



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1902312 B

(45) 授权公告日 2011.02.23

(21) 申请号 200480039819.3

C12N 5/16 (2006.01)

(22) 申请日 2004.10.29

A61K 39/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 48/00 (2006.01)

374808/2003 2003.11.04 JP

A61P 35/00 (2006.01)

187028/2004 2004.06.24 JP

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

CH JIN 等, recombinant sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hemotopoietic stem cells. GENE THERAPY. 2003, 10(3), 272-277.

2006.07.04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2004/016089 2004.10.29

(87) PCT申请的公布数据

W02005/042737 JA 2005.05.12

(73) 专利权人 株式会社载体研究所

地址 日本茨城县

审查员 李美宣

(72) 发明人 冈野慎士 米满吉和 居石克夫

柴田智子 长谷川护

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 33 页 序列表 8 页
附图 22 页

(54) 发明名称

制备导入了基因的树突细胞的方法

(57) 摘要

本发明提供用于向树突细胞导入基因的方法,其包括将负链 RNA 病毒与树突细胞接触的步骤。本发明也提供制备导入了基因的树突细胞的方法,其包括将负链 RNA 病毒与树突细胞接触的步骤。本发明还提供用这种方法制备的导入了基因的树突细胞。本发明提供激活树突细胞的方法,其包括将负链 RNA 病毒与树突细胞接触的步骤。本发明使向树突细胞有效导入基因成为可能。导入了抗原基因或细胞因子基因的树突细胞作为疫苗是有用的。

1. 仙台病毒载体在制造用于制备成熟树突细胞的试剂中的用途,其中成熟树突细胞的制备包括下述步骤:

(i) 将仙台病毒载体与 CD11c⁺ 未成熟树突细胞接触,或

(ii) 将仙台病毒载体与树突细胞的 CD34⁺ 或 CD11c⁺ 前体细胞接触,并在粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和白介素 -4 (IL-4) 的存在下将细胞分化成为未成熟树突细胞,从而诱导至少由该仙台病毒载体贡献的未成熟树突细胞的成熟。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述成熟树突细胞是经基因转移的成熟树突细胞。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中成熟树突细胞的制备包括权利要求 1 的步骤 (i)。

4. 权利要求 1 或 2 的用途,其中成熟树突细胞的制备包括权利要求 1 的步骤 (ii)。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的用途,其中载体包含细胞因子基因。

6. 权利要求 5 的用途,其中细胞因子是干扰素 β 。

7. 权利要求 1-6 中任一项的用途,其中细胞是人类细胞。

制备导入了基因的树突细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及向树突细胞导入基因的方法。本发明的方法可以用于制备抗癌症或抗感染性疾病等的疫苗。

背景技术

[0002] 树突细胞 (DC) 是抗原呈递细胞 (APC) 之一, 存在于外周血, 皮肤, 淋巴器官, 和胸腺, 并且广泛分布于淋巴组织和非淋巴组织 (见 Steinman, R. M., Ann. Rev. Immunol. 9 : 271 (1991) ; Banchereau, J. B. and Steinman R. M., Nature 392 : 245 (1998))。树突细胞具有强的抗原呈递能力并且在树突细胞表面表达 I 和 II 类抗原肽, 其分别激活 CD4 和 CD8T 细胞。通过这种激活, 这些细胞诱导对特异性抗原 (例如, 致病微生物的抗原, 肿瘤相关抗原, 移植抗原, 等等) 的体内免疫应答。

[0003] 树突细胞中的基因改变产生大量对临床有益的效果。例如, 表达 T 细胞应答所需共刺激信号的诱导分子 (CD80, CD86, 等等) 的成熟树突细胞的产生和应用, 使得能强烈激活对抗原的获得性免疫应答 (例如, 抗病毒和肿瘤的疫苗)。或者, 可以通过使用缺乏共刺激信号诱导分子的树突细胞或使用表达抑制性刺激分子的树突细胞来诱导对抗原的免疫耐受 (例如, 对移植抗原和引起自身免疫病的抗原获得性不敏感)。已报道的这种应用的例子包括: 通过向树突细胞导入白细胞介素 (IL)-1 β 基因进行免疫刺激 (Gene Therapy 7 : 2113-2121 (2000)), 通过向树突细胞导入 Fas 配体基因去除抗原特异性 T 细胞 (J Immunol. 2000 : 164 : 161-167)。在肿瘤免疫治疗方面, 可以通过将肿瘤抗原基因导入树突细胞来诱导抗肿瘤免疫。

[0004] 非专利文件 1 : Steinman, R. M., 1991, Ann. Rev. Immunol. 9 : 271

[0005] 非专利文件 2 : Banchereau, J. B. and R. M. Steinman, 1998, Nature 392 : 245

[0006] 非专利文件 3 : Akiyama, Y. et al., 2000, Gene Therapy, 7 : 2113-2121

[0007] 非专利文件 4 : Min, W. P., 2000, J. Immunol., 164 : 161-167

[0008] 非专利文件 5 : Hsu, F. J. et al., 1996, Nat. Med. 2, 52-58

[0009] 非专利文件 6 : Nestle, F. O., et al., 1998, Nat. Med. 4, 328-332

[0010] 非专利文件 7 : Camporeale, A., et al., 2003, Cancer. Res. 63, 3688-3694

[0011] 非专利文件 8 : Bon, L. A., et al., 2003, Nat. Immunol. 4, 1009-1015

[0012] 非专利文件 9 : Xia, D. J., et al., 2002, Gene Therapy, 9, 592-601

[0013] 非专利文件 10 : Mullins, D. W. et al., 2003, J. Exp. Med. 198, 1023-1034

[0014] 非专利文件 11 : Okada, T. et al., 2003, Gene Therapy 10, 1891-1902

[0015] 非专利文件 12 : Nakahara, S. et al., 2003, Cancer Res. 63, 4112-4118

[0016] 非专利文件 13 : Teitz-Tennenbaum, S. et al., 2003, Cancer Res. 63, 8466-8475

[0017] 非专利文件 14 : Imboden, M. et al., 2001, Cancer Res. 61, 1500-1507

[0018] 非专利文件 15 : Goldszmid, R. S. et al., 2003, J. Immunol. 171, 5940-5947

[0019] 非专利文件 16 : Strome, S. E. et al., 2002, Cancer Res. 62, 1884-1889

发明内容

[0020] 本发明要解决的问题

[0021] 本发明提供用于向树突细胞导入基因的方法。本发明也提供用于制备导入了基因的树突细胞的方法。而且,本发明也提供按照本发明方法导入基因的树突细胞的应用。而且,本发明提供用本发明的方法导入基因的树突细胞。此外,本发明提供用于向树突细胞导入基因的病毒载体。本发明也提供用于激活树突细胞的方法。

[0022] 解决问题的方法

[0023] 本发明者们发现,负链 RNA 病毒载体是向树突细胞导入基因的良好载体。仅通过负链 RNA 病毒载体和树突细胞间短间接接触就可以达到足够的基因导入效率,并且在较长时间内可检测到表达。而且,只用负链 RNA 病毒载体感染就可以激活树突细胞。

[0024] 尽管希望向树突细胞导入基因可应用于各种类型的免疫治疗,但是向树突细胞转移基因的以前的技术复杂和 / 或它们的导入效率不令人满意。本发明已经证实,外源基因可以通过非常简单的步骤用负链 RNA 病毒载体导入树突细胞。用本发明的方法可以向树突细胞有效导入基因,因此预期该方法可应用于免疫治疗的树突细胞的基因改变。

[0025] 具体地,本发明涉及向树突细胞等导入基因的方法,更具体地,涉及权利要求书每一项描述的发明。权利要求书中引用相同权利要求的一或多项发明的组合也包括在权利要求书中。更具体地,本发明涉及:

[0026] 用于制备导入了基因的树突细胞的方法,其包括将负链 RNA 病毒载体与树突细胞或其前体细胞接触的步骤,

[0027] 用于制备成熟树突细胞的方法,其包括将负链 RNA 病毒载体与树突细胞或其前体细胞接触的步骤,

[0028] [1] 或 [2] 的方法,其中接触步骤包括将负链 RNA 病毒载体与未成熟树突细胞接触,

[0029] [1] 至 [3] 任何一个的方法,其中接触步骤包括将负链 RNA 病毒载体与 CD34⁺ 细胞接触,

[0030] [1] 至 [4] 任何一个的方法,进一步包括在接触步骤之前或之后有 GM-CSF 和 IL-4 存在时培养细胞的步骤,

[0031] [1] 至 [5] 任何一个的方法,其中载体包括细胞因子基因,

[0032] [6] 的方法,其中细胞因子是干扰素 β ;

[0033] [1] 至 [7] 任何一个的方法,其中负链 RNA 病毒载体是副粘病毒载体;

[0034] [8] 的方法,其中副粘病毒载体是仙台病毒载体;

[0035] [1] 至 [9] 任何一个的方法,其中细胞是人类细胞;

[0036] 用 [1] 至 [10] 任何一个方法制备的含有载体的细胞;

[0037] [11] 的细胞,其是成熟树突细胞;

[0038] 用于抑制肿瘤生长的方法,其包括向肿瘤部位给予 [11] 或 [12] 的树突细胞的步骤;和

[0039] [13] 的方法,进一步包括将肿瘤抗原与树突细胞接触和 / 或在树突细胞中表达肿瘤抗原的步骤。

[0040] 发明的效果

[0041] 树突细胞具有高的免疫诱导能力。因此,制备对于抗肿瘤、感染性疾病等的免疫治疗有用的树突细胞(DC)疫苗可以通过本发明的方法向树突细胞导入目的抗原基因或免疫激活基因。例如,为在用于肿瘤免疫治疗的树突细胞上呈递肿瘤抗原,可以使用将树突细胞与肿瘤细胞裂解物混合的方法,肽脉冲方法,向树突细胞导入肿瘤抗原基因的方法等等。在这些方法中,与肿瘤裂解物和肽脉冲方法相比,预期向树突细胞导入肿瘤抗原基因的方法能延长体内肿瘤抗原存在的持续时间,并且还具有不受HLA限制的优点(如果是肽的情况下,使用源自抗原的某肽;但是,由于需要与HLA结合,使用的肽抗原的区域根据HLA的类型而变化)。

[0042] 对于用质粒作为载体向树突细胞导入基因,脂质体方法,电穿孔等等是有效的。然而,由于导入效率低,认为这些方法是不实用的(Cancer Gene Ther 4:17-25s(1997))。实用的载体包括下列三类载体:

[0043] (i) 腺病毒载体(J. Immunotherapy 25:445-454(2002);Gene Therapy7:249-254(2000)),

[0044] (ii) 逆转录病毒载体(J. Leuko. Biol.,263-267(1999);Br. J. Haematol. 108:817-824(2000)),和

[0045] (iii) 慢病毒载体(J. Gene Med. 3:311-320(2001);J. Immunol. Meth. 153-165(2002);Mol. Ther. 283-290(2002);Cancer Gene Therapy 9:715-724(2002))。

[0046] 上述这些中,(ii)的逆转录病毒载体只可以导入生长期的细胞中。此外,这些载体需要细胞毒试剂,例如,利于载体导入的1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物(polybrene),并且这些导入消耗大量时间。因此,它们是不利的,因为它们易于导致较低的细胞存活。而且,从外周血诱导这些载体向树突细胞的导入效率更差。因此,一般地,在载体导入CD34-阳性细胞后诱导细胞向树突细胞分化。由于此方法需要用G-CSF永生化的骨髓细胞,脐带血细胞,或外周血细胞,因此对患者是非常侵害的。此外,逆转录病毒载体向树突细胞的导入不能提高树突细胞的激活状态。而且,逆转录病毒载体将病毒核酸整合到细胞基因组中,其引起对基因组破坏的关注。还有,导入效率一般是低的,因此需要通过分选等筛选载体导入的细胞。

[0047] 使用(iii)的慢病毒载体,例如逆转录病毒载体的载体导入是非常消耗时间的。这反过来可以降低细胞生存能力。慢病毒向静息细胞转移基因也是已知的。但是,一般地,由于进入后(postentry)限制,向分化至某种程度并失去增殖活性的树突细胞中导入所达到的效率是非常低的(百分之几)(J. Virol. 75:5448-5456)。而且,从外周血诱导的向树突细胞导入的效率更低。因此,只有如下方法可以使用慢病毒,在该方法中载体导入CD34阳性干细胞后在体外获得树突细胞;由于需要用G-CSF将骨髓细胞,脐带血,或外周血永生化,因此这种方法对患者的侵害很大。最近载体修饰技术企图克服这个问题,而且,目前,在SIV情况下,可以做到向外周血来源的单核细胞和分化的树突细胞转移基因,其通过在辅助构建物中保留vpx(其促进前病毒DNA的核迁移)或通过用HIV插入DNA-flap序列(其也促进前病毒DNA的核迁移)但是,这仍需要在单核细胞向树突细胞分化的早期感染病毒,并且因此,树突细胞的分化可能被插入的基因干扰。此外,供体间导入效率变化大。而且,载

体的导入不能提高树突细胞的激活状态。与上述逆转录病毒载体相似,使用慢病毒载体有破坏基因组和发生恶性肿瘤的风险,这是目前此载体实际应用的障碍。而且,由于低的导入效率,通常需要筛选或者需要高滴度载体以改善导入效率,其妨碍载体的临床应用。此外,载体需要辅助操作(例如离心)或辅助试剂(例如 1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物),以及由于复杂的导入步骤而需要较长的反应时间。载体纯化所需费用也是问题。

[0048] 同时,由于导入效率(大约 80%)和直接将基因转移入分化的树突细胞的能力,(i)的腺病毒是目前向树突细胞导入基因的优选载体。但是,导入效率是时间依赖的并且获得最大导入效率需要大约 72 小时(J. Immunotherapy 25:445-454(2002))。而且,此载体需要比负链 RNA 病毒高 10 至 100 倍的滴度。更关键的问题是在允许高的基因转移效率的 MOI 时,此载体具有免疫抑制效应,其减弱自身 T 细胞的混合淋巴细胞反应 (MLR)(特别是在高 DC:T 比例时)(Gene Therapy 2000;7:249-254)。此外,由于游离基因的稀释,在基因转移后有时很难进行将树突细胞从干细胞例如 CD34 阳性细胞区分的步骤。

[0049] 完成向树突细胞导入基因的需要包括以下几点:高的导入效率,基因导入技术稳定,方便,临床上安全,和维持树突细胞的 T 细胞激活能力。然而,目前能得到的载体没有一种能满足所有这些需要。与此相反,当使用负链 RNA 病毒载体时,非常短时间的接触导致基因转移效率接近 100%,并且自身 T 细胞应答的抑制相对微弱以保留细胞的 T 细胞刺激能力。因此,负链 RNA 病毒载体可能满足上述所有需要,认为具有在细胞质中表达蛋白能力的载体是安全的,并且既不需要向核转移也不需要基因插入基因组。上述 (i) 至 (iii) 的载体的基因转移不改变树突细胞的激活状态。相反,负链 RNA 病毒载体的基因转移诱导树突细胞激活,因此,当用于免疫刺激时(例如肿瘤免疫等等),可以将转移后用细胞因子激活的步骤等省略,其被认为有益于细胞活力的维持,减少费用,和进一步减少回体(ex vivo)操作所需的时间。这里也确认,通过使用经负链 RNA 病毒载体导入基因的树突细胞,可以在回体情况下短时间有效且容易地诱导 T 细胞转移治疗所需要的激活的 T 细胞,特别是肿瘤特异性细胞毒 T 细胞等。此外,与慢病毒载体相似,当载体基因转移进干细胞后树突细胞分化时,导入效率达到大约 70%。这些特征扩大了负链 RNA 病毒载体的临床应用范围。

附图说明

[0050] 图 1 显示从富含单核细胞的外周血中的单核细胞衍生的树突细胞的表型。选 PI 识别的活细胞,并用抗-CD11c-PE 偶联的抗体和抗 HLA-II 类 (DR, DP 和 DQ) FITC 偶联抗体观察 CD11c 和 HLA-II 类 (DR, DP 和 DQ) 的表达(左侧图)。而且,选择 CD11c 和 HLA-II 类 (DR, DP 和 DQ) 双阳性细胞,用下列抗体检测表达水平:(1) 抗-CD14-APC-偶联的抗体;(2) 抗-CD1a-APC-偶联的抗体;和 (3) 抗-CD80-生物素偶联的抗体(用链亲和素-APC 进行第二次染色),这些表达水平相对于 CD11c 的表达表示于点图(dot plot)中(右侧的三个图)。在实施例中,“II 类”表示用识别 HLA-DR, DQ 和 DP 这三者的抗体获得的结果,“HLA-DR”表示用特异性识别 HLA-DR 的抗体获得的结果。

[0051] 图 2 显示导入了 SeV-GFP 的 DC 中 GFP 和共刺激分子的表达。

[0052] 图 3 显示 SeV-GFP 向人单核细胞源树突细胞的导入效率和树突细胞的激活(感染 2 天后)。

- [0053] 图 4 显示 SeV-GFP 向人单核细胞源树突细胞的导入效率和树突细胞的激活（感染 4 天后）。
- [0054] 图 5 显示 SeV-GFP 向人单核细胞源树突细胞的导入效率和树突细胞的激活（感染 8 天后）。
- [0055] 图 6 显示 SeV-GFP 导入后 DC 计数的变化。
- [0056] 图 7 显示 SeV-GFP 导入后 GFP 表达的持续时间。
- [0057] 图 8 显示 LPS 刺激对 SeV-GFP 向人 DC 导入效率的影响。
- [0058] 图 9 显示 LPS 刺激对 SeV-GFP 向人 DC 导入效率的影响。
- [0059] 图 10 显示向 DC 导入基因所需的保温时间的检测结果。
- [0060] 图 11 显示向脐带血源 DC 导入基因。
- [0061] 图 12 显示向脐带血源 DC 导入基因。
- [0062] 图 13 显示导入基因后共刺激分子的表达（与 LPS 刺激相比）。
- [0063] 图 14 显示导入基因后共刺激分子的表达（与 LPS 刺激相比）。
- [0064] 图 15 显示导入基因后共刺激分子的表达（与 LPS 刺激相比）。
- [0065] 图 16 显示导入基因后的吞噬能力。
- [0066] 图 17 显示导入基因后的吞噬能力。
- [0067] 图 18 显示导入负链 RNA 病毒载体后单核细胞源 DC 中的细胞因子产生。
- [0068] 图 19 显示导入负链 RNA 病毒载体后树突细胞上标记蛋白的表达。
- [0069] 图 20 显示导入负链 RNA 病毒载体后树突细胞上标记蛋白的表达。
- [0070] 图 21 显示导入了 SeV-GFP 的 DC 的异 (allo)-T 细胞刺激能力。
- [0071] 图 22 描绘通过导入负链 RNA 病毒载体来体外诱导 MART-1 特异性 CTL 的结果。
- [0072] 图 23 描绘皮下注射的 B16 黑素瘤细胞的生长曲线。
- [0073] 图 24 显示 YAC-1 靶细胞的 ^{51}Cr 释放试验结果。
- [0074] 图 25 显示 TRP2 肽 +EL-4 的 ^{51}Cr 释放试验结果。
- [0075] 实施本发明的方案
- [0076] 本发明提供用于制备经负链 RNA 病毒载体导入基因的树突细胞的方法。本方法包括将携带希望导入的基因的负链 RNA 病毒载体与树突细胞或其前体细胞接触的步骤。本发明者们发现负链 RNA 病毒载体能以很高效率向树突细胞导入基因。此外,载体的导入激活树突细胞分化成成熟树突细胞而不需细胞因子刺激。所得到的成熟树突细胞保持了激活 T 细胞的能力。本方法对树突细胞呈递目的抗原,或在树突细胞中表达目的细胞因子或表达其它生理活性因子是有用的。用本方法遗传修饰的树突细胞具有强的激活免疫系统的能力,并且适合用于预防或治疗感染性疾病,癌症,和其它希望诱导免疫以起到有益效果的目的疾病。载体和树突细胞之间的接触可以在体内或体外完成,例如,在想要的生理性水溶液中,例如培养液,生理盐水,血液,血浆,血清,和体液中完成。
- [0077] 负链 RNA 病毒载体在未激活的（未成熟的）树突细胞中的导入效率明显高于在成熟的树突细胞中的导入效率。因此,优选将负链 RNA 病毒载体与未成熟树突细胞接触或将载体与含有未成熟树突细胞的细胞级分混合。这种方法也包括在本发明用于向树突细胞导入基因的方法中。树突细胞与细菌,脂多糖 (LPS),双链 RNA 等等接触被激活。当要导入基因的树突细胞单独用这种方法激活时,可以在激活后导入载体。但是,为防止载体导入效率

的降低,优选激活处理不是在载体导入之前完成而是在用负链 RNA 病毒载体导入基因之后(或在负链 RNA 病毒载体与树突细胞接触的同时)。

[0078] 通过简单技术即可达到高效率基因转移是负链 RNA 病毒载体介导的向树突细胞基因转移的重要优势。由逆转录病毒载体等介导的向树突细胞基因转移具有低效率,并且有时需要毒性试剂,例如 1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物以刺激基因转移。另一方面,通过简单的向含有树突细胞的溶液中加入载体,可以用负链 RNA 病毒载体完成出色的基因转移,而不需要任何特殊试剂。而且,负链 RNA 病毒载体介导的向树突细胞基因转移可以在极短的暴露时间(30 分钟或更短)最高效率完成。考虑到临床情况,这些特点简化回体和体内树突细胞的遗传改变,并能最小化操作带来的副作用,例如细胞活力的丧失。

[0079] 对于载体与树突细胞的接触,MOI(感染复数:每个细胞感染病毒的数量)优选在 1 至 500 的范围,更优选在 2 至 300 的范围,甚至更优选在 3 至 200 的范围,还更优选在 5 至 100,也更优选在 7 至 70 的范围。载体和树突细胞接触仅需要短时间,其可以是例如,1 分钟或更长,优选 3 分钟或更长,5 分钟或更长,10 分钟或更长,或 20 分钟或更长,例如,在大约 1 至 60 分钟的范围,更具体地在大约 5 至 30 分钟的范围。当然,接触时间可以更长,例如,几天或更长。接触可以在体内或回体完成。例如,本方法适合用于回体基因转移,将从身体离开的树突细胞或其前体细胞回体与负链 RNA 病毒载体接触,并在载体导入后回输到体内。

[0080] 本方法的特征之一是基因转移后树突细胞中导入基因的持续长期表达。按照该方法,在载体感染细胞后持续 2 天或 2 天以上,例如 3 天或 3 天以上,5 天或 5 天以上,10 天或 10 天以上,14 天或 14 天以上,30 天或 30 天以上,50 天或 50 天以上,甚至 60 天或更长时间检测到树突细胞中导入基因的表达。

[0081] 本发明也提供用于选择性向未成熟树突细胞导入基因的方法,其包括允许携带基因的负链 RNA 病毒载体与由成熟的和未成熟的树突细胞组成的细胞群共存。短语“选择性向未成熟树突细胞”意思是与成熟树突细胞相比,基因以明显高的效率被导入未成熟树突细胞。具体地,导入载体的未成熟树突细胞与总的未成熟树突细胞的比例明显高于导入载体的成熟树突细胞与总的成熟树突细胞的比例。例如,本发明提供一种方法其包括将携带目的基因的负链 RNA 病毒载体加入要转导的成熟的和未成熟的树突细胞组成的细胞群的步骤。相对于成熟树突细胞,由于负链 RNA 病毒载体优先向未成熟树突细胞转移基因,通过这种方法基因可以被选择性地导入未成熟树突细胞。这种方法也包括在本发明的用于向树突细胞导入基因的方法中。

[0082] 树突细胞(DC)是一种在成熟状态表现出树突状的形态并具有通过呈递抗原激活 T 细胞能力的细胞。树突细胞包括一群分布在身体各种器官和组织中有树突形态的骨髓来源细胞,和一群用细胞因子等体外分化骨髓或血液来源干细胞获得的细胞,其相当于分布在身体各种器官和组织中有树突形态的细胞。具体地,树突细胞包括,例如,淋巴细胞的树突细胞(包括诱导 Th2 或免疫耐受的细胞),骨髓树突细胞(通常使用的树突细胞,包括未成熟的和成熟的树突细胞),朗格罕氏细胞(作为重要的皮肤抗原呈递细胞的树突细胞),指状突细胞(分布在淋巴结和脾脏 T 细胞区,被认为有向 T 细胞抗原呈递的功能),和滤泡树突细胞(作为重要的 B 细胞的抗原呈递细胞;该细胞向 B 细胞呈递抗原,其通过抗体受体或补体受体在表面呈递抗原-抗体复合物或抗原-补体复合物)。优选地,树突细胞高表达 I 类和 II 类 MHC,并且更优选表达 CD11a。

[0083] 树突细胞也可以是有树突形态并且是下列两种或多种表面标志阳性的细胞：CD11c, HLA-II 类 (HLA-DR, -DP 或 -DQ), CD40 和 CD1a。本发明的树突细胞更优选是 HLA-II⁺ 和 CD11c⁺ 细胞, 甚至更优选地, CD1a⁺、HLA-II⁺ 和 CD11c⁺ 细胞, 其不表达 T 细胞标志 (CD3)、B 细胞标志 (CD19, CD20)、NK 细胞标志 (CD56)、中性粒细胞标志 (CD15) 和单核细胞标志 (CD14)。在用于载体导入的树突细胞群中 CD14⁺ 细胞比例是, 例如 10% 或更低, 优选 5% 或更低, 并更优选 1% 或更低。

[0084] 此外, 本发明的树突细胞包括成熟的和未成熟的树突细胞。未成熟的树突细胞指有低的 T 细胞激活能力的树突细胞。具体地, 与通过加入 LPS (1 μ g/ml) 并培养 2 天诱导成熟的树突细胞相比, 未成熟的树突细胞可能具有低于 1/2 的抗原呈递能力, 优选低于 1/4。可以测定抗原呈递能力, 例如, 通过激活自身反应性 T 细胞能力 (例如, 混合淋巴细胞试验: 将自身反应性 T 细胞和树突细胞以 T 细胞: 树突细胞为 1: 10 比例混合培养, 或优选地以各种比例; 在终止培养前 8 小时加入 ³H- 胸腺嘧啶, 并以掺入 T 细胞 DNA 中的 ³H- 胸腺嘧啶的量为基础测定 T 细胞生长能力。如图 21, GeneTherapy 2000; 7; 249-254) 或者通过用肽诱导特异性细胞毒 T 细胞 (CTLs) 的能力 (例如, 将已知的某种抗原的 I 类-限制性肽加入树突细胞; 将树突细胞与从提供该树突细胞的同一健康供体外周血中得到的 T 细胞共培养, (给予 25U/ml 或优选 100U/ml 的 IL-12 的第 3 天或以后) (优选地在 2-1 天里用树突细胞刺激三次, 更优选在 14 天里刺激两次); 将所得到的效应细胞与 ⁵¹Cr- 标记的靶细胞 (I 类-限制性肽阳性肿瘤细胞) 以下列比例共培养四小时: 20: 1, 10: 1, 5: 1, 或 2.5: 1, 优选 100: 1, 50: 1, 25: 1, 或 12.5: 1, 并定量从细胞释放的 ⁵¹Cr。如图 22; Arch Dermatol Res 292: 325-332 (2000))。而且未成熟树突细胞优选具有吞噬抗原的能力, 并且更优选诱导 T 细胞激活的共刺激受体表达低 (例如, 明显低于上述 LPS 诱导的成熟 DC) 或阴性。另一方面, 成熟树突细胞指具有对 T 细胞激活等等具有强的抗原呈递能力的树突细胞。具体地, 与加入 LPS (1 μ g/ml) 并培养两天而诱导成熟的树突细胞的抗原呈递能力相比, 成熟树突细胞可以具有其一半或更强的抗原呈递能力, 优选具有相当的或更强的抗原呈递能力。而且, 成熟树突细胞优选具有弱的或无抗原吞噬能力, 并更优选表现诱导 T 细胞激活共刺激的受体高表达。树突细胞的激活指从未成熟到成熟树突细胞的转变, 并且激活的树突细胞包括成熟树突细胞和在转变过程中的树突细胞, 其中受激活刺激, 诱导共刺激信号的 CD80 和 CD86 的表达升高。在 CD11c 阳性树突细胞中, CD83 阳性作为成熟树突细胞的标志。

