



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02810886.8

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100560720C

[22] 申请日 2002.3.28 [21] 申请号 02810886.8

[30] 优先权

[32] 2001. 3.28 [33] US [31] 60/279,366

[86] 国际申请 PCT/US2002/009680 2002.3.28

[87] 国际公布 WO2002/079417 英 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.28

[73] 专利权人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

共同专利权人 综合医院公司

[72] 发明人 Y·卢 H·曹

[56] 参考文献

WO9723236A1 1997.7.3

Anthrax toxin fusion proteins for intracellular delivery of macromolecules. . Leppla 等. J. Applied Microbiology, Vol. 87 No. 2. 1999

Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanustoxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non - neuronal cells. . Arora 等. J. Biological Chemistry, Vol. 269 No. 2. 1994

审查员 吴汀晨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图 28 页

[54] 发明名称

将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法,及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种用于将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法,包括将靶抗原(如一种蛋白)结合于包含二分蛋白外毒素的片段的转运因子,但不是相应的保护性抗原。优选将所述靶蛋白融合于所述转运因子。优选的转运因子包括来自炭疽芽孢杆菌的致死因子(LFn)的保护性抗原结合结构域,它包括1-255号氨基酸,优选与LFn具有至少80%同源性的至少80个氨基酸的片段,以及来自羧基部分的不结合PA的大约105个氨基酸的片段。所述靶抗原可以包括希望诱导CMI反应的任何分子,包括病毒抗原和肿瘤抗原。

1. 一种将靶抗原递送到细胞的胞质溶胶中的方法,包括将所述靶抗原结合于一种转运因子,其中,所述转运因子至少包含炭疽致死因子(LF)N末端结构域(Lfn)的最靠近羧基末端的105个氨基酸,其中所述转运因子不表现锌金属蛋白酶、使促分裂原活化的蛋白激酶失活或这两种作用,并且,其中不使用保护性抗原(PA)。

2. 如权利要求1的方法,其中,所述Lfn是SEQ ID NO: 2。

3. 如权利要求1的方法,其中,所述转运因子不包含SEQ ID NO: 2的结合PA的部分。

4. 如权利要求1的方法,其中,所述转运因子是SEQ ID NO: 2。

5. 如权利要求1的方法,其中,所述转运因子是SEQ ID NO: 3。

6. 如权利要求1的方法,其中,所述转运因子不超过350个氨基酸。

7. 如权利要求1的方法,其中,所述靶抗原选自下列一组:病毒抗原、细菌抗原和肿瘤抗原。

8. 如权利要求7的方法,其中,所述病毒抗原是HIV抗原。

9. 如权利要求1的方法,其中,所述转运因子通过表达一种融合多肽与所述靶抗原结合,其中,由单个核酸编码序列编码所述转运因子和靶抗原。

10. 如权利要求1的方法,其中,所述转运因子通过化学键与所述靶抗原结合。

11. 一种用于将靶抗原递送到细胞的胞质溶胶中的包含靶抗原和转运因子的分离的多肽,其中,所述转运因子至少包含炭疽致死因子(LF)N末端结构域(Lfn)的最靠近羧基末端的105个氨基酸,其中所述转运因子不表现锌金属蛋白酶、使促分裂原活化的蛋白激酶失活或这两种作用。

12. 如权利要求11的分离的多肽,其中,所述转运因子是SEQ ID NO: 2。

13. 如权利要求11的分离的多肽,其中,所述转运因子不包含结合于保护性抗原(PA)的部分。

14. 一种分离的DNA,它编码权利要求11的多肽。

15. 如权利要求14的分离的DNA,还包含含有至少一个用于表达肽的启动子序列的5'侧翼区。

16. 一种载体,含有权利要求14的分离的DNA。

17. 一种药物组合物,包含免疫原性量的权利要求11的多肽,并且

其中不存在相应的保护性抗原。

18. 如权利要求 17 的药物组合物, 还包含一种佐剂。

19. 如权利要求 18 的药物组合物, 其中, 所述佐剂是明矾。

20. 权利要求 17、18 或 19 的药物组合物在制备用于在哺乳动物体内产生细胞介导的免疫反应的药物中的用途。

21. 如权利要求 20 的用途, 其中, 所述药物是皮下或肌肉制剂或口服摄取制剂。

22. 一种生产蛋白的方法, 包括在一种细胞中表达权利要求 14 的分离的 DNA。

23. 如权利要求 22 的方法, 其中, 所述细胞选自下列一组: 细菌细胞、昆虫细胞、和哺乳动物细胞。

24. 一种用于体外检测细胞介导的免疫反应的试剂盒, 包含权利要求 11 的多肽。

将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法，及其用途

本发明得到了国家卫生部基金 AI47539 的支持，因此，美国政府对其拥有某些权利。

发明领域

本申请涉及将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法，新融合蛋白及其用途。

发明背景

很多注意力都集中在产生免疫反应方面。对外源抗原的一种类型的免疫反应是产生抗体，通常称之为体液免疫。第二种形式的免疫反应是通过抗原呈递细胞（APC）呈递抗原产生的。这种类型的免疫反应被广义地称为细胞介导的免疫反应（CMI），或 T 细胞反应。尽管这两种类型的免疫反应都是重要的，最近将主要注意力集中在 CMI 上。在处理诸如由人类免疫缺陷病毒（HIV）导致的 AIDS 的感染性疾病时，未能证实针对所述病毒及其部分的抗体反应足以产生免疫性。类似地，在处理与很多恶性肿瘤相关的外源蛋白时，也未能证实所述抗体反应是足够的。因此，将注意力集中在产生 CMI 反应方面。

为了诱导 CMI，必须将一种抗原结合在 APC 表面上的主要组织相容性复合体（MHC）I 类或 II 类分子上。I 类分子通常将抗原，如内源蛋白，所述蛋白来自病毒感染，以及肿瘤抗原呈递到外面。当由宿主 I 类 MHC 编码的分子呈递病原体来源的（或癌）肽表位（通常 8-10 个氨基酸）时，抗原特异性 T 细胞通常能识别受感染的靶细胞（7）。所述表位源于被蛋白质裂解成小的肽片段的细胞质蛋白。这些片段随后被转运到内质网（ER）腔中，在这里它们与新合成的 MHC-I 分子复合，然后转运到细胞表面，在这里发生 T 细胞识别（8-13）。细胞外流体中的抗原（外源抗原）通常不能进入大多数细胞的这种加工区室。因此，用疫苗诱导 CMI 的一个主要挑战是，将外源抗原递送到胞质溶胶内，以便由 MHC I 类分子呈递。希望能够制备多种感染性疾病，如 HIV，以及癌症，如前列腺癌，乳腺癌和黑素瘤的疫苗。

例如，越来越多的证据表明 CMI 在控制 HIV 感染方面发挥重要作用 (Ogg 等, *Science* 279: 2103-6 (1998); Schmitz 等, *Science* 283: 857-60 (1999); Brodie 等, *Nat. Med.* 5: 34-41 (1999))。接触过 HIV 但是仍然没有被感染的个体，通常具有抗病毒 CMI，但是没有抗体反应。在形成特异性抗体之前，初次感染的病毒血症，是通过病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 形成而解决的 (Letvin, *Science* 280: 1875-96 (1998))。以上数据表明了 CMI 在控制 HIV 感染方面发挥着关键作用。

很多肿瘤与特定蛋白的表达和/或某些蛋白的过量表达相关。例如，前列腺癌与升高水平的蛋白，如前列腺特异性抗原 (PSA) 相关。乳腺癌可能与诸如 Her-2, Muc-1, CEA 之类的蛋白的表达和/或过量表达相关。因此，相当大的注意力集中在试图产生免疫反应方面，特别是在治疗所述恶性肿瘤时产生针对所述抗原的 CMI。

产生针对传染性疾病的细胞介导的免疫性的方法包括使用完整的感染剂，例如，通过制备遗传工程化的失活病毒或使用杀灭的感染剂。另一种方法是亚基疫苗，它能将一种或多种抗原（而不是完整病毒）呈递给受治对象。

为了产生 CMI，必须将抗原递送到细胞内部。所述细胞对外源蛋白的吸收很差。因此，优选方法是使用诸如病毒载体、脂质体、裸 DNA 的方法或类似方法。不过，所述方法具有诸多缺陷。例如，很多重组病毒在反复施用，其本身会产生抗原性反应。由于产生免疫反应的标准形式通常需要被称为激发的起始注射，和被称为加强的后续注射，以便获得满意的免疫性，这可能是一个严重问题。另外，尽管大部分注意力一直集中在改善病毒载体的安全性方面，但是总是存在某些危险。例如，很多目标群体，如 HIV 感染的群体可能具有减弱的免疫系统。因此，在很多个体中是完全安全的某些病毒载体在上述个体内会产生某种程度的危险。将蛋白递送到细胞内的方法也未能证明像本发明这样完全安全。因此，需要新的和简单的方法将抗原递送到胞质溶胶内，以便刺激 CMI。

为了产生 CMI 反应，还存在难于测定所述反应的技术问题。

用于检测细胞介导的免疫反应的现有实验室测定方法具有严重缺陷，特别是在应用于各种临床设置中的大规模疫苗效力试验时更是这样，这是因为使用现有技术测定 CMI 所需要的现有设备和技术支持，通

常在需要它们的野外设施中是很少的。人们认为 CTL 在控制 HIV-1 感染方面起着关键作用，并且设计了多种 HIV-1 疫苗候选物，以便刺激 T 细胞反应，和中和抗体（1-6）。不过，用于检测 CMI，如 HIV-特异性 CTL 的标准实验室方法是复杂的、费时间的、并且通常局限于高度专业化的设备。用于检测 T 细胞反应的改进方法，将会对 T 细胞依赖性疫苗或免疫治疗的开发产生显著影响。这种策略有可能被应用于其他研究领域，其中，已知 CMI 反应在预防和控制疾病方面起着重要作用。

体外检测 CMI 反应的一个困难是因为对抗原呈递的特殊需要。如上文所述，将外源蛋白递送到胞质溶胶内，以便通过 MHC I 类分子呈递给 T 细胞是一种重大挑战。所述 I 类途径的物理学分配一直是在体外检测 T 细胞反应的主要障碍。因此，大部分测定 CMI 的现有实验室方法，采用活病毒或细菌载体将抗原递送到胞质溶胶中，其中，诸如痘苗病毒的重组痘病毒是最常使用的。另一种方法是使用源于已知 CTL 表位的合成肽（10-20 个氨基酸）从外部将 MHC-I 分子加载到靶细胞表面上。这种方法在一般临床应用中具有严格限制。诸如重组痘苗病毒的活病毒载体的使用，需要受过训练的和免疫过的实验室人员，包括最低污染设施，作为预防性安全措施。合成肽不仅价格十分昂贵，而且适合各种群体的多样性 MHC-I 分子的“通用”肽特征的设计也是极其困难的。因此，开发测定 T 细胞反应的测定方法的挑战是将外源抗原的大片段递送到胞质溶胶内，而又不依赖活的重组病毒或细菌载体。

因此，需要能够用于体外检测 CMI 的试剂盒。特别是可方便地在诸如非洲、印度和亚洲的遥远地方使用的试剂盒，在这些地方，有很多建议要检测大量的疫苗候选物，如抗 HIV 的疫苗。

现在，我们已经发现诸如炭疽芽孢杆菌的二分蛋白外毒素家族包含可用于将诸如蛋白的外源抗原递送到胞质溶胶中的片段。来自所述蛋白的一种优选的蛋白片段，是含有保护性抗原（PA）结合结构域的 N-末端部分，而不是会产生对所述细胞的毒性的部分。更优选地，所述片段业已修饰过，以便除去结合 PA 的特定结构域。

炭疽芽孢杆菌是动物和人类炭疽病的致病剂。由炭疽芽孢杆菌产生的毒素由两种二分蛋白外毒素，致死毒素（LT）和水肿毒素组成。LT 由保护性抗原（PA）和致死因子（LF）组成，而水肿毒素由 PA 和水肿因子（EF）组成。三种成分 PA，LF 和 EF 中，没有一种单独是有毒性的。不过，一

旦组合在一起，水肿毒素能导致水肿，而 LT 通过在动物和人体内的系统性休克能导致死亡。与它在形成两种毒素中的关键作用吻合，业已将 PA 确定为抗炭疽病疫苗的保护性成分。目前对炭疽毒素作用的分子机制的假设如下：PA 是具有 735 个氨基酸的多肽，它通过细胞受体与哺乳动物细胞表面结合。一旦结合之后，通过细胞蛋白酶将 PA 裂解成 63-kDa 的分子而被激活，它在靶细胞的细胞质膜中能形成环形七聚体（图 1）（6, 7）。所述 PA 七聚体然后与通过胞吞作用而内化的 EF 或 LF 结合。在内体酸化之后，PA 使得 EF 或 LF 能进入胞质溶胶，推测是通过由所述七聚体的形成的一个孔进入的。在胞质溶胶中，EF 起着腺苷酸环化酶的作用（8），将 ATP 转化成 cAMP。异常高水平的 cAMP 干扰了细胞代谢。

LF 在胞质溶胶中的作用是通过一种尚不十分了解的机制导致宿主细胞死亡。LF 能诱导大量淋巴因子的过量产生（9），导致了宿主动物中的致死性系统性休克。最近的研究业已表明，LF 具有两种酶促活性：它起着锌金属蛋白酶的作用（10），并且它能使促分裂原活化的蛋白激酶失活（11）。尽管仍然不清楚 LF 的这两种酶促活性是如何联系在一起的，不过，这两种活性都是 LF 毒性所必须的。以前业已报导过，炭疽毒素 B 成分可用于递送表位，所述表位在存在 PA 的情况下又能通过所述免疫系统诱导免疫反应（WO 97/23236）。

LF 是具有 796 个氨基酸的多肽，并且决定这两种酶促活性的功能结构域位于 383-796 号氨基酸之间（图 2A）（12）。没有该催化结构域的 N-末端截短的 LF 在与 PA 混合并且添加到培养的噬菌体中后，或在注射到动物体内后完全没有任何毒性作用。不过，它仍然能有效结合 PA。LF 的 PA 结合结构域（LFn）由 1-225 号氨基酸组成（图 2B）（12）。

发明概述

本发明提供了将外源抗原递送到细胞质中的方法，新融合蛋白及其用途。

另外，我们业已发现可以将被修饰而使毒素结构域失活的致死因子转运因子、其片段，如 LFn 和 LFn 的片段，如包括所述片段的羧基部分的片段用作转运因子与没有 PA 的靶抗原融合，以便将所述抗原递送到胞质溶胶内。所述转运因子优选是 LFn 或其片段。一种优选类型的 LFn 片段是不含 PA 结合结构域的片段。所述转运因子更优选是 LFn。例如，LFn

的最靠近羧基末端的 60 个氨基酸可以用作转运因子；更优选最靠近羧基末端的 80 个氨基酸。人们还可以使用其他片段。例如，可以使用含有更多致死因子蛋白的片段，只要使其毒素部分失活就行。所述转运因子片段优选包括 LFn 的最靠近羧基末端的 80 个氨基酸的部分，并且包括该片段的其他部分，只要除去了含有毒性的部分就行。所述片段优选为 350 个氨基酸或更少，更优选 300 个氨基酸或更少，甚至更优选 250 个氨基酸或更少。一种优选的片段是 105 个氨基酸或更少。一种更优选的片段是 80 个氨基酸或更少。然后，将该转运因子连接到希望递送到胞质溶胶中的抗原上。这一目的可以通过本领域众所周知的技术实现。例如，可以制备含有希望递送到所述细胞的胞质溶胶中的抗原的融合蛋白。

本发明的优选方法的特征在于在接受治疗的动物体内诱导细胞介导的免疫反应的新多肽。

本发明提供了编码本发明的新融合多肽的 DNA，以所述 DNA 序列为特征的重组 DNA 分子，用所述 DNA 序列和分子转化过的单细胞宿主，以及使用所述序列、分子和宿主产生所述新多肽和对本发明所需的抗原的 CMI 免疫反应的方法。

在另一种优选实施方案中，本发明提供了包含一种或多种本发明的新融合肽的药物组合物。这种组合物能有效诱导细胞介导的免疫反应。在一种优选实施方案中，可将其用作疫苗。在另一种实施方案中，可以将所述融合蛋白用于制备生产细胞，优选用于生产多种蛋白特别是业已证实在所述细胞中难于表达的蛋白的细菌生产细胞。

在另一种优选实施方案中，本发明提供了一种用于检测细胞介导的免疫反应的方法。

在另一种优选实施方案中，本发明提供了用于体外检测细胞介导的免疫反应的试剂盒。

附图简述

图 1 是表示 PA-介导的 LFn 通过胞吞作用进入细胞，以及随后由 MHC-I 类分子呈递的示意图。

图 2A-C 表示各种致死片段 (LF) 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 1)。图 2A 表示 LF 的完整长度氨基酸序列。图 2B 表示 LFn 的前 289 个氨基酸的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 2)。图 2C 表示致死因子的 185-289 号氨基

酸的序列，有时称之为片段 3 (SEQ ID NO : 3)。

图 3 A-B 是表示靶的 LFn 的呈递是不依赖于 PA 的曲线图。在标准铬释放测定中以 10: 1 的效应细胞与靶 (E: T) 的比例，检测业已充分表征的 CTL 克隆的活性。靶细胞是 HLA-匹配的 EBV-转化细胞系，业已在有或没有 PA 的条件下用 LFn 敏化过夜。所使用的对照是重组痘苗载体 (将 NYCBH 用于对照，而 rVV-Nef 或 Env 肽用于合适的克隆)。图 3A 表示 Nef-特异性克隆 (KM) 的活性，所述活性是用 Nef 重组痘苗载体，对 PA 和 LfnNef 或 LFn Nef 自身温育过夜的 B60 限制性靶细胞测试的。包括每一种靶细胞的本底/对照 (对照 PA-LFn, LFn)。图 3B 表示 Env-特异性 CTL 克隆 (SP 511) 能以剂量依赖性方式识别用 LfnEnv 标记过的靶细胞，并且，同样是不依赖于 PA 的。所使用的对照是肽 Env 106B (100, $\mu\text{g}/\text{ml}$)。所列举的 LFn 构建体的剂量以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为单位 (LfnEnv 5=5 μ/ml 的 LfnEnv)。

图 4 A-B 是表示 LFn-HIV 识别是 HLA 限制性的曲线图。4A 表示用 HLA 匹配的和错配的用 LFn-p24 敏化的 B-LCL 检测 HLA-B14 限制的 Gag 克隆 (AC13) 的活性，并且是在标准铬释放测定中检测的。用 Rw-Gag 作对照。图 2B 表示 B60 Nef 克隆 (KM) 的 HLA-限制作用，这是用 HLA 匹配的和错配的用 LFnNef 敏化的靶细胞证实的。用 Lfn-Nef 和最佳 Nef 肽敏化 TAP 缺陷型 (T2)，HLA-B60 靶细胞，并且检测裂解。T2 LfnNef 靶细胞缺乏活性表明需要蛋白体加工。所有克隆都是以 10: 1 的 E: T 比例使用的，并且将裂解水平从所述本底对照中扣除。将 NYCBH 用于重组痘苗病毒对照，并且将 LFn 本身用于 LFnP24 和 LfnNef。阳性对照包括 Nef 肽 180 和重组痘苗载体 Gag (rvv-Gag)。

图 5 A-B 是表示 LFn-HIV 的内化和加工的曲线图。图 5A 表示在存在布雷菲尔德菌素 A、细胞松弛素 B 和氯喹的条件下，用 LfnNef 敏化的 HLA-匹配的靶细胞与单独使用 LfnNef 相比敏化的 HLA-匹配的靶细胞的 Nef 特异性克隆 (KM) 裂解作用。与细胞松弛素 B 和布雷菲尔德菌素 A 共同温育，破坏了 Nef-特异性克隆的识别作用，但是与氯喹一起温育则不能。图 5B 表示相同 Nef 克隆的活性，用表达 Nef 的重组痘苗病毒感染靶细胞过夜，或用最佳表位肽 Nef 180 自身敏化或在存在氯喹、细胞松弛素 B 或布雷菲尔德菌素 A 的条件下敏化。当在存在细胞松弛素 B、氯喹或布雷菲尔德菌素 A 的条件下温育靶细胞和 CTL 克隆时，没有发现活性的显著

降低。所示出的裂解水平扣除了低于 10% 的本底裂解作用。

图 6A-E 是表示在 Elispot 测定中 LFn-HIV 表达的曲线图。将来自 HIV-1 感染的个体的具有已知 HIV-特异性 CTL 活性或表位的低温保存的 PBMCs 用于 Elispot 测定, 该测定使用了重组痘苗病毒或 LFn-HIV。将 LFn 自身和 NYCBH 用作对照。使用重复的孔, 每孔 100K 细胞。结果以 SFC/百万 (每一百万的成斑点细胞) 形式报道。

