



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108473960 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680075578.0

(22)申请日 2016.12.22

(30)优先权数据

15202329.7 2015.12.23 EP

16190399.2 2016.09.23 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/082445 2016.12.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/109110 EN 2017.06.29

(71)申请人 基因医疗免疫疗法有限责任公司

地址 德国普拉内格-马廷斯里德

申请人 健康与环境慕尼黑德国研究中心赫姆霍茨中心(有限责任公司)

(72)发明人 斯拉沃柳布·米洛舍维奇

克里斯蒂安·埃林格尔

卡里娜·韦纳 德洛利斯·申德尔

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51)Int.Cl.

C12N 5/0784(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页
序列表5页 附图5页

(54)发明名称

树突细胞组合物

(57)摘要

本发明涉及树突细胞组合物。树突细胞组合物采用与抗原或其片段融合的MHC II类靶向信号以获得抗原或其片段的MHC II递呈。特别地,本发明涉及包含树突细胞的树突细胞疫苗,该树突细胞表达与抗原或其片段融合的MHC II类靶向信号。还描述了用于刺激抗黑素瘤相关抗原的免疫应答的树突细胞疫苗。

1. 一种树突细胞组合物, 包含树突细胞, 所述树突细胞表达至少一种包含以下的融合蛋白:

- 至少一种抗原或其片段,
- 所述抗原N-末端前端的内质网 (ER)-易位信号序列, 和
- 所述抗原C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。

2. 根据权利要求1所述的树突细胞组合物,

其中所述树突细胞组合物还包含表达至少一种抗原或其片段的树突细胞, 其中所述抗原不与促进所述抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的树突细胞组合物, 其中所述促进所述MHC II递呈的靶向信号序列是选自以下组成的组中的至少一种

- 所述抗原N-末端前端的内质网 (ER)-易位信号序列, 和
- 所述抗原C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述融合蛋白和所述抗原是瞬时表达或稳定表达的, 优选是稳定表达的。

5. 根据权利要求4所述的树突细胞组合物, 其中所述瞬时表达是通过引入ivt-RNA进行的。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述内体/溶酶体靶向序列来源于DC-LAMP。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述内体/溶酶体靶向序列源于人类。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述内体/溶酶体靶向序列包含序列SEQ ID NO:3或其片段。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述内体/溶酶体靶向序列包含序列SEQ ID NO:14或其片段。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述ER-易位信号序列来源于内体/溶酶体相关蛋白。

11. 根据权利要求10所述的树突细胞组合物, 其中所述内体/溶酶体相关蛋白选自包括LAMP1、LAMP2、DC-LAP、CD68和CD1b的组。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述ER-易位信号序列来源于LAMP1。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述ER-易位信号序列包含序列SEQ ID NO:1或其片段。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物, 其中所述树突细胞是通过包括以下步骤的方法产生的成熟树突细胞:

- (i) 提供单核细胞;
- (ii) 将步骤i)的单核细胞与IL-4和GM-CSF孵育;
- (iii) 将步骤ii)的单核细胞与IL-4和GM-CSF及成熟混合物组合孵育。

15. 根据权利要求14所述的树突细胞组合物, 其中所述成熟混合物包括IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2和可选的TLR3激动剂的组合。

16. 根据权利要求15所述的树突细胞组合物,其中所述成熟混合物包括IL- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2和TLR3激动剂的组合。

17. 根据权利要求14至16所述的树突细胞组合物,其中步骤ii)的孵育持续至少2天。

18. 根据权利要求14至17所述的树突细胞组合物,其中步骤iii)的孵育持续至少12小时,优选24小时。

19. 根据权利要求15至18所述的树突细胞组合物,其中所述TLR7/8激动剂是R848并且其中所述TLR3激动剂是聚(I:C)。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的树突细胞组合物,其中所述抗原是MELAN-A。

21. 一种树突细胞疫苗,包含权利要求1至20中任一项所述的树突细胞组合物。

22. 根据权利要求21所述的树突细胞疫苗,其中所述树突细胞是自体细胞。

23. 根据权利要求22所述的树突细胞疫苗,其中所述树突细胞疫苗是药学上可接受的流体组合物。

24. 根据权利要求1至20所述的树突细胞组合物或权利要求21至23所述的树突细胞疫苗,其用于作为药物使用。

25. 根据权利要求1至20所述的树突细胞组合物或权利要求21至23所述的树突细胞疫苗,其用于在治疗癌症中使用。

26. 根据权利要求1至20所述的树突细胞组合物或权利要求21至23所述的树突细胞疫苗,其用于在刺激抗黑素瘤相关抗原的免疫应答中使用。

27. 根据权利要求26使用的所述树突细胞组合物或所述树突细胞疫苗,其中所述黑素瘤相关抗原是MELAN-A。

28. 一种组合物,包含

a) 表达载体,其包含

-人ER-易位信号序列,

-包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域,和

-至少一种抗原或其片段;和

b) 表达载体,其包含至少一种抗原或其片段,但不含有ER-易位信号序列和包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域。

29. 一种试剂盒,包含

a) 表达载体,其包含

-人ER-易位信号序列,

-包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域,和

-至少一种抗原或其片段;和

b) 表达载体,其包含至少一种抗原或其片段,但不含有ER-易位信号序列和包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域。

树突细胞组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及树突细胞组合物。树突细胞组合物采用与抗原或其片段融合的MHC II类靶向信号以获得抗原或其片段的MHC II递呈。

[0002] 特别地,本发明涉及包含树突细胞的树突细胞疫苗,该树突细胞表达与抗原或其片段融合的MHC II类靶向信号。还描述了用于刺激抗黑色素瘤相关抗原的免疫应答的树突细胞疫苗。

背景技术

[0003] 由于树突细胞可以在进行T细胞介导的免疫过程中有效地激发幼稚T细胞并刺激适应性免疫反应,因而树突细胞代表免疫治疗中非常有效的药物。树突细胞不仅具有激活针对病原体的免疫反应的能力,而且具有针对恶性细胞的免疫反应的能力。在体内,未成熟或处于中等成熟阶段的树突细胞巡查外周组织以便捕获和加工抗原。在局部细胞因子和危险信号的影响下,树突细胞经历复杂的成熟过程并迁移到区域性淋巴结,在此它们与T细胞形成免疫突触,并在MHC I类或II类分子作用下递呈来源于所集中的抗原的肽。CD4⁺T细胞的激活依赖于MHC-II复合物结合,而CD8⁺的相互作用依赖于MHC I结合。

[0004] 树突细胞许可模型描述了通过相互作用介导的激活使得树突细胞提供共刺激信号,因而CD4⁺T细胞间接帮助CD8⁺T细胞。因此,随着人们越来越了解CD4⁺T细胞帮助对于抗原特异性CD8⁺T细胞的扩增和记忆产生的重要作用,已经认识到CD4⁺T细胞帮助对于针对肿瘤的有效免疫应答具有重要作用。此外,由于肿瘤抗原主要是不提供如致病性抗原的“危险信号”(例如,PAMP:病原体相关分子模式)的自身抗原,因此CD4⁺T细胞帮助对于诱导CD8⁺T细胞记忆是至关重要的。

[0005] 因此,需要改善的树突细胞疫苗,该树突细胞疫苗促进患者免疫系统攻击自身肿瘤细胞并建立持久的免疫力。期望的是疫苗诱导T细胞增殖水平更高,T细胞激活诱导的IFN- γ 分泌增强和T细胞的肿瘤杀伤能力更高。

发明内容

[0006] 因此,本发明的目的是提供允许在MHC II复合物上递呈抗原的先进的树突细胞疫苗。

[0007] 因此,本发明的第一方面涉及树突细胞组合物,其包含树突细胞,该树突细胞表达至少一种包含以下的融合蛋白

[0008] -至少一种抗原或其片段,

[0009] -抗原N-末端前端的内质网(ER)-易位信号序列,和

[0010] -抗原C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。

[0011] 此外,为了改善免疫应答,期望额外刺激抗原特异性CD8⁺T细胞。

[0012] 因此,在优选的实施方式中,树突细胞组合物还包含表达至少一种抗原或其片段的树突细胞,其中抗原不与促进抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合。

