

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00809172.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100352921C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2000.5.5 [21] 申请号 00809172.2

[30] 优先权

[32] 1999. 5. 6 [33] US [31] 60/132,752

[32] 1999. 5. 6 [33] US [31] 60/132,750

[86] 国际申请 PCT/US2000/012177 2000.5.5

[87] 国际公布 WO2000/067761 英 2000.11.16

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.19

[73] 专利权人 威克福雷大学

地址 美国北卡罗来纳

[72] 发明人 S-Y·陈 Z·尤

审查员 丁海

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李瑛

权利要求书 5 页 说明书 80 页 附图 34 页

[54] 发明名称

用于鉴定引起免疫反应的抗原的组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及一种表达载体，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原蛋白或肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。更具体地说，本发明涉及引起针对哺乳动物体内抗原的免疫反应的方法，该方法包括下列步骤：将所述表达载体导入细胞；在所述抗原分泌自所述细胞的条件下表达该载体以便产生抗原；使所分泌的抗原胞吞入细胞；加工所述抗原；并将片段呈递给受体以便引起 T-细胞反应。此外，本发明涉及一种疫苗及其使用方法。本发明还涉及结合在 MHC-II 上的表位的鉴定方法。

1. 一种表达载体，它包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列，其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，所述细胞结合元件为 Fc 片段。

2. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的多核苷酸启动子序列选自组成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子组成的组。

3. 权利要求 2 所述的表达载体，其中所述的组成型启动子选自下列启动子组成的组：~~猿猴病毒 40 (SV40)~~ 早期启动子、~~小鼠乳腺瘤病毒~~ 启动子、人免疫缺陷病毒长末端重复启动子、莫洛尼氏病毒启动子、鸟白血病病毒启动子、EB 病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、人肌动蛋白启动子、人肌球蛋白启动子、人血红蛋白启动子、巨细胞病毒 (CMV) 启动子和人肌酸启动子。

4. 权利要求 2 所述的表达载体，其中所述的诱导型启动子选自金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子组成的组。

5. 权利要求 2 所述的表达载体，其中所述的组织特异性启动子选自 HER-2 启动子和与 PSA 相关联的启动子组成的组。

6. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码信号序列的多核苷酸选自乙型肝炎病毒 B 抗原信号序列、免疫球蛋白重链前导序列和细胞因子前导序列组成的组。

7. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 B 细胞反应。

8. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 CD4⁺ T-细胞反应。

9. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包

括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 CD8+ T-细胞反应。

10. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发导入了所述抗原的哺乳动物体内的 B 细胞反应、CD4+ T-细胞反应和 CD8+ T-细胞反应。

11. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于多个表位的多核苷酸序列，其中所述的多个表位诱发导入了所述抗原的哺乳动物体内的 B 细胞反应、CD4+ T-细胞反应和 CD8+ T-细胞反应。

12. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种同源多核苷酸序列或异源多核苷酸序列。

13. 权利要求 12 所述的表达载体，其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种同源 Fc 片段。

14. 权利要求 12 所述的表达载体，其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种异源 Fc 片段。

15. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的表达载体进一步包括有利于将所述表达载体整合入细胞基因组的整合信号序列。

16. 权利要求 15 所述的表达载体，其中所述的整合信号序列是一种病毒长末端重复序列或腺伴随病毒 ITR 序列。

17. 权利要求 1 所述的表达载体，其中所述的载体选自病毒载体、细菌载体和哺乳动物载体组成的组。

18. 一种包括表达载体的转化的细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列，其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，并且细胞结合元件为 Fc 片段。

19. 权利要求 18 所述的细胞，其中所述的细胞是原核细胞或真核细胞。

20. 权利要求 19 所述的细胞，其中所述的真核细胞选自由酵母、昆虫

和哺乳动物组成的真核细胞的组。

21. 一种包括信号序列、抗原和细胞结合元件的融合蛋白，其中抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，细胞结合元件为 Fc 片段。

22. 一种包括表达载体的疫苗，其中所述的表达载体包括编码启动子序列的多核苷酸、编码分泌信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和编码聚腺苷酸化序列的多核苷酸，其中所述的序列均是可操作地连接的，其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，并且细胞结合元件为 Fc 片段。

23. 一种包括树突细胞的疫苗，其中在体外用权利要求 21 所述的融合蛋白转导所述的树突细胞。

24. 一种包括树突细胞的疫苗，其中在体外用权利要求 1 所述的表达载体转导所述的树突细胞。

25. 一种包括权利要求 21 所述的融合蛋白的疫苗。

26. 一种表达载体，它至少包括编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸和编码细胞结合元件的多核苷酸，其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，并且细胞结合元件为 Fc 片段。

27. 表达载体在制备疫苗中的应用，其中所述疫苗用于引起针对抗原的免疫反应，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码所述抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列，其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，并且所述细胞结合元件为 Fc 片段。

28. 权利要求 27 所述的应用，其中所述的多核苷酸启动子序列选自组成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子组成的组。

29. 权利要求 28 所述的应用，其中所述的组成型启动子选自下列启动子组成的组：猿猴病毒 40 (SV40) 早期启动子、小鼠乳癌病毒启动子、人免疫缺陷病毒长末端重复启动子、莫洛尼氏病毒启动子、鸟白血病毒启动子、EB 病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、人肌动蛋白启动子、人肌球蛋白启动子、人血红蛋白启动子、巨细胞病毒 (CMV) 启

动子和人肌酸启动子。

30. 权利要求 28 所述的应用, 其中所述的诱导型启动子选自金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子组成的组。

31. 权利要求 28 所述的应用, 其中所述的组织特异性启动子选自 HER-2 启动子和与 PSA 相关联的启动子组成的组。

32. 权利要求 27 所述的应用, 其中所述的编码信号序列的多核苷酸选自乙型肝炎病毒 e 抗原信号序列、免疫球蛋白重链前导序列和细胞因子前导序列组成的组。

33. 权利要求 27 所述的应用, 其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种同源多核苷酸序列或异源多核苷酸序列。

34. 权利要求 33 所述的应用, 其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种同源 Fc 片段。

35. 权利要求 33 所述的应用, 其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种异源 Fc 片段。

36. 权利要求 27 所述的应用, 其中所述的表达载体进一步包括有利于将所述表达载体整合入细胞基因组的整合信号序列。

37. 权利要求 36 所述的应用, 其中所述的整合信号序列是一种病毒长末端重复序列或腺伴随病毒 ITR 序列。

38. 权利要求 27 所述的应用, 其中所述的载体选自病毒载体、细菌载体和哺乳动物载体组成的组。

39. 一种生产用于对哺乳动物进行免疫接种的疫苗的体外方法, 该方法包括下列步骤:

通过将一种表达载体导入所述树突细胞来转导树突细胞以便产生转导的树突细胞, 其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列, 其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe, 并且所述细胞结合元件为 Fc 片段; 和

在所述抗原分泌自所述细胞的条件下表达所述载体以便产生抗原。

40. 一种生产融合蛋白的体外方法，该方法包括下列步骤：

通过将一种表达载体导入所述树突细胞来转导树突细胞以便产生转导的树突细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列，其中所述抗原为癌抗原 MAGE-3 或感染性疾病抗原 HBe，并且所述细胞结合元件为 Fc 片段；和

在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下表达所述载体以便产生融合蛋白。

用于鉴定引起免疫反应的抗原的组合物和方法

发明领域

本发明涉及一种表达载体及其在哺乳动物体内引起完全免疫反应的应用。更具体地说，本发明涉及将内源性抗原加工成用于在 MHC-II 上呈递的外源性抗原的方法。本发明还涉及一种疫苗及其对哺乳动物进行免疫接种的使用方法。

发明背景

人体中不充分的抗原呈递导致控制和清除致病性感染和恶性细胞生长的人免疫系统衰竭。用于慢性感染和癌症的成功的治疗用疫苗和免疫疗法依赖于开发诱发能够控制和清除攻击性抗原的强烈免疫反应的有效抗原呈递的新手段。

细胞识别抗原的能力取决于抗原与 MHC I 型 (MHC-I) 或 II 型 (MHC-II) 蛋白的结合。例如，细胞毒性 T-细胞对与 MHC-I 蛋白结合的抗原反应。因此，杀灭病毒感染的细胞的细胞毒性 T 细胞不会杀灭被相同病毒感染的细胞，条件是细胞也不表达合适的 MHC-I 蛋白。辅助 T 细胞识别 MHC-II 蛋白。辅助 T 细胞的活性一般取决于对抗原呈递细胞上的抗原的识别和“自体” MHC-II 蛋白在这些细胞上的存在。这种识别与自体-MHC 蛋白结合抗原的需求称作 MHC 结合。发现 MHC-I 蛋白实际上存在于所有带核细胞的表面上。发现 MHC-II 蛋白存在于包括脾脏的巨噬细胞、B 细胞和树突细胞以及皮肤的朗格汉斯细胞在内的某些细胞的表面上。

一个使哺乳动物体内发动免疫反应的决定性步骤就是激活识别结合在主要组织相容性复合物 (MHC) -II 上的外源性抗原的 CD4+辅助 T-细胞。在诸如树突细胞 (DCs) 这样的抗原呈递细胞中以细胞内途径俘获并加工这些抗原 (Zajac 等, 1998; Bona 等, 1998; Kalams 等,

1998; Mellman 等, 1998; Banchereau 等, 1998)。在内体和溶酶体中, 将所述抗原加工成在高尔基体区室内的 MHC-II 上呈递的小抗原肽类以便形成抗原-MHC-II 复合物。这种复合物在细胞表面上表达, 这种表达可诱导 CD4⁺ T 细胞的活化。

在诱发动物体内的有效免疫反应中的其它决定性事件包括激活 CD8⁺ T-细胞和 B 细胞。当将所需的蛋白质以这类方式通过细胞传递以便作为在与 MHC-I 抗原复合的加工蛋白在细胞表面呈递时, CD8⁺ 细胞被激活。B 细胞可以通过其表面的免疫球蛋白 (IgM 和 IgD) 与抗原发生相互作用而不需 MHC 蛋白。然而, CD4⁺ T-细胞的活化刺激免疫系统的全部分支。在活化时, CD4⁺ T-细胞 (辅助 T 细胞) 产生白细胞介素。这些白细胞介素帮助激活免疫系统的其它分支。例如, 辅助 T 细胞产生帮助 B 细胞产生抗体的白细胞介素-4 (IL-4) 和白细胞介素-5 (IL-5)、激活 CD4⁺ 和 CD8⁺ T-细胞的白细胞介素-2 (IL-2) 和激活巨噬细胞的 γ 干扰素。

由于识别结合在 MHC-II 上的抗原的辅助 T-细胞在激活和克隆扩充细胞毒性 T-细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞和 B 细胞中起主要作用, 所以激活辅助 T 细胞对抗原作出反应的起始事件对诱发针对该抗原的有效免疫反应来说是决定性的。已经报导了使用一种来源于溶酶体跨膜蛋白的序列刺激辅助 T-细胞活化的尝试 (Wu, 1995)。然而, 这些尝试没有导致诱发就 CD8⁺ T-细胞和 B 细胞而言在所测试哺乳动物体内的有效免疫反应。

因此, 在本领域中存在对引起用于治疗哺乳动物体内疾病的免疫反应的有效和定向方式的持久需求。本发明满足了这一需求。

发明概述

本发明的一个实施方案是一种表达载体, 它包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。

在本发明的特定实施方案中, 所述的多核苷酸启动子序列选自组

成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子组成的组。

在本发明的另一个特定的实施方案中，所述的编码信号序列的多核苷酸选自乙型肝炎病毒 E 抗原信号序列、免疫球蛋白重链前导序列和细胞因子前导序列组成的组。

本发明的一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 B 细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 CD4⁺ T-细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 CD8⁺ T-细胞反应。

本发明的一个特定实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发导入了所述抗原的哺乳动物体内的 B 细胞反应、CD4⁺ T-细胞反应和 CD8⁺ T-细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸序列包括用于多个表位的多核苷酸序列，其中所述的多个表位诱发导入了所述抗原的哺乳动物体内的 B 细胞反应、CD4⁺ T-细胞反应和 CD8⁺ T-细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码细胞结合元件的多核苷酸是一种与细胞表面受体结合的配体的多核苷酸序列。在特定的实施方案中，所述的细胞结合元件选自编码 Fc 片段、毒素细胞结合结构域、细胞因子、小肽和抗体的多核苷酸序列组成的组。在特定的实施方案中，编码细胞结合元件的多核苷酸是一种同源多核苷酸序列或异源多核苷酸序列。

本发明的另一个实施方案是一种包括表达载体的转化的细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编

码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。

本发明的另一个实施方案是一种融合蛋白，其中该融合蛋白包括信号序列、抗原和细胞结合元件。在特定的实施方案中，已经用该融合蛋白在体外转导了抗原呈递细胞。在其它实施方案中，将该融合蛋白直接给予哺乳动物。

本发明的一个特定实施方案是一种包括表达载体的疫苗，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。在特定的实施方案中，疫苗包括抗原呈递细胞，其中用所述的表达载体在体外转导了所述的抗原呈递细胞。在其它实施方案中，疫苗包括抗原呈递细胞，其中用所述的融合蛋白在体外转导所述的抗原呈递细胞。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，它至少包括编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸和编码细胞结合元件的多核苷酸。

本发明的另一个实施方案是一种引起针对抗原的免疫反应的方法，该方法包括下列步骤：将表达载体导入细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和在下列条件下表达所述的载体以便产生抗原：其中所述的抗原分泌自所述细胞；所述的分泌抗原被胞吞入所述细胞；在所述细胞内加工所述的胞吞抗原；和将所述加工的抗原呈递给细胞表面蛋白，从而引起 T-细胞介导的免疫反应。在特定的实施方案中，所述抗原由第一种细胞分泌并由第二种细胞摄入，其中第一种和第二种细胞是抗原呈递细胞。在其它实施方案中，第一种细胞是非抗原呈递细胞而第二种细胞是抗原呈递细胞。

本发明的另一个特定实施方案是一种鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的多核苷酸序列的方法，其中的表位能够激活 CD4+

辅助 T 细胞, 所述的方法包括下列步骤: 将表达载体导入抗原呈递细胞以便产生转导的抗原呈递细胞, 其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列; 使所述的转导的抗原呈递细胞与原初 T-细胞或致敏的 T-细胞接触; 和评价是任何的原初 T-细胞还是致敏的 T 细胞在与所述转导的抗原呈递细胞接触时被激活, 其中任何所述 T-细胞的激活表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段。在特定实施方案中, 所述的编码测试多肽的多核苷酸选自由病毒基因组、细菌基因组、寄生虫基因组和人基因组组成的 cDNA 文库的组。

本发明的另一个实施方案是一种鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的多核苷酸序列的方法, 其中的表位能够在体内引起免疫反应, 所述的方法包括下列步骤: 将表达载体导入抗原呈递细胞以便产生转导的抗原呈递细胞, 其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列; 通过非肠道途径给哺乳动物施用所述的转导的抗原呈递细胞; 收集来自脾细胞中的 T-细胞并与树突细胞一起共培养; 和评价 T-细胞的激活情况, 其中所述 T-细胞的激活表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段。在特定的实施方案中, 所述的编码测试多肽的多核苷酸是一种分离自肿瘤细胞系的 cDNA 文库。在特定的实施方案中, 所述的编码测试多肽的多核苷酸选自由病毒基因组、细菌基因组、寄生虫基因组和人基因组组成的 cDNA 文库的组。

本发明的一个特定实施方案是一种鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的多核苷酸序列的方法, 其中的表位能够在体内引起免疫反应, 所述的方法包括下列步骤: 通过非肠道途径给哺乳动物施用一种表达载体, 其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核

核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；通过非肠道途径给哺乳动物施用所述转导的抗原呈递细胞；收集来自脾细胞中的 T-细胞并与树突细胞一起共培养；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段。在特定的实施方案中，所述的编码测试多肽的多核苷酸选自由病毒基因组、细菌基因组、寄生虫基因组和人基因组组成的 cDNA 文库的组。

本发明的一个特定的实施方案是一种治疗癌症的方法，该方法包括下列步骤：鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的测试多肽，其中在用一种表达载体将抗原呈递细胞转导成产生转导的抗原呈递细胞的抗原呈递细胞的条件下鉴定所述多肽，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明所述表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段；且通过非肠道途径给哺乳动物施用抗原呈递细胞，其中用所述的测试多肽转导所述的抗原呈递细胞。

本发明的另一个特定的实施方案是一种治疗癌症的方法，该方法包括下列步骤：鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的测试多肽，其中在用一种表达载体将抗原呈递细胞转导成产生转导的抗原呈递细胞的抗原呈递细胞的条件下鉴定所述多肽，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明所述表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段；且通过非肠道途径给哺乳动物施用一种表达载体，其中所述的表达载体包括至少一种编码测试多肽的多核苷酸和编码细胞结合元件的多核苷酸且用所述的测试多肽转导所述的抗原

呈递细胞。

本发明的另一个特定的实施方案是一种治疗病毒性感染的方法，该方法包括下列步骤：鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的测试多肽，其中在用一种表达载体将抗原呈递细胞转导成产生转导的抗原呈递细胞的抗原呈递细胞的条件下鉴定所述多肽，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明所述表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段；且通过非肠道途径给哺乳动物施用抗原呈递细胞，其中用所述的测试多肽转导所述的抗原呈递细胞。

本发明的另一个实施方案是一种治疗病毒性感染的方法，该方法包括下列步骤：鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的测试多肽，其中在用一种表达载体将抗原呈递细胞转导成产生转导的抗原呈递细胞的抗原呈递细胞的条件下鉴定所述多肽，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明所述表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段；且通过非肠道途径给哺乳动物施用一种表达载体，其中所述的表达载体包括至少一种编码测试多肽的多核苷酸和编码细胞结合元件的多核苷酸且用所述的测试多肽转导所述的抗原呈递细胞。

本发明的另一个实施方案是一种治疗自身免疫病的方法，该方法包括下列步骤：鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的测试多肽，其中在用一种表达载体将抗原呈递细胞转导成产生转导的抗原呈递细胞的抗原呈递细胞的条件下鉴定所述多肽，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多

核苷酸聚腺苷酸化序列；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明所述表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段；且通过非肠道途径给哺乳动物施用抗原呈递细胞，其中用所述的测试多肽转导所述的抗原呈递细胞。

本发明的一个特定的实施方案是一种治疗自身免疫病的方法，该方法包括下列步骤：鉴定编码至少一种结合在 MHC-II 上的表位的测试多肽，其中在用一种表达载体将抗原呈递细胞转导成产生转导的抗原呈递细胞的抗原呈递细胞的条件下鉴定所述多肽，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码测试多肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和评价 T-细胞的激活情况，其中所述 T-细胞的激活表明所述表明编码测试多肽的多核苷酸是一种能够激活 CD4+辅助 T 细胞的基因或其片段；且通过非肠道途径给哺乳动物施用一种表达载体，其中所述的表达载体包括至少一种编码测试多肽的多核苷酸和编码细胞结合元件的多核苷酸且用所述的测试多肽转导所述的抗原呈递细胞。

本发明的另一个实施方案是一种生产用于对哺乳动物进行免疫接种的疫苗的方法，该方法包括下列步骤：通过将一种表达载体导入细胞来转导抗原呈递细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和在所述抗原分泌自所述细胞的条件下表达所述载体以便产生抗原。在特定的实施方案中，在给哺乳动物施用抗原呈递细胞前在体外或体内用所述抗原转导抗原呈递细胞。

本发明的另一个特定的实施方案是一种诱发免疫反应的方法，该方法包括给哺乳动物共同施用细胞因子表达载体和 retrogen 表达载体的步骤，其中所述的 retrogen 表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。

本发明的另一个实施方案是一种诱发免疫反应的方法，该方法包括给哺乳动物共同施用一种表达载体的步骤，其中所述的表达载体包括在一种启动子的转录控制下的编码细胞因子蛋白的多核苷酸序列和编码融合蛋白的多核苷酸序列，其中所述的融合蛋白包括抗原和细胞结合元件。在特定的实施方案中，编码细胞因子蛋白的多核苷酸序列和编码融合蛋白的多核苷酸序列均在独立的转录控制下，且其中编码细胞因子蛋白的多核苷酸序列和编码融合蛋白的多核苷酸序列以串联方式位于一种表达载体中。

本发明的另一个实施方案是一种诱发免疫反应的方法，该方法包括给哺乳动物共同施用两种不同的 retrogen 表达载体的步骤，其中第一种 retrogen 表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码第一种抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列，而第二种 retrogen 表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码第二种抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。

本发明的另一个特定的实施方案是一种诱发免疫反应的方法，该方法包括给哺乳动物施用一种表达载体的步骤，其中所述的表达载体包括在一种启动子的转录控制下的编码第一种融合蛋白的多核苷酸序列和编码第二种融合蛋白的多核苷酸序列，其中所述的第一种融合蛋白包括第一种抗原和第一种细胞结合元件且所述的第二种融合蛋白包括第二种抗原和第一种细胞结合元件。在特定的实施方案中，第一种和第二种抗原是不同的抗原且所述的细胞结合元件是 Fc 片段。在其它实施方案中，第一种和第二种抗原是不同的抗原且所述的第一种和第二种细胞结合元件是不同的细胞结合元件。另一个实施方案包括编码第一种融合蛋白的多核苷酸序列和编码第二种融合蛋白的多核苷酸序列均在独立的转录控制下，且其中编码第一种融合蛋白的多核苷酸序列和编码第二种融合蛋白的多核苷酸序列以串联方式位于一种表达载体中。

本发明的一个特定的实施方案是一种同时诱导 CD4⁺和 CD8⁺ T-细胞的方法，该方法包括给予一种融合蛋白的步骤，其中所述的蛋白质包括与细胞结合元件融合的 MHC-I 和 MHC-II 表位。

本发明的另一个实施方案是一种生产融合蛋白的方法，该方法包括下列步骤：通过将一种表达载体导入细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下表达所述载体以便产生融合蛋白。在特定的实施方案中，在体外用所述融合蛋白转导抗原呈递细胞。

本发明的一个特定的实施方案是一种分泌胞内蛋白的方法，该方法包括下列步骤：将一种表达载体导入细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码胞内蛋白的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下表达所述载体以便产生融合蛋白。更具体地说，所述编码胞内蛋白的多核苷酸被截短以便增加分泌功效。

本发明的另一个特定的实施方案是一种分泌膜蛋白的方法，该方法包括下列步骤：将一种表达载体导入细胞，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码膜蛋白的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列；和在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下表达所述载体以便产生融合蛋白。更具体地说，所述编码膜蛋白的多核苷酸被截短或使之发生突变以便增加分泌功效。

附图简述

附图 1A 和附图 1B 是表示本发明 retrogen 策略的示意图。使本发明的 retrogen 在例如一种肌细胞这样的细胞中产生（附图 1A）且然后由抗原呈递细胞吸收（附图 1B）。将 retrogen 在抗原呈递细胞中

加工并在其上表达为 MHC-I 或 MHC-II 复合物或如附图 1A 和附图 1B 中所示呈递给 B 细胞受体。retrogen 的 MHC-I 呈递导致激活细胞毒性 CD8⁺ T-细胞且 retrogen 的 MHC-II 呈递导致激活 CD4⁺ T-细胞。

附图 2A、附图 2B 和附图 2C 是一系列表达载体的图解表示。附图 2A 说明了通过如示意图中所示产生融合基因并将该基因克隆入逆转录病毒载体 (LNC-NGFR) 或表达载体 pRc/CMV 而构建的包括 HBeAg (分泌性)、HBcAg (胞质) 或带有信号序列 (分泌性) 的 Fc 片段的载体。附图 2B 和附图 2C 说明了构建的其它载体。

附图 3 是描绘 HBe-retrogen 表达和分泌的蛋白质印迹影象。用各种表达载体转染 COS 细胞。然后用抗-IgG 或抗-HBeAg 抗体沉淀培养基 (M) 和细胞裂解物 (C) 并通过 SDS-PAGE 进行分析。

附图 4A、附图 4B 和附图 4C 是一系列描绘树突细胞中 retrogen 转导和表达的示意图。用各种重组逆转录病毒载体转导鼠骨髓细胞；在有 GM-CSF、TNF 和 IL-4 存在的情况下使所述细胞发育成树突细胞并用抗-NGFR 染色。通过流式细胞测定法测定它们。附图 4A 表示未转导的树突细胞。附图 4B 表示转导的树突细胞。附图 4C 是阴性对照。

附图 5A、附图 5B、附图 5C、附图 5D 和附图 5E 是一系列描绘如流式细胞测定法测定的树突细胞上存在的表面标记 (MHC-I、MHC-II、共刺激和粘着分子 (CD11C、CD54、CD80 和 CD86)) 的示意图。附图 5A 表示存在的 CD11C 表面标记。附图 5B 表示存在的 CD54 表面标记。附图 5C 表示存在的 CD80 表面标记。附图 5D 表示存在的 CD86 表面标记。且附图 5E 表示存在的 MHC-II。

附图 6A 和附图 6B 说明了描绘体外通过 retrogen 转导的树突细胞激活原初 CD4⁺ T-细胞的两种棒形示意图。附图 6A 表示共培养物中 GM-CSF 的含量。附图 6B 表示共培养基中 IFN- γ 的含量。

附图 7A 和附图 7B 说明了 MHC-II 依赖性活化。附图 7A 表示来自获自用 HBe-retrogen 转导并进行了共培养的 MHC-II-剔除 (KO) 或野生型 (WT) C57BL/6 小鼠的细胞和来自野生型小鼠的原初 CD4⁺ T-细胞的细胞因子浓度 (IFN- γ)。

附图 8 表示免疫接种小鼠血清中的抗体反应。

附图 9A、附图 9B、附图 9C、附图 9D、附图 9E 和附图 9F 表示 s-MAGE-3-Fc 融合蛋白的构建和表达。附图 9A 表示重组逆转录病毒载体的图解表示。(S: 信号序列; IRES: 内部核糖体进入位点序列)。附图 9B 表示通过用小鼠抗-MAGE-3 和抗小鼠 IgG HRP 缀合物染色的蛋白质印迹分析测定的树突细胞中不同构建体的表达。附图 9C 表示通过使用 Image-Quant 软件的 PhosphorImager (分子动力学 (Molecular Dynamics)) 分析的附图 9B 的蛋白质印迹的蛋白质带的强度。附图 9D、附图 9E 和附图 9F 说明了用各构建体转导并对 MHC-II (附图 9E) (M5/114.15.2)、CD40 (附图 9D) (HM40-3) 和 CD86/B7.2 (附图 9F) (GL1) (PharMingen) 染色的转导树突细胞的流式细胞分析。

附图 10A、附图 10B、附图 10C 和附图 10D 表示共培养 CD4⁺ T-细胞后体内诱发的培养基中免疫接种了用不同载体转导的树突细胞的小鼠的 CD4⁺ Th1 反应。附图 10A 表示 IFN- γ 的浓度。附图 10B 表示 IL-2 的浓度。附图 10C 表示 TNF- α 的浓度。附图 10D 表示 IL-4 的浓度。

附图 11A 和附图 11B 表示在有或没有抗-CD4 或抗-CD8 抗体存在的情况下分离自与 s-MAGE-3-Fc-树突细胞共培养 (附图 11A) 或与 HBcAg 转导的树突细胞共培养 (附图 11B) 的免疫接种小鼠的 s-MAGE-3-Fc-树突细胞的 CD4⁺ T-细胞的 IFN- γ 水平。

附图 12A、附图 12B、附图 12C 和附图 12D 表示分离自收集的小鼠脾细胞的 CD4⁺ T-细胞中的细胞因子水平, 其中所述的小鼠按 1000: 1 的比例免疫接种了与分离自相同免疫接种小鼠排空淋巴结 (LN) 的树突细胞共培养的树突细胞。附图 12B 表示 IL-2 的浓度。附图 12C 表示 TNF- α 的浓度。附图 12D 表示 IL-4 的浓度。

附图 13 表示从分离自免疫接种小鼠的脾细胞诱发体内细胞毒性反应, 其中将所述的小鼠在体外用照射的 EL4-MAGE-3 细胞重新刺激 (E) 并与 ³H-胸苷标记的靶细胞 EL4-MAGE-3 或 EL4-HBcAg (对照) (T) 一起共培养。

附图 14 表示树突细胞免疫接种后 6 周诱发的抗体反应。

附图 15 表示通过在有或没有由 ELISA 测定的抗-CD40L 抗体(MR1, PharMingen)存在的情况下测定共培养物中 IL-12 水平而增强的 T-细胞与 s-MAGE-3-Fc-树突细胞的相互作用。

附图 16A 和附图 16B 表示在皮内接种 EL4-MAGE-3 肿瘤细胞前通过静脉内注射 1×10^5 个用不同构建体转导的树突细胞而免疫接种小鼠的抗肿瘤免疫性。附图 16A 表示肿瘤的体积。附图 16B 表示各组中存活小鼠的百分比。

附图 17 说明了 HPV 16E7 的带电荷的氨基酸残基, 使它们缺失以便稳定蛋白质并有助于分泌。

附图 18 说明了表达载体的图解表示。在 CMV 启动子控制下分别将 HBe-Fc 融合基因、HBcAg (胞质) 基因、HBeAg (分泌性) 基因或带有信号序列 (分泌性) 的 Fc 的 cDNA 片段克隆入 pRc/CMV 载体。黑色正方形代表信号序列。

附图 19A 和附图 19B 表示 HBe-Fc、HBcAg、HBeAg 和 Fc 构建体的表达。附图 19A 表示如蛋白质印迹分析测定的细胞内表达的不同构建体的表达。附图 19B 表示通过使用 Image-Quant 软件的 PhosphorImager (分子动力学 (Molecular Dynamics)) 分析的附图 19A 中蛋白质印迹的蛋白质带的强度。

附图 20 说明了体内诱发的在用不同质粒或致敏的 T 细胞进行 DNA 免疫接种后小鼠的 T-细胞反应, 其中将所述的小鼠在免疫接种后 4 周处死。用 HBe/cAg 重组蛋白将脾细胞重新刺激 5 天。

附图 21A、附图 21B、附图 21C 和附图 21D 说明了体内诱发的用不同质粒免疫接种并在免疫接种后 4 周处死的小鼠的 CD4⁺ T-细胞反应。附图 21A 和附图 21B 表示以一式两份与 HBe/cAg 脉冲的树突细胞共培养的 CD4⁺ T 细胞。附图 21C 和附图 21D 表示在有或没有抗-CD4⁺或抗-CD8⁺抗体存在的情况下来自与 HBe/cAg 脉冲的树突细胞共培养的 HBeFc 免疫接种小鼠的 CD4⁺ T 细胞。在共培养 72 小时后通过 ELISA 测定培养基中 IFN- γ 和 IL-2 的浓度。

附图 22 说明了体内诱发的在分离自 DNA 免疫接种小鼠并在体外用

照射的 EL4-HBcAg 细胞重新刺激 5 天的脾细胞中的 CTL 反应。将重新刺激的脾细胞 (E) 与 ^3H -标记的靶细胞 EL4-HbcAg 或 EL4-MAGE3 (对照) (T) 一起共培养 4 小时。

附图 23 表示抗体反应的诱发。通过 ELISA 测定 DNA 免疫接种后 4 - 6 周时来自小鼠的 HBc/eAg-特异性 IgG 抗体。

附图 24 说明了来自树突细胞转移实验中的数据。CD11c+树突细胞分离自免疫接种了 DNA 疫苗的供体小鼠的脾细胞。将致敏的树突细胞注入同源原初受体侧尾静脉。在过继转移后 2 - 4 周进行 T-细胞增殖测定试验。

附图 25 描绘了用于构建鉴定结合在 MHC-II 上的表位的 cDNA 文库的逆转录病毒示意图。

附图 26 描绘了能够引起 CD4+辅助 T-细胞反应的结合在 MHC-II 上的表位的鉴定方法的示意图。

详细描述

本领域技术人员显然可以理解可以实施本申请中公开的本发明的各种实施方案并对其进行修改而不会脱离本发明的范围和实质。

本文所用的术语“抗体”指的是能够特异性地结合抗原上的特异性表位的免疫球蛋白分子。抗体可以是来源于天然来源或来源于重组来源的完整免疫球蛋白且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体一般是免疫球蛋白分子的四聚物。本发明中的抗体可以以不同形式存在, 例如包括多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab 和 F(ab)_2 以及单链抗体和人源化抗体 (Harlow 等, 1988; Houston 等, 1988; Bird 等, 1988)。

将本文所用的术语“抗原”定义为激发免疫反应的分子。这种免疫反应可以包括抗体的产生或特异性免疫感受态细胞的激活或两者兼而有之。抗原可以来源于微生物、蛋白质/抗原的亚单位、杀灭的或失活的完整细胞或裂解物。典型的微生物包括但不限于螺杆菌属、弯曲杆菌属、梭状芽孢杆菌属、白喉棒状杆菌、百日咳博德特氏杆菌、流

感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、疟原虫属、单纯疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、乳头瘤病毒、霍乱弧菌、大肠杆菌、麻疹病毒、轮状病毒、志贺氏菌属、伤寒沙门氏菌、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoea*)。因此,本领域技术人员认识到实际上包括所有蛋白质或肽类在内的任何大分子可以用作抗原。此外,抗原可以来源于重组或基因组 DNA,本领域技术人员认识到含有致病基因组或可引起免疫反应的蛋白质的基因或基因片段的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何 DNA 可使抗原合成。此外,本领域技术人员认识到本发明并不限于应用基因或基因组的完整核酸序列。本身便利的是本发明包括但不限于应用一种以上基因或基因组的核苷酸序列且可以将这些核酸序列按照各种组合进行排列以引起所需的免疫反应。

将本文所用的术语“自身免疫病”定义为因自身免疫反应导致的疾病。自身免疫性是一种对自身抗原不合适且过度的反应。实例包括但不限于艾迪生病、格雷夫斯病、I 型糖尿病、多发性硬化、粘液性水肿、恶性贫血、风湿热、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和溃疡性结肠炎。

