



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102821790 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201080040593. 4

A61K 39/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 14

A61K 39/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/242, 210 2009. 09. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/048827 2010. 09. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02011/032179 EN 2011. 03. 17

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学托管会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 D·B·韦纳 K·A·克赖尼亚克

M·库兹勒

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 31 页

序列表 2 页 附图 10 页

(54) 发明名称

包含 IL-15 受体 α 和 / 或编码 IL-15 受体 α 的核酸分子的疫苗和免疫治疗剂, 以及其使用方法

(57) 摘要

公开了包含编码免疫原的一种或多种分离的核酸分子连同编码 IL-15R α 或其功能片段的分离的核酸分子的组合物、重组疫苗和活减毒病原体。公开了使用此类组合物诱导个体对免疫原的免疫反应的方法。

1. 一种组合物,其包含:编码免疫原的分离的核酸分子;和编码 IL-15R α 或其功能片段的分离的核酸分子。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述免疫原是病原体抗原、癌症相关的抗原或与涉及自身免疫疾病的细胞相关的抗原。
3. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述免疫原是来引起慢性感染的病原体的病原体抗原。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的组合物,其中所述编码 IL-15R α 的分离的核酸分子包含编码 IL-15R α 的核酸编码序列,所述 IL-15R α 具有如 SEQ ID NO:1 所述的序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的组合物,其进一步包含编码 IL-15 或其功能片段的核酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的组合物,其中所述核酸分子是质粒。
7. 一种可注射的药物组合物,其包含根据权利要求 1-6 中任一项所述的组合物。
8. 一种诱导个体对免疫原的免疫反应的方法,其包括对所述个体施用根据权利要求 1-7 中任一项所述的组合物。
9. 一种重组疫苗,其包含编码可操作地连接于调控元件的免疫原的核苷酸序列和编码 IL-15R α 或其功能片段的核苷酸序列。
10. 根据权利要求 9 所述的重组疫苗,其中所述免疫原是病原体抗原、癌症相关的抗原或与涉及自身免疫疾病的细胞相关的抗原。
11. 根据权利要求 10 所述的重组疫苗,其中所述免疫原是来引起慢性感染的病原体的病原体抗原。
12. 根据权利要求 9-11 中任一项所述的重组疫苗,其中编码 IL-15R α 的所述分离的核酸分子包含编码 IL-15Ra 的核酸编码序列,所述 IL-15Ra 具有如 SEQID NO:1 所述的序列。
13. 根据权利要求 9-12 中任一项所述的重组疫苗,其进一步包含编码 IL-15 或其功能片段的核酸序列。
14. 一种诱导个体对免疫原的免疫反应的方法,其包括对所述个体施用根据权利要求 9-13 中任一项所述的重组疫苗。
15. 一种活减毒病原体,其包含编码 IL-15R α 或其功能片段的核苷酸序列。
16. 根据权利要求 15 所述的活减毒病原体,其中所述病原体是引起慢性感染的病原体的减毒株。
17. 根据权利要求 15 或 16 中任一项所述的活减毒病原体,其中编码 IL-15R α 的所述核酸编码序列是 SEQ ID NO:1。
18. 根据权利要求 15-17 中任一项所述的活减毒病原体,其进一步包含编码 IL-15 或其功能片段的核酸序列。
19. 一种诱导个体对免疫原的免疫反应的方法,其包括对所述个体施用根据权利要求 15-18 中任一项所述的活减毒病原体。
20. 一种核酸分子,其包含具有 IL-15R α 免疫调节功能、IL-15 结合功能、与 IL-15 受体复合物的其它亚单位结合的功能或其组合的 SEQ ID NO:1 或其片段。

包含 IL-15 受体 α 和 / 或编码 IL-15 受体 α 的核酸分子 的疫苗和免疫治疗剂, 以及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 9 月 14 日提交的美国临时申请第 61/242, 210 号的优先权, 所述美国临时申请的全部内容以引用方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及改进的疫苗, 用于使个体对免疫原预防性和 / 或治疗性免疫的改进的方法, 以及改进的免疫治疗组合物和改进的免疫治疗方法。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫治疗是指调节人的免疫反应来产生需要的治疗效果。免疫治疗剂是指当对个体施用时, 充分调节所述个体的免疫系统以最终减少与不希望的免疫反应相关的症状或因增大需要的免疫反应而最终减轻症状的组合物。在一些情况下, 免疫治疗是接种方案的一部分, 在所述接种方案中, 对个体施用的疫苗使所述个体暴露于免疫原, 从而在此类情况下, 所述个体对所述免疫原产生免疫反应, 免疫治疗剂增大了免疫反应和 / 或选择性地增强了一部分免疫反应 (诸如细胞免疫 (cellular arm) 或体液免疫 (humoral arm)), 所述免疫反应是治疗或预防特定的病状、感染或疾病所需要的。

[0006] 可通过递送调节人的免疫反应从而诱导改进的免疫反应的药剂来改进疫苗方案。在对个体施用的疫苗使所述个体暴露于免疫原从而所述个体对所述免疫原产生免疫反应的一些接种方案中, 所提供的药剂增大免疫反应和 / 或选择性地增强一部分免疫反应 (诸如细胞免疫或体液免疫), 所述免疫反应是治疗或预防特定的病状、感染或疾病所需要的。

[0007] 疫苗可用于使个体对靶抗原 (诸如过敏原、病原体抗原或与涉及人类疾病的细胞相关的抗原) 免疫。与涉及人类疾病的细胞相关的抗原包括癌症相关的肿瘤抗原和与涉及自身免疫疾病的细胞相关的抗原。

[0008] 在设计此类疫苗时, 已认识到, 在接种个体的细胞中产生靶抗原的疫苗可有效诱导免疫系统的细胞免疫。具体来讲, 活减毒疫苗、使用无毒载体的重组疫苗和 DNA 疫苗各自在接种个体的细胞中引起抗原的产生, 从而产生免疫系统的细胞免疫的诱导。另一方面, 虽然死疫苗或灭活疫苗和仅包含蛋白质的亚单位疫苗会诱导有效的体液反应, 但是它们并不诱导良好的细胞免疫反应。

[0009] 为了提供保护避免病原体感染以及提供用于治疗病原体感染、癌症或自身免疫疾病的有效免疫介导治疗, 细胞免疫反应往往是必要的。因此, 往往优选在接种个体的细胞中产生靶抗原的疫苗, 诸如活减毒疫苗、使用无毒载体的重组疫苗和 DNA 疫苗。

[0010] 通过 DNA 疫苗技术来产生有效的 CD8+T 细胞反应是 DNA 疫苗开发者追求的目标。据报道, 在 HIV 模型以及其它病毒感染中, CD8+T 细胞有助于控制人 (Koup 等, 1994; Cao 等, 1995; Musey 等, 1997; Ogg 等, 1998; Betts 等, 1999) 和非人灵长类动物模型 (Jin 等, 1999; Schmitz 等, 1999; Barouch 等, 2000; Amara 等, 2001; Shiver 等, 2002) 的病毒复制。

[0011] 已将许多不同的策略与 DNA 疫苗技术一起使用, 这些策略包括改进的递送技术、

增强的构建体设计、异源预激 - 加强策略 (heterologous prime-boost strategies) 和使用分子佐剂。包括趋化因子和细胞因子的分子佐剂可以合并到疫苗策略中从而使免疫反应偏向细胞免疫或体液免疫。诸如 IL-12 和 IL-15 的细胞因子可有效增强鼠科和非人灵长类动物模型中的免疫反应 (Morrow 和 Weiner, 2008)。

[0012] 已证实白细胞介素-15 (IL-15) 在 CD8+T 细胞的产生和维持中发挥作用, 因为其由共用的 $\beta \gamma$ 链来传导信号, 所述共用的 $\beta \gamma$ 链还由 IL-2 所利用。已证实 IL-15 在预激 (Priming) 自然杀伤细胞和 CD8+T 细胞期间经由 IL-15R α 反式递呈 (trans-presented) 在抗原递呈细胞的表面上 (Dubois 等, 2002 ; Koka 等, 2004 ; Lucas 等, 2007 ; Sato 等, 2007)。近期还证实了 IL-15R α 在 IL-15 分泌的调控中发挥作用 (Duitman 等, 2008)。据认为, 这种细胞表面复合物允许 IL-15 由促进细胞分裂和这些细胞存活的记忆 CD8+T 细胞上的 $\beta \gamma$ 受体来传导信号 (Lodolce 等, 1998 ; Kennedy 等, 2000 ; Lodolce 等, 2001 ; Burkett 等, 2003 ; Burkett 等, 2004 ; Sandau 等, 2004 ; Schluns 等, 2004a ; Schluns 等, 2004b)。与单独的任何一种分子相比, 一起作为复合物的 IL-15 和 IL-15R α 显示增强的稳定性和分泌 (Bergamaschi 等, 2008)。

[0013] 就质粒编码的 IL-15 在接种模型中的使用来说, 早前已报道了使用其作为 HIV-1 疫苗佐剂来增强小鼠的溶胞和记忆 CD8+T 细胞反应 (Oh 等, 2003 ; Kutzler 等, 2005 ; Zhang 等, 2006 ; Calarota 等, 2008 ; Li 等, 2008)。对恒河猴的研究也证实 IL-15 增强 CD4+T 细胞的效应子功能的能力 (Picker 等, 2006) 以及救援效应子 CD4+ 和 CD8+T 细胞两者的双重 IFN- γ /TNF 反应的能力 (Halwani 等, 2008)。重要地是, 对恒河猴加用具有 SIV/HIV 抗原的 pIL-15 在 SHIV89.6p 攻毒之后产生增强的保护 (Boyer 等, 2007)。

[0014] 虽然此类疫苗常常有效地使个体对病原体感染或人类疾病预防性或治疗性免疫, 但是仍需要改进的疫苗。需要产生增强的免疫反应的组合物和方法。仍需要改进的策略来使有效的 DNA 疫苗成为可能, 包括增强对 DNA 疫苗的免疫反应的新佐剂。

[0015] 同样, 虽然一些免疫治疗剂可用于调节患者的免疫反应, 但是仍 需要改进的免疫治疗组合物和方法。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及核酸分子, 其包含编码具有 IL-15R α 免疫调节功能和 / 或 IL-15 结合功能和 / 或与 IL-15 受体复合物的其它亚单位结合的功能的蛋白质的 SEQ ID NO :1 或其片段。

[0018] 本发明涉及一种组合物, 其包含编码免疫原的分离的核酸分子连同编码 IL-15R α 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0019] 本发明进一步涉及一种组合物, 其包含编码免疫原和 IL-15R α 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0020] 本发明涉及可注射的药物组合物, 其包含编码免疫原的分离的核酸分子连同编码 IL-15R α 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0021] 本发明涉及可注射的药物组合物, 其包含编码免疫原和 IL-Ra 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0022] 在本发明的一些方面中, 所述免疫原是病原体抗原、癌症相关的抗原或来自与自身免疫疾病相关的细胞的抗原。在一些方面中, 所述病原体是引起慢性感染的病原体。

[0023] 本发明进一步涉及诱导个体对免疫原的免疫反应的方法,所述方法包括对所述个体施用组合物,所述组合物包含编码免疫原的分离的核酸分子连同编码 IL-15R α 或其功能片段的分离的核酸分子。

[0024] 本发明进一步涉及诱导个体对免疫原的免疫反应的方法,所述方法包括对所述个体施用编码免疫原和 IL-15R α 或其功能片段的核酸分子。

[0025] 本发明进一步涉及重组疫苗,其包含编码可操作地连接于调控元件的免疫原的核苷酸序列,编码 IL-15R α 或其功能片段的核苷酸序列;并且,涉及诱导个体对免疫原的免疫反应的方法,所述方法包括对个体施用此重组疫苗。

[0026] 本发明进一步涉及一种活减毒病原体,其包含编码 IL-15R α 或其功能片段的核苷酸序列;并且,涉及诱导个体对病原体的免疫反应的方法,所述方法包括对个体施用所述活减毒病原体。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1A-1E 展示与 IL-15R α 单克隆抗体的产生相关的结果和信息。图 1A 展示重组人 IL-15R α 蛋白在 12.0 至 16 μ g 蛋白质的 2 倍稀释液中的考马斯染色。图 1B 展示商业化抗人 IL-15R α 抗体可在直接的 ELISA 中检测重组 IL-15R α 蛋白。图 1C 展示用于 BALB/c 小鼠中的抗人 IL-15R α 单克隆抗体产生的免疫程序。图 1D 通过 ELISA 展示来自克隆 KK1.23 的杂交瘤上清液具有对重组 IL-15R α 蛋白的高抗体效价。图 1E 展示纯化的单克隆抗体 KK1.23 在 ELISA 中结合重组 IL-15R α 并且通过蛋白质印迹分析具体地展示。

[0029] 图 2A-2G 涉及 IL-15R α DNA 质粒的构建和表达。图 2A 描绘如何将人 IL-15R α cDNA 插入 pVAX1 表达载体中。图 2B 和 2C 展示质粒 IL-15R α 表达了适当大小的蛋白质(约 30kDa),分别由用 R&D 和 KK1.23 单克隆抗人 IL-15R α 抗体进行的放射性活体外翻译来检测。图 2D 展示单克隆 KK1.23 抗体(IgG1 同种型)不结合非转染的 HeLa 细胞(20x)。图 2E 展示由小鼠 IgG1 同种型对照染色的 pTRACER-IL-15R α 转染细胞(绿色)(20x)。图 2F 和 2G 分别以 20x 和 60x 展示 KK1.23 抗人 IL-15R α 抗体(红色)结合 pIL-15R α -pTRACER 转染的细胞。

[0030] 图 3A-3C 展示与单独递送的任何一种质粒相比,pIL-15 和 pIL-15R α 的组合增强免疫反应。图 3A 展示用含有载体、抗原质粒(HIV-1gag 和 pol)、pIL-15 和 / 或 pIL-15R α 的组分的 DNA 制剂注射的 BALB/c 小鼠组的免疫程序。pIL-15/pIL-15R α 的组合是在同一只腿上给予或在两只不同的腿上分开给予(一只腿上给予 pIL-15,另一只腿上给予 pIL-15R α)。使用电穿孔 3 次进行肌肉免疫,并在最后的加强之后一周将小鼠处死。图 3B 和 3C 展示细胞反应。在 IFN- γ ELISpot 试验中使用来自免疫小鼠的脾细胞。用培养基(阴性对照)、伴刀豆球蛋白 A(阳性对照)或抗原肽(HIV-1gag 和 pol 池)将脾细胞刺激过夜并将 IFN- γ 斑点形成单元计数。

[0031] 图 4A 和 4B 展示在无 pIL-15 情况下,IL-15R α DNA 质粒的免疫原性是剂量依赖方式的。如图 3A 所示,将 BALB/c 小鼠用含有载体、5 μ g 抗原质粒(HIV-1gag 和 pol)和渐增剂量的 IL-15R α (7.5、10 或 15 μ g) 的组分的 DNA 制剂来免疫。在用 R10(阴性对照)、ConA(阳性对照)和 HIV-1gag 肽池或 HIV-1pol 肽池刺激的脾细胞上进行 IFN- γ ELISpot。图 4A 中展示使用 HIV-1gag 肽池的实验数据。图 4B 中展示使用 HIV-1pol 肽池的实验数据。

[0032] 图 5A 和 5B 展示 pIL-15R α 主要通过 CD8+T 细胞增强 IFN- γ 分泌。由 CD8+T 细胞贡献的 IFN- γ 分泌是通过使用 Miltenyi 珠使来自免疫小鼠脾细胞的 CD8+T 细胞的体外去除来测量。图 5A 展示全脾细胞（黑色条形图）和 CD8 去除的脾细胞（灰色条形图）的总抗原反应，并且所述总抗原反应是通过 IFN- γ ELISpot 来测量。在图 5B 中，对 HIV-1gag p24 抗原蛋白质的抗体效价是从用如物料和方法中所述的相同构建体和时间安排免疫的 BALB/c 小鼠的血清样品测定。将在处死时获取的血清的稀释液在接种 p24 的 ELISA 板上操作并且用抗小鼠 IgG-HRP 抗体检测以测定抗原特异性 IgG 的水平。在绘图之前，将仅有稀释剂的孔中的背景反应从样品 OD 值中减去。

[0033] 图 6A 至 6C 展示 pIL-15 和 pIL-15R α 的组合没有增强记忆反应。将小鼠免疫三次并在处死之前静养 30 周。图 6A 展示 IFN- γ 分泌是通过 IFN- γ ELISpot 从免疫小鼠的脾细胞中测量。图 6B 展示用于从免疫小鼠测定记忆反应的细胞内细胞因子染色。将来自免疫小鼠的脾细胞在布雷菲尔德菌素 A 存在下用培养基、PMA/ 离子霉素或优势亚 优势 HIV-1gag 和 pol 抗原肽刺激 5 小时。在图 6C 中，从免疫小鼠获取血清并在 HIV-1gag p24ELISA 上操作。分析血清稀释液的抗原特异性 IgG。在绘图之前，将仅有稀释剂的孔中的背景反应仅从样品 OD 值中减去。

[0034] 图 7A 至 7C 展示在没有内源性 IL-15 的情况下 pIL-15R α 可以作为佐剂。为了探究 IL-15R α 作为佐剂的机理，我们考察了人 IL-15R α 结合鼠 IL-15 的能力。图 7A 展示放射性标记的人 IL-15R α 结合小鼠 IL-15 并且与抗小鼠 IL-15 抗体一起共同免疫沉淀。根据在图 3A 中的程序，在对照 C57BL/6（在图 7B 中展示）和 IL-15 敲除的小鼠（在图 7C 中展示）中也重复了免疫，并且对脾细胞进行 IFN- γ ELISpots。优选实施方案的详细描述

[0035] 如本文所用的术语“IL-15Ra”是指白细胞介素 15 受体 α 蛋白。

[0036] 如本文所用的“功能片段”意指 IL-15Ra 的片段，当与免疫原一起递送时，与在有所述片段的情况下递送免疫原时诱导的免疫相比，所述片段提供增大的免疫反应。片段长度通常是 10 个或 10 个以上氨基酸。

[0037] 如本文所用的术语“靶蛋白”意指由本发明的基因构建体编码的肽和蛋白质，其充当免疫反应的靶蛋白。术语“靶蛋白”和“免疫原”可互换使用，并且是指可引出免疫反应的蛋白质。靶蛋白是免疫原性的蛋白质，其与来自病原体或不希望的细胞类型（诸如癌细胞或需要免疫反应的涉及自身免疫疾病的细胞）的蛋白质共用至少一个表位。针对靶蛋白的免疫反应将保护个体免受与所述靶蛋白相关的特定感染或疾病，和 / 或治疗个体的与所述靶蛋白相关的特定感染或疾病。

[0038] 如本文所用的术语“遗传构建体”是指包含编码靶蛋白或免疫调节蛋白的核苷酸序列的 DNA 或 RNA 分子。所述编码序列包括可操作地连接于调控元件的起始和终止信号，所述起始和终止信号包括能够在施用所述核酸分子的个体的细胞中引导表达的启动子和多腺苷酸化信号。

[0039] 如本文所用的术语“可表达形式”是指基因构建体，其含有可操作地连接于编码靶蛋白或免疫调节蛋白的编码序列的必要调控元件，以在存在于所述个体的细胞中时，使得所述编码序列可得以表达。