- [0013] 典型地,促进MHC II递呈的靶向信号序列是选自由以下组成的组中的至少一种:
- [0014] -抗原N-末端前端的内质网(ER)-易位信号序列,和
- [0015] -抗原C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。
- [0016] 通常,融合蛋白和抗原(其不与靶向信号序列融合)是瞬时表达或稳定表达的,优选是稳定表达的。例如,可以通过引入ivt-RNA来进行瞬时表达。
- [0017] 在一些实施方式中,内体/溶酶体靶向序列来源于DC-LAMP。优选地,内体/溶酶体靶向序列源于人类。一个实施方式涉及如本文所述的树突细胞组合物,其中内体/溶酶体靶向序列包含序列SEQ ID NO:3或其片段。在具体的实施方式中,内体/溶酶体靶向序列包含序列SEQ ID NO:14或其片段。
- [0018] ER-易位信号序列可以来源于内体/溶酶体相关蛋白。优选地,ER-易位信号序列来源于LAMP1。更优选地,ER-易位信号序列包含序列SEQ ID NO:1或其片段。
- [0019] 在一些实施方式中,树突细胞是通过包括以下步骤的方法产生的成熟树突细胞:
- [0020] (i) 提供单核细胞;
- [0021] (ii) 将步骤i)的单核细胞与IL-4和GM-CSF孵育;
- [0022] (iii) 将步骤ii)的单核细胞与IL-4和GM-CSF及成熟混合物组合孵育。
- [0023] 例如,成熟混合物包括IL- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2和TLR3激动剂的组合。步骤ii)的孵育可以持续至少2天。步骤iii)的孵育可以持续至少12小时,优选24小时。优选地,TLR7/8激动剂是R848并且TLR3激动剂是聚(I:C)。
- [0024] 在具体的实施方式中,抗原是MELAN-A。
- [0025] 本发明的另一方面涉及包含如本文所述的树突细胞组合物的树突细胞疫苗。优选地,树突细胞是自体细胞。
- [0026] 通常,树突细胞组合物和树突细胞疫苗是药学上可接受的流体组合物。
- [0027] 本发明的另一方面涉及用于作为药物使用的根据本发明的树突细胞组合物或根据本发明的树突细胞疫苗。
- [0028] 本发明的一个实施方式涉及用于在治疗癌症中使用的如本文所述的树突细胞疫苗。
- [0029] 具体实施方式涉及用于在刺激抗黑素瘤相关抗原的免疫应答中使用的根据本发明的树突细胞组合物或树突细胞疫苗。在具体的实施方式中,黑素瘤相关抗原是MELAN-A。

附图说明

- [0030] 图1:疫苗接种步骤的实验概述。
- [0031] 在第一天,对16只分成四个不同小组的小鼠移植来自健康HLA-A*02:01-阳性供体的 10×10^6 百万人PBMC。在接下来的14天内重建外周T细胞库。在第14天和第21天接种疫苗,施用 1×10^6 转染有常规ivt-RNA (2) 或CrossTAg-ivt-RNA (3) 的成熟树突细胞。此外,使一组接受转染有CrossTAg-ivt-RNA的成熟树突细胞和转染有常规ivt-RNA的成熟树突细胞的混合物(1:1) (4)。对照组不接种疫苗(1)。在第28天,分离脾细胞,并采用HLA-A*02:01-Melan-A特异性多聚体通过多聚体染色筛选Melan-A特异性CD8⁺T细胞。在体外用适当树突细胞将剩余脾细胞再刺激,并再扩增10天。从对照组分离的脾细胞仅接受人IL-2,以便进一步体外培养。在第38天,对Melan-A特异性CD8⁺T细胞进行定量,并进行功能测试(如IFN- γ 分泌测

定和细胞毒性测定)。

[0032] 图2:树突细胞的成熟和电穿孔。

[0033] 通过从健康HLA-A*02:01血液供体中分离单核细胞,然后按照3d DC方案(包含IL- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TLR7/8激动剂R848、PGE2和TLR3)使该单核细胞成熟,以产生用于在第14天(1.疫苗接种)和第21天(2.疫苗接种)接种疫苗的成熟树突细胞。(A)为验证成熟状态,用与不同表面标志物(对成熟细胞(CD80、CD83、CD86、CD40、CCR7、CD209和HLA-DR)或未成熟细胞(CD14)具有特异性)结合的单克隆抗体对树突细胞进行染色,并通过FACS分析法进行分析。将同种型对照抗体用作阴性对照。(B)在施用前,用CrossTAg-Melan-A-ivt-RNA或常规Melan-A-ivt-RNA转染成熟树突细胞。在孵育6小时后,通过Melan-A蛋白(APC)的细胞内染色,验证Melan-A表达。

[0034] 图3:分离的体外扩增的脾细胞的多聚体染色。

[0035] (A)多聚体染色的示意图:将MHC分子(HLA-A*02:01)相互连接,并用荧光标记物(藻红蛋白,PE)标记。为了比较不同DC疫苗的诱导效率,对CD8⁻和多聚体-双阳性的细胞进行计数。离体测量脾细胞群中Melan-A特异性CD8⁺T细胞的数量(B),以及测量用相应树突细胞和IL-2(对照组仅用IL-2处理)体外再扩增10天后的脾细胞群中Melan-A特异性CD8⁺T细胞的数量(C)。用HLA-A*02:01-Melan-A-多聚体和CD8单克隆抗体对细胞进行染色。每个图总结了示例性实验中的来自每个NSG接受者的Melan-A特异性CD8⁺T细胞的百分比。分析了3次单独的实验,每次实验共有16只小鼠。

[0036] 图4:Melan-A特异性CD8⁺T细胞的细胞因子分泌能力。

[0037] (A)通过在体外再刺激脾细胞后10天的IFN- γ 分泌对Melan-A特异性CD8⁺T细胞的反应性进行了研究。将扩增的脾细胞与靶细胞以1:1的比率共培养24小时。所采用的靶细胞是K562细胞(MHC-I和-II阴性)、用或未用Melan-A-肽孵育2小时的K562-A2(HLA-A02:01⁺)和Mel1624.38(HLA-A02:01⁺,Melan-A⁺)。用ELISpot阅读器(C.T.L.)检测IFN- γ 斑点的数量。图中示出的每个数据点表示来自一只小鼠的激活T细胞的FN-g斑点的数量。分析三次单独的实验,每次实验共有16只小鼠(示出了一个示例性实验)。(B)采用单克隆panMHC-I或panMHC-II抗体分析靶细胞系Mel1624.38上的MHC-I和-II表达。将小型爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)转化的类淋巴母细胞系(mLCL)用作阳性对照,将未染色的细胞用作阴性对照。

[0038] 图5:扩增的脾细胞的杀伤能力。

[0039] 用放射性铬标记靶细胞,如果细胞溶解的话,可以在上清液中检测到放射性铬。将不同的肿瘤细胞系用作为靶细胞。在测量上清液中所释放的放射性铬之前,将扩增的脾细胞与靶细胞以不同比例(脾细胞:APC=80:1;40:1;20:1;10:1)共同培养4小时。采用各种靶细胞以预料在所选择的脾细胞群K562(MHC-I/-II-)内的NK细胞活性。将加载Melan-A-肽的K562-A2(Melan-A⁻,HLA-A*02:01⁺)或Mel1624.38(Melan A⁺,HLA-A*02:01⁺)作为阳性对照。将Mel1375(Melan A⁻,HLA-A*02:01⁺)用作阴性对照。图中显示的每个数据点均表示以两个测量值计算出的标准偏差显示的平均值。分析三次单独的实验,每次实验共有16只小鼠(示出了一个示例性实验)。

具体实施方式

[0040] 在参照一些优选实施例详细地描述本发明之前,提供以下常规定义。

[0041] 在不存在任何一个或多个要素、一种或多种限制下,可以适当地实施如下文说明性描述的本发明,这里并未具体公开。

[0042] 将参照一些特定实施例且参考某些附图对本发明进行描述,但本发明仅由权利要求限定,并不限于此。

[0043] 在本说明书和权利要求书中使用术语“包含 (comprising)”时,其并不排除其它要素。为了本发明的目的,术语“由...组成 (consisting of)”被认为是术语“包括 (comprising of)”的优选实施例。如果在下文中将组定义为包括至少一定数量的实施例,则这也将理解为公开了优选仅由这些实施例组成的组。

[0044] 在涉及单数名词时使用不定冠词或定冠词的情况下,例如,“一种 (a)”、“一种 (an)”或“该”,除非另有特定说明,否则该单数名词包括其复数。

[0045] 如在本文中所使用的,术语“表达”是指基于基因的核酸序列产生多肽的过程。因此,术语“表达的”蛋白质或多肽包括但不限于细胞内的、跨膜的和分泌的蛋白质或多肽。

[0046] 按其常规意义使用技术术语。如果某些术语具有特定含义,那么将在以下使用该术语的上下文中给出对其的定义。

[0047] 本发明的一个方面涉及包含表达抗原或其片段的树突细胞的树突细胞组合物,其中该抗原或其片段与促进该抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合。

[0048] 更具体地,本发明涉及树突细胞组合物,其包含树突细胞,该树突细胞表达至少一种包含以下的融合蛋白

[0049] -至少一种抗原或其片段,

[0050] -抗原或其片段N-末端前端的内质网 (ER)-易位信号序列,和

[0051] -抗原或其片段C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。

[0052] 该片段可以是对该抗原具有特异性的抗原序列,即不存在于哺乳动物 (特别是人类) 的另一种蛋白质或肽中。该片段可以比抗原序列更短,例如比抗原短至少5%、至少10%、至少30%、至少50%、至少70%、至少90%。该片段的长度可以为至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或更多个氨基酸。

[0053] 与施用包含表达常规的但不与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞的树突细胞组合物相比,施用包含表达与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞的树突细胞组合物导致抗原特异性CD8⁺T细胞增加。因此,与仅表达常规的但不与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞相比,表达与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞提供了优异的诱导能力,改善了刺激后分泌IFN- γ 的能力以及杀伤能力较高。

