



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101070540 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 200710103491. 2

G01N 33/577(2006. 01)

(22) 申请日 2001. 04. 27

A61K 38/17(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/39(2006. 01)

60/200, 580 2000. 04. 28 US

A61K 39/395(2006. 01)

60/240, 169 2000. 10. 13 US

A61K 35/15(2015. 01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

01812016. 4 2001. 04. 27

EBI:Q9WUL5. EBI, 1999,

EBI:AF142780. EBI, 2000,

(73) 专利权人 约翰霍普金斯大学

胡渝华等. 人胎肝细胞对 BALB/C 小鼠

地址 美国马里兰州

免疫系统及其功能的影响. 华西医科大学报 31

(72) 发明人 德鲁·M·帕多尔 土屋东夫

1. 2000, 31(1), 全文.

凯文·S·戈尔斯基 苏-伊·特森

审查员 孙彦珂

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

C12N 15/12(2006. 01)

C07K 14/705(2006. 01)

C12N 15/85(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

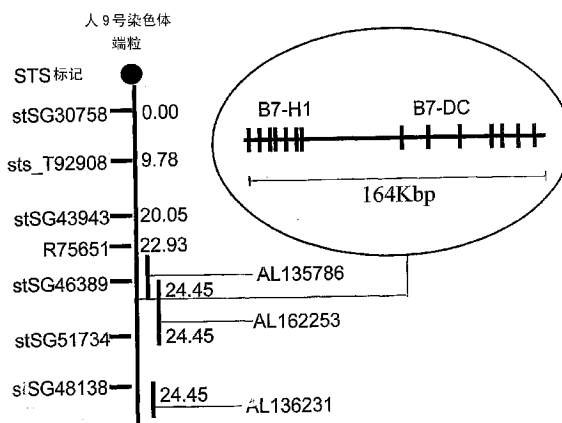
权利要求书1页 说明书58页 附图8页

(54) 发明名称

新的树突状细胞共刺激分子

(57) 摘要

描述了一种新的共刺激蛋白质分子B7-DC, 其为B7家族的一个成员, 编码该分子的DNA和含有这种DNA的表达载体。B7-DC蛋白质、片段、融合多肽/蛋白质和其它功能性衍生物, 及表达B7-DC的转化细胞可用于疫苗组合物和方法。公开了诱导有效的T细胞介导的反应的组合物和方法, 其可用于抗肿瘤和抗病毒免疫。



1. 一种分离的核酸分子,其编码由第一融合配偶体与第二种多肽组成的融合蛋白,其中所述第一融合配偶体由 SEQ ID NO:2 的 N-末端氨基酸组成,且不具有跨膜结构域,其中所述的第二多肽含有 (a) 一个或多个 Ig 重链恒定区的结构域;(b) IgG 重链恒定区的两个 C 结构域;或 (c) 人免疫球蛋白 C_γ1 链的铰链区, C_H2 区和 C_H3 区,和其中所述融合蛋白结合程序性死亡分子-1 (PD-1),其中所述 N-末端氨基酸由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-221 组成。

2. 分离的核酸分子,其编码由第一融合配偶体和第二多肽组成的融合蛋白,其中所述第一融合配偶体由与成熟的权利要求 1 的第一融合配偶体连接的前导序列组成,所述第二多肽含有 (a) 一个或多个 Ig 重链恒定区的结构域;(b) IgG 重链恒定区的两个 C 结构域;或 (c) 人免疫球蛋白 C_γ1 链的铰链区, C_H2 区和 C_H3 区。

3. 权利要求 1 和 2 任一项的核酸分子,其在表达载体中,并可操作地与启动子连接。

4. 权利要求 3 的核酸分子,其可操作地与在真核细胞中调节所述核酸表达的附加调节序列相连接。

5. 权利要求 3 或 4 的核酸分子,其中该表达载体是质粒或病毒载体。

6. 一种宿主细胞,其被权利要求 1-5 任一项的核酸分子转化或转染,其中所述宿主细胞不是胚胎干细胞,或人或动物的生殖细胞。

7. 权利要求 6 的宿主细胞,该细胞是一种哺乳动物细胞。

8. 权利要求 7 的宿主细胞,其中所述细胞选自树突状细胞,其前体细胞和肿瘤细胞组成的组。

9. 权利要求 7 的宿主细胞,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

10. 一种从权利要求 6-9 任一项的宿主细胞的上清液获得的分离的成熟融合蛋白。

11. 权利要求 10 的融合蛋白在制备用于增强哺乳动物受试者对抗原性刺激的 T 细胞应答的试剂中的应用,其中所述试剂有效增加所述受试者对抗原性刺激的 T 细胞应答。

新的树突状细胞共刺激分子

[0001] 本申请是国际申请号为 PCT/US01/13430, 国际申请日为 2001 年 4 月 27 日, 中国申请号为 01812016.4, 发明名称为“新的树突状细胞共刺激分子”专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 发明领域

[0004] 本发明属于生物化学和医学领域, 涉及在树突状细胞表面选择性表达的新蛋白质, 该蛋白质能用来作为细胞表面分子或在疫苗组合物中以可溶的形式来刺激产生免疫反应。

[0005] 背景技术的描述

[0006] T 淋巴细胞免疫反应的产生是一个复杂的过程, 其涉及到细胞与细胞的相互作用和可溶性介质 (细胞因子或淋巴因子) 的产生, 该反应受几种作为“受体”的 T 细胞表面分子, 包含 T 细胞受体 (TCR) 复合体和其它的“辅助”表面分子的调节, 所述“辅助”表面分子很多是由单克隆抗体 (“CD 分子”) 首次定义的细胞表面“分化抗原”。

[0007] 使所有的淋巴细胞达到最佳活化状态需要两种信号: 一种抗原特异性的或克隆的信号和一种抗原非特异性的第二信号 (Janeway, C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54:1-14(1989))。假如没有称为共刺激分子 (如下文描述的 B7) 的共刺激, 当淋巴细胞单独遇到抗原时, 会产生克隆失活, 也称为“无反应性” (Schwartz, R. Science 248:1349(1990)) 或编程性细胞死亡 (程序性细胞死亡); 假如提供了共刺激信号, 就会产生特异于刺激抗原的克隆扩充。没有共刺激, 就不会出现明显的针对给定抗原的免疫反应扩增 (June 等. (Immunology Today 15:321-331, 1994); Chen 等 (Immunology Today 14:483486); Townsend, SE 和 Allison, JP(1993) Science 259:368-370)。

[0008] 免疫反应的性质和潜在在很大程度上依赖于抗原呈递细胞 (APC) 的种类, 该细胞处理并将抗原呈递给 T 细胞。在 T 细胞结合和活化时, 用于结合 TCR 的肽抗原 MHC 配体的密度和由 APC 提供可溶的和 / 或膜结合的共刺激信号是重要的。由于这些原因, 免疫治疗策略已经开始集中于提供 (a) 合适 APC 种类的目标抗原和 (b) 合适的共刺激分子以增强 T 细胞活化。

[0009] 提供活化 T 细胞所需要的信号的 APC 包含单核细胞 / 巨噬细胞、B 淋巴细胞和最重要的树突状细胞 (DC)。在过去, 认为活化的巨噬细胞是在体内引发 T 细胞免疫反应的关键的 APC。这一概念是基于该细胞能有效的吞噬抗原并将抗原在表面展示和呈递。特别是最近, 人们已经将注意力转到 DC, 将其作为体内抗原特异性 T 细胞免疫反应的主要引发物。DC 具有和活化的巨噬细胞不同的表型, 并可将其分成能够引发不同免疫反应的不同亚型。DC 的一个功能特点是它们在体外活化原初 T 细胞的能力大约比巨噬细胞大 100 倍。迄今为止, 对这种潜能的解释是基于已知的对于抗原呈递很重要的分子的数量差异。本发明是基于发现一种重要的数量差异。

[0010] 抗原呈递的第一信号是由 TCR 和抗原的相互反应引发的, 其中的抗原存在于 APC 上的 II 型主要组织相容性复合体 (MHC) 分子的范围中 (Allen, Immunol. Today 8:270(1987))。共刺激信号来源于其它的分子, 最佳表征的是 B7 家族 (即 B7.1, B7.2 和或者

B7.3),它们也存在于 APC 上。

[0011] 在 T 细胞表面表达的两种蛋白质是共刺激分子例如 B7 的最佳表征的配体或反向受体。CD28 是免疫球蛋白 (Ig) 超家族的同源二聚体糖蛋白质 (Aruffo 和 Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 84 :8573-8577 (1987)),其存在于大多数在 T 细胞活化中起作用的成熟 T 细胞上。CD28 在静息 T 细胞上组成型表达,并在活化后增加。信号经由 T 细胞受体后,CD28 的连接反应诱导 T 细胞增殖,并分泌 IL-2(Linsley, PS, 等. (1991) J Exp. Med. 173, 721-730 ;Gimmi, CD, 等. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 6575-6579 ;Thompson, C. B., 等. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 1333-1337 ;June, C. H., 等. (1990) Immunol. Today. 11, 211-6 ;Harding, F. A., 等. (1992) Nature. 356, 607-609.)。CD28 介导细胞-细胞的接触 (“细胞间粘附”),一种免疫反应所必需的非抗原依赖型细胞间相互作用 (Springer 等., Ann. Rev. Immunol. 5 :223-252 (1987))。

[0012] CTLA4 是一种与 CD28 高度同源的 T 细胞表面分子,但是它不在静息 T 细胞上表达,在 T 细胞活化后出现 (Brunet, J. F., 等., (1987) Nature 328, 267-270)。CTLA-4 最初是通过鼠溶细胞的 T 细胞 cDNA 文库的示差筛选来鉴定的, Brunet 等. 见上文。Linsley 等. (1991) J. Exp. Med. 174 :561-569 中讨论了 CTLA-4 作为 B7 的第二受体的作用,并且还公开了 B7 对 CTLA4 比对 CD28 具有更高的亲和性。Freeman 等. (1993) Science 262 :907-909 讨论了 B7 缺陷小鼠中的 CTLA-4。CTLA-4 的配体在 Lenschow 等. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90 : 11054-11058 中有描述。

[0013] 细胞分泌生长并且诱导分化的细胞因子例如 IL-2、IL-4 和 IL-6 可能以聚集的形式存在于 Th-B 细胞接触区,这保证了只活化将抗原呈递给 Th 细胞的 B 细胞,避免活化其它的 B 细胞。

[0014] CD28 和 CTLA-4 与共刺激分子相互作用,共刺激分子一般是 B7。B7 最初被描述为一种 B 细胞活化抗原,命名为 B7/BB-1,因为它是在 B 细胞上发现的 (Linsley 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :5031-5035 (1990)。此后,这种分子被称为 B7, B7-1 或 B7.1)。B7 和特别是最近描述的 B7 同系物也是 Ig 超家族中的一员,与 CD28 和 CTLA-4 相比较, B7 含有两个胞外 Ig 结构域:一个 N 末端可变样 (V) 结构域,接下来是一个恒定区样 (C) 结构域。

[0015] B7 家族成员一般在 APC 上表达,并且如同所提及的,它们对于静息 T 细胞的活化是非常重要的。这些家族成员包含 B7-1 (= B7, 也称 CD80) 和 B7-2 (也称 CD86)。有关 B7-1 的描述的参考文献包含 Schwartz, R. H. Cell 71 :1065-1068, 1992 ;Chen, L. 等. Cell 71 : 1093-1102, 1992 ;Freeman, G. J. 等 J Immunol 143 :2714-2722, 1989 ;和 Freeman, G. J. 等 J Exp. Med. 174 :625-631, 1991)。有关 B7-2 的描述的参考文献包含 (Freeman, G. J. 等 Science 262 :909-911 813-960, 1993)。迄今为止,鼠 B7-1 和 B7-2 及人 B7-1 和 B7-2 已经被描述 (Freeman 等., 1989, 见上文 ;1991, 见上文 ;和 1993, 见上文)。活化的人 B 淋巴细胞表达 CTLA4/CD28 结合反受体 B7-2 和 B7-3,两者都能通过 CD28 或 CTLA4 将共刺激信号传递到 T 细胞。

[0016] 在用抗 Ig 或抗 II 型 MHC 的 mAb 共刺激 24 小时后 B 细胞表达 B7-2。B7-2 诱导可检测的 IL-2 分泌和 T 细胞增殖。活化后大约 48-72 小时, B 细胞表达 B7-1 和用 mAbBB-1 鉴定的第三种 CTLA4 反受体, (Yokochi, T, 等. (1982) J Immunol. 128, 823-827), 命名为 B7-3。B7-3 也可以在 B7- 阴性活化的 B 细胞上表达,并能共刺激 T 细胞的增殖而不产生可检测的

IL-2, 这表明 B7-1 和 B7-3 分子是不同的。B7-3 在广泛的各种细胞上表达, 包含活化的 B 细胞、活化的单核细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞和角质细胞。在 B 细胞活化后 72 小时, B7-1 和 B7-3 的表达开始降低。在活化的 B 淋巴细胞表面存在的这些 CTLA4/CD28 结合反受体表明 T 细胞的共刺激是受调节的, 部分地受 B 细胞被活化后这些分子瞬时表达的调节。

[0017] B7 :CD28/CTLA4 共刺激途径的重要性在体外和体内已经得到证实。T 细胞活性的增加和 B7 表达的增加之间具有直接的联系 (Razi-Wolf 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4210-4214(1992))。当 T 细胞在缺乏结合 CD28 的共刺激配体的细胞上与肽抗原接触时, 会变成无反应性。这种共刺激途径的阻断导致在鼠和人系统中就会产生抗原特异耐性的发展 (Harding 等., 见上文; Lenschow, D. J. 等. (1992) Science. 257, 789-792; Turka, LA 等. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 11102-11105; Gimmi, CD 等. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6586-6590; Boussiotis, V. 等. (1993) J Exp. Med. 178, 1753-1763)。相反的, B7 阴性鼠肿瘤细胞表达 B7 诱导 T 细胞介导的特异性免疫反应, 伴随着肿瘤排斥和对肿瘤攻击的长久保护。(Chen, L, 等. (1992) Cell 71 :1093-1102; Townsend 等., 见上文; Baskar, S, 等. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 5687-5690.)。因此, B7 :CD28/CTLA4 途径的调控可以产生非常大的潜力以刺激或抑制人体中的免疫反应。

[0018] 已通过 B7 或 CD28 的胞外片段与 Ig C γ 1 链的遗传融合鉴定了 CD28 和 B7 间的相互反应 (Linsley 等, J. Exp. Med. 173 :721-730(1991))。当 B7 Ig 融合蛋白质被固定, 或当 B7 在细胞例如转染的 CHO 细胞表面被表达时, 它们共刺激 T 细胞增殖。B7+CHO 细胞对 T 细胞的刺激也特异性的刺激 IL-2 转录水平的提高。

[0019] U. S. 5, 521, 288 描述了一种调节免疫反应的方法, 该方法将由编码 B7 的部分 DNA 编码的片段与 CD28 阳性 T 细胞接触, 其中所述的部分 DNA 编码的片段主要相应于 B7 的细胞外结构域 (ECD)。也可以用 B7 的衍生物来调节免疫反应, 其中的衍生物是融合蛋白质构建体, 其包含至少一部分 B7 ECD 和另外一种蛋白质, 如能改变 B7 的可溶性、结合亲和性和 / 或化合价的人 Ig C γ 1 结构域。例如, 将编码 B7 ECD 1-125 位氨基酸残基的 DNA 和编码相应于人 Ig C γ 1 的铰合部、CH2 和 CH3 区序列的氨基酸残基的 DNA 连接, 形成一个编码 B7 Ig 融合蛋白质的 DNA 融合产物。该文还公开了一种通过给药 B7 或 B7Ig 融合蛋白质以通过结合 CD28 受体与 T 细胞反应来治疗 T 细胞介导的免疫系统疾病的方法。通过 CD28+T 细胞与 B7 抗原或 B7 Ig 融合蛋白质反应, 结合一种免疫抑制剂抑制了在移植物抗宿主疾病中的 T 细胞增殖。

[0020] 美国专利 5, 861, 310 公开了修饰的肿瘤细胞, 该细胞能表达一种或多种 T 细胞共刺激分子, 包含 B7-2 和 B7-3。一个具体实施方案还包含表达 B7。所述修饰可以用编码 B7-2、B7-3 或 B7 蛋白质的核酸转染。肿瘤细胞也可以在体内被遗传修饰。这类修饰的肿瘤细胞据称对治疗肿瘤患者是有用的, 以预防或抑制转移性扩散或抑制肿瘤的复发。该文公开了一种抗肿瘤的特异性诱导的 CD4+T 细胞反应的方法。

[0021] 美国专利 5, 942, 607 公开了分离的核酸, 其编码新的共刺激 T 细胞活化的 CTLA4/CD28 配体。在一个具体实施方案中, 该分离的核酸编码 B7-2。该文还公开了一种含有至少一部分公开的全长 B7-2 序列的核酸。根据该文, 该核酸序列能被整合到不同表达载体中, 其中的载体在多种宿主细胞包含哺乳动物和昆虫细胞中能指导相应的蛋白质或肽的合成。该文还公开了转化的宿主细胞, 该细胞生产由这些核酸序列编码的蛋白质或肽和含有至少

一部分 B7-2 序列的分离的蛋白质和肽。

[0022] Dong H 等, Nat Med 1999 5 :1365-1399 描述了 B7 家族的第三个成员,被命名为 B7-H1,它不与 CD28、CTLA4 或 ICOS(可诱导的共刺激物)结合。B7-H1 的连接反应共刺激 T 细胞对多克隆刺激物和同种抗原作出反应,优选刺激白细胞介素 -10 的产生。以少量产生的 IL-2 对 B7-H1 共刺激效果是必需的。这个研究鉴定出了一种先前未知的共刺激分子,该分子可能与细胞介导的免疫反应的负调节相关。同一实验室 (Wang S 等, Blood. 2000 ;96 : 2808-2813) 描述了一种新的人 B7 样基因,命名为 B7-H2,它的表达在单核细胞来源的未成熟 DC 表面被检测到。可溶的 B7-H2 和 Ig 的融合蛋白质, B7-H2Ig 能和激活的 T 细胞但不是静息 T 细胞结合。上述结合被可溶形式的 ICOS (ICOSIg) 抑制,而不被 CTLA4Ig 抑制。ICOSIg 可将 B7-H2 基因转染的 CHO 细胞染色。用亚最佳交联的 CD3 作为刺激物,发现 B7-H2Ig 对 T 细胞增殖的共刺激是剂量依赖的,且和 IL-2 的分泌相关,而最佳的 CD3 连接反应优选刺激 IL-10 的产生。作者认为 B7-H2 是 ICOS T 细胞分子可能的配体。

[0023] Swallow MM 等, Immunity, 1999, 11 :423-432 报道了一个新基因 b7h 的克隆,它是在 APC 上表达的 B7 分子相近的同系物。B7h 通过作用于不同于 CD28 或 CTLA-4 的受体共刺激纯化的 T 细胞的增殖。令人惊讶的是,尽管 B7h 在未刺激的 B 细胞中表达,但是在用 TNF α 处理的非淋巴样细胞 (3T3 细胞 ;胚成纤维细胞) 中,该表达也能得以诱导,该表达在用 LPS,一种有效的 TNF α 活化剂处理的鼠非淋巴样组织中被上调。这些研究定义了一种新的 T 细胞共刺激配体,表明了利用 TNF α 对 B7h 的诱导可以直接增加炎症过程中的自我识别。

[0024] Yoshinaga SK 等., Nature, 1999, 402 :827-832 描述了一个新的鼠共刺激受体-配体对。其中的受体与 CD28 相关,是人蛋白质 ICOS 的鼠同系物,并在活化的 T 细胞和静息记忆 T 细胞上表达。其中的配体,其和 B7 分子同源,被命名为 B7 相关蛋白质 -1 (B7RP-1)。B7RP-1 是 1 型跨膜蛋白质,与鼠 B7. 1 (CD80) 和 B7. 2 (CD86) 分别具有 20% 和 19% 的氨基酸同一性。由于 B7. 1 和 B7. 2 仅仅具有 27% 的氨基酸同一性,该同系物是有效的 (Freeman, GJ 等., J. Exp. Med. 178 :2185-2192 (1993))。该同系物在保守位点 (从开始的甲硫氨酸起,残基 62, 138, 185 和 242) 含有对于 Ig 环的形成很重要的半胱氨酸。B7RP-1 的全长和跨膜区域的相关位置与 B7 分子相似 (Greenfield, EA 等., Crit. Rev. Immunol. 18 :389-418 (1998))。B7RP-1 是在 B 细胞和巨噬细胞上表达。ICOS 和 B7RP-1 不与 CD28-B7 途径中的蛋白质相互作用,且 B7RP-1 独立于 CD28 共刺激 T 细胞。表达 B7RP-1 和 Ig 的 Fc 片段的融合蛋白质 (" B7-RP1-Fc ") 的转基因鼠在脾、淋巴结和淋巴集结中发生淋巴增殖。当抗原攻击时,用 B7RP-1-Fc 处理的抗原预敏化鼠中延迟型超敏反应增强证实了在体内 B7RP-1 的共刺激活性。作者认为 ICOS 和 B7RP-1 是一种独特的新的受体-配体对,其结构与 CD28-B7 相关,参与适应性免疫反应。

[0025] Yoshinaga SK 等., Int Immunol, 2000, 10 月 12 :1439-1447 报道了通过人 B7RP-1 和 ICOS 相互作用进行的人 T 细胞共刺激。这种配体-受体对相互作用的 KD 值大约为 33nM, $t_{(1/2)} > 10\text{min}$ 的解离速率 (off-rate)。TNF α 有差别地调节 B 细胞、单核细胞和 DC 上的人 B7RP-1 的表达。TNF α 增强 B 细胞和单核细胞上 B7RP-1 的表达,但抑制 DC 上 B7RP-1 的表达。一种人 B7RP-1-Fc 蛋白质或表达膜结合的 B7RP-1 的细胞在体外共刺激 T 细胞的增殖。特异的细胞因子,如 IFN γ 和 IL-10 由 B7RP-1 共刺激所诱导。虽然 IL-2 的水平没有显著

增加,但 B7RP-1 诱导的共刺激依赖于 IL-2。这些研究鉴定了鼠 B7RP-1 的人定向进化同源基因 (human ortholog),并表征了其与人 ICOS 的相互作用。

[0026] PD-1 是由活化的 T、B 和骨髓细胞表达的免疫抑制受体。PD-1 缺陷的鼠由于其外周耐受性的丧失而表现出多种形式的自身免疫。Freeman, GJ 等., J. Exp. Med. 192 : 1027-1034 (2000) 报道了 PD-1 的配体 (PD-L1),该配体是 B7 基因家族的一个成员。PD-1 与 PD-L1 结合导致了抑制 TCR 介导的淋巴细胞的活化 (增殖、细胞因子的分泌)。另外,PD-1 信号抑制亚最佳水平的 CD28 介导的共刺激。PD-L1 由 APCs 表达 (用 TNF γ 刺激的人单核细胞,活化的人 DC)。另外,PD-L1 还在心脏和肺中表达。作者推断在 APC 上抑制的 PD-L1 信号和共刺激的 B7-1/B7-2 信号的相对大小可以决定 T 细胞活化的程度和耐受性与自身免疫性间的阈值。在非淋巴样组织中 PD-L1 的存在可以对炎症位点免疫反应的大小起作用。

[0027] 上文引用的文献并不意味着上述的任何文献都是与本文相关的现有技术。这些文献的所有关于日期的陈述和关于内容的描述是基于本申请可用的信息,但不肯定关于这些文献的日期或内容的正确性。

[0028] 发明概述

[0029] 为了鉴定用于 T 细胞活化的新的树突状细胞 (DC) 特异性共刺激分子的编码基因,本发明人筛选了 DC 和活化的巨噬细胞之间的扣除 cDNA 文库。这种 cDNA 扣除方法能确定由 DC 表达但不由活化的巨噬细胞表达的基因。利用这种方法已经发现了几种新的 DC 特异性基因,这些基因在增强依赖于 T 细胞活化的疫苗的潜能方面是有用的。本申请涉及一种这样的基因。

[0030] 基于存在于 DC 文库中而不存在于活化的巨噬细胞文库的事实,鉴定了一个新的编码序列,命名为“B7-DC”。B7-DC 基因是编码共刺激分子的 B7 家族基因的一个成员。B7-DC 是第一个具有 DC 特异性表达和不同受体特异性的 B7 家族成员。该基因的产物在介导 DC 刺激 T 细胞的独特能力上具有重要作用。功能性分析表明在刺激 T 细胞产生的 IFN γ 方面,B7-DC 比 B7-1 具有更高的活性。因此,B7-DC DNA 和多肽被用于提高细胞和分子疫苗组合物效能的组成和方法中,而不考虑抗原特异性。

[0031] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸分子,该核酸分子编码一种命名为 B7-DC 的哺乳动物蛋白质,该蛋白质在树突状细胞上选择性表达而不在活化的巨噬细胞上表达。该核酸分子优选包含一个选自 SEQ ID NO :1 (人源的) 或 SEQ ID NO :5 (鼠源的) 的核苷酸序列。本发明还涉及一种在严格的杂交条件下与上述核酸分子杂交的分离核酸。优选的严格条件包含 :于 45°C 在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中保温,接着在约 50°C 温度下用约 0.2X SSC 冲洗。优选地,上述核酸分子含有核苷酸序列 SEQ ID NO :1。如上所述优选的核酸分子编码一种具有选自 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的蛋白质或编码该蛋白质的生物活性片段、同系物或其它功能性衍生物。优选地,该核酸分子编码具有序列 SEQ ID NO :2 (人源的 B7-DC) 的蛋白质或编码 SEQ ID NO :2. 的生物活性片段、同系物或其它功能性衍生物。

[0032] 在一个优选的实施方案中,该核酸分子编码 B7-DC 蛋白质的细胞外结构域,该细胞外结构域包含残基 26-221,其编码它的一个共刺激同系物、片段或其它功能性衍生物。

[0033] 在另一个实施方案中,编码 B7-DC 融合蛋白质的上述核酸分子包含 :

[0034] (a) 编码第一多肽的第一核酸序列,该第一多肽是完整的 B7-DC 蛋白质或其中的

一部分（优选为 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4）；

[0035] (b) 任选地，在读框内将第一核酸序列融合以编码一个接头肽的接头核酸序列；和

[0036] (c) 在读框内与第一核酸序列连接或与接头核酸序列连接的第二核酸序列，该第二核酸序列编码第二多肽。

[0037] 第二多肽优选含有一个或多个 Ig 重链恒定区结构域，优选人 IgG 的两个的 C 结构域，优选 IgG1。

[0038] 本发明还提供了一种表达载体，其含有任一上述核酸分子，其中的核酸分子可操作地与 (a) 一个启动子和 (b) 任选地，在真核细胞中调节该核酸表达的附加调控序列相连接。

[0039] 上述表达载体可以是质粒或病毒载体。这些载体含有自我复制的 RNA 复制子 (DNA- 起动的或 RNA)、自杀型 RNA 载体、DNA 病毒（如腺病毒、痘苗病毒等）和在包装细胞系中生长的 RNA 病毒颗粒。

[0040] 该载体 DNA 或 RNA 可以与金颗粒络合，以用基因枪介导将其导入到宿主中，也可以与另一种聚合物络合，例如，在控制的释放制剂中，该聚合物增强向理想的靶细胞和组织的递送。

[0041] 本发明还包含一种载体组合物，其包含：

[0042] (a) 第一重组表达载体，在该载体的序列中整合了一个编码目的抗原的核苷酸序列，其中的目的抗原诱导产生免疫反应；和

[0043] (b) 第二重组表达载体，在该载体的核酸序列中整合了一个或多个编码共刺激多肽的核苷酸序列，其中至少有一个多肽是 B7-DC，或其生物活性片段、同系物或其它的功能性衍生物。