将本文所用的术语“癌症”定义为一种细胞增殖情况,其唯一的特征-正常控制缺失-导致不加调节的生长、缺乏分化、局部组织侵入和转移。实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌和肺癌。

本文所用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用。所有这些术语还包括其任何和全部随后产生的子代。可以理解所有子代因有意或无意突变而不可能相同。

将本文所用的术语“细胞结合元件”定义为能够结合细胞膜上的受体的蛋白质的部分。

将本文所用的术语“DNA”定义为脱氧核糖核酸。

将本文所用的术语“树突细胞”或“DC”定义为来源于骨髓的抗原呈递细胞的一个实例。

将本文所用的术语“表位”定义为可以引发抗体并与抗体反应的抗原分子上的小化学基团。抗原可以带有一个或多个表位。大部分抗原带有许多表位，即它们是多价的。一般来说，表位约为 5 个氨基酸或糖的大小。本领域技术人员理解分子的总体三维结构而非特定的线性序列是抗原特异性的主要标准。

将本文所用的术语“表达”定义为特定核苷酸序列通过其启动子驱动的转录和/或翻译。

本文所用的术语“表达载体”指的是含有编码至少部分能够被转录的基因产物的核酸序列的载体。在某些情况中，随后将 RNA 分子翻译成蛋白质、多肽或肽。在其它情况中，例如在产生反义分子或核酶的过程中不翻译这些序列。表达载体可以含有各种控制序列，它们指的是转录和可能翻译特定宿主生物体中可操作地连接的编码序列所必不可少的核酸序列。除控制转录和翻译的控制序列外，载体和表达载体还可以含有也可产生其它功能的核酸序列且如下文所述。

将本文所用的术语“辅助 T-细胞”定义为其基本功能是促进其它 B 和 T 淋巴细胞和巨噬细胞的活化和功能的效应 T-细胞。

将本文所用的术语“异源”定义为来源于不同物种的 DNA 或 RNA 序列或蛋白质。

将本文所用的术语“同源”定义为来源于相同物种的 DNA 或 RNA 序列或蛋白质。

将本文所用的术语“宿主细胞”定义为表达异源核酸序列的细胞。

将本文所用的术语“免疫球蛋白”或“Ig”定义为一类起抗体作用的蛋白质。在该类蛋白质中包括的 5 个成员是 IgA、IgG、IgM、IgD 和 IgE。IgA 起初次抗体的作用，这些抗体存在于诸如唾液、眼泪、乳汁、胃肠分泌物和呼吸道和生殖泌尿道的粘液分泌物这样的身体分泌物中。IgG 起最常见的循环抗体的作用。IgM 是初次应答中产生的主要免疫球蛋白。它是凝集、补体结合和其它抗体应答中最有效的免疫球蛋白且在防御细菌和病毒中是重要的。IgD 是尚未了解抗体功能但可以用作抗原受体的免疫球蛋白。IgE 是通过在接触过敏原时使介体从

肥大细胞和嗜碱性粒细胞中释放而介导即发型超敏反应的免疫球蛋白。

将本文所用的术语“主要组织相容性复合物”或“MHC”定义为基因的特定簇，它们中的许多编码在抗原呈递中所涉及的与进化相关的细胞表面蛋白，这些基因属于组织相容性的最重要决定簇。I 型 MHC 或 MHC-I 主要在将抗原呈递给 CD8 T 淋巴细胞中起作用。II 型 MHC 或 MHC-II 主要在将抗原呈递给 CD4 T 淋巴细胞中起作用。

将本文所用的术语“多核苷酸”定义为一条核苷酸链。此外，核酸是核苷酸的聚合物。因此，本文所用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是可以水解成单体“核苷酸”的多核苷酸这样的一般知识。单体核苷酸可以水解成核苷酸。本文所用的多核苷酸包括但不限于通过本领域中可得到的任何方法获得的所有核酸序列，所述的方法包括但不限于：重组方法，即使用常规克隆技术和 PCRTM 从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列等和通过合成方法。此外，本领域技术人员认识到多核苷酸包括通过本领域中众所周知方法得到的多核苷酸的局限突变，包括但不限于核苷酸的突变或核苷突变。

将本文所用的术语“多肽”定义为通常具有确定序列的一条氨基酸残基链。本文所用的术语多肽相互包含术语“肽类”和“蛋白质”。

将本文所用的术语“启动子”定义为由启动多核苷酸序列特异性转录所需的细胞的合成机构或导入的合成机构识别的 DNA 序列。

本文所用的术语“retrogen”或“retrogen 融合蛋白”指的是带有在如本文所述表达和加工时能够引起哺乳动物体内免疫反应的表位的多肽，其中该多肽与细胞结合元件融合。

本文所用的术语“retrogen 表达载体”指的是包括至少一种编码信号序列、抗原和细胞结合元件的多肽序列的表达载体。

将本文所用的术语“RNA”定义为核糖核酸。

将本文所用的术语“重组 DNA”定义为通过连接不同来源的 DNA 片段产生的 DNA。

将本文所用的术语“重组多肽”定义为通过使用重组 DNA 方法产

生的杂交蛋白。

将本文所用的术语“T-细胞”定义为胸腺衍生的参与各种细胞介导的免疫反应的细胞。

本文所用的术语“转染的”或“转化的”或“转导的”指的是外源核酸转化入或导入宿主细胞的过程。转化的细胞包括原始主体细胞及其子代。

本文所用的术语“在转录控制下”或“可操作地连接的”指的是相对于多核苷酸启动子处于正确的位置和方向上以便控制 RNA 聚合酶的启动和多核苷酸的表达。

将本文所用的术语“疫苗”定义为用于在给哺乳动物施用所述物质后激发免疫反应且由此产生免疫性的物质。

将本文所用的术语“病毒”定义为由包封在有或没有外层脂被膜的蛋白质外壳中的核酸（RNA 或 DNA）组成的颗粒，它仅能够在完整细胞内复制和在细胞间扩散。

本发明的一个实施方案是一种表达载体，它包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。

在特定的实施方案中，编码融合蛋白（抗原细胞结合元件）的核酸序列处于启动子的转录控制下。大量有关启动子如何组织化的考虑来源于对几种病毒启动子的分析，这些病毒启动子包括那些用于 HSV 胸苷激酶（tk）和 SV40 早期转录单位的启动子。由近来更进一步的工作扩充的这些研究已经证实启动子由分立的功能组件构成，它们各自由约 7-20bp 的 DNA 组成并含有一个或多个转录激活物或阻抑蛋白的识别位点。

在各启动子中至少一种组件起确定 RNA 合成的起始位点定位的作用。它的最佳公知实例是 TATA 盒状室，而在某些启动子中缺乏 TATA 盒状室，诸如用于哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和用于 SV40 基因的启动子，位于起始位点上面的分立元件本身能够有助于固定起始位置。

其它启动子元件，即增强子，调节转录开始的频率。一般来说，它们位于起始位点上游的 30 - 110bp 区，不过，近来已经证实许多启动子还含有起点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔通常是柔性的，使得当元件彼此相互颠倒或移动时启动子的功能是保守的。在 tk 启动子中，在活性开始下降前启动子元件之间的间隔可以增加至 50bp 间距。随着启动子的不同，看起来各个元件可以以共操作的方式起作用或独立地起作用以便激活转录。

启动子可以是一种天然与基因或多核苷酸序列相关联的启动子，它可以通过分离定位于编码区段和/或外显子上游的 5' 非编码序列而获得。将这类启动子称作“内源性的”。类似地，增强子可以是一种天然与多核苷酸序列相关联的增强子，它位于所述序列的下游或上游。另一方面，通过在重组或异源启动子控制下给编码多核苷酸区段定位将获得某些优点，所述的编码多核苷酸区段指的是通常不与其天然环境中的多核苷酸序列相关联的启动子。重组或异源增强子也指通常不与其天然环境中的多核苷酸序列相关联的增强子。这类启动子或增强子可以包括其它基因的启动子或增强子和分离自任何其它原核细胞、病毒细胞或真核细胞的启动子或增强子以及并非“天然存在的”，即含有不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变的启动子或增强子。除了以合成方式产生启动子和增强子的核酸序列外，使用包括 PCRTM 在内的重组克隆和/或核酸扩增技术与本文公开的组合物（美国专利 4,683,202；美国专利 5,928,906）也可以产生序列。此外，值得关注的是还可以使用在诸如线粒体、叶绿体等这样的非核细胞器内指导序列转录和/或表达的控制序列。

实际上，重要的是使用有效指导在选择用于表达的细胞类型、细胞器和生物体内 DNA 区段的表达的启动子和/或增强子。分子生物学领域的技术人员一般了解如何使用用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型的组合，例如参见 Sambrook 等（1989）。所用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或在指导导入 DNA 区段的高水平表达的适宜条件下可用的，诸如在大规模生产重组蛋白质和/或肽

类中有利的启动子。该启动子可以是异源的或内源的。

本文列举的实验例中典型的启动子序列是立即早期巨细胞病毒 (CMV) 启动子序列。该启动子序列是一种能够驱动可操作连接的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。然而, 也可以使用其它组成型启动子序列, 包括但不限于: 猿猴病毒 40 (SV40) 早期启动子; 小鼠乳腺癌病毒 (MMTV) 启动子; 人免疫缺陷病毒 (HIV) 长末端重复 (LTR) 启动子; 莫洛尼氏病毒启动子; 鸟白血病病毒启动子; EB 病毒立即早期启动子; 劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子, 诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸启动子。此外, 本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被考虑作为本发明的一部分。本发明的诱导型启动子的应用提供了一种能够在需要表达时启动可操作连接的多核苷酸序列表达或在不需表达时中断表达的分子开关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。此外, 本发明包括组织特异性启动子的应用, 该启动子仅在所需组织中具有活性。组织特异性启动子在本领域中是众所周知的且包括但不限于 HER-2 启动子和与 PSA 相关联的启动子序列。

在本发明的特定实施方案中, 所述的表达载体包括编码信号序列的多核苷酸, 所述的信号序列指导由此编码的蛋白质的加工进入合适的细胞机构 (cellular machinery) 以便使蛋白质从所述细胞中分泌。可以使用包括但不限于乙型肝炎病毒 E 抗原信号序列、免疫球蛋白重链前导序列、细胞因子前导序列等这样的典型信号序列。指导蛋白质从细胞中分泌的任何信号序列基本上适用于本发明的表达载体。除信号序列外, 可以使用其它用于分泌的机理, 诸如但不限于抑制蛋白质分泌的序列的截短或缺失、抑制蛋白质分泌的序列的点突变和使蛋白质与装配入病毒颗粒的病毒基因连接。

本发明的一个实施方案是一种表达载体, 其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列, 其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 B 细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 CD4⁺ T-细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发哺乳动物体内的 CD8⁺ T-细胞反应。

本发明的一个特定实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括至少一个表位的多核苷酸序列，其中所述的至少一个表位诱发导入了所述抗原的哺乳动物体内的 B 细胞反应、CD4⁺ T-细胞反应和 CD8⁺ T-细胞反应。

本发明的另一个实施方案是一种表达载体，其中所述的编码抗原的多核苷酸包括用于多个表位的多核苷酸序列，其中所述的多个表位诱发导入了所述抗原的哺乳动物体内的 B 细胞反应、CD4⁺ T-细胞反应和 CD8⁺ T-细胞反应。

在本发明的特定实施方案中，所述的表达载体包括编码抗原的多核苷酸序列。所述的编码抗原的多核苷酸序列选自至少一种与疾病相关的多核苷酸序列，其中所述的疾病选自感染性疾病、癌症和自身免疫病组成的组。更具体地说，所述的编码抗原的多核苷酸是一种多核苷酸序列，它选自导致由病毒、细菌、真菌和原生动物组成的感染性疾病的致病微生物的组。这些编码公知蛋白质或其片段的 DNA 序列包括病毒抗原，诸如但不限于：乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒抗原；人免疫缺陷病毒抗原；包括但不限于 gp160、gp120 和 gag 蛋白；乳头瘤病毒抗原，包括但不限于 E7 和 E6 蛋白。作为有用的 retrogen 融合蛋白，疱疹病毒蛋白质诸如例如由 EB 病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹 1 型和 2 型病毒、人疱疹 6、7 和 8 型病毒编码的蛋白质也是本发明所关注的。在其它实施方案中，编码抗原的多核苷酸是一种选自乳腺癌、宫颈癌、黑素瘤、肾癌和前列腺癌组成的组的多核苷酸。此外，所述的蛋白质可以是一种诱导激活针对肿瘤细胞的免疫反应的蛋白质，其目的在于抑制其生长和复制，即激活对黑素瘤中黑素细胞的免疫反应的

酪氨酸酶。其它与肿瘤相关的蛋白质包括但不限于 MART、trp、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、gp100、HER-2、PSA、与肺癌相关的 Ras 抗原和任何其它肿瘤特异性、组织特异性或与肿瘤相关的抗原。本领域技术人员了解已知编码与肿瘤相关抗原的多核苷酸序列且它们充分公开在科学文献中且正在非常迅速地发现迄今为止未知的多核苷酸序列。在另一个实施方案中，所述的编码抗原的多核苷酸序列选自包括但不限于类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化、银屑病和局限性回肠炎在内的自身免疫病。此外，本发明应包括编码自身抗原的 DNA 以便诱发在一些情况中的免疫耐受性，其中这类耐受性对哺乳动物可能是有利的。此外，本发明应包括编码能够诱发哺乳动物体内全身性免疫反应的抗原的 DNA，其中全身性免疫反应对哺乳动物来说是有利的。全身性免疫反应在哺乳动物是免疫抑制的情况中对哺乳动物有利，即作为 HIV 感染、化疗或其它免疫抑制过程的结果。这类抗原可以包括但不限于当与抗原呈递细胞上的 Fc 受体结合时用于通过这些细胞增量调节抗原呈递的 Fc 抗体片段。此外，可以将诸如但不限于白细胞介素 5 这样的白细胞介素用于在需要诱发全身性免疫反应的哺乳动物体内产生相似的辅助作用。本发明由此应包括任何已知或迄今为止未知的多核苷酸序列，如果它们包含在本发明的表达载体中，那么当将载体或由此编码的融合蛋白导入哺乳动物时它们能够激活免疫反应。

本领域技术人员认识到核酸序列编码全长蛋白质并非必要。所表达的蛋白质包括在抗原呈递细胞中加工时引起所需免疫反应的表位是完全必要的。因此，由此信息中显然可以看出核酸序列可以编码能引起导入了表达载体的动物体内免疫反应的任何抗原。因此，本发明决不应限定表达载体内包含的核酸序列类型，而应包括通过本领域中可得到的任何方法获得的任何和所有的核酸序列，所述的方法包括但不限于重组方法和通过合成方法，其中所述的重组方法包括但不限于使用常规克隆技术和 PCR[™] 从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列的方法。本发明也不应以任何方式限定核酸序列的来源，因为核酸序列可

以获自任何可得到的来源。本领域技术人员了解获得核酸序列的方案在本领域中是众所周知的且例如如 Sambrook 等 (1989) 和 Ausubel 等 (1997) 所述。

在本发明的特定实施方案中,所述的表达载体进一步包括编码细胞结合元件的多核苷酸序列。所述的细胞结合元件是一种多肽的部分,它有利于使蛋白质与细胞受体结合。可以将编码与细胞受体蛋白结合的任何配体的多核苷酸用于本发明的表达载体中。典型的细胞结合元件包括但不限于:免疫球蛋白 Fc 片段;毒素受体蛋白细胞结合结构域,诸如例如假单胞菌外毒素结合结构域;细胞因子,例如白细胞介素 5 和白细胞介素 6;任何类型的抗体分子等。本领域技术人员认识到任何的抗体能够结合抗原呈递细胞表面上的细胞表面标记,从而启动抗原/抗体复合物的摄入。因此,可以将抗体或其片段用作启动摄入的细胞结合元件。典型的抗体包括但不应限于抗 CDC11、抗 CD54、抗 CD80 和抗 CD86。此外,本领域技术人员认识到所述的细胞结合元件可以是同源的或异源的。例如,Fc 片段可以是同源的或异源的。因此,本发明不应以任何方式限定所述细胞结合元件的来源,因为用于细胞结合元件的序列可以获自任何可得到的来源,包括但不限于使用常规克隆技术和 PCRTM 等从重组文库或细胞基因组中克隆 DNA 的方法和通过合成方法。

除了使用已知结合元件的部分外,本领域技术人员认识到通过本领域中众所周知的典型筛选步骤可以鉴定小肽类。筛选 DNA 文库(cDNA 或基因组)以便鉴定有效地与抗原呈递细胞结合的小肽类。一旦鉴定了这些肽类,则对所述肽测序并用作本发明中的细胞结合元件。

在表达中,一般包括聚腺苷酸化序列以便对转录物进行适当的聚腺苷酸化。并不认为聚腺苷酸化序列的性质对成功实施本发明来说是决定性的和/或可以使用任何这类序列。优选的实施方案包括适宜和/或已知在各种靶细胞中充分起作用的 SV40 聚腺苷酸化序列、LTR 聚腺苷酸化序列和/或牛生长激素聚腺苷酸化序列。作为表达载体的元件另外所关注的是转录终止位点。这些元件能用于提高信息水平和/或使从

插入的编码抗原和细胞结合元件的多核苷酸序列到载体的其它序列的连续减少到最低限度。

特异性起始信号也是有效翻译编码序列所需的。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供包括ATG起始密码子在内的外源翻译控制信号。本领域技术人员能够便利地测定它并提供必要的信号。众所周知起始密码子必须与所需编码序列读框“符合”以便确保整个插入片段的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含合适的转录增强子元件可以提高表达的效率。

为了使载体在宿主细胞中增殖，它可以含有一个或多个复制起点（通常称作“ori”），它是在该位点上开始复制的特异性核酸序列。另一方面，如果宿主细胞是酵母，那么可以使用自主复制序列（ARS）。在表达载体在细胞内复制是有利的情况中，载体可以通过整合序列整合入细胞的基因组，所述的整合序列即逆转录病毒长末端重复序列（LTRs）、腺伴随病毒的ITR序列，它们存在于所述载体中；或另一方面，所述载体自身可以含有DNA复制起点和其它有利于载体在细胞内复制的序列，同时该载体维持附加型。例如，表达载体可以任选地包括EB病毒（EBV）的DNA复制起点和编码EBV EBNA-1蛋白的序列以便载体的附加型复制在导入了该载体的细胞中得到促进。例如，带有EBV起点和核心抗原EBNA-1编码的DNA构建体能够在哺乳动物细胞内复制到高拷贝数并且例如商购自Invitrogen（San Diego, CA）。

重要的是应注意在本发明中，为适宜的蛋白质表达而将所述表达载体整合入宿主细胞的基因组并不是必要的。相反，所述的表达载体还可以以附加型分子形式存在于所需细胞中。例如，存在某些细胞类型，其中表达载体复制以便表达所需蛋白质并不是必要的。这些细胞是那些诸如肌细胞这样通常不复制且仍然完全能够进行基因表达的细胞。可以将表达载体导入非分化细胞非在没有表达载体复制的情况下表达由此编码的蛋白质。

为了鉴定含有本发明核酸构建体的细胞，在体外或体内通过使标记包含在表达载体中来鉴定所述细胞。这类标记为细胞提供了可鉴定

的改变，从而可以便利地鉴定含有所述表达载体的细胞。一般来说，选择标记是一种提供选择特性的标记。正选择标记是一种在有标记存在的情况下使其进行选择的标记，而负选择标记是一种其存在可防止其进行选择的标记。正选择标记的实例是药物抗性标记。

通常包含药物选择标记有助于转化体的克隆和鉴定，例如产生新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、zeocin 和组氨醇抗性的基因是有用的选择标记。除了产生鉴别基于实施条件的转化体的表型的标记外，还关注包括诸如 GFP 这样的筛选性标记在内的其它类型的标记，其基础是比色分析。另一方面，可以使用诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶（tk）或氯霉素乙酰转移酶（CAT）这样的筛选性酶。本领域技术人员还了解如何将免疫性标记与 FACS 分析结合使用。例如，在表达载体中包含 NGFR（神经生长因子受体）是为了有利于通过使用流式细胞测定法筛选包括所述载体的细胞，从而检测该细胞表面上的 NGFR 表达。并不认为所用的标记是重要的，条件是它能够与编码基因产物的核酸一起同时被表达。选择和筛选性标记的其它实例对本领域技术人员来说是众所周知的。

所述的表达载体还可以包括原核细胞的 DNA 复制起点和编码用于选择包括所述表达载体的原核细胞的检测标记的基因，例如一种抗生素抗性基因，诸如例如氨苄西林抗性基因。

此外，可以将所述的表达载体以 RNA 而不是 DNA 的形式提供给细胞。载体的核心成分与本文所述的用于 DNA 载体的那些成分相同且另外可以添加用于使体液中和组织和细胞中的 RNA 保持稳定的其它成分。

将本文所述的各种成分彼此连接以产生本发明的表达载体的实际方法在本领域中是众所周知的且例如如 Sambrook 等（1989）、Ausubel 等（1994）和 Gerhardt 等（1994）所描述。

在特定的实施方案中，所述的表达载体选自病毒载体、细菌载体和哺乳动物载体组成的组。存在包括上述组成中至少一部分或全部的大量表达载体系统。可以将以原核生物和/或真核生物载体为基础的系

统用于本发明以便产生核酸序列、或其关连多肽类、蛋白质类和肽类。许多这类系统是商购的和可广泛得到的。

昆虫细胞/杆状病毒系统可以产生异源核酸片段的高水平蛋白质表达，诸如它们描述在美国专利号 5,871,986、4,879,236 中；且例如这些系统可以在下列商品名下购买：来自 INVITROGEN® 的 MAXBAC® 2.0 和来自 CLONTECH® 的 BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM。

表达载体系统的其它实例包括 STRATAGENE® 的包括合成蜕皮激素诱导型受体的 COMPLETE CONTROL™ 诱导型哺乳动物表达系统或其 pET 表达系统，即一种大肠杆菌表达系统。另一种诱导型表达系统的实例商购自 INVITROGEN®，它携带 T-REX™（四环素调节的表达）系统，即一种使用全长 CMV 启动子的诱导型哺乳动物表达系统。INVITROGEN® 还提供了一种称作甲醇毕赤酵母（*Pichia methanolica*）表达系统的酵母表达系统，设计它是为了在甲基营养酵母甲醇毕赤酵母中产生高含量的重组蛋白。本领域技术人员了解如何表达诸如表达构建体这样的载体以便产生核酸序列或其关连多肽、蛋白质或肽。

通过将表达载体导入细胞而产生包括表达载体的转化细胞。将 DNA 导入细胞或宿主细胞是分子生物学领域中众所周知的技术且例如如 Sambrook 等（1989）、Ausubel 等（1994）和 Gerhardt 等（1994）所描述。细胞的转染方法包括磷酸钙沉淀法、脂质体介导的转染法、DEAE 葡聚糖介导的转染法、电穿孔等。另一方面，可以使用参考文献和其中提供的实施例中所描述的常规技术用本发明的 retrogen 表达载体简单转导细胞。宿主细胞包括原核细胞或真核细胞且它包括能够复制载体和/或表达由载体编码的异源基因的任何可转化的生物体。可以并且已经将宿主细胞用作载体的受体。宿主细胞可以来源于原核生物或真核生物，这取决于所需的结果是载体的复制还是载体编码的核酸序列的部分或全部的表达。可以得到用作宿主细胞的大量细胞系和培养物且它们可以通过美国典型培养物保藏中心（ATCC）获得，ATCC 是一个作为活的培养物和遗传材料的存档的组织（www.atcc.org）。它在本领域中是众所周知的且本领域技术人员可确定合适的宿主。一般

来说, 这要以载体主链和所需结果为基础。例如, 可以将质粒或粘粒导入原核生物的宿主细胞以用于许多载体的复制。用作载体复制和/或表达的宿主细胞的细菌细胞包括 DH5 α 、JM109 和 KC8 以及许多诸如 SURE[®]感受态细胞和 SOLOPACK[™]金细胞 (STRATAGENE[®], La Jolla, CA) 这样的商购细菌宿主细胞。另一方面, 可以将诸如大肠杆菌 LE392 这样的细菌细胞用作噬菌体病毒的宿主细胞。可以用作宿主细胞的真核细胞包括但不限于酵母、昆虫和哺乳动物。复制和/或表达载体用的哺乳动物真核宿主细胞的实例包括但不限于 HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos 和 PC12。酵母菌株的实例包括但不限于 YPH499、YPH500 和 YPH501。来自各种细胞类型和生物体的许多宿主细胞是可得到的且它们对本领域技术人员来说是公知的。类似地, 可以将病毒载体与真核或原核宿主细胞, 特别是一种允许复制或表达载体的宿主细胞结合使用。

此外, 可以以病毒载体形式将所述的表达载体提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是众所周知的且例如如 Sambrook 等 (1989)、Ausubel 等 (1994) 和 Gerhardt 等 (1994) 以及其它病毒学和分子生物学指南中所描述。用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒属。

某些载体可以使用允许在原核细胞和真核细胞中复制和/或表达的控制序列。本领域技术人员将会进一步认识到培养所述的所有宿主细胞以维持它们并允许复制载体的条件。大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸及其关连多肽类、蛋白质类或肽类的技术和条件也是可以理解的和公知的。

本发明的一个特定实施方案是一种包括信号序列和抗原和细胞结合元件的融合蛋白。本发明还包括 retrogen 蛋白或融合蛋白作为疫苗的应用。可以通过在包括表达载体的任何细胞内表达 retrogen 蛋白并从细胞、细胞碎片和细胞培养基中分离 retrogen 蛋白而获得 retrogen 蛋白。特别可以将亲和柱纯化方法用于纯化本发明的 retrogen, 因为根据定义 retrogen 包括细胞结合元件。可以将包括配对细胞受体或诸

如蛋白质 A 或蛋白质 G 这样的通用蛋白质的亲和柱用于从细胞成分中分离 retrogen。另一个实施方案是一种包括在体外用所述融合蛋白转导的抗原呈递细胞的疫苗。

在其它实施方案中，疫苗包括所述的表达载体，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的编码启动子序列的多核苷酸、编码分泌信号序列的多核苷酸序列、编码抗原的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和编码聚腺苷酸化序列的多核苷酸。可以将包括所述表达载体的所述疫苗直接对哺乳动物的部位给药，在这些部位中存在可以向其中导入在该载体内所包含的所述序列、表达和可能引起针对所需蛋白质的免疫反应的细胞。在这种情况下，以在一种药物载体中和制剂形式给予所述的表达载体，使得 DNA 能够进入细胞并在其中被表达。然后所表达的蛋白质可以进入抗原呈递细胞以用于本文所述的加工和 MHC 呈递。本领域技术人员认识到可以以各种方式给予 DNA 且随注射途径的不同可能需要操作 DNA 的组合物。非肠道注射的典型途径包括但不限于肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下和皮内。此外，通过将表达载体的 DNA 直接注入哺乳动物的组织而将表达载体的 DNA 导入哺乳动物细胞并不是必要的。相反，可以使用将所述表达载体导入哺乳动物的其它方式，包括但不限于非侵入性压力注射、鼻内、口服等。

导入哺乳动物的 DNA 的量是足以在细胞中有效表达 DNA 的量，使得足够量的蛋白质被表达并从其中分泌，然后该蛋白质被抗原呈递细胞吸收并在其上表达为 MHC 复合物。本文将这样的 DNA 量称作 DNA 的“治疗量”。构成治疗量的 DNA 的精确浓度可以由将这类化合物给予哺乳动物的本领域技术人员便利地确定且当然会随其中包含的成分和包括但不限于导入了 DNA 的组织 and 哺乳动物的年龄和健康情况在内的其它因素而改变。

本发明的另一个特定的实施方案是一种包括用所述表达载体转导的细胞的疫苗。将这些转导的细胞以药物组合物的形式给予哺乳动物，目的在于在其中引起免疫反应。细胞中 retrogen 蛋白质的表达使 retrogen 蛋白从细胞中分泌。然后分泌的 retrogen 蛋白可以被哺乳

动物体内的抗原呈递细胞吸收以用于在其中加工和由此表达为 MHC-I 或 MHC-II 复合物。当真核细胞是抗原呈递细胞时, retrogen 蛋白可以在其中表达、从其中分泌并可以重新进入细胞以便加工和抗原的 MHC 呈递。当真核细胞不是抗原呈递细胞时, 细胞表达和分泌 retrogen 蛋白, 随后它被抗原呈递细胞吸收以用于抗原的 MHC 呈递。用于本发明的非抗原呈递细胞包括不能加工 MHC 呈递用抗原的任何细胞, 即肌细胞。抗原呈递细胞包括树突细胞 (DC)、巨噬细胞、单核细胞等。另外包括的肿瘤细胞可以是能够或不能加工 MHC 呈递用抗原的细胞。

还可以将所述的表达载体导入哺乳动物的干细胞, 可以直接在体内导入哺乳动物或更优选在体外导入从哺乳动物中分离并在将载体导入细胞后重新导入哺乳动物的细胞。还可以按照体外手段将表达载体导入哺乳动物中的其它细胞。当将载体导入哺乳动物的细胞时, 所述载体立即表达由此编码的蛋白质并不是必要的, 因为更为需要的可能是在稍后的时间时在细胞中表达蛋白质。在这种情况下, 所述的表达载体优选包括诱导型启动子, 它在将合适的诱导物给予哺乳动物或哺乳动物细胞时被激活。体外技术在本领域中是众所周知的且例如在美国专利号 5,399,346 中描述。

另一个实施方案是一种至少包括编码信号序列的多核苷酸、编码抗原的多核苷酸和编码细胞结合结构域的多核苷酸的表达载体。

本发明的另一个实施方案是一种引起针对抗原的免疫反应的方法。更具体地说, 该方法使用本发明的表达载体操纵细胞以便产生内源性抗原, 如同它们是外源性抗原。这种新型抗原呈递策略包括用新型重组表达载体转导细胞以便产生和分泌由抗原和细胞结合元件组成的融合蛋白。分泌的融合蛋白通过受体介导的胞吞作用被胞吞入或“以逆向方式”被转运入抗原呈递细胞 (Daeron, 1997; Serre 等, 1998; Ravetch 等, 1993)。作为结果, 尽管已经以内源方式产生, 但是在本公开说明书中所称的融合蛋白或 “retrogen” 因其分泌后的逆向转运而在附加型途径中被加工并作为结合在 MHC-II 上的外源性抗原片段在抗原呈递细胞的细胞表面上被呈递。抗原呈递细胞表面上的抗原

的 MHC-II 结合的抗原片段激活 CD4+ T-细胞,该细胞随后刺激 CD8+ T-细胞和巨噬细胞以及 B-细胞,从而诱发细胞和体液免疫。

在本发明中还发现也可以在融合蛋白的合成、分泌和胞吞过程中的胞质途径内加工 retrogen 蛋白且它与抗原呈递细胞表面上的 MHC-I 相关联,从而直接激活 CD8+ T-细胞。在本领域中和例如由 Kovacsovics-Bankowski 等在 1995 年描述了通过摄入的抗原激活 CD8+ T-细胞。此外,如上所述和另外在本文中更详细地描述的,通过分泌的 retrogen 可以激活 B 细胞。因此,B 细胞的激活在本系统中明显被增强,因为 CD4+细胞也激活 B 细胞。因此,这种策略使用一致的机理来激活免疫系统中所有的分支。

在特定的实施方案中,将表达载体导入细胞以便产生转导的细胞。在细胞中表达 retrogen 蛋白导致 retrogen 蛋白从细胞中分泌。然后分泌的 retrogen 蛋白被哺乳动物体内的抗原呈递细胞吸收以用于在其中加工和由此表达为 MHC-I 或 MHC-II 复合物。因此,本领域技术人员认识到转导的细胞或第一种细胞分泌抗原且分泌的抗原被摄入细胞,即属于相同或不同细胞的第二种细胞。当真核细胞是抗原呈递细胞时,retrogen 蛋白可以在其中表达、从其中分泌并可以重新进入细胞以便加工和抗原的 MHC 呈递。当真核细胞不是抗原呈递细胞时,细胞表达和分泌 retrogen 蛋白,随后它被抗原呈递细胞吸收以用于抗原的 MHC 呈递。用于本发明的非抗原呈递细胞包括不能加工 MHC 呈递用抗原的任何细胞,即肌细胞。抗原呈递细胞包括树突细胞(DC)、巨噬细胞、单核细胞等。另外包括的肿瘤细胞可以是能够或不能加工 MHC 呈递用抗原的细胞。

本发明的另一个实施方案是一种引起针对抗原的免疫反应的方法,该方法包括直接给哺乳动物施用所述表达载体的步骤。

本发明还包括一种筛选或鉴定多核苷酸序列的方法,所述的多核苷酸序列编码至少一种能够引起哺乳动物体内免疫反应的结合在 MHC-II 上的表位。优选所鉴定的多肽是一种引起有利于哺乳动物的免疫反应的多肽。该方法包括获得分离的 DNA 分子群体并筛选那些分离

的 DNA 分子的步骤, 这些 DNA 分子编码至少一种能够激活 CD4+辅助 T-细胞的结合在 MHC-II 上的表位。DNA 分子在本文中称作“测试 DNA”或“测试多核苷酸序列”。将测试多核苷酸序列克隆入本发明的表达载体, 在该载体中它位于例如附图 25 中所述的信号序列与细胞结合元件之间。在该方法中, 通过将包括测试多核苷酸序列的载体导入抗原呈递细胞来转导抗原呈递细胞、使转导的抗原呈递细胞与原初 T-细胞或致敏 T-细胞接触且通过评价是任何原初 T-细胞还是致敏 T-细胞在与所述转导的抗原呈递细胞接触时被激活来评估转导的细胞在体外对原初 CD4+ T-细胞的能力。转导的抗原呈递细胞对 T 细胞的激活表示其中包含的测试多核苷酸序列是编码至少一种能够激活 CD4+辅助 T-细胞以引起哺乳动物体内免疫反应的表位的多核苷酸序列、基因或其片段。在本测定试验中可以使用的合适的对照品包括用包括已知不会激活哺乳动物体内免疫反应的分离的多核苷酸序列的表达载体转导的细胞(阴性对照)和用包括已知激活哺乳动物体内免疫反应的分离的多核苷酸序列的表达载体转导的细胞(阳性对照)。本领域技术人员认识到可以将这种筛选过程用于筛选人基因组以便鉴定编码蛋白质或表位的基因, 所述的蛋白质或表位由可用于癌症或自身免疫病的免疫疗法或用于基因疗法的 CD4+ T-细胞识别。此外, 可以筛选包括细菌、病毒或寄生虫的基因组在内的其它基因组。