[0040] 如本文所用的术语“共用一个表位”是指包含至少一个与另一种蛋白质的表位相同或大体上类似的表位的蛋白质。

[0041] 如本文所用的术语“大体上类似的表位”意指具有与蛋白质的表位不相同的结构，但仍然引起与所述蛋白质交叉反应的细胞或体液免疫反应的表位。

[0042] 如本文所用的术语“细胞内病原体”意指病毒或病原生物体，它们的繁殖或生命周期的至少部分是处于宿主细胞内，并且在宿主细胞中产生病原体蛋白质或引起病原体蛋白质的产生。

[0043] 如本文所用的术语“过度增殖性疾病”意指特征为细胞过度增殖的疾病和病症。

[0044] 如本文所用的术语“过度增殖性相关的蛋白质”意指与过度增殖性疾病相关的蛋白质。

[0045] 本发明源自以下发现：当作为疫苗的部分来递送时，编码 IL-15Ra 和其功能片段的核酸分子和其组合调节免疫反应。因此，编码 IL-15Ra 和其功能片段的核酸分子和其组合可作为免疫治疗剂与疫苗组合来递送或作为疫苗的组分来递送。

[0046] 此外，本发明源自以下发现：当作为疫苗的部分来递送时，编码 IL-15Ra 或其功能片段的核酸分子连同 IL-15 或其功能片段的核酸分子调节免疫反应。因此，编码 IL-15Ra 或其功能片段的核酸分子连同 IL-15 或功能片段的核酸分子可作为免疫治疗剂与疫苗组合来递送或作为疫苗的和其组合来递送。

[0047] 本发明的一些方面提供 IL-15Ra 蛋白质的核酸编码序列在治疗疫苗中的用途，特别是在不需要 CD8⁺ 记忆 T 细胞反应的此类情况下在治疗疫苗中的用途。此类治疗疫苗包括其中的抗原靶是在正常以及疾病相关的细胞中表达的抗原的疫苗，借此，带有抗原的细胞的短期消除具有治疗效果，而没有针对表达所述抗原的正常细胞的长期免疫反应。因此，本发明的这方面特别可用于针对癌细胞上的抗原（也存在于正常细胞上的抗原）的治疗疫苗、针对由与自身免疫疾病相关的细胞表达的抗原（也存在于正常细胞上的抗原）的治疗疫苗，以及针对涉及不希望有持久免疫反应的慢性感染的病原体抗原的治疗疫苗。慢性感染是指病原体未被清除的病原体感染。实例包括但不限于 HCV、HSV、CMV、水痘、HIV 等，相对来说，急性感染诸如脊髓灰质炎、天花、腮腺炎等。

[0048] 本发明一些方面提供编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列连同编码 IL-15 的核酸编码序列在治疗疫苗中的用途，特别是在不需要增强的爆发免疫反应 (burst immune response) 的此类情况下在治疗疫苗中的用途。在免疫反应的初始诱导后，IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列和编码 IL-15 的核酸编码序列的组合提供累加的佐剂效应。可以对与编码 IL-15 的核酸编码序列或编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列相同的位点施用编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列，并且所述核酸编码序列可以递送到不同位点以便实现累加的免疫反应。

[0049] 人 IL-15Ra 的核苷酸序列公开为基因库登录号 NM172200 和 NM002189，将其各自以引用方式并入本文。人 IL-15Ra 的蛋白质序列公开为基因库登录号 Q13261、NP002180 和 NP751950，将其各自以引用方式并入本文。在本发明的一些实施方案中，将编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列进行优化以达到高水平的表达。在本发明的一些实施方案中，将编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列进行优化，诸如 SEQ ID NO:1 的核酸编码序列。在本发明的一些实施方案中，编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列是未优化的，诸如 SEQ ID NO:2 的核酸编码序列。

[0050] 人 IL-15 的核苷酸序列公开为基因库登录号 NM172174 和 NM000585，将其各自以

引用方式并入本文。人 IL-15 的蛋白质序列公开为基因库登录号 CAA86100、CAA62616、AAI00964、CAA72044、AAH18149 和 AAU21241,将其各自以引用方式并入本文。在本发明的一些实施方案中,将编码 IL-15 蛋白的核酸编码序列进行优化以达到高水平的表达。在一些实施方案中,使用诸如在美国专利第 10/560,650 号 (US 20070041941) 中描述的改进的 IL-15 构建体,将所述美国专利以引用方式并入本文。在一些实施方案中,使用诸如在美国专利第 12/160,766 号中描述的改进的 IL-15 构建体,将所述美国专利以引用方式并入本文。在本发明的一些实施方案中,编码 IL-15 蛋白的核酸编码序列是 SEQ ID NO :3。

[0051] 在本发明的一些实施方案中,编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列和编码靶抗原的核酸编码序列各自在相同质粒上。

[0052] 在本发明的一些实施方案中,提供一种组合物,其包含两个质粒:第一质粒包含编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列;第二质粒包含编码靶抗原的核酸编码序列,所述核酸编码序列各自在相同质粒上。

[0053] 在本发明的一些实施方案中,提供两种组合物。第一种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列,并且第二种组合物包含一个质粒,其包含编码靶抗原的核酸编码序列,所述核酸编码序列各自在相同质粒上。两种组合物可提供在独立的容器中并且包装成试剂盒。

[0054] 在本发明的一些实施方案中,编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列、编码 IL-15 的核酸编码序列和编码靶抗原的核酸编码序列各自在相同质粒上。

[0055] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供包含两个质粒的组合物。编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列和编码 IL-15 的核酸编码序列在一个质粒上并且编码靶抗原的核酸编码序列在第二质粒上。

[0056] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供包含三个质粒的组合物。编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列在第一质粒上,编码 IL-15 的核酸编码序列在第二质粒上并且编码靶抗原的核酸编码序列在第三质粒上。

[0057] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供两种组合物,第一种组合物包含一个质粒并且第二种组合物包含一个质粒。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列和编码靶抗原的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15 的核酸编码序列。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15 蛋白的核酸编码序列和编码靶抗原的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15Ra 的核酸编码序列。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15 蛋白的核酸编码序列和编码 IL-15Ra 的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码靶抗原的核酸编码序列。所述多种组合物可提供在被包装形成试剂盒的独立容器中。

[0058] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供两种组合物,第一种组合物包含两个质粒并且第二种组合物包含一个质粒。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含第一质粒,其包含编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列;和第二质粒,其包含编码靶抗原的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15 的核酸编码序列。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含第一质粒,其包含编码 IL-15 蛋白的核酸编码序列;和第二质粒,其包含编码靶抗原的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15Ra 的

核酸编码序列。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含第一质粒,其包含编码 IL-15 蛋白的核酸编码序列;和第二质粒,其包含编码 IL-15Ra 的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码靶抗原的核酸编码序列。所述多种组合物可提供在被包装形成试剂盒的独立容器中。

[0059] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供三种组合物,第一种组合物包含一个质粒,第二种组合物包含一个质粒并且第三种组合物包含一个质粒。在一些此类实施方案中,第一种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15Ra 蛋白的核酸编码序列。第二种组合物包含一个质粒,其包含编码靶抗原的核酸编码序列。第三种组合物包含一个质粒,其包含编码 IL-15 的核酸编码序列。所述多种组合物可提供在被包装形成试剂盒的独立容器中。

[0060] 编码免疫调节蛋白的分离的 cDNA 可用作构建可产生所述免疫调节蛋白的构建体的起始物质。可使用标准技术和易获得的起始物质制备编码免疫调节蛋白的核酸分子。

[0061] 可使用许多众所周知技术的任何技术来递送核酸分子,这些技术包括 DNA 注射(也称为 DNA 接种)、重组载体,诸如重组腺病毒、重组腺病毒相关的病毒和重组牛痘病毒。

[0062] DNA 疫苗描述于美国专利第 5,593,972、第 5,739,118 号、第 5,817,637 号、第 5,830,876 号、第 5,962,428 号、第 5,981,505 号、第 5,580,859 号、第 5,703,055 号、第 5,676,594 号以及这些专利中引用的优先权申请中,将各专利以引用方式并入本文。除了在那些申请中描述的递送方案外,递送 DNA 的替代方法描述于美国专利第 4,945,050 号和第 5,036,006 号中,将这两个申请以引用方式并入本文。

[0063] 施用途包括但不限于肌内、鼻内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口部以及局部、透皮、通过吸入或栓剂施用或对粘膜组织施用,诸如通过对阴道、直肠、尿道、口腔和舌下组织灌洗施用。优选的施用途包括粘膜组织、肌内、腹膜内、皮内和皮下注射。遗传构建体可借助包括但不限于传统注射器、无针注射装置或“微弹轰击基因枪(microprojectile bombardment gene guns)”的方法来施用。

[0064] 另一种施用途涉及使用电穿孔来递送遗传构建体,如在美国专利第 5,273,525 号、第 5,439,440 号、第 5,702,359 号、第 5,810,762 号、第 5,993,434 号、第 6,014,584 号、第 6,055,453 号、第 6,068,650 号、第 6,110,161 号、第 6,120,493 号、第 6,135,990 号、第 6,181,964 号、第 6,216,034 号、第 6,233,482 号、第 6,241,701 号、第 6,347,247 号、第 6,418,341 号、第 6,451,002 号、第 6,516,223 号、第 6,567,694 号、第 6,569,149 号、第 6,610,044 号、第 6,654,636 号、第 6,678,556 号、第 6,697,669 号、第 6,763,264 号、第 6,778,853 号、第 6,865,416 号、第 6,939,862 号和第 6,958,060 号中所述,所述美国专利在此以引用方式并入本文。

[0065] 当被细胞吸收时,遗传构建体可作为发挥作用的染色体外分子保留在细胞中。可以一个质粒或多个质粒的形式将 DNA 引入细胞内,所述 DNA 在所述细胞中短暂存在(transient basis)。或者,可对所述细胞施用 RNA。本发明也涵盖提供作为线性微型染色体的遗传构建体,其包括着丝点、端粒和复制起点。基因构建体可构成对受试者施用的减毒活微生物或重组微生物载体中的遗传物质的部分。基因构建体可以是重组病毒疫苗的基因组的部分,其中所述遗传物质保留在染色体外。遗传构建体包括核酸分子的基因表达所必需的调控元件。所述元件包括:启动子、起始密码子、终止密码子和多腺苷酸化信号。此外,编码靶蛋白或免疫调节蛋白的序列的基因表达常常需要增强子。这些元件必需可操作地连

接于编码所需蛋白质的序列,而且所述调控元件必需在其所施用的个体中是可操作的。

[0066] 通常认为起始密码子和终止密码子是编码所需蛋白质的核苷酸序列的部分。然而,这些元件必需在施用基因构建体的个体中是功能性的。起始密码子和终止密码子必须与编码序列一起在框架中。

[0067] 使用的启动子和多腺苷酸化信号必须在所述个体细胞内是功能性的。

[0068] 用于实践本发明,尤其用于产生人用遗传疫苗的启动子的实例包括但不限于来自猿猴病毒 40 (SV40) 的启动子、小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV) 启动子、人类免疫缺陷病毒 (MV) (诸如 BIV 长末端重复序列 (LTR) 启动子)、莫洛尼病毒 (Moloney virus)、ALV、巨细胞病毒 (CMV) (诸如 CMV 早期瞬时启动子)、Epstein Barr 病毒 (EBV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 以及来自人类基因的启动子,诸如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌酸和人金属硫蛋白。

[0069] 用于实践本发明,尤其用于产生人用遗传疫苗的多腺苷酸化信号的实例包括但不限于 SV40 多腺苷酸化信号、牛生长激素多腺苷酸化 (bgh-PolyA) 信号和 LTR 多腺苷酸化信号。具体来讲,使用在 pCEP4 质粒 (Invitrogen, San Diego Calif.) 中的 SV40 多腺苷酸化信号,称为 SV40 多腺苷酸化信号。

[0070] 除了 DNA 表达所需的调控元件外,在 DNA 分子中也可以包括其它元件。此类其它的元件包括增强子。增强子可选自包括但不限于以下的组:人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌酸,以及病毒增强子,诸如来自 CMV、RSV 和 EBV 的病毒增强子。

[0071] 为了使构建体保持在染色体外并且在细胞中产生所述构建体的多个拷贝,可提供具有哺乳动物复制起点的遗传构建体。来自 Invitrogen (San Diego, Calif.) 的质粒 pVAX 1、pCEP4 和 pREP4 都含有 Epstein Barr 病毒复制起点和产生高拷贝游离型复制而无整合作用的核抗原 EBNA-1 编码区域。

[0072] 在与免疫应用相关的一些优选实施方案中,递送的核酸分子包括编码靶蛋白、免疫调节蛋白和,此外,进一步增强对此类靶蛋白的免疫反应的蛋白质的基因的核苷酸序列。此类基因的实例是编码其它细胞因子和淋巴因子的基因,所述因子诸如 α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生生长因子 (PDGF)、TNF、GM-CSF、表皮生长因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 和 IL-15,包括具有缺失的信号序列并且任选包括来自 IgE 的信号肽的 IL-15。

[0073] 在所述方法中使用的组合物可进一步包含一种或多种以下蛋白和/或编码此类蛋白的核酸分子,如以引用方式并入本文的美国专利第 10/139,423 号(对应于美国公布第 20030176378 号)中所述:主要组织相容性复合体抗原,包括主要组织相容性复合体 I 类抗原或主要组织相容性复合体 II 类抗原;死亡结构域受体,包括但不限于 Apo-1、Fas、TNFR-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2 和 DR6;死亡信号,即与死亡结构域受体相互作用的蛋白质,包括但不限于 FADD、FAP-1、TRADD、RIP、FLICE 和 RAIDD;或包括结合死亡结构域受体并引发细胞凋亡的配体的死亡信号,包括但不限于 FAS-L 和 TNF;以及,与死亡结构域受体相互作用的介体,包括但不限于 FADD、MORT1 和 MyD88;包括杀死细胞的蛋白质的毒素,诸如但不限于昆虫毒和蛇毒、细菌内毒素(诸如绿脓杆菌(Pseudomonas)内毒素)、双链核糖体灭活蛋白质(诸如蓖麻毒素,包括单链毒素和白树毒素)。

[0074] 在所述方法中使用的组合物可进一步包含一种或多种以下蛋白和/或编码此类

蛋白的核酸分子,如以引用方式并入本文的美国专利第 10/560,650 号(对应于美国公布第 20070041941 号)中所述:IL-15,其包括包含连接于 IL-15 蛋白序列的非 IL-15 信号肽的融合蛋白(诸如包含连接于 IL-15 蛋白序列的 IgE 信号肽的融合蛋白),CD40L、TRAIL; TRAILrecDRC5、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、F461811 或 MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、CD30、CD153(CD30L)、Fos、c-jun、Sp-1、Ap1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I κ B、NIK、SAPK、SAP1、JNK2、JNK1B2、JNK1B1、JNK2B2、JNK2B1、JNK1A2、JNK2A1、JNK3A1、JNK3A2、NF- κ -B2、p49 剪接形式、NF- κ -B2、p100 剪接形式、NF- κ -B2、p105 剪接形式、NF- κ -B50K 链前体、NF κ Bp50、人 IL-1 α 、人 IL-2、人 IL-4、鼠 IL-4、人 IL-5、人 IL-10、人 IL-15、人 IL-18、人 TNF- α 、人 TNF- β 、人白细胞介素 12、MadCAM-1、NGF IL-7、VEGF、TNF-R、Fas、CD40L、IL-4、CSF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、LFA-3、ICAM-3、ICAM-2、ICAM-1、PECAM、P150.95、Mac-1、LFA-1、CD34、RANTES、IL-8、MIP-1 α 、E-选择体、CD2、MCP-1、L-选择体、P-选择体、FLT、Apo-1、Fas、TNFR-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4(TRAIL)、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、ICE、VLA-1 和 CD86(B7.2)。

[0075] 在所述方法中使用的组合物可进一步包含一种或多种以下蛋白和/或编码此类蛋白的核酸分子,如以引用方式并入本文的美国专利第 10/560,653 号(对应于美国公布第 20070104686 号)中所述:Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I κ B、灭活的 NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素反应基因、NF κ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1 和 TAP2。

[0076] 如果出于任何原因需要消除接受遗传构建体的细胞,那么可加入担当细胞破坏靶的另一元件。在所述遗传构建体中可包括可表达形式的疱疹胸腺嘧啶激酶(tk)基因。可对个体施用药物更昔洛韦(gancyclovir),而此药物将会引起任何产生 tk 的细胞的选择性杀死,从而提供用于具有所述遗传构建体的细胞的选择性破坏的方法。

[0077] 为了最大化蛋白质产生,可选择良好适合于施用所述构建体的细胞中的基因表达的调控序列。此外,可选择在细胞中最有效转录的密码子。本领域普通技术人员可以制造在细胞中有功能性的 DNA 构建体。

[0078] 在一些实施方案中,可以提供基因构建体以便产生本文所描述的 连接于 IgE 信号肽的免疫调节蛋白的编码序列。

[0079] 本发明的一种方法包括以下步骤:通过肌内、鼻内、腹膜内、皮下、皮内或局部施用核酸分子或通过灌洗选自由吸入、阴道、直肠、尿道、口腔和舌下组成的组的粘膜组织施用核酸分子。

[0080] 在一些实施方案中,将核酸分子与多核苷酸功能增强剂或遗传疫苗促进剂一起递送细胞。多核苷酸功能增强剂描述于美国专利第 5,593,972 号和第 5,962,428 号中,这两个专利各自以引用方式并入本文。遗传疫苗促进剂描述于美国专利第 5,739,118 号中,将其以引用方式并入本文。与核酸分子联合施用的辅剂可以作为与核酸分子的混合物施用,或在施用核酸分子的同时、之前或之后独立地施用。此外,可具有起转染剂和/或复制剂和/或炎性剂功能并且可以与多核苷酸功能增强剂共同施用的其它药剂包括生长因子、细胞因子和淋巴因子,诸如 α -干扰素、 γ -干扰素、GM-CSF、血小板衍生生长因子(PDGF)、TNF、

表皮生长因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 和 IL-15 以及成纤维细胞生长因子、表面活性剂 (诸如免疫刺激性复合物 (ISCOMS))、LPS 类似物 (包括单磷脂 A (WL))、胞壁酰肽、醌类似物和泡囊 (诸如角鲨烯和角鲨烯), 并且透明质酸也可以与遗传构建体一起施用。在一些实施方案中, 免疫调节蛋白可用作多核苷酸功能增强剂。在一些实施方案中, 为了增强递送 / 摄取, 将核酸分子与聚 (丙交酯 - 共聚 - 乙交酯) (PLG) 联合提供。

[0081] 根据本发明的药物组合物包含约 1 纳克至约 2000 微克的 DNA。在一些优选实施方案中, 根据本发明的药物组合物包含约 5 纳克至约 1000 微克的 DNA。在一些优选实施方案中, 药物组合物含有约 10 纳克至约 800 微克的 DNA。在一些优选实施方案中, 药物组合物含有约 0.1 至约 500 微克的 DNA。在一些优选实施方案中, 药物组合物含有约 1 至约 350 微克的 DNA。在一些优选实施方案中, 药物组合物含有约 25 至约 250 微克的 DNA。在一些优选实施方案中, 药物组合物含有约 100 至约 200 微克的 DNA。

[0082] 根据本发明的药物组合物是根据所用的施用模式来配制。在药物组合物是可注射的药物组合物的情况下, 它们是无菌、无热原和无颗粒的。优选使用等渗制剂。通常, 用于等渗性的添加剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇和乳糖。在一些情况下, 优选等渗溶液, 诸如磷酸盐缓冲盐水。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实施方案中, 将血管收缩剂加入制剂中。

