



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101460054 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 12

(21) 申请号 200780020901. 5

(22) 申请日 2007. 04. 06

(30) 优先权数据

11/400, 774 2006. 04. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 12. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/008734 2007. 04. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/117682 EN 2007. 10. 18

(73) 专利权人 阿戈斯治疗公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 D·希利 A·希诺哈拉 M·亚当斯

M·德贝内德特 I·彻雷潘诺娃

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军 刘玥

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

A61K 39/00 (2006. 01)

A61P 35/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 93/08207 A1, 1993. 04. 29, 全文.

Irina Y Tcherepanova et al.. Ectopic expression of a truncated CD40L protein from synthetic post-transcriptionally capped RNA in dendritic cells induces high levels of IL-12 secretion. 《BMC Molecular Biology》. 2008, 第9卷90.

Frank Blaeser et al.. Critical function of the CD40 pathway in parvovirus B19 infection revealed by a hypomorphic CD40 ligand mutation. 《Clinical Immunology》. 2005, 第117卷231-237.

审查员 张丽华

权利要求书1页 说明书56页

序列表28页 附图28页

(54) 发明名称

成熟的树突细胞组合物和用于培养其的方法

(57) 摘要

本发明提供了新 CD40L 多肽和核酸, 以及包含此种 CD40L 多肽和 / 或核酸的抗原呈递细胞和疫苗, 和用于制备抗原呈递细胞和疫苗的相关方法。抗原呈递细胞和疫苗对于增强免疫应答是有用的。本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的方法, 其包括下述顺次步骤: (a) 用包含干扰素 γ 受体 (IFN- γ R) 激动剂和 / 或肿瘤坏死因子 α 受体 (TNF- α R) 激动剂的第一种信号给分离的未成熟的树突细胞 (iDCs) 发信号, 以产生发信号的树突细胞; 和 (b) 用包含有效量的 CD40 激动剂的第二种瞬时信号给所述发信号的树突细胞发信号, 以产生 CCR7⁺ 成熟的树突细胞。本发明还提供了通过本发明方法制备的树突细胞的富集群体。此种树突细胞具有增强的免疫刺激性质和增加的 IL-12 分泌和 / 或减少的 IL-10 分泌。

CD40 发信号可以通过由编码 CD40L 的外源多核苷酸 (例如, mRNA 或 DNA) 翻译的一种或多种多肽、针对 CD40 受体的激动性抗体或由 CD40 配体多肽起始。富集群体可以通过给 DC 施用免疫原得到进一步修饰。DC 将在其细胞表面上吸收且加工免疫原。

1. 一种树突细胞,其包含由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成的重组 CD40L 多肽。
2. 一种树突细胞,其包含编码由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成的 CD40L 多肽的体外转录的 RNA。
3. 一种疫苗,其包含权利要求 2 的树突细胞。
4. 一种载体,其包含编码由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成的重组 CD40L 多肽的重组核酸。
5. 一种用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的方法,其包含下述顺次步骤:
 - (a) 在 TNF- α R 激动剂存在下,用干扰素 γ 受体 (IFN- γ R) 激动剂培养分离的未成熟的树突细胞 (iDCs),以产生 CD83⁺ 成熟树突细胞;和
 - (b) 用编码有效量的 CD40L 多肽的 mRNA 转染所述 CD83⁺ 成熟树突细胞,以产生 CD83⁺CCR7⁺ 成熟的树突细胞;其中所述 CD40L 多肽由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述 mRNA 对应于 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:33 的 cDNA、或由于密码子简并而不同的变体,其中所述 mRNA 任选是加帽的和 / 或多腺苷酸化的。
7. 权利要求 5 的方法,其中所述树突细胞用电穿孔转染。
8. 权利要求 5 的方法,其进一步包括使所述 iDCs 和 / 或所述 CD83⁺ 成熟树突细胞与 PGE₂ 接触。
9. 权利要求 5 的方法,进一步包括使步骤 (a) 的所述 iDCs 和步骤 (b) 的所述 CD83⁺ 成熟树突细胞与 GM-CSF 和 IL-4 或 IL-13 中的至少一种接触。
10. 权利要求 5 的方法,其中使步骤 (a) 中的所述未成熟的树突细胞与 TNF- α 接触。
11. 权利要求 10 的方法,其进一步包括使步骤 (a) 中的所述未成熟的树突细胞与 PGE₂ 接触。
12. 权利要求 5 的方法,其中所述 IFN- γ R 激动剂是 IFN- γ 。
13. 权利要求 5 的方法,其中在 PGE₂ 存在下进一步培养所述 iDCs。
14. 权利要求 5 的方法,其进一步包括使所述未成熟的树突细胞和 / 或 CD83⁺ 成熟树突细胞和 / 或 CD83⁺CCR7⁺ 成熟的树突细胞与选自糖基神经酰胺的化合物接触。
15. 权利要求 5 的方法,其进一步包括使所述未成熟的树突细胞和 / 或 CD83⁺ 成熟树突细胞和 / 或 CD83⁺CCR7⁺ 成熟的树突细胞与化合物接触,所述化合物是半乳糖神经酰胺。
16. 权利要求 15 的方法,其中所述半乳糖神经酰胺是 (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-吡喃型半乳糖基)-2-(N-二十六烷基氨基)-1,3,4-十八烷三醇 (KRN7000)。
17. 权利要求 5 的方法,其进一步包括使所述未成熟的树突细胞和 / 或 CD83⁺ 成熟树突细胞和 / 或 CD83⁺CCR7⁺ 成熟的树突细胞与选自下述的化合物接触:呋喃型半乳糖神经酰胺、吡喃型阿拉伯糖神经酰胺、 α -C-半乳糖神经酰胺和 α -S-半乳糖神经酰胺。