这种 T-细胞的体外激活测定试验可以适合于高通量自动测定试验以便有利于同时检测许多不同的测试多核苷酸序列。本领域技术人员认识到可以操作本发明以使用含有各种可能表位序列的表达载体转导细胞。可以将转导的细胞置于含有原初 T-细胞的 96 孔平板内并可以通过掺入 T-细胞的 DNA 中的放射性的自动评价、使用临床免疫学中便于获得的技术来评估 T-细胞的激活情况。

在其它实施方案中, 可以进一步评价由测试多核苷酸序列编码的蛋白质产物以便体内评估哺乳动物中的免疫反应的激活。除了将通过导入包括测试多核苷酸序列的表达载体转导的转导抗原呈递细胞经非肠道途径给予哺乳动物外, 本测定试验与体外测定试验相同。在特定

的实施方案中，直接将包括测试多核苷酸序列的表达载体给予哺乳动物。从脾细胞中收集 T-细胞并与树突细胞一起共培养。评价 T-细胞的激活情况以便测定编码测试多肽的测试多核苷酸是否能够激活 CD4+ 辅助 T-细胞。此外，本领域技术人员认识到可以将这种筛选过程用于鉴定可用于治疗癌症、病毒性感染和自身免疫病的结合在 MHC-II 上的表位。

如本文所述，可以通过在分子生物学领域中常用的任何普通方法获得所述的测试多核苷酸序列。例如，测试多核苷酸序列可以获自表达文库，该文库可以表达其功能未知的蛋白质。测试多核苷酸序列还可以获自表达已知功能但迄今为止尚未得知具有激活哺乳动物体内免疫系统的特性的蛋白质的表达文库。典型的表达 cDNA 文库包括但不限于肿瘤细胞、病毒基因组、细菌基因组、寄生虫基因组和人基因组。还可以使用组合的方法获得测试多核苷酸序列，其中最初尚不了解所述的多核苷酸序列是否编码蛋白质；且此外尚不了解所述的多核苷酸序列是否编码能够激活免疫反应的蛋白质。也可以通过合成方法获得测试多核苷酸序列，其中在自动合成仪中合成多核苷酸序列，将不连续长度的片段克隆入所述的表达载体并如本文所述进行测试。

并不始终必要的是免疫反应是保护性的，但仅仅是对宿主哺乳动物有利。例如，对哺乳动物可能有利的是在对抗原的免疫反应对哺乳动物有害的情况下诱发免疫耐受性，例如在诸如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化和局限性回肠炎等这样的某些自身免疫病中，可以通过诱发针对攻击抗原的免疫耐受性而获得的免疫反应的减少是需要的。在这种情况下，DNA 包括编码攻击抗原的 DNA，然后所述的攻击抗原在哺乳动物细胞中被表达且随后在抗原呈递细胞中被加工以便在其表面上被表达为 MHC-I 和/或 MHC-II 复合物，从而在哺乳动物体内诱发对所述抗原的免疫耐受性。

在另外的实施方案中，将所鉴定的多核苷酸序列用作治疗癌症、病毒性感染或自身免疫病的方法。更具体地说，将所鉴定的编码测试多肽的多核苷酸转导入抗原呈递细胞并通过非肠道途径将转导的抗原

呈递细胞直接给予哺乳动物以便治疗癌症、病毒性感染或自身免疫病。此外，通过非肠道途径将至少含有编码测试多肽和细胞结合元件的多核苷酸的表达载体直接给予哺乳动物以便治疗癌症、病毒性感染或自身免疫病。

本发明的另一个实施方案是一种生产对哺乳动物进行免疫接种的疫苗的方法，该方法包括下列步骤：通过将本发明的表达载体导入细胞并表达所述载体以便在所述抗原分泌自所述细胞的条件下产生抗原来转导抗原呈递细胞。在特定的实施方案中，在将抗原呈递细胞给予哺乳动物前用所述抗原在体外或离体转导抗原呈递细胞。可以通过非肠道方式给予本发明的所有疫苗。

在特定的实施方案中，诱发免疫反应的方法包括将表达载体和细胞因子表达载体共同给予生物体的步骤。大量研究已经证实通过共同给予细胞因子表达质粒可以提高对各个质粒的反应。应注意从表达载体局部合成的细胞因子的皮克至纳克量过低以致于不能对哺乳动物整体产生系统性作用，但仍然可以强烈地影响局部细胞因子环境和由此影响对给予的抗原的免疫反应。细胞因子的实例包括但不限于 GM-CSF 和 IL-2。本领域技术人员认识到可以将用于细胞因子的多核苷酸序列和用于抗原的多核苷酸序列混入一种表达载体，由此消除使用两种独立的载体。除了细胞因子外，含有未甲基化的 CpG 序列的质粒提高细胞介导 (Th1) 的反应 (Carson 等, 1997)。CpG 序列基元包括但不限于 RRCpGYY。因此，本领域技术人员认识到在本发明中用表达载体补充细胞因子或添加 CpG 序列基元导致免疫反应的增强。

在本发明的某些实施方案中，内部核糖体进入位点 (IRES) 元件用于生成多基因或多顺反子信息。IRES 元件能够绕过 5' 甲基化帽依赖性翻译的核糖体扫描模型并在内部位点上启动翻译 (Pelletier 和 Sonenberg, 1988)。已经描述了来自细小核糖核酸病毒科的两个成员 (脊髓灰质炎和脑心肌炎) 的 IRES 元件 (Pelletier 和 Sonenberg, 1988) 和来自哺乳动物信息的 IRES (Macejak 和 Sarnow, 1991)。IRES 元件可以与异源可读框连接。可以一起转录多个可读框；通过 IRES 将

它们各自分离,从而生成多顺反子信息。各可读框通过 IRES 元件接近用于有效翻译的核糖体。可以使用单一启动子/增强子有效表达多个核酸序列以便转录单个信息(美国专利 5,925,565 和 5,935,819)。此外,本领域技术人员认识到不必使用基因的整个核酸序列。代之以可以将结合在 MHC I 型和 II 型上的表位的部分核酸序列彼此融合,从而产生由一种启动子转录的嵌合融合基因。例如,本发明的一个特定实施方案是一种同时诱导 CD4⁺和 CD8⁺ T-细胞的方法,该方法包括给予一种融合蛋白的步骤,其中所述的蛋白质包括与细胞结合元件融合的 MHC-I 和 MHC-II 表位。因此,本领域技术人员认识到多个抗原序列的应用使得通过给予一种疫苗治疗各种疾病成为可能。

本发明的另一个特定的实施方案是一种诱发免疫反应的方法,该方法包括给哺乳动物施用一种表达载体的步骤,其中所述的载体包括在一种启动子的转录控制下的编码第一种融合蛋白的多核苷酸序列和编码第二种融合蛋白的多核苷酸序列,其中所述的第一种融合蛋白包括第一种信号序列、第一种抗原和第一种细胞结合元件且所述的第二种融合蛋白包括第二种信号序列、第二种抗原和第一种细胞结合元件。在特定的实施方案中,第一种和第二种信号序列是相同的信号序列,第一种和第二种抗原是不同的抗原且所述的细胞结合元件是 Fc 片段。在其它实施方案中,第一种和第二种信号序列是相同的、第一种和第二种抗原是不同的抗原且第一种和第二种细胞结合元件是相同的细胞结合元件。其它实施方案包括:第一种和第二种信号序列是不同的、第一种和第二种抗原是不同的抗原且第一种和第二种细胞结合元件是相同的细胞结合元件或第一种和第二种信号序列是相同的、第一种和第二种抗原是不同的抗原且第一种和第二种细胞结合元件是不同的细胞结合元件。另一个实施方案包括编码第一种融合蛋白的多核苷酸序列和编码第二种融合蛋白的多核苷酸序列均在独立的转录控制下,且其中编码第一种融合蛋白的多核苷酸序列和编码第二种融合蛋白的多核苷酸序列以串联方式位于一种表达载体中。

本领域技术人员认识到可以将多个核酸序列以串联方式克隆入所

述载体，使得各核酸序列是一个独立的整体。各整体含有驱动各个核酸序列表达的启动子，从而由一种载体表达独立的抗原。这项技术使用用于转录各个信息的多个启动子有效地表达了核酸序列。

本发明的另一个实施方案是一种生产融合蛋白的方法，该方法包括将本发明的表达载体导入细胞并表达所述载体以便在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下产生融合蛋白的步骤。在特定的实施方案中，在体外用融合蛋白转导抗原呈递细胞。更具体地说，将所述的融合蛋白通过非肠道方式给予哺乳动物。

本发明的一个特定的实施方案是一种分泌胞内蛋白的方法，该方法包括将表达载体导入细胞并表达所述载体以便在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下产生融合蛋白的步骤，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码胞内蛋白的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。更具体地说，将编码胞内蛋白的多核苷酸序列截短或使之发生突变以便提高分泌的效率。在特定的实施方案种，所述的胞内蛋白是 HPV 16 E7。

本发明的另一个特定的实施方案是一种分泌膜蛋白的方法，该方法包括将表达载体导入细胞并表达所述载体以便在所述融合蛋白分泌自所述细胞的条件下产生融合蛋白的步骤，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码膜蛋白的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。更具体地说，将编码膜蛋白的多核苷酸序列截短或使之发生突变以便提高分泌的效率。在特定的实施方案中，所述的膜蛋白是 EBV 核心抗原 1。

本发明还包括一种试剂盒，它包括本发明的组合物和描述通过外膜给哺乳动物的细胞或组织施用该组合物的说明书。在另一个实施方案中，该试剂盒包括适合于在将本发明的化合物给予哺乳动物前溶解或悬浮所述组合物的溶剂（优选无菌的）。

剂量和制剂

可以配制并给予本发明的表达载体、转导的细胞和融合蛋白（活性组分）以便通过使所述活性组分与生物体内活性剂的作用部位接触的任何方式治疗各种疾病状态。可以将它们与作为各个治疗活性组分或与治疗活性组分的组合的药物一起通过可得到的任何常规方法来给药。可以单独给予它们，不过，一般将它们与以选择的给药途径和标准药物操作为基础选择的药物载体一起给药。

可以以诸如胶囊剂、片剂和粉剂这样的固体剂型或诸如酏剂、糖浆剂、乳剂和混悬剂这样的液体剂型通过口服方式给予所述的活性组分。还可以将所述的活性组分配制成通过注射、快速输注、鼻咽吸入或皮肤吸收的非肠道给药的剂型。可以通过肌内、静脉内或作为栓剂给予所述的活性剂。

胶囊含有活性组分和诸如乳糖、蔗糖、甘露糖醇、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸等这样的粉状载体。可以使用类似的稀释剂以便制成压制片剂。可以将片剂和胶囊剂制备成缓释产品以便在数小时的期限内使药物连续释放。可以给压制片剂包糖衣或包薄膜衣以便掩盖任何不令人满意的味道并防止片剂接触空气或可以将压制片剂包肠溶衣以便在胃肠道内选择性地崩解。

用于口服给药的液体剂型可以含有着色剂和调味剂以便增加患者的可接受性。

一般来说，水、合适的油、盐水、右旋糖（葡萄糖）水溶液和相关的糖溶液以及诸如丙二醇或聚乙二醇这样的二醇类是合适的非肠道用溶液的载体。非肠道给药用溶液含有活性组分、合适的稳定剂且如果必要含有缓冲物质。单独或组合使用的诸如硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸这样的抗氧化剂是合适的稳定剂。还使用柠檬酸及其盐和乙二胺四乙酸钠（EDTA）。此外，非肠道用溶液可以含有诸如苯扎氯胺、羟苯甲酸甲酯或羟苯甲酸丙酯和氯代丁醇这样的防腐剂。合适的药物载体描述在《Remington 氏药物科学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）中，在本领域种它是一本标准的参考书。

可以将本发明的活性组分配制成可将其悬浮在适用于哺乳动物且特别是人的药物上可接受的组合物中的形式。这类制剂包括应用诸如胞壁酰二肽衍生物 (MDP) 这样的佐剂或描述在美国专利号 4,082,735、4,082,736、4,101,536、4,185,089、4,235,771 和 4,406,890 中所述的类似物。可利用的其它佐剂包括矾 (Pierce Chemical Co.)、脂 A、海藻糖二霉菌酸酯和二甲基二辛酸十八烷溴化铵 (DDA)、弗氏佐剂和 IL-12。其它成分可以包括聚氧化丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物 (Pluronic®)、非离子型表面活性剂和诸如角鲨烯这样的产生代谢变化的油 (美国专利 4,606,918)。

另外,可以将标准制药方法用于控制作用期限。它们在本领域中众所周知的且包括控释制剂且可以包括例如聚合物、聚酯类、聚氨基酸、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素或硫酸鱼精蛋白这样的合适大分子。可以调节大分子的浓度和导入的方法以便控制释放。另外,可以将所述的试剂混入诸如聚酯类、水凝胶、聚(乳酸)或乙烯乙酸乙烯酯共聚物这样的聚合物颗粒中。除混入外,还可以将这些试剂用于捕集微囊中的化合物。

用于给予本发明化合物的有用的药物剂型如下所述。

胶囊剂: 通过给两段硬胶囊各填充 100 毫克粉状活性组分、175 毫克乳糖、24 毫克滑石和 6 毫克硬脂酸镁的装填物来制备胶囊剂。

软胶囊: 制备活性组分溶于大豆油中的混合物并用正位移泵将其注入胶囊以便形成含有 100 毫克活性组分的软胶囊。然后洗涤并干燥该胶囊。

片剂: 通过常规方法制备片剂,使得剂量单位为 100 毫克活性组分、0.2 毫克胶体二氧化硅、5 毫克硬脂酸镁、275 毫克微晶纤维素、11 毫克玉米淀粉和 98.8 毫克乳糖。可以将合适的包衣材料用于增加可口性或用于延缓吸收。

可注射的剂型: 通过在 10% (体积) 的丙二醇和水中搅拌 1.5% (重量) 的活性组分来制备适合于经注射给药的非肠道用组合物。用氯化钠将该溶液制成等渗溶液并灭菌。

混悬剂：制备用于口服给药的水混悬剂，使得每 5 毫升含有 100 毫克精细分散的活性组分、200 毫克羧甲基纤维素钠、5 毫克苯甲酸钠、1.0 克的山梨醇溶液 U. S. P. 和 0.025 毫升香草醛。

因此，可以通过各种途径输送本发明的药物组合物并输送至哺乳动物体内的不同部位以获得特定的作用（例如，参见 Rosenfeld 等，1991；Rosenfeld 等，1991a；Jaffe 等，参见上文；Berkner，参见上文）。本领域技术人员会认识到：尽管可以使用一种以上的给药途径，但是特定的途径可以比另一种途径产生更为迅速和更为有效的反应。通过包括将所述制剂施用于体腔或滴注入体腔、吸入或吹入气溶胶在内的给药或通过包括肌内、静脉内、腹膜、皮下、皮内以及局部给药在内的非肠道导入可以完成局部或全身输送。

可以将本发明的活性组分制成单位剂型，其中例如茶匙、片剂、溶液或栓剂这样的各剂量单位含有预定量的组合物，可以单独含有或以与其它活性剂联用的方式含有它们。本文所用的术语“单位剂型”指的是适合作为人和哺乳动物受治疗者的单位剂量的物理分散单位，各单位含有预定量的以单独或以与其它活性剂联用形式的本发明组合物，所述的量按照足以产生所需作用的量来计算，如果合适，该组合物中还含有药物上可接受的稀释剂、载体或赋形剂，本发明对单位剂型的说明取决于所实现的特定作用和与特定宿主中的药物组合物相关的药效学。

本文所述的这些方法决非包含了全部方法，而其它方法也适合于特定的应用，这对本领域技术人员来说是显而易见的。此外，通过与已知发挥所需作用的化合物类似可以进一步近似得到所述组合物的有效量。

液体制剂和/或毫微型胶囊

在某些实施方案中，为了将表达载体导入宿主细胞，关注的是液体制剂和/或毫微型胶囊的应用。

毫微型胶囊一般以稳定和/或可再现的方式捕集化合物。为了避免

以胞内聚合物过载导致的副作用，应使用能够在体内降解的聚合物设计这类超微粒（大小在 $0.1\mu\text{m}$ 左右）。所关注的是用于本发明的满足这些要求的可降解的聚烷基氰基丙烯酸酯毫微型颗粒和/或易于制备这类颗粒。

在本发明的一个特定的实施方案中，所述的表达载体可以与脂类结合。可以使与脂类结合的表达载体包囊在脂质体的水层内、散布在脂质体的脂双层内、通过与脂质体和寡核苷酸连接的连接分子与脂质体结合、在脂质体中捕集、与脂质体复合、分散在含有脂类的溶液中、与脂类混合、与脂类合并、作为混悬液包含在脂类中、包含在胶束内或与胶束复合否则与脂类结合。与脂类或脂类/表达载体结合的本发明组合物并不限于溶液形式的任何特定结构。例如，它们可以作为胶束存在于双层结构中或具有“可收缩的”结构。还可以简单地使它们散布在溶液中，可能形成大小或形状不均匀的聚集物。

脂类是可以属于天然存在或合成的脂类的脂肪物质。例如，脂类包括在细胞质中天然存在的脂滴以及本领域中众所周知含有长链脂族烃类及其衍生物类型的化合物，诸如脂肪酸类、醇类、胺类、氨基醇类和醛类。

可以将磷脂类用于制备本发明的脂质体且它们可以携带净正电荷、负电荷或呈电中性。可以将磷酸二乙酰酯用于提供脂质体上的负电荷并可以将硬脂酰胺用于提供脂质体上的正电荷。该脂质体可以由一种或多种磷脂类制成。

呈电中性的脂类可以包括不带电荷的脂类、基本上不带电荷的脂类或带有相同数量的正电荷和负电荷的脂类混合物。合适的磷脂类包括磷脂酰胆碱类和其它本领域技术人员众所周知的磷脂类。

适用于本发明的脂类可以获自商品来源。例如，二肉豆蔻基磷脂酰胆碱（“DMPC”）可以获自 Sigma Chemical Co.；磷酸二鲸蜡酯（“DCP”）获自 K & K Laboratories (Plainview, NY)；胆固醇（“Chol”）获自 Calbiochem-Behring；二肉豆蔻基磷脂酰甘油（“DMPG”）和其它脂类可以获自 Avanti Polar Lipids, Inc.

(Birmingham, AL.)。可以将脂类的氯仿或氯仿/甲醇储备溶液储存在约-20℃下。优选将氯仿用作唯一的溶剂,因为它比甲醇更易于蒸发。

来自诸如卵或大豆磷脂酰胆碱、脑磷脂酸、脑或植物磷脂酰肌醇、心磷脂和植物或细菌磷脂酰乙醇胺这样天然来源的磷脂类并不优选作为主要磷脂即构成50%或50%以上总磷脂组合物的磷脂,这是由于所得脂质体的不稳定性和渗漏程度所造成的。

“脂质体”是一种包括通过产生包封的脂双层或聚集物而形成的各种单层和多层脂小泡的通用术语。脂质体的特征在于具有带有磷脂双层膜的囊状结构和内部水介质。多层脂质体具有通过水介质隔离的多脂层。它们在磷脂类悬浮于过量水溶液中时自发形成。脂成分在形成封闭结构前进行自身重排并捕集脂双层之间的水和溶解的溶质(Ghosh 和 Bachhawat, 1991)。然而,本发明还包括在溶液中具有不同结构而非正常囊状结构的组合物。例如,可以推定脂类是一种微团结构或仅作为不均匀的脂类分子聚集物存在。还关注 lipofectamine-核酸复合物。

磷脂类在分散在水中时可以形成非脂质体的各种结构,这取决于脂类与水的摩尔比。在低比例下脂质体是优选的结构。脂质体的物理特征取决于 pH、离子强度和/或存在的二价阳离子。脂质体可以表现出对离子和/或极性物质的低渗透性,而在升温下发生显著改变其渗透性的相变。相变包括从称作凝胶态的稠密填充的有序结构改变成称作液态的疏松填充的无序结构。这种情况在特征相变温度下发生和/或导致对离子、糖类和/或药物的渗透性增加。

脂质体通过4种不同的机理与细胞发生相互作用:通过诸如巨噬细胞和/或中性粒细胞这样的网状内皮系统的吞噬细胞的胞吞作用;通过非特异性弱疏水作用和/或静电力和/或通过与细胞表面成分的特性相互作用吸附在细胞表面;通过将脂质体的脂双层插入质膜而与浆细胞融合,同时将脂质体内含物释放入细胞质;和/或通过将脂质体脂类转入细胞和/或亚细胞膜和/或反之亦然,但不结合脂质体内含物。

改变脂质体制剂可以改变操作机理，不过，可以同时实施一种以上的机理。

已经在体外极为成功地进行了脂质体介导的寡核苷酸转运和外源 DNA 的表达。Wong 等（1980）证实了在培养的鸡胚胎、HeLa 和肝细胞瘤细胞中进行脂质体介导的转运和外源 DNA 的表达的可行性。Nicolau 等（1987）成功地完成了静脉注射后大鼠体内脂质体介导的基因转移。

在本发明的某些实施方案中，可以将脂类与血凝病毒（HVJ）结合。已经证实了这种情况，从而有利于与细胞膜的融合和促进细胞进入脂质体包裹的 DNA（Kandeda 等，1989）。在其它实施方案中，脂类可以与核非组蛋白染色体蛋白质（HMG-1）复合或与之一起使用（Kato 等，1991）。在其它实施方案中，脂类可以与 HVJ 和 HMG-1 复合或与之一起使用。即已经成功地将这类表达载体用于在体外和体内转移和表达寡核苷酸，然后它们可应用于本发明。尽管在 DNA 构建体中使用细菌启动子，但是在脂质体内包括合适的细菌聚合酶也是需要的。

可以通过不同方法制备本发明使用的脂质体。脂质体的大小根据合成方法的不同而改变。悬浮在水溶液中的脂质体一般呈球形囊泡的形状，它们带有一层或多层脂双层分子的同心层。各层由通式 XY 代表的平行排列的分子组成，其中 X 是亲水部分而 Y 是疏水部分。在水混悬液中，同心层的排列使得亲水部分倾向于保持与水相接触，而疏水区倾向于自结合。例如，当水相存在于脂质体内和不存在于脂质体内时，脂类分子均可以形成称作片层的 XY-YX 排列的双层。当一种以上脂类分子的亲水和疏水部分彼此结合时，可以形成脂类的聚集物。这些聚集物的大小和形状取决于许多不同的变化因素，诸如溶剂的性质和溶液中存在的其它化合物。

可以按照公知的实验室技术制备本发明范围内的脂质体。在一个优选的实施方案中，通过在例如玻璃梨形烧瓶这样的容器内混合脂质体脂类来制备脂质体。该容器应具有大于预计脂质体混悬液体积 10 倍的体积。使用旋转蒸发器在约 40℃ 和负压下除去溶剂。溶剂通常在约 5 分钟 - 2 小时内被除去，这取决于所需的脂质体的体积。可以在真空

中的干燥器内进一步干燥所述组合物。因随时间变质的倾向而一般在约1周后弃去干燥的脂类。

通过阵摇至所有液体膜重新悬浮可以使干燥的脂类在无菌的不含致热原的水中水合成约25-50mM磷脂。然后将这种水脂质体分离成等分部分、将它们各自置于小瓶内、冻干并在真空中密封。

在另一种选择中,可以按照其它公知的实验室方法制备脂质体: Bangham等(1965)的方法,将该文献的内容引入本文作为参考; Gregoiradis的方法,如《生物学和药物中的药物载体》(DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE)中所述, G. Gregoiradis编辑(1979) 287-341页,将该文献的内容引入本文作为参考; Deamer和Uster在1983年所述的方法,将该文献的内容引入作为参考;和如 Szoka和Papahadjopoulos在1978年所述的反相蒸发法。上述方法在其捕集含水物质的相应能力及其相应的含水空间与液体比方面存在差异。

可以使如上所述制备的干燥脂类或冻干脂质体脱水并在抑制性肽溶液中再溶解和用例如DPBS这样的合适溶剂稀释成合适的浓度。然后在涡流混合器中剧烈振摇该混合物。通过以 $29,000 \times g$ 离心除去未包裹的核酸并洗涤脂质体沉淀。将洗涤的脂质体重新悬浮至合适的总磷脂浓度、例如约50-200mM。可以按照标准方法测定包裹的核酸的量。在测定脂质体制剂中包裹的核酸的量后,可以将该脂质体稀释成合适的浓度并在4℃下储存至应用为止。

包括所述脂质体的药物组合物通常包括无菌的药物上可接受的载体或稀释剂,诸如水或盐水溶液。

基因疗法的给药

本领域技术人员认识到可以将本发明的表达载体用于基因疗法。就基因疗法而言,本领域技术人员认识到所用的载体必须含有可操作地与启动子连接的有意义的基因。就反义基因疗法而言,有意义的基因的反义序列可操作地与启动子连接。本领域技术人员认识到在某些情况中,诸如3' UTR调节序列这样的其它序列可用于表达有意义的基

因。如果合适，可以按照本领域中公知的方式将基因疗法的载体配制成固体、半固体、液体或气态形式的制剂以适合于其相应的给药途径。可以将本领域中公知的方法用于防止组合物的释放和吸附，直到它达到靶器官或确保组合物的定时释放为止。应使用不会使本发明组合物无效的药物上可接受的剂型。在药物剂型中，可以将所述组合物单独使用或以合适的结合方式以及组合方式与其它具有药物活性的化合物一起使用。必须给予足够量的含有治疗核酸序列的载体以便提供药理上有效剂量的基因产物。

本领域技术人员认识到可以将不同的转运方法用于将载体给药入细胞。实例包括：（1）使用物理方式的方法，诸如电穿孔（电）、基因枪（物理力）或应用大体积的液体（压力）；和（2）使所述载体与诸如脂质体、凝集的蛋白质或转运蛋白分子这样的另一种整体复合的方法。

因此，本发明提供了一种将治疗基因转入宿主的方法，该方法包括使用任何上述给药途径或本领域技术人员所公知且适合于特定应用的可选择途径给予本发明的载体，优选作为组合物的一部分的步骤。可以依据治疗作用（例如与所治疗特定疾病相关的某些症状的缓解）或另外通过证实转移的基因或基因在宿主内的表达监测按照本发明将载体转入宿主细胞的有效基因转移（例如，使用与测序、RNA 印迹或 DNA 杂交结合的聚合酶链反应；或检测宿主细胞内核酸的转录测定试验；或使用免疫印迹分析、抗体介导的检测、mRNA 或蛋白质半衰期研究；或检测由转移的核酸编码的蛋白质或多肽或因这类转移导致的对水平或功能的影响的颗粒化试验）。

本文所述的这些方法决不意味着包含所有方法且可以使用适合于特定应用的其它方法，这对本领域技术人员来说是显而易见的。此外，可以通过与已知发挥所需作用的化合物类似而进一步近似得到所述组合物的有效量。

此外，实际剂量和方案可以根据是否将所述组合物与其它药物组合物联用给药或根据个体之间的药代动力学、药物性能和代谢方面的

差异来改变。类似地，剂量可以在体外应用中改变，这取决于所用的特定细胞系（例如，基于存在于细胞表面上的载体受体的数量或所用的特定载体用于基因转移以便在该细胞系中复制的能力）。此外，每个细胞中添加的载体量能够随插入载体的治疗基因的长度和稳定性以及序列的性质来改变且它特别是一种需要根据经验确定的参数且可以因并不是本发明方法固有的因素（例如，与合成相关的成本）而改变它。本领域技术人员可以根据特定情况中的要求方便地进行任何必要的调整。

含有治疗基因的细胞还可以含有一种自杀基因（即编码可以用于破坏细胞的产物的基因，诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶），这是可能的。在许多基因疗法的情况中，需要能够在宿主细胞中表达用于治疗目的的基因，而且需要具有一旦完成疗法、成为无法控制的或不会导致可预计的或所需的结果就破坏宿主细胞的能力。因此，可以通过启动子驱动治疗基因在宿主细胞中的表达，不过，所述自杀基因的产物在没有前体药物的情况下仍保持无害。一旦疗法完成或不再需要或需求治疗，则前体药物的给药会导致自杀基因产物对细胞成为致命性的。可以使用的自杀基因/前体药物组合的实例是：单纯疱疹病毒-胸苷激酶（HSV-tk）和 9-[1, 3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤、无环鸟苷或 FIAU；氧化还原酶和环己酰亚胺；胞嘧啶脱氨酶和 5-氟胞嘧啶；胸苷激酶胸苷酸激酶（Tdk:Tmk）和 AZT；以及脱氧胞苷激酶和胞嘧啶阿糖胞苷。

通过实例提供了下列实施例且它们不以任何方式来限定本发明的范围。

实施例 1

逆转录病毒载体中 HBe 抗原的构建和表达

尽管由 HBV 前 CC 基因编码 HBcAg 和 HBeAg 蛋白，但是分泌性 HBeAg 蛋白开始于 HBcAg 的起始密码子上游 29 个残基的起始密码子。修复获自美国典型培养保藏中心（Rockville, MD）的 HbeAg 基因以便修正两个突变。发现这两个突变因在 74 位密码子上产生移码的单碱基对缺失

而发生，从而在 84 和 85 位上产生两个连续的终止密码子。通过使用 PCR 诱变插入缺失的碱基来修正这些突变。使在病毒感染过程中裂解的 HBeAg 的富含精氨酸的 C'-末端序列 (aa 150-185) 缺失。然后使截短的 HBeAg 基因与 IgG Fc 片段进行符合读框的融合。将 HBe-retrogen 融合基因 (HBe-retrogen) 克隆入逆转录病毒载体 (LNC-NGFR) 或表达载体 pRc/CMV。使用本领域可获得的技术构建包括 HBcAg (胞质) 和 HBeAg (分泌) 的载体且所述的技术例如由 Sambrook 等 (1989) 和 Ausubel 等 (1997) 描述。将 IgG Fc 片段基因与 IgG 信号前导序列融合并如附图 2A 中所示克隆入表达载体中。以这种方式，如附图 2A 中所示构建含有 HBeAg 基因 (分泌)、带有信号前导序列的 Fc 片段基因 (分泌性) 或 HBcAg 基因 (胞质) 的一系列对照逆转录病毒载体。

为了评价 HBe-Fc 融合蛋白的表达和分泌，用不同的表达载体转染 COS 细胞并在 48 小时后对所述细胞进行放射性标记。正如附图 3 中所示，当用抗人 IgG 或抗-HBeAg 抗体 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 沉淀时，在细胞裂解物和培养基中均检测到了符合 HBeAg-Fc 融合蛋白的蛋白质带。

对转染细胞的免疫荧光染色还显示出一种典型的分泌性蛋白质图式。仅在获自转染细胞的细胞裂解物中观察到了 HBcAg 蛋白并且在所述培养基和所述细胞裂解物中均观察到了 HBeAg 和 Fc 片段蛋白质。这些结果表明有效地产生了 HBeAg-Fc 蛋白 (HBe-retrogen) 且它们分泌自细胞。

实施例 2

树突细胞 (DCs) 中 HBe-retrogen 的转导和表达

为了在 DCs 中评价 “retrogen” 策略，使用瞬时转染法由 PA317 包装细胞生产含有 HBe-retrogen 或包括 NGFR 标记的各种对照基因 (附图 2A) 的逆转录病毒载体。鼠骨髓细胞获自 C57BL/B6 小鼠。在补充了鼠干细胞因子 (SCF) 和 IL-6 的培养基中刺激所述细胞并将其用下

文所述的逆转录病毒载体等转导。

Dcs 的转导

在装有含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 的 10mm 培养皿中以约 40% 的融合率培养获自美国典型培养物保藏中心 (Rockville, MD) 的 PA317 包装细胞。用 10-15 μ m 滤膜转染这些细胞。

从小鼠肢体骨中冲洗出鼠骨髓、使之通过尼龙筛网并用氯化铵排空红细胞。在用 RPMI-1640 充分洗涤后, 在 37 $^{\circ}$ C 下用家兔补体和一组单克隆抗体、抗-CD4⁺、抗-CD8⁺、抗-B 细胞和抗-MHC 型阳性细胞混合物在 RPMI-1640 中将所述细胞培养 40-60 分钟。在用 RPMI-1640 充分洗涤后, 将 5×10^5 个细胞/ml 悬浮在补充了 6% FBS、80ng mSCF/ml 和 20U mIL-6/ml 的 RPMI-1640 中。将该细胞平板固定在 12 孔培养平板 (3ml/孔) 中, 在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下培养过夜且然后用含有相同组分的新鲜培养基替换。在进行 48 小时培养后, 将所述细胞通过离心收集, 重新悬浮在 1.5ml 的逆转录病毒上清液中并平板固定在 24 孔培养平板上, 将该平板用 10mg/ml 浓度的逆转录柄蛋白 (Retronectin) 包被。在 37 $^{\circ}$ C 下以 2,500rpm 将所述细胞离心 90-120 分钟且然后在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下将它们再培养 3-4 小时以便进行逆转录病毒转导。接着用补充了 5% FBS、10ng mSCF/ml、60ng mGM-CSF/ml 和 100U mIL-4/ml 的 2.5ml RPMI-1640 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 替换逆转录病毒上清液过夜。接下来将转导过程重复 2-3 次。转导后, 洗涤细胞并在含有 mGM-CSF 和 mIL-4 的 Opti-MEM (GIBCO, Grand Island, NY) 中培养几天以便在收集前进一步使 DCs 成熟 (Banchereau 等, 1998; Inaba 等, 1992)。