[0083] 根据本发明的实施方案, 提供了诱导对免疫原的免疫反应的方法, 该方法包括对个体递送免疫原和 IL-15R α 或其功能片段的组合。所述疫苗可以是活减毒疫苗、重组疫苗或核酸或 DNA 疫苗。

[0084] 本发明可用于引出对靶蛋白, 即对特别与病原体、过敏原或个体自身的“异常”细胞相关的蛋白质的增强的免疫反应。本发明可用于使个体对致病因子和病原生物体免疫, 以使对病原体蛋白质的免疫反应提供对所述病原体的保护性免疫。本发明可用于通过引出对特别与所述过度增殖性细胞相关的靶蛋白的免疫反应来对抗过度增殖性疾病和病症, 诸如癌症。本发明可用于通过引起对特别与涉及所述自身免疫病状的细胞相关的靶蛋白的免疫反应来抵抗自身免疫疾病和病症。

[0085] 根据本发明的一些方面, 将编码靶蛋白和免疫调节蛋白的 DNA 或 RNA 引入表达它的个体的组织细胞中, 从而产生编码的蛋白质。编码所述靶蛋白和免疫调节蛋白的 DNA 或 RNA 序列与个体的细胞表达所必需的调控元件连接。用于 DNA 表达的调控元件包括启动子和多腺苷酸化信号。此外, 所述遗传构建体中也可以包括诸如 Kozak 区域的其它元件。

[0086] 在一些实施方案中, 编码靶蛋白的可表达形式的序列和编码两种免疫调节蛋白的可表达形式的序列均出现在递送到个体的同一核酸分子上。

[0087] 在一些实施方案中, 编码靶蛋白的可表达形式的序列出现在与编码免疫调节蛋白的可表达形式的序列的不同的核酸分子上。在一些实施方案中, 编码靶蛋白的序列的可表达形式和编码一种或多种免疫调节蛋白的可表达形式的序列出现在与含有编码免疫调节蛋白的可表达形式的序列的核酸分子不同的核酸分子上。可根据本发明来产生和递送多种不同的核酸分子。

[0088] 核酸分子可以质粒 DNA、重组载体的核酸分子或减毒疫苗中提供的遗传物质的部分形式来提供。或者, 在一些实施方案中, 除了编码它们的核酸分子之外或代替编码它们的核酸分子, 靶蛋白和免疫调节蛋白可以蛋白质形式递送。

[0089] 遗传构建体可包含编码可操作地连接于基因表达所需的调控元件的靶蛋白或免疫调节蛋白的核苷酸序列。根据本发明,提供基因构建体组合物,其包括一个包含编码靶蛋白的可表达形式的核苷酸序列的构建体和一个包含编码免疫调节蛋白的可表达形式的核苷酸序列的构建体。将包括所述基因构建体组合的 DNA 或 RNA 分子递送到活细胞中引起 DNA 或 RNA 的表达以及靶蛋白和一种或多种免疫调节蛋白的产生。产生了对靶蛋白的增强免疫反应。

[0090] 本发明可用于使个体对诸如病毒、原核生物和病原真核生物体(诸如单细胞病原生物体和多细胞寄生虫)的病原体免疫。本发明特别可用于使个体对感染细胞并且不被囊封的病原体免疫,所述病原体诸如病毒和原核生物,诸如淋病病毒、李斯特菌和志贺菌。此外,本发明也可用于使个体对原生动物病原体免疫,所述原生动物病原体包括在生命周期中它们是细胞内病原体的阶段。表 1 提供一些病毒科和属的列表,可根据本发明产生用于所述病毒科和属的疫苗。包含编码包含至少一个与病原体抗原(诸如列于表中的抗原)上呈现的表位相同或大体上类似的表位的肽的 DNA 序列的 DNA 构建体可用于疫苗。此外,本发明也可用于使个体对其它病原体免疫,所述其它病原体包括原核和真核原生动物病原体以及诸如列于表 2 中的多细胞寄生虫。本领域技术人员可容易地鉴别和区分引起慢性感染的病原体与感染后被清除的病原体(即急性传染)。

[0091] 表

[0092] 表 1- 病毒

[0093] 微小核糖核酸病毒科

[0094] 属:

[0095] 鼻病毒:(医学)引起 ~50% 普通感冒病例。

[0096] 肠病毒:(医学)包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、艾柯病毒和人肠道病毒,诸如甲肝病毒。

[0097] 口疮病毒:(兽医学)它们是口蹄疫病毒。

[0098] 靶抗原:VP1、VP2、VP3、VP4、VPG

[0099] 杯状病毒科

[0100] 属:

[0101] 诺瓦克群病毒:(医学)它们是流行性胃肠炎的重要致病病因。

[0102] 披膜病毒科

[0103] 属:

[0104] α 病毒:(医学和兽医学)实例包括辛德毕斯病毒、罗斯河病毒和委内瑞拉东方 & 西方马脑炎病毒。

[0105] 呼肠孤病毒:(医学)风疹病毒。

[0106] 黄病毒科

[0107] 实例包括:(医学)登革热病毒、黄热病病毒、日本脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒和虱传脑炎病毒。西尼罗河病毒(基因库 NC001563、AF533540、AF404757、AF404756、AF404755、AF404754、AF404753、AF481864、M12294、AF317203、AF196835、AF260969、AF260968、AF260967、AF206518 和 AF202541)

[0108] 代表性靶抗原:E NS5 C

[0109] 丙肝病毒:(医学)这些病毒不属于任何科,但又被认为是披膜病毒或黄病毒。大多数类似于披膜病毒科。

[0110] 冠状病毒科:(医学和兽医学)

[0111] 传染性支气管炎病毒(家禽)

[0112] 猪可传播性胃肠道病毒(猪)

[0113] 猪凝血性脑脊髓炎病毒(猪)

[0114] 猫传染性腹膜炎病毒(猫)

[0115] 猫肠道冠状病毒(猫)

[0116] 犬冠状病毒(犬)

[0117] SARS 相关的冠状病毒

[0118] 人呼吸道冠状病毒引起约 40% 的普通感冒病例。EX. 224E、OC43 注意 - 冠状病毒可引起非甲、非乙或非丙型肝炎

[0119] 靶抗原:E1- 也称为 M 或基质蛋白 E2- 也称为 S 或刺突蛋白 E3- 也称为 BE 或血凝素 -eltero 糖蛋白(不存在于所有冠状病毒中)N- 壳包核酸

[0120] 弹状病毒科

[0121] 属:

[0122] 水疱病毒、狂犬病病毒:(医学和兽医学)狂犬病;

[0123] 靶抗原:G 蛋白、N 蛋白

[0124] 线状病毒科:(医学)

[0125] 出血热病毒,诸如马堡病毒和埃博拉病毒

[0126] 副粘病毒科:

[0127] 属:

[0128] 副粘病毒:(医学和兽医学)腮腺炎病毒、新城疫病毒(重要的鸡病原体)

[0129] 麻疹病毒:(医学和兽医学)麻疹、犬瘟热

[0130] 肺病毒:(医学和兽医学)呼吸道合胞病毒

[0131] 正粘液病毒科(医学)流感病毒

[0132] 布尼亚病毒科

[0133] 属:

[0134] 布尼亚病毒:(医学)加利福尼亚脑炎、拉克罗斯脑炎(La Crosse)

[0135] 白蛉热病毒:(医学)里夫特山谷热

[0136] 汉坦病毒:Puremala 是一种 hemahagin 热病毒

[0137] 内罗毕病毒(兽医学)内罗毕绵羊病

[0138] 还有许多未分类的布尼亚病毒

[0139] 沙粒病毒科(医学)LCM、拉沙热病毒

[0140] 呼肠孤病毒科

[0141] 属:

[0142] 呼肠孤病毒:一种可能的人病原体

[0143] 轮状病毒:儿童急性胃肠炎

[0144] 环状病毒:(医学和兽医学)科罗拉多虱传热、

- [0145] 莱邦博 (Lebombo) (人) 马脑炎、蓝舌病
- [0146] 逆转录病毒科
- [0147] 亚科：
- [0148] 致癌病毒：(兽医学)(医学)猫白血病病毒、HTLVI 和 HTLVII
- [0149] 慢病毒：(医学和兽医学)HIV、猫免疫缺陷病毒、马传染性贫血病毒
- [0150] Spumavirinal 乳多泡病毒科
- [0151] 亚科：多瘤病毒：(医学)BKU 和 JCU 病毒
- [0152] 亚科：乳头瘤病毒：(医学)与癌症或乳头瘤恶性进展相关的许多病毒类型。
- [0153] 腺病毒 (医学)EX AD7、ARD、O. B. - 引起呼吸道疾病 - 一些腺病毒, 诸如 275 引起肠炎
- [0154] 细小病毒科 (兽医学)
- [0155] 猫细小病毒：引起猫肠炎
- [0156] 猫瘟病毒
- [0157] 犬细小病毒
- [0158] 猪细小病毒
- [0159] 疱疹病毒科
- [0160] 亚科：
- [0161] α 疱疹病毒
- [0162] 属：
- [0163] 单纯疱疹病毒 (医学)
- [0164] HSVI (基因库 X14112、NC001806)、
- [0165] HSVII (NC001798)
- [0166] 水痘病毒：(医学兽医学)
- [0167] 假性狂犬病
- [0168] 水痘病毒
- [0169] 亚科
- [0170] β 疱疹病毒
- [0171] 属：
- [0172] 巨细胞病毒 (医学)
- [0173] HCMV
- [0174] 鼠巨细胞病毒
- [0175] 亚科：
- [0176] γ 疱疹病毒
- [0177] 属：
- [0178] 淋巴隐病毒 (医学)
- [0179] EBV-(伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma))
- [0180] 痘病毒科
- [0181] 亚科：
- [0182] 带状疱疹病毒 (医学 - 兽医学)

[0183] 属：

[0184] 天花（天花病毒）

[0185] 牛痘（牛痘病毒）

[0186] 副痘病毒－兽医学

[0187] 禽痘病毒－兽医学

[0188] 山羊痘病毒

[0189] 兔痘病毒

[0190] 猪痘病毒

[0191] 亚科：

[0192] 昆虫痘病毒

[0193] 肝 DNA 病毒科

[0194] 乙肝病毒

[0195] 未分类的肝炎 δ 病毒

[0196] 表 2

[0197] 细菌病原体

[0198] 病原性革兰阳性球菌包括：肺炎球菌；葡萄球菌和链球菌。

[0199] 病原性革兰阴性球菌包括：脑膜炎球菌和淋球菌。

[0200] 病原性革兰阴性肠道杆菌包括：肠杆菌；假单胞菌、不动细菌和艾肯菌、类鼻疽；沙门菌；志贺菌；嗜血杆菌；软性下疳；布鲁菌；土拉菌；耶尔森菌（巴斯德菌）；念珠状链杆菌和螺旋菌；单核细胞增生李斯特菌；红斑丹毒丝菌；白喉杆菌、霍乱杆菌、炭疽杆菌；杜诺万菌（性病性肉芽肿）和巴尔通氏体。

[0201] 病原性厌氧菌包括：破伤风杆菌；肉毒梭菌；其它梭菌；结核杆菌；麻风杆菌和其它分枝杆菌。

[0202] 病原性螺旋体病包括：梅毒；密螺旋体病；热带肉芽肿、品他病和地方性梅毒和钩端螺旋体病。

[0203] 由较高级病原菌和病原性真菌引起的其它感染包括：放线菌病；诺卡菌病；隐球菌病、酵母病、组织胞浆菌病和球孢子菌病；念珠菌病、曲霉病和毛霉菌病；孢子丝菌病；巴西芽生菌病、霉样真菌病、球拟酵母菌病、足分枝菌病和染色芽生菌病和皮肤真菌病。

[0204] 立克次体感染包括立克次体感染和立克次体病。

[0205] 支原体和衣原体感染的实例包括：支原体肺炎；性病性淋巴肉芽肿；鹦鹉热；和产期衣原体感染。

[0206] 病原性真核生物

[0207] 病原性原生动物和蠕虫以及由其引起的感染包括：阿米巴病；疟疾；利什曼病；锥虫病；弓形体病；卡氏肺囊虫病；巴贝虫病；贾第鞭毛虫病；旋毛虫病；丝虫病；血吸虫病；线虫病；吸虫病和绦虫（cestode/tapeworm）感染。

[0208] 为了产生预防病原体感染的遗传疫苗，在遗传构建体中必须包括编码免疫原性蛋白质（可对所述免疫原性蛋白质产生保护性免疫反应）的遗传物质作为标靶的编码序列。因为 DNA 和 RNA 两者都相对较小并且可以相对容易地产生，所以本发明提供允许用多种病原体抗原接种的另外的优点。遗传疫苗中使用的遗传构建体可包括编码许多病原体抗原的

遗传物质。例如,在单一构建体中可以包括若干病毒基因从而提供多个标靶。

[0209] 表 1 和表 2 包括一些病原体和生物体的列表,可以制备保护个体免受它们感染的遗传疫苗。在一些优选实施方案中,使个体对病原体免疫的方法针对人类免疫缺陷病毒(HIV)、单纯疱疹病毒(HSV)、丙肝病毒(HCV)、西尼罗河病毒(West Nile Virus, WNV) 或乙型肝炎病毒(HBV)。

[0210] 本发明的另一个方面提供一种赋予对过度增殖性疾病中特有的过度增殖性细胞的保护性免疫反应的方法和一种治疗患有过度增殖性疾病的个体的方法。过度增殖性疾病的实例包括所有形式的癌症和银屑病。

[0211] 已发现向个体的细胞中引入包括编码免疫原性的“过度增殖性细胞”相关的蛋白质的核苷酸序列的遗传构建体会引起个体的接种细胞中产生那些蛋白质。为了对过度增殖性疾病免疫,对个体施用包括编码与过度增殖性疾病相关的蛋白质的核苷酸序列的遗传构建体。

[0212] 为了使过度增殖性相关的蛋白质成为有效的免疫原性标靶,其必须专门在过度增殖性细胞中产生或与正常细胞相比,在过度增殖性细胞中以较高水平产生。靶抗原包括此类蛋白质、其片段和肽;其包含 出现在此类蛋白质上的至少一个表位。在一些情况下,过度增殖性相关的蛋白质是编码蛋白质的基因突变的产物。突变的基因编码的蛋白质与正常蛋白质几乎相同,只是其氨基酸序列稍有不同从而产生正常蛋白质上没有的不同表位。此类靶蛋白包括由诸如 myb、myc、fyn 的致癌基因和转位基因 bcr/abl、ras、src、P53、neu、trk 和 EGRF 编码的蛋白质。除了作为靶抗原的致癌基因产物之外,用于抗癌治疗和保护性疗法的靶蛋白包括由 B 细胞淋巴瘤产生的抗体可变区和由 T 细胞淋巴瘤的 T 细胞受体的可变区,在一些实施方案中,它们也可用作自身免疫疾病的靶抗原。可以用其它肿瘤相关的蛋白质,诸如在肿瘤细胞中以较高水平出现的蛋白质来作为靶蛋白,包括单克隆抗体 17-IA 识别的蛋白质和叶酸结合蛋白或 PSA。

[0213] 虽然本发明可用于使个体对若干癌症形式中的一种或多种癌症形式免疫,但是本发明特别可用于使易患癌症或已患上癌症并且因此易复发的个体预防性免疫。遗传学和技术以及流行病学的发展使得对个体患上癌症的可能性确定和风险评估成为可能。使用遗传筛选和 / 或家族健康史,有可能预测特定个体患上若干癌症类型中的任一类型癌症的可能性。

[0214] 类似地,已经患上癌症并且已受治疗去除癌症或处于缓解期的那些个体尤其容易复发和复现癌症。作为治疗疗法的一部分,可以使这些个体对其已被确诊患有的癌症免疫以对抗癌症复现。因此,一旦得知个体患过某种类型的癌症并有复发的风险,就可对他们免疫以使其免疫系统准备对抗任何未来出现的癌症。

[0215] 本发明提供一种治疗患有过度增殖性疾病的个体的方法。在此类方法中,引入的遗传构建体担当免疫治疗剂,引导和促进个体的免疫系统对抗产生靶蛋白的过度增殖性细胞。

[0216] 本发明提供一种治疗患有自身免疫疾病和病症的个体的方法,所述方法赋予对与自身免疫相关的标靶(包括细胞受体和产生针对“自身”的抗体的细胞)的广泛保护性免疫反应。

[0217] T 细胞介导的自身免疫疾病包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、干燥综

综合征 (Sjogren' s syndrome)、肉样瘤病、胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM)、自身免疫甲状腺炎、反应性关节炎、强直性脊柱炎、硬皮病、多肌炎、皮炎、银屑病、脉管炎、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener' s granulomatosis)、克罗恩氏病 (Crohn' s disease) 和溃疡性结肠炎。这些疾病各自的特征为 T 细胞受体结合内源性抗原并且引发与自身免疫疾病相关的炎症级联。对 T 细胞可变区的接种将引出包括 CTL 的免疫反应以消除那些 T 细胞。

[0218] 在 RA 中,涉及所述疾病的 T 细胞受体 (TCR) 的一些特定可变区已得到表征。这些 TCR 包括 V. β . -3、V β . -14、20V. β . -17 和 Va-17。因此,用编码这些蛋白质的至少一种蛋白质的 DNA 构建体接种将引出靶向涉及 RA 的 T 细胞的免疫反应。参见:Howell, M. D. 等,1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:10921-10925;Piliard, X. 等,1991 Science 253:325-329;Williams, W. V. 等,1992 J Clin. Invest. 90:326-333;将各参考文献以引用方式并入本文。在 MS 中,涉及所述疾病的 TCR 的一些特定可变区已得到表征。这些 TCR 包括 V β P 和 Va-10。因此,用编码这些蛋白质的至少一种蛋白质的 DNA 构建体接种将引出靶向涉及 MS 的 T 细胞的免疫反应。参见:Wucherpfennig, K. W. 等,1990 Science 248:1016-1019;Oksenberg, J. R. 等,1990 Nature 345:344-346;将各参考文献以引用方式并入本文。

[0219] 在硬皮病中,涉及所述疾病的 TCR 的一些特定可变区已得到表征。这些 TCR 包括 V. β . -6、V. β . -8、V. β . -14 和 Va-16、Va-3C、Va-7、Va-14、Va-15、Va-16、Va-28 和 Va-12。因此,用编码这些蛋白质的至少一种蛋白质的 DNA 构建体接种将引出靶向涉及硬皮病的 T 细胞的免疫反应。

[0220] 为了治疗患有 T 细胞介导的自身免疫疾病的患者,尤其是患有所述 TCR 的可变区尚待表征的疾病的患者,可以进行滑膜活检。可获取存在 T 细胞的样品并使用标准技术鉴定那些 TCR 的可变区。可以使用这种信息来制备遗传疫苗。

[0221] B 细胞介导的自身免疫疾病包括狼疮 (SLE)、格雷夫斯氏病 (Grave' s disease)、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫血小板减少症、哮喘、冷球蛋白血症、原发性胆管硬化和恶性贫血。这些疾病各自的特征为抗体结合内源性抗原并且引发与自身免疫疾病相关的炎症级联。对抗体可变区的接种将引出包括 CTL 的免疫反应以消除产生抗体的那些 B 细胞。

[0222] 为了治疗患有 B 细胞介导的自身免疫疾病的患者,必须鉴定涉及自身免疫活动的抗体的可变区。可进行活检并且可获取存在于炎症部位的抗体样品。可以使用标准技术鉴定那些抗体的可变区。可以使用这种信息制备遗传疫苗。