图 7 A-B 是表示在细胞内流式 (flow-based) 测定中 LFn-HIV 表达的 FACS 曲线图。IFN- γ 在 Nef 特异性克隆 (KM) 中的细胞内生产 (A) 以及来自具有 Env-特异性 CTL 活性的血清阳性个体 (AC2) 的 PBMC (B)。将未刺激过的细胞用作阴性对照 (1), 并且将重组痘苗病毒用作阳性对照 (2), 分别使用 LfnNef 和 LfnEnv (3)。

图 8A 和 B 是表示 LFn 融合蛋白的示意图。

图 9 是表示 LFn 融合蛋白的一系列示意图。

图 10 表示 CHO 细胞对 LFn-GFP 的细胞摄取。在胶原处理过的有隔室的载玻片中培养 CHO 细胞, 达到 80% 的铺满度, 然后与纯化的 LFn-GFP 一起温育 1 小时, 然后用 PBS 和 PBS + 蛋白酶充分洗涤, 以便除去膜结合蛋白。然后用抗运铁蛋白抗体对所述细胞进行染色, 并且用低聚甲醛固定。通过共焦显微术分别检测所述载玻片的绿色 (GFP, (Super-expose) 如图 10A-D 所示) 和红色 (抗运铁蛋白, 如图 10E-H 所示)。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像, 形成了每一个视野的第三种图像 (图 10 I-L)。因此, 黄色斑点表示 GFP 可能存在于与运铁蛋白相同的斑点内, 因此, 提供了对所述细胞内 GFP 定位的参考。如图 10A-D 所示, 在用 LFn-GFP 处理 1 个小时的细胞中, 有大量可见的绿色斑点, 表明 LFn-GFP 确实可以进入细胞。

图 11 表示 CHO 细胞对 GFP 的细胞摄取, 使用了与图 10 所述相同的条件。图 11 A, D 和 G 表示用 GFP 温育 CHO 细胞 1 小时的结果; 图 11 B-C, E-F 和 H-I 表示用 GFP 温育 CHO 细胞 2 小时的结果。图 11 A-C 表示通过共焦显微术检测绿色 (GFP) 的细胞视野; 图 11 D-F 表示通过共焦显微术检测红色 (抗运铁蛋白) 的相应视野; 通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像, 提供了每一个视野的第三种图像 (图 11 G-I)。GFP 处理过的细胞表现出少数绿色斑点 (图 11)。

图 12 表示 GFP 和 LAMP-2 免疫荧光的共同定位, 用于表明所述溶酶

体,使用了与图 10 所述相同的实验方法。图 12A-D 表示通过共焦显微术检测红色的细胞视野(LAMP-2);图 12 E-H 表示通过共焦显微术检测绿色的相应视野(LN-GFP)。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像,提供了每一个视野的第三种图像(图 12I-L)。

图 13 表示 GFP 和 EEA-1 免疫荧光的共同定位,用于表明核内体,使用图 10 所述相同的实验方法。图 13A-D 表示通过共焦显微术检测红色的视野(EEA-1);图 13 E-H 表示通过共焦显微术检测绿色的相应视野(LN-GFP)。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像,提供了第三种图像(图 13I-L)。

图 14 表示 GFP 和抗高尔基抗体的共同定位,使用与图 10 所述相同的实验方法。图 14A-B 表示通过共焦显微术检测红色(抗高尔基抗体)的细胞视野;图 14 C-D 表示通过共焦显微术检测绿色(LN-GFP)的相应视野。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像,提供了每一个视野的第三种图像(图 14E-F)。

图 15 表示 GFP 和抗-20s 免疫荧光的共同定位,用于表示所述蛋白体。条件类似于在图 10 所使用的条件,所不同的是,将 HeLa 细胞与 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LN-gfp 共同温育 2 小时。图 15 A-D 表示通过共焦显微术检测红色(抗 20s 抗体)的细胞视野,图 15E-H 表示通过共焦显微术检测绿色(LN-GFP)的相应视野。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像,提供了每一个视野的第三种图像(图 15I-L)。通过比较图 12-15 中的不同图像,具有大部分黄色斑点的叠加的图像是图 15 所示的图像,其中,绿色斑点表示细胞内 LFn-GFP,它与表示细胞蛋白体的红色斑点显著重叠。

图 16 表示与缺乏 PA 相比,在类似于图 15 所使用的条件下,添加 PA 不会增加细胞内绿色斑点的数量。图 16A-F 表示在没有 PA 的条件下用 LN-GFP 温育 HeLa 细胞;图 16 G-L 表示在有 PA 的条件下温育 HeLa 细胞。图 16 A-B 和 G-H 表示通过共焦显微术检测红色(抗 20s 抗体)的细胞视野,图 16C-D 和 I-J 表示通过共焦显微术检测绿色(LN-GFP)的相应视野。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像提供了每一个视野的第三种图像(图 16E-F 和 K-L)。

图 17 中分别用不同的抗原制剂腹膜内注射免疫三组 BALB/c 小鼠,每组 4 只(15 μg LFn-p24 加 4 μg PA, 15 μg LFn-p24 + 4 μg PA 加明矾,15 LFn-p24 仅加明矾)。在免疫之后 1 周,将来自免疫过的 BALB/c

小鼠的脾单核细胞用作 CTL 源。通过与来自未免疫过的 γ 辐射过的和肽脉冲的 BALB/c 脾细胞一起培养, 体外激活脾培养物中的 CTL。在 37°C 下, 在 CO₂ 孵育箱中培养 6 天之后, 检测成熟的 CTL (效应细胞) 裂解 ⁵¹Cr-标记过的 P20 肽脉冲的 P815 细胞 (阳性靶细胞) 或 ⁵¹Cr-标记过的介质脉冲的细胞 (阴性靶细胞) 的能力。所示出的裂解百分比扣除了阴性靶细胞的本底裂解, 并且是以每一组的平均值形式提供的。

图 18 中分别用 15 μ g LFn-p24, 15 μ g MLFn-p24 和 15 μ g p24 通过腹膜内注射免疫三组 BALB/c 小鼠, 每组 4 只。免疫 1 周之后, 检测脾组织中的 CTL。

发明详述

现在, 我们业已发现了一种用于将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法, 包括在没有保护性抗原 (PA) 的条件下将靶抗原 (如蛋白) 结合于含有二分蛋白外毒素的片段的转运因子。优选将所述靶抗原融合于所述转运因子。所述转运因子优选是来自炭疽芽孢杆菌的致死因子的保护性抗原结合结构域, 它由 1-288 号氨基酸 (SEQ ID NO: 2) 或其不包括 PA 结合结构域的片段, 如羧基部分组成。例如, 所述转运因子的优选类型的氨基酸 LFn1 氨基酸片段的最靠近羧基末端的大约 80 个氨基酸的片段包括至少 80 个氨基酸, 通过用预设参数进行 Blast 分析, 发现它与 SEQ ID NO: 2 具有至少 80% 的同源性。更优选的是, 该片段与它具有至少 90% 的同源性, 更优选, 与它具有至少 95% 的同源性。所述片段优选不包括 PA 结合结构域。一种优选的转运因子是 LFn 片段或其部分。更优选的是, 所述转运因子包括 LFn 的最靠近羧基末端的至少 60 个氨基酸, 但不包括 PA 结合结构域。一种优选的片段具有来自 SEQ ID NO: 2 的羧基部分的大约 105 个氨基酸或更少。

所述靶抗原可以包括希望诱导针对它的 CMI 反应的任何分子, 包括病毒抗原和肿瘤抗原。

本发明的一种实施方案提供了一种包含所生产的新融合多肽的组合物。本发明的另一种实施方案包括通过将外源蛋白递送到胞质溶胶中而检测 CMI 反应的测定方法。一种优选实施方案提供了用于检测 CMI 反应的试剂盒。

本发明的新融合多肽包括与靶抗原连接的转运因子。所述转运因子可

以包括任何二分蛋白外毒素的片段，该片段能在缺乏保护性抗原的条件下将所述蛋白递送到胞质溶胶中，而且不包括任何有毒性的片段。该转运方法不依赖于PA相关的途径，因此不需要PA。一种优选的外毒素是炭疽芽孢杆菌的致死因子(LF) (SEQ ID NO : 1) (图2A)。LF的PA结合结构域是LF_n的一部分，或它的可以跨过细胞膜的片段，由1-255号氨基酸组成(SEQ ID NO : 2) (图2B)。LF_n的任何片段都可以用作转运因子。它优选不包括PA结合结构域，该结构域存在于LF_n的N-末端的一半(1-149号氨基酸)。一种优选片段具有来自SEQ ID NO : 2的羧基部分的105个氨基酸或更少。优选最靠近羧基末端的60个氨基酸，更优选最靠近羧基末端的80个氨基酸，一种优选的转运因子是片段3 (SEQ ID NO : 3) (图2C)。

人们还可以将其他片段用作转运因子。所述转运因子优选是350个氨基酸或更少，更优选300个氨基酸或更少，更优选它是250个氨基酸或更少。

优选用作所述转运因子的其他片段与LF_n的片段3 (SEQ ID NO : 3) 具有至少55%的同源性(图2C)。例如，炭疽芽孢杆菌的水肿因子的片段使用预设参数通过Blast分析，发现与片段3具有大约57%的同源性。更优选它与之具有至少65%的同源性，更优选它与之具有至少75%的同源性；更优选它与之具有至少80%的同源性；更优选它与之具有至少90%的同源性；更优选它与之具有至少95%的同源性。

将所述转运蛋白连接在任何希望递送到胞质溶胶中的抗原上。所述连接优选是融合蛋白形式的。不过，可以产生现有技术中已知的其他接头。例如，一种接头单元可能是所述转运蛋白的一部分，然后通过化学方法将其连接在靶抗原上。优选的抗原包括病毒、细菌、寄生虫和肿瘤相关抗原。优选的病毒抗原包括来自任何病毒的蛋白，其中，需要一种细胞介导的免疫反应。特别优选的病毒包括HIV-1，HIV-2，肝炎(包括乙型和丙型肝炎)病毒，埃博拉病毒，西尼罗病毒和疱疹病毒，如HSV-2。优选的细菌抗原包括来自鼠伤寒沙门氏菌和分支杆菌(包括结核分支杆菌)的抗原。优选的寄生虫抗原包括来自疟原虫属(包括恶性疟原虫)的抗原。

优选的肿瘤抗原包括在诱导T细胞反应时被识别的表位，包括但不限于以下各种：前列腺癌抗原(如PSA, PSMA等)，乳腺癌抗原(如

HER2/neu, 小型-MUC, MUC-1, HER2 受体, mammoglobulin, labyrinthine, SCP1, NY-ESO-1, SSX-2, N-末端封闭的可溶性细胞角蛋白, 43 kD 人类癌抗原, PRAT, TUAN, Lb 抗原, 癌胚抗原, 聚腺苷酸聚合酶, p53, mdm-2, p21, CA15-3, 癌蛋白 18/stathmin, 和人腺体激肽释放酶), 和黑素瘤抗原等。

当人们希望在受治对象体内产生免疫反应时, 优选还可以使用一种免疫佐剂。佐剂为本领域所公知, 并且包括细胞因子, 如 IL-2, Ig-IL-2, CM-CSF, CpG, RIBL Detox (Ribi Immunochemical), QS21 (Cambridge Biotech), 不完全弗氏佐剂及其他。我们业已意外地发现, 尽管明矾在现有系统中确实能抑制 CTL 诱导, 还是将明矾优选用于刺激特异性 CTL。

本发明的方法还可用于通过与 CMI 测定组合制备与所述转运因子融合的肿瘤抗原文库而鉴定其他癌抗原, 如下文所述。

所述靶抗原可以是能够递送到胞质溶胶中的任何大小的抗原。所述靶抗原优选少于 750 个氨基酸, 更优选少于 600 个氨基酸, 更优选少于 500 个氨基酸。

本发明的新融合多肽可以包括单个靶抗原或多个靶抗原作为单个融合蛋白的一部分。一种优选的融合多肽包括若干种 HIV-1 蛋白的片段, 如 gag 和 nef (图 8, 9)。

人们还可以利用诸如 HIV 的感染性病毒的多种菌株制备表位 (参见图 9)。

所述新融合多肽可以是较大的多聚体分子的一部分, 它可以是通过重组方法生产的或可以是化学方法合成的。所述多聚体还可以包括与除了氨基酸以外的部分, 包括脂类和糖类融合或偶联的多肽。

所述多聚体蛋白优选由在同一分子内的重复的多个 T 细胞表位组成, 所述表位是随机排列的, 或者在它们之间具有间隔基 (氨基酸或其他成分)。

可以方便地制备编码所述新融合蛋白的 DNA 序列。例如, 编码 LFn 的序列是众所周知的, 并且可以通过已知技术修饰, 如缺失不需要的部分, 如可变环, 并且插入任何其他需要的编码序列, 如接头片段。编码各种靶抗原的所述序列在本领域中也是已知的。另外, 编码各种氨基酸残基的密码子是已知的, 并且通过标准技术可以方便地制备其他编码序列。

DNA 序列可以在多种动物中使用，以便表达所述新融合蛋白，所表达的融合蛋白可用于多种用途，包括用于疫苗组合物和用于 CMI 测定，如下文所述。

编码新融合蛋白的 DNA 能够以多种宿主/载体组合形式表达。载体包括化学偶联物，如披露于 WO 93/04701 中的偶联物，它具有导向部分（例如，细胞表面受体的配体）和核酸结合部分（例如聚赖氨酸），病毒载体（例如，DNA 或 RNA 病毒载体），质粒，噬菌体等。所述载体可以是染色体、非染色体或合成载体。

例如，可用于真核宿主的表达载体包括含有源于 SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、腺伴随病毒、巨细胞病毒和逆转录病毒的表达控制序列的载体。可用于细菌宿主的表达载体包括细菌质粒，如来自大肠杆菌的质粒，包括 pBluescript, pGEX-2T, pUC 载体, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 及其衍生物，较宽宿主范围质粒，如 RP4，噬菌体 DNAs，例如， λ 噬菌体的多种衍生物，例如， λ .GT10 和 λ .GT11，以及其他噬菌体。可用于酵母细胞的表达载体包括 2 μ 质粒及其衍生物。可用于昆虫细胞的载体包括 pVL 941。

优选的载体包括病毒载体，融合蛋白和化学偶联物。逆转录病毒载体包括 Moloney 鼠白血病病毒和基于 HIV 的病毒。一种优选的基于 HIV 的病毒载体包括至少两种载体，其中，gag 和 pol 基因来自 HIV 基因组，而 env 基因来自另一种病毒。优选 DNA 病毒载体。所述载体包括疱疹病毒载体，如单纯疱疹 I 病毒(HSV)载体(Geller, A. I. 等., J Neurochem 64: 487, 1995; Lim, F. 等., 见 DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed., Oxford Univ. Press, Oxford England, 1999; Geller, A. I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7603, 1993; Geller, A. I., I Proc Natl. Acad. Sci USA 87: 1149, 1990), 腺病毒载体(LeGal LaSalle 等., Science 259: 988, 1993; Davidson, 等., Nat. Genet 3: 219, 1993; Yang, 等., R Virol. 69: 2004, 1995), 和腺伴随病毒载体(Kaplitt, M. G., 等., Nat. Genet. 8: 148, 1994)。将所述 DNA 序列与一种启动子可操作地连接，以便能在宿主细胞中表达。所述启动子为本领域所熟知，并且可以方便地选择。

可以将多种单细胞宿主细胞用于表达本发明的 DNA 序列。所述宿主可以包括众所周知的真核和原核宿主，如大肠杆菌、假单胞菌属、芽孢

杆菌属、链霉菌属、真菌、酵母，昆虫细胞，如草地贪夜蛾(SF9)，动物细胞，如CHO和小鼠细胞，非洲绿猴细胞，如COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40和BMT 10，和人类细胞，以及组织培养的植物细胞。本发明的分子可用于制备多种生产细胞，这些生产细胞特别适用于生产某些目前难于在细胞中大量表达的蛋白。

包括由本发明的DNA序列编码的新融合多肽的分子可以从发酵物或细胞培养物中分离，并且用多种常规方法中的任意一种纯化，包括：液相层析，如正相或反相层析，使用HPLC, FPLC等；亲和层析（如使用无机配体或单克隆抗体）；大小排阻层析；固定的金属螯合层析；凝胶电泳等等；在不超出本发明范围的前提下，本领域技术人员可以选择最合适的分离和纯化技术。

可以方便地制备所述新融合蛋白的稳定化形式，例如，通过偶联，如聚（烯化氧）偶联物。所述偶联物优选是通过将所述聚（烯化氧）的羟基末端共价键合于所述融合蛋白的不会影响其构象的部分的游离氨基而形成的。其他本领域认可的偶联所述物质的方法包括酰胺或酯连接。可以使用共价连接以及非共价偶联，如亲脂性或亲水性相互作用。

所述偶联物可以包括非抗原性聚合物，如葡聚糖，聚乙烯吡咯烷酮，多糖，淀粉，聚乙烯醇，聚丙烯酰胺或其他类似的，基本上为非免疫原性的聚合物。优选聚乙二醇（PEG）。其他聚（烯化氧）包括单甲氧基-聚乙二醇聚丙二醇，聚乙二醇的嵌段共聚物，和聚丙二醇等。还可以用C1-4烷基取代单甲氧基基团对所述聚合物的远端进行封端。所使用的聚（烯化氧）在室温下必须可溶于液体。因此，其分子量优选为大约200-大约20,000道尔顿，更优选2,000-大约10,000，更优选大约5,000。

本领域技术普通技术人员可以理解的是，可以在所得到的本发明的新融合蛋白上偶联多种可能的成分。例如，参见"Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds.), Carger Press, New York, 1989, 该文献的所有内容被收作本文参考。

偶联可以通过结合两种分子的任何化学反应实现，只要所述新融合蛋白和其他部分保留其相应的活性就行。这种连接包括许多化学机制，例如，共价结合，亲和结合，嵌入，配位结合和复合。不过，优选的结合

是共价结合，共价结合可以通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥接分子的掺入而实现。很多二价和多价连接剂可用于将蛋白分子，如本发明的抗体与其他分子偶联。例如，典型的偶联剂可以包括有机化合物，如硫酯，碳二亚胺，琥珀酰亚胺酯，二硫氰酸盐，戊二醛，重氮苯和六亚甲基二胺。以上所列举的偶联剂并非是对本领域已知的各种类型连接剂的穷举，相反，它只是更常见的偶联剂的代表(参见 Killen 和 Lindstrom, *J. Immunol.* 133: 1335-2549, 1984; Jansen, F. K., 等., *Imm. Rev.* 62: 185-216, 1982 和 Vitetta et al., 同上)。

优选接头披露于文献中。例如，参见 Ramakrishnan, S., 等., *Cancer Res.* 44: 201-208 (1984)，其中披露了 MBS (M-马来酰苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯) 的用途。还可参见 Umemoto 等., 美国专利 5,030,719, 该专利披露了通过寡肽接头将卤化酰肼衍生物偶联在一种抗体上。特别优选的接头包括: (i) EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐); (ii) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫)-甲苯 (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G)); (iii) SPDP (琥珀酰亚胺基-6-[3-(2-吡啶基二硫)丙酰氨基]己酸酯 (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) 硫代-LC-SPDP (硫代琥珀酰亚胺基 6-[3-(2-吡啶基二硫)-丙酰胺]己酸酯 (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); 和 (v) EDC 偶联的磺基-NHS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺: Pierce Chem. Co., Cat. #24510)。

上文所披露的接头包括具有不同作用的成分，因此，产生了具有不同生理化学特性的偶联物。例如，烷基羧酸酯的磺基-NHS 酯比芳族羧酸酯的磺基-NHS 值更稳定。含有 NHS-酯的接头的溶解度比磺基-NHS 酯的溶解度低。另外，所述接头 SMPT 含有空间位阻二硫键，并且，可以形成稳定性增加的偶联物。一般，二硫键的稳定性比其他键差，因为二硫键在体外被裂解，导致了较低的偶联物可利用性。具体地讲，磺基-NHS 可以增强碳二亚胺偶联的稳定性。当碳二亚胺偶联(如 EDC)被用于与磺基-NHS 结合时，所形成的酯比碳二亚胺偶联反应本身更抗水解作用。

本发明的新融合蛋白可用于蛋白的稳定表达。例如，某些蛋白在某些表达系统中是难于表达的，这些系统包括细菌表达系统。与诸如 LFn 的转运因子融合之后，可以稳定某些所述蛋白。我们业已发现，所述转运因子优选为 250 个氨基酸或更少，更优选 150 个氨基酸或更少，更优选