[0085] 例如, 成熟树突细胞可以优选是 CD40, CD80, CD86 和 HLA-II 类的表达强阳性的细胞。更优选地, 成熟树突细胞表达 CD83。可以将未成熟树突细胞与成熟树突细胞区分, 例如使用选自 CD80, CD83, 和 CD86 的标志。未成熟树突细胞的这些标志弱阳性, 优选阴性, 而成熟树突细胞是阳性。

[0086] 如上所述, 未成熟树突细胞通常具有高的吞噬能力。当向树突细胞加入 LPS (1 μ g/ml) 并培养两天时, 它们变为激活的并且其吞噬能力降低。吞噬能力的测定可以通过测定树突细胞中摄取的小分子的量或摄取的细胞比例。优选使用树突细胞中摄取的小分子的量判定吞噬能力。例如, 使用大小约 1 μ m 的有色珠, 可以测定树突细胞中摄取的珠子。通过减去 4°C 时阳性背景进行定量。高的吞噬能力表示一种能力, 其中与上述用 LPS (1 μ g/ml) 刺激两天的树突细胞的摄取相比, 树突细胞中摄取的小分子的量为之 4 倍或以上, 更优选 5 倍或以上, 甚至更优选 6 倍或以上。或者, 摄取小分子的细胞比例为之 2 倍或以上, 并且更优选

3 倍或以上。低吞噬能力表示与 LPS (1 μ g/ml) 刺激两天的树突细胞的摄取相比, 摄入树突细胞中小分子的量低于其 4 倍, 更优选低于 2 倍, 并且更优选低于 1.5 倍。或者, 当检测摄入小分子的细胞比例时, 该比例低于 2 倍, 更优选低于 1.5 倍。

[0087] 成熟树突细胞的辨别是本领域技术人员常规进行的, 并且上述各个标志和测定其表达的方法也是本领域技术人员熟知的。例如, CD11c 是大约 150 kD (p150, 整合素 α 链) 的粘附糖蛋白。CD11c 与 CD18 结合形成 CD11c/CD18 复合物, 其能结合于纤维蛋白原并且已经报道起到 iC3b 和 ICAM-1 受体的功能。此外, 已经报道 CD11c/CD18 可以起到粘附分子的功能, 其结合于受刺激的上皮细胞的受体 (Knapp, W. et al., eds., 1989, *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Barclay, N. A. et al., eds., 1993, *The Leucocyte Antigen Facts Book*, CD11 Section, Academic Press Inc., San Diego, California, p. 124; Stacker S. A. and T. A. Springer, 1991, *J. Immunol.* 146 :648)。

[0088] CD1a 是大约 49 kD 的结合于 β 2 微球蛋白的多肽。CD1a 结构与 MHC I 类抗原相似并推测其在抗原呈递中起作用 (Knapp, W. et al., eds., 1989, *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Hanau, D. et al., 1990, *J. Investigative Dermatol.* 95 :503; Calabi, F. and A. Bradbury., 1991, *Tissue Antigens* 37 :1)。

[0089] CD14 是表达在树突网状细胞 (dendritic reticulum cell) 和某些类型朗格罕氏细胞上的糖基磷脂酰肌醇 (GPI)- 锚定的 53 到 55kD 单链糖蛋白。鉴定 CD14 是对 LPS 和血清 LPS- 结合蛋白 (LPB) 复合物有高度亲和力的表面受体 (McMichael, A. J. et al., eds., 1987, *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Knapp, W. et al., eds., 1989, *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Wright, S. D. et al., 1990, *Science* 249 :1434)。

[0090] CD40 是 45 到 48kD 的 I 类整合膜蛋白 (I 类整合膜糖蛋白)。CD40 经常被用作细胞标志 (Schlossman, S. et al., eds., 1995, *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Galy, A. H. M. ; and H. Spits, 1992, *J. Immunol.* 149 :775; Clark, E. A. and J. A. Ledbetter, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 :4494; Itoh, H. et al., 1991, *Cell* 66 :233; Barclay, N. A. et al., 1993, *The Leucocyte Antigen Facts Book*, Academic Press)。

[0091] CD80 是大约 60kD 的跨膜糖蛋白, 并且是 Ig 超基因家族的一个成员。CD80 是表达在 T 细胞上的 CD28 和 CD152 (CTLA-4) 的配体 (Schlossman, S. et al., eds., 1995, *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, Oxford University Press, New York; Schwartz, R. H., 1992, *Cell* 71 :1065; Azuma, M. et al., 1993, *J. Exp. Med.* 177 :845; Koulova, L. et al., 1991, *J. Exp. Med.* 173 :759; Freeman, G. J. et al., 1998, *J. Immunol.* 161 :2708; Behrens, L. et al., 1998, *J. Immunol.*, 161 (11) :5943; Guesdon, J. -L. et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.* 27 :1131-1139)。

[0092] CD83 是大约 45kD 的跨膜蛋白,并且是 Ig 超家族的一个成员。CD83 具有短的 V- 型 Ig 细胞外结构域和 C- 末端细胞质尾。CD83 主要表达在滤泡树突细胞,循环树突细胞,淋巴组织中指状树突细胞,体外制备的树突细胞,和胸腺的树突细胞上 (Zhou, L.-J., and T. F. Tedder, 1995, *J. Immunol.* 154: 3821; Zhou, L.-J. et al., 1992, *J. Immunol.* 149: 735; Summers, K. L. et al., 1995, *Clin Exp. Immunol.* 100: 81; Weissman, D. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 92: 826; Hart, D. N. J., 1997, *Blood* 90: 3245)。

[0093] CD86 (B70/B7-2) 是大约 75kD 的细胞表面蛋白,其是 CD28 和 CTLA-4 的第二配体,并且在早期免疫应答 T 细胞的共刺激中起重要作用 (Azuma M. et al., 1993, *Nature* 366: 76; Nozawa Y. et al., 1993, *J. Pathology* 169: 309; Engle, P. et al. 1994., *Blood* 84: 1402; Engel, P. et al., CD86 Workshop Report. In: *Leukocyte Typing V.* Schlossman, S. F. et al. eds., 1994, Oxford University Press; Yang, X. F. et al., 1994, Upregulation of CD86 antigen on TPA stimulated U937 cells, 1994, (abstract). American Society of Hematology, Nashville, TN; Guesdon, J. -L. et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1131-1139)。

[0094] CCR7 也叫做 BLR-2, EBI-1, 和 CMKBR7, 其是七跨膜 G 蛋白 - 偶联受体, 并且是 CC 趋化因子 MIP-3 β /Exodus 3/ELC/CCL19 和 6CKine/Exodus2/SLC/TCA4/CCL21 的受体 (Sallusto, F. et al., 1999, *Nature* 401: 708-12; Lipp, M. et al., 2000, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 251: 173-9; Birkenbach, M. et al., 1993, *J. Virol.* 67: 2209-20; Schweickart, V. L. et al., 1994, *Genomics* 23: 643-50; Burgstahler, R. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 737-43; Yoshida, R. et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 13803-9; Yoshida, R. et al., 1998, *J. Biol. Chem.* 273: 7118-22; Yoshida, R. et al., 1998, *Int. Immunol.* 10: 901-10; Kim, C. H. et al., 1998, *J. Immunol.* 161: 2580-5; Yanagihara, S. et al., 1998, *J. Immunol.* 161: 3096-102)。

[0095] DR, DP 和 DQ 作为 HLA-II 类抗原存在,并且使用结合这三个抗原的抗体能将其共同检测出来 (Pawelec, G. et al., 1985, *Human Immunology* 12: 165; Ziegler, A. et al., 1986, *Immunobiol.* 171: 77)。HLA-DR 是人 MHC II 类抗原之一,其是由 α 链 (36kDa) 和 β 亚基 (27kDa) 组成的跨膜糖蛋白。在表皮的朗格罕氏细胞中,该蛋白与 CD1a 抗原共表达。CD1a 在抗原呈递的细胞间相互作用中起重要作用 (Barclay, N. A. et al., 1993, *The Leukocyte Antigen Facts Book.* p. 376. Academic Press)。

[0096] 使用上述标志基因的同源基因产物作为指示剂,也可以指定非人类哺乳动物的树突细胞。这些标志物的抗体是可商业获得的,例如,从 BDBiosciences (BD Pharmingen), 并且详细的信息可以在公司或其分销商的网站上获得。

[0097] 对于树突细胞标志,也参见 Kiertscher 等和 Oehler 的参考文献 (Kiertscher SM, Roth MD, Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4, *J. Leukoc. Biol.*, 1996, 59(2): 208-18; Oehler, L. et al., Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics., *J. Exp. Med.*, 1998, 187(7): 1019-28)。关于流式细胞术的进一步描述参见 Okano 等和 Stites 等的参考文献 (Okano, S. et al., Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes.

Gene Ther., 2003, 10 (16) :1381-91 ;Stites, D. et al., Flowcytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence., Clin. Immunol. Immunopathol., 1986, 38 :161-177)。可以判定每种标志的表达,例如当用同型对照抗体染色时,使用 1%或更低阳性率作为荧光强度阈值,其中荧光相当于或强于阈值的被认为是阳性,荧光低于阈值的认为是阴性。

[0098] 可以按照或以已知方法为基础制备树突细胞或其前体细胞。例如,可以从血液(例如外周血或脐带血),骨髓,淋巴结,其它淋巴器官,脾脏和皮肤中分离细胞。优选从血液或骨髓获得本发明使用的树突细胞。或者,本发明中使用的树突细胞可以是皮肤朗格罕氏细胞,输入淋巴系统的面纱细胞(veiled cell),滤泡树突细胞,脾脏树突细胞,和淋巴器官的并指状树突细胞(interdigitating cell)。用于本发明的树突细胞包括选自下列的树突细胞:CD34⁺来源的树突细胞,骨髓-来源的树突细胞,单核细胞-来源的树突细胞,脾细胞-来源的树突细胞,皮肤-来源的树突细胞,滤泡树突细胞和生发中心树突细胞。可以从脐带血,骨髓等获得的造血干细胞,造血祖细胞等分化出 CD34⁺源树突细胞,其中所述分化使用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-4、IL-13、干细胞因子(SCF)、Flt-3 配体、c-kit 配体、它们的联合等来进行。例如,使用 GM-CSF 和 IL-4 可以将外周血单核细胞分化成未成熟树突细胞,然后使用 TNF- α 刺激分化成成熟树突细胞。

[0099] 当树突细胞选自(或富集于)包括树突细胞和其它细胞的组合物时,优选进行所谓的阴性选择,其去除非树突细胞的细胞。通过阴性选择步骤,DC-粒细胞的前体(J. Exp. Med., 1998, 187 :1019-1028 ;Blood, 1996, 87 :4520-4530)保留,因此认为不仅从粘附的 CD14⁺细胞分化的 DC 而且从前体分化的 DC 可以一起被回收。希望这降低载体导入所致的细胞毒。

[0100] 例如,通过使用对其特异性抗体去除 T 细胞, NK 细胞, B 细胞等等,可以富集树突细胞。具体地,例如,优选获得低表达或不表达下列表面标志的细胞:CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, 和 CD66b,或它们任何的联合。更优选的是 CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, 和 CD66b 的表达都低或都阴性的细胞。因此,优选使用抗这些标志的抗体去除表达这些标志的细胞(Hsu et al., Nature Med. 2 :52 (1996))。可以如实施例所示使用多价抗体进行阴性选择。或者,也可以使用磁性细胞分离(MACS)的珠子等等进行相似的选择。对于大量的细胞制备,例如通过血液细胞分离等等收集单核细胞,使用珠子是优选的。例如从单核细胞阴性选择制备的树突细胞优选用于本发明,其中所述单核细胞是从身体获得的细胞溶液中富集的。

[0101] 当在负链 RNA 病毒导入前,对从粘附细胞获得的外周血单核细胞分化来的树突细胞进行选择时,有时会降低载体导入效率。为防止未成熟树突细胞比例的降低,在与负链 RNA 病毒载体接触前,细胞培养优选无筛选粘附于固相支持物(例如培养容器如培养皿或培养瓶)的细胞的步骤;但是,用于本发明的树突细胞不限于此。具体地,本发明提供一种方法,其除外在树突细胞与负链 RNA 病毒载体接触前 24 小时内筛选粘附于固相支持物细胞的步骤。更优选地,所述方法除外在树突细胞与负链 RNA 病毒载体接触前 2, 3, 5, 或 7 天内筛选粘附于固相支持物细胞的步骤。

[0102] 所述方法优选除外在与负链 RNA 病毒载体接触前筛选 CD14⁺细胞的步骤,但是不限于此。特别地,本发明提供一种方法,其除外在树突细胞与负链 RNA 病毒载体接触前 24

小时内筛选 CD14⁺ 细胞的步骤。更优选地,所述方法除外在树突细胞与负链 RNA 病毒载体接触前 2,3,5,或 7 天内筛选 CD14⁺ 细胞的步骤。

[0103] 分离树突细胞的具体方法描述于,例如 Cameron et al., Science 257:383(1992);Langhoff et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7998(1991);Chehimi et al., J.Gen.Virol.74:1277(1993);Cameron et al.,Clin.Exp.Immunol.88:226(1992);Thomas et al.,1993, J.Immunol.150:821(1993);和 Karhumaki et al.,Clin.Exp.Immunol.91:482(1993)。用流式细胞术的树突细胞分离描述于,例如 Thomas et al., J.Immunol.153:4016(1994);Ferbass et al., J.Immunol.152:4649(1994);和 O'Doherty et al., Immunology 82:487(1994)。此外,磁性细胞分离描述于,例如 Miltenyi et al.,Cytometry 11:231-238(1990)。

[0104] 而且,例如,可以用下列描述的方法分离和培养人树突细胞:Macatonia et al., Immunol.74:399-406(1991);O'Doherty et al., J.Exp.Med.178:1067-1078(1993);Markowicz et al., J.Clin.Invest.85:955-961(1990);Romani et al., J.Exp.Med.180:83-93(1994);Sallusto et al., J.Exp.Med.179:1109-1118(1994);Berhard et al., J.Exp.Med.179:1099-1104(1995);等等。而且,可以从骨髓,脐带血,外周血等等获得的 CD34⁺ 细胞形成树突细胞,和按 Van Tendeloo et al., Gene Ther.5:700-707(1998)描述的方法从外周血来源的单个核细胞形成树突细胞。

[0105] 在本发明中,优选将负链 RNA 病毒载体与含有高密度树突细胞或其前体细胞(例如,CD11c⁺ 细胞或 CD34⁺ 细胞)的细胞级分混合。前体细胞指在存在合适的细胞因子时(具体地,G-CSF,GM-CSF,TNF- α , IL-4, IL-13, SCF, Flt-3 配体,或 c-kit 配体,或它们的联合)能分化成树突细胞的细胞。优选在 4 周内将前体细胞分化成树突细胞,更优选在 20 天内,甚至更优选在 18 天内,还更优选在 16 天内。这样的细胞包括 CD34⁺ 干细胞。可以这样完成向树突细胞的分化,例如,通过在存在 SCF(50ng/ml), GM-CSF(500U/ml),和 TNF- α (50ng/ml) 时培养细胞大约 3 天,然后在存在 SCF(50ng/ml), GM-CSF(500U/ml), IL-4(250U/ml),和 TNF- α (50ng/ml) 情况下培养。细胞级分指通过细胞分选(或细胞分离)获得的细胞群。细胞级分也可以是包括细胞和可药用载体的组合物。载体实际例子包括可以用来悬浮活细胞的目的溶液,例如生理盐水,磷酸盐缓冲的盐水(PBS),培养基,和血清。按照本方法,与载体接触的细胞级分包括树突细胞和/或其前体细胞,其以占总活细胞的比例,例如,30%或以上,优选 40%或以上,优选 50%或以上,优选 60%或以上,且优选 70%或以上。

[0106] 而且,与负链 RNA 病毒载体接触的树突细胞优选包括未成熟树突细胞。在包括将与载体混合的树突细胞的细胞级分中,未成熟树突细胞占总活细胞的比例是,例如,10%或以上,优选 20%或以上,更优选 30%或以上,更优选 40%或以上,更优选 50%或以上,更优选 60%或以上,并且更优选 70%或以上。

[0107] 使用负链 RNA 病毒的本发明的方法具有多种优势。例如,用负链 RNA 病毒,可以单独经载体感染就可以获得激活的树突细胞,并且可以省略获得成熟树突细胞的随后步骤。由于树突细胞必需被激活才能用于免疫刺激中,所以只用载体感染就达到激活是有优势的。而且,利用此特性,可以在体外短时间内诱导 T 细胞转移治疗所必需的激活的 T 细胞,特别是细胞毒 T 细胞等等。使用未经负链 RNA 病毒导入的树突细胞不能诱导 CTL。按照以前报道的其它载体的特征,体外仅通过这些其它载体的基因转移对诱导 CTL 是困难的。因

此,负链 RNA 病毒载体具有仅通过转导就能激活 T 细胞(诱导 CTL)的优点(如图 22)。此外,负链 RNA 病毒载体因为拥有以下全部特征而优于其它载体:高的导入效率,基因转移的稳定性,方便,安全,和维持树突细胞激活 T 细胞的能力。

[0108] 而且,负链 RNA 病毒载体对于基因转移入树突细胞后干细胞的分化也是有用的。当在负链 RNA 病毒载体导入干细胞后诱导树突细胞分化时,基因转移效率达到接近 70%。这个效率同等于修饰的逆转录病毒和慢病毒载体的效率。由于导入后游离基因稀释使表达水平降低,所以向干细胞导入腺病毒载体是困难的。可以将负链 RNA 病毒载体应用于如下两种方法,在载体导入干细胞后进行树突细胞分化,和将基因导入已经从外周血单个核细胞分化来的树突细胞中。

[0109] 此外,当将 MOI 设置得高时(例如,10 或更高,优选 20 或更高,更优选 30 或更高,例如,40 或更高,或 50 或更高),可以将负链 RNA 病毒载体以导入效率近乎 100%地稳定导入细胞,而没有任何明显的细胞毒性影响。而且,由于负链 RNA 病毒不将基因整合入宿主基因组中,因此具有低肿瘤发生风险。

[0110] 这里,负链 RNA 病毒载体指包括负链(对应于编码病毒蛋白的正义链的反义链)RNA 作为基因组的病毒。负链 RNA 也称作 negative strand RNA。用于本发明的负链 RNA 病毒特别包括单股负链 RNA 病毒(也称作非节段负链 RNA 病毒)。“单股负链 RNA 病毒”指具有单股负链(即,负链)RNA 作为基因组的病毒。负链 RNA 病毒包括属于下列病毒科的病毒:副粘病毒科(Paramyxoviridae)(包括副粘病毒属(Paramyxovirus),麻疹病毒属(Morbillivirus),腮腺炎病毒属(Rubulavirus),和肺炎病毒属(Pneumovirus)),弹状病毒科(Rhabdoviridae)(包括水泡性病毒属(Vesiculovirus),狂犬病病毒属(Lyssavirus),和短暂热病毒属(Ephemerovirus)),纤丝病毒科(Filoviridae),正粘病毒科(Orthomyxoviridae),(包括流感病毒 A, B, 和 C, 和索戈托样病毒(Thogoto-like virus)),布尼病毒科(Bunyaviridae)(包括布尼亚病毒属(Bunyavirus),汉坦病毒属(Hantavirus),内罗病毒属(Nairovirus),和白蛉病毒属(Phlebovirus)),沙粒病毒科(Arenaviridae),等等。

[0111] 此外,负链 RNA 病毒载体是以负链 RNA 病毒为基础的具有感染力的病毒颗粒,可作为载体向细胞导入基因。这里,“感染力”指负链 RNA 病毒载体保持粘附细胞能力、并将载体所携的基因导入该载体所粘附的细胞的能力。在优选实施方案中,本发明的负链 RNA 病毒载体具有掺入其基因组 RNA 中的要表达的外源基因。本发明的副粘病毒载体可以具有传播能力,也可以是不具有传播能力的缺陷载体。“具有传播能力”是指病毒在感染了该病毒载体的宿主细胞中复制并产生感染性病毒颗粒的能力。

[0112] “重组病毒”指由重组多核苷酸或其扩增产物产生的病毒。“重组多核苷酸”指一种多核苷酸,其中的核苷酸在一端或两端不以自然状态连接。具体地,重组多核苷酸是一种多核苷酸,其多核苷酸链的连接已经过人工修饰(裂解和/或连接)。重组多核苷酸可以用公知的重组技术,通过联合使用多核苷酸合成、核酸酶、连接酶处理等方法来制备。重组病毒可以如下产生:通过基因操作构建编码病毒基因组的多核苷酸,使该多核苷酸表达,并重建该病毒。例如,从编码病毒基因组的 cDNA 重建该病毒的方法是已知的(Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624(1999))。

[0113] 在本发明中,“基因”指遗传物质,是在其正义链或反义链中具有可以被转录的序

列的核酸。基因可以是 RNA 或 DNA。在本发明中,将编码蛋白的核酸称作该蛋白的基因。基因也可以不编码蛋白。例如,基因可以编码编码功能性 RNA,例如核酶或反义 RNA。基因可以是天然产生的或人工设计的序列。在本发明中,“DNA”包括单链和双链 DNA。“编码蛋白”表示,多核苷酸在其正义链或反义链中包括编码该蛋白的氨基酸序列的 ORF,从而可以在合适条件下表达该蛋白。

[0114] 用于本发明的负链 RNA 病毒优选包括,例如,副粘病毒科 (Paramyxoviridae) 的仙台病毒 (Sendai virus)、新城疫病毒 (Newcastle diseaseVirus)、腮腺炎病毒 (Mumps virus)、麻疹病毒 (Measles virus)、呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus, RS 病毒)、牛瘟病毒 (rinderpest virus)、温热病毒 (distemper virus)、猴副流感病毒 (SV5) 和人副流感病毒的 I、II 和 III 型等;正粘病毒科的流感病毒;弹状病毒科的水泡性口炎病毒和狂犬病病毒。

[0115] 可用于本发明的病毒的其它例子包括选自下列的病毒:仙台病毒 (SeV),人副流感病毒 -1 (HPIV-1),人副流感病毒 -3 (HPIV-3),猪瘟病毒 (phocinedistemper virus, PDV),犬瘟病毒 (canine distemper virus, CDV),海豚瘟热病毒 (dolphin molbillivirus, DMV),小反刍兽疫病毒 (peste-des-petits-ruminantsvirus, PDPR),麻疹病毒 (MV),牛瘟病毒 (RPV),亨德拉病毒 (Hendra),立百病毒 (Nipah),人副流感病毒 -2 (HPIV-2),猴副流感病毒 5 (SV5),人副流感病毒 -4a (HPIV-4a),人副流感病毒 -4b (HPIV-4b),腮腺炎病毒 (MUmps),和新城疫病毒 (NDV)。更优选的例子是选自下列的病毒:仙台病毒 (SeV),人副流感病毒 -1 (HPIV-1),人副流感病毒 -3 (HPIV-3),猪瘟病毒 (PDV),犬瘟病毒 (CDV),海豚瘟热 (DMV),小反刍兽疫病毒 (PDPR),麻疹病毒 (MV),牛瘟病毒 (RPV),亨德拉病毒 (Hendra),和立百病毒 (Nipah)。

[0116] 本发明优选的病毒包括那些属于副粘病毒科 (Paramyxoviridae) (包括呼吸道病毒属 (Respirovirus),腮腺炎病毒属 (Rubulavirus),和麻疹病毒属 (Morbillivirus)) 的病毒或其衍生物,更优选呼吸道病毒属 (也称副粘病毒属 (Paramyxovirus)) 的病毒或其衍生物。所述衍生物包括经过了遗传修饰或化学修饰、但未损害它们的基因导入能力的病毒。可用于本发明的呼吸道病毒属的病毒例子是人副流感病毒 -1 (HPIV-1),人副流感病毒 -3 (HPIV-3),牛副流感病毒 -3 (BPIV-3),仙台病毒 (也称为鼠副流感病毒 -1),和猴副流感病毒 -10 (SPIV-10)。本发明中更优选的副粘病毒是仙台病毒。这些病毒可以源自天然株,野生株,突变株,实验室传代株,人工构建株,等等。

[0117] 负链 RNA 病毒载体中携带的基因按照反义方向被置于基因组 RNA 中。基因组 RNA 是指,能与负链 RNA 病毒的病毒蛋白形成核糖核蛋白 (RNP) 的 RNA。基因组中所含基因被 RNP 表达,基因组 RNA 被复制,形成子代 RNP。通常,在负链 RNA 病毒的基因组中,病毒基因按照反义方向位于 3' - 前导区和 5' - 尾随区之间。在各个基因的 ORF 之间存在转录终止序列 (E 序列) - 间插序列 (I 序列) - 转录起始序列 (S 序列),其允许编码每个 ORF 的 RNA 作为独立的顺反子被转录。

[0118] 编码负链 RNA 病毒的病毒蛋白的基因包括 NP、P、M、F、HN 和 L 基因。“NP、P、M、F、HN 和 L 基因”分别指编码核衣壳蛋白、磷蛋白、基质蛋白、融合蛋白、血凝素 - 神经氨酸酶蛋白和大分子蛋白的基因。副粘病毒亚科中每种病毒的基因通常表示如下,NP 基因通常也描述为“N 基因”。

[0119]	呼吸道病毒属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
[0120]	腮腺炎病毒属	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
[0121]	麻疹病毒属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

[0122] 例如, 仙台病毒每种基因的核苷酸序列的数据库登录号是: 对于 NP 基因为 M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, 和 X17218 ; 对于 P 基因为 M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, 和 X17008 ; 对于 M 基因为 D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, 和 X53056 ; 对于 F 基因为 D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, 和 X02131 ; 对于 HN 基因为 D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, 和 X56131 ; 对于 L 基因为 D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, 和 X58886。其它病毒编码的病毒基因的例子是: 对于 N 基因: CDV, AF014953 ; DMV, X75961 ; HPIV-1, D01070 ; HPIV-2, M55320 ; HPIV-3, D10025 ; Mapuera, X85128 ; Mumps, D86172 ; MV, K01711 ; NDV, AF064091 ; PDPR, X74443 ; PDV, X75717 ; RPV, X68311 ; SeV, X00087 ; SV5, M81442 ; 和 Tupaia, AF079780 ; 对于 P 基因: CDV, X51869 ; DMV, Z47758 ; HPIV-1, M74081 ; HPIV-3, X04721 ; HPIV-4a, M55975 ; HPIV-4b, M55976 ; Mumps, D86173 ; MV, M89920 ; NDV, M20302 ; PDV, X75960 ; RPV, X68311 ; SeV, M30202 ; SV5, AF052755 ; 和 Tupaia, AF079780 ; 对于 C 基因: CDV, AF014953 ; DMV, Z47758 ; HPIV-1, M74081 ; HPIV-3, D00047 ; MV, AB016162 ; RPV, X68311 ; SeV, AB005796 ; 和 Tupaia, AF079780 ; 对于 M 基因: CDV, M12669 ; DMV, Z30087 ; HPIV-1, S38067 ; HPIV-2, M62734 ; HPIV-3, D00130 ; HPIV-4a, D10241 ; HPIV-4b, D10242 ; Mumps, D86171 ; MV, AB012948 ; NDV, AF089819 ; PDPR, Z47977 ; PDV, X75717 ; RPV, M34018 ; SeV, U31956 ; 和 SV5, M32248 ; 对于 F 基因: CDV, M21849 ; DMV, AJ224704 ; HPN-1, M22347 ; HPIV-2, M60182 ; HPIV-3, X05303 ; HPIV-4a, D49821 ; HPIV-4b, D49822 ; Mumps, D86169 ; MV, AB003178 ; NDV, AF048763 ; PDPR, Z37017 ; PDV, AJ224706 ; RPV, M21514 ; SeV, D17334 ; 和 SV5, AB021962 ; 对于 HN(H 或 G) 基因: CDV, AF112189 ; DMV, AJ224705 ; HPIV-1, U709498 ; HPIV-2, D000865 ; HPIV-3, AB012132 ; HPIV-4A, M34033 ; HPIV-4B, AB006954 ; Mumps, X99040 ; MV, K01711 ; NDV, AF204872 ; PDPR, Z81358 ; PDV, Z36979 ; RPV, AF132934 ; SeV, U06433 ; 和 SV-5, S76876。但是, 每种病毒已知有多个病毒株, 由于病毒株的差异, 存在一些含有除上述序列以外的序列的基因。