[0223] 在 SLE 的情况下,认为 DNA 是一种抗原。因此,在将要对 SLE 免疫的患者中,可以筛选其血清的抗 DNA 抗体并且可以制备包括编码在所述血清中出现的此类抗 DNA 抗体的可变区的 DNA 构建体的疫苗。

[0224] TCR 和抗体的可变区的共同结构特征是众所周知的。通常可按照众所周知的方法来找到编码特定 TCR 或抗体的 DNA 序列,这些方法描述于 Kabat 等 1987 Sequence of Proteins of Immunological Interest U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda Md. 中,将所述参考文件以引用方式并入本文。此外,克隆抗体的功能性可变区的一般方法可以在 Chaudhary, V. K. 等,1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066 中找到,将所述参考文献以引用方式并入本文。

[0225] 除了使用可表达形式的免疫调节蛋白编码序列来改进遗传疫苗之外,本发明还

涉及改进的减毒活疫苗和使用重组载体递送编码抗原的外来基因的改进的疫苗。减毒活疫苗和使用重组载体递送外来抗原 的疫苗的实例描述于以下美国专利 :4,722,848、5,017,487、5,077,044、5,110,587、5,112,749、5,174,993、5,223,424、5,225,336、5,240,703、5,242,829、5,294,441、5,294,548、5,310,668、5,387,744、5,389,368、5,424,065、5,451,499、5,453,364、5,462,734、5,470,734 和 5,482,713 中,将各专利以引用方式并入本文。提供的基因构建体包括编码 IL-15 α 或其功能片段的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列可操作地连接于可以在疫苗中起作用以影响表达的调控序列。将基因构建体合并到减毒活疫苗和重组疫苗中以产生根据本发明的改进的疫苗。

[0226] 本发明提供一种使个体免疫的改进的方法,所述方法包括将基因构建体作为疫苗组合物的部分对个体细胞递送的步骤,所述疫苗组合物包括 DNA 疫苗、减毒活疫苗和重组疫苗。基因构建体包含编码 IL-15 受体 α 或功能片段的核苷酸序列并且可操作地连接于可以在疫苗中起作用以影响表达的调控序列。所述改进的疫苗产生增强的细胞免疫反应。

实施例

[0227] 将小鼠用 pIL-15 和 pIL-15R α 共同免疫以测定使用 HIV-1DNA 疫苗抗原产生的增强的免疫反应。数据显示,虽然 IL-15 和 IL-15R α 组合确实增强总体的细胞免疫反应,但意外的是,IL-15R α 质粒以 IL-15 非依赖方式增强免疫反应。重要的是,所诱导的记忆反应仅在用 pIL-15 以及 pIL-15R α 共同接种的小鼠中得到维持,而并不在单独用 IL-15R α 接种的小鼠中维持。这些研究首次证明了单独的 IL-15R α 蛋白可作为具有有限的免疫扩展表现型的佐剂。

[0228] 材料和方法

[0229] 蛋白质印迹分析

[0230] 根据标准方案进行蛋白质印迹分析。在 SDS-PAGE 凝胶 (Cambrex, Rockland, ME) 上操作每孔 3 μ g 的重组 IL-15R α 或 VPR 蛋白 (Abgent), 在硝化纤维素膜上进行印迹,并用 R&D 或 KK1.23 抗人 IL-15R α 抗体探测。使用抗小鼠 IgG-HRP (Zymed) 将信号扩增并用 ECL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) 检测。

[0231] DNA 质粒

[0232] 如先前描述制备表达 HIV-1gag 和 HIV-1pol (Kim 等,1998) 和人 IL-15 (Kutzler 等,2005) 的 DNA 疫苗构建体。将人 IL-15R α 的开放阅读框架移动到 pVAX1 和 pTRACER 载体中 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。分别使用 EcoRI 和 BamHI 或 NheI 和 EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA) 进行限制性内切酶消化。通过序列分析检验阳性克隆。

[0233] 活体外翻译试验

[0234] 使用 TNT-T7 Quick Coupled Transcription/Translation Reticulocyte Lysate 系统 (Promega, WI) 和 [35S] 甲硫氨酸来产生标记的 IL-15R α 蛋白产物。根据由制造商提供的说明书,将单独的 pVAX 载体 (阴性对照) 或含有 IL-15R α 和 [35S] 甲硫氨酸的 pVAX 载体加入反应混合物中。将反应在 30 $^{\circ}$ C 下进行 1 小时。在 RIPA 缓冲液中,使用 5 μ g 纯化的单克隆抗 IL-15R α 抗体 (R&D Systems) 或克隆 KK1.23 将标记的蛋白质在 4 $^{\circ}$ C 下旋转免疫沉淀过夜。向各免疫沉淀反应中加入大约 5mg 蛋白质 G-Sepharose 珠 (GE Healthcare) (50 μ L 的 100mg/mL 储备液),并将样品在 4 $^{\circ}$ C 下旋转孵育 2 小时。将珠粒用含有高盐和牛

血清白蛋白的结合缓冲液洗涤三次,并最终混悬在 2x 样品缓冲液中。通过煮沸 5 分钟将免疫沉淀蛋白质复合物从琼脂糖凝胶珠上洗脱,并在 12% SDS-PAGE 凝胶 (Cambrex) 上操作。将凝胶固定并用扩增溶液 (GE Healthcare) 处理,并且在凝胶干燥器 (Bio-Rad, Hercules, CA) 中干燥 2 小时。将干燥的凝胶在 -80℃ 下曝光于 X- 射线胶片并使用 Kodak 自动显影剂 (Kodak, Rochester, NY) 显影。

[0235] 间接免疫荧光试验

[0236] 用于确认 pIL-15R α 质粒表达的间接免疫荧光试验是通过以下的先有技术描述 (Ramanathan 等, 2002) 方案来进行。使在玻片腔室 (BD Biosciences, Bedford, MA) 中, 在完全的 DMEM 加上 10% FBS (Hyclone, Logan, UT) 和抗菌 - 抗霉 (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 以每腔室 100,000 个细胞的密度生长的 HeLa 细胞 (ATCC, Rockville, MD) 附着过夜。根据制造商的方案, 使用 FuGENE 6 转染试剂 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 将细胞用 pIL-15R α -pTRACER 或 pVAX-1 (1 μ g/ 孔) 转染。转染之后二十四小时, 用 PBS 洗涤细胞并在室温下使用 2% PFA/PBS 在载玻片上固定 1 小时。在 37 度下, 将载玻片用在我们实验室制备的 5 μ g 克隆 KK1.23 小鼠抗人 IL-15R α 或 IgG1 同种型对照 (R&D systems, Minneapolis, MN) 孵育 90 分钟。以 1 : 200 添加抗小鼠 IgG- 若丹明共轭的二级抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 并将载玻片在室温下孵育 45 分钟。随后, 在室温下 DAPI (Molecular Probes, Invitrogen) 染色 10 分钟, 将载玻片安放在 Fluoromount G 培养基 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 上并使用用于荧光显微镜检查的 Phase 3 Image Pro Program (Media Cybernetics, Bethesda, MD) 分析。

[0237] 质粒免疫和小鼠

[0238] 6 至 8 周大的雌性 BALB/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)、C57BL/6 (Taconic, Germantown, NY) 或 IL-15 敲除 (Taconic) (Kennedy 等, 2000) 小鼠进行胫骨前肌肉注射 3 次, 每次相隔 2 周, 并如先前描述 (Khan 等, 2003; Laddy 等, 2008), 使用 **CELLECTRA®** 适配的恒流装置 (VGX Pharmaceuticals, The Woodlands, TX) 进行电脉冲。对所有小鼠实验来说, 所述动物均用 35 μ g pVAX1、5 μ g HIV-1 抗原质粒 (gag, pol)、10 μ g pIL-15 和 / 或 7.5、10 或 15 μ g pIL-15R α (n = 3-7 只每组) 免疫。各种基因质粒的共同施用涉及在以等渗柠檬酸盐缓冲液 (Kim 等, 1998; Kutzler 等, 2005) 中的 0.25% 布比卡因 -HCL (Sigma) 注射之前, 将指定的 DNA 质粒混合至 40 μ l 的最终体积。所有动物均圈养在宾夕法尼亚大学的温度受控、光照循环的设施中, 并且按照美国国家卫生研究所和宾夕法尼亚大学的指导对它们进行照料。

[0239] 小鼠处死、样品采集和组织获取的方法

[0240] 在免疫程序指定的时间点, 使用止痛药将动物镇静并采集血液, 之后通过颈部脱臼将动物处死。从各个小鼠获取脾脏并汇集 (每个实验组) 到含有 R10 培养基 (RPMI1640 加 10% 胎牛血清、抗菌 / 抗霉和 B- 巯基乙醇) 的 15ml 锥形瓶中。在无菌组织培养罩中, 使用 stomacher 装置 (Seward 80, Metrohm, Riverview, FL) 将来自各个实验组的汇集的脾脏 / 培养基混合物挤进单细胞混悬液中。使细胞 / 组织基质通过 40- 微米细胞过滤器并用 R10 洗涤, 造粒并在室温下, 在 ACK 裂解缓冲液 (Lonza, Switzerland) 中孵育 5 分钟以使红细胞裂解。随后将脾细胞计数并用于以下描述的免疫试验中。

[0241] IFN- γ ELISPOT 试验

[0242] 如先前描述 (kutzler 等, 2005) 进行 IFN- γ ELISPOT 以测定来自免疫小鼠的抗原特异性细胞因子分泌。简单地说, 用抗小鼠 IFN- γ 俘获抗体接种 ELISpot 96 孔板并在 4°C 下孵育 24 小时 (R&D Systems)。将来自免疫小鼠的 2×10^5 个脾细胞加入 ELISpot 板的各个孔中并在 37°C、5% CO₂, 在 R10 (阴性对照)、伴刀豆球蛋白 A (阳性对照) 或特异性肽 (HIV-1 gag 或 pol) 抗原 (10 μ g/ml) 存在下刺激过夜。跨越整个相应蛋白质 (11 个氨基酸重叠) 的 HIV-1 Consensus Clade B 亚型 HIV-1 gag 和 pol 15-mer 肽是从 AIDS Reagent and Reference Repository (Frederick, MD) 获得。对于 CD8 缺失实验来说, 根据制造商的方案, 通过使用抗 CD8a (Ly-2) 抗体 (Miltenyi Biotech, Germany) 的阳性磁性分选, 将 CD8+T 细胞从全部脾细胞中除去。刺激 24 小时之后, 将板洗涤并在 4°C 下用生物素化的抗小鼠 IFN- γ 抗体 (R&D Systems) 孵育过夜。将板洗涤并在室温下用链霉亲和素碱性磷酸酶 (R&D Systems) 孵育 2 小时。将板洗涤, 添加 5-溴-4-氯-3'-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐 (BCIP) 和氯化硝基四氮唑兰 (NBT) (the Chromogen Color Reagent, R&D Systems)。将板用蒸馏水冲洗, 并在室温下干燥。用自动化 ELISpot 读数器 (CTL Limited, Inc. Cleveland, OH) 将斑点计数。测定原始数值并乘以系数五, 以使数据表示为每百万脾细胞的斑点形成细胞。在绘图之前, 将在各组的 R10 孔中的背景值从肽刺激的孔的值中减去。

[0243] 还通过使用 Cytofix/Cytoperm Kit 和标准方案 (BD Biosciences) 的细胞内细胞因子染色来测定细胞内细胞因子染色 HIV-1 特异性 T 细胞反应。将来自免疫小鼠的脾细胞在具有 R10 和 DMSO (阴性对照) 的 1 μ l/ml GolgiPlug (BD Biosciences)、10 ng/ml PMA 和 250 ng/ml 离子霉素 (阳性对照) 或 HIV-1 consensus Clade B gag 或 pol 15-mer 肽存在下刺激 5 小时。在表面染色之前, 在 37°C 下用 LIVE/DEAD 可固定的紫罗兰试剂盒 (Molecular Probes, Invitrogen) 将细胞染色 10 分钟, 并在 4°C 下经过 15 分钟添加 Fc 封闭剂 (BD) 以封闭 Fc 受体。所有抗体均购自 BD Biosciences 并且以 1 μ l/ 测试使用。在透化 / 固定之前, 在 4°C 下将细胞用 CD4-Alexa700 和 CD8-PerCP 染色 30 分钟。在 4°C 下, 在细胞内染色的 45 分钟中包含 CD3-PECy5 和 IFN- γ PE-Cy7。使用 LSRII 流式细胞仪 (BD Biosciences) 获得来自 50,000 活的 CD3+ 淋巴细胞门控事件 (gated event) 的数据并且使用 FlowJo 软件 (Treestar, Inc., Ashland, OR) 分析。在绘图之前, 将来自阴性对照孔的反应从抗原刺激中减去。

[0244] HIV-1Gag 结合抗体的分析

[0245] 如 (Ogawa 等, 1989; Mestecky 等, 2004) 所述, 将 ELISA 用于测定小鼠血清中的 HIV-1 Gag- 特异性抗体 IgG。将 EIA/RIA 板 (Corning Costar, Cambridge, MA) 用以 100 μ l 每孔的最终体积稀释在 PBS (Mediatech, Herndon, VA) 中的 1 μ g/ml 重组 HIV-1 IIIIB gag p24 (Immunodiagnostics, Woburn, MA) 来接种并在 4°C 下孵育过夜。将板用 PBS/Tween (0.05% Tween 20) 洗涤并在室温下用 200 μ l 封闭缓冲液 / 稀释剂 (PBS 中 3% BSA) 对非特异性结合封闭 2 小时。将板洗涤并分三次添加从免疫小鼠汇集的血清的稀释液 (100 μ l 每孔), 稀释度为 1 至 10 到 1 至 1600, 并且在室温下孵育 2 小时。用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) (Zymed) 检测结合抗体并用底物 TMBH202 (Sigma-Aldrich) 显影。用 2N H₂SO₄ 将显色反应终止, 在 EL312Bio-Kinetics 微板读数器 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) 中读取在 450nm 处的吸光度。

[0246] 结果

[0247] 抗人 IL-15R α 抗体的产生

[0248] 产生对人 IL-15R α 的单克隆抗体,因为市售的抗体缺乏检测 IL-15R α 质粒 (pIL-15R α) 在细胞上表达的能力。重组人 IL-15R α 是如下产生的:

[0249] 重组人 IL-15R α 蛋白是由 Abgent (San Diego, CA) 产生。将人 IL-15R α 的开放阅读框架 (是由 Thomas Waldmann (NCI, NIH, Bethesda, MD) 慷慨赠送) 克隆到高度表达的细菌载体 pET21a (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ) 中。将感受态细胞转化,在大肠杆菌中扩增,并使用 Ni-NTA 柱纯化重组蛋白质。通过直接 ELISA,使用抗人 IL-15R α 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 精确确认纯化蛋白质。

[0250] 为了确认新产生的 IL-15R α 蛋白的大小,在 SDS-PAGE 凝胶上操作纯化蛋白质的稀释度逐渐减小的稀释液并用考马斯蓝染料染色 (图 1A)。如图 1A 所示,产生的蛋白质大约是 30kDa,即预期的大小。测试此蛋白质结合市售抗体的能力,以作为其正确完整性的指标。图 1B 展示 ELISA 试验,由重组 IL-15R α 或 VPR 蛋白 (阴性对照) 俘获板。使用的 VPR 是通过与 IL-15R α 蛋白类似的方法来产生。图 1B 展示市售抗人 IL-15R α 抗体可检测产生的重组蛋白质。

[0251] 为了产生对 IL-15R α 的抗体,如图 1C 并且如下将重组人 IL-15R α 蛋白注射到 BALB/c 小鼠中:

[0252] 将重组人 IL-15R α 蛋白质注射到 BALB/c 小鼠 ($n = 4$) 中以产生单克隆抗体。每次注射 (Sigma, St. Louis, MO) 给于在完全弗氏佐剂 (仅第一次免疫) 或不完全的弗氏佐剂 (随后的免疫) 中乳化的总共 5 μ g 蛋白。向各侧腹皮下注射 50 μ l 并向腹膜注射 100 μ l。在融合之前三天,对小鼠静脉内给于 35ug 蛋白质的无菌 PBS 终点加强剂 (final boost)。通过直接 ELISA,使用重组 IL-15R α 蛋白和抗小鼠 IgG-HRP (Zymed, San Francisco, CA) 测定血清中的抗体水平。将具有对 IL-15R α 的抗体的 1 : 8,000 效价的一只小鼠处死,将其脾脏除去用于与骨髓瘤细胞系融合。通过 ELISA 筛选 1,500 个杂交瘤上清液,扩增 8 个阳性克隆,并将一个克隆通过硫酸铵柱纯化,其为抗体 KK1.23。由 Wistar Institute Hybridoma Facility (Philadelphia, PA) 的 Julia Conicello 负责产生并纯化单克隆抗体。

[0253] 通过 ELISA 筛选大约 1,500 个杂交瘤上清液之后,如图 1D 所示,一个杂交瘤 KK1.23 显示抗体的效价 (> 1 至 12,800)。随后将此杂交瘤克隆、扩增并纯化。如图 1E 中的蛋白质印迹分析所示,纯化的抗体 KK1.23 对人 IL-15R α 是特异性的。此外, KK1.23 似乎以比市售抗体更高的亲合力与人 IL-15R α 结合 (图 1E)。

[0254] pIL-15R α 表达生物活性蛋白质

[0255] 产生适用于接种研究的 IL-15R α 表达载体。如图 2A 所示,在 CMV 启动子的控制下,将人 IL-15R α ORF 克隆到 pVAX1 表达载体中。为了评价 IL-15R α 质粒的适当的表达,进行活体外翻译试验。在图 2B&2C 中展示 S35 放射性标记的蛋白质,以大致 30.0kD 迁移,而对照质粒 pVAX 与预期的一样不产生任何可检测的蛋白质产物。针对人 IL-15R α 的商业化 R&D (2B) 或 KK1.23 (2C) 抗体用于使放射性标记的蛋白质免疫沉淀。

[0256] 为了确认质粒 IL-15R α 的表达,使用来自上述实施例 I 的 KK1.23 抗体进行免疫荧光试验。将人 IL-15R α 的 ORF 克隆到 pTRACER 表达载体中,所述载体也编码绿色荧光蛋白质 (GFP) 报告基因。因此,发绿色荧光的细胞 (图 2E-G) 也表达 pIL-15R α 。使用抗小鼠 IgG-PE (Red) 检测 KK1.23 抗人 IL-15R α 。图 2D 中展示未转染的对照,而图 2E 中展示同

种型对照。数据说明 pIL-15R α 质粒表达的能力以及抗人 pIL-15R α 抗体检测翻译的蛋白质产物的能力。pIL-15R α 质粒编码构型精确的和表面定位的蛋白质。

[0257] 组合 pIL-15 和 pIL-15R α 作为佐剂

[0258] 为了研究 pIL-15R α 与 pIL-15 相比增强免疫反应的能力,根据图 3A 中展示的程序,对 BALB/c 小鼠进行胫骨前肌内免疫并伴随进行体内电穿孔。用 pVAX 对照载体或具有 10 μ g pIL-15、15 μ g pIL-15R α 或 pIL-15 和 pIL-15R α 两者的 5 μ g 抗原构建体 (HIV-1gag, HIV-1pol),以 40 μ l 的最终体积将小鼠免疫。预先测定这些剂量以在初步研究中得到最佳的反应(数据未展示)。如图 3B 所示,如通过 IFN- γ ELISpot 的测量,用单独的抗原构建体的免疫产生 2,300 个斑点形成细胞 (SFC)/10⁶ 脾细胞。pIL-15 的添加增强反应至 3,800 个 SFC 的,而用 pIL-15R α 和 pIL-15 共同免疫显示超过单独的抗原组的最显著增加,产生 5,900 个 SFC。这些结果支持了 IL-15/IL-15R α 免疫复合物的形成可担当比单独的 IL-15 更有效力的佐剂的观点。

