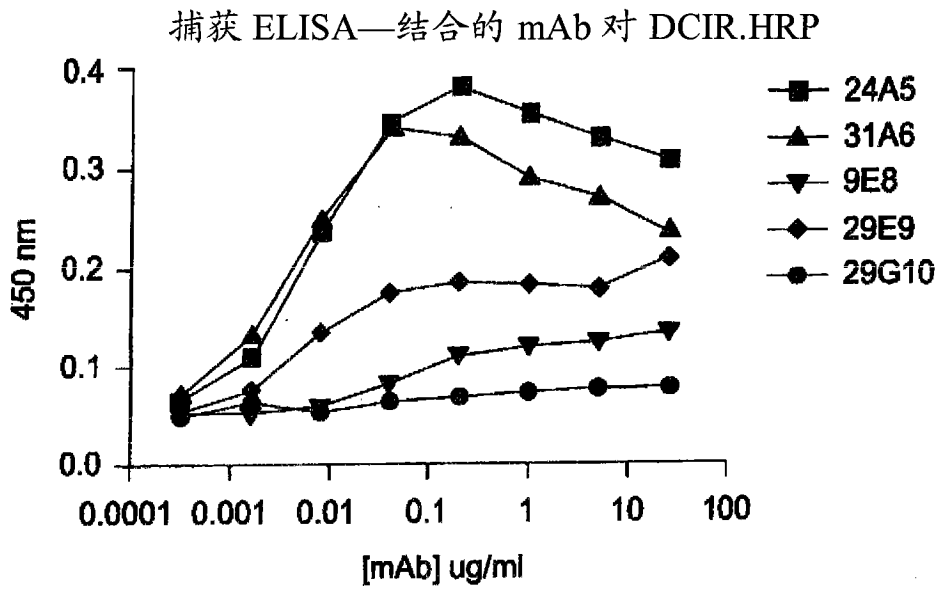


图 1

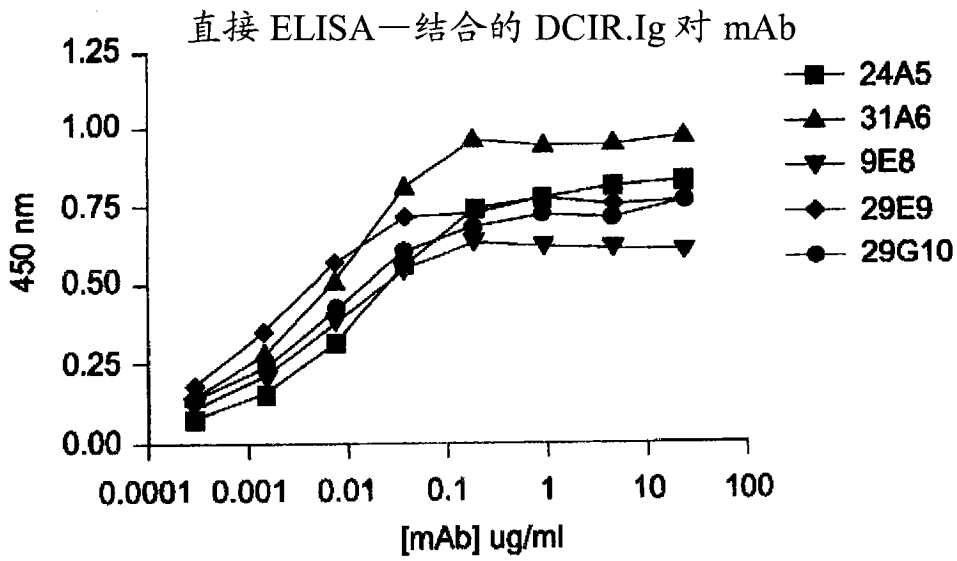


图 2

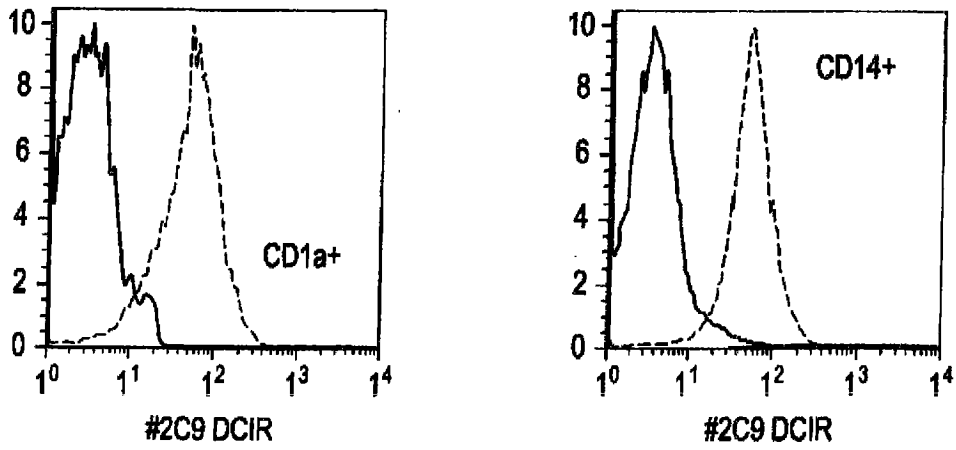


图 3

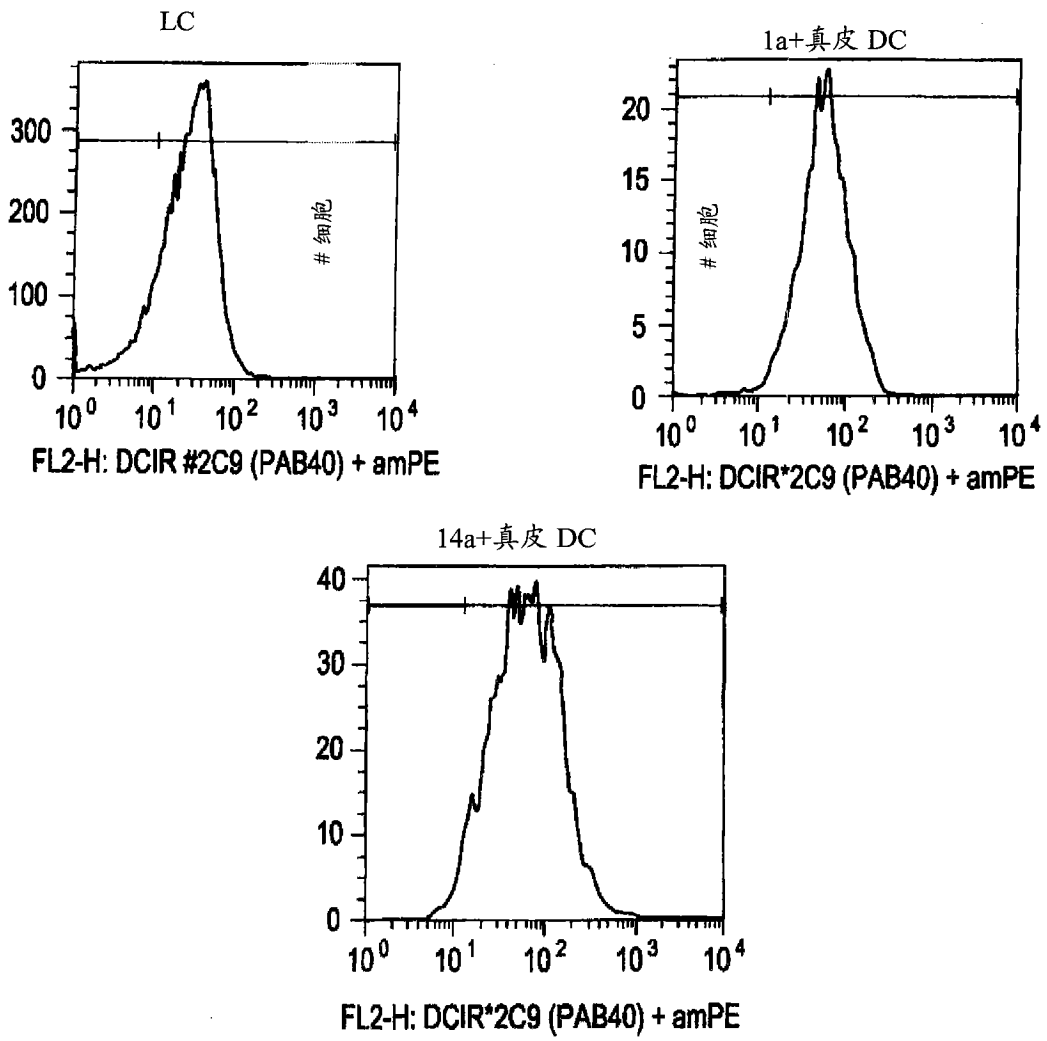