105 个氨基酸或更少，甚至更优选 80 个氨基酸或更少。

本发明的融合蛋白可用于产生免疫反应，例如，作为疫苗。

典型的药物组合物是治疗有效量的新融合蛋白，它能诱导免疫反应，因此，起着预防性免疫原的作用，任选包含在可以药用的、并且相容的载体中。本文所使用的术语“可以药用的并且相容的载体”将在下文作更全面的说明，它包括 (i) 一种或多种相容的固体或液体填料稀释剂或胶囊化物质，所述物质适合给予人类或其他动物，和/或 (ii) 一种能够将所述分子递送到靶细胞中的系统。因此，在本发明中，术语“载体”表示天然的或合成的有机或无机成分，本发明的分子与它组合，以便有利于使用。术语“治疗有效量”是本发明的药物组合物能产生需要的结果或对要治疗的特定症状产生需要的影响的本发明药物组合物的量。例如，产生提供预防性保护作用的免疫反应所需要的量。通常，当所述组合物被用作预防性免疫原时，在初次给药之后，需要定期进行至少 1 次“加强”。在制备采用相同成分的组合物时可以使用各种浓度，以便提供针对接受治疗的患者的年龄、症状严重程度、治疗持续时间和给药方式的变化。

在一种优选实施方案中，将同样是免疫原性多肽的本发明的新融合多肽掺入多成分疫苗中，该疫苗可能包含其他免疫原性多肽。多成分疫苗可以包含本发明的新融合蛋白，以便诱导 T 细胞反应，并且包含其他抗原，以便诱导 B 细胞反应。

在一种优选的免疫方法中，可以用本发明的新融合蛋白激发，然后用不同的新融合蛋白加强。

人们还可以用含有多种不同新融合蛋白的混合物激发，并且可以用多种不同的新融合蛋白或用包含多种抗原的融合蛋白加强（图 8，9）。

可以将所述新融合蛋白用于制备能够识别并且与之相互作用的多种抗原，例如，来自不同 HIV 菌株的抗原的多种 T 细胞。还可以将所述新融合蛋白的 DNA 序列用作亚单位疫苗。

为了产生免疫反应，如用一种疫苗组合物产生免疫反应，优选还使用一种佐剂。佐剂包括，但不局限于明矾，RIBI Detox (Ribi Immunochemical)，QS21 (Cambridge Biotech)，和不完全弗氏佐剂。明矾是优选的佐剂。另一类佐剂包括诸如细胞因子的免疫刺激剂，如 IL-12，IL-4 和诸如 B7 的共刺激分子。已知具有免疫刺激作用的多种分

子包括诸如 ICAM 和 LFA 的辅助分子。在一种优选实施方案中，在最初的免疫给药之前，给予患者 GM-CSF。GM-CSF 可以用一种病毒载体给药，或作为药物制剂中的分离的蛋白给药。可以使用佐剂的组合，如 GM-CSF，ICAM 和 LFA。尽管通常会产生针对感染性疾病抗原的强的免疫反应，而对于肿瘤相关抗原来说，通常会产生较弱的免疫反应。因此，优选将上文所述的免疫刺激剂与它们一起使用。如上文所述，明矾是优选的佐剂。

本发明的免疫刺激组合物可有利地与其他治疗方案一起使用。例如，所述系统可以与传统治疗方案联合用于癌症治疗，包括手术、放疗、化疗和激素治疗。例如，包含本发明新融合蛋白的乳腺癌疫苗可以与能干扰雌激素活性的柠檬酸他莫昔芬联合使用。该系统还可以与免疫治疗联合，例如，使用 Herceptin™ (trastuzumab)，即为了阻断 HER2 受体而开发的一种抗 HER2 人源化单克隆抗体；骨髓移植；和外周血干细胞治疗也可以使用。可以与本发明组合物联合使用的其他优选的治疗方案，包括血管发生抑制剂和细胞毒性剂。

本文所使用的术语“相容性”表示所述药物组合物的成分能够与本发明的小分子、核酸和/或多肽混合，并且彼此混合，其方式使得不会显著破坏需要的药效。

本发明药物组合物的剂量根据受治对象以及所使用的特定给药途径而变化。剂量可以为 0.1-100000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ ，更优选 1-10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。所述组合物的优选剂量优选为至少 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。仅仅是举例来说，对于人类而言可以使用例如大约 1mg-大约 300mg/的总的剂量范围。该剂量可以根据组合物以定期的间隔递送。例如，至少分 2 次给药，优选间隔大约 4 周。其他化合物可以每天给药。本发明的药物组合物还可以按照多种其他业已充分鉴定的方法给予受治对象。例如，某些目前被接受的免疫方案包括以下方案：(i) 给药时间为，第一个剂量在选定日期给药；第二个剂量在第一个剂量之后 1 个月给药；第三个剂量在随后的日期，例如，在第二剂量之后 5 个月给药。参见 Product Information, Physician's Desk Reference, Merck Sharp & Dohme (1990), 1442-43. (例如，乙型肝炎疫苗型方案)；(ii) 例如，对于其他疫苗来说，所推荐的儿童给药方法是第一个剂量在选定日期给药 (6 周大或更大一些)；第二个剂量在第一个剂量之后 4-8 周给药；第三个剂量在第二个剂量之后 4-8 周给

药；第四个剂量在第三个剂量之后 6-12 个月给药；第五个剂量在 4-6 岁大时给药；在最后一个剂量之后，每隔 10 年进行额外的加强。参见 Product Information, Physician's Desk Reference, Merck Sharp & Dohme (1990), 879 (例如，白喉、破伤风和百日咳型疫苗方案)。用于递送特定组合物的多个剂量的理想的时间间隔，可以由本领域普通技术人员通过少量常规实验就可以确定。

本发明的新融合蛋白还可以单独（纯粹）给药，或者以可以药用的盐的形式给药。在用于医药中时，所述盐应当是可以药用的，但是非可以药用的盐可以被方便地用于制备它的可以药用的盐，并且没有被排除在本发明范围之外。所述可以药用的盐包括，但不局限于用以下酸制备的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、唾液酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸、和苯磺酸。另外，可以药用的盐可以制备成碱金属或碱土金属盐，如羧酸基团的钠、钾或钙盐。因此，本发明还提供了用于医学使用的药物组合物，它包含本发明的核酸和/或多肽，以及一种或多种它的可以药用的载体，并且任选包含任何其他治疗成分。

所述组合物包括适合口服、直肠、阴道内、局部、鼻内、眼内或肠胃外给药的组合物，上述所有给药途径都可以用作使用本发明物质的给药途径。其他合适的给药途径包括直接鞘内给药至脑脊液（CSF），直接注射到动脉表面和通过实质内注射，直接注射到器官内靶部位。优选适合肠胃外给药的组合物。术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内、肌内、胸骨内注射或输液技术。优选肌内给药。

所述组合物可以方便地以单位剂量形式提供，并且可以通过药物学领域所熟知的任何方法制备。所述方法通常包括将本发明的活性成分与构成一种或多种辅助成分的载体结合在一起的步骤。

适合口服的本发明的组合物可以以独立的单位形式提供，如胶囊、扁胶囊、片剂或锭剂，各自在脂质体中含有预定数量的本发明的核酸和/或多肽，或作为悬浮在含水液体或无水液体中的悬浮液，如糖浆、酏剂、或乳液。

适合肠胃外给药的优选组合物通常包含本发明分子的无菌含水制剂，该制剂优选是与受体血液等渗的。所述含水制剂可以按照已知方法，用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制。无菌注射制剂还可以是溶解在

无毒、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如溶解在 1, 3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载体和溶剂包括水、Ringer's 溶液、和等渗氯化钠溶液。另外，通常将无菌固定油用作溶剂或悬浮介质。为此，可以使用任何无刺激性固定油，包括合成的一或二甘油酯。另外，诸如油酸的脂肪酸可用于制备注射剂。

为了进一步改进产生本发明提供的细胞介导的反应的可能性，可以分析由本发明的核酸序列所编码的多肽的氨基酸序列，以便鉴定可能与受体结合相关的氨基酸序列的需要部分。例如，可以对多肽序列进行计算机分析，以便确定所述位点。

通过合适的测定方法，如下文所披露的 CMI 测定，以及通过其他常规类型的免疫测定方法，可以检测与本发明分子形成的复合物。

本发明提供了体外测定细胞介导的免疫反应的测定方法。用于检测 CMI 反应的现有的实验室鉴定方法存在严重缺陷，特别是在各种临床场合下应用于大的疫苗效力试验时更是如此。这是因为现有的设备和技术支持是有限的。如上文所述，人们认为 CTL 在控制 HIV-1 感染方面发挥关键作用，设计了多种 HIV-1 疫苗候选物以刺激 T 细胞反应，以及中和抗体 (1-6)。

本发明的用于测定 T 细胞反应的方法对于开发所有 T 细胞依赖型疫苗或免疫疗法具有重要作用。该策略可应用于其他研究领域，其中，CMI 反应在预防和控制有关疾病方面发挥重要作用。

在一种优选实施方案中，本发明提供了新融合多肽在 Elispot 测定中的用途。Elispot 测定的主要优点是，可以对大量人群的大量 CTL 反应进行有效和经济的评估（例如，参见 Lalvani 等., J. Exp. Med. 186: 859-65 (1997)）。Elispot 测定可以使用任何标准细胞，包括低温保存的 PBMCs，以及 CD8+ CTL 细胞。例如，来自 HIV-1 阳性个体的 CD8+ CTL 克隆。

另一种优选实施方案提供了将所述新型融合多肽用于流式细胞内细胞因子测定的用途。基于流式细胞术的测定，可以在体外刺激抗原特异性 T 细胞之后检测细胞因子的细胞内积累。用抗原刺激 CTLs，并且与布雷菲尔德菌素 A 一起温育，它能抑制蛋白转运，并且在细胞内积累新合成的蛋白，如细胞因子。表面标记 (CD8, CD3) 和 IFN- γ 和 CD69 的细胞内染色，可以在未表征过的 MHC 背景中针对抗原性表位对特定细胞群进

进行检测和定量。

使用本发明新型融合多肽的 CMI 测定，可用于评估针对多种病毒、细菌和肿瘤抗原的细胞免疫反应。所述测定可用于评估疫苗效力或抑制传染性病原体的感染状态。

使用本发明的新型融合多肽的 CMI 测定还可用作检测癌抗原的早期诊断试剂盒。

本发明还提供了用于检测 CMI 反应的试剂盒。一种优选的试剂盒包含装在试管、孔等中的新融合蛋白。所述试剂盒优选包含用于体外检测 CMI 反应的含有病毒或肿瘤的试剂。所述试剂盒优选包含用于抽取诸如血液的生物样品的装置。在一种优选实施方案中，所述试剂盒包含指导检测 CMI 反应的说明书。所述试剂盒优选包含冷冻干燥形式的新融合蛋白。

一种优选的试剂盒包含冷冻干燥的，并且涂敷在用于采集血液的试管内侧上的新融合蛋白。这样，可以将血液直接从个体体内抽入所述试管中，以便温育数小时（例如 4 小时），然后固定。这种固定样品可长时间（例如 2 周）稳定用于 CMI 测定。所述试剂盒特别适用于野外校正样品，例如，在疫苗效力试验期间使用，这种情况通常出现在偏远地区。类似地，其他优选实施方案包括涂敷在诸如平皿、孔或试管的任何表面上的冷冻干燥的蛋白，可以在它上面添加小体积的生物样品。优选的生物样品包括血液、尿液、唾液、粪便、来自脑脊液的上清液和细胞样品。

在一种特定例子中，诸如上文所述的可能仅含有 LFn 的羧基部分的 LFn 融合蛋白，可以在缺乏 PA 的情况下，以 MHC-I 限制方式敏化 CTL 靶细胞。在这种向 MHC-I 途径呈递外源蛋白抗原的新方法中，抗原的胞质溶胶递送取决于与细胞内抗原加工相关的功能性转运，而不依赖于活的病毒或细菌载体。所述 LFn 片段是能够从胞质溶胶进入 MHC-I 途径的新类型蛋白的例子。事实上，例如，LFn 可以在缺乏 PA 的条件下将 HIV-I 抗原递送到细胞质中，这一点与现有的对有关炭疽致死毒素如何起作用的假说相矛盾（32）。在正常情况下，LF（炭疽致死因子）是取决于 PA 的，以便发挥其毒性作用，并且 LF 的毒性结构域可能具有防止进入细胞的未知功能。

另外，诸如 LFn-HIV 的融合蛋白，可以用作调整和简化用于在疫苗

试验中检测 T 细胞反应的方法的工具。该方法还可用于研究其他细胞内病毒或细菌疾病，如病毒性肝炎，TB，和疟疾。本发明可消除在现有 CMI 测定中使用活的重组痘苗病毒的必要性。与使用重叠的合成肽相比，它还具有若干优点，这种重叠的合成肽不仅昂贵，并且尚未证实对具有 HLA-I 多样性的不同群体的理论覆盖率。所述新抗原递送提供了简化的 CMI 测定，该测定方法被普遍应用于野外用途。另外，所述 LFn 融合蛋白便于在大肠杆菌中生产，可以用相对简单的方法纯化，并且稳定。

本发明所提供的所有新融合多肽，以及编码所述多肽的 DNA 序列基本上不含炭疽芽孢杆菌保护性抗原或其片段，因此可安全地用于多种用途，而没有对宿主造成意外损伤的危险。因此，本发明的新型融合多肽特别有利于用于产生针对靶抗原的多种细胞介导的反应的组合物和方法。

下面的实施例用于说明本发明，而不是要以任何形式限定本发明。

实施例 1

材料和方法

LFn-HIV 融合蛋白

通过 PCR 扩增来自 HIV-HXB 的编码 env gp120, gag p24 的 DNA 片段，克隆到 LFn 表达质粒 pET15bLFn 上，并且测序，以便证实 LFn 和 HIV 编码序列之间的框内融合。由 HIV-ELI 扩增 Nef 编码序列。LFn 及其融合衍生物的蛋白表达载体是 pET15b 质粒 (Novagen ;Madison, WI)。该载体系统的主要特征包括诱导型 T7 启动子，用于蛋白纯化的内部 His-标记，和多个克隆位点。重组 LFn 是以细胞内可溶蛋白形式在大肠杆菌中表达的，在其 N-末端具有 6 个串联的组氨酸残基(14)。在 10 升 Bioflow 2000 台式生物反应器 (New Brunswick Scientific, NJ) 中生长细菌。使用市售试剂盒，按照生产商 (Novagen) 的方法纯化带有 His-标记的蛋白。通过现有技术修饰 LFn 编码区可以制备 LFn 片段。

试剂

在 Applied Biosystems 肽合成仪 (Model 430A) 上合成合成肽。所使用的重组痘苗病毒是 vAbT 141 (Gag), vAbT 299 (Env) 和 Nef (15)，用 NYCH 作为对照痘苗载体。将布雷菲尔德菌素 A，细胞松弛素 B 和氯喹

(Sigma, St Louis, MO) 添加到细胞培养物中, 培养 2 小时, 并且洗涤 2 次, 然后重新添加到所述细胞中。用于流式分析的抗体是从 Becton-Dickinson (San Jose, CA) 获得的。

流式细胞内细胞因子染色

用 LFN-HIV (30 μ g/ml)、重组痘苗载体 (MOI 3-5) 或肽 (10 μ g/ml) 在 37°C 下, 在 5% CO₂ 中温育低温保存的 PBMCs 过夜。用最佳肽 (10 μ g/ml)、LFn-HIV (10 μ g/ml) 或重组痘苗病毒 (MOI 3-5) 温育自体 B-LCLs 过夜, 洗涤 2 次, 并且在存在共刺激抗 CD28 和抗 CD49d (1 μ g/ml, Becton-Dickinson, San Jose, CA) 的条件下以 10: 1 的 E:T 比例添加到效应细胞中。然后添加布雷菲尔德菌素 A (10 μ l, 1 μ g/ml), 并且在 37°C 下温育细胞培养物 6 小时 (对于 APC 来说使用 IgG1, 对于 FITC 来说使用 PE, PerCP 和 IgG2b) 或别藻蓝蛋白 (APC) 标记的 CD3 单克隆抗体 (Mab), 藻红蛋白 (PE) 标记的抗-CD8 Mab (Becton Dickinson) 的饱和溶液染色。在 4°C 下遮光温育 20 分钟之后, 用 FACS 洗涤液洗涤 2 次。添加 100 μ l 试剂 A (Fix and Perm 试剂盒, Caltag Laboratories, Austria), 并且在室温下 (RT) 遮光温育 20 分钟之后, 用 FACS 洗涤液洗涤 2 次。然后添加 100 μ l 试剂 B (Fix and Perm 试剂盒), 并且在室温下温育细胞 5 分钟。在添加 FITC-IFN γ 和多甲藻素叶绿素蛋白 (PerCP)-偶联的 CD69 Mab (CD69 perCP) 抗体并且在 4°C 下遮光温育之后, 用 FACS 洗涤液洗涤所述细胞两次, 并且在 Becton Dickinson FACScalibur 流式细胞计上, 用 Cell Quest 软件分析。

使用 FACScalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 和 Cellquest 软件 (Becton Dickinson) 通过四色染色分析样品。所使用的阴性对照和阳性对照是未刺激过的细胞和分别用促分裂原植物凝集素 PHA (0.25 μ g/ml, Murex Biotech) 刺激过的细胞。

细胞系和培养条件

将自体 Epstein-Barr 病毒 (EBV)-转化过的 B 类淋巴母细胞以及 T1 和 T2 (HLA-B60) 细胞系用作抗原呈递细胞 (APCs)。用合适的指数肽或 LFn-HIV 构建体脉冲靶细胞, 或用重组痘苗病毒感染过夜。AC 13 (HLA B 14 限制的 p24 [DRFYKTLRA]) 和 KM (HLV B60 限制的 Nef [KEKGGLEGL])

是 Gag 和 Nef-特异性克隆 (分别) 和 AC2 (HLA B44 限制的 gp120 [AENLWVTVY])。都是从 HIV 感染的个体体内获得的, 对这种个体的 CTL 反应业已作过充分鉴定 (Rosenberg, 个人通信), 并且通过一个血清阳性乌干达人制备了 Env 特异性克隆 (SP 511) (16)。用于 Elispot 研究的 PMBCs 是来自塞内加尔和乌干达的 HIV-1 感染的个体 (15, 16)。为了研究布雷菲尔德菌素 A, 细胞松弛素 B 或氯喹对 LFn-HIV MHC-I 类限制呈递的影响, 用所述蛋白构建体标记 APCs, 在 RPMI 1640m 10% FCS 中培养, 并且与相应的试剂共培养 1 小时, 然后洗涤, 并且通过标准铬释放测定检测。

Elispot

对低温保存的 PMBCs 进行 Elispot 测定。在 4℃ 下, 用 0.5 mg/ml 的单克隆抗体 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden) 对 96 孔硝酸纤维素平板 (Millititer, Millipore Corp., Bedford, MA) 预包被过夜。然后用磷酸缓冲的盐溶液 (PBS) 洗涤所述平板 6 次, 分别以每孔 50,000 个细胞, 和每孔 25,000 个细胞的密度添加 PMBCs 至双份的孔。在 37℃ 下, 在 5% CO₂ 中温育所述平板过夜, 并且以 0.5 mg/ml 的浓度添加生物素化的单克隆抗体抗 IFN- γ -Mab (Mabtech), 温育 10 分钟, 然后添加链亲和素-ALP (Mabtech) 在室温下温育 1 小时。用 PBS 洗涤所述平板 3 次, 并且添加 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯和硝基兰 (Sigma), 以便使反应显色。15 分钟之后, 添加自来水以便终止反应。以暗斑形式检测各个细胞因子生长细胞, 观察所述细胞, 并且以 SFC/孔 (成斑点集落/孔) 形式定量。从所述斑点数量中扣除对照孔的数量, 并且将 4 个孔加以平均计算 CTL 频率 (CTLp)。最终的 CTLp 是作为每 10⁶ 个细胞的平均频率形式报导的。如果 SFCs 至少为对照的 2 倍的话, 就将其反应视为是阳性的。本底 SFC 平均低于 15/孔。

铬释放测定:

在存在重组 IL-2 的条件下, 用抗 CD3 单克隆抗体 (12F6) 刺激 CD8+ CTL 克隆, 并且在 7 天内测定活性。用表达 HIV-1 基因产物的重组痘苗病毒 (感染复数为 3-5) 或用 LFn 蛋白 (5-30 μ g/ml) 感染靶细胞, 包括自体 B-LCL 或 HLA-匹配的 APCs 过夜, 并且用放射性铬 (⁵¹Cr) 标记。在

200 μ l 的最终体积中, 效应细胞: 靶细胞的比例(E: T)为 10: 1, 所有特征都是在双份的孔中进行的。4 小时之后收获上清液, 并且根据以下公式确定特异性裂解的百分比: $100 \times [(\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})]$ 。HIV-特异性 CTL 活性被定义为高出本底/对照 10%。对于所有测定来说, 自发释放小于最大释放的 30%。