成熟的树突细胞组合物和用于培养其的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及截短的 CD40L 蛋白质和核酸以及用作疫苗和产生成熟的树突细胞的方法。

[0002] 背景

[0003] 细胞疗法利用经修饰的抗原呈递细胞 (APCs) 或免疫效应细胞以起始患者中的免疫应答。抗原呈递细胞对于细胞疗法是重要的,因为它们起始免疫应答。实际上,它们是能够诱导来自 T 淋巴细胞的初次免疫应答的唯一细胞。

[0004] 树突细胞 (DC) 是涉及适应性免疫的最有效的 APCs。它们协调经由幼稚 T 细胞和 B 细胞起始的免疫应答,且诱导抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。DCs 以几种方式特化以在体内致敏 (prime) 辅助和杀伤 T 细胞。例如,准备位于外周组织中的未成熟的 DCs 以捕获抗原且产生免疫原性 MHC- 肽复合物。响应成熟诱导刺激例如炎症性细胞因子,未成熟的 DCs 通过上调粘附和共刺激分子发育成有效的 T 细胞刺激物。同时,它们迁移至次级淋巴器官以选择和刺激稀少的抗原特异性 T 细胞。然而,T 细胞的有效刺激仅在 DC 成熟后发生,这个过程增加细胞表面上的 MHC/ 肽复合物的有效性,除了指导应答性 T 细胞的效应子功能的共刺激分子外。实际上,未成熟的 DCs 在抗肿瘤和其他免疫疗法中可能是有害的,因为它们可以诱导免疫耐受性而不是免疫刺激。

[0005] 共刺激对于 T 细胞一般是必需的,以产生诱导克隆扩充的足够的细胞因子水平。使得其成为有效的抗原呈递细胞的树突细胞的一个特征是它们富含免疫应答的共刺激分子,例如活化 T 淋巴细胞上的分子 CD28 的分子 CD80 和 CD86。作为回报,T 辅助细胞表达连接 DCs 上的 CD40 的 CD40L。DCs 和 T 细胞之间的这些彼此的相互作用导致前者的‘成熟’,和后者中的效应子功能的发展。粘附分子如分子 CD54 或分子 CD11a/CD18 的表达促进树突细胞和 T 细胞之间的合作。树突细胞的另一个特别特征是依赖于其分化阶段采用不同的功能。因此,抗原的捕获及其转化是未成熟的树突细胞的 2 种主要功能,而当树突细胞迁移到组织和淋巴神经节内时,它呈递抗原以刺激 T 细胞的能力增加。这种功能性的改变对应于树突细胞的成熟。因此,未成熟的树突细胞至成熟的树突细胞的推移代表免疫应答的起始中的基础步骤。传统上,这种成熟随后为监控该过程期间 DCs 上的表面标记的改变。树突细胞的不同成熟阶段的一些更重要的细胞表面标记特征概括于下表 I 中。然而,表面标记可以依赖于成熟过程而变。