[0044] 其中表达载体能共感染或共转染一种宿主细胞，产生抗原和共刺激多肽，多肽片段、同系物或衍生物的共表达。

[0045] 在上述实施方案的一个改进中，本发明提供了编码目的蛋白质的第三个核酸序列，其 (i) 促进表达产物（抗原）在细胞间，优选在 APC 间的扩散，(ii) 提高抗原在表达核酸的 APC 上的展示，和 / 或 (iii) 促进导入了载体的宿主 APC 中的抗原的再呈递（交叉引发 (cross-priming)）和展示。编码目的蛋白质的核酸可以与编码抗原或共刺激分子或以上两者的核酸相融合。第一或第二载体 (acid the first or the second vector) 包含核酸。在一个实施方案中，该载体组合物将编码抗原的核酸、编码共刺激分子的核酸（优选为 B7-DC）和编码“目的蛋白质”的核酸结合于一个单一融合的构建体中。

[0046] 本发明包含用上述的任何核酸分子或表达载体转化或转染的细胞。该细胞优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞，最优选人细胞，该细胞可以是树突状细胞或其前体 (progenitors) 细胞。在另一个实施方案中，该细胞是肿瘤细胞，更优选该肿瘤细胞携带一个抗原，该抗原与宿主肿瘤中的一种抗原一致或与其发生交叉反应，从而引起免疫反应。

[0047] 一个优选的实施方案是用编码哺乳动物 B7-DC 蛋白质（优选 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4）的外源核酸分子或其生物活性片段、同系物或其它功能性衍生物转染分离的哺乳动物肿瘤细胞，当上述肿瘤细胞表达所述的蛋白质、其片段、同系物或衍生物并且该肿瘤细胞与 T 细胞接触时

- [0048] (i) B7-DC 蛋白质、其片段、同系物或衍生物与 T 细胞结合 ; 和
- [0049] (ii) 肿瘤细胞共刺激 T 细胞使其增殖和 / 或产生和分泌细胞因子。
- [0050] 本发明也涉及到在树突状细胞上选择性表达而不在活化的巨噬细胞上表达的多肽, 该多肽具有以下性质 :
- [0051] (a) 与 T 细胞上的结合配偶体结合 ; 和
- [0052] (b) 共刺激 T 细胞使其增殖和 / 或产生和分泌细胞因子。
- [0053] 本发明也包含该多肽的生物活性片段、同系物或其它功能性衍生物。
- [0054] 该多肽、片段、同系物或功能性衍生物优选由具有序列 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :5 的核酸分子, 或该核酸分子的片段、同系物或等价物编码。优选的多肽具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4。
- [0055] 该多肽或其生物活性片段、同系物或其它功能性衍生物可以由上述核酸之一的重组表达产生。
- [0056] 优选的多肽含有 B7-DC 蛋白质的细胞外结构域, 优选为
- [0057] (a) SEQ ID NO :2 (人) 的氨基酸残基 26-221, 或
- [0058] (b) SEQ ID NO :4 (鼠) 的氨基酸残基 26-221。
- [0059] 上述多肽可以主要由 B7-CD 的细胞外结构域组成。
- [0060] 本发明还提供了一个含有第一融合配偶体的 B7-DC 融合多肽, 该融合配偶体包含全部或部分的 B7-DC 蛋白质, 该蛋白质
- [0061] (ii) 直接与第二多肽融合, 或
- [0062] (ii) 任选地, 与第二多肽相融合的头序列融合。
- [0063] 上述的 B7-DC 融合蛋白质也可以与第二多肽, 优选一个或多个 Ig 重链恒定区结构域, 优选具有相应于人免疫球蛋白 C_γ1 链的铰链区、C_H2 和 C_H3 区的氨基酸序列相融合。
- [0064] 在上述融合蛋白质的一个实施方案中, 第一融合配偶体是 B7-DC 蛋白质的细胞外结构域, SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4 的全长序列。
- [0065] 该融合蛋白质优选结合 T 细胞上的结合配偶体, 并在存在 T 细胞受体的适宜刺激时共刺激 T 细胞。
- [0066] 本发明还提供了一种二聚或三聚融合蛋白质, 其是上述融合蛋白质的二聚体或三聚体。优选地, 各链通过二硫键或其它的链间共价键互相连接。
- [0067] 在优选的二聚融合蛋白质中, 二聚体由两个 Ig 重链的 C_H区中的半胱氨酸残基的共价键连接而成, 其中的半胱氨酸残基与二聚的正常 IgH 链中用二硫键连接的半胱氨酸残基相同。
- [0068] 本发明的融合蛋白质可以包含两个或多个重复的第一融合配偶体的多聚体, 其中的第一融合配偶体彼此首尾相连, 或和一个或多个单体间的接头序列相连。
- [0069] 本发明还提供了一种对 B7-DC 蛋白质的一个表位具有特异性的抗体, 其中的表位不存在于 B7 家族蛋白质的已知成员之中。该表位可以是 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4 多肽的线状或构象表位。抗体优选为单克隆抗体, 更优选人或人源化 (通过基因工程) 的单克隆抗体。
- [0070] 本发明还提供了一种利用上述抗体来鉴定或定量细胞群中在其表面表达 B7-DC 多肽的细胞的方法, 该方法包含

[0071] (a) 将细胞群中的细胞与上述抗体接触,以使抗体与表达表位的细胞结合;

[0072] (b) 检测抗体结合的细胞的存在或定量检测抗体结合细胞的数量。

[0073] 本发明还提供了另一种从细胞群中分离在其表面表达 B7-DC 多肽的细胞的方法,该方法包含:

[0074] (a) 将细胞群与上述抗体接触,以使抗体与表达表位的细胞结合;

[0075] (b) 正筛选与抗体结合的细胞或者负筛选没有与抗体结合的细胞。

[0076] 本发明还提供了一种在样品中检测 B7-DC 多肽、其片段或同系物的存在或定量 B7-DC 多肽、其片段或同系物的方法,该方法包含如下步骤:

[0077] (a) 将样品与权利要求 43 中的抗体接触,以使抗体与含有表位的任何多肽或片段结合;

[0078] (b) 检测与抗体结合的多肽或片段的存在或者定量检测与抗体结合的多肽或片段。

[0079] 本发明还涉及一种诱导或增强抗原呈递细胞或其前体细胞中的 B7-DC 多肽的表达,以增强在对 T 细胞受体存在适宜刺激的情况下该细胞在体外或体内共刺激 T 细胞的能力的方法,该方法包含用如上所述的表达载体转化或转染抗原呈递细胞或前体细胞,从而在细胞上诱导或增强 B7-DC 多肽的表达。该抗原呈递细胞优选为树突状细胞,前体是树突状细胞前体。

[0080] 本发明提供了用细胞共刺激组合物和多肽共刺激物来刺激免疫反应的方法。一种为了增强哺乳动物受试者对抗原刺激的 T 细胞应答的方法包含向受试者施用有效量的上述细胞,优选肿瘤细胞,和抗原刺激物,其中的细胞能有效地增强受试者对抗原刺激的 T 细胞应答。上述方法优选同时注射抗原和共刺激组合物。

[0081] 一种利用肿瘤相关抗原来增强哺乳动物受试者对抗原刺激的 T 细胞应答的方法包含向受试者施用有效量的上述肿瘤细胞,其中的肿瘤细胞表达所述抗原,施用的肿瘤细胞对于增强受试者对肿瘤抗原刺激的 T 细胞应答是有效的。

[0082] 一种增强哺乳动物受试者对抗原刺激的 T 细胞应答的方法,其包含向受试者施用有效量的如上述的多肽、片段、同系物或功能性衍生物,或上述的融合多肽或蛋白质,和抗原刺激物,其中施用的多肽对于增强受试者对抗原刺激的 T 细胞应答是有效的。

[0083] 本发明还提供了一种抑制哺乳动物受试者对抗原刺激的 T 细胞应答的方法,其包含向受试者施用有效量的上述抗体,其中施用的抗体对于阻断 T 细胞的刺激或消灭抗原反应性 T 细胞是有效的,从而抑制了 T 细胞应答。这些方法可以特别用于治疗组织或器官移植的受试者以抑制移植排斥和 / 或促进移植,对于自身抗原,该方法可以阻断或降低自身免疫反应和它们的病理后遗症。

[0084] 本发明提供了利用已被本发明的组合物体内刺激的 T 细胞进行治疗的方法。一种增强哺乳动物受试者对抗原刺激的免疫反应的方法包含:

[0085] (a) 从受试者中、从所述受试者的免疫学相容性供体中或从免疫学可接受的培养细胞系中获得 T 细胞;

[0086] (b) 将来自体内的 T 细胞与有效量的上述细胞接触,其中该接触对于提高 T 细胞对抗原刺激的应答是有效的;和

[0087] (c) 向受试者施用步骤 (b) 的 T 细胞,

[0088] 从而增强了受试者的免疫反应。

[0089] 在另一个实施方案中,增强哺乳动物受试者对抗原刺激的免疫反应的方法包含:

[0090] (a) 从受试者中、从所述受试者的免疫学相容性供体中或从免疫学可接受的培养细胞系中获得 T 细胞;

[0091] (b) 将来自体内的 T 细胞与有效量的 (i) 上述多肽、片段、同系物或功能性衍生物,或 (ii) 上述融合多肽接触,其中该接触对于提高 T 细胞对抗原刺激的应答是有效的;和

[0092] (c) 向受试者施用步骤 (b) 的 T 细胞,

[0093] 从而增强(或产生)了受试者的免疫反应。

[0094] 本发明还提供了一种疫苗组合物,包含

[0095] (a) (i) 如上文所描述的表达 B7-DC 构建体的细胞, (ii) B7-DC 多肽、片段、同系物或功能性衍生物, (iii) B7-DC 融合多肽或蛋白质

[0096] (b) 通常,另一种来源的抗原,针对该抗原的免疫反应是期望的 - 虽然在基于细胞的疫苗中不需要该抗原,其中的细胞能自身能表达该抗原(如同含有肿瘤抗原的肿瘤细胞);

[0097] (c) 任选地,一种常规的免疫刺激物或辅剂;和

[0098] (d) 用于 (a)、(b) 和 (c) 的一种药学上和免疫学上可接受的赋形剂或载体。

[0099] 一种诱导或增强哺乳动物受试者对抗原的免疫反应的方法,该方法包含向受试者施用有效量的上述疫苗组合物。

[0100] 本发明还提供了一种与抗原或疫苗一起使用的共刺激组合物,该组合物包含:

[0101] (a) B7-DC 多肽(优选 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4)、其片段、同系物或功能性衍生物或 B7-DC 融合多肽,和

[0102] (b) 一种药学上和免疫学上可接受的赋形剂或载体。

[0103] 一种加强哺乳动物受试者对抗原或疫苗的免疫反应的方法,该方法包含向受试者联合施用上述共刺激组合物和抗原或疫苗。

[0104] 一种刺激受试者对肿瘤的系统免疫反应的方法,该方法包含向受试者施用经遗传改变的肿瘤细胞,该细胞

[0105] (a) 来源于受试者中的肿瘤,和

[0106] (b) 通过导入如上所述的体内的 B7-DC 核酸进行遗传改变,所述核酸在受试者中表达提供一种共刺激信号,

[0107] 其中,施用后产生直接针对肿瘤的系统免疫反应的刺激。

[0108] 该肿瘤细胞优选是被处理,优选通过照射处理,以防止其在被施用后生长。

[0109] 在施用上述治疗组合物之前,对受试者可以进行化学疗法的肿瘤消退处理、照射或外科切除术。

[0110] 本发明还提供了一种在含有抗原阳性(antigen-positive)肿瘤的哺乳动物中诱导抗肿瘤反应的方法,该方法包含:

[0111] (a) 提供肿瘤或肿瘤细胞系的细胞,该细胞

[0112] (i) 表达与哺乳动物肿瘤共有的抗原;

[0113] (ii) 用上述编码 B7-DC 的核酸载体转染,当表达时,B7-DC 分子引起细胞共刺激对肿瘤抗原的 T 细胞应答;

- [0114] (ii) 任选地,在 (b) 步骤之前进行照射;
- [0115] (b) 向哺乳动物施用有效量的细胞,该细胞表达抗原和 B7-DC 分子;
- [0116] 从而诱导抗肿瘤应答。
- [0117] 在上述方法中,该抗肿瘤反应特征在于:
- [0118] (A) 所有可测量的损害的最大垂直直径产物的总数至少减少 50%;
- [0119] (B) 没有产生新损害的迹象,和
- [0120] (C) 任何原有的损害都没有恶化。
- [0121] 本发明还提供了一种在具有肿瘤的哺乳动物中诱导肿瘤的初级生长或再生消退或衰减的方法,该方法包含:
- [0122] (a) 提供肿瘤或肿瘤细胞系的细胞,该细胞
- [0123] (i) 表达与哺乳动物肿瘤共有的抗原;
- [0124] (ii) 用上述编码 B7-DC 的核酸载体转染,当表达时,B7-DC 分子使细胞共刺激 T 细胞对肿瘤抗原产生反应;
- [0125] (iii) 任选地,在 (b) 步骤之前进行照射;
- [0126] (b) 向哺乳动物施用有效量的细胞,该细胞表达抗原和 B7-DC 分子;从而诱导对黑色素瘤肿瘤抗原特异的系统免疫反应,从而诱导消退或衰减。
- [0127] 一种抑制哺乳动物中抗原阳性肿瘤复发生长的方法,该方法包含:
- [0128] (a) 提供肿瘤或肿瘤细胞系的细胞,该细胞
- [0129] (i) 表达与哺乳动物肿瘤共有的抗原;
- [0130] (ii) 用上述编码 B7-DC 的核酸载体转染,当表达时,使细胞共刺激 T 细胞对肿瘤抗原产生反应;
- [0131] (iii) 任选地,在 (b) 步骤之前进行照射;
- [0132] (b) 向哺乳动物施用有效量的细胞,该细胞表达抗原和 B7-DC 分子;
- [0133] 从而在哺乳动物中诱导对肿瘤抗原特异的系统免疫反应,该免疫反应抑制肿瘤细胞的复发生长。
- [0134] 另一个实施方案涉及一种在哺乳动物受试者中定位施用 (locally-administered) 抗原的附近提供一种共刺激信号,以促进炎症反应和免疫反应的定位发生,从而产生对抗原的系统免疫的方法,该方法包含向受试者定点施用
- [0135] (a) 上述表达共刺激有效量的 B7-DC 多肽、片段、同系物或功能性衍生物的细胞,和
- [0136] (b) 抗原
- [0137] 使得用抗原共刺激身体的相邻部位促使反应的定点产生,产生系统免疫。
- [0138] 在以上方法中,抗原优选为肿瘤抗原,在 (b) 中该抗原以肿瘤细胞或亚细胞抗原物质的形式被施用。该肿瘤细胞也可以是 (a) 中的表达 B7-DC 多肽、片段、同系物或衍生物的细胞。
- [0139] 附图简述
- [0140] 图 1 是显示定位于人染色体 9p24 上的 hB7-DC 图谱。BAC 克隆 RPCI-11.2 的 hB7-DC 图谱。
- [0141] 图 2 显示 B7-DC 在 DC 和巨噬细胞间被差异性表达。通过在 1% 的琼脂糖凝胶上电

泳纯化的 $0.5 \mu\text{g}$ /道 DNA 进行有效的 Northern 印迹分析,检测骨髓 DC、脾 DC、巨噬细胞、巨噬细胞系和组织中 B7-DC mRNA 的分布。G3PDH 用作对照。J774A1、Raw264.7、Pu5-1.8 和 WEHI 细胞是巨噬细胞系。BM:骨髓。

[0142] 图 3 显示 B7-DC 在人 DC 上表达的有效 Northern 印迹分析。道 1 显示用 GM-CSF+F1t-3L 培养的人 DC,道 2 显示人胎盘和道 3 显示用 GM-CSF+IL4 培养的人 DC。来自人 B7-DC 的 5' 和 3' UTR 的寡核苷酸用作 PCR DNA 探针以对人 DC 总 RNA 进行有效的 Northern 印迹分析。 β -肌动蛋白用作对照以确定 mRNA 的质量。

[0143] 图 4 表示显示 B7-DC 在成熟 BM-DC 上的表面表达的流式细胞分析。生长 9 天的鼠 BM-DCs 被 Fc 封闭,并用对照抗体或 B7-DC 抗血清染色。通过加入 B7-DC-Ig 以竞争抗 B7-DC 对 DC 表面的结合来证实结合的特异性。

[0144] 图 5 显示 B7-DC 与 PD-1 结合,但不与 CTLA-4 或 CD28 结合。用 pCAGGS-B7.1o pCAGGS-B7-DC 瞬时转染 293T 细胞。用 PD-1-Ig、28-Ig 和 CTLA-4-Ig 融合分子染色转染子,接着用 PE 标记的第二抗体染色。PCAGGS(空载体)转染子的染色是阴性的(未显示)。

[0145] 图 6(左图和右图)显示用抗 CD3 和 B7-DC-Ig 对 T 细胞增殖的共刺激。左图:在孔中培养纯化的 T 细胞(CD4+CD8),该孔预先用增加浓度的抗 CD3(mAb2C11)和固定浓度($0.1 \mu\text{g/ml}$)的固定的 B7.1-Ig(◆)、B7-DC-Ig(●)或同型对照(▲)包被。结果描述了三者中的一个典型试验。培养细胞 72h,并用 ^3H -胸苷 CPM 标记,每分钟计数。右图:在孔中培养纯化的 CD8T 细胞,该孔预先用增加浓度的抗 CD3 和固定浓度($0.1 \mu\text{g/ml}$)的固定的 B7.1-Ig(◆)、B7-DC-Ig(●)或同型对照(▲)包被。结果为二者中的一个典型试验。培养细胞 72h,并用 ^3H -胸苷 CPM 标记,每分钟计数。

[0146] 图 7 显示了抗原特异性 T 细胞增殖反应的共刺激。用 $\text{IFN } \gamma$ 处理 RENCA 细胞 72 小时,以诱导 II 型 MHC 的表达,将该细胞与 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 的 HA110-120 多肽一起培养。将纯化的 HA+I-E_d 特异转基因 T 细胞加到可溶形式的增加浓度的 B7.1-Ig(◆)、B7-DC-Ig(●)或同型对照(▲)中。培养细胞 48h,并用 ^3H -胸苷 CPM 标记,每分钟计数。结果为三者中的一个典型试验。

[0147] 图 8 显示用 B7-DC 共刺激的 T 细胞的细胞因子的分泌。

[0148] 上部:在孔中培养纯化的 T 细胞,该孔如同图 6(左边)预先用抗 CD3($0.12 \mu\text{g/ml}$)和 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 的固定的 B7.1-Ig(◆)、B7-DC-Ig(●)或同型对照(▲)包被。结果为三者中的一个典型试验。

[0149] 下部:用纯化的 HA+I-E_d 特异转基因 T 细胞和 $2 \mu\text{g/ml}$ 可溶的 B7.1-Ig、B7-DC-Ig 或同型对照(标记同上)培养带有 $12.5 \mu\text{g/ml}$ HA(110-120)多肽的 γ -IFN 处理过的 RENCA 细胞。结果为两者中的一个典型试验。培养 24h 和 48h 后收集上清液,并用 ELISA 检测指示的淋巴因子。

[0150] 图 9 显示在体内共刺激后,B7-DC-Ig 大大增强了抗原特异性增殖。在适当的转移 2.5×10^6 个 HA 特异的 TCR 转基因细胞后,在小鼠后爪垫中单独使用 HA 多肽(110-120)、不完全弗氏佐剂(IFA)或结合使用 IFA 和 B7-DC-Ig+IFA 或一种同型对照抗体免疫三组小鼠。在第 7 天收集排出的淋巴结。将 1.5×10^5 LN 细胞与 HA 肽培养 48h,用 $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] 胸苷脉冲,并在 12h 后检测结合的放射性。

[0151] 优选实施方案的描述

[0152] 本发明已经鉴定出了新的蛋白质和核酸,该蛋白质和核酸可以作为改进免疫治疗组合物和方法的基础。被命名为 B7-DC 的人和鼠形式的新的共刺激蛋白质已被发现并公开于此。

[0153] 编码人 B7-DC 的 DNA 具有核苷酸序列 SEQ ID NO :1,显示如下:

[0154] 1 atgatcttctcctgctaagtgtgagcctggaattgcagcttcaccagatagcagcttta
 [0155] 61 ttcacagtgcagtcacctaaaggaactgtacataatagagcatggcagcaatgtgaccctg
 [0156] 121 gaatgcaactttgacactggaagtcattgtgaaccttggagcaataacagccagtttgcaa
 [0157] 181 aaggtggaataatgatacatccccacaccgtgaaagagccactttgctggaggagcagctg
 [0158] 241 cccctaggaaggcctcgttccacatacctcaagtccaagtgaggacgaaggacagtac
 [0159] 301 caatgcataatcatctatggggctgcctgggactacaagtacctgactctgaaagtcaaa
 [0160] 361 gcttctacaggaaaataaacactcacatcctaaaggttccagaaacagatgaggtagag
 [0161] 421 ctcacctgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggccaaacgtcagcgtt
 [0162] 481 cctgccaacaccagccactccaggaccctgaaggcctctaccaggtcaccagtggtctg
 [0163] 541 cgcctaaagccacccctggcagaaacttcagctgtgtgttctggaatactcacgtgagg
 [0164] 601 gaacttactttggccagcattgaccttcaaagtcagatggaaccagaccatccaact
 [0165] 661 tggtgcttcacatcttcatccccctcctgcatcattgctttcattttcatagccacagtg
 [0166] 721 atagccctaagaaaacaactctgtcaaaagctgtattcttcaaaaagacacaacaaaaaga
 [0167] 781 cctgtcaccacaacaaagaggggaagtgaacagtgctatc 819

[0168] 人 B7-DC 蛋白质具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2,显示如下(带有前导序列、跨膜结构域和胞质尾区的注释):

[0169]

	<u>推导的前导序列</u>	
1	<u>MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVFVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV</u>	50
51	<u>NLGATTASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY</u>	100
101	<u>QCIIYYGVAW DYKYLTLKVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL</u>	150
151	<u>AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR</u>	200
	<u>推导的 TM 结构域</u>	
201	<u>ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPSC IIAFIFIATV IALRKQLCQKL</u>	250
251	<u>LYSSKDTTKR PVTTTKREVN SAI</u>	273
	胞质尾	

[0170] 该蛋白质的胞外结构域是从残基 P²⁶到残基 W²²¹。

[0171] 包含编码鼠 B7-DC 的编码序列的 DNA 克隆具有核苷酸序列 SEQ ID NO :3,显示如下。该编码序列(划有下划线,以三联体的形式表示)开始于核苷酸 210 处的甲硫氨酸密码子 atg(粗体),中止于 tag 终止密码子(粗体)(核苷酸 951-953)。

[0172] gaattcggcacgaggtcaaatgtggcatatctttgtgtctccttctgtctcccaactag 60
 [0173] agagaacacacttacggctcctgtcccgggcaggtttggtgtcgggtgattggcttcc 120
 [0174] agggaacctgatacaaggagcaactgtgtgctgccttttctgtgtctttgcttgaggagc 180
 [0175] tgtgctgggtgctgatattgacacagacc 209
 [0176] atg ctg ctc ctg ctg ccg ata ctg aac ctg agc tta caa ctt cat cct 257
 [0177] gta gca gct tta ttc acc gtg aca gcc cct aaa gaa gtg tac acc gta 305
 [0178] gac gtc ggc agc agt gtg agc ctg gag tgc gat ttt gac cgc aga gaa 353
 [0179] tgc act gaa ctg gaa ggg ata aga gcc agt ttg cag aag gta gaa aat 401

[0180]	<u>gat acg tct ctg caa agt gaa aga gcc acc ctg ctg gag gag cag ctg</u>	449
[0181]	<u>ccc ctg gga aag gct ttg ttc cac atc cct agt gtc caa gtg aga gat</u>	497
[0182]	<u>tcc ggg cag tac cgt tgc ctg gtc atc tgc ggg gcc gcc tgg gac tac</u>	545
[0183]	<u>aag tac ctg acg gtg aaa gtc aaa gct tct tac atg agg ata gac act</u>	593
[0184]	<u>agg atc ctg gag gtt cca ggt aca ggg gag gtg cag ctt acc tgc cag</u>	641
[0185]	<u>gct aga ggt tat ccc cta gca gaa gtg tcc tgg caa aat gtc agt gtt</u>	689
[0186]	<u>cct gcc aac acc agc cac atc agg acc ccc gaa ggc ctc tac cag gtc</u>	737
[0187]	<u>acc agt gtt ctg cgc ctc aag cct cag cct agc aga aac ttc agc tgc</u>	785
[0188]	<u>atg ttc tgg aat gct cac atg aag gag ctg act tca gcc atc att gac</u>	833
[0189]	<u>cct ctg agt cgg atg gaa ccc aaa gtc ccc aga acg tgg cca ctt cat</u>	881
[0190]	<u>gtt ttc atc ccg gcc tgc acc atc gct ttg atc ttc ctg gcc ata gtg</u>	929
[0191]	<u>ata atc cag aga aag agg atc tag</u>	953
[0192]	gggaagctgtattacggaagaagtggctcttcttccagatctggacctgcggtcttgg	1013
[0193]	gagttggaaggatctgatgggaaacctcaagagacttctggactcaagtgagaatctt	1073
[0194]	gcaggacctgccatttgcacttttgaacctttggacggtgacctcagggtccgaagagg	1133
[0195]	agcttgtaagactgacaatcttccctctgtctcaagactctctgaacagcaagacccaa	1193
[0196]	tggcactttagacttaccctgggatcttgaccccagtgaggcctaaggctcctaagt	1253
[0197]	actttcagggtgagaacaaaaggaattgctctccgccccacccccacctctgctttccg	1313
[0198]	caggagacatggaaattcccagttactaaaatagattgtcaatagagttatttatagcc	1373
[0199]	ctcatttctccggggacttggaaacttcagacagggtttttcataaacaagtcataac	1433
[0200]	tgatgtgttttacagcatcctagaatcctggcagcctctgaagttctaattaactggaag	1493
[0201]	catttaagcaacacgtcaagtgccctctgtgtggtatgttttctacttttctgttttta	1553
[0202]	aagtgtgagtcacaaggtaattgttgtaacctgtgatatactgtttcttgtgtctcttc	1613
[0203]	tttcaactacatcttttaaaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1655

[0204] SEQ ID NO :5 是 SEQ ID NO :3 的编码序列部分。

[0205] 由 SEQ ID NO :3, (例如由 SEQ ID NO :5) 的编码区编码的鼠 B7-DC 蛋白质具有氨基酸序列 SEQ ID NO :4, 显示如下 (带有前导序列、跨膜结构域和胞质尾区的注释) :

[0206]

	<u>推导的前导序列</u>	
1	MLLLLPILNL SLQLHPVAAL FTVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECFDRRECT	50
51	ELEGIRASLQ KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGOY	100
101	RCLVICGAAW DYKYLTVKVK ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL	150
151	AEVSWQNVSV PANTSHIRTP EGLYQVTSVL RLKPQPSRNF SCMFWNAHMK	200
	<u>推导的 TM 结构域</u>	
201	ELTSALIDPL SRMEPKVPRT WPLHVFIPAC TIALIFLAIV IIQKRI	247
	胞质尾	

[0207] 该蛋白质的胞外结构域是从残基 P²⁶到残基 W²²¹。

[0208] 完整的鼠 B7-DC 的 DNA 序列 (最初命名为“嗜乳脂蛋白质样蛋白质”或“Btdc”) 具有基因库登记号 AF142780. 2。

[0209] 基本的分子方法

[0210] 该方法在实施例中将作更详细的描述。本发明人利用 PCR 选择法 (PCR Select), 该方法具有两个重要的特征。第一, 在杂交步骤之前的初始 PCR 反应只需要少量的 RNA。该