转导的评价 (表达的测定)

在培养几天后, 在骨髓衍生的 DCs 上表达显示出典型的 DC 形态和高水平的 MHC、粘着和共同刺激分子 (CD11、CD54、CD80 和 CD86) 的所述细胞 (附图 4A-4C 和 5A-5E)。正如通过抗-NGFR 染色所测定的, 培养物中的细胞被转导了约 20-30%。在 RT-PCR 测定中证实转录了

DCs 中的 HBe-retrogen 基因。

如下进行 RT-PCR 测定：使用 Trizol (Gibco-BRL Grand Island, NY) 从 DCs 中提取细胞 RNA 并在 37℃ 下将其用不含 RNase 的 DNase 处理 30 分钟。在进行逆转录后，将 cDNAs 用作使用对应于 HBeAg 基因的引物对的 PCR 反应的模板。通过经琼脂糖的电泳对 PCR 产物进行分析。

这些结果共同表明将 HBe-retrogen 融合基因有效转导入了鼠骨髓细胞并在骨髓衍生的 DCs 中表达。有意义的是 MHC-II 和共同刺激分子在包括转导 HBe-retrogen 的 DCs 上的表面表达明显高于所述分子在用 HBeAg 或 HBcAg 转导的 DCs 上的表达。这一观察结果提示 Fc 与受体的结合激活了 DCs。

实施例 3

原初 CD4⁺-T-细胞的体外活化

为了评价转导的 DCs 是否能够在细胞培养物中致敏原初 CD4⁺-T-细胞，将分离自 C57BL/6 小鼠脾细胞的原初 CD4⁺-T-细胞与用实施例 1 的逆转录病毒载体转导的鼠 DCs 按 1: 20 的比例 (DCs:T-细胞) 一起共培养。使用富含 CD4⁺ T 细胞的柱 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 从小鼠脾脏悬浮液中分离 CD4⁺T 细胞。使用富含 CD8⁺T 细胞的柱 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 从小鼠脾脏悬浮液中分离 CD8⁺ T 细胞。在 37℃ 和 5% CO₂ 下用补充了 10% FBS 的 RPMI-1640 培养纯化的 CD4⁺或 CD8⁺ T 细胞。

当将原初 CD4⁺-T-细胞与用 HBeAg、HBcAg 或 Fc 片段基因转导的 DCs 一起共培养时，在培养基中通过 ELISA 仅检测到低或背景水平的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和干扰素 (IFN) - γ 。此外，当监测到细胞数量或 ³H-胸苷掺入率时，没有观察到明显的 T-细胞增殖。相反，当将原初 CD4⁺-T-细胞与用 HBe-retrogen 转导的 DCs 一起共培养 5 天时，T-细胞活跃地增殖且在培养基中检测到了高水平的 GM-CSF 和 IFN- γ (附图 6A 和 6B)。这些结果提示不能将分泌性 HBeAg 或胞质 HBcAg 有效加工和由 DCs 呈递给 MHC-II。相反，在 Fc-受体介

导的摄入和呈递给 DCs 中的 MHC-II 后能有效加工分泌性 HBe-retrogen, 从而导致原初 CD4⁺ T-细胞的体外活化。

在含有转导的 DCs 的共培养物中没有检测到明显的原初 CD8⁺ T-细胞活化。在细胞培养物中没有检测到原初 CD8⁺ T-细胞活化可能是由于在 HBeAg 中仅存在一种已知结合在 MHC-I 上的表位和 CD4⁺-T-细胞是 CD8⁺ T-细胞的有效活化所需要的这一事实 (Ridge 等, 1998)。

为了使用 retrogen 策略进一步证实结合在 MHC-II 上的抗原呈递, 使用 MHC-II 剔除 (KO) C57BL/6 小鼠 (Charles River, NY), 其中消除了 MHC-II 通过 DCs 的抗原呈递。用 HBe-retrogen 转导来源于野生型 (WT) 或 MHC-II KO 小鼠的 DCs 且然后将它们与获自 WT 小鼠的 CD4⁺ T-细胞按 1: 20 的比例一起共培养。正如附图 7A 和 7B 中所示, 在含有转导的 KO-DCs 的共培养物的培养基中仅检测到低浓度的 GM-CSF 和 IFN- γ , 而没有观察到明显的 T-细胞增殖。相反, 当将 CD4⁺ T-细胞与用转导的 WT DCs 一起共培养 5 天时, T-细胞活跃地增殖且在培养基中检测到了高浓度的 GM-CSF 和 IFN- γ (附图 7A 和 7B)。

实施例 4

辅助和细胞毒性 T-细胞的体内诱导以及 B-细胞的免疫反应

评价体内 retrogen 抗原呈递策略的可能性。将小鼠 (C57BL/6) 分成 4 组 (4-6 只小鼠/组) 并通过腹膜内注射对每只小鼠给予用 HBcAg、HBeAg、Fc 或 HBe-retrogen 在含有 50,000U IL-2 (Chiron Corp. Emeryville, CA) 的 0.2ml PBS 中转导的约 50 万个 DCs。在最终给药后的不同的时间处死小鼠并收集外周血液、脾脏和其它器官。分离 T-细胞以便使用富含 CD4 或 CD8⁺ T-细胞的柱 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 进行分析。

在第一次注射后 3 个月, 处死小鼠并收集外周血液、脾脏和其它组织样品。从总体检查中可以看出, 在给予 HBe-retrogen-转导的 DCs 的小鼠体内的腹腔中的淋巴结显著扩大, 而正常小鼠和给予其它构建体的小鼠体内淋巴结小至难以观察到。组织学检查还显示在给予

HBe-retrogen-DCs 的小鼠腹部淋巴结中的 T-细胞和 B-细胞增殖活跃。

实施例 5

T_H1 和 T_H2 辅助 T-细胞的诱导

将如实施例 4 中所述免疫接种的小鼠用于测定 T_H1 和 T_H2 辅助 T-细胞的诱导情况。本领域技术人员认识到了测定 T_H1 和 T_H2 细胞的诱导的重要性。众所周知 CD4⁺-T-细胞具有下列功能：1) 它们帮助 B-细胞发育成产生抗体的浆细胞；2) 它们帮助 CD8⁺-T-细胞成为活化的细胞毒性 T-细胞；和 3) 它们引起迟发过敏性。这些功能通过 CD4 细胞的两种亚群来完成：T_H1 细胞介导迟发过敏性并主要产生 IL-2 和 γ 干扰素 (IFN- γ)，而 T_H2 细胞具有 B-细胞辅助功能且主要产生 IL-4 和 IL-5。

使用抗-CD4 柱 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 从免疫接种的小鼠脾脏中分离 CD4⁺-T-细胞且然后将这些细胞与用重组 HBeAg 蛋白脉冲的小鼠 DCs 一起共培养。在 T-细胞：DCs 之比为 1000: 1 的细胞共培养物中仅 2 天后，来自给予 HBe-retrogen-DCs 的 CD4⁺-T-细胞增殖活跃。在所述共培养基中检测到了高浓度的 GM-CSF 和 IFN- γ (刺激巨噬细胞和 CD8⁺-T-细胞) 以及 IL-4 和 IL-5 (刺激 B-细胞)。抗-CD4 抗体而非抗-CD8 抗体显著阻断了细胞因子在这些共培养的 T-细胞中的产生。相反，当将获自免疫接种了 HBeAg-、HBcAg-或 Fc-DCs 的小鼠的 CD4⁺-T-细胞与 HBeAg-DCs 一起共培养时，在共培养基中仅检测到了低浓度的 GM-CSF、IFN- γ 、IL-4 和 IL-5 而没有观察到活跃的 T-细胞的增殖。由于 IL-4 和 IL-5 主要由 T_H2 产生且 GM-CSF 和 IFN- γ 主要由 T_H1 细胞产生，所以这些结果表明 HBe-retrogen-转导的 DCs 有效激活 T_H1 和 T_H2 T-细胞。

实施例 6

高滴度抗-HBeAg 抗体的诱导

如实施例 4 中所述给小鼠免疫接种以便测定抗体的水平。给小鼠

免疫接种 HBe-retrogen-转导的 DCs 在小鼠体内诱发了高滴度的、长期的抗-HBe/cAg 抗体反应。正如附图 8 中所示,在给予 HBe-retrogen-转导的 DCs 的小鼠血清中检测到的抗-HBeAg 抗体的滴度显著高于给予 HBeAg-转导的 DCs 的小鼠体内的抗-HBeAg 抗体的滴度。使用 ELISA 评价免疫接种小鼠血清中抗-HBeAg 抗体的水平。简单地说,在 4℃ 下用连续稀释的血清在封闭性缓冲液中将包被了 HBcAg 重组蛋白的微量滴定板 (50ng/孔) 培养 2 小时。用针对在封闭性缓冲液中稀释的小鼠 IgG 的过氧化物酶接合的抗体培养后检测结合的抗体。将获自 Chiron Corp. (Emmergyville, CA) 的多克隆抗-HBcAg 抗体用作阳性对照而将正常小鼠血清用作阴性对照。将抗体滴度定义为具有 OD₄₅₀ 值的最高稀释度,它高于阴性水平的 2 倍。

所观察到的抗体产生的倍增可能是由于 CD4+辅助 T-细胞较强活化造成的。免疫接种了 HBcAg-转导的 DCs 的小鼠血清中抗-HBe/cAg 抗体水平明显较低可能是由于 HBcAg 的胞质定位和 CD4+ T-细胞活化缺乏所造成的。因此, HBe-retrogen 在诱发免疫接种它的哺乳动物体内的抗体反应方面显著优于其它 HBeAg 和 HBcAg 构建体。这些小鼠模型的研究结果共同表明用 HBe-retrogen 转导的 DCs 诱发了 CD4+-和 CD8+-T-细胞的强有力的活化以及 B-细胞的活化。

实施例 7

胞内肿瘤抗原的载体构建

MAGE-3 是一种缺乏用于内源性 MHC-II 呈递途径的引导序列的胞质和核内蛋白,它使得在 MHC-II 上呈递变得不可能或难以在 MHC-II 上进行呈递。由于没有小鼠的同源物,所以将人 MAGE-3 基因与来源于人趋化因子 RANTES 基因的信号前导序列连接以便使 MAGE-3 分泌。使用下列引物对将编码全长 MAGE-3 基因的质粒用作模板以便扩增 MAGE-3 DNA: 5'-引物 (A): (SEQ ID No.1) 5'-ACGCGTCGACATGCCTCTTGAGCAGAGGAGTCAG-3', 它相当于带有附加 Sal I 限制位点的 MAGE-3 基因的 1-24 位多核苷酸序列; 和 3'-引物 (B):

(SEQ ID No. 2) 5'-CCGCTCGAGTCACTCTTCCCCCTCTCTCAAAAC-3', 它相当于带有 Xho I 位点的 MAGE-3 基因的 921-945 位多核苷酸序列。通过使用下列引物对的 PCR 扩增来产生来源于人 RANTES 基因的附加的信号前导序列: 5'-引物 (C): (SEQ ID No. 3) 5'-ACGCGTCGACATGAAGGTCTCCGCGGCAGCCCTCGCTGTCATCCTCATTTGCTACTGCCCC TCTGCGCTCCTGCATCTGCCATGCCTCTTGAGCAGAGGAGTCAG-3', 它相当于 RANTES 信号前导序列且相当于带有 Sal I 位点的 MAGE-3 基因的 1-24 位多核苷酸序列; 和 3'-引物 (B)。通过使用 5'-引物-C 和 3'-引物 (D) 的 PCR 来产生不含终止密码子的信号-MAGE-3 片段 (s-MAGE-3): (SEQ ID No. 4) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCTTCCCCCTCTCTCAAAAC-3', 它相当于带有 Not I 位点的 MAGE-3 的 921-942 位多核苷酸序列。属于最有效的 APCs 的 DCs 表达 IgG Fc 受体 (FcγRs), 它介导有效结合在 MHC-II 和 MHC-I 上的抗原的特许抗原摄入途径。因此, 将来源于可有效与鼠 DCs 上的 Fc 受体结合的人 IgG1a 的 Fc 片段 cDNA 与修饰的 MAGE-3 基因进行符合读框的融合以便通过 DCs 介导 MAGE-3 的摄入 (附图 9A)。然后将分泌性 MAGE-3 融合基因 (s-MAGE-3-Fc) 克隆入鼠逆转录病毒载体 pFB-Neo (Stratagene) (附图 9A)。通过应用含有人 IgG1a 重链 cDNA 的质粒 pEE6/CLL-1 作为模板的 PCR 扩增产生人 IgG cDNA Fc 片段。用于 PCR 反应的引物对是: 5'-引物 (E), (SEQ ID No. 5) 5'-ATAAGCGGCCGCTAAACTCACACATGCCCA-3', 它相当于带有附加 Not I 位点的重链的 785-802 位多核苷酸序列; 和 3'-引物 (F): (SEQ ID No. 6) 5'-CCGCTCGAGTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3', 它相当于带有 Xho I 位点的重链的 1447-1468 位多核苷酸序列。将鼠逆转录病毒载体 pFB-Neo (Stratagene) 用于本研究。通过对不含终止密码子的 s-MAGE-3 片段、Fc 和 Sal I/Xho I 切割的 pFB-Neo 进行三段连接来构建逆转录病毒载体 s-MAGE-3-Fc。通过分别将 s-MAGE-3 或 MAGE-3 基因插入 Sal I/Xho I 切割的 pFB-Neo 来构建逆转录病毒载体 s-MAGE-3 或 MAGE-3。为了构建 IgG Fc 表达载体, 通过两次 PCR 反应将人 IgG Fc cDNA 片段与免疫球蛋白重链 (VH) 信号前导序列连接。在第一次

PCR 反应中, 将 IgG Fc cDNA 用作应用下列引物对进行扩增的模板:
 5' 引物, (SEQ ID No. 7) 5'-
 GCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC-
 3', 它相当于重链的 785-815 位多核苷酸序列和部分 VH-前导序列; 和
 3'-引物 F: (SEQ ID No. 6)。应用第一次 PCR 产物作为模板的第二
 次 PCR 使用下列引物对进行: 5' 引物, (SEQ ID No. 8) 5'-
 ACGCGTCGACATGGGAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGG
 GTCCTGTCC-3', 它相当于带有附加 Sal I 位点的 VH-分泌信号前导序
 列的 N-末端多核苷酸序列和; 和 3'-引物 F: (SEQ ID No. 6)。然后
 将带有信号前导序列的 Fc cDNA 克隆入逆转录病毒载体。通过将
 MAGE-3 插入 XhoI/XbaI-切割的 pcDNA3.1 (Invitrogen) 来构建表达
 载体 pcDNA3.1-MAGE-3。还构建了表达天然胞内 MAGE-3、分泌性 s-
 MAGE-3 或分泌性 Fc 片段的几种对照逆转录病毒载体 (附图 9A)。通
 过限制酶分析鉴定所得的各载体并通过 DNA 测序来进一步证实。

实施例 8

逆转录病毒的生产 and 骨髓衍生的 DC 的转导

通过瞬时转染生产逆转录病毒载体。将包装细胞 (PA317) 在装有含 10% 加热失活的 FBS (Gibco-BRL) 的 DMEM 的 100-mm 培养皿中培养并用通过使用 Lipofectin 生产的不含内毒素的 QIAGEN 试剂盒 (Gibco-BRL) 制备的 10 - 15 μ g 逆转录病毒载体质粒 (来自实施例 7, 即胞内 MAGE-3、分泌性 s-MAGE-3 或分泌性 Fc 片段) 转染。在培养过夜后, 用含有 5% FBS 的 DMEM 替换所述培养基。48 小时后, 如上所述收集含有重组逆转录病毒的培养基并过滤 (0.22 μ m) (Chen 等, 1997)。为了产生 DCs, 从小鼠肢体骨中冲洗出骨髓细胞, 使之通过尼龙筛网并用氯化铵排空红细胞。在用 RPMI-1640 充分洗涤后, 在 37 $^{\circ}$ C 下用家兔补体 (Calbiochem) 和由抗-CD4、抗-CD8、抗-CD45R/B220 和抗-MHC-II 组成的单克隆抗体混合物 (PharMingen and BioSource International) 在 RPMI-1640 中将所述细胞培养 40 - 60 分钟。在用

RPMI-1640 充分洗涤后, 将在补充了 6% FBS、80ng mSCF/ml (R&D System) 和 20 个单位 (U) mIL-6/ml (BioSource International) 的 RPMI-1640 中的细胞 (5×10^5 个细胞/ml) 平板固定在 12 孔培养平板 (2.5ml/孔) 中, 在 37℃ 和 5% CO₂ 下培养过夜且然后向其中重新加进新鲜培养基。在进行 48 小时培养后, 使所述细胞充分旋转, 重新悬浮在 1.5ml 的逆转录病毒上清液中, 以 10 - 20ng/ml 的浓度平板固定在包被了逆转录柄蛋白 (PanVera) 的 24 孔培养平板上并在 37℃ 和 5% CO₂ 下培养 3 - 4 小时。接着用补充了 5% FBS、10ng 鼠干细胞因子 (mSCF) /ml、60ng mGN-CSF/ml (BioSource International) 和 100U mIL-4/ml (R&D Systems) 替换上清液过夜。将转导过程重复 2 - 3 次且通过该过程通常转导了约 30% 的 BM 细胞。在最终的转导后, 洗涤细胞并在含有 mGM-CSF 和 mIL-4 的 Opti-MEM (Gibco-BRL) 中培养几天以便使 DC 进一步分化。如上所述使用 50% FCS-RPMI-1640 沉降过程进一步富集 DCs (Inaba 等, 1992)。

在培养几天后, 细胞的主要级分显示出不同的 DC 形态。正如通过逆转录 (RT) -PCR 测定试验所证实的, 转导 DCs 中的 s-MAGE-3-Fc、s-MAGE-3、MAGE-3 或 Fc 基因得到了转录。将定量蛋白质印迹分析用于证实蛋白质通过转导 DCs 中的构建体的表达和分泌。简单地说, 在冰上用缓冲液 (Boehringer Mannheim) (10mM Tris 150mM NaCl (pH 7.4)、1% TX-100 (Sigma)、0.5mM PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物片) 将转导的 DCs 裂解 10 分钟。然后用针对 MAGE-3 的家兔多克隆抗体沉淀细胞裂解物和培养基, 随后用蛋白质 A-琼脂糖 (Sigma) 培养。接着将沉淀物重新悬浮于 20μl 加样缓冲液中。将蛋白质样品 (20μl) 上 10% SDS-PAGE 凝胶并转移到 Hybond PVDF 膜 (Amersham Pharmacia Biotech) 上, 在 4℃ 下通过在含有 5% 脱脂奶粉 (Carnation) 和 0.1% (v/v) Tween-20 (Fisher Scientific) 的 PBS (pH7.5) 中过夜培养将该膜封闭。在用缓冲液 (含有 0.1% (v/v) Tween-20 的 PBS) 洗涤后, 在室温下将该膜用针对在含有 2.5% 脱脂奶粉和 0.1% Tween-20 (1:400) 的 PBS 缓冲液中稀释的 MAGE-3 的小鼠单克隆抗体培养 1 小

时。在洗涤后,在室温下将该膜用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠 IgG (Amersham Pharmacia Biotech) 在缓冲液(1: 10,000)中培养 1 小时。在最终的洗涤后,用 ECL + 化学发光检测试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech) 使该膜显影并在 Kodak 胶片上曝光。测定胶片上蛋白质印迹的蛋白质带强度并通过带有 Image-Quant 1.2 版本软件的 PhosphorImager (Molecular Dynamics) 进行分析。发现有效地产生了 s-MAGE-3-Fc 和 s-MAGE-3 蛋白质且它们分泌自 DCs, 而 MAGE-3 保留在胞内(附图 9B 和 9C)。在转导的 DCs 中表达了相差无几水平的 s-MAGE-3-Fc、s-MAGE-3 和 MAGE-3 蛋白质。

实施例 9

Fc 对 DC 的相互作用

Fc 与 DCs 上 FcγRs 的相互作用引发细胞活化,从而导致对抗原呈递中所涉及的细胞表面分子的增量调节。检验表面标记以便评价转导的 DCs 中 s-MAGE3-Fc 的表达是否可以诱发 DC 活化。通过流式细胞测定法测定用 s-MAGE-3-Fc、s-MAGE-3 或载体转导的 DCs 的表面标记。简单地说,在 4℃ 下用阻断 FcγRs 的抗-CD16/CD32 抗体(2.4G2, PharMingen)将 DCs 预培养 30 - 60 分钟。然后在 4℃ 下用初次抗体将 DCs 培养 30 分钟,随后用抗小鼠或抗家兔 IgG-FITC 缀合物进行培养。在充分洗涤后,通过带有 CellQuest 软件的 FACScan (Becton Dickinson) 分析 DCs。正如附图 9D、9E 和 9F 中所示,在来源于用 s-MAGE-3-Fc 转导的 BM 细胞的 DCs 上和在有 LPS 存在的情况下的 DCs 上表达的 MHC II 型、CD40 和 CD86 的水平高于在用 s-MAGE-3 或载体对照品转导的 DCs 上表达的 MHC II 型、CD40 和 CD86 的水平。这些结果提示融合蛋白 Fc 的分泌和随后的与 FcγRs 相互作用激活 DCs。

实施例 10

体内有效 T_H1 的诱导

为了评价 MAGE-3 的分泌和随后的摄入是否可以促进这种抗原在

体内的免疫原性, 将 DCs 用 s-MAGE-3-Fc、s-MAGE-3、MAGE-3 或 Fc 通过逆转录病毒载体转导且然后通过静脉注射给 C57BL/6 小鼠一次 (溶于 30 μ l 含有 50,000U IL-2 (chiron) 的 PBS 的 $0.5-1 \times 10^5$ DC / 小鼠)。在免疫接种 4-6 周后, 处死小鼠并收集外周血液、脾脏和其它组织样品。免疫接种了 s-MAGE-3-Fc-DCs 的小鼠体内的淋巴结基本上扩大, 对此可以考虑病原体感染, 而在给予了用 s-MAGE-3、MAGE-3 或 Fc 转导的 DCs 的小鼠体内没有出现这种情况。

为了确定免疫接种转导的 DCs 是否可以诱发 CD4+ 辅助 T 细胞的反应, 从免疫接种小鼠的脾细胞中分离 CD4+ T-细胞且然后将它们与骨髓 (BM) 衍生的用 s-MAGE-3-Fc 转导的 DCs 一起共培养。简单地说, 使用 CD4+ 或 CD8+ T-细胞富集柱 (R&D System) 从脾细胞混悬液中分离 CD4+ 或 CD8+ T-细胞且然后在进一步分析前在补充了 10% FBS 的 RPMI-1640 中培养 24-48 小时。在 37 $^{\circ}$ C 下将来自免疫接种小鼠的排空的淋巴结用 0.1% DNA 酶 I (级分 IX, Sigma) 和 1mg/ml 胶原酶 (Roche Molecular Biochemicals) 的混合物消化 40-60 分钟。使用抗 CD11c (N418) Micro-Beads (Miltenyi Biotec Inc) 从淋巴结或脾的细胞混悬液中确切分离 DCs 以便进一步研究。在以 CD4+ T-细胞与 DCs 的不同比例共培养 2 周的过程中, 来自免疫接种了 s-MAGE-3-DCs、MAGE-3-DCs 或 Fc-DCs 的小鼠的 CD4+ T-细胞没有活跃地增殖且在共培养基中仅检测到了低水平的 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 (附图 10A、10B、10C 和 10D)。将来自免疫接种小鼠的 CD4+ T-细胞与 DCs 按 1000:1 的比例 (T 细胞: DC, 2×10^5 : 2×10^2) 一起共培养不同的时间。收集共培养物中的上清液且随后通过 ELISA、按照制造商的说明 (PharMingen) 检测细胞因子浓度。相反, 在与来自免疫接种了 s-MAGE-3-Fc-DCs 的小鼠的 CD4+ T-细胞的共培养过程中, 甚至仅在按 1: 1000 (DC: T-细胞) 比例共培养 48 小时后在共培养基中检测到了高水平的 IL-2 和 IFN- γ 。抗-CD4 而非抗-CD8 抗体通过共培养的细胞阻断了细胞因子的产生 (附图 11A)。重复实验显示出了相似的结果。为了进一步测定 T-细胞反应的特异性, 将用表达无关乙型肝炎病毒核

心抗原 (HBcAg) 的逆转录病毒载体转导的 BM 衍生的 DCs 与来自 s-MAGE-3-Fc-DCs 免疫接种小鼠的 CD4⁺ T-细胞一起共培养。在共培养基中仅检测到了低水平的 IFN- γ 和其它细胞因子 (附图 11B)。此外, 使用抗-CD11c 微珠 (Miltenyi Biotec Inc.) 分离来自免疫接种后 6 周小鼠淋巴结的 DCs 并将其与来自相同免疫接种小鼠的 CD4⁺ T-细胞一起共培养。正如附图 12A、12B、12C 和 12D 中所示, 仅在来自 s-MAGE-3-Fc-DCs 免疫接种小鼠的细胞共培养物中检测到了高水平的 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 。这些结果表明用 s-MAGE-3-Fc 转导的 Dcs 可以返回到淋巴样器官或组织中且比用天然 MAGE-3 或 s-MAGE-3 转导的 DCs 更有效地激活 Th1 反应。

实施例 11

体内 CTLs 的诱导

进行 JAM 或“合理的另一种方法”试验以便测定免疫接种了 s-MAGE-3-Fc-DCs 是否可以诱发强 CTL 反应。将 JAM 试验用于测定细胞毒性活性。简单地说, 在免疫接种后的不同时间点处死小鼠并在 RPMI 1640 10% FBS 中培养脾细胞的单细胞混悬液。在 37°C 下在 5% CO₂ 中在 24-孔平板 (Costar) 内将总计 4×10^6 个脾细胞用 8×10^4 γ -照射的 (10,000 拉德) 同源的 EL4-MAGE-3 细胞或 EL4-HBcAg 细胞/2ml 重新刺激 4-6 天、收集且然后重新悬浮至 1×10^7 个细胞/ml。为了标记靶细胞, 以 2 μ Ci/ml 的终浓度将 ³H-胸苷加入到 5×10^5 /ml EL4-MAGE-3 或 EL4-HBcAg 细胞中。在进行 6 小时培养后, 将所述细胞用 PBS 温和洗涤一次并重新悬浮于培养基中 (1×10^5 个细胞/ml)。然后在 37°C 下在 96 孔圆底平板 (200 μ l/孔) 中将不同数量的效应细胞与恒定数量的靶细胞 (1×10^4 /孔) 一起共培养 4 小时, 此后将细胞及其培养基抽吸到纤维玻璃滤膜 (Filter Mate Harvester, Packard) 上, 然后将该滤膜用水充分洗涤。在将该滤膜干燥并置于 96 孔平板上后, 向各孔中加入 25 μ l MicroScint 20 (Packard)。在 TopCount NXT 微量平板闪烁和发光计数器 (Packard) 中对平板进行计数。在一些实验中, 用

抗-CD4 或抗-CD8 抗体 (30 μ l/孔, PharMingen) 将重新刺激的效应细胞群体培养 30 - 60 分钟以便在细胞毒性测定试验前排空 CD4+或 CD8+ T-细胞。将特异性杀灭百分比定义为: (在没有 T-细胞存在情况下保留的靶细胞 DNA (自发) - 在有 T-细胞存在情况下保留的靶细胞 DNA) /保留的自发 DNA $\times$ 100。总 ^3H -胸苷掺入值通常与自发保留值相似。在体外在 RPMI-1640、10% FBS 中用同源细胞 EL4-MAGE-3 重新刺激来自免疫接种小鼠的脾细胞且然后将它们与 ^3H -胸苷标记的 EL4-MAGE-3 细胞按不同的效应细胞/靶细胞比例一起共培养以便测定特异性杀灭率。通过用 MAGE-3 表达载体 (pcDNA3.1-MAGE-3) 转染和 Zeocin (Invitrogen) 选择确定 EL4-MAGE-3 细胞且证实它们可通过 PCR 和免疫沉淀测定法表达 MAGE-3。

来自免疫接种 s-MAGE-3-Fc-DCs 的小鼠的脾细胞对靶细胞的杀灭比来自免疫接种 s-MAGE-3、MAGE-3 或 Fc 的小鼠的那些脾细胞对靶细胞的杀灭更为有效 (附图 13)。通过 s-MAGE-3-Fc-DCs-免疫接种小鼠脾细胞没有能力杀灭表达无关 HBcAg 的 EL4-HBcAg 细胞 (附图 13) 并通过使用抗-CD8 而非抗-CD4 抗体对杀灭的抑制进一步证实了杀灭的特异性。因此, 这些结果证明了 s-MAGE-3-Fc-DCs 诱发 CTL 反应的优良能力, 这是由于 T_H1 增强和受体介导的抗原摄入交叉致敏所导致的。

实施例 12

抗体的诱导

由于抗体还在抗肿瘤免疫性方面起作用, 所以通过 ELISA 测定免疫接种小鼠血清中的抗-MAGE-3 的抗体滴度 (类似于实施例 10)。通过 ELISA 检测免疫接种小鼠血清中的抗-MAGE-3 抗体。简单地说, 在室温下在封闭缓冲液 (KPL, Gathersburg, MD) 中用连续稀释的血清将包被了重组 MAGE-3 蛋白质 (各 50ng/孔) 的微量滴定平板 (Dynatech) 培养 2 小时。在用针对封闭缓冲液中稀释的小鼠 IgG (Sigma) 的过氧化物酶接合的抗体培养后检测结合的抗体。将抗 MAGE-3 的单克隆抗体用作阳性对照并将正常小鼠血清用作阴性对照。

将抗体滴度定义为使用大于 0.2 的 OD_{A450} 得到的最高稀释度。正常小鼠血清的背景 OD_{A450} 低于 0.1。在 DC 免疫接种后 2 周诱导抗-MAGE-3 抗体且在免疫接种后 4-6 周达到峰值。

正如附图 14 中所示, 在 s-MAGE-3-Fc-DC 免疫接种小鼠血清中检测到的抗-MAGE-3 抗体的滴度显著高于在免疫接种了 s-MAGE-3-DCs 或 MAGE-3-DCs 小鼠血清中检测到的抗-MAGE-3 抗体的滴度。通过缺乏抗免疫接种小鼠体内无关 HBcAg 的抗体来证实抗体反应的特异性。这些发现的结果共同表明 s-MAGE-3-Fc-DCs 在诱导 $CD4^+$ T_H 、 $CD8^+$ CTL 和 B-细胞反应方面优于 MAGE-3-DCs 或 s-MAGE-3-DCs。

实施例 13

辅助 T-细胞增强的相互作用

就 DCs 上的 MHC-II 而言识别其特异性肽类的致敏的 $CD4^+$ T_H 显著增加了它们与条件 DCs 的相互作用。这种通过 CD40-CD40L 的相互作用可以引起 DC 产生 IL-12 且对于生成 CTL 反应的 T-细胞辅助细胞来说是关键的。为了测试这种手段是否可以增强 $CD4^+$ T_H 与 s-MAGE-3-Fc-DCs 的相互作用, 测定在与致敏的 $CD4^+$ T-细胞的共培养物中通过转导的 DCs 产生的 IL-12。从免疫接种了 s-MAGE-3-Fc-DCs 的小鼠体内分离致敏的 $CD4^+$ T-细胞且然后将它们与用 s-MAGE-3-Fc、s-MAGE-3、s-MAGE-3 或 Fc 转导的 BM 衍生的 DCs 一起共培养。正如附图 15 中所示, 在 $CD4^+$ T-细胞与 s-MAGE-3-Fc-DCs 的共培养物中观察到了 IL-12 的产生显著增加, 而在与 s-MAGE-3-Fc 或 s-MAGE-3-DCs 的共培养物中没有观察到这种情况。在致敏的 $CD4^+$ T-细胞上通过用 CD40L 阻断来抑制通过 s-MAGE-3-Fc-DCs 产生 IL-12。Fc 在 DCs 中的表达在较低的程度上也非特异性地强化 IL-12 的产生。这些结果与实施例 10、11 和 12 数据的体内结果一起表明 MAGE-3 的分泌和随后 Fc γ Rs-介导的摄入导致 MAGE-3 在 DCs 上交叉呈递以便诱导 T_H1 和 CTL 反应。

实施例 14

由 s-MAGE-3-Fc-DCs 诱导的保护性免疫

为了检验抗-MAGE-3 免疫反应的强化是否能够导致有效的抗肿瘤免疫性, 进行攻击实验。EL4-MAGE-3 细胞系来源于在同源小鼠体内快速生长的亲本肿瘤 EL-4 系并将它们用于攻击实验。当皮内植入同源 C57BL/6 小鼠时, EL4-MAGE-3 细胞 ($0.5 - 1 \times 10^6$ 个细胞) 显示出类似于亲本 EL-4 细胞的侵害性肿瘤生长, 从而仅在接种后 3-5 天在小鼠体内产生肉眼可见的肿瘤并通常在接种后 1 个月导致小鼠死亡。为了测试 s-MAGE-3-Fc-DCs 抑制 EL4-MAGE-3 肿瘤生长的能力, 给小鼠以静脉注射的方式免疫接种 2 次(间隔 7 天)用 s-MAGE-3-Fc、s-MAGE-3、s-MAGE-3 或 Fc 转导的 1×10^5 DCs, 随后用 EL4-MAGE-3 细胞攻击 (1×10^6)。通过在第 0 天和第 7 天静脉注射给 C57BL/6 小鼠免疫接种 1×10^5 转导的 DCs 且然后在第二次免疫接种后 1 周用 1×10^6 呈指数生长的 EL4-MAGE-3 或 EEL4-HBcAg 细胞以皮内方式进行攻击。每隔 2-3 天测量一次肿瘤大小, 其中如下计算肿瘤体积: (最长直径) $\times$ (最短直径)²。

