



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102625714 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 01

(21) 申请号 200980136014. 3

(22) 申请日 2009. 07. 16

(30) 优先权数据

61/081234 2008. 07. 16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 03. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/050903 2009. 07. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02010/009346 EN 2010. 01. 21

(71) 申请人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯

(72) 发明人 J·F·班彻罗 G·祖拉夫斯基

A·L·弗拉玛 A·科布 H·米德

M·蒙特斯

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

A61K 39/12 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

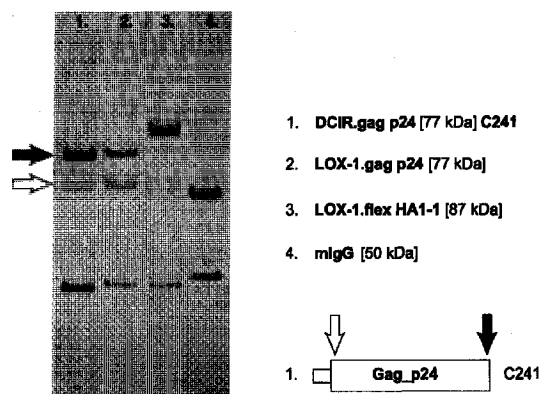
权利要求书 5 页 说明书 43 页 附图 26 页

(54) 发明名称

基于将最大化的 GAG 和 NEF 靶向树突细胞的 HIV 疫苗

(57) 摘要

本发明包括制备并使用疫苗的组合物和方法,所述疫苗包括:DC-特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述 DC-特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Gag 抗原通过消除一个或多个蛋白水解位点而对蛋白水解降解较不敏感;或者 DC-特异性抗体或其片段,将工程用的 Nef 抗原结合至所述 DC-特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌;或者两者都有;其中所述疫苗能够引发 HIV-特异性 T 细胞对 Gag p17、Gag p24、Nef 和 / 或 Cyclin D1 的免疫应答。



1. 一种通过抗原呈递细胞来增强抗原呈递效力的方法,所述方法包括:

分离并纯化树突细胞(DC)-特异性抗体或其片段,将工程用的Gag抗原结合至所述DC-特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点来使所述Gag抗原对蛋白水解降解较不敏感;和

在处理并呈递抗体-抗原复合物用于T细胞识别的条件下接触抗原呈递细胞。

2. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞包括树突细胞。

3. 权利要求1所述的方法,其中,所述DC-特异性抗体或其片段结合至Coherin/Dockerin对的一半。

4. 权利要求1所述的方法,其中,所述DC-特异性抗体或其片段结合至Coherin/Dockerin对的一半并且工程用的Gag抗原结合至Coherin/Dockerin互补对的一半,从而形成复合物。

5. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在DC-特异性抗体或其片段与Gag抗原之间的柔性连接体。

6. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新的糖基化位点。

7. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在DC-特异性抗体或其片段与Gag抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、以及增加的分泌。

8. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在DC-特异性抗体或其片段与Gag抗原之间的柔性连接体。

9. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在DC-特异性抗体或其片段与Gag抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。

10. 权利要求1所述的方法,其中,所述DC-特异性抗体或其片段是人源化的。

11. 权利要求1所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物选自SEQ ID NOS:1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31或32。

12. 权利要求1所述的方法,其中,所述DC-特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性地结合至I型MHC、II型MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和IL-2受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和ASPGR。

13. 一种通过抗原呈递细胞来增强抗原呈递效力的方法,所述方法包括:

分离和纯化DC-特异性抗体或其片段,将工程用的Nef抗原结合至所述DC-特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述Nef抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌;和

在处理并呈递抗体-抗原复合物用于T细胞识别的条件下接触抗原呈递细胞。

14. 权利要求13所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞包括树突细胞。

15. 权利要求13所述的方法,其中,所述DC-特异性抗体或其片段结合至Coherin/

Dockerin 对的一半,并且工程用的 Gag 抗原结合至 Coherin/Dockerin 互补对的一半,从而形成复合物。

16. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体。

17. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间的增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、以及增加的分泌。

18. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体。

19. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。

20. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述 DC-特异性抗体或其片段是人源化的。

21. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述抗体-抗原复合物选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

22. 权利要求 13 所述的方法,其中,所述 DC-特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性地结合至 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

23. 一种疫苗,所述疫苗包括 DC-特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述 DC-特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点,使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感。

24. 权利要求 23 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体。

25. 权利要求 23 所述的疫苗,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新的糖基化位点。

26. 权利要求 23 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体和抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、以及增加的分泌。

27. 权利要求 23 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体。

28. 权利要求 23 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC-特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。

29. 权利要求 23 所述的疫苗,其中,所述 DC-特异性抗体或其片段是人源化的。

30. 权利要求 23 所述的疫苗,其中所述抗体-抗原复合物选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、

5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

31. 权利要求 23 所述的疫苗,其中,所述 DC- 特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性地结合至 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

32. 一种疫苗,所述疫苗包括 DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Nef 抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌。

33. 权利要求 32 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体。

34. 权利要求 32 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新的糖基化位点。

35. 权利要求 32 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体和抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、以及增加的分泌。

36. 权利要求 32 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体。

37. 权利要求 32 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。

38. 权利要求 32 所述的疫苗,其中所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。

39. 权利要求 32 所述的疫苗,其中所述抗体-抗原复合物选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

40. 权利要求 32 所述的疫苗,其中所述 DC- 特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性结合至 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

41. 一种疫苗,所述疫苗包括:

DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点来使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感;和

DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Nef 抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌,其中所述疫苗能够引起对 Gag p17、Gag p24 和 Nef 的 HIV- 特异性 T 细胞免疫应答。

42. 权利要求 41 所述的疫苗,其中,所述 Gag 和 Nef 抗原包括融合蛋白。

43. 权利要求 41 所述的疫苗,其中,所述 Gag 和 Nef 抗原包括由一个或多个柔性连接体分开的融合蛋白。

44. 权利要求 41 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 或 Nef 抗原之间的柔性连接体。

45. 权利要求 41 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。

46. 权利要求 41 所述的疫苗,其中,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。

47. 权利要求 41 所述的疫苗,其中,所述疫苗选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

48. 一种疫苗,所述疫苗包括:

DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点来使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感;和

将工程用的 Nef 抗原结合至 DC- 特异性抗体或其片段或者结合至 Gag 抗原,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌,其中所述疫苗能够引起对 Gag p17、Gag p24 和 Nef 的 HIV- 特异性 T 细胞免疫应答。

49. 权利要求 48 所述的疫苗,其中所述 DC- 特异性抗体或其片段,所述 Gag 和 Nef 抗原包括融合蛋白。

50. 权利要求 48 所述的疫苗,其中所述 Gag 和 Nef 抗原包括由一个或多个柔性连接体分开的融合蛋白。

51. 权利要求 48 所述的疫苗,其中所述蛋白选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

52. 一种增强树突细胞效力的方法,所述方法包括:

分离患者的树突细胞;

将所述树突细胞暴露于激活量的疫苗,所述疫苗包括:

DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点来使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感;和

将工程用的 Nef 抗原结合至 DC- 特异性抗体或其片段或者结合至工程用的 Gag 抗原,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌,其中所述疫苗能够引起对 Gag p17、Gag p24 和 Nef 的 HIV- 特异性 T 细胞免疫应答;和

将加载了抗原、经活化的树突细胞重新导入患者中。

53. 一种疫苗,所述疫苗包括 DC- 特异性抗体或其片段,将包括 CyclinD1 或其片段的工程用抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点,使所述 Cyclin D1 抗原对于蛋白水解降解较不敏感。

54. 权利要求 53 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或

其片段与 Cyclin D1 抗原之间的柔性连接体。

55. 权利要求 53 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新的糖基化位点。

56. 权利要求 53 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Cyclin D1 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体和抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、以及增加的分泌。

57. 权利要求 53 所述的疫苗,其中,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Cyclin D1 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。

58. 权利要求 53 所述的疫苗,其中,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。

59. 权利要求 53 所述的疫苗,其中,所述 DC- 特异性抗体或其片段结合至 Coherin/Docker 对的一半,并且所述工程用的 Cyclin D1 抗原结合至 Coherin/Docker 互补对的一半,从而形成复合物。

60. 一种增强树突细胞效力的方法,所述方法包括:

分离患者的树突细胞;

将所述树突细胞暴露于激活量的疫苗,所述疫苗包括:

DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的包含 Cyclin D1 的抗原或其片段结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点来使所述 Cyclin D1 对蛋白水解降解较不敏感;和

将加载了抗原、经活化的树突细胞重新导入患者中。

61. 一种经分离和纯化的核酸,所述核酸编码选自 SEQ ID NO. :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32 的多肽。

62. 一种经分离和纯化的多肽,所述多肽选自 SEQ ID NO. :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

基于将最大化的 GAG 和 NEF 靶向树突细胞的 HIV 疫苗

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明一般涉及,将病毒蛋白靶向树突细胞的试剂的领域。

[0003] 发明背景

[0004] 在不限制本发明的范围的情况下,结合抗原呈递描述其背景。

[0005] 树突细胞在通过提供可溶的细胞间信号,随后识别病原体来控制先天的和后天的免疫的界面中起到关键的作用。DCs 的这些功能很大程度上依赖于特异性表面受体,“模式识别受体”(PRRs) 的表达,最显著地由 Toll 样受体 (TLRs) 和 C 型凝集素或凝集素样受体 (LLRs) 来表示。

[0006] 在当今的范例中,TLRs 的主要作用是唤醒 DCs 以产生白细胞介素 12(IL-12) 和其它炎症细胞因子用于引起免疫应答。C 型 LLRs 作为强有力的抗原捕获的构件并且掌握巨噬细胞和 DCs 的机理。然而与 TLRs 相比,LLRs 可能具有更广泛的生物功能,所述功能包括细胞迁移、细胞间相互作用。不像 TLRs, LLRs 的这些多种功能可能由于 LLRs 的事实,因此可以识别其自身及非其自身。然而,LLRs 的复杂性,包括在免疫细胞中表达大量 LLRs 的丰富性,已成为了解单个 LLR 的具体功能的主要障碍。除此之外,大多数这些受体的天然配体仍尚鉴别。尽管如此,近期的研究迹象显示,LLRs 与 TLRs 协同作用可以在微生物感染中期间对免疫细胞的活性有贡献。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个实施方案中,本发明包括通过抗原呈递细胞来增强抗原呈递效力的组合物和方法,所述方法包括:分离并纯化 DC- 特异性抗体或其片段,并将工程用的 Gag 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点来使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感;以及在处理并呈递抗体-抗原复合物用于 T 细胞识别的条件下接触抗原呈递细胞。在一方面,所述抗原呈递细胞包括树突细胞。在另一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段结合至 Coherin/Dockerin 对的一半,或者所述 DC- 特异性抗体或其片段结合至 Coherin/Dockerin 对的一半并且所述工程用的 Gag 抗原结合至 Coherin/Dockerin 互补对的一半来形成复合物。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新糖基化位点,或者所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、和增加的分泌。在又一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个选自 SEQ ID NOS. 4 和 6 的连接体。

[0009] 在本发明的另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性的抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。在一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。在一个具体的方面,所述抗体-抗原复合物选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。在另一方面,所述抗体-抗

原复合物还包括用于纯化或鉴定所述复合物的序列标签。在又一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性地结合于 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

[0010] 本发明的另一个实施方案包括通过抗原呈递细胞来增强抗原呈递效力的组合物和方法,所述方法包括:分离并纯化 DC- 特异性抗体或其片段,使工程用的 Nef 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌;以及在处理并呈递抗体-抗原复合物用于 T 细胞识别的条件下接触抗原呈递细胞。在一方面,所述抗原呈递细胞包括树突细胞。在另一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段结合至 Coherin/Dockerin 对的一半,或者所述 DC- 特异性抗体或其片段结合至 Coherin/Dockerin 对的一半并且工程用的 Nef 抗原结合至 Coherin/Dockerin 互补对的一半以形成复合物。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新糖基化位点,或者所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、和增加的分泌。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个选自 SEQ ID NOS. 4 和 6 的连接体。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,该糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。在一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。在又一方面,所述抗体-抗原复合物包括 SEQ ID NOS:11、12、13、14、15、16 和 17。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括用于纯化或鉴定所述复合物的序列标签。在一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性地结合至 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

[0011] 本发明的又一个实施方案是包括 DC- 特异性抗体或其片段的疫苗,将工程用的 Gag 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点,使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新糖基化位点。在又一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、和增加的分泌。在还一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性弹性体,所述柔性弹性体包括一个或多个选自 SEQ ID NO. 4

和 6 的连接体。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。在一个方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。在一个具体的方面,所述抗体-抗原复合物选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。在另一方面,抗体-抗原复合物还包括用于纯化所述复合物的序列标签。本领域技术人员要认识的是,所述抗体-抗原复合物可以通过所述 DC- 特异性抗体或其片段与抗原之间的共价或非共价的连接来形成或者以融合蛋白的形式来形成,所述融合蛋白的氨基端或羧基端的任一部分或者一个或多个的任一部分作为接触体(contactamer)。在一个方面,所述 DC- 特异性抗体或片段选自抗体,所述抗体特异性地结合至 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

[0012] 本发明的又一个实施方案是包括 DC- 特异性抗体或其片段的疫苗,使工程用的 Nef 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新糖基化位点。在又一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、和增加的分泌。在还一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性弹性体,所述柔性弹性体包括一个或多个选自 SEQ ID NO. 4 和 6 的连接体。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或者多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。在一个具体的方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。在另一个具体的方面,所述抗体-抗原复合物包括 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。在又一方面,所述抗体-抗原复合物还包括用于纯化所述复合物的序列标签。本领域技术人员要认识的是,所述抗体-抗原复合物可以通过所述 DC- 特异性抗体或其片段与抗原之间的共价或非共价的连接来形成或者以融合蛋白的形式来形成,所述融合蛋白的氨基端或羧基端的任一部分或者一个或多个的任一部分作为接触体(contactamer)。在另一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段选自抗体,所述抗体特异性地结合至 I 型 MHC、II 型 MHC、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDC-A-2、MARCO、DEC-205、甘露糖受体、Langerin、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1、和 ASPGR。

[0013] 本发明的又一个实施方案是疫苗,所述疫苗包括:DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个

或多个蛋白水解位点,使所述 Gag 抗原对蛋白水解降解较不敏感;和 DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Nef 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌,其中所述疫苗能够引起对 Gag p17、Gag p24 和 Nef 的 HIV- 特异性 T 细胞免疫应答。在一方面,所述 Gag 和 Nef 抗原包括融合蛋白。在另一方面,所述 Gag 和 Nef 抗原包括由一个或多个柔性连接体分开的融合蛋白。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 或 Nef 抗原之间的柔性连接体,所述柔性弹性体包括一个或多个选自 SEQ ID NO. 4 和 6 的弹性体。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Gag 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有机体的连接体序列。在一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。在一个具体的方面,所述疫苗选自 SEQ ID NOS :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。在另一个方面,所述抗体-抗原复合物还包括用于纯化所述复合物的序列标签。

[0014] 在又一个实施方案中,本发明为疫苗,所述疫苗包括:DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点,使所述 Gag 抗原对于蛋白水解降解较不敏感;和将工程用的 Nef 抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原复合物的分泌,其中所述疫苗能够引起对 Gag p17、Gag p24 和 Nef 的 HIV- 特异性 T 细胞的免疫应答。在一方面,DC- 特异性抗体或其片段,所述 Gag 和 Nef 抗原包括融合蛋白。在一方面,所述 Gag 和 Nef 抗原包括由一个或多个柔性连接体分开的融合蛋白。

[0015] 本发明的又一个实施方案包括增强树突细胞的效力的方法,该方法包括:分离患者的树突细胞;将所述树突细胞暴露于激活剂量的疫苗,所述疫苗包括:DC- 特异性抗体或其片段,将工程用的 Gag 抗原结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段以形成抗体-抗原复合物,其中所述 Gag 抗原通过消除一个或多个蛋白水解位点而对蛋白水解降解不敏感;和工程用的 Nef 抗原,将所述 Nef 抗原结合至 DC- 特异性抗体或其片段或者结合至工程用的 Gag 抗原以形成抗体-抗原复合物,其中所述 Nef 抗原包括一个或多个使用最优化的密码子,所述密码子增加抗体-抗原的分泌,其中所述疫苗能够引起对 Gag p17、Gag p24 和 Nef 的 HIV- 特异性 T 细胞免疫响应;以及将加载了抗原、经活化的树突细胞再次引入患者中。

[0016] 本发明的又一个实施方案包括疫苗,所述疫苗包括 DC- 特异性的抗体或其片段,将包括 CyclinD1 或片段的工程用的抗原结合至所述抗体或其片段,从而形成抗体-抗原复合物,其中通过消除一个或多个蛋白水解位点,使所述 Cyclin D1 抗原对蛋白水解降解较不敏感。在一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Cyclin D1 抗原之间的柔性连接体。在另一方面,所述抗体-抗原复合物还包括一个或多个新糖基化位点。在又一方面,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Cyclin D1 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点提供在抗体与抗原之间增强的柔性、在连接体上减少的蛋白水解、以及增加的分泌。例如,所述抗体-抗原复合物还包括在 DC- 特异性抗体或其片段与 Cyclin D1 抗原之间的柔性连接体,所述柔性连接体包括一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点选自得自纤维素降解有

机体的连接体序列。在一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段是人源化的。在另一方面,所述 DC- 特异性抗体或其片段结合至 Coherin/Dockerin 对的一半,以及所述工程用的 Cyclin D1 结合至 Coherin/Dockerin 互补对的一半,从而形成复合物。本发明还包括增强树突细胞效力的方法,所述方法包括:分离患者的树突细胞;将所述树突细胞暴露于激活量的疫苗,所述疫苗包括:DC- 特异性抗体或其片段,将包含 Cyclin D1 工程用的抗原或其片段结合至所述 DC- 特异性抗体或其片段以形成抗体-抗原复合物,其中所述 Cyclin D1 抗原通过消除一个或多个蛋白水解位点、或引入一个或多个糖基化位点、或通过选择一个或多个改进表达的密码子来改进表达,而对蛋白水解降解不敏感;和将加载了抗原、经活化的树突细胞再次引入患者中,。

[0017] 本发明的又一个实施方案包括经分离和纯化的核酸,所述核酸编码选自 SEQ ID NO. :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32 的多肽。本发明的又一个实施方案包括经分离和纯化的多肽,所述多肽选自 SEQ ID NO. :1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、31 或 32。

[0018] 附图的简要说明

[0019] 为了更完全地理解本发明的特征和优点,现在将本发明的详述及其附图作为参考,其中:

[0020] 图 1 显示了蛋白 A 亲和性的考马斯亮蓝染色还原的 SDS PAGE 分析,所述蛋白 A 由 gag p24- 抗体融合蛋白层析纯化,所述融合蛋白得自 CHO-S 或 293F 细胞,所述细胞由编码 H 链 -gag p24 融合蛋白的表达载体瞬时转染;并且显示了构成和期待的分子量的图表。

[0021] 图 2 显示了蛋白 A 亲和性的考马斯亮蓝染色还原的 SDS PAGE 分析,所述蛋白 A 由 gag p24- 抗体融合蛋白层析纯化,所述融合蛋白得自 CHO-S 或 293F 细胞,所述细胞由编码 H 链 -gag p24 融合蛋白与 H 链 -gag p24 连接体的表达载体瞬时转染,所述 H 链 -gag p24 融合蛋白与 H 链 -gag p24 连接体得自纤维酶体锚合脚手架蛋白 B 前体 [溶纤维素拟杆菌] 以及相应的轻 [L] 链表达质粒,并且显示了构成和期待的糖基化位点以及分子量的图表。

[0022] 图 3A 至 3C 显示了 cipA 结构性结构域的示意图。

[0023] 图 4A 至 4C 显示了纤维酶体锚合脚手架蛋白 B 前体 [溶纤维素拟杆菌] 结构性结构域的示意图。

[0024] 图 5 显示了具有期待 C535 编码的 H 链的大体位置的凝胶,并且显示了构成和期待的分子量的图表。

[0025] 图 6 显示了由 [mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-var1-Viralgag-p40-var1-6xHis]C601 与适当的 L 链表达质粒共转染来表达的部分纯化产物的凝胶,并且显示了构成和期待的糖基化位点以及分子量的图表。

[0026] 图 7 显示了不同的 H- 链抗原构建物与相同的适合的 L 链表达构建物瞬时共转染到 293F 细胞中,并且显示了构成和期待的糖基化位点以及分子量的图表。

[0027] 图 8 是筛选来检测可以结合并激活 CD40 的抗 -CD40 抗体的亚类的图。

[0028] 图 9 显示了由 10ug/ml 至无抗 -CD4012E12-hIgG4 Dockerin-Cohesin Flu M1 缀合物的剂量引起的 CD8+ 染色 [横轴] 对 Flu M1- 四聚体染色 [纵轴] 的 FACS 分析。

[0029] 图 10 显示了由 10ug/ml 至无对照抗 hIgG4 Dockerin-Cohesin Flu M1 缀合物的剂量引起的 CD8+ 染色 [横轴] 对 Flu M1- 四聚体染色 [纵轴] 的 FACS 分析。

[0030] 图 11 描绘了用来体外分析对抗 DC 受体 - 抗原靶分子 (TM) 引起抗原特异性 T 细胞在 PBMC 的培养基环境下的扩展的潜能的规程。

[0031] 图 12 显示了 [在 PBMC 中] 使用抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗靶向 DC 的效果。

[0032] 图 13 显示了疫苗引起 CD4⁺ T 细胞的扩展,所述细胞对所有的 gag p24 肽簇具有特异性。

[0033] 图 14 为 FACS 数据 - 纵轴显示了 IFN γ 产生的细胞的百分比 [上框]。下框显示了在 PBMC 培养基中 CD8⁺ 细胞的相似数据,并且该数据也显示了与无肽对照相比,所有覆盖了 gag p17 序列的肽簇更显著地引起 IFN γ 产生的 T 细胞的产生。

[0034] 图 15 显示了以下数据,其中疫苗引起对大多数 HIV nef 肽簇特异的 CD4⁺ 细胞扩展 - 甚至在所测试的最少的疫苗剂量下,IFN γ 产生的 CD4⁺T 细胞比未用肽处理的细胞多。

[0035] 图 16 为 FACS 数据,其中疫苗引起对大多数 HIV nef 肽簇特异的 CD4⁺ T 细胞扩展 - 甚至在所测试的最少的疫苗剂量下,IFN γ 产生的 CD4⁺T 细胞比未用肽处理的细胞多。

[0036] 图 17 显示了图中的数据 - 纵轴显示了 IFN γ 产生的细胞的百分比 [上框]。下框显示了在 PBMC 培养基中 CD8⁺ 细胞的相似数据,并且该数据也显示了与无肽对照相比,所有覆盖了 nef 序列的肽簇更显著地引起 IFN γ 产生的 T 细胞的产生。

[0037] 图 18 显示了测试疫苗能力的规程概要,所述疫苗包括连接至 PSA 的抗 -CD40-12E12 [前列腺特异性抗原] 从而引发从新生 T 细胞种群的 PSA- 特异性的 CD4⁺T 细胞的扩展,所述 CD4⁺T 细胞相应于广泛范围的 PSA 表位。

[0038] 图 19 显示了许多 PSA 肽引发潜在的产生 IFN γ 的应答,这显示了抗 -CD4012E12 和相似抗 CD40 试剂可以有效地将抗原递送至 DC,导致针对抗原的多重表位的初级免疫应答。

[0039] 图 20 显示了用抗 -CD40-PSA 靶向的 DCs 诱导 PSA- 特异性的 CD8⁺T 细胞的应答。IFNDCs 用具有 PSA 的 1 μ g mAb 融合蛋白来靶向。将经纯化的自体同源的 CD8⁺T 细胞共培养 10 天。将细胞用抗 -CD8 和 PSA (KLQCVDLHV) - 四聚体染色。细胞来自 HLA-A*0201 阳性健康供体。结果证明了抗 -CD40 有效地将 PSA 递送至 DC,其依次引起 PSA 特异性的 CD8⁺T 细胞的扩展。

[0040] 图 21 概述了用于测试抗 DC 受体靶向疫苗来引导抗原特异性 T 细胞的扩张的能力的 DC 靶向规程,所述 T 细胞产生自 DC 靶向的摄取以及在其细胞表面上抗原表位的呈递。

[0041] 图 22 [上框] 显示了抗 -CD4012E12 nef、anti-CD4012E12gag p24 和抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph002]。

[0042] 图 22 [下框] 显示了抗 -CD4012E12 nef、anti-CD4012E12 gag p24 和抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph002]。

[0043] 图 23 [上框] 显示了抗 -CD4012E12 nef、anti-CD4012E12 gag p24 和抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph010]。

[0044] 图 23 [下框] 显示了抗 -CD4012E12 nef、anti-CD4012E12 gag p24 和抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph002]。

[0045] 图 24 是显示了 Cohesin-Cyclin D1 融合蛋白与抗 DC 受体 - Dockerin 重组抗体的相互作用的凝胶。

[0046] 图 25 显示了 Cyclin D1 的交叠肽的示意图。

[0047] 图 26 显示了设计用于测试抗-CD40-Cyclin D1 复合物在体外引发 Cyclin D1-特异性的 CD4+T 细胞扩展的能力研究的示意图（左侧），以及从其中所得的 FACS 结果（右侧）。