[0054] 在一个具体的实施方式中,树突细胞组合物还包含表达至少一种抗原或其片段的树突细胞,其中该抗原不与促进该抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合。

[0055] 这表示树突细胞组合物包含 (i) 表达至少一种与促进该抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合的抗原的树突细胞,和 (ii) 表达至少一种不与促进该抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合的抗原或其片段的树突细胞。

[0056] 换言之,本发明涉及一种树突细胞组合物,其包含

[0057] (i) 表达至少一种融合蛋白的树突细胞,其包含

[0058] -至少一种抗原或其片段,

[0059] -抗原或其片段的N-末端前端的内质网 (ER)-易位信号序列,以及

[0060] -抗原或其片段的C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域,以及

[0061] (ii) 表达至少一种抗原或其片段的树突细胞,其不具有

[0062] -抗原或其片段的N-末端前端的内质网(ER)-易位信号序列,以及

[0063] -抗原或其片段的C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。

[0064] 在一个优选的实施方式中,(i)和(ii)的抗原是相同的抗原。例如,这表示本发明的具体实施方式涉及树突细胞组合物,其包含:

[0065] (i) 表达至少一种融合蛋白的树突细胞,其包含

[0066] -MELAN-A抗原或其片段,

[0067] -MELAN-A抗原或其片段的N-末端前端的内质网(ER)-易位信号序列,和

[0068] -MELAN-A抗原或其片段的C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域,和

[0069] (ii) 表达MELAN-A抗原或其片段的树突细胞,其不含有

[0070] -MELAN-A抗原或其片段的N-末端前端的内质网(ER)-易位信号序列,和

[0071] -MELAN-A抗原或其片段的C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域。

[0072] 施用表达与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞与表达不与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞的混合物导致抗原特异性CD8⁺T细胞增加。因此,与仅表达不与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞或与仅表达与靶向信号序列融合的抗原的树突细胞相比,所述混合物提供了优异的诱导能力。该混合物还表现出刺激时分泌IFN- γ 的能力较高和杀伤能力较高。

[0073] 可以将抗原(与或不与促进MHC II递呈的靶向信号序列融合)引入树突细胞,例如,通过瞬时表达或稳定表达。换言之,抗原(与或不与促进MHC II递呈的靶向信号序列融合)的表达可以是瞬时表达或稳定表达。在优选的实施方式中,表达是瞬时表达,例如通过引入编码至少一种融合蛋白的ivt-RNA。ivt-RNA的表达具有可以快速产生质量受控的ivt-RNA并且不携带免疫原性蛋白质污染物的优点。

[0074] ER-易位信号序列可以来源于内体/溶酶体相关蛋白。

[0075] 在本公开的方法中使用的ER-易位信号序列可以是定位于内体/溶酶体的蛋白质的分选序列。如在本文中所使用的定位于内体/溶酶体的蛋白质是指位于细胞的内体和/或溶酶体的膜或内腔的蛋白质。

[0076] 定位于内体或溶酶体的蛋白质的实例是糖苷酶,如 α -半乳糖苷酶A/GLA、内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶H/内切H、 α -N-乙酰半乳糖胺酶/NAGA、半乳糖神经酰胺酶/GALC、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶/NAGLU、葡糖神经酰胺酶/GBA、 α -半乳糖苷酶/ α -Gal、乙酰肝素酶/HPSE、 α -L-岩藻糖苷酶、肝素酶I、组织 α -L-岩藻糖苷酶/FUCA1、肝素酶II、 β -半乳糖苷酶-1/GLB1、肝素酶III、 β -葡萄糖醛酸酶/GUSB、氨基己糖苷酶A/HEXA、 β (1-3)-半乳糖苷酶、透明质酸裂解酶、 β (1-4)-半乳糖苷酶、透明质酸酶1/HYAL1、几丁质酶3-样1、透明质酸酶4/HYAL4、几丁质酶3-样2、 α -L-艾杜糖醛酸酶/IDUA、几丁质酶3-样3/ECF-L、壳二糖酶/CTBS、壳三糖酶/CHIT1、乳糖酶样蛋白/LCTL、软骨素B裂解酶/软骨素酶B、溶酶体 α -葡糖苷酶、软骨素酶ABC、MBD4、软骨素酶AC、NEU-1/唾液酸酶-1、胞质 β -葡糖苷酶/GBA3、O-连接的N-乙酰

葡糖胺水解酶(O-GlcNAcase/OGA)、内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶F1/内切F1、N-糖酰胺酶F(PNGase F)、内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶F3/内切F3、SPAM1;溶酶体内蛋白酶,如AMSH/STAMPB、组织蛋白酶H、组织蛋白酶3、组织蛋白酶K、组织蛋白酶6、组织蛋白酶L、组织蛋白酶7/组织蛋白酶1、组织蛋白酶O、组织蛋白酶A/溶酶体羧肽酶A、组织蛋白酶S、组织蛋白酶B、组织蛋白酶V、组织蛋白酶C/DPPI、组织蛋白酶X/Z/P、组织蛋白酶D、半乳糖神经酰胺酶/GALC、组织蛋白酶F、*öcgumain*/天冬酰胺酰基内肽酶;硫酸酯酶,如芳基硫酸酯酶A/ARSA、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶/IDS、芳基硫酸酯酶B/ARSB、N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶/GALNSv、芳基硫酸酯酶G/ARSG、磺胺糖苷酶/SGSH、葡糖胺(N-乙酰基)-6-硫酸酯酶/GNS、硫酸酯酶-2/SULF2;或其它溶酶体蛋白,如BAD-LAMP/LAMP5;透明质酸酶1/HYAL1;CD63;LAMP1/CD107a;CD-M6PR;LAMP2/CD107b;网格蛋白重链1/CHC17;Rab27a;网格蛋白重链2/CHC22;UNC13D、CD68、CD1b或DC-LAMP。

[0077] ER-易位信号序列可以来源于内体/溶酶体相关蛋白。内体/溶酶体相关蛋白可以是LAMP1、LAMP2、DC-LAMP、CD68或CD1b,优选LAMP1。优选地,ER-易位信号源于人类。ER-易位信号序列可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12中的至少一种的序列。在一些实施方式中,ER-易位信号序列可以包含选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13所组成的组的序列中的至少一种序列。在一些实施方式中,ER-易位信号序列可以由选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13所组成的组的序列之一组成。在具体的实施方式中,ER-易位信号序列包含序列SEQ ID NO:1或其片段。在更具体的实施方式中,ER-易位信号序列由序列SEQ ID NO:2组成。

[0078] 内体/溶酶体靶向序列可以来源于LAMP1或DC-LAMP,优选DC-LAMP。内体/溶酶体靶向序列通常是跨膜胞质结构域的一部分。因此,包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域可以来源于LAMP1或DC-LAMP,优选DC-LAMP。优选地,包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域源于人类。通常,内体/溶酶体靶向序列包含基序Y-XX,随后接着疏水性氨基酸(SEQ ID NO:4)。优选地,内体/溶酶体靶向信号序列是YQRI(SEQ ID NO:5)。例如,包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域可以包含序列SEQ ID NO:14或其片段。

[0079] 术语疏水性氨基酸是本领域技术人员所熟知的。疏水性氨基酸的实例是Ala、Ile、Leu、Phe、Val、Pro、Gly、Met、Trp、Tyr、Pro、Cys。

[0080] 树突细胞可以包含不同抗原递呈细胞的群体,每个群体表达不同的抗原融合蛋白。

[0081] 通常,树突细胞是成熟的树突细胞,其通过包括以下步骤的方法产生:i)提供单核细胞;ii)将步骤i)的单核细胞与IL-4和GM-CSF孵育;iii)将步骤ii)的单核细胞与IL-4和GM-CSF及成熟混合物组合孵育。

[0082] 成熟混合物可以包含选自IL- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2和TLR3激动剂或其组合所组成的组的组分中的至少一种。TLR7/8激动剂可以是R848或CL075。TLR3激动剂可以是聚(I:C)。例如,成熟混合物可以包含IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2的组合,如IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2和TLR3激动剂的组合。在具体的实施方式中,成熟混合物可以包含IL- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TLR7/8激动剂和PGE2的组合。在另一具体的实施方式中,成熟混合物可以包含IL- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TLR7/8激动剂、PGE2和TLR3激动剂的组合。本发明还涉及如

本文所述的成熟混合物。此外,本发明还涉及至少一种未成熟树突细胞的体外成熟,包括用本文所述的成熟混合物刺激至少一种未成熟树突细胞。

[0083] 步骤ii)的孵育可以持续至少2天。步骤iii)的孵育可以持续至少12小时,优选24小时。

[0084] 通常,抗原是肿瘤抗原或病毒抗原。肿瘤抗原可以选自由病毒肿瘤抗原、肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原和携带患者特异性突变并在患者的肿瘤细胞中表达的抗原所组成的组。优选地,患者的非癌性细胞中并不表达携带患者特异性突变并在患者的肿瘤细胞中表达的抗原。