图 4

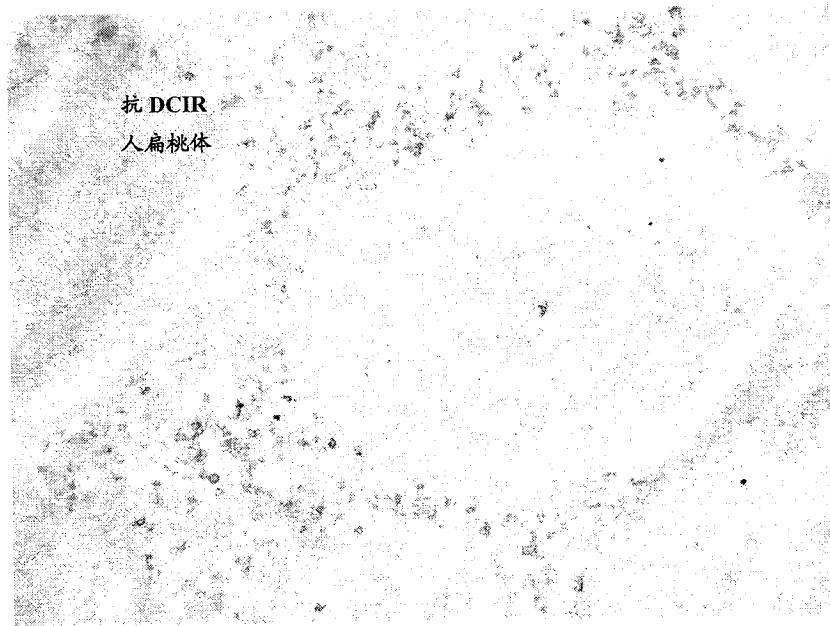


图 5

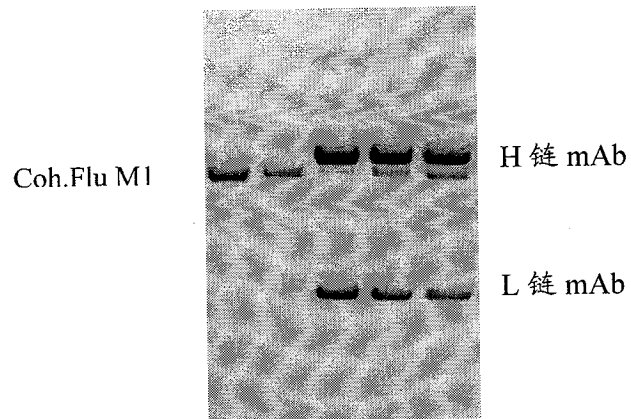


图 6

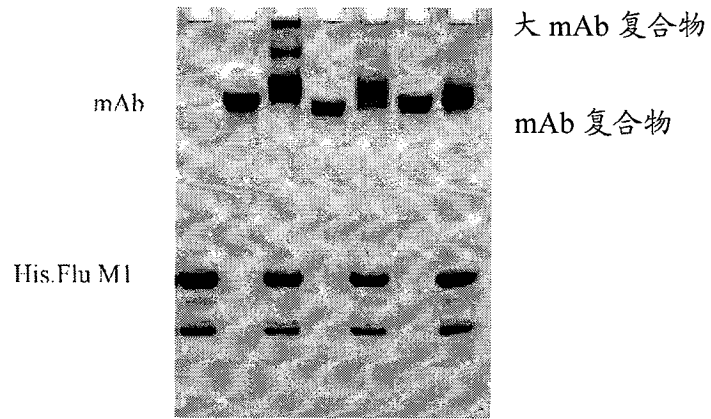


图 7

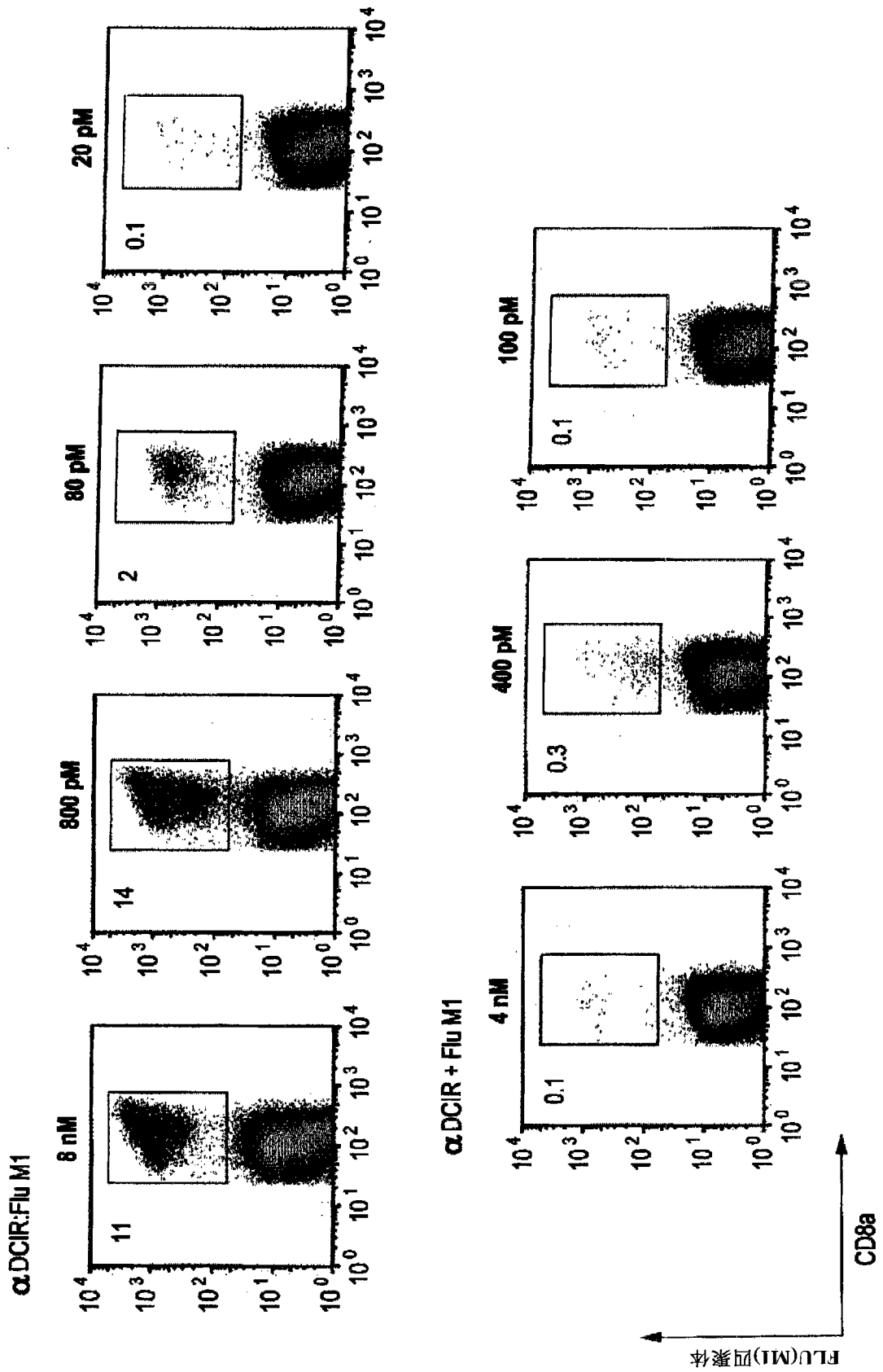