[0048] 图 27 是相似于图 26 中所详细描述 FACS 分析，其使用不同的正常供体——在这种情况下抗-CD40-Cyclin D1 复合物引发对于 Cyclin D1 肽 P4、P43 和 P70 有特异性的 IFN γ 阳性增殖的 CD4+T 细胞的扩张。

[0049] 图 28 显示了相似于图 26 中所示的示意图（左侧）和分析（右侧），除了使用 CD8+T 细胞之外。

[0050] 图 29 显示了与图 28 的供体相同的相似数据，然而其使用肽池中单个的肽进行分析。

[0051] 发明详述

[0052] 尽管以下详细地讨论了本发明各种实施方案的制备和应用，应当理解的是，本发明提供了许多适用的发明构思，这些发明构思可以体现在各种各样的具体上下文中。本文所讨论的具体实施方案仅仅举例说明了制备和使用本发明的具体方式，并不限制本发明的范围。

[0053] 为了有助于理解本发明，以下定义了许多术语。本文所定义的术语具有本发明相关领域的普通技术人员通常所理解的含义。术语如“一个”、“一种”和“该”不意在仅指一个单数的实体，而是包括可以用于举例说明的具体例子的一般类型。本文的术语用于描述本发明的具体实施方案，但它们的用法并不限制本发明，除了如在权利要求中所概括的。

[0054] 树突细胞 (DCs) 是在调控抗原特异性免疫中起到关键作用的抗原呈递细胞 (Mellman and Steinman 2001), (Banchereau, Briere 等人 .2000), (Cella, Sallusto 等人 1997)。DC 捕获抗原，将其处理成肽并将这些呈递至 T 细胞。因此，将抗原直接地递送到 DC 是改进疫苗的重要领域。开发基于 DC 的疫苗的一个这样的实例是使用自体同源 DCs 的体外抗原加载，并将这些 DCs 重新给药至患者 (Banchereau, Schuler-Thurner 等人 2001), (Steinman and Dhodapkar 2001)。另一种改进疫苗效果的策略是特异性地靶向 DC，所述 DC 结合至相对于内在化 DC 特异性受体的抗体。对于疫苗而言 DC 的潜在靶向通过关键的小鼠研究来体现。在体内，使用偶联至卵清蛋白 (OVA) 的抗-LOX-1 mAb 靶向通过针对 I 型 MHC 路径的外源抗原交叉呈递，从而诱导了保护性的 CD 8+ 细胞的应答 (Delneste, Magistrelli 等人 2002)。而且，结合至抗-DEC205mAb 的 OVA 与 CD40L 成熟刺激物的组合通过体内 DCs 增强了 I 型 MHC 限制呈递，并导致效应器记忆 CD8+T 细胞持久形成。(Bonifaz, Bonnyay 等人 2004)。这些研究均显示了引人注目的剂量节约（即在非常低的抗原剂量下的强免疫响应）并在其它类型的 OVA 免疫中显示了比正常更宽的应答。近期关于将 HIV gag 抗原通过 DEC205 靶向至 DC 的工作将这些概念拓展到临床上相关的抗原，并证实了将抗原靶向至 DC 上的原则——引人注目的剂量节约，单次接种得到保护性应答，以及在 CD8 和 CD4 细胞成分中抗原特异性 T 细胞的扩展 (Trumpfheller, Finke 等人 2006)。

[0055] 本发明提供了以受控制的，多变量的方式将多种抗原或蛋白（工程用的，表达的，并独立地从原代 mAb 进行纯化）与一种单独的原代重组 mAb 进行复合。当前存在用于位点特异地加工生物素化位点的方法，用来向一个原代 mAb 加入不同的蛋白（各个被加工并分别连接到抗生蛋白链菌素）。然而，本发明提供了以固定的摩尔比和在固定的位置向原代

mAb 加入分别加工的蛋白的多种组合。

[0056] 如本文所使用的,术语“抗体或其片段”用于描述已被加工来提供靶向特异性抗体的重组抗体系统。单克隆抗体使用标准的杂种细胞技术,重组抗体显示,人源化的单克隆抗体等等来制备。所述抗体可以被用于,例如(通过一个原代重组抗体针对内在化受体,例如人类的树突细胞受体)将多重抗原和/或抗原以及活化细胞毒素靶向至树突细胞(DC)。

[0057] 抗体的抗原结合部分包括一个或多个的片段(即其片段),所述片段可以包括一个或多个可变的结构域、一个或多个可变的和第一个不变的结构域、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段和 Fv 片段、以及 Fabc 片段和/或具有部分 Fc 结构域的 Fab 片段,在所述片段上将同源的分子结合部分加入至氨基酸序列和/或结合。所使用的抗体可以为任意的同型的或同类的,同亚类或来自任意的来源(动物和/或重组)。在特定的方面,抗原结合位点得自非人类的单克隆抗体,所述抗体使用本领域公知的技术移植到人类抗体骨架上,从而将所述抗体“人源化”。

[0058] 本文所使用的术语“抗原”指在接受抗原时,能够引发体液的和/或细胞免疫应答的分子。在本发明中抗原可能在两种背景下使用:作为抗体或工程用或重组抗体(rAb)的其它抗原识别结构域的靶,或者作为以缀合蛋白(以共价或非共价连接)或融合蛋白通过 rAb 运输到和/或进入细胞中的分子。抗原通常是引起疾病的试剂,对于所述疾病接种会是有好处的治疗。当抗原在 MHC 上呈递,肽通常是约 8 到约 25 个氨基酸。抗原包括任意类型的生物分子,其包括例如简单的代谢中间产物、糖、脂和激素,以及大分子如复合的碳水化合物、磷脂、核酸和蛋白。抗原的一般分类包括,但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原及其它的寄生生物抗原、肿瘤抗原、涉及自发免疫疾病的抗原、涉及过敏和移植排斥的抗原、和其它各种各样的抗原。本发明使用来自病毒的具有改进的性质(如减少的蛋白水解,增加的分泌,增加的表达或者稳定性)的抗原,所述抗原利用抗体或者其片段靶向抗原呈递细胞。

[0059] 病毒抗原的实例包括,但不限于,例如逆转录病毒抗原,如来自人类免疫缺陷病毒(HIV)抗原的逆转录病毒抗原,如 gag、pol 和 env 基因的基因产品, Nef 蛋白,反转录酶和其它 HIV 成分;肝炎病毒抗原如乙型肝炎的 S、M 和 L 蛋白,乙型肝炎病毒的 pre-S 抗原,和其它肝炎,所述其它的肝炎如甲型、乙型和丙型,病毒成分如丙型肝炎的病毒 RNA;流感病毒抗原如红细胞凝聚素和神经氨酸苷酶和其它的流感病毒的成分;麻疹病毒抗原如麻疹病毒融合蛋白及其它的麻疹病毒成分;风疹抗原如蛋白 E1 和 E2 及其它的风疹病毒成分;轮状病毒抗原如 VP7_{sc} 及其它的轮状病毒成分;巨细胞病毒抗原如信封糖蛋白 B 及其它巨细胞病毒抗原成分;呼吸道合体细胞病毒抗原如 RSV 融合蛋白, M2 蛋白及其它呼吸道合体细胞病毒抗原成分;单纯疱疹病毒抗原如即早蛋白、糖蛋白 D 及其它单纯疱疹病毒抗原成分;带状疱疹病毒抗原如 gpI、gpII 及其它带状疱疹病毒抗原成分;流行性乙型脑炎病毒抗原如蛋白 E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2A、80% E 及其它流行性乙型脑炎病毒成分;狂犬病病毒抗原如狂犬病糖蛋白、狂犬病核蛋白及其它狂犬病病毒抗原成分。病毒抗原的更多实例参见 Fundamental Virology, 第二版, eds. Fields, B. N. and Knipe, D. M. (Raven Press, New York, 1991)。

[0060] 可以使用本发明的 rAb-DC/DC- 抗原疫苗递送的抗原性靶点包括基因编码抗原如病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生生物抗原。病毒包括小核糖核酸病毒、冠状病毒、囊膜

病毒、黄病毒、棒状病毒、副粘病毒、正粘病毒、本扬病毒、砂粒病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、痘病毒、嗜肝病毒和海绵状病毒。其它的病毒靶点包括流感、1 型和 2 型单纯疱疹病毒、麻疹、登革热、天花、小儿麻痹症或 HIV。病原体包括锥体虫、绦虫、蛔虫、蠕虫、疟疾。可以以这种方式靶向肿瘤标记物如胎儿抗原或者前列腺特异抗原。其它的实例包括：HIV env 蛋白和乙肝表面抗原。将根据本发明的载体出于接种的目的的给药要求该载体所关联的抗原对于引发长期的转基因表达是充分地无免疫原性的，对其期待强的免疫应答。在一些情况下，不要求对个体进行频繁的接种，可能每年或者每两年一次，并且接种针对感染性的试剂提供长效的免疫原性保护。在本发明中用作载体并最终用作抗原的有机体、过敏原和核酸及氨基酸序列见于第 6,541,011 号美国专利，在此将其相关的部分，尤其地，将有机体与可能用于本发明的具体序列配对的表格引入作为参考。

[0061] 在免疫细胞，如能够使用本发明的 rAb 进行靶向的抗原呈递细胞或者树突细胞表面上的抗原通常将根据多种因素进行选择，所述因素包括：内在化的可能性、免疫细胞特异性的水平、所靶向的免疫细胞的类型、免疫细胞成熟和 / 或激活的水平等等。树突细胞的细胞表面标记物的实例包括，但不限于，I 型 MHC、II 型 MHC、B7-2、CD18、CD29、CD31、CD43、CD44、CD45、CD54、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR 和 / 或 ASPGR 等等；而在一些的情况下也不存在 CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD56 和 / 或 CD57。用于抗原呈递细胞的细胞表面标记物的实例包括，但不限于，I 型 MHC、II 型 MHC、CD40、CD45、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和 IL-2 受体、ICAM-1、Fc γ 受体、LOX-1 或 ASPGR。用于 T 细胞的细胞表面标记物包括，但不限于 CD3、CD4、CD8、CD 14、CD20、CD11b、CD16、CD45 和 HLA-DR。

[0062] 如本文所使用的，术语“表位”指包括与表位相似的一级、二级、或三级结构的肽或蛋白，所述表位是位于多种病原体多肽中的，该多肽由病原体 DNA 或 RNA 编码。相似性水平通常达到这样的程度，以至于受控制针对该多肽的单克隆或多克隆抗体也会结合至肽或蛋白抗原、与肽或蛋白抗原反应或识别肽或蛋白抗原。可以将此抗体与多种免疫测定方法结合使用，所述免疫测定方法如蛋白印迹法、ELISA、RIA 等等，其对于本领域技术人员全部是已知的。病原体表位和 / 或其功能等价物的鉴定，所述蛋白表位和 / 或其功能等价物适用作本发明的疫苗。一旦进行分离和鉴定，能够容易地获得其功能等价物。例如，可以利用在第 4,554,101 号美国专利中所教导的 Hoop 方法，在此将其结合作为参考，该专利教导了基于疏水性对氨基酸序列的表位进行鉴定和制备。在基于这一点的其它几篇论文及软件程序中所描述的方法也能用于确定表位的核心序列（参见如 Jameson and Wolf, 1988; Wolf 等人, 1988; 第 4,554,101 号美国专利）。这些“表位核心序列”的氨基酸序列随后可能被容易地包括于肽中，这通过使用肽合成技术或重组技术。

[0063] 如本文所使用的，术语“单克隆抗体”指具有同种的抗体群的抗体组合物。该术语不限制抗体的种类或来源，也不意在将其按照其制备的方式进行限制。该术语围绕着整个的免疫球蛋白以及片段如 Fab、F(ab')₂、Fv、或在母体单克隆抗体分子中呈现免疫结合性质的其它片段。

[0064] 如本文所使用的，术语“抗原结合位点”或“结合蛋白”指免疫球蛋白分子参与抗原结合的部分。所述抗原结合位点由重（“H”）和轻（“L”）链的 N 端可变的（“V”）区域的氨基酸残基形成。在重和轻链的 V 区中的三种高度不同的延伸称作“高度可变的区域”，所述区域插入于称作“框架区域”（FRs）更保守的侧面延伸之间。如本文所使用的，术语“FR”

指发现在免疫球蛋白中,天然地位于高度可变区域之间或者附近的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链中的三个高度可变区域和重链中的三个高度可变区域在三维空间中相互关联地分布,从而形成抗原结合的表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面是互补的,以及重和轻链的三个高度可变区域称作“互补决定区域”或者“CDRs”。

[0065] 如本文所使用的,术语“人源化”抗体指包括得自所述的非人免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,其包括具有啮齿类动物 V 区域的嵌合类抗体,以及其与人类的恒定结构域融合的相关 CDRs,啮齿动物的 CDRs 在于合适的人类恒定结构域融合之前移植到人类的支持 FR 中,以及由重组的镶嵌的啮齿动物 FR 所支持的啮齿动物 CDRs。这些“人源化”的分子设计用于使得针对啮齿动物抗人类的抗体分子不期待的免疫应答最小化,所述的不期待的免疫应答限制了这些部分在人类接受者中的持久性和治疗应用的效力。

[0066] 疫苗组合物的制备可以被制备为注射剂,所述疫苗组合物包括编码本发明的抗原的核酸作为活性成分,所述注射剂可以为液体溶液或者混悬液,也可以为适于溶解或者悬浮于液体中的固体。所述制备可以为在脂质体中乳化、封装。所述活性免疫成分通常与载体混合,所述载体是药学上可接受的并与活性成分相容的。

[0067] 术语“药学上可接受的载体”指对于其所给药的受体,不导致过敏反应或者其它不希望的效果。适用的药学上可接受的载体包括如水、盐水、磷酸盐缓冲液、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。除此之外,如果希望,所述疫苗可以包含少量的辅助物质如湿润剂和乳化剂,pH 缓冲试剂和 / 或佐剂,它们增强疫苗的效力。可能有效的佐剂的实例包括,但不限于:氢氧化铝、N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酰基-D-异谷酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-非胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷酰胺、MTP-PE 和 RIBI,其包含提取自细菌的三种组分:单磷酰基酯类 A、海藻糖霉菌酸酯和在 2% 角鲨烯 / Tween 80 乳液中的细胞壁骨架 (MPL+TDM+CWS)。其它的佐剂的实例包括 DDA (二甲基二十八烷基溴化铵)、Freund's 完整和不完整的佐剂、和 QuilA。除此之外,免疫调节物质也可以与在此描述的佐剂共同使用,所述的免疫调节物质如淋巴因子 (如 IFN- γ , IL-2 和 IL-12) 或合成的 IFN- γ 诱导物如聚 I:C。

[0068] 药物产品可以包括裸多核苷酸,所述裸多核苷酸具有特异性核苷酸序列的一个或多个拷贝,所述核苷酸序列结合于阿朴脂蛋白的特异性 DNA 结合位点,所述 DNA 结合位点存在于本发明所述的血浆阿朴脂蛋白上。所述多核苷酸可以编码生物上的活性肽、反义 RNA 或核酶,并且将以生理上可接受的给药形式提供。可能来自本发明的另一种药物产品可以包括高度纯化的血浆脂蛋白段,所述脂蛋白组分根据在此描述的方法从患者的血液中或者其它的来源分离;并且包括多核苷酸,所述多核苷酸包括特异性核苷酸序列的一个或多个拷贝,所述核苷酸序列结合于阿朴脂蛋白的特异性 DNA 结合位点,所述 DNA 结合位点存在于本发明所述的血浆阿朴脂蛋白上,并将其与纯化的脂蛋白段预先结合成为生理上可接受的且可给药的形式。

[0069] 再一种药物产品可以包括高度纯化的血浆脂蛋白段,所述血浆脂蛋白段包括重组的阿朴脂蛋白片段,所述阿朴脂蛋白片段包括特异的 DNA 结合基序的一个或多个拷贝,并以药学上可接受的且可给药的形式,预先结合到含有一个或多个特异的核苷酸序列的多核苷酸上。

[0070] 给药的剂量在很大程度上取决于所治疗的受体的体重和生理状况、以及给药的途径和治疗的频率。包括预先结合到高度纯化的脂蛋白段的裸多核苷酸的药物组合物可以以

1 μ g 至 1mg 的多核苷酸和 1 μ g 至 100mg 的蛋白的量给药。

[0071] 将疫苗给药患者应该遵守给药化学疗法的一般规程,考虑载体的毒性,如果有的话。如果需要,应预料到治疗周期会被重复。

[0072] 当考虑基因疗法的临床实践时,必须为所期待的应用制备复合物用作合适的药物组合物。通常来说,这将必须制备基本没有致热原且基本没有可能对人或动物有害的任何其它杂质的药物组合物。也可以期待使用合适的盐和缓冲液来使所述复合物稳定,并使所述复合物通过靶向细胞来摄取。

[0073] 本发明的含水组合物可以包括有效量的化合物,所述化合物溶解或分散于药学上可接受的载体或含水的介质中。这样的组合物也可以被称作接种体。这样的介质和试剂在药学上的活性物质的应用被本领域所公知。除了迄今为止与活性成分不相容的任何传统的介质或试剂,均考虑其治疗组合物中的使用。也可以将补充的活性成分加入到组合物中。本发明的组合物可以包括经典的药物制剂。分散液也可以在甘油、液态的聚乙二醇及其混合物中,以及在油中制备。在一般的储存和使用的条件下,这些制剂含有防腐剂,从而防止微生物的生长。

[0074] 疾病状态。根据本发明的治疗组合物的给药可以取决于所治疗的具体疾病,通过任意常规的途径(只要目标组织通过该途径是可达的)使抗原递送到位置最大化用于将免疫应答最大化(或在一些情况下最小化)。给药通常通过原位、皮内、皮下、肌肉内、腹膜内或脉管内注射。其它的用于递送部位包括:口、鼻、面颊、直肠、阴道或局部。局部给药可能对于皮肤癌是特别有利的。这样的组合物通常以包括生理学上可接受的载体、缓冲剂或其它赋形剂的药学上可接受的组合物的形式给药。

[0075] 本发明的疫苗或者治疗组合物可以不经肠道给药,通过注射,例如皮下或者肌肉内给药。适用作其它给药模式的制剂包括栓剂,并且在一些情况下,包括口服制剂或适用于分散成为气雾的制剂。在口服制剂的情况下,T 细胞亚型的操作使用佐剂、抗原封装或向各种制剂中加入单个的细胞毒素,从而得到具有优化免疫应答的改进的口服疫苗。栓剂、传统的粘合剂和载体可以包括例如聚二醇或甘油三酯;该栓剂可以由含有 0.5% 至 10% 的活性成分的混合物来形成,优选地 1% -2%。口服制剂包括这样的通常采用的赋形剂,如医药级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、钠糖精、纤维素、碳酸镁等。这些组合物以溶液、悬浮液、药片、药丸、胶囊、缓释制剂或者粉末的形式,并含有 10% -95% 的活性成分,优选为 25% -70%。

[0076] 本发明的核酸编码抗原可以在疫苗中或者治疗组合物中,作为中性物质或者盐的形式进行配制。药学上可接受的盐包括酸加成盐(通过肽的游离氨基基团形成)和用无机酸形成的那些,所述无机酸如盐酸或磷酸,或者用有机酸形成的那些,所述有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、马来酸等。利用游离的羧基基团形成的盐也可由无机碱得到,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或者氢氧化铁,以及可有机碱得到,例如异丙基胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0077] 疫苗或治疗组合物以与剂型相符合的方式给药,并且这样的量在预防上和/或治疗上都是有效的。所给药量取决于所治疗的受体,包括,所述受体的免疫系统来合成抗体的能力,以及所期待的保护或者治疗的程度。适合的剂量范围在每个接种几百个微生物活性成分的量级上,范围为 0.1mg 至 1000mg,如约 1mg 至 300mg,且优选地在约 10mg 至 50mg

的范围内。对于起始给药的合适控制以及加强的注射也是可变的,但通过初始给药之后随继的接种或其它给药来代表。所需给药的活性成分的精确量取决于从业者的判断,并可能对于各个对象而言是独特的。对于本领域的技术人员而言明显的是,本发明治疗有效量的核酸分子或者融合多肽和其它的情况一起取决于给药的计划、给药抗原的单位剂量、核酸分子或融合多肽是否与其它的治疗剂共同给药、接收者的免疫状态和健康情况、以及具体核酸分子或者融合多肽的治疗活性。

[0078] 组合物可能以单剂量给药,或者多剂量给药。在多剂量的计划中,接种的主要过程可以包括如 1-10 个独立的剂量,随后在间隔的时间给药其它剂量,从而保持或者增强免疫应答,例如在第 1-4 个月进行第二剂量,并且如果需要,在几个月后给药随后的剂量(或者多个剂量)。周期性的加强给药以 1-5 年的间隔,通常三年的给药,从而保持期待的保护性免疫的水平。免疫的过程可以随后进行外周血液淋巴细胞(PBLs)与 ESAT 或者 ST-CF 的体外增殖试验,并且通过测量从待发的淋巴细胞中释放的 IFN- γ 。该试验可以使用传统的标记物进行,所述标记物如放射性的核苷酸、酶、荧光标签等。这些技术对于本领域技术人员是已知的,并且见于第 3,791,932,4,174,384 和 3,949,064 号美国专利中,将其相关的部分引入本文作为参考。

[0079] 本发明的疫苗可以以一个或多个“单位剂量”的形式来提供,这取决于是否使用核酸载体、是否使用最终纯化的蛋白或最终的疫苗形式。单位剂量定义为含有预先确定量的治疗组合物,计算所述的治疗组合物以在其给药的时候,即在期待的途径下和治疗区域中产生期待的应答。要给药的量,以及具体的途径和制剂是临床技术领域技术人员所了解的。也可以对要治疗的受体进行评估,尤其对于受体的免疫系统的状态和所期待的保护进行评估。单位剂量未必作为单次的注射给药,但可以在一定时间段内包括连续的融合。本发明的单位剂量可以以 DNA/kg(或蛋白/Kg)体重进行描述,以约 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.5、1、10、50、100、1,000 或更多的 mg/DNA 或蛋白/kg 体重来给药。相似地,所递送的 rAb-DC/DC- 抗原疫苗的量可以在约 0.2 至约 8.0mg/kg 之间变化。因此,在具体的实施方案中,可以在体内将 0.4mg、0.5mg、0.8mg、1.0mg、1.5mg、2.0mg、2.5mg、3.0mg、4.0mg、5.0mg、5.5mg、6.0mg、6.5mg、7.0mg 和 7.5mg 的疫苗递送到个体中。所给药的疫苗的剂量在很大程度上取决于受体的体重和身体状态,以及所给药的途径以及治疗的频率。包括预先结合到脂质体或病毒递送载体的裸多核苷酸可以以 1 μ g 至 1mg 的量,以及以 1 μ g 至 100mg 蛋白的量给药。因此,颗粒组合物可以包括约 1 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g、50 μ g、60 μ g、70 μ g、80 μ g、100 μ g、150 μ g、200 μ g、250 μ g、500 μ g、600 μ g、700 μ g、800 μ g、900 μ g 或 1,000 μ g 的多核苷酸或者蛋白,所述的多核苷酸或蛋白独立地结合至 1 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g、3.0 μ g、40 μ g、50 μ g、60 μ g、70 μ g、80 μ g、100 μ g、150 μ g、200 μ g、250 μ g、500 μ g、600 μ g、700 μ g、800 μ g、900 μ g、1mg、1.5mg、5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg 或 100mg 的载体。

[0080] 本发明也可以用于制备组合式的 rAb 载体,其例如重组的人源化的 mAb(用于特异性的人类树突细胞受体),所述重组的人源化的 mAb 与来自蓖麻毒素、炭疽毒素和葡萄球菌 B 肠毒素的保护性抗原复合。其潜在的市场在于所有军事人员的接种,以及备用的储存疫苗,该疫苗用于针对任何与这些试剂相关的生物威胁给药大的人口集中地。本发明在一般的,于人类和动物的疫苗设计中有广泛的应用。感兴趣的产业包括制药和生物技术产业。

[0081] 本发明包括组合物和方法,包括疫苗,所述疫苗为了针对抗原引发有效的且广泛的免疫响应,特异性地将抗原靶向(递送)到抗原呈递细胞(APC)。这些组合物针对产生抗原的试剂(病原体或癌)产生预防性或者治疗性的免疫应答。除此之外,本发明制备试剂,所述试剂直接地或与其它试剂一起在其余抗原呈递细胞的特异性结合中有治疗意义。

[0082] Gag-Nef 疫苗。下文所示的序列是重链(H)-HIV gag p24 融合蛋白,其中 p24 区域[斜体的通过短的间隔[黑体]连接到 hIgG4H 的 C 端,所述的间隔得自人类主要组织相容性复合体的柔性环,第二类,DR α 前体。下划线的 AS 残基由用于构造目的的限制位点编码[在此情况中 Nhe I]。该类型的抗体 p-24 融合蛋白在科技文献中已经描述了[例如 Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses (2006) Boscardin 等人, JEM, 第 203 卷, Number 3, 599-606]。

[0083] 改进的抗体-抗原连接体序列。[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-Viralgag]C241 为

[0084]

**QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPFEGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASDMAKKETVWRLEEFGRPIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVV
EEKAFSPEVIPMFSA LSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAE
WDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQE QIGWMTNNPPIPVGEIYK
RWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNW
MTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL (SEQ
ID NO.:1)**