技术允许使用高度纯化的成熟 DC, 其中的 DC 已经基本上除去了污染的巨噬细胞、前体细胞或其它潜在的污染细胞。已知这样高度纯化的 DC 是很难大量获得的。第二, PCR 选择程序能克隆低拷贝数、差异表达的基因。

[0211] 为了鉴定由相应于其细胞对应物, 活化的巨噬细胞的 DC 差异表达的基因和鉴定与 DC 特异功能相关的基因, 本发明人应用了 cDNA 扣除法 (cDNA subtraction approach)。他们使用了改良的基于 PCR 的、结合抑制 PCR (PCR Select™) 的“典型差异显示分析 (RDA)” (Diatchenko, L. 等., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93 :66025-6030 (1996))。

[0212] 常规的重组 DNA 方法

[0213] 基础的版本公开了分子生物学的常规方法, 所有的这些通过参考结合于此, 包括: Sambrook, J 等., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 纽约, 1989; Ausubel, FM 等. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Wiley-Interscience, 纽约, (当前版); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); Glover, DM, ed, DNA Cloning: A Practical Approach, 卷. I & II, IRL Press, 1985; Albers, B. 等., Molecular Biology of the Cell, 第二版, Garland Publishing, Inc., 纽约, NY (1989); Watson, JD 等., Recombinant DNA, 第二版, Scientific American Books, 纽约, 1992; 和 Old, RW 等, Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, 第二版, 加利福尼亚大学出版社 (University of California Press), 伯克利, 加利福尼亚 (1981)。

[0214] 除非另有说明, 一个具体的核酸序列倾向于包含其保守取代的变体 (例如简并密码子的取代) 和互补序列。术语“核酸”和“多核苷酸”是同义的, 倾向于包含一个基因、cDNA 分子、mRNA 分子以及它们的片段例如寡核苷酸, 更进一步的还包含其等价物 (下文将作更充分的解释)。核酸的大小用千碱基 (kb) 或碱基对 (bp) 来表示。这根据琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和被使用者确定或公开的核酸序列来测定。蛋白质的大小用千道尔顿 (kDa) 的分子量或长度 (氨基酸残基数) 来表示。蛋白质的大小根据 PAGE、测序、基于编码的核酸序列推导出的氨基酸序列或公知的氨基酸序列来测定。

[0215] 具体地, 编码与 B7-DC 或其片段或衍生物相应的氨基酸序列的 cDNA 分子可以使用来源于此处公开的蛋白质序列的引物通过聚合酶链反应 (PCR) 来合成 (参见例如 U. S. 4, 683, 202)。然后这些 cDNA 序列被转入真核或原核表达载体, 获得的载体在合适的宿主细胞, 例如 COS 或 CHO 细胞中能用于指导 B7-DC 或其片段或衍生物的合成。

[0216] 本发明包含分离的核酸, 该核酸具有编码新的 B7-DC、其片段或其等价物的核苷酸序列。此处使用的术语核酸倾向于包含这类片段或等价物。本发明的核酸序列可以是 DNA 或 RNA。优选的核酸是编码具有序列 SEQ ID NO: 1 的人 B7-DC 或其等价物的 cDNA。

[0217] 优选地, 本发明的核酸是编码至少一部分 B7-DC 的 cDNA 分子。该 cDNA 可以由 mRNA 制备, 其中的 mRNA 是从天然表达这种蛋白质的成熟 DC 或其它的细胞中提取的。编码 B7-DC 的核酸序列可以从 DC 的基因组 DNA 中获得。因此, 编码 B7-DC 的 DNA 可以根据公知的技术从 cDNA 或基因组文库中克隆。

[0218] 编码 B7-DC 的 cDNA 核苷酸序列可以通过从合适的细胞系中分离总 mRNA 而得到。从总 mRNA 制备双链 cDNA。可以利用任何一种公知的技术将该 cDNA 插入到合适的质粒、噬菌体或病毒载体中。

[0219] 关于核苷酸序列,术语“等价物”倾向于包含结构类似物和 / 或功能等价蛋白质的编码序列。例如, B7-DC 核苷酸序列的天然多态性(特别是密码子的第三个碱基)可以作为不改变氨基酸序列的“沉默”突变的证明。但是,涉及到 B7-DC 中的氨基酸序列改变的多态性可以存在于人(或其它哺乳动物)群中,本领域的那些普通技术人员能够理解,由于存在天然等位基因变异体,因此很可能在人群中会发现有一个或多个核苷酸发生改变(最多占整个编码序列的 3-4%)的这些等位基因变异体。在编码 B7-DC 的 DNA 中所有的这种等位基因变异体和产生的核酸和多肽的多态性都包含在本发明的范围内。

[0220] 更进一步地,还可以是此处描述的 B7-DC 蛋白质的一个或多个天然存在的异构体或相关的、免疫学上可发生交叉反应的家族成员。这类异构体或家族成员被定义为具有与 B7-DC 功能相似的氨基酸序列的蛋白质,即使它们由不同基因座的基因编码。

[0221] 核酸片段

[0222] 核酸序列片段定义为具有比编码全长 B7-DC 蛋白质的核苷酸序列较少的核苷酸的核苷酸序列。本发明包括这类编码多肽的核酸片段,该多肽保留了(1) B7-DC 结合 T 细胞上其天然配体的能力和(2) 增强或抑制(依赖于它们被如何呈递)活化的 T 细胞介导的免疫反应(用收到初级活化信号的 T 细胞的细胞因子产物和 / 或 T 细胞增殖来测量)。

[0223] 例如,此处的核酸片段编码 B7-DC 多肽,该多肽保留有结合 T 细胞表面受体,并传递共刺激信号到 T 淋巴细胞的能力,其中的受体没有被鉴定(但明显不是 CD28 或 CTLA-4)。根据另一个标准,本发明的核酸片段是和来自于另一种动物物种的核酸杂交的核酸片段,因此它被用来筛选测定以检测与 B7-DC 发生交叉反应的新蛋白质。

[0224] 通常,编码 B7-DC 多肽片段的核酸序列含有来自成熟蛋白质的编码序列的核苷酸。但是,在一些例子中,也可以含有核酸的全部或部分前导序列。本发明的核酸序列也可以含有接头序列、天然的或修饰的限制性内切酶位点和对关于克隆、表达和编码的蛋白质或片段的纯化操作有用的其它序列。这些和其它修饰的核酸序列在此处做了描述或是本领域公知的。

[0225] 在一个实施方案中,利用 PCR,将编码相应于 B7-DC 的 ECD 的氨基酸序列的 DNA 与编码相应于人 Ig C γ 1 铰链区、C μ 2 和 C μ 3 区的氨基酸序列的 DNA 连接,从而形成表达 B7-DC-Ig 融合蛋白质的构建体,其中 B7-DC 的 ECD 含有大约位点 26-221 的氨基酸。

[0226] 一种编码 B7-Ig 融合蛋白质的类似 DNA 分子公开于 U. S. 5, 521, 288 中,并保藏于 Rockville, Md 的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),保藏号为 68627。

[0227] 重排和表达编码 B7-DC 和可溶 B7-DC 融合蛋白质的 DNA 的技术如寡核苷酸的合成、PCR、转化细胞、构建载体、表达系统等在本领域是非常成熟的,本领域的普通技术人员对于具体条件和步骤的标准来源的材料是熟悉的。

[0228] 在另一个实施方案中,将编码 B7-DC 的一个结构域或片段的 DNA 与编码另一种 B7 家族蛋白质,例如 B7. 1、B7. 2 或 B7. 3 大部分或全部剩余部分的核酸融合。完整的人 B7. 1(CD80) 的 DNA 序列具有基因库(Genbank) 登记号 X60958;鼠序列的登记号是 X60958;兔序列的登记号是 U05593。人 B7. 2(CD86) 的完整的 cDNA 序列具有基因库登记号 L25259;鼠序列的登记号是 L25606。

[0229] 表达载体和宿主细胞

[0230] 本发明包括含有编码 B7-DC 多肽的核酸序列的表达载体,其中的核酸序列与至少一种调节序列可操作连接。“可操作连接”指的是编码序列以允许编码序列的表达的方式与调节序列连接。公知的调节序列被选择用来在合适的宿主细胞中指导目的蛋白质的表达。因此,术语“调节序列”包含启动子、增强子和其它的表达调控元件。这类调控序列在如 Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology, 卷. 185, 学术出版社 (Academic Press), 圣地亚哥, 加利福尼亚. (1990) 中作了描述。

[0231] 本领域的普通技术人员能够理解,本发明表达载体的具体构建需要考虑例如用于转染的宿主细胞和 / 或表达的蛋白质的种类。

[0232] 本发明的表达载体含有编码各种实施方案中 B7-DC : 全长蛋白质和其功能性衍生物 (此处所定义的), 包含多肽片段、变异体、融合蛋白质等的全长核酸分子。因此,, 在一个实施方案中, 该表达载体包含单独的或融合了另一种蛋白质, 编码至少一部分 B7-DC 蛋白质例如 ECD 的核酸。

[0233] 这类表达载体被用来转染宿主细胞以表达 DNA 和生产包含融合蛋白质或肽的编码蛋白质。可以理解表达 B7-DC 多肽的经遗传修饰的细胞可以在足以使所述细胞用于既定目的的一段时间内瞬时表达外源 DNA。因此, 如果细胞作为在体内和体外均具有增大的共刺激能力的免疫原, 那么表达所需要的或细胞存活的时间长度是细胞发挥其免疫原性和 / 或共刺激功能所必需的时间。例如, 对于本发明的表达 B7-DC 的转导的肿瘤细胞, B7-DC 的表达可以仅仅是 6 小时, 优选 24h, 更优选至少 2-4 天。当然, 表达也可以是稳定的 (例如, 对于活细胞)。下文所讨论的合适的表达载体和调控元件 (如, (如可诱导的或组成型启动子) 可根据表达所需要的稳定性来挑选。

[0234] 本发明提供了生产 B7-DC 蛋白质、片段和衍生物的方法。例如, 用编码至少一部分 B7-DC 蛋白质的核酸载体转染宿主细胞, 在合适的条件下培养该宿主细胞使其表达 B7-DC 多肽。

[0235] 宿主细胞也可以用一个或多个表达载体转染, 该表达载体可以单独或结合地包含编码至少一部分 B7-DC 蛋白质的 DNA 和编码至少一部分第二种蛋白质的 DNA, 从而使宿主细胞产生两部分都含有的融合多肽。

[0236] 当重组载体含有编码一部分 B7-DC 的 DNA 和编码另一种蛋白质例如人 IgC γ 1 的 DNA 时, 产生的融合蛋白质可能具有改变的溶解性、结合亲和力和 / 或化合价。例如, B7-DC Ig 融合蛋白质优选由培养物中被转染的宿主细胞所分泌, 并因此可从培养基中分离出来。备选地, 如果蛋白质保留在细胞质中, 则收获并裂解细胞, 从裂解物中分离蛋白质。

[0237] 培养物典型地包括宿主细胞, 适当的生长培养基和其它副产物。合适的培养基在本领域中是众所周知的。利用常规的纯化蛋白质和肽的技术可从培养基或细胞裂解物中分离 B7-DC 蛋白质, 所述技术包括硫酸铵沉淀, 分馏柱层析 (如离子交换, 凝胶过滤, 亲和层析等) 和 / 或电泳 (通常参见“Enzyme Purification and Related Techniques”, Methods in Enzymology, 22 : 233-577 (1971))。一旦纯化, 部分的或均一的, 本发明的重组 B7-DC 蛋白质就能用于在此处将作更详细的描述的药物组合物。

[0238] 被转化或转染以表达 B7-DC 或其同系物或功能性衍生物的真核或原核宿主细胞都在本发明的范围之内。例如, B7-DC 可以在细菌细胞例如大肠杆菌 (E. coli), 昆虫细胞 (杆状病毒), 酵母或哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或人细胞中表达。其它合

适的宿主细胞可以在 Goeddel, (1990) (见上文) 中找到或是本领域普通技术人员公知的。

[0239] 在真核细胞中表达可以导致部分或完全的糖基化和 / 或形成重组蛋白质的相应的链内或链间二硫键。

[0240] 在啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中进行表达的载体的实例包含 pYepSec1 (Baldari 等., (1987) *EMBO J* 6 :229-234), pMFa (Kurjan 等., (1982) *Cell* 30 :933-943), pJRY88 (Schultz 等., (1987) *Gene* 54 :113-123), 和 pYES2 (Invitrogen Corporation, 圣地亚哥, 加利福尼亚)。用于在培养的昆虫细胞 (SF 9 细胞) 中表达蛋白质的杆状病毒载体包含 pAc 系列 (Smith 等., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3 :2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow, V. A., 和 Summers, M. D., (1989) *Virology* 170 :31-39)。通常, 将 COS 细胞 (Gluzman, Y., (1981) *Cell* 23 :175-182) 与这类载体例如 pCDM 8 (Aruffo A. 和 Seed, B., 见上文) 相结合以在哺乳动物细胞中瞬时扩增 / 表达, 而 CHO (dhfr⁻ 阴性 CHO) 细胞与载体例如 pMT2PC (Kaufman 等., (1987), *EMBO J.* 6 :187-195) 使用以在哺乳动物细胞中稳定扩增 / 表达。NSO 骨髓瘤细胞系 (一种谷氨酸合成酶表达系统) 购自 Celltech 有限公司。

[0241] 通常, 在融合表达载体中, 在报道基因和目的蛋白质的连接处引入一个蛋白质酶剪切位点, 以纯化融合蛋白质后使目的蛋白质能够和报道基因分离。适于这种切割的蛋白质酶及其识别序列包含 Xa 因子, 凝血酶和肠激酶。

[0242] 典型的融合表达载体包含 pGEX (Amrad 公司, 墨尔本, 澳大利亚), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 和 pRIT5 (发玛西亚, 皮斯卡塔韦, 新泽西州), 这些载体分别将谷胱甘肽 S- 转移酶, 麦芽糖 E 结合蛋白质, 蛋白质 A 与目的重组蛋白质相融合。

[0243] 可诱导的非融合表达载体包含 pTrc (Amann 等., (1988) *Gene* 69 :301-315) 和 pET 11d (Studier 等., *Gene Expression Technology :Methods in Enzymology* 185, 学术出版社, 圣地亚哥, 加利福尼亚., (1990) 60-89)。目的基因的表达依赖于宿主 RNA 聚合酶从 pTrc 中的杂合 trp-lac 融合启动子处进行的转录, 插入到 pET 11d 中的目的基因的表达依赖于由共表达的病毒 RNA 聚合酶 (T7gn1) 介导的从 T7gn10-lac0 融合启动子处进行的转录。该病毒聚合酶是由宿主菌 BL21 (DE3) 或 HMS174 (DE3) 提供, 所述宿主菌来自具有位于 lacUV 5 启动子转录控制下的 T7gn1 的停留 γ 噬菌体。

[0244] 本发明的一个实施方案是再次表达新的 B7-DC 的转染细胞。对于已经表达了 B7-DC 的细胞例如成熟 DC, 转染的细胞在其表面表达增加量的 B7-DC 蛋白质或其片段。

[0245] 例如, 用在下述肿瘤细胞表面指导 B7-DC 表达的载体转染肿瘤细胞如肉瘤、黑素瘤、白血病、淋巴瘤、癌或成神经细胞瘤。这类转染的肿瘤细胞可以用来作为免疫原以诱导此处所描述的治疗性抗肿瘤免疫。

[0246] 载体的构建

[0247] 构建合适的含有目的编码和调控序列的载体使用本领域公知的标准连接和限制技术。将分离的质粒、DNA 序列或合成的寡核苷酸按需要的形式切割、加尾和再连接。

[0248] 形成载体的 DNA 序列可以有許多来源。主链载体和调控系统一般存在于可利用的、在构建体中被用作序列容器的“宿主”载体中。对于相关的编码序列, 起始构建体可以是且经常是一种从 cDNA 或基因组 DNA 文库中重新得到的大概合适的序列。但是, 一旦该序列被公开, 就可以从单个的核苷酸衍生物开始在体外合成全部的基因序列。相当长例如 500-1000bp 的基因的全部的基因序列可以通过合成单独的重叠互补寡核苷酸, 并在脱氧核

苷酸三磷酸存在的条件下用 DNA 聚合酶填充单链的非重叠区域来制备。该方法已经成功构建了几个已知序列的基因。例如,参见 Edge, M. D., Nature(1981)292 :756 ;Nambair, K. P., 等., Science(1984)223 :1299 ;和 Jay, E., J Biol Chem(1984)259 :6311。

[0249] 可利用上述参考文献所描述的磷酸三酯法或 Beaucage, S. L., 和 Caruthers, M. H., Tet Lett(1981)22 :1859 ; 和 Matteucci, M. D., 和 Caruthers, M. H., J Am Chem Soc(1981)103 :3185 所描述的亚磷酰胺法制备合成的寡核苷酸,也可以用可商购的寡核苷酸自动合成仪来制备。在 50mM Tris, H 7.6, 10mM MgCl₂, 5mM 二硫苏糖醇, 1-2mMATP, 1.7pmoles γ -³²P-ATP(2.9mCi/mmoles), 0.1mM 亚精胺, 0.1mM EDTA 存在的情况下,用过量的例如约 10 单位的多核苷酸激酶处理 1nmol 的底物实现退火或进行标记前单链的激酶处理。

[0250] 一旦由此获得了所需载体的各部分,就可以用标准的限制和连接程序对其进行切割和连接。位点特异的 DNA 的切割可以在本领域通常公知的条件下,特别是由这些可商购的限制酶的制造商具体说明的条件下用合适的限制酶(或酶)处理来完成。参见,如 New England Biolabs, Product Catalog。一般说来,在大约 20ml 的缓冲溶液中,1mg 的质粒或 DNA 序列用 1 单位的酶切割;在此处的实施例中,典型地,使用过量的限制酶以确保 DNA 底物的完全消化。虽然变化是允许的,但一般是在约 37°C 下温育 1 到 2 小时。每次温育后,用苯酚/氯仿抽提除去蛋白质,接着可用醚抽提,通过用乙醇沉淀,从水相中回收核酸。若需要,可以利用标准技术通过聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳分离不同大小的切割片段。片段大小分离的一般描述见 Methods in Enzymology(1980)65 :499-560。

[0251] 在存在四种脱氧核苷酸三磷酸(dNTPs)的情况下,通过在 50mM Tris pH 7.6, 50mM NaCl, 6mM MgCl₂, 6mM DTT 和 0.1-1.0mM dNTP 中用 E. coli DNA 聚合酶 I 的大片段(Klenow)在 20-25°C 下温育 15-25 分钟处理限制切割片段使其变成平末端。即使存在四种 dNTPs, 该 Klenow 片段填充了 5' 单链突出端,而切割掉了突出的 3' 单链。如果需要,在由突出端的性质决定的限制范围内,可以通过提供仅一种或选择性地提供 dNTP 进行选择修复。用 Klenow 处理后,用苯酚/氯仿抽提混合物并用乙醇沉淀。在合适条件下用 S1 核酸酶或 BAL-31 处理,使任何单链部分水解。

[0252] 在 15-50ml 体积中,在下述的标准条件和温度下进行典型的连接反应:例如, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 33 μ g/ml BSA, 10-50mM NaCl, 和 40 μ M ATP, 0.01-0.02(Weiss)单位的 T4 DNA 连接酶, 0°C (“粘性末端”连接)或 1mM ATP, 0.3-0.6(Weiss)单位的 T4 DNA 连接酶, 14°C (“平末端”连接)。实行分子间“粘性末端”连接的 DNA 总浓度为 33-100 μ g/ml (最终总浓度为 5-100nM)。实行分子间“平末端”连接的 DNA 最终总浓度为 1mM。

[0253] 在载体构建中使用了“载体片段”,该片段通常用细菌碱性磷酸酶(BAP)或牛肠碱性磷酸酶(CIAP)处理以除去 5' 磷酸和防止自身连接。在大约 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8 中,以约 1 单位/mg 载体的量用 BAP 或 CLAP 在 60°C 消化约 1 小时。用苯酚/氯仿抽提该产物,用乙醇沉淀。备选地,可以在已被另外的限制酶双消化的载体中防止再连接,和分离不必要的片段。

[0254] 可以用任何方法向编码序列中引入突变以产生本发明的变异体,这些突变包含简单的缺失或插入、系统缺失、插入或簇碱基的替换或单个碱基的替换。

[0255] 例如,利用定点诱变对 B7-DC DNA 序列(cDNA 或基因组 DNA)进行修饰,定点诱变

是公知的技术,其方案和试剂是可商购的(Zoller, MJ等., Nucleic Acids Res(1982)10:6487-6500和Adelman, JP等., DNA(1983)2:183-193)。例如,通过用连接混合物首先转化E. coli 菌株 MC1061(Casadaban, M.,等., J Mol Biol(1980)138:179-207)或其它合适的宿主来确定质粒构建的正确连接。利用常规的方法,根据质粒构建的方式,基于存在氨苄青霉素一、四环素一或其它的抗生素抗性基因(或其它筛选标记)来筛选转化子。从带有任选的氯霉素扩增的转化子制备质粒,任选地接着进行氯霉素的扩增(Clewell, DB等., Proc Natl Acad Sci USA(1969)62:1159; Clewell, D. B., J Bacteriol(1972)110:667)。通常使用几种微 DNA 片段(preps),参见,如“Holmes, DS,等., Anal Biochem(1981)114:193-197; Birnboim, HC等., Nucleic Acids Res(1979)7:1513-1523。通过限制和/或用 Sanger 的双脱氧核苷法(Proc Natl Acad Sci USA(1977)74:5463)测序、或用 Maxam 等. Methods in Enzymology(1980)65:499 的方法来分离的 DNA,其中的双脱氧核苷酸法在 Messing, 等., Nucleic Acids Res(1981)9:309 中作了进一步的描述。

[0256] 通过常规的技术,如磷酸钙或氯化钙共沉淀法、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔法将载体 DNA 导入到哺乳动物细胞中。转化宿主细胞的合适的方法可以在 Sambrook 等. 见上文,和其它的文章中找到。

[0257] 通常,在融合表达载体中,在报道基因和目的蛋白质的连接处导入了一个蛋白质酶剪切位点,这样在纯化融合蛋白质后使目的蛋白质能够和报道基因分离。适于这种切割的蛋白质酶及其识别序列包含 Xa 因子,凝血酶和肠激酶。

[0258] 典型的融合表达载体包含 pGEX(Amrad 公司., 墨尔本, 澳大利亚), pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.) 和 pRIT5(发玛西亚, 皮斯塔韦, 新泽西州), 这些载体分别将谷胱甘肽 S- 转移酶, 麦芽糖 E 结合蛋白质, 蛋白质 A 与目的重组蛋白质相融合。

[0259] 可诱导的非融合表达载体包含 pTrc(Amann 等., (1988)Gene 69:301-315) 和 pET 11d(Studier 等., Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185, 学术出版社, 圣地亚哥, 加利福尼亚.(1990)60-89)。目的基因的表达依赖于宿主 RNA 聚合酶从 pTrc 中的杂合 trp-lac 融合启动子处进行的转录, 插入到 pET 11d 中的目的基因的表达依赖于由共表达的病毒 RNA 聚合酶(T7gn1)介导的从 T7gn10-lac0 融合启动子处进行的转录。该病毒聚合酶是由宿主菌 BL21(DE3) 或 HMS174(DE3) 提供, 所述宿主菌来自具有位于 lacUV 5 启动子转录控制下的 T7gn1 的停留 γ 噬菌体。

[0260] 启动子和增强子

[0261] DNA 或 RNA 分子的启动子区结合 RNA 聚合酶, 启动“可操作连接”的核酸序列的转录。作为在此处使用,“启动子序列”是指启动子的核苷酸序列, 该启动子位于 DNA 或 RNA 链上, 由 RNA 聚合酶转录。当核酸分子的两个序列, 如启动子和编码序列以一定的方式相互连接时, 它们被“可操作连接”, 所述方式允许这两个序列都被转录到同一个 RNA 转录体中或允许一个序列中的 RNA 转录体开始被延伸到第二个序列中。因此, 如果在启动子序列起始的转录产生一个可操作连接的编码序列 RNA 转录体, 则两个序列例如启动子序列和 DNA 或 RNA 的编码序列被可操作连接。为了实现“可操作连接”, 在线性序列中并不需要使两个序列立即彼此临近。

[0262] 本发明优选的启动子序列必须是在哺乳动物细胞中可操作的, 可以是真核或病毒启动子。合适的启动子可以是可诱导的、可抑制的或组成型的。组成型的启动子的实例

是病毒启动子 MSV-LTR, 该启动子在各种类型的细胞中都有效和有活性, 而且, 与大多数其它启动子相比, 该启动子在停滞和生长的细胞中具有同样增强的活性。其它优选的病毒启动子包含存在于 CMV-LTR(来自巨细胞病毒)(Bashart, M. 等., Cell 41:521(1985)) 或 RSV-LTR(来自劳斯肉瘤病毒)(Gorman, C. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777(1982)) 中的启动子。其它的有用的启动子是鼠金属硫蛋白质 I 基因的启动子(Hamer, D., 等., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288(1982)); 疱疹病毒的 TK 启动子(McKnight, S., Cell 31:355-365(1982)); SV40 早期启动子(Benoist, C., 等., Nature 290:304-310(1981)) 和酵母 gal4 基因启动子(Johnston, S. A., 等., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975(1982); Silver, P. A., 等., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 81:5951-5955(1984))。与启动子区有关的转录因子和各自的活性和结合转录因子的 DNA 的其它举例性描述包括: Keegan 等., Nature(1986) 231:699; Fields 等., Nature(1989) 340:245; Jones, Cell(1990) 61:9; Lewin, Cell(1990) 61:1161; Ptashne 等., Nature(1990) 346:329; Adams 等., Cell(1993) 72:306。上述所列的所有参考文献的相关公开内容通过参考结合于此。

[0263] 所述的启动子区还可以进一步包含一个八聚体区, 该八聚体区通过与特定组织中的某种蛋白质相互作用, 作为组织特异性增强子发挥作用。本发明的 DNA 构建体的增强子区是对被转染的靶细胞具有特异性或被这类靶细胞的细胞因子高度激活的增强子区。载体(质粒或反转录病毒)的实例公开于(Roy-Burman 等., 美国专利号 5, 112, 767) 中。有关转录中的增强子及其活性的一般性讨论参见 Lewin, B. M., Genes IV, 牛津大学出版社(Oxford University Press), 牛津, (1990), 552-576 页。特别有用的增强子是反转录病毒增强子(例如病毒 LTR)。增强子优选位于启动子的上游, 与启动子相互影响以刺激基因表达。如果使用反转录病毒载体, 内源性病毒 LTR 以被用来作为弱增强子, 且可以被其它所需的增强子序列取代, 该所需的增强子序列赋予组织特异性或其它所需的性质, 如对本发明的编码 B7-DC 的 DNA 分子的转录有效性。

[0264] 本发明的核酸序列也可以用标准技术化学合成。化学合成多聚脱氧核苷酸的各种方法是已知的, 包括固相合成, 如肽合成, 利用可商购的 DNA 合成仪其已经可完全自动化(参见, 如, Itakura 等. 美国专利号 4, 598, 049; Caruthers 等. 美国专利号 4, 458, 066; 和 Itakura 美国专利号 4, 401, 796 和 4, 373, 071, 通过参考结合于此)。

[0265] 蛋白质和多肽

[0266] 本发明包含一种具有序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的“分离的”B7-DC 蛋白质。本发明的说明书以全长的人和鼠 B7-DC 蛋白质(和 DNA) 为例, 但是应当理解具有此处公开的特征的、来自于其它哺乳动物物种的 B7-DC 的同系物和其突变体也属于本发明的范围。