[0006] 表 I

[0007]

细胞类型	表面标记
造血干细胞	CD34+
单核细胞	CD14++, DR+, CD86+, CD16+/-, CD54+, CD40+
未成熟的树突细胞	CD14+/-, CD16-, CD80+/-, CD83-, CD86+, CD1a+, CD54+, DQ+, DR++
成熟的树突细胞	CD14-, CD83++, CD86++, CD80++, DR+++, DQ++, CD40++, CD54++, CD1a +/-

[0008] 对于免疫疗法成熟的 DCs 目前优于未成熟的 DCs。只有完全成熟的 DC 后代缺乏 GM-CSF 受体 (GM-CSF-R) 且在 GM-CSF 去除后 / 在不存在 GM-CSF 的情况下保持稳定成熟。同样,成熟的 DCs 已显示在体外和体内诱导 T 细胞应答方面是优良的。相比之下,未成熟的 DCs 被报道通过诱导调节性 T 细胞在体外 (Jonuleit 等人 (2000)Exp. Med. 192 :1213) 以及体内 (Dhodapkar 等人 (2001)Exp. Med. 193 :233) 诱导耐受。成熟的树突细胞还用于在体外或体内吸收抗原且将抗原呈递给 T 淋巴细胞。由这些经修饰的 DCs 驯化的修饰的抗原呈递 DCs 和 / 或 T 细胞具有许多应用,包括诊断、治疗、接种疫苗、研究、筛选和基因递送。

[0009] 从外周血中分离成熟的树突细胞是困难的,因为少于 1% 的白细胞属于这个范畴。成熟的 DCs 也难以从组织中提取。这个困难与 DCs 在细胞疗法中潜在的治疗利益组合已驱动朝向新方法的研究和开发,以使用可替代的资源产生成熟的树突细胞。报道了由未成熟的树突细胞产生成熟的 DCs 的几种方法。

[0010] 例如,Jonuleit 等人 (Eur J Immunol (1997)12 :3135-3142) 公开了通过在包含细胞因子混合物 (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 PGE₂) 的培养基中培养使未成熟的人 DCs 成熟。

[0011] W095/28479 公开了用于制备树突细胞的方法,其通过分离外周血细胞且富集 CD34⁺ 血液前体细胞,随后为用造血生长因子和细胞因子的组合扩充实现。

[0012] 欧洲专利公开 EP-A-0922758 公开了由未成熟的树突细胞生产成熟的树突细胞,所述未成熟的树突细胞衍生自具有表达巨噬细胞或树突细胞特征的潜力的多潜能 (pluripotent) 细胞。该方法要求使未成熟的树突细胞与包含 IFN- γ 的树突细胞成熟因子接触。

[0013] 欧洲专利公开 EP-B-0633930 教导了人树突细胞的生产,其通过首先 (i) 用 GM-CSF、(ii) 用 TNF- α 和 IL-3、或 (iii) 用 GM-CSF 和 TNF- α 培养人 CD34⁺ 造血细胞,以诱导 CD1a⁺ 造血细胞的形成实现。

[0014] 专利公开号 2004/0152191 公开了通过使其与 RU 41740 接触使树突细胞成熟。

[0015] 美国专利公开号 2004/0146492 教导了用于生产重组树突细胞的方法,其通过使造血干细胞转化,随后通过在包含 GM-CSF 的培养基中培养使干细胞分化成树突细胞实现。

[0016] 美国专利公开号 2004/0038398 公开了用于由哺乳动物的外周血制备基本上纯化

的 DCs 和单核细胞群体的方法。从哺乳动物中分离髓样细胞,且使 DCs 与这个群体分开以产生分离的单核细胞亚群。DCs 随后通过用抗 CD2 抗体负选择进行富集以去除 T 细胞。