在没有 PA 的条件下由 LFn-HIV 介导的 HIV-1 抗原进入和加工:

为了评估 LFn-HIV 与细胞表面上的 MHC-I 分子缔合的能力, 在存在或不存在 PA 的条件下, 用 LFn-HIV 敏化类淋巴母细胞 B 细胞系 (B-LCL), 并且通过标准铬释放测定, 用若干业已充分表征的 HIV-特异性 CTL 克隆进行测定 (图 3)。我们发现在有或没有 PA 的条件下, 用 LFn-HIV 对 CTL 识别的靶细胞的敏化程度相当。裂解水平是取决于剂量的, 并且获得了与阳性对照相当的水平, 其中, B-LCLs 是用表达相同 HIV 抗原的重组痘苗病毒感染的。只有在靶细胞与 LFn-HIV 一起长时间 (8 小时与 1 小时) (数据未发表) 温育时, 才证实了 HIV-特异性 CTL 活性, 表明了表面抗原出现的推迟和需要细胞内加工。

LFn-HIV 在经典 MHC-I 途径中呈递

我们随后证实了 LFn-HIV 是由经典的 MHC-I 途径提供的, 表现为 CTLs 对所述构建体的识别是 HLA-I 限制性的 (图 4)。用呈递 LFn-Nef 或 LFn-p24 的 HLA 匹配的和错配的靶细胞, 分别检测 HLAB60-和 B14-限制型的两种 Nef- (KM) 和 Gag-特异性 (AC13) 克隆。只有 HLA-匹配的靶细胞表现出显著裂解, 证实了 LFn-HIV 的 MHC-I 呈递。

我们还检查了 LFn-HIV 的摄取和加工的潜在机制。为了确定 LFn-HIV 在细胞表面上的内化是否是活跃进行的, 我们用 100 μ M 的细胞松弛素 B (17, 18) ——一种吞噬作用抑制剂预温育 B-LCL, 然后添加 LFn-HIV 抗原。在存在细胞松弛素 B 的情况下, 破坏了 CTL 识别, 这表明它是一种胞吞介导的内化过程。

如果将外源 LFn 融合蛋白导入胞质溶胶, 并且随后进行加工的话, 就需要 TAP 蛋白 (与抗原加工相关的转运蛋白), 以便将肽转运到 ER 腔中与 MHC-I 结合 (19-21)。为了评估在胞吞作用之后对抗原加工的要求, 我们检测了 LFn-HIV 融合蛋白敏化 B60-表达细胞系 T1 和 T2 以便由 CTL

裂解的能力。T2 细胞 (22-24) 是缺乏 TAP 功能的 T1 细胞的衍生物, 它能将肽从蛋白体转运到 ER 腔中, 以便与 MHC-I 结合 (19, 20)。在 T2 细胞中的识别受到破坏 (图 4B), 表明在加工之后需要表位转运。如果用直接针对表面“空” MHC-I 分子的最佳表位肽脉冲所述细胞的话, 相同克隆对 TAP 缺陷型靶细胞的识别得以保持, 避免了对细胞内加工的需要。

为了进一步证实外源蛋白进入 MHC I 类途径的机制, 用布雷菲尔德菌素 A 处理靶细胞, 它能抑制来自 ER 和高尔基复合体的蛋白的胞吐作用, 并且抑制新组装的肽-MHC 复合体到达细胞表面 (25)。在给靶细胞呈递 LFn-HIV 之前添加布雷菲尔德菌素 A, 能有效阻断 CTLs 的识别作用 (图 5)。这一发现, 连同以前对 HLA 限制和 TAP 需求的验证, 证实了 LFn-HIV 是由 MHC I 类途径中的 B-LCL 加工和呈递的。

LFn-HIV 的加工对氯喹是不敏感的

很多外源抗原在 MHC-I 分子上的呈递涉及到在胞吞腔室中的蛋白水解作用 (26-28), 并且所述肽随后得以进入胞质溶胶, 在这里它进入 MHC I 类途径。为了研究 LFn 介导的抗原呈递作用是否需要在酸性小泡中的蛋白水解作用, 我们在接触 LFn-HIV 期间用氯喹处理 B-LCL (图 5)。已知氯喹能提高内体和溶酶体区室的 pH, 从而抑制组织蛋白酶的蛋白水解作用, 这种酶的活性需要酸性环境 (29, 30)。我们的发现表明, 具有渗漏特征的吞噬体不是 LFn-HIV 进入胞质溶胶的必要条件。

如果用最佳八聚体表位脉冲靶细胞表面的话, 添加细胞松弛素 B、布雷菲尔德菌素 A 或氯喹, 不会影响靶细胞的识别和裂解, 这表明所述试剂既不会影响 CTL 功能, 又不会影响靶细胞存活力 (图 5)。

通过不同的 CMI 测定比较 LFn-HIV 和重组痘苗病毒

在证实了 LFn-HIV 用 MHC-I 分子将 CTL 表位呈递到细胞表面的能力之后, 我们进一步试验了 LFn 融合蛋白在各种 CMI 测定中的可应用性, 包括酶联斑点 (Elispot) 测定和流式细胞内干扰素测定。这些测定方法提供了对 T 细胞反应的更简单和更快速的评估, 并且, 理论上更适合大规模临床测试, 特别是用于疫苗研究领域。Elispot 测定的主要优点是, 可以在大量人群中对 HIV-特异性 CTL 反应进行有效和经济地评估 (31)。

目前,有多种抗原刺激被用于该测定,包括能表达 HIV 抗原的重组痘苗病毒或重叠的合成肽。在 Elispot 测定中,测试了来自若干 HIV-1 阳性个体的冷冻保存的 PBMCs 和 CD8+ CTL 克隆,与能表达相同抗原的重组痘苗病毒平行使用 LFn_{p24}, LFn-Nef 或 LFn-gp120。用 LFn-HIV 观察到了相当的斑点形成集落,并且在某些场合下,与重组痘苗病毒相比出现了更少的本底斑点(图 6)。

通过流式细胞测定检测在体外刺激抗原特异性 T 细胞之后细胞因子的细胞内积累。用抗原刺激 CTLs,并且用布雷菲尔德菌素 A 温育,它能抑制蛋白转运,并且使得诸如 IFN- γ 的新合成的细胞因子在细胞内积累。表面标记(CD8, CD3)和 IFN- γ 和 CD69 的细胞内染色,可以在未鉴定过的 HLA-I 背景中对针对抗原性表位的特异性 T 细胞群进行检测和定量。用 LFn-Nef 刺激 Nef-特异性克隆(KM),并随后通过流式分析评估干扰素的细胞内生产(图 7A)。在 CD8+细胞群中,用 LFn-Nef 和表达 Nef 的重组痘苗病毒检测 Nef-特异性反应。用 LFn-Env 和表达 Env 的重组痘苗病毒(rVV-Env)敏化来自具有已知 gp120 表位的个体(AC2)的新分离的、未刺激过的 PBMCs。与用 rVV-Env 温育的细胞相比,在接触 LFn-Env 的细胞中,在 CD8+细胞群中细胞内 IFN- γ 的百分比更高一些(图 7B)。

实施例 2

在没有 PA 的条件下,LFn 融合蛋白也能以 MHC-I 限制的方式敏化 CTL 靶细胞。LFn 融合蛋白的这种胞质溶胶递送,取决于与抗原呈递细胞内的细胞内抗原加工相关的功能性转运(Cao H, Agrawal D, Kushner N, Touzjian N, Essex M, and Lu Y. *J Infect. Dis.* 185: 244-251 (2002))。我们业已证实与 LFn 融合的绿色荧光蛋白(GFP)在没有 PA 的情况下能进入细胞。我们还证实外源 GFP 的这种 PA 非依赖型 LFn 递送与细胞蛋白体相关,这一结论与以前的观察吻合。

LFn-GFP 和 GFP 构建和纯化

通过将来自 pEGFP-C1 (Clontech) 的 GFP 开放读框插入在以前的研究中所披露的 LFn 表达载体中,构建了 LFn-GFP 融合蛋白(Lu, Y., R. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8027-32 (2000)), 所述融合蛋白可溶于细菌细胞提取物中,并且可以通过一个步骤的亲和层析纯化。纯

化融合蛋白的分子量大约为 55 kD, 并且其溶液具有亮绿色(资料未发表)。为了对该实验进行适当控制, 将 GFP 自身构建在相同的细菌表达载体 pET15b 中, 以便在 GFP 和 LFn-GFP 的表达、纯化和使用中的唯一差别是, 在 GFP 中缺少 LFn 序列。

LFn-GFP 能进入 CHO 细胞, 而 GFP 则不能

将 CHO 细胞在胶原处理过的有隔室的载玻片中培养达到 80% 的铺满度, 然后用纯化的 LFn-GFP 温育 1-2 小时, 然后用 PBS 和 PBS+蛋白酶进行充分洗涤, 以便消除膜结合蛋白。然后用抗运铁蛋白抗体对所述细胞进行染色, 并且用低聚甲醛固定。通过共焦显微术分别检查所述载玻片的绿色(GFP)和红色(抗运铁蛋白)。通过叠加相同细胞的绿色图像和红色图像, 提供了每一个视野的第三种图像。因此, 黄色斑点表示 GFP 可能存在于与运铁蛋白相同的斑点内, 因此提供了 GFP 在细胞内的定位的参考。如图 10 所示, 在用 LFn-GFP 处理 1 小时的细胞中存在大量可见的绿色斑点, 这表明 LFn-GFP 确实进入了细胞。在完全相同的实验条件下, GFP 处理过的细胞表现出少量绿色斑点(图 11)。

LFn-GFP 在处理过的细胞内的定位

使用与上述图 10-11 相同的实验方法, 我们分别用抗溶酶体抗体(图 12), 抗核内体抗体(图 13), 抗高尔基抗体(图 14)和抗蛋白体抗体(图 15)取代了抗运铁蛋白抗体。通过比较不同的图像, 具有最多的黄色斑点的图像是图 15 所示的图像, 其中, 绿色斑点表示细胞内 LFn-GFP 与表示细胞蛋白体的红色斑点显著重叠。

PA 的存在不能增强细胞对 LFn-GFP 的摄取

我们进一步检验了在存在 PA 的条件下是否能增强 LFn-GFP 的摄取, 检验是在图 10-15 所使用的实验条件下进行的。如图 16 所示, 与缺乏 PA 的细胞相比, 添加 PA 不能增加细胞内绿色斑点的数量。另外, PA 的存在似乎减少了黄色斑点的数量。很显然, 在这种条件下, 这些黄色斑点仍然可能表示 LFn-GFP 的进入仍然是 PA 非依赖型的。

实施例 3

缺失 LFn 的 N-末端一半, 以及明矾对 LFn 免疫的佐剂作用

其他动物免疫结果表明, 包括 PA 结合结构域的 LFn 的 N-末端一半可以缺失, 而不会对抗原递送产生负面影响。非常意外的是, 我们发现添加明矾能显著增强 LFn 融合蛋白的 CTL 诱导。

尽管在过去两年中进行了很多成功的尝试, 我们一直未能证实在存在 PA 的条件下 LFn-p24 能在免疫过的 BALB/c 小鼠体内刺激 CTL。以前的研究业已证实, 诸如 LFn-V3, LFn-LL0, 和 LFn-OVA 的 LFn 融合蛋白能够在小鼠体内刺激特异性 CTL (Lu, Y., 等. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8027-32 (2000); Ballard, J. D. 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12531-12534 (1996); Ballard, J. D., 等., Infect. Immun. 66, 615-619 (1998))。所述融合蛋白仅具有 12-33 个氨基酸, 而 LFn-p24 具有大约 230 个氨基酸。因此, 插入抗原的大小可能产生差异。我们决定检验添加免疫佐剂是否能提高 LFn-p24 的免疫原性。在测试过的试剂中, 包括重组 IL-2, Ig-IL2, CpG, 明矾及其他, 明矾意外地表现出最佳佐剂活性。人们普遍认为某些实验佐剂, 如 QS21 和 PCPP 能增强细胞介导的免疫反应, 而明矾实际上能抑制 CTL 诱导 (Schiembeck, R., 等., J. Immunol. 152: 1110-1119 (1994); Barouch, D. H. 等, Science 290: 486 (2000); Davis, H. L. 等., J. Immunol. 160: 870-876 (1998); Payne, L. G. 等., Dev. Biol. Stand. 92: 79-87 (1998))。

图 17 中分别用不同的抗原制剂腹膜内注射免疫三组 BALB/c 小鼠, 每组 4 只 (15 μ g LFn-p24 加 4 μ g PA, 15 μ g LFn-p24 + 4 μ g PA 加明矾, 15 LFn-p24 仅加明矾)。在免疫之后 1 周, 将来自免疫过的 BALB/c 小鼠的脾单核细胞用作 CTL 源。通过与来自未免疫过的 γ 辐射过的和肽脉冲的 BALB/c 脾细胞一起培养, 体外激活脾培养物中的 CTL。在 37 $^{\circ}$ C 下, 在 CO₂ 孵育箱中培养 6 天之后, 检测成熟的 CTL (效应细胞) 裂解 ⁵¹Cr-标记过的 P20 肽脉冲的 P815 细胞 (阳性靶细胞) 或 ⁵¹Cr-标记过的介质脉冲的细胞 (阴性靶细胞) 的能力。所示出的裂解百分比扣除了阴性靶细胞的本底裂解, 并且是以每一组的平均值形式提供的。

如图 17 所示, 通过添加明矾, 我们能够证明 LFn-p24 能够在有或没有 PA 的条件下在免疫过的小鼠体内刺激特异性 CTL。以上结果进一步证实了 PA 的存在并非是体内抗原递送所必需的。

其中的 LFn 的 N-末端一半业已缺失的 LFn 融合蛋白仍然是有活性的。

为了证实没有 PA 的情况下 LFn-p24 能够诱导 CTL，我们构建了一种突变型 LFn 融合蛋白 (MLFn-p24)，其中，去掉了 LFn 的 N-末端一半 (1-149)，以便破坏其结合 PA 的能力。我们通过为了测试 PA-依赖型膜转运而专门设计的实验方法证实了这一点。简单地讲，在 4℃ 下，用 CHO-K1 细胞温育胰蛋白酶切口的 PA。然后用冷 PBS 洗涤所述细胞，并且与 ³⁵S-标记过的 LFn-NG 或 LFn-ENV 一起，在 4℃ 下温育 2 小时。充分洗涤所述细胞，并且在 37℃ 下接触 MES/葡糖醛酸缓冲液 (pH 4.8) 2 分钟。然后添加链霉蛋白酶 E 或缓冲液，消化尚未内化的表面结合的 LFn 融合蛋白。然后再次洗涤所述细胞，裂解，并且计数。按照以下公式计算通过 PA 转运的蛋白的百分比。比例 = $100 \times (\text{在有 PA 和链霉蛋白酶处理过的细胞的情况下的计数} - \text{在没有 PA 和链霉蛋白酶处理过的细胞的情况下的计数}) / (\text{在有 PA 和模拟处理过的细胞的条件下的计数} - \text{在没有 PA 和模拟处理过的细胞的条件下的计数})$ 。在这种特殊测定方法中，PA 将高达 72% 的膜结合 LFn 转运到细胞内，而由 PA 转运的 MLFn 的量是无法检测的。

然后，我们在免疫过的小鼠体内比较了 LFn-p24 和 MLFn-p24 对 CTL 的诱导。在图 18 中，通过腹膜内注射，分别用 15 μg LFn-p24, 15 μg MLFn-p24 和 15 μg p24 对三组 BALB/c 小鼠，每组四只进行免疫。免疫 1 周之后检测脾组织中的 CTL。

如图 18 所示，在进行一次免疫接种之后，LFn-p24 和 MLFn-p24 都能刺激显著的 CTL 活性。事实上，与 LFn-p24 诱导的反应相比，我们重复观察到了由 MLFn-p24 引起的改进的 CTL 诱导。本实验还证实了 LFn 的 C-末端一半 (150-253) 确实负责所述细胞内抗原递送，因为从所述抗原 (p24) 中缺失 MLFn 序列，能破坏有效的 CTL 诱导。

参考文献

1. Anderson, K. S., J. Alexander, M. Wei, and P. Cresswell 1993. Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines *Journal of Immunology*. 151:3407-19.
2. Androlewicz, M. J., K. S. Anderson, and P. Cresswell 1993. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:9130-4.
3. Ballard, J. D., A. M. Doling, K. Beauregard, R. J. Collier, and M. N. Starnbach 1998. Anthrax toxin-mediated delivery in vivo and in vitro of a cytotoxic T-lymphocyte epitope from ovalbumin *Infection & Immunity*. 66:615-9.
4. Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. A. Oldstone 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection *J. Virol.* 68:6103-6110.
5. Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Peffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. Hahn, M. B. Oldstone, and G. M. Shaw 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus *Nature Medicine*. 3:205-211.
6. Cao, H., P. Kanki, J.-L. Sankale, A. Dieng-Sarr, G. P. Mazzara, S. A. Kalams, B. Korber, S. MBoup, and B. D. Walker 1997. Cytotoxic T-lymphocyte

- cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implication for vaccine development *J. Virol.* 71:8615-23.
7. Cao, H., I. Mani, R. Vincent, R. Mugerwa, P. Mugenyi, P. Kanki, J. Ellner, and B. D. Walker 2000. Cellular immunity to HIV-1 Clades: relevance to HIV-1 vaccine trials in Uganda *J. Infec Dis.* 182:1350-56.
8. Doling, A. M., J. D. Ballard, H. Shen, K. M. Krishna, R. Ahmed, R. J. Collier, and M. N. Stambach 1999. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes fused to anthrax toxin induce protective antiviral immunity *Infection & Immunity.* 67:3290-6.
9. Falk, K., O. Rötzchke, K. Deres, J. Metzger, G. Jung, and H.-G. Rammensee 1991. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope, forecast. *J. Exp. Med.* 174:425-434.
10. Finbloom, D. S., J. Martin, and R. K. Gordon 1987. Endocytosis of particulate and soluble IgG immune complexes: differential effects of cytoskeletal modulating agents *Clinical & Experimental Immunology.* 67:205-10.
11. Geisow, M. J., P. D'Arcy Hart, and M. R. Young 1981. Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy *Journal of Cell Biology.* 89:645-52.
12. Goldberg, A. L., and K. L. Rock 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation *Nature.* 357:375-9.

13. Hanna, P. C., D. Acosta, and R. J. Collier 1993. On the role of macrophages in anthrax *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:10198-201.
14. Harding, C. V., and R. Song 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules *Journal of Immunology*. 153:4925-33.
15. Howard, J. C. 1995. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules *Current Opinion in Immunology*. 7:69-76.
16. Klaus, G. G. 1973. Cytochalasin B. Dissociation of pinocytosis and phagocytosis by peritoneal macrophages *Experimental Eye Research*. 79:73-8.
17. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome *J. Virol*. 68:4650-4655.
18. Lalvani, A., R. Brookes, S. Hambleton, W. J. Britton, A. V. Hill, and A. J. McMichael 1997. Rapid effector function in CD8+ memory T cells *Journal of Experimental Medicine*. 186:859-65.
19. Lu, Y., R. Friedman, N. Kushner, A. Doling, L. Thomas, N. Touzjian, M. Starnbach, and J. Lieberman 2000. Genetically modified anthrax lethal toxin safely delivers whole HIV protein antigens into the cytosol to induce T cell immunity *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:8027-32.

20. Man, S., R. D. Salter, and V. H. Engelhard 1992. Role of endogenous peptide in human alloreactive cytotoxic T cell responses *International Immunology*. 4:367-75.
21. Neefjes, J., F. Momberg, and G. Hammerling 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 261:769-771.
22. Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, v. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F. Nixon, and A. J. McMichael 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA *Science*. 279:2103-6.
23. Ohkuma, S., and B. Poole 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75:3327-31.
24. Ortmann, B., M. J. Androlewicz, and P. Cresswell 1994. MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding *Nature*. 368:864-7.
25. Pfeifer, J. D., M. J. Wick, R. L. Roberts, K. Findlay, S. J. Normark, and C. V. Harding 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells *Nature*. 361:359-62.
26. Pinto, L. A., J. Sullivan, J. A. Berzofsky, M. Clerici, H. A. Kessler, A. L. Landay, and G. M. Shearer 1995. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses

- in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids *J. Clin. Invest.* 96:867-76.
27. Powis, S. J. 1997. Major histocompatibility complex class I molecules interact with both subunits of the transporter associated with antigen processing, TAP1 and TAP2 *European Journal of Immunology.* 27:2744-7.
28. Rowland-Jones, S., J. Sutton, K. Ariyoshi, T. Dong, F. Gotch, S. McAdam, D. Whitby, S. Sabally, A. Gallimore, T. Corrah, M. Takiguchi, T. Schultz, A. McMichael, and H. Whittle 1994. Resistance to HIV-1 infection- HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-exposed but uninfected Gambian women *Nature Medicine.* in Press.
29. Sadasivan, B., P. J. Lehner, B. Ortman, T. Spies, and P. Cresswell 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP *Immunity.* 5:103-14.
30. Solheim, J. C., M. R. Harris, C. S. Kindle, and T. H. Hansen 1997. Prominence of beta 2-microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing *Journal of Immunology.* 158:2236-41.
31. Song, R., and C. V. Harding 1996. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway *Journal of Immunology.* 156:4182-90.