图 8

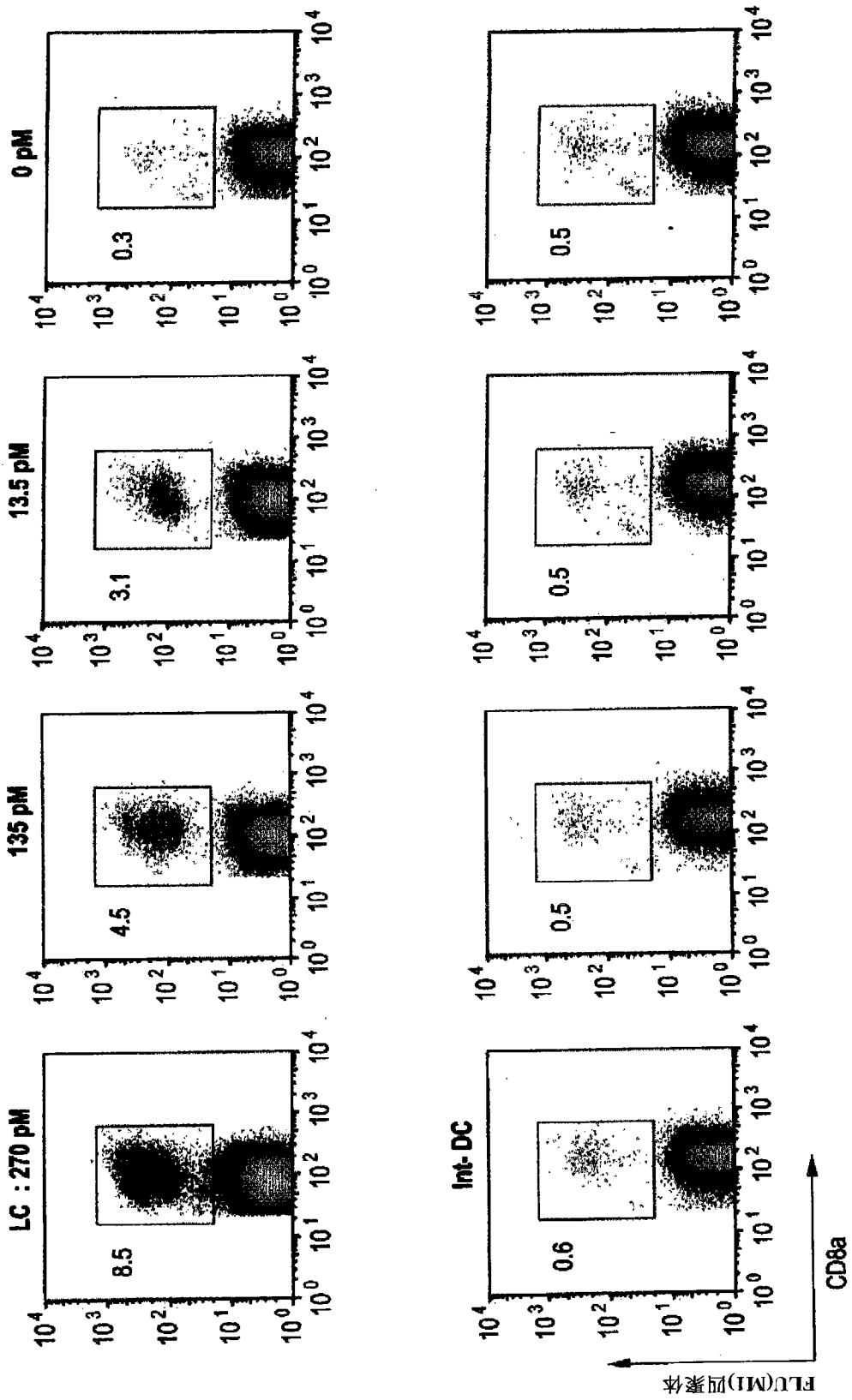


图 9

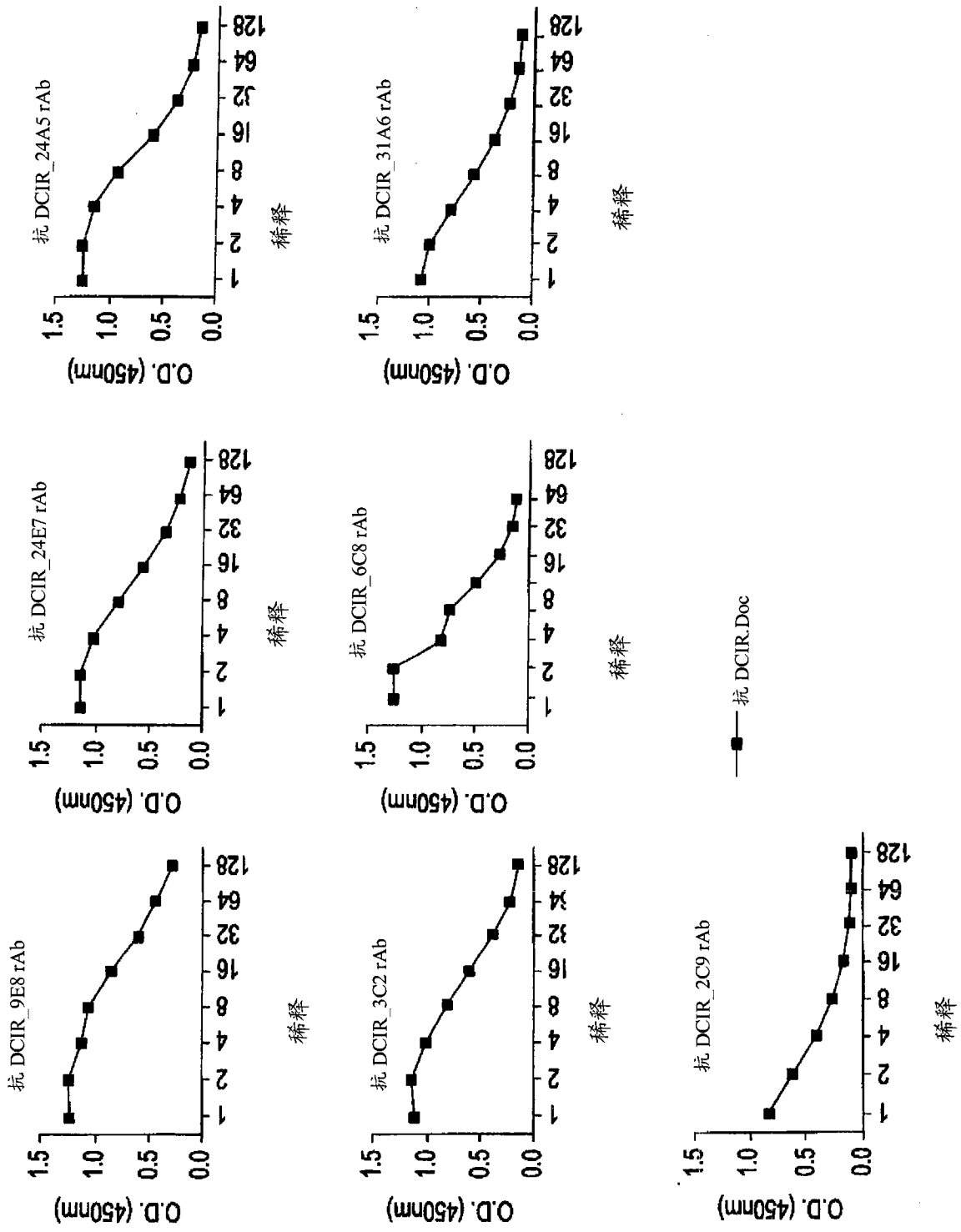


图 10

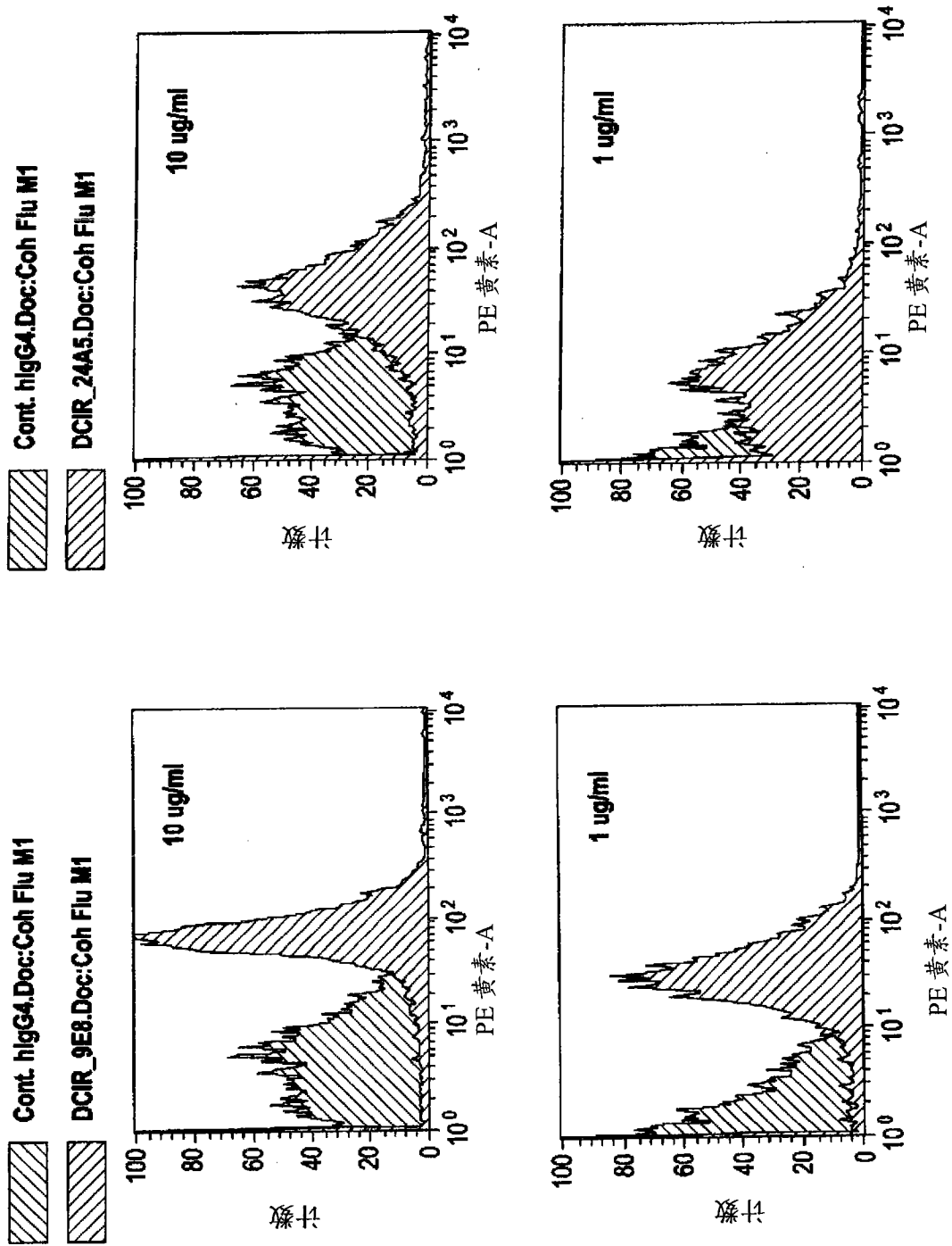


图 11

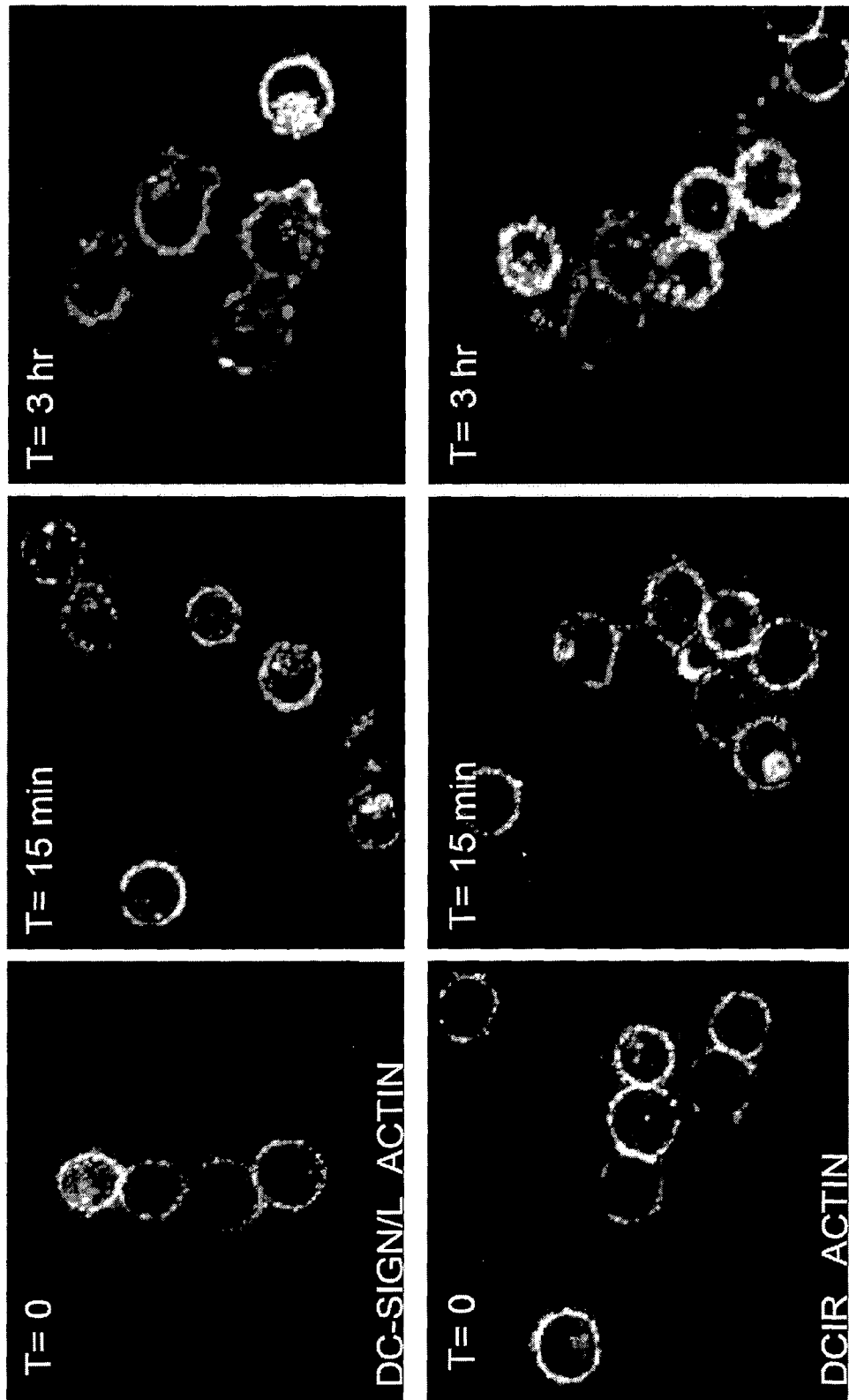