[0123] 编码这些病毒蛋白的 ORF 以及外源基因的 ORF 借助上述 E-I-S 序列而按照反义方向排列在基因组 RNA 中。离基因组 RNA 3' - 末端最近的 ORF 只需要在 3' - 前导区与该 ORF 之间有 S 序列, 但不需要 E 或 I 序列。而离基因组 RNA 5' - 末端最近的 ORF 只需要在 5' - 尾随区与该 ORF 之间一 E 序列, 但不需要 I 或 S 序列。而且, 两个 ORF 可以作为单个顺反子被转录, 例如, 可以利用内部核糖体进入位点 (IRES) 序列来实现这一点。在这种情况下, 这两个 ORF 之间不需要 E-I-S 序列。例如, 在野生型副粘病毒中, 典型的 RNA 基因组包括 3' 前导序列, 以反义方向依次编码 N, P, M, F, HN 和 L 蛋白的六个 ORF, 在另一端是 5' 尾随区。对本发明基因组 RNA 中病毒基因的取向没有限制, 但与野生型病毒相似, 优选将编码 N, P, M, F, HN 和 L 蛋白的 ORF 按此顺序排列在 3' - 前导区之后且在 5' - 尾区之前。某种类型的病毒具有不同的病毒基因, 但甚至在这种情况下, 优选将每一基因如上述按照在野生型中的顺序排列。通常, 在细胞中, 保留了 N, P 和 L 基因的载体可以从 RNA 基因组自主表达。而且, 通过 F 和 HN(编码包膜蛋白) 及 M 等基因的作用, 可形成感染性病毒颗粒并将其

释放到细胞外侧。因此,这类载体成为具有传播能力的病毒载体。可以将需要导入树突细胞的外源基因插入该基因组的蛋白非编码区,如下述。

[0124] 本发明的负链 RNA 病毒载体还可以缺陷野生型病毒的任何基因。例如,在本发明中可以优选使用不含 M, F 和 / 或 HN 基因的病毒载体。这种病毒载体可通过,例如,外源供给这些缺陷基因的产物来重建。与野生型病毒相似,如此制备的病毒载体粘附于宿主细胞并引起细胞融合,但它们不能形成具有与起始载体同样的感染力的子代病毒颗粒,因为导入细胞的载体基因组在病毒基因中有缺陷。因此,这种载体可以用作仅一次性导入基因的安全的病毒载体。基因组中可以缺陷的基因的例子是 F 基因和 / 或 HN 基因。例如,可以用表达 F 基因缺陷型重组负链 RNA 病毒载体基因组的质粒、表达 F 蛋白的载体以及表达 NP, P 和 L 蛋白的表达载体一起转染宿主细胞,重建病毒载体 (W000/70055 和 W000/70070 ;Li, H. -O. et al., J. Virol. 74(14)6564-6569(2000))。也可以使用已经在其染色体中掺入了 F 基因的那些宿主细胞产生病毒。在这些蛋白中,氨基酸序列不需要与病毒序列相同,可以使用突变基因或来自另一种病毒的同源基因作为替代物,只要核酸导入活性与天然类型相比相同或更强。

[0125] 进一步,可以制备包括除载体基因组来源的病毒包膜蛋白以外的包膜蛋白的载体,作为本发明使用的病毒载体。例如,当重建病毒时,可以通过表达除了该基础病毒基因组编码的包膜蛋白以外的包膜蛋白,产生保护所需包膜蛋白的病毒载体。对这样的蛋白没有特别限制。可以使用赋予细胞感染能力的所需蛋白。这样的蛋白的例子包括其它病毒的包膜蛋白,例如,水泡性口炎病毒的 G 蛋白 (VSV-G)。VSV-G 蛋白可以源自任意 VSV 株。例如,可以使用源自 Indiana 血清型病毒株株的 VSV-G 蛋白 (J. Virology 39 :519-528(1981)),但是本发明不限于此。而且,本发明的载体可以包括其它病毒来源的包膜蛋白的任意组合。这样的蛋白的优选例子是感染人细胞的病毒的包膜蛋白。对这种蛋白没有特别限制,可包括兼嗜性逆转录病毒包膜蛋白等。作为兼嗜性逆转录病毒包膜蛋白,可以用例如来自小鼠白血病病毒 (MuLV) 4070A 株的包膜蛋白,也可以用来自 MuMLV 10A1 株的包膜蛋白 (例如 pCL-10A1 (Imgenex) (Naviaux, R. K. et. al., J. Virol. 70 :5701-5705(1996)))。另外,还包括来自疱疹病毒科 (Herpesviridae) 的蛋白,例如单纯疱疹病毒的 gB、gD、gH 和 gp85 蛋白,EB 病毒的 gp350 和 gp220 蛋白等;嗜肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae) 的蛋白,包括例如乙型肝炎病毒的 S 蛋白等。这些蛋白可以作为将 F 或 HN 蛋白的胞外区与胞内区相连的融合蛋白使用。如上述,用于本发明的病毒载体包括假型化病毒载体,其含有并非由提供基因组的病毒提供的包膜蛋白,例如 VSV-G。当病毒载体经过设计以致这些包膜蛋白并不在 RNA 基因组中编码时,那么在病毒颗粒感染细胞后将不表达这些蛋白。

[0126] 而且,用于本发明的病毒载体可以是,例如,在包膜表面含有能与特定细胞粘附的粘附因子、配体、受体、抗体或片段等蛋白的载体,或含有胞外区的上述蛋白与胞浆区病毒包膜多肽所形成的嵌合蛋白的载体。因此,可以控制载体的树突细胞特异性。这些蛋白可以由病毒基因组编码,或通过并非病毒基因组中的基因 (例如,其它表达载体携带的基因,或宿主染色体中的基因) 在病毒载体重建时表达来供给。

[0127] 病毒载体中所含的任何病毒基因都可以从野生型基因来修饰,以降低由病毒蛋白引起的免疫原性,或增强 RNA 转录或复制效率。具体地,例如,对复制因子 N, P 和 L 基因中至少一个进行修饰,被认为可以增强转录或复制功能。HN 蛋白作为包膜蛋白既具有血凝素

活性又具有神经氨酸酶活性,减弱血凝素活性有可能提高病毒在血液中的稳定性,改变神经氨酸酶活性则有可能控制感染性。还可通过修饰 F 蛋白来控制膜融合能力。例如,可以分析 F 蛋白和 / 或 HN 蛋白上可作为细胞表面抗原分子的那些表位,并将其用于制备对这些蛋白而言具有降低的抗原性的病毒载体。

[0128] 负链 RNA 病毒载体可以缺失一个或多个辅助基因。例如, V 基因是 SeV 辅助基因之一,敲除该基因可明显降低 SeV 对小鼠等宿主的致病性,而不妨碍在培养细胞中的基因表达和复制 (Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71 :7266-7272 ;Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16 :578-587 ;Curran, J. et al., W001/04272, EP1067179)。这种减毒的载体尤其可以用作体内或回体基因导入的非毒性病毒载体。

[0129] 负链 RNA 病毒是出色的基因导入载体。它们不具有 DNA 阶段,仅在宿主细胞质中进行转录和复制,因而不发生染色体整合 (Lamb, R. A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae : The viruses and their replication. In : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of Virology. Vol. 2. Lippincott-Raven Publishers : Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204)。因此,不会由于染色体畸变而发生转化和永生化等安全问题。负链 RNA 病毒的这一特点在将该病毒用作载体时对安全性意义重大。例如,外源基因表达结果显示,甚至在 SeV 多次连续传代后,几乎没观察到核苷酸突变。这表明,在较长时间段里,病毒基因组高度稳定,而插入的外源基因被稳定表达 (Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997))。另外,SeV 不含衣壳结构蛋白也有多种好处,例如包装可塑性和插入基因的大小,这提示负链 RNA 病毒载体可以成为人类基因治疗的新型高效载体。有传播能力的 SeV 载体能够导入多达至少 4kb 大小的外源基因,并且通过添加转录单位能同时表达两种或多种基因。

[0130] 另外,已知 SeV 对啮齿类致病引起肺炎,但对人类不致病。以前关于鼻腔给予野生型 SeV 对非人灵长类没有严重伤害的报道也支持这点 (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15 : 533-540, 1997)。SeV 的这些特征提示 SeV 载体可以用于人类治疗,这支持了 SeV 载体是靶向人树突细胞的基因治疗的可能选择的提议。

[0131] 本发明的病毒载体能在其基因组 RNA 中编码外源基因。含有外源基因的重组病毒载体可通过在上述病毒载体基因组中插入外源基因来获得。外源基因可以是需要在靶树突细胞中表达的任何目的基因,并可以是编码天然蛋白、或在天然蛋白中删除、取代或插入氨基酸残基而修饰的蛋白的基因。外源基因可插入病毒基因组中蛋白质非编码区的任何目的位置。例如,可以将上述核酸插入基因组 DNA 中 3' - 前导区与离 3' - 端最近的病毒蛋白 ORF 之间 ;各个病毒蛋白 ORF 之间 ;和 / 或离 5' - 端最近的病毒蛋白 ORF 与 5' - 尾区之间。在缺失 F 或 HN 基因等的基因组中,可以将编码外源基因的核酸插入这些缺失区域。在将外源基因导入副粘病毒时,希望插入所述基因,使插到基因组中的多核苷酸的链长度为六的倍数 (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993)。应当将 E-I-S 序列安排在插入的外源基因和病毒 ORF 之间。两个或多个基因可以通过 E-I-S 序列串联插入。

[0132] 载体中所含外源基因的表达水平,可通过添加在该基因上游的转录起始序列的类型来控制 (W001/18223),也可通过基因组中外源基因插入点的位置来控制 :插入点越靠近负链的 3' - 末端,表达水平越高 ;插入点越靠近负链的 5' - 末端,表达水平越低。因此,为获得所需的基因表达水平,可以适当控制外源基因的插入位置,使外源基因与其前后编码

病毒蛋白的基因的组合最合适。通常,由于认为外源基因高表达水平是有利的,优选将外源基因与高效转录起始序列连接,并将其插入负链基因组的 3' - 端附近。具体地,可将外源基因插入 3' - 前导区与离 3' - 端最近的病毒蛋白 ORF 之间。或者,可以将外源基因插入离 3' - 端最近的病毒基因 ORF 与离 3' - 端第二近的病毒基因之间。在野生型副粘病毒中,离基因组 3' - 端最近的病毒蛋白基因是 N 基因,第二近的基因是 P 基因。或者,当不希望导入的基因高水平表达时,通过例如将外源基因插入载体中尽可能靠近负链 5' - 端的位点、或通过选择低效率转录起始序列,可以抑制病毒载体的基因表达水平,以获得相应效应。

[0133] 为制备负链 RNA 病毒载体,可以在有 RNP(病毒的一个组成部分)重建必需的病毒蛋白(即 N, P 和 L 蛋白)的情况下,在哺乳动物细胞中转录编码病毒基因组 RNA 的 cDNA。通过产生负链基因组(即,与病毒基因组相同的反义链)或者正链(编码病毒蛋白的正义链)可以重建病毒 RNP。为提高载体重建的效率优选产生正链。RNA 末端优选尽可能准确反映天然病毒基因组的 3' - 前导序列和 5' - 尾随序列。为准确调节转录物的 5' - 末端,例如,可以用 T7 RNA 聚合酶的识别序列作为转录起始位点,在细胞中表达 RNA 聚合酶。为调节转录物的 3' - 末端,例如,可以在转录物的 3' - 末端编码自我裂解性核酶,允许用此核酶准确裂解 3' - 末端(Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78 :2813-2820, 1997 ;Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16 :578-587 ;and Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2 :457-466)。

[0134] 可以按照例如 Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78 :2813-2820, 1997 ;Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16 :578-587 ;Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2 :457-466 中记载方法,如下构建带有外源基因的重组仙台病毒载体。

[0135] 首先,制备包含所需外源基因的 cDNA 序列的 DNA 样品。优选此 DNA 样品在 25ng/ μ l 或更高的浓度可以通过电泳确认为单个质粒。下面是将外源基因插入病毒基因组 DNA 的 NotI 位点的一个实施例。当靶 cDNA 核苷酸序列中包含 NotI 识别位点时,优选事先用定点诱变法等改变基础序列,但不改变所编码的氨基酸序列,并优选事先将 NotI 位点切出。从所述样品通过 PCR 扩增并回收所需基因片段。在引物对的 5' 区添加 NotI 位点,使扩增片段的两个末端都带有 NotI 位点。将 E-I-S 序列设计在引物中,使外源基因插入病毒基因组之后,在外源基因的 ORF 之间,以及在病毒基因 ORF 的每一侧各有一个 E-I-S 序列。

[0136] 例如,正向侧合成性 DNA 序列在 5' - 侧选择具有不少于两个核苷酸(优选 4 个核苷酸,不包括 GCG 和 GCC 等来自 NotI 识别位点的序列,更优选 ACTT)的任意所需序列,以确保用 NotI 消化,在该序列的 3' - 侧添加 NotI 识别序列 gcggccgc。在 3' - 侧还添加任意 9 个核苷酸或 9 加 6 的倍数个核苷酸作为间隔序列。进一步在该间隔序列 3' - 侧添加所需 cDNA ORF 的约 25 个核苷酸的序列,它从起始密码子 ATG 开始并包括 ATG。优选地,从所需 cDNA 选取约 25 个核苷酸作为正向侧合成性寡 DNA 的 3' - 末端,使最后一个核苷酸为 G 或 C。

[0137] 反向合成性 DNA 序列在 5' - 侧选择不少于两个的核苷酸(优选 4 个核苷酸,不包括 GCG 和 GCC 等来自 NotI 识别位点的序列,更优选 ACTT),在 3' - 侧添加 NotI 识别序列 gcggccgc,再在 3' - 侧添加寡 DNA 插入片段以调节长度。寡 DNA 的长度被设计为,使最终 PCR 扩增产物的 NotI 片段的链长为 6 的倍数个核苷酸(所谓“6 的法则”;Kolakofski D. 等, J. Virol., 1998, 72, 891-899 ;Calain P. 和 Roux L., J. Virol., 1993, 67, 4822-4830)。向该引物添加 E-I-S 序列时,在寡 DNA 插入片段 3' - 侧添加仙台病毒 S 序列的互补序列(优选

5' -CTTTCACCCT-3' ;SEQ ID NO:1)、I 序列的互补序列 (优选 5' -AAG-3')、E 序列的互补序列 (优选 5' -TTTTCTTACTACGG-3' ;SEQ ID NO:2),再在 3' -侧添加约 25 个核苷酸的互补序列,该互补序列从所需 cDNA 终止密码子开始向上游计数,其长度使最后一个核苷酸为 G 或 C,从而形成反向合成性寡 DNA 的 3' -末端。

[0138] 可以按照传统方法,使用 Taq 聚合酶或其它 DNA 聚合酶进行 PCR。可以将目的扩增片段用 Not I 消化,然后插入质粒载体例如 pBluescript 的 Not I 位点。用测序仪确认如此获得的 PCR 产物的核苷酸序列,并选择包括正确序列的质粒。用 Not I 将插入片段从这些质粒上切下,并克隆到包含基因组 cDNA 的质粒的 Not I 位点。重组仙台病毒 cDNA 也可以不使用质粒载体、而是直接向基因组 cDNA 的 Not I 位点插入所述片段来获得。

[0139] 例如,可以根据文献记载的方法构建重组仙台病毒基因组 cDNA (Yu, D. 等, Genes Cells, 1997, 2, 457-466, 1997 ;Hasan, M. K. 等, J. Gen. Virol., 78 :2813-2820, 1997)。例如,首先将带有 NotI 识别位点的 18bp 间隔序列 (5' -(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3' ;SEQ ID NO:3) 插到克隆化仙台病毒基因组 cDNA (pSeV(+)) 中前导序列与 N-蛋白 ORF 之间,得到带有丁型 (delta) 肝炎病毒反基因组链的自我裂解性核酶位点的质粒 pSeV18^b(+) (Hasan M. K. 等, J. General Virol., 1997, 78, 2813-2820)。将外源基因片段插入 pSeV18^b(+) 的 NotI 位点,能获得插入了所需外源基因的重组仙台病毒 cDNA。

[0140] 在有上述病毒蛋白 (L, P 和 N) 的情况下,病毒载体可以通过对编码如上述制备的重组病毒基因组 RNA 的 DNA 进行转录而在细胞中重建。本发明提供向树突细胞导入时使用的负链 RNA 病毒载体。此外,本发明涉及负链 RNA 病毒载体用于制备导入了基因的树突细胞的用途,以及用于制备成熟树突细胞的用途。本发明也提供在制备树突细胞导入时使用的负链 RNA 病毒载体的病毒基因组 RNA 的编码 DNA。本发明还涉及编码所述载体的基因组 RNA 的 DNA 用于制备本发明载体的用途。重组病毒可以通过本领域已知的方法重建 (W097/16539 ;W097/16538 ;Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235 :323-332 ;Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :8388-8392 ;Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13 :4195-4203 ;Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14 :5773-5784 ;Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :4477-4481 ;Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14 :6087-6094 ;Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1 :569-579 ;Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71 :1265-1271 ;Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :15400-15404)。用这些方法,可以从 DNA 重建负链 RNA 病毒,包括副流感病毒,水泡性口炎病毒,狂犬病病毒,麻疹病毒,牛瘟病毒以及仙台病毒。本发明的载体可以按照这些方法重建。当使病毒载体 DNA 缺陷 F 基因、HN 基因、和 / 或 M 基因时,这样的 DNA 不能形成感染性病毒颗粒。但是,可以将这些缺陷基因和 / 或编码其它病毒包膜蛋白的基因导入宿主细胞,并在细胞中表达这些基因,来形成感染性病毒颗粒。

[0141] 具体地,可以通过下列步骤制备病毒:(a) 在表达 N, P 和 L 蛋白的细胞中,转录编码负链 RNA 病毒基因组 RNA (负链 RNA) 或其互补链 (正链) 的 cDNA ;和 (b) 收获细胞培养上清,其中含有所产生的负链 RNA 病毒。为进行转录,将编码基因组 RNA 的 DNA 连接在合适启动子的下游。如此转录的基因组 RNA 在有 N, L 和 P 蛋白的情况下复制,形成 RNP 复合物。然后,在有 M, HN 和 F 蛋白的情况下,形成病毒颗粒,外包包膜。例如,可以将编码基因组 RNA 的 DNA 连接在 T7 启动子下游,用 T7 RNA 聚合酶转录为 RNA。除了含有 T7 聚合酶识别序列

的启动子以外,任何所需启动子都可以作为启动子使用。或者,可以将体外转录的 RNA 转染到细胞中。

[0142] T7 RNA 聚合酶等从 DNA 起始转录基因组 RNA 所需的酶可以如下提供:转导能表达所述酶的质粒或病毒载体,或,例如,在细胞染色体中掺入 RNA 聚合酶基因以确保诱导其表达,然后在病毒重建时诱导表达。而载体重建所需的基因组 RNA 和病毒蛋白可以通过例如转导其表达质粒来提供。在提供这些病毒蛋白时,可以使用辅助病毒,例如负链 RNA 病毒的野生型或一些突变体。

[0143] 将表达基因组 RNA 的 DNA 导入细胞的方法包括例如:(i) 制备能被靶细胞内化的 DNA 沉淀的方法,(ii) 制备包含 DNA 的复合体的方法,所述 DNA 适于被靶细胞内化、具有较低细胞毒性并且带正电,和 (iii) 利用电脉冲在靶细胞膜上打开瞬时性小孔的方法,其中所述小孔的大小足以让 DNA 分子通过。

[0144] 方法 (ii) 中可以使用各种转染试剂,如 DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN#301305), DOTAP, DOPE, 和 DOSPER (Roche#1811169)。方法 (i) 中,可使用磷酸钙进行转染,尽管在这种方法中,导入细胞的 DNA 是通过吞噬小泡被内化的,但已知有足量的 DNA 能被摄入细胞核中 (Graham F. L. 和 van Der Eb J., *Virol.*, 1973, 52, 456; Wigler M. 和 Silverstein S., *Cell*, 1977, 11, 223)。Chen 和 Okayama 研究了导入技术的最佳条件,他们报道说:(1) 在 35°C、2-4% CO₂ 中将细胞和共沉淀物温育 15-24hr, (2) 环状 DNA 比线性 DNA 活性更高,和 (3) 当沉淀混合液中 DNA 浓度为 20-30 μ g/ml 时,可形成最佳沉淀 (Chen C. 和 Okayama H., *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 2745)。方法 (ii) 适于瞬时转染。还有一种已知方法是用 DEAE-葡聚糖 (Sigma#D-9885 M. W. 5×10^5) 与 DNA 以所需浓度比混合,然后去进行转染。由于大多数复合体在内体中降解,可以加入氯喹来提高效率 (Calos M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3015)。方法 (iii) 称为电穿孔法,它比方法 (i) 或方法 (ii) 应用更广泛,因为它可以用于任何类型的细胞。可通过优化脉冲电流的持续时间、脉冲的形式、电场强度(电极间空隙,和电压)、缓冲液的导电性、DNA 浓度和细胞密度而使这些方法获得良好效率。

[0145] 在上述三种方法中,方法 (ii) 操作简单,且能用大量细胞检测大量样品,使转染试剂适于将 DNA 导入细胞中进行重建载体。转染试剂优选但不限于 Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, 目录号 301305), 或 DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, 目录号 1811169)。

[0146] 具体地,可以按下述方法从 cDNA 重建病毒:

[0147] 在约 6-24 孔的塑料板或 100mm Petri 培养皿中,用极限必需培养基 (MEM) 将猴肾细胞 LLC-MK2 (ATCC CCL-7) 培养至 70-80% 铺满,所述培养基含有 10% 胎牛血清 (FCS) 和抗生素 (100U/ml 青霉素 G 和 100 μ g/ml 链霉素)。将表达 T7 聚合酶的重组痘苗病毒 vTF7-3 在 1 μ g/ml 补骨脂素的存在下于 UV 中暴露 20 分钟灭活,然后以 2 PFU/细胞的量感染细胞 (Fuerst T. R. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 8122-8126; 和 Kato. A. 等, *Genes Cells*, 1996, 1, 569-579)。可以适当调整补骨脂素的加入量和暴露于 UV 的时间长短。感染 1 小时后,将 2-60 μ g (更优选 3-20 μ g) 编码重组仙台病毒基因组 RNA 的 DNA、与病毒 RNP 生成所需的病毒反式作用蛋白的表达质粒 (0.5-24 μ g pGEM-N, 0.25-12 μ g pGEM-P 和 0.5-24 μ g pGEM-L) (Kato. A. 等, *Genes Cells*, 1996, 1, 569-579) 一起,采用 Superfect (QIAGEN) 等通

过脂转染方法进行转染。例如,编码 N,P 和 L 蛋白的表达载体的量优选是 2 : 1 : 2,质粒的量适当调整为例如,1-4 μ g pGEM-N,0.5-2 μ g pGEM-P,1-4 μ g pGEM-L。

[0148] 在 MEM 中培养转染细胞,所述 MEM 不含血清,根据需要,可以含有 100 μ g/ml 利福平 (Sigma) 和优选浓度仅为 40 μ g/ml 的阿糖胞苷 (AraC) (Sigma)。将药物浓度调整至最佳,从而使痘苗病毒的细胞毒性最小而病毒的回收率最高 (Kato. A. 等, *Genes Cells*, 1996, 1, 569-579)。转染后将细胞培养约 48-72hr,然后收集并通过三次冻融而裂解。用包含 RNP 的细胞裂解物再转染 LLC-MK2 细胞并培养。或者回收培养上清,将其添加到 LLC-MK2 细胞的培养液中,使其感染细胞并进行培养。转染可以通过例如与脂转染胺 (lipofectamine),聚阳离子脂质体等形成复合物,并将复合物转导入细胞来进行。具体地,可以使用各种转染试剂,例如, DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN#301305), DOTAP, DOPE 和 DOSPER (Roche#1811169)。为防止在内体中降解,还可以加入氯喹 (Calos, M. P., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 :3015)。在转导了 RNP 的细胞中,病毒基因由 RNP 表达并且 RNP 进行复制,载体被扩增。将所得病毒溶液适当稀释 (例如, 10^6 - 倍),然后反复进行扩增,可以将痘苗病毒 vTF7-3 彻底消除。扩增可以反复例如三次或更多次。所得载体可以贮存在 -80℃。为了重建缺乏编码包膜蛋白的基因并且不能传播的病毒载体,可以用表达该包膜蛋白的 LLC-MK2 细胞进行转染,或与表达该包膜蛋白的质粒一起转染。另一种方法是,将转染过的细胞覆盖在表达该包膜蛋白的 LLC-MK2 细胞的上层并进行培养,使缺陷型病毒载体繁殖 (参照 W000/70055 和 W000/70070)。

[0149] 所得病毒的滴度可通过,例如,测定 CIU (细胞感染单位) 或血凝素活性 (HA) 来确定 (W000/70070 ;Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1 :569-579 ;Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., *Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells*. Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine* ;Humana Press ;pp. 295-306, 1999)。携带 GFP (绿色荧光蛋白) 标志基因等的载体的滴度可以通过使用该标志作为指示剂 (例如 GFP-CIU) 直接计数被感染的细胞来定量。所测得的滴度可与 CIU 同法处理 (W000/70070)。

[0150] 只要能重建病毒载体,对于重建的宿主细胞无特殊限制。例如,在仙台病毒载体等的重建中,可以使用来自猴肾的 LLC-MK2 细胞和 CV-1 细胞、来自仓鼠肾的 BHK 细胞等培养细胞,以及来自人的细胞等。通过在这些细胞中表达适当的包膜蛋白,也可以获得在包膜中包含该蛋白的感染性病毒粒子。此外,为了获得大量仙台病毒载体,可以用从上述宿主获得的病毒载体感染受孕鸡卵,从而扩增该载体。已经开发了用鸡卵制备病毒载体的方法 (Nakanishi, et al., ed. (1993), “State-of-the-Art Technology Protocol in Neuroscience Research III, *Molecular Neuron Physiology*”, Koseisha, Osaka, pp. 153-172)。具体地,例如,将受精卵在孵化器中 37-38℃ 培养 9-12 天以形成胚。将病毒载体接种到尿囊腔,将该受精卵培养数日 (例如, 3 日) 使病毒载体繁殖。可根据所用的重组仙台病毒类型的不同而改变培养时间等条件。然后,回收含有该载体的尿囊液。可以用常规方法从尿囊液样品中分离和纯化仙台病毒载体 (Tashiro, M., “Virus Experiment Protocol”, Nagai, Ishihama, ed., *Medical View Co., Ltd.*, pp. 68-73, (1995))。

[0151] 例如,可以如下构建和制备 F 基因缺失型仙台病毒载体 (参照 W000/70055 和 W000/70070)。

[0152] <1> 构建 F 基因缺失型仙台病毒基因组 cDNA 和 F 基因表达质粒

[0153] 用 SphI/KpnI 消化仙台病毒 (SeV) 的全长基因组 cDNA, pSeV18⁺b(+) (Hasan, M. K. 等, 1997, J. Gen. Virol. 78, 2813-2820) (“pSeV18⁺b(+)”也叫“pSeV18⁺”), 回收消化片段 (14673bp), 将该片段克隆到 pUC18, 得质粒 pUC18/KS, 在此 pUC18/KS 上构建 F 基因缺失部位。F 基因缺失通过联合应用 PCR- 连接反应来构建, 结果除去 F 基因 ORF (ATG-TGA = 1698bp)。然后, 例如连接 atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO :4), 以构建 F 基因缺失型 SeV 基因组 cDNA (pSeV18⁺/ΔF)。将采用引物对 [正向 :5′ -gttgagtactgcaagagc/SEQ ID NO :5, 反向 :5′ -tttgccggcatgcatgtttcccaagggagagttttgcaacc/SEQ ID NO :6] 通过 PCR 获得的产物连接到 F 上游 ; 将采用引物对 [正向 :5′ -atgcatgccggcagatga/SEQ ID NO :7, 反向 :5′ -tggtgaatgagagaatcagc/SEQ ID NO :8] 通过 PCR 获得的产物用 EcoT22I 连接到 F 基因下游。用 SacI 和 SalI 消化按上述方法获得的质粒, 回收含有 F 基因缺失部位的片段 (4931bp) 并将其克隆到 pUC18, 得 pUC18/dFSS。该 pUC18/dFSS 用 DraIII 消化, 回收片段, 用 pSeV18⁺ 中包含 F 基因区域的 DraIII 片段置换, 连接后得到质粒 pSeV18⁺/ΔF。