[0085] 图 1, 道 1 和道 2 显示了蛋白 A 亲和性的考马斯亮蓝染色还原的 SDS PAGE 分析, 所述蛋白 A 由 gag p24- 抗体融合蛋白层析纯化, 所述融合蛋白得自 CHO-S 或 293F 细胞, 所述细胞由编码 H 链 -gag p24 融合蛋白的表达载体瞬时转染[编码, 例如通过天然信号序列编码前述的 C241], 以及相应的轻链(L) 表达质粒。一般对于分泌蛋白的产生而言, 在收获培养的悬浮物用于后续的纯化之前长达几天时, 进行共转染培养。全长的[~77kDa]H 链 -gag p24 融合链显示于上行。也显示了经剪切的 H 链产物[下行], 所述的经剪切的 H 链产物比未与其它蛋白融合的 H 链迁移的稍微更慢一些[以~50kDa 的条带显示于道 4 中]。该结果显示 H 链 -p24 连接体序列对于蛋白水解卵裂是易受影响的, 从而危害了所产生的分泌的

抗体-抗原融合蛋白的完整性。

[0086] 于此相比,抗体-流感 HA1-1 融合蛋白可以在 H 链的 C 端与 HA1-1 结构域之间不显著观察到的卵裂的情况下分泌和回收。[mAnti-LOX-115C4H-LV-hIgG4H-C-Flex-FluHA1-1-6xHis]C114 为:

[0087]

EIQLQQTGPELVKPGASVKISCKASGYPFTDYIMVWVKQSHGKSLE
WIGNISPYYGTTNYNLKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYC

[0088]

ARSPNWDGAWFAHWGQGALVTVSAAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
GKASDTTEPATPTTPVTTDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLE
DSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSEN
GICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKS
SFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPPNSKEQQONLYQN
ENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGN
LIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGE
CLKYVRS AKLRMVHHHHHHH (SEQ ID NO.:2)

[0089] 在这种情况下,将得自纤维素酶体锚脚手架 B 前体 [来自热纤梭菌 ATCC 27405 的 CipA] 的短连接体 [黑体] 插入到 H 链的 C 端 [通过下划线的连接序列] 与流感 HA1-1 结构域 [斜体] 之间。在 H 链的 C 端与 HA1-1 结构域之间没有明显的蛋白水解卵裂 [图 1 的道 3]。

[0090] 图 2 的道 3 显示了蛋白 A 亲和性的考马斯亮蓝染色还原的 SDS PAGE 分析,所述蛋白 A 由 gag p24- 抗体融合蛋白层析纯化,所述融合蛋白得自 CHO-S 或 293F 细胞,所述细胞由编码 H 链-gag p24 融合蛋白与 H 链-gag p24 连接体的表达载体瞬时转染,所述 H 链-gag p24 融合蛋白与 H 链-gag p24 连接体得自纤维素酶体锚合脚手架蛋白 B 前体 [溶纤维素拟杆菌] 和相应的轻 [L] 链表达质粒。

[0091] [mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-var1-Viralgag-var1-6xHis]C560 示于下文 [下划线的残基来自限制性位点连接序列,而黑体的是柔性的连接体残基]:

[0092]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
[0093]

PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKAASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKNPASVDSEFAQQAAADTGH
SNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSE
GATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQ
MREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTHNPPIVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSI
LDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTIL
KALGPGATLEEMMTACQGVGHHHHHH (SEQ ID NO.:3)

[0094] 上述的抗体-gag p24 融合蛋白完整地制备,在 H 链 C 端与 gag p24 结构域之间没有可检测的卵裂。因此,QTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKNP (SEQ ID NO. :4) 连接体序列对于 gag p24 对于疫苗生产目的而言是优秀的。

[0095] 优选的连接体序列得自脚手架蛋白和相关的蛋白。下文的序列是 CipA——来自纤维素降解细菌的脚手架蛋白。该蛋白包含多个由连接体序列 [斜体的] 散布的 Cohesin 结构域,所述的连接体序列明显地是柔性的——反映了该蛋白的角色:(i) 通过碳水化合物结合结构域 [CBM-3, 图 3] 锚定于纤维素基质;(ii) 以及通过酶连接锚定结构域,结合于纤维素降解酶如内切葡聚糖酶 D。

[0096] > gi | 2506991 | sp | Q06851 | CIPA_CLOTM 纤维素溶酶体脚手架蛋白 A 前体 (纤维素溶酶体糖蛋白 S1/SL) (纤维素结合蛋白 A) (Cohensin) [热纤梭菌 ATCC 27405]。黑体的残基是用于上述 C114 构建物的连接体序列。

[0097]

MRKVISM L L V V A M L T T I F A A M I P Q T V S A A T M T V E I G K V T A A V G S K V E I
P I T L K G V P S K G M A N C D F V L G Y D P N V L E V T E V K P G S I I K D P D P S K S F D S A I Y
P D R K M I V F L F A E D S G R G T Y A I T Q D G V F A T I V A T V K S A A A P I T L L E V G A F A
D N D L V E I S T T F V A G G V N L G S S *V P T T Q P N V P S D* G V V V E I G K V T G S V G T T V E I P
V Y F R G V P S K G I A N C D F V F R Y D P N V L E I I G I D P G D I I V D P N P T K S F D T A I Y P D R
K I I V F L F A E D S G T G A Y A I T K D G V F A K I R A T V K S S A P G Y I T F D E V G G F A D N D L
V E Q K V S F I D G G V N V G N A T P T K G A T P T N T A T P T K S A T A T P T R P S V P T N T P T N T P
A N T P V S G N L K V E F Y N S N P S D T T N S I N P Q F K V T N T G S S A I D L S K L T L R Y Y Y T V
D G Q K D Q T F W C D H A A I I G S N G S Y N G I T S N V K G T F V K M S S T N N A D T Y L E I S
F T G G T L E P G A H V Q I Q G R F A K N D W S N Y T Q S N D Y S F K S A S Q F V E W D Q V T A Y L N G

[0098]

VLVWGKEPGGSVVPSTQPVTTPPATTKPPATTKPPATTIPPSDDPNAIKIKVDT
VNAKPGDTVNIPVRFSGIPSKGIANCDFVYSYDPNVLEIIEIKPGELIVDPNP
DKSFDTAVYPDRKIIIVFLFAEDSGTGAYAITKDGVFATIVAKVKSGAPNGLS
VIKFVEVGGFANNDLVEQRTQFFDGGVNVGDTTVPTTPTTPVTTPPTDDSN
VRIKVDTVNAKPGDTVRIPVRFSGIPSKGIANCDFVYSYDPNVLEIIEIEPG
DIIVDPNPDKSFDTAVYPDRKIIIVFLFAEDSGTGAYAITKDGVFATIVAKVKS
GAPNGLSVIKFVEVGGFANNDLVEQKTQFFDGGVNVGDTTEPATPTTPVT
*TPTTTDDLD*AVRIKVDTVNAKPGDTVRIPVRFSGIPSKGIANCDFVYSYDP
NVLEIIEIEPGDIIVDPNPDKSFDTAVYPDRKIIIVFLFAEDSGTGAYAITKD
GVFATIVAKVKSGAPNGLSVIKFVEVGGFANNDLVEQKTQFFDGGVNVGDT
TEPATPTTPVTTPTTTDDLD
AVRIKVDTVNAKPGDTVRIPVRFSGIPSKGIAN
CDFVYSYDPNVLEIIEIEPGDIIVDPNPDKSFDTAVYPDRKIIIVFLFAEDSGT
GAYAITKDGVFATIVAKVKEGAPNGLSVIKFVEVGGFANNDLVEQKTQFF
DGGVNVGDTTEPATPTTPVTTPTTTDDLD
AVRIKVDTVNAKPGDTVRIPV
RFGIPSKGIANCDFVYSYDPNVLEIIEIEPGELIVDPNPDKSFDTAVYPDRKM
IVFLFAEDSGTGAYAITEDGVFATIVAKVKSGAPNGLSVIKFVEVGGFANN
DLVEQKTQFFDGGVNVGDTTEPATPTTPVTTPTTTDDLD
AVRIKVDTVNAK
PGDTVRIPVRFSGIPSKGIANCDFVYSYDPNVLEIIEIEPGDIIVDPNPDKSF
DTAVYPDRKIIIVFLFAEDSGTGAYAITKDGVFATIVAKVKEGAPNGLSVIKF
VEVGGFANNDLVEQKTQFFDGGVNVGDTTVPTTSPTTTPPEPTITPNKLTL
KIGRAEGRPGDTVEIPVNLYGVPQKGIASGDFVVSYPNVLEIIEIEPGELI
VDPNPDKSFDTAVYPDRKMIVFLFAEDSGTGAYAITEDGVFATIVAKVKEG
APEGFSAIEISEFGAFADNDLVEVETDLINGGVLVTNKPVIEGYKVS
GYILP
DFSFDATVAPLVKAGFKVEIVGTELYAVTDANGYFEITGVPANASGYTLKI
SRATYLDRVIANVVVTGDTSVSTSQAPIMMWVGDIVKDNSINLLDVAEVI
RCFNATKGSANYVEELDINRNGAINMQDIMIVHKHFGATSSDYDAQ
(SEQ ID NO.:5)

[0099] 图 3A 至 3C 显示了 cipA 的结构性结构域的示意图。图 3A 显示了 cipA 的 NetOGlyc 1.0 Server 和 NetNGlyc 1.0 Server 分析的结构性结构域示意图,其用于显示高度预测的 O- 连接 (图 3C) 和 N- 连接的糖基化位点 (图 3C)。尤其是所述的 O- 连接位点在很大程度上位于连接体序列之内。

[0100] 另一个相似于 cipA A 的实例示于下文。在前述的 C560 所示的连接体序列 [QTPTNTISVTPTNNSTPTNTSTPKPNP] (SEQ ID NO.:6) 得自这个序列 [在下文中以粗斜体显

示,除了将 N 替换为 T 之外],并包含两个潜在的 N 糖基化位点[下划线的]。其它在下述的构建物中和 / 或 HIV

[0101] 多肽的连接体序列以黑体显示。

[0102] > gi|50656899|gb|AAT79550.1| 纤维素酶体锚定脚手架蛋白 B 前体 [溶纤维素拟杆菌]

[0103]

MQSPRLKRKILSVILAVCYIISSFSIQFAATPQVNIIGSAQGIPGSTV
KVPINLQNVPEIGINNCDFTIKFDSIDLDFNSVEAGDIVPLPVASFSSNNSKD
IIKFLFSDATQGNMPINENGLFAVISFKIKDNAQKGISNIKVSSYGSFSGMS
GKEMQSLSPFFSGSIDVSDVSTSKLDVKVGNVEGIAGTEVNVPIITFENVP
DNGINNCNFTLSYDSNALEFLTTEAGNIPLAIADYSSYRSMEGKIKFLFSD
SSQGTRSIKNDGVFANIKFKIKGNAIRDTYRIDLSELGSFSSKQNNNLKSIA
TQFLSGSVNVKDIESSVSPTTSVHPTPTSVPTPTKSSPGNKMKIQIGDVK
ANQGDTVIVPITFNEVPVMGVNNCNFTLAYDKNIMEFISADAGDIVTLPM
ANYSYNMPDGLVKFLYNDQAQGAMSIKEDGTFANVKFKIKQSAAFGKY
SVGIIKAIGSISALSNSKLIPIESIFKDGSITVTNKPIVNIEIGVKVKVAGDKIK
VPVEIKDIPSIGINNCNFTLKYNSNVLKYVSNEAGTIVPAPLANLSINKPDE
GIIKLLFSDASQGGMPIKDNGIFVNLEFQAVNDANIGVYGLELDTIGAFSGI
SSAKMTSIEPQFNNGSIEIFNSAQTPVPSNTEVQTPTNTISVTPTNNSTPTN
NSTPKPNPLYNLNVNIGEISGEAGGVIEVPIEFKNVPDFGINNCDFSVKYD
KSIFEYVTYEAGSIVKDSIVNLACMENSIGINLLFNDATQSSSPIKNNGVFA
KLKFKINSNAASGTYQINAEQYKFKSGNLNGKLT SINPIFENGIINIGNVTV
KPTSTPADSSITPTATPTATPTIKGTPTVTPIYWMNVLIGNMNA AIGEEV
VPIEFKNVPPFGINNCDFKLVYDSNALELKKVEAGDIVPEPLANLSSNKSE
GKIQFLFNDASQGS MQIENGGVFAKITFKVKSTAASGIYNIRKDSVGSFSG
LIDNKMTSIGPKFTDGSIVVGTVTPTATATPSAIVTTITPTATTKPIATPTIKG
TPTATPTMYWMNVVIGKMNAE VGGEVVVP IEFNNVPSFGINNCDFKLVYD
ATALELKNVEAGDIIKTPLANFSNNKSEEGKISFLFNDASQGS MQIENGGV
FAKITFKVKSTTATGVYDLRKDLVGSFSG LKDNKMTSIGAEFTNGSITVAA
TAPTVTPTVNATPSAATPTVTPTATATPSVTIPTVTPTATATPSVTIPTVTPTATAT
PSAATPTVTPTATATPSVTIPTVTPTVTATPSDTIPTVTPTATATPSAIVTTITPTATA

[0104]

**KPIATPTIKGTPTATPMYWMNVVIGKMNAEVGGEVVVPIEFKNVPSFGINN
CDFKLVYDATALELKNVEAGDIKTPLANFSNNKSEEGKISFLFNDASQGS
MQIENGGSVSAKITFKVKSTTAIGVYDIRKDLIGSFSGLKDSKMTSIGAEFT
NGSITVATTAPTPTATATPSVTIPTVTPTATATPGTATPGTATPTATATPGAATP
TETATPSVMIPTVTPTATATPTATATPTVKGTPTIKPVYKMNVVIGRVNVVAGE
EVVVPVEFKNIPAIGVNNCNCFVLEYDANVLEVKKVDAGEIVPDALINFGS
NNSDEGKVYFLFNDALQGRMQIANDGIFANITFKVKSSAAAGIYNIRKDS
VGAFSGLVDKLVPISAEFTDGSISVESAKSTPTATATGTNVTPVAATVTPTAT
PASTTPTATPTATSTVKGTPTATPLYSMNVIIIGKVNAAEASGEVVVPVEFKDVP
SIGINNCFILEYDASALELDSAEAGEIVPVPLGNFSSNNKDEGKIYFLFSD
GTQGRMQIVNDGIFAKIKFKVKSTASDGTYIIRKDSVGAFSGLIEKKIIKIG
AEFTDGSITVRSLTPTPTVTPNVASPTPTKVVAEPTSNQPAGPGPITGTIPTA
TTTATATPTKASVATATPTATPIVVVEPTIVRPGYNKDADLAVFISSDKSRYE
ESSIITYSIEYKNIGKVNATNVKIAAQIPKFTKVYDAAKGAVKGSEIVWMI
GNLAVGESYTKKEYKVKVDSLTKSEEYTDNTVTISSDQTVDIPENITTGNDD
KSTIRVMLYSNRFTPGSHSSYILGYKDKTFKPKQNVTRA EVAAMFARIMG
LTVKDGAKSSYKDVS NKHWALKYIEAVTKSGIFKGYKDSTFHPNAPITRA
ELSTVIFNYLHLNNIAPSKVHFTDINKHWAKNYIEEIYRFKLIQGYSDGSFK
PNNNITRAEVVTMINRMILYRGPLKVKVGSFPDVSPKYWAYGDIEEASRN
HKYTRDEKDGSEILIE (SEQ ID NO.: 7)**

[0105] 图 4A 至 4C 显示了纤维酶体锚合脚手架蛋白 B 前体 [溶纤维素拟杆菌] 结构性结构域的示意图。图 4A 显示了 cipA 的 NetOGlyc 1.0 Server 和 NetNGlyc 1.0 Server 分析的结构性结构域示意图,其用于显示高度预测的 O- 连接 (图 3C) 和 N- 连接的糖基化位点。尤其是 O- 连接位点很大程度上位于连接体的序列内。

[0106] 本发明包括用于内部结构性结构域连接体序列的组合物和方法,在蛋白加工的优选内部结构域连接体序列中,所述连接体序列得自纤维素降解微生物——尤其是那些具有高度预测的糖基化位点的,所述糖基化位点用于在真核表达宿主内工程用的蛋白。发现了在使用这些序列时,改进的性质包括:i)固有的柔性,从而便于分离所连接的结构域,这在合成过程中应当对正确地折叠所连接的结构域有很大帮助,并且通过 B 细胞抗原构象表位的匹配来保持不受障碍的接近;ii)糖基化,从而帮助产物融合蛋白的分泌和溶解性,并针对蛋白酶为连接体序列提供防护。

[0107] 从 gag 序列中除去蛋白水解卵裂位点。图 5 道 1 [下] 显示了 [mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Viralgag-p40]C535 与合适的 L 链表达质粒共转染的、经纯化的表达产物。C535 的成熟的 H 链序列 [gag 残基是斜体的,而编码连接性的限制行位点的是下划线的] 是:

[0108]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASLEMGARASILSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFA
VNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKE
ALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAI SPRT
LNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAA MQMLK
ETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQE QIGWMTHNP
PIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQ A
SQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVG (SEQ ID
NO.:8)

[0109] 图5的上行显示了对于C535-编码的H链所期待的大致位置——仅有少部分的产物在此位置有条带。产品的大部分,如下面的行所显示的,是更短的H链,其尺寸显示了大致在gag p17-p24的范围内由对于蛋白酶敏感的位点的存在。

[0110] 图6道3[下]显示了[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-var1-Viralgag-p40-var1-6xHis]C601与合适的L链表达质粒共转染的、经部分纯化的表达产物。C535的成熟的H链[gag残基是斜体的,而连接性的限制性位点所编码的残基是下划线的,而柔性连接体残基是黑体的]为:

[0111]

QVTLKESGPGILQPSQTL~~SLTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE~~
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSTPTNNSNPKNPASLEMGARASILSGGELD
RWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPS
LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSVDSEFAQQAA
ADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMF
SALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTHNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRM
YSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPD
CKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGHHHHHH (SEQ ID NO.:9)

[0112] 上述的 gag 序列具有从 KKK 至 VDES 的序列变化 [显示与上文, 下划线的], 从而将针对 gag p17 的 C 端的潜在的蛋白酶敏感位点除去。图 6 显示了由 H 链产生的变体形式, 在很大程度上是未降解的 [道 3 中更低分子量条带为“背景污染物”, 参见图 7]。

[0113] 在一个具体的实施方案中, 本发明包括 gag p40 [p17+p24] 的变体, 其如前文所述关于 KKK 序列, 该变化预防分泌关联的 gag p17+p24 蛋白的蛋白水解卵裂。

[0114] 连接至优选的 HIV nef 抗原的抗体。本发明包括, 但不限于, 一种优选的疫苗, 所述疫苗将 HIV 抗原靶向至树突细胞, 所述树突细胞将最大量的 gag 抗原连接至最大量的 nef 抗原。图 7 道 4 [下] 显示了与合适的 L 链表达质粒共转染的 [mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-ViralNef]C757 的表达的部分纯化的产品。C757 的成熟 H 链 [nef Consensus CladeB 残基是斜体的, 而连接性的限制性位点编码的残基是下划线的, 而柔性连接体是黑体的] 为:

[0115]

QVTLKESGPGILQPSQTL~~SLTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE~~
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA

[0116]

RSSHYYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSPTPTNNSNPKNPASMGGKWSKRSVVGWP
TVRERMRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEV
GFPVRPQVPLRPMYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQ
GYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANEGENNSLLHPMSL
HGMDDPEREVLVWKFDSRLAFHHMARELHPEYYKDC (SEQ ID NO.:10)

[0117] 图 7 中的抗体 - 抗原产物分析显示了不同 H 链抗原构建物与相同的合适的 L 链表达构建物短暂地共转染到 293F 细胞中。各个道代表了得自将 5mL 转染细胞悬浮物 [3 天的生产] 结合至蛋白 A 珠的产物,所述产物用 PBS+1M NaCl 洗涤两次,使用 20mM HCl 洗提,干燥并溶解于还原 SDS PAGE 样品缓冲液中,并通过考马斯亮蓝染色的还原 SDS PAGE 进行分析。该技术不仅使得能评估所期待的 H 链产物的完整性,还使得抗体 - 抗原产物的相对生产水平的估计成为可能。相对生产水平的问题非常重要,因为疫苗生产成本很大程度上取决于在大规模哺乳动物细胞发酵系统中的完整分泌的疫苗的收率。尽管通过交互式的载体系统, (尤其是当加入到哺乳动物细胞基因组并且选择高产量的转染细胞克隆时,携带 DNA 元素青睐的增强的转录),来将表达水平大大提高,但是在不使用这些额外方法的情况下,通过使以良好收率表达完整分泌产物的构建物开始来大大地协助这些方法。在经转染的哺乳动物细胞中,分泌的抗体 - 抗原融合物中大量的变异在此前的专利申请 [cohesin-dockerin 和 DCIR] 中有详细记载,并且这些数据显示了生产水平很大程度上与抗体载体是不相关 [可变的和恒定的区域],但其更是抗原本身的固有性质。因此,图 7 的道 4 显示了 [mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-ViralNef] 非常有效率的生产,显示了通过 QTPTNTISVTPTNNSPTPTNNSNPKNP 连接的与 nef Consensus Clade B 抗原融合的抗体的构型是非常有利的。

[0118] 连接至特定的优选的 HIV gag 和 nef 抗原的抗体。[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-Viralgag-p40-ViralNef]C758 直接地在靠近前述的 gag p40 变体处附加了 nef Consensus Clade B 抗原 [连接残基是下划线的,而柔性连接体序列是黑体的]:

[0119]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKNPASLEMGARASILSGGELD
RWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPS
*LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEKDTKEALDKIEEEQNKSV**DSEFAQQAA*
*ADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQ**AI**SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMF*
*SALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQ**AAMQ**MLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI*
*APGQMREPRGSDIAGTTSTLQE**QIGWMTHNPPIVGEIYKRWIILGLNKIVRM*
*YSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQ**ASQEVKNWMTETLLVQNANPD*
*CKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGGP**ASMGGKWSKRSVVGWPTVRERM*
*RAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEA**QEEEEVGFPVRPQ*
*VPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILD**LWVYHTQGYFPDWQ*
*NYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANE**GENNSLLHPMSLHGMD*
DPE
REVLVWKFDSRLAFHHMARELHPEYYKDC (SEQ ID NO.:11)

[0120] 图7道5显示了该表达质粒当与合适的L链共转染时,引导轻链-抗原融合物的合成作为分泌产物的表达很弱。第6-9道显示了与L链表达质粒和H链gag表达的构建物共转染的293F细胞的分泌产物,所述构建物具有nef Consensus Clade B抗原编码的序列插入物,所述插入物与最接近的和/或末梢的柔性连接序列相关。加入柔性连接体序列有助于完整的抗体-gag/nef融合疫苗的分泌。对于生产最高水平的疫苗而言,优选的构建物是[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-p17-f3-nef-f4-p24-6xHis]C791[参见道9]。由于在哺乳动物的表达系统中,抗体-抗原融合物的相对水平在很大程度上与抗原的V区域不相关,如果将[-Flex-v1-p17-f3-nef-f4-p24-6xHis]附加于其H链的C端,靶向不同DC受体的抗体-gag/nef抗原疫苗应该在生产中有相似的优点。

[0121] 道6的H链是[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-Viralgag-p40-f4-nef]C767[连接残基是下划线的,而柔性的连接体残基是黑体的,而抗原残基是斜体的]:

[0122]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNP SLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTGPS
SSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKNPASLEMGARASILSGGELD
RWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPS
LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSVDSEFAQQAA
ADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMF
SALSEGATPQDLN TMLNTVGGHQAA MQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWMTHNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRM
YSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPD
CKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGGPTNGSITVAATAPTVTPTVNATPS
AAGPASMGGKWSKRSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITS
SNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFPVRPQVPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGL
EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVPVE
PEKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREVLVWKFD SRLAFHHMARELHP
EYYKDC (SEQ ID NO.:12)

[0123] 道 7 的 H 链是 [mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-p17-nef-f4-p24-6xHis]
C790C767 [连接残基是下划线的, 而柔性连接体残基是黑体的, 而抗原残基是斜体的] :

[0124]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLLP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKNPASLEMGARASILSGGELD
RWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPS
LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSVDMGGKWSK
RSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLE
AQEEEEVGFPVRPQVPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILD
LWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANEENNS
LLHPMSLHGMDDPEREVLVWKFDSSLAFHHMARELHPEYYKDCEFTNGSIT
VAATAPTVTPTVNATPSAAQEAQQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMV
HQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQ
AAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQI
GWMTHNPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFY
KTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQG
VGHHHHHH (SEQ ID NO.:13)

[0125] 道 8 的 H 链 是 [mAnti-DC-IR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-p
17-f3-nef-p24-6xHis]C797C767[连接残基是下划线的,而柔性连接体残基是黑体的,而抗
原残基是斜体的]:

[0126]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLLP
[0127]

PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSTPTNNSNPKPNPASLEMGARASILSGGELD
RWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPS
LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSVDTVTPTATA
TPSAIVTTITPTATTKPVDMGGKWSKRSVVGWPTVRERMMRAEPAADGVG
AVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFPVRPQVPLRPMTYKG
ALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRY
PLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREVLVWKFD
SRLAFHHMARELHPEYYKDCEFAQQAAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMV
HQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQ
AAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQI
GWMTHNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFY
KTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQG
VGHHHHHH (SEQ ID NO.:14)

[0128] 道9的H链是[mAnti-DC-IR_9E8_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-p17-f3-nef-f4-p24-6xHis]C791C767[连接残基是下划线的,而柔性连接体残基是黑体的,而抗原残基是斜体的]:

[0129]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE
WLAHIYWDDDKRYNP~~SLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA~~
RSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKR~~VESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVF~~LFP~~
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKASQTPTNTISVTPTNNSTPTNNSNPKPNPASLEMGARASILSGGELD
RWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPS

[0130]

LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEKDTKEALDKIEEEQNKSVDTVTPTATA
TPSAIVTTITPTATTKPVD**MGGKWSKRSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVG**
AVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFPVRPQVPLRPMTYKG
ALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRY
PLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREVLVWKFD
SRLAFHHMARELHPEYYKDCE**FTNGSITVAATAPTVTPTVNATPSAAQFA**
QQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQ**AI****SPRTLNAWVKVVEEKAFSPE**
VIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQ**AAMQMLKETINEEAAEWDRVHPV**
HAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQE**QIGWMTHNPPIVGEIYKRWIILGLN**
KIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQ
NANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGHHHHH (SEQ ID NO.:15)

[0131] 测试进一步的修饰,从而在 CHO-S 细胞生产上述蛋白中,除去在剧烈的发酵条件下检测到的残留的降解物,所述修饰显示于下文,其将 KKK 改变为 NKQ,以下划线、黑体和斜体高亮显示:

[0132]

QVTLKESGPGILQPSQTL**SLTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLE**
WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCA
RSSHYYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSLGTKTYTCNV**DHKPSNTKVDKR****VESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP**
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGK**ASQTPTNTISVTPTNNSTPTNNSNPKNP****ASLE****MGARASILSGGELD**
RWEKIRLRPGG**NKQYKLKHIVWASRELERFAVN****PGLLETSE****GCRQILGQLQPS**
LQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEKDTKEALDKIEEEQNKSVDTVTPTATA
TPSAIVTTITPTATTKPVD**MGGKWSKRSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVG**
AVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFPVRPQVPLRPMTYKG
ALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRY
PLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREVLVWKFD
SRLAFHHMARELHPEYYKDCE**FTNGSITVAATAPTVTPTVNATPSAAQFA**
QQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQ**AI****SPRTLNAWVKVVEEKAFSPE**

[0133]

*VIPMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRVHPV
HAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWMTHNPPIPVGEIYKRWIILGLN
KIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQ
NANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGHHHHHH (SEQ ID NO.:16)*

[0134] 发现特定的 gag-nef 抗原与最大化的抗原表位的融合物具有高效的分泌 / 生产性质。发现插入或附加了 nef 抗原的 gag p40 的变体被特别好地生产和分泌,所述的抗原附近有优选的柔性连接体序列。发现在此公开以及可得自纤维素降解微生物的柔性连接体序列能够有利于完整的抗原和 / 或连接的抗原以抗体 - 抗原融合蛋白的形式来分泌。

[0135] 抗原编码序列的 DNA 序列 :C757 抗原区域是 [黑体的序列为连接位点或终止密码子] :

[0136]

**GCTAGCATGGGAGGCAAATGGAGTAAAAGAAGTGTTGTGGGTTG
GCCAACTGTGAGAGAAAGAATGAGAAGGGCTGAACCAGCCGCTGATG
GTGTAGGTGCTGTGTACGAGATCTGGAAAAACACGGAGCAATAACA
TCCTCTAATAACCGCCGCAAATAACGCAGACTGTGCCTGGCTCGAAGCT
CAAGAAGAAGAAGAAGTCGGATTCCCCGTGCGACCCCAAGTTCCCCT
CAGACCAATGACTTATAAAGGCGCTCTGGATCTTAGCCACTTTCTTAA
AGAAAAAGGAGGACTGGAAGGACTTATTTATTCACAAAAAAGACAAG
ACATCCTCGATTTGTGGGTATATCATACTCAAGGTTATTTCCCAGACT
GGCAAAATTATACTCCTGGACCCGGCATTTCGATATCCCCTTACCTTTG
GATGGTGCTTTAACTTGTCCTCCCGTCGAACCTGAAAAAGTAGAAGAA
GCAAATGAAGGCGAAAATAATTCAGTCTCCACCCTATGTCAGTGCAC
GGAATGGATGACCCCGAACGCGAAGTTCTGGTATGGAAATTTGATTC
AAGACTTGCTTTTCACCACATGGCTAGAGAACTTCACCCCGAATATTA
TAAAGACTGTTGA (SEQ ID NO.:17)**

[0137] C791 连接体和抗原编码序列是 [黑体序列为连接位点或终止密码子] :

[0138]

**GCTAGTCAGACCCCCACCAACACCATCAGCGTGACCCCCACCAA
CAACAGCACCCCCACCAACAACAGCAACCCCAAGCCCAACCCCGCTA
GCCTCGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGCGGTGGCGAATTAG
ATAGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATA
AATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAG
TTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGG**

[0139]

GACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTTAGATCAT
TATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATA
AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACA
AAAGTGTCGATACCGTGACCCCCACCGCCACCGCCACCCCCAGCGCCA
TCGTGACCACCATCACCCCCACCGCCACCACCAAGCCCGTCGACATGG
GAGGCAAATGGAGTAAAAGAAGTGTTGTGGGTTGGCCAACTGTGAGA
GAAAGAATGAGAAGGGCTGAACCAGCCGCTGATGGTGTAGGTGCTGT
GTCACGAGATCTGGAAAAACACGGAGCAATAACATCCTCTAATACCGC
CGCAAATAACGCAGACTGTGCCTGGCTCGAAGCTCAAGAAGAAGAAG
AAGTCGGATTCCCCGTGCGACCCCAAGTTCCCCTCAGACCAATGACTT
ATAAAGGCGCTCTGGATCTTAGCCACTTTCTTAAAGAAAAAGGAGGAC
TGGAAGGACTTATTTATTCACAAAAAAGACAAGACATCCTCGATTTGTG
GGTATATCATACTCAAGGTTATTTCCCAGACTGGCAAAATTATACTCCTG
GACCCGGCATTTCGATATCCCCTTACCTTTGGATGGTGCTTTAACTTGTC
CCCGTCGAACCTGAAAAAGTAGAAGAAGCAAATGAAGGCGAAAATAA
TTCCTGCTCCACCCTATGTCCTGACGGAATGGATGACCCCGAACG
CGAAGTTCTGGTATGGAAATTTGATTCAAGACTTGCTTTTCACCACATG
GCTAGAGAACTTCACCCCGAATATTATAAAGACTGTGAATTCACCAACG
GCAGCATCACCGTGCCCGCCACCGCCCCCACCCTGACCCCCACCGTGA
ACGCCACCCCCAGCGCCGCCCAATTCGCACAGCAAGCAGCAGCTGAC
ACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAAC
ATCCAGGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATG
CATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATAC
CCATGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACAC
CATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAA
AGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGT
GCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAA
GTGACATAGCAGGAACCTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGA
TGACACATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAGGTGGAT
AATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT
CTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAGAGACTATGTAGAC
CGATTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAA

[0140]

AATTGGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGT
AAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATG
ATGACAGCATGTCAGGGAGTGGGGCATCACCATCACCATCACTGA

(SEQ ID NO.: 18)

[0141] 随后的实例显示了本发明能够将 HIV 及其它抗原通过 CD40 靶向至人类 DC。产生潜在的活性抗-CD40 单克隆抗体。将小鼠用小鼠 IgG2b-人 CD40 融合蛋白进行免疫,并随后将注射位置的淋巴结流出的 B 细胞保存成为杂种细胞。与转染了 CD40 cDNA 的 293F 细胞相对照,将来自 35 个杂种细胞的上清液在过夜培养的人类树突细胞中进行试验从而诱导细胞毒素的分泌,所述实验的杂种细胞按照 FACS 的分析,分泌抗-CD40 的反应性的抗体。图 8 显示了此类型的筛选的实例,所述筛选设计用于检测抗-CD40 抗体的亚类,所述抗体可以结合并活化 CD40。该数据集显示两种杂种细胞 12E12 和 9A11 在控制 DC 分泌 IL-12p40 中尤其有效。编码 12E12 的重链和轻链的 cDNA 是利用标准的克隆和测序技术而产生的,并且将可变的区域加工到表达移植到人类 IgG5 恒定区的小鼠 12E12 可变区域的载体中。

[0142] C269 rAB-pIRES2[manti-CD40_12E12.3F3_K-V-hIgGK-C] 下列 DNA 序列显示了嵌合体轻链编码区域与氨基酸序列。预计分泌的具有小鼠的可变区域的成熟轻链以斜体表示。

[0143]

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCA
AGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCT
GCCTCTCTAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCAGGGC
ATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTTA
AACTCCTGATCTATTACACATCAATTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAG
GTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATCGGCAA
CCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTTTAATAAG
CTTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAACCTCGAGATCAAACGAACT
GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTATGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT

[0144]

CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGDIQMTQTTSSLSASLGDR
VTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSL
TIGNLEPEDLATYYCQQFNKLPPTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO.: 19)

[0145] C230 rAB-pIRES2[manti-CD40_12E12.3F3_H-V-hIgG4H-C] 下列 DNA 序列显示了嵌合体的重链编码区域和氨基酸序列。预计分泌的具有小鼠的可变区域的成熟轻链以斜体表示。

[0146]

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAG
GTGTCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG
CAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACT
TTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGG
CTGGAGTGGGTTCGCATACATTAATTCTGGTGGTGGTAGCACCTATTATC
CAGACACTGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGA
ACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGGCTGAAGTCTGAGGACACAGCCA
TGTATTACTGTGCAAGACGGGGGTACCGTTCCATGCTATGGACTATTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCC
CATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA
CAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAG
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAA
TATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTCGAAGGGGGA
CCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAA
GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGC

[0147]

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCTGGGTAAAGCTAGCTGA**EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDY**
YMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPD**TVKGRFTISR****DNAKNTLYLQMSR**
LKSEDTAMYYCARRGLPFHAMDYWGQ**TSVT****VSSAKTKGPSVFPLAPCSRS**
TSESTAALGCLVKDYFPEP**VT****SVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**
VTVPSSSLG**TKTYTCNVDHKPSNTKVDKR****VESKYGPPCPPCPAPEFEGGPS**
VFLFPPKPKDTLMISRTPEV**TCV****VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK**
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV**MHEALHNHYT**
QKSLSLSLGKAS (SEQ ID NO.: 20)

[0148] C230 的变体经过加工来编码具有融合到人类 IgG64 的 C 端的抗原的 CD4012E12H 链, 例如 C291rAB-pIRES2[manti-CD40_12E12.3F3_H-V-hIgG4H-C-Flex-FluHA1-1-6xHis] 编码具有下文所示的序列的 H 链, 所述的序列中流感的 HA1-1 抗原区域以斜体表示, 而柔性连接体序列和 C 端的多聚组氨酸标签以黑体表示:

[0149]

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLE
WVAYINSGGGSTYYPD**TVKGRFTISR****DNAKNTLYLQMSRLKSEDTAMYY**
CARRGLPFHAMDYWGQ**TSVT****VSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL**
GCLVKDYFPEP**VT****SVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL**
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR**VESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK**
KDTLMISRTPEV**TCV****VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ**
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV**MHEALHNHYTQKSLSLSL**
GKASDTTEPATPTTPVT**TD****TICIGYHANNSTD****TVDTVLEKNVTVT****HSVN****LLE**
DSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSEN
GICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWP**NHNTNGVTAACSHEGKS**

[0150]

*SFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPPNSKEQQONLYQN
ENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGN
LIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGE
CLKYVRS AKLRMVHHHHHHH (SEQ ID NO.: 21)*

[0151] 另一种变体 H 链构建物是 C450rAB-pIRES2[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hIgG4H-C-Dockerin-var1], 其编码具有下述序列的 H 链, 其中的 C 端的 Dockerin 结构域抗原区域以斜体显示:

[0152]

*EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLE
WVAYINSGGGSTYYPD TVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSRLKSEDTAMYY
CARRGLPFHAMDYWGQGT SVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
GKASNSPQNEVLYGDVND DGKVNSTDLTLKRYVLKAVSTLPSSKA EKNADV
NRDGRVDSSDVTILSRYLIRVIEKLPI (SEQ ID NO.: 22)*

[0153] 因此, 可以将编码上述且相似的变体 H 链的表达载体共转染到 293F 或者 CHO-S 细胞中, 导致抗 -CD4012E12-hIgG4 抗体融合蛋白的分泌, 所述蛋白能够容易地通过蛋白 A 亲和色谱进行纯化。

[0154] 这样的抗体-抗原蛋白可以用作疫苗, 从而高效地在体外或者体内将抗原递送至人类的树突细胞。所述抗 -CD4012E12-hIgG4 Dockerin 可以类似地用于递送 cohesin- 抗原融合蛋白。例如, C32Ecoli-pET28[Cohesin-FluM1-6xHis] 编码下述的序列, 其中流感 M1 蛋白以斜体显示:

[0155]

*MDLDAVRIKVD TVNAKPGD TVNIPVRFSGIPSKGIANCDFVYSYDPN
VLEIIEIKPGELIVDPNPTKSFD TAVYPDRKMIVFLFAEDSGTGAYAITKD G
VFATIVAKVKEGAPNGLSVIKFVEVGGFANNDLVEQKTQFFDGGVNVGDT
TEPATPTTPVTTPTTTDD LDAASLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAG
KNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVP SERGLQRRRFVQNALNGN*

[0156]

***GDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEIALSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTT
EVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTNTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQM
AGSSEQAAEAMDIASQARQMVMQAMRTIGTHPSSSAGLKDDLLENLQAYQKRM
GVQMQRFKLEHHHHHHH (SEQ ID NO.:23)***

[0157] 上述蛋白可以作为在大肠杆菌中可溶蛋白表达,并通过离子交换和金属亲和性层析来制备成为纯产品。可以通过高亲和性的 Dockerin-Cohesin 相互作用,装配高度稳定的抗 -CD4012E12-hIgG4 Dockerin 融合蛋白和 Cohesin Flu M1 融合蛋白的复合物或缀合物。

[0158] 将一定剂量范围的这样的抗 -CD4012E12-hIgG4 Dockerin-Cohesin Flu M1 缀合物与人类的树突细胞孵育一天,随后加入同源 CD8+T 细胞,并继续孵育几天。随后将细胞使用抗 -CD8+ 抗体和 HLA-A2 四聚体试剂染色,所述四聚体试剂对于针对免疫支配的 Flu M1 表位 58-66 产生 TCR 的 T 细胞是特异性的。四聚体阳性细胞在箱的门处显示。这一数据显示低至 0.001ug/ml 浓度水平的抗 -CD4012E12-hIgG4 Dockerin Cohesin Flu M1 缀合物引发 Flu M1- 特异性的 CD8+T 细胞的扩展,所述扩展水平显著高于没有缀合物加入或者 [下一个图框] 平行剂量范围的对照 IgG4 Dockerin Cohesin Flu M1 缀合物。这些数据证实了抗 -CD4012E12 抗体明显擅长将抗原递送至 DC,导致抗原的处理和呈递,这一点通过抗原特异性的 T 细胞的扩展可以看到。

[0159] 图 9 显示了由 10ug/ml 至无抗 -CD4012E12-hIgG4 Dockerin-Cohesin Flu M1 缀合物的剂量范围引起的 CD8+ 染色对 Flu M1- 四聚体染色 [纵轴] 的 FACS 分析。

[0160] 图 10 显示了 10ug/ml 至无对照 hIgG4Dockerin-CohesinFlu M1 缀合物的剂量范围引起的 CD8+ 染色对 Flu M1- 四聚体染色 [纵轴] 的 FACS 分析。

[0161] C269(seqA) 抗 -CD4012E12 轻链序列与变体的排列,所述变体经过加工从而保持 CD40 的结合,并增强与人类轻链可变序列的相似性——以及通过包括优选的密码子,从而增强所分泌的产物的表达。

[0162] seqA

[0163] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYT

[0164] SILHSGVPS

[0165] seqB

[0166] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIHYT

[0167] SILHSGVPS

[0168] seqC

[0169] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIHYT

[0170] SILHSGVPS

[0171] seqD

[0172] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIHYT

[0173] SILHSGVPS

[0174] seqE

[0175] DIQMTQTTSSLSTSLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIHYT

[0176] SILHSGVPS

```

[0177] *****:*****:*****
[0178]      seqA
[0179] RFSGSGSGTDYSLTIGNLEPEDIATYYCQQFNKLPPTFGGGTKLEIKRTVAA
[0180] PSVFIFPP
[0181]      seqB
[0182] RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQFNKLPPTFGGGTKLEIKRTVAA
[0183] PSVFIFPP
[0184]      seqC
[0185] RFSGS-SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQFNKLPPTFGGGTKLEIKRTVAAP
[0186] SVFIFPP
[0187]      seqD
[0188] RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQFNKPPPTFGGGTKLEIKRTVAA
[0189] PSVFIFPP
[0190]      seqE
[0191] RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQFNKLPPTFGGGTKLEIKRTVAA
[0192] PSVFIFPP
[0193] *****, *****:***** *****
[0194]      seqA
[0195] SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
[0196] KDSTYLSSTLT
[0197]      seqB
[0198] SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
[0199] KDSTYLSSTLT
[0200]      seqC
[0201] SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
[0202] KDSTYLSSTLT
[0203]      seqD
[0204] SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
[0205] KDSTYLSSTLT
[0206]      seqE
[0207] SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
[0208] KDSTYLSSTLT
[0209] *****
[0210]      seqA      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0211]      seqB      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0212]      seqC      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0213]      seqD      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0214]      seqE      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0215] *****

```

[0216] (SEQ ID NO. :24、25、26、27、28, 分别地) C268 (seqA) 抗-CD4012E12 重链序列与变体的排列, 所述的变体经过加工从而保持 CD40 的结合, 并增强与人类轻链可变序列的相似性——以及通过包括优选的密码子, 从而增强所分泌的产物的表达。

[0217] seqA

[0218] EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVA

[0219] YINSGGGSTYY

[0220] seqB

[0221] EVNLVESGGGLVQPGGSLKVSCVTSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVA

[0222] YINSGGGSTYY

[0223] **:*****:**.*****

[0224] seqA

[0225] PDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDAMYYCARRGLPFHAMDY

[0226] WGQGTSVTVSSA

[0227] seqB

[0228] PDTVKGRFTISRDNANKSLYLQMSRLKSEDAMYYCARRGLPFHAMDY

[0229] WGQGTSLTVSVA

[0230] *****:***** *

[0231] seqA

[0232] KTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

[0233] FPAVLQSSG

[0234] seqB

[0235] STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

[0236] FPAVLQSSG

[0237] .*****

[0238] seqA

[0239] LYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP

[0240] EFEGGPSVF

[0241] seqB

[0242] LYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP

[0243] EFEGGPSVF

[0244] *****

[0245] seqA

[0246] LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK

[0247] PREEQFNSTYR

[0248] seqB

[0249] LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK

[0250] PREEQFNSTYR

[0251] *****

[0252] seqA

[0253] VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
[0254] PPSQEEMTKN
[0255] seqB
[0256] VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
[0257] PPSQEEMTKN
[0258] *****
[0259] seqA
[0260] QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTV
[0261] DKSRWQEGN
[0262] seqB
[0263] QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTV
[0264] DKSRWQEGN
[0265] *****
[0266] seqA VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKAS
[0267] seqB VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKAS
[0268] *****
[0269] (分别地为 SEQ ID NO. :29、30)

[0270] 图 11 描述了用于在体外分析抗 DC 受体-抗原靶分子 [TM] 引发抗原-特异性 T 细胞在 PBMC 的培养基中扩展的潜能的方法。简而言之,将来自 HIV 患者的单采血液的 2E6PBMC 与一定剂量范围的靶向疫苗以及 100U/ml IL-2 一起孵育。每两天更换介质一次。在第 7 天,将对应于抗原的肽簇加入从而诱导 T 细胞产生 IFN γ , 所述 T 细胞对于各个簇中的肽序列具有 TCR 特异性。在与所述肽簇与阻断细胞因子分泌的抗原孵育 4 小时后,将细胞用抗-CD4、抗-CD8、抗-IL-13 和抗-IFN γ 试剂染色,并使用 FACS 分析。

[0271] 图 12 和 13 显示了用抗-CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗靶向 DC[在 PBMC 中]的效果-在下文中显示了 H 链组合物:C8I8rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12. 3F3_H-LV-hIgG4H-C-Flex-v1-Viralgag-p17-f3-nef-f4-p24-6xHis] 连接残基是下划线的,柔性连接体残基是黑体的,而抗原残基是斜体的。

[0272]

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLE
WVAYINSGGGSTYYPD TVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSRLKSEDTAMYY
CARRGLPFHAMDYWGQGTSVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL

[0273]

GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
GKASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKNPASLEMGARASILSGGELDR
WEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSL
QTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEKDTKEALDKIEEEQNKSVDTVTPTATA
TPSAIVTTITPTATTKPVDMMGGKWSKRSVVGWPTVRRERMRAEPAADGVG
AVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFPVRPQVPLRPMYK
ALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRY
PLTFGWCFKLVPVEPEKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREVLVWKFD
SRLAFHHMARELHPEYYKDCEFTNGSITVAATAPTVTPTVNATPSAAQFA
QQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPE
VIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAMQMLKETINEEAAEWDRVHPV
HAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWMTHNPPIPVGEIYKRWIILGLN
KIVRMYSPTSILDIRQGPKPEFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQ
NANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGHHHHHH (SEQ ID NO.:31)

[0274] 图 12 显示了疫苗引发 CD4+T 细胞的扩张,所述 CD4+T 细胞具有针对所有 gag p24 肽簇的特异性——甚至在所测试的最少疫苗剂量下,产生 IFN γ 的 CD4+T 细胞的百分比显著地高于细胞不用肽处理的时候。图 13[上框] 在图中显示了该数据,纵轴显示了 IFN γ 产生的细胞的百分比(%)。下框显示了 CD8+T 细胞在 PBMC 培养基中的相似数据,并且该数据也显示了与无肽对照相比,覆盖 gag p24 序列的所有肽簇引起了更显著地生成 IFN γ 产生的 T 细胞。因此,疫苗引发了针对 HIV gag p24 中的多个表位的潜能和应答。

[0275] 图 14 显示了疫苗引发 CD4+T 细胞的扩张,所述 CD4+T 细胞具有针对所有的 gag p17 肽簇的特异性——甚至在所测试的最少疫苗剂量下,产生 IFN γ 的 CD4+T 细胞的百分比显著地高于细胞不使用多肽处理的时候。图 15 在图中显示了该数据,纵轴显示了 IFN γ 产生细胞的百分比(%) [上框]。下框显示了 CD8+T 细胞在 PBMC 培养基中的相似数据,并且该数据也显示了与无肽对照相比,覆盖了 gag p17 序列所有肽簇引起了更显著地生成 IFN γ 产生的 T 细胞。因此,疫苗引发了针对 HIV gag p17 中的多个表位的潜能和应答。

[0276] 图 16 显示了疫苗引发 CD4+T 细胞的扩张,所述 CD4+T 细胞具有针对大多数 HIV nef 肽簇的特异性——甚至在所测试的最少疫苗剂量下,产生 IFN γ 的 CD4+T 细胞的百分比显著地高于细胞不使用多肽处理的时候。图 17 在图中显示了该数据,纵轴显示了 IFN γ 产生的细胞的百分比(%) [上框]。下框显示了 CD8+ 细胞在 PBMC 培养基中的相似数据,

以及该数据也显示了与无肽的对照相比,覆盖了 nef 序列的所有肽簇引起了更显著地生成 IFN γ 产生的 T 细胞。因此,疫苗引发了针对 HIV nef 中的多个表位的潜能和应答。

[0277] 已发现数据显示了疫苗 [抗-CD4012E12-连接至特异的工程用的 gag p17 nef gag p24 融合蛋白],在低剂量下也可以引发广泛的免疫应答,即在 CD4⁺ and CD8⁺T 细胞的分隔中引发广泛的表位表示。该数据还证明了两个疫苗部分的各部分 [抗-CD4012E12 和其它的具有相似的特异性质的抗体,以及 gag-nef 抗原,所述 gag-nef 抗原通过加工实现最大表位呈递化及有效地生成]-即抗-CD40 组分可以是其它的抗原递送的载体,并且该抗原组分可能通过其它抗 DC 受体载体来递送。结果还证明了基于 CD40 的靶向在扩展大量抗原特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的能力,所述 T 细胞来自记忆 [给药 HIV 疫苗的 HIV 患者] 和新生 [给药 PSA 抗原的正常供体] 的 T 细胞种群。

[0278] 由抗-CD40-PSA 靶向的 DCs 诱导了 PSA-特异性的 CD4⁺T 细胞应答。图 18 显示了测试疫苗能力的规程概要,所述疫苗包括连接至 PSA [前列腺特异性抗原] 的抗-CD40-12E12 从而引发从新生 T 细胞种群的 PSA-特异性的 CD4⁺ T 细胞的扩展,所述 CD4⁺T 细胞对应于广泛范围的 PSA 表位。简言之,将 IFN α 和单核细胞的 GM-CSF 培养得到的 DCs 与所述疫苗一起孵育,所述的单核细胞来自正常的供体。次日,将细胞置于新鲜的培养基中,并向其中加入来自同一供体的纯 CD4⁺T 细胞。几天之后,加入 PSA 肽,并且在四小时后测定在培养基上清液中的分泌的 IFN γ 水平。

[0279] 图 19 显示了多种 PSA 肽引发潜在的产生 IFN γ 的应答,这显示了抗-CD4012E12 和相似的抗 CD40 试剂可能有效地将抗原递送至 DC,导致针对抗原的多重表位的初级免疫应答。