[0267] 本发明也包括 B7-DC 的“功能性衍生物”, “功能性衍生物”是指氨基酸替换的变体, B7-DC 的“片段”或“化学衍生物”, 术语“片段”和“化学衍生物”在下文中解释。一个功能性衍生物保留有可检测的 B7-DC 活性, 优选为能结合 T 细胞上的受体并共刺激 T 细胞活性, 该活性允许其按照本发明的效用。“功能性衍生物”包含“变体”和“片段”, 而不论它们在本发明中是被同时使用还是被单独使用。

[0268] 一种功能性同系物必须具有上述生化和生物活性。考虑到其功能特征, 使用的来自于其它物种的同系物蛋白质 B7-DC, 包含仍没有发现的蛋白质, 如果这些蛋白质具有序列

相似性和列举的生物化学和生物活性,那么这些蛋白质都在本发明的范围之内。

[0269] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,为了最佳比较的目的对比序列(例如在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中都导入缺口以进行最佳对比,为了进行比较去掉非同源序列)。在一个优选的对比方法中,对比了半胱氨酸残基。

[0270] 在一个优选的实施方案中,进行比较的序列长度至少占参考序列长度的30%,优选至少为40%,更优选至少为50%,甚至更优选至少为60%,和甚至更优选至少为70%、80%或90%。例如,当第二个序列与含有276个氨基酸残基的人B7-DC蛋白质氨基酸序列(SEQ ID NO:2)进行对比时,至少83个,优选为至少110个,更优选为至少138个,甚至更优选为至少166个,和甚至更优选为至少193个、221个或248个氨基酸残基被对比)。然后比较相应的氨基酸位点(或核苷酸位点)的氨基酸残基(或核苷酸)。如果在第一序列中的一个位置与第二序列中的相应位置具有相同的氨基酸残基(或核苷酸),那么这两个分子在该位置是一致的(在此处使用的氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。考虑到为了进行两个序列的最佳对比的需要而导入的缺口的数量和每个缺口的长度,两个序列的同一性百分比是一个表征序列共有的同样的位点数的参数。

[0271] 两个序列间的序列比较和同一性百分比测定可以利用数学运算法来完成。在一个优选的实施方案中,两个氨基酸序列的同一性百分比是使用 Needleman 和 Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453(1970)) 运算法,使用 Blossom 62 矩阵和 PAM250 矩阵和 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口值(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度值(length weight)来确定,该运算法已包含于 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可得到)中。在另一个优选的实施方案中,两个核苷酸序列间的同一性百分比使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可得到),使用 NWSgapdna, CMP 矩阵和 40、50、60、70 或 80 的缺口重量和 1、2、3、4、5、或 6 的长度重量来测定。在另一个实施方案中,两个氨基酸或核苷酸序列的同一性百分比是用 E. Meyers 和 W. Miller 运算法(CABIOS, 4:11-17(1989)),使用 PAM120 重量残基表(weight residue table), gap 长度罚分为 12, gap 罚分为 4 来测定,其中的运算法已经被包含于 ALIGN 程序(2.0 版本)中。

[0272] 本发明的核酸和蛋白质还被用作“查询序列”以进行公共数据库的检索,例如,鉴定其它的家族成员或相关序列。这种检索可以用 Altschul 等.(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(2.0 版本)进行。利用 NBLAST 可以进行 BLAST 核苷酸检索,分值(score) = 100, wordlength = 12, 以获得与人或鼠 B7-DC 核酸分子同源的核苷酸序列。也可以用 XBLAST 程序进行 BLAST 蛋白质检索,分值(score) = 50, wordlength = 3, 以获得与本发明的人或鼠 B7-DC 蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得缺口排列(alignment)以进行比较,可以如同 Altschul 等.(1997)Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 的描述利用 GappedBLAST。当利用 BALST 和 Gapped BLAST 程序时,使用各个程序(例如 XBLAST 和 NBLAST)中的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0273] 因此,上文所描述的 B7-DC 蛋白质的同系物具有下述性质(a)天然 B7-DC 的功能活性,和(b)当用上述方法测定时,与天然 B7-DC 蛋白质(例如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4)的序列相似性为至少约 30%(氨基酸水平),优选为至少约 50%,更优选为至少约 70%,甚至更优选为至少约 90%。

[0274] 基于已公开的 B7-DC 序列,利用 DNA 探针获得并表达该蛋白质是本领域的公知常

识。然后用本领域公认的方法如本文所描述的方法,例如标准 T 细胞增殖或细胞因子分泌测定来检测该蛋白质的生化和生物活性。T 细胞共刺激的生物学检测将显示同系物是否具有必需的活性而作为“功能性”同源物。

[0275] 优选的试验测定 B7-DC 的功能特性如刺激 T 细胞合成细胞因子,这依赖于 TCR 的结合或交联(“初级活化信号”)以及共刺激信号的传递。B7-DC 在 T 细胞上与其天然配体结合发出一个引起细胞因子,如 IL-2 增量生产的信号,其反过来刺激增殖,所述的增殖可以用常规方法测定。

[0276] B6-DC 的“变异体”是指与其全长蛋白质或其片段基本上一致的分子,在该分子中一个或几个氨基酸残基已被取代(取代变异体)或一个或几个残基缺失(缺失变异体)或增加(增加变异体)。B6-DC 的“片段”指的是该分子的任何亚型,优选的是含有 ECD 的分子,即该全长蛋白质的较短的多肽。

[0277] 有很多方法可以用来制备分离的 DNA 序列的片段、突变体和变异体。编码 B7-DC 蛋白质的核酸小亚区或片段,例如长度为 1-30 个碱基,可以用标准的化学合成法来制备。反义寡核苷酸和引物可以用来制备较大的合成片段。

[0278] 一种优选的功能性衍生物是一种融合蛋白质,一种含有 B7-DC 功能性片段的多肽。例如,一种有用的 B7 衍生物是 B7-DC-Ig 融合蛋白质,该融合蛋白质含有相应于 B7-DC 的 ECD 的多肽和一种 Ig 的 C 区。

[0279] 融合配偶体的存在可以改变 B7-DC 蛋白质的溶解性、亲和力和/或化合价(这儿定义为每个分子可用的结合位点的数目)。一种可溶的 B7-DC 融合蛋白质,当其与 T 细胞上的受体结合时会产生与在 APC 上表达的天然蛋白质不同的生物学效应,即通过竞争性结合而不是共刺激来抑制 T 细胞的刺激。

[0280] 本文所用的 B7-DC 的细胞外结构域(ECD)是指能识别和结合 PD-1 或者 T 细胞上的其它受体的该蛋白质的整个细胞外部分或其任何片段,其中的 T 细胞上的受体不是 CD28 或 CTLA-4。优选地, B7-DC 的 ECD 是由 SEQ ID NO :2 或 SEQ IDNO :4 的位点 26 到位点 221 的氨基酸残基所编码的部分。

[0281] “可溶性 B7-DC”是指无细胞形式的 B7-DC,其可以从生产的细胞中被脱出(shed)、分泌或另外的抽提。可溶性的 B7-DC 包含,但不限于可溶性的融合蛋白质如 B7-DC-Ig, B7-DC 的自由 ECD 或与生物活性分子融合(遗传方法或化学方法)的 B7-DC ECD。

[0282] 如前文所述,本发明还包含由一个 B7-DC 结构域和另一种 B7 家族蛋白质的一个结构域或片段形成的杂交融合蛋白质,优选在细胞表面以共刺激的形式表达。

[0283] 一组优选的 B7-DC 变异体是至少有一个氨基酸残基,优选仅仅一个残基被不同残基取代的变异体。关于蛋白质化学和结构的详细描述,参见 Schulz, GE 等., Principles of Protein Structure, Springer Verlag, 纽约,1978,和 Creighton, T.E., Proteins : Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman&Co., 旧金山,1983,上述参考文献通过参考结合于此。在蛋白质分子中可以发生的取代的类型可以基于不同物种的同源蛋白质间的氨基酸发生改变的频率的分析结果,如 Schulz 等(见上文)的表 1-2 和 Creighton(见上文)的图 3-9。基于这种分析,本发明将保守取代定义下列 5 组中的一组发生交换:

[0284]

1	小的脂肪族、无极性和有微极性的残基	丙氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸 (脯氨酸, 甘氨酸);
2	极性的、带负电荷的残基及其酰胺	天冬氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酸, 谷氨酰胺;
3	极性的、带正电荷的残基	组氨酸, 精氨酸, 赖氨酸;
4	大的脂肪族、无极性残基	甲硫氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸 (半胱氨酸)
5	大的芳香族残基	苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸。

[0285] 上表圆括号中的三个氨基酸残基在蛋白质的结构中具有特别的作用。甘氨酸是唯一的一种没有侧链的残基, 因而使链具有弹性。脯氨酸, 由于其不一般的几何学构型, 而紧紧地束缚链。半胱氨酸能参与二硫键的形成, 二硫键在蛋白质的折叠中是重要的。

[0286] 生化的、功能的 (或免疫学的) 属性方面更实质的改变是通过选择性取代产生的, 该选择性取代保守性较低, 如在上述 5 组间, 而不是在 5 组内的取代。这种改变更明显不同于它们在保持 (a) 取代区的肽主链的结构, 例如片状或螺旋状结构, (b) 在靶位点分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链的体积的方面的作用。这种取代的实例是 (i) 甘氨酸和 / 或脯氨酸被另一种氨基酸取代或缺失或插入甘氨酸或脯氨酸; (ii) 亲水性残基例如丝氨酸或苏氨酸取代疏水性残基如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、或丙氨酸, (被该疏水性残基取代); (iii) 半胱氨酸残基取代其它残基 (或被其它残基取代); (iv) 带阳电性侧链的残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代带阴电性的残基如谷氨酸或天冬氨酸 (或被带阴电性的残基取代); 或 (v) 具有大侧链的残基如苯丙氨酸取代不含有这种侧链的残基如甘氨酸 (或不含有这种侧链的残基取代)。

[0287] 按照本发明中的最能接受的缺失、插入和取代是那些对 B7-DC 蛋白质在其 T 细胞共刺激活性方面的特性没有产生根本性改变的缺失、插入和取代。但是, 在进行取代、缺失、插入之前难以准确预言其影响时, 本领域的普通技术人员能够理解可以通过常规的检测方法, 如本文所描述的方法, 而不需要过量的试验来评估其影响。

[0288] 对于本发明, 较短链变异体可以通过化学合成来制备, 优选的较长链变异体是通过编码 B7-DC 多肽的核酸的位点专一诱变, 在细胞培养物中表达变异体核酸, 和任选地, 从细胞培养物中纯化多肽例如用固定到柱上的特异性抗体 (以通过结合至少一个表位来吸附变异体) 来进行免疫亲和色谱纯化多肽来典型地制备。

[0289] B7-DC 的化学衍生物

[0290] B7-DC 的“化学衍生物”含有通常不是蛋白质某部分的另外的化学部分。多肽的共价修饰也包含在本发明的范围之内。这类衍生的部分可以提高溶解性、吸附作用、生物半寿期等。能接到这类作用的部分公开于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)。

[0291] 通过将多肽的靶氨基酸残基与有机衍生试剂反应将这种修饰导入到分子中, 其中的衍生试剂能和选择的侧链或末端残基反应。另一种修饰是蛋白质的环化。

[0292] 多肽的化学衍生物的实例如下。

[0293] 用琥珀酸酐或其它羧酸酐衍生赖氨酸残基和氨基末端残基,用环状羧酸酐产生的衍生物具有改变赖氨酸残基电荷的作用。其它合适的衍生含有氨基的残基的试剂包括亚氨酸酯如甲基吡啶亚氨酸甲酯 (methyl picolinimidate);磷酸吡哆醛;吡哆醛;氯代氢硼化物;三硝基苯磺酸;0-甲基异脲;2,4-戊二酮;和氨基转移酶催化的与乙醛酸的反应。

[0294] 通过与碳二酰亚胺 ($R-N=C=N-R'$) 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二酰亚胺或 1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳二酰亚胺) 反应来选择性修饰羧基侧链基团、天冬氨酰基或谷氨酰基。而且,通过与氨反应可以将天冬氨酰基和谷氨酰基转换为天冬酰胺酰和谷氨酰胺酰残基。

[0295] 其它的修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化、赖氨酸的氨基的甲基化 (Creighton, 见上文, 79-86 页)、N 末端氨基的乙酰化和 C 末端羧基的酰胺化。

[0296] 还包括其中一个或多个 D-氨基酸取代一个或多个 L-氨基酸的多肽。

[0297] 多聚肽 (Multimeric Peptides)

[0298] 本发明还包含更长的多肽,在该多肽中从 B7-DC 序列获得的基本肽序列重复了约 2- 约 100 次,带有或不带有间插间隔和接头。很明显这种多聚体可以由此处所定义的任何肽变异体来构建。而且,一个肽多聚体可以含有肽单体和其公开的取代的变异体的不同组合。这种寡聚或多聚肽可以通过本文所描述的化学合成或重组 DNA 技术来制备。当用化学方法生产时,该寡聚体优选含有 2-8 个重复的基本肽序列。当用重组方法生产时,该多聚体可以含有表达系统所能允许许多的重复,例如 2- 约 100 个重复。

[0299] 在 B7-DC 肽或多肽的串联多聚体中,优选为二聚体和三聚体,各链之间通过链内二硫键或其它的“人造”共价键结合,因此,各链是“肩并肩”而不是“首尾相连”。优选的二聚体和三聚体是有 B7-DC 的融合蛋白质,如本文所描述的 B7-DC-Ig 之间形成的二聚体和三聚体。

[0300] B7-DC 肽的抗体特异性

[0301] 在下文的描述中,免疫学、细胞生物学和分子生物学领域的普通技术人员公知的各种方法学将引为参考。阐明这些公知方法学的出版物和其它材料的全部内容都通过参考结合于此。阐明免疫学基本原理的一般参考文献包含 A. K. Abbas 等., Cellular and Molecular Immunology (第四版), W. B. Saunders Co., 费城, 2000; C. A. Janeway 等., 免疫生物学. The Immune System in Health and Disease, 第四版., Garland Publishing Co., 纽约, 1999; Roitt, I. 等., Immunology, (current ed.) C. V. Mosby Co., St. Louis, MO (1999); Klein, J., Immunology, Blackwell Scientific Publications, Inc., Cambridge, MA, (1990)。

[0302] 单克隆抗体 (mAbs) 和其制备与使用方法描述于 Kohler 和 Milstein, Nature 256:495-497 (1975); 美国专利号 4,376,110; Hartlow, E. 等., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约, 1988); Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, 纽约, 纽约 (1980); H. Zola 等., in Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, 1982)。

[0303] 免疫测定方法也描述于 Coligan, J.E. 等编., *Current Protocols in Immunology*, Wiley-Interscience, 纽约 1991(或当前版本); Butt, W.R. (编) *Practical Immunoassay: The State of the Art*, Dekker, 纽约, 1984; Bizollon, Ch. A., 编., *Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassays*, Elsevier, 纽约, 1984; Butler, J.E., ELISA(第 29 章), In: van Oss, C.J. 等., (编), *IMMUNOCHEMISTRY*, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1994, 759-803 页; Butler, J.E. (编), *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, 1991; Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986; Work, T.S. 等., *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, North Holland Publishing Company, 纽约, (1978)(由 Chard. T 编写的一章, “An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques”)。

[0304] 抗独特型抗体也描述于, 例如, *Idiotypy in Biology and Medicine*, 学术出版社, 纽约, 1984; *Immunological Reviews* 79 卷, 1984; *Immunological Reviews* 90 卷, 1986, *Curr. Top. Microbiol., Immunol.* 119 卷, 1985; Bona, C. 等., *CRC Crit. Rev. Immunol.*, 33-81 页 (1981); Jerne, NK, *Ann. Immunol.* 125C :373-389(1974); Jerne, NK, In: *Idiotypes-Antigens on the Inside*, Westen-Schnurr, I., 编., Editiones Roche, Basel, 1982, Urbain, J 等., *Ann. Immunol.* 133D :179-(1982); Rajewsky, K 等., *Ann. Rev. Immunol.* 1 :569-607(1983)。

[0305] 本发明提供了抗体, 包含单克隆的和多克隆的抗体, 该抗体能与已知的 B7 家族蛋白质中不存在的 B7-DC 的新表位发生反应。该抗体可以是异源的、同种异型的、同基因的或其修饰形式, 如人源化的或嵌合的抗体。也包含对抗 B7-DC 抗体的独特型具有特异性的抗独特型抗体。术语“抗体”的含义也包含完整分子和含有抗原结合位点、并能与 B7-DC 的表位结合的该分子的片段。这些包括缺乏完整抗体的 Fc 片段的 Fab 和 F(ab')₂ 片段, 其比完整的抗体更快速地从循环中清除, 并且具有更少的非特异性组织结合 (Wahl 等, *J. Nucl. Med.* 24 :316-325(1983))。还包含 Fv 片段 (Hochman, J. 等 (1973) *Biochemistry* 12 :1130-1135; Sharon, J. 等 (1976) *Biochemistry* 15 :1591-1594.)。这些不同的片段可以用常规技术如蛋白酶切割或化学切割 (参见, 如, Rousseaux 等., *Meth. Enzymol.*, 121 :663-69(1986)) 来制备。

[0306] 从被免疫的动物例如兔、山羊、啮齿动物类等中获得血清形式的多克隆抗体, 该抗体可以不需进一步处理直接使用, 或也可以进行常规的浓缩或纯化方法如硫酸铵沉淀、离子交换色谱和亲和色谱 (见 Zola 等., 见上文)。

[0307] 该免疫原可以含有完整 B7-D6 蛋白质, 或其片段或衍生物。优选的免疫原含有全部或部分的人 B7-DC 的 ECD(氨基酸残基 26-221), 在天然 B7-DC 上发现这些残基包含有翻译后修饰如糖基化。用本领域现有的各种方法生产的含有细胞外结构域的免疫原, 如用常规的重组方法表达的克隆基因, 从原始细胞, 表达高水平 B7-DC 的细胞群等中分离。

[0308] 可以用常规的杂交瘤技术, 如用 Kohler 和 Milstein (*Nature*, 256 :495-97(1975)) 介绍的方法, 和其改进的方法 (参见上述参考文献) 生产 mAbs。用上述的一种免疫原免疫一种动物, 优选为鼠, 以在被免疫的动物中产生所需的抗体。

[0309] 通常,在存在融合促进剂如聚乙二醇(PEG)的情况下,将来源于被免疫动物的淋巴结、脾或外周血液的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合。鼠骨髓瘤细胞系的任何细胞都能用于融合:P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-k0Ag8.653, Sp2/0-Ag14,或HL1-653骨髓瘤细胞系(可从ATCC, Rockville, MD得到)。接下来的步骤包含在选择性培养基中生长以使未发生融合的亲代骨髓瘤细胞和供体淋巴细胞完全死亡,而只有杂交瘤细胞存活。克隆并培养这些杂交瘤细胞,并从上清液中筛选具有所需特异性的抗体,如通过使用B7-DC-Ig融合蛋白质的免疫测定技术筛选。阳性克隆被亚克隆,例如,通过有限稀释法亚克隆,并分离mAbs。

[0310] 用本领域公知的技术可以在体外或体内(在腹水液中)繁殖按照这些方法生产的杂交瘤(通常参见Fink等., Prog. Clin. Pathol., 9:121-33(1984))。一般来说,在培养基中繁殖单个细胞系,通过倾析、过滤或离心收集含有高浓度单mAb的培养基。

[0311] 产生的抗体可以是单链抗体或scFv,而不是正常的多聚体结构。该单链抗体包含目的Ig的高变区,并当单链抗体是完整Ig的一部分时,再造天然Ig的抗原结合位点(Skerra, A.等.(1988)Science, 240:1038-1041; Pluckthun, A.等.(1989)Methods Enzymol. 178:497-515; Winter, G.等.(1991)Nature, 349:293-299); Bird等., (1988)Science 242:423; Huston等.(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Jost CR等., J. Biol. Chem. 1994 269:26267-26273; 美国专利号4,704,692,4,853,871,4,94,6778,5,260,203,5,455,0Kn与含有未知量的标记抗体(其作为一种“报道分子”)的溶液接触。第二次培养后,使标记的抗体与抗原结合,该抗原通过未标记的抗体与固体支持物结合,再次冲洗固体支持物以除去未反应的标记抗体。这种类型的正向夹心(forward sandwich)测定可以是一种简单的“是/否”测定,以鉴定抗原是否存在,也可以通过比较标记抗体与从含有已知量的抗原的标准样品中获得的抗体的量来进行定量测定。

[0312] 在另一种类型的“夹心”测定中,使用所谓的“同步”和“反向”测定法。同步检测涉及一个培养步骤,因为结合固相支持物的抗体和标记的抗体都被同时加到被测试的样品中。在培养结束后,冲洗固相支持物以除去残留的液体样品和未结合的标记抗体。然后如同常规的“正向”夹心检测来检测与固相支持物结合的标记抗体的存在。

[0313] 在“反向”检测中,先逐步向液体样品中加入标记抗体的溶液,在孵育合适的时间后,接着加入结合到固体支持物上的未标记抗体。在第二次孵育后,以常规的方式冲洗固相以除去被检测的残留的样品和未反应的被标记的抗体溶液。然后如同“同步”和“正向”检测来检测与固相支持物结合的标记抗体。

[0314] 上述的抗体在抑制T细胞刺激和治疗与不需要的T细胞活化相关的疾病如移植排斥和自身免疫的方法中是有用的。该方法涉及向需要这种治疗的受试者施用有效量的抗体,优选为mAb,更优选为对B7-DC的共刺激表位特异的人或人源化的mAb。施用的抗体必须在阻断T细胞的刺激或消除抗原活性T细胞方面是有效的,从而抑制定向T细胞应答。相关的剂量范围在下文中将作描述。

[0315] 编码B7-DC蛋白质的核酸的应用

[0316] 通过检测生物样品细胞中B7-DC的表达或者检测一种试剂对B7-DC的表达的影响,本发明的核酸在诊断上可以用来检测疾病的进程。这优选通过检测细胞的mRNA水平来实现。为了在这类诊断方法中使用,该核酸序列被可检测性标记,例如,利用放射性或荧光标记或生物素标记,并用于常规的斑点印迹或Northern杂交步骤以探测mRNA分子存在于

例如生物样品的总 kor poly(A+)RNA 的制剂。

[0317] 治疗组合物及其给药

[0318] B6-DC 多肽或表达该多肽的细胞例如 DC 或肿瘤细胞施用于哺乳动物受试者, 优选人。用与细胞结合、固定的或其它集合形式的多肽来提高 T 淋巴细胞的反应性和产生的免疫性。B6-DC-Ig 融合蛋白质形成一个二聚体并, 如实施例所示, 共刺激 T 细胞。可溶性单体形式的 B6-DC 多肽能结合 T 细胞上的受体, 而不产生刺激活性, 因而被认为是由刺激形式的分子产生的 T 细胞共刺激的竞争性抑制剂或拮抗物。这种 B6-DC 拮抗物的结合可以抑制正在进行的 T 细胞活性或可以干扰由内源性 B6-DC 或甚至由其它的 B7 家族成员通过其受体 (如 CD28 或 CTLA-4) 呈递的共刺激信号的作用。

[0319] 本发明所描述的具有 B7-DC 活性的组合物在药用载体中以生物有效量或治疗有效量来给药。该 B7-DC 多肽 (或表达该多肽的细胞) 可以单独给药或与其它蛋白质或多肽如具有 B7 家族的另一成员的活性蛋白质或多肽或另一种免疫刺激分子结合给药。治疗可以包含给药一种佐剂, 该佐剂在广义上包含任何非特异性的免疫刺激化合物, 如干扰素。本发明考虑的佐剂包含间苯二酚, 非离子型的表面活性剂如聚氧乙烯油基醚和正 - 十六烷基聚乙醚。

[0320] 下面是向受试者给药本发明的抗体的剂量。

[0321] 治疗有效量是指当给药一段有效期时要达到所需的免疫学或临床效果的剂量。

[0322] 具有 B7-DC 活性的多肽 (或一种抗 B7-DC 的抗体) 的治疗活性量可根据因素而改变, 所述因素如疾病的状态、年龄、性别和个体的体重及肽在个体体内引起所需的反应的能力。可以调整剂量疗法以提供最佳的治疗反应。例如, 可以每天施用几个分开的剂量或如由治疗情况的迫切需要所指示适当地减少剂量。治疗有效量的、与细胞结合形式的蛋白质可以根据蛋白质或细胞等价物来确定。

[0323] 因此, 每一千克体重的接受者的有效量是约 1ng- 约 1g, 更优选为约 1 μ g-100mg/kg, 更优选为约 100 μ g- 约 100mg/kg。适用于内部给药的剂量形式优选含有 (对于后者的剂量范围) 每单位大约 0.1mg-500mg 的活性成分。基于该组合物的总重量, 该活性成分可以在 0.5-95% 重量范围内变化。备选地, 表达 B7-DC 的细胞, 如此优选的转导细胞如 DC 或无活性的肿瘤细胞的有效剂量是每个对象约 10^4 - 10^9 个细胞, 更优选约 10^6 - 10^8 个细胞, 优选为分离的剂量形式。免疫治疗领域的普通技术人员能够调整这些剂量而不需要过多的试验。

[0324] 该活性化合物 (如 B6-DC 多肽或用 B6-DC DNA 转导的细胞) 可以以常规的方式例如通过常规的并且有效的途径注射给药。优选的途径包括皮下, 真皮内, 静脉内和肌肉内途径。其它可能的途径包括口服给药、鞘内、吸入、透皮给药或直肠给药。为了治疗没有完全切除的肿瘤, 也可以直接肿瘤内注射。

[0325] 依赖于给药的途径, 活性化合物可以包被在一种材料中以防止该化合物被酶、酸和其它灭活该化合物的自然条件作用。因此, 对于通过肠途径给药具有 B7-DC 活性的多肽或肽的方式, 必须将组合物用一种防止其失活的材料包被或将组合物与一种防止其失活的材料共同给药。例如, 以合适的载体、稀释剂或佐剂形式对个体给药肽, 与酶抑制剂 (如胰腺的胰岛素抑制剂、二异丙基氟磷酸 (或酯) (DEP) 和抑肽酶) 共给药, 或以合适的载体如脂质体 (包含水包油包水 (water-in-oil-in-water) 乳状液和常规的脂质体 (Strejan

等., (1984) JNeuroimmunol 7:27)) 形式给药。

[0326] 本发明所用的“药用载体”包含任何和所有的溶剂,分散剂,涂层,抗菌剂和抗真菌剂,等渗的和吸收延迟剂等。这些介质和试剂用作制药上的活性物质是本领域公知的。除了在任何常规介质或试剂于活性化合物不相容以外,可以考虑它们在治疗组合物中的应用。辅助的活性化合物也可以用于组合物。

[0327] 优选的药用稀释剂包含盐水和含水缓冲液。适合于注射的药物组合物包含灭菌的含水溶液(可溶于水)或分散体和灭菌的可注射溶液或分散体的临时制剂的灭菌粉末。等渗剂如糖,多元醇如甘露醇、山梨糖醇,氯化钠可以包含在药物组合物之中。在任何情况下,组合物应该灭菌且应该是流体.,在制造和保藏条件下应该是稳定的,必须含有防腐剂以防止微生物如细菌和真菌污染。分散体也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中和油中制备。在一般的保藏和使用条件下,这些制剂可以含有防腐剂以防止微生物生长。

[0328] 载体可以是一种溶剂或分散剂,其包含如水、乙醇、多元醇(如丙三醇、丙二醇、和液态的聚乙二醇等)和它们的合适的混合物。可以保持合适的流动性,例如通过使用一种涂层如卵磷脂,通过保持分散体所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂来实现。

[0329] 利用各种抗菌剂和抗真菌剂,如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸,乙基汞硫代水杨酸钠等可以抑制微生物的作用。