[0154] 将外源基因插入例如 pUC18/dFSS 中 F 基因缺失部位的 NsiI 和 NgoMIV 限制酶位点。为此, 例如, 可以用末端为 NsiI 的引物和末端为 NgoMIV 的引物扩增外源基因片段。

[0155] <2> 制备诱导 SeV-F 蛋白表达的辅助细胞

[0156] 为了构建表达仙台病毒 F 基因 (SeV-F) 的 Cre/loxP 诱导型表达质粒, 通过 PCR 扩增 SeV-F 基因, 将扩增产物插入为了能通过 Cre DNA 重组酶诱导基因产物表达而设计的质粒 pCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) 的单一 SwaI 位点, 由此构建质粒 pCALNdLw/F。

[0157] 为了从 F 基因缺失型基因组回收感染性病毒颗粒, 建立表达 SeV-F 蛋白的辅助细胞系。可以使用例如 SeV 增殖中常用的猴肾细胞系 LLC-MK2 细胞。在 37℃ 和 5% CO₂ 中用添加了下列成分的 MEM 培养 LLC-MK2 细胞 : 10% 的经热处理灭活的胎牛血清 (FBS)、青霉素 G 钠 (50U/ml) 和链霉素 (50 μg/ml)。由于 SeV-F 基因产物具有细胞毒性, 用磷酸钙法 (Mammalian Transfection Kit (Stratagene)) 将为了能通过 Cre DNA 重组酶诱导 F 基因产物表达而设计的上述质粒 pCALNdLw/F 按公知的方案导入 LLC-MK2 细胞。

[0158] 将 10 μg 质粒 pCALNdLw/F 导入已在 10cm 培养皿中培养至 40% 铺满的 LLC-MK2 细胞中, 然后用 10ml 含 10% FBS 的 MEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 小时。24 小时后将细胞剥下, 悬浮于 10ml 培养基后, 播种到五个 10ml 的培养皿中, 5ml 的一皿、2ml 的两皿、0.2ml 的两皿, 用 10ml 含 G418 (Gibco-BRL) 1, 200 μg/ml 和 10% FBS 的 MEM 培养基培养 14 天, 每两天更换一次培养基, 选出稳定的基因导入株。用克隆环回收上述培养基中繁殖的 G418 抗性细胞。回收的各克隆均在 10cm 的培养皿中扩增到铺满。

[0159] 在 6cm 培养皿中将细胞扩增到铺满, 按照齐藤等的方法 (Saito 等, Nucl. Acids Res. 23, 3816-3821, 1995 ; Arai, T. 等, J. Virol. 72(2), 1115-1121, 1998) 以例如 moi = 3d 腺病毒 AxCANCre 感染细胞, 由此诱导 F 蛋白表达。

[0160] <3> F 基因缺失型 SeV 病毒的重建和扩增

[0161] 将携带外源基因的上述质粒 pSeV18⁺/ΔF 用如下方法转染至 LLC-MK2 细胞中。将 LLC-MK2 细胞以 5×10⁶ 个细胞 / 皿的浓度播种到 100mm 培养皿中。为了用 T7 RNA 聚合酶转录基因组 RNA, 上述细胞在培养 24 小时后, 用经补骨脂素和长波长紫外线 (365nm) 处理

20 分钟的表达 T7 RNA 聚合酶的重组痘苗病毒 (PLWUV-VacT7 ;Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83,8122-8126(1986)) 室温转染 1 小时 (moi 约为 2)。用例如装有 5 只 15 瓦灯泡的 UV Stratalinker 2400 (商品目录号 400676(100V), Stratagene, La Jolla, CA, 美国) 进行痘苗病毒的紫外线照射。将细胞用不含血清的 MEM 洗涤后, 使用适当的脂转染试剂, 将表达基因组 RNA 的质粒, 和分别表达负链 RNA 病毒 N, P, L, F 或 HN 蛋白的表达质粒导入细胞。按照该顺序, 这些质粒的比例优选但不限于 6 : 2 : 1 : 2 : 2 : 2。例如, 表达基因组 RNA 的质粒, 和分别表达 N、P、或 L 蛋白、或 F 和 HN 蛋白的表达质粒 (pGEM/NP、pGEM/P、pGEM/L、和 pGEM/F-HN ;W000/70070, Kato, A., 等, Genes Cells 1,569-579, (1996)) 分别以 12、4、2、4 和 4 μ g/皿的量转染细胞。培养数小时后, 细胞用不含血清的 MEM 洗涤, 然后在含 40 μ g/ml 胞嘧啶 β -D-阿拉伯呋喃糖苷 (AraC ;Sigma, St. Louis, MO) 和 7.5 μ g/ml 胰蛋白酶 (Gibco-BRL, Rockville, MD) 的 MEM 中培养。回收这些细胞, 将所得沉淀悬浮于 OptiMEM 中 (10^7 个细胞/ml)。将悬浮液反复冻融三次, 与脂转染试剂 DOSPER (Boehringer Mannheim) 混合 (10^6 个细胞/25 μ l DOSPER) 混合, 室温放置 15 分钟后, 转染上述克隆的 F 表达辅助细胞 (10^6 个细胞/孔, 12 孔平皿), 用不含血清的 MEM (含有 40 μ g/ml AraC 和 7.5 μ g/ml 胰蛋白酶) 培养, 回收上清。缺失除了 F 以外的基因 (例如 HN 和 M 基因) 的病毒也可用与上述相似的方法制备。

[0162] 为了制备病毒基因缺失型载体, 可以例如将在所含病毒基因组上缺失不同病毒基因的两种或更多载体导入同一细胞。每种缺失的病毒蛋白通过其它载体的表达来提供。这样一来, 载体彼此互补, 形成感染性病毒颗粒, 从而能完成病毒载体的复制周期并进行繁殖。具体地, 当将两种或多种本发明载体联合接种以允许病毒蛋白互补时, 能以较低成本产生各种病毒基因缺失型载体的大量混合物。由于这些病毒缺乏病毒基因, 它们的基因组比不缺失病毒基因的病毒的基因组小, 因而可插入较长的外源基因。此外, 这些由于缺乏病毒基因而不能增殖的病毒在细胞外被稀释, 很难维持共感染状态, 因此它们不会产生后代, 对环境的损害较小。

[0163] 用负链 RNA 病毒导入外源基因时, 对外源基因没有限制, 天然蛋白包括如激素, 细胞因子, 生长因子, 受体, 细胞内信号分子, 酶和肽。这些蛋白可以是分泌蛋白, 膜蛋白, 细胞质蛋白, 核蛋白等等。人工蛋白包括例如, 嵌合毒素等融合蛋白, 显性阴性蛋白 (包括可溶性受体分子或膜结合的显性阴性受体), 截短的细胞粘附分子, 以及细胞表面分子。所述蛋白也可以是已经附加分泌信号, 膜定位信号, 核转座信号等等的蛋白。具体基因的功能可以通过导入并表达反义 RNA 分子, 裂解 RNA 的核酶等等作为转基因来进行抑制。当用治疗疾病的基因作为外源基因制备病毒载体时, 可以通过导入该载体进行基因治疗。通过将基因直接施用或回体施用, 可以将本发明病毒载体用于基因治疗, 并且能由树突细胞表达那些预计有治疗效果的外源基因或体内供给不足的内源基因。此外, 可以将本发明的载体用作再生医疗中的基因治疗载体。

[0164] 按照本文所述的产病毒方法, 本发明的病毒载体可以以 1×10^5 CIU/ml 或更高的滴度, 优选 1×10^6 CIU/ml 或更高, 更优选 5×10^6 CIU/ml 或更高, 更优选 1×10^7 CIU/ml 或更高, 更优选 5×10^7 CIU/ml 或更高, 更优选 1×10^8 CIU/ml 或更高, 更优选 5×10^8 CIU/ml 或更高释放到产病毒的细胞的细胞外液中。病毒滴度可以按本文所述或其它文献所述 (Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74(1990) ;W000/70070) 来确定。

[0165] 可以将回收的病毒载体纯化使其达到基本纯。纯化可以用公知的纯化 / 分离方法实现,所述方法包括过滤、离心、吸附和柱纯化,或上述方法的任何联用。“基本纯”是指,载体成分构成该载体的溶液的主要部分。例如,当溶液所含的全部蛋白质(作为乘载体(carrier)或稳定剂加入的蛋白质除外)中,作为病毒载体成分的蛋白的比例为 10%或以上,优选 20%或以上,更优选 50%或以上,优选 70%或以上,更优选 80%或以上,进一步优选 90%或以上时,可以将该病毒载体组合物确认为基本纯。副粘病毒的具体纯化方法包括采用纤维素硫酸酯或交联多糖硫酸酯的方法(特公昭 JP62-30752、特公昭 JP62-33879 和特公昭 JP62-30753)和吸附于含有岩藻糖硫酸的多糖和 / 或其分解产物上的方法(W097/32010),但不限于此。

[0166] 在制备含有载体的组合物时,可以根据需要将载体与所需可药用乘载体或介质联用。“可药用乘载体或介质”是可以与载体一起给药的,不明显抑制经由该载体进行的基因导入的物质。这样的乘载体和介质包括,例如去离子水,无菌水,氯化钠溶液,葡萄糖溶液,含有葡萄糖、氯化钠和乳酸的 Ringer's 溶液,培养基,血清和磷酸盐缓冲液(PBS)。它们可以与所述载体适当联用配制成组合物。组合物还可以包括用于脂质体的膜稳定剂(例如,胆固醇等固醇)。组合物还可以包括抗氧化物(例如,生育酚或维生素 E)。组合物还可以包括植物油,悬浮剂,表面活性剂,稳定剂,杀生物剂等等。还可加保存剂或其他添加物。本发明组合物的剂型可以是水溶液,胶囊,悬液,浆液等等。本发明的载体组合物也可以是溶液,冻干制品,或气雾剂。当是冻干制品时,其可以包括山梨醇,蔗糖,氨基酸,各种蛋白等等作为稳定剂。含有本发明载体的组合物可以用作向树突细胞导入基因的试剂,还可以用作靶向树突细胞的基因治疗的药物。载体溶液还可以用作疫苗(J. I. Mayordomo et al., Nature Med. 1(12), 1279-1302, (1995))。当用本发明载体在树突细胞中表达抗原肽时,可以将呈递该肽的细胞用作疫苗。疫苗组合物可以包括细胞因子、霍乱毒素和沙门氏菌毒素等免疫刺激剂以增强免疫原性。还可以将疫苗与明矾、不完全弗氏佐剂、MF59(油乳胶)、MTP-PE(来自分枝杆菌细胞壁的胞壁酰三肽)和 QS-21(来自皂树 *Quilajaponaria*) 等佐剂联用。

[0167] 当给予组合物时,将其与改善佐剂效果的细胞因子联用是有效的。这样的基因包括,例如,(i) IL-2 和单链 IL-12 联用(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(15):8591-8596, 1999);(ii) IL-2 和干扰素- γ (美国专利 5,798,100);(iii) 粒细胞集落刺激因子(GM-CSF),单独使用;和(iv) GM-CSF 与 IL-4 联用(J. Neurosurgery 90(6), 1115-1124(1999))。

[0168] 需要由树突细胞呈递的抗原可以由负链 RNA 病毒载体编码,将其添加到(尤其是,脉冲到)已导入该载体的树突细胞中,或用另一种目标载体进行表达。这样的抗原包括与感染性微生物、病毒、寄生虫、病原体、癌症等相关的目标抗原。它们可以是结构蛋白或非结构蛋白。这样的抗原(或其加工肽)在树突细胞表面与 MHC 分子结合而被呈递,从而诱导免疫应答。

[0169] 所述抗原作为疫苗可用于,例如,肿瘤,感染性疾病,和其它一般性疾病。为治疗感染性疾病,可以例如分析感染性微生物抗原蛋白的表位,然后由树突细胞进行表达或呈递。

[0170] 病原体抗原包括,例如,甲型肝炎病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,丁型肝炎病毒,乳头瘤病毒抗原,单纯疱疹病毒(HSV),水痘带状疱疹病毒(VZV),Epstein-Barr 病毒,巨细胞病毒(CMV),HIV,疟疾等等的蛋白,或其部分肽。编码这类抗原蛋白的负链 RNA 病毒

可用于预防或治疗。具体地,流感病毒强毒株 H5N1 的包膜可用于预防或治疗流感,日本脑炎病毒包膜蛋白 (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882(1999)) 可用于预防或治疗日本脑炎, HIV 和 SIVgag 蛋白 (J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIV 包膜蛋白、Nef 蛋白以及其它病毒蛋白可用于预防或治疗 AIDS。此外,霍乱毒素 B 亚基 (CTB) (Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10) :934-8, Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3) :292-7) 可用于预防或治疗霍乱;狂犬病病毒糖蛋白 (Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8) :949-52) 可用于预防或治疗狂犬病;人类乳头瘤病毒 6 型的衣壳蛋白 L1 (J. Med. Virology, 60, 200-204(2000)) 可用于预防或治疗宫颈癌。其它致病病毒的抗原蛋白也可以由所述载体表达。而且,可使用日本脑炎病毒的 JE-E 抗原蛋白 (特开昭 64-74982, 特开平 1-285498), 人单纯疱疹病毒的 gD2 蛋白 (特开平 5-252965), 丙型肝炎病毒的多肽 (特开平 5-192160), 假型狂犬病病毒的多肽 (特表平 7-502173), 等等。例如,可以分析被这类致病微生物感染的患者的细胞,从而鉴定出抗原蛋白的需要呈递在抗原呈递细胞 (APC) 表面的表位备用。优选适当选择 HLA 类型并鉴定与所需 HLA 相应的标为以备用。

[0171] 为特异性促进抗肿瘤免疫应答,可以将表达一或多种肿瘤抗原的负链 RNA 病毒载体导入树突细胞,或用肿瘤抗原对已被负链 RNA 病毒载体激活的树突细胞进行脉冲。肿瘤抗原可以是肿瘤细胞特异性抗原 (即,肿瘤细胞中有、非肿瘤细胞中无) 或在肿瘤细胞中比在同类非肿瘤细胞中表达水平高的抗原。当 CTL 作为主要效应物时,可以使用所需的细胞内或细胞外肿瘤抗原。当用树突细胞激活 CD4⁺ T 细胞,通过 B 细胞激活诱导抗体生成,并以此抗体作为效应物反应时,优选使用呈递在细胞表面的抗原。例如,细胞表面受体或细胞粘附蛋白可用作抗原。肿瘤抗原包括,例如,诱导卵巢癌等的 Muc-1 或 Muc-1 样粘蛋白串联重复肽 (美国专利 5,744,144);人乳头瘤病毒的 E6 和 E7 蛋白,其引起宫颈癌;黑素瘤抗原 MART-1, MAGE-1, -2, -3, gp100, 和酪氨酸酶;前列腺癌抗原 PSA;以及 CEA (Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47(1998)90-96) 和 Her2neu (HER2p63-71, p780-788;Eur. J. Immunol. 2000;30:3338-3346)。

[0172] 按照本发明制备的树突细胞在癌症和感染性疾病的有效免疫治疗中是有用的。用导入了肿瘤抗原或感染性疾病相关抗原的基因的树突细胞进行免疫致敏的方法,或用这种树突细胞刺激 T 细胞进行免疫致敏的方法,可以作在患者中诱导抗肿瘤或抗感染性疾病免疫的有效方法。本发明还涉及用本发明方法获得的树突细胞在诱导免疫应答中的用途。具体地,本发明涉及用本发明方法获得的树突细胞在免疫治疗,特别是,例如肿瘤或感染性疾病的治疗中的用途。本发明还涉及用本发明方法获得的树突细胞在制备免疫激活剂中的用途。具体地,本发明涉及用本发明方法获得的树突细胞在制备免疫治疗剂,特别是,例如,抗肿瘤剂 (肿瘤生长抑制剂) 或感染性疾病治疗剂中的用途。

[0173] 所述细胞也可以用于一般性疾病。例如,为了治疗糖尿病,胰岛素片段的肽可以作为表位在 I 型糖尿病动物模型中应用 (Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2) : 189-94)。

[0174] 此外,通过在树突细胞中表达细胞因子,这些细胞可刺激免疫系统,从而增强抗癌症或感染性微生物的免疫应答。因此,导入了编码细胞因子基因的树突细胞在治疗癌症和其它预期细胞因子治疗有效的疾病中也是有用的。导入了携带免疫刺激性细胞因子

编码基因的负链 RNA 病毒载体的树突细胞可作为有效的免疫诱导物。例如,免疫刺激性细胞因子包括白细胞介素(例如,IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-23, 和 IL-27),干扰素(例如,IFN- α , IFN- β , IFN- γ),肿瘤坏死因子(TNF),转化生长因子(TGF)- β ,粒细胞集落刺激因子(G-CSF),巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),胰岛素样生长因子(IGF)-I, IGF-2, Flt-3 配体, Fas 配体, c-kit 配体,和其它免疫调节蛋白(例如趋化因子和共刺激分子)。

[0175] 这些细胞因子的氨基酸序列是本领域技术人员熟知的。IL-4 可参见 Arai et al. (1989), J. Immunol. 142(1) 274-282; IL-6 可参见 Yasukawa et al. (1987), EMBO J., 6(10):2939-2945; IL-12 可参见 Wolf et al. (1991), J. Immunol. 146(9):3074-3081; IFN- α 可参见 Gren et al. (1984) J. Interferon Res. 4(4):609-617, 和 Weismann et al. (1982) Princess Takamatsu Symp. 12:1-22; TNF 可参见 Pennica et al. (1984) Nature 312:724-729; G-CSF 可参见 Hirano et al. (1986) Nature 324:73-76; GM-CSF 可参见 Cantrell et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82(18):6250-6254。更具体地,编码 GM-CSF 的核酸序列包括含有登录号 NM_000758 的位置 84 至 461 所示序列的序列(对应于 NP_000749 氨基酸序列的位置 18 至 144)。编码 IL-4 的核酸序列包括含有登录号 NM_000589 的位置 443 至 829 所示序列的序列(对应于 NP_000580 氨基酸序列的位置 25 至 153)。可以设计载体,使之包括编码这些细胞因子的天然基因或由于遗传密码简并性而仍编码功能性细胞因子的突变基因,再将这些载体导入树突细胞。

[0176] 而且,所述基因可以通过修饰来表达细胞因子的修饰形式。例如,具有前体和成熟这两种形式(例如,通过裂解信号肽或通过限制性蛋白水解产生活性片段)的细胞因子可以通过遗传修饰来表达前体或者成熟形式。也可以使用其它修饰形式(例如,细胞因子活性片段与异源序列(例如,异源信号肽)的融合蛋白)。

[0177] 例如,如实施例所示,导入了携 IFN- β 基因的负链 RNA 病毒载体的树突细胞非常强地激活细胞毒 T 淋巴细胞,以致明显抑制表达相应抗原的肿瘤生长。由于树突细胞因载体的导入而被激活,故不需要用毒性 LPS 等等刺激这些树突细胞。这样一来,导入了携 IFN- β 基因的负链 RNA 病毒载体的树突细胞可作为抗肿瘤免疫治疗的有效治疗剂。各种灵长类以及包括人和小鼠在内的哺乳动物的 IFN- β 基因是熟知的。例如,SEQ ID NO:12 例举人 IFN- β 基因(成熟多肽是 SEQ ID NO:13 的位置 21 至 187),SEQ ID NO:14 例举小鼠 IFN- β 基因(成熟多肽是 SEQ ID NO:15 的位置 21 至 182)(Derynck, R. et al., Nature 285, 542-547(1980); Higashi, Y. et al., J. Biol. Chem. 258, 9522-9529(1983); Kuga, T. et al. Nucleic Acids Res. 17, 3291(1989))。必要时,上述信号肽可以替换为其它蛋白的信号序列。

[0178] IFN- β 基因可基于 IFN- β cDNA 和蛋白的上述已知序列,通过同源性搜索(例如, BLAST; Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)来鉴定。或者, IFN- β 基因可以用基于 IFN- β cDNA 的已知核苷酸序列所设计的引物通过 RT-PCR 获得,或通过用 IFN- β cDNA 作探针,在严谨条件下杂交,而从人、小鼠、大鼠或其它哺乳动物 cDNA 文库筛选而轻易获得。从含有 IFN- β cDNA 编码区的核酸或用作杂交靶的核酸制备探针,并检测该探针是否与另一核酸杂交,可确定杂交条件。探针可以是所述核酸的片段,其长度通常 20

个碱基以上,优选 30 个碱基以上长,更优选 50 个碱基以上。严谨杂交条件的例子是:在含有 $5\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ 含有 150mM NaCl 和 15mM 柠檬酸钠), 7% (w/v) SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ 变性鲑精 DNA, $5\times\text{Denhardt's}$ 溶液 ($1\times\text{Denhardt's}$ 溶液含有 0.2% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.2% 牛血清白蛋白和 0.2% Ficoll) 的溶液中, 于 48℃、优选 50℃、更优选 52℃ 进行杂交, 随后在与杂交同样的温度、更优选 60℃、甚至更优选 65℃、最优选 68℃, 于 $1\times\text{SSC}$, 更优选 $0.5\times\text{SSC}$ (例如在 $0.1\times\text{SSC}$ 中) 振荡洗涤 2 小时。

[0179] 哺乳动物 IFN- β 的核苷酸或氨基酸序列通常由与已知 IFN- β 序列高度同源的序列 (例如, 对应于 SEQ ID NOs:12 至 15 中所示成熟蛋白的序列) 构成。高度同源是指, 序列同一性为 70% 或以上, 优选 75% 或以上, 更优选 80% 或以上, 更优选 85% 或以上, 更优选 90% 或以上, 更优选 95% 或以上。可以使用例如 BLAST 程序 (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) 判断序列同一性。具体地, 可以使用 blastn 程序判断核苷酸序列同一性, 而用 blastp 程序判断氨基酸序列同一性。例如, 在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 BLAST 网页, 可以使用缺省参数进行计算机运算, 将过滤程序 (the filters), 例如“低复杂性 (low complexity)”设为“OFF” (Altschul, S. F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T. L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。参数可如下设置: 开放缺口 (open gap) 值, 核苷酸设为 5, 蛋白质设为 11; 延伸缺口 (extend gap) 值, 核苷酸设为 2, 蛋白质为 1; 核苷酸错配罚分设为 -3, 核苷酸配对奖分设为 1; 期望值设为 10; wordsize, 核苷酸设为 11, 蛋白质为 2; blast 延伸的 Dropoff (X) (以字节计) 在 blastn 中设为 20, 在其它程序中设为 7; 缺口比对 (gapped alignment) (以字节计) 的 X dropoff 值在除 blastn 外的程序中设为 15; 缺口比对 (以字节计) 的最终 X dropoff 值在 blastn 中为 50, 在其它程序中为 25。在氨基酸序列对比中, 可以使用 BLOSUM62 作为评分矩阵。blast2sequences 程序 (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) 可对比两个序列, 可用它生成两序列比对并因此判定它们的序列同一性。对成熟 IFN- β 蛋白的完整 CDS (例如, SEQ ID NO:12 中位置 64 至 561 或 SEQ ID NO:14 中位置 64 至 546) 或完整氨基酸序列 (例如, SEQ ID NO:13 中位置 22-187 或 SEQ ID NO:15 中位置 22-182) 进行计算, 将缺口与错配作同样处理, 并忽略成熟 IFN- β 蛋白编码序列 (CDS) 以外的缺口。

[0180] IFN- β 存在多态性和变体。保持与野生型 IFN- β 同等活性的变体可以适当使用。与野生型 IFN- β 同等的活性包括抗病毒活性, 此活性可以通过, 例如, 测定对水泡性口炎病毒细胞毒作用的抑制活性来判断。具体地, 将水泡性口炎病毒 Indiana 病毒株 [VR-1238AF; ATCC (美国典型培养物保藏中心)] 接种 WISH 细胞 (CCL-25; ATCC, Manassas, VA, U. S. A.), 检测由该病毒引起的细胞死亡, 从而测定 IFN- β 的防御作用 (测定条件参照 Knezic, Z., et al. (1993) Antiviral Res. 25, 215-221)。将病毒介导的细胞死亡被抑制 50% 之时的浓度定义为 1 国际单位 (IU)。具有与野生型 IFN- β 同等抗病毒活性的多肽优选具有 $1\times 10^6\text{IU/mg}$ 蛋白或更高, 更优选 $5\times 10^6\text{IU/mg}$ 蛋白或更高, 更优选 $1\times 10^7\text{IU/mg}$ 蛋白或更高的比活性。进一步, 具有与野生型 IFN- β 同等抗病毒活性的多肽优选具有野生型 IFN- β 的十分之一或更高的抗病毒比活性。

[0181] IFN- β 的多态性形式或变体一般可以包括在一种 IFN- β 分子序列 (例如, SEQ ID

NOs :12-15) 中取代、删除和 / 或插入一或多个残基后得到的核苷酸或氨基酸序列。与已知 IFN- β 序列的差别一般是 30 个残基或更少, 优选 20 个残基或更少, 优选 10 个残基或更少, 更优选 5 个残基或更少, 更优选 3 个残基或更少, 更优选 2 个残基或更少。氨基酸取代可以是保守取代。有保守取代的蛋白易于保持活性。保守取代包括, 例如, 在下列组的成员之间进行的氨基酸取代, 例如碱性氨基酸 (例如, 赖氨酸, 精氨酸和组氨酸), 酸性氨基酸 (例如, 天冬氨酸和谷氨酸), 不带电荷的极性氨基酸 (例如, 甘氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸和半胱氨酸), 非极性氨基酸 (例如, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 蛋氨酸和色氨酸), β -支链氨基酸 (例如, 苏氨酸, 缬氨酸和异亮氨酸), 和芳香族氨基酸 (例如, 酪氨酸, 苯丙氨酸, 色氨酸和组氨酸)。

[0182] 具体地, IFN- β 基因包括下列核酸:

[0183] (a) 编码多肽的核酸, 所述多肽含有 SEQ ID NO:13 的位置 22-187 或 SEQ ID NO:15 的位置 22-182 所示氨基酸序列;

[0184] (b) 核酸, 其包括 SEQ ID NO:12 的位置 64-561 的序列, SEQ ID NO:14 的位置 64-546 的序列, 或其互补序列, 并编码包括 SEQ ID NO:13 的位置 22-187 或 SEQ ID NO:15 的位置 22-182 所示氨基酸序列的多肽;

[0185] (c) 核酸, 其在严谨条件下与 SEQ ID NO:12 的位置 64-561 的序列, SEQ ID NO:14 的位置 64-546 的序列, 或其互补序列杂交, 并编码具有与野生型 IFN- β 同等活性的多肽;

[0186] (d) 编码具有与野生型 IFN- β 同等活性的多肽的核酸, 其中所述多肽包括 SEQ ID NO:13 的位置 22-187 或 SEQ ID NO:15 的位置 22-182 所示氨基酸序列、且其中取代, 删除, 和 / 或插入了一或多个氨基酸;

[0187] (e) 编码具有与野生型 IFN- β 同等活性的多肽的核酸, 其包括与 SEQ ID NO:12 的位置 64-561 的序列, SEQ ID NO:14 的位置 64-546 的序列, 或它们的互补序列高度同源的序列; 和

[0188] (f) 编码具有与野生型 IFN- β 同等活性的多肽的核酸, 所述多肽包括与 SEQ ID NO:13 的位置 22-187 或 SEQ ID NO:15 的位置 22-182 的序列高度同源的序列。