[0259] 为了确定是否在体内真实地形成了这种免疫复合物,增加了另一个免疫组,其中在不同的腿中注射 pIL-15 和 pIL-15R α (具有抗原)。在这种分开的递送方法中,质粒递送的 IL-15 和 IL-15R α 不可能形成免疫复合物。发现在不同腿中的 pIL-15 和 IL-15R α 的共同免疫引出与在同一腿中递送相同组合所观测的类似的 IFN- γ 水平(分别是 4,562 对 4,072 SFC)。应注意,用抗原构建体和 pIL-15R α 的免疫组也增强抗原特异性 IFN- γ 分泌,达到大约 3500 个 SFC(图 3B)。为了确认这些结果,我们用逐渐增加剂量的 pIL-15R α 质粒连同抗原构建体对一个新的小鼠组进行免疫,以观察 pIL-15R α 是否会以剂量依赖方式诱导反应。如图 4 所示,在测量的对 pGag(视图 A)或 pPol(视图 B)的反应中,pIL-15R α 的包括确实以剂量依赖方式增强所诱导的 IFN- γ 的分泌。不考虑所使用的 HIV-1 抗原构建体,在使用的最高剂量下,用 pIL-15R α 的共同免疫使细胞免疫反应增强 1.5 至 2 倍。注意,即使在不存在 IL-15,IL-15R α 似乎仍增强抗原特异性免疫反应。

[0260] 为了进一步确认 pIL-15R α 的佐剂性质,研究了接种之后的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的效应子功能。在进行 IFN- γ ELISpot 试验之前,从用先前提到(上文)的各种疫苗组合免疫的小鼠的脾细胞中除去 CD8⁺T 细胞。如图 5A 所示,从用 pIL-15、pIL-15R α 或两者的组合免疫的小鼠的脾细胞除去 CD8⁺T 细胞显著地降低检测到的 IFN- γ 分泌的量。与在全脾细胞中观测的总反应(黑色条形图)相比,在任何免疫的组中的 CD4⁺T 细胞贡献(灰色条形图)之间没有差异。综合来看,接种策略中的 pIL-15R α 和 pIL-15 的组合比单独递送任何一个构建体大大地增强免疫反应。这种累加效应主要作用于 CD8⁺T 细胞,因为所述效应随着此细胞群体的除去而损失。

[0261] 为了确定 pIL-15R α 是否也会对体液免疫反应有作用,也通过 ELISA 测定了由各种接种策略引出的抗体反应。对来自免疫小鼠的血清进行试验以测定针对 HIV-1 Gag(p24)蛋白的 IgG 抗体的水平(图 5B)。虽然 pIL-15 和 pIL-15R α 的组合对于引出细胞免疫性是最好的,但是与用 pVAX(未检测)、单独的 pGag 或组合(1 : 800)免疫的小鼠相比,用单独的 pIL-15 或 pIL-15R α 免疫的小鼠具有 HIV-1 特异性抗体的最高效价(1 : 1600)。

[0262] pIL-15Ra 佐剂似乎不增强 CD8⁺T 细胞记忆

[0263] 如本文先前所述,将小鼠免疫三次;然而,并不在第三次免疫后一周处死这些动物,而是使它们静养大约 30 周,以确保观测的反应将主要归因于记忆群体。如图 6A 所示,

一段显著的静养期之后的反应仍然十分强。用单独的抗原构建体免疫的小鼠具有 1700 个 SFC 左右的反应。最高的反应明显在用 pIL-15 免疫的小鼠组中,对于 pIL-15 和 pIL-15/pIL-15Ra 组合来所,都是约 2800 个 SFC。在没有 pIL-15 的情况下用 pIL-15R α 共同免疫的小鼠中,不再观测到佐剂影响(约 1700 个 SFC)。也通过细胞内细胞因子染色和流式细胞术观测到相同的趋势(图 6B),其中由 CD8+T 细胞产生的 IFN- γ 的水平在用 pIL-15 共同免疫的小鼠中最突出。观测到在接种策略中添加 pIL-15R α 对记忆反应几乎不具有作用,而观测到 pIL-15 具有大的作用。因此,支持了以下理论:虽然 pIL-15R α 在接种之后初期是强的佐剂,但是随着时间的过去 IL-15 似乎是记忆 CD8+T 细胞的较佳诱导物。

[0264] 记忆抗体反应类似于在效应期期间观测到的反应。如图 6C 所示,用 pIL-15 免疫的小鼠在 1 : 1600 的稀释度下具有可检测的对 HIV-1Gag(p24) 的抗体,而包括 pIL-15/pIL-15R α 的组合的所有其它的组,在 1 : 400 稀释度下就具有可检测的对 HIV-1Gag(p24) 的抗体。虽然显示 pIL-15 在体液的产生以及细胞记忆反应中是有效的佐剂;但另一方面, pIL-15R α 似乎也在加快对抗原的急性免疫反应中发挥作用。

[0265] 无 IL-15 的 pIL-15R α 佐剂

[0266] 为了测试人 IL-15R α 蛋白是否可通过与内源性鼠 IL-15 形成复合物或不依赖于 IL-15 来增强接种小鼠的免疫反应,在 IL-15 敲除的小鼠中进行接种研究。最初,作为对照,测试了翻译的人 IL-15R α 蛋白与小鼠 IL-15 的结合。如图 7A 所示,用鼠 IL-15 孵育的 S35 放射性标记的人 IL-15R α 蛋白能够与抗小鼠 IL-15 一起抗体免疫沉淀,暗示鼠 IL-15 与人 IL-15R α 结合的能力。

[0267] 研究了在没有鼠 IL-15 的情况下, pIL-15R α 的辅佐能力。因此,在 IL-15 敲除的小鼠中进行了相同的接种研究,所述小鼠缺乏内源性 IL-15 并且因此在 NK 和记忆 CD8+T 细胞中具有缺陷(Kennedy 等,2000)。图 7C 展示,如通过 IFN- γ ELISpot 的测定在所述敲除小鼠中,没有内源性鼠 IL-15 的情况下, pIL-15R α 辅佐了免疫反应。此外, pIL-15 和 pIL-15R α 的组合未能进一步增强最初在 BALB/c 小鼠中观测到的由于单独施用任何一种佐剂的免疫反应。IL-15 $^{-/-}$ 小鼠是在来自 Taconic 的 C57/BL6 基础上产生。因此,为了进行核实,我们在适当的背景对照小鼠中获得如在 BALB/c 中观测到的类似的反应,重复相同的试验。图 7B 展示来自用相同的程序的免疫的对照小鼠的结果并且显示出与 BALB/c 免疫小鼠相同的趋势。

[0268] 结论

[0269] IL-15R α 构建体连同 IL-15 和 HIV-1 抗原 DNA 构建体的共同免疫比单独用抗原构建体的免疫产生大 2.5 倍效力的 IFN- γ 分泌水平(图 3B)。IFN- γ 分泌可归因于 CD8+T 细胞,因为在接种到 ELISpot 之前除去这些细胞会导致少 10 倍的 IFN- γ 分泌。使用 IL-15/IL-15R α 的组合递送时,观测到的效价的增加不可能是由于在转染的细胞中形成了稳定的复合物,因为向不同的腿(具有抗原)中注射这些 pIL-15 和 pIL-15Ra 也引出与在相同的腿中递送时类似的免疫反应。因此,使用 pIL-15/pIL-15R α 的共同递送时观测到的增强的反应更有可能是两种独立的佐剂的累加效应。如通过对血清中的 IgG 抗体的测定,这两种佐剂的共同递送似乎不会进一步增强体液免疫反应。

[0270] 也研究了组合的 pIL-15/pIL-15R α 对免疫反应的长期作用。为了观测记忆反应,在进行免疫分析之前,允许在第三次免疫之后经过 30 周。结果显示,虽然这两种佐剂的组

合在免疫反应初期引出有效力的 CD8+T 细胞反应,但是对记忆 T 细胞的作用主要仅在一起使用 pIL-15 免疫的小鼠中观测到。与单独的抗原相比,增强的记忆免疫反应需要包括 pIL-15。类似地, IL-15R α 最初引出的免疫反应等于或大于 IL-15 引起的免疫反应,但其对维持记忆反应没有帮助。因此,虽然 IL-15R α 扩展了反应爆发量 (burst size),但是在没有记忆 IL-15 信号的情况下的释放量不足以维持长期反应。

[0271] 在一次意外的观测中,具有 pIL-15R α 的抗原质粒的递送也增强 细胞免疫反应,并且等于由 pIL-15 引出的免疫反应。为确认,用逐渐增加量的 pIL-15R α 进行免疫并且观测到剂量依赖反应。可能是人 IL-15R α 蛋白能够与内源性鼠 IL-15 结合并且以类似方式将其转呈,因为鼠 IL-15 与人 IL-15 约 73%一致 (Anderson 等,1995a)。为了检验此假设,将缺乏任何内源性 IL-15 的 IL-15 敲除的小鼠免疫。与单独的抗原相比,在用 pIL-15R α 免疫的 IL-15 敲除的小鼠中观测到大约 2 倍增加。由于难于大量地获得在 6-8 周龄之间的 IL-15 $^{-/-}$ 雌性小鼠,在这些实验中排除了 pIL-15 组。然而,不再观测到 pIL-15/pIL-15R α 的組合的增强效应。应注意,对照 C57/BL6 小鼠显示出在 BALB/c 小鼠中看到的相同的趋势 (虽然 pVAX 组的总斑点数较低和背景值更高),甚至与 C57/BL6 小鼠相比,IL-15 敲除的小鼠的反应总体更低。先前描述这些小鼠具有些许缺陷型宿主防御反应,包括不能保护免受牛痘攻毒 (Kennedy 等,2000)。不考虑总体较低的免疫反应,在没有任何内源性 IL-15 的情况下,仍然观测到 pIL-15R α 的辅佐效应。虽然不希望受理论束缚,但从对结果全面补充考虑,认为 IL-15R α 可担当能够引出不依赖于 IL-15 的反应的新颖佐剂。这种免疫反应增强似乎特别地集中在宿主 T 细胞反应的急性期而非记忆期期间的免疫扩展上。

[0272] 参考文献

[0273] AMARA, R. R., VILLINGER, F., ALTMAN, J. D., LYDY, S. L., O' NEIL, S. P., STAPRANS, S. I., MONTEFIORI, D. C., XU, Y., HERNDON, J. G., WYATT, L. S., CANDIDO, M. A., KOZYR, N. L., EARL, P. L., SMITH, J. M., MA, H. L., GRIMM, B. D., HULSEY, M. L., MILLER, J., MCCLURE, H. M., MCNICHOLL, J. M., MOSS, B. 和 ROBINSON, H. L. (2001), 通过多蛋白 DNA/MVA 疫苗控制粘膜攻毒和预防 AIDS (Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine), 《科学》(Science) (纽约州, 纽约市) 第 292 期, 69-74。

[0274] ANDERSON, D. M., JOHNSON, L., GLACCUM, M. B., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., VALENTINE, V., KIRSTEIN, M. N., SHAPIRO, D. N., MORRIS, S. W. 等 (1995a), IL15 的染色体定位和基因组结构 (Chromosomal assignment and genomic structure of IL15), 《基因组学》(Genomics) 第 25 期, 701-706。

[0275] ANDERSON, D. M., KUMAKI, S., AHDIEH, M., BERTLES, J., TOMETSKO, M., LOOMIS, A., GIRI, J., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. 等 (1995b), 人白细胞介素 -15 受体 α 链和 IL15RA 与 IL2RA 基因的紧密键的功能表征 (Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL 15RA and IL2RA genes), 《生物化学期刊》(The Journal of biological chemistry) 第 270 期, 29862-29869。

[0276] BAMFORD, R. N., DEFILIPPIS, A. P., AZIMI, N., KURYS, G. 和 WALDMANN, T. A. (1998), IL-15 的羧基末端的 5' 非翻译区、信号肽和编码序列参与其多方面的翻译控制 (The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl

terminus of IL-15 participate in its multitaceted translational control),《免疫学期刊》(J Immunol) 第 160 期,4418-4426。

[0277] BAROUCH, D. H. , SANTRA, S. , SCHMITZ, J. E. , KURODA, M. J. , FU, T. M. , WAGNER, W. , BILSKA, M. , CRATU, A. , ZHENG, X. X. , KRIVULKA, G. R. , BEAUDRY, K. , LIFTON, M. A. , NICKERSON, C. E. , TRIGONA, W. L. , PUNT, K. , FREED, D. C. , GUAN, L. , DUBEY, S. , CASIMIRO, D. , SIMON, A. , DA VIES, M. E. , CHASTAIN, M. , STROM, T. B. , GELMAN, R. S. , MONTEFIORI, D. C. , LEWIS, M. G. , EMINI, E. A. , SHIVER, J. W. 和 LETVIN, N. L. (2000), 通过细胞因子增强的 DNA 接种控制恒河猴的病毒血症并预防恒河猴的临床 AIDS (Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination),《科学》(Science) (纽约州, 纽约市) 第 290 期, 486-492。

[0278] BECKER, T. C. , WHERRY, E. J. , BOONE, D. , MURALI-KRISHNA, K. , ANTIA, R. , MA, A. 和 AHMED, R. (2002), 病毒特异性记忆 CD8T 细胞的增殖性再生需要白细胞介素 15 (Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells),《实验医学期刊》(The Journal of experimental medicine) 第 195 期, 1541-1548。

[0279] BERGAMASCHI, C. , ROSATI, M. , JALAH, R. , VALENTIN, A. , KULKARNI, V. , ALICEA, C. , ZHANG, G. M. , PATEL, V. , FELBER, B. K. 和 PAVLAKIS, G. N. (2008), 白细胞介素 -15 与其受体 α 在产生期间的细胞内相互作用引起相互稳定化作用和增强的生物活性 (Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity),《生物化学期刊》(The Journal of biological chemistry) 第 283 期, 4189-4199。

[0280] BETTS, M. R. , KROWKA, J. F. , KEPLER, T. B. , DAVIDIAN, M. , CHRISTOPHERSON, C. , KWOK, S. , LOUIE, L. , ERON, J. , SHEPPARD, H. 和 FRELINGER, J. A. (1999), 1 型人免疫缺陷病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞活性与 1 型 HIV 感染的长期幸存者携带的 1 型 HIV 病毒呈负相关性 (Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors),《艾滋病研究和人逆转录病毒》(AIDS research and human retroviruses) 第 15 期, 1219-1228。

[0281] BOYER, J. D. , ROBINSON, T. M. , KUTZLER, M. A. , VANSAN T, G. , HOKEY, D. A. , KUMAR, S. , PARKINSON, R. , WU, L. , SIDHU, M. K. , PAVLAKIS, G. N. , FELBER, B. K. , BROWN, C. , SILVERA, P. , LEWIS, M. G. , MONFORTE, J. , WALDMANN, T. A. , ELDRIDGE, J. 和 WEINER, D. B. (2007), 用人免疫缺陷病毒 (SHIV) 抗原和 IL-15 质粒共同免疫来 保护猕猴抵抗猿 / 人免疫缺陷病毒 (SHIV) 89.6P (Protection against simian/human immunodeficiency virus (SHIV) 89.6P in macaques after coimmunization with SHIV antigen and IL-15 plasmid),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 第 104 期, 18648-18653。

[0282] BULANOVA, E. , BUDAGIAN, V. , POHL, T. , KRAUSE, H. , DURKO P, H. , PAUS, R. 和 BULFONE-PAUS, S. (2001), IL-15R α 链通过与人 B 细胞中的 Syk 缔合传递信号 (The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells),《免疫学期刊》

(J Immunol) 第 167 期,6292-6302。

[0283] BURKETT, P. R., KOKA, R., CHIEN, M., CHAI, S., BOONE, D. L. 和 MA, A. (2004), 白细胞介素 (IL)-15R α 和 IL-15 的协调表达和反式递呈支持自然杀伤细胞和记忆 CD8+T 细胞体内平衡 (Coordinate expression and trans presentation of interleukin(IL)-15R α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+T cell homeostasis),《实验医学期刊》(The Journal of experimental medicine) 第 200 期,825-834。

[0284] BURKETT, P. R., KOKA, R., CHIEN, M., CHAI, S., CHAN, F., MA, A. 和 BOONE, D. L. (2003), CD8+T 细胞上的 IL-15R α 表达对 T 细胞记忆来说不是必要的 (IL-15R α expression on CD8+T cells is dispensable for T cell memory),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 第 100 期,4724-4729。

[0285] CALAROTA, S. A., DAI, A., TROCIO, J. N., WEINER, D. B., LORI, F. 和 LISZIEWICZ, J. (2008), IL-15 作为记忆 T 细胞佐剂用于局部 HIV-1 DermaVir 疫苗 (IL-15 as memory T-cell adjuvant for topical HIV Derma Vir vaccine),《疫苗》(Vaccine)。

[0286] CAO, Y., QIN, L., ZHANG, L., SAFRIT, J. 和 HO, D. D. (1995), 1 型人免疫缺陷病毒感染的长期幸存者的病毒学和免疫学表征 (Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection),《新英格兰医学期刊》(The New England journal of medicine) 第 332 期,201-208。

[0287] DUBOIS, S., MARINER, J., WALDMANN, T. A. 和 TAGAYA, Y. (2002), IL-15R α 将 IL-15 循环并反式递呈到邻近细胞 (IL-15R α recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells),《免疫》(Immunity) 第 17 期,537-547。

[0288] DUITMAN, E. H., ORINSKA, Z., BULANOVA, E., PAUS, R. 和 BULFONE-PAUS, S. (2008), 细胞因子如何通过与其自身受体的复合由分泌途径伴送:从 IL-15/IL-15R α 得到的启示 (How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from IL-15/IL-15R α),《分子和细胞生物学》(Molecular and cellular biology)。

[0289] FULLER, D. H., LOUDON, P. 和 SCHMALJOHN, C. (2006), 用于传染性疾病的粒子介导的 DNA 疫苗的临床前和临床发展 (Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA Vaccines for infectious diseases),《方法》(Methods) (加州, 圣地亚哥) 第 40 期,86-97。

[0290] GAO, F., LI, Y., DECKER, J. M., PEYERL, F. W., BIBOLLET-RUCHE, F., RODENBURG, C. M., CHEN, Y., SHAW, D. R., ALLEN, S., MUSONDA, R., SHAW, G. M., ZAJAC, A. J., LETVIN, N. 和 HAHN, B. H. (2003), 1 型 HIV 亚型 C gag、pol、env 和 nef 基因的密码子用法优化:在 DNA 接种的小鼠中的活体外表达和免疫反应 (Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice),《艾滋病研究和人逆转录酶病毒》(AIDS research and human retroviruses) 第 19 期,817-823。

[0291] GIRI, J. G., AHDIEH, M., EISENMAN, J., SHANEBECK, K., GRABSTEIN, K., KUMAKI, S., NAMEN, A., PARK, L. S., COSMAN, D. 和 ANDERSON, D. (1994), 通过新型细胞因子 IL-15

利用 IL-2 受体的 β 和 γ 链 (Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15),《欧洲分子生物学学会会刊》(The EMBO journal) 第 13 期,2822-2830。

[0292] GIRI, J. G., ANDERSON, D. M., KUMAKI, S., PARK, L. S., GRABSTEIN, K. H. 和 COSMAN, D. (1995), IL-15, 一种与 IL-2 共用活性和受体组件的新型 T 细胞生长因子 (IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2),《白血球生物学杂志》(Journal of leukocyte biology) 第 57 期,763-766。