[0085] 病毒肿瘤抗原(也称为致癌病毒抗原)是致癌病毒的抗原,如致癌DNA病毒(例如,如乙型肝炎病毒、疱疹病毒和乳头瘤病毒的病毒)和致癌RNA病毒。肿瘤特异性抗原是指仅由肿瘤细胞表达的肿瘤相关突变。肿瘤相关抗原的组包括,例如组织特异性癌症/睾丸抗原或组织分化抗原,如MART-1(MELAN-A)、酪氨酸酶或CD20。肿瘤抗原可以是肿瘤相关抗原,可选地,肿瘤相关抗原是癌症/睾丸抗原(C/T抗原)。C/T抗原可以选自包括MAGE家族成员的组(例如,MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4,但不限于这些)、包含单点突变的肿瘤抗原、NY-ES01、肿瘤/睾丸抗原1B、GAGE-1、SSX-4、XAGE-1、BAGE、GAGE、SCP-1、SSX-2、SSX-4、CTZ9、CT10、SAGE和CAGE。优选地,C/T抗原可以选自由GAGE-1、SSX-4和XAGE-1所组成的组。优选地,肿瘤抗原是组织分化抗原,如MART-1,酪氨酸酶或CD20。

[0086] 更优选地,肿瘤抗原是MART-1,其也被称为MELAN-A。

[0087] 因此,在具体的实施方式中,本发明涉及树突细胞组合物,其包含树突细胞,该树突细胞表达至少一种包含以下的融合蛋白:

[0088] -至少一种抗原或其片段,

[0089] -抗原或其片段N-末端前端的内质网(ER)-易位信号序列,和

[0090] -抗原或其片段C-末端后端的包含内体/溶酶体靶向序列的跨膜胞质结构域;

[0091] 其中融合蛋白是MELAN-A。

[0092] 本发明的具体实施方式涉及包含表达至少一种抗原或其片段的树突细胞的树突细胞组合物,其中抗原不与促进抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合,其中所述树突细胞不表达抗原或其片段,其中抗原与促进抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合,其中抗原是MELAN-A。

[0093] 在具体的实施方式中,树突细胞组合物包含(i)表达至少一种与促进抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合的抗原的树突细胞,和(ii)表达至少一种不与促进抗原或其片段的MHC II递呈的靶向信号序列融合的抗原或其片段的树突细胞,其中抗原是MELAN-A。

[0094] 因此,本发明还涉及用于作为药物使用的树突细胞组合物。还涉及用于作为药物使用的树突细胞疫苗。

[0095] 本发明的另一方面涉及用于在治疗癌症中使用的树突细胞组合物。具体实施方式涉及用于在刺激抗黑色素瘤相关抗原的免疫应答中使用的树突细胞组合物。

[0096] 本发明的另一方面涉及用于在治疗癌症中使用的树突细胞疫苗。具体实施方式涉及用于在刺激抗黑色素瘤相关抗原的免疫应答中使用的树突细胞疫苗。

[0097] 可以确定用本发明组合物治疗的激活特征,例如通过测量从向其施用本发明树突

细胞组合物的生物体分离出的T细胞的激活诱导的细胞因子释放或抗原引导的杀伤能力。

[0098] 为了测量激活诱导的细胞因子分泌,可以将T细胞与加载抗原的树突细胞共培养。可以采用不同比率的效应细胞与靶细胞(E:T)。可以将与对照抗原递呈细胞(即,模拟转染的APC)孵育的T细胞或在不存在刺激细胞下孵育的T细胞作为阴性对照。通过标准的酶联免疫吸附测定法(ELISA)评估培养物上清液。标志物的实例是但不限于粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)、IL-2和TNF- α 分泌物。在遇到抗原后所产生的IFN- γ 、IL-2和TNF- α 分泌物与抗肿瘤功能增强相关,因此它们在测量CD8⁺细胞毒性T细胞的抗原诱导的细胞因子分泌物时特别有用。此外,对于评估抗原-特异性CD4⁺T辅助-1(Th1)-极化T细胞克隆,IFN- γ 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是明确的细胞因子。

[0099] 可以测量由本发明树突细胞群体激活的T细胞的细胞毒性活性,例如通过铬释放测定法。以这种测定法,用放射性铬标记靶细胞,并将其暴露于T细胞。在杀死靶细胞后,放射性铬被释放到上清液中,并在共培养开始后4小时内能够检测到放射性铬。通过在不存在效应细胞下培养靶细胞来评估自发释放,将具体的铬释放归一化至自发释放。因此,上清液中的高铬含量与极好的细胞溶解T细胞活性相关。优选地,进行铬释放测定以筛选肿瘤抗原-特异性CD8⁺T细胞。

[0100] 源于供体的抗原递呈细胞可以是,例如成熟化至树突细胞的分离的单核细胞。成熟化的树突细胞表现出最佳的激活能力。

[0101] 通常,树突细胞是自体细胞,即从患者获得的细胞(根据本发明教导对该细胞进行处理,然后施用于同一患者)。例如,从患者分离单核细胞,将该单核细胞成熟化为树突细胞,并如本文所述进行处理以表达期望抗原,然后将该树突细胞施用于同一患者。

[0102] 本发明还涉及包含如本文所述的树突细胞组合物的树突细胞疫苗。

[0103] 优选地将本发明的活性组分(如树突细胞组合物)以一剂量与可接受的载体或载体材料混合用于药物组合物中,以治疗或至少减轻疾病。除了活性组分和载体之外,这种组合物还可以包含填充材料、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和其它现有技术已知的材料。

[0104] 术语“药学上可接受的”定义为无毒性材料,其不干扰活性组分(即本发明的树突细胞)的生物活性的有效性。载体的选择取决于应用。

[0105] 药物组合物可以含有增强活性组分活性或补充治疗的其它组分。这类其它组分和/或因素可以是药物组合物的一部分以实现协同效应或将不利的或不希望的影响最小化。

[0106] 用于本发明活性组分的制剂或制备和施用/药物治疗的技术公布于“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack出版公司,Easton,PA,最新版。合适的施用是肠胃外施用,例如皮内、肌内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、结节内、腹膜内或瘤内注射。静脉注射是治疗患者的优选方法。

[0107] 药物组合物可以是可注射组合物,即药学上可接受的流体组合物,包含至少一种活性成分,例如本发明的树突细胞组合物。通常将活性成分溶解或悬浮在生理上可接受的载体中,并且组合物可以额外包含少量的一种或多种无毒辅助物质,如乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等。可用于与本公开的树突细胞一起使用的这类可注射组合物是常规的;对于本领域普通技术人员来说,合适的制剂是众所周知的。

[0108] 适合于肠胃外施用(如通过关节内(在关节中的)、静脉内、肌内、真皮内

(intradermal)、皮内 (intracutan)、腹膜内和皮下途径,优选真皮内 (intradermal)、结节内、皮内 (intracutan) 或皮下) 的制剂包含无菌水性等渗注射溶液 (其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质), 和无菌水性与非水性悬浮液 (其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂)。真皮内 (intradermal)、皮内 (intracutan)、皮下或结节内施用是施用本发明树突细胞的优选方法。

[0109] 在本发明的上下文中,施用至患者的树突细胞的剂量应该足以随时间而对患者产生有益的治疗反应,或抑制癌细胞的生长,或抑制感染。因此,向患者施用足以对病毒或肿瘤抗原产生有效CTL应答和/或减轻、减小、治愈或至少部分阻止疾病或感染的症状和/或并发症的量的细胞。将足以实现这点的量定义为“治疗有效剂量”。通过所产生的树突细胞的活性和患者的状况决定剂量。还将由向特定患者施用特定细胞所伴随的任何不良副作用的存在性、性质和程度决定剂量大小。在治疗或预防疾病 (如癌症) 中确定待施用的细胞的有效量时,医师需要评估CTL毒性、疾病进展和对针对任何所引入细胞类型免疫应答的诱导。

[0110] 在施用之前,获得血液样品并进行保存以供分析。通常,经由皮内 (intracutan)、结节内、皮下或真皮内注射以单剂量或多剂量形式将约 10^4 至 10^6 个且更优选 10^6 至 10^{10} 个细胞施用至70kg患者。优选地,每次疫苗接种采用至少 2×10^6 - 10^7 个细胞。可以每周施用注射物一次,持续4周,接着每月施用/注射1次,并且应当优选地在淋巴结附近注射,直接注射至淋巴结,或通过真皮内 (intradermal)、皮内 (intracutan) 或皮下注射。可以额外进行加强注射。如上所述,优选地每月重复细胞再输注一次,在一年时期内总共进行10-12次治疗。在第一次治疗后,可以听凭临床医生处理,基于门诊患者情况进行输液。如果对作为门诊患者的参与者进行再输注,那么在治疗后监测该参与者至少4小时。

[0111] 可以施用树突细胞组合物/树突细胞疫苗至少一次、至少两次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次。可以施用疫苗不超过15次、18次、20次、25次、30次。施用间隔是至少3天、至少7天、至少14天或至少4周。优选地,每周施用疫苗一次,持续4周,随后每月施用1次,总共10至12次治疗。