[0189] 使用负链 RNA 病毒载体遗传修饰的树突细胞可用于体内刺激患者自身的 T 细胞。这些遗传修饰的树突细胞还可以用于体外刺激 T 细胞。经回体免疫治疗可以将致敏的 T 细胞给予患者以刺激患者免疫系统。

[0190] 本发明涉及用于制备经树突细胞刺激的 T 细胞的方法, 其包括以下步骤: (a) 使负链 RNA 病毒载体与树突细胞或其前体细胞接触; (b) 使这些细胞分化为成熟树突细胞; 和 (c) 使成熟树突细胞与 T 细胞接触。由树突细胞呈递的抗原可以是所述载体表达的蛋白 (或其加工产物) 或外源脉冲至树突细胞中的蛋白。导入了负链 RNA 病毒载体的树突细胞可激活 T 细胞并诱导 CTL。

[0191] 本发明还涉及用本发明方法制备的树突细胞刺激免疫系统的方法。例如, 可以对感染性疾病、癌症等等的患者进行处理以刺激其免疫系统。此方法包括给予树突细胞或 T 细胞的步骤。具体地, 此方法包括以下步骤: (a) 给予患者治疗有效量的导入了负链 RNA 病毒载体的树突细胞; 或 (b) 给予患者治疗有效量的 T 细胞, 所述 T 细胞被导入了负链 RNA 病毒载体的树突细胞刺激。负链 RNA 病毒载体可以携带一或多个疾病相关抗原或细胞因子的编码基因或者可以不携带外源基因。由于负链 RNA 病毒载体通过感染树突细胞而激活这些

细胞,所以被不携带外源基因的载体感染的树突细胞也能激活患者的免疫系统。通过用抗原肽脉冲树突细胞以呈递目标抗原可以获得更高效的树突细胞。或者,当将 T 细胞与树突细胞在体外接触时,优选从患者收集 T 细胞并进行回体给药。

[0192] 所述载体的体内合适剂量依据疾病,患者的体重,年龄,性别,和症状,以及给药目的,给药的组合物的形式,给药方法,转导的基因,等等因素而变化;可由本领域技术人员适当判断。给药途径可以适当选择,包括例如,经皮,鼻内,经支气管,肌肉内,腹腔内,静脉内,关节内和皮下给药。可以局部或全身给药。优选所述载体在可药用载体中的剂量为约 10^5 CIU/ml 至约 10^{11} CIU/ml,更优选约 10^7 CIU/ml 至约 10^9 CIU/ml,最优选约 1×10^8 CIU/ml 至约 5×10^8 CIU/ml。人用剂量优选每一次为 2×10^5 CIU 至 2×10^{10} CIU,并且只要副作用在临床可接受的范围内,可以给药一次或多次。同样的原则适用于每天的给药次数。对非人动物,可以基于目标动物与人的体重比或给药靶点体积比(例如平均值)对上述剂量进行转换。此外,当在向受试者或细胞给药后由于治疗完成而必需抑制可传播的负链 RNA 病毒载体增殖时,通过给予 RNA- 依赖性 RNA 聚合酶抑制剂,可以特异性地抑制病毒载体的增殖而不损害宿主。

[0193] 为进行回体给药,可以将载体与树突细胞在体外(例如,在试管或平皿中)接触。优选载体用量为 MOI 1-500,更优选 2-300,甚至更优选 3-200,还更优选 5-100,还更优选 7-70。对接受载体给药的受试者没有特别限制,包括鸟类和哺乳动物(人和非人哺乳动物),包括小鸡,鹌鹑(quail),小鼠,大鼠,狗,猪,猫,牛,兔,绵羊,山羊,猴,人以及其它脊椎动物。

[0194] 当给予导入了载体的树突细胞时,所述细胞一般可以通过肌肉内,腹腔内,皮下或静脉内方式注射,或直接注射入淋巴结。优选通过皮下或腹膜内注射或直接向淋巴结注射的方式向患者给予细胞。通常可以给予患者 10^5 至 10^9 转化的树突细胞,优选 10^6 至 10^8 细胞,更优选约 10^7 细胞。

[0195] 导入了负链 RNA 病毒载体的树突细胞可以用作抗肿瘤剂。例如,通过向肿瘤部位给予导入了载体的树突细胞可以抑制肿瘤生长。肿瘤部位指肿瘤及其周围区域(例如,离肿瘤 5mm 以内,优选离肿瘤 3mm 以内的区)。尽管预期所述载体即使不携带外源基因载体也引起抗肿瘤效应,但是让载体携带 IFN- β 基因可获得更好效果。更好的效果可以通过使肿瘤抗原与树突细胞接触之后再对肿瘤给药来获得。肿瘤抗原与树突细胞的接触可以用下列方法实现:使肿瘤细胞裂解物与树突细胞混合的方法,用肿瘤抗原肽脉冲树突细胞的方法,或将肿瘤抗原基因导入树突细胞并在该细胞中表达的方法。还可以通过向肿瘤直接注射 IFN- β 或携带 IFN- β 基因的载体,来达到抗肿瘤效果。例如,携带 IFN- β 基因的负链 RNA 病毒载体是出色的抗肿瘤剂。更好的抗肿瘤效果可以通过在肿瘤部位将给予树突细胞与注射载体联用来获得,其中所述树突细胞中导入了负链 RNA 病毒载体,所述载体带有 IFN- β 基因。

[0196] 当给予经过树突细胞激活的 T 细胞时,所述 T 细胞的每剂静脉注射量可以是每 1m^2 体表面积约 10^5 至 10^9 细胞,优选 10^6 至 10^9 细胞,更优选 10^8 至 10^9 细胞(参见 Ridell et al., 1992, Science 257:238-241)。可以按所需间隔(例如,每月一次)重复注射。给药后,可以在 T 细胞注射期间或之后根据需要监测受体的任何副作用。在这种情况下,优选从已经收集树突细胞的同一个患者获得 T 细胞。或者,从患者收集 T 细胞,而用于刺激 T 细胞

的树突细胞可以源自 HLA- 相容性健康供体。相反地,可以从患者收集树突细胞,而 T 细胞可以源自 HLA- 相容性健康供体。

[0197] 含有按本发明制备的树突细胞作为疫苗活性成分的细胞可以作为治疗疫苗接种人体。因此,使它们缺乏生长能力是较安全的。例如,已知在诱导分化后,脐带血源单核细胞的生长能力明显降低。但是,为将细胞用作安全的细胞疫苗,生长能力可通过热处理,放射线照射,丝裂霉素 C 处理等降低或消除而不损失疫苗的功能。例如,当使用 X- 射线照射时,X- 射线的总照射剂量可以是 1000-3300Rad。用丝裂霉素 C 处理时,可以将丝裂霉素 C 以 25 至 50 μ g/ml 加入树突细胞中并于 37°C 保温 30-60 分钟。当细胞进行热处理时,可以将细胞在 50-65°C 热处理 20 分钟。

[0198] 实施例

[0199] 在下文实施例中具体描述本发明;但是,不应理解为本发明仅限于此。这里引用的所有发表物在这里引入作为说明书的一部分。

[0200] A. 检测导入效率:

[0201] [实验 1]

[0202] 通过阴性选择来富集健康供体的单核细胞。用 RosetteSep™- 人单核细胞富集混合物 (Stem Cell Technology Inc.) 在该阴性选择中富集单核细胞。具体地,使用四聚体抗体 (由两个抗体分子连接在一起构成,一个是识别红细胞的抗血型糖蛋白 A 抗体,另一个是识别单核细胞表面抗原的抗体) 结合细胞以去除红细胞,并且用 Ficol1 Paque™ Plus (Pharmacia Biotech Inc.) 去除细胞。通过阴性选择,除去表达 CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, 和 CD66b 的细胞,用剩余的细胞作为后续诱导 DC 分化时的富含单核细胞的细胞。在此阶段,65-80% 是 CD14⁺ 细胞。向富含单核细胞的细胞中加入 GM-CSF (500U/ml) 和 IL-4 (250U/ml), 并将细胞在无内毒素的含 10% FCS 的 RPMI 中培养以制备 DC。3-4 天后,将一半培养上清替换为具有同样成分的新鲜培养基。确认细胞为共刺激分子和 CD11c、HLA-II 类 (DR, DP, 和 DQ)、以及 CD1a 表达阳性,并且不表达其它系的标志 (CD3, CD56, CD19, CD15, 和 CD14) (图 1, 数据未显示)。用这些细胞测试载体导入效率。在此阶段,90-98% 的活细胞表达 DC 标志 (CD11c, 和 HLA-II 类 (DR, DP, 和 DQ))。

[0203] 尽管在本实施例所述选择中使用上述试剂盒,但也可以用抗体包被的磁珠进行类似的选择。优选使用珠子以大量制备细胞,例如通过血细胞分离等等收集单核细胞。

[0204] [实验 2]

[0205] 将表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的仙台病毒载体 (SeV-GFP) (transmissible; W000/70070) 以各种 MOIs 感染实验 1 (诱导分化后 7 天) 获得的 DC。研究细胞数, GFP 的表达水平, 和共刺激分子的表达水平随时间的变化。结果显示当 MOI 为 20 或更高时, % GFP 达到最高水平 (图 2-5)。当 MOI 增至 100 时 GFP 的平均荧光强度 (MFI) 可以进一步升高。另外,到第 8 天 GFP 的 MFI 增加。当 MOI 为 20 或更高时,共刺激分子 (CD80 和 CD86) 的整体水平达最高。在细胞数减少方面,当 MOI 为 1-20 时,观察到较小变化,当 MOI 为 50 时,观察到轻微减少,但无明显差异 (图 6)。

[0206] [实验 3]

[0207] 将 SeV-GFP 以 MOI 20 感染 DC, 用 FACS 检测 GFP 在不同时间的表达。结果,两周后表达下降 (细胞数也下降) 但表达 GFP 的细胞在两个月后还可检测到 (图 7)。如下面实施

例中描述的,通过负链 RNA 病毒载体的感染可激活 DC。因此,用负链 RNA 病毒载体向 DC 导入基因的方法可在临床上用于疫苗接种。给药可以在体内或回体完成。体内维持长时间基因表达可以通过,例如,频繁地回体给予被该载体感染的 DC 来实现。

[0208] [实验 4]

[0209] 检测激活和感染效率。检测是否所述激活改变了载体的感染效率。将培养 7 天的 DC 用 LPS (1 μ g/ml) 刺激 2 天,用 SeV-GFP 以 30 的 MOI 感染,并在 2 天后用 FACS 分析 GFP。或者,SeV-GFP 感染 2 天后,在同样条件下完成 LPS 刺激 (2 天) (图 8 和 9)。

[0210] 结果:发现用 LPS 激活后接近 60% 的人 DC 为 % GFP 阳性。而在小鼠 DC 中,阳性率非常低 (结果未显示)。但是,MFI 在人类也非常低,显示激活后向 DC 导入基因的效率显著下降。而在载体导入后用 LPS 刺激不改变基因导入的效率。这些结果证明,对于用负链 RNA 病毒载体向 DC 导入基因,优选使用未成熟 DC,即未激活的 DC。

[0211] [实验 5]

[0212] 检测感染所需接触时间 (图 10)。结果证明在大约 30 分钟或更短时间内可以完成基因导入。

[0213] [实验 6]

[0214] 以前有报道称,通过向 CD34 细胞导入基因并诱导分化成 DC,可以成功制备导入了基因的 DC (J. Immunol. Meth. 2002 ;153-165)。对 SeV-GFP 使用相似的方法。使用 CD34 微珠将 CD34 阳性干细胞 (CD34 > 90%) 从人脐带血中分离。以 0, 10, 或 100 的 MOI 感染后,充分洗涤细胞。将细胞在添加了 SCF (50ng/ml), GM-CSF (500U/ml), 和 TNF- α (50ng/ml) 的 RPMI+10% FCS 中培养 3 天,然后,用添加了 SCF (50ng/ml), GM-CSF (500U/ml), IL-4 (250U/ml), 和 TNF- α (50ng/ml) 的培养基传代 (每 3-4 天更换一半培养基),并且在载体感染 13 天后检测 GFP 的表达。结果,基因导入效率达到 65% 至 70%,并制得了 GFP 表达效率与比其它载体更高的 DC。通过分析共刺激分子的表达,从感染的 DC 比从未感染的 DC 回收到更多激活的 DC。

[0215] 按照上述实施例,证明负链 RNA 病毒的导入效率远远高于慢病毒或逆转录病毒的导入效率,并且可以非常快速和容易地达到相当于腺病毒的效率。此外,发现用其它载体不改变激活标志;但是,用负链 RNA 病毒感染可以诱导 DC 的激活。

[0216] B. 评价诱导后的 DC 功能

[0217] [实验 1]:用 SeV-GFP 以 30-50 的 MOI 感染 DC。第二天,细胞用 LPS 刺激 (2 天),测定共刺激分子的表达。将单独 LPS 刺激、单纯 SeV-GFP 感染、和无 LPS 刺激也无 SeV-GFP 感染的条件作为对照,进行检测和对比。

[0218] 结果:所得结果证明,单纯 SeV 感染时发生 DC 激活。

[0219] 与 LPS 同等的:CD80 (+) HLA-DR (-) CD83 (-)

[0220] 高于 LPS:CD86 (+) CCR7 (-)

[0221] 低于 LPS:CD40 (-)

[0222] (+) 表示使用 LPS 和 SeV 可以获得协同效应。(图 13 至 15)

[0223] [实验 2]:用 SeV-GFP 以 30 的 MOI 感染 DC (一些组在感染后的第二天或感染后 3 天用 LPS 刺激)。按照与实验 1 相似的方法检测各组的吞噬活性 (使用 1 μ m PCV-RED 乳胶微囊。柱状图代表减去 4°C 阳性本底后的活性)。

[0224] 结果:如激活标志所示,发现用 SeV 感染的细胞由于激活而吞噬活性降低。特别是, GFP 表达水平越高,吞噬活性越低。因此,例如,当将肿瘤细胞裂解物用作 DC 上肿瘤抗原时,优选在负链 RNA 病毒载体导入 DC 之前将 DC 与该裂解物共培养(图 16 至 17)。

[0225] [实验 3]:为检测与 SeV 激活树突细胞有关的树突细胞产细胞因子能力,将培养 7 天获得的单核细胞源树突细胞 (MoDC) 在 12 孔板里培养 48 小时 ($8 \times 10^5/2\text{ml}/\text{孔}$;培养基添加 X-vivo15™, 2% 自体血清, GM-CSF (500U/ml), 和 IL-4 (250U/ml)), 培养条件见下文。用 Luminex™ 系统测定所得上清中 TNF- α , IL- β , IL-6 和 IL-8 的水平。用 SeV 以 MOI30 感染,将细胞培养 2 天。

[0226] 未刺激组:只用培养基的组;尿囊液组:SeV 悬液中添加 60 μl 鸡卵尿囊液(无 SeV)的组;UV-SeV-GFP 组:添加了经紫外线照射除去复制能力的 60 μl SeV-GFP 溶液的组;和 -SeV-GFP 组:添加了 60 μl SeV-GFP 溶液(有复制能力的 SeV)的组。

[0227] 结果:产生 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6,且只有在已被有复制能力的 SeV 导入了 GFP 的树突细胞中 IL-8 的生成增加(图 18)。树突细胞上 CD40, CD80, CD83, CD86, 和 HLA-DR 的表达只被有复制能力的 SeV 诱导(图 19 和 20)。这些结果表明,仅将 SeV 导入树突细胞,就可以诱导树突细胞中对免疫应答重要的促炎细胞因子的产生。另外还提示,不是向树突细胞导入基因时 SeV 与树突细胞膜上受体的接触,而是 SeV 感染后 SeV RNA 的扩增,对树突细胞的激活很关键。

[0228] [实验 4]:用 3000rad 射线照射 DC,检测同样实验组的 T 细胞激活能力。将(纯化的 ($\text{CD}3^+ > 95\%$) 异体 (allo) 或同基因 (syngenic) T 细胞与各种剂量的 DC 共培养 3 天)。使用同基因 T 细胞作为对 SeV-GFP 应答的指示剂。

[0229] 结果:由于 DC 比例低且 T 细胞数少,差别相当不明显。虽然如此,发现单独 SeV 感染刺激异体 T 细胞的效应与 LPS 等效(图 21)。也可以用未经射线照射的 DC。

[0230] C. 癌抗原特异性 CTL 的诱导

[0231] 使用上述 A 章节中的方法,从人外周血 (HLA-A 0201 健康供体) 富集 $\text{CD}14^+$ 细胞,用 x-vivo 15™ (Cambrex)+2% 自体血清添加 GM-CSF (500U/ml) 和 IL-4 (250U/ml) 作为培养基,制备未成熟的树突细胞(每 3-4 天更换一半培养基)。将所得未成熟树突细胞分成以下三组,然后在有 GM-CSF (500U/ml) 和 IL-4 (250U/ml) 的情况下培养 48 小时:

[0232] 1 组:无添加;2 组:用 SeV-GFP (MOI 30) 感染;和 3 组:用细胞因子混合物 (50ng/ml IL-1 β , 500ng/ml IL-6, 2500U/ml IFN- α , 100ng/ml TNF- α , 和 20 μM PGE2) 刺激。

[0233] 接下来,回收树突细胞并用 MART-1 肽脉冲 (EAAGIGILTV (SEQ ID NO:9); 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 持续 3 小时)。通过阴性选择,从提供树突细胞的同一个健康供体的外周血中富集 T 细胞 ($\text{CD}3^+ > 97\%$),与上述三组经过肽脉冲的树突细胞共培养 7 天 (X-vivo 15™+2% 自体血清)。每 3-4 天或当培养基变黄时更换一半培养基。在第一次刺激时,将 T 细胞和树突细胞在缺乏 IL-2 的情况下共培养,从第三天开始添加 100U/ml IL-2)。将该处理重复 2 次。从每种混合培养液中回收细胞,用作 CTL 实验的效应细胞。

[0234] 用 T2 细胞 (TAP 缺陷细胞系,一种 T 细胞-B 细胞杂交瘤,从 HLA-A2 $^+$ 供体获得) 作靶细胞。这些细胞缺乏 TAP (I 类的转运物蛋白),因此不能将胞质蛋白水解产生的肽转移至 I 类。因此,当外源添加肽时,肽负载在 I 类上使 I 类表达。用 MART-1 肽变体 (ELAGIGILTV (SEQ ID NO:10); 一种与上述刺激中所用肽相比具有较强 HLA-A2 结合

能力而 T 细胞受体识别位点无改变的肽),或者用流感肽 (Flu;一种作为第三实体的肽; GILGFVFTL (SEQID NO:11)) 脉冲靶细胞,并用 Cr 标记。将上述三组的效应 T 细胞,与两类靶细胞中的任一类,以 20 : 1,10 : 1,5 : 1 或 2.5 : 1 共培养 4 小时,以检测 CTL 活性。

[0235] 该实验中的联用简述如下。

效应细胞	靶细胞	图中的符号
1 组的效应 T 细胞	MART1 肽变体+ T2 细胞	实心方块的实线
2 组的效应 T 细胞	MART1 肽变体+ T2 细胞	实心三角的实线
[0236] 3 组的效应 T 细胞	MART1 肽变体+ T2 细胞	实心倒三角的实线
1 组的效应 T 细胞	Flu 肽+ T2 细胞	实心菱形的虚线
2 组的效应 T 细胞	Flu 肽+ T2 细胞	实心圆圈的虚线
3 组的效应 T 细胞	Flu 肽+ T2 细胞	空心方块的虚线

[0237] 结果 :在上述三组中,当用未激活的 DC (MART1 肽+) 刺激 T 细胞时不能诱导 MART-1 特异性 CTL。但是,作为阳性对照,当用经过细胞因子激活 (在目前抗肿瘤免疫的树突细胞治疗中最强的激活细胞的方法) 的树突细胞来刺激 T 细胞时,可以诱导 MART-1 特异性 CTL (当在所述刺激中,用 MART-1 肽代替 MART-1 变体肽来脉冲所述靶时,获得相似结果)。当使用经 SeV 导入基因的树突细胞时,获得了相当于阳性对照的 CTL 活性 (图 22)。具体地,当用 CTL 实验进行测定时,显示树突细胞被单独的 SeV 感染激活,并且它们能在体外以与细胞因子激活的树突细胞相同的水平诱导 CTLs。当将 Sev 用于 T 细胞激活时,靶基因导入的同时可以完成激活,其不需加入激活因子 (例如细胞因子),并且因此降低费用,节省时间且保持细胞活力。

[0238] D. 免疫刺激性细胞因子基因的导入效应

[0239] 体内检测是否 SeV 激活的树突细胞发挥抗肿瘤免疫效应。将只以极低水平表达 MHC I 类分子并展现较弱免疫原性的 B16 黑素瘤移植模型用作肿瘤模型。用 C57BL/6 小鼠 (6 周龄 -8 周龄 ;雌性) (CHARLES RIVER JAPAN, INC.) 作肿瘤模型小鼠,并从 C57BL/6 小鼠 (8- 周龄 ;雌性) (CHARLES RIVER JAPAN, INC.) 收集树突细胞。从 C57BL/6 小鼠股骨收集的骨髓获得树突细胞 ;用 SpinSep™、小鼠造血祖细胞富集混合物 (抗 CD5 抗体、抗 CD45R 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 TER119 抗体、抗 7/4 抗体 ;Stem Cell technology) 去除 T 细胞 ;然后添加 IL-4 和 GM-CSF 培养细胞一周。在第 0 天,将 1×10^5 /100 μ L 的 B16 黑素瘤细胞皮下 (s. c.) 注射到小鼠的腹部。在第 10 天,17 天和 24 天,将未经刺激激活的树突细胞,用 LPS 激活的树突细胞 (LPS DC) 或通过导入 SeV-GFP 或表达小鼠干扰素 β 的 SeV-IFN β 而激活的树突细胞 (分别为 SeV GFP DC 和 SeV IFN β DC) 在肿瘤周围区域给药。同时地,进行另一个实验,其中将树突细胞在用肿瘤抗原 (冻融 B16 细胞所得肿瘤裂解物) 脉冲后给药。除了这些实验,将 SeV-IFN β 在肿瘤注射 10 天后 (第 10 天) 直接瘤内注射以检测抗肿瘤作用。

[0240] 用 SeV-IFN β 以 MOI 40 感染如上述培养一周的树突细胞,并将细胞培养 8 小时,从而将 SeV 导入树突细胞。当用肿瘤抗原脉冲树突细胞时,将如上述培养一周的树突细胞回收,并用肿瘤裂解物作为肿瘤抗原进行脉冲 (DC : 肿瘤裂解物 = 1 : 3),培养 18 小时,用

SeV-IFN β 以 40 的 MOI 感染,并培养 8 小时。然后,回收这些树突细胞,以 5×10^5 至 10×10^5 个细胞的细胞数在小鼠肿瘤周围区域给药。

[0241] 如图 23 所示,将 SeV-IFN β 直接瘤内注射后,肿瘤生长被抑制 2 周。但是,此后,肿瘤再生长明显。当使用 DC/SeV-GFP 时,可以观察到明显的抗肿瘤作用,在用 DC/LPS 处理的小鼠和用 DC/SeV-IFN β 处理的小鼠中,观察到最强的肿瘤抑制。

[0242] 详细检测上述每个治疗组的抗肿瘤作用。为测定自然杀伤 (NK) 细胞活性,在第三轮 DC 治疗结束后 7 天将上述每个治疗组的小鼠的脾切下以制备效应细胞。用 Yac-1 作为靶进行 ^{51}Cr 释放实验。进一步,为测定 T 淋巴细胞的细胞毒活性,将上述 NK 细胞活性试验剩余的脾细胞用 TRP-2 肽 (一种 B16 肿瘤抗原) 培养 5 天以用作效应细胞。将效应细胞与已被 mTRP-2 肽脉冲的 EL-4 靶细胞共培养,然后进行 ^{51}Cr 释放实验。特异性 ^{51}Cr 释放率计算如下:

[0243]
$$[(\text{样品 (cpm)} - \text{自发发射 (cpm)}) / (\text{最大发射 (cpm)} - \text{自发发射 (cpm)})] \times 100$$

[0244] 其中,最大发射用经 1% triton X 保温的靶细胞判定,而自发发射用经单独的培养基保温的靶细胞判定。

[0245] 自然杀伤 (NK) 细胞的激活只在直接用载体注射的小鼠检测到,在树突细胞注射组没有检测到 (图 24)。而细胞毒 T 淋巴细胞 (CTLs) 的激活在 DC/LPS 处理组和用 DC/SeV-IFN β 处理的小鼠中最强,在 DC/SeV-GFP 处理组略低,在 SeV-IFN β 直接注射组未检测到 (图 25)。肿瘤裂解物脉冲对肿瘤生长和 CTL 应答均无明显影响。因此证明,使用已借助 SeV 导入了免疫刺激性细胞因子的树突细胞进行肿瘤免疫治疗,可发挥抗肿瘤治疗作用。还发现,尽管 DC/LPS 处理组和 DC/SeV-IFN β 处理组的 CTL 活性略有差异,但它们的抗肿瘤作用是同等的。由于直接注射 IFN β 表达载体诱导的抗肿瘤作用的机制与经树突细胞表达 IFN β 所诱导的不同,因此预计将它们联用更有效。

[0246] 工业应用性

[0247] 本发明有利于对树突细胞进行有效基因导入。优选本发明载体诱导抗病毒、细菌等等的保护性免疫,以及用在抗肿瘤免疫治疗等等中。由于树突细胞具有强的诱导免疫的能力,因此可以通过使用本发明的方法,将目的抗原基因或免疫激活基因导入树突细胞,来制备能诱导抗原特异性细胞免疫作用的 DC 疫苗。

序列表

<110> 株式会社载体研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)

<120> 制备导入了基因的树突细胞的方法

<130>D3-A0307Y1P

<140>

<141>

<150>JP 2003-374808

<151>2003-11-04

<160>15

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>10

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>1

ctttcaccct

10

<210>2

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>2

tttttcttac tacgg

15

<210>3

<211>18

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210>4

<211>18

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>4

atgcatgccg gcagatga

18

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>5

gttgagtact gcaagagc

18

<210>6

<211>42

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>6

tttgccggca tgcattgtttc ccaaggggag agttttgcaa cc 42

<210>7

<211>18

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>7

atgcatgccg gcagatga 18

<210>8

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的序列

<400>8

tgggtgaatg agagaatcag c 21

<210>9

<211>10

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽

<400>9

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1

5

10

<210>10

<211>10

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽

<400>10

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210>11

<211>9

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽

<400>11

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210>12

<211>561

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221>CDS

<222> (1).. (561)

<223>

<220>

<221>sig_peptide

<222> (1).. (21)

<223>

<400>12

atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc	48
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser	
1 5 10 15	
act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga	96
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg	
20 25 30	
agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg	144
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg	
35 40 45	
ctt gaa tat tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag	192
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu	
50 55 60	
att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc	240
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile	
65 70 75 80	
tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct	288
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser	
85 90 95	
agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc	336
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val	
100 105 110	
tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag	384
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu	
115 120 125	
aaa gaa gat ttt acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa	432
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys	
130 135 140	
aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt	480
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser	
145 150 155 160	
cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac	528
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr	
165 170 175	
ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac	561
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn	
180 185	

<210>13

<211>187

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>13

```

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1           5           10           15
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
          20           25           30
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
          35           40           45
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
          50           55           60
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
65           70           75           80
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
          85           90           95
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
          100          105          110
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
          115          120          125
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
          130          135          140
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145          150          155          160
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
          165          170          175
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
          180          185

```

<210>14

<211>546

<212>DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (546)

<223>

<220>

<221>sig_peptide

<222>(1).. (21)