图 12

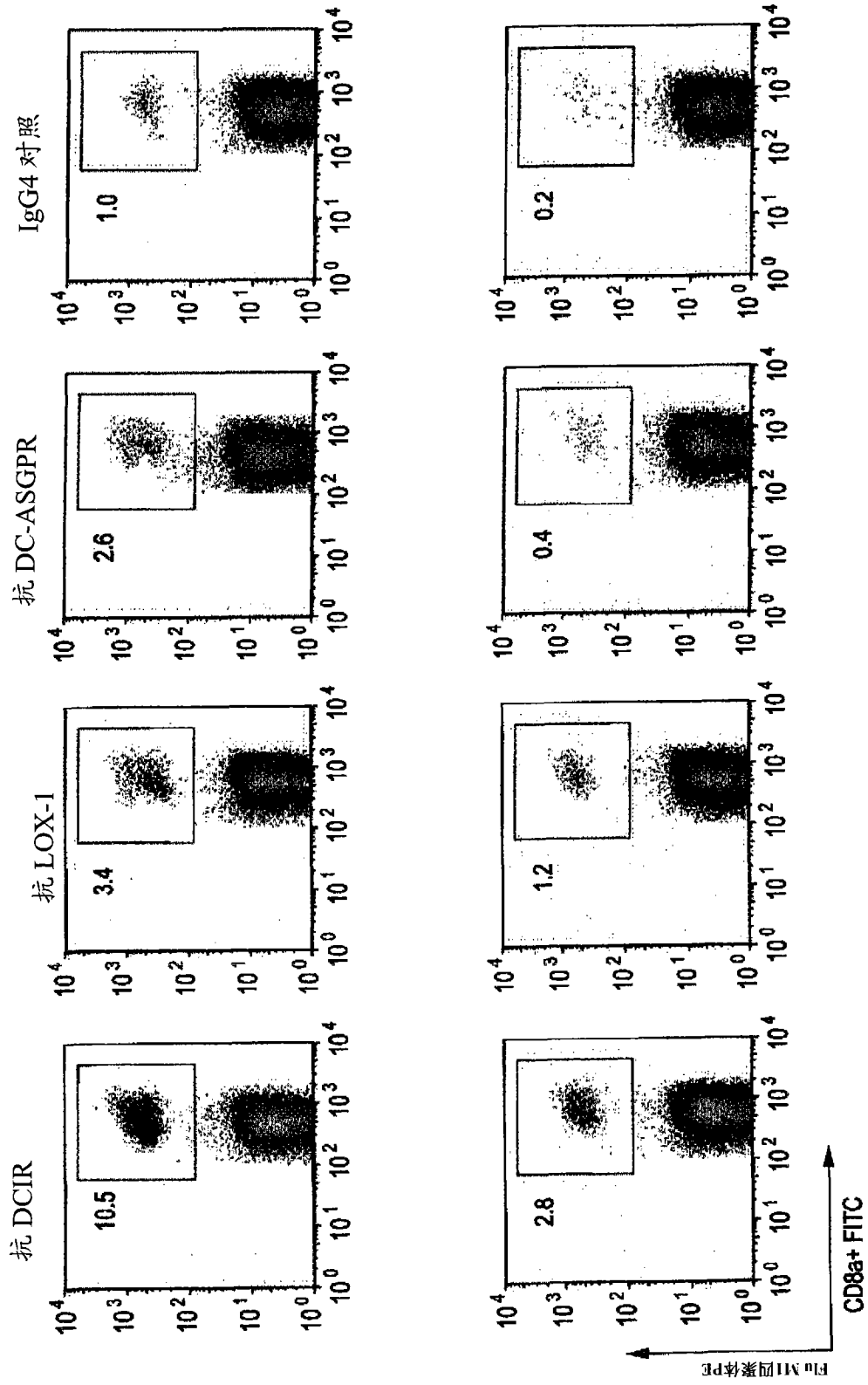


图 13

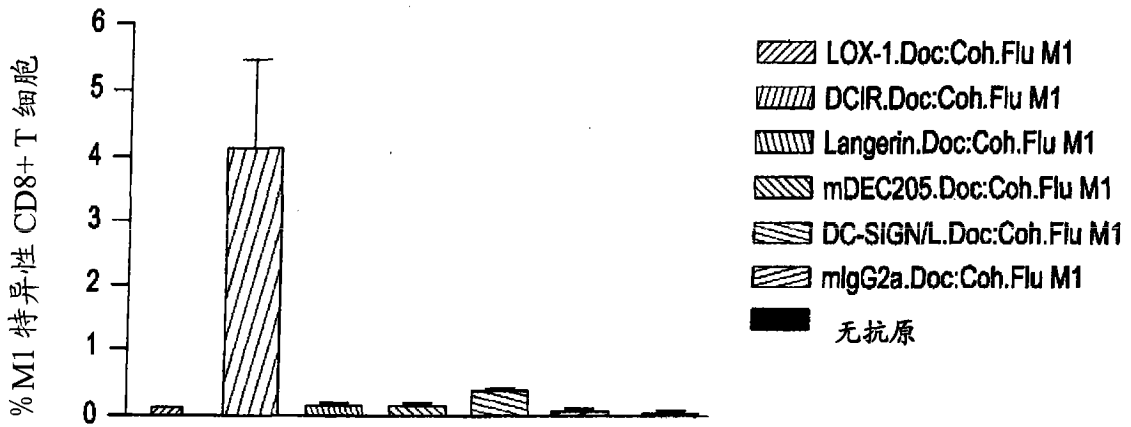
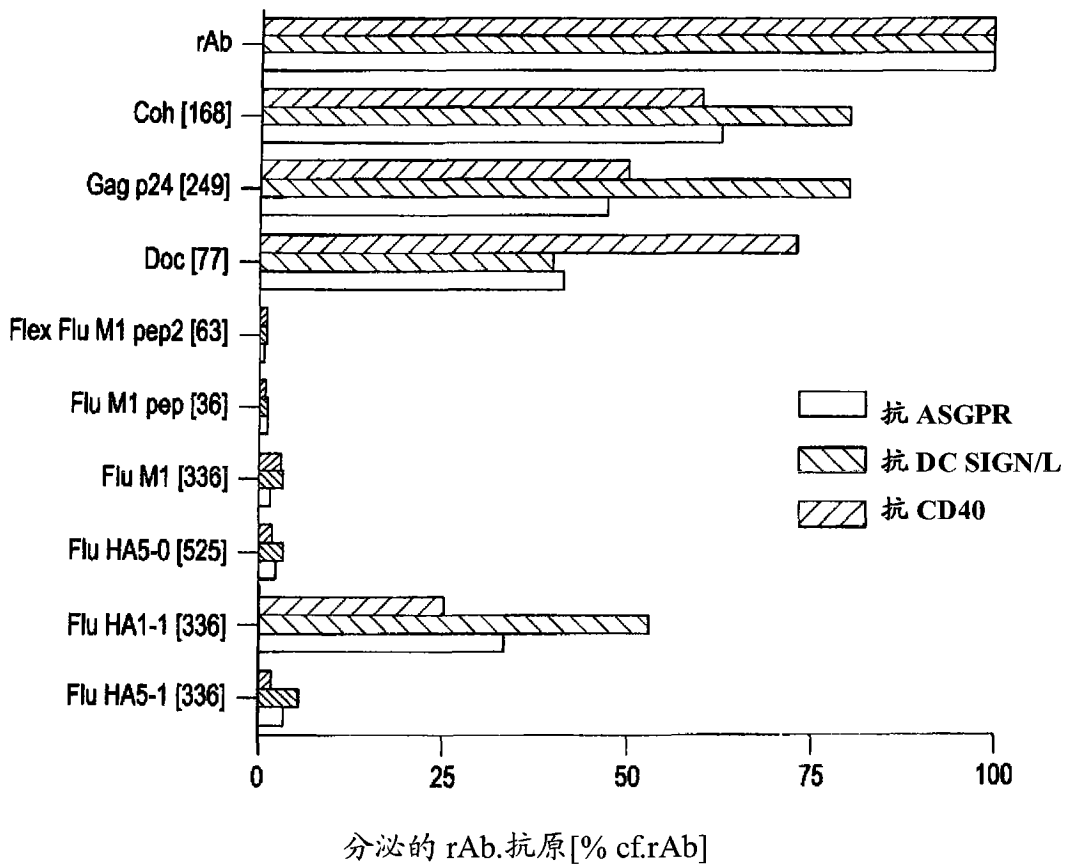


图 14



分泌的 rAb.抗原[% cf.rAb]