-
32. Suh, W. K., M. F. Cohen-Doyle, K. Fruh, K. Wang, P. A. Peterson, and D. B. Williams 1994. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing *Science*. 264:1322-6.
33. Wei, M. L., and P. Cresswell 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature*. 356:443-6.
34. Yewdell, J. W., and J. R. Bennink 1989. Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes *Science*. 244:1072-5.

本文所披露的所有文献都被收作本文参考。

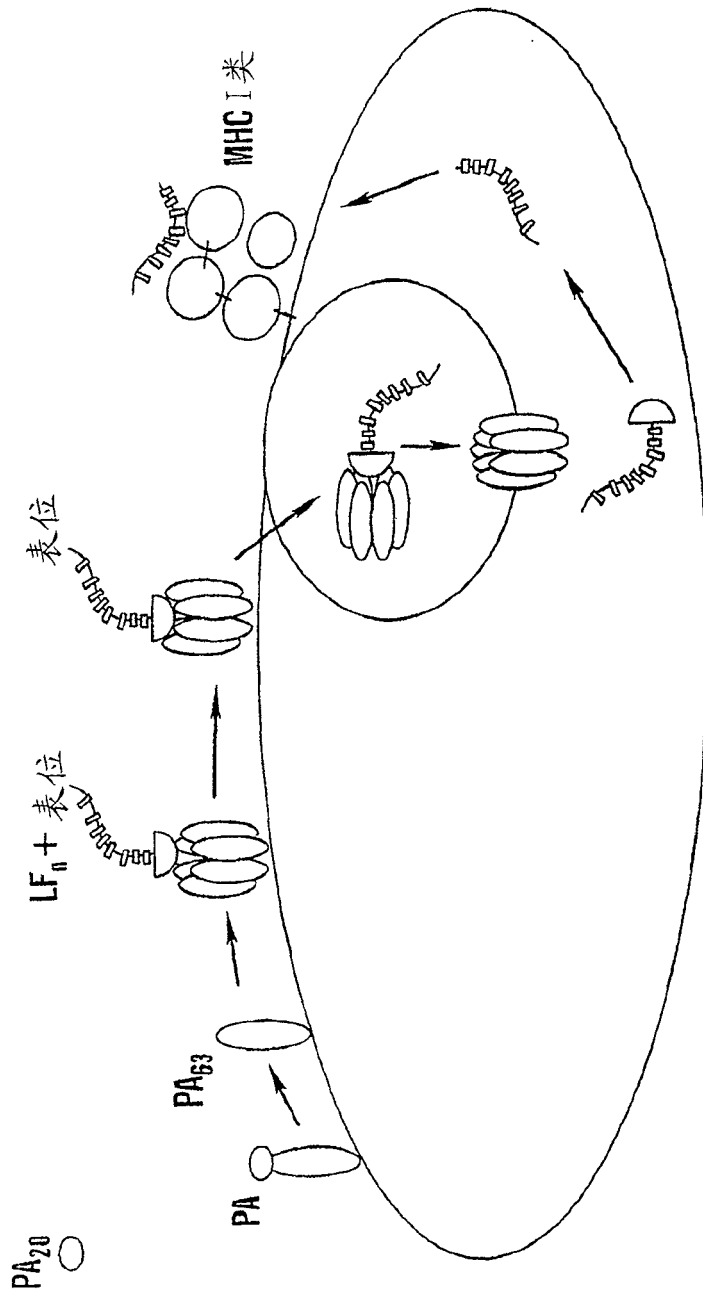


图 1

LF

1 mnikkefikv ismsclvtai tlgpvpfipl vqgagghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
 61 rnktqeehlk eimkhivkie vkgeeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
 121 itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh yvyakegyep vlvqssedy ventekalnv
 181 yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvInti knasdsdggd llftnqlkeh ptdfsvefle
 241 qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsle elkdqrmIsr
 301 yekwekikqh yqhwsdsIsle egrllkklq ipiepkkddi ihlsqeeke llkriqidss
 361 dflsteekef lkkIqIdird slseeekell nriqvdsnp lsekekeflk kIkIdIqpyd
 421 inqrlqdtgg lidspSInld vrkqykrdiq nidallhqsI gstlynkiyl yenmninnlt
 481 atlgadlvds tdntkinrgi fnefkknfky sissnymivd inerpaldne rIkwriqlsp
 541 dtragyleng klIqrnigl eIkdvqiIkq sekeyirida kvvpkskidt kIqeaqlnIn
 601 qewnkalglp kytklitfnv hnryasnive saylilnewk nniqsdlIkk vtnylvDgng
 661 rfvftditlp nIaeqythqd eiyeqvhskg lyvpepsrIl lhgpskgvel rndsegfihe
 721 fghavddyag ylldknqsdl vtnskKfidi fkeegsnlts ygrtneaeff aeafrlmhst
 781 dhaerlkvqk napktfqIn dqIkfiIn

图 2A

LFn

1 mnikkefikv ismsclvtai tlgpvpfipl vqgagghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
 61 rnktqeehlk eimkhivkie vkgeeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
 121 itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh yvyakegyep vlvqssedy ventekalnv
 181 yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvInti knasdsdggd llftnqlkeh ptdfsvefle
 241 qnsnevqevf akafayyiepqhrdvlqlya peafnymdkf neqeinls

图 2B

片段3

gkilsr dilskinqpy qkfldvInti knasdsdggd llftnqlkeh ptdfsvefle qnsnevqevf
 akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinls

图 2C

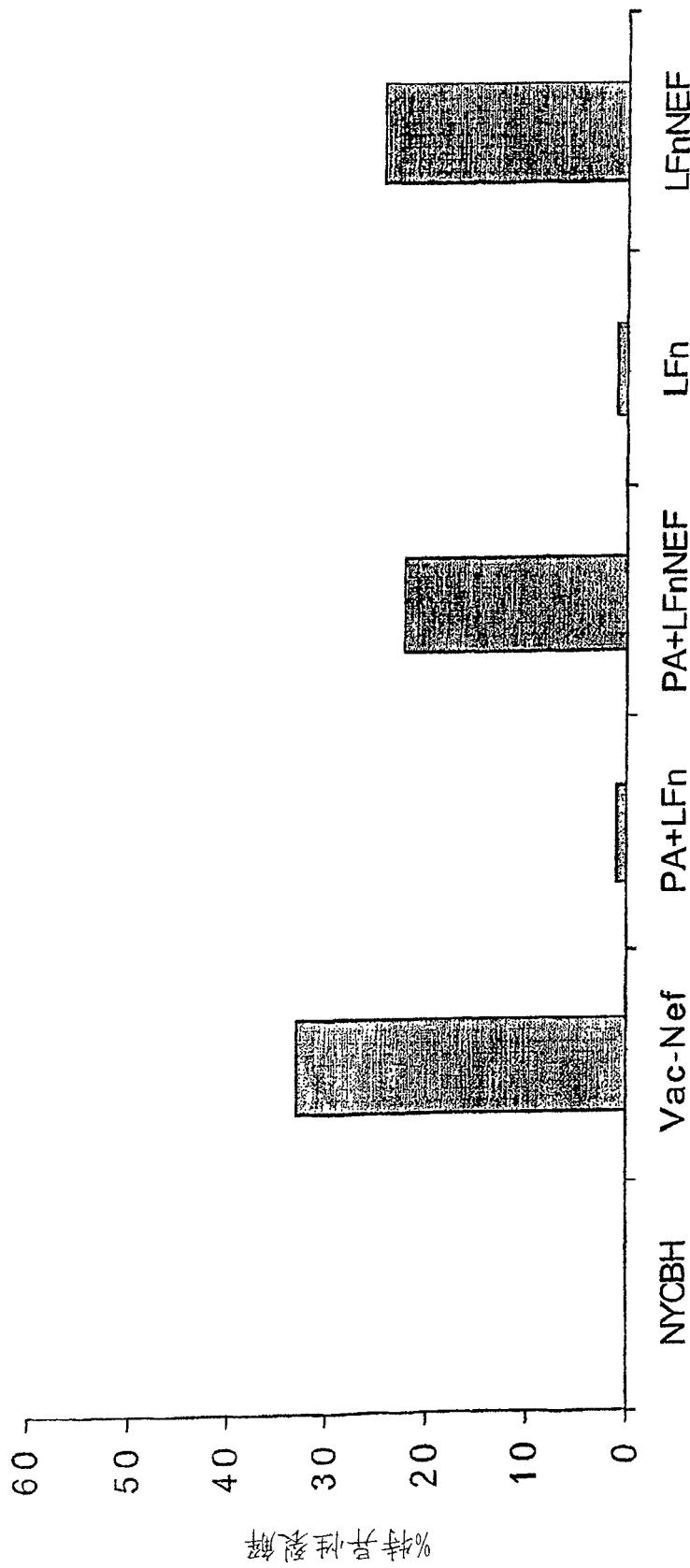


图 3A

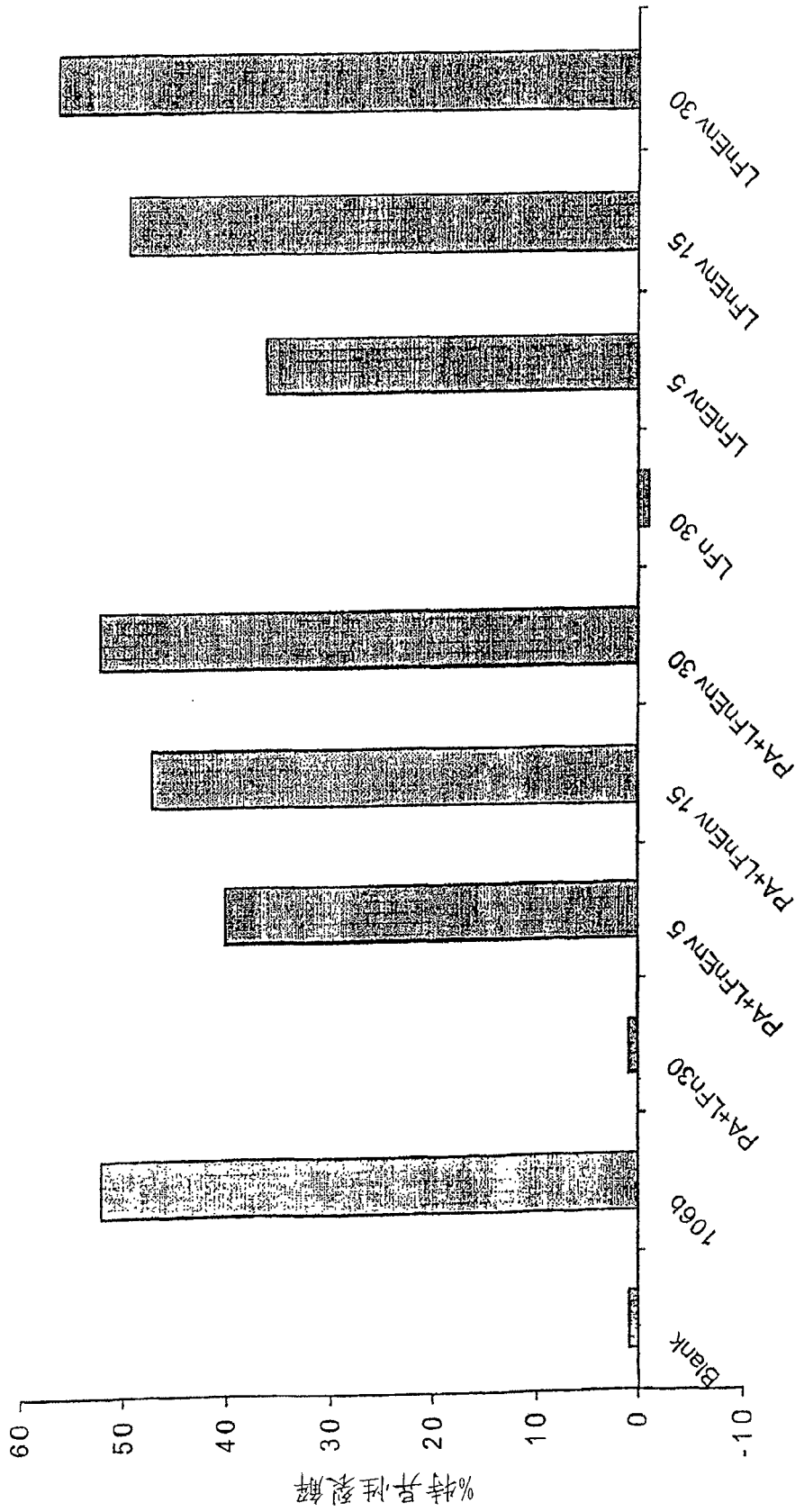


图 3B

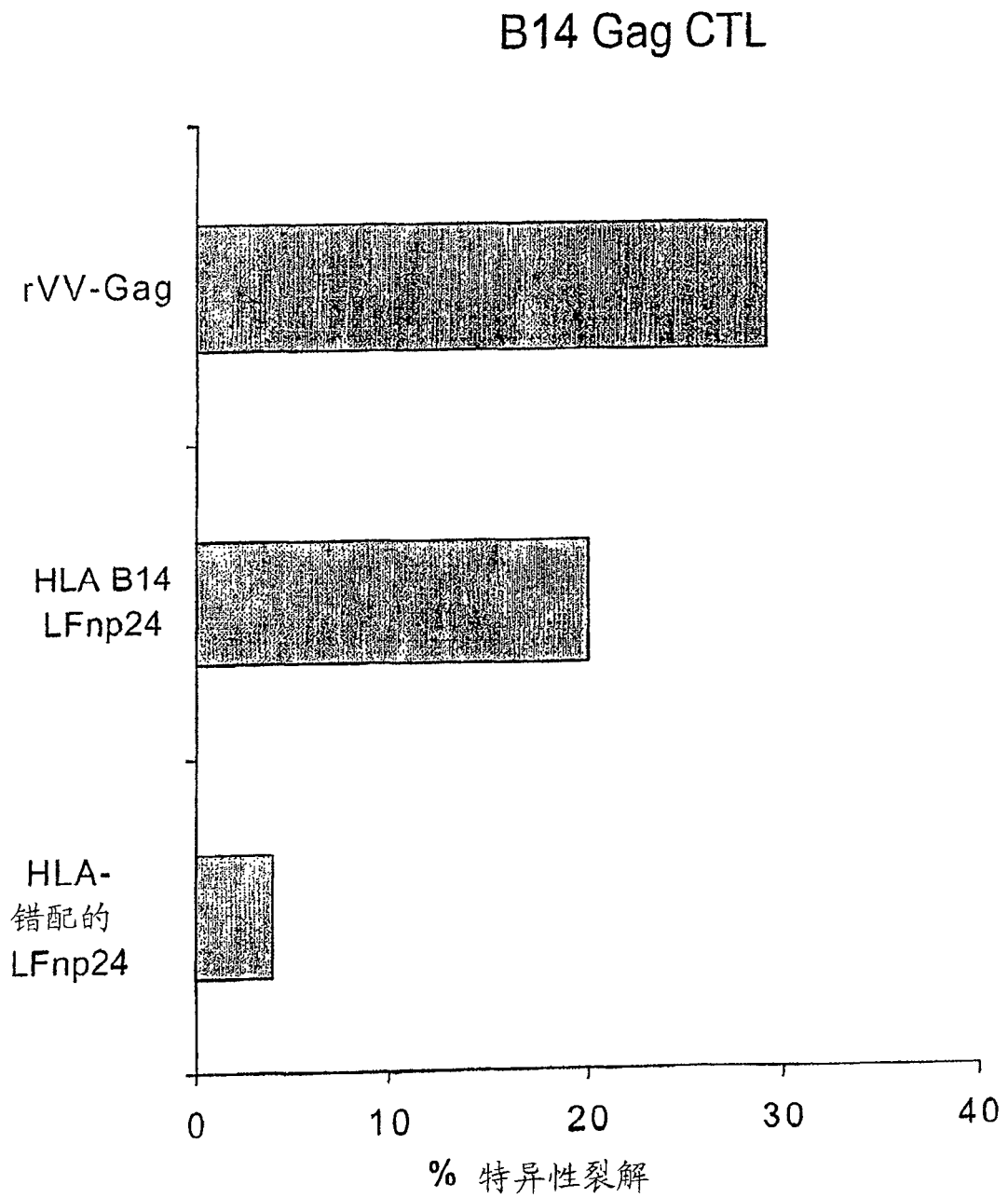


图 4A

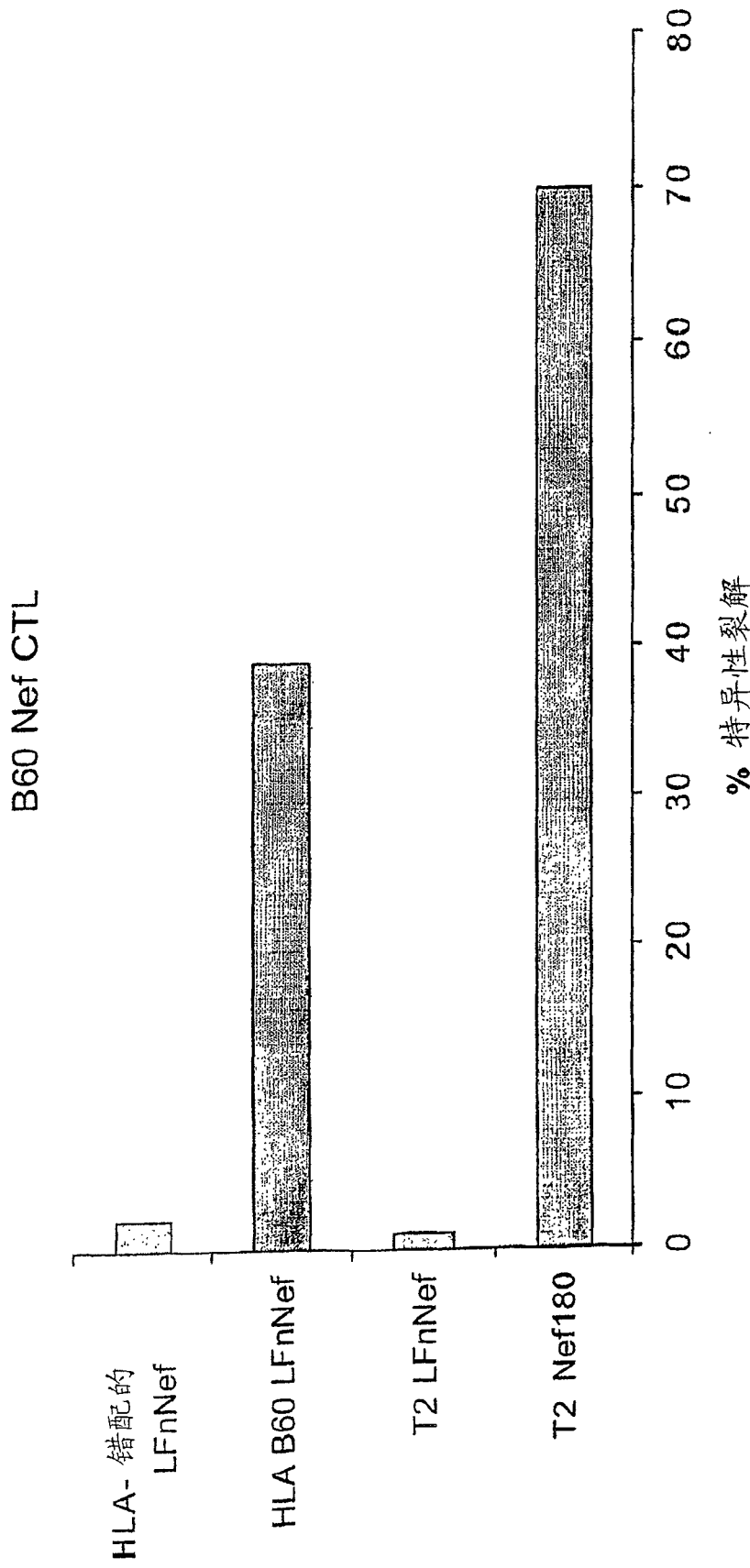


图 4B

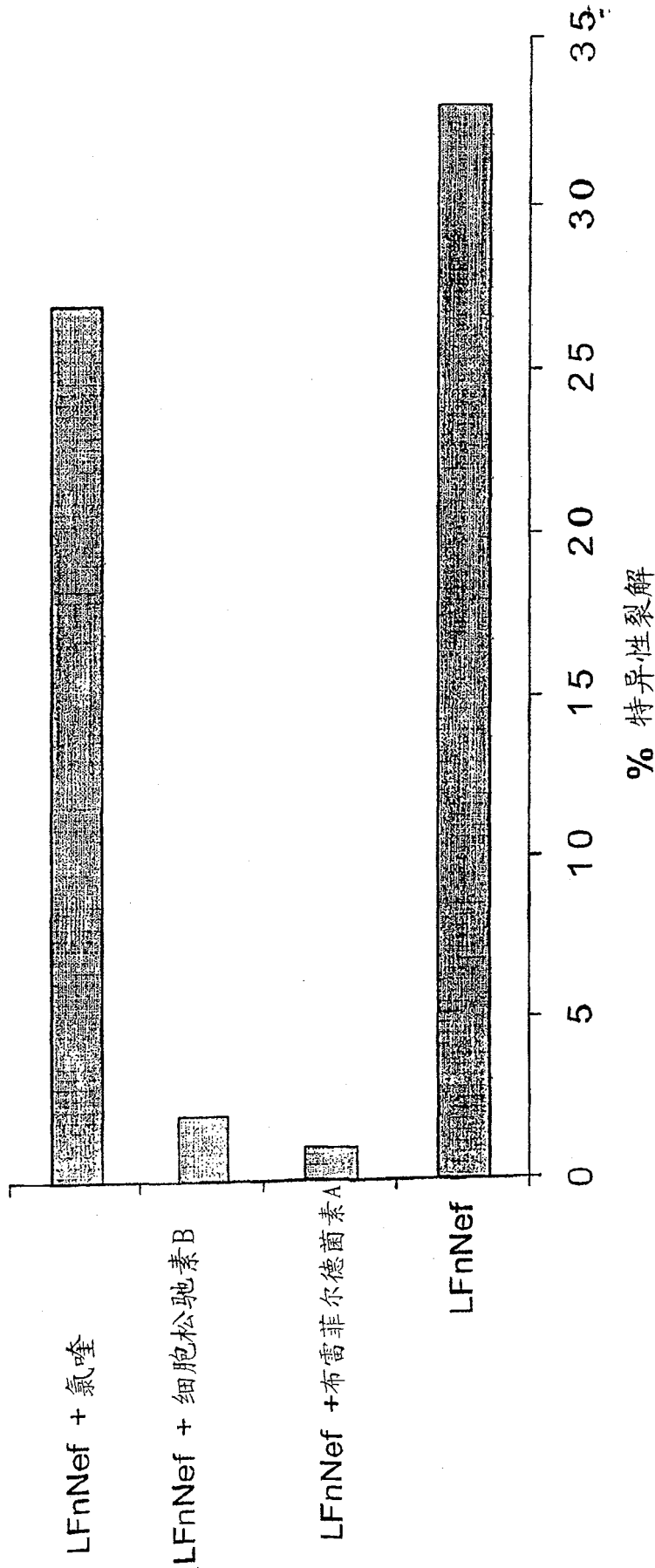


图 5A

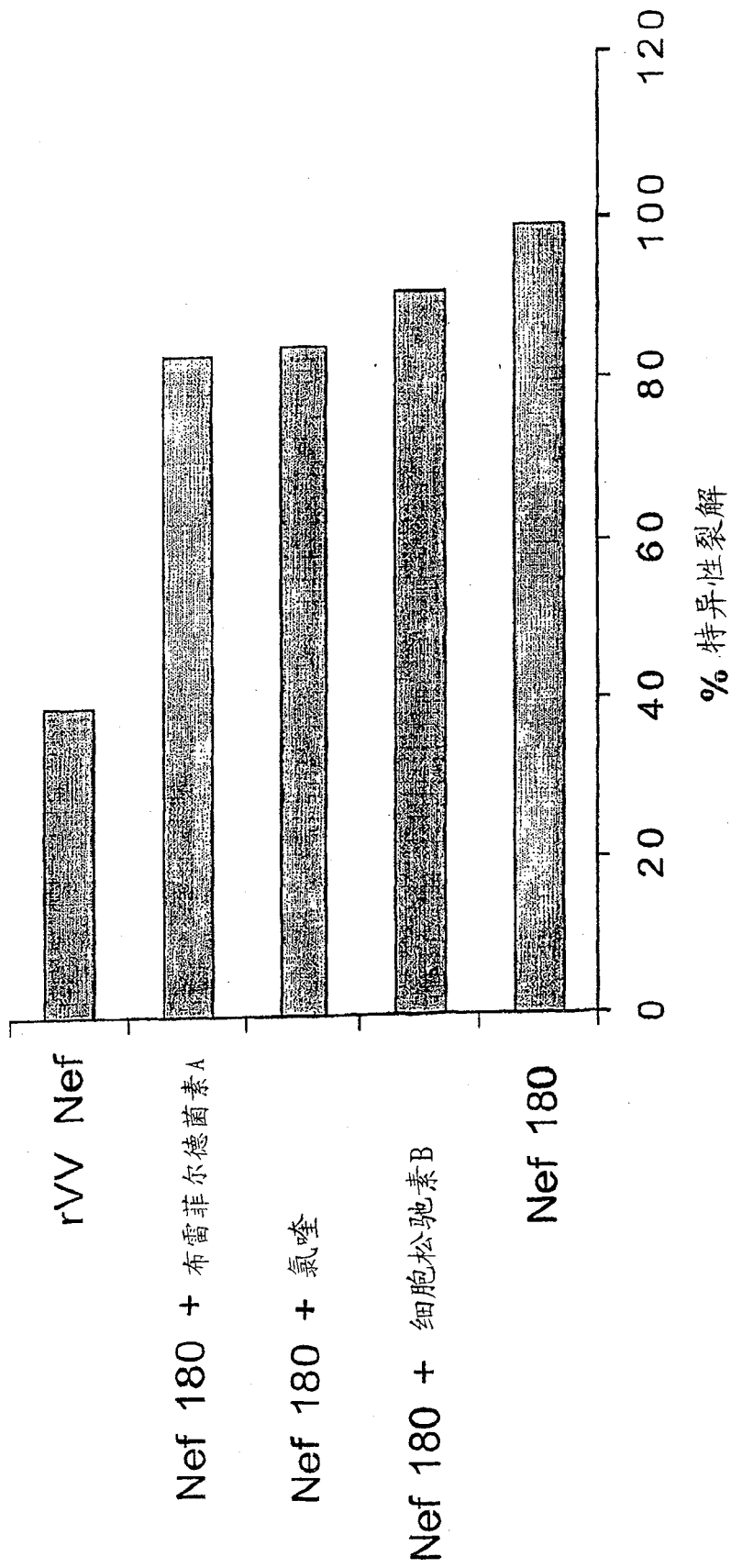


图 5B

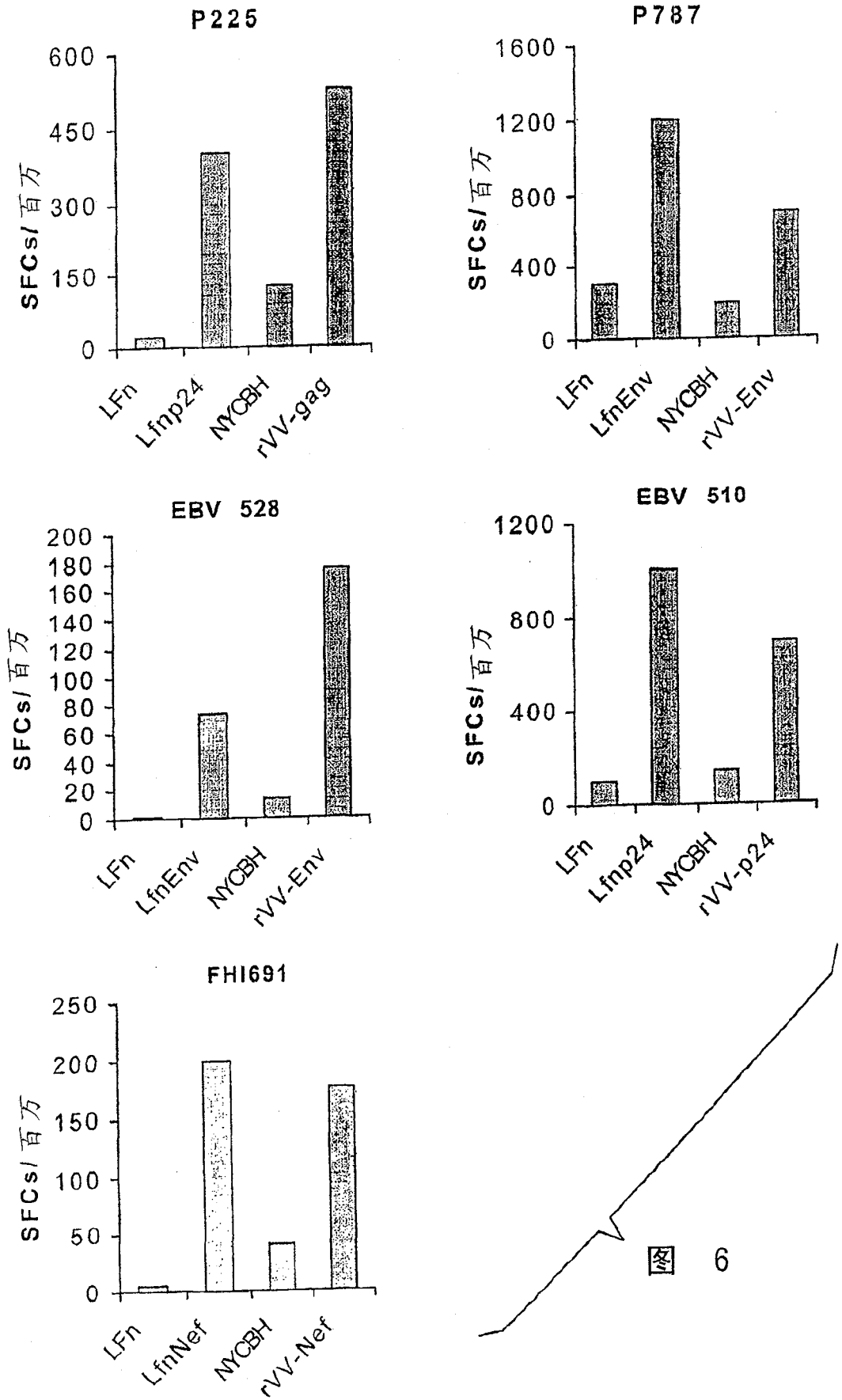


图 6

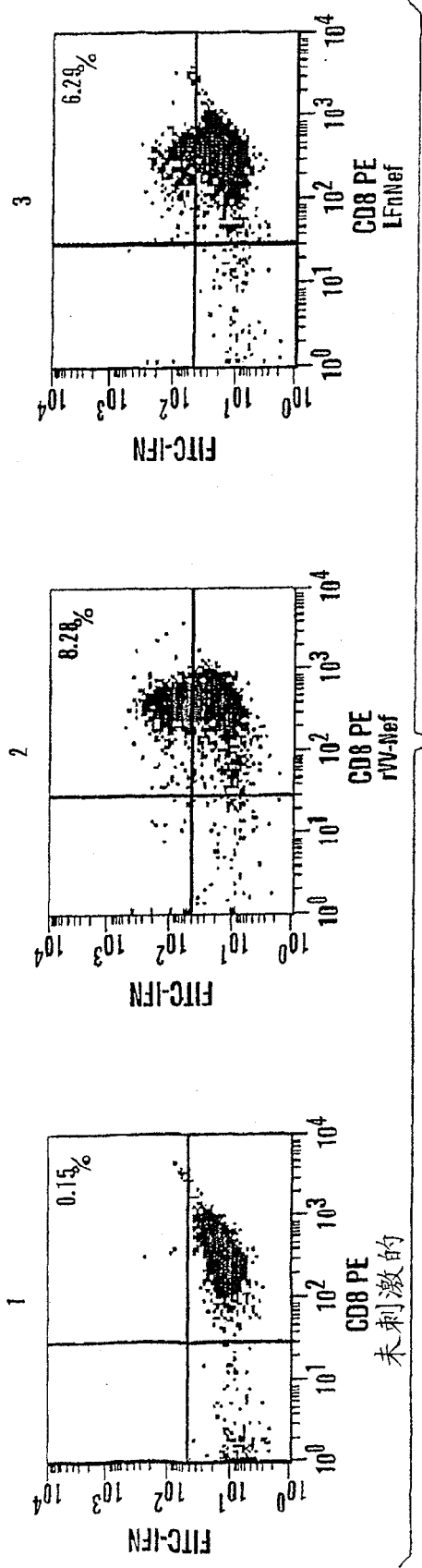


图 7A

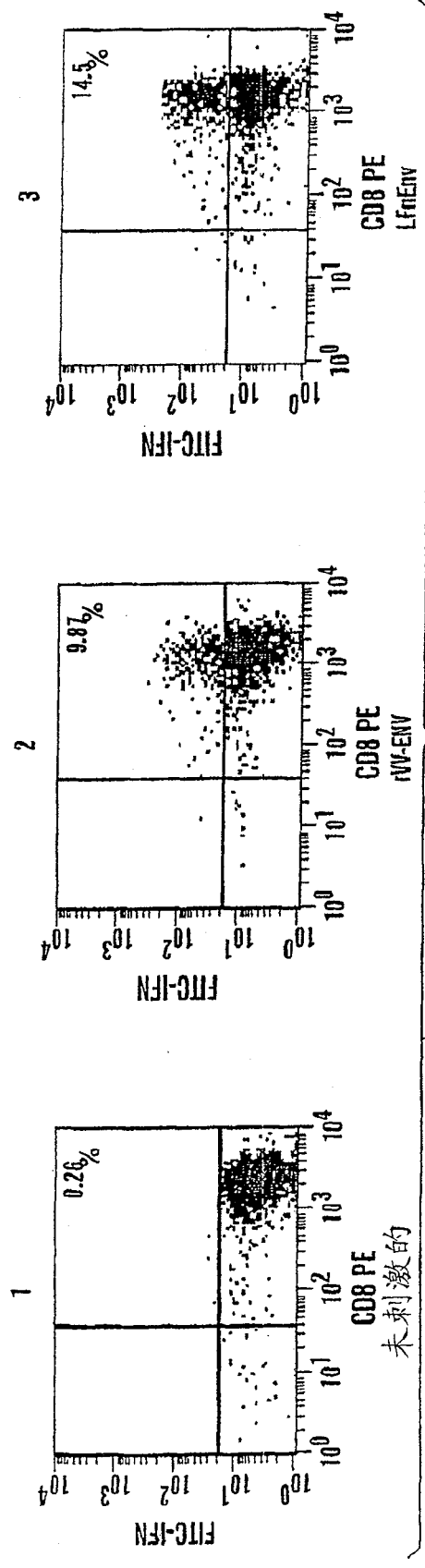


图 7B

用于此报道的LFn融合蛋白

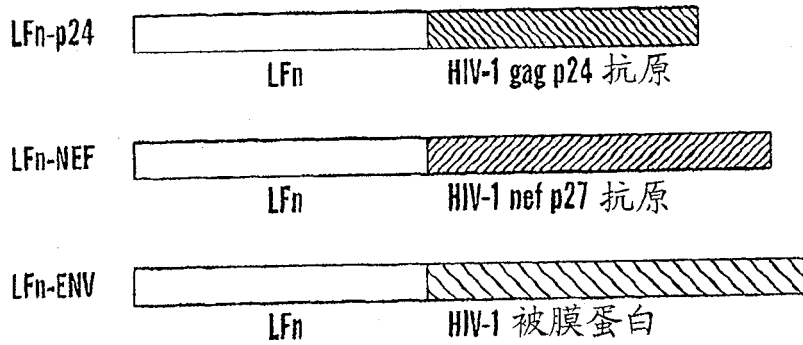


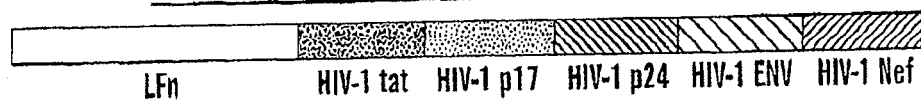
图 8A

商业应用的推荐LFn融合蛋白

携带相同病毒的不同抗原的LFn融合蛋白



携带来自不同抗原的多个表位的LFn融合蛋白



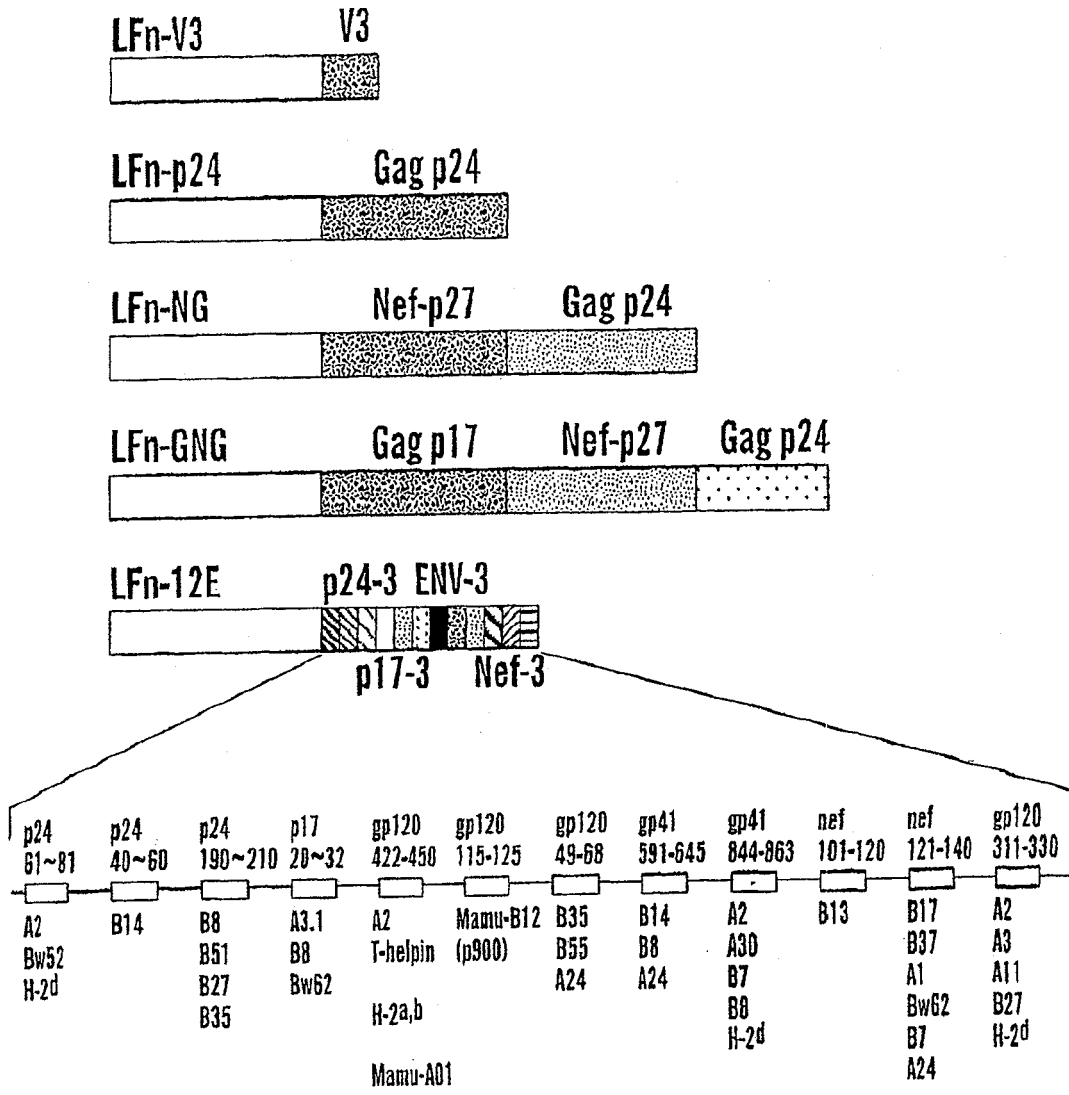
携带来自不同HIV亚型的抗原的LFn融合蛋白



携带来自不同病原体或肿瘤抗原的抗原的LFn融合蛋白

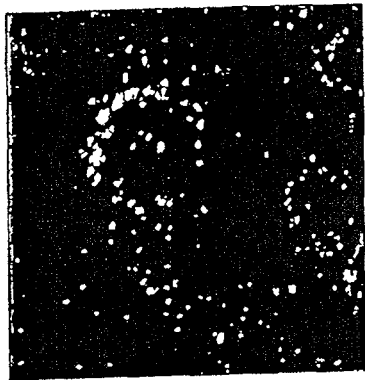


图 8B



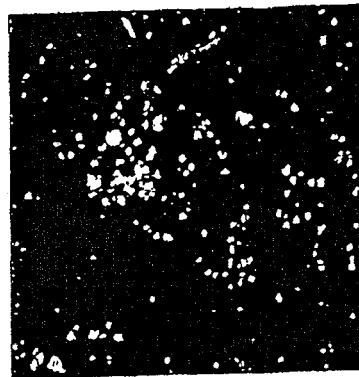
Ag	E#	人	小鼠	猴
p24	3	A2, B8, B14, B27, B35, B51, Bw52,	H-2d	0
p17	1	A3.1, B8, Bw62	0	0
gp120	4	A2, A24, A3, A11, B35, B55, B27,	H-2a,b, H-2d	Mamu-A01, Mamu-B12
gp41	2	A2, A24, A30, B7, B8, B14,	H-2d	0
nef	2	A1, A24, B7, B13, B17, B37, Bw62,	0	0