<223>

<400>14

atg aac aac agg tgg atc ctc cac gct gcg ttc ctg ctg tgc ttc tcc	48
Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser	
1 5 10 15	
acc aca gcc ctc tcc atc aac tat aag cag ctc cag ctc caa gaa agg	96
Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg	
20 25 30	
acg aac att cgg aaa tgt cag gag ctc ctg gag cag ctg aat gga aag	144
Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys	
35 40 45	
atc aac ctc acc tac agg gcg gac ttc aag atc cct atg gag atg acg	192
Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr	
50 55 60	
gag aag atg cag aag agt tac act gcc ttt gcc atc caa gag atg ctc	240
Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu	
65 70 75 80	
cag aat gtc ttt ctt gtc ttc aga aac aat ttc tcc agc act ggg tgg	288
Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp	
85 90 95	
aat gag act att gtt gta cgt ctc ctg gat gaa ctc cac cag cag aca	336
Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr	
100 105 110	
gtg ttt ctg aag aca gta cta gag gaa aag caa gag gaa aga ttg acg	384
Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr	
115 120 125	
tgg gag atg tcc tca act gct ctc cac ttg aag agc tat tac tgg agg	432
Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg	
130 135 140	
gtg caa agg tac ctt aaa ctc atg aag tac aac agc tac gcc tgg atg	480
Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met	
145 150 155 160	

gtg gtc cga gca gag atc ttc agg aac ttt ctc atc att cga aga ctt 528
 Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175
 acc aga aac ttc caa aac 546
 Thr Arg Asn Phe Gln Asn
 180

<210>15

<211>182

<212>PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400>15

Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
 20 25 30
 Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
 35 40 45
 Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
 50 55 60
 Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
 65 70 75 80
 Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
 85 90 95
 Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
 100 105 110
 Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
 115 120 125
 Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
 130 135 140
 Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
 145 150 155 160
 Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175
 Thr Arg Asn Phe Gln Asn
 180

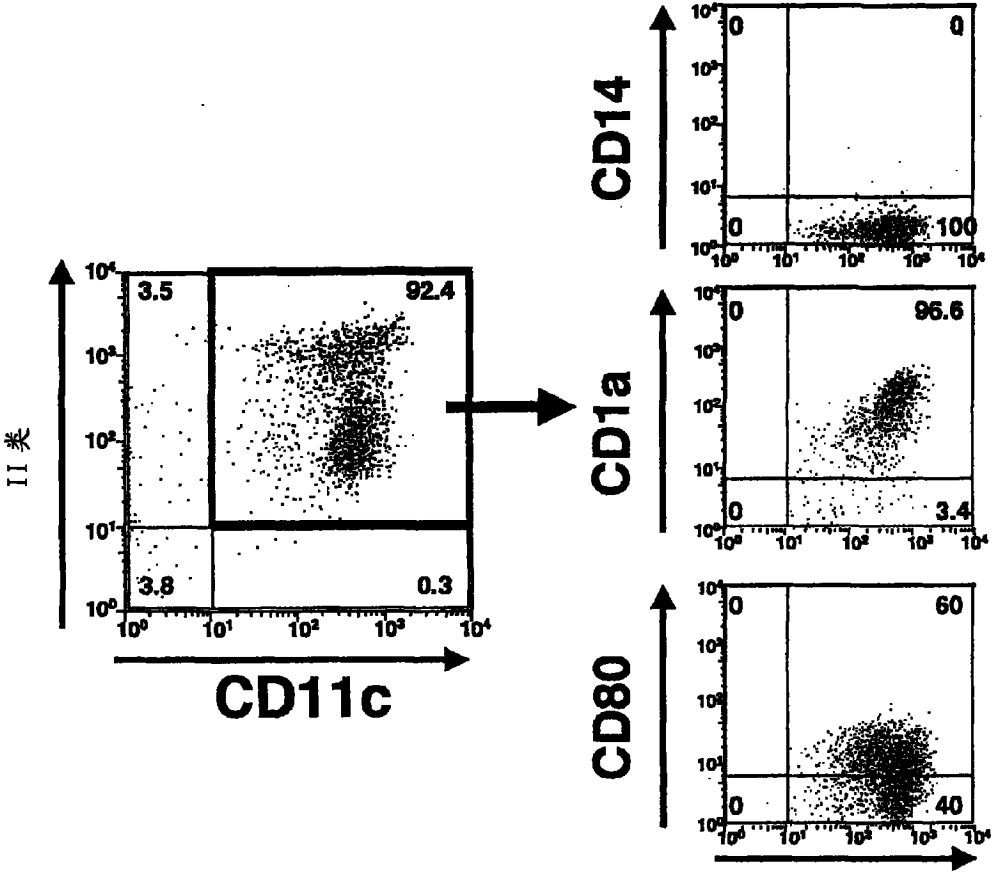
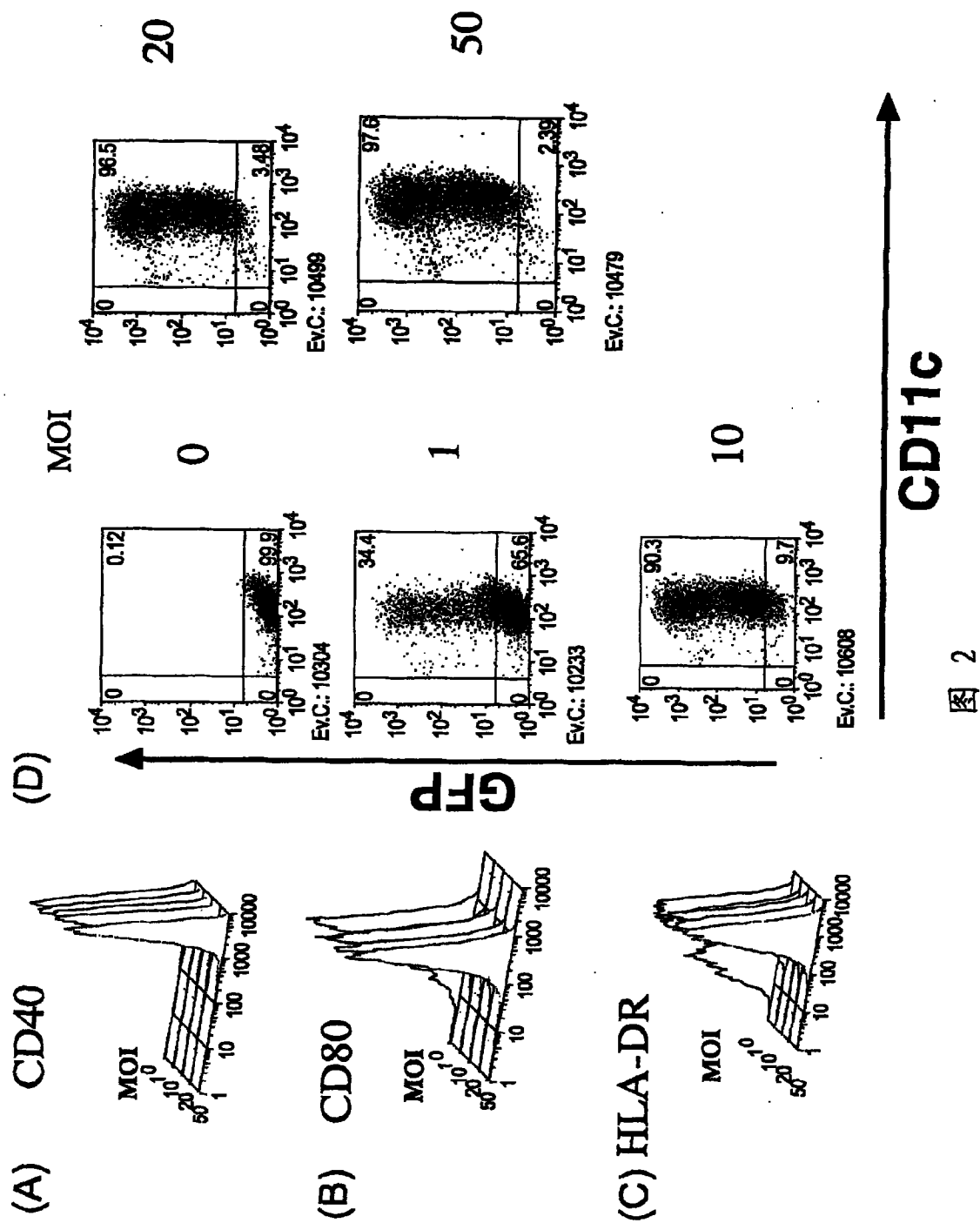