正如附图 16A 中所示, 尽管免疫接种 s-MAGE-3-DCs、MAGE-3-DCs、s-MAGE-3 乃至 Fc-DCs (非特异性免疫刺激剂) 确实产生了一定程度的保护作用, 但是在免疫接种了 s-MAGE-3-Fc-DCs 的小鼠体内将肿瘤生长抑制到极高的程度。由这些构建体显示出的抗肿瘤活性的效能与其诱导免疫反应的能力相关。免疫接种 s-MAGE-3-DCs 的小鼠的存活时间始终显著长于免疫接种其它载体转导的 DCs 的小鼠的存活时间 (附图 16B)。由 s-MAGE-3-Fc-DCs 诱导的抗肿瘤活性是特异性的, 这是因为免疫接种 s-MAGE-3-Fc-DCs 并用野生型 EL4 或 EL4-HBcAg 细胞攻击的小鼠发展成了致命的肿瘤并在 1 个月内死亡。S-MAGE-3-Fc-DCs 还部分抑制了小鼠体内建立的 EL4-MAGE-3 肿瘤的生长, 不过, 该免疫系统在这种模型中可能不具有有效控制致命性肿瘤快速生长的足够反应时间。

实施例 15

HBe 抗原在哺乳动物表达载体中的构建

编码全长 HBV (*adw* 亚型) 基因组的质粒获自美国典型培养保藏中心 (ATCC)。发现 HBV 前核心/核心基因含有单一碱基对缺失, 它造成在 79 位密码子上移码, 从而产生 84 和 85 位上的两个连续的终止密码子。通过使用 PCR 诱变插入缺失的碱基来修复该基因并通过 DNA 测序来证实。通过使用下列引物对对修复的 HBV 基因组进行 PCR 扩增来产生全长 HBeAg 基因: (5'-引物 (P-A): (SEQ ID No.9) 5'-TTAAGCTTATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATC-3', 它相当于带有附加 HindIII 限制位点的 HBV 基因组的 1904-2020 位多核苷酸序列; 和 3'-引物 (P-B): (SEQ ID No.10) 5'-TTTCTAGFAATCGATTAACATTGAGATTCCCGAGA-3', 它相当于带有 Xba I 和 Cla I 位点的 HBV 基因组的 2437-2457 位多核苷酸序列。通过使用下列引物对的 PCR 扩增来产生带有缺失的在病毒感染过程中裂解的富含精氨酸的 HBeAg 的 C'-末端序列 (aa 150-185) 的截短的 HBeAg 基因: (5'-引物 (P-A): (SEQ ID No.9) 和 3'-引物 (SEQ ID No.11) 5'-GTGCGGCCGC TCTAACAACAGTAGTTTCCGGAAGTGT-3', 它相当于带有附加 Not I 限制位点的 HBV 基因组的 2324-2350 位多核苷酸序列。通过使用下列引物对的 PCR 扩增来产生全长 HBcAg 基因: (5'-引物: (SEQ ID No.12) 5'-TTAAGCTTATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGC-3', 它相当于带有附加 HindIII 限制位点的 HBV 基因组的 1901-1932 位多核苷酸序列; 和引物 P-B (SEQ ID No.10)。通过使用含有人 IgG 重链 cDNA 的质粒 pEE6/CLL-1 作为模板的 PCR 扩增来产生人 IgG cDNA Fc 片段。用于 PCR 反应的引物对是: 5'-引物 (SEQ ID No.13) 5'-ATAAGCGGCCGCTAAAACTCACACATGCCCA-3', 它相当于带有附加 Not I 位点的重链的 785-802 位多核苷酸序列; 和 3'-引物 (P-C) (SEQ ID No.14) 5'-TATTCTAGATCGATCACTCATTTACCCGGAGACAGG-3', 它相当于带有 Cla I 位点的重链的 1447-1468 位多核苷酸序列。将 pRc/CMV 载体 (Invitrogen) 用于本研究。通过三段连接截短的 HBe 片段、IgG Fc 和 HindIII/Cla I 切割的 pRc/CMV 载体来构建表达载体 HBe-Fc, 它表

达由与 IgG Fc 进行符合读框的融合的截短的 HBeAg 组成的分泌性 HBe-Fc 融合蛋白。通过将 HBeAg 基因插入 HindIII/Cla I 切割的 pRc/CMV 载体来构建表达分泌性 HBeAg 蛋白的表达载体 HBeAg。通过将 HBcAg 基因插入 HindIII/Cla I 切割的 pRc/CMV 载体来构建表达胞质 HBcAg 蛋白的表达载体 HBcAg。为了构建 IgG Fc 表达载体, 通过两次 PCR 反应将人 IgG Fc cDNA 片段与小鼠 VH 信号前导序列连接。在第一次 PCR 反应中, 将 IgG Fc cDNA 用作使用下列引物对进行扩增的模板:

(5'- 引 物 (SEQ ID No. 15) 5'-
GCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC-
3', 它相当于重链和部分 VH-前导序列的 785-815 位多核苷酸序列; 和
3'-引物 (P-C): (SEQ ID No. 14))。应用第一次 PCR 产物作为模
板的第二次 PCR 使用下列引物对进行: (5'引物, (SEQ ID No. 16)
5'-

TTAAGCTTCATATGGGAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATG
GGTCCTGTCC-3', 它相当于带有附加 HindIII 和 NdeI 位点的 VH-前导
序列的 N-末端多核苷酸序列和; 和 3'-引物 P-C: (SEQ ID No. 14))。
然后将带有前导序列的 Fc cDNA 克隆入 HindIII/ClaI 切割的-pRc/CMV
载体。通过限制酶分析来鉴定这些得到的载体并通过 DNA 测序来证
实。将质粒转入大肠杆菌菌株 (XL-1 蓝) 并在 37℃ 和有 50μg/ml 氨苄
西林存在的情况下使其从单菌落开始生长 16-20 小时。使用不含内毒
素的纯化试剂盒 (Qiagen)、按照标准方案分离 DNA。将 DNA 重新悬
浮于不含内毒素的 PBS (Sigma) 中至终浓度为 1mg/ml。OD_{260/280} 之
比在 1.8-2.0 的范围。将 DNA 储存在-200℃ 下并在免疫接种的该天之前
通过限制消化来分析。

将来源于人 IgG1a 的 Fc 片段用作细胞结合元件以便促进模型 HBV
核壳蛋白的摄入, 这是由于 DCs 表达 IgG Fc 受体 (FcγRs) 的结果,
该受体介导用于与 MHC-II 和 I-有效结合的抗原呈递的特定抗原摄入
途径。尽管 HBcAg 和 HBeAg 由 HBV 前 C/C 基因编码, 但是分泌性 HBeAg
蛋白从 HbcAg 起始密码子上游的 29 个残基的起始密码子开始。HBeAg

以符合读框的形式与人 IgG1a Fc 片段 cDNA 基因融合且然后被克隆入 pRc/CMV。IgG1a Fc 片段可以有效地与小鼠 APCs 上的 Fc 受体结合。构建含有 HBeAg 基因(分泌性)、带有分泌信号前导序列的 Fc 片段(分泌性)或 HBcAg 基因(胞质)的对照载体(附图 18)。使鼠骨髓 DCs 产生。简单地说,在补充了 6% 的 FBS、60ng mHM-CSF/ml 和 100U mIL-4/ml 的 RPMI-1640 中将骨髓干细胞培养 4 天。然后在含有重组 HBeAg (100µg/ml) 和 HBcAg (100µg/ml) 蛋白 (American Research Products, Boston, MA) 的混合物的培养基中将 DCs 再培养 4 天。将脉冲的 DCs (PDCs) 用 $1 \times$ PBS 以 1000rpm 洗涤 2 次、持续 5 分钟并重新悬浮于 RPMI 1640 中以便进一步分析。通过使用放射性标记和免疫沉淀/SDS-聚丙烯酰胺凝胶分析 (PAGE) 发现有效地产生了 HBeAg-Fc 蛋白 (HBe-Fc) 且它们分泌自转染的细胞 (附图 19A)。通过蛋白质 A 珠直接沉淀胞内和分泌的 HBe-Fc, 这表明融合蛋白保留了其对蛋白质 A 的结合能力。

实施例 16

T_H1 、辅助 T-细胞通过 HBe-Fc DNA 疫苗的体内诱导

给小鼠免疫接种以便评价这种体内策略。将 C57BL/6 或 BALB/c 小鼠分成 4 组并且通过肌肉注射一次 100µg (25-50µg (µl)/四头肌) HBcAg、HBeAg、Fc 或 HBeAg-Fc DNA 给各只小鼠进行免疫接种。在免疫接种 2-4 周后,处死小鼠并采集外周血液、脾脏和其它组织样品。

首先,用重组 HBe/cAg 蛋白将来自免疫接种 DNA 疫苗后 2-4 周小鼠的脾细胞重新刺激 5 天。从重新刺激的脾细胞中分离 T-细胞且然后通过使用 3 -胸苷结合测定试验进行评价。正如附图 20 中所示,来自免疫接种 HBe Fc 构建体或 HBe-Fc DNA 疫苗致敏的 T 细胞的小鼠的 T 细胞增殖活跃。相反,来自免疫接种 HBeAg、HBcAg 或 Fc DNA 疫苗或 HBeAg、HBcAg 或 Fc DNA 疫苗致敏的 T 细胞的小鼠的 T 细胞没有显示出活跃地增殖。

类似于实施例 5,将来自免疫接种小鼠的 CD4+ T-细胞与使用重组

HBeAg 和 HBcAg 脉冲的 DCs 一起共培养。在与不同比例的 T-细胞与 DCs 的 6 天共培养过程中, 来自免疫接种 HBeAg、HBcAg 或 Fc 构建体的小鼠的 CD4⁺ T-细胞没有显示出活跃地增殖且在共培养基中仅检测到了低浓度的 IL-2 和 IFN- γ (附图 21A 和附图 21B)。相反, 在与来自免疫接种 HBe-Fc 构建体的小鼠的 CD4⁺ T-细胞的共培养中, CD4⁺ T-细胞仅在甚至以 1: 1000 (DC: T-细胞) 比例的 48 小时共培养后也活跃地增殖。此外, 共培养基中的 IL-2 和 IFN- γ 浓度显著高于在与来自给予了 HBeAg 或 HBcAg 构建体的小鼠的 CD4⁺ T-细胞的共培养物中的 IL-2 和 IFN- γ 浓度 (附图 21A 和附图 21B)。抗-CD4 而非抗-CD8 抗体通过共培养的细胞显著阻断了这些细胞因子的产生 (附图 21C 和附图 21D)。此外, 以平行方式将一种无关抗原即重组 HBsAg 蛋白 (American Research Products, Boston, MA) 用于与 HBe/cAg 一起脉冲 DCs。HBsAg 脉冲的 DCs 不能在所述试验中刺激 HBe-Fc 构建体免疫接种小鼠的 CD4⁺ T-细胞, 从而证明了由 HBe-Fc 构建体免疫接种诱发的 CD4⁺ T 辅助 1 细胞反应的特异性。这些结果表明 HBe-Fc 构建体可以比 HBeAg 或 HBcAg 构建体更为有效地激活 T_H1。在任何实验中没有检测到显著浓度的 IL-4。由此 IL-2 和 IFN- γ 主要由 T_H1 细胞产生。该结果表明 HBe-Fc 构建体诱发 T_H1 反应。

实施例 17

体内 CTLs 的诱导

为了测定免疫接种 HBe-Fc 构建体是否可以诱发 CTL 反应, 与实施例 11 类似进行 JAM 试验。在含有合成肽 HBcAg13-27 的培养基中将来自不同免疫接种小鼠的脾细胞在体外重新刺激 4-6 天且然后与 ³H-标记的肽 (HBcAg13-27) 脉冲的靶细胞 EL-4 (H-2^b) 和 p815 (H-2^d) 按不同效应细胞/靶细胞比例一起共培养以便测定靶细胞的杀灭率。正如附图 22 中所示, 来自免疫接种 HBe-Fc 构建体的小鼠的脾细胞显示出对靶细胞的杀灭显著高于来自免疫接种 HBeAg 或 HBcAg 的小鼠的那些脾细胞对靶细胞的杀灭率。通过这些脾细胞没有能力杀灭带有 H-2^d 背

景的 HBcAg 脉冲的 p815 靶细胞并通过抗-CD8 而非抗-CD4 抗体对杀灭率的抑制来证实了杀灭的特异性。此外, 还将 HBsAg 用于重新刺激来自 HBe-Fc 构建体免疫接种小鼠的脾细胞且没有观察到通过 HBsAg-再刺激的脾细胞可显著杀灭 HBcAg-脉冲的靶细胞。由 HBe-Fc 构建体诱发的优良细胞毒性反应是由于 T 辅助 1 增强和由 DCs 对摄入的 HBe-Fc 融合蛋白进行直接的 MHC-I 型呈递所导致的。

实施例 18

抗体的诱导

为了测定 HBe-Fc-DC 的免疫接种是否可以诱发抗体反应, 与实施例 6 类似在收集的免疫接种了不同载体的小鼠血清中测定抗-HBe/cAg 的抗体滴度。正如附图 23 中所示, 在免疫接种 HBe-Fc 构建体的小鼠血清中检测到了抗-HBe/cAg 抗体。通过缺乏抗免疫接种小鼠体内 HBsAg 的抗体来证实抗体反应的特异性。相反, 在免疫接种 HBeAg 或 HBcAg 构建体的小鼠体内检测到了显著低的抗体滴度(附图 23)。这些结果共同表明 HBe-Fc DNA 在诱发 CD4⁺ T 辅助细胞 1 和 CD8⁺ 细胞毒性 T-细胞以及 B-细胞反应方面显著优于表达原初 HBeAg 或 HBcAg 的 DNAs。

实施例 19

DCs 通过 HBe-Fc DNA 疫苗接种的系统性活化

为了评价 HBe-Fc 或 HBeAg 蛋白从转导的细胞中分泌并通过体循环以进行抗原呈递的可能性, 进行 DC 转移实验。将 DCs 从免疫接种小鼠体内分离并转入幼鼠以便评价转化的 DCs 是否可以致敏原初 CD4⁺和 CD8⁺ T-细胞。在 1 个月后处死免疫接种 HBeAg-Fc、PEA-HBe 或对照 DNA 疫苗的小鼠。将小鼠 CD11c(N418)MicroBeads(Miltenyi Biotec)用于从小鼠脾脏中分离 DCs。将 CD11c+DCs 注入(IP 或 IV)幼鼠(约 $1-5 \times 10^5$ /小鼠)。在 DC 转移 2-4 周后, 处死小鼠并监测不同小鼠的抗原特异性 CD4⁺和 CD8⁺ T-细胞反应。正如附图 24 中所示, 来自

HBe-Fc 免疫接种小鼠脾细胞的 DCs 有效激活了原初 T-细胞反应,而来自 HBe 或 HBc 免疫接种小鼠脾细胞的 DCs 没有在幼鼠体内激活 T-细胞。该结果与 PCR 和摄入测定试验的结果共同表明通过 FcγR-介导的抗原胞吞作用可促进 DC 抗原呈递。

实施例 20

改变的膜和胞内蛋白的分泌

可以将含有防止蛋白质膜运输和分泌的序列或缺乏分泌用信号序列的膜蛋白和胞内蛋白用于本发明的策略而不需进一步修改。预计阻断蛋白质分泌的序列的缺失或突变可以导致蛋白质分泌。膜蛋白通常含有高比例的疏水氨基酸,由此改变这些蛋白质的疏水性,使得它们被靶向而分泌。本领域技术人员认识到还可以将 retrogen 策略用于增强这些蛋白质的免疫原性。用于缺失或突变膜蛋白的两个实例是 HPV E7 和 EBV 蛋白。

E7 是一种胞质蛋白。一段带电荷残基的存在阻碍了该蛋白质的分泌。消除这些残基有利于蛋白质的分泌并使该蛋白质保持稳定(附图 17)。因此,通过两次 PCR 反应使 HPV 16 E7 蛋白的一段带电荷残基在该构建体中缺失(实心方块)。结果是在与前导信号(IL-2)连接后截短的 E7 蛋白的分泌得到了显著提高。

EBV 核心抗原 1 是一种核蛋白,它含有一段会干扰蛋白质膜运输和分泌的疏水氨基酸残基。在一项研究中,使 EBNA1 蛋白中的该段疏水氨基酸残基缺失。结果是截短的 EBNA1 蛋白在与前导信号序列连接后可有效地从细胞中分泌。

除所述序列缺失或截短外,本领域技术人员还认识到还可以使该序列发生突变以便降低蛋白质的疏水性。位点定向诱变通过将一种或多种多核苷酸序列改变导入所选择的 DNA 而制备和测试了序列变体。

一般来说,首先获得单链载体或融合双链载体的两个链,在其序列中包括编码所需蛋白质或遗传因子的 DNA 序列。然后使用单链 DNA 制备物使以合成方式制备的含有所需突变序列的寡核苷酸引物退火,

当选择杂交条件时要考虑到失配的程度。使杂交产物接触诸如大肠杆菌聚合酶 I (克列诺片段) 这样的 DNA 聚合酶以便完成对含有突变的链的合成。因此, 形成异源双链, 其中一个链编码原始的非突变序列而第二个链带有所需的突变。接着将这种双链载体用于转化诸如大肠杆菌细胞这样的合适的宿主细胞并选择包括带有突变序列排列的重组载体的克隆。

位点定向诱变公开在美国专利 5,220,007、5,284,760、5,354,670、5,366,878、5,389,514、5,635,377 和 5,789,166 中。

除膜蛋白外, 还可以修饰胞内蛋白, 从而产生分泌。一种这样的修饰方法仅在于添加信号前导序列。例如, MAGE 是一种缺乏分泌用信号序列的蛋白质。在实施例 7 中, 通过使用 PCR 技术将信号序列添加到 MAGE 中。向 MAGE 中添加信号序列能够使这种胞内蛋白得到分泌。另一种对胞内蛋白的修饰方法是改变通常属于一种胞内蛋白的前体, 使得它类似于成熟蛋白而得到分泌。例如, IL-1 β 前体蛋白是一种胞质蛋白, 且可分泌成熟蛋白。因此, Siders 和 Mizel (《生物学与化学杂志》(J. Biol. Chem.) 1995) 截短了该前体蛋白中的氨基酸残基。他们的解释是使 100-104 位之间的几个氨基酸缺失可将截短蛋白质的分泌水平增加到成熟 IL-1 β 的水平。因此, 本领域技术人员能够应用这种信息来改变其它胞内蛋白。

进一步的修饰包括应用从细胞中释放的病毒颗粒。因此, 将 retrogen 与病毒基因融合并装配入用于释放的病毒颗粒。病毒颗粒由被蛋白质壳包围的核酸基因组构成。通过本领域中众所周知方法中的任何一种来包装病毒颗粒。

实施例 21

蛋白质的糖基化

在本领域中已知 IgG-Fc 的糖基化对通过 Fc γ R 识别使效应细胞得到最佳活化来说是必不可少的。因此, 必须在能够进行糖基化的系统中产生含有 Fc 部分的重组融合蛋白, 条件是与 Fc γ R 结合对其可能的应

用来说是必不可少的。通常将杆状病毒昆虫细胞系统用于产生高产率的重组蛋白。该系统向糖蛋白中添加核心寡糖和外臂（outer arm）糖残基的能力对本领域技术人员来说是众所周知的且使一种合适的系统表达和纯化 HBe-Fc 融合蛋白成为可能。

构建 tHBeAgFc 质粒中包含的 1230bp 的 HBeFc 片段，它表达由与 IgG Fc 以符合读框形式融合的截短的 HBeAg 组成的分泌性 HBe-Fc 蛋白。简单地说，使用带有 pFB1 供体质粒的 pFastBac 系统（Gibco BRL）产生重组 HBe-Fc 杆状病毒。首先使用下列引物从 tHBeAgFc 模板对 HBe-Fc 片段进行 PCR 扩增：分别是 5'引物（DEQ ID NO.17）5'-GATCGAATTCATGCAACTTTTTTCACCTCTGC-3'和 3'引物（DEQ ID NO.18）5'-GATCAAGCTTTCATTTACCCGGAGACAGGGA-3'，从而将 EcoRI 和 HindIII 限制位点导入 5'和 3'末端。将这种 PCR 产物进行凝胶纯化、消化并连入 EcoRI/HindIII 切割的 pFB1 供体质粒中。通过限制酶分析鉴定所得的载体（pFB1-HBeFc）并通过 DNA 测序来证实。通过用 pFB1-HBeFc 供体质粒转化 DH10Bac 大肠杆菌将来自供体质粒的 HBe-Fc 表达弹夹转座入杆状病毒基因组。当转座入杆粒破坏 lacZ α 肽的表达时，通过 X-gal 选择来鉴定重组杆状病毒。通过小量制备分离重组杆粒 DNA 并按照制造商的说明将其用于转染 Sf9 昆虫细胞。

通过用 0.5ml 的病毒储备液转染 50ml、 2×10^6 个细胞/ml 的 Sf9 细胞混悬液培养物来扩增获自起始转染的病毒储备液并在 48 小时后收集上清液。然后使该储备液再进行两个循环的扩增，此时>90% 的细胞产生重组 HBe-Fc，正如通过对感染细胞进行免疫荧光染色所监测到的。接着将扩增的储备液用于将 4 份 100ml 的 Sf9 细胞培养物感染 72 - 90 小时。收集上清液并在 4℃ 下通过以 14,000 RPM 离心 20 分钟来使该上清液净化。接下来使澄清的上清液通过 5ml 洗涤吸附剂凝胶柱（Boehringer Mannheim）以便除去可能干扰蛋白质回收的泊洛沙姆（pluronic）。然后通过以 1ml/分钟的流速过蛋白质 G 柱（Pharmacia）从上清液中纯化重组 HBe-Fc 蛋白。将该柱用 10 个体积的 100mM、pH 6.0 的 Tris 和 10mM、pH 6.0 的 Tris 依次洗涤并用 10 个体积 pH 2.7

的 100mM 甘氨酸将所述蛋白质洗脱在 1ml 级分中。立即通过添加 1/10 体积的 1M、pH 8.0 的 Tris 将所有级分的 pH 调节至中性。通过 A_{280} 测定含有蛋白质的级分并通过 12% SDS-PAGE 进行分离以便测定纯度。然后使纯化的级分进行蛋白质印迹。简单地说,在还原(R)或非还原(NR)条件下通过 12% SDS-PAGE 分离了 15 μ g 含有主要蛋白质的洗脱级分、将它们转到硝化纤维上、印迹并使用 ECL 蛋白质印迹检测试剂展开。初次抗体、家兔抗-HBc、二次抗体、小鼠抗-家兔-过氧化物酶缀合物。

实施例 22

结合在 MHC-II 上的抗原的鉴定

本发明用于鉴定结合在 MHC-II 上的病毒抗原,即 HIV、HCV、EBV、细菌抗原、其它病原体抗原、肿瘤抗原和涉及自身免疫病的自身抗原。将本发明中的表达载体进行修饰以便包括“测试”多核苷酸。尚不了解引起免疫反应的多核苷酸序列。本发明的策略鉴定了用于开发新疫苗的新抗原/表位。

首先使用来自所选择的细胞即肿瘤细胞的 mRNA 构建 cDNA 文库。当由以极高水平表达所关注的多核苷酸序列的细胞或组织制备 cDNA 时,可以通过最小的努力选择含有所述多核苷酸序列的多个 cDNA 克隆。就较少转录的多核苷酸序列而言,可以将各种方法用于在制备文库前富集特定的 mRNAs。将逆转录病毒用作所述文库的载体。逆转录病毒文库提供了将高复杂度文库输送入实际上任何的有丝分裂活性细胞类型以表达克隆的理想方式。因为病毒颗粒以高效感染,所以它们可输送比基于转染的方法更为复杂的文库。本领域技术人员认识到可以将任何的载体用于该文库。通过使用本领域中众所周知的方法来构建 cDNA 文库。简单地说,由肿瘤样品建立肿瘤细胞系。通过与来源于单核细胞/巨噬细胞的哺乳动物肿瘤裂解物脉冲的 DCs 共培养使来自相同哺乳动物外周血液的 CD4⁺ T-细胞膨胀。鉴定由膨胀的自体 CD4⁺ T-细胞识别的这些肿瘤细胞。接下来将所述细胞系平板固定在 96 孔

中。将膨胀的自体 CD4⁺ T-细胞添加到 96 孔中并监测 96 孔共培养基中 IFN- γ 或 GM-CSF 的浓度。下一步是培养并从阳性肿瘤细胞中提取 mRNA。将分离的 mRNA 转化成 cDNA 并插入例如带有 GFP 标记的慢病毒载体这样的载体中或将测试 cDNAs 克隆入本发明的表达载体。将测试 cDNAs 克隆入例如附图 25 中所述的信号序列与细胞结合元件之间的载体中。一旦构建了 cDNA 文库, 就将病毒载体转染入包装细胞。接着用重组载体转导来源于来自具有相同 MHC-II 基因型的哺乳动物单核细胞的未成熟 DCs 并测定效率。将转导的 DCs 与膨胀的自体 CD4⁺ T-细胞一起共培养。通过 ELISA (GM-CSF) 或经流式细胞排列的 IL2 表面表达来鉴定阳性克隆。对该阳性克隆进行 PCR 扩增并测序以便测定蛋白质 (附图 26)。

筛选人基因组以便鉴定编码由 CD4⁺ T-细胞识别的蛋白质和表位的多核苷酸序列。将这些多核苷酸序列用于癌症疗法或诱发对自身免疫病疗法的免疫耐受性或用于基因疗法。这种基本的筛选过程为用于设计小治疗分子的表位提供了鉴定方法。

因此, 本领域技术人员认识到可以将这种筛选过程进行改变以便筛选不同的基因组, 即人、病毒、细菌或寄生虫基因组。cDNA 文库的构建在本领域中是众所周知的。因此, 本领域技术人员能够应用这种信息来改变本发明以便鉴定抗原。

本说明书中所述的全部专利和公开出版物表明了本发明涉及的本领域技术人员的水平。将全部专利和公开出版物引入本文作为参考, 就如同特别和分别指定将各个公开文献引入作为参考一样。

引用的参考文献

Abbas, A. K., Murohy, K. M. & Sher, A. 《自然》 (Nature) 383, 787-93 (1996)。

Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. 《自然》 (Nature) 392, 86-9 (1998)。

Ausubel 等 (1997, 《分子生物学最新方案》 (Current Protocols

in Molecular Biology), John Wiley & Sons, New York)。

Banchereau, J. & Steinman, R. M. 《自然》(Nature)392, 245-52 (1998)。

Bangham 等《分子生物学杂志》(J. Mol. Biol.) 13: 238, 1965。

Bei R., Schlom J, Kashmiri SVS《免疫学方法杂志》(J. Immunol. Meth.) 186: 245-255 (1995)。

Bennett, S. R. Carbone, F. R., Karamalis, F. Miller, J. F. & Heath, W. R. 《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 186, 65-70 (1997)。

Bennett, S. R. 等《自然》(Nature) 393, 478-80 (1998)。

Bird 等《科学》(Science) 242: 23-426 (1988)。

Bona, C. A. Casares, S. & Brumeanu, T. D. 《今日免疫学》(Immunology Today) 19, 126-33 (1998)。

Chaux, P. 等《实验药物杂志》(J. Experimental Medicine) 189, 767-78 (1999)。

Chen, J. D. Bai, X. Yang, A. G., Cong, Y. & Chen, S. Y. 《天然药物》(Nature Medicine) 3, 1110-6 (1997)。

Cyster, J. G., Gartley, S. B. & Goodnow, C. C. 《自然》(Nature) 371, 389-95 (1994)。

Daeron, M. 《免疫学综述年鉴》(Annual Review of Immunology) 15, 203-34 (1997)。

De Veerman, M. 等《免疫学杂志》(Journal of Immunology) 162, 144-51 (1999)。

Deamer 和 Uster “脂质体制备: 方法和机理” - 《脂质体》(LIPOSOMES), M. Ostro 编辑 (1983)。

Ferrari, C. 等《免疫学杂志》(J. Immunol.) 145, 3442-9 (1990)。

Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A. & Hueerll, J. G. R. 《免疫学最新方案》(Current Protocols in Immunology) (附录 26) 第 2 卷 (Coico, R. 编辑) 8.100.1-8.10.21 (John Wiley

& Sons, Inc., 1998)。

Gaugler 等《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 179, 921-30 (1994)。

Gerhardt 等(编辑, 1994《一般方法和分子细菌学》(Methods for General and Molecular Bacteriology), 美国微生物学协会 (American Society for Microbiology), Washington, DC)。

Ghosh 和 Bachhawat:《肝脏疾病、使用特异性受体和配体的靶向诊断和疗法》(Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using receptors and ligands), Wu G. Wu C. 编辑, New York: Marel Dekker, 87-104 页, 1991。

Gilboa, E.《免疫》(Immunity) 11, 263-70 (1999)。

Greenberg, P. D., Cheever, M. A. & Fefer, A.《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 154, 952-63 (1981)。

Gregoriadis《生物学和药物中的药物载体》(DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE), G. Gregoriadis (编辑), 1979, 287-341 页。

Haeffner-Cavaillon, N., Klein, M. & Dorrington, K. J.《免疫学杂志》(Journal of Immunology) 123, 1905-13 (1979)。

Harlow 等, 1988《抗体实验指南》(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor, New York。

Houston 等, 1988《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85: 5879-5883。

Hsu TA, Takahashi N, Tsukamoto Y, Kato K, Shimada I, Masuda K, Whiteley EM, Fan JQ, Lee YC, Betenbaugh MJ,《生物学与化学杂志》(J Biol Chem) 1997; 272:9062-9070。

Hu, P. 等《人抗体与杂交瘤》(Human Antibodies & Hybridomas) 6, 57-67 (1995)。

Huang, A. Y. 等《科学》(Science) 264: 961-5 (1994)。

Hung, K. 等《实验药物杂志》(Journal of Experimental

Medicine) 188, 2357-68 (1998)。

Inaba, K. 等《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 176, 1693-702 (1992)。

James, R. F., Edwards, S., Hui, K. M., Bassett, P. D. & Grosveld, F.《免疫学》(Immunology) 72, 213-8 (1991)。

Jarvis D, Kavar Z, Hollister J.《生物技术最新观点》(Curr Opin Biotechnol) 1998; 9: 528-533。

Kalams, S. A. & Walker, B. D.《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 188, 2199-204 (1998)。

Kaneda 等《科学》(Science) 243: 357-378, 1989。

Kato 等《生物学与化学杂志》(J. Biol. Chem.) 266:3361-3364, 1991。

Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K. L.《科学》(Science) 267: 243-6, (1995)。

Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Jefferis R.《免疫学杂志》(J. Immunol.) 1996; 157:4963-4969。

Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Nakagawa H, Jefferis R.《FASEB 杂志》(FASEB J) 1995; 9: 115-119。

Macky, M. F. 等《癌症研究》(Cancer Research) 57, 2569-74 (1997)。

Manici, S. 等《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 189, 871-6 (1999)。

Matzinger, P.《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 145, 185-92 (1991)。

Mellman, I., Turley, S.J. & Steinman, R. M.《细胞生物学趋势》(Trends in Cell Biology) 8, 231-7 (1998)。

Mumberg, D. 等《美国国家科学院会议论文集》(Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America) 96, 8633-8 (1999)。

Nestle, F. O. 等《天然药物》(Nature Medicine) 4, 328-32 (1998)。

Nicolau 等《酶学方法》(Methods Enzymol.) 149: 157-176, 1987。

Nuchtern, J. G., Biddison, W. E. & Klausner, R. D. 《自然》(Nature) 343, 74-6 (1990)。

Ossendorp, F., Mengede, E., Camps, M., Filius, R & Melief, C. J. 《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 187, 693-702 (1998)。

Ou, J. H., Laub, O. & Rutter, W. J. 《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 83: 1578-82 (1986)。

Pardoll, D. M. & Topalian, S. L. 《免疫学最新观点》(Current Opinion in Immunology) 10: 588-94 (1998)。

Ravetch 等, 1993《免疫学综述年鉴》(Ann. Rev. Immunol.) 9: 457-492。

Regnault, A. 等《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 189, 371-80 (1999)。

Reynolds, S. R. 等《国际癌症杂志》(International Journal of Cancer) 72, 972-6 (1997)。

Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. 《自然》(Nature) 393, 474-8 (1998)。

Rosenberg, S. A. 《免疫》(Immunity) 10, 281-7 (1999)。

Rosenfeld 等《临床研究》(Clin. Res.) 39(2), 311A(1991a);

Sambrook 等(1989, 《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 美国冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory), New York)。

Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R & Melief, C. J. 《自然》(Nature) 393, 480-3 (1998)。

Serre, K. 等《免疫学杂志》(J. Immunology) 161, 6059-67 (1998)。

Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R. & Rock, K. L. 《自然》(Nature) 398, 77-80 (1999)。

Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. 《细胞生物学杂志》(J. of Cell Biology) 55, 186-204 (1972)。

Steinman, R. M. & Swanson《实验药物杂志》(J. of Experimental Medicine) 182, 283-8 (1995)。

Syrengeles, A. D. & Levy, R. 《免疫学杂志》(J. of Immunology) 162, 4790-5 (1999)。

Szoka 和 Papahadjopoulos《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75: 4194-98 (1978)。

Tanaka, F. 等《癌症研究》(Cancer Research) 57, 4465-8 (1997)。

Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejean, A. 《自然》(Nature) 317, 489-95 (1985)。

Valmori, D. 等《实验药物杂志》(Journal of Experimental Medicine) 189, 895-906 (1999)。

van der Bruggen, P. 等《欧洲免疫学杂志》(European Journal of Immunology) 24, 3038-43 (1994)。

Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. 《免疫学最新观点》(Current Opinion in Immunology) 9: 684-93 (1997)。

Vijiayasaradhi, S., Xu, Y., Bouchard, B. & Houghton, A. N. 《细胞生物学杂志》(J. of Cell Biology) 130, 807-20 (1995)。