[0280] 图 20 显示了用抗-CD40-PSA 靶向的 DCs 诱导 PSA-特异性的 CD8⁺T 细胞的应答。IFNDCs 用具有 PSA 的 1 μ gmAb 融合蛋白来靶向。将经纯化的自体同源的 CD8⁺T 细胞共培养 10 天。将细胞用抗-CD8 和 PSA (KLQCVDLHV)-四聚体染色。细胞来自 HLA-A*0201 阳性健康供体。结果证明了抗-CD40 有效地将 PSA 递送至 DC,其依次引起 PSA 特异性的 CD8⁺T 细胞的扩展。

[0281] 图 21 概述了用于测试抗 DC 受体靶向疫苗来引导抗原特异性 T 细胞的扩张的能力的 DC 靶向规程,所述 T 细胞产生自 DC 靶向的摄取以及在其细胞表面上抗原表位的呈递。简言之,HIV 患者的单核细胞通过在 IFN α 和 GM-CSF 中培养 3 天,分化成为 DC。然后将 10ug/ml 的疫苗 [FP] 与自体同源的 T 细胞一同加入。培养 10 天之后,将抗原肽簇加入到扩张的 T 细胞中,并在 4 小时后测量细胞外的 IFN α 。

[0282] 图 22 [上框] 显示了抗-CD4012E12 nef、抗-CD4012E12 gag p24 和抗-CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph002]。抗-CD4012E12 nef [绿色条] 激发了仅对 nef 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD4⁺T 细胞的扩张,抗-CD4012E12 gag p24 [蓝色条] 激发了仅对 p24 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD4⁺ T 细胞的扩张,而抗-CD4012E12 gag p17 nef gag p24 激发了对 gag p17、nef 和 p24 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD4⁺T 细胞的扩张。

[0283] 图 22 [下框] 显示了抗-CD4012E12 nef、抗-CD4012E12 gag p24 和抗-CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph002]。抗-CD4012E12 nef [绿色条] 激发了仅对 nef 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD8⁺T 细胞的扩张,抗-CD4012E12 gag p17

nef gag p24[橙色条] 激发了对 p17 和 nef 多肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD8+ T 细胞的扩张。

[0284] 图 23[上框] 显示了抗 -CD4012E12 nef、抗 -CD4012E12 gag p24 和抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的对比 [患者 Aph010]。抗 -CD4012E12 nef 疫苗 [绿色条] 激发了仅对 nef 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD4+ T 细胞的扩张, 抗 -CD4012E12 gag p24[蓝色条] 激发了仅对 p24 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD4+ T 细胞的扩张, 而抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 激发了对 gag p17、nef 和 p24 多肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD4+ T 细胞的扩张。

[0285] 图 23[下框] 显示了抗 -CD4012E12 nef、抗 -CD4012E12 gag p24 和抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗的效果的比较 [患者 Aph002]。抗 -CD4012E12 nef 疫苗 [绿色条] 激发了仅对 nef 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD8+ T 细胞的扩张, 抗 -CD4012E12 gag p24[蓝色条] 激发了仅对 p24 肽表位有应答的 IFN α 产生的 CD8+ T 细胞的扩张, 而抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 激发了对 gag p17 和 nef 肽表位都有应答的 IFN α 产生的 CD8+T 细胞的扩张。

[0286] 这些数据证实了抗 -CD4012E12 gag p17 nef gag p24 疫苗可以引发广泛的 T 细胞应答, 该应答覆盖了疫苗的全部三种抗原元素的多重表位 -HIVgag p17、HIV gag p24 和 HIV nef。

[0287] 下文的序列为 Cohesin 的氨基酸序列 [黑体残基]-Cyclin D1[下划线残基] 由 C515 载体表达的融合蛋白。

[0288] C515 大肠杆菌 -pET28[Cohesin-hCyclinD1-6xHis]

[0289]

MDLDAVRIKVDTVNAKPGDTVNIPVRFSGIPSKGIANCDFVYSYD
PNVLEIIEIKPGELIVDPNPTKSFD TAVYPDRKMIVFLFAEDSGTGAYAI
TKDGVFATIVAKVKEGAPNGLSVIKFVEVGGFANNDLVEQKTQFFDG
GVNVGDTTEPATPTTPVTTPTTTDDLDAAASLEMEHQLLCCEVETIRRAY
PDANLLNDRVLRAMLKAEETCAPSVSYFKCVQKEVLPSMRKIVATWMLE
VCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLSLEPVKKSRILQLLGATCMFVASKMKE
TIPLTAEKLCIYTDNSIRPEELLQMELLLVNKLKWNLAAMTPHDFIEHFLS
KMPEAEENKQIIRKHAQTFVALCATDVKFISNPPSMVAAGSVVAQGLN
LRSPNNFLSYRRLTRFLSRVIKCDPDCLRACQEQIEALLESSLRQAQQNMD
PKAAEEEEEEEEVDLACTPTDVRDVIDHHHHHHH (SEQ ID NO.:32)

[0290] 在大肠杆菌中产生的 Coh. Cyclin D1 蛋白的表达和纯化。

[0291] Coh. Cyclin D1 在大肠杆菌株 T7Express(NEB) 中表达, 其在 Luria broth(Difco) 中、在 37℃ 下生长, 选择卡那霉素 (40 μ g/ml) 耐受的类型, 并且以 200 转 / 分钟震荡至对数生长期。随后加入 120mg/L IPTG(Bioline), 并在 3 小时后, 将细胞通过离心收集, 并且在 -80℃ 下储存。将 1L 发酵液中的大肠杆菌细胞在含有 0.2ml 的蛋白酶抑制剂 Cocktail II(Calbiochem) 的 50ml 冰 - 冷的 50mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0 中再悬浮。以 5 分钟的剩

余时间设定 18 (Fisher Sonic Dismembrator 60), 将细胞在冰上超声降解两次 4 分钟, 并随后在 4°C 下以 17,000rpm (Sorvall SA-600) 旋转 20 分钟。将 50ml 细胞裂解液的上清液通过 10ml 的 ANX 琼脂糖珠 (GE Healthcare), 随后将流出液调整为粘合缓冲液, 其具有 7.5ml 160mM Tris、40mM 咪唑、4M NaCl pH 7.9, 并加载到装有 Ni^{++} 的 5ml HiTrap 螯合 HP 柱 (GE Healthcare) 上。将结合蛋白用 20mM NaPO_4 、300mM NaCl、10mM 咪唑 pH 7.6 (缓冲溶液 A) 洗涤, 并使用缓冲溶液 A、10–500mM 咪唑进行梯度洗提。峰的成分通过 SDS-PAGE 凝胶进行分析和收集。将约 15 毫克所收集的经洗提的 Cohesin-Cyclin D1 融合蛋白在室温下与 10 毫克的 mPEG-MAL 20k 试剂 (Nektar) 反应过夜, 其在游离的半胱氨酸残基上添加 20kDa 的 pegyl 基团 [在 Cyclin D1 结构域中有几个这种残基]。将此反应的一部分与 DPBS [Gibco] 进行透析, 并将部分调整到 pH 7.5, 随后在室温下加 DTT 至 10mM 1.5 小时, 从而还原所有的二硫键, 随后在室温下加入 25mM 碘乙酰胺 1.5 小时, 随后在室温下加入 20mM DTT 1.5 小时, 从而将游离的半胱氨酸集团烷基化, 随后与 DPBS 进行透析。需要进行聚乙二醇化, 从而保证蛋白在 DPBS 中还是可溶的, 并且烷基化 [其对于体外抗 -CD40 的靶向环境中的蛋白活性而言不是必须的] 保证了产品中不含分子间的二硫键交联形式。

[0292] 图 24. Cohesin-Cyclin D1 融合蛋白与抗 DC 受体 -Dockerin 重组抗体的相互作用的分析。将抗体 -Dockerin 或抗体 -HIV nef 融合蛋白 [20 μ g] 与 100 μ l 蛋白 A-Sepharose 珠 [GE Biosciences] 共同孵育, 并使用 DPBS 洗涤两次。三十分钟之后, 在室温下加入聚乙二醇化的 [peg] 或者聚乙二醇化且烷基化的 [peg alk] Cohesin-Cyclin D1 [Coh. Cyclin D1] [20 μ g], 将上清从珠中通过离心分离。将珠使用 20mM HCl 洗提并将洗提液和上清液干燥, 在 SDS. PAGE 加载缓冲液中再分散, 并在还原 SDS. PAGE 上跑胶, 并通过考马斯亮蓝进行观测。道 1 显示了来自加载了抗 -Dockerin+peg Coh 珠的上清液, 而道 2 为相对应的珠的洗提液。道 3 显示了来自加载了抗体 -HIV nef+peg Coh. Cyclin D1 的珠的上清液, 而道 4 为相对应的珠的洗提液。道 5 显示了来自加载了抗体 -Dockerin+peg alk Coh. Cyclin D1 的珠的上清液, 而道 6 为相对应的珠的洗提液。道 7 显示了来自加载了抗体 -HIV nef+peg alk Coh. Cyclin D1 的珠的上清液, 而道 8 为相对应的珠的洗提液。道 9 显示了单独的抗体 -Dockerin, 道 10 显示了单独的抗体 -HIV nef, 道 11 显示了单独的 peg Coh. Cyclin D1, 而道 12 显示了单独的 peg alk Coh. Cyclin D1。箭头 [上到下] 显示了: 1) Coh. Cyclin D1 高分子量地聚乙二醇化的形式, 2) 抗体重链的位置, 3) 未聚乙二醇化的 Coh. Cyclin D1 的位置 [其大约为制剂的 50%], 4) 抗体轻链的位置。

[0293] 上述的分析显示了抗体 -Dockerin 有效地捕获大多数 Coh. Cyclin D1, 而不是抗体 -HIV nef 有效地捕获大多数 Coh. Cyclin D1。这证明了 Coh. Cyclin D1 制剂可以与抗 DC 受体 -Dockerin 靶向载体结合形成复合物。

[0294] 外套细胞淋巴瘤是 B- 细胞非 -Hodgkin 淋巴瘤, 其占全部的非 -Hodgkin 淋巴瘤的 5–10%, 其主要在老年的男性中。其是非常有侵略性的癌症, 在传统的治疗后带来最坏的预后、频繁复发以及相对而言生存期短。其具有遗传学上的标志: t(11;14)(q13;q32) 易位 - 导致 Cyclin D1 的过表达。

[0295] G1/S- 特异性的 cyclin-D1- 也称作 PRAD1, 通过与 CDK4 和 6 形成复合物, 在 G1 期和 G1/S 转化中起到 Bcl-1 的细胞周期控制功能。在成熟的淋巴细胞中没有正常的表达, 因为该表达依赖于细胞周期, 在 G1 最高, 在 S 最低。因此, 提高细胞毒素的 T 细胞应答特异性

地针对过度表达 Cyclin D1 的细胞,是有吸引力的 MCL 接种策略。

[0296] 图 25 显示了来自 Cyclin D1 的交叠的多肽的示意图。将其加入 T 细胞的培养物中,或者作为单独的肽或者作为肽的集合,在这里其在 MHC 上呈递并因此激发对肽有特异性的 T 细胞的扩展。

[0297] 图 26 显示了设计用于测试抗-CD40-Cyclin D1 复合物在体外引发 Cyclin D1-特异性的 CD4+T 细胞的扩张的研究的示意图 [左框]。将 DC 与靶向复合物一起孵育后,将使用 CFSC 染料标记的自体同源的 CD4+T 细胞 [即来自同一供体] 加入并与 IL-2 继续培养 8 天,随后在没有 IL-2 的情况下培养剩下的两天。随后,将培养物分开并使用单个的 Cyclin D 刺激,或者不使用肽,所述刺激持续 8 小时,随后使用 IFN γ 和 IL-2 [T 细胞活化指示剂] 进行染色并使用 FACS 分析。

[0298] 该分析显示了与不用肽 [或其它 Cyclin D1 肽 [未显示]] 孵育的细胞相比, Cyclin D 多肽 P8、P16 和 P54 激发了扩展的 [即由 CFSC 稀释液所标记] CD4+T 细胞显著地更高的产生。因此,抗-CD40-Cyclin D1 复合物起到引发正常供体 T 细胞成为具有效应子功能显型的 Cyclin D1-特异性的 T 细胞的扩展。

[0299] 图 27 显示了相似于图 26 中详述的研究和分析,区别在于使用不同的正常供体——在这种情况下抗-CD40-Cyclin D1 复合物引发了 IFN γ 阳性繁殖的 CD4+ T 细胞的扩张,所述细胞对 Cyclin D1 多肽 P4、P43 和 P70 是特异性的。

[0300] 图 28 显示了相似于图 26 中所示的示意图和分析,区别在于使用了 CD8+T 细胞。在这种供体中,抗-CD40-Cyclin D1 复合物引发了 Cyclin D1-specific CD8+ T 细胞的扩张,尤其对于包括于池 I 和池 II 中的肽有特异性的那些。

[0301] 图 29 显示了来自相同供体的相似数据,但是其由来自这些池中的单个的肽进行分析。具体地,这些 T 细胞对于肽 P7、P8 和 P10 显示特异性。

[0302] 预期的是,本说明书中所讨论的任何实施方案可以由关于本发明的任何方法、试剂盒、试剂或组合物来实施,反之亦然。此外,本发明的组合物可以用于实现本发明的方法。

[0303] 要理解的是,本文所述的具体实施方案是通过阐释而不是限制本发明的方法来展示的。本发明的主要特征可以在不脱离本发明范围的情况下用于各种实施方案中。本领域技术人员将认识到,或者仅仅利用例行的实验能够确定,本文所述具体步骤的许多等同物。这样的等同物被认为是在本发明的范围内,且被权利要求所涵盖。

[0304] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请指示了本发明所涉及领域的技术人员的水平。所有的出版物和专利申请均引入本文作为参考,其引入的程度如同各个独立的出版物或专利申请具体并独立地被指明引入作为参考。

[0305] 词语“一个”或“一种”当与权利要求和 / 或说明书中的术语“包含”结合使用时,可以指“一种”,但其也与“一种或多种”、“至少一种”和“一种或多种”的意思相一致。在权利要求中所使用的术语“或者”是指“和 / 或”,除非明确指明仅仅是指供选择物,或供选择物为相互排斥的,尽管公开内容支持仅仅指供选择物及“和 / 或”的定义。在整个本申请中,术语“大约”用来说明这样的值,其包括装置和用来测定所述值的方法的误差的固有变化,或者研究受试者之间存在的变化。

[0306] 如在本说明书和权利要求书中所使用的,词语“包含”(以及任何形式的“包含”),“具有”(以及任何形式的“具有”),“包括”(以及任何形式的“包括”)或“含有”(以及任

何形式的“含有”)是包括的或开放式的,且不排除额外的,未述及的元素或方法步骤。

[0307] 本文所使用的术语“或其组合”是指在该术语之前所列举项目的全部排列和组合。例如,“A、B、C 或其组合”意在包括 A、B、C、AB、AC、BC 或 ABC 中的至少一种,并且如果在特定的上下文中顺序是重要的,那么还包括 BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC 或 CAB。继续这个例子,明显包括的是包含一种或多种项目或术语重复的组合,如 BB、AAA、AB、BBC、AAABCCCC、CBAAAA、CABABB 等等。本领域技术人员将理解的是,通常对任何组合中的项目或术语的数目没有限制,除非从上下文中另外是明显的。

[0308] 根据本发明的公开内容,在没有不适当的实验下可以制备和实施本文所公开和要求保护的全部组合物和 / 或方法。尽管已就优选的实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员来说明显的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以改变本文所述的组合物和 / 或方法以及方法的步骤或方法的步骤的顺序。所有这样相似的对本领域技术人员而言明显的取代和修饰被认为是在附加的权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念内。