图 1



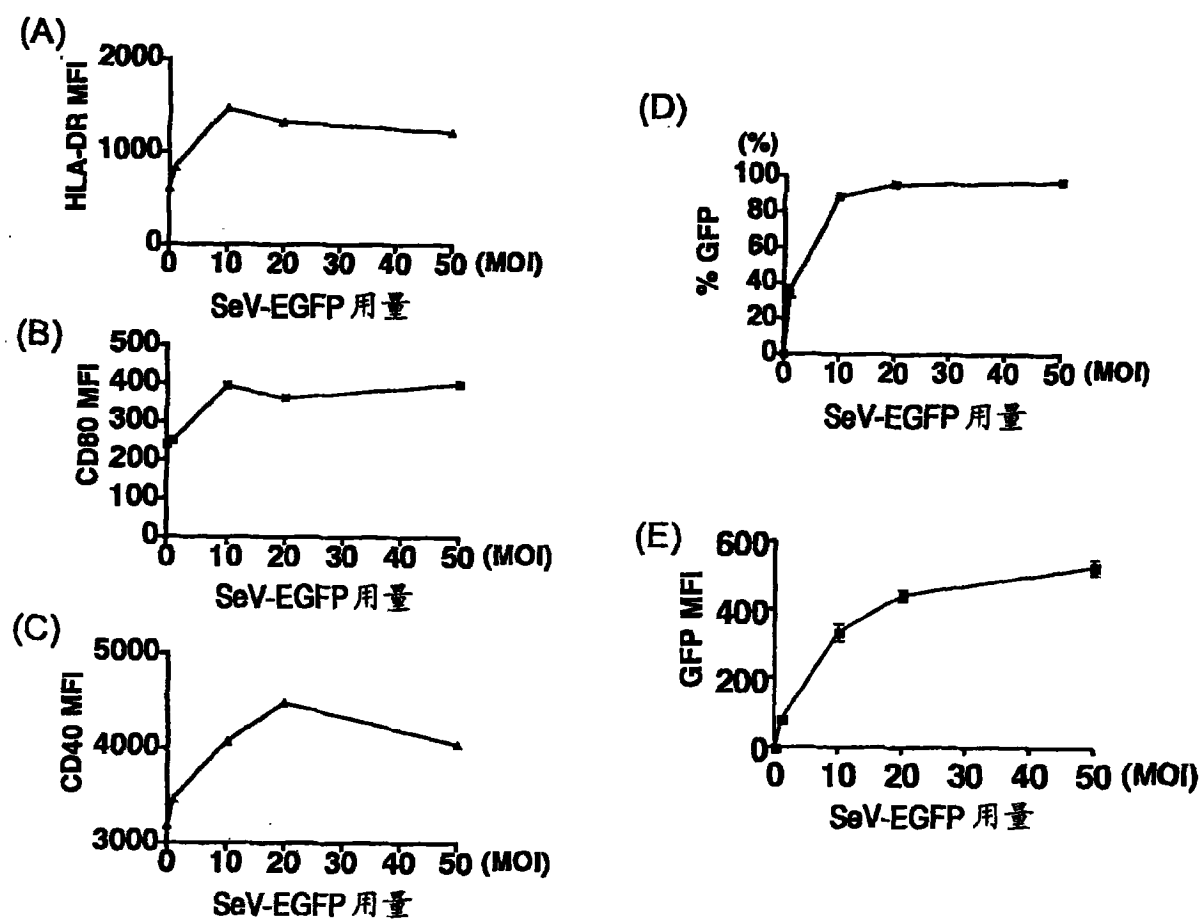


图 3

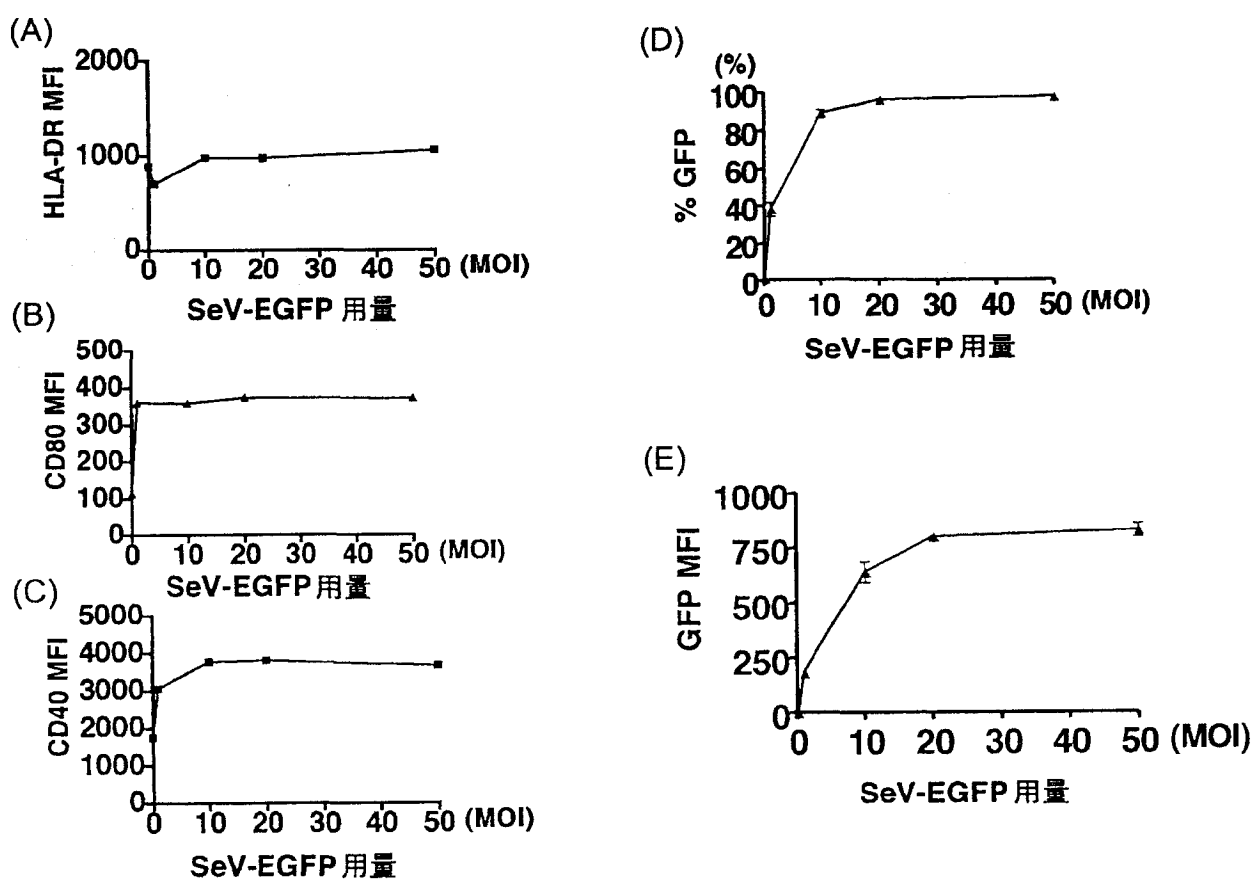


图 4

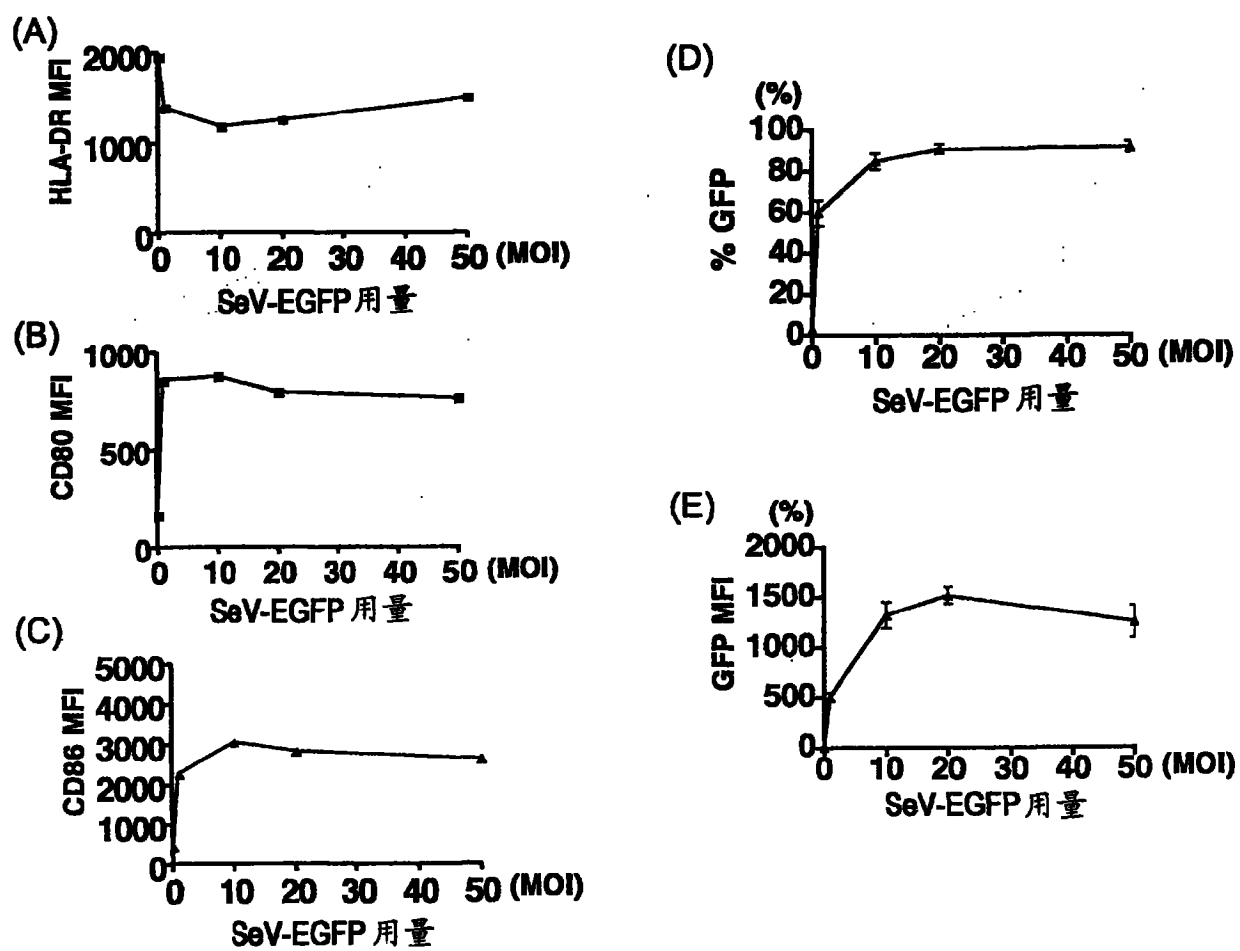


图 5

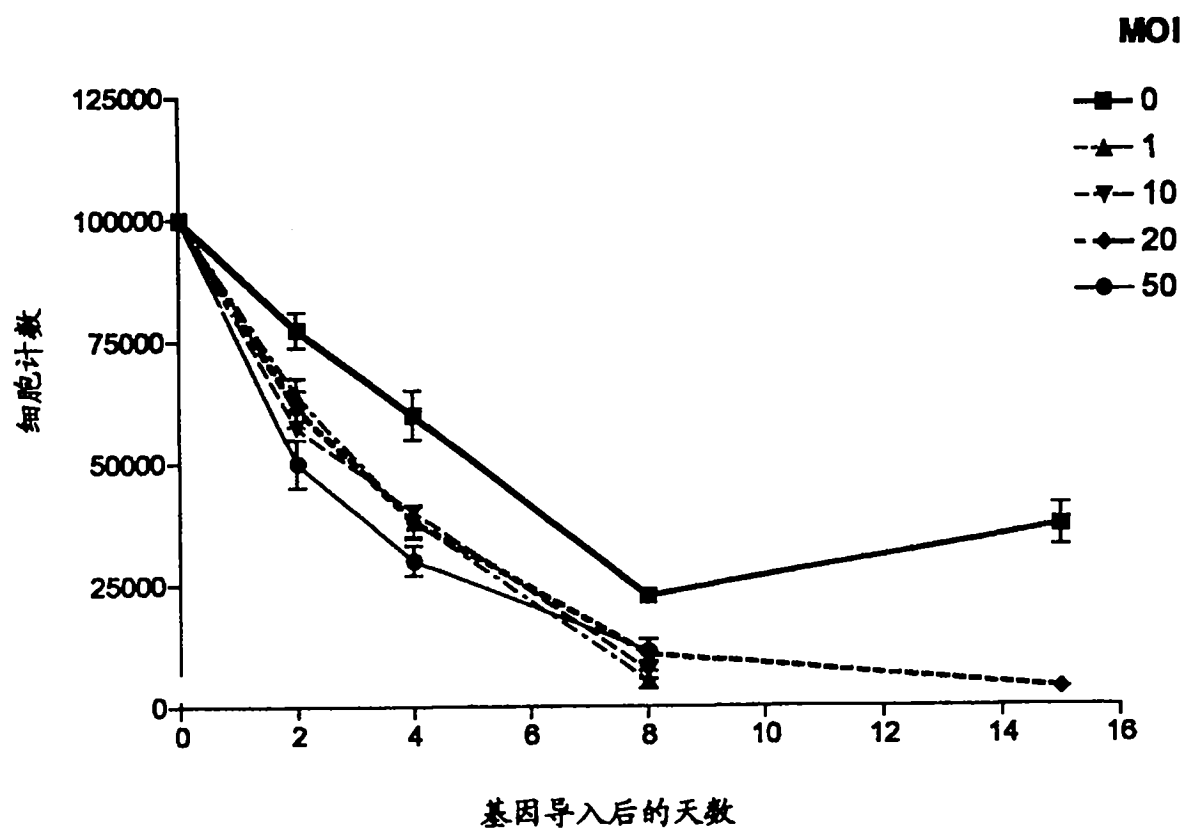


图 6

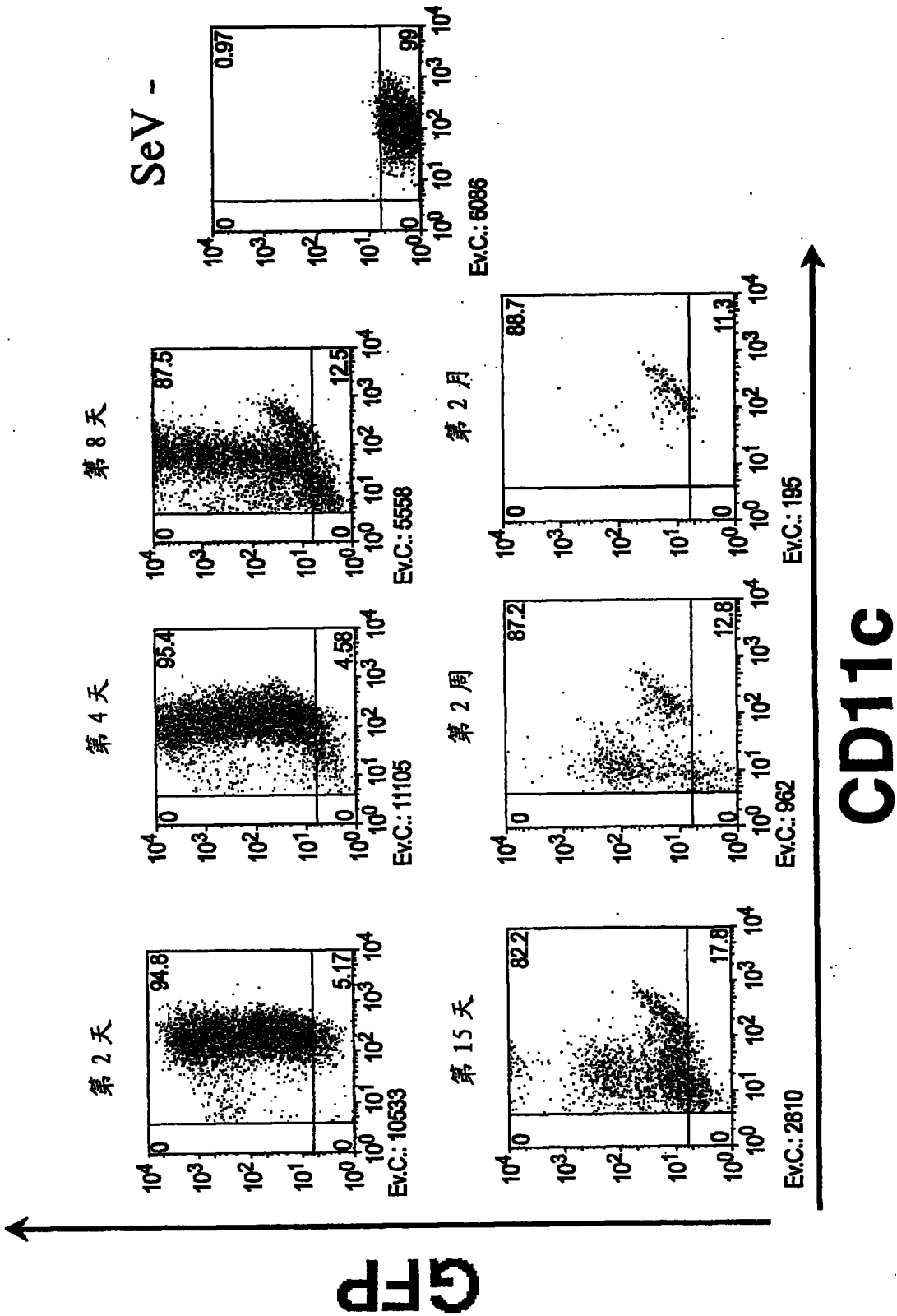


图 7

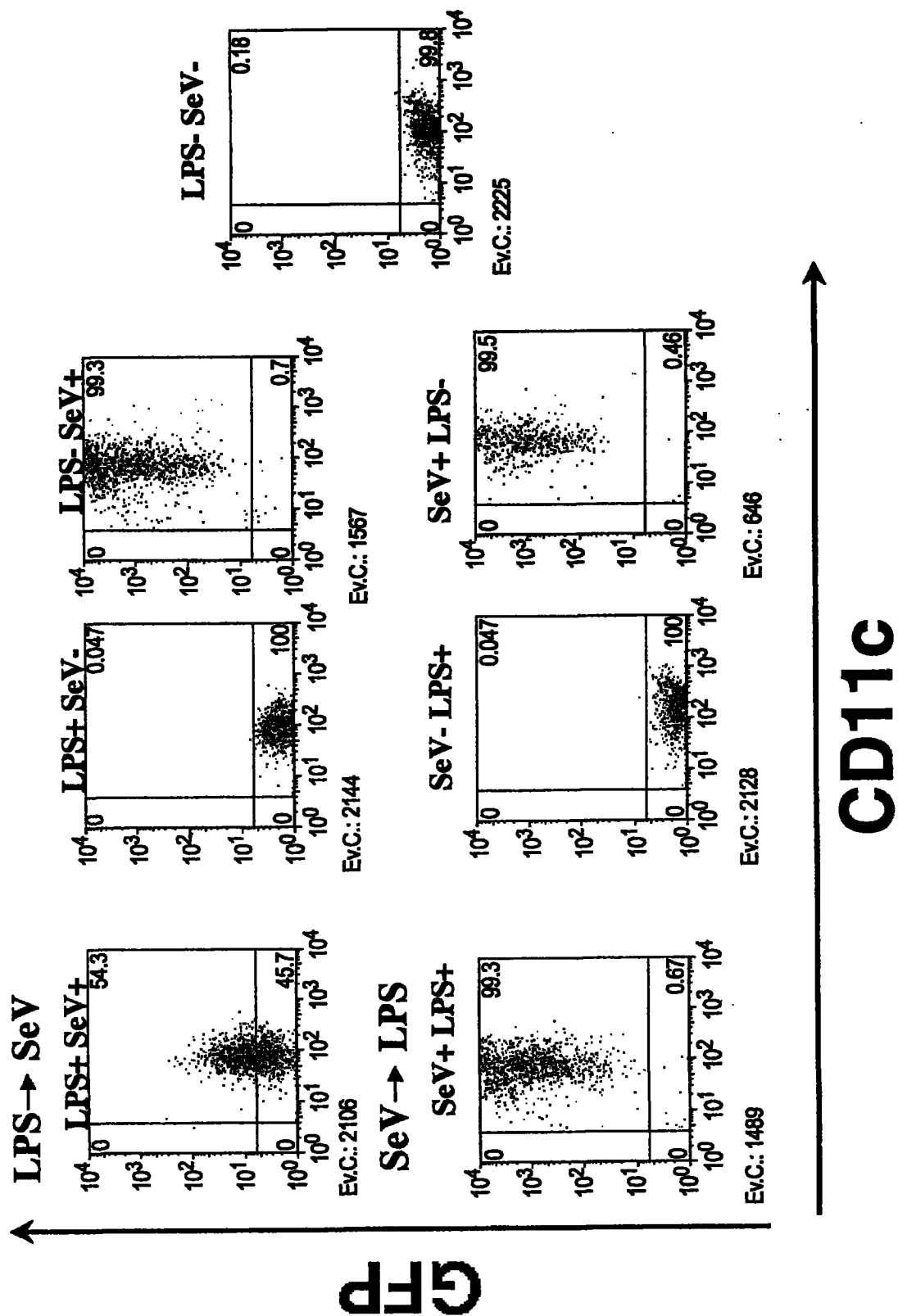


图 8

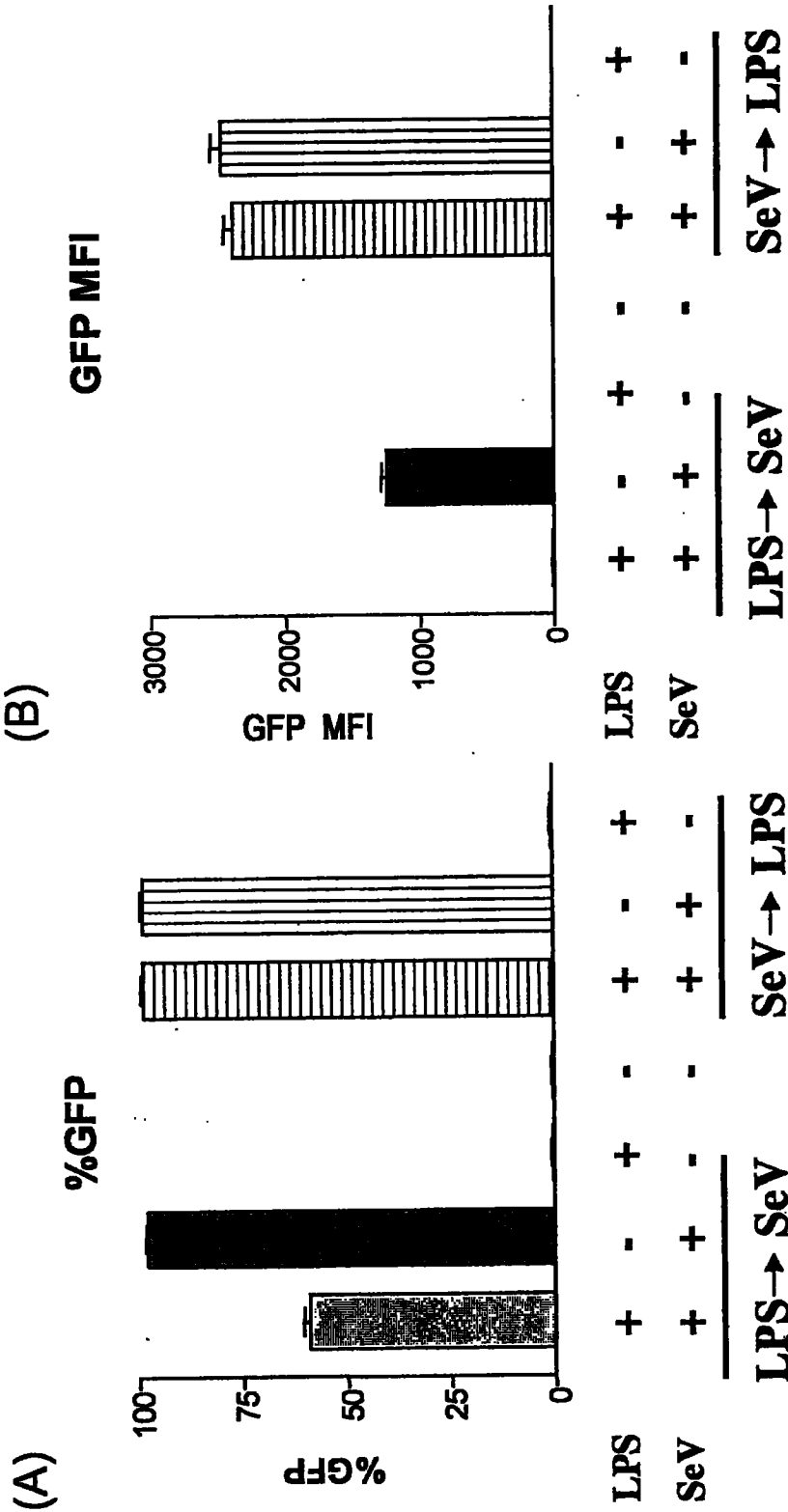


图 9

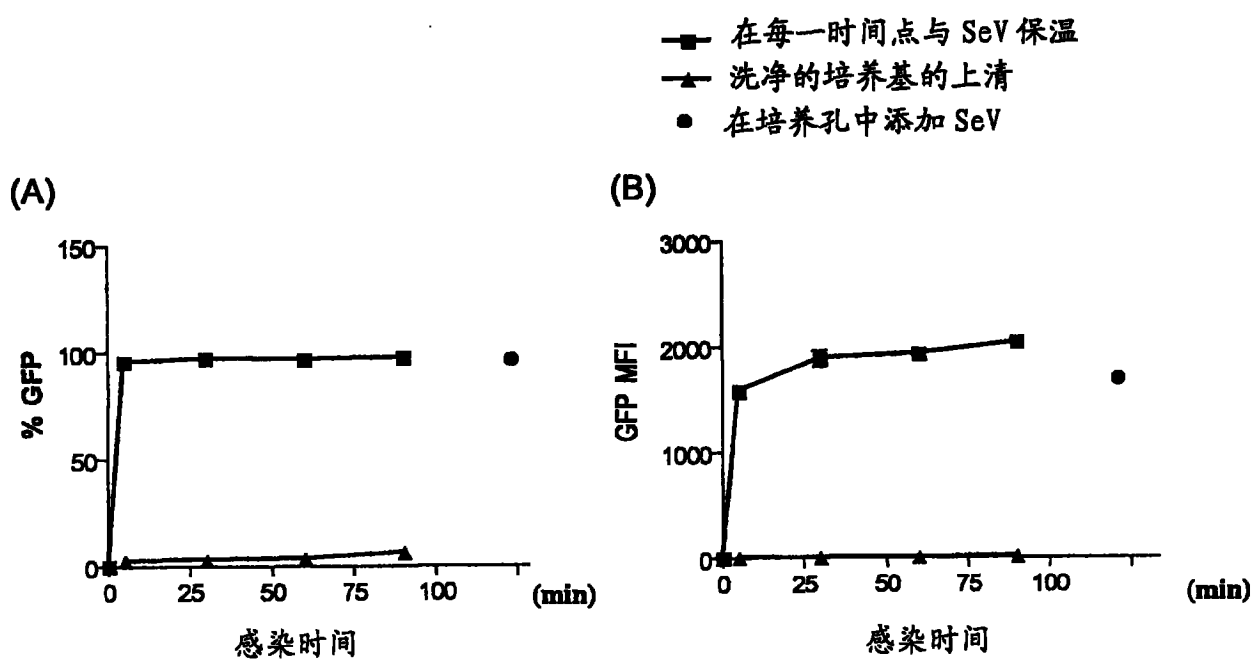


图 10

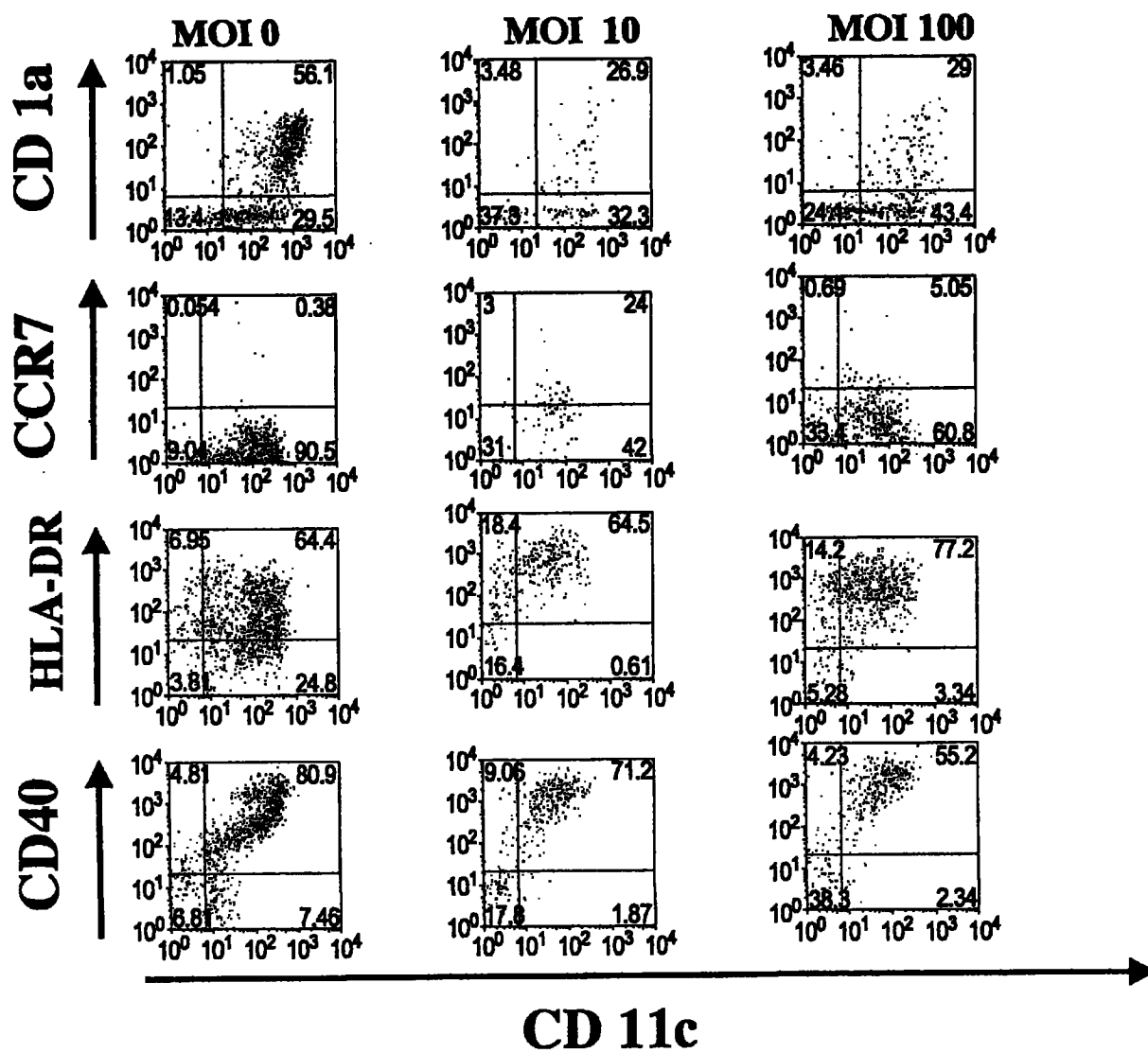


图 11

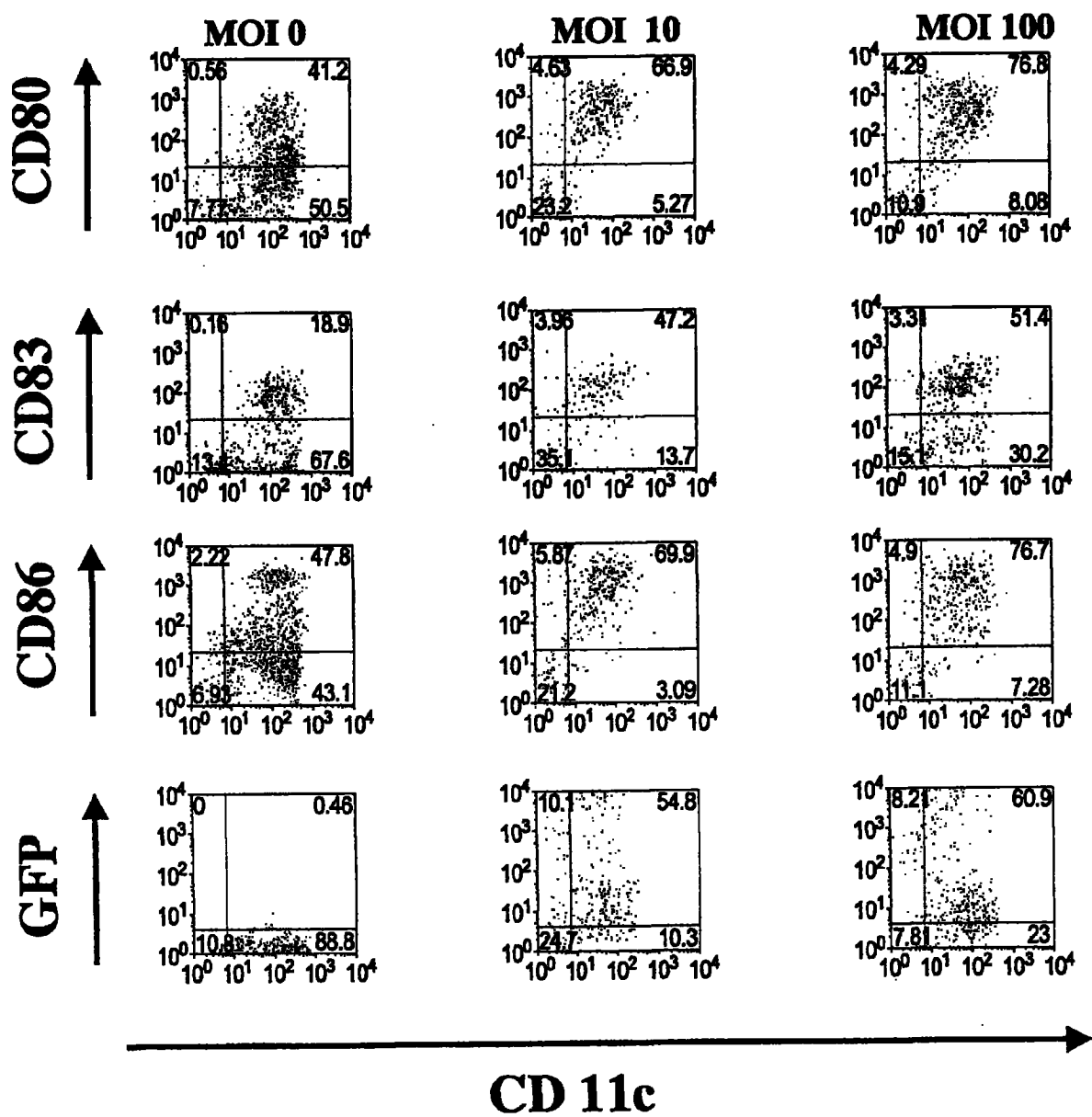


图 12

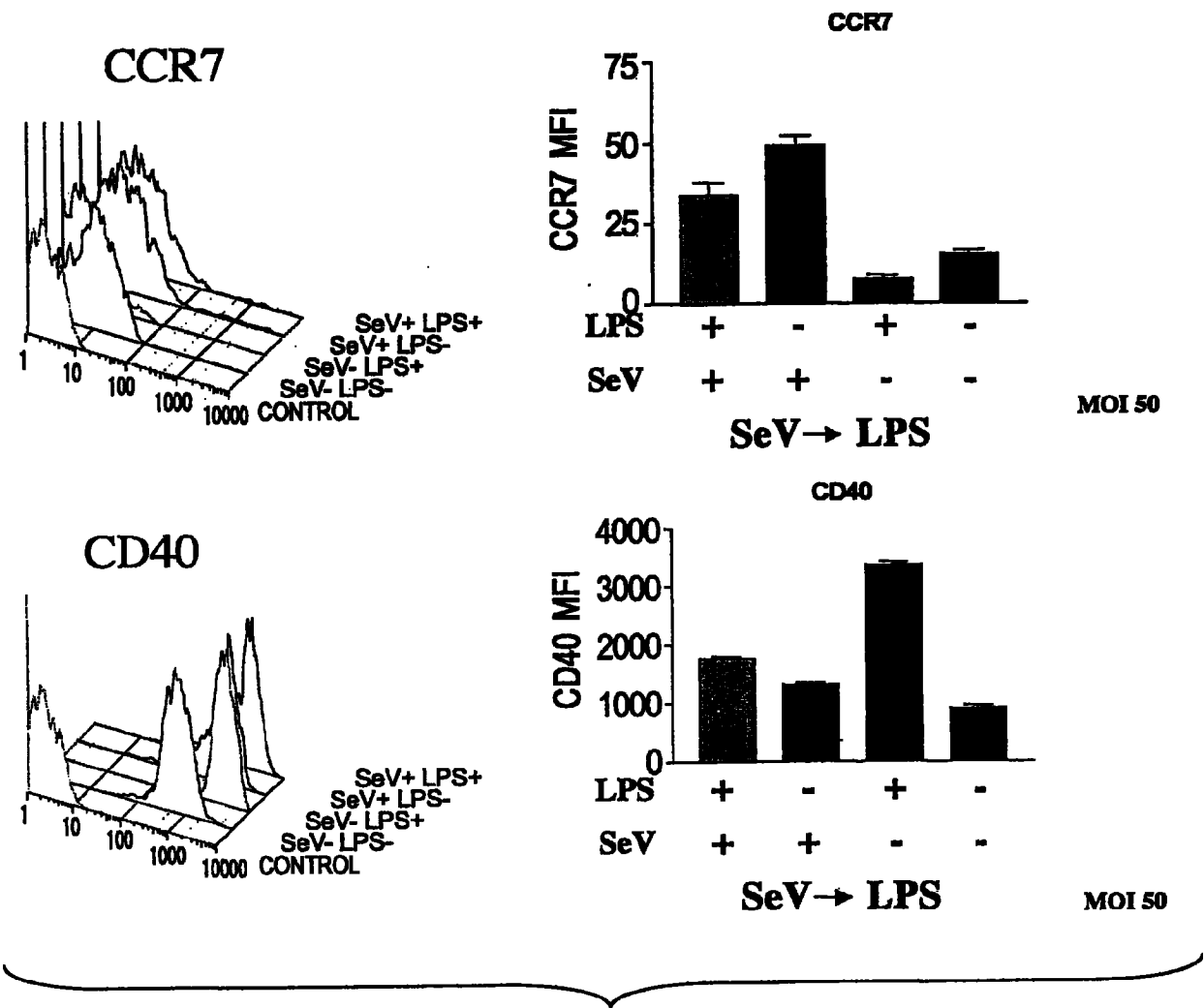


图 13

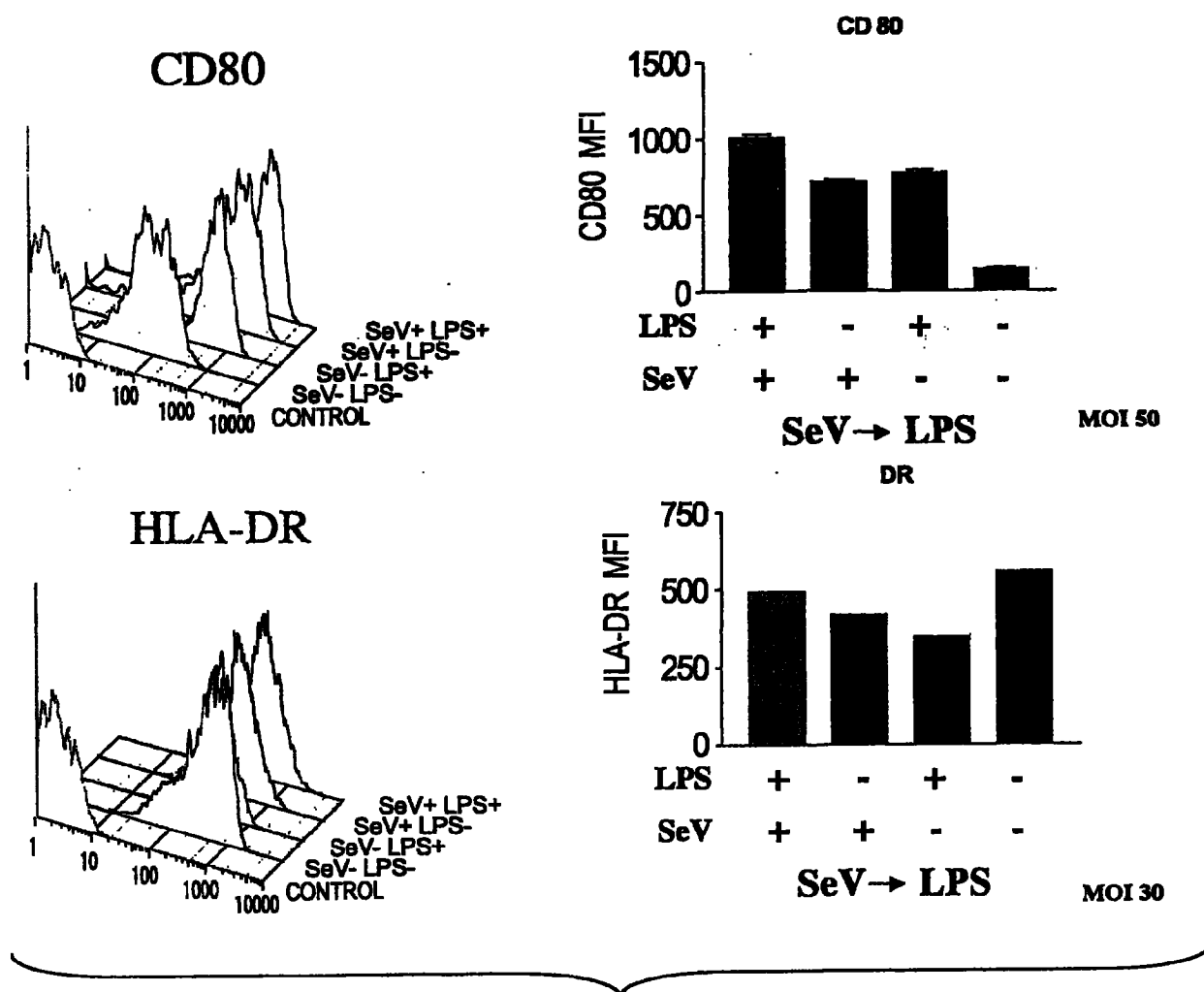