[0330] 通过在组合物中包含一种延迟吸附的制剂,如单硬脂酸铝和明胶可实现可注射组合物的延长吸附。

[0331] 优选以剂量单位的形式来配制胃肠外组合物,以利于给药和剂量均一。剂量单位形式是指适于作为单一剂量对哺乳动物受试者给药的身体上的独立单位;每一个单位由预先确定量的计算过的产生所需的治疗效果的活性化合物与所需要的药物载体组成。对本发明的剂量单位的说明根据或直接取决于(a) 活性化合物独特的特性和所要达到的具体治疗效果,和(b) 在混合这种活性化合物来治疗个体敏感性的领域中所固有的局限性。

[0332] 对于肺滴注法,可使用雾化的溶液,在可喷射的气溶胶制剂中,活性蛋白质可以与固态或液态惰性载体物质结合。其也可以包装在压挤瓶中或与加压挥发物,通常是气态推进剂混合。该气溶胶制剂除了含有本发明的蛋白质外,可以含有溶剂、缓冲液、表面活性剂和抗氧化剂。

[0333] 对于局部应用,本发明的蛋白质可以结合局部应用的赋形剂如药膏或软膏,所述赋形剂具有对皮肤的平滑作用并能将活性成分直接给药到被感染的区域。

[0334] 用于活性成分的载体既可以是可喷射的形式也可以是不可喷射的形式。不可喷射的形式可以是半固体或固体形式,其含有一个适于局部施用的载体且具有优选大于水的动态粘度。合适的制剂包含,但不限于溶液、混悬液、乳状液、乳膏、软膏、粉末、擦剂、油膏等。如果需要,这些可以被灭菌或与助剂如防腐剂、稳定剂、保湿剂、缓冲剂、或影响渗透压的盐等混合。用于不可喷射的局部制剂的优选的赋形剂的实例包含软膏基质,如聚乙二醇-1000(PEG-1000),常规的乳膏如HEB乳膏,凝胶和凡士林凝胶等。

[0335] 用于本发明的B7-DC多肽的其它药用载体有脂质体,含有活性蛋白质的药物组合物,所述组合物是分散的或以不同的颗粒形式存在,其中的颗粒由与脂层结合的水层组成。活性蛋白质优选存在于水层中和脂层中、内部或外部或任何部位,或公知的脂质体悬液的非均一系统中。疏水层,或油脂层,通常但不专有地含有磷脂,如卵磷脂和鞘磷脂,类固醇,

如胆固醇,或多或少地离子表面活性剂,如联十六烷基磷酸盐、十八烷胺硬脂胺或磷脂酸和/或其他的天然疏水性材料。

[0336] 肿瘤细胞的修饰以表达 B7-DC 和多重共刺激分子

[0337] 本发明的另一个方面是一种细胞,优选肿瘤细胞,其被修饰以表达多重共刺激分子。在活化的 B 细胞上共刺激分子 B7、B7-2 和 B7-3 的瞬时表达是不同的。例如, B7-2 在 B 细胞活化的早期表达,而 B7-3 在晚期表达。在免疫反应过程中不同的共刺激分子因此而具有不同的功能。一个有效的 T 细胞应答需要 T 细胞接受来自多重共刺激分子的共刺激信号。

[0338] 因此,本发明包含了经遗传修饰的或表达多于一个共刺激分子的肿瘤细胞,例如,可以修饰肿瘤细胞以表达 B7-DC 和一个或多个 B7、B7-2 和 B7-3。

[0339] 在进行修饰之前,细胞,如肿瘤细胞可以不表达任何共刺激分子或可以表达某种共刺激分子而不表达其它的共刺激分子。如本发明所描述,可以通过单独用编码 B7-DC 的核酸转染或用不同的共刺激分子转染而修饰肿瘤细胞。例如,用编码 B7-DC 的核酸转染的肿瘤细胞还可以进一步用编码 B7 的核酸转染。编码人或鼠 B7-DC 蛋白质的 cDNA 分子的序列分别是 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :3 的编码部分。备选地,可使用多于一种的修饰。例如,可以用诱导 B7-1、B7-2 或 B7-3 表达的试剂来刺激被编码 B7-DC 的核酸转染的肿瘤细胞。

[0340] 与病原体相关的抗原

[0341] 本发明的主要应用是本发明的组合物在治疗性疫苗方面的应用,该疫苗能治疗癌症和世界范围内导致发病和死亡的主要慢性病毒感染。设计这种疫苗以消除被感染的细胞,这需要 T 细胞在抗体失效时发生反应。除了自身的抗原表位外,本发明的疫苗还包含:

[0342] (a) 载体,如裸 DNA、裸 RNA、自我复制的 RNA 复制子和病毒,所述病毒包括痘苗病毒、腺病毒、腺伴随病毒 (AAV)、慢性病毒属和 RNA 甲病毒属;

[0343] (b) 抗原定位 (targeting) 或加工信号,如 HSP70、钙网膜蛋白、Flt-3 配体的细胞外结构域、假单胞菌外毒素 A (ETA) 的结构域 II、单纯疱疹 VP22 靶蛋白质等 (参见普通转让的美国专利申请 09//421,608 ;09/501,097 ;09/693,450 ;60/222,9002 ;60, /222,985 ;60/268,575 和 Chang, W-F 等., J. Virol. 75 :2368-2376 (2001),全部的全文通过参考结合于此);和

[0344] (c) 一个共刺激信号,优选为本发明的 B7-DC 蛋白质或其融合蛋白质、片段或功能性衍生物 (单独或与其它的已知共刺激蛋白质如 B7. 1、B7. 2、可溶的 CD40 等结合)。

[0345] 用一个编码一种抗原的核酸转化、转染或其它的方式转导肿瘤细胞或其它类型的宿主细胞,包括 APC,其中的抗原能引起免疫反应。这种抗原优选的是致病微生物的表位,宿主细胞是通过效应 T 细胞应答,包含细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和延迟型超敏反应来对抗致病微生物而得到保护的。这些致病微生物典型地包含病毒,细胞内寄生虫如疟原虫 (malaria) 和在细胞内生长的细菌如分支杆菌属 (mycobacteria) 和李斯特氏菌属 (listeria)。因此,包含在本发明的疫苗组合中的抗原的类型是任何与这些病原菌有关的形式 (当然还包含肿瘤特异性抗原)。值得注意的是当病毒是癌症的致病因素的情况下,一些病毒抗原也是肿瘤抗原。

[0346] 事实上,世界上两种最普遍的癌症:肝细胞癌和子宫颈癌都与病毒感染有关。乙

型肝炎病毒 (HBV) (Beasley, R. P. 等., Lancet 2, 1129-1133 (1981)) 已经被作为是肝细胞癌的病原体。80-90%的宫颈癌表达 E6 和 E7 抗原,该抗原来自四种“高危 (high risk)”人乳头瘤病毒类型:HPV-16、HPV-18、HPV-31 和 HPV-45 中的一种 (Gissmann, L. 等., Ciba Found Symp. 120, 190-207 (1986); Beaudenon, S., 等. Nature 321, 246-249 (1986))。由于其在宫颈癌中普遍表达, HPV E6 和 E7 抗原最有可能是免疫活性个体中与病毒相关的癌症的靶抗原。除了它们作为治疗性癌症疫苗的靶抗原的重要性以外,病毒相关的肿瘤抗原也是预防性疫苗的理想候选物。事实上,在亚洲预防性 HBV 疫苗的引入已经减少了肝癌的发病率 (Chang, M. H., 等. New Engl. J. Med. 336, 1855-1859 (1997)), 这对癌症预防产生了很大的影响。

[0347] 慢性人病毒感染方面最重要的病毒是人乳头瘤病毒 (HPV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、埃-巴二氏病毒 (EBV) 和单纯疱疹病毒 (HSV)。

[0348] 除了用于人癌症和感染性疾病外,本发明也可以在兽医领域来治疗动物疾病。因此,本发明描述的方法可以被本领域的普通技术人员现成的用来治疗牲畜的疱疹病毒感染,包含马疱疹病毒、牛疱疹病毒、小鸡和其它家禽中的马立克氏病病毒;动物逆转录病毒疾病、假狂犬病和狂犬病等。

[0349] 下述参考文献给出了基础病毒学,医学病毒学和兽医病毒学领域的原理和当前信息,全部通过参考结合于此:Fields Virology, Fields, BN 等., 编., LippincottWilliams&Wilkins, 纽约,1996;Principles of Virology:Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, Flint, S. J. 等., 编., Amer Society for Microbiology, Washington, 1999;Principles and Practice of Clinical Virology, 第四版, Zuckerman. A. J. 等., 编, John Wiley&Sons, 纽约, 1999;The Hepatitis C Viruses, by Hagedom, CH 等., 编, Springer Verlag, 1999;Hepatitis B Virus:Molecular Mechanisms in Disease and Novel Strategies for Therapy, Koshy, R. 等., 编., World Scientific Pub Co, 1998;Veterinary Virology, Murphy, F. A. 等., 编., Academic Press, 纽约, 1999;Avian Viruses:Function and Control, Ritchie, B. W., Iowa State University Press, Ames, 2000;Virus Taxonomy:Classification and Nomenclature of Viruses:Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, by M. H. V Van Regenmortel, MHV 等., 编, Academic Press;纽约, 2000。

[0350] 靶分子

[0351] 具有不同作用模式的许多种蛋白质已经被作为“靶”分子用于与抗原结合,优选作为融合多肽,以使抗原定位到细胞和亚细胞区室中,从而以更有效且有用的方式促进抗原呈递到 T 细胞上。

[0352] 抗原与热休克蛋白质 (HSP) 的连锁代表了一种潜在的用于提高核酸 (和其它的) 疫苗的有效性的方法。HSP 显然是癌症和病毒疫苗中的天然生物佐剂。驻留在内质网 (ER) 中的 gp96 HSP 和细胞质 Hsp70 都可以作为免疫佐剂 (Srivastava, PK 等., Semin. Immunol. 3, 57-64 (1991); Udono, H 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3077-3081 (1994))。这些 HSP 或陪伴蛋白结合大量的肽 (Lammert, E., 等. Eur. J Immunol. 27, 923-927 (1997))。Hsp70 是一种能将相关的蛋白质定位到蛋白体 - 主要的细胞蛋白酶复合体上的陪伴蛋白

质,其中的细胞蛋白酶复合体能产生肽以与MHC I类分子结合。因此,直接与Hsp70连结的抗原能更有效的被I类MHC呈递(引导产生,尤其是CTL应答)。有两个特征显然与HSP的佐剂性相关:(1)在体外,结合有gp96的肽能有效地将抗原导入到I类MHC处理途径中;(2)gp96与巨噬细胞的结合能诱导促炎细胞因子的分泌,于是扩大了肽抗原靶定的细胞的功能。

[0353] 用从肿瘤或从病毒感染细胞中分离的HSP复合体免疫能诱导有效的抗肿瘤免疫(Srivastava,PK等.,*Int J Cancer*. 33:417-22,1984;Srivastava,PK等.,*Proc Natl Acad Sci USA*. 83:3407-11,1986;Udono,H等.,*J Immunol*. 152:5398-5403,1994;Blachere,NE等.,*J Immunother*. 14:352-6,1993;Udono,H等.,见上文;Tamura,Y等.,*Science*. 278:117-20,1997;Janetzki,S等.,*J Immunother*. 21:269-76,1998)或抗病毒免疫(Heikema,A等.,*Immunol Lett*. 57:69-74,1997;Suto,R等.,*Science*. 269:1585-8,1995)。在体外将肽与HSP混合产生免疫原性的HSP-肽复合体(Ciupitu,AM等.,*J Exp Med*. 187:685-91,1998;Blachere,NE等.,*J Exp Med*. 186:1315-22,1997)。一些基于HSP的蛋白质疫苗涉及到抗原与HSP的融合(Suzue,K等.,*J Immunol*. 156:873-9,1996;Suzue,K.等.,*Proc Natl Acad Sci USA* 94:13146-51,1997)。最近,本发明人和其同事(如Chen,C-H等.,*Canc. Res*. 60:1035-1042(2000))在嵌合形式的DNA或RNA复制子疫苗中使用了HSP。它们使用HPV-16E7作为抗原,与结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)HSP70融合,表现出E7特异性CD8+T细胞的扩增和活化的增强,这导致对已有的肿瘤的有效抗肿瘤免疫(Lin,K.-Y.等.,*Cancer Res*. 56:21-26.,1996)。

[0354] 另一种有用的靶分子是假单胞菌外毒素A(ETA)的转运结构域,例如ETA的结构域II(dII)(包含残基253-364)。转运结构域是一种能诱导蛋白质或多肽转运到细胞的细胞质中的多肽。例如,类似的适用的多肽来源于白喉、梭状芽孢杆菌属(*Clostridia*)(肉毒杆菌(*botulinum*)、tetani)、炭疽病、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)或百日咳博德特氏菌毒素。在这种组合物的制备中,编码该毒素的毒素结构域的DNA优选被突变或缺失。

[0355] 钙网蛋白(CRT)是一个丰富的46kDa的蛋白质,定位在内质网(ER)腔中,该蛋白质表现出植物凝集素活性,已知与初生的糖蛋白质的折叠和组装有关(Nash(1994)*Mol. Cell. Biochem*. 135:71-78;Hebert(1997)*J Cell Biol*. 139:613-623;Vassilakos(1998)*Biochemistry* 37:3480-3490;Spiro(1996)*J Biol. Chem*. 271:11588-11594。被转运蛋白转运到ER中的肽与CRT结合,该转运蛋白与抗原加工相关,如TAP-1和TAP-2(Spee(1997)*Eur. J. Immunol*. 27:2441-2449)。CRT在体外与肽形成复合体。当将这些复合体给药于鼠时,引发肽特异性CD8+T细胞应答(Basu(1999)*J Exp. Med*. 189:797-802;Nair(1999)*J. Immunol*. 162:6426-6432)。从鼠肿瘤中纯化的CRT产生对用作CRT来源的肿瘤,而非抗原独特的肿瘤的特异免疫(Basu,见上文)。用结合肽的CRT在体外进一步刺激DC,该肽在上文的DC I型分子中被再次呈递,并刺激肽特异性的CTL(Nair,见上文)。

[0356] Flt-3配体在体内刺激DC前体的生长,并可促进大量DC的产生(Maraskovsky,E.等.,*J Exp Med*. 184:1953-62,1996;Shurin,MR.等.,*Cell Immunol*. 179:174-84,1997)。Flt3,一种鼠酪氨酸激酶受体(Rosnet,O.等.,*Oncogene* 6:1641-50,1991)是III型受体激酶家族的一个成员(参见Lyman,SD,*Curr Opin Hematol*. 5:192-6,1998)。在

造血组织中, Flt3 的表达只限于 CD34 阳性前体。Flt3 被用于鉴定和亚克隆相应的配体, Flt3-配体 (Lyman, SD 等., Cell 75 :1157-67, 1993 ;Hannum, C 等., Nature 368 :643-8, 1994)。合成的主要形式的 Flt-3 配体作为跨膜蛋白质,用蛋白质酶剪切从中制备出功能相似的可溶 ECD (Lyman 等, 见上文)。这些蛋白质结合并活化唯一的酪氨酸激酶受体。在造血细胞中, Flt-3 受体的表达主要限于最原始的前体细胞, 包含 DC 前体。Flt-3 配体的 ECD 对几种鼠模式肿瘤, 包含纤维肉瘤、乳房癌、肝癌、肺癌、黑素瘤和淋巴瘤产生强烈的抗肿瘤作用 (Lynch, DH 等., Nat Med. 3 :625-631, 1997 ;Chen, K 等., Cancer Res. 57 :3511-3516, 1997 ;Braun, SE 等., Hum Gene Ther. 10 :2141-2151, 1999 ;Peron, JM 等., J Immunol. 161 :6164-6170, 1998 ;Chakravarty, PK 等., Cancer Res. 59 :6028-6032, 1999 ;Esche, C 等., Cancer Res. 58 :380-383, 1998.) (19)。本发明人的同事将编码 HPV Ek7 蛋白的 DNA 与编码 Flt-3 配体 ECD 的 DNA 连接。用该构建体免疫, 大幅度地提高了 E7 抗原特异性 CD8+T 细胞的扩增和活性, 对已有的表达 E7 的转移性肿瘤产生了有效的抗肿瘤免疫。

[0357] 可以使用, HSV-1 蛋白质 VP22 是一种原型蛋白质, 由于具有杰出的细胞内转移性能, 该蛋白质能, 尤其是提高抗原的扩散 (Elliott, G., 和 P. O' Hare. 1997. Cell 88 :223-33)。例如, 与 p53 (Phelan, A. 等., 1998, Nat Biotechnol 16 :440-443) 或胸苷激酶 (Dilber, MS 等., 1999, Gene Ther 6 :12-21) 结合的 VP22, 在体外促进连接的蛋白质扩散到周围的细胞中和治疗模式肿瘤。在上文的 DNA 疫苗中, 与 HPV-16 E7 抗原连接的 VP22 引起了被免疫的鼠中的 E7 特异性 CD8+T 细胞前体数量的大幅度增加 (大约 50 倍), 使低效的 DNA 疫苗转变成对表达 E7 的肿瘤明显有效的疫苗。非扩散的 VP22 突变体不能增强疫苗的功效。VP22 和具有相似作用模式的蛋白质以几种方式来增强疫苗的功效:(1) 促进抗原从转染的细胞向周围 APC 的扩散, 从而增加通过 I 类 MHC 途径呈递抗原的 APC 的数量;(2) 在转染的细胞中更有效地呈递抗原;(3) 进行“交叉引发 (cross-priming)”从而释放 VP22/抗原融合蛋白质, 引起 DC (或其它的 APC) 的吸收和处理从而通过 MHC-I 限制性途径呈递 (Huang, AY 等., 1994, Science 264 :961-965)。

[0358] 那些本领域的普通技术人员了解如何来鉴定来自病原体的相关蛋白的合适表位如 CTL 表位, 以依照本发明来应用。

[0359] B7-DC DNA 向细胞和动物的转移

[0360] DNA 转移, 例如来实现通常已知的“基因治疗”, 涉及将“外源”DNA 导入到细胞中, 最后导入到活的动物中。几种常规的基因治疗技术已经被研究并被大量重复 (Yang, N-S., Crit. Rev. Biotechnol. 12 :335-356 (1992) ;Anderson, W. F., Science 256 :808-813 (1992) ;Miller, A. S., Nature 357 :455-460 (1992) ;Crystal, R. G., Amer. J Med 92 (suppl 6A) :44S-52S (1992) ;Zwiebel, J. A. 等., Ann. N. Y. Acad. Sci. 618 :394-404 (1991) ;McLachlin, J. R. 等., Prog Nucl. Acid Res. Molec. Biol. 38 :91-135 (1990) ;Kohn, D. B. 等., Cancer Invest. 7 :179-192 (1989), 这些参考文献全文通过参卡结合于此)。

[0361] 一个方法包含将核酸转移到培养的初级细胞中, 接着将来自体内的被转化的细胞自体移植到宿主中, 进行同源转移将转化的细胞转移到宿主中, 既可以转移到全身, 也可转移到具体的器官或组织中。

[0362] 为了实现本发明的目的, 通过将功能活性 DNA 在体内直接转移到哺乳动物的体组

织或器官中来实现核酸治疗。可以用下面描述的许多方法来实现 DNA 的转移。用选择性标记（如 G418 抗性）在体外检测这些系统是否成功表达以筛选表达 DNA 的转染的克隆，接着用产物的抗体通过合适的免疫测定法来检测 B7-DC 的表达产物是否存在（对可诱导的系统用诱导物处理之后）。该方法的有效性，包含 DNA 的吸收、质粒的整合和整合质粒的稳定性可以通过用已知的方法线性化质粒和用高分子量的哺乳动物 DNA 作为“载体”共转染而得以提高。

[0363] 现有技术中成功“基因转移”的报道的实例包含：(a) 将质粒 DNA 直接注射到鼠肌肉组织中，以引起在不确定的期限内标记基因的表达 (Wolff, J. A. 等., *Science* 247:1465(1990); Acsadi, G. 等., *The New Biologist* 3:71(1991)); (b) 逆转录病毒载体对体内和原位感染血管组织是有效的；(c) 将逆转录病毒制剂经门静脉注射和直接注射到肝中影响体内基因转移和表达 (Horzaglou, M. 等., *JBiol. Chem.* 265:17285(1990); Koleko, M. 等., *Human Gene Therapy* 2:27(1991); Ferry, N. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8387(1991)); (d) 将重组腺病毒气管内注入到肺组织中对于外源基因在肺呼吸上皮中的体内转移和长期表达是有效的 (Rosenfeld, M. A. 等., *Science* 252:431(1991)); (e) 单纯疱疹病毒载体能在体内将基因转移到脑组织中 (Ahmad, F. 等., 编, *Miami Short Reports-Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Human Genetic Disease*, 卷 1, BoerringerMannheim Biochemicals, USA, 1991)。

[0364] 逆转录病毒介导的人体治疗使用的是双嗜性、复制缺陷型的逆转录病毒系统 (Temin, H. M., *Human Gene Therapy* 1:111(1990); Temin 等., 美国专利 4,980,289; Temin 等., 美国专利 4,650,764; Temin 等., 美国专利号 5,124,263; Wills, J. W. 美国专利 5,175,099; Miller, A. D., 美国专利号 4,861,719)。这类载体已经被用来将功能性 DNA 导入到人细胞或组织中，例如，将腺苷脱氨酶基因导入到淋巴细胞中，将 NPT-II 基因和编码肿瘤坏死因子的基因导入到肿瘤渗入 (infiltrating) 淋巴细胞中。逆转录病毒介导的基因转移一般需要靶细胞增殖以用于基因转移 (Miller, D. G. 等., *Mol. Cell. Biol.* 10:4239(1990))。通过确信本发明的 DNA 分子将导入的优选的靶细胞即活跃生长的肿瘤细胞，而使该条件得到满足。通过任何方法用质粒转染和用逆转录病毒载体转染进行的囊性纤维化的基因治疗已经被 Collins 等., 美国专利 5,240,846 公开。

[0365] 编码 B7-DC 序列的 DNA 分子可以用包装细胞系包装到逆转录病毒载体中，其中的包装细胞系产生复制缺陷型逆转录病毒，如在本领域中所熟知的（参见，例如，Cone, R. D. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349-6353(1984); Mann, R. F. 等., *Cell* 33:153-159(1983); Miller, A. D. 等., *Molec. Cell. Biol.* 5:431-437(1985); Sorge, J., 等., *Molec. Cell. Biol.* 4:1730-1737(1984); Hock, R. A. 等., *Nature* 320:257(1986); Miller, A. D. 等., *Molec. Cell. Biol.* 6:2895-2902(1986))。能进行安全有效的基因转移的更新的包装细胞系也已经被公开 (Bank 等., 美国 5,278,056)。

[0366] 这个方法可以被用来以位点特异的方式将逆转录病毒载体转移到被选择的组织或器官中。因此，例如可使用导管转移系统 (Nabel, EG 等., *Science* 244:1342(1989))。使用逆转录病毒载体或脂质体载体的这类方法对于将表达的核酸转移到血管壁或肿瘤的血液循环中是特别有效的。

[0367] 也可以使用其它的病毒载体，包含神经元特异性转移和停留的重组腺病毒

(Horowitz, M. S., In: *Virology*, Fields, BN 等., 编, Raven Press, 纽约, 1990, 1679 页; Berkner, K. L., *Biotechniques* 6:616-919(1988), Strauss, S. E., In: *The Adenoviruses*, Ginsberg, HS, 编, Plenum Press, 纽约, 1984, 第 11 章), 单纯疱疹病毒 (HSV)。利用腺病毒载体进行人基因治疗的好处包括很少发生重组, 没有发现与这类病毒有关的人恶性肿瘤, 腺病毒的基因组是双链 DNA, 其可被处理以接受大到 7.5kb 大小的外源基因, 且活的腺病毒是安全的人疫苗生物体。根据本发明, 腺伴随病毒也被用于人的治疗 (Samulski, R. J. 等., *EMBO J.* 10:3941(1991))。

[0368] 能表达本发明的 DNA 分子, 且在本发明的治疗, 特别是对人的治疗中有用的另一种载体是痘苗病毒, 该病毒可制成非复制型 (美国专利 5,225,336; 5,204,243; 5,155,020; 4,769,330; Sutter, G 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:10847-10851; Fuerst, T. R. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86:2549-2553; Falkner F. G. 等.; *Nucl. Acids Res* (1987) 15:7192; Chakrabarti, S 等., *Molec. Cell. Biol.* (1985) 5:3403-3409)。有关重组痘苗病毒和其它含有异源 DNA 的病毒及其在免疫和 DNA 治疗方面的应用的描述见: Moss, B., *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1993) 3:86-90; Moss, B. *Biotechnology* (1992) 20:345-362; Moss, B., *Curr Top Microbiol Immunol* (1992) 158:25-38; Moss, B., *Science* (1991) 252:1662-1667; Piccini, A 等., *Adv. Virus Res.* (1988) 34:43-64; Moss, B. 等., *Gene Amplif Anal* (1983) 3:201-213。

[0369] 除了裸 DNA 或 RNA、或病毒载体外, 工程菌也可以用作载体。大量的细菌菌株包含沙门氏菌属 (*Salmonella*)、BCG 和单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)-(LM) (Hoiseh&Stocker, *Nature* 291,238-239(1981); Poirier, TP 等. *J. Exp. Med.* 168,25-32(1988); (Sadoff, J. C., 等., *Science* 240,336-338(1988); Stover, C. K., 等., *Nature* 351,456-460(1991); Aldovini, A. 等., *Nature* 351,479-482(1991); Schafer, R., 等., *J. Immunol.* 149,53-59(1992); Ikonomidis, G. 等., *J. Exp. Med.* 180,2209-2218(1994))。这些生物体用作疫苗载体表现出两个有前途的特性: (1) 肠途径注射, 提供了疫苗口服的可能性; 和 (2) 感染单细胞/巨噬细胞而将抗原定位到专门的 APC 上。

[0370] 除了病毒介导的体内基因转移外, 本领域公知的物理方法也可以用来直接转移 DNA, 包含给药质粒 DNA (Wolff 等., 1990, 见上文) 和粒子轰击介导的基因转移 (Yang, N.-S., 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9568(1990); Williams, R. S. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726(1991); Zelenin, A. V. 等., *FEBS Lett.* 280:94(1991); Zelenin, A. V. 等., *FEBS Lett.* 244:65(1989); Johnston, S. A. 等., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:11(1991))。另外, 电穿孔法, 一种公知的在体外将基因转移到细胞中的方法, 也能用于将本发明的 DNA 转移到体内组织中 (Titomirov, A. V. 等., *Biochim. Biophys. Acta* 1088:131(1991))。

[0371] “载体介导的基因转移”也已经有描述 (Wu, C. H. 等., *J. Biol. Chem.* 264:16985(1989); Wu, G. Y. 等., *J Biol. Chem.* 263:14621(1988); Soriano, P. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7128(1983); Wang, C-Y. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851(1982); Wilson, J. M. 等., *J. Biol. Chem.* 267:963(1992))。优选的载体是靶向脂质体 (Nicolau, C. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1068(1983); Soriano 等., 见上文), 如能

将酰化的 mAb 结合到脂质双分子层中的免疫脂质体 (Wang 等., 见上文)。也可以使用聚阳离子, 如脱唾液酸糖蛋白 / 聚赖氨酸 (Wu 等., 1989, 见上文), 其中的结合物包含识别靶组织的分子 (例如肝中的脱唾液酸血清类粘蛋白) 和一种结合 DNA 的化合物以结合待转染的 DNA。聚赖氨酸是一个 DNA 结合分子的实例, 它能结合 DNA 而不损害它。该结合物随后与本发明的质粒 DNA 结合以用于转移。