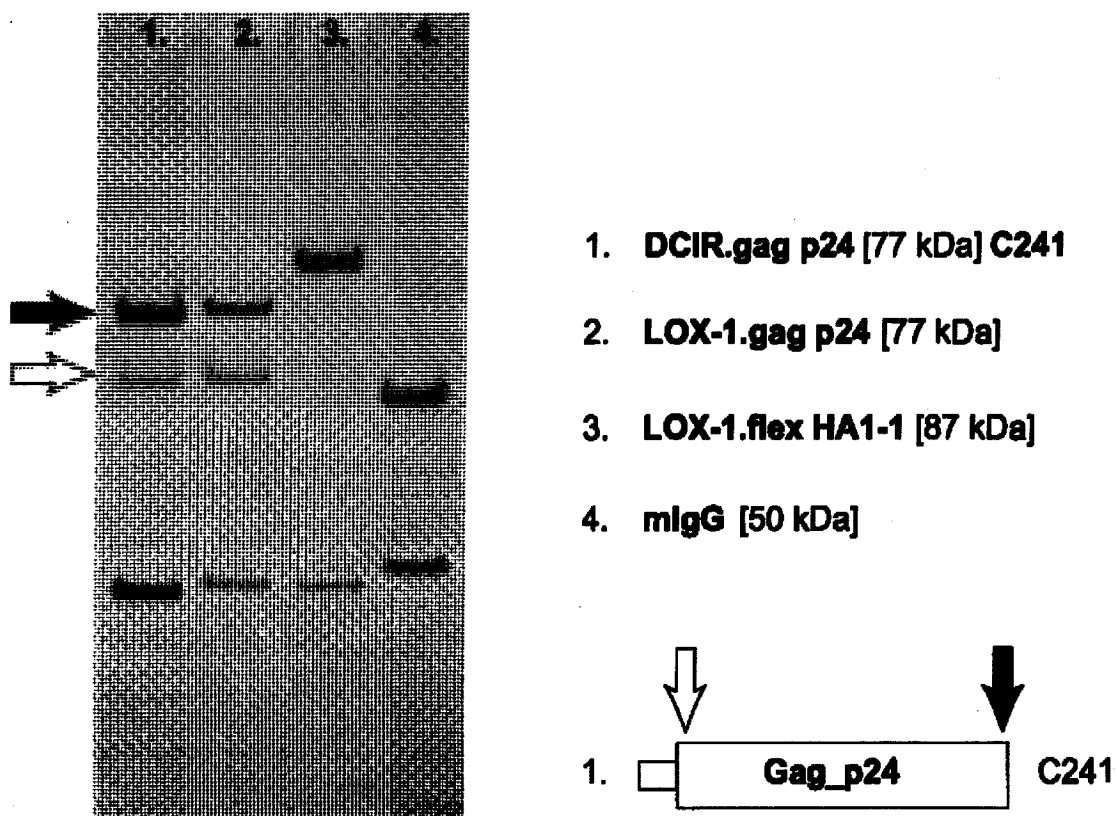


图 1

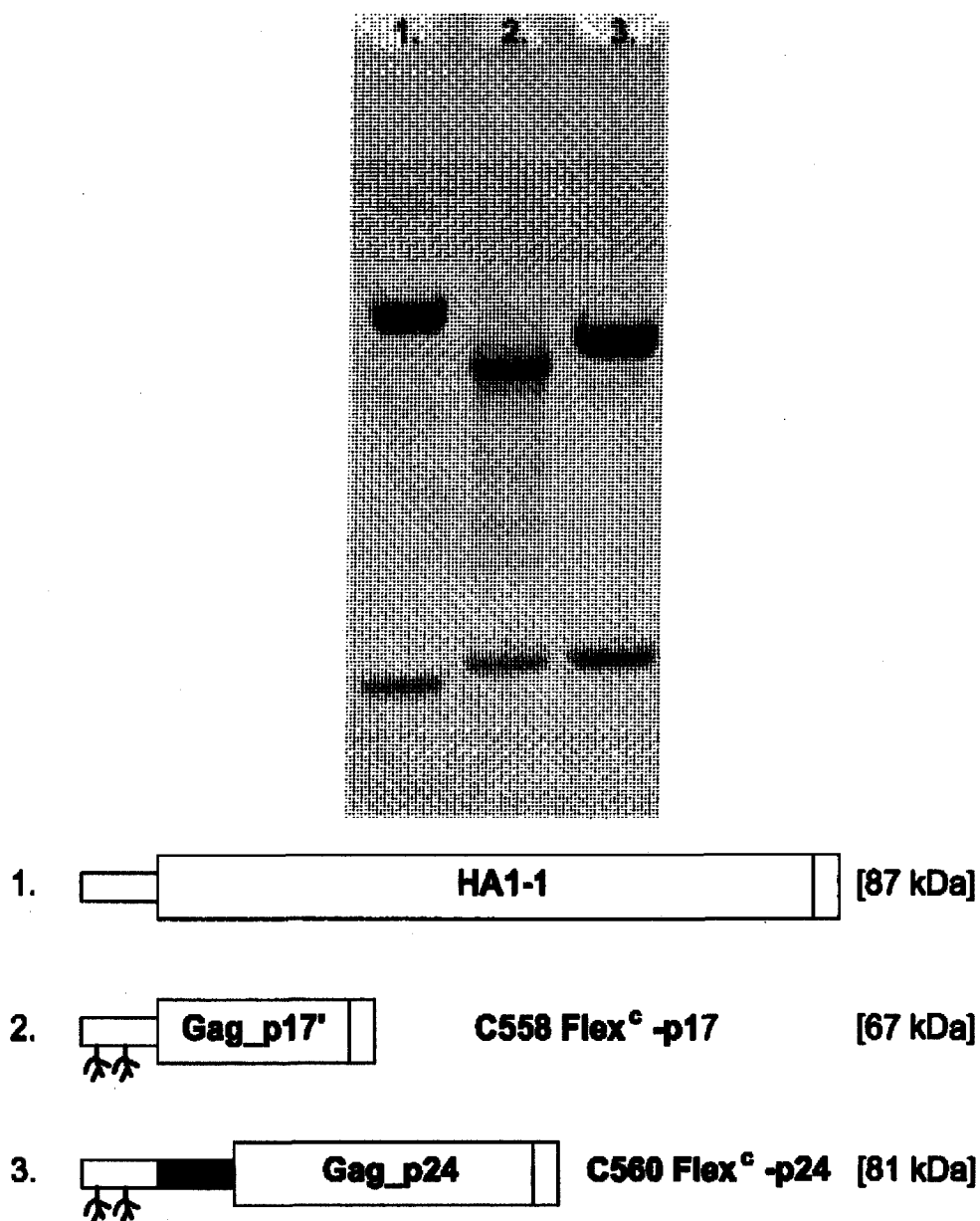


图 2

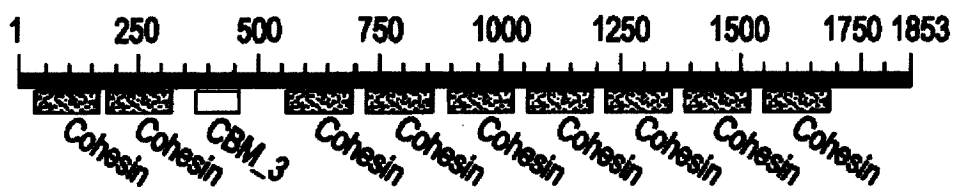


图 3A

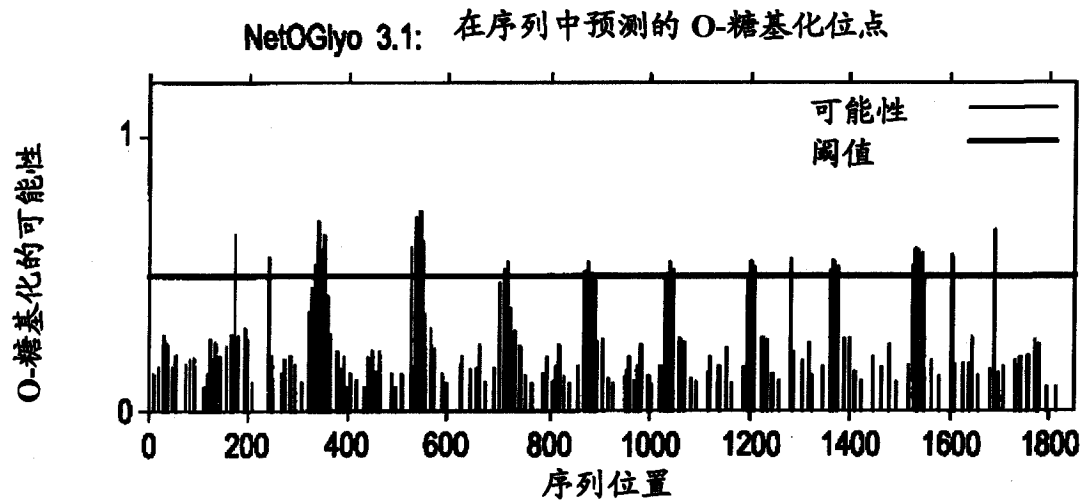


图 3B

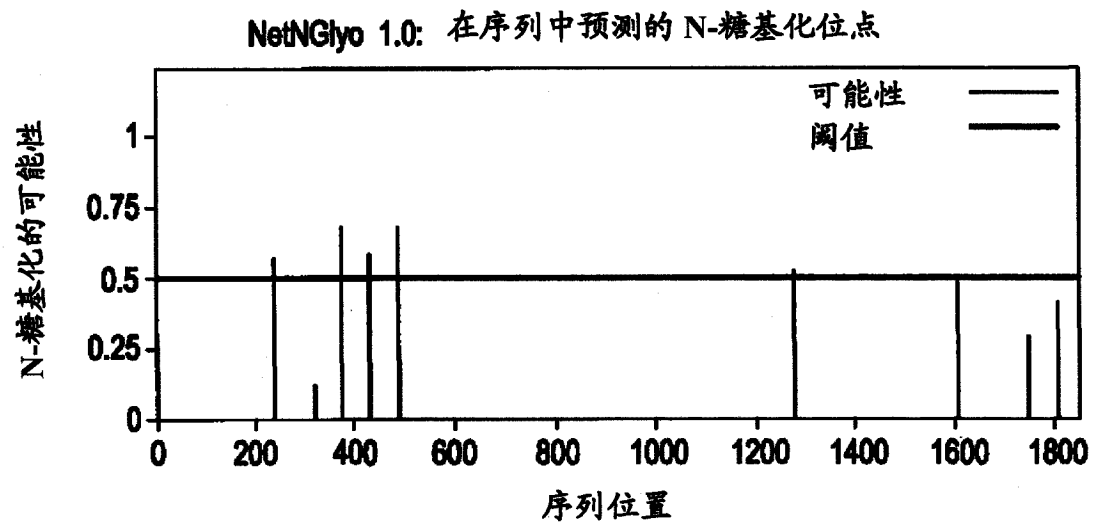


图 3C

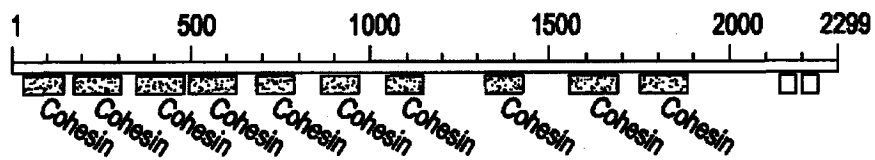


图 4A

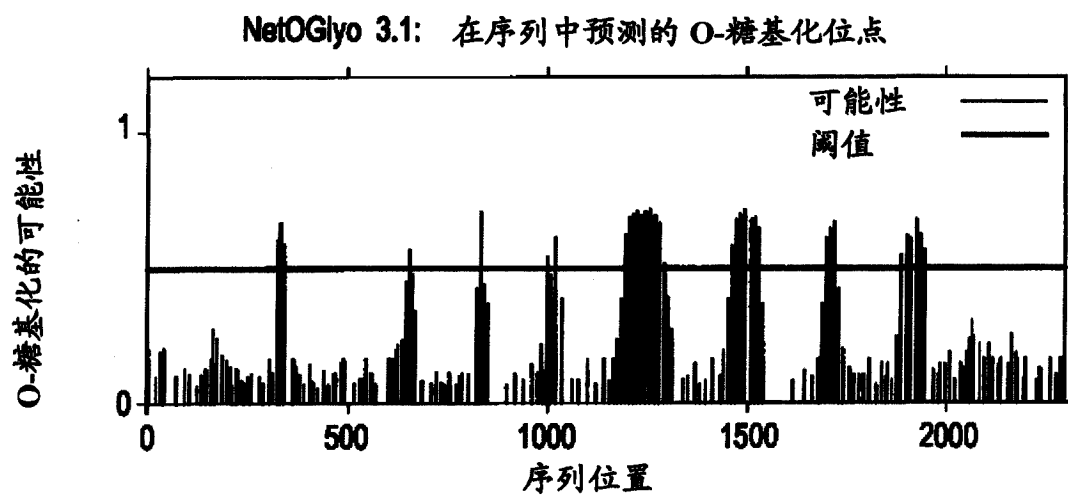


图 4B

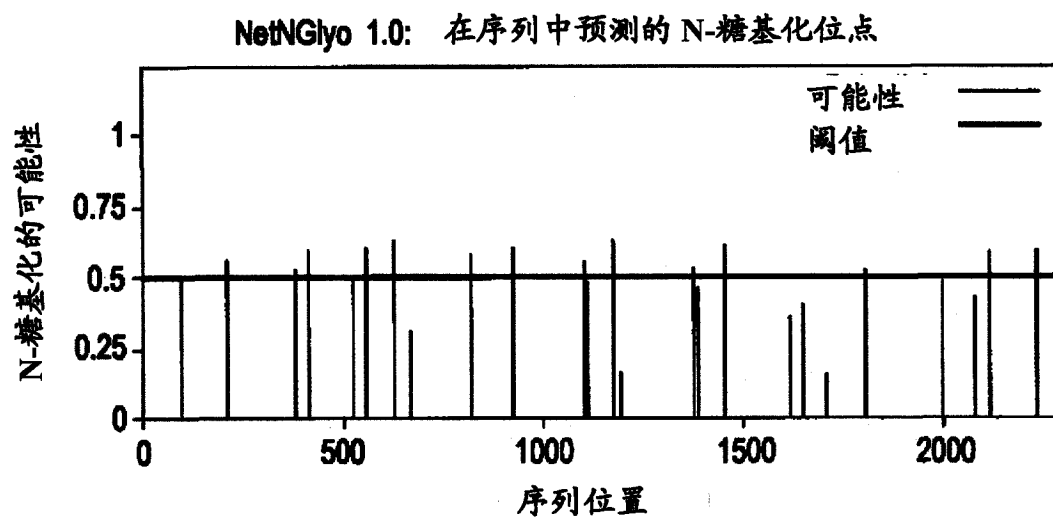


图 4C

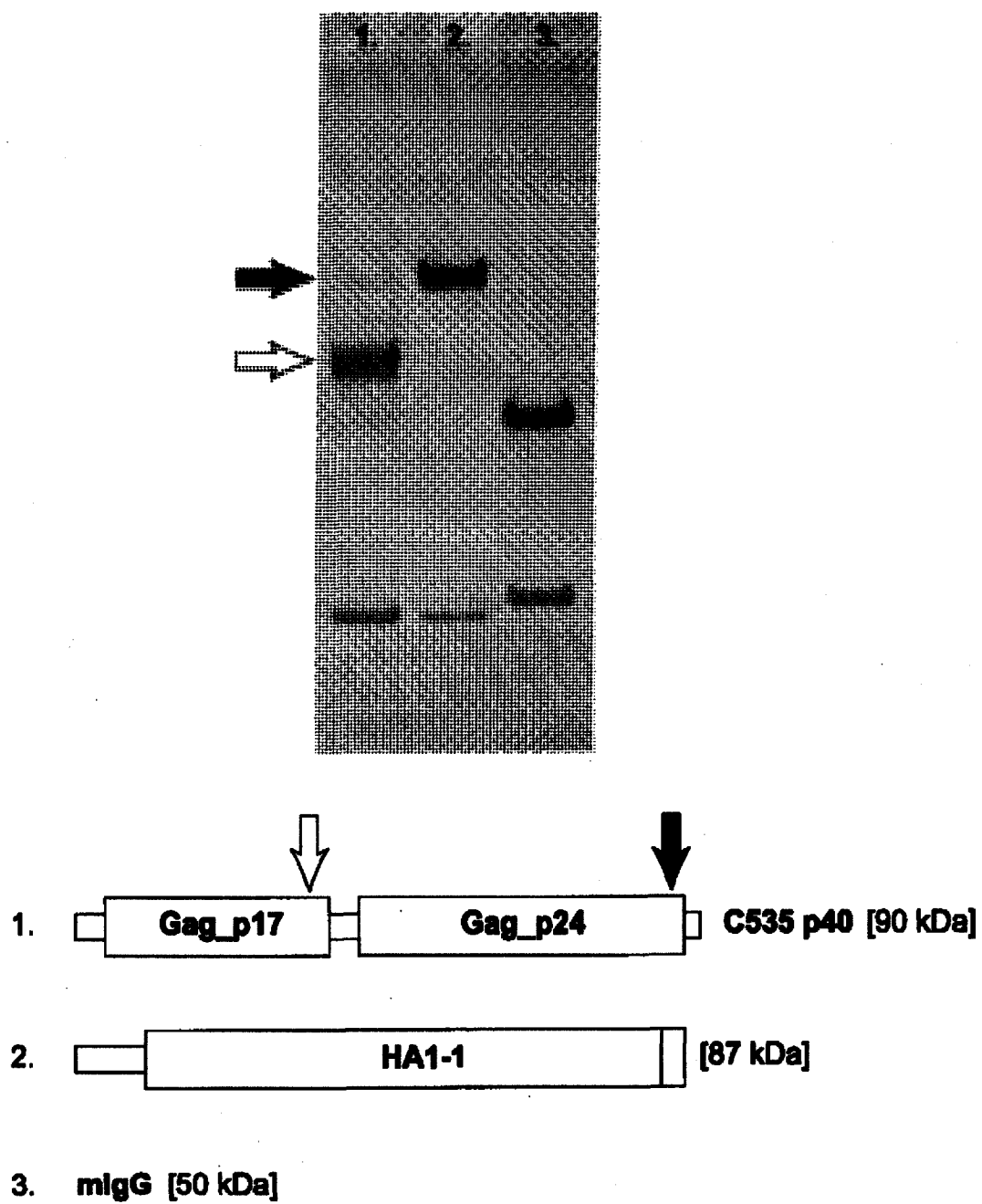


图 5

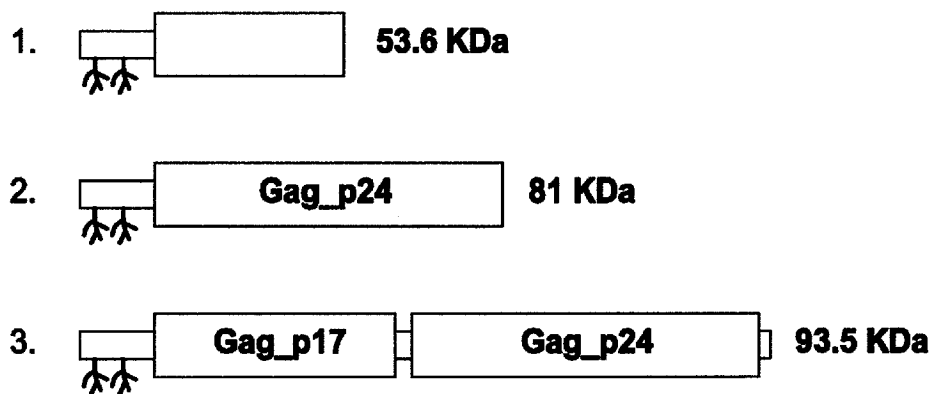
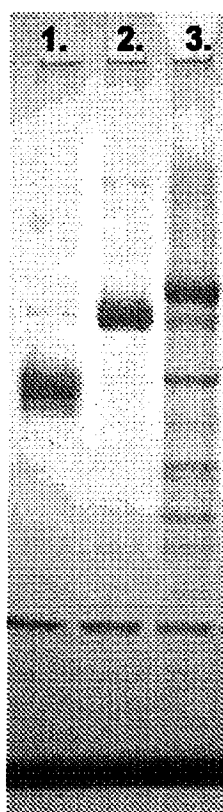
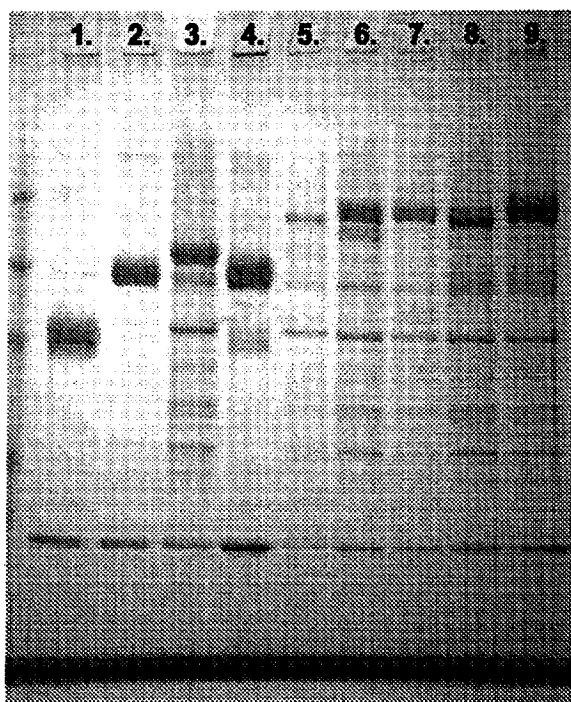


图 6



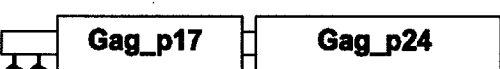
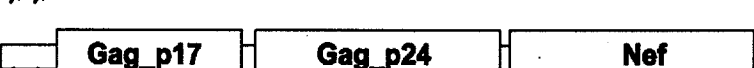
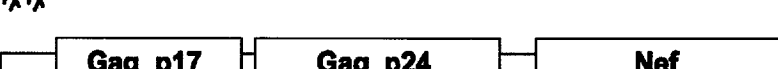
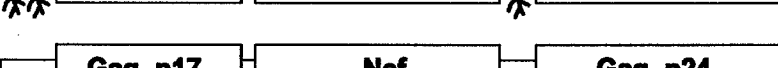
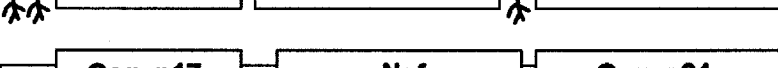
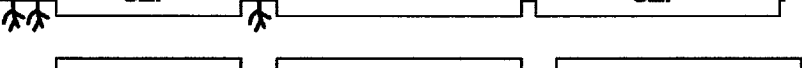
1.  53.6 KDa
2.  81 KDa
3.  93.5 KDa
4.  76.4 KDa
5.  117 KDa
6.  119 KDa
7.  119.7 KDa
8.  119.7 KDa
9.  122.3 KDa