图 14

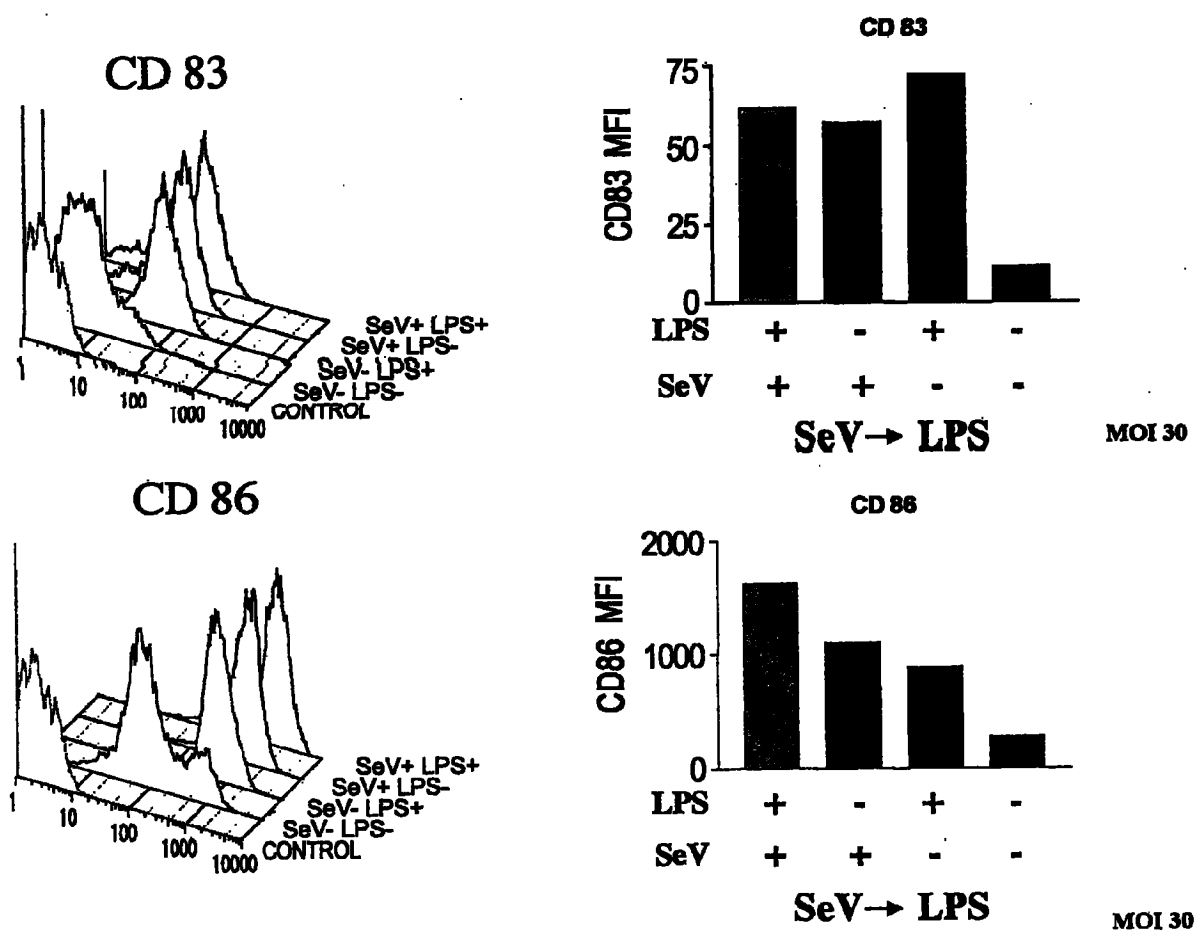


图 15

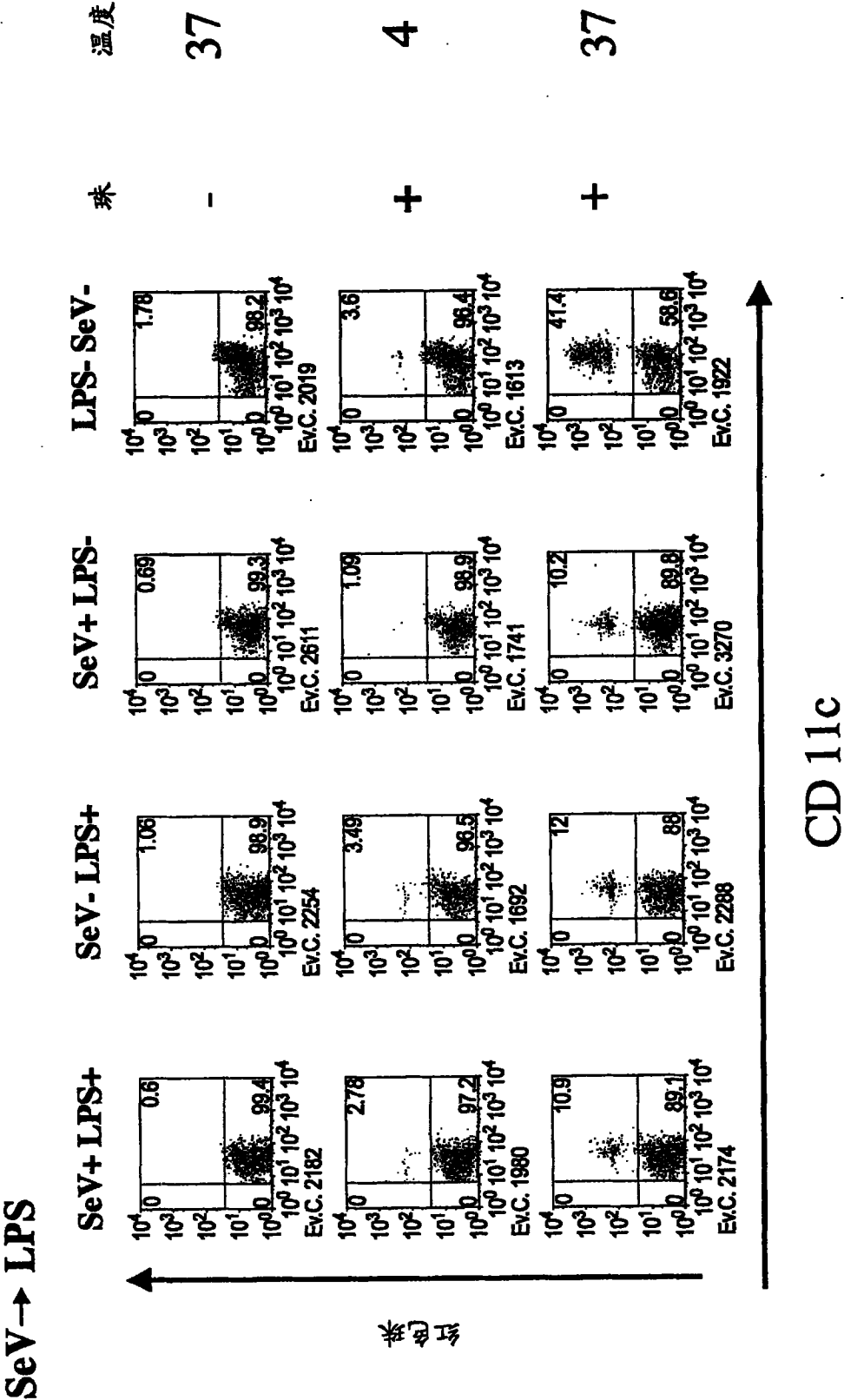


图 16

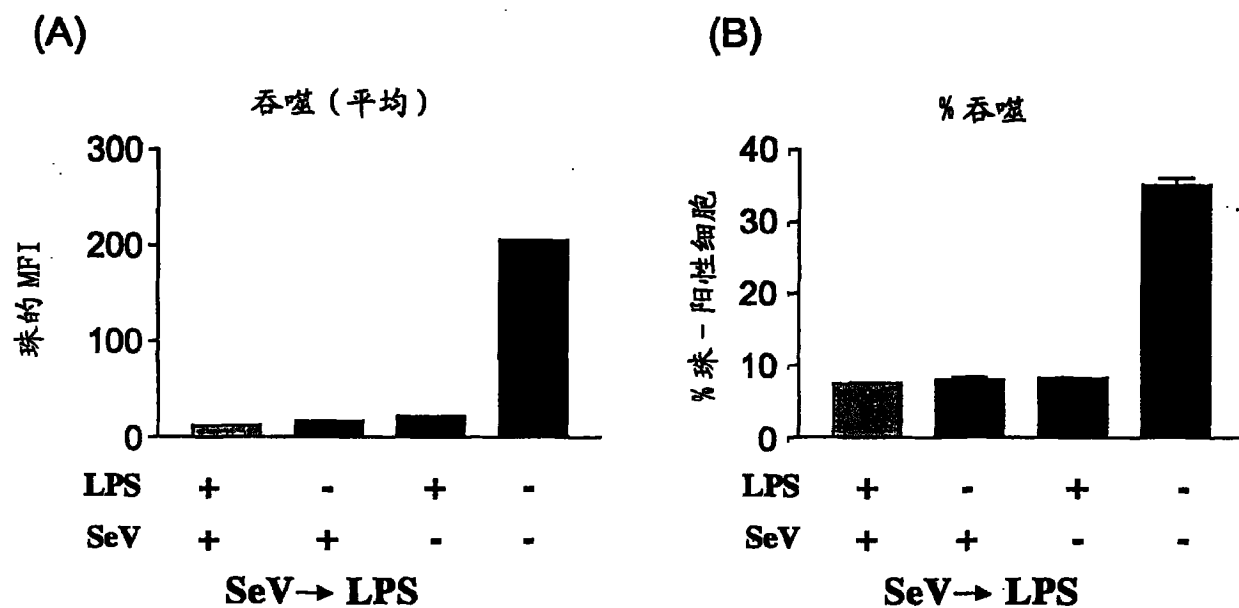


图 17

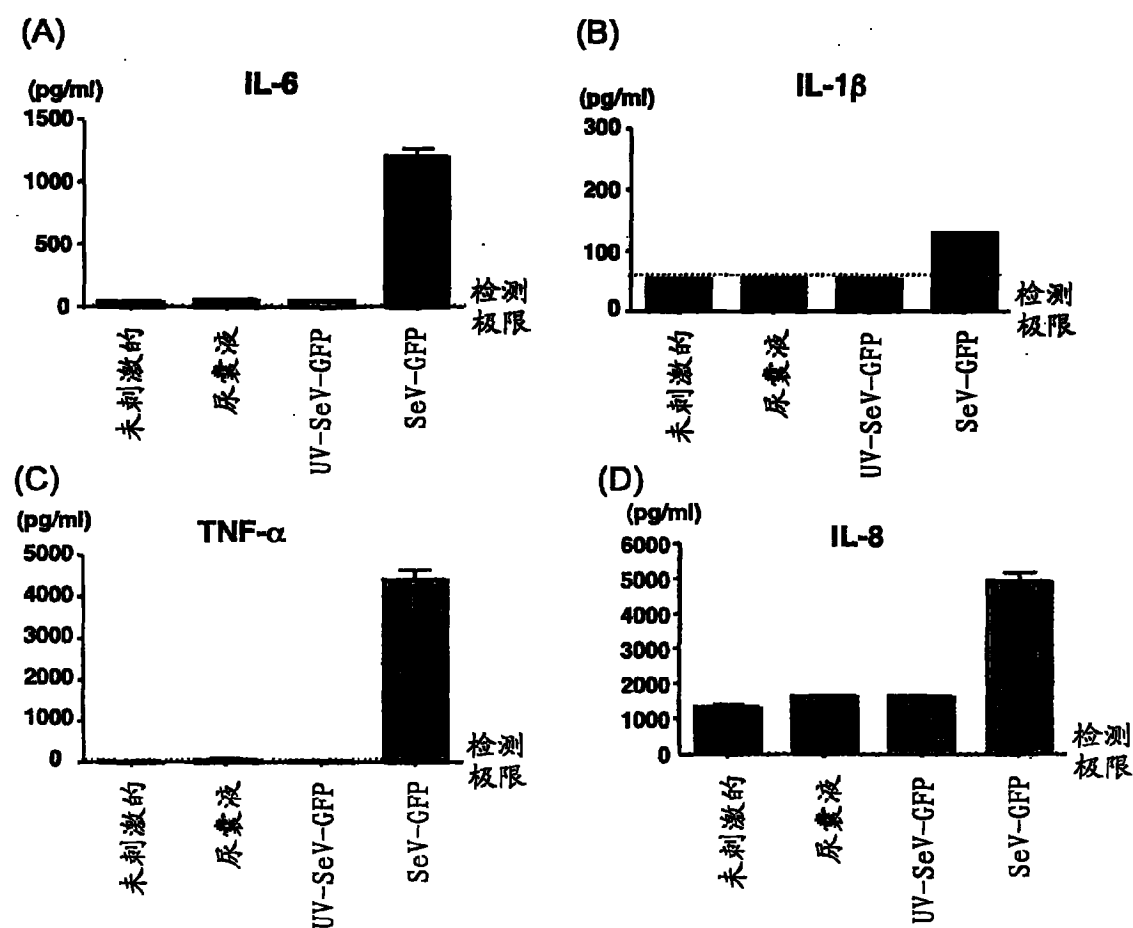


图 18

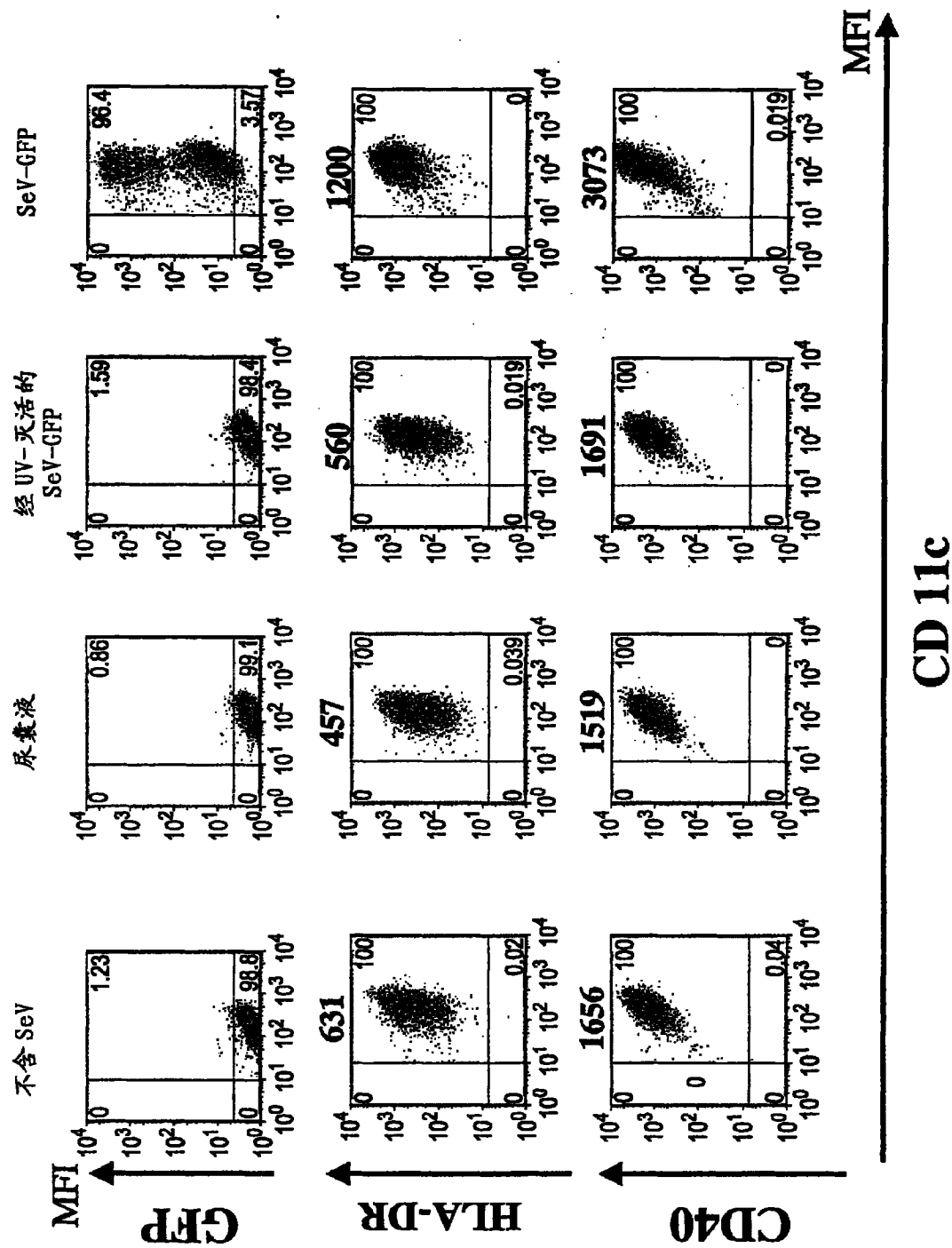


图 19

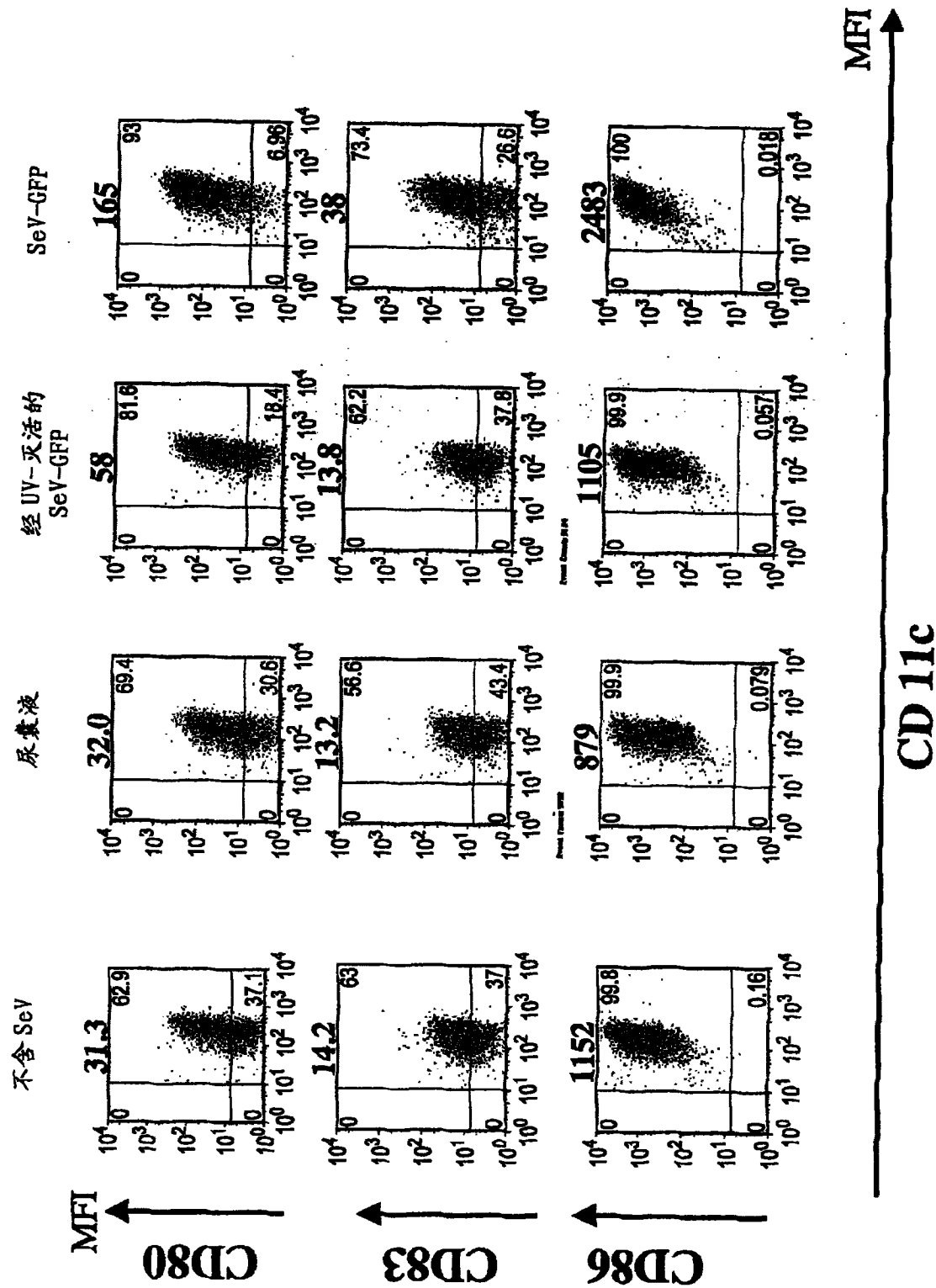


图 20

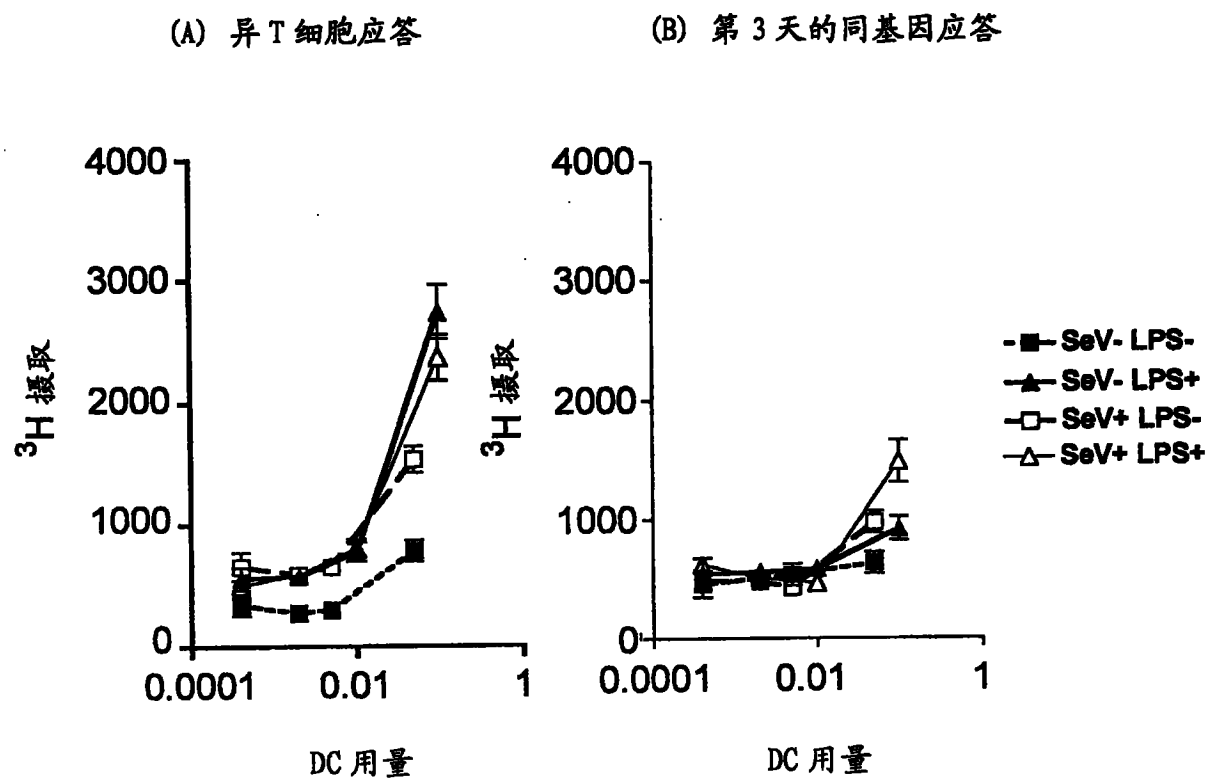


图 21

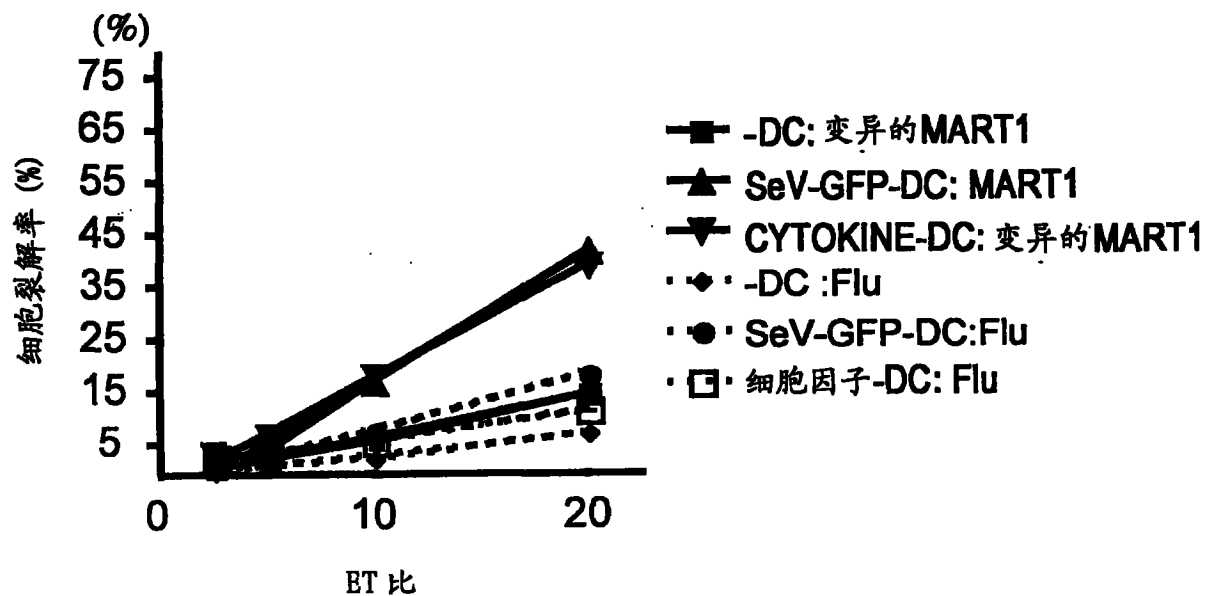


图 22

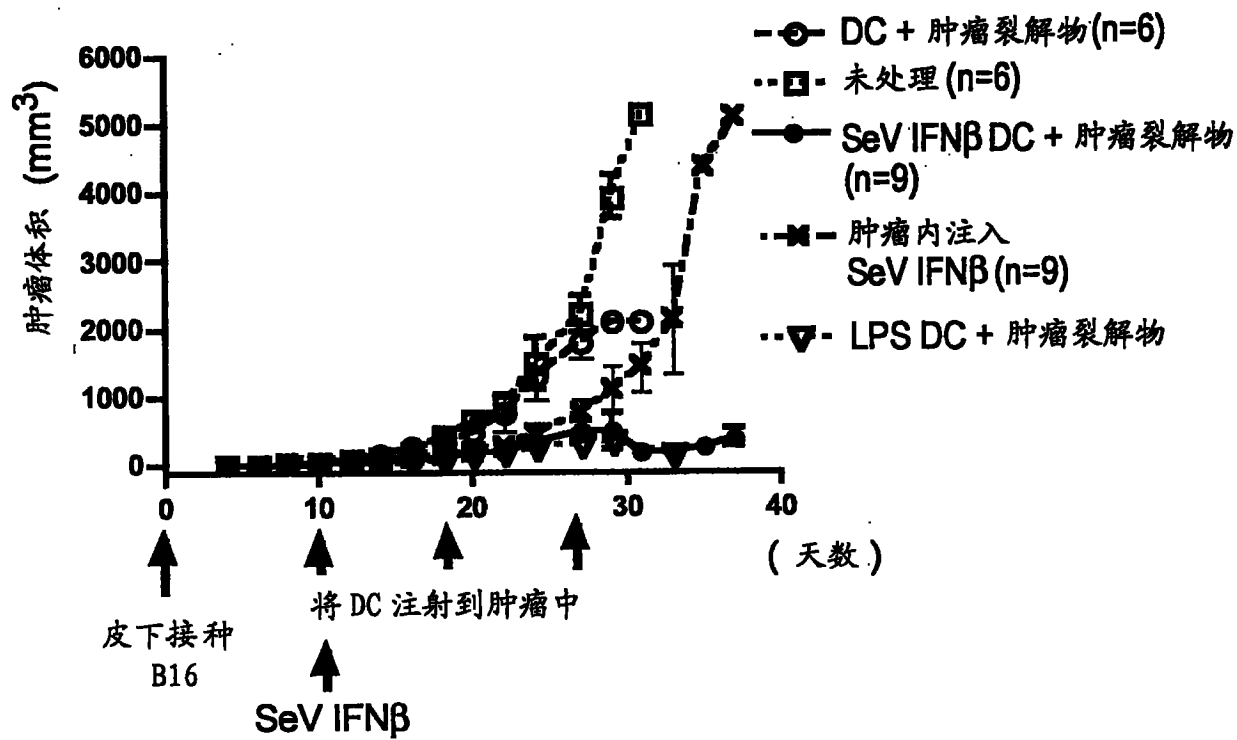


图 23

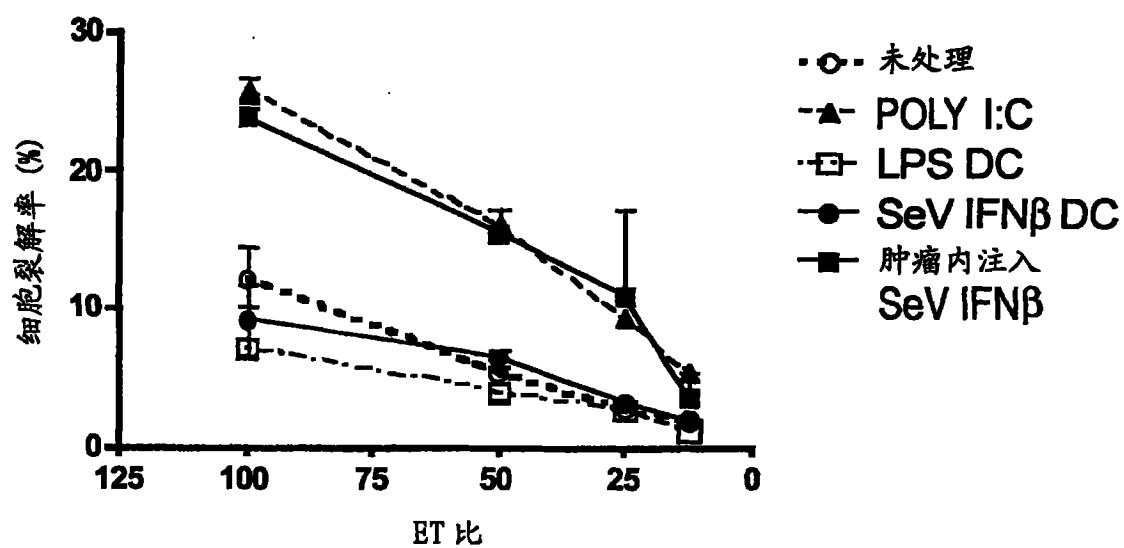


图 24

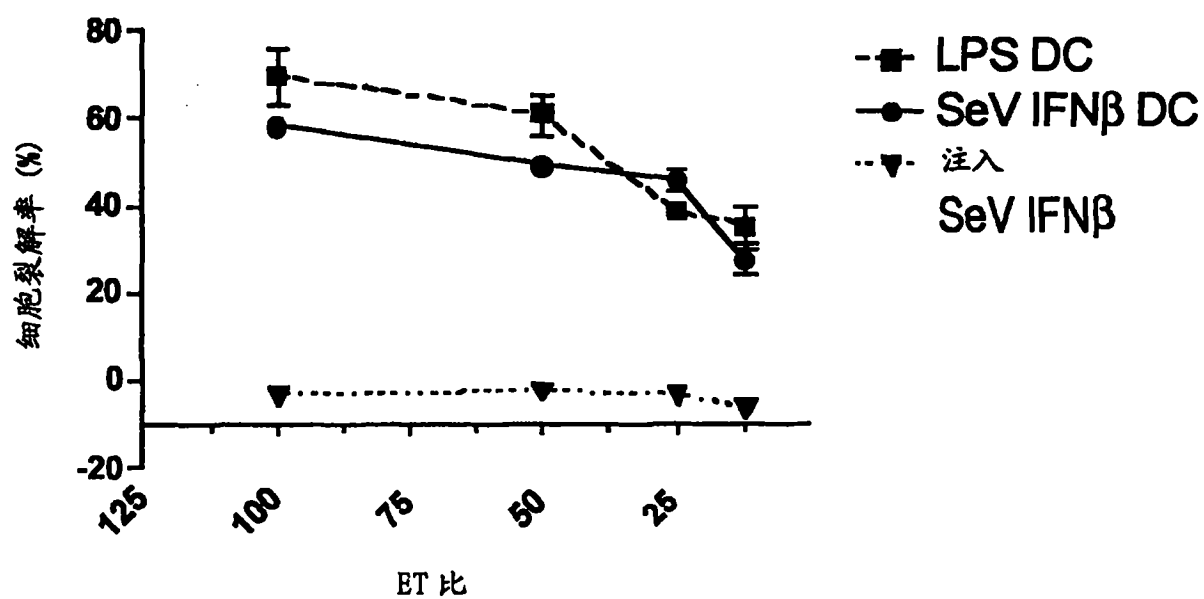


图 25