[0372] 用于转染或显微注射的质粒 DNA 可以用本领域公知的方法来制备, 如利用 Quiagen 的方法 (Quiagen), 接着用已知的方法进行 DNA 纯化, 如本文所列举的方法。

[0373] 此外, 如上述所提及, 按照本发明利用转导的 B7-DC 分子不需要稳定的表达。相反, 多肽的瞬时表达足以使转导细胞行使其免疫原性和 / 或共刺激功能。

[0374] 上文已经对本发明作了一般性说明, 通过参考下文的实施例将加深对本发明的理解, 本发明的实施例以举例的方式提供, 如果未说明, 这些实施例无意于对本发明进行限定。

[0375] 实施例 I

[0376] 材料和方法

[0377] 细胞的制备和培养

[0378] 6-12 周龄的雌性 BALB/c 小鼠从 NCI 购得, 用于制备 DC 和巨噬细胞。

[0379] 如前所述 (26), 在 RPMI-1640 (Gibco BRL) 培养基中培养来源于骨髓的 DC, 该培养基中补充有 5% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone)、青霉素 / 链霉素 ((JRHBiosciences)、庆大霉素 (Sigma)、非必需氨基酸 (JRH Biosciences)、L- 谷氨酸 (盐) (JRH Biosciences)、丙酮酸钠 (Sigma)、2- 巯基乙醇 (Sigma) 和 1000 单位 /ml 的重组鼠 GM-CSF (Immunex)。生长 8 天的来源于骨髓的 DC 通过常规的方法用单克隆抗体进行染色。从杂交瘤的上清液中纯化抗 II 类 MHC 的单克隆抗体, 14-4-4s。William Baldwin 博士, 约翰霍普金斯大学 (Johns Hopkins University) 友好地提供了 CTLA4-Ig 融合分子。I 类 MHC 的抗体 (28-14-8), F4/80 的抗体 (Cl. A3-1)、B7.1 的抗体 (1G10)、B7.2 的抗体 (GL1)、Fc γ RII/III 的抗体 (2.4G2) 和 Mac-1 的抗体 (M1/70) 购自 PharMingen。为了制备检测用 cDNA, 约翰霍普金斯大学肿瘤中心 (Johns Hopkins University Oncology Center) 用 14-4-4s 和 CTLA4-Ig 通过细胞分选仪纯化了生长 8 天的细胞。分选后 II^{hi} 类 MHC 和 B7^{hi} 种群的纯度是 93-98%。

[0380] 来源于骨髓的巨噬细胞培养在 RPMI-1640 培养基中, 该培养基中补充有 10% 的 FCS、青霉素 / 链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠、L- 谷氨酸 (盐)、2- 巯基乙醇和 250 单位 /ml 的重组鼠 M-CSF, 如前所述 (27), 用 500 单位 /ml 的 γ -IFN (PharMingen) 和 5 μ g/ml 的 LPS (Sigma) 处理。刺激后, 培养 10 天后用流式细胞计量 (cytometric) 分析确认 II 类 MHC 和 B7 的细胞表面表达。

[0381] 巨噬细胞系 WEHI-3, RAW264.7, J774.A.1, PU5-1.8 由 NIAID, 健康国家研究所 (National Institutes of Health) 的 Joshua Farber 博士提供。用 ATCC 推荐的培养基培养。

[0382] 异源混合的淋巴细胞反应

[0383] 生长 8 天的、特征在于 II^{hi} 类 MHC 和 B7^{hi} 的 BM 来源的 DC 被检测其在 MLC 中刺激异源 T 细胞的能力。通过将增加量的 BALB/c 刺激细胞加到 3×10^5 个异源 C57BL/6 淋巴细胞中, 在 96 孔平底微孔板中进行 MLC 反应。培养 3 天后, 向每个孔中再加入 1 μ Ci 的 [³H]-甲

基-胸苷 (Amersham), 培养 18h, 评定 T 细胞的增殖。然后收集细胞, 用 β 计数器 (Packard 96) 测定放射性的结合。

[0384] cDNA 减数杂交

[0385] 用 TRIzol (Gibco BRL) 抽提来自于分拣的 DC 和活化的巨噬细胞的总 RNA。用 Oligotex mRNA 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化信使 RNA。我们使用基于 PCR 的 SMART cDNA 合成系统 (Clontech) 来扩增 cDNA, 接着进行基于 PCR 的减数系统 PCR 选择 (Clontech)。按照制造商的方案进行减数。在最后一次减数 PCR 后, 将 DNA 片段连接到质粒载体 pCR2.1 (Invitrogen) 或 pCR Blunt (Invitrogen) 中。转化后, 培养每个克隆以进行质粒 DNA 扩增和小量制备 DNA, 然后用 EcoRI 消化以证实存在插入片段。然后进行质粒斑点印迹以证实该 cDNA 克隆是树突状细胞特异的。将碱变性的微量制备的 DNA 点样到 Hybond N+ 膜 (Amersham) 上与 SMART cDNA 探针杂交, 该探针来源于分拣的 DC 或活化的巨噬细胞。用随机引物标记法 (Stratagene Prime-It II), 使用 ^{32}P 标记这些 cDNA 探针, 如以前所述 (28) 进行杂交和冲洗。将膜曝光于胶片 (Amersham) 1-2 天, 并显影。

[0386] 质粒斑点印迹分析

[0387] 将碱变性微量制备的 DNA 样品点样到 Hybond N+ 膜 (Amersham) 上, 用来源于分拣的 DC 或活化的巨噬细胞的 SMART[®] cDNA 探针杂交。用随机引物标记法 (Stratagene Prime-It II), 使用 ^{32}P 标记这些 cDNA 探针。如以前所述 (cites ??) 进行杂交和冲洗, 将膜曝光于胶片 (Amersham) 1-2 天, 并显影。

[0388] cDNA 文库的构建和筛选——B7-DC 的克隆

[0389] 不经过分拣, 生长 8 天后收集骨髓来源的 DC。大约 20% -40% 的这些细胞高水平表达 II 类 MHC 和 B7。如上所述进行总 RNA 的抽提和 polyA RNA 的纯化。对于寡 dT 引导的 DC 文库构建, 我们使用 γ ZAP 表达 cDNA 合成系统 (Stratagene)。B7-DC 的 PCR DNA 片段标记作为探针用于筛选。根据 Stratagene 的方案进行膜转移、变性、复性。如上进行探针的放射标记、杂交、冲洗和放射自显影。分离阳性克隆, 进行二次筛选。二次筛选后, 通过体内切除来切除质粒, 通过斑点印迹和测序来检测。由 Core Facility 在约翰霍普金斯大学医学院 (Johns Hopkins University School of Medicine) 进行了序列测定。用 BLAST 程序在 Genbank (NCBI) 中进行核酸序列的同源性检索以确定其与先前报道的基因的相似性。从 DC cDNA 文库中分离出全长 B7-DC cDNA 克隆。用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 进行 5' -RACE。将 5' -RACE 产物克隆到 pCR2.1 载体中并进行测序。通过 RT-PCR 获得两个超过全长的 B7-DC, 比较它们的序列以避免序列错误。

[0390] 如下克隆人 B7-DC: 如前所述 (29), 在 GM-CSF+IL-4 或 GM-CSF+F1t-3L 中培养正常外周血单核细胞, 从中获得人 DC。同上抽提 RNA。BLAST 检索确定了重叠的 EST 克隆, GenBank 登记号为 AK001879, 其与鼠 B7-DC 的同源。同上进行 5' RACE。我们测出了一个 5' -RACE PCR 片段的序列, 设计了一个与人 B7-DC 的 5' -UTR 相应的引物。位于 B7-DC 的 5' -UTR 和 3' -UTR 中的下列引物被用来扩增全长的人 B7-DC:

[0391] 5' -GGAGCTACTGCATGTTGATTGTTTTG-3' [SEQ ID NO :6] 和

[0392] 5' -TGCAAAGTGGAGGCACTGAAAAGTC-3' [SEQ ID NO :7]

[0393] 人和鼠 B7-DC cDNA 的全长 cDNA 序列已经保藏在 EMBL/GenBank/DBS, 其登记号为 AF329193 和 AF142780。

[0394] BAC(129SVJ) 文库的筛选 / 基因组克隆和作图

[0395] 按照制造商的方案 (Genome Systems, Inc.) 进行 BAC 文库筛选。所用的引物是 :

[0396] 5' -TTGTTGTCTCCTTCTGTCTCCCAAC-3' [SEQ ID NO :8] 和

[0397] 5' -ACAGTTGCTCCTTGTATCAGGTC-3' [SEQ ID NO :9]

[0398] 筛选 BAC 文库获得 3 个阳性克隆。通过荧光原位杂交 (Genome Systems Inc.) 绘制染色体定位图谱。总共分析了 80 个中期细胞, 79 个显示特异性标记。通过使用商售的生物信息学工具、NCBI 的 BLAST 程序和国际 RH 作图协定 (Mapping Consortium) 来定位人 B7-DC 基因。在 htsg 中检索该 hB7-DC 序列, 发现其定位于两个定位在 9 号染色体的 BAC 克隆 RP11-574F11 (AL162253) 和 Rp11-635N21 (AL354744) 中。

[0399] 病毒的 Northern 印迹

[0400] 4-6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠购自 NCI, 并用于制备组织 RNA。如上述进行 RNA 抽提和组织 SMART cDNA 合成, 分拣 DC 和活化的巨噬细胞。用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化 SMART PCR cDNA。0.5 μ g / 泳道的纯化的 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶上跑电泳, 转移到 Nytran 尼龙膜 (Schleier 和 Schuell) 上。为了制备放射性探针, 我们以来源于减数文库的质粒 DNA 为模板进行了扩增。我们利用质粒 DNA 的克隆位点的临近位置的引物对通过 PCR 扩增 DNA, 将每个克隆的纯化的 PCR DNA 用作杂交探针。这些引物的核苷酸序列如下 :

[0401] 5' -GTAACGGCCGCCAGTGTGCTG-3' [SEQ ID NO :10] 和

[0402] 5' -CGCCAGTGTGATGGATATCTGCA-3' [SEQ ID NO :11]

[0403] 还进行了人 DC 和对照胎盘的总 RNA 的病毒 Northern 分析。所用探针和 RNA 的制备如上所述。探针的放射性标记、杂交、冲洗和放射自显影也如上所述进行。

[0404] 仓鼠抗 mB7-DC Ab 产物

[0405] DC2.4、RAW246.7 和 RENCA 细胞系中的稳定的 B7-DC 转染子被用来免疫美国仓鼠。将 B7-DC 克隆到修饰的 pCAGGS 载体 (30) 中。用含有 B7-DC 的质粒 (Rockland) 加强免疫该仓鼠三次。该研究中使用的抗 B7-DC 抗体来自三只被免疫的仓鼠中的一只的血清。

[0406] CD28-Ig、CTLA4-I 和 PD-1-Ig 结合试验

[0407] 利用脂转染胺 2000 (Gibco BRL), 用 B7.1-pCAGGS、B7-DC-pCAGG、PD-1-pCAGGS 或单独的载体转染 293T 细胞。24h 后, 在 FACS 缓冲液 (1 \times HBSS, 2% 小牛血清, 10mM HEPES 和 0.1% NaN_3) 中重悬浮细胞, 在 4 $^{\circ}$ C 下 1000rpm 旋转 5 分钟。然后倒掉缓冲液, 将抗体加到试管中, 4 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟, 用 FACS 缓冲液冲洗两次, 对于二级抗体重复这个程序。在 FACScan 上走样。将 B7.1 抗体进行 1 : 5 的稀释, 10 μ l / 样品 (Gal-Tag)。将重组的 CD28-Ig、CTLA-4-Ig 和 PD-1-Ig 嵌合体分别以 2 μ g/ml、10 μ l / 样品的浓度使用 (R&D System, Inc)。羊 F(ab')₂ 抗人 IgG-PE 作 1 : 20 的稀释后使用 (Southern Biotechnology Associates, Inc.)。

[0408] B7-DC-Ig 二聚体的合成

[0409] 通过在 pIg-Tail Plus 载体 (R&D systems) 中融合编码 B7-DC N 末端氨基酸的序列和编码人 IgG₁Fc C 末端氨基酸的序列制备 B7-DC-Ig 构建体, 其中的 B7-DC 的 N-末端氨基酸不含有阅读框内的跨膜结构域。利用脂转染胺 2000 (Gibco BRL) 或 GINE JAMMER (Stratagene), 用 pIg/B7-DC 瞬时转染 COS-7 细胞。通过饱和硫酸铵沉淀从无血清的上清液中纯化 B7-DC-Ig 融合蛋白质。SDS-PAGE 和银染证实了其纯度 > 90%。

[0410] T 细胞增殖和细胞因子试验

[0411] 对于抗 CD3 的共刺激试验, 96 孔平底板 (购自 Dynex 的 Immulon 4) 用抗 CD3 抗体 (2C11, Pharmingen) 和 B7. 1-Ig (R&D System), 和在 $1 \times \text{PBS}$ (Gibco) pH7. 4 中稀释的 100 ng/ml B7-DC-Ig 或同型对照 (Sigma) 在 37°C 下预包被 2 小时。然后用 $1 \times \text{PBS}$ 冲洗平板 3 次, 用补充有 10% FCS、青霉素 / 链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠、L- 谷氨酸 (盐)、2- 巯基乙醇的 RPMI1640 培养基封闭平板半小时, 再加入 T 细胞。从 6-10 周龄的 BALB/c 小鼠中获取脾和淋巴结。用间接方法, 用 ACK 缓冲液裂解 RBC, 用 dynabeads M-280 (Dynex) 纯化 T 细胞。用 PBS pH 7. 4+1% FCS 冲洗该珠子两次, 再加入细胞, 将由抗 IE^d 和 B220/CD45RO 或 CD8 α (Pharmingen) 组成的抗体混合物加到细胞中, 伴随着双向混合于 4°C 温育 30'。将试管放在 Dynal MPC 5' 来分离细胞, 1500 rpm 离心 5', 用 $2 \times \text{PBS}$ pH7. 4+1% FCS 冲洗两次以除去未结合的 Ab。用温育 15', 以 2×10^5 细胞 / 孔接种细胞来重复同样的步骤。温育 72h 后, 将 $10 \mu\text{l}$ ^3H - 胸苷 ($1 \mu\text{Ci}$ / 孔) 加入到每个孔中, 温育 18h。用一个 Packard Micromate 细胞收集器收集细胞, 在 Packard Matrix 96 直接 β 计数器上读数过滤物。

[0412] 对于利用呈递 HA 抗原的 RENCA 系统进行的共刺激试验, 用补充有 10% FCS、青霉素 / 链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠的 RPMI-1640 培养基培养 RENCA 细胞。用 $\text{IFN-}\gamma$ (75 U/ml) 诱导细胞 72hr 以使 II 类 MHC 表达。然后照射 13, 200 拉德, 以为 2×10^4 细胞 / 孔 (96 孔平底板) 接种。然后, 向孔中加入 $2.5 \mu\text{g}$ / 孔的 HA110-120 肽和不同浓度的 Ig 融合分子。如上所述分离转基因 I-E^d +HA 特异性 T 细胞 (H. vonBoehmer 惠赠, 哈佛大学), 以 4×10^5 细胞 / 孔接种。温育 48hr 后, 将 $10 \mu\text{l}$ ^3H - 胸苷 ($1 \mu\text{Ci}$ / 孔) 加入到每个孔中并温育 18hrs。用一个 Packard Micromate 细胞收集器收集细胞, 在 Packard Matrix 96 直接 β 计数器上读数过滤物。

[0413] 为了通过 ELISA 分析细胞因子产物, 如上文所述进行培养, 在指定的时间收集上清液。用可商购的 ELISA 试剂盒 (Endogen) 及 IL-4 和 IL-6 (R&D 系统) 测定 IL-2、IL-10 和 $\text{IFN-}\gamma$ 的浓度。

[0414] 体内共刺激

[0415] 将来源于 TCR 转基因鼠系 6. 5 的混合的腋窝、腹股沟、子宫颈和肠系膜的 LN 在 RPMI 培养基 (GIBCOBRL) 中离解, 通过 $100 \mu\text{m}$ 的尼龙细胞过滤器, 在灭菌的 Hank' s 缓冲液 (GIBCO BRL) 中冲洗, 其中的转基因鼠系 6. 5 在 B10. D2 遗传背景下能表达一个识别 I-E^d 表位 ($^{110}\text{SFERFEIFPKE}^{120}$ [SEQ ID NO: 12]) 的 TCR。FACS[®] 着色以测定典型克隆的 CD4 细胞的比率后, 在 0.2 ml 灭菌 Hank' s 缓冲液中含有 2.5×10^6 典型克隆细胞的细胞制剂静脉内 (i. v.) 注射到受体 B10. D2 小鼠的尾静脉中。进行这种转移 3 天后, 通过皮下 (s. c) 注射到后脚掌 (hind footpad) 中来免疫动物。每一只小鼠接受三种制剂中的一种的两侧注射:

[0416] (A) 以 1 : 1 的体积比与不完全氟氏佐剂 (IFA) (Sigma) 结合的 $10 \mu\text{g}$ 合成的 HA (每个脚掌) (HA 肽 (111-120)),

[0417] (B) 含有 $25 \mu\text{g}$ B7-DC-Ig 的 HA-IFA 混合物, 或

[0418] (C) 含有 $25 \mu\text{g}$ 同型对照抗体的 HA-IFA 混合物。7 天后, 收获排出的 LN 节; 1.5×10^5 个 LN 细胞与指定浓度的合成 HA 肽一起在圆底 96 孔组织培养板中培养。通过用 $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] 胸苷脉冲培养物 48 小时, 再培养 12 小时后收集, 检测结合的放射性的量来进行增殖试验。

[0419] 实施例 II

[0420] B7-DC 的鉴定和表征

[0421] 从 DC 和活性巨噬细胞间的减数文库中分离 B7-DC。这两个用于 cDNA 减数的细胞群是作为“测试”群的骨髓来源的 GM-CSF 培养的 DC 和作为“驱动”群的 γ -干扰素 +LPS 活化的粘性骨髓来源的 M-CSF 巨噬细胞。生长 8 天的 II^{hi}类 MHC B7^{hi} “成熟”DC 被分拣至 >93% 的纯度用作测试 cDNA 的来源。通过流式细胞计, DC 被表征为比巨噬细胞具有大约高 50 倍的 II 类 MHC 水平。这两个群都表达 B7.1 和 B7.2,但在 DC 中 B7.2 的水平要高得多。F4/80 和 CD16 在巨噬细胞群中的表达水平较高。对这两个细胞群进行功能性比较证实 DC 群在刺激同种异型混合淋巴细胞反应方面比巨噬细胞群大约有效 100 倍。

[0422] 从两个群中抽提 RNA 后,我们使用一个基于 PCR 的 cDNA 合成系统,接着进行基于 PCR 的减数步骤,PCR 筛选。我们将差异性表达的克隆中的一个命名为 B7-DC,其中的克隆编码一个新的免疫球蛋白超基因家族成员。小鼠 B7-DCcDNA 的长度为 ~ 1.7kb,编码一个 247 个氨基酸 (aa) 的含有一个 23aa 的 N 末端信号肽的前体蛋白质,分子量预计为 ~ 25kd(表 1)。用 SOSUI 程序 (31) 鉴定推导的前导序列和跨膜结构域。在 mB7-DC 的 23aa 的跨膜结构域中发现两个带电荷的氨基酸,表明该处为结合配偶体。在氨基酸水平,小鼠 mB7-DC 与人 B7-DC 具有 70% 的同源性,这表明它们是直向同源的 (orthologues) (见下表)。hB7-DC 稍微不同于小鼠 B7-DC,因为它具有一个较长的细胞质尾巴。

[0423] 通过同源性检索,发现 B7-DC 与 B7-H1 (34% 的同一性,48% 的相似性) (表 2)、含量较低的嗜乳脂蛋白 (30% 的同一性,45% 的相似性) 具有很高的同源性,与 B7.1 和 B7.2 具有 < 20% 的同一性 (表 3)。系统发育研究表明,嗜乳脂蛋白可能通过外显子改组 (exon shuffling) (32,33) 与 B7 家族发生联系。它们每一个都含有典型的 IgV-IgC 结构和跨膜结构域。与其它的 B7 家族成员相反,小鼠 B7-DC 具有非常短的细胞质尾巴 (4aa)。

[0424] 表 1

[0425] 小鼠 B7-DC 和人 B7-DC 的氨基酸序列比较。上划线标出 mB7-DC 推导的前导区和跨膜结构域。利用 Clustalw Gonnet Pam250 矩阵进行对比,[*] 表示一致的氨基酸,[:] 表示保守的取代,对于免疫球蛋白 V 区或 C 区内的二硫键的形成很重要的半胱氨酸残基用斜体表示。

[0426] 推导的前导序列

[0427] mB7-DC MLLLLPILNLSLQLHPVAALFTVTAPKEVYTVDVGSSVSLECFDRRECTELEGIRAS LQ

[0428] hB7-DC MIFLLLMLSLELQLHQIAALFTVTPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITAS LQ

[0429] * : * * : * . * . * * * * : * * * * * * * . * * * : * : : * * . * : * * * : * * . . : * . * * * * *

[0430] mB7-DC KVENDTSLQSERATLLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAAWDYKYLTVK VK

[0431] hB7-DC KVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCII IYGVAWDYKYLTLK VK

[0432] * * * * * * * : * . * *

[0456] mB7-H1 RSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELI IPELPATHPPQ
NR
[0457] .. : * * * ; * * * * * : : ... * * * * . : : : . : * * * . . * *
[0458] mB7-DC T-WPLHVFIPACTIALIFLAIVIIQRKRI-----
[0459] mB7-H1 THWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET
[0460] * * * * * . : : : . : : : * :

[0461] 表 3

[0462] B7-DC 与 B7 家族成员的氨基酸序列比较

参考 B7 蛋白质	比拟	%同一性 ¹	%相似性 ²
mB7-DC	hB7-DC	70	80
	hBT3.1	25	41
mB7-DC	mB7-H1	34	48
	mBT ⁴	30	45
	mB7.1	-	- ³
	mB7.2	-	-
	mB7RP-1/B7h	-	-
MBT	mB7.1	24	48
	mB7.2	24	40
MB7.1	mB7.2	27	45
MB7-H1 ⁵	mB7.1	23	40
	mB7.2	25	49
	mB7RP-1/B7h	24	41
	mBT	24	45

[0464] 用 NCBI blast2 检索 (矩阵 BLOSUM62) 进行比较

[0465] 1. 在相应的位点一致的氨基酸

[0466] 2. 在相应的位点相似的氨基酸 - 如下分组 : (A, G) ; (S, T) ; (E, D) ; (R, K, H) ; (Q, N) ; (V, I, L, M) ; (Y, F) ; (W) ; (C) ; (P)

[0467] 3. 用矩阵 BLOSUM62 没有发现明显的相似性

[0468] 4. BT = 嗜乳脂蛋白质

[0469] 5. = PDL-1

[0470] 为了测定 mB7-DC 的基因组结构, 本发明通过利用 5' 和 3' UTR 探针筛选一个混合的细菌人工染色体 (BAC) 文库, 分离出一个基因组克隆。用 BAC 克隆作染色体定位图。用荧光原位杂交 (FISH) 进行 B7-DC 的染色体定位。测定 10 个特异性标记的 19 号染色体, 证实 mB7-DC 定位在异染色质 - 常染色质的边界到 19 号染色体的端粒间距离的 47% 处, 即条带 19C2 和 19C3 界面的相应区域。在带有荧光素的抗洋地黄毒苷抗体中温育杂交玻片, 然后计算被 DAPI 着色的点来检测特异性杂交信号。这个座位相应于人 9 号染色体的区域, 在此处 hB7-H1 被定位。

[0471] 发现 hB7-DC 定位在两个 9 号染色体 BAC 克隆上。另外, 发现 hB7-DC 和 hB7-H1

都定位在单一 9 号染色体 BAC 克隆上,该克隆带有约 164kb 的插入大小(图 1)。B7-DC 和 B7-H1 基因组的接近使人联想到 B7.1/B7.2 对,它们彼此定位于 1 兆碱基对内的范围内。

[0472] 实施例 III

[0473] 在树突状细胞中选择性表达 B7-DC

[0474] 为了测定 B7-DC 的表达方式,用 RNA 进行病毒 Northern 分析,其中的 RNA 从各种组织、巨噬细胞系、巨噬细胞培养物和来源于骨髓和脾的树突状细胞中抽提得到。用 B7-DC 探针在未成熟的(4,6 天)和成熟的(8 天和经过分拣的 MHCII^{hi}B7^{hi})骨髓来源的 DC 和脾 DC 中检测到强烈的杂交,而在 4 种巨噬细胞系、活化的 BM 巨噬细胞或腹膜巨噬细胞的任何一个中都没有检测到信号(图 2)。用加有 IL-4 或 Flt-3L 的 GM-CSF 培养外周血单核细胞,在从中生长的人 DC 中检测到 hB7-DC 的强烈表达(图 3)。为了检验 B7-DC 蛋白质的细胞表面表达,利用抗 m B7-DC 抗体来着染 DC。用可溶性 B7-DC-Ig 封闭,在 DC 上发现有染色(图 4)。

[0475] B7-DC 不与 CD28 或 CTLA-4 结合,但与 PD-1 结合

[0476] 虽然 B7-DC 具有与 B7 家族同源的结构和序列,但它不含有推断的 CD28/CTLA-4 结合序列, SQDXXXELY[SEQ ID NO:13] 或 XXXYXXRT[SEQ ID NO:14] (34) (其中 X = 任何氨基酸)。为了直接评价结合,研究了二聚体 CD28-Ig 和 CTLA-4-Ig 着色经 B7-DC 或 B7.1 转染的 293T 细胞的能力。B7.1 转染子发现强烈的结合,而 B7-DC 转染子没有结合(图 5)。基于 B7-DC 和 B7-H1/PD-L1 的同源性(homology)和基因组近似性,进行试验来测试作为 B7-DC 候选的结合配偶体的 PD-1。实际上,PD-100IG 与 B7-DC 转染子结合,但不与 B7.1 转染子结合。BPD-1-Ig 与 B7-DC 转染子的结合比 CTL-4-Ig 和 CD28-Ig 与 B7.1 转染子的结合低,虽然它是特异性的。稳定的 B7-DC-GFP 转染子与 PD-1-Ig 发生的阳性染色进一步证实了 PD-1 能与 B7-Dc 结合。因此可以得出结论,如同 B7-H1 和 B7h/B7RP-1 一样,B7-DC 不以 CD28 或 CTLA-4 作为受体。相反,PD-1 似乎是 B7-DC 的受体。

[0477] 实施例 IV

[0478] B7-DC 作为 T 细胞共刺激分子的功能

[0479] 制备能加到 T 细胞刺激检测中的可溶的 B7-DC-Ig 融合蛋白质以用来检测 B7-DC 是否具有共刺激活性。在存在 B7-DC-Ig、B7.1-Ig 或一种同型对照的情况下,通过增加固定的抗 CD3 的量来检测 T 细胞对刺激的增殖应答。图 6(左图)显示了在存在最适度以下的抗 CD3 浓度时,B7-DC 比 B7.1 更大地共刺激 T 细胞增殖应答。而且,在 CD4 细胞中 B7-DC 共刺激的增殖应答比在 CD8 细胞中更高(图六右)。在缺乏 TCR 集中的刺激物时,B7-DC 不能刺激 T 细胞,这表明 B7-DC 提供了一个真实的共刺激信号。

[0480] 当 MHC 肽复合体产生“信号 1”时,B7-DC 也共刺激增殖应答。用 γ -IFN 处理 RENCA 细胞(通过 RT-PCR 分析,该细胞不表达内源性 B7.1, B7.2 或 B7-DC)以诱导 II 类 MHC 的表达。这些细胞携带有 I-E^d限制性 HA110-120 肽(FERFEIFPKE) (35) [SEQ ID NO:15]。加入从 I-E^d+HA 110-120 特异性 TCR 转基因小鼠系中纯化的脾 T 细胞,在存在 B7-DC-Ig、B7.1-Ig 或同型对照的情况下测定增殖应答。图 7 显示 B7-DC 比 B7.1 具有更大的共刺激活性。