图 7

IL-12p40 诱导测试的抗-CD40 杂种瘤上清液

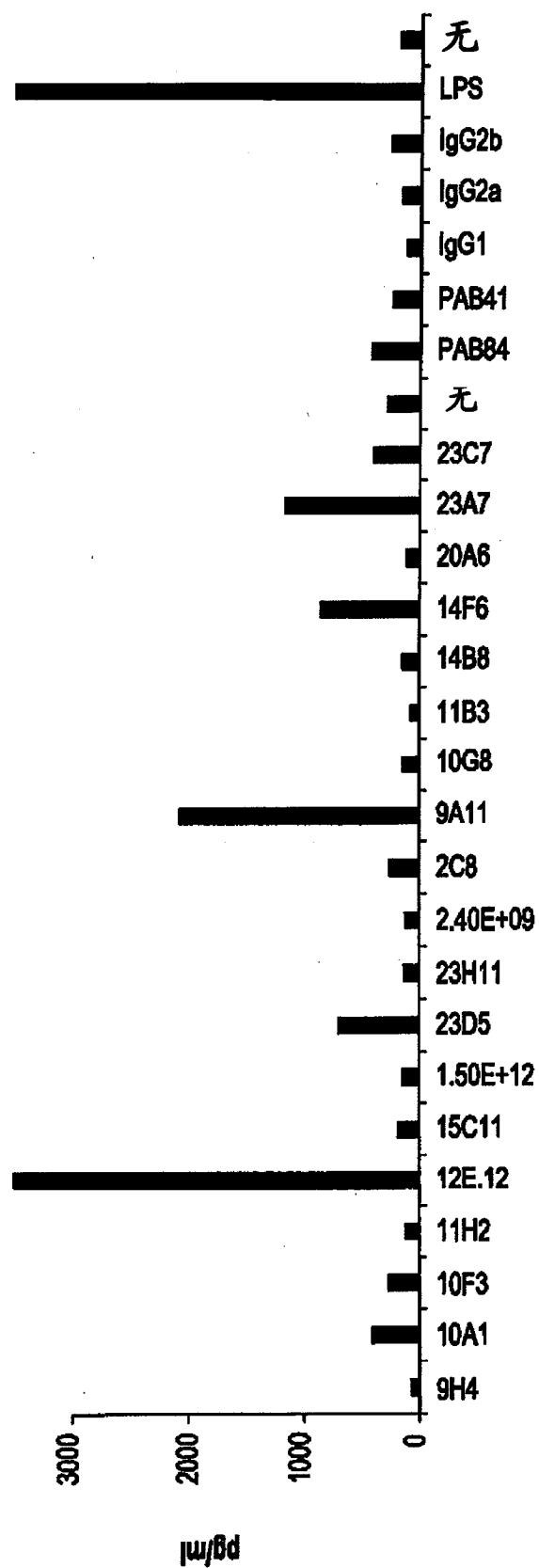


图 8

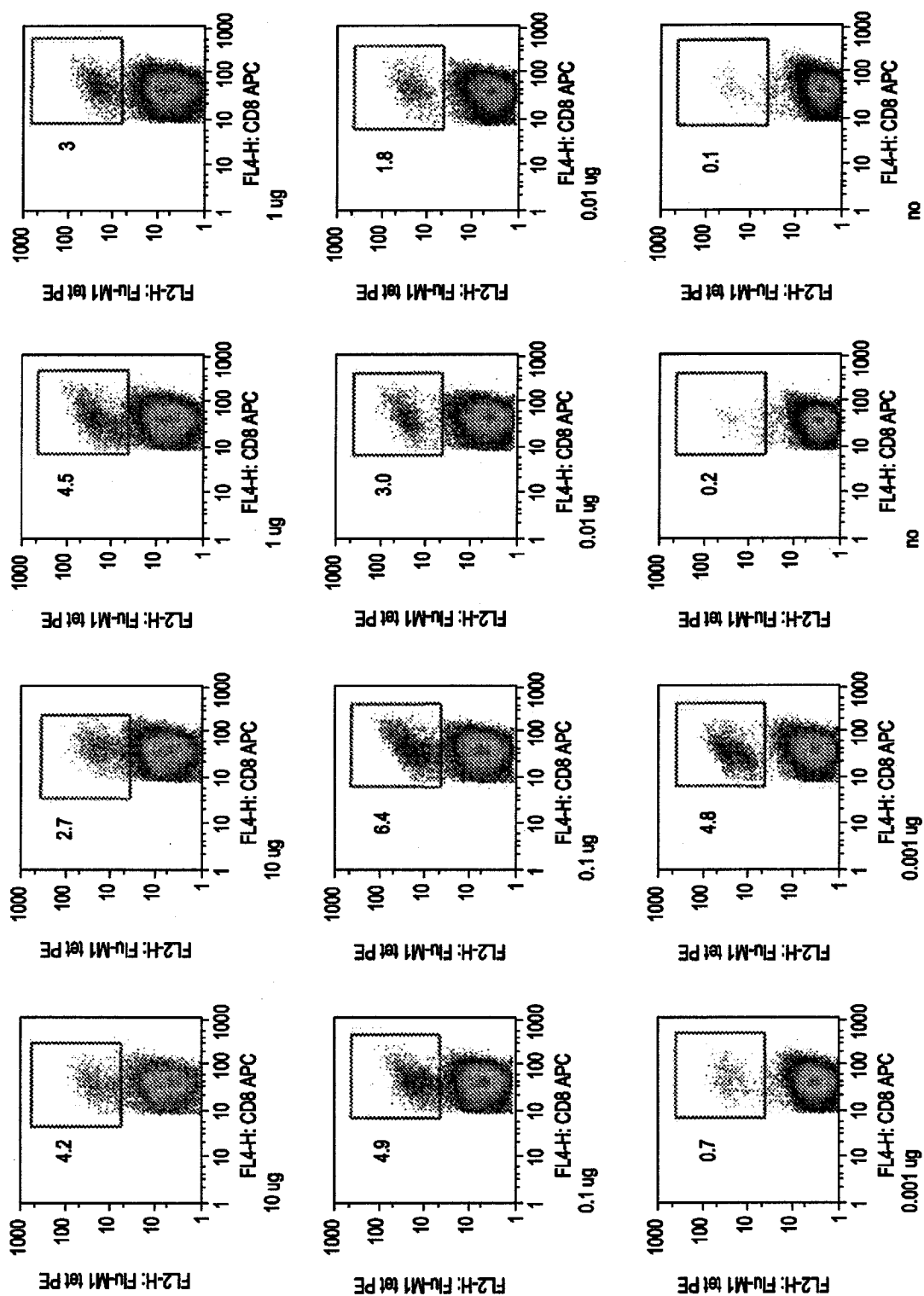


图 9

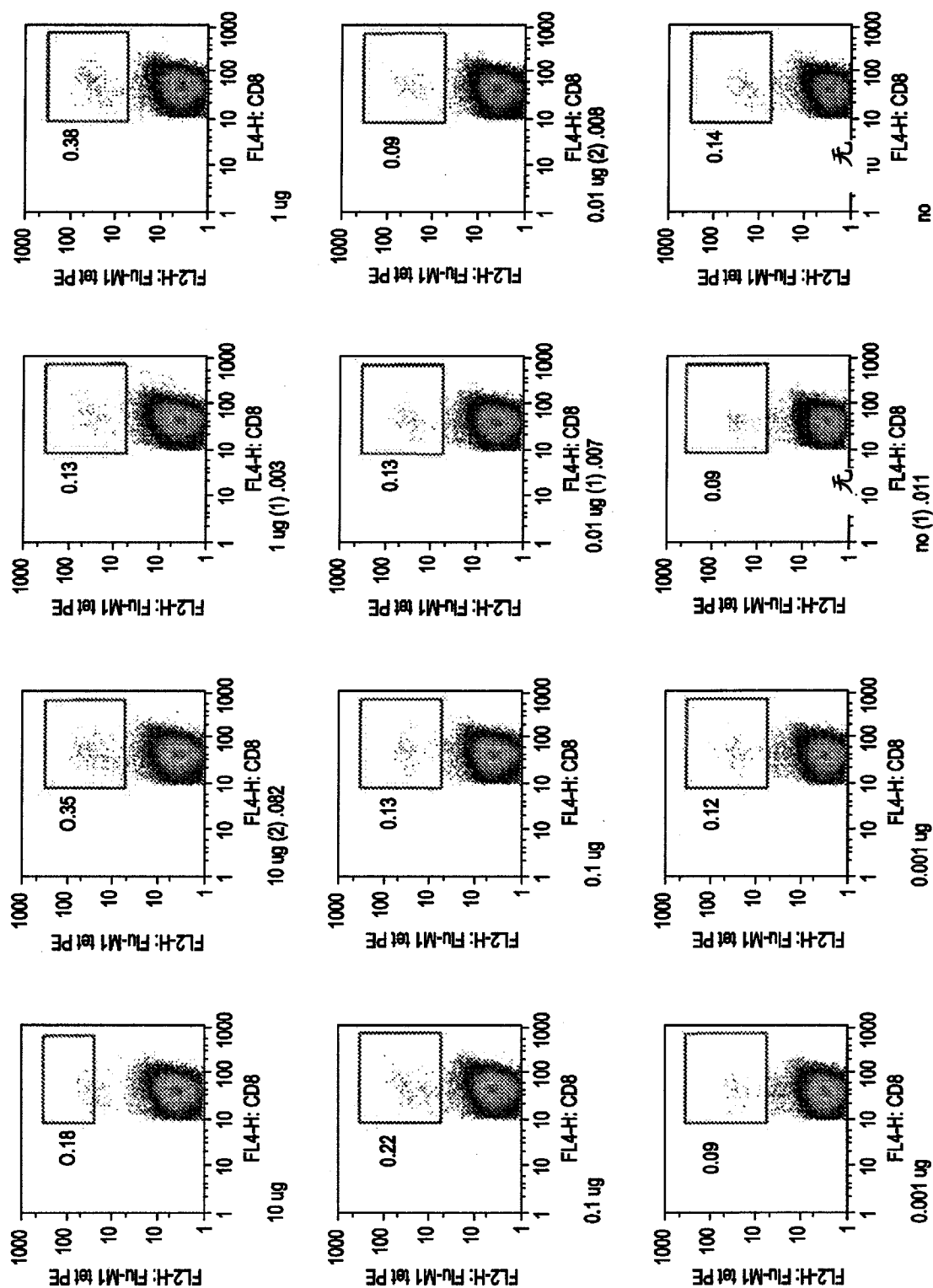


图 10

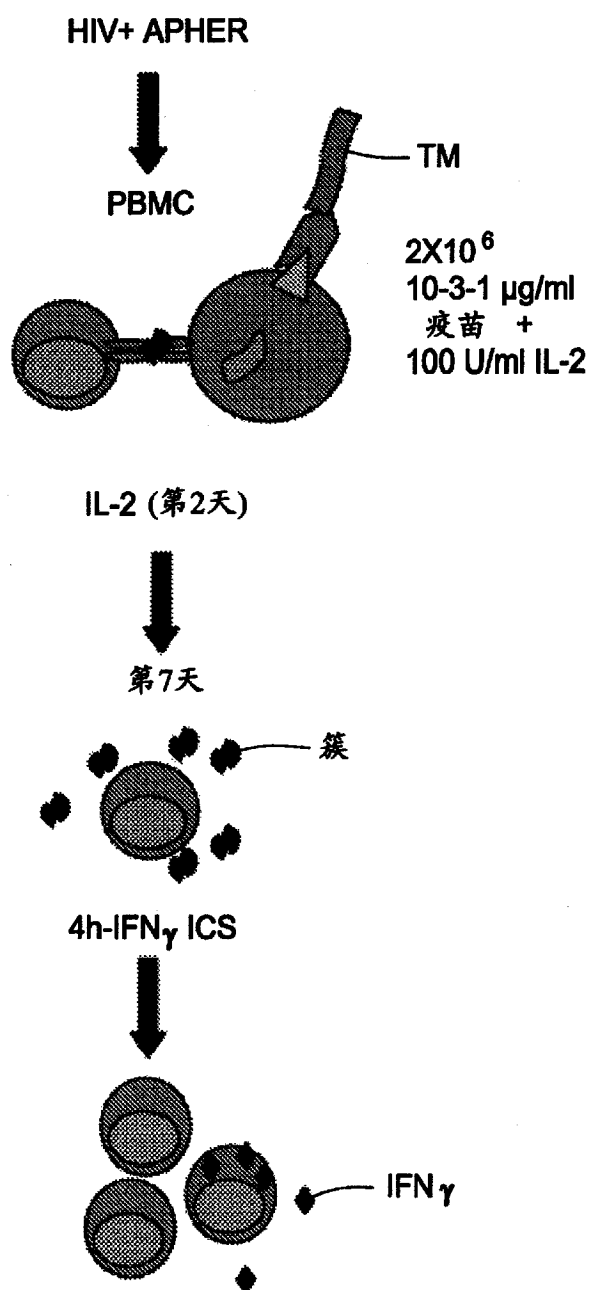


图 11

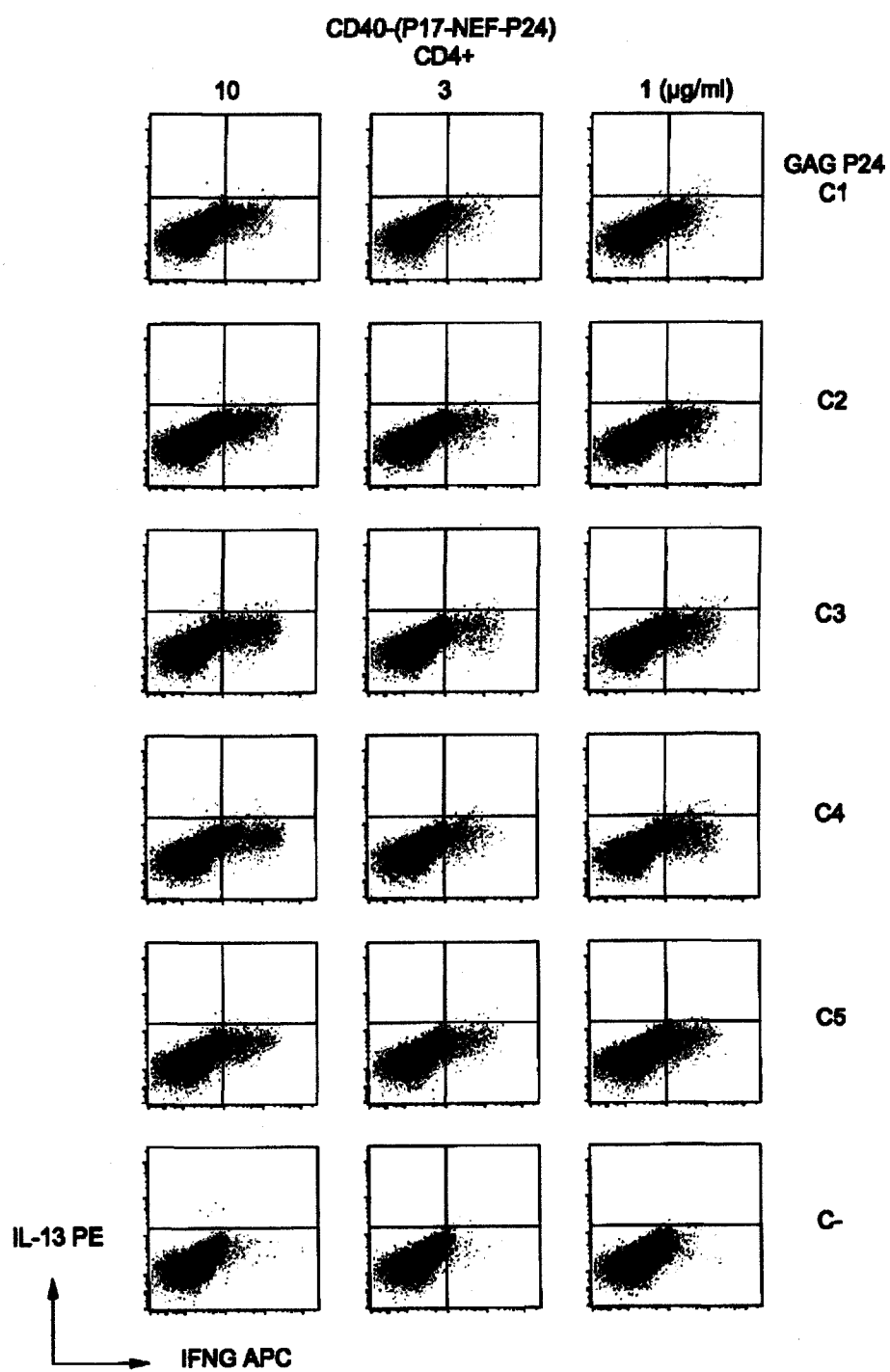


图 12

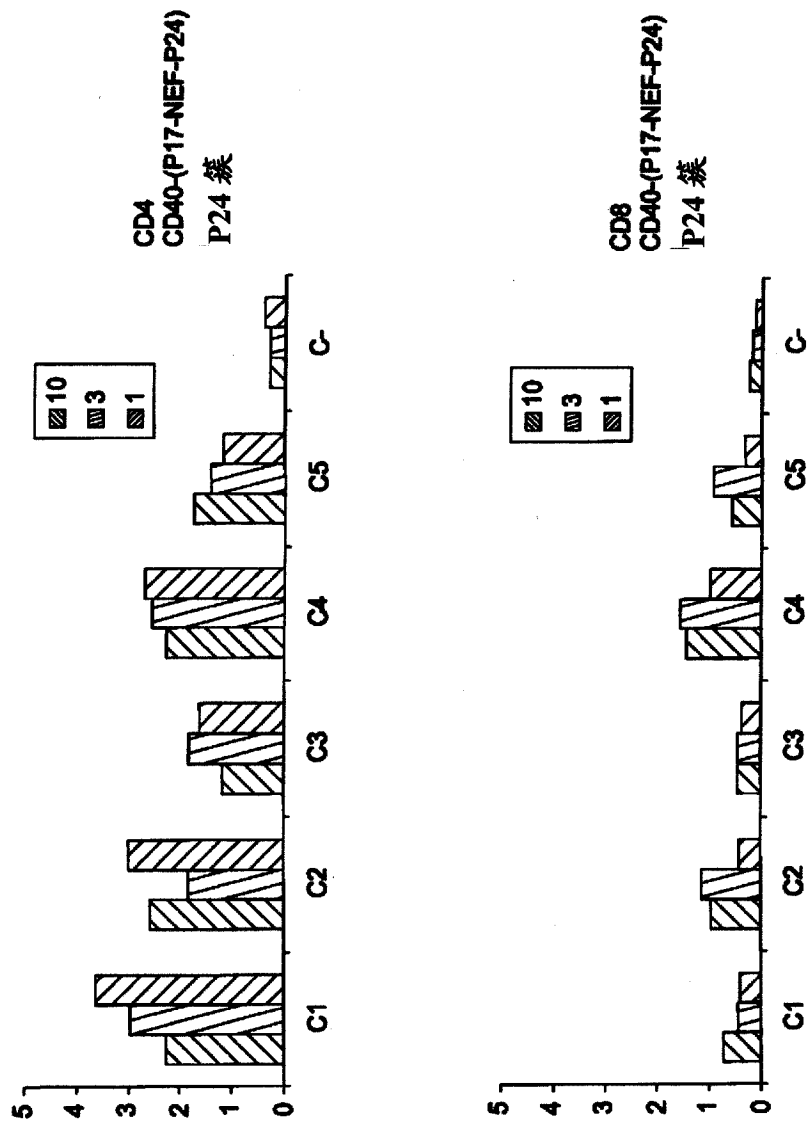


图 13

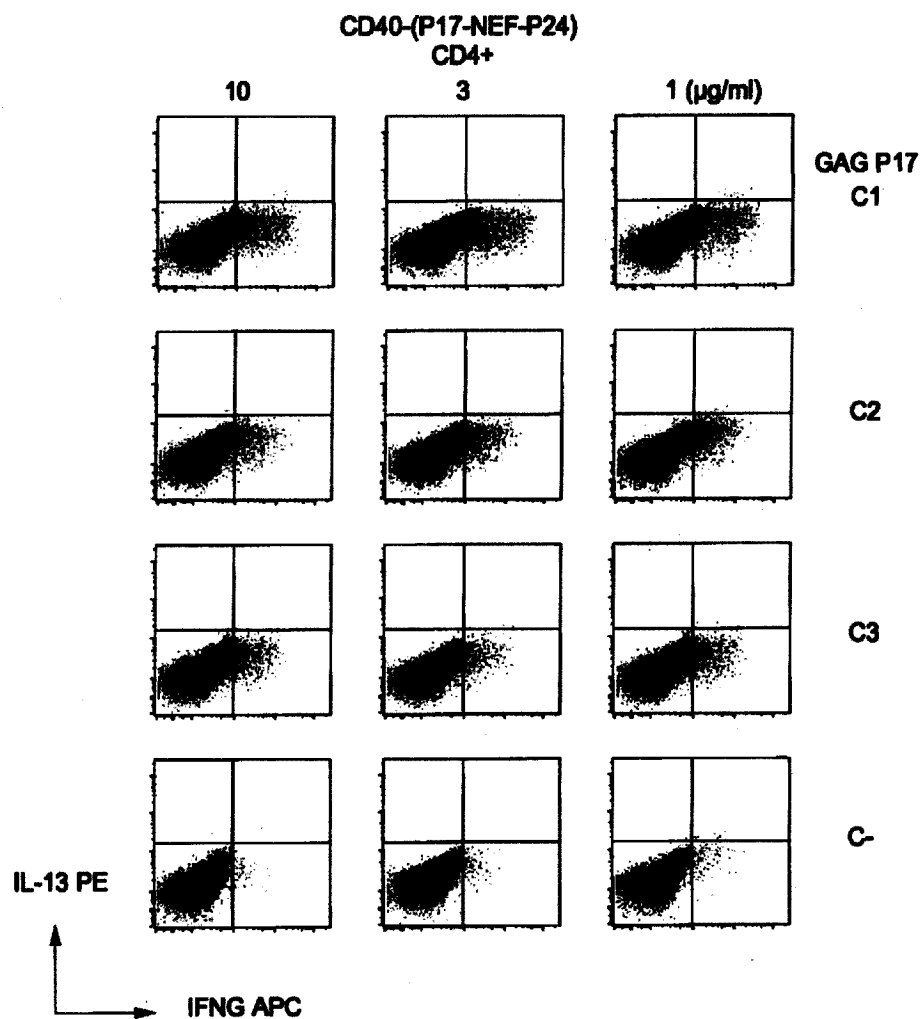


图 14

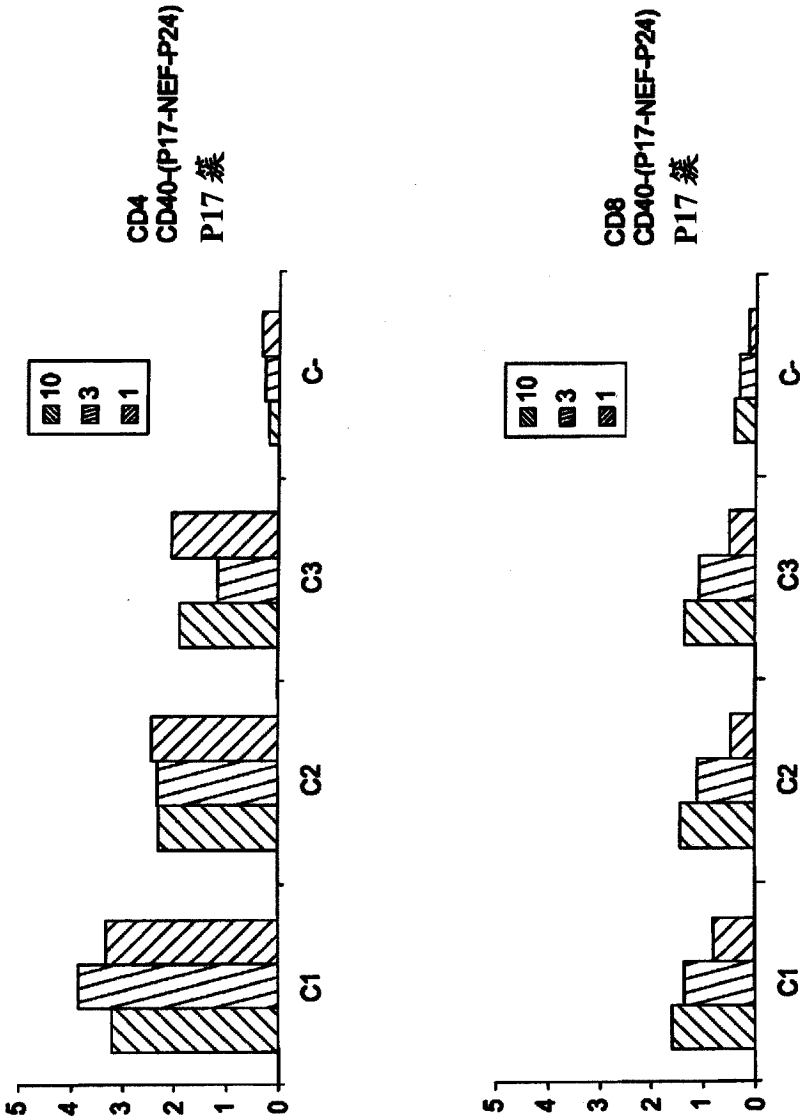


图 15

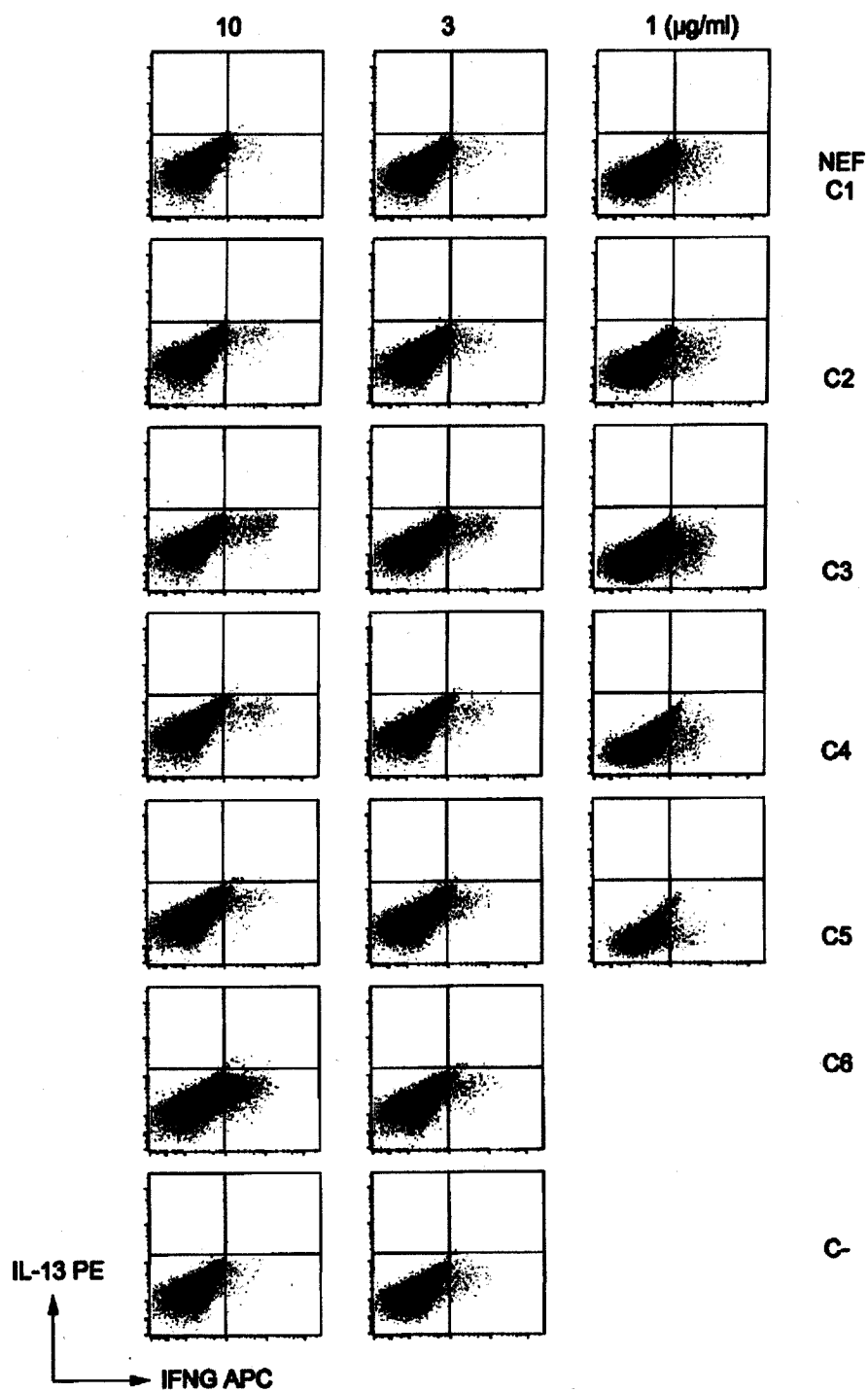


图 16

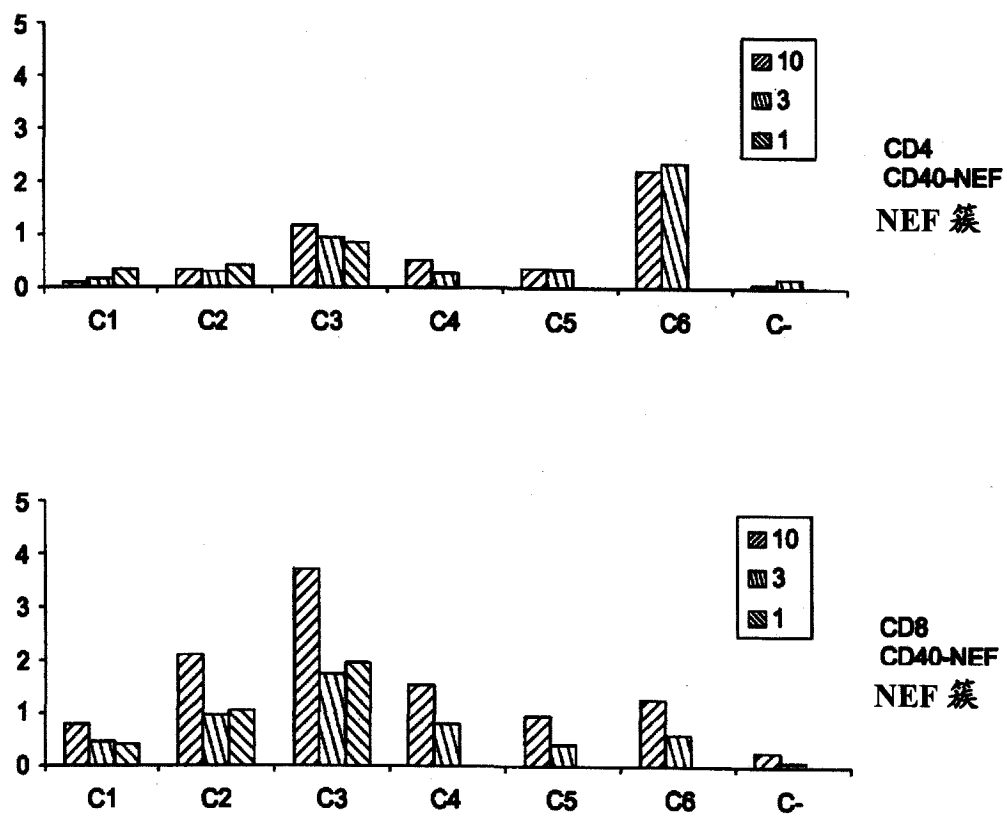


图 17

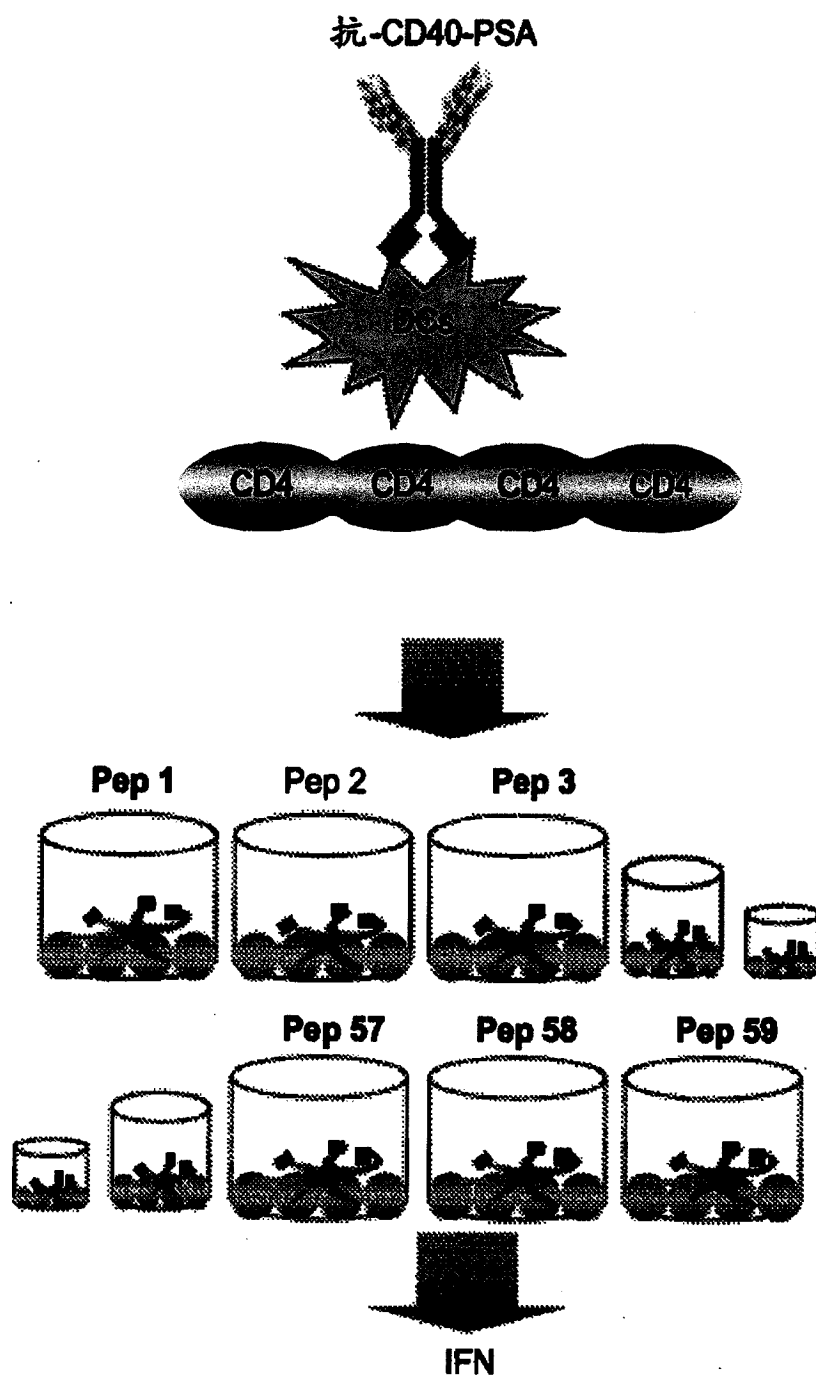


图 18

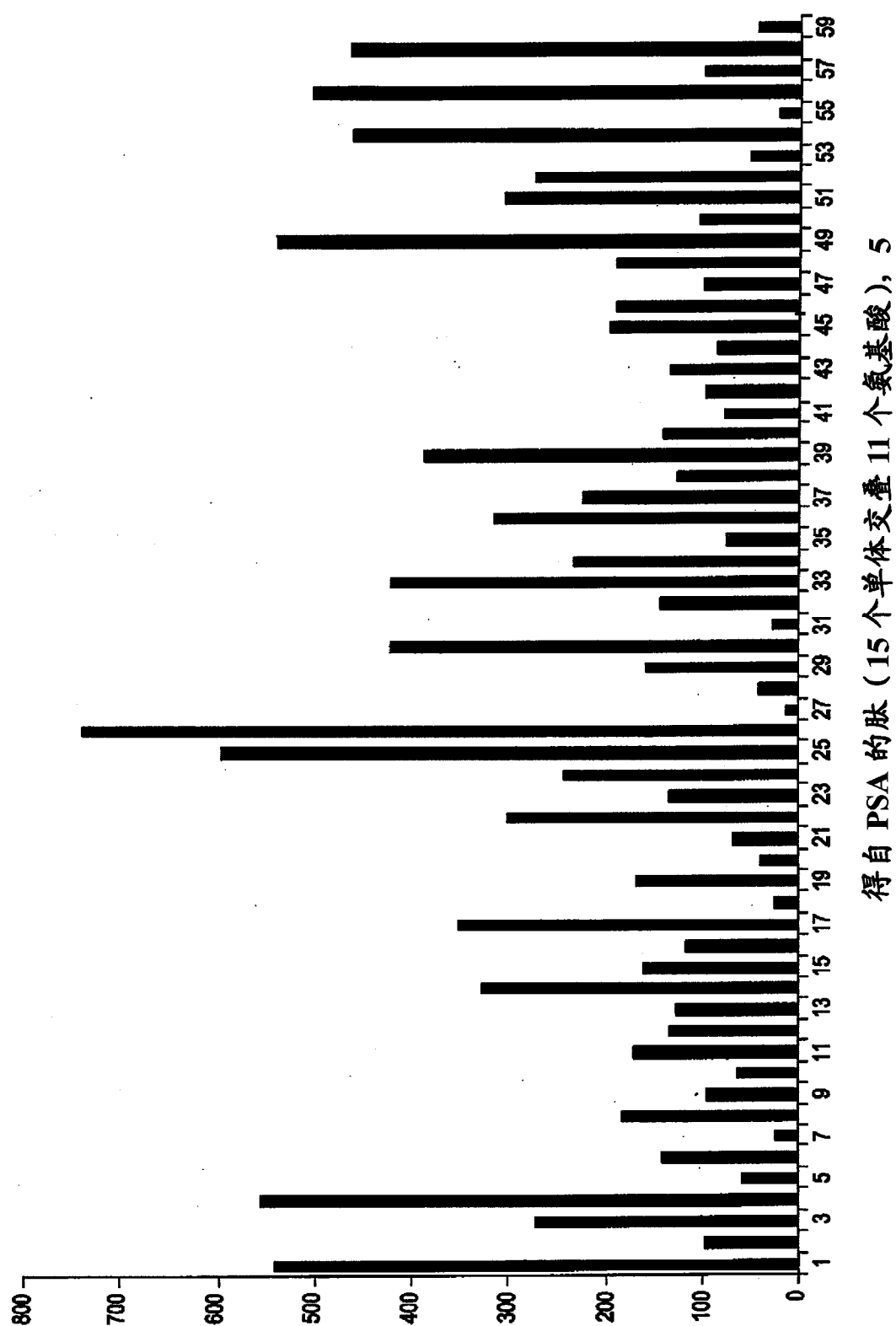


图 19