[0293] HALWANI, R., BOYER, J. D., YASSINE-DIAB, B., HADDAD, E. K., ROBINSON, T. M., KUMAR, S., PARKINSON, R., WU, L., SIDHU, M. K., PHILLIPSON-WEINER, R., PAVLAKIS, G. N., FELBER, B. K., LEWIS, M. G., SHEN, A., SILICIANO, R. F., WEINER, D. B. 和 SEKALY, R. P. (2008), 用猴免疫缺陷病毒 (SIV)-DNA+IL-12 或 IL-15 的治疗性接种诱导 SIV 感染的猕猴的显著不同的 CD8 记忆亚群 (Therapeutic vaccination with simian immunodeficiency virus(SIV)-DNA+IL-12 or IL-15 induces distinct CD8 memory subsets in SIV-infected macaques),《免疫学期刊》(J Immunol) 第 180 期,7969-7979。

[0294] HOKEY, D. A. 和 WEINER, D. B. (2006), 用于 HIV 的 DNA 疫苗:挑战与机遇 (DNA Vaccines for HIV:challenges and opportunities),《施普林格免疫病理学论文集》(Springer seminars in immunopathology) 第 28 期,267-279。

[0295] JIN, X., BAUER, D. E., TUTTLETON, S. E., LEWIN, S., GETTIE, A., BLANCHARD, J., IRWIN, C. E., SAFRIT, J. T., MITTLER, J., WEINBERGER, L., KOSTRIKIS, L. G., ZHANG, L., PERELSON, A. S. 和 HO, D. D. (1999), 猴免疫缺陷病毒感染的猕猴中 CD8(+) T 细胞耗竭后血浆病毒血症的急剧升高 (Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques),《实验医学期刊》(The Journal of experimental medicine) 第 189 期,991-998。

[0296] KENNEDY, M. K., GLACCUM, M., BROWN, S. N., BUTZ, E. A., VINEY, J. L., EMBERS, M., MATSUKI, N., CHARRIER, K., SEDGER, L., WILLIS, C. R., BRASEL, K., MORRISSEY, P. J., STOCKING, K., SCHUH, J. C., JOYCE, S. 和 PESCHON, J. J. (2000), 白细胞介素 15 缺陷型小鼠的自然杀伤和记忆 CD8 T 细胞谱系的可逆缺陷 (Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin15-deficient mice),《实验医学期刊》(The Journal of experimental medicine) 第 191 期,771-780。

[0297] KHAN, A. S., SMITH, L. C., ABRUZZESE, R. V., CUMMINGS, K. K., POPE, M. A., BROWN, P. A. 和 DRA GHIA-AKLI, R. (2003), 对在猪中肌肉内递送质粒的电穿孔参数的优化 (Optimization of electroporation parameters for the intramuscular delivery of plasmids in pigs),《DNA 和细胞生物学》(DNA and cell biology) 第 22 期,807-814。

[0298] KIM, J. J., NOTTINGHAM, L. K., SIN, J. I., TSAI, A., MORRISON, L., OH, J., DANG, K., HU, Y., KAZAHAYA, K., BENNETT, M., DENTCHEV, T., WILSON, D. M., CHALIAN, A. A., BOYER, J. D., AGADJANYAN, M. G. 和 WEINER, D. B. (1998), CD8 阳性 T 细胞通过表达趋化因子影响抗原特异免疫反应 (CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines),《临床检查杂志》(The Journal of clinical investigation) 第 102 期,1112-1124。

[0299] KOKA, R. , BURKETT, P. , CHIEN, M. , CHAI, S. , BOONE, D. L. 和 MA, A. (2004), 尖端技术: 鼠科树突状细胞需要 IL-15R α 预激 NK 细胞 (Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells), 《免疫学期刊》(J Immunol) 第 173 期, 3594-3598。

[0300] KOUP, R. A. , SAFRIT, J. T. , CAO, Y. , ANDREWS, C. A. , MCLEOD, G. , BORKOWSKY, W. , FARTHING, C. 和 HO, D. D. (1994), 细胞免疫反应与原发 1 型人免疫缺陷病毒综合征的病毒血症的初始控制的时间关联 (Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type1 syndrome), 《病毒学期刊》(Journal of virology) 第 68 期, 4650-4655。

[0301] KU, C. C. , MURAKAMI, M. , SAKAMOTO, A. , KAPPLER, J. 和 MARRACK, P. (2000), 通过对抗细胞因子控制 CD8+ 记忆 T 细胞的体内平衡 (Control of homeostasis of CD8+memory T cells by opposing cytokines), 《科学》(Science) (纽约州, 纽约市) 第 288 期, 675-678。

[0302] KUTZLER, M. A. , ROBINSON, T. M. , CHATTERGOON, M. A. , CHOO, D. K. , CHOO, A. Y. , CHOE, P. Y. , RAMANATHAN, M. P. , PARKINSON, R. , KUDCHODKAR, S. , TAMURA, Y. , SIDHU, M. , ROOPCHAND, V. , KIM, J. J. , PAVLAKIS, G. N. , FELBER, B. K. , WALDMANN, T. A. , BOYER, J. D. 和 WEINER, D. B. (2005), 用优化的 IL-15 质粒的共同免疫产生部分独立于 CD4T 细胞帮助的 CD8T 细胞的功能增强和寿命延长 (Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help), 《免疫学期刊》(J Immunol) 第 175 期, 112-123。

[0303] LADDY, D. J. , YAN, J. , KUTZLER, M. , KOBASA, D. , KOBINGER, G. P. , KHAN, A. S. , GREENHOUSE, J. , SARDESAI, N. Y. , DRAGHIA-AKLI, R. 和 WEINER, D. B. (2008), 经由合成的一致性 DNA 抗原的活体内电穿孔的针对病原性人流感和禽流感病毒的异源亚型保护 (Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza virus via in vivo electroporation of synthetic consensus dna antigen), PLoS ONE 3, e2517。

[0304] LEIFERT, J. A. , RODRIGUEZ-CARRENO, M. P. , RODRIGUEZ, F. 和 WHITTON, J. L. (2004), 将质粒编码的蛋白质靶向抗原递呈途径 (Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways), 《免疫学评论》(Immunological reviews) 第 199 期, 40-53。

[0305] LI, W. , LI, S. , HU, Y. , TANG, B. , CUI, L. 和 HE, W. (2008), HIV-1 gag DNA 接种的持久免疫反应通过 IL-15 质粒加强的有效增强 (Efficient augmentation of a long-lasting immune responses in HIV-1 gagDNA vaccination by IL-15 plasmid boosting), 《疫苗》(Vaccine) 第 26 期, 3282-3290。

[0306] LODOLCE, J. P. , BOONE, D. L. , CHAI, S. , SWAIN, R. E. , DASSOPOULOS, T. , TRETTIN, S. 和 MA, A. (1998), IL-15 受体通过支持淋巴细胞归巢和增殖维持淋巴体内平衡 (IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation), 《免疫》(Immunity) 第 9 期, 669-676。

[0307] LODOLCE, J. P. , BURKETT, P. R. , BOONE, D. L. , CHIEN, M. 和 MA, A. (2001), 旁细胞增殖需要 T 细胞独立性白细胞介素 15R α 信号 (T cell-independent interleukin 15R α

signals are required for bystander proliferation),《实验医学期刊》(The Journal of experimental medicine) 第 194 期,1187-1194。

[0308] LUCAS, M., SCHACHERLE, W., OBERLE, K., AICHELE, P. 和 DIEFENBACH, A. (2007), 树突状细胞通过反式递呈白细胞介素 15 预激自然杀伤细胞 (Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15),《免疫》(Immunity) 第 26 期, 503-517。

[0309] MESTECKY, J., JACKSON, S., MOLDOVEANU, Z., NESBIT, L. R., KULHAVY, R., PRINCE, S. J., SABBAJ, S., MULLIGAN, M. J. 和 GOEPFERT, P. A. (2004), 1 型 HIV 感染的个体的血清抗原特异 IgA 反应和外分泌的缺乏 (Paucity of antigen-specific IgA responses in sera and external secretions of HIV-type 1-infected individuals),《艾滋病研究和人逆转录酶病毒》(AIDS Res Hum Retroviruses) 第 20 期,972-988。

[0310] MOORE, A. C., KONG, W. P., CHAKRABARTI, B. K. 和 NABEL, G. J. (2002), 抗原和遗传佐剂在小鼠中对针对人免疫缺陷病毒 DNA 疫苗的免疫反应的作用 (Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA Vaccines in mice),《病毒学期刊》(Journal of virology) 第 76 期,243-250。

[0311] MORROW, M. P. 和 WEINER, D. B. (2008), 细胞因子作为用于增大抗 HIV 反应的佐剂 (Cytokines as adjuvants for improving anti-HIV responses), AIDS (英国, 伦敦) 第 22 期,333-338。

[0312] MUSEY, L., HUGHES, J., SCHACKER, T., SHEA, T., COREY, L. 和 MCEL RATH, M. J. (1997), 早期 1 型人免疫缺陷病毒感染中的细胞毒性 T 细胞反应、病毒负荷和疾病进展 (Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection),《新英格兰医学期刊》(The New England journal of medicine) 第 337 期,1267-1274。

[0313] OGAWA, T., TARKOWSKI, A., MCGHEE, M. L., MOLDOVEANU, Z., MESTECKY, J., HIRSCH, H. Z., KOOPMAN, W. J., HAMADA, S., MCGHEE, J. R. 和 KIYONO, H. (1989), 对来自局部慢性炎症组织的分泌人 IgG 和 IgA 亚类抗体的细胞的分析 (Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue),《免疫学期刊》(J Immunol) 第 142 期,1150-1158。

[0314] OGG, G. S., JIN, X., BONHOEFFER, S., DUNBAR, P. R., NOWAK, M. A., MONARD, S., SEGAL, J. P., CAO, Y., ROWLAND-JONES, S. L., CERUNDOLO, V., HURLEY, A., MARKOWITZ, M., HO, D. D., NIXON, D. F. 和 MCMICHAEL, A. J. (1998), 对负荷病毒 RNA 的 HIV-1 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞和血浆的定量分析 (Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA),《科学》(Science) (纽约州, 纽约市) 第 279 期,2103-2106。

[0315] OH, S., BERZOFISKY, J. A., BURKE, D. S., WALDMANN, T. A. 和 PERERA, L. P. (2003), HIV 疫苗载体与表达 IL-15 而非 IL-2 的牛痘病毒的共用施用诱导持久的细胞免疫性 (Coadministration of HIV Vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular Immunity),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

America) 第 100 期,3392-3397。

[0316] OH, S., PERERA, L. P., BURKE, D. S., WALDMANN, T. A. 和 BERZOFISKY, J. A. (2004), 记忆 CD8+T 细胞的 IL-15/IL-15R α 介导的亲合力成熟 (IL-15/IL-15R α -mediated avidity maturation of memory CD8+T cells),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 第 101 期, 15154-15159。

[0317] OH, S., PERERA, L. P., TERABE, M., NI, L., WALDMANN, T. A. 和 BERZOFISKY, J. A. (2008), IL-15 作为用于 CD8+T 细胞寿命和避免 TRAIL 介导的细胞凋亡的 CD4+ 帮助介体 (IL-15 as a mediator of CD4+help for CD8+T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 第 105 期,5201-5206。

[0318] ONU, A., POHL, T., KRAUSE, H. 和 BULFONE-PAUS, S. (1997), 经由两种 IL-15 同工型的前导肽调控 IL-15 分泌 (Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms),《免疫学期刊》(J Immunol) 第 158 期,255-262。

[0319] PICKER, L. J., REED-INDERBITZIN, E. F., HAGEN, S. I., EDGAR, J. B., HANSEN, S. G., LEGASSE, A., PLANER, S., PIATAK, M., JR., LIFSON, J. D., MAINO, V. C., AXTHELM, M. K. 和 VILLINGER, F. (2006), IL-15 诱导非人灵长类动物中的 CD4 效应型记忆 T 细胞产生和组织 (IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates),《临床检查杂志》(The Journal of clinical investigation) 第 116 期,514-1524。

[0320] RAMANATHAN, M. P., CURLEY, E., 3RD, SU, M., CHAMBERS, J. A. 和 WEINER, D. B. (2002), hVIP/mov34 的羧基末端对 HIV-1 Vpr 相互作用和糖皮质激素介导的信号传递是关键的 (Carboxyl terminus of hVIP/mov34 is critical for HIV-1-Vpr interaction and glucocorticoid-mediated signaling),《生物化学学期刊》(The Journal of biological chemistry) 第 277 期,47854-47860。

[0321] SANDAU, M. M., SCHLUNS, K. S., LEFRANCOIS, L. 和 JAMESON, S. C. (2004), 尖端技术:IL-15 通过骨髓衍生的细胞的反式递呈需要 IL-15 和 IL-15R α 通过相同细胞的表达 (Cutting edge:transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R α by the same cells),《免疫学期刊》(J Immunol) 第 173 期,6537-6541。

[0322] SATO, N., PATEL, H. J., WALDMANN, T. A. 和 TAGAYA, Y. (2007), 细胞表面上的 IL-15/IL-15R α 实现持续的 IL-15 活性并有助于 CD8 记忆 T 细胞的长期存活 (The IL-15/IL-15R α on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 第 104 期, 588-593。

[0323] SCHLUNS, K. S., KLONOWSKI, K. D. 和 LEFRANCOIS, L. (2004a), 通过 IL-15R α + 骨髓衍生的细胞反式调控记忆 CD8T 细胞增殖 (Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15R α +bone marrow-derived cells),《血液》(Blood) 第 103 期,988-994。

[0324] SCHLUNS, K. S. , NOWAK, E. C. , CABRERA-HERNANDEZ, A. , PUDDINGTON, L. , LEFRANCOIS, L. 和 AGUILA, H. L. (2004b), 显著不同的细胞类型借助于 IL-15 和 IL-15 受体 α 表达控制淋巴亚群发育 (Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression),《美国科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 第 101 期,5616-5621。

[0325] SCHMITZ, J. E. , KURODA, M. J. , SANTRA, S. , SASSEVILLE, V. G. , SIMON, M. A. , LIFTON, M. A. , RACZ, P. , TENNER-RACZ, K. , DALESANDRO, M. , SCALLON, B. J. , GHAYEB, J. , FORMAN, M. A. , MONTEFIORI, D. C. , RIEBER, E. P. , LETVIN, N. L. 和 REIMANN, K. A. (1999), 通过 CD8+ 淋巴细胞控制猴免疫缺陷病毒感染的病毒血症 (Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+lymphocytes),《科学》(Science) (纽约州, 纽约市) 第 283 期,857-860。

[0326] SCHOENLY, K. A. 和 WEINER, D. B. (2008), 1 型人免疫缺陷病毒疫苗研发 : 细胞毒性 T 淋巴细胞平台“点样业务”的最新进展 (Human immunodeficiency virus type 1 Vaccine development: recent advances in the cytotoxic T-lymphocyte platform “spotty business”),《病毒学期刊》(Journal of virology) 第 82 期,3166-3180。

[0327] SHIVER, J. W. , FU, T. M. , CHEN, L. , CASIMIRO, D. R. , DA VIES, M. E. , EVANS, R. K. , ZHANG, Z. Q. , SIMON, A. J. , TRIGONA, W. L. , DUBEY, S. A. , HUANG, L. , HARRIS, V. A. , LONG, R. S. , LIANG, X. , HANDT, L. , SCHLEIF, W. A. , ZHU, L. , FREED, D. C. , PERSAUD, N. V. , GUAN, L. , PUNT, K. S. , TANG, A. , CHEN, M. , WILSON, K. A. , COLLINS, K. B. , HEIDECKER, G. J. , FERNANDEZ, V. R. , PERRY, H. C. , JOYCE, J. G. , GRIMM, K. M. , COOK, J. C. , KELLER, P. M. , KRESOCK, D. S. , MACH, H. , TROUTMAN, R. D. , ISOPI, L. A. , WILLIAMS, D. M. , XU, Z. , BOHANNON, K. E. , VOLKIN, D. B. , MONTEFIORI, D. C. , MIURA, A. , KRIVULKA, G. R. , LIFTON, M. A. , KURODA, M. J. , SCHMITZ, J. E. , LETVIN, N. L. , CAULFIELD, M. J. , BETT, A. J. , YOUIL, R. , KASLOW, D. C. 和 EMINI, E. A. (2002), 无法复制的腺病毒疫苗载体引出有效的抗免疫缺陷病毒免疫性 (Replication-incompetent adenoviral Vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity),《自然》(Nature) 第 415 期,331-335。

[0328] SPRENT, J. (2003), 记忆表型 CD8+T 细胞的更替 (Turnover of memory-phenotype CD8+T cells),《微生物与感染 / 巴斯德学院》(Microbes and infection/Institut Pasteur) 第 5 期,227-231。

[0329] TAGAYA, Y. , BAMFORD, R. N. , DEFILIPPIS, A. P. 和 WALDMANN, T. A. (1996), IL-15 : 一种具有以多种水平来控制表达的多种受体 / 信号传递途径的多效性细胞因子 (IL-15 : a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels),《免疫》(Immunity) 第 4 期,329-336。

[0330] WALDMANN, T. (2002), 对比 IL-2 和 IL-15 在活淋巴细胞和死淋巴细胞中的作用 : 对风湿性疾病的免疫治疗的暗示 (The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases),《关节炎研究》(Arthritis research) 第 4 期增刊第 3 期, S161-167。

[0331] WALDMANN, T. A. 和 TAGAYA, Y. (1999), 白细胞介素 -15 表达的多方面调控和这

种细胞因子在 NK 细胞分化和对细胞内病原体的 宿主反应中的作用 (The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens),《免疫学年度综述》(Annual review of immunology) 第 17 期,19-49。

[0332] YAJIMA, T., NISHIMURA, H., ISHIMITSU, R., WATASE, T., BUSCH, D. H., PAMER, E. G., KUWANO, H. 和 YOSHIKAI, Y. (2002), IL-15 活体内过度表达增加在微生物暴露后的抗原驱动的记忆 CD8+T 细胞 (Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+T cells following a microbe exposure),《免疫学期刊》(J Immunol) 第 168 期,1198-1203。

[0333] ZHANG, W., DONG, S. F., SUN, S. H., WANG, Y., LI, G. D. 和 QU, D. (2006), 用 IL-15 质粒的共同免疫延长通过编码乙肝病毒核抗原的 DNA 诱导的 CD8T 细胞的寿命 (Coimmunization with IL-15 plasmid enhances the longevity of CD8 T cells induced by DNA encoding hepatitis B virus core antigen),《世界胃肠病学杂志》(World J Gastroenterol) 第 12 期,4727-4735。

[0334] ZHANG, X., SUN, S., HWANG, I., TOUGH, D. F. 和 SPRENT, J. (1998), 通过 IL-15 活体内有效并选择性刺激记忆表型 CD8+T 细胞 (Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+T cells in vivo by IL-15),《免疫》(Immunity) 第 8 期,591-599。

[0001]

案卷号: 133172.02802 (W5263)