图 15

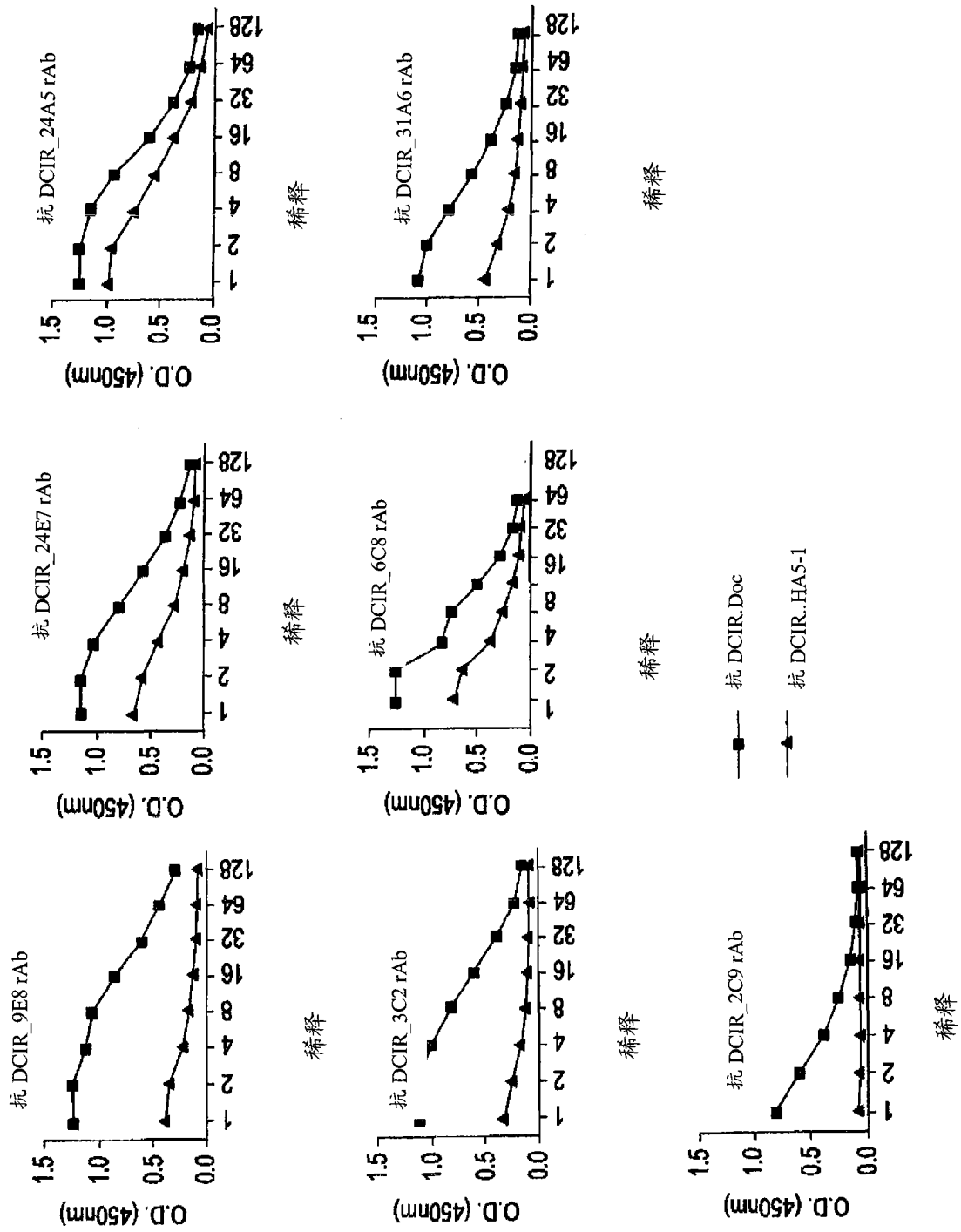


图 16

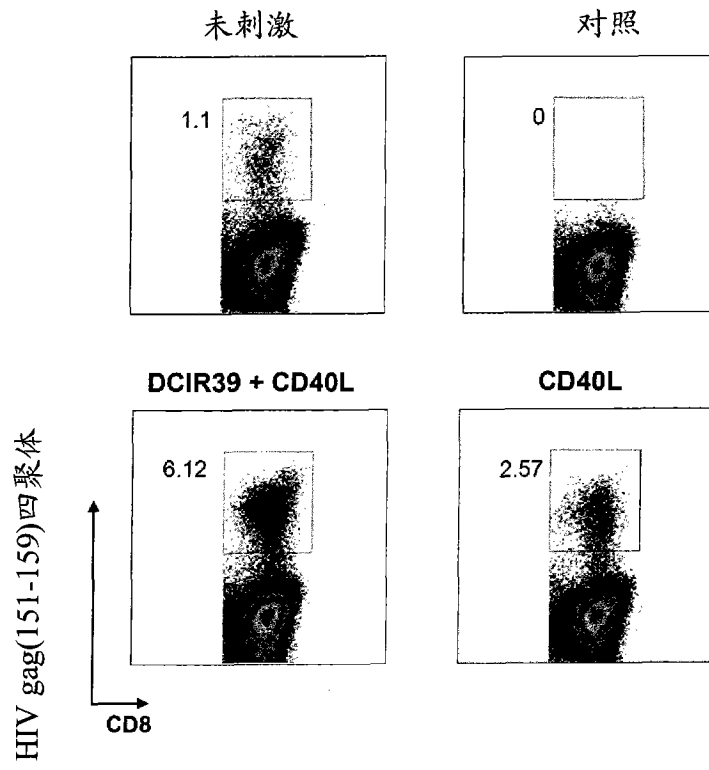


图 17

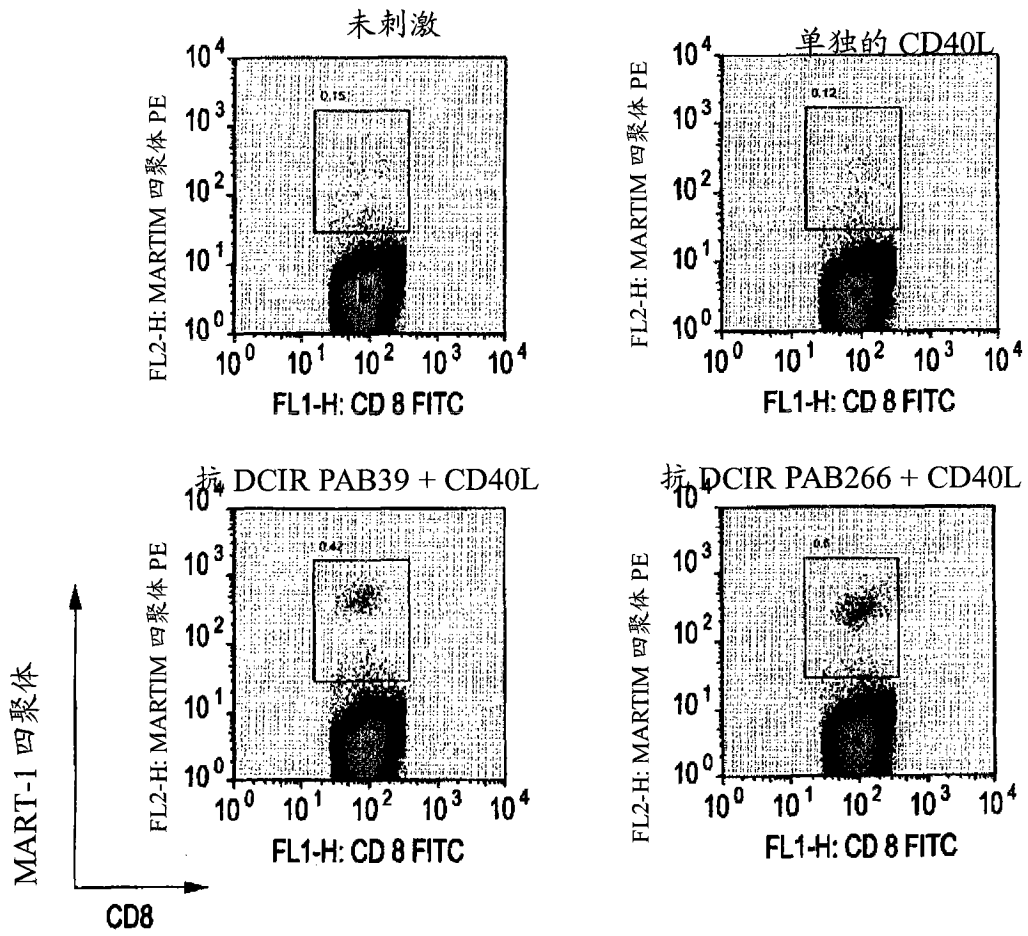


图 18

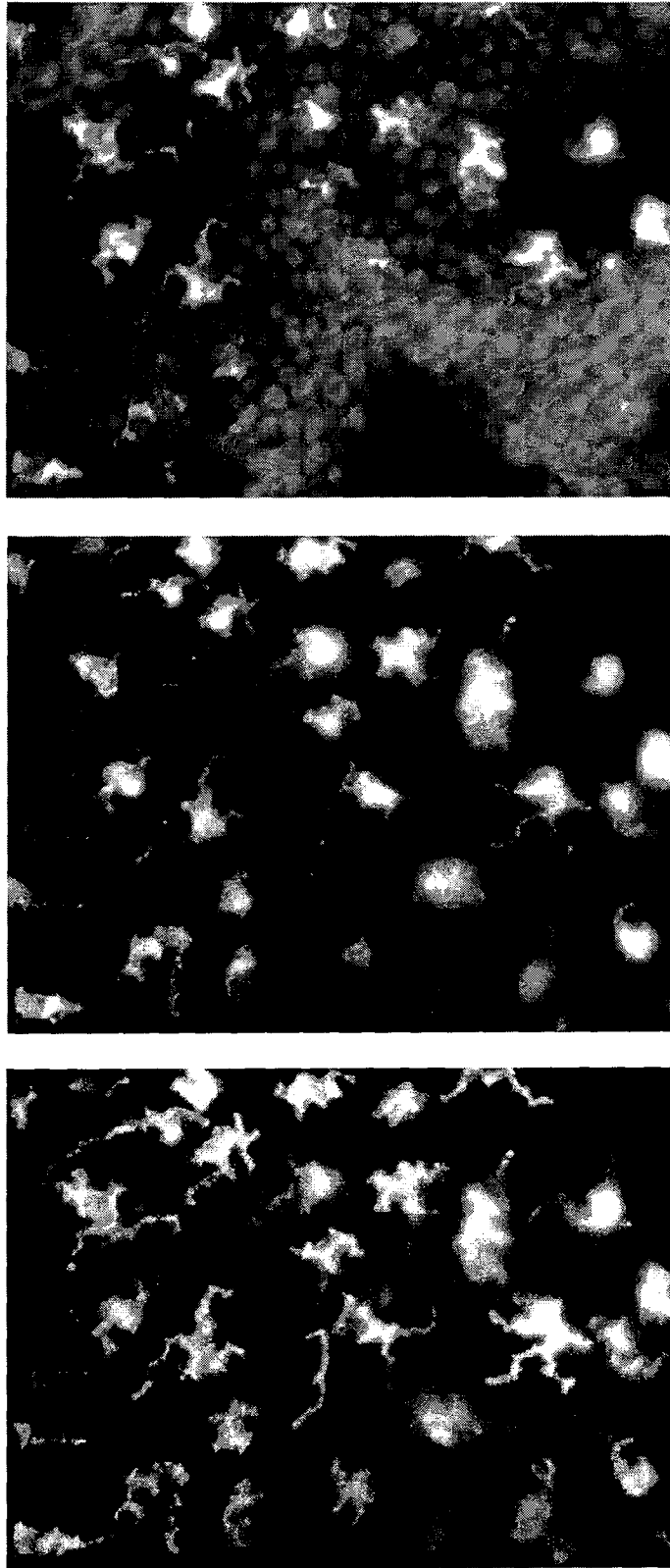


图 19