[0481] B7-DC 共刺激产生淋巴因子的方式

[0482] 对 B7 家族分子共刺激的最佳表征的 T 细胞应答是产生淋巴因子。这些淋巴因子是重要的 T 细胞效应介质。研究分析了 T 细胞产生的许多不同的淋巴因子,其中的 T 细胞

已经被抗 CD3 或 HA 抗原 (图 8) 刺激并被 B7-DC-Ig、B7.1-Ig 或同型对照共刺激。淋巴因子共刺激的方式相当一致,无论是用抗 CD3 或 MHC 肽复合体作为“信号 1”。显然,B7-DC 比 B7.1 共刺激更高水平的 γ -IFN。B7-DC 还共刺激产生大量的 IL-6,而 B7.1 实际上共刺激完全没有产生。当两个分子共刺激产生 IL-2 时,B7.1 比 B7-DC 更有效。因此,B7-DC 和 B7.1 共刺激的方式是不同的,在共刺激重要的促炎淋巴因子方面 B7-DC 更有效。

[0483] 实施例 V

[0484] B7-DC 提高体内免疫反应

[0485] 为了确定 B7-DC 在体内是否具有生物活性,本发明人研究了对于肽疫苗, B7-DC-Ig 是否能提高免疫反应。将 B7-DC-Ig 或一个同型对照抗体加到 HA 110-120 肽和 IFA 的免疫原性混合物中。为了对体内的 HA 特异性 CD4T 细胞进行计数,免疫前 3 天,将 2.5×10^6 抗 HA 6.5T 细胞转到小鼠中。免疫 7 天后,收集排出的 LN 细胞,用不同量的 HA110-120 肽体外刺激细胞 2 天。图 9 显示了加入的 B7-DC-Ig 实际上大幅度提高了对 HA 的增殖应答。相对于同型抗体对照,加入 B7-DC-Ig 的组在排出的 LN 中 HA 特异性 T 细胞的总量增加了大约 2 倍。因此,可以推断 B7-DC 具有提高抗原特异性反应的能力,甚至在每一个细胞基础上。

[0486] 实施例 VI

[0487] 讨论和结论

[0488] 本发明人已经发现并表征了一种新的 B7 家族成员,其表达被高度限制在 DC 中,且具有独特的 T 细胞共刺激性能。B7-DC 的人直向同源物也在 DC 中表达。

[0489] 与以前所描述的 B7 家族成员不同,该限制性表达方式表明了 B7-DC 参与不同于已知的 B7.1/2 途径的免疫反应。当在活化的巨噬细胞中检测到一个弱的 B7-DC 信号时,进行的初步实时 RT-PCR 分析表明 B7-DC mRNA 在 DC 中的表达比在活化的巨噬细胞中高 > 15 倍。同样,用抗体着色技术在活化的巨噬细胞表面检测到非常低水平的 B7-DC。不清楚这是否足够用于有效的 T 细胞活化。

[0490] 与其它 B7 家族成员比较,B7-DC 共刺激产生淋巴因子的不寻常方式意味着一个独特的生物学作用。细胞因子的传统分类如下:Th1 细胞因子包含 IL-2、 γ -IFN 和淋巴毒素;Th2 细胞因子包含 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13(36)。B7-DC 不诱导任何一类 Th1 或 Th2 淋巴因子分布(profile)。B7-DC 诱导非常少的 IL-4,不诱导 IL-10。然而,IL-6 被认为是一种 Th2 细胞因子。相对于 B7.1, B7-DC 共刺激的较低的 IL-2 和较高的 γ -IFN 不符合标准的 Th1 模式。但是,高的 γ -IFN 产量表明了 B7-DC 引起了重要的 T 细胞效应物功能。

[0491] B7-DC 共刺激 IL-6 的能力值得注意。由 B7-DC 诱导的强烈的 T 细胞增殖反应是部分由于其强烈地共刺激产生 IL-6,这在用 B7.1 的情况下观察不到。IL-6 是 T 细胞增殖的一个有效的扩增剂(与其它的增殖刺激物结合)(37,38)。IL-6 是一种多功能的细胞因子,不仅能调节 T 细胞的功能,还能调节促炎反应、单核细胞的分化、B 细胞的分化、血栓形成、骨吸收和某些造血肿瘤的生长(39,40)。IL-6 与可溶性 IL-6 受体(sIL-6R)合作诱导趋化因子和白细胞募集(41)。它可以通过 Stat-3 活化介导有效的抗编程性细胞死亡作用。已经报道了在 T 细胞中依赖于 Stat-3 活化的 IL-6 是活化的 T 细胞存活的一个重要途径(42,43),尽管其它报道推测 Stat-3 在静息 T 细胞方面发挥作用。

[0492] 虽然 B7-DC 不与 CD28 或 CTLA-4 结合,但它结合 PD-1, B7-H1/PD-L1 的一个受体

(22, 47, 48)。它是否结合 B7h/B7RP-1 的一个受体 (23-25, 44-46)-ICOS 还没有确定。B7-DC 与 B7-H1/PDL-1 间明显的同源性 (比 B7. 1 和 B7. 2 间的同源性高)、hB7-H1/PD-L1 与 hB7-DC 相似的物理连锁及它们与共同的受体结合表明它们通过一个相对新近的基因复制事件产生关连。这与 B7. 1 和 B7. 2 的关系相似, B7. 1 和 B7. 2 都定位在鼠 16 号染色体和人 3 号染色体的一个兆碱基对范围内 (49)。

[0493] 弄清楚当 PD-1 和其它的推断受体介导时, B7-DC 对 B7-H1/PD-L1 的相对生物作用是重要的。在 T 细胞活化后 PD-1 被表达, 并且似乎抑制 T 细胞活化。在用高浓度的抗 CD3 刺激 T 细胞的条件下, PD-1 引起细胞编程性死亡。PD-1 可以剔除小鼠出现自身免疫综合症 (22), 其表征为心肌肥大症的临床表现形式。相反, Dong 等 (21) 报道在较低浓度的抗 CD3 下, B7-H1/PD-L1 共刺激 T 细胞增殖和细胞因子的释放。根据 CD28/CTLA-4 的关系类推, PD-L1 可以是一种仍没有鉴定的活性受体的反受体。尽管具有结合 PD-1 的性能, B7-DC 和 B7-H1 在它们的淋巴因子共刺激方式方面是不同的; B7-H1 共刺激 T 细胞 IL-10 产物, 而 B7-DC 不能。B7-DC 的独特的细胞表达方式和共刺激作用表明了其在免疫作用中具有独特的作用。

[0494] 上文和下文中引用的参考文献全部以参考的方式加入本文, 无论其是否是具体地加入。

[0495] 已经对本发明作了充分的描述, 本领域的普通技术人员能够理解, 在不偏离本发明的精神和范围的情况下, 在一个宽的等同参数、浓度和条件范围内也能实施本发明, 而不需要过多的试验。

[0496] 尽管已经结合本发明的具体实施方案对本发明作了描述, 但是应该理解为能够对本发明作进一步的改进。本申请倾向于涵盖通常遵循本发明的基本原则的任何变化、应用或改进, 包含相对于本发明的这类偏离, 例如在本发明属于的领域中已知的或通常的实践范围内的偏离, 和例如可以应用到上文的必要技术特征中的偏离, 这些必要技术特征在后附的权利要求的范围之内阐明。

[0497] 引用的文献

[0498] 除了在正文中全部引用的文献外, 有些文献仅通过数字引用 (附加说明的); 后者列出如下:

[0499] 1. Hathcock, K. S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley, and R. J. Hodes. 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 180, no. 2 :631.

[0500] 2. Razi-Wolf, Z., G. J. Freeman, F. Galvin, B. Benacerraf, L. Nadler, and H. Reiser. 1992. Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, no. 9 :4210.

[0501] 3. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9 :271.

[0502] 4. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, no. 6673 :245.

[0503] 5. Patterson, S. 2000. Flexibility and cooperation among dendritic cells.

Nature Immunol. 1, no. 4 :273.

[0504] 6. Langenkamp, A. , M. Messi, A. Lanzavecchia, and S. Federica. 2000. Kinetics of dendritic cell activation : impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. Nature Immunol. 1, no. 4 :311.

[0505] 7. Thompson, C. B. , T. Lindsten, J. A. Ledbetter, S. L. Kunkel, H. A. Young, S. G. Emerson, J. M. Leiden, and C. H. June. 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. Proc Natl Acad Sci USA 86, no. 4 :1333.

[0506] 8. Harding, F. A. , J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, and J. P. Allison. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature 356, no. 6370 :607.

[0507] 9. Linsley, P. S. , W. Brady, L. Grosmaire, A. Aruffo, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. J Exp Med 173, no. 3 :721.

[0508] 10. Fraser, J. D. , B. A. Irving, G. R. Crabtree, and A. Weiss. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. Science 251, no. 4991 :313.

[0509] 11. Lindstein, T. , C. H. June, J. A. Ledbetter, G. Stella, and C. B. Thompson. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. Science 244, no. 4902 :339.

[0510] 12. Linsley, P. S. , W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. J Exp Med 174, no. 3 :561.

[0511] 13. Waterhouse, P. , L. E. Marengere, H. W. Mittrucker, and T. W. Mak. 1996. CTLA-4, a negative regulator of T lymphocyte activation. Immunol Rev 153 :183.

[0512] 14. Kuchroo, V. K. , M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi, and L. H. Glimcher. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways : application to autoimmune disease therapy. Cell 80, no. 5 :707.

[0513] 15. Lanier, L. L. , S. O' Fallon, C. Somoza, J. H. Phillips, P. S. Linsley, K. Okumura, D. Ito, and M. Azuma. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. J Immunol 154, no. 1 :97.

[0514] 16. Van Parijs, L. , M. P. Sethna, A. N. Schweitzer, F. Borriello, A. H. Sharpe, and A. K. Abbas. 1997. Functional consequences of dysregulated B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression in B or T lymphocytes of transgenic mice. J Immunol 159, no. 11 :5336.

[0515] 17. Abbas, A. K. , and A. H. Sharpe. 1999. T-cell stimulation : an abundance of

B7s[news ;comment]. Nat Med 5, no. 12 :1345.

[0516] 18. Borriello, F. , M. P. Sethna, S. D. Boyd, A. N. Schweitzer, E. A. Tivol, D. Jacoby, T. B. Strom, E. M. Simpson, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 1997. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6, no. 3 :303.

[0517] 19. Sharpe, A. H. 1995. Analysis of lymphocyte costimulation in vivo using transgenic and 'knockout' mice. *Curr Opin Immunol* 7, no. 3 :389.

[0518] 20. Green, J. M. , P. J. Noel, A. I. Sperling, T. L. Walunas, G. S. Gray, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1994. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1, no. 6 :501.

[0519] 21. Dong, H. , G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T cell proliferation and interleukin-10 secretion [see comments]. *Nat Med* 5, no. 12 :1365.

[0520] 22. Freeman, G. J. , A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, no. 7 :1027.

[0521] 23. Swallow, M. M. , J. J. Wallin, and W. C. Sha. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity* 11, no. 4 :423.

[0522] 24. Wang, S. , G. Zhu, A. I. Chapoval, H. Dong, K. Tamada, J. Ni, and L. Chen. 2000. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96, no. 8 :2808.

[0523] 25. Yoshinaga, S. K. , J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M. A. Coccia, T. Kohno, A. Tafuri-Bladt, D. Brankow, P. Campbell, D. Chang, L. Chiu, T. Dai, G. Duncan, G. S. Elliott, A. Hui, S. M. McCabe, S. Scully, A. Shahinian, C. L. Shaklee, G. Van, T. W. Mak, and et al. 1999. T cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, no. 6763 :827.

[0524] 26. Inaba, K. , W. J. Swiggard, R. Steinman, N. Romani, and G. Schuler. 1998. Isolation of dendritic cells. John Wiley & Sons, Inc. , New York.

[0525] 27. Fortier, A. H. , and L. A. Falk. 1994. Isolation of murine macrophages. John Wiley & Sons, Inc. , New York.

[0526] 28. Orimoto, K. , H. Tsuchiya, J. Sakurai, M. Nishizawa, and O. Hino. 1998. Identification of cDNAs induced by the tumor suppressor Tsc2 gene using a conditional expression system in Tsc2 mutant (Eker) rat renal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247, no. 3 :728.

[0527] 29. Romani, N. , S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, and G. Schuler. 1994. Proliferating

dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180, no. 1 :83.

[0528] 30. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, no. 2 :193.

[0529] 31. Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku. 1998. SOSUI : Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, no. 4 :378.

[0530] 32. Linsley, P. S., R. Peach, P. Gladstone, and J. Bajorath. 1994. Extending the B7 (CD80) gene family. *Protein Sci* 3, no. 8 :1341.

[0531] 33. Henry, J., M. Ribouchon, D. Depetris, M. Mattei, C. Offer, R. Tazi-Ahnini, and P. Pontarotti. 1997. Cloning, structural analysis, and mapping of the B30 and B7 multigenic families to the major histocompatibility complex (MHC) and other chromosomal regions. *Immunogenetics* 46, no. 5 :383.

[0532] 34. Fargeas, C. A., A. Truneh, M. Reddy, M. Hurler, R. Sweet, and R. P. Sekaly. 1995. Identification of residues in the V domain of CD80 (B7-1) implicated in functional interactions with CD28 and CTLA4. *J Exp Med* 182, no. 3 :667.

[0533] 35. Kirberg, J., A. Baron, S. Jakob, A. Rolink, K. Karjalainen, and H. von Boehmer. 1994. Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 180, no. 1 :25.

[0534] 36. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 :145.

[0535] 37. Suda, T., A. O'Garra, I. MacNeil, M. Fischer, M. W. Bond, and A. Zlotnik. 1990. Identification of a novel thymocyte growth-promoting factor derived from B cell lymphomas. *Cell Immunol* 129, no. 1 :228.

[0536] 38. Suda, T., R. Murray, C. Guidos, and A. Zlotnik. 1990. Growth-promoting activity of IL-1 alpha, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in combination with IL-2, IL-4, or IL-7 on murine thymocytes. Differential effects on CD4/CD8 subsets and on CD3+/CD3-double-negative thymocytes. *J Immunol* 144, no. 8 :3039.

[0537] 39. Taga, T., and T. Kishimoto. 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15 :797.

[0538] 40. Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunol* 1, no. 6 :510.

[0539] 41. Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. Van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and A. Mantovani. 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6, no. 3 :315.

[0540] 42. Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and

S. Akira. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 161, no. 9 :4652.

[0541] 43. Teague, T. K. , B. C. Schaefer, D. Hildeman, J. Bender, T. Mitchell, J. W. Kappler, and P. Murrack. 2000. Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *J Exp Med* 191, no. 6 :915.

[0542] 44. Coyle, A. J. , S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, T. Burwell, H. Schneider, J. A. Gonzalo, M. Gosselin, L. R. Owen, C. E. Rudd, and J. C. Gutierrez-Ramos. 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, no. 1 :95.

[0543] 45. Hutloff, A. , A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroccek. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, no. 6716 :263.

[0544] 46. Yoshinaga, S. K. , M. Zhang, J. Pistillo, T. Horan, S. D. Khare, K. Miner, M. Sonnenberg, T. Boone, D. Brankow, T. Dai, J. Delaney, H. Han, A. Hui, T. Kohno, R. Manoukian, J. S. Whoriskey, and M. A. Coccia. 2000. Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int Immunol* 12, no. 10 :1439.

[0545] 47. Ishida, Y. , Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 11, no. 11 :3887.

[0546] 48. Shinohara, T. , M. Taniwaki, Y. Ishida, M. Kawauchi, and T. Honjo. 1994. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23, no. 3 :704.

[0547] 49. Reeves, R. H. , D. Patch, A. H. Sharpe, F. Borriello, G. J. Freeman, S. Edelhoff, and C. Disteché. 1997. The costimulatory genes Cd80 and Cd86 are linked on mouse chromosome 16 and human chromosome 3. *Mamm Genome* 8, no. 8 :581

[0548] 序列表

[0549] <110> 约翰霍普金斯大学

[0550] 帕多尔, 德鲁

[0551] 土屋, 东夫

[0552] 戈尔斯基, 凯文, S

[0553] 特森, 苏 - 伊

[0554] <120> 新的树突状细胞共刺激分子

[0555] <130> 2240-171934

[0556] <140> PCT/US01/13430

[0557] <141> 2001-04-17

[0558] <160>16
 [0559] <170>PatentIn version 3.1
 [0560] <210>1
 [0561] <211>819
 [0562] <212>DNA
 [0563] <213>人
 [0564] <220>
 [0565] <221>CDS
 [0566] <222>(1).. (819)
 [0567] <223>
 [0568] <400>1
 [0569] atg atc ttc ctc ctg cta atg ttg agc ctg gaa ttg cag ctt cac cag 48
 [0570] Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
 [0571] 1 5 10 15
 [0572] ata gca gct tta ttc aca gtg aca gtc cct aag gaa ctg tac ata ata 96
 [0573] Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
 [0574] 20 25 30
 [0575] gag cat ggc agc aat gtg acc ctg gaa tgc aac ttt gac act gga agt 144
 [0576] Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
 [0577] 35 40 45
 [0578] cat gtg aac ctt gga gca ata aca gcc agt ttg caa aag gtg gaa aat 192
 [0579] His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 [0580] 50 55 60
 [0581] gat aca tcc cca cac cgt gaa aga gcc act ttg ctg gag gag cag ctg 240
 [0582] Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 [0583] 65 70 75 80
 [0584] ccc cta ggg aag gcc tcg ttc cac ata cct caa gtc caa gtg agg gac 288
 [0585] Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
 [0586] 85 90 95
 [0587] gaa gga cag tac caa tgc ata atc atc tat ggg gtc gcc tgg gac tac 336
 [0588] Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
 [0589] 100 105 110
 [0590] aag tac ctg act ctg aaa gtc aaa gct tcc tac agg aaa ata aac act 384
 [0591] Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 [0592] 115 120 125
 [0593] cac atc cta aag gtt cca gaa aca gat gag gta gag ctc acc tgc cag 432
 [0594] His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 [0595] 130 135 140
 [0596] gct aca ggt tat cct ctg gca gaa gta tcc tgg cca aac gtc agc gtt 480

[0597]	Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val			
[0598]	145	150	155	160
[0599]	cct gcc aac acc agc cac tcc agg acc cct gaa ggc ctc tac cag gtc			528
[0600]	Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val			
[0601]		165	170	175
[0602]	acc agt gtt ctg cgc cta aag cca ccc cct ggc aga aac ttc agc tgt			576
[0603]	Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys			
[0604]		180	185	190
[0605]	gtg ttc tgg aat act cac gtg agg gaa ctt act ttg gcc agc att gac			624
[0606]	Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp			
[0607]		195	200	205
[0608]	ctt caa agt cag atg gaa ccc agg acc cat cca act tgg ctg ctt cac			672
[0609]	Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His			
[0610]		210	215	220
[0611]	att ttc atc ccc tcc tgc atc att gct ttc att ttc ata gcc aca gtg			720
[0612]	Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val			
[0613]	225	230	235	240
[0614]	ata gcc cta aga aaa caa ctc tgt caa aag ctg tat tct tca aaa gac			768
[0615]	Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp			
[0616]		245	250	255
[0617]	aca aca aaa aga cct gtc acc aca aca aag agg gaa gtg aac agt gct			816
[0618]	Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala			
[0619]		260	265	270
[0620]	atc			819
[0621]	Ile			
[0622]	<210>2			
[0623]	<211>273			
[0624]	<212>PRT			
[0625]	<213>人			
[0626]	<400>2			
[0627]	Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln			
[0628]	1	5	10	15
[0629]	Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile			
[0630]		20	25	30
[0631]	Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser			
[0632]		35	40	45
[0633]	His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn			
[0634]		50	55	60
[0635]	Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu			

[0636]	65	70	75	80
[0637]	Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp			
[0638]		85	90	95
[0639]	Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr			
[0640]		100	105	110
[0641]	Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr			
[0642]		115	120	125
[0643]	His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln			
[0644]		130	135	140
[0645]	Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val			
[0646]		145	150	160
[0647]	Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val			
[0648]		165	170	175
[0649]	Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys			
[0650]		180	185	190
[0651]	Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp			
[0652]		195	200	205
[0653]	Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His			
[0654]		210	215	220
[0655]	Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val			
[0656]		225	230	240
[0657]	Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp			
[0658]		245	250	255
[0659]	Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala			
[0660]		260	265	270
[0661]	Ile			
[0662]	<210>3			
[0663]	<211>1655			
[0664]	<212>DNA			
[0665]	<213>Murinae gen. sp.			
[0666]	<220>			
[0667]	<221>CDS			
[0668]	<222>(210)..(953)			
[0669]	<223>			
[0670]	<400>3			
[0671]	gaattcggca cgaggcaaaa tgtggcatat ctttgttgte tctttctgct tcccaactag			60
[0672]	agagaacaca cttacggctc ctgtcccggg caggtttggt tgtcgggtgtg attggcttcc			120
[0673]	agggaacctg atacaaggag caactgtgtg ctgccttttc tgtgtctttg cttgaggagc			180
[0674]	tgtgctgggt getgatattg acacagacc atg ctg etc ctg ctg ccg ata ctg			233

[0675]	Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu	
[0676]	1	5
[0677]	aac ctg agc tta caa ctt cat cct gta gca gct tta ttc acc gtg aca	281
[0678]	Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr	
[0679]	10	15 20
[0680]	gcc cct aaa gaa gtg tac acc gta gac gtc ggc agc agt gtg agc ctg	329
[0681]	Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu	
[0682]	25	30 35 40
[0683]	gag tgc gat ttt gac cgc aga gaa tgc act gaa ctg gaa ggg ata aga	377
[0684]	Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu Leu Glu Gly Ile Arg	
[0685]	45	50 55
[0686]	gcc agt ttg cag aag gta gaa aat gat acg tct ctg caa agt gaa aga	425
[0687]	Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Leu Gln Ser Glu Arg	
[0688]	60	65 70
[0689]	gcc acc ctg ctg gag gag cag ctg ccc ctg gga aag gct ttg ttc cac	473
[0690]	Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Leu Phe His	
[0691]	75	80 85
[0692]	atc cct agt gtc caa gtg aga gat tcc ggg cag tac cgt tgc ctg gtc	521
[0693]	Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val	
[0694]	90	95 100
[0695]	atc tgc ggg gcc gcc tgg gac tac aag tac ctg acg gtg aaa gtc aaa	569
[0696]	Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys	
[0697]	105	110 115 120
[0698]	gct tct tac atg agg ata gac act agg atc ctg gag gtt cca ggt aca	617
[0699]	Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr	
[0700]	125	130 135
[0701]	ggg gag gtg cag ctt acc tgc cag gct aga ggt tat ccc cta gca gaa	665
[0702]	Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu	
[0703]	140	145 150
[0704]	gtg tcc tgg caa aat gtc agt gtt cct gcc aac acc agc cac atc agg	713
[0705]	Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg	
[0706]	155	160 165
[0707]	acc ccc gaa ggc ctc tac cag gtc acc agt gtt ctg cgc ctc aag cct	761
[0708]	Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro	
[0709]	170	175 180
[0710]	cag cct agc aga aac ttc agc tgc atg ttc tgg aat gct cac atg aag	809
[0711]	Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys	
[0712]	185	190 195 200
[0713]	gag ctg act tea gcc atc att gac cct ctg agt cgg atg gaa ccc aaa	857

[0714]	Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys	
[0715]	205	210 215
[0716]	gtc ccc aga acg tgg cca ctt cat gtt ttc atc ccg gcc tgc acc atc	905
[0717]	Val Pro Arg Thr Trp Pro Leu His Val Phe Ile Pro Ala Cys Thr Ile	
[0718]	220	225 230
[0719]	gct ttg atc ttc ctg gcc ata gtg ata atc cag aga aag agg atc tag	953
[0720]	Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ile Val Ile Ile Gln Arg Lys Arg Ile	
[0721]	235	240 245
[0722]	gggaagctgt attacggaag aagtggcttc ttcttcccag atctggacct gcggtcttgg	1013
[0723]	gagttggaag gatctgatgg gaaaccctca agagacttct ggactcaaag tgagaatctt	1073
[0724]	gcaggacctg ccatttgcaac ttttgaacct tttggacggt gaccagggc tccgaagagg	1133
[0725]	agcttgtaag actgacaate ttccctctgt ctcaagactc tetgaacagc aagaccccaa	1193
[0726]	tggcacttta gacttaccce tgggatcctg gaccccagtg agggcctaag gctcctaag	1253
[0727]	actttcaggg tgagaacaaa aggaattgct ctccgcccc cccccacctc ctgctttccg	1313
[0728]	caggagaca tggaaattcc cagttactaa aatagattgt caatagagtt atttatagcc	1373
[0729]	ctcatttct cccgggactt ggaagcttca gacagggtt ttcataaaca aagtcataac	1433
[0730]	tgatgtgttt tacagcatcc tagaatcctg gcagcctctg aagttctaata taactggaag	1493
[0731]	catttaagca acacgtcaag tgcccctgct gtggtatttg tttctacttt tctgttttta	1553
[0732]	aagtgtgagt cacaaggtaa ttgttgtaac ctgtgatate actgtttctt gtgtctcttc	1613
[0733]	tttcaactac atcttttaaa acaaaaaaaaa aaaaaaaaa aa	1655
[0734]	<210>4	
[0735]	<211>247	
[0736]	<212>PRT	
[0737]	<213>Murinae gen. sp.	
[0738]	<400>4	
[0739]	Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro	
[0740]	1	5 10 15
[0741]	Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val	
[0742]	20	25 30
[0743]	Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu	
[0744]	35	40 45
[0745]	Cys Thr Glu Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn	
[0746]	50	55 60
[0747]	Asp Thr Ser Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu	
[0748]	65	70 75 80
[0749]	Pro Leu Gly Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp	
[0750]	85	90 95
[0751]	Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr	
[0752]	100	105 110

[0753]	Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr	
[0754]	115 120 125	
[0755]	Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln	
[0756]	130 135 140	
[0757]	Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val	
[0758]	145 150 155 160	
[0759]	Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val	
[0760]	165 170 175	
[0761]	Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys	
[0762]	180 185 190	
[0763]	Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp	
[0764]	195 200 205	
[0765]	Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Pro Leu His	
[0766]	210 215 220	
[0767]	Val Phe Ile Pro Ala Cys Thr Ile Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ile Val	
[0768]	225 230 235 240	
[0769]	Ile Ile Gln Arg Lys Arg Ile	
[0770]	245	
[0771]	<210>5	
[0772]	<211>744	
[0773]	<212>DNA	
[0774]	<213>Murinae gen. sp.	
[0775]	<400>5	
[0776]	atgctgctcc tgetgccgat actgaacctg agcttacaac ttcacccctgt agcagcttta	60
[0777]	ttcacccgtga cagcccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg	120
[0778]	gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgcag	180
[0779]	aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca cctgctgga ggagcagctg	240
[0780]	cccctgggaa aggetttggt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtac	300
[0781]	cgttgcctgg tcattcgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa	360
[0782]	gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggaggttc caggtacagg ggaggtgcag	420
[0783]	cttacctgcc aggettagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtgtt	480
[0784]	cctgccaaca ccagccat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg	540
[0785]	cgcctcaage ctcagcctag cagaaacttc agctgcatgt tetggaatgc tcacatgaag	600
[0786]	gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aacccaaagt ccccgagaacg	660
[0787]	tggccacttc atgttttcat cccggcctgc accatcgett tgatcttctt ggccatagtg	720
[0788]	ataatccaga gaaagaggat ctag	744
[0789]	<210>6	
[0790]	<211>26	
[0791]	<212>DNA	