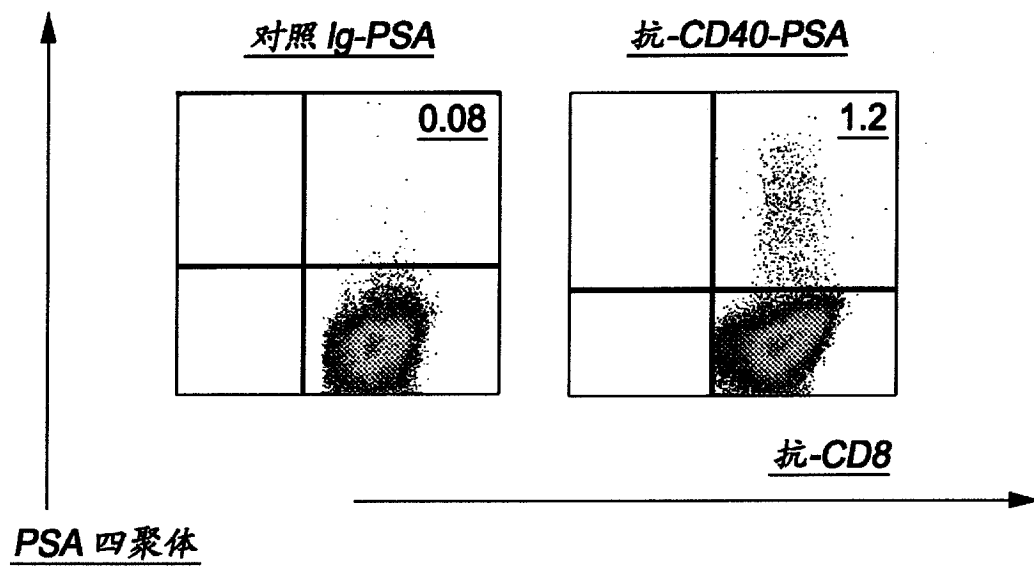


图 20

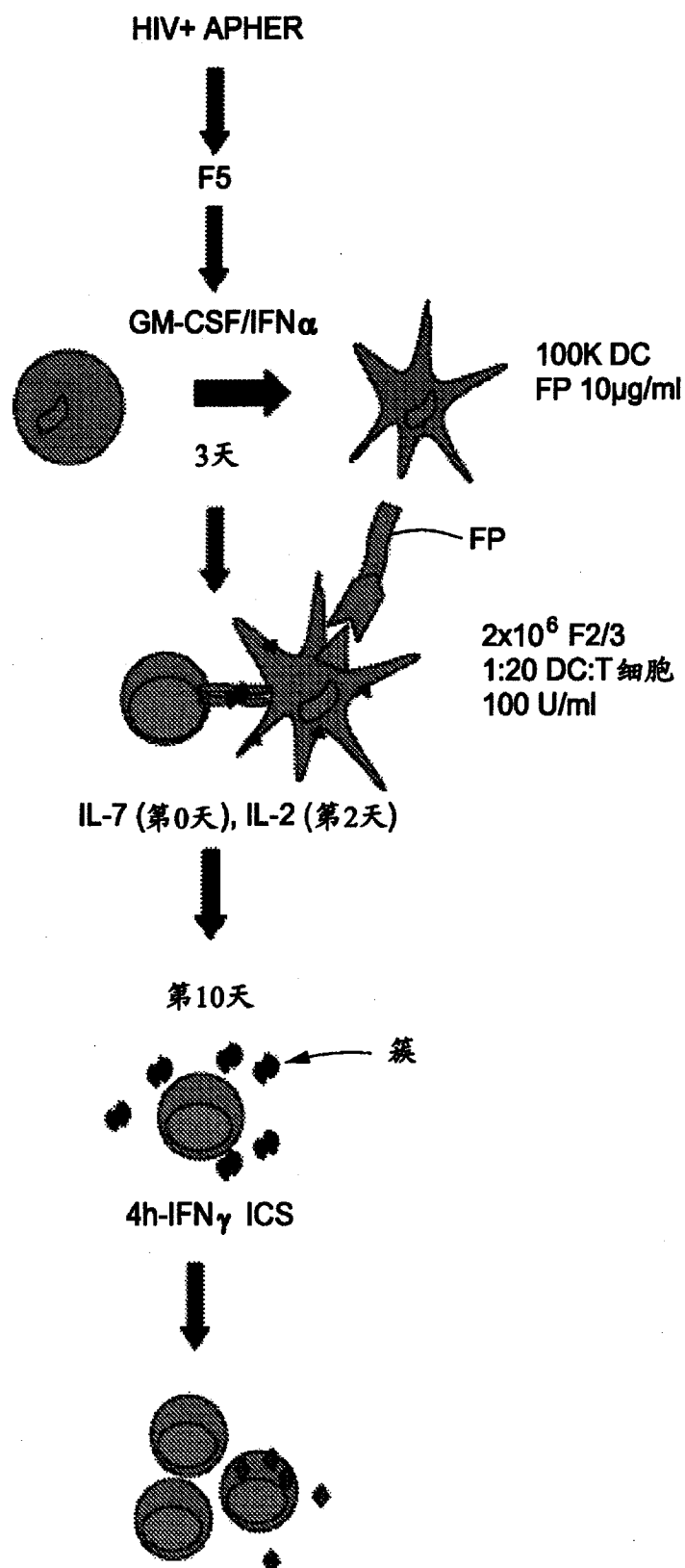


图 21

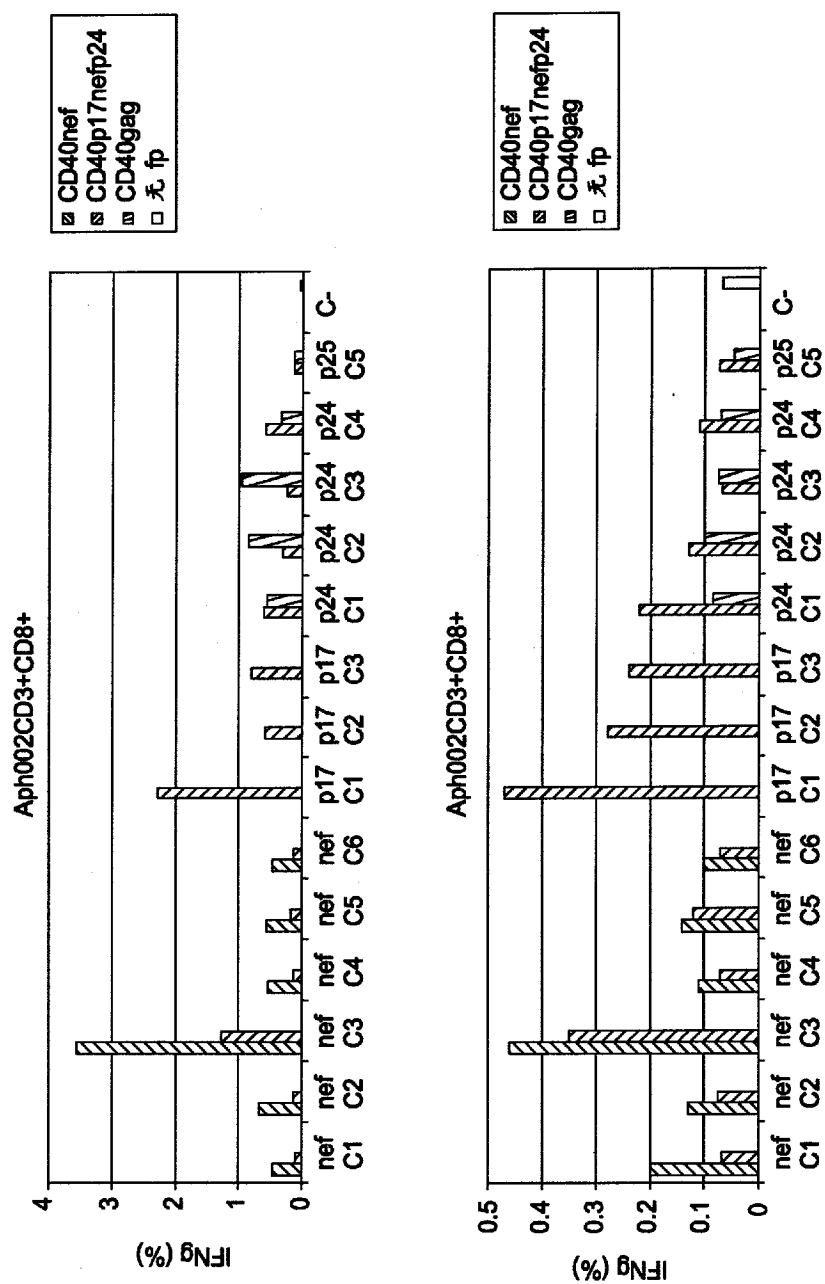


图 22

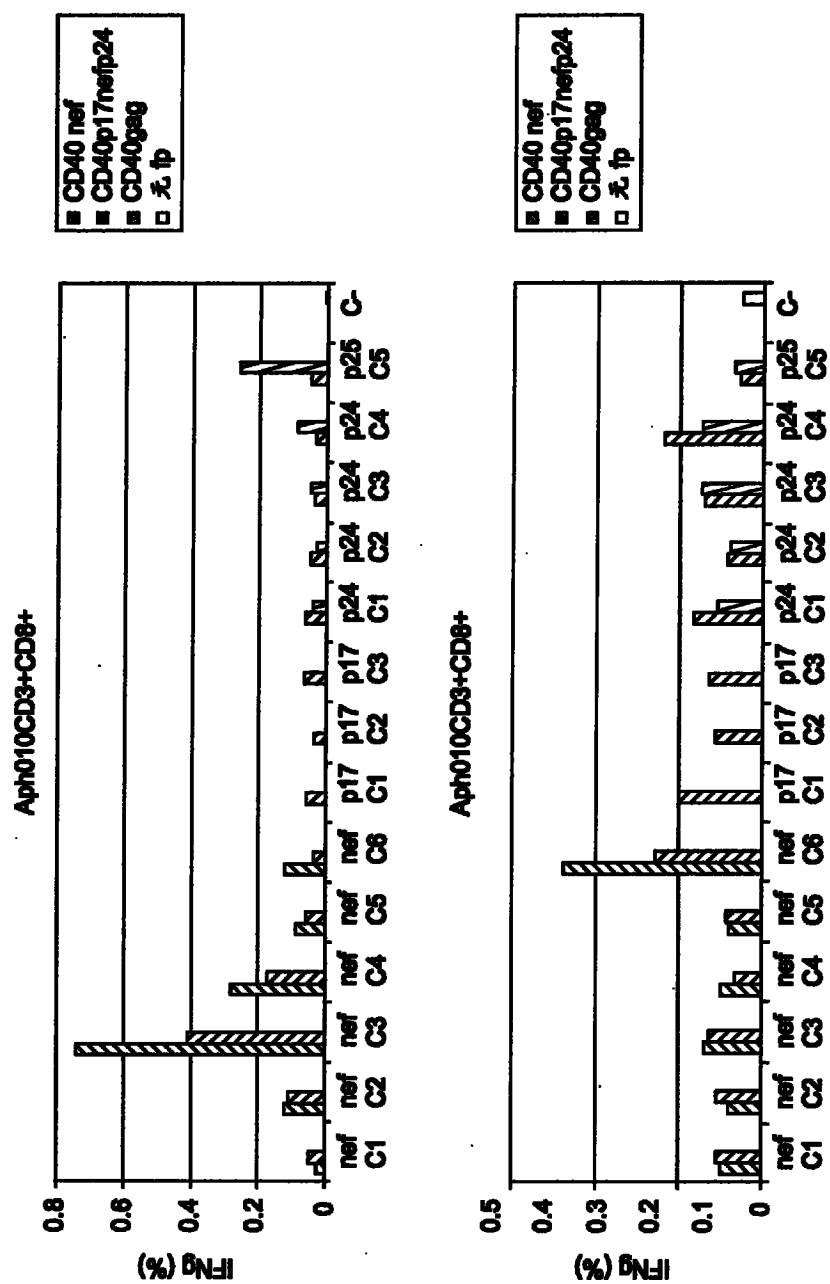


图 23

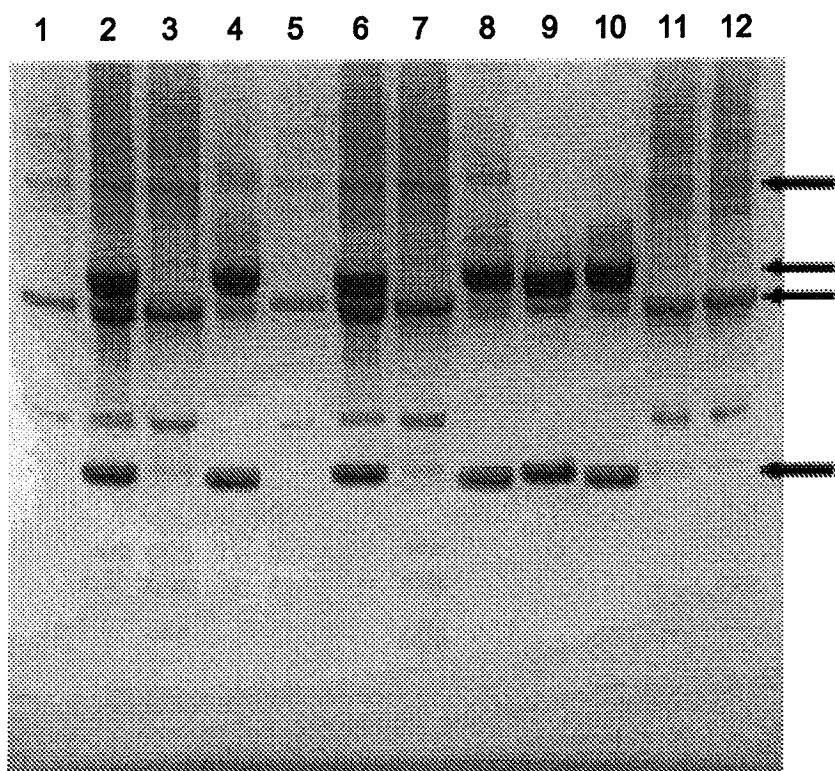


图 24

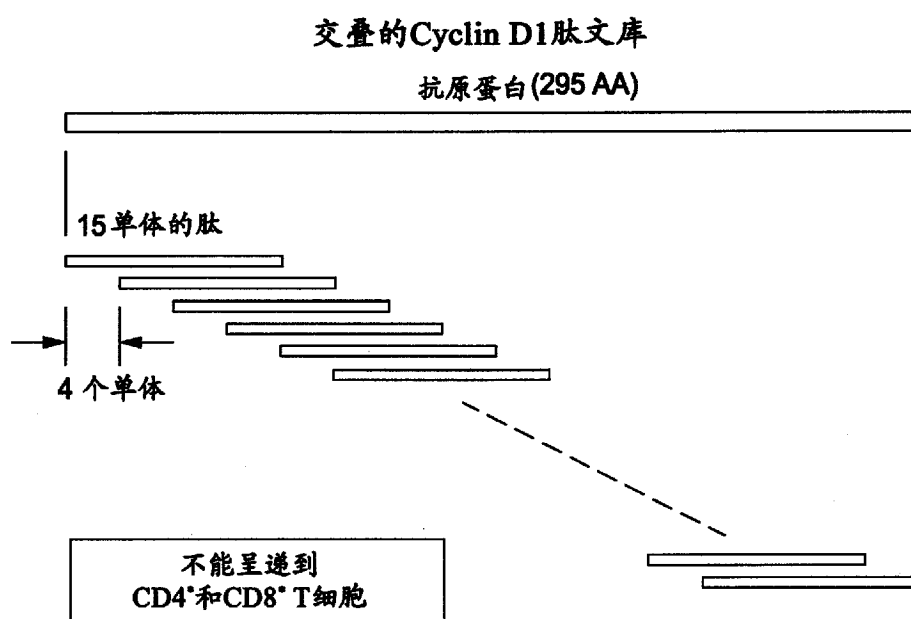


图 25

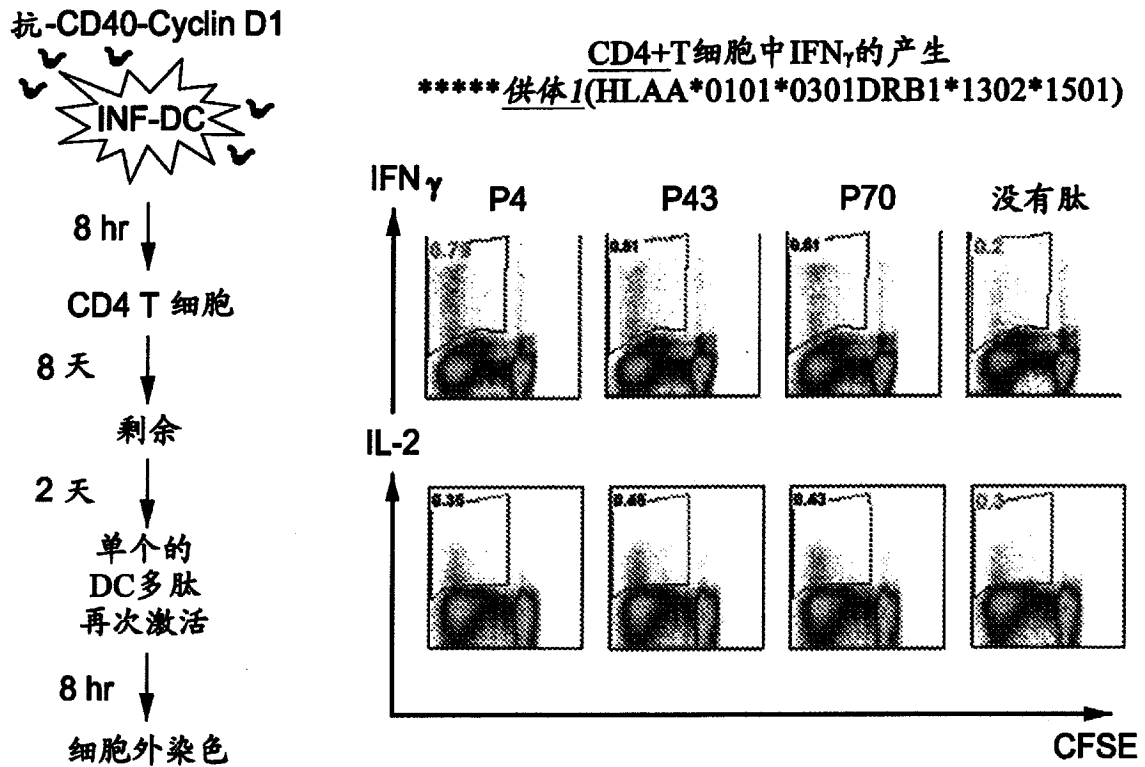


图 26

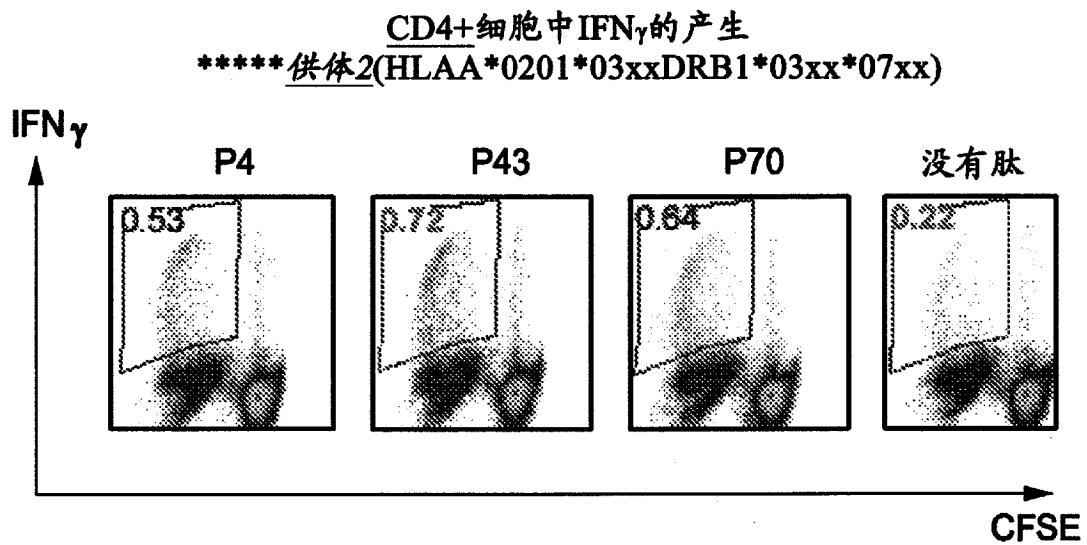


图 27

抗-CD40-Cyclin D1



O/N

CD8 T细胞

8天

剩余

2天

单个的 DC
多肽再次激活

8小时

细胞外染色

CD8+ T 细胞中 IFN γ 的产生-

***** 供体 2 (HLAA *02)

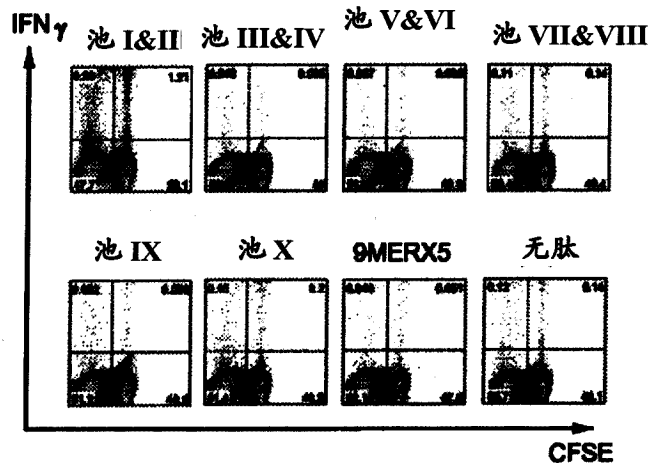


图 28

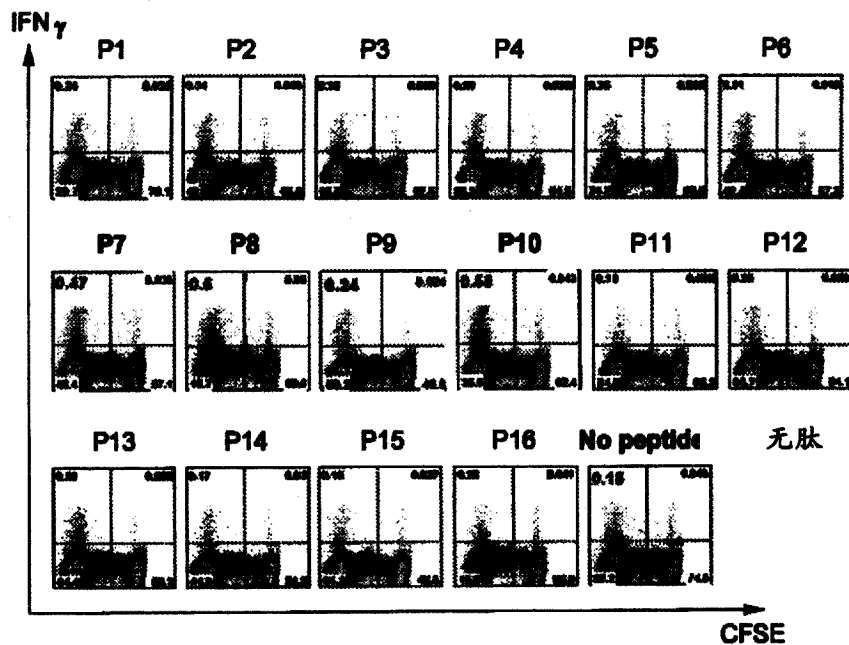
CD4+ T 细胞中 IFN γ 的产生***** 供体 2 (HLAA *0201)

图 29