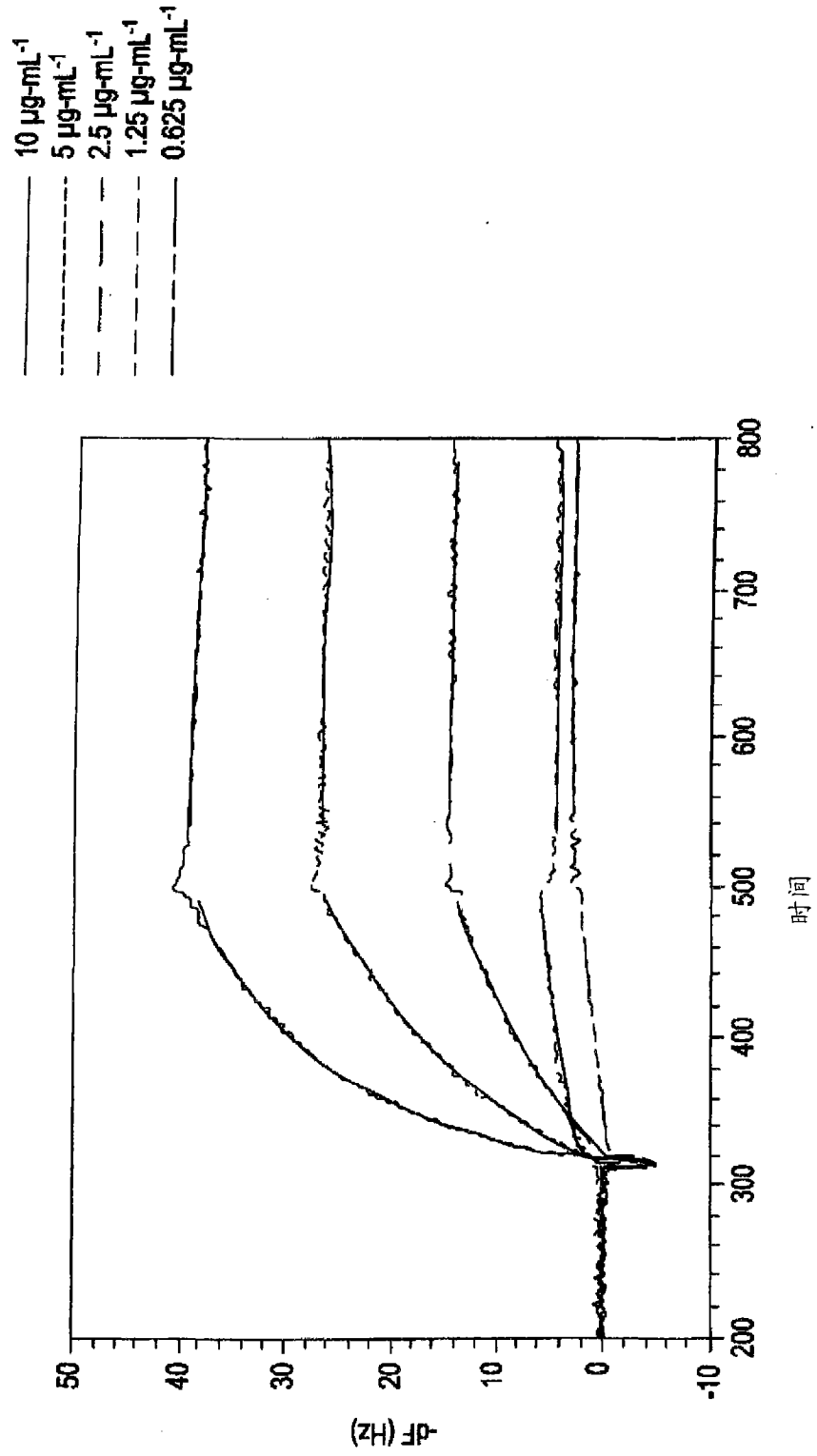


图 20A

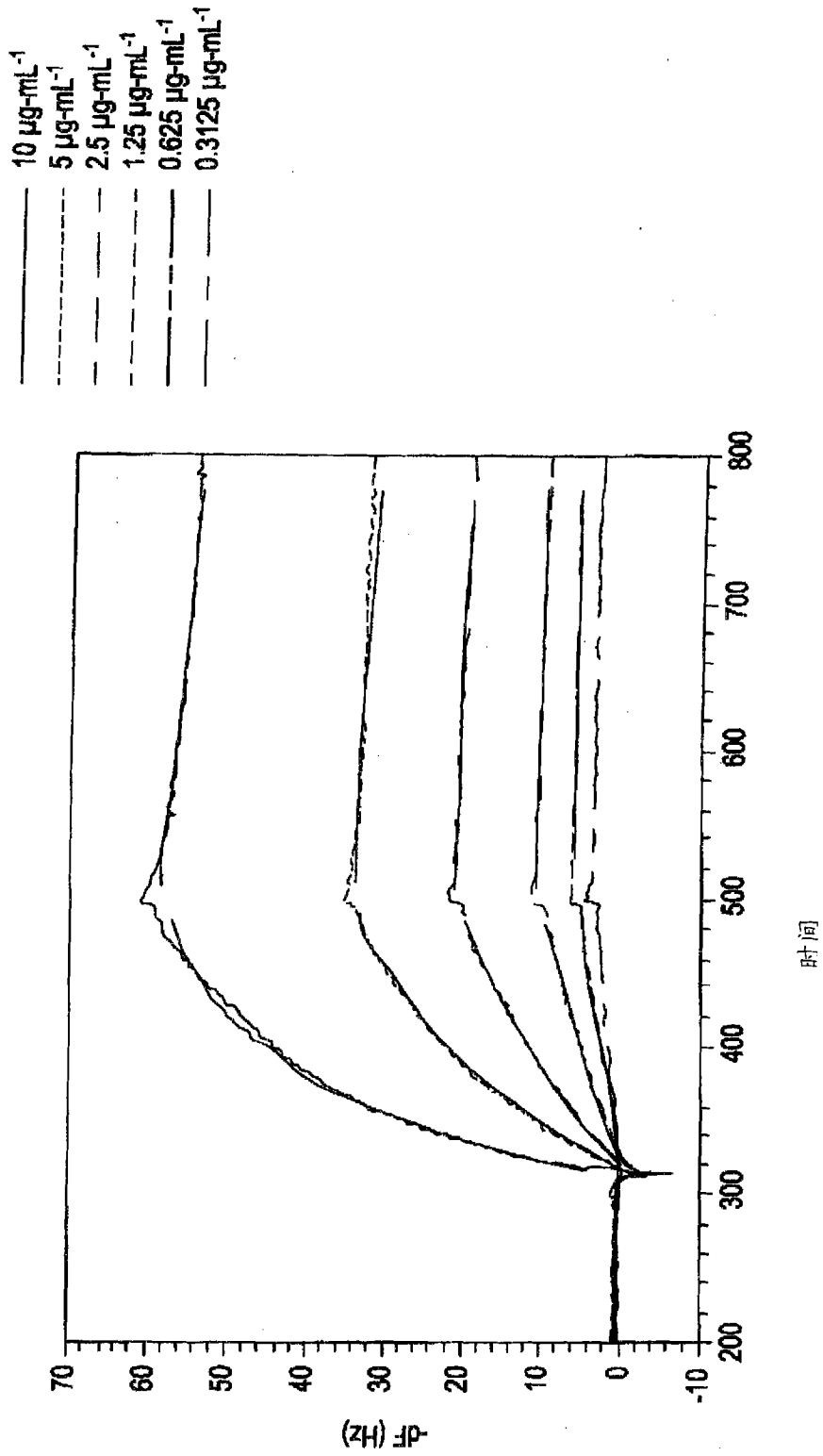


图 20B

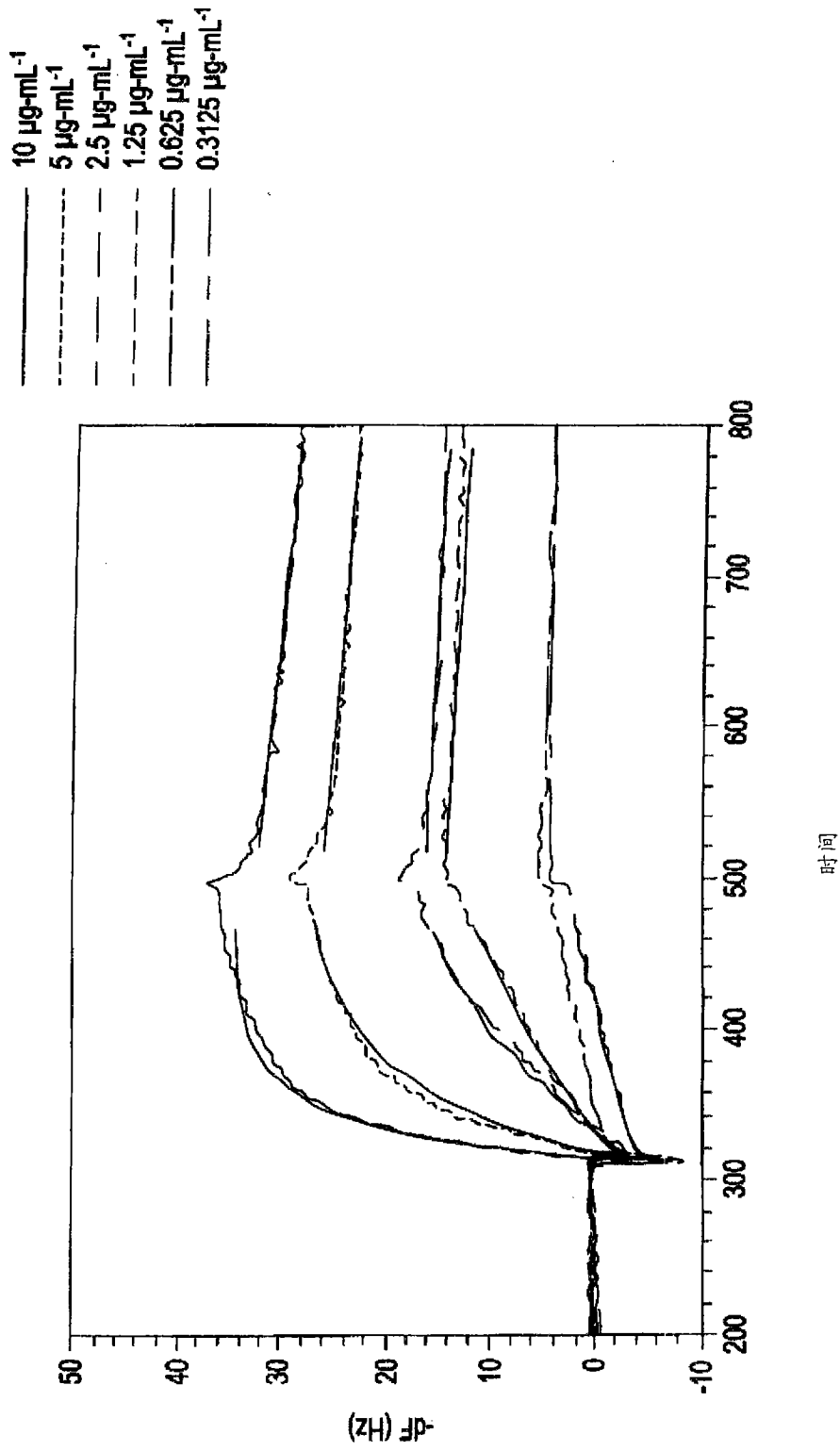


图 20C

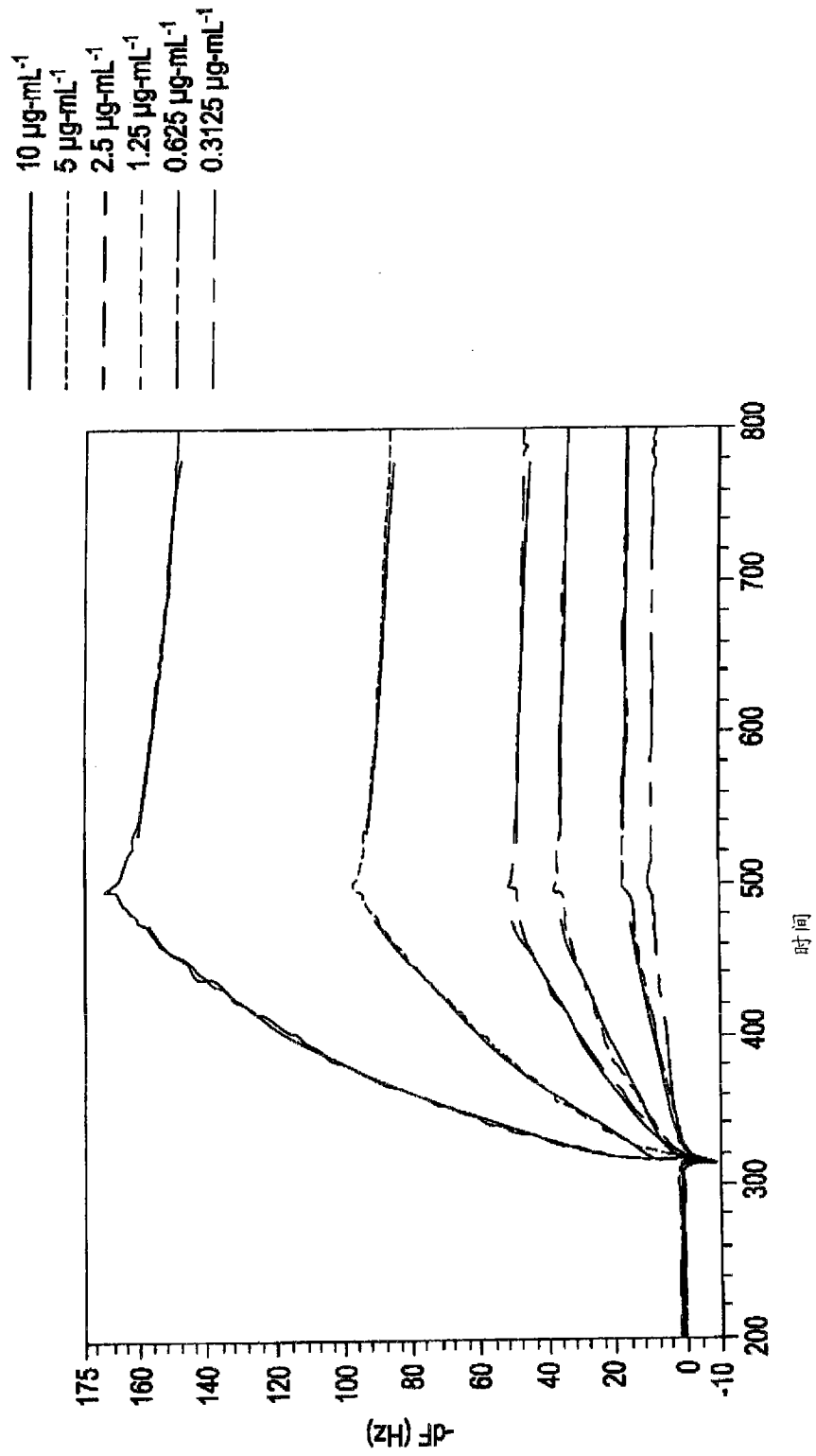


图 20D