Watts, C. 《免疫学综述年鉴》(Annual Review of Immunology) 15: 821-50 (1997)。

Weber, J. S. 等《免疫疗法杂志》(Journal of Immunotherapy) 22, 431-40 (1999)。

Wong 等《基因》(Gene) 10: 87-94, 1980。

Wu, T. C. 等《美国国家科学院会议论文集》(Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America) 92, 11671-5 (1995)。

Yang, A. G., Bai, X., Huang, X. F., Yao, C. & Chen, S. 《美国国家科学院会议论文集》 (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America) 94, 11567-72 (1997)。

Zajac 等《免疫学最新观点》 (Curr. Opin. Immunol.) 10: 444 (1998)。

本领域技术人员会轻易地理解为适应本发明的目的可以对本发明进行充分的修改并获得所述的以及其中固有的结果和优点。本文所述的疫苗、载体、方法、步骤和技术是目前优选实施方案的代表且是典型的而不用来限定范围。本领域技术人员对其中所作的改变和其它应用也包括在本发明或由所附权利要求范围定义的范围内。

序列表

<110> CHEN, SI-YI AND ZHAOYANG, YOU

<120> 用于鉴定引起免疫反应的抗原的组合物和方法

<130> TBA

<140> TBA

<141> TBA

<150> 60/132,752

<151> 1999-05-06

<150> 60/132,750

<151> 1999-05-06

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> 人类

<400> 1

acgcgtcgac atgcctcttg agcagaggag tcag

34

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 人类

<400> 2

ccgctcgagt cactcttccc cctcttcaa aac

33

<210> 3

<211> 103

<212> DNA

<213> 人类

<400> 3

acgcgtcgac atgaaggctt ccgcggcagc cctcgtgtc atctcattg ctactgccct 60

ctgcgctcct gcctctgccca tgcctcttga gcagaggagt cag 103

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> 人类

<400> 4

ataagaatgc gccgctctc ttccccctct ctcaaac 38

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> 人类

<400> 5

ataagcggcc gctaaaactc acacatgcc a 31

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> 人类

<400> 6

ccgctcgagt catttaccgc gagacaggga gag 33

<210> 7

<211> 55

<212> DNA

<213> 人类

<400> 7

gcagctccca gatgggtcct gtccaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcac 55

<210> 8

<211> 68

<212> DNA

<213> 人类

<400> 8

acgcgtcgac atgggaacat ctgtggttct tccttctcct ggtggcagct cccagatggg 60
tcctgtcc 68

<210> 9

<211> 35

<212> DNA	
<213> 乙型肝炎病毒	
<400> 9	
ttaagcttat gcaactttt cacctctgcc taatc	35
<210> 10	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 乙型肝炎病毒	
<400> 10	
tttctagaat cgattaacat tgagattccc gaga	34
<210> 11	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 乙型肝炎病毒	
<400> 11	
gtgcggccgc tctaacaaca gtagttccg gaagtgt	37
<210> 12	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 乙型肝炎病毒	
<400> 12	
ttaagcttat ggacattgac ccttataaag aatttgagc	40
<210> 13	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 13	
ataagcggcc gctaaaactc acacatgccc a	31
<210> 14	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 14	
tattctagat cgatcactca ttacccgga gacagg	36

<210> 15
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> 人类 (前 30) / 鼠 (后 25)

<400> 15
 gcagctccca gatgggtcct gtccaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcac 55

<210> 16
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 16
 ttaagcttca tatgggaaca tctgtggttc ttccttctcc tgggtggcagc tcccagatgg 60
 gtcctgtcc 69

<210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 乙型肝炎病毒

<400> 17
 gatcgaattc atgcaacttt ttcacctctg c 31

<210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 18
 gatcaagctt tcatttaccg ggagacaggg a 31

<210> 19
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人类乳头瘤 E7 型病毒

<400> 19
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

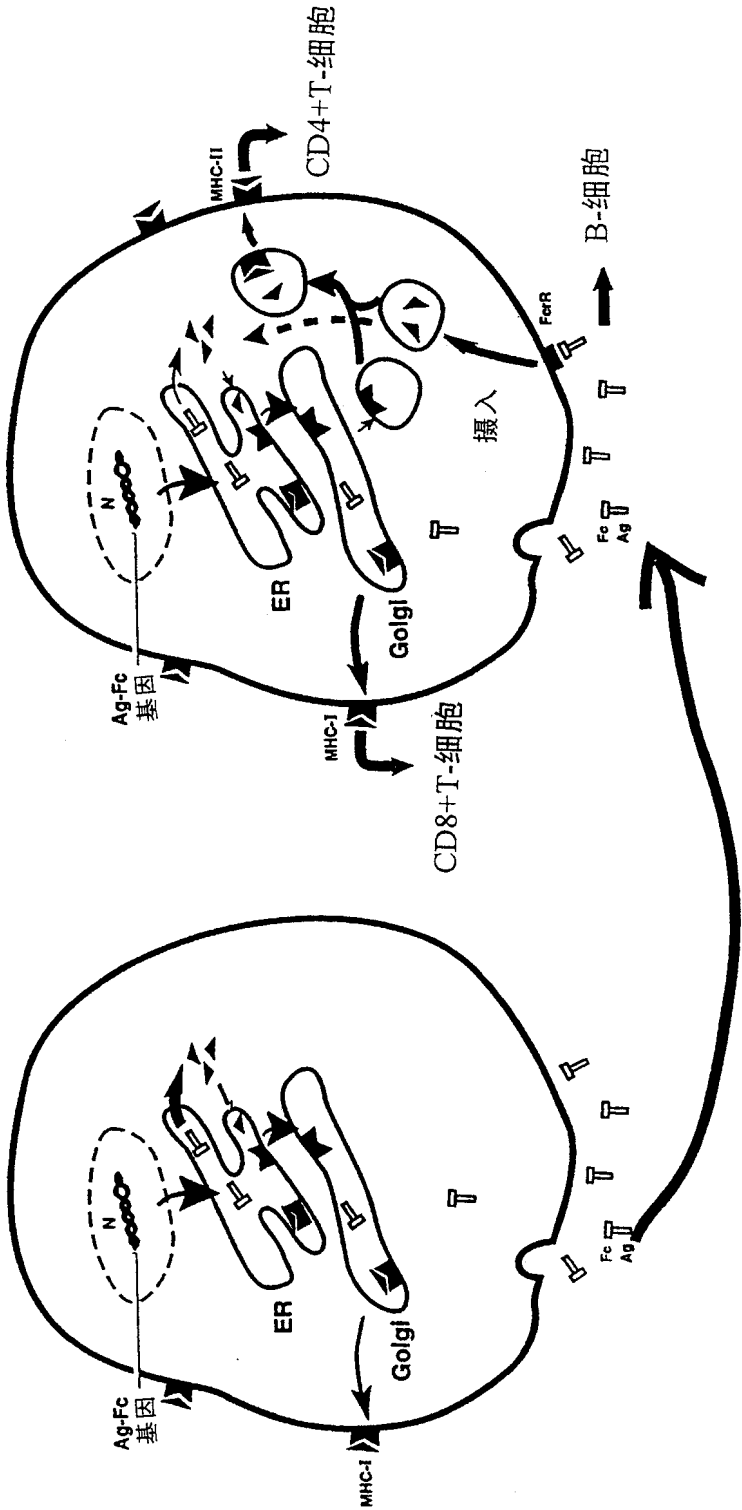


图 1B

图 1A

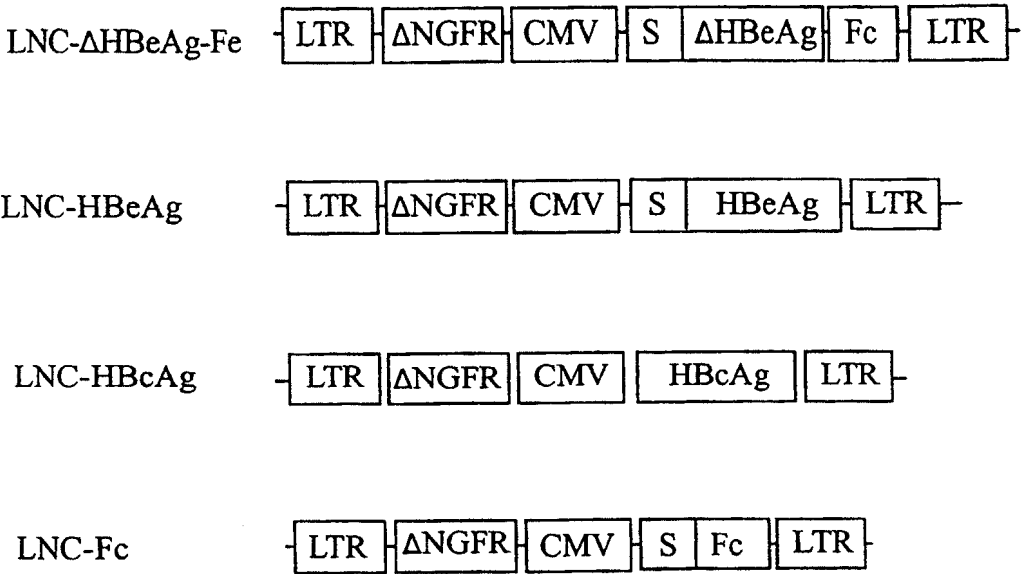
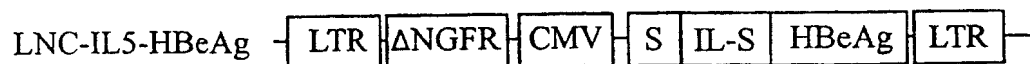


图 2A

用于细胞结合的 IL-5 (HBeAg, 乙型肝炎病毒)



用于酪氨酸酶的 Fc 片段 (黑素瘤)



用于乳头瘤病毒 16E-7 的 Fc 片段 (宫颈癌)

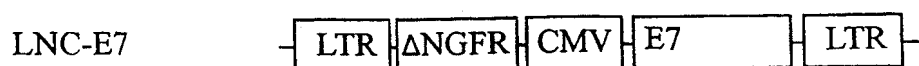


图 2B

HIV-1 的 PET 细胞结合结构域

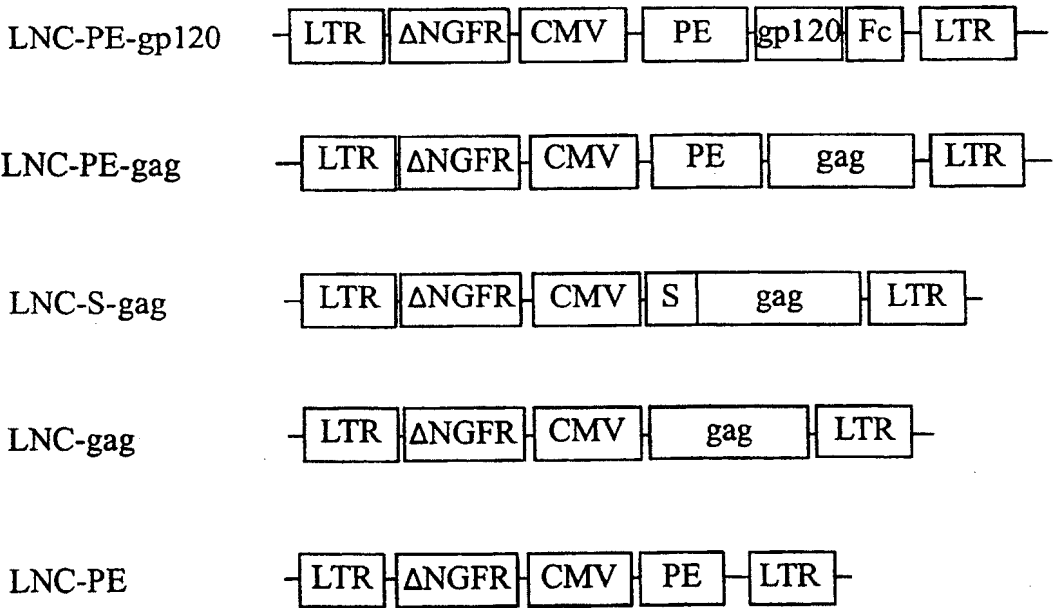


图 2C

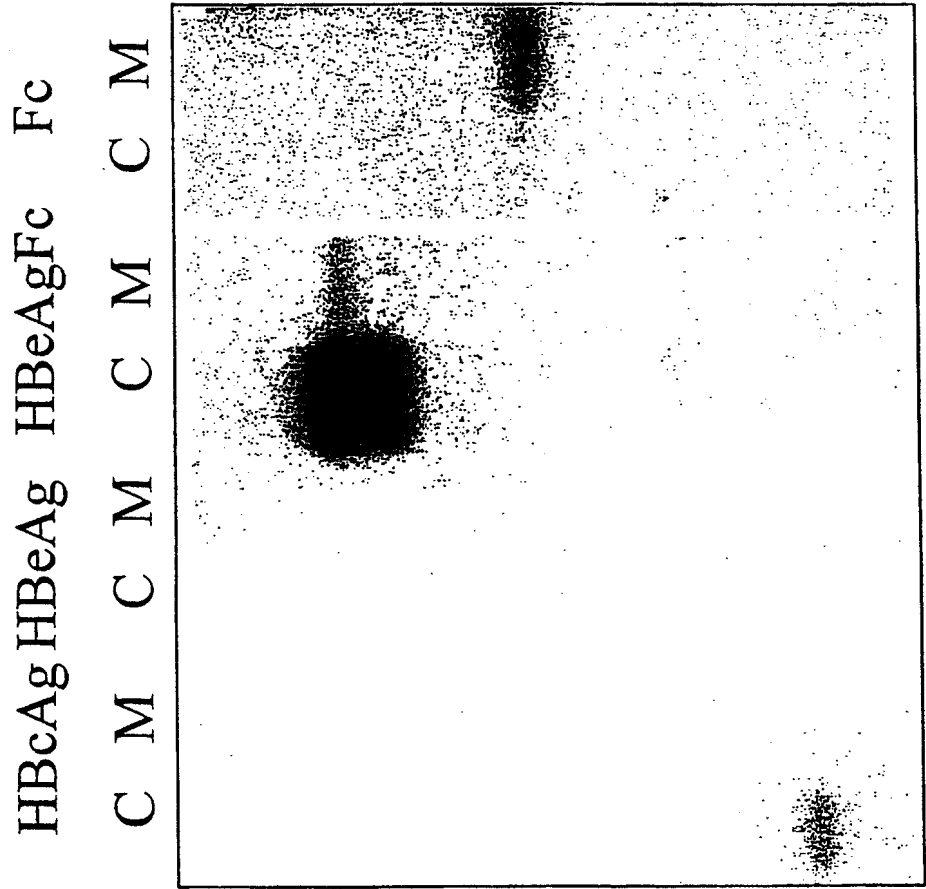
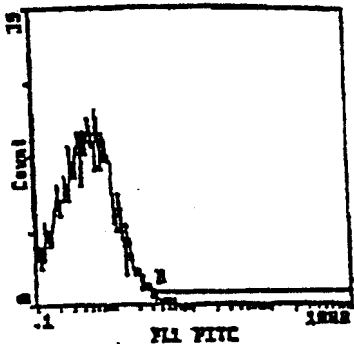
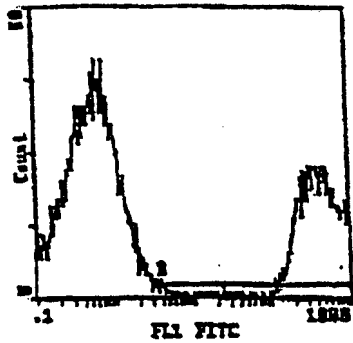


图 3

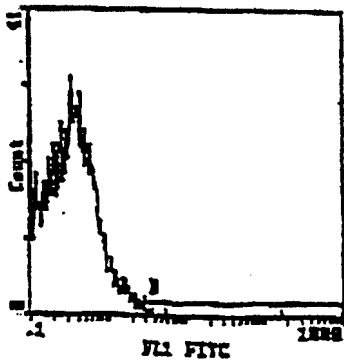
未转导的 DCs
图 4A

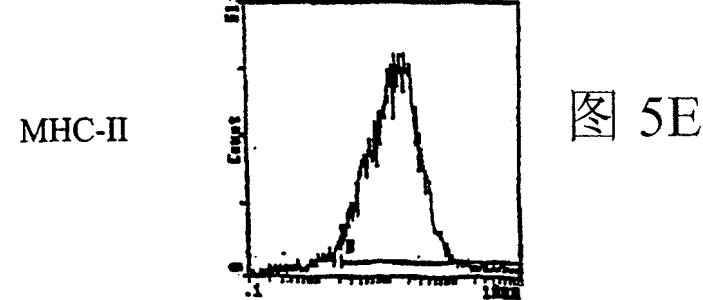
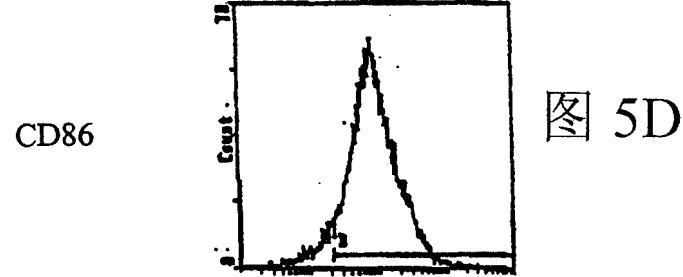
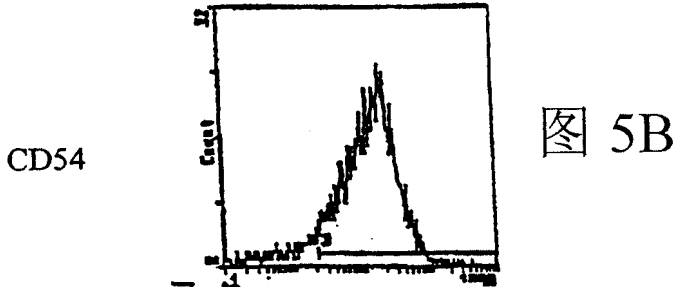
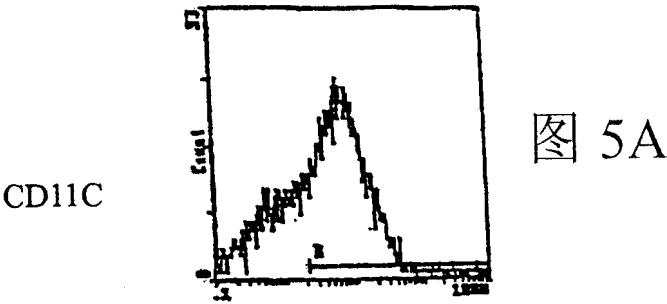


转导的 DCs
图 4B



阴性对照
图 4C





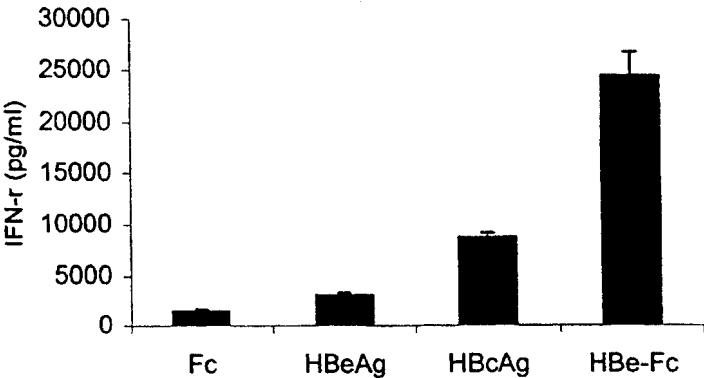


图 6A

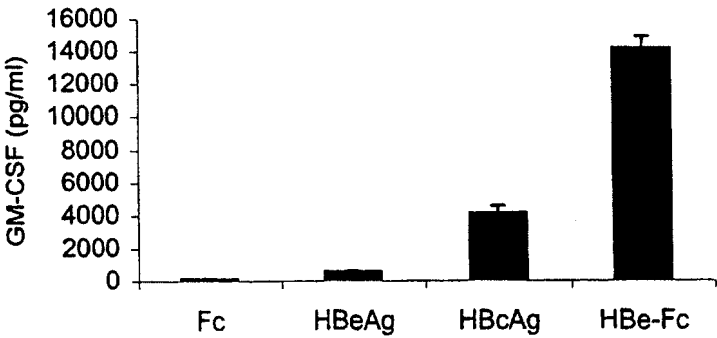


图 6B

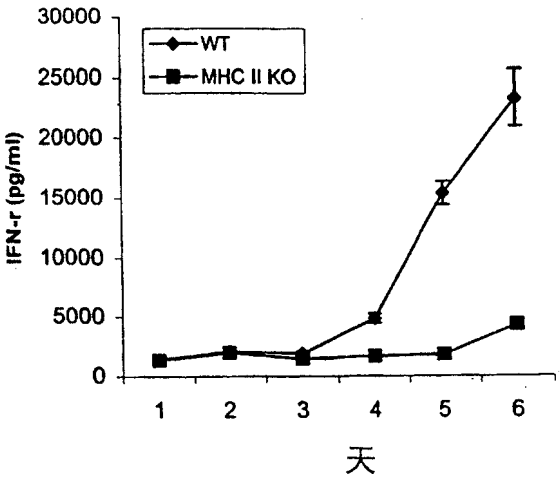


图 7A

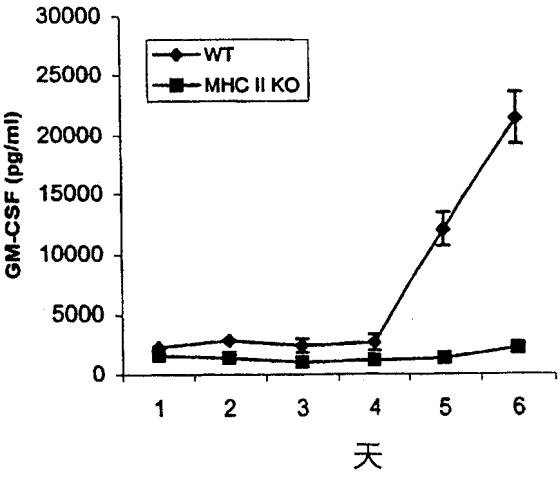
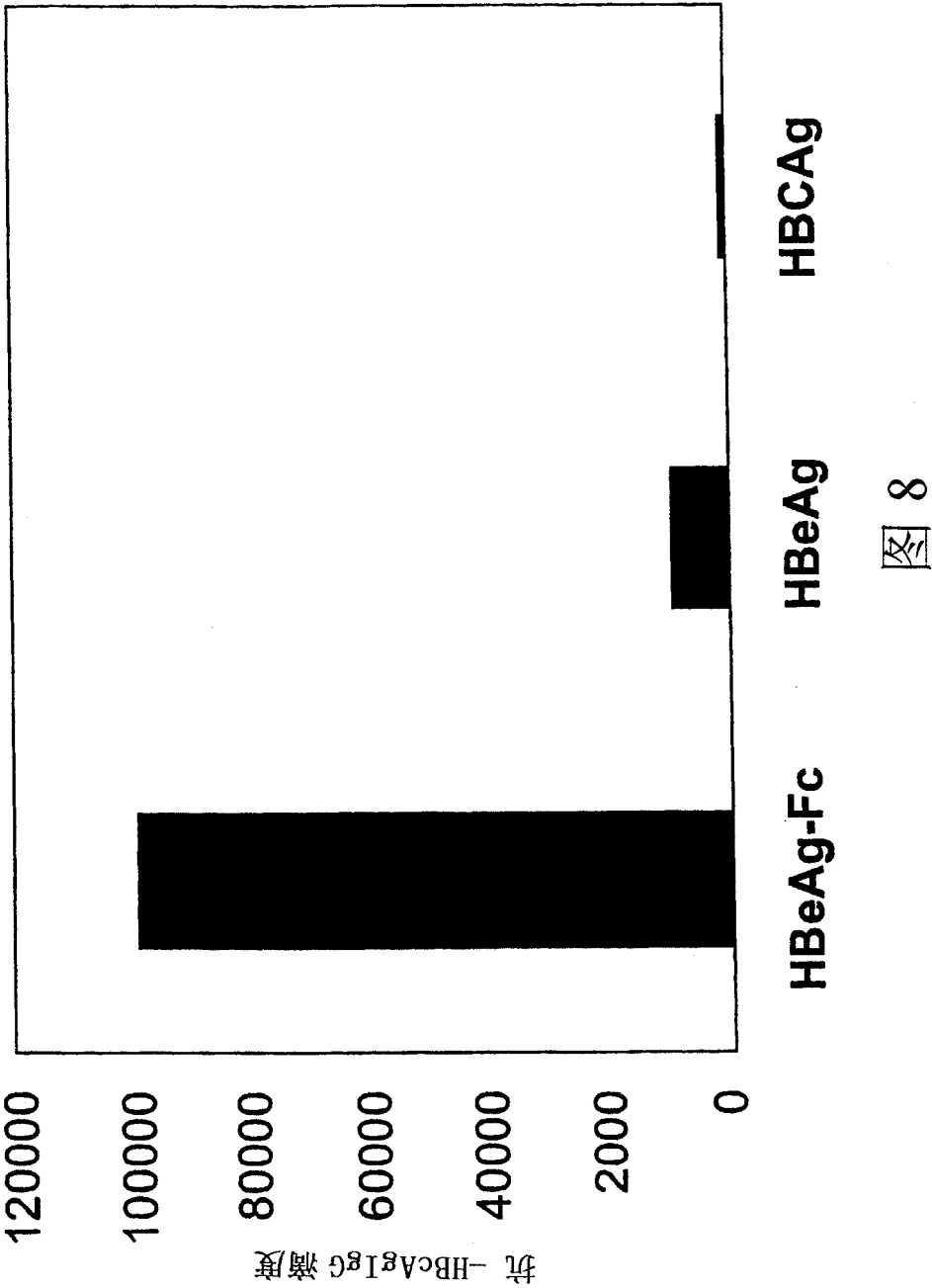


图 7B



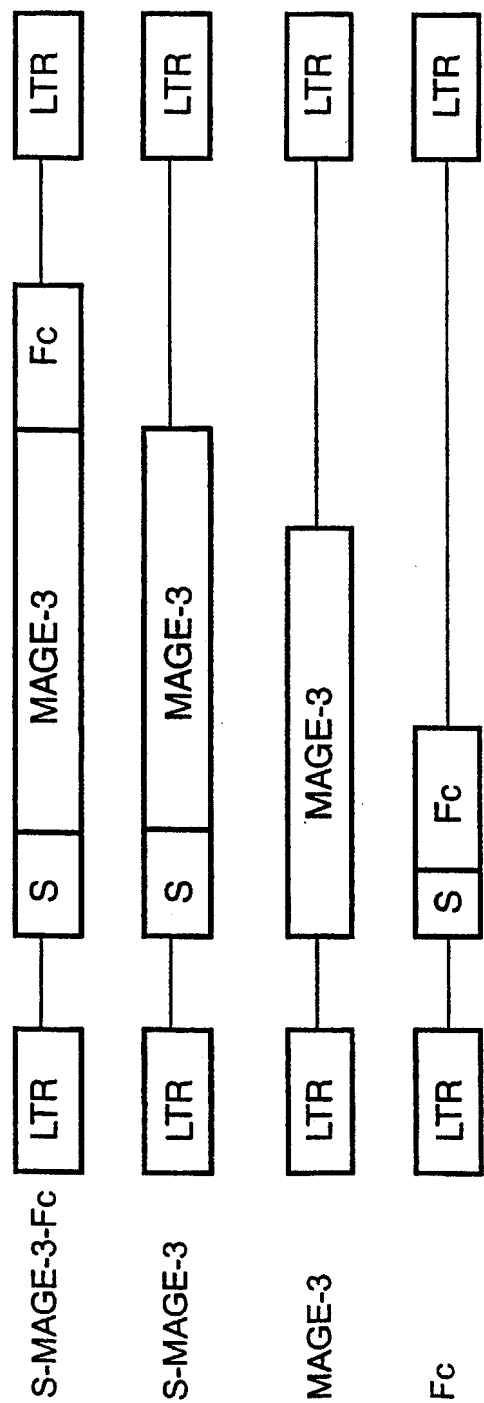


图 9A

图 9B

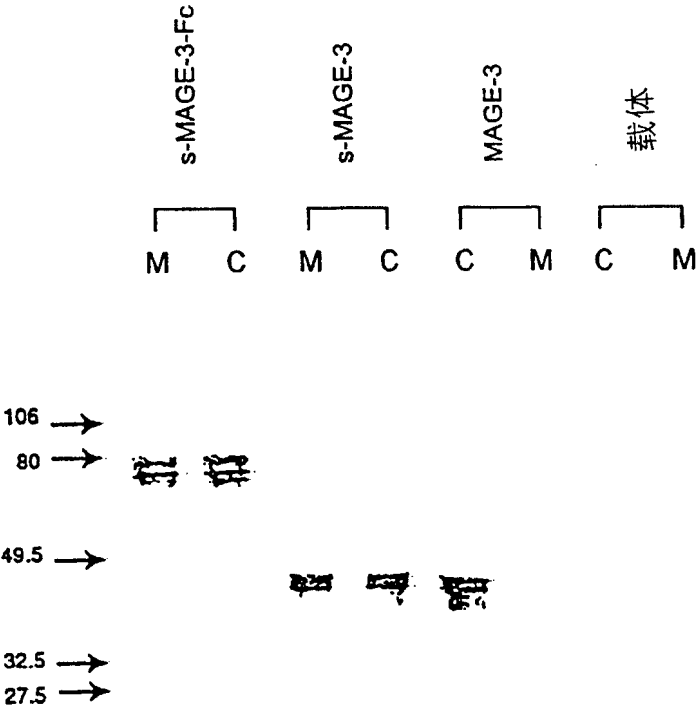
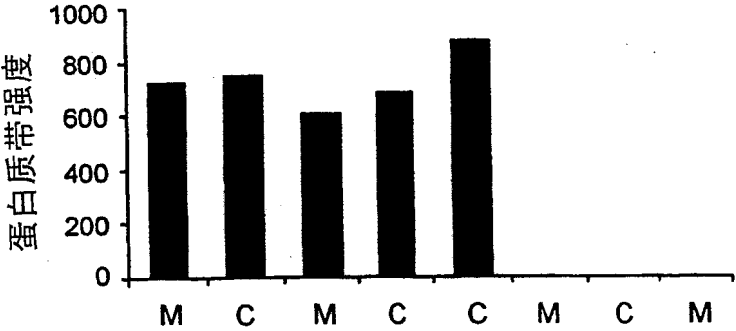