[0792]	<213> 人工序列	
[0793]	<220>	
[0794]	<223> 引物	
[0795]	<400>6	
[0796]	ggagctactg catggtgatt gttttg	26
[0797]	<210>7	
[0798]	<211>24	
[0799]	<212>DNA	
[0800]	<213> 人工序列	
[0801]	<220>	
[0802]	<223> 引物	
[0803]	<400>7	
[0804]	tgcaactga ggcactgaaa agtc	24
[0805]	<210>8	
[0806]	<211>25	
[0807]	<212>DNA	
[0808]	<213> 人工序列	
[0809]	<220>	
[0810]	<223> 引物	
[0811]	<400>8	
[0812]	ttgttgcttc cttctgtctc ccaac	25
[0813]	<210>9	
[0814]	<211>24	
[0815]	<212>DNA	
[0816]	<213> 人工序列	
[0817]	<220>	
[0818]	<223> 引物	
[0819]	<400>9	
[0820]	acagttgctc cttgtatcag gttc	24
[0821]	<210>10	
[0822]	<211>21	
[0823]	<212>DNA	
[0824]	<213> 人工序列	
[0825]	<220>	
[0826]	<223> 引物	
[0827]	<400>10	
[0828]	gtaacggccg ccagtgtget g	21
[0829]	<210>11	
[0830]	<211>23	

- [0831] <212>DNA
- [0832] <213> 人工序列
- [0833] <220>
- [0834] <223> 引物
- [0835] <400>11
- [0836] cgccagtg atggatatct gca 23
- [0837] <210>12
- [0838] <211>11
- [0839] <212>PRT
- [0840] <213>Murinae gen. sp.
- [0841] <400>12
- [0842] Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
- [0843] 1 5 10
- [0844] <210>13
- [0845] <211>9
- [0846] <212>PRT
- [0847] <213> 未知
- [0848] <220>
- [0849] <223> 结合序列
- [0850] <220>
- [0851] <221>misc_feature
- [0852] <222>(4).. (6)
- [0853] <223>4-6 位置的 Xaa 可以是任何氨基酸
- [0854] <400>13
- [0855] Ser Gln Asp Xaa Xaa Xaa Glu Leu Tyr
- [0856] 1 5
- [0857] <210>14
- [0858] <211>8
- [0859] <212>PRT
- [0860] <213> 未知
- [0861] <220>
- [0862] <223> 结合序列
- [0863] <220>
- [0864] <221>misc_feature
- [0865] <222>(1).. (3)
- [0866] <223>1-3 位置的 Xaa 可以是任何氨基酸
- [0867] <220>
- [0868] <221>misc_feature
- [0869] <222>(5).. (6)

[0870] <223>5-6 位置的 Xaa 可以是任何氨基酸
 [0871] <400>14
 [0872] Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Arg Thr
 [0873] 1 5
 [0874] <210>15
 [0875] <211>10
 [0876] <212>PRT
 [0877] <213>Murinae gen. sp.
 [0878] <400>15
 [0879] Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 [0880] 1 5 10
 [0881] <210>16
 [0882] <211>290
 [0883] <212>PRT
 [0884] <213>Murinae gen. sp.
 [0885] <400>16
 [0886] Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
 [0887] 1 5 10 15
 [0888] Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 [0889] 20 25 30
 [0890] Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
 [0891] 35 40 45
 [0892] Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
 [0893] 50 55 60
 [0894] Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
 [0895] 65 70 75 80
 [0896] Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
 [0897] 85 90 95
 [0898] Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 [0899] 100 105 110
 [0900] Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
 [0901] 115 120 125
 [0902] Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
 [0903] 130 135 140
 [0904] Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
 [0905] 145 150 155 160
 [0906] Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
 [0907] 165 170 175
 [0908] Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val

[0909]		180		185		190
[0910]	Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys					
[0911]		195		200		205
[0912]	Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile					
[0913]		210		215		220
[0914]	Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp					
[0915]	225		230		235	240
[0916]	Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val					
[0917]		245		250		255
[0918]	Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys					
[0919]		260		265		270
[0920]	Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu					
[0921]		275		280		285
[0922]	Glu Thr					
[0923]		290				

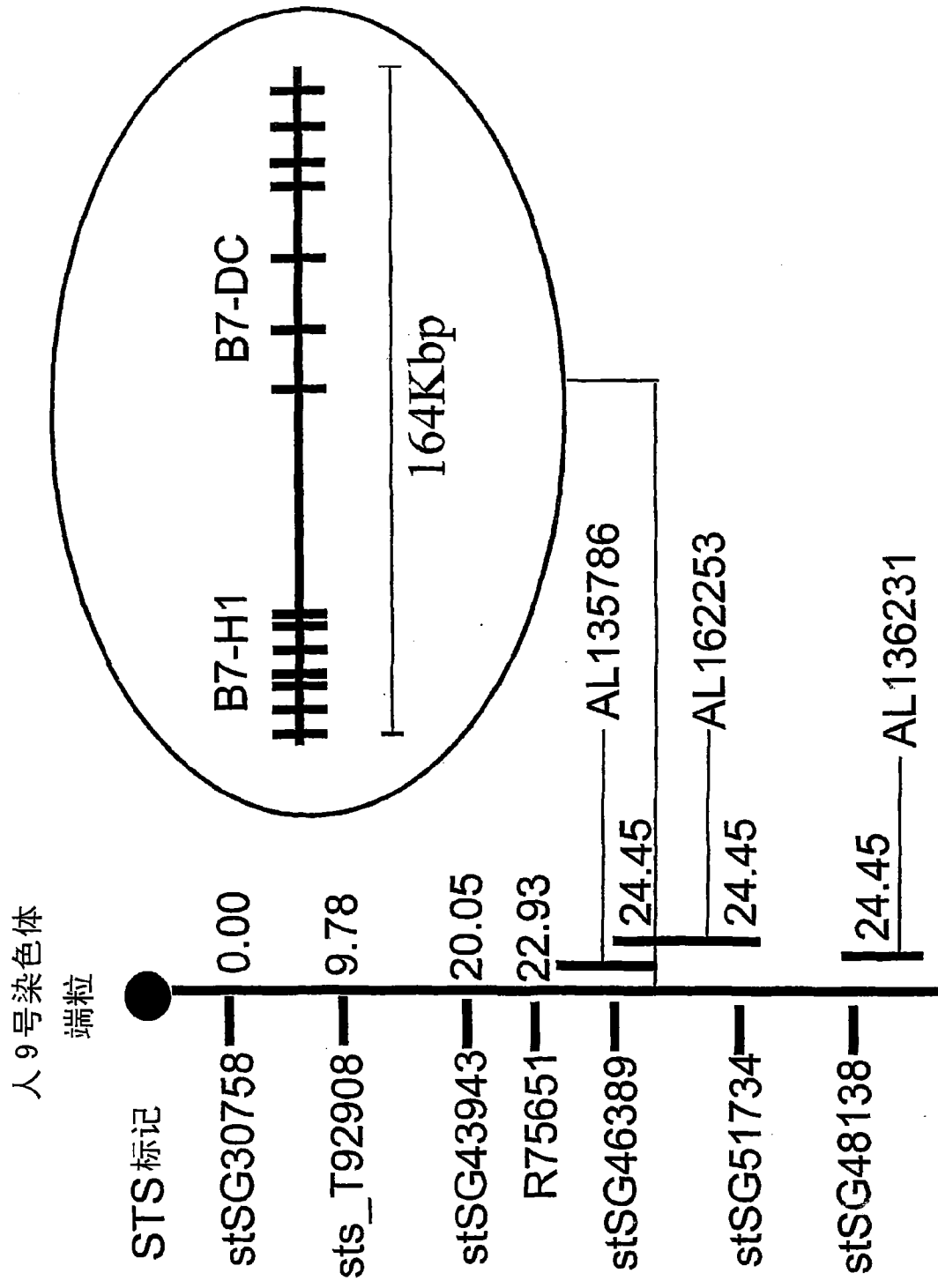


图 1

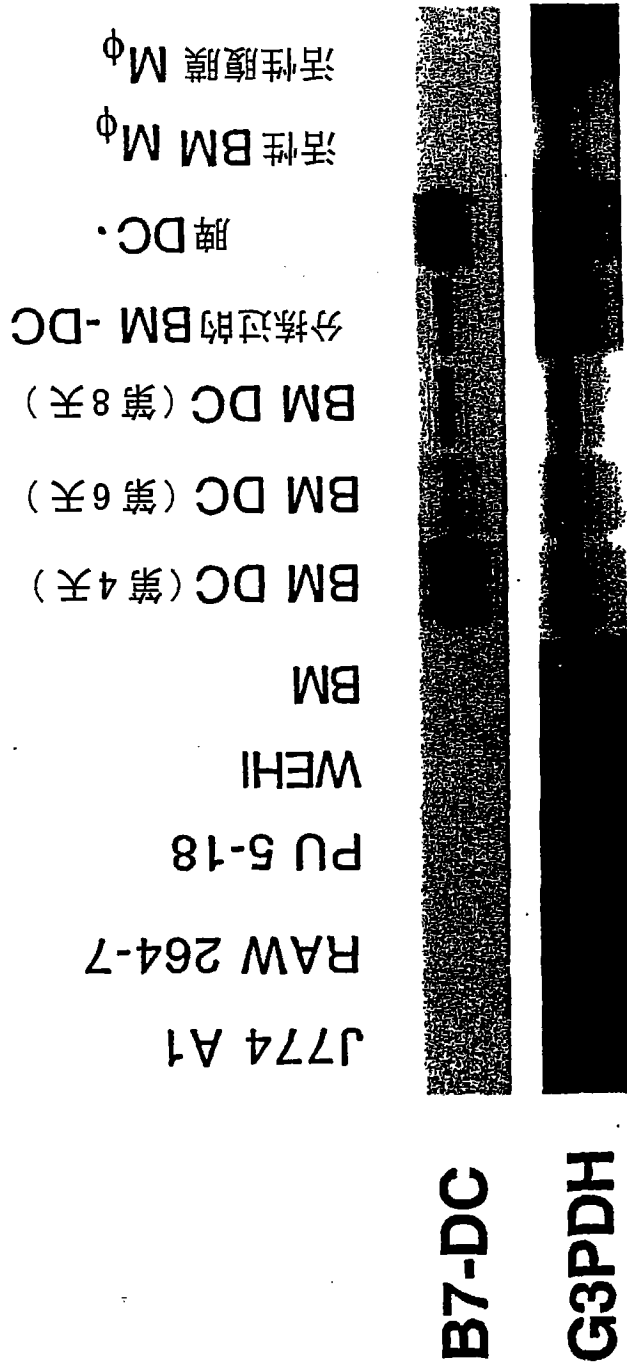


图 2

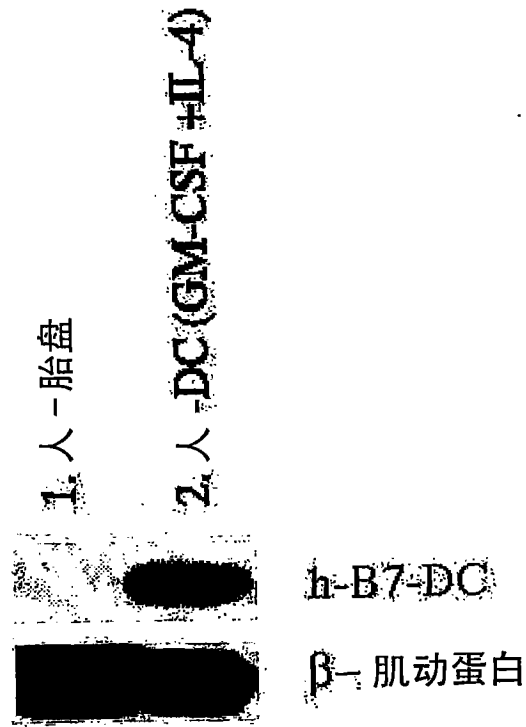


图 3

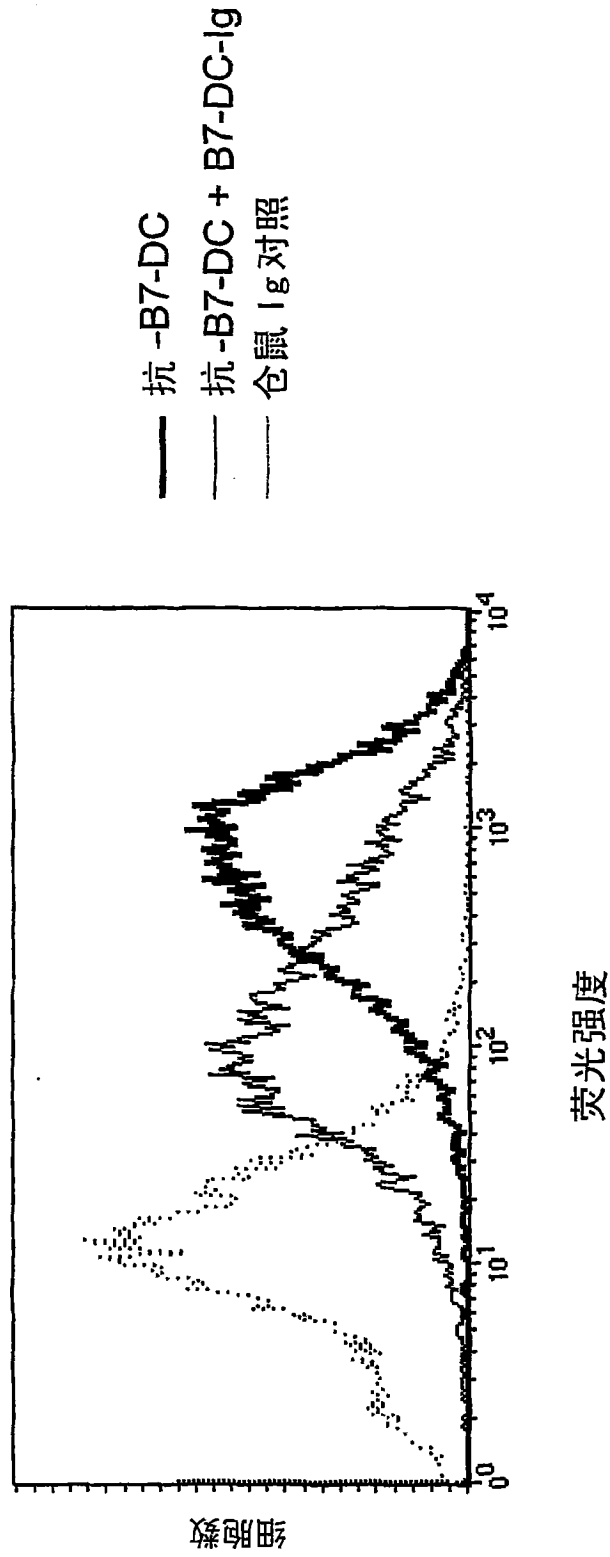


图 4

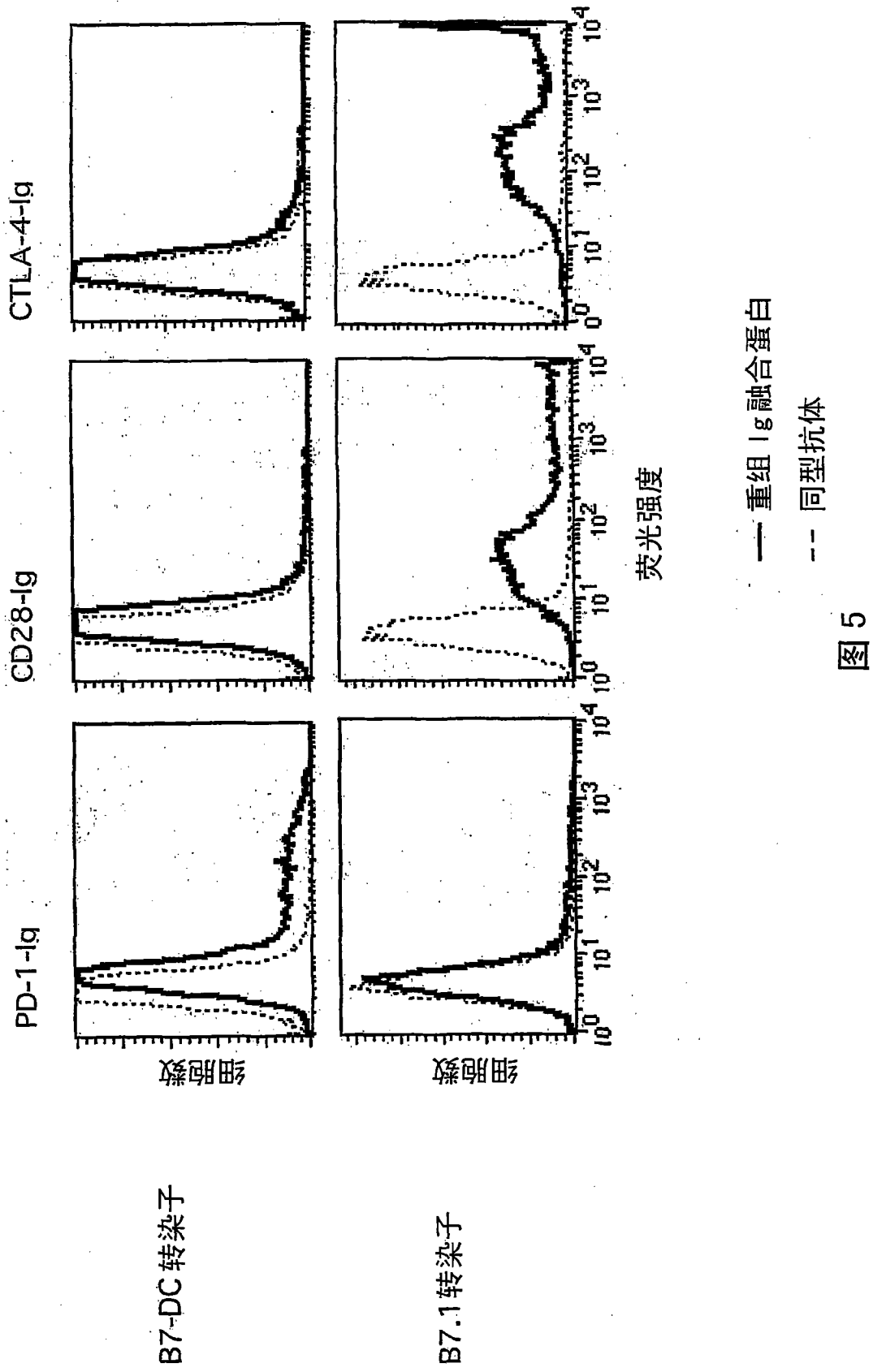


图 5

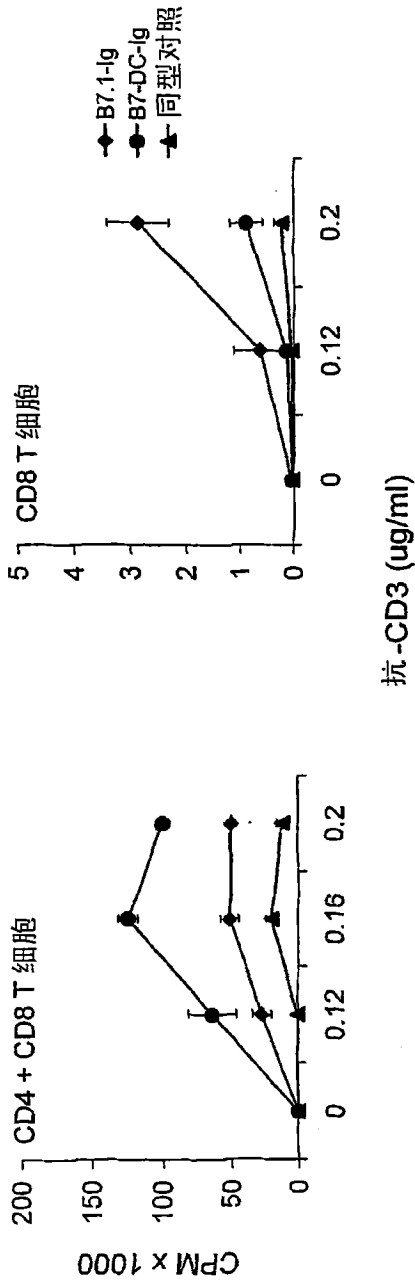


图 6

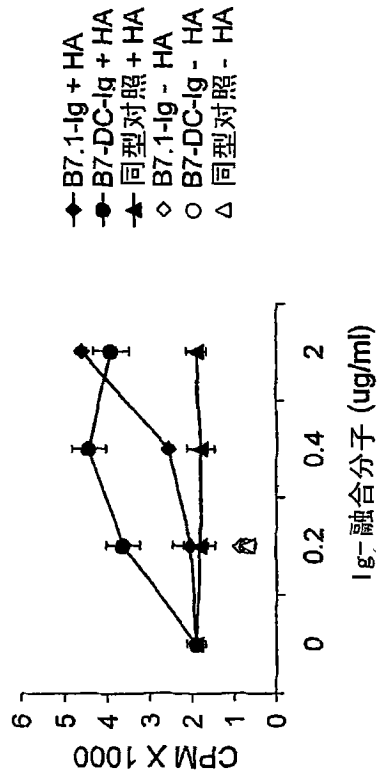


图 7

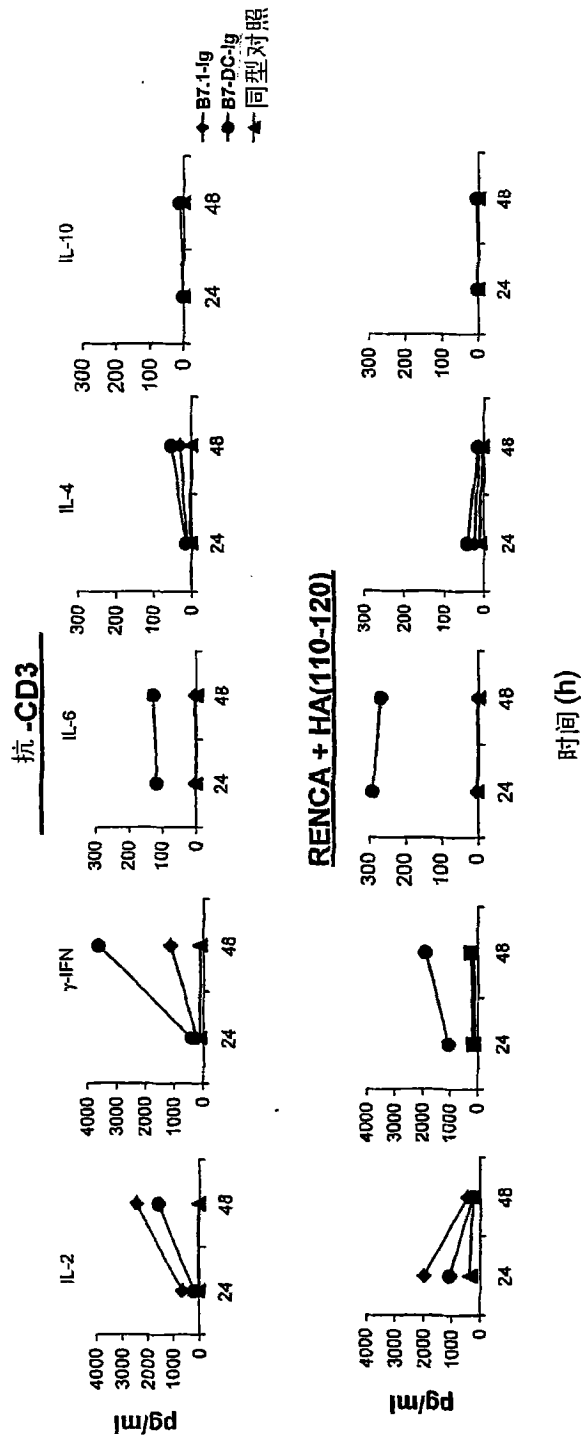


图 8

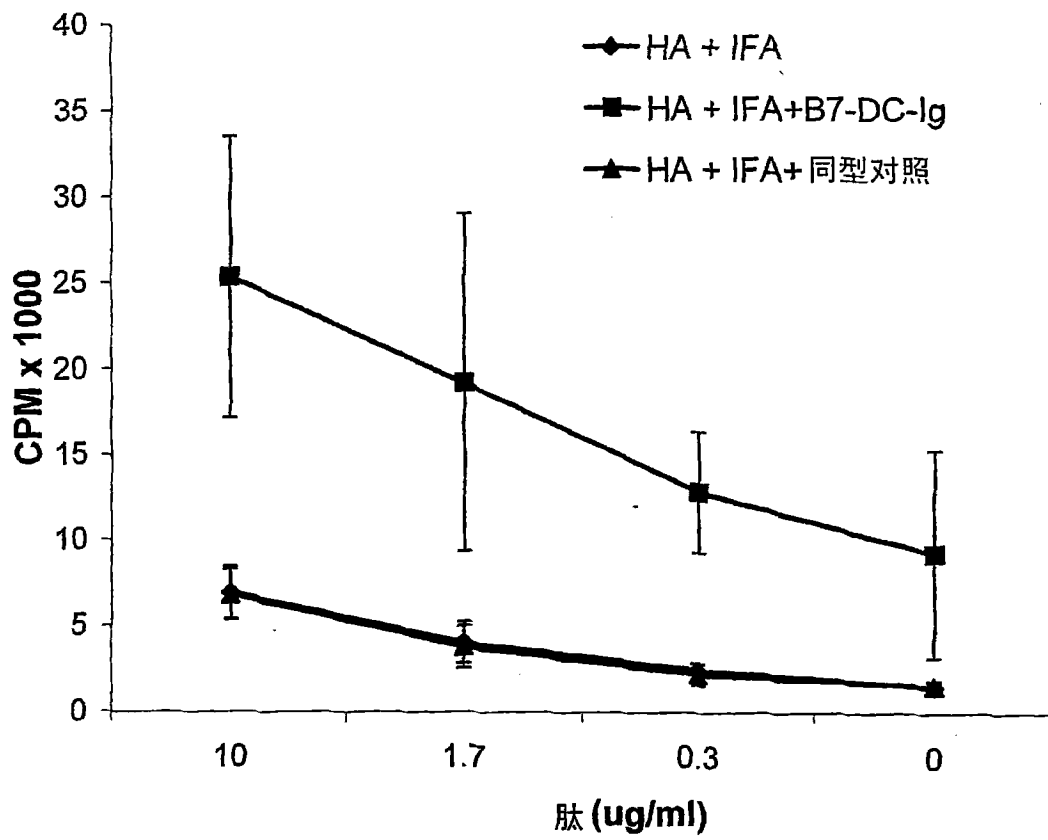


图 9

专利名称(译)	新的树突状细胞共刺激分子		
公开(公告)号	CN101070540B	公开(公告)日	2015-04-01
申请号	CN200710103491.2	申请日	2001-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
当前申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
[标]发明人	德鲁M帕多尔 土屋东夫 凯文S戈尔斯基 苏伊特森		
发明人	德鲁·M·帕多尔 土屋东夫 凯文·S·戈尔斯基 苏·伊·特森		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/705 C12N15/85 C12N5/10 C07K19/00 C07K16/28 G01N33/53 G01N33/577 A61K38/17 A61K39/39 A61K39/395 A61K35/15		
代理人(译)	程金山		
优先权	60/200580 2000-04-28 US 60/240169 2000-10-13 US		
其他公开文献	CN101070540A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了一种新的共刺激蛋白质分子B7-DC，其为B7家族的一个成员，编码该分子的DNA和含有这种DNA的表达载体。B7-DC蛋白质、片段、融合多肽/蛋白质和其它功能性衍生物，及表达B7-DC的转化细胞可用于疫苗组合物和方法。公开了诱导有效的T细胞介导的反应的组合物和方法，其可用于抗肿瘤和抗病毒免疫。