[0017] 尽管成熟的 DCs 在功能上是活性的且因此用于诱导抗原特异性 T 细胞,但并非所有成熟的 DCs 都被最优化以诱导这些应答。已显示一些成熟的 DCs 还可以通过分泌 IL-12 刺激 T 辅助细胞。Macatonia 等人 (1995) Immunol. 154 :5071 ;Ahuja 等人 (1998) Immunol. 161 :868 和 Unintford 等人 (1999) Immunol. 97 :588。IL-12 还已在动物模型中显示增强针对抗原的抗原特异性 CD8+T 细胞应答。Schmidt 等人 (1999) Immunol. 163 :2561。

[0018] Mosca 等人 (2000) Blood 96 :3499 公开了与在仅包含可溶性 CD40L 三聚体的培养基中培养相比较,在包含可溶性 CD40L 三聚体和 IFN γ 1b 的 AIM V 培养基中培养 DC 导致增加的 IL-12 表达。

[0019] Koya 等人 (2003) J. Immunother. 26 (5) :451 报道 IL-12 表达可以通过在 IFN γ 的存在下用编码 CD40 配体的慢病毒载体稳定转导未成熟的 DCs 得到增强。超过 90% 的 CD40L 转导的 DCs 在其细胞表面上表达 CD83。不幸的是,慢病毒转导的细胞不适合于治疗用途,且整合到转导细胞的基因组内的原病毒可以导致白血病。此外,CD40L 的持续表达可能对 APC 功能和生存力具有不利作用。

[0020] Koya 等人的工作补充了 Mackey 等人 (1998) J. Immunol. 161 :2094 的早期工作, Mackey 等人报道在体内 DCs 需要经由 CD40 的成熟以产生抗肿瘤免疫。类似地, Kuniyoshi, J. S. 等人 (1999) Cell Immunol. 193 :48 已显示用可溶性三聚 CD40 配体加上 IFN- γ 处理的 DCs 刺激有效的 T 细胞增殖,且诱导具有增强的抗原特异性裂解的 T 细胞。Kalady, M. F. 等人 (2004) J. SurgRes. 116 :24 报道暴露于同时或顺次加入的不同成熟刺激的人单核细胞衍生的 DCs 显示出,抗原呈递、IL-12 分泌和在这些 DCs 的存在下产生的效应 T 细胞的免疫原性中的变异性,所述 DCs 用编码黑素瘤抗原 MART-1 或流感 M1 基质蛋白的 mRNA 转染。最重要的是,这项研究显示由 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 PGE₂ 组成的‘细胞因子混合物’,随后为细胞外可溶性 CD40L 蛋白质的应用优于同时应用所有试剂。然而,这些作者未研究在顺次过程中 IFN- γ 发信号与瞬时 CD40L 发信号的组合。此外,尽管当 IFN- γ 和 CD40L 伴随加入培养基时产生 IL-12,但近来的现有技术显示所得到的 DCs 实际上是免疫抑制的而不是促炎的 (Hwu 等人 (2000) J. Immunol. 164 :3596 ;Munn 等人 (2002) 297 :1867 ;和 Grohmann 等人 (2003) Trends Immunol. 24 :242),这是由于诱导使色氨酸代谢的酶导致应答者 T 细胞饥饿,所述应答者 T 细胞随后无法增殖。因此,目前的文献暗示 IFN- γ 和 CD40L 的组合应不增加免疫能力。本发明解决了长期以来感到的需要,以提供改善的方法用于 DC 成熟和具有增强的免疫能力的成熟的 DCs。

[0021] 发明概述

[0022] 申请人已发现当未成熟的树突细胞用包含干扰素 γ 受体 (IFN- γ R) 激动剂的第一种信号随后为包含 CD40 激动剂的第二种信号顺次发信号时,有效的免疫刺激发生。DCs 在给予第二种信号时可以是未成熟的或成熟的。

[0023] 在一个实施方案中,本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的方法,其包括下述顺次步骤:(a) 用包含干扰素 γ 受体 (IFN- γ R) 激动剂,和任选地 TNF- α R 激动剂的第一种信号给分离的未成熟的树突细胞 (iDCs) 发信号,以产生发信号的树突细胞;和 (b) 用包含有效量的 CD40 激动剂的第二种瞬时信号给所述发信号的树突细胞发信号,以产生