[0112] 对于施用,可以由细胞类型的LD-50 (或其它毒性测量指标) 和在施用至大量全面健康的患者时不同浓度下的细胞类型的副作用所确定的速率施用本发明细胞。可以通过单次剂量或分次剂量完成施用。本发明的细胞可以通过已知的常规疗法补充其它的疾病治疗方法,包括细胞毒性剂、核苷酸类似物和生物反应调节剂。类似地,可选地添加生物反应调节剂以用于树突细胞治疗。

[0113] 本发明还涉及一种组合物,其包含

[0114] a) 表达载体,其包含

[0115] -人ER-易位信号序列,

[0116] -包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域,和

[0117] -至少一种抗原或其片段;和

[0118] b) 表达载体,其包含至少一种抗原或其片段,但不含有ER-易位信号序列和包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域。

[0119] 本发明还涉及一种试剂盒,其包含:

[0120] a) 表达载体,其包含:

[0121] -人ER-易位信号序列,

[0122] -包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域,和

[0123] -至少一种抗原或其片段;和

[0124] b) 表达载体,其包含至少一种抗原或其片段,但不含有ER-易位信号序列和包含内体/溶酶体靶向序列的人跨膜胞质结构域。

[0125] “载体”是具有将核酸序列携带到合适宿主细胞中的能力的任何分子或组合物,在其中可以合成经过编码的多肽。通常且优选地,载体是已经使用本领域已知的重组DNA技术被工程化的核酸,以合并所需的核酸序列(例如,本发明的核酸)。载体可以包含DNA或RNA和/或包含脂质体。载体可以为质粒、穿梭载体、噬菌粒、柯斯质粒载体、表达载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体或颗粒载体和/或用于基因治疗的载体。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,如复制起点。载体还可以包含本领域普通技术人员已知的一种或多种选择标志物基因和其它遗传元件。载体优选为表达载体,其包含根据本发明的核酸,本发明的核酸可操作地连接至允许所述核酸表达的序列。

[0126] 实施例

[0127] 1.1在NSG小鼠模型中激活Melan-A特异性CD8⁺T细胞

[0128] 为了开发人源化小鼠模型以研究体内接种本申请DC,我们采用异种移植有人PBMC的NOD-scid/Il2r γ ^{-/-}(NSG)小鼠。由于NSG小鼠具有免疫缺陷(缺少NK细胞、T细胞和B细胞)(SPRANGER,S.等人.2012.NOD/scid IL-2Rg(null)mice:a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies in vivo.J Transl Med,10,30),免疫细胞群中所产生的小生境允许非常有效地移植入人PBMC(SHULTZ,等人.2007.Humanized mice in translational biomedical research.Nat Rev Immunol,7,118-30)。

[0129] 将16只NSG受体小鼠分成四组,并在14天内用人HLA-A*02:01PBMC进行异种移植。对不同组小鼠的疫苗接种包括两次静脉注射新鲜制备的自体成熟树突细胞,该自体成熟树突细胞是用CrossTAg-Melan-A-ivt-RNA、常规Melan-A-ivt-RNA或混合ivt-RNA电穿孔的,注射两次,两次注射之间间隔一周。在另外7天后,且在随后的体外再刺激后,通过FACS分析脾脏群体以计算Melan-A特异性CD8⁺T细胞。还通过铬释放和ELISpot测定法分析了所有4组的Melan-A特异性T细胞的细胞毒性和分泌IFN- γ 的能力(图1)。

[0130] 1.2转染的成熟树突细胞的成熟状态和Melan-A表达

[0131] 将来自健康HLA-A*02:01供体的单核细胞分离,并按照Spranger等人所描述的在3天内体外将其成熟化(Spranger等人.2010.Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075.J Immunol,185,738-47)。为了验证用于随后施用于人源化小鼠体内的树突细胞的体外成熟,我们通过FACS分析测定了通常在未成熟树突细胞和成熟树突细胞上表达的细胞表面分子的表达(Burdek等人.2010.Three-day dendritic cells for vaccine development:antigen uptake,processing and presentation.J Transl Med,8,90)。所分析的树突细胞表达出成熟表型(图2A)。按照用于成熟的3d树突细胞的电穿孔条件,用CrossTAg-Melan-A-ivt-RNA或用常规的Melan-A-ivt-RNA转染成熟的树突细胞(Burdek等人,2010)。通过用单克隆抗体对Melan-A蛋白进行细胞内染色来检查转染效率(电穿孔后6小时)(图2B)。

[0132] 1.3 Melan-A特异性CD8⁺T细胞的定量

[0133] 在分离并分析脾细胞之前,对重建的小鼠接种两次(其中间隔一周)。为了比较不同DC疫苗的诱导效率,通过加载有Melan-A表位的荧光标记的HLA-A*02:01-多聚体检测Melan-A特异性CD8⁺T细胞的数量(图3A)。

[0134] 脾细胞的离体分析已经显示了常规DC组与对照组相比仅显示出特异性细胞数量稍微更高,而在CrossTAg-DC组或混合组中的Melan-A特异性CD8⁺T细胞相比于常规DC组更高。此外,我们检测到CrossTAg组中的CD8⁺T细胞百分比相比于常规组显著更高(图3B)。随后,通过Melan-A转染的树突细胞和hIL-2在体外进一步扩增剩余的脾细胞,而对照组仅用hIL-2处理。对扩增细胞的再次分析表明,含有CrossTAg-Melan-A的树突细胞和常规Melan-A树突细胞在Melan-A特异性CD8⁺T细胞的平均数量上具有明显差异。与常规组相比,CrossTAg组可以看到数量显著更多的Melan-A特异性CD8⁺T细胞(图3C)。因此,用加载有CrossTAg-Melan-A-ivt-RNA的树突细胞接种得到优异的诱导能力,由Melan-A特异性CD8⁺T细胞增殖更多得以证实。证实了用加载有CrossTAg-Melan-A-ivt-RNA的树突细胞和加载有未与CrossTAg融合的Melan-A-ivt RNA的树突细胞的组合接种具有更强的诱导能力。

[0135] 1.4诱导的Melan-A特异性CD8⁺T细胞的功能分析

[0136] 我们证实了CrossTAg转染的树突细胞具有优异的诱导抗原特异性CD8⁺T细胞的效率,表明具有包含靶抗原侧翼的CrossTAg序列的RNA构建体的明显益处。对于建立CD8⁺T细胞记忆以及成功消退肿瘤,先前文献已经记载了CD4⁺T细胞的关键作用(Mortenson等人,2013.Effective anti-neu-initiated antitumor responses require the complex role of CD4⁺T cells.Clin Cancer Res,19,1476-86;Rosenberg et al.Cancer immunotherapy:moving beyond current vaccines.Nat Med,10,909-15)。因此,在用含有CrossTAg-Melan-A的树突细胞接种的NSG小鼠中诱导的免疫应答增强可以通过由CD4⁺T细胞被赋予的帮助作用得以解释,这种帮助作用由导致MHC-I和-II上的Melan-A递呈的CrossTAg序列提供。

[0137] 为了进一步检查所诱导的T细胞的功能,下一个需要明确的重要问题是诱导的Melan-A特异性CD8⁺T细胞是否也能够分泌对于适当免疫应答至关重要的IFN- γ 。因此,分析了Melan-A特异性CD8⁺T细胞在刺激后分泌IFN- γ 的能力。将体外扩增的脾细胞与作为刺激细胞的各种肿瘤细胞系共培养以评估IFN- γ 分泌。发现未刺激的脾细胞是完全不反应的。由于NK细胞由缺乏任何MHC分子的靶细胞激活,因此通过采用HLA阴性肿瘤细胞系K562来确定脾细胞群内的NK细胞活性。没有检测到NK细胞活性。只有表达Melan-A或加载有特定肽的刺激细胞导致强烈激活脾细胞,而Melan-A阴性细胞不刺激脾细胞。平均而言,与常规组或对照组相比,从CrossTAg-组或混合组分离的CD8⁺T细胞中可以检测到更多的IFN- γ 斑点(图4A)。

[0138] 为了解决在ELISpot测定中观察到的反应性是否可以起源于CD8⁺T细胞而不是起源于CD4⁺T细胞的问题,检测了刺激细胞上的MHC-II表达。刺激细胞系对MHC-I呈阳性但对MHC-II无效(图4B)。即使在过夜处理刺激细胞的IFN- γ 后,也没有导致MHC-II分子的诱导表达(数据未显示)。因此,只有MHC-I限制性T细胞可以被激活,表明观察到的反应性起源于激活的CD8⁺T细胞(由于CD4⁺T细胞需要将MHC-II上的抗原递呈激活)。

[0139] 为了能够杀死肿瘤细胞,CD8⁺T细胞具有细胞毒性也是重要的。因此,通过铬释放测定法来评估Melan A特异性T细胞的细胞毒性能力(图5)。细胞毒性结果表明扩增的脾细