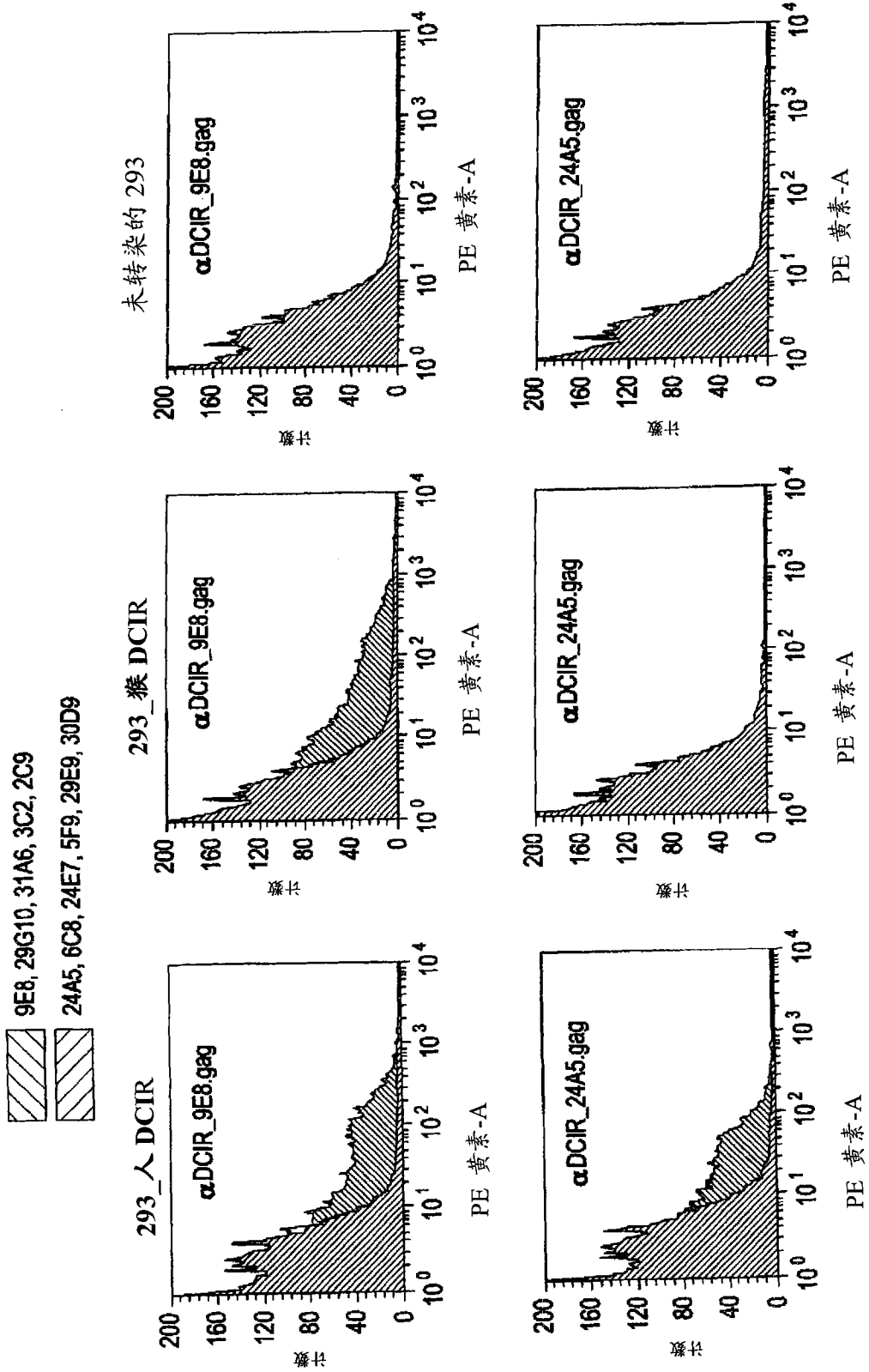


图 21

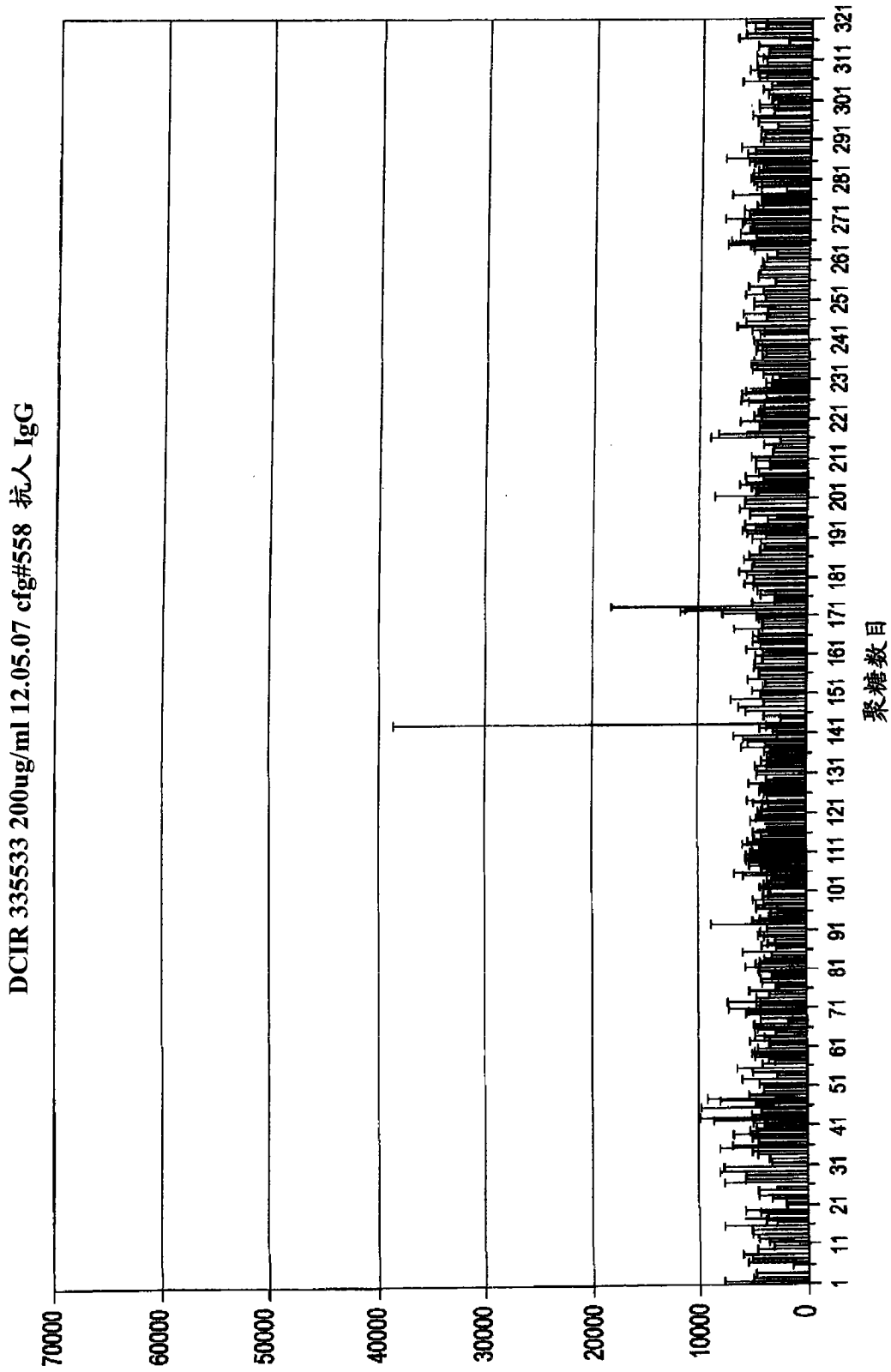


图 22

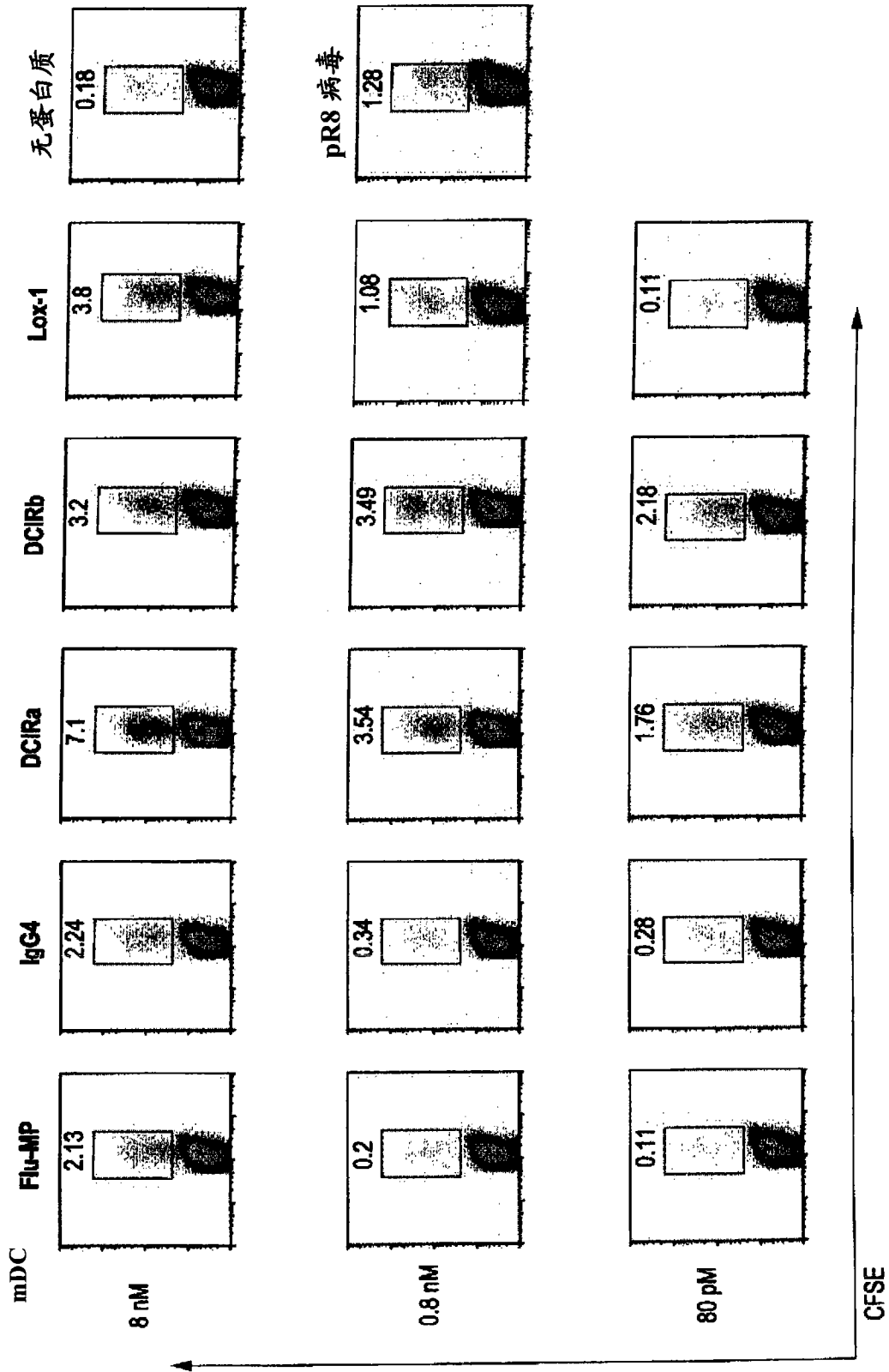


图 23A

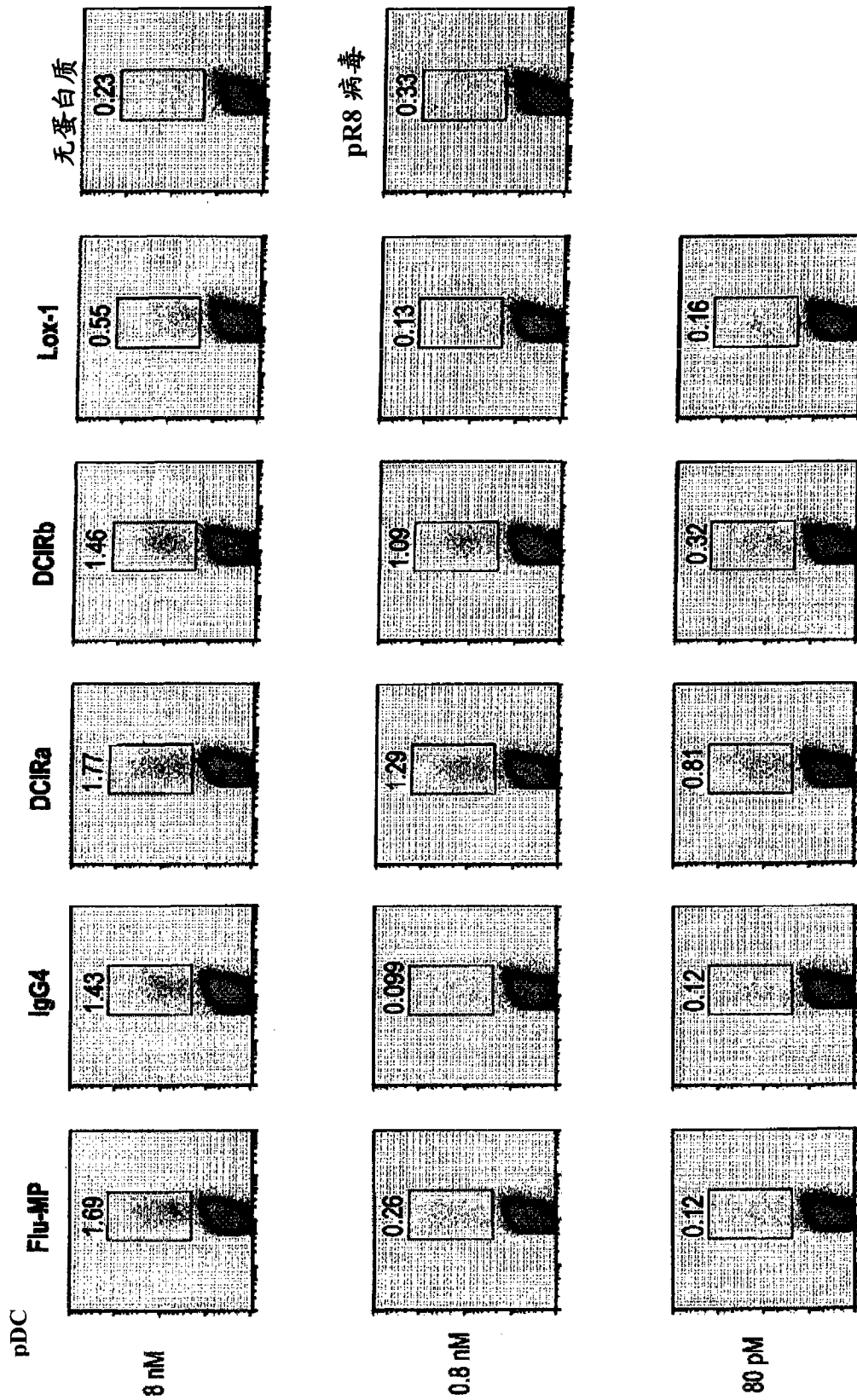


图 23B

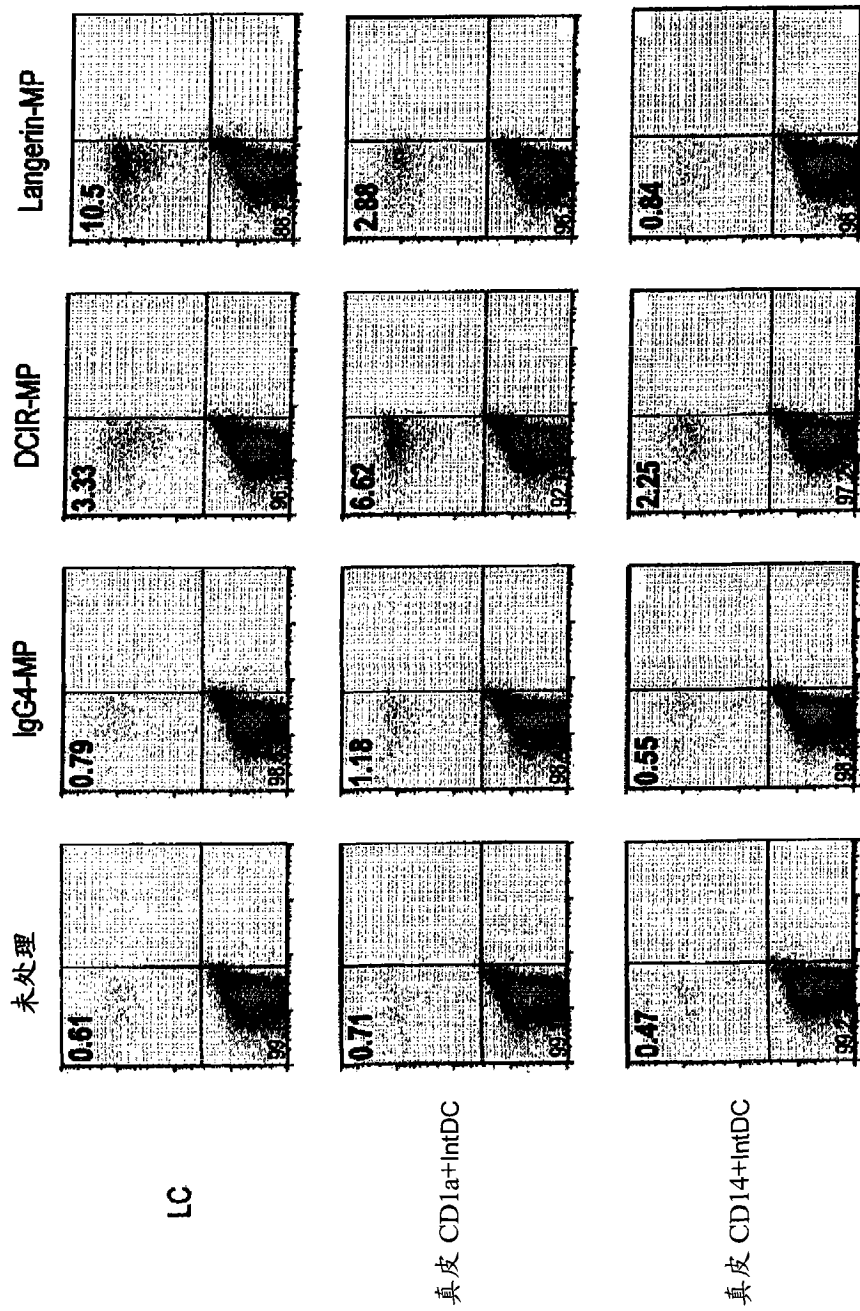