图 9



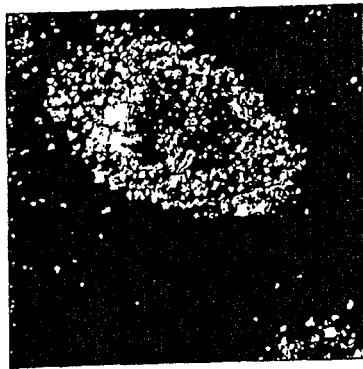
LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10A



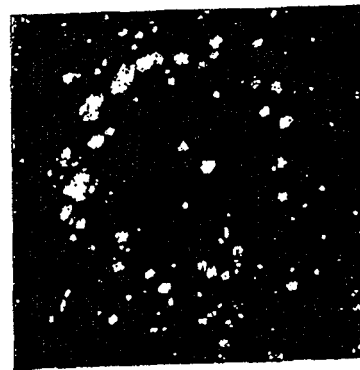
LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10B



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10C



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10D



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10E



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10F



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10G



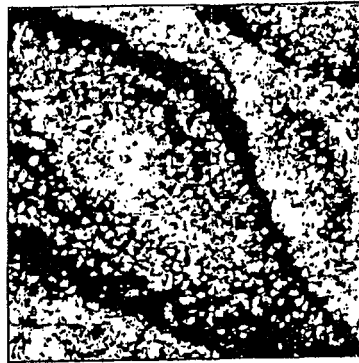
LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10H



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10I



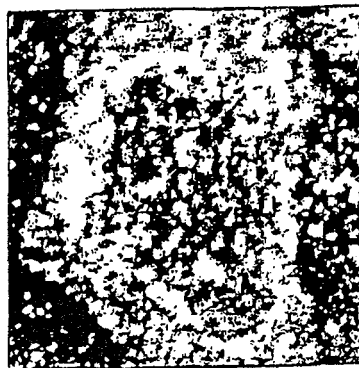
LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10J



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10K



LN-GFP @37 C , 1 hr

图 10L

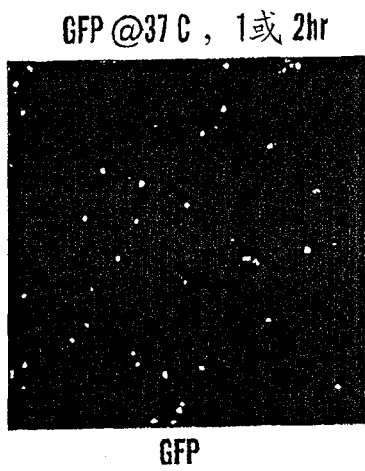


图 11A

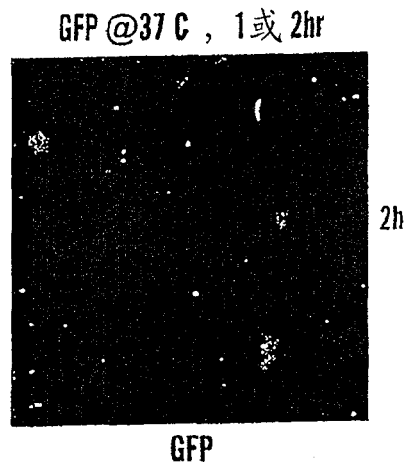


图 11B

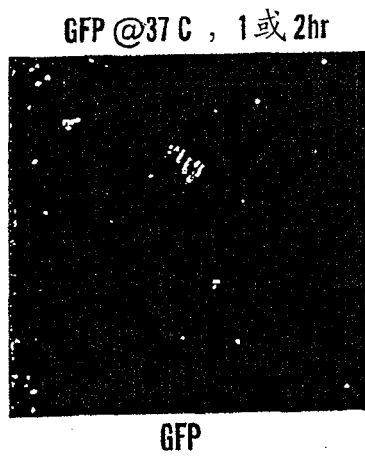


图 11C

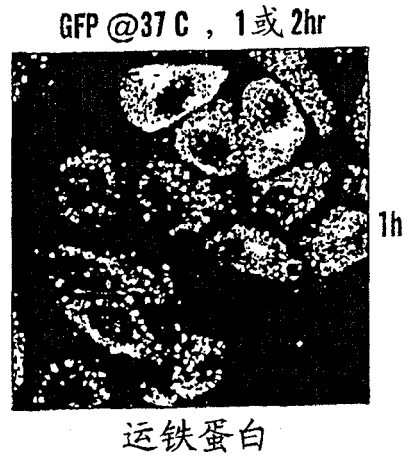


图 11D

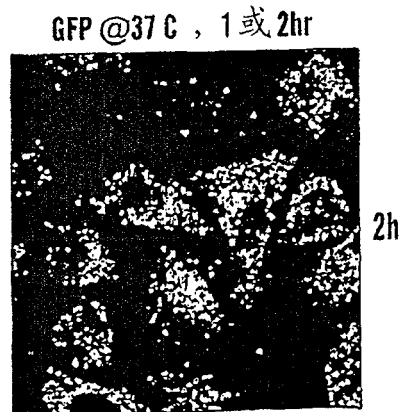
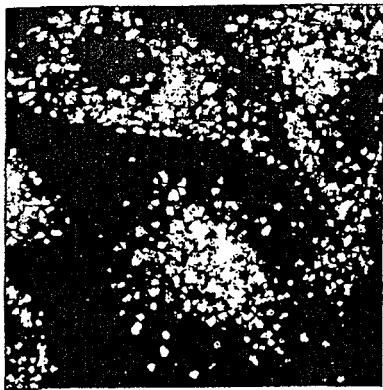


图 11E

GFP @37 C , 1或 2hr



运铁蛋白

图 11F

GFP @37 C , 1或 2hr

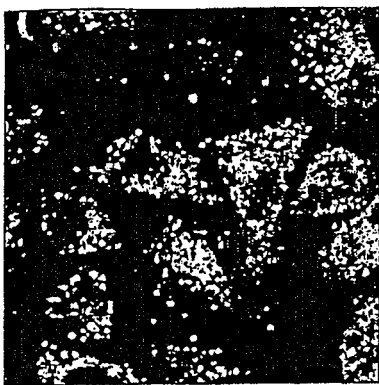


1h

合并

图 11G

GFP @37 C , 1或 2hr

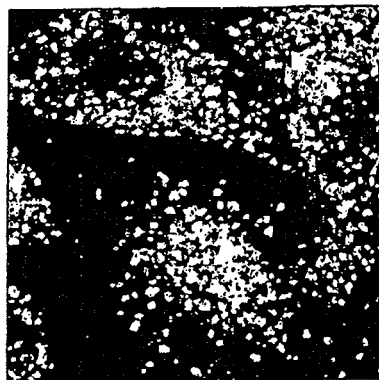


2h

合并

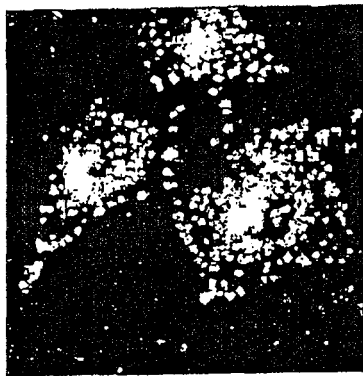
图 11H

GFP @37 C , 1或 2hr



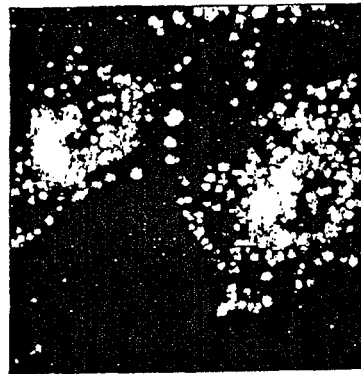
合并

图 11I



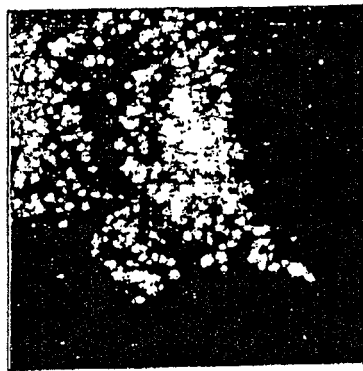
Lamp-2

图 12A



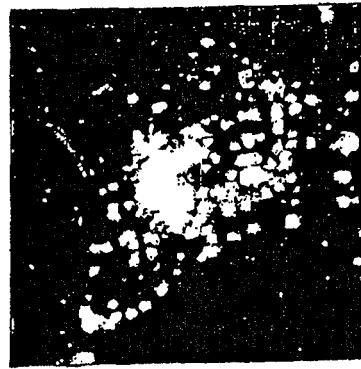
Lamp-2

图 12B



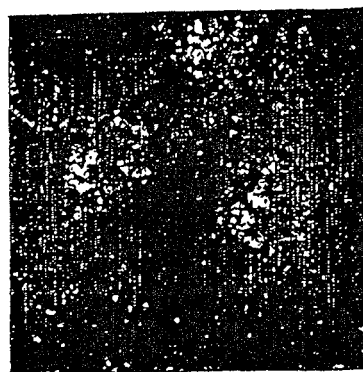
Lamp-2

图 12C



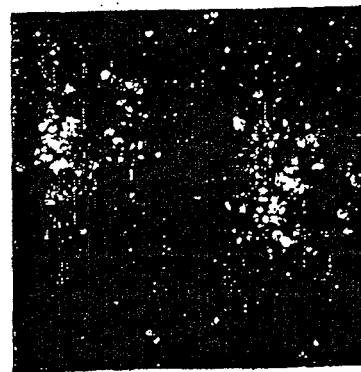
Lamp-2

图 12D



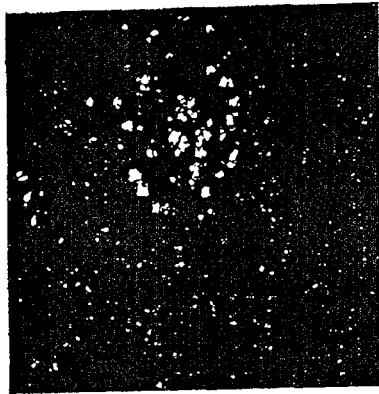
LN-GFP

图 12E



LN-GFP

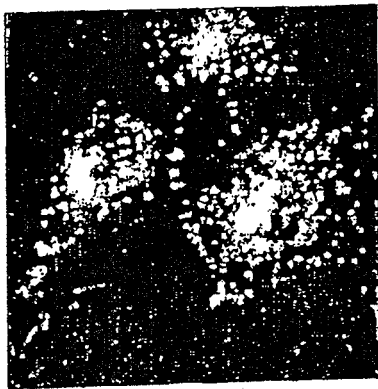
图 12F



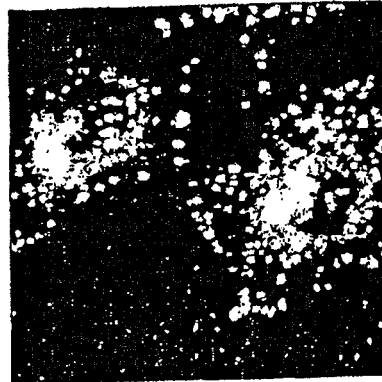
LN-GFP
图 12G



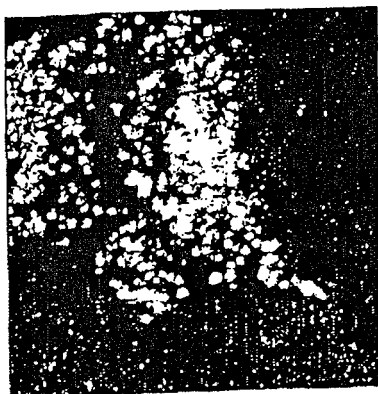
LN-GFP
图 12H



合并
图 12I



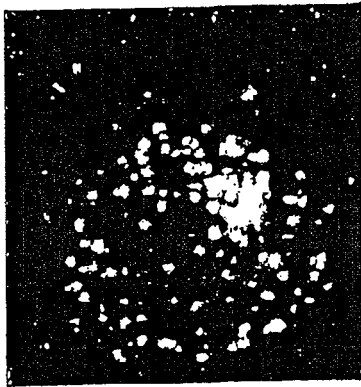
合并
图 12J



合并
图 12K

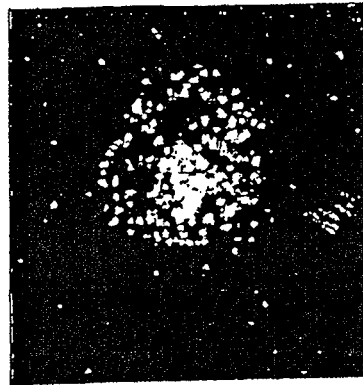


合并
图 12L



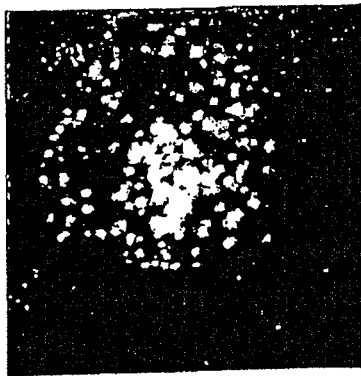
EEA-1

图 13A



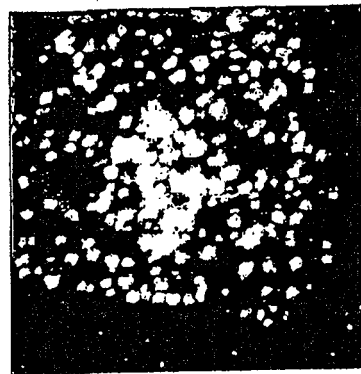
EEA-1

图 13B



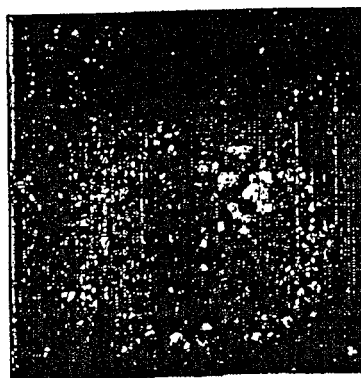
EEA-1

图 13C



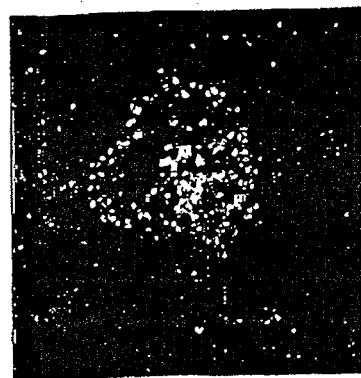
EEA-1

图 13D



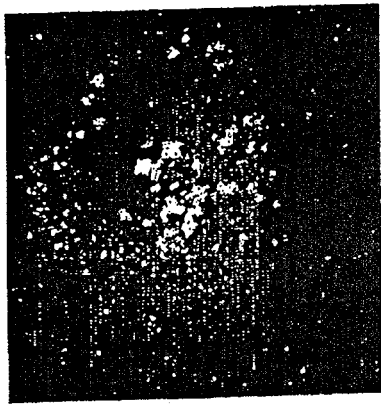
LN-GFP

图 13E



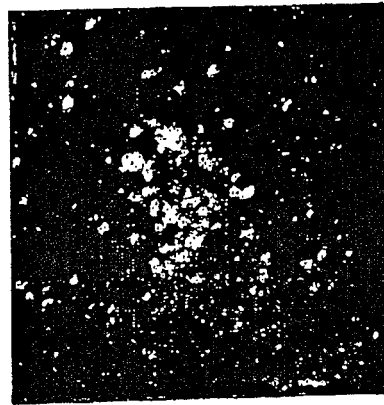
LN-GFP

图 13F



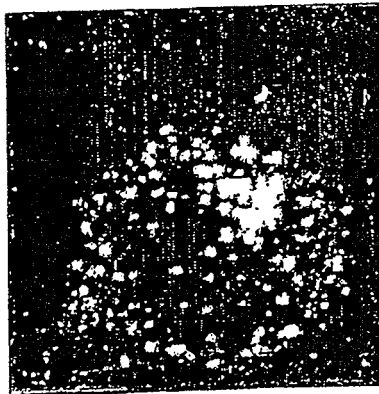
LN-GFP

图 13G



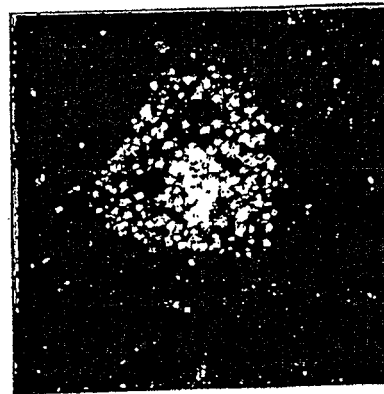
LN-GFP

图 13H



合并

图 13I



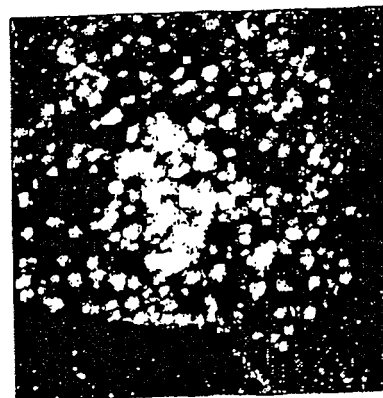
合并

图 13J



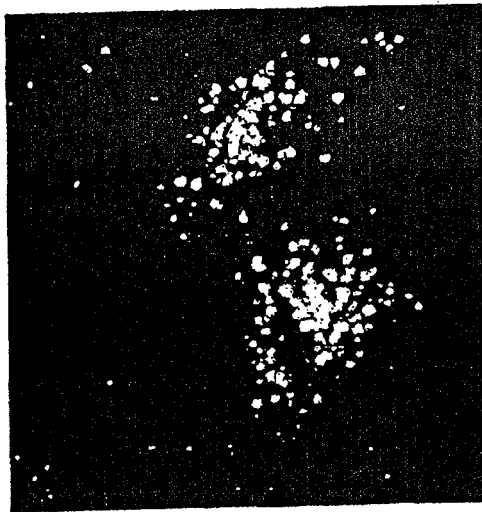
合并

图 13K



合并

图 13L



Golgi

图 14A



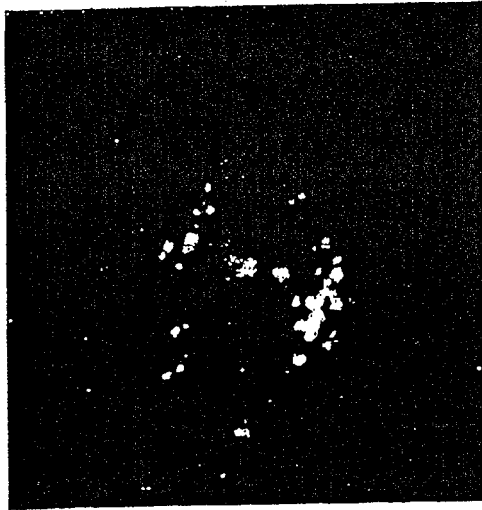
Golgi

图 14B



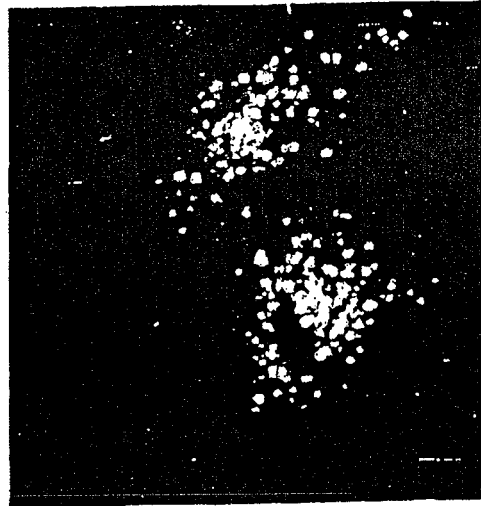
LN-GFP

图 14C



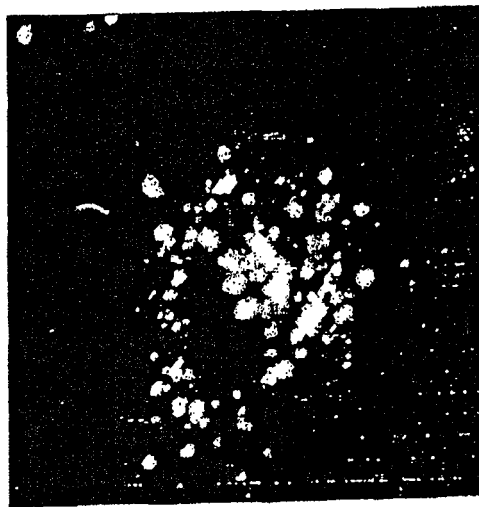
LN-GFP

图 14D



合并

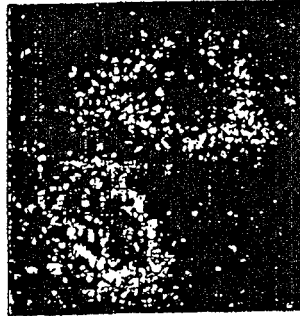
图 14E



合并

图 14F

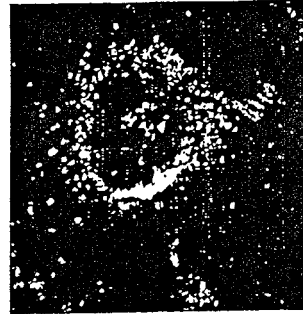
用40 μg/ml LN_gfp在37℃温育Hela细胞2个小时,然后固定并且用抗20S蛋白体多克隆抗体(CalBiochem)染色