胞仅特异性裂解Melan-A肽递呈细胞,而不能特异性裂解对靶抗原阴性的对照细胞系。来自对照组的细胞并不显示任何杀伤活性。所有组的脾细胞的NK细胞活性也非常低。值得注意的是,与来自常规DC组的脾细胞相比,来自CrossTAg-DC组和混合组的细胞显示出高得多的杀伤能力。

[0140] 方法

[0141] 遗传构建体

[0142] 采用pGEM-eGFP-A120载体作为CrossTAg-载体的起始构建体。原始pGEM载体的聚A120变体使得经过转录的RNA的稳定性更高并改善蛋白质表达。该质粒还包含位于eGFP cDNA5'末端的独特AgeI位点,以及位于3'末端的独特EcoRI位点。SpeI位点紧接着聚-A尾,其允许将用于ivt-RNA生产的质粒线性化。

[0143] 通过用编码Cross TAg靶向信号的cDNA替代eGFP来克隆pGEM-CrossTAg-A120质粒。该CrossTAg序列由与DC-LAMP(登录号:NP_055213,376-416个氨基酸)的跨膜胞质结构域的5'融合的人溶酶体相关膜蛋白-1(LAMP-1,登录号:NP_005552,1-28个氨基酸)的ER-易位信号组成。为了插入编码抗原的cDNA,用含有NheI、KpnI和PstI限制性位点的18bp间隔序列将不同的CrossTAg序列分隔开,并不会破坏LAMP1开放阅读框(ORF)。实际上使用计算克隆软件设计密码子优化的Cross-TAg序列,并由GeneArt(雷根斯堡,德国)进行合成。随后采用AgeI(5'末端)和EcoRI(3'末端)限制性位点将完整的CrossTAg序列从质粒DNA切割掉,并将其连接到等量消化的pGEM-A120载体的MCS中。

[0144] 为了克隆各种C/T抗原-CrossTAg构建体(pGEM-GAGE-1-CrossTAg-A120、pGEM-MAGE-A4-CrossTAg-A120、pGEM-NY-ES0-1-CrossTAg-A120、pGEM-SSX-4-CrossTAg-A120、pGEM-XAGE-1-CrossTAg-A120),通过PCR采用正向和反向基因特异性引物从质粒扩增抗原cDNA(登录号:GAGE-1、U19142;MAGE-A4、NM_001011550;NY-ES01、AJ003149;SSX-4、U90841;XAGE-1、AF251237),并经由NheI和PstI/NotI限制性位点连接。将所有抗原序列插入pGEM-CrossTAg-A120的裂解CrossTAg-信号中,而不会破坏初始ORF。

[0145] 为了验证CD4⁺T细胞表位,合成互补寡核苷酸(Metabion,普拉内格,德国)并进行退火。将退火时所产生的粘性末端用于将这些短抗原序列直接连接到CrossTAg载体中。

[0146] 产生ivt-RNA

[0147] 在将SpeI线性化之后,根据制造商的说明书,使用mMESSAGE mMACHINE T7试剂盒(赛默飞世尔科技公司,马萨诸塞州,美国),将pGEM-质粒作为模板用于产生单种群体外转录(ivt)-RNA。为了控制质量,通过琼脂糖凝胶电泳分析ivt-RNA产物长度。通过Nanodrop ND-1000分光光度计(赛默飞世尔科技公司,马萨诸塞州)测定浓度和纯度。

[0148] 细胞培养

[0149] 通过Bürdek等人的描述产生和转染源自单核细胞的3d成熟树突细胞(Journal of Translational Medicine 2010,8:90)。RNA转染成熟树突细胞:通过电穿孔实现了小型爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)转化的类淋巴母细胞系(mLCL)。

[0150] 树突细胞的表面表型分型

[0151] 用以下抗体检测由树突细胞表达的表面标志物:PE缀合的CCR7-特异性抗体(3D12)(eBioscience,法兰克福,德国)、Hz450缀合的CD4-特异性抗体(RPA-T4)、Hz500缀合的CD8-特异性抗体(RPA-T8)、FITC缀合的CD14-特异性抗体(M5E2)、PE缀合的CD40-特异性

抗体(5C3)、PE缀合的CD40L-特异性抗体(TRAP1)、PE缀合的CD80-特异性抗体(L307.4)、FITC缀合的CD83-特异性抗体(HB15e)、FITC缀合的CD86-特异性抗体(2331)、APC缀合的CD137-特异性抗体(4B4-1)、FITC缀合的DC-SIGN-特异性抗体(DCN46)、PE缀合的HLA-DR-特异性抗体(G46-6)(均来自BD Biosciences, 海德堡, 德国)。洗涤后, 将细胞在4℃下染色30分钟, 并添加碘化丙啶(2μg/ml)以排除死亡细胞。通过流式细胞术(LSR II, BD)分析所有表面标志物的表达。使用FlowJo 8软件(TreeStar)完成采集后的数据分析。采用2μg/ml αCD40抗体(克隆G28.5, 由柏林-勃兰登堡再生疗法中心的M. Frensch提供), 按照Frensch, M. 等人的描述分析T细胞表面表达的CD40L(Frensch, M. 等人, (2005) Direct access to CD4⁺T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. Nat Med 11(10):1118-1124), 并在T细胞:APC共培养开始后6小时进行评估。

[0152] 用RNA转染的树突细胞从头激发PBL

[0153] 用编码MELAN-A的CrossTag-RNA转染健康供体的3d成熟树突细胞。在电穿孔后收获转染的成熟树突细胞, 并且将混合物中的混合成熟树突细胞与外周血淋巴细胞(PBL)(外周血淋巴细胞与混合mDC的比率在2:1内)共培养, 其在产生成熟树突细胞过程中的PBMC塑性粘附期间是不贴壁的。在37℃下在潮湿气氛中培养细胞。在1天后加入白细胞介素-2(IL-2, 20U/ml; Chiron Behring, 马尔堡, 德国)和IL-7(5ng/ml)(Promokine, 海德堡, 德国), 之后每隔一天加入它们。

[0154] 细胞因子释放测定

[0155] 为了测量激活诱导的细胞因子分泌, 在37℃和潮湿气氛下, 将 5×10^4 个T细胞与 1×10^5 个加载有ivt-RNA的抗原递呈细胞DC在圆底96孔板的200μl T细胞培养基中共培养。将用模拟转染的APC与T细胞、或不在刺激细胞下的T细胞用作阴性对照。在共培养16小时后, 收集上清液, 并采用OptEIA人IFN-γ或GM-CSF组合(均来自BD Biosciences, 马尔堡, 德国)通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行评估。

序列表

<110> 基因医疗免疫疗法有限责任公司
健康与环境慕尼黑德国研究中心赫姆霍茨中心（有限责任公司）

<120> 树突细胞组合物

<130> M10978/ DB; MG-DC 16-01

<150> EP15202329

<151> 2015-12-23

<150> EP16190399

<151> 2016-09-23

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Pro Gly Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

[0001]

Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala
20 25

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Ala Ala Pro Gly Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala
20 25

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ser Ser Asp Tyr Thr Ile Val Leu Pro Val Ile Gly Ala Ile Val Val

<210> 7
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

Met Val Cys Phe Arg Leu Phe Pro Val Pro Gly Ser Gly Leu Val Leu
 1 5 10 15

Val Cys Leu Val Leu Gly Ala Val Arg Ser Tyr Ala Leu
 20 25

<210> 8
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Met Pro Arg Gln Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15

[0003] Val Ile Leu His Asp Gly Ser Gln Met Arg Ala
 20 25

<210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9

Met Pro Arg Gln Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15

Val Ile Leu His Asp Gly Ser Gln Met Arg Ala Lys
 20 25

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 10

Met Arg Leu Ala Val Leu Phe Ser Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Gly Thr Gly
20

<210> 11
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Met Arg Leu Ala Val Leu Phe Ser Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Gly Thr Gly Asn
20

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

[0004] Met Leu Leu Leu Pro Phe Gln Leu Leu Ala Val Leu Phe Pro Gly Gly
1 5 10 15

Asn

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Met Leu Leu Leu Pro Phe Gln Leu Leu Ala Val Leu Phe Pro Gly Gly
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