图 9C



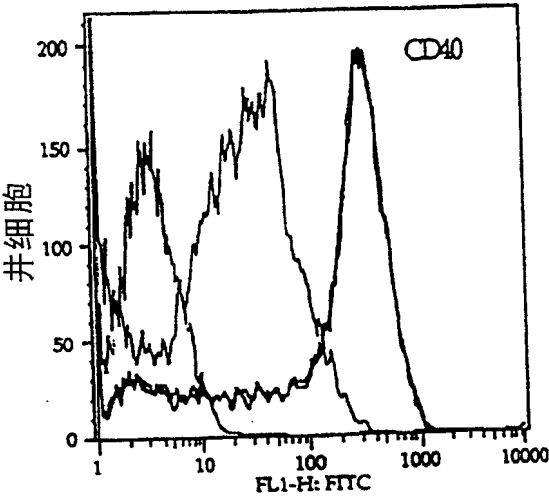


图 9D

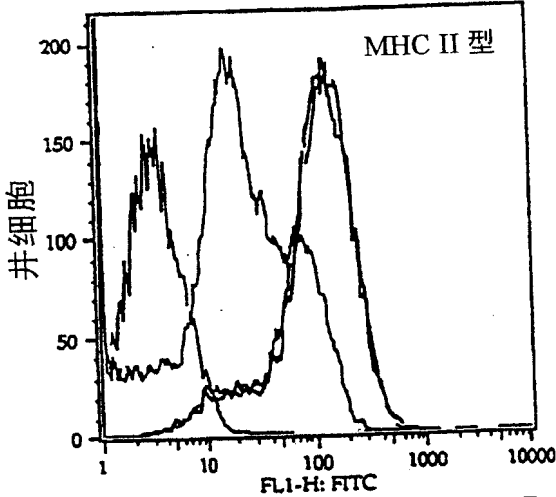


图 9E

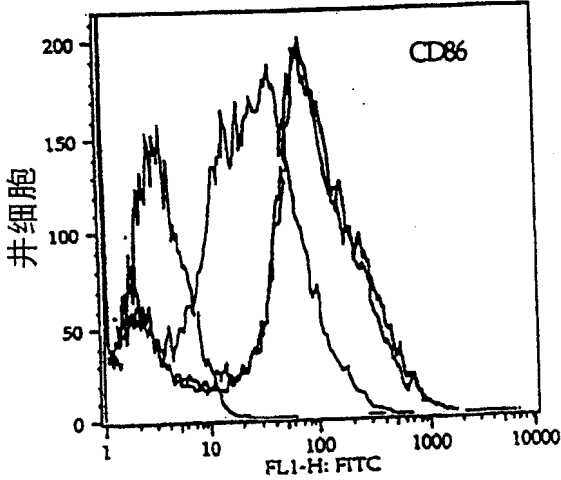


图 9F

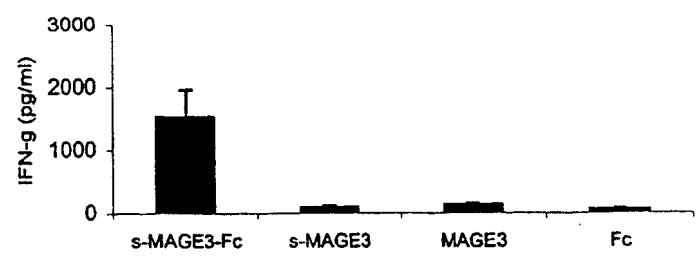


图 10A

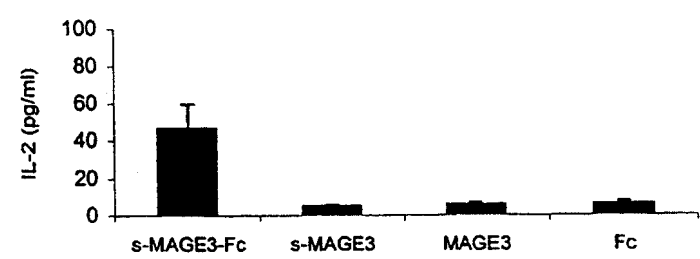


图 10B

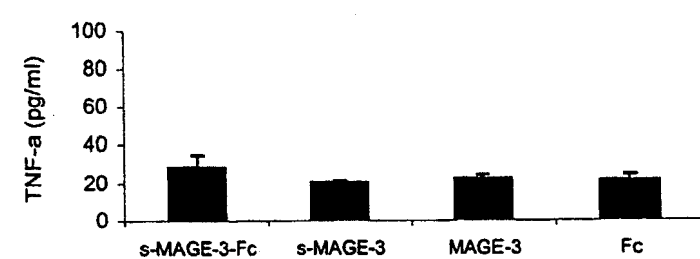


图 10C

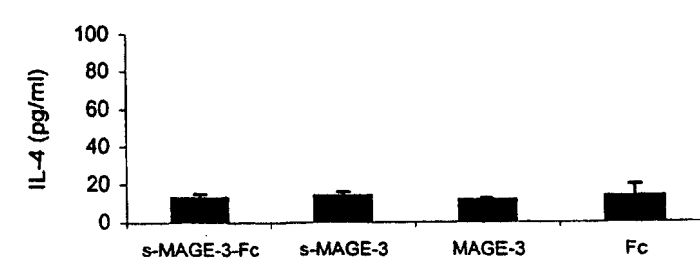


图 10D

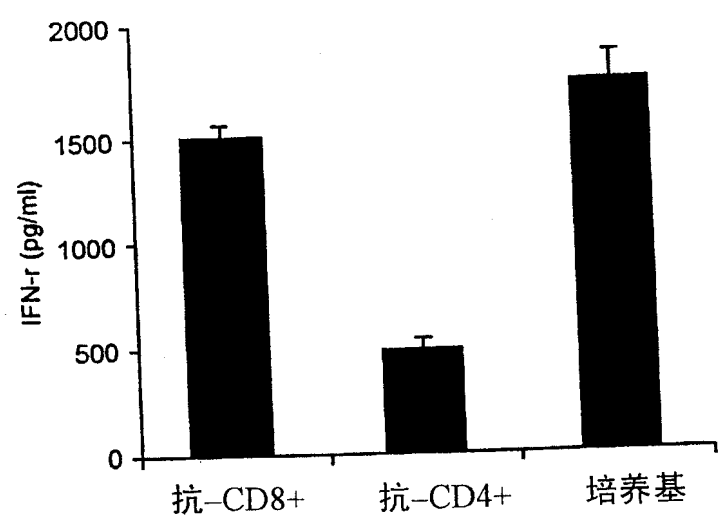


图 11A

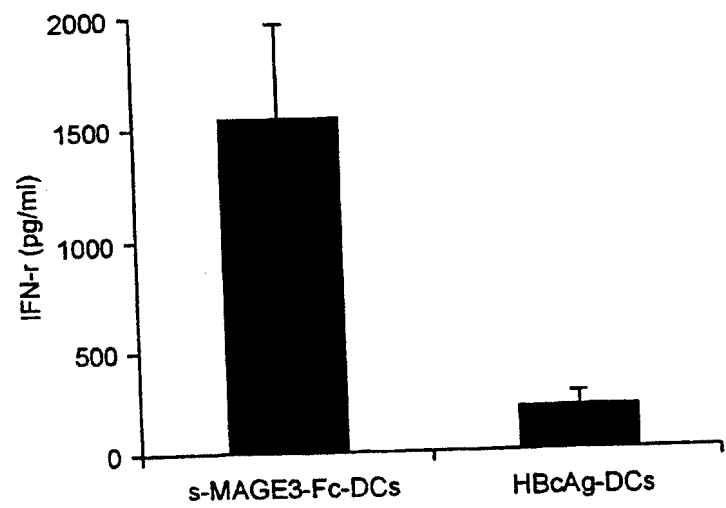


图 11B

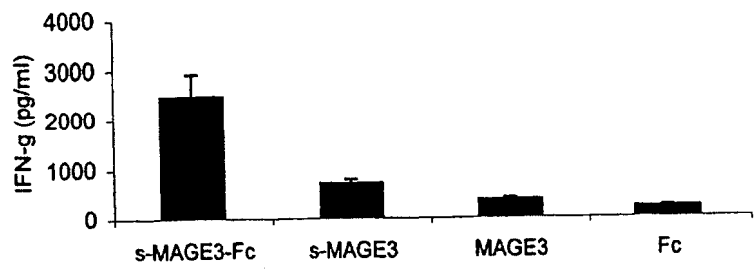


图 12A

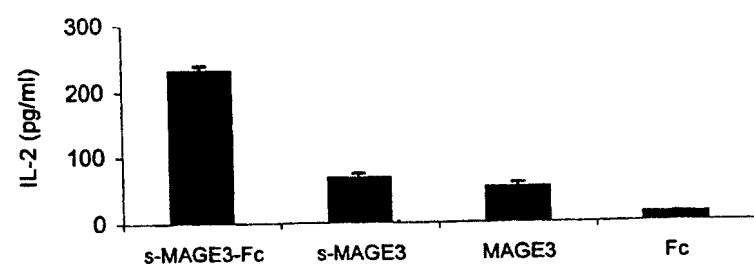


图 12B

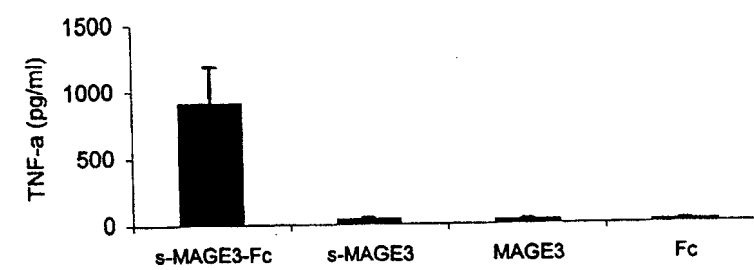


图 12C

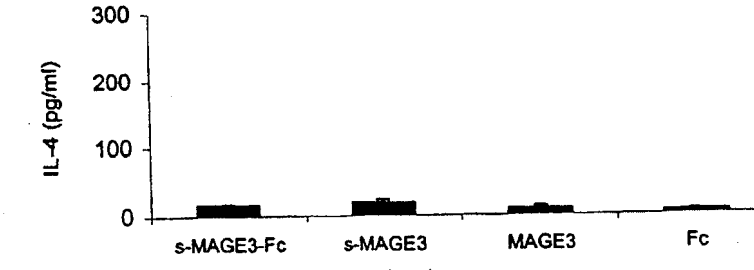


图 12D

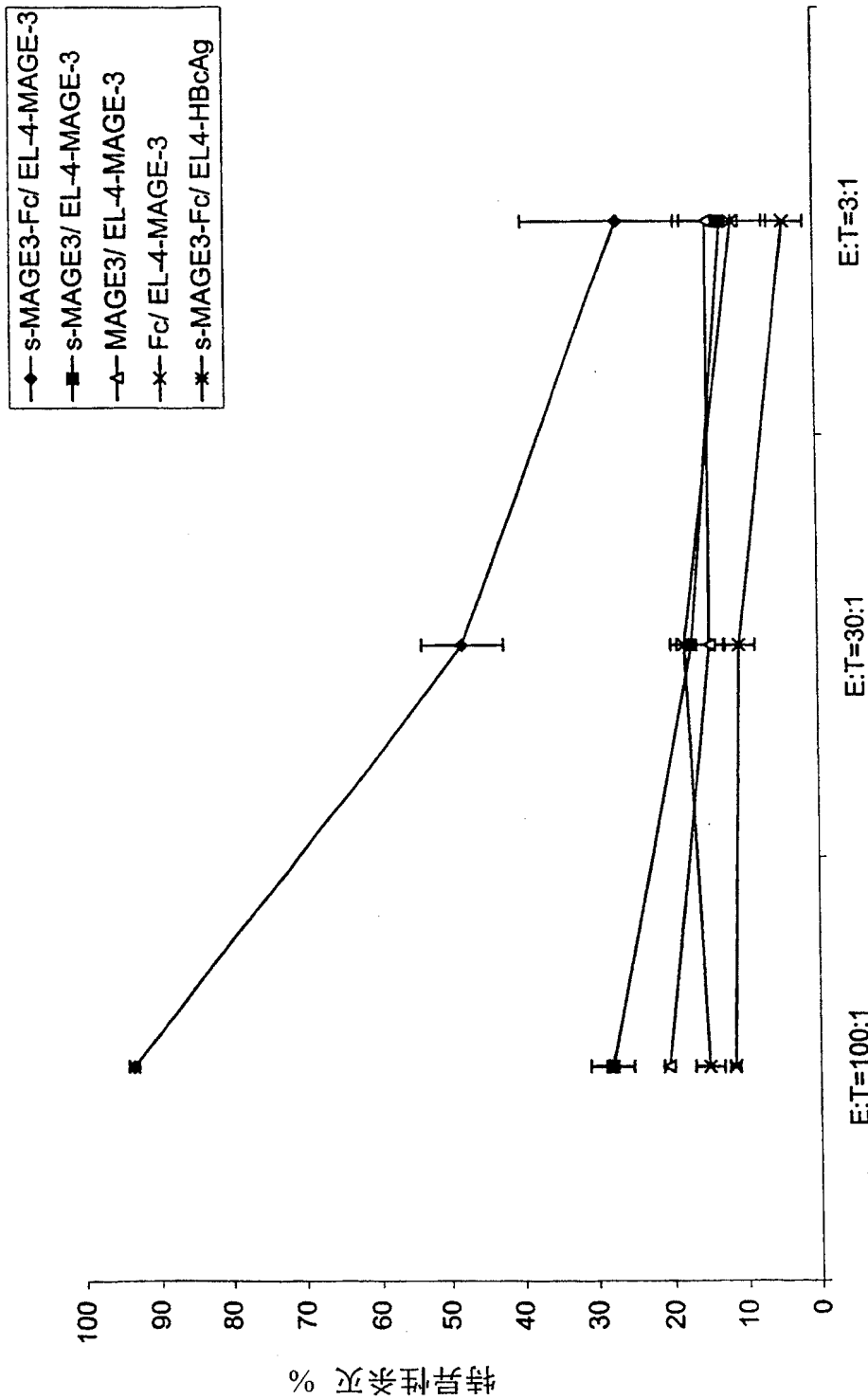


图 13

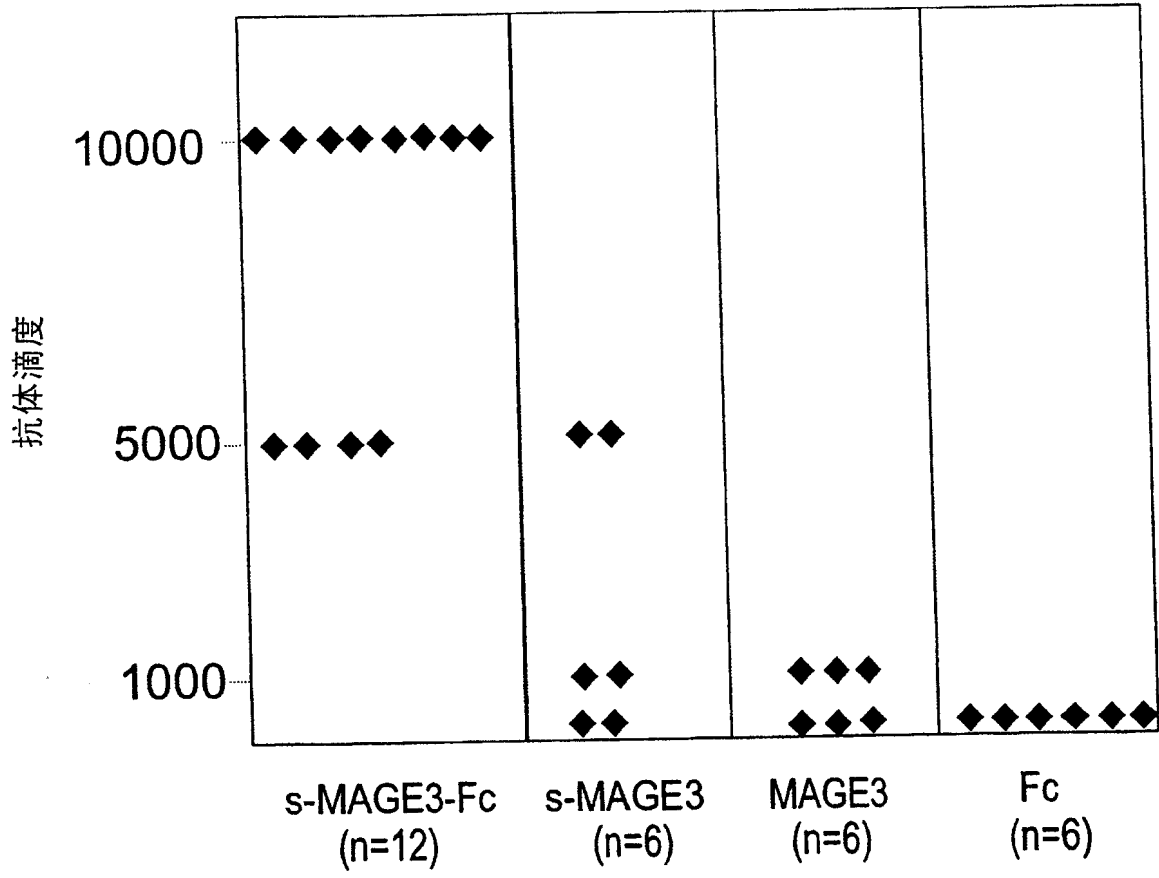


图 14

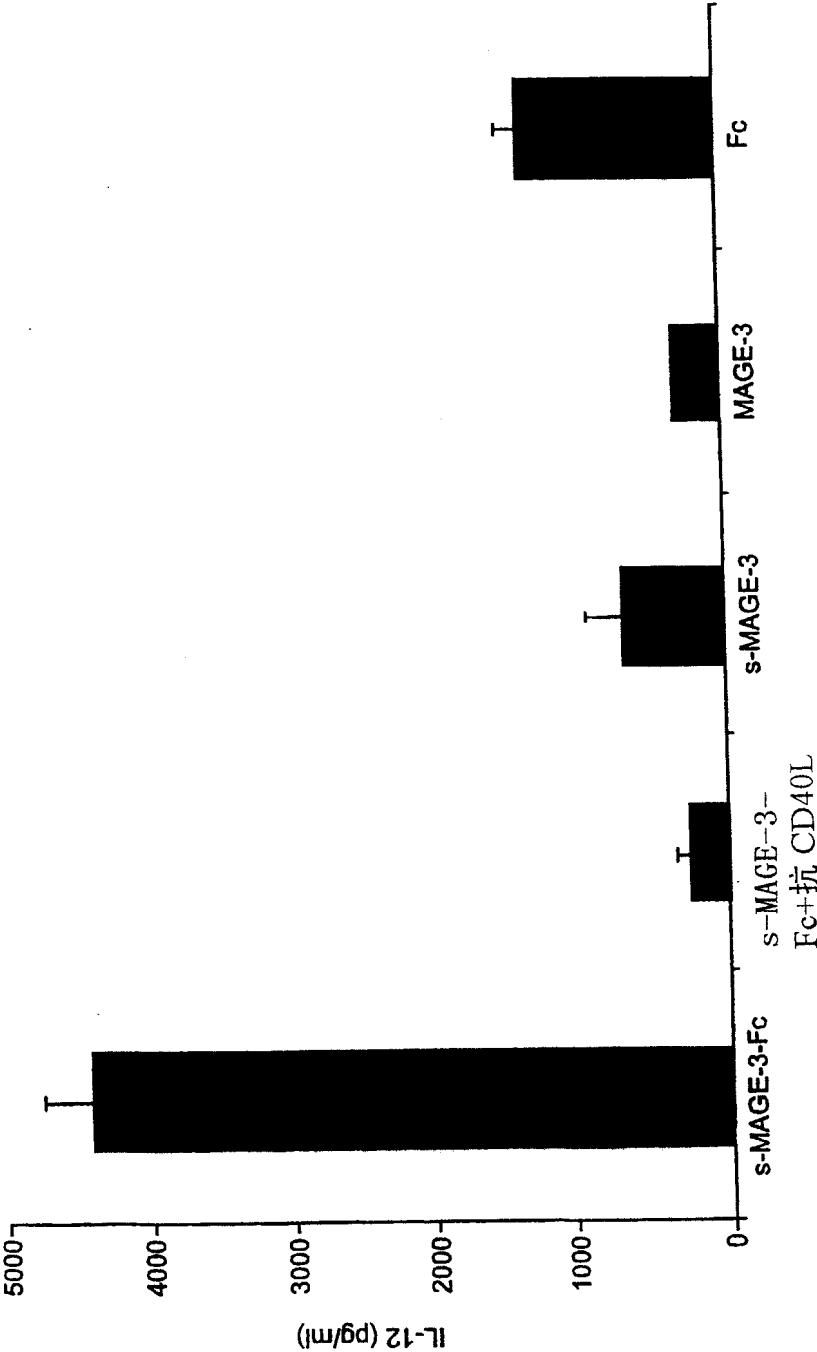


图 15

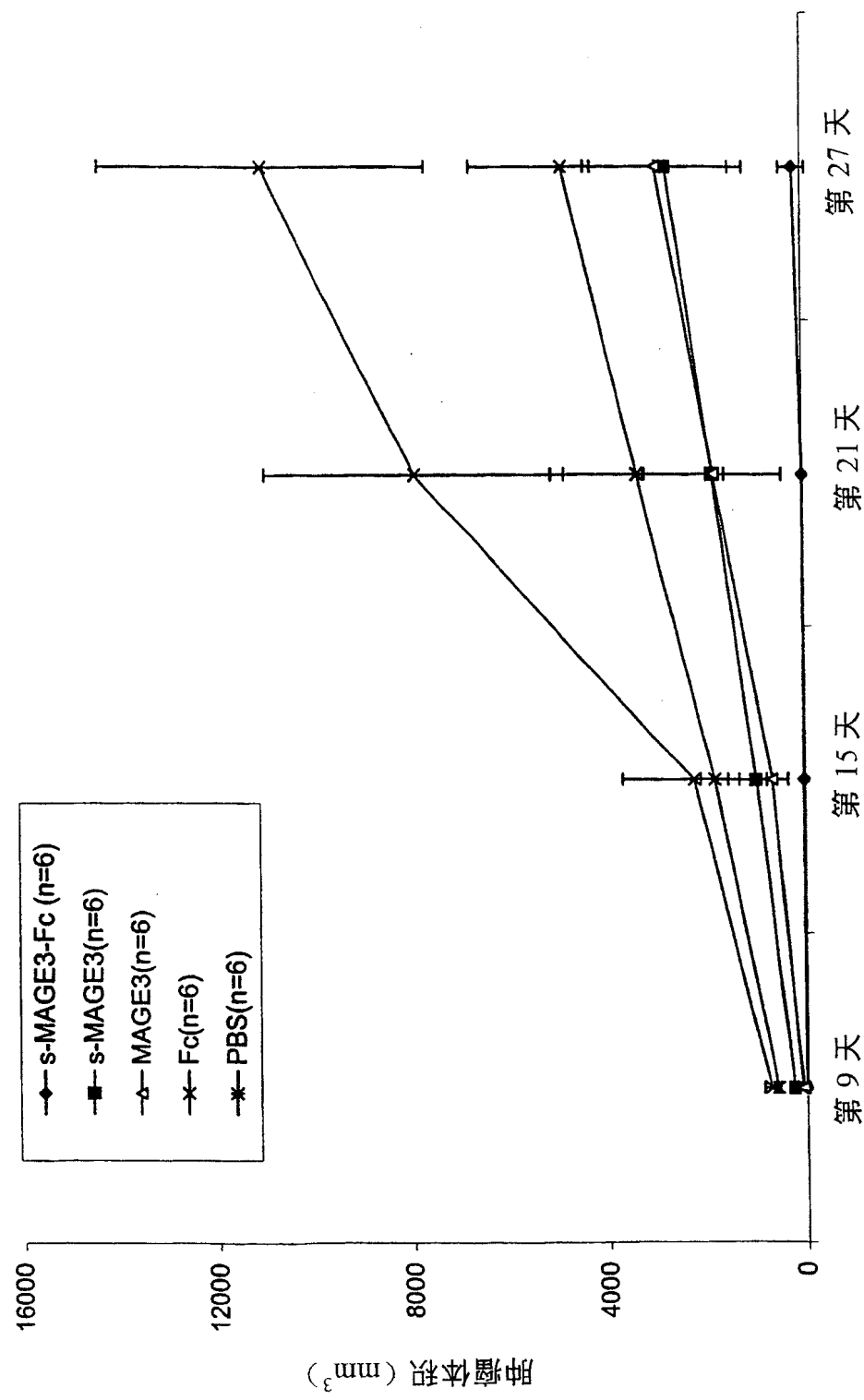
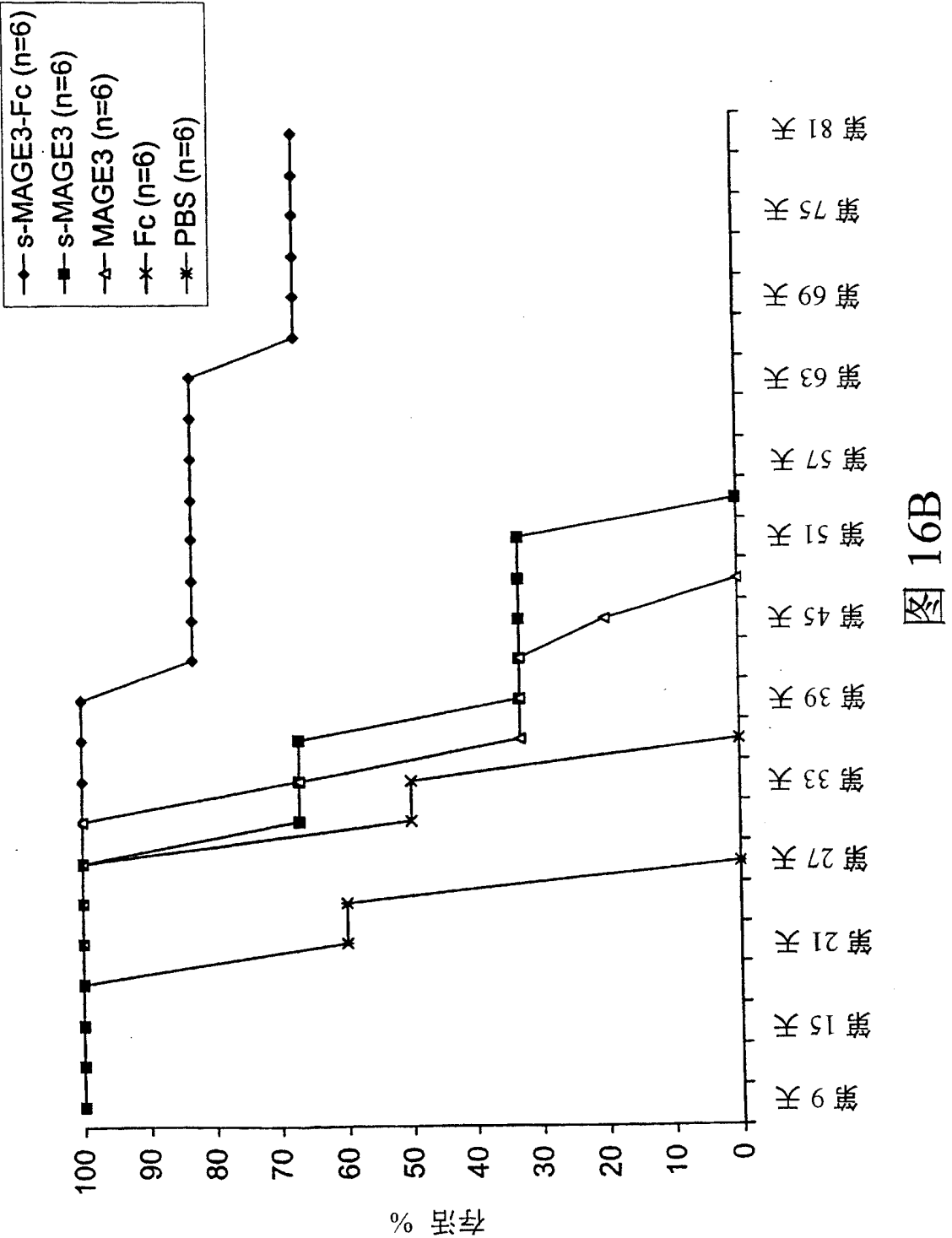


图 16A



SEQ. ID. NO. 19 M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T D
L Y C Y E Q L S D S S E E E D E I D G P A G
Q A E P D R A H Y N I V T F C C K C D S T L
R L C V Q S T H V D I R T L E D L L M G T L
G I V C P I C S Q K P -