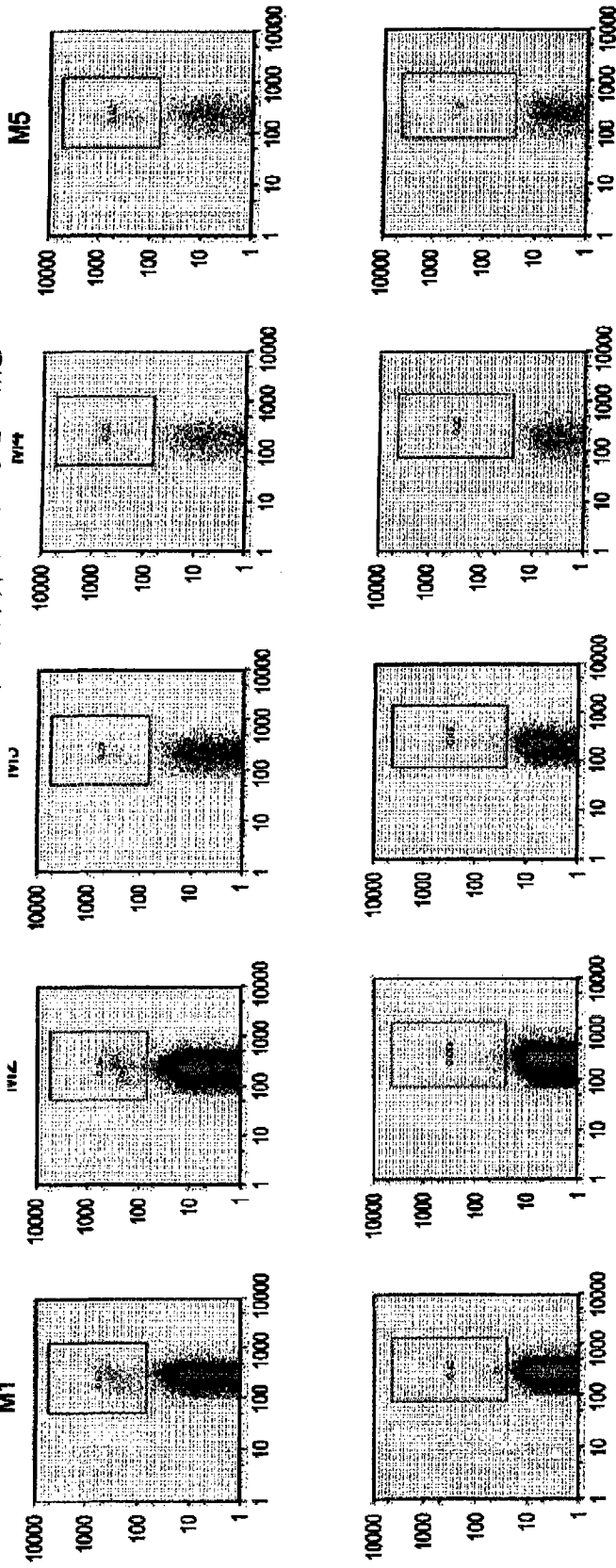


图 23C

用 DCIR-FluM1 接种之后血液中的特异性 CD8 T 细胞



样品	CD8+ T 细胞	FluM1+频率
	细胞计数	在 CD8+ 中 (%)
M1	23178	0.63
M2	61339	0.34
M3	5338	0.21
M4	1356	0.22
M5	1286	0.62

图 24