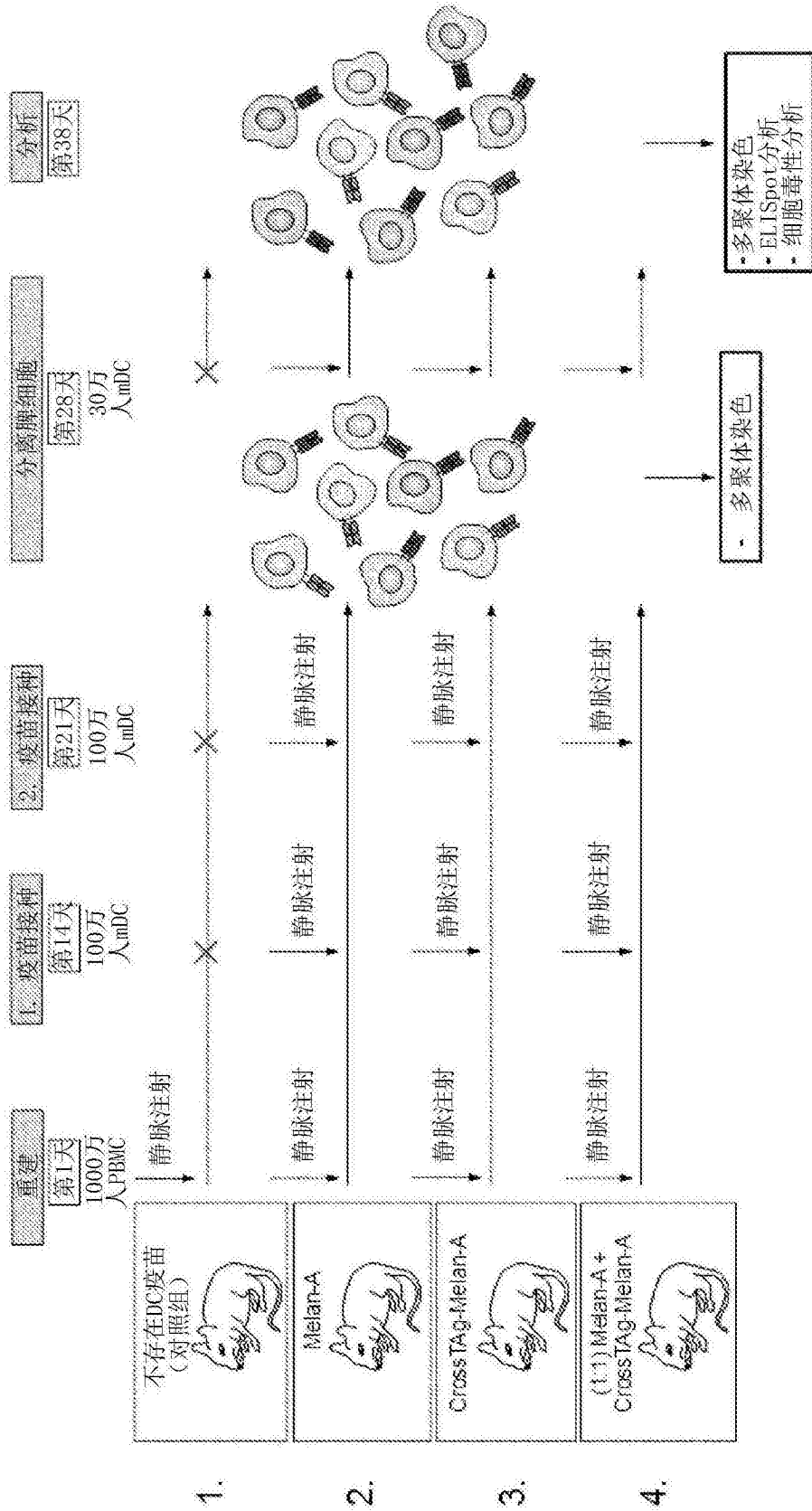
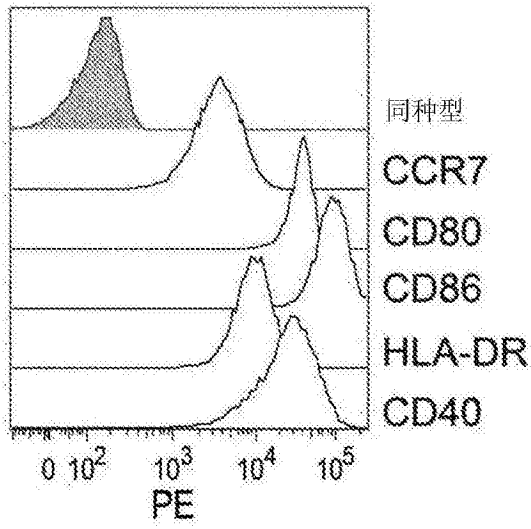


图1

A)



B)

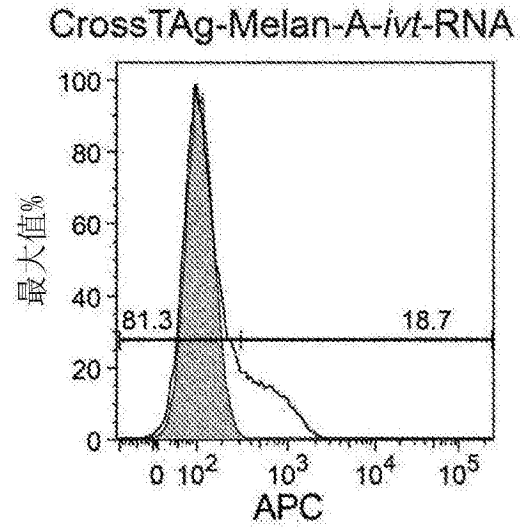
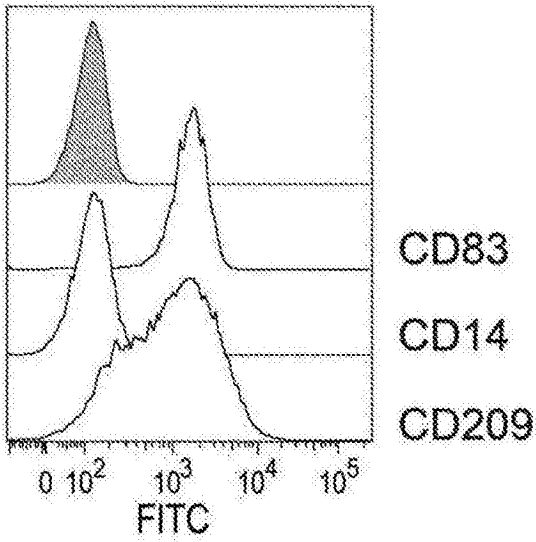
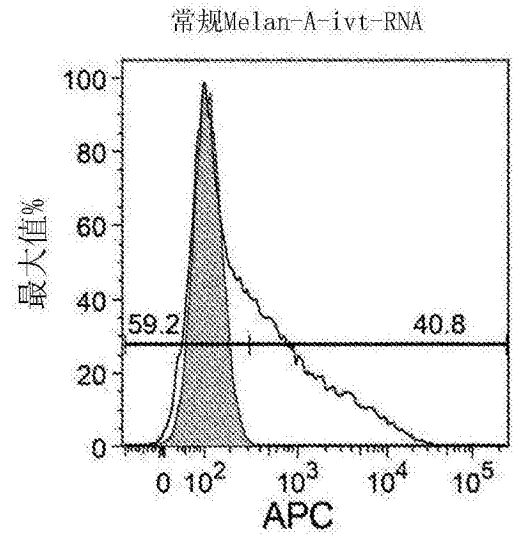
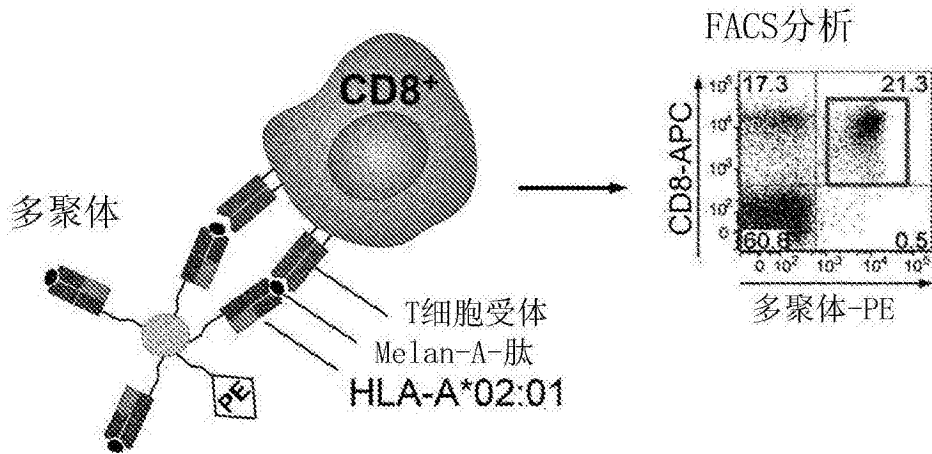
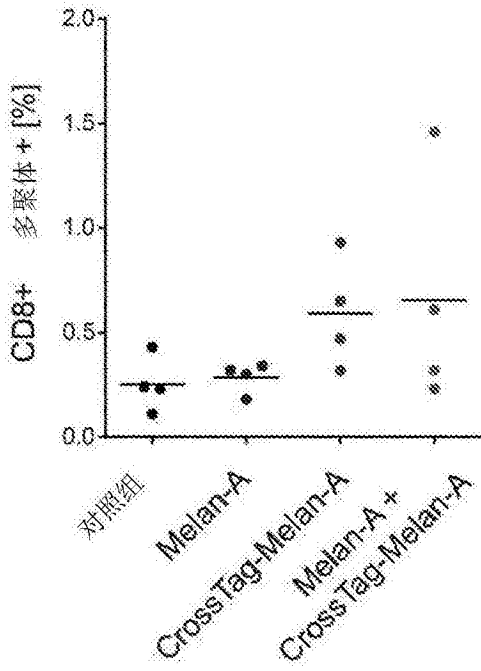