LN_gfp

图 15A

用40 μg/ml LN_gfp在37℃温育Hela细胞2个小时,然后固定并且用抗20S蛋白体多克隆抗体(CalBiochem)染色



LN_gfp

图 15B

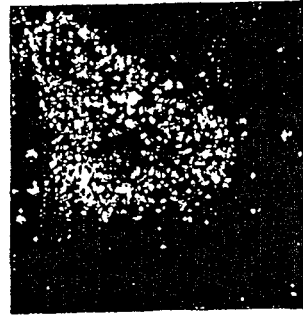
用40 μg/ml LN_gfp在37℃温育Hela细胞2个小时,然后固定并且用抗20S蛋白体多克隆抗体(CalBiochem)染色



LN_gfp

图 15C

用40 μg/ml LN_gfp在37℃温育Hela细胞2个小时,然后固定并且用抗20S蛋白体多克隆抗体(CalBiochem)染色



LN_gfp

图 15D

用40 μg/ml LN_gfp在37℃温育Hela细胞2个小时,然后固定并且用抗20S蛋白体多克隆抗体(CalBiochem)染色



20S

图 15E

用40 μg/ml LN_gfp在37℃温育Hela细胞2个小时,然后固定并且用抗20S蛋白体多克隆抗体(CalBiochem)染色



20S

图 15F

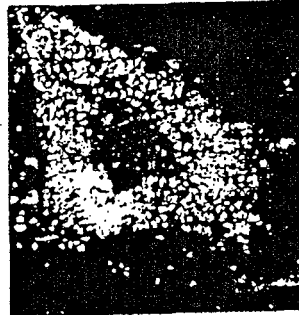
用40 μg/ml LNgfp在37℃
温育Hela细胞2个小时,然后
固定并且用抗20S蛋白体多
克隆抗体 (CalBiochem) 染色



20S

图 15G

用40 μg/ml LNgfp在37℃
温育Hela细胞2个小时,然后
固定并且用抗20S蛋白体多
克隆抗体 (CalBiochem) 染色



20S

图 15H

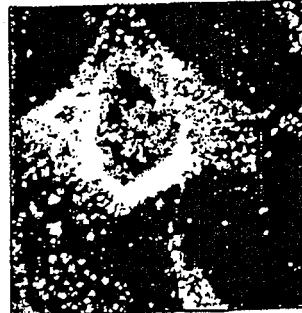
用40 μg/ml LNgfp在37℃
温育Hela细胞2个小时,然后
固定并且用抗20S蛋白体多
克隆抗体 (CalBiochem) 染色



合并

图 15I

用40 μg/ml LNgfp在37℃
温育Hela细胞2个小时,然后
固定并且用抗20S蛋白体多
克隆抗体 (CalBiochem) 染色



合并

图 15J

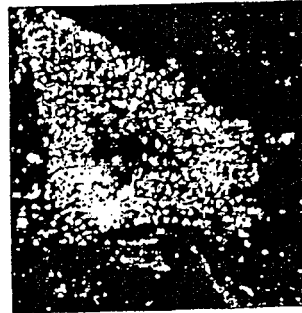
用40 μg/ml LNgfp在37℃
温育Hela细胞2个小时,然后
固定并且用抗20S蛋白体多
克隆抗体 (CalBiochem) 染色



合并

图 15K

用40 μg/ml LNgfp在37℃
温育Hela细胞2个小时,然后
固定并且用抗20S蛋白体多
克隆抗体 (CalBiochem) 染色



合并

图 15L

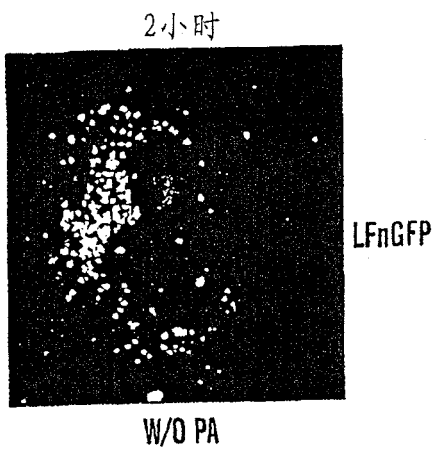


图 16A

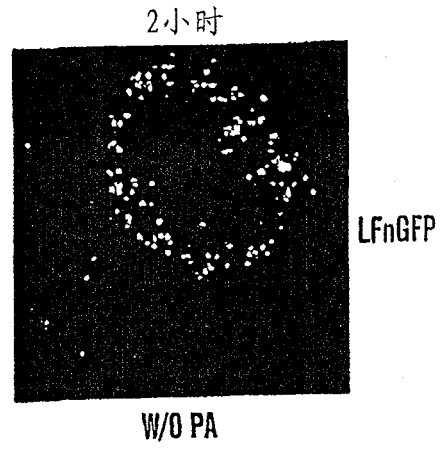


图 16B

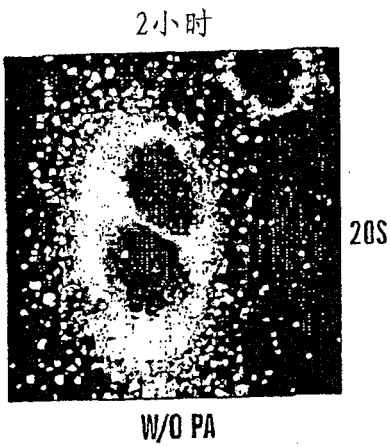


图 16C

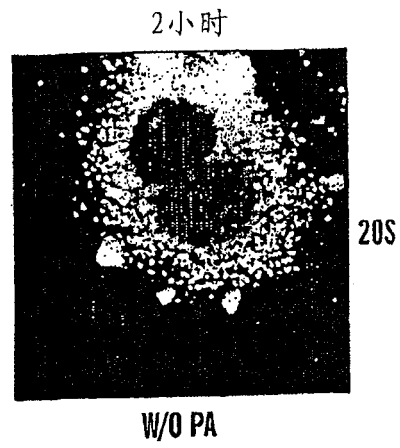


图 16D

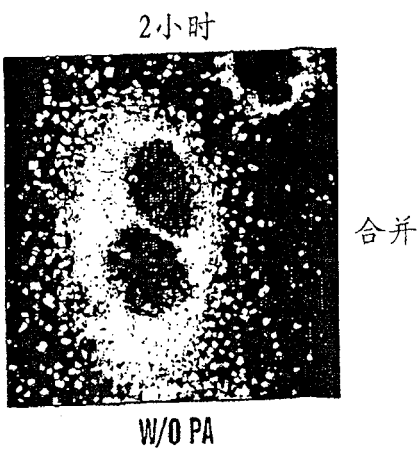


图 16E

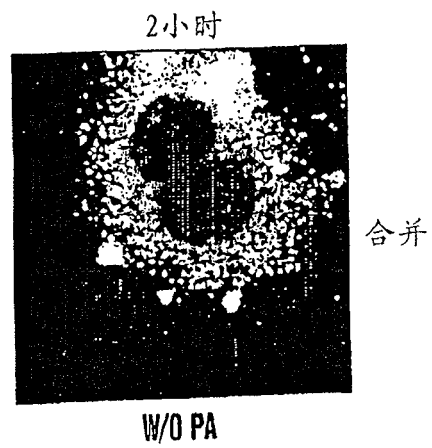


图 16F

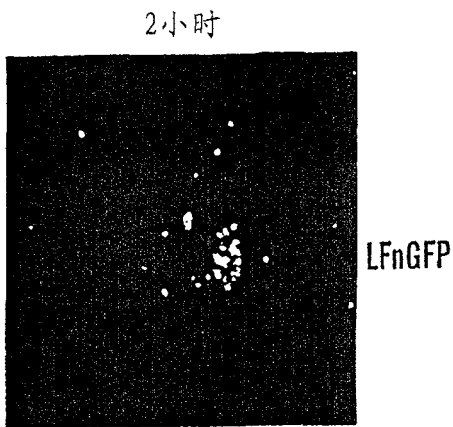


图 16G

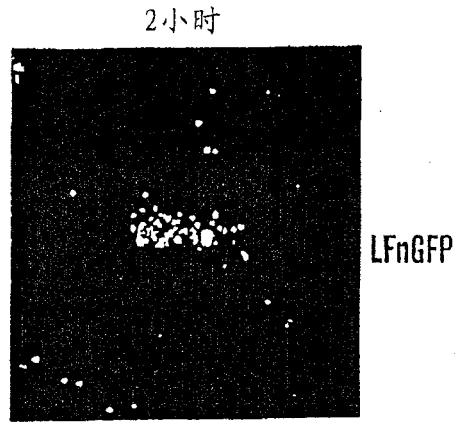


图 16H

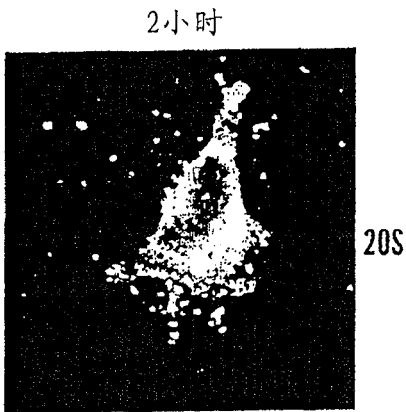


图 16I

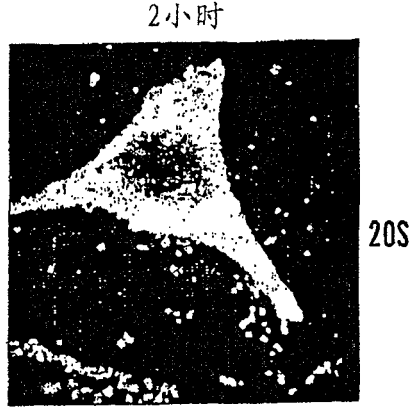


图 16J

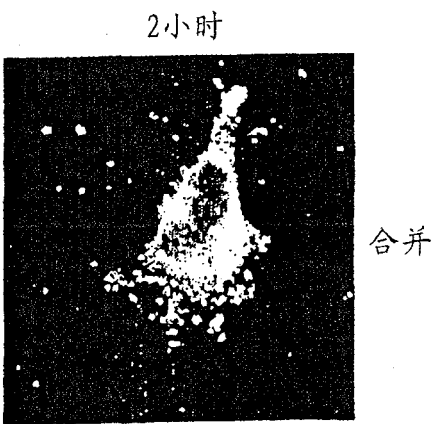


图 16K

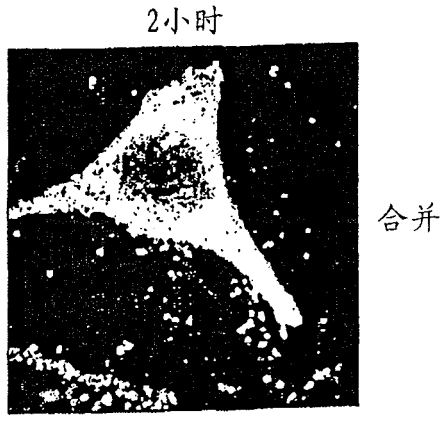


图 16L

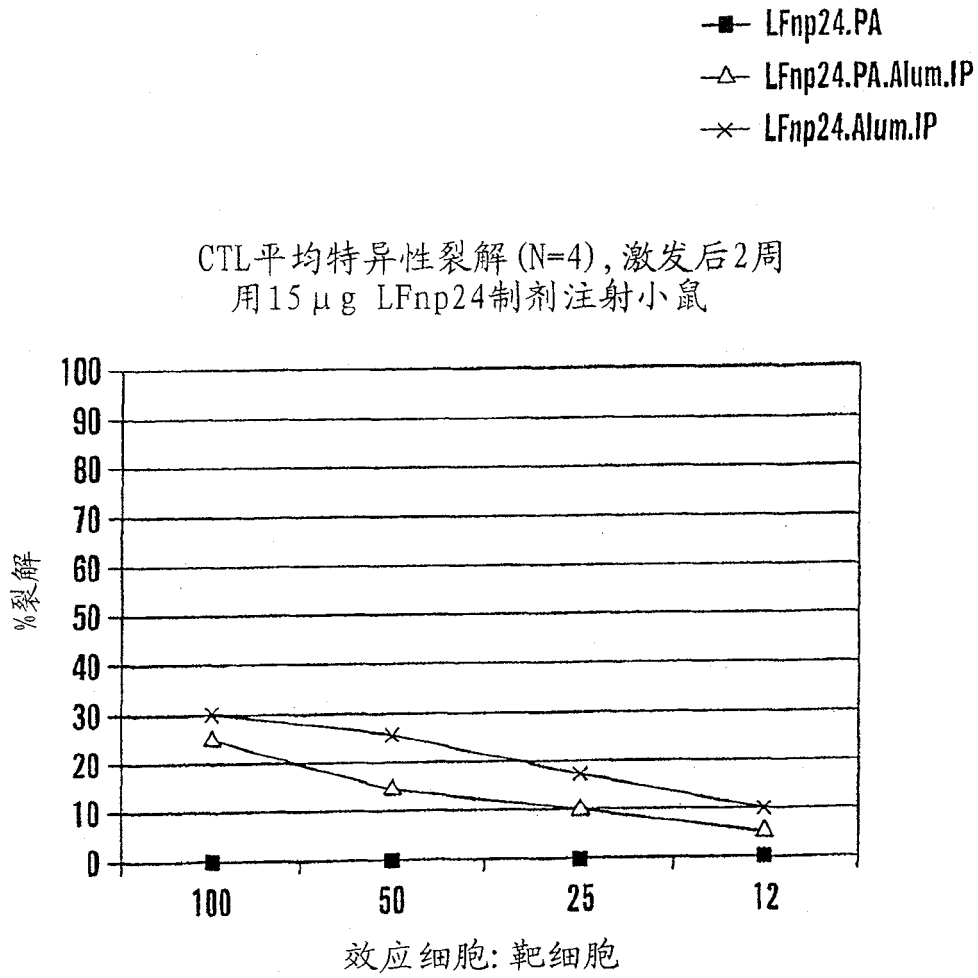


图 17

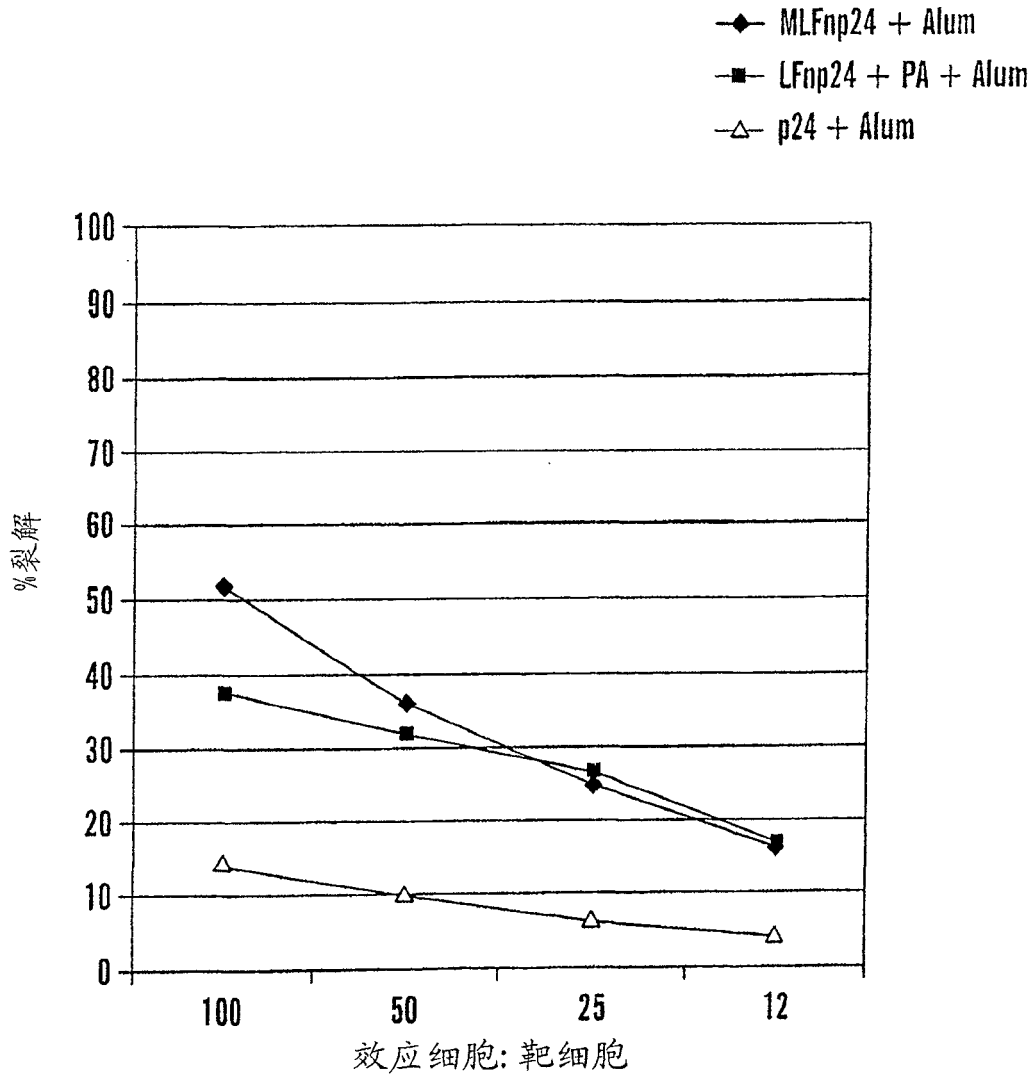


图 18

专利名称(译)	将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法,及其用途		
公开(公告)号	CN100560720C	公开(公告)日	2009-11-18
申请号	CN02810886.8	申请日	2002-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会 通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会 综合医院公司		
当前申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会 综合医院公司		
[标]发明人	Y·卢 H·曹		
发明人	Y·卢 H·曹		
IPC分类号	C12N11/00 G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/21 A61K39/385 A61K39/39 A61K47/42 A61K47/48 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/32 C07K14/47 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/74 C12N15/87 C12P21/02 C12P21/04 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/32 C12N2740/16234 A61K2039/57 A61K2039/525 A61K39/385 C12N15/87 C07K2319/00 C07K2319/01 C12N2740/16134 G01N33/6863 A61K38/00 A61K39/21 A61K2039/6068 A61K2039/6037 A61K2039/55505 C12N2740/16334 A61K39/12 Y02A50/394 Y02A50/484		
优先权	60/279366 2001-03-28 US		
其他公开文献	CN1636060A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于将外源蛋白递送到胞质溶胶中的方法,包括将靶抗原(如一种蛋白)结合于包含二分蛋白外毒素的片段的转运因子,但不是相应的保护性抗原。优选将所述靶蛋白融合于所述转运因子。优选的转运因子包括来自炭疽芽孢杆菌的致死因子(LFn)的保护性抗原结合结构域,它包括1-255号氨基酸,优选与LFn具有至少80%同源性的至少80个氨基酸的片段,以及来自羧基部分的不结合PA的大约105个氨基酸的片段。所述靶抗原可以包括希望诱导CMI反应的任何分子,包括病毒抗原和肿瘤抗原。