专利

序列表

SEQ ID NO:1 优化的 IL-15 受体 α DNA 序列

GGTACCGGATCCGCCACCA**T**GGACTGGACCTGGATTCTGTTCCCTGGTGGCTGCCGCCACA
AGAGTGACAGCGCCCCCAGGCGGGCCAGAGGCTGTAGAACCCTGGGCCTGCCTGCTCTG
CTGCTGCTGCTCCTCCTGAGGCCCCCTGCCACCCGGGGCATCACCTGCCCCCTCCCATG
AGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTACAGCCTGTACAGCCGGGAGCGGTAC
ATCTGCAACAGCGGCTTCAAGCGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTGACCGAGTGCGTGCTG
AACAAAGGCCACCAACGTGGCCCACTGGACCACCCCCAGCCTGAAGTGCATCCGGGACCCC
GCCCTGGTGCATCAGAGACCCGCCCTCCTAGCACAGTGACCACAGCCGGCGTGACCCCC
CAGCCCCGAGAGCCTCTCCCCAGCGGCAAAGAGCCTGCCGCCAGCAGCCCCAGCAGCAAC
AACACCGCCGCCACAACCGCCGCCATCGTGCCCGGCAGCCAGCTGATGCCAGCAAGAGC
CCTTCCACCGGCACAACCGAGATCAGCAGCCACGAGAGCAGCCACGGAACACCCCTCTCAG
ACCACCGCCAAGACCTGGGAGCTGACCGCCAGCGCCTCTCACCAGCCTCCTGGCGTGATC
CCTCAGGGCCACAGCGACACCACCGTGCCATCAGCACCTCCACCGTGCTGCTGTGCGGC
CTGAGCGCGGTGAGCCTGCTGGCCTGCTACCTGAAGAGCCGGCAGACCCCCCTCTGGCC
AGCGTGGAGATGGAAGCTATGGAAGCCCTGCCTGTACCTGGGGCACCAGCTCCAGGGAC
GAGGACCTGGAAAAC**T**GCAGCCACCACCTGTGAT**T**GAGAATTCGAGCTC

SEQ ID NO:2 未优化的 IL-15 受体 α 序列

ATG GAT TGG ACT TGG ATC TTA TTT TTA GTT GCT GCT GCT ACT AGA GTT CAT TCT GCC CCG
CGG CGG GCG CGC GGC TGC CGG ACC CTC GGT CTC CCG GCG CTG CTA CTG CTG CTG CTC
CGG CCG CCG GCG ACG CGG GGC ATC ACG TGC CCT CCC CCC ATG TCC GTG GAA CAC GCA GAC
ATC TGG GTC AAG AGC TAC AGC TTG TAC TCC AGG GAG CGG TAC ATT TGT AAC TCT GGT TTC
AAG CGT AAA GCC GGC ACG TCC AGC CTG ACG GAG TGC GTG TTG AAC AAG GCC ACG AAT GTC
GCC CAC TGG ACA ACC CCC AGT CTC AAA TGC ATT AGA GAC CCT GCC CTG GTT CAC CAA AGG
CCA GCG CCA CCC TCC ACA GTA ACG ACG GCA GGG GTG ACC CCA CAG CCA GAG AGC CTC TCC
CCT TCT GGA AAA GAG CCC GCA GCT TCA TCT CCC AGC TCA AAC AAC ACA GCG GCC ACA ACA
GCA GCT ATT GTC CCG GGC TCC CAG CTG ATG CCT TCA AAA TCA CCT TCC ACA GGA ACC ACA
GAG ATA AGC AGT CAT GAG TCC TCC CAC GGC ACC CCC TCT CAG ACA ACA GCC AAG ACC TGG
GAA CTC ACA GCA TCC GCC TCC CAC CAG CCG CCA GGT GTG TAT CCA CAG GGC CAC AGC GAC
ACC ACT GTG GCT ATC TCC ACG TCC ACT GTC CTG CTG TGT GGG CTG AGC GCT GTG TCT CTC
CTG GCA TGC TAC CTC AAG TCA AGG CAA ACT CCC CCG CTG GCC AGC GTT GAA ATG GAA GCC
ATG GAG GCT CTG CCG GTG ACT TGG GGG ACC AGC AGC AGA GAT GAA GAC TTG GAA AAC TGC
TCT CAC CAC CTA **TGA**

SEQ ID NO:3 具有 IgE 前导序列的优化的 IL-15 受体 α 序列

AAATGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCC
ATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGA
TTTTGAACTTTGTCTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACT
CAGCAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTT
ACAACCAATTAACCAATTCTGCGTTCAAAATGGTATGCGTTTGGACACATCCACTATATATCCGTGTG
TTCTGTCCACTCCTGAATCCCATTCCAGAAATTCTCTAGCGATTCCAGAAGTTTCTCAGAGTCGGAAAG
TTGACCAGACATTACGAACCTGGCACAGATGGTCATAACCTGAAGGAAGATCTGATTGCTTAACCTGCTT
CAGTTAAGACCGACGCGCTCGTCGTATAACAGATGCGATGATGCAGACCAATCAACATGGCACCTGCC
ATTGCTACCTGTACAGTCAAGGATGGTAGAAATGTTGTCGGTCCTTGACACGAATATTACGCCATTG
CCTGCATATTCAAACAGCTCTTCTACGATAAGGGCACAAATCGCATCGTGGAACGTTTGGGCTTCTACC
GATTTAGCAGTTTGATACACTTTCTCTAAGTATCCACCTGAATCATAAATCGGCAAAATAGAGAAAA
TTGACCATGTGTAAGCGGCCAATCTGATTCCACCTGAGATGCATAATCTAGTAGAATCTCTTCGCTATC
AAAATTCACCTCCACCTTCCACTCACCGGTTGTCCATTATGGCTGAACCTCTGCTTCCTCTGTTGACATG

[0002]

案卷号: 133172.02802 (W5263)

专利

ACACACATCATCTCAATATCCGAATACGGACCATCAGTCTGACGACCAAGAGAGCCATAAACACCAAT
AGCCTTAACATCATCCCCATATTTATCCAATATTCGTTCCCTTAATTTTCATGAACAATCTTCATTCTTTCT
TCTCTAGTCATTATTATTGGTCCGTTTCATAACACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTFA
TTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTT
CCCCGGCCCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
GATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACC
GCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAG
CAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTG
TAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGT
GTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGG
TTCTGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT
GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAA
CAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCGTGATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGC
CACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
CAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCC
CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGAC
CGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATC
TGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCC
AGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACA
AGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTCGCTGCTTCGCGA
TGTAACGGCCAGATATAGCCGCGGCATCGATGATATCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATG
TACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG
TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAAT
GGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGG
CATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
ATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATT
TCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAA
ATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGA
AGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGCGCGCGGTCCAGTGTGGTGGAATTCGCCGCCACCATGG
ATTGGACTTGGATCTTATTTTTAGTTGCTGCTGCTACTAGAGTTCATTCTAAGTGGGTGAATGTAATAA
GTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTG
ATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTG
AGTCCGGAGATGCAAGTATTTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAAACAAGTTTGTCT
TCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAG
AATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGACTCGGGGCGACGCGAA
ACTTGGGCCCCTCGAGAGGCGCGCCGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTA
ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC
AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAATTT

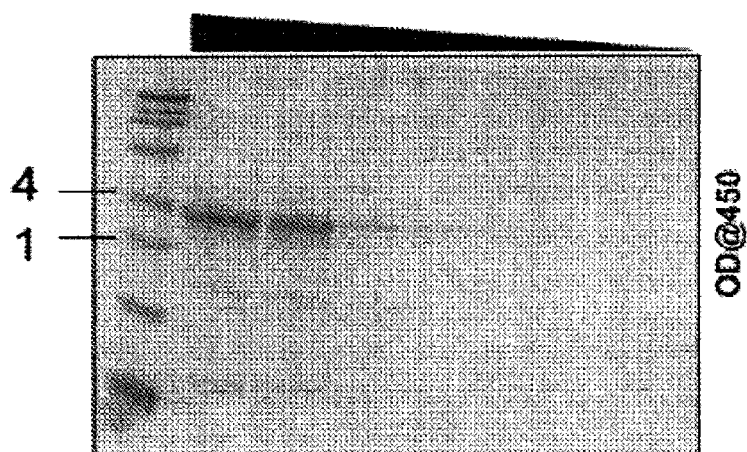


图 1A

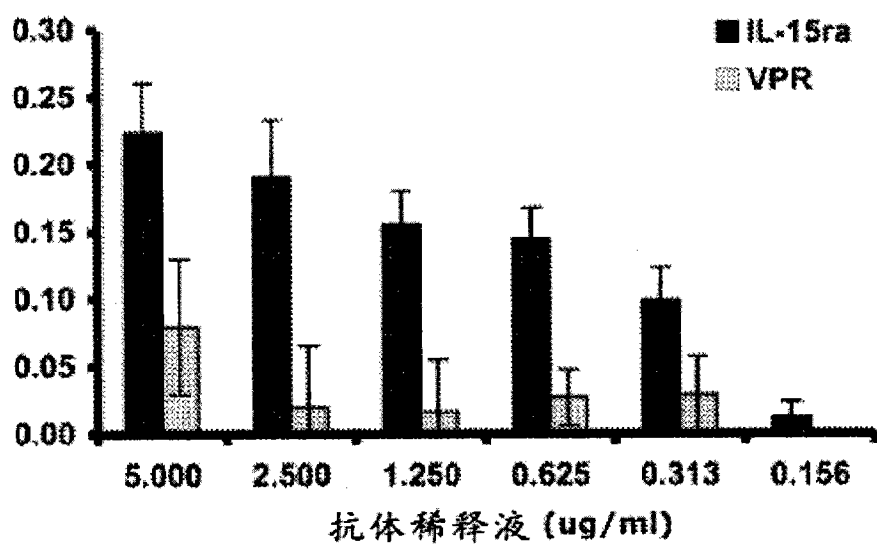


图 1B

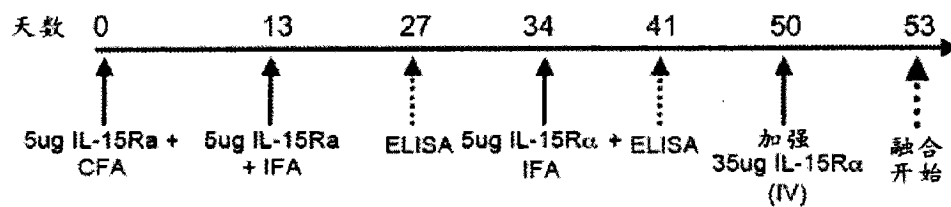


图 1C

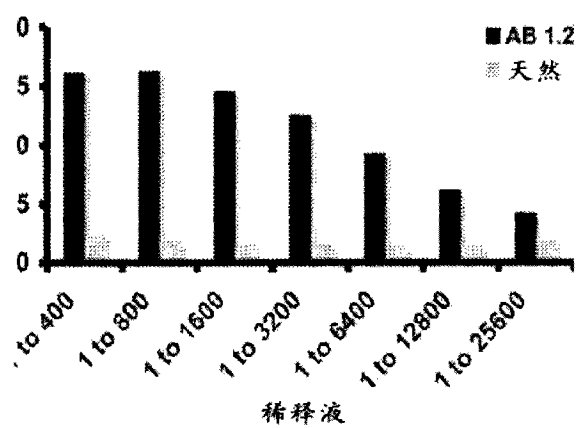


图 1D

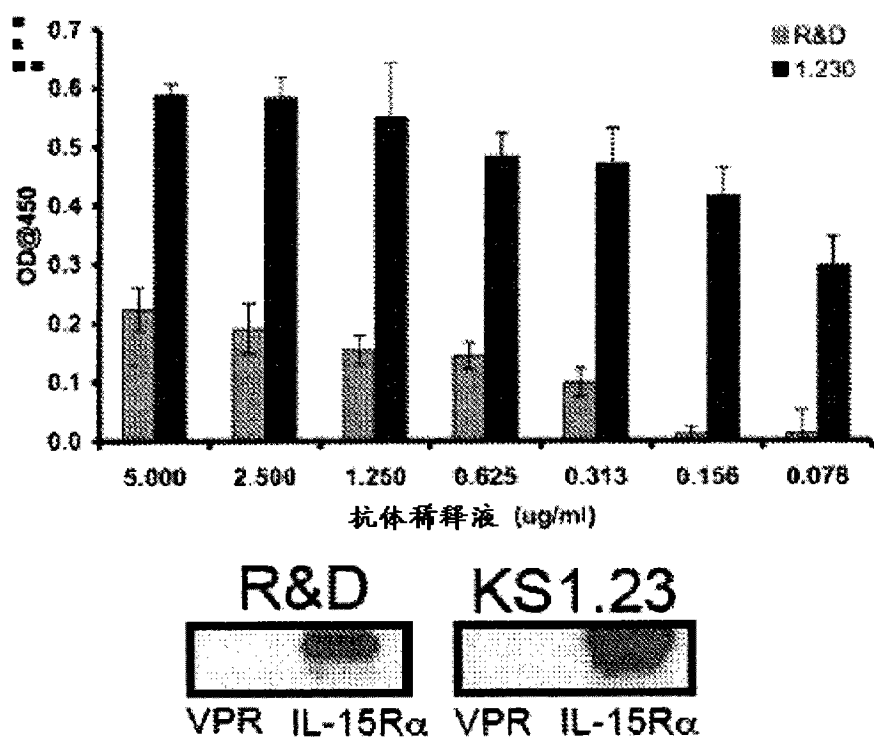


图 1E

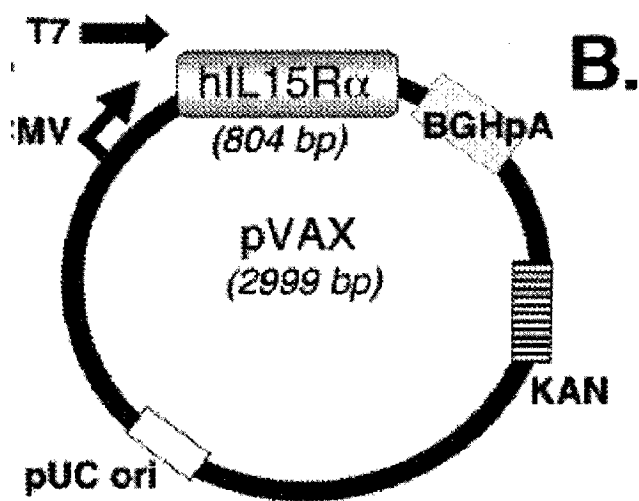


图 2A

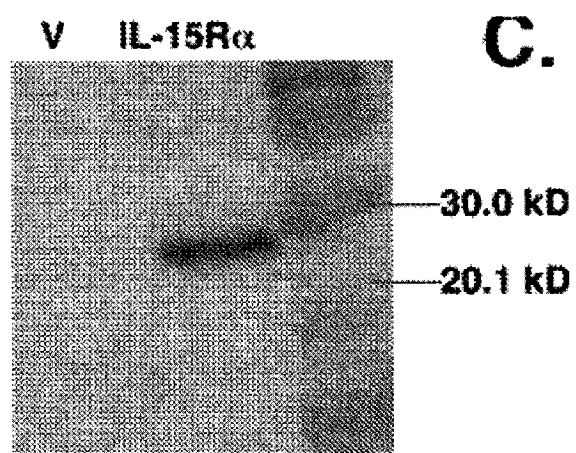


图 2B

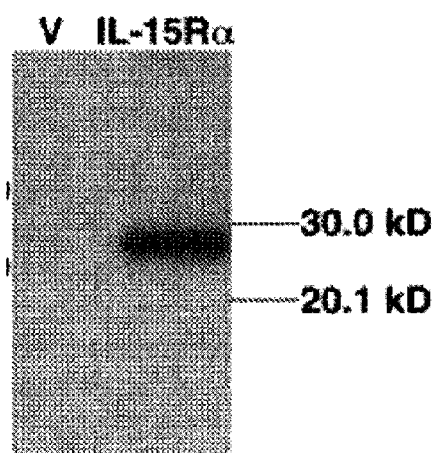


图 2C

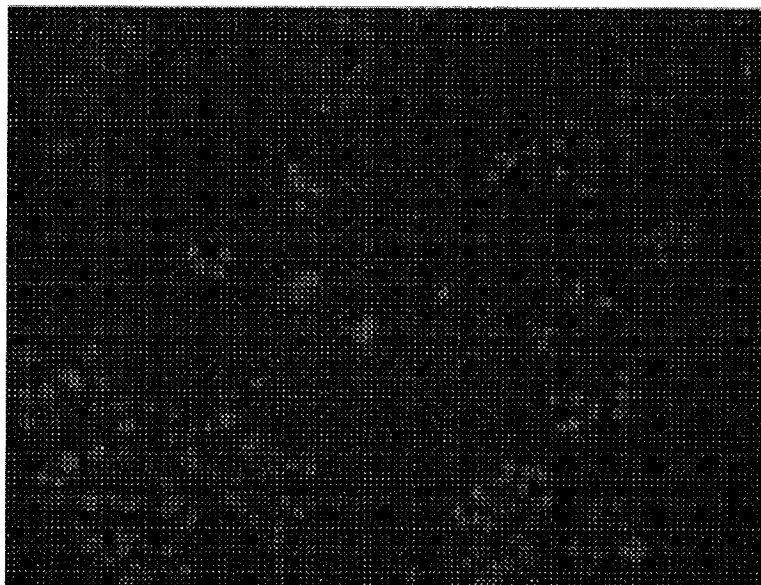


图 2D

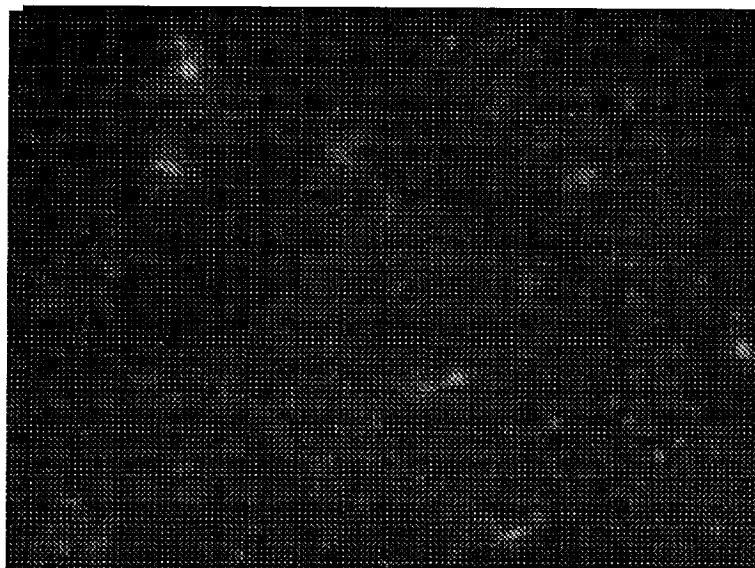


图 2E

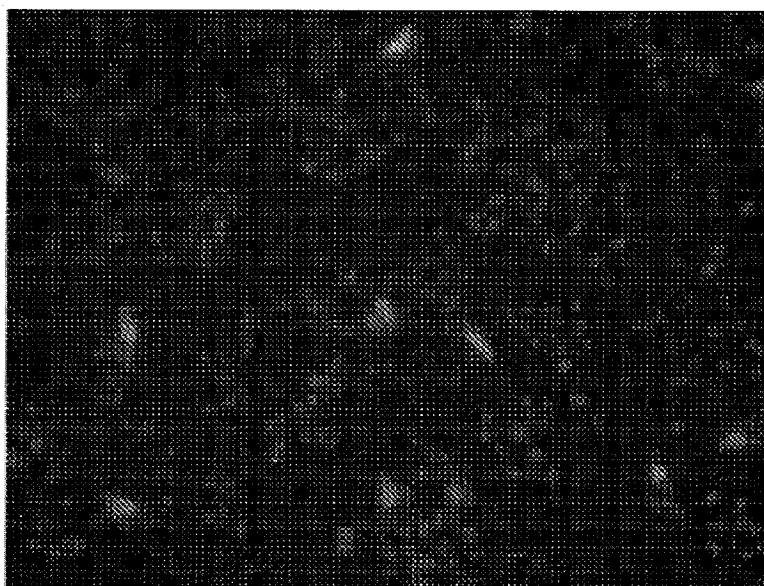


图 2F

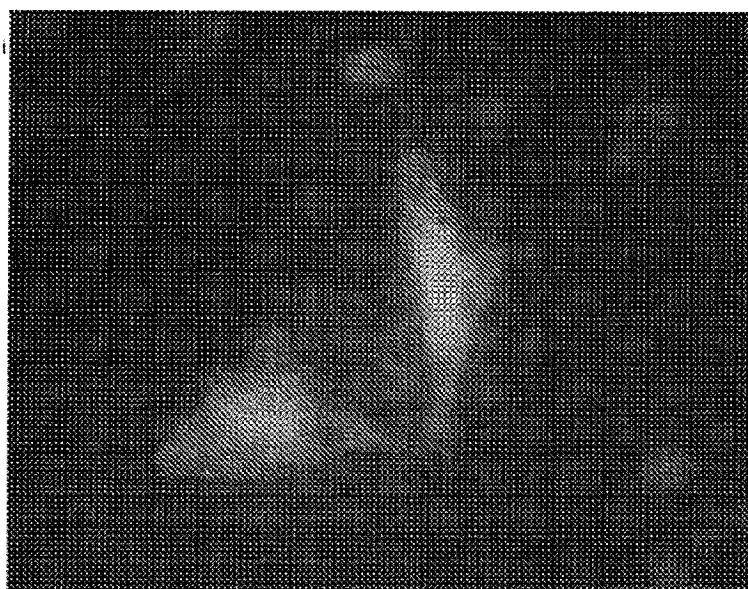


图 2G

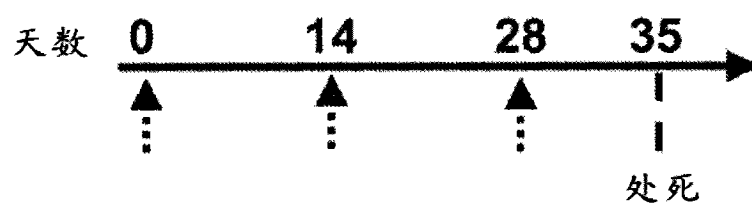


图 3A

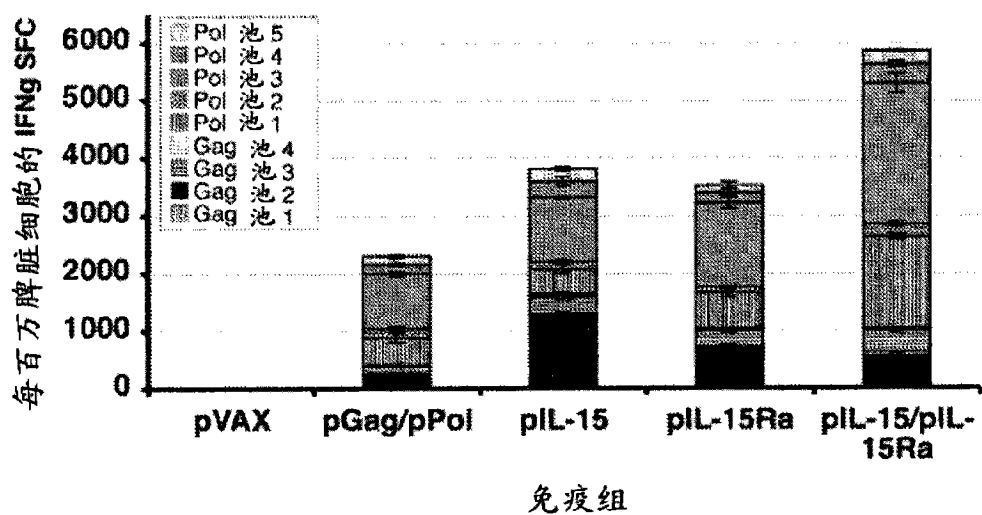


图 3B

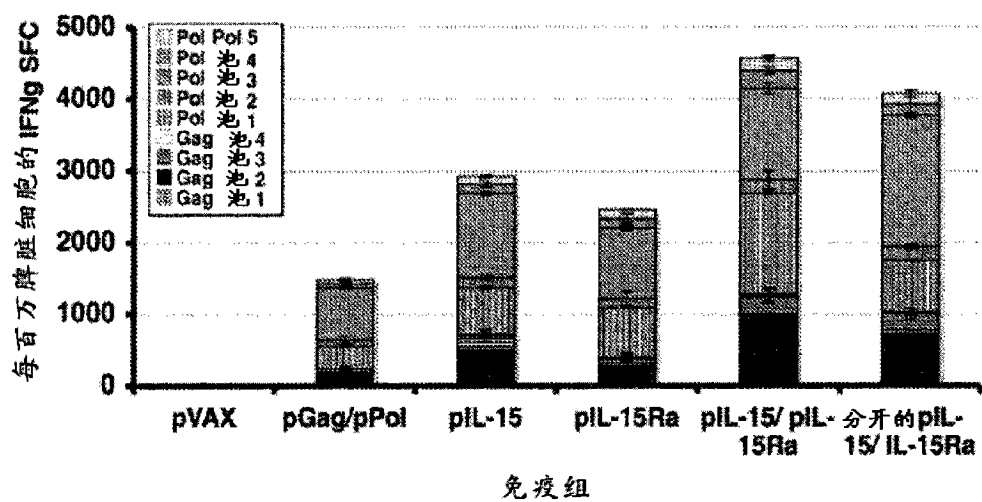


图 3C

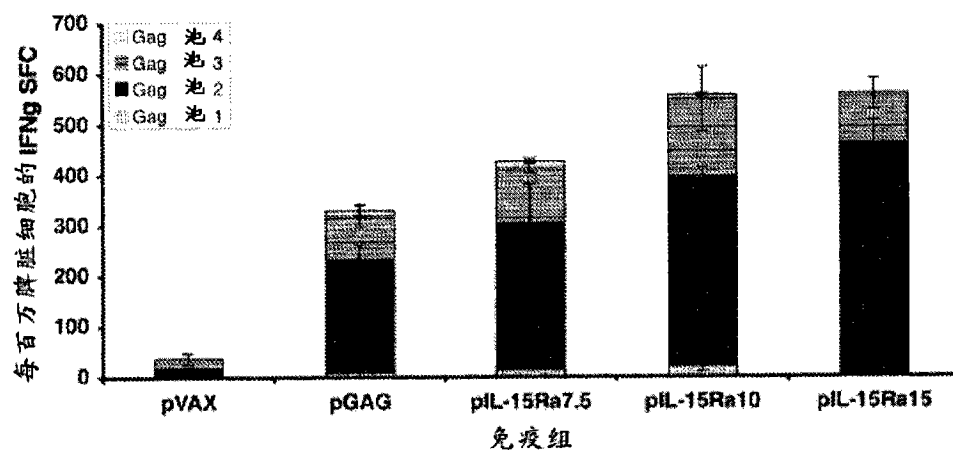


图 4A

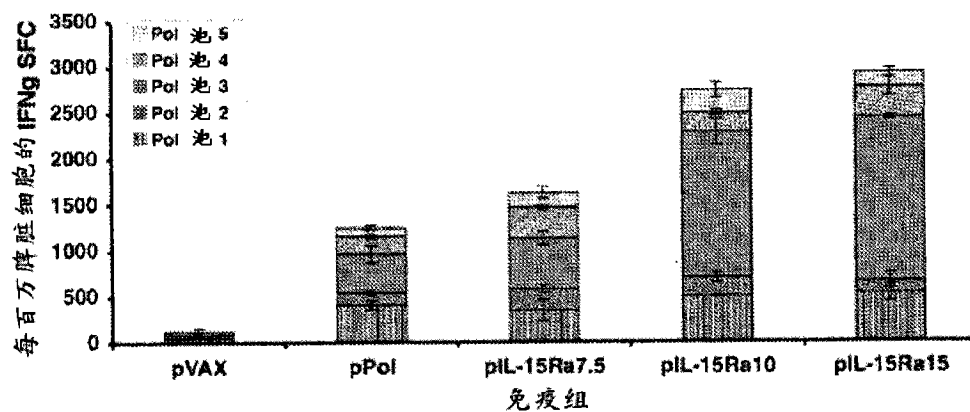


图 4B

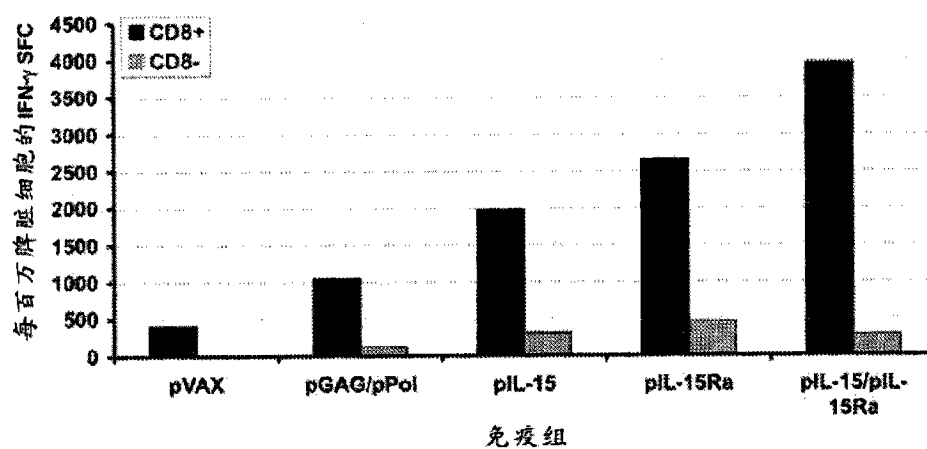


图 5A

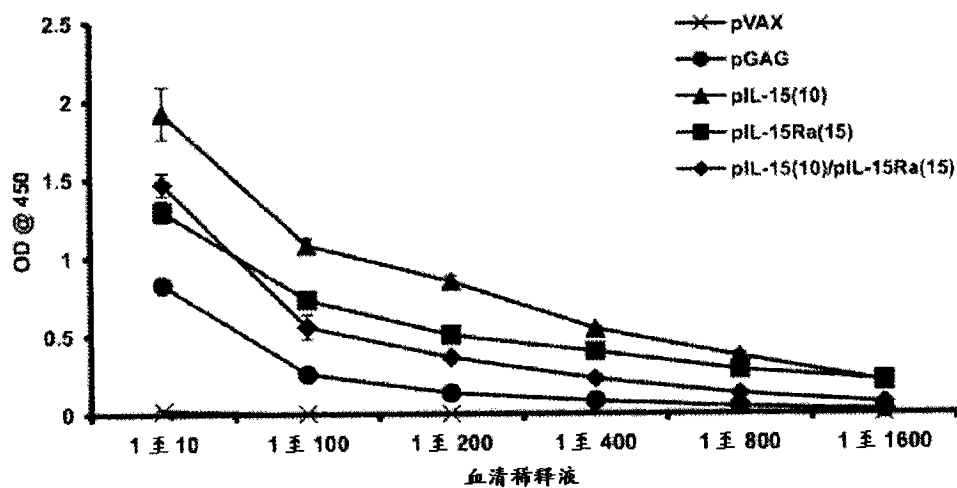


图 5B

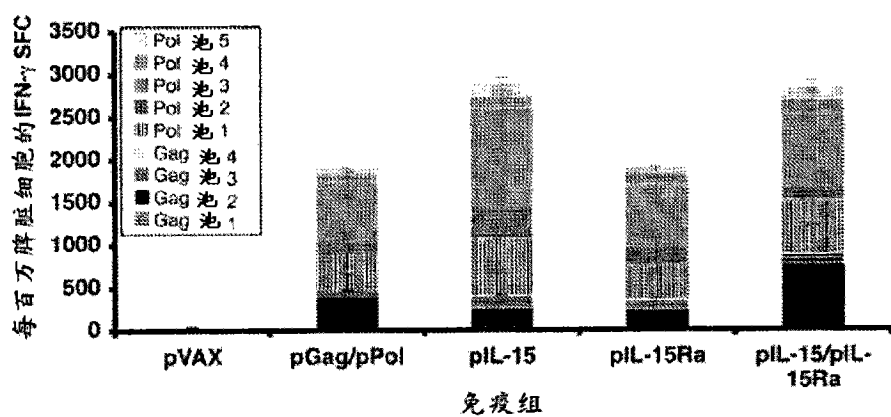


图 6A

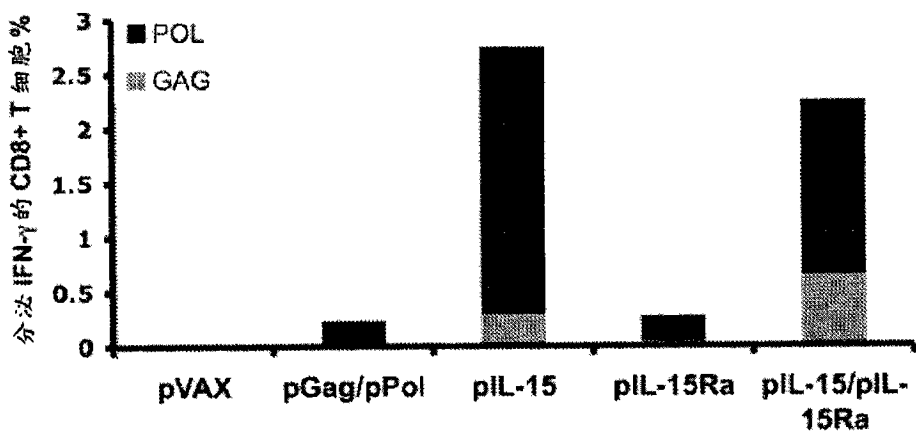


图 6B

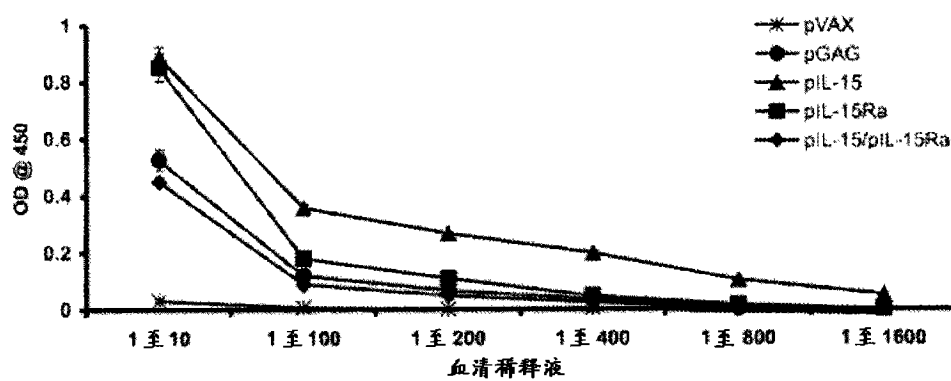


图 6C

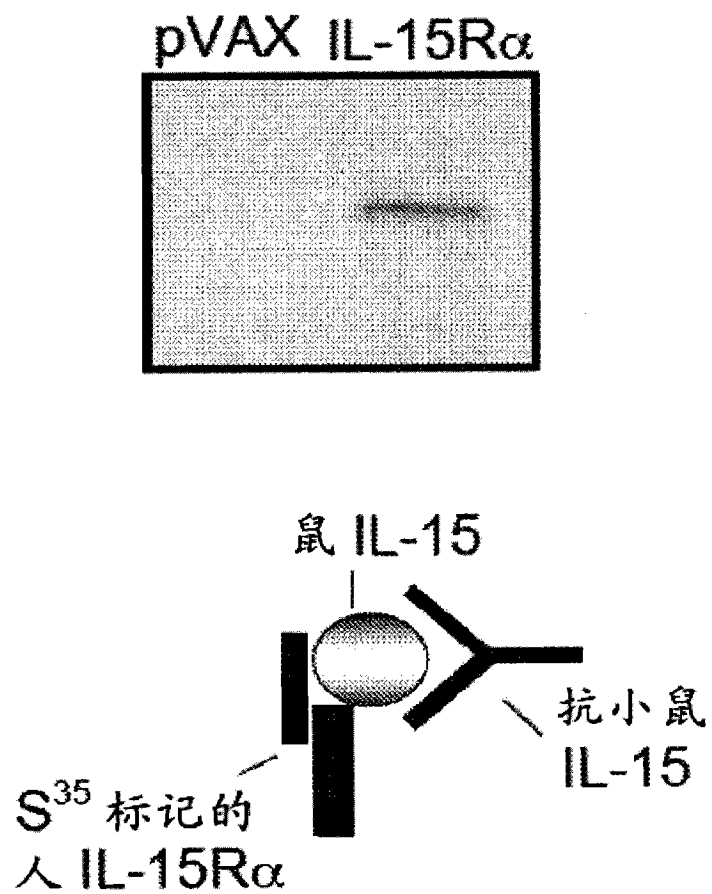


图 7A

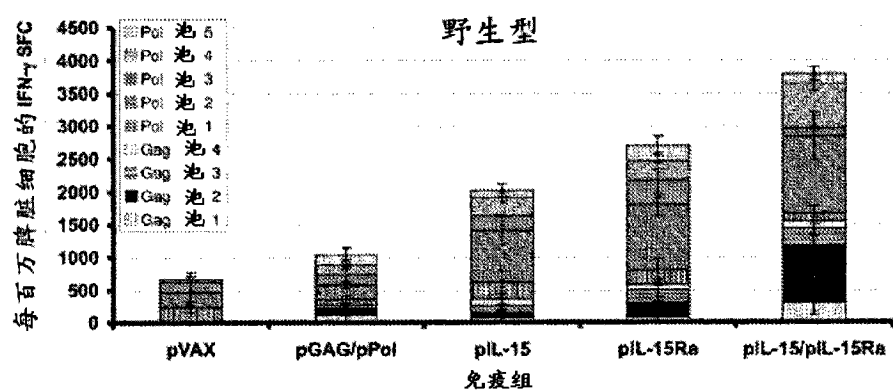


图 7B

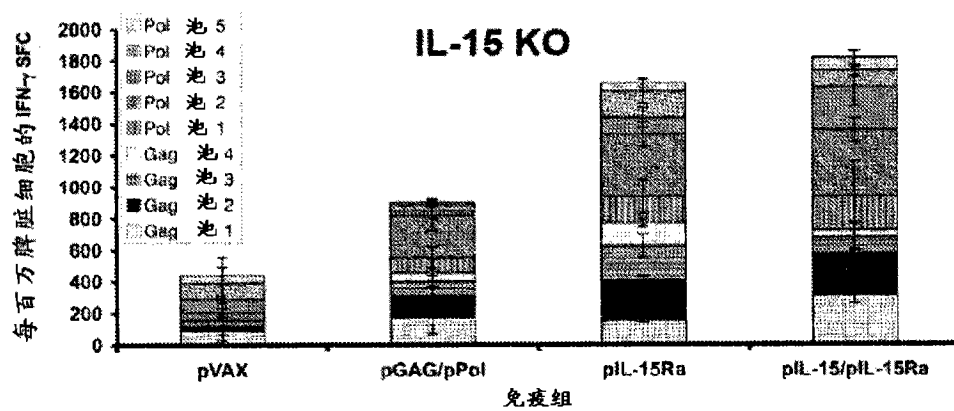


图 7C