图2

A)



B)



C)

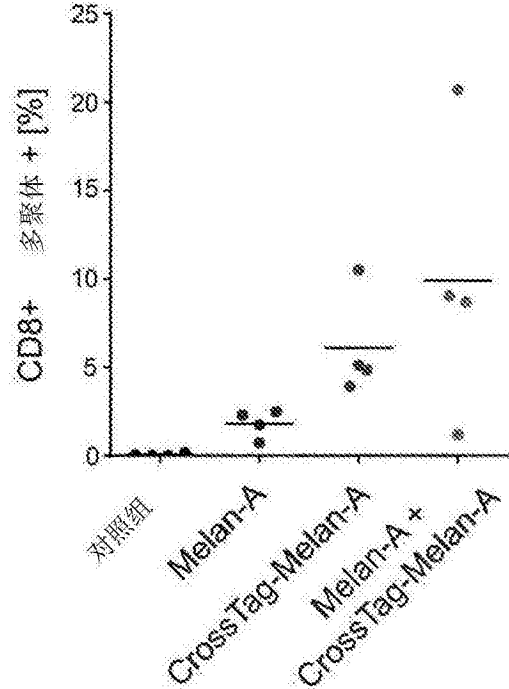
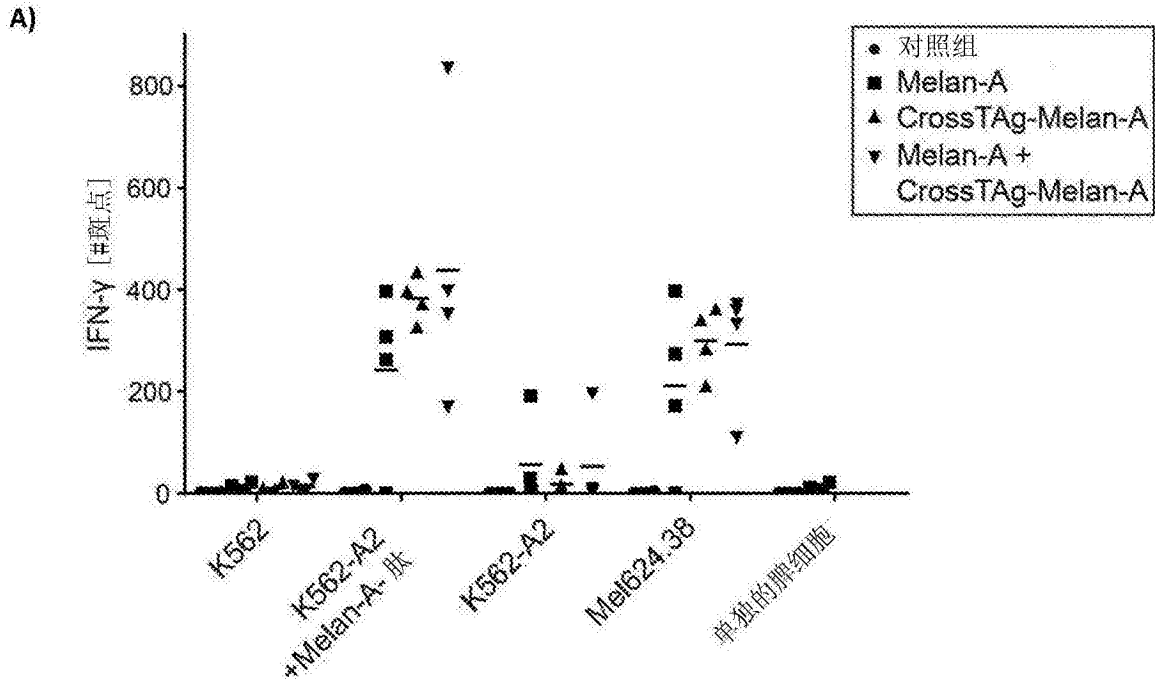


图3



B)

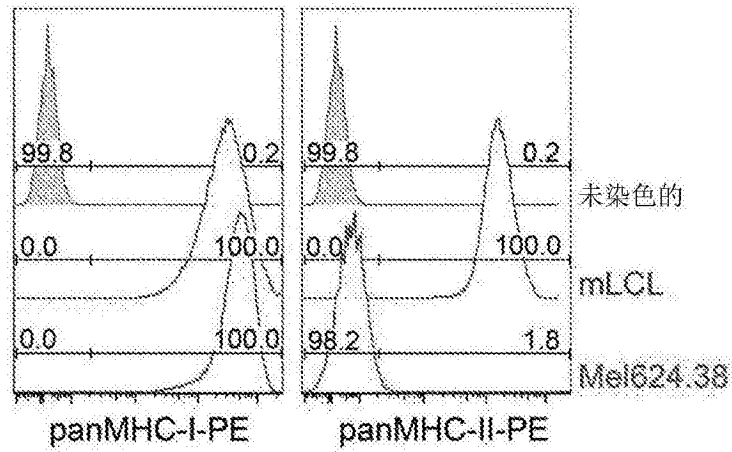


图4

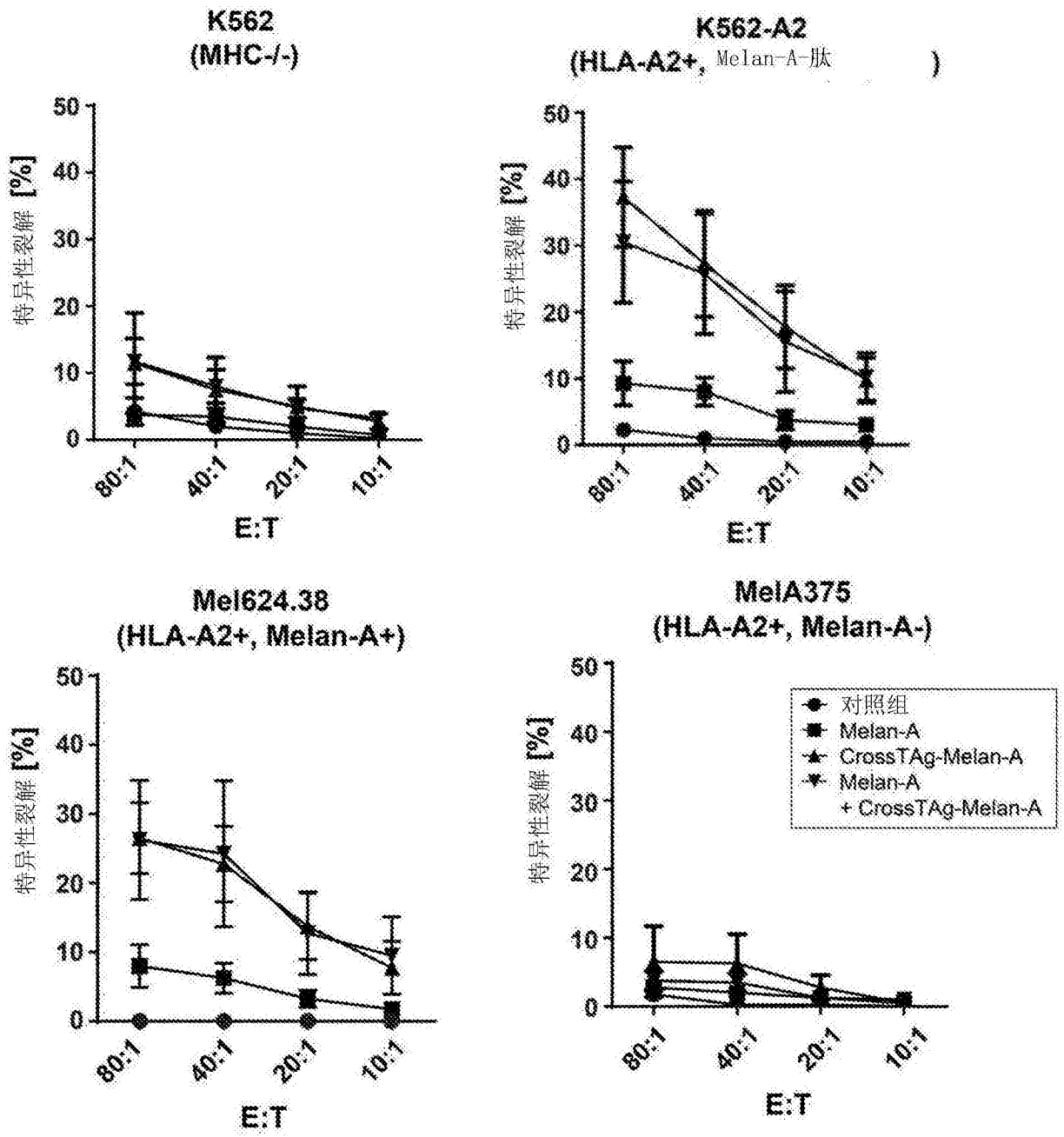


图5