图 17

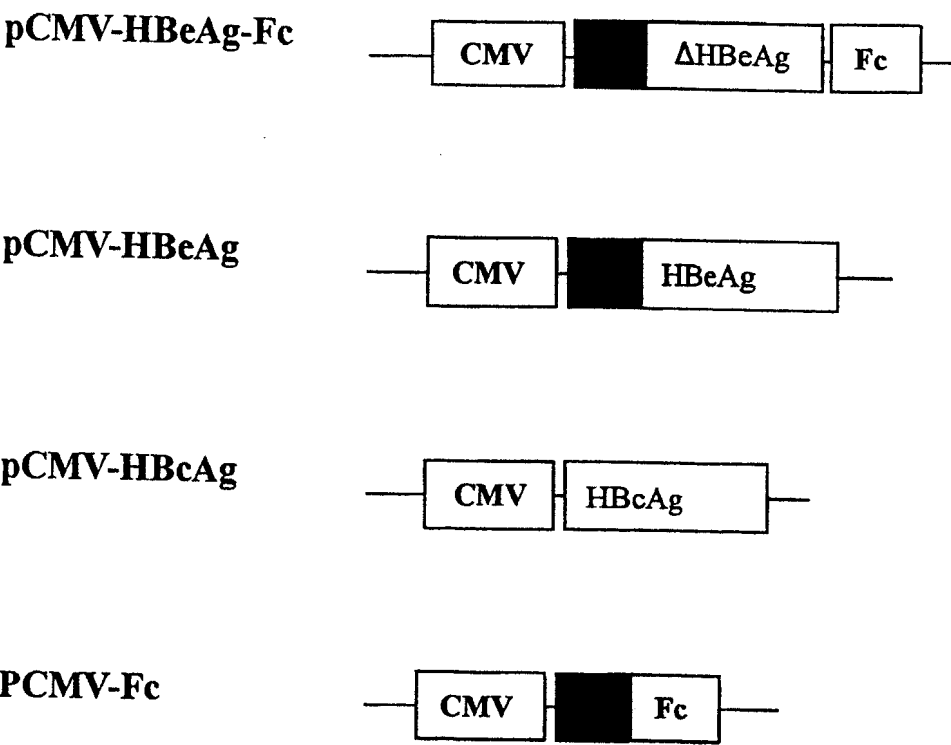


图 18

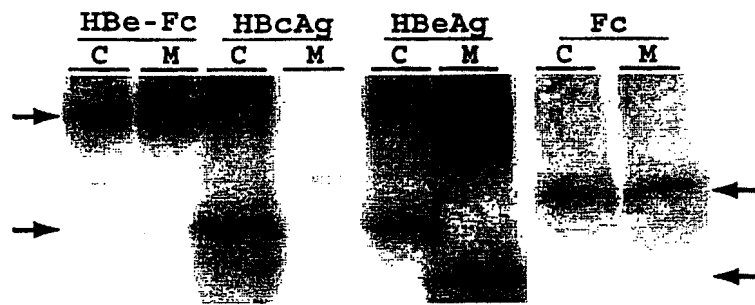


图 19A

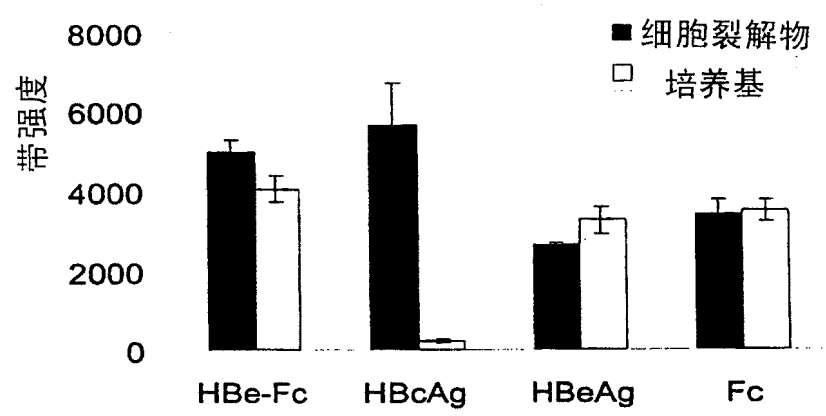


图 19B

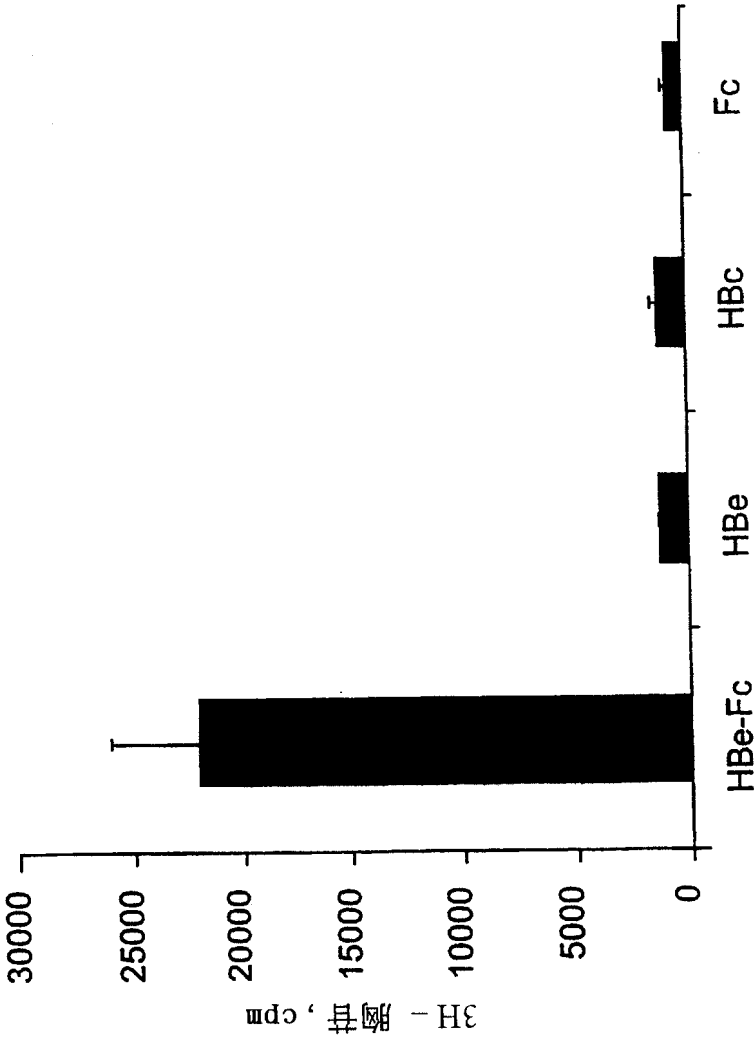


图 20

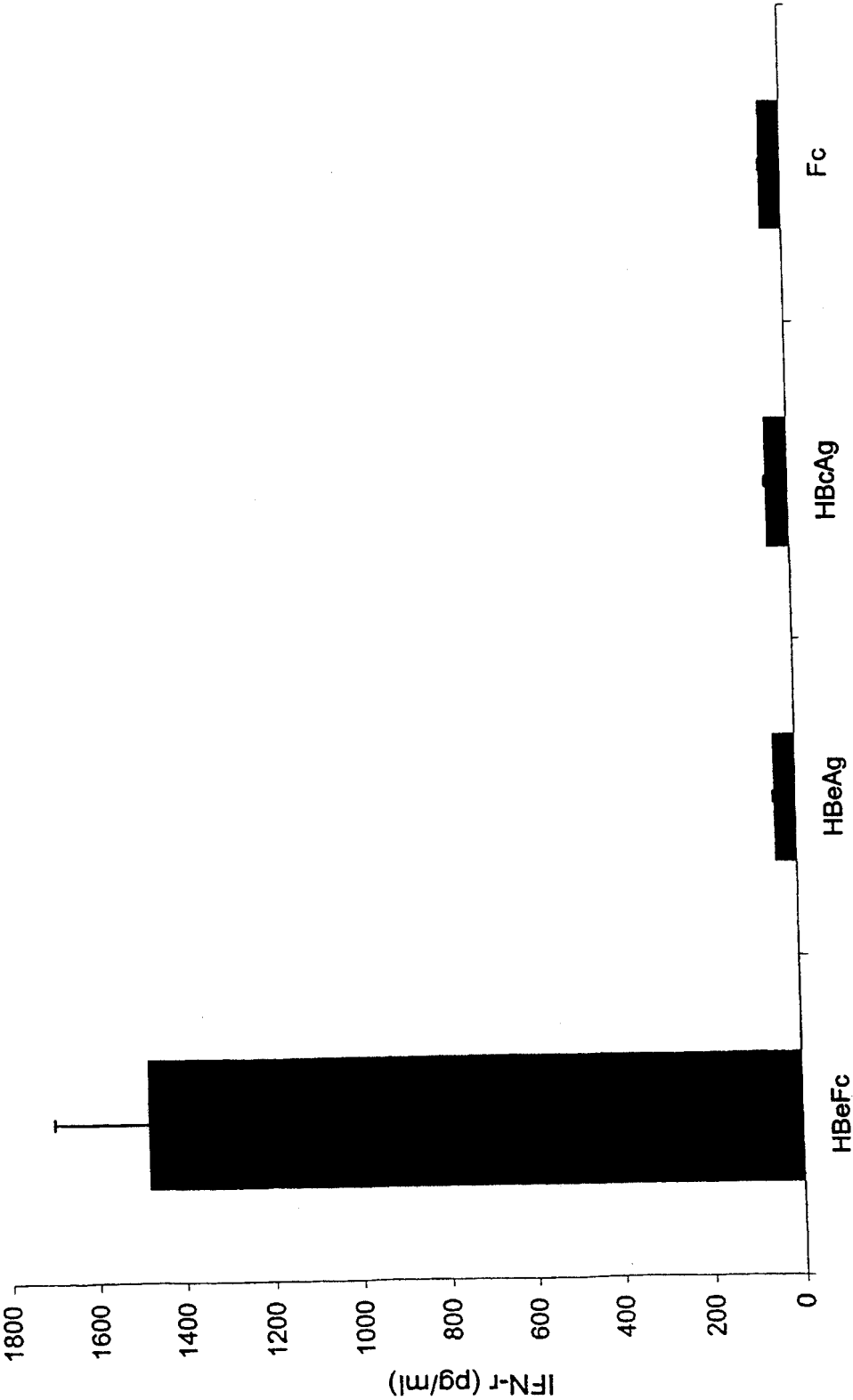


图 21A

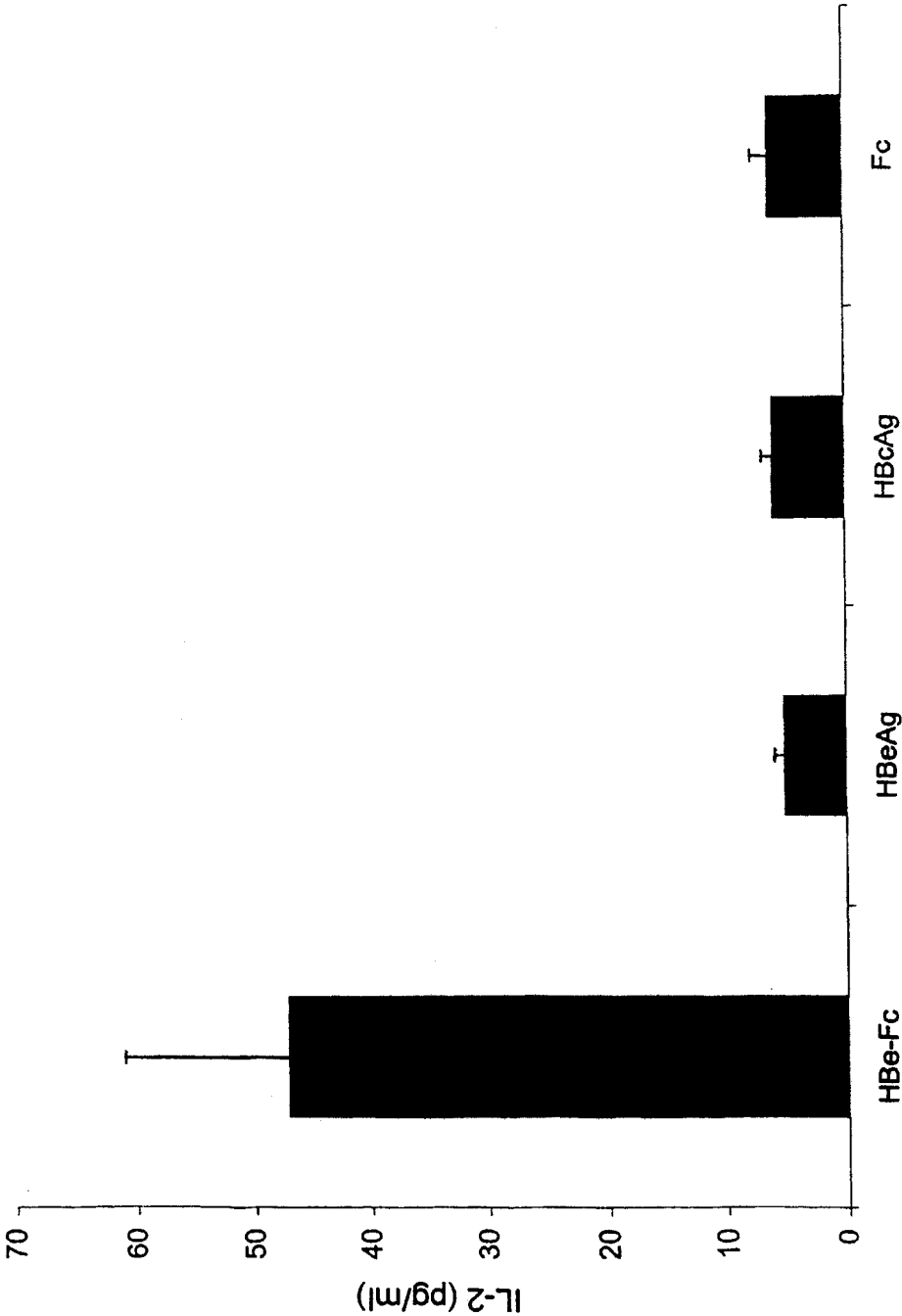
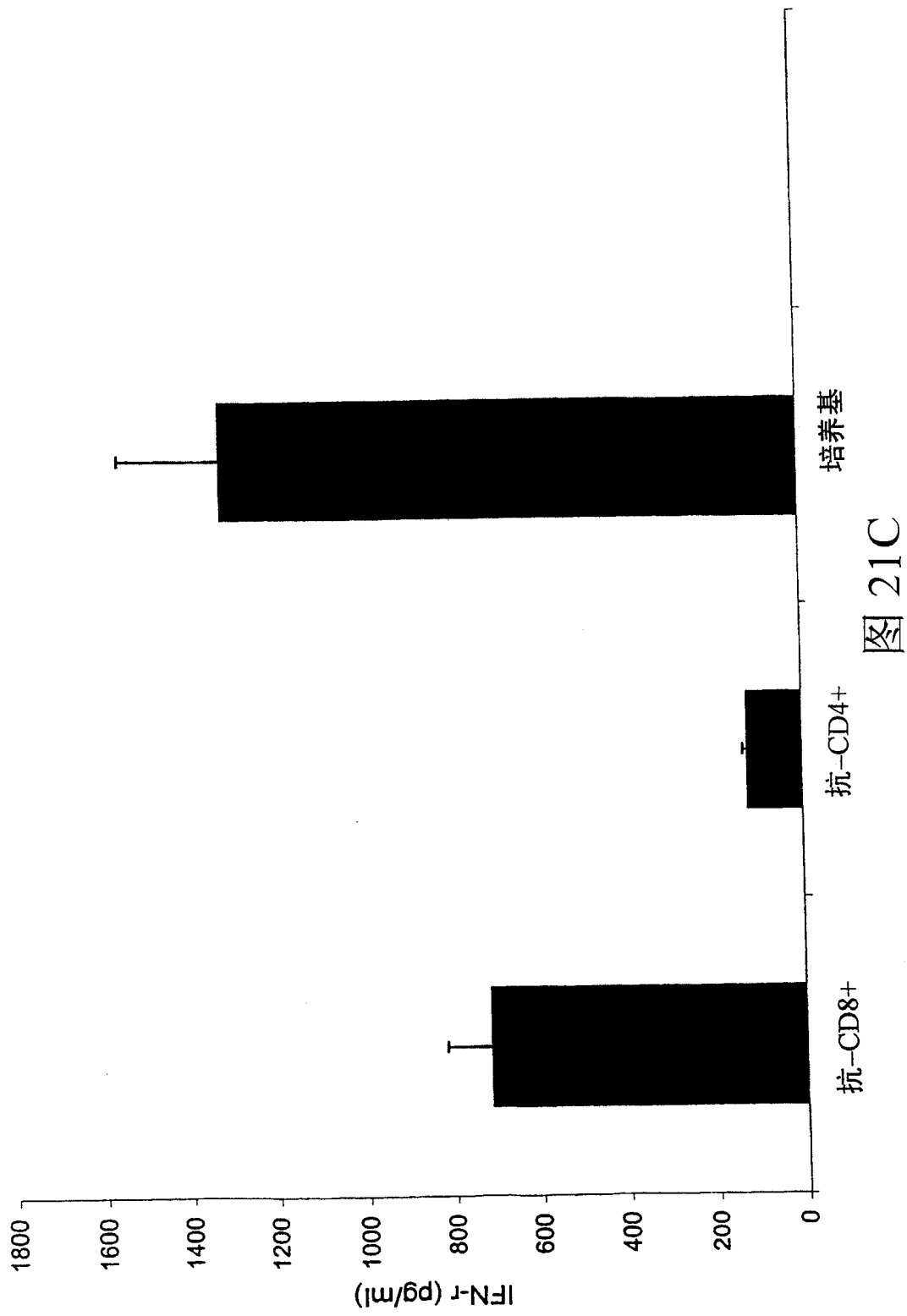


图 21B



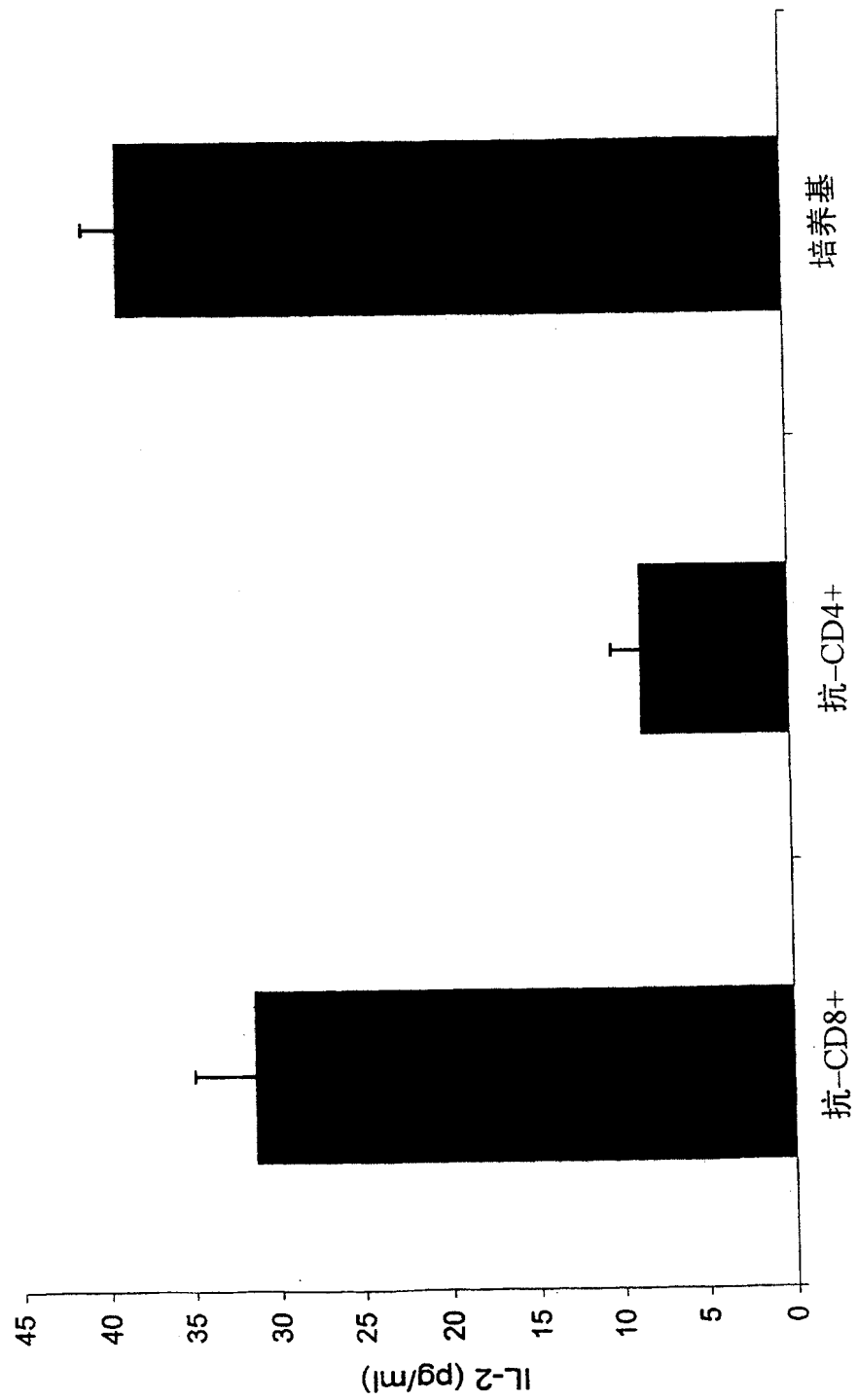


图 21D

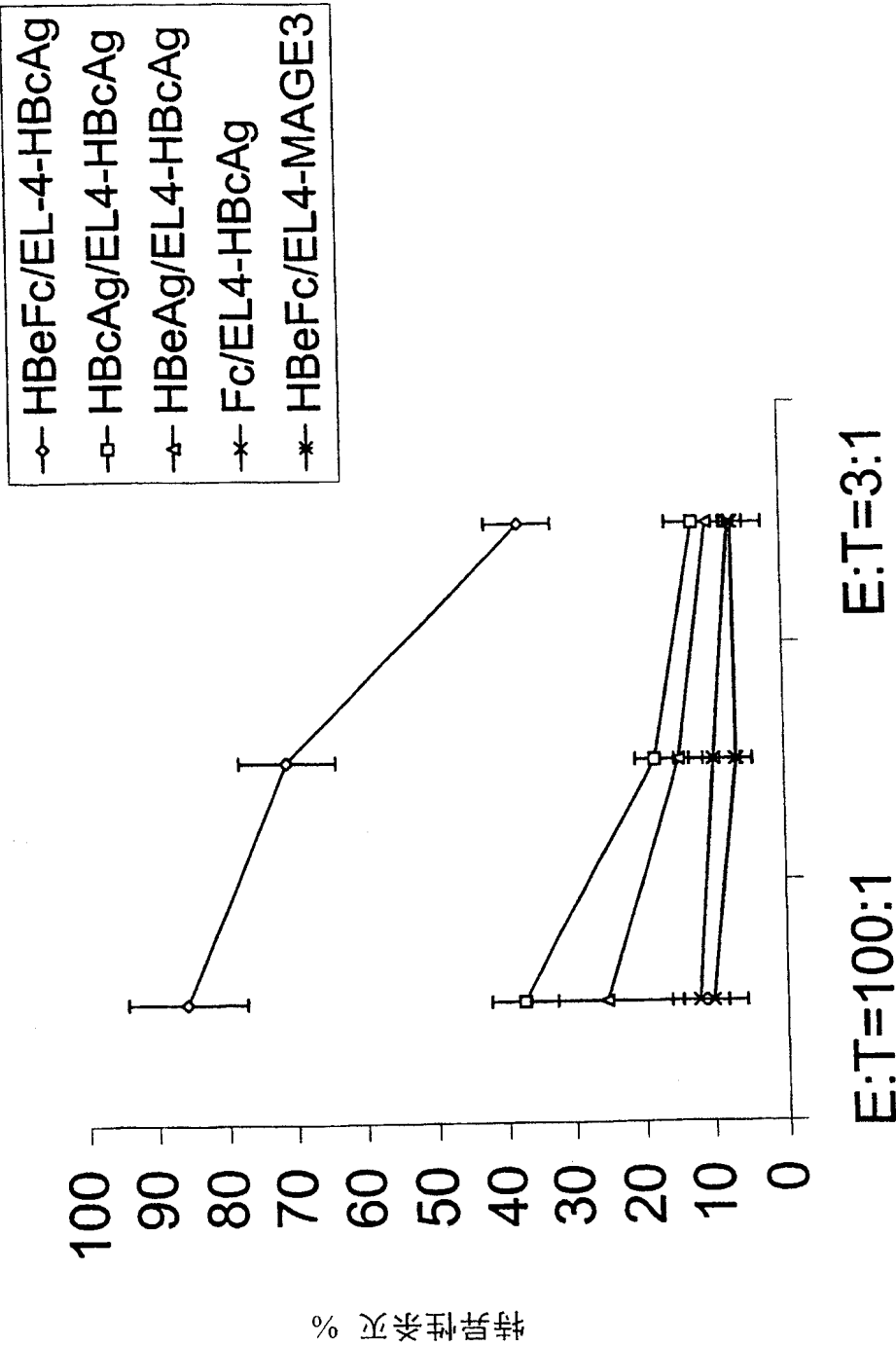


图 22

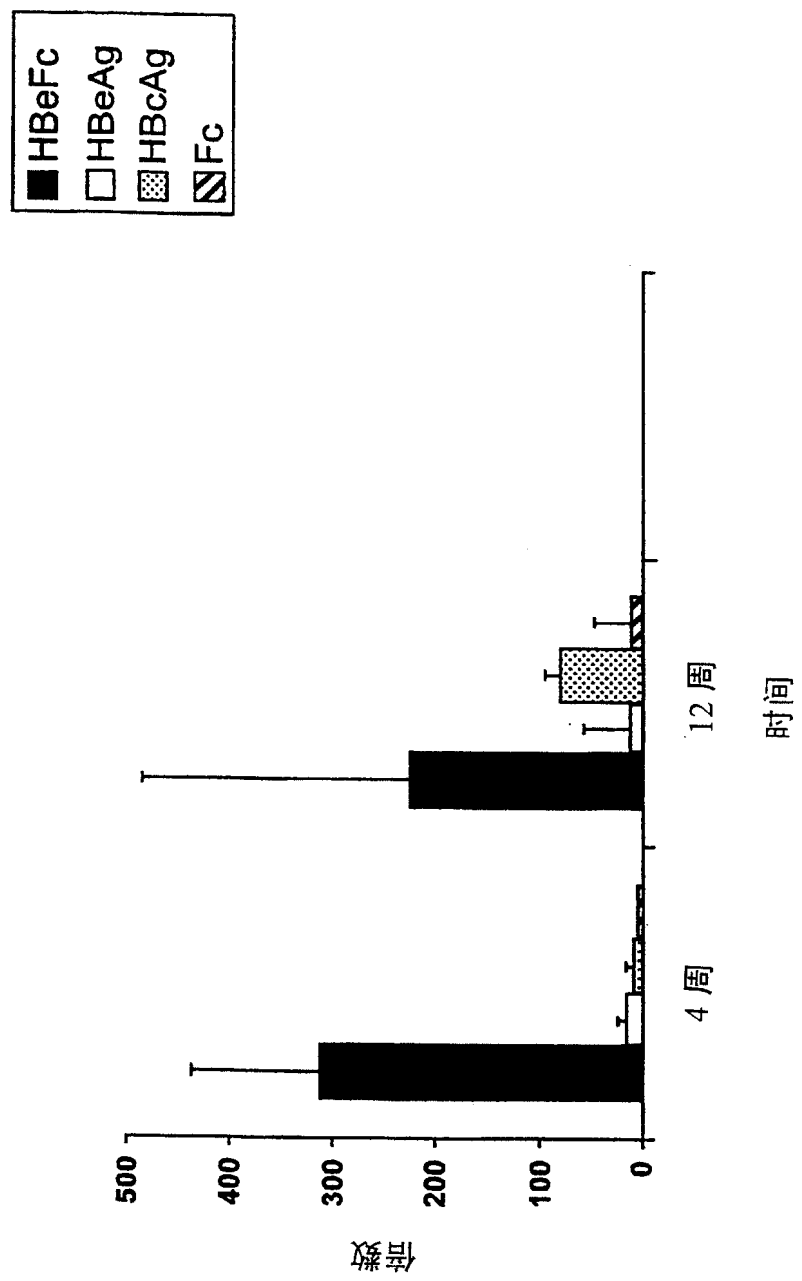


图 23

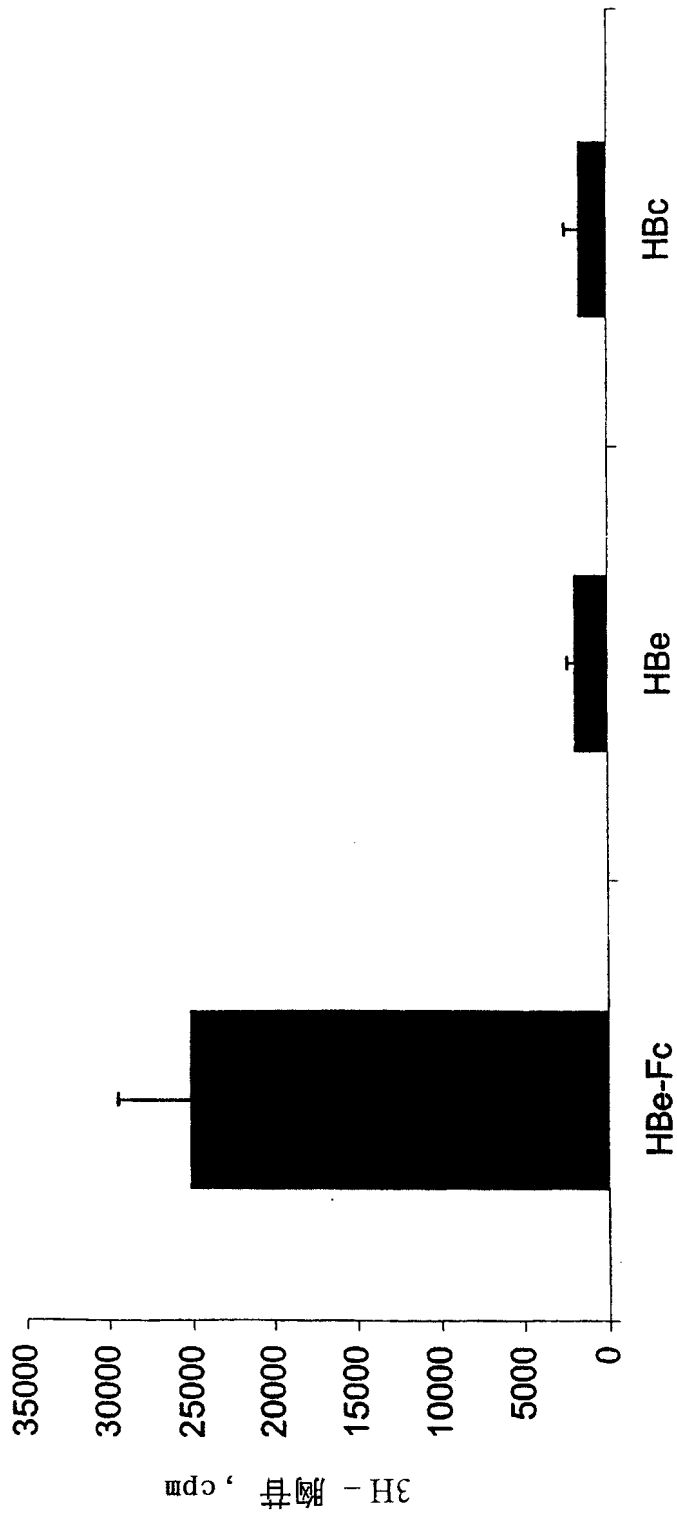


图 24

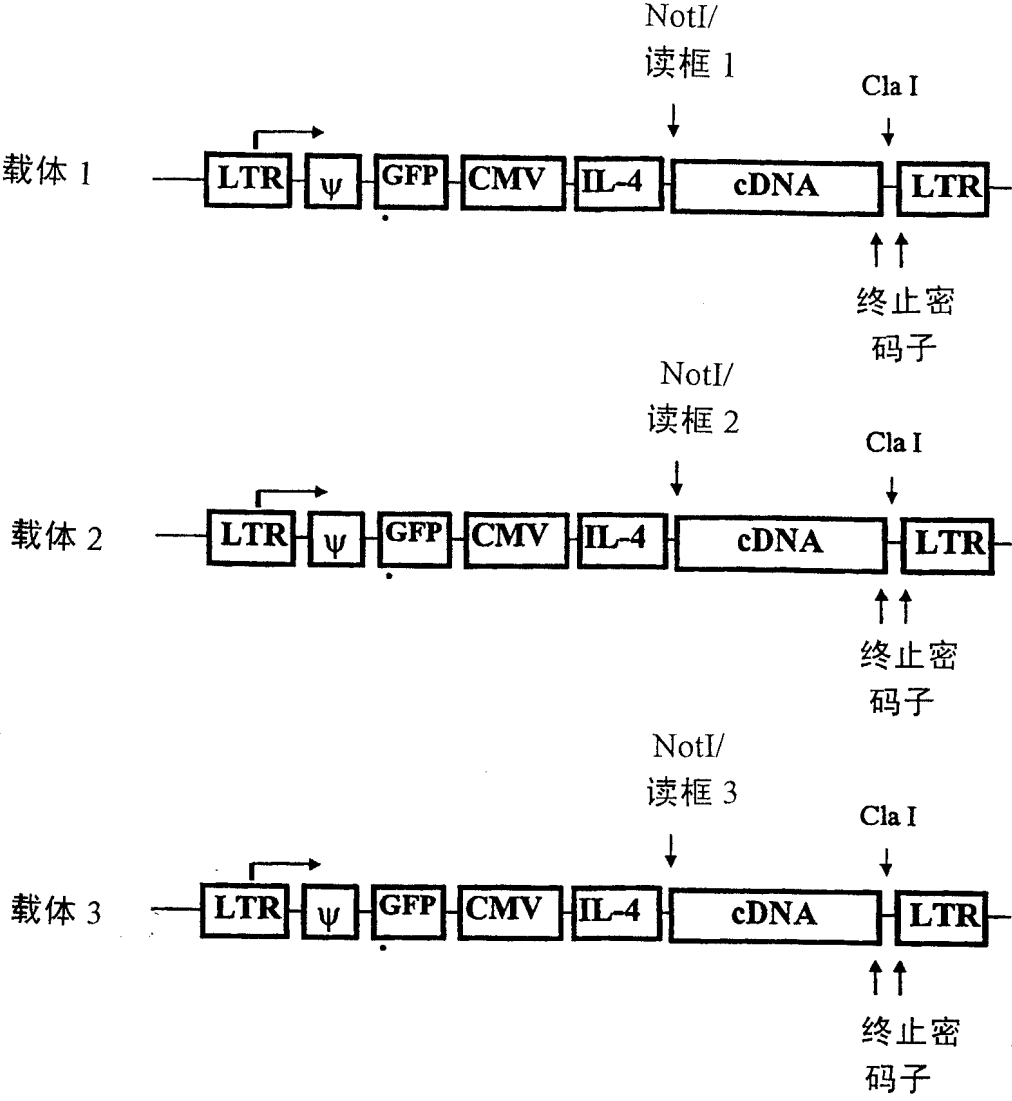


图 25

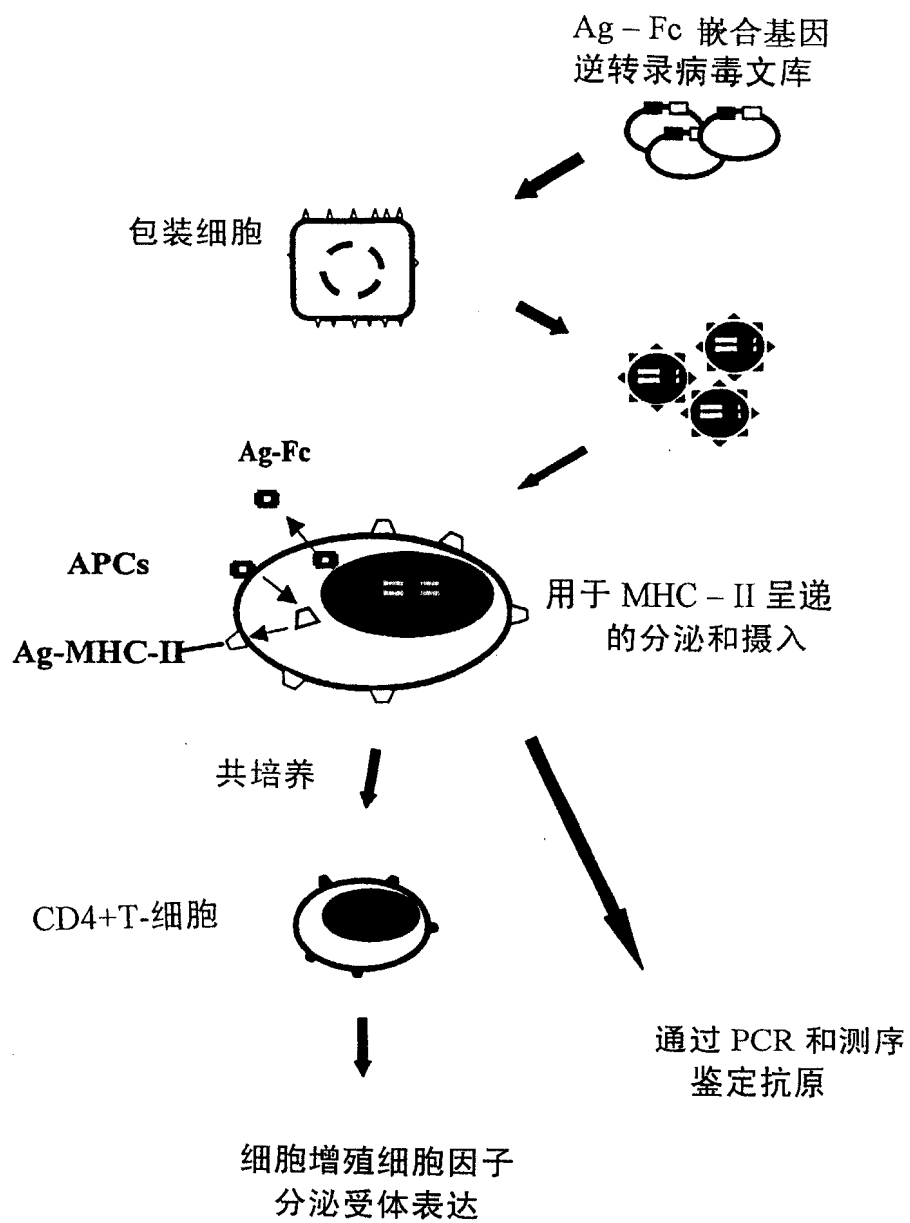


图 26

专利名称(译)	用于鉴定引起免疫反应的抗原的组合物和方法		
公开(公告)号	CN100352921C	公开(公告)日	2007-12-05
申请号	CN00809172.2	申请日	2000-05-05
申请(专利权)人(译)	威克福雷大学		
当前申请(专利权)人(译)	威克福雷大学		
[标]发明人	S Y陈 Z尤		
发明人	S-Y·陈 Z·尤		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/70 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/20 A61K39/00 A61K39/002 A61K39/02 A61K39/12 A61K49/00 C07K14/00 C07H21/04 C12N5/00 C12N15/63 C12N15/85 C12P21/00 C12Q1/00 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/29 A61K47/48 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/005 C07K14/02 C07K14/195 C07K14/54 C07K14/73 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/08 C12N5/10 C12N15/867 C12Q1/70		
CPC分类号	C12N15/1086 C12N2740/15043 C12N2730/10122 C07K14/005 C07K2319/30 C07K2319/74 C12N2740/10043 C12N2740/13051 C12N2820/85 A61K2039/5156 A61K38/00 C12N2740/10051 C12N15/86 C07K2319/02 A61K48/00 A61K47/4833 C12N2840/203 A61K2039/5154 C12Q1/6886 A61K2039/515 C12N2730/10134 C12N2740/15051 C12N2740/13043 A61K39/292 A61K39/0011 A61K2039/53 C12N2840/20 C12Q1/70 A61K39/00 C12Q1/6883 A61K39/12 A61K47/646 A61K2039/55533 A61K2039/57 A61K2039/6056 A61P1/04 A61P3/10 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 A61K39/001106 A61K39/001156 A61K39/001164 A61K39/001186 A61K39/001191 A61K39/001194		
代理人(译)	李瑛		
审查员(译)	丁海		
优先权	60/132752 1999-05-06 US 60/132750 1999-05-06 US		
其他公开文献	CN1368885A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种表达载体，其中所述的表达载体包括均为可操作地连接的多核苷酸启动子序列、编码信号序列的多核苷酸、编码抗原蛋白或肽的多核苷酸、编码细胞结合元件的多核苷酸和多核苷酸聚腺苷酸化序列。更具体地说，本发明涉及引起针对哺乳动物体内抗原的免疫反应的方法，该方法包括下列步骤：将所述表达载体导入细胞；在所述抗原分泌自所述细胞的条件下表达该载体以便产生抗原；使所分泌的抗原胞吞入细胞；加工所述抗原；并将片段呈递给受体以便引起T-细胞反应。此外，本发明涉及一种疫苗及其使用方法。本发明还涉及结合在MHC-II上的表位的鉴定方法。

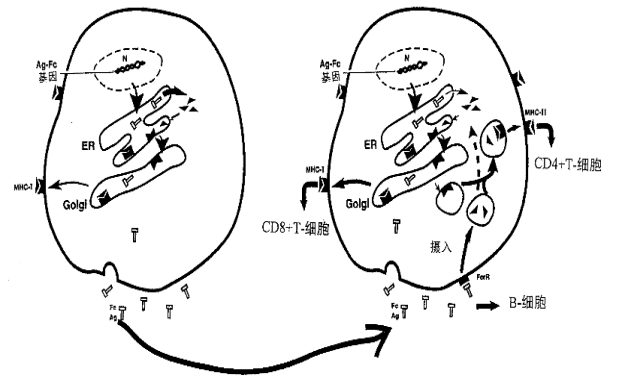


图 1A

图 1B