CCR7⁺ 成熟的树突细胞。

[0024] 在优选实施方案中,未成熟的 DCs 进一步与 PGE₂ 和任选地与 TNF- α 接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括使未成熟的 DCs、发信号的 DCs 和 / 或 CCR7⁺ 成熟的树突细胞与选自下述的化合物接触:半乳糖神经酰胺、糖基神经酰胺、呋喃型半乳糖神经酰胺 (galactofuranosylceramides)、吡喃型阿拉伯糖神经酰胺 (arabinopyranosylceramides)、 α -C-半乳糖神经酰胺和 α -S-半乳糖神经酰胺。优选地,该化合物是半乳糖神经酰胺。最优选地,半乳糖神经酰胺是 (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-吡喃型半乳糖基)-2-(N-二十六烷基氨基)-1,3,4-十八烷三醇 (KRN7000)。

[0025] 在本发明的一些实施方案中,IFN- γ R 激动剂可以由肿瘤坏死因子 α 受体 (TNF- α R) 激动剂替换或与 TNF- α R 激动剂组合使用。例如,在一个实施方案中,本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的富集群体的方法,其包括用包含肿瘤坏死因子 α 受体 (TNF- α R) 激动剂的第一种信号随后为包含 CD40 激动剂的第二种信号给未成熟的树突细胞顺次发信号,从而制备成熟的树突细胞的富集群体,其中所述发信号是在不存在有效量的 IL-1 β 或 IL-6 的情况下的。优选地,未成熟的 DCs 进一步与 PGE₂ 接触。

[0026] 优选的 IFN- γ R 激动剂是哺乳动物 IFN- γ , 优选地人 IFN- γ 及其活性片段。优选的 TNF- α R 激动剂是哺乳动物 TNF- α , 优选地人 TNF- α 及其活性片段。优选的 CD40 激动剂是哺乳动物 CD40 配体 (CD40L), 优选地人 CD40L 及其活性片段和变体,以及针对 CD40 受体的激动性抗体。最优选地,CD40L 激动剂是本文提供的新 CD40L 多肽,由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成或基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成。还提供了编码新 CD40L 多肽的核酸、转染的 DCs 和相关疫苗。

[0027] 发信号可以通过在培养基中提供发信号激动剂、将激动剂引入细胞内、和 / 或在编码激动性多肽的 mRNA 在树突细胞内翻译后起始。该方法可以在体内或先体外后体内进行实践。根据本发明方法先体外后体内成熟的树突细胞随后可以施用于受试者以诱导或增强免疫应答。

[0028] 每个树突细胞可以通过将免疫原施用于 DC 得到进一步修饰。DC 将吸收且加工免疫原,且将其展示在其细胞表面上。免疫原可以在体内或先体外后体内递送。成熟的、培养的 DCs 可以施用于受试者以诱导或增强免疫应答。在另外一个进一步的实施方案中,抗原装载的成熟的 DCs 用于驯化幼稚免疫效应细胞。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了包含体外培养的树突细胞,例如 CD83⁺CCR7⁻ 成熟的 DCs 和 CD83⁺CCR7⁺ 成熟的 DCs 的组合物。与未成熟的树突细胞相比较,本发明成熟的树突细胞表达增加水平的 IL-12,和 / 或表达小于 500pg IL-10/ 百万树突细胞。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明提供了由抗原特异性 T 细胞群体优先诱导 CD28⁺CD45RA⁻ 记忆 / 效应 T 细胞群体的树突细胞。本发明的组合物通过将有效量的群体施用于受试者而用于增加受试者中的免疫应答。

[0031] 本发明进一步提供了由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成、或基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成的重组截短的 CD40L 多肽。在另一个实施方案中,本发明提供了由与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 具有至少 80% 氨基酸同源性的多肽组成、基本上由与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 具有至少 80% 氨基酸同源性的多肽组成的重组 CD40L 多肽。在另一个实施方案中,本发明提供了编码这些截短的 CD40L 多肽的核酸,

以及包含此种核酸的载体、树突细胞和疫苗。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备成熟的树突细胞(DCs)的方法,其包括下述顺次步骤:a)用包含干扰素 γ 受体(IFN- γ R)激动剂,和任选地TNF- γ R激动剂的第一种信号给分离的未成熟的树突细胞(iDCs)发信号,以产生IFN- γ R激动剂发信号的树突细胞;和b)用包含有效量的CD40L多肽的第二种瞬时信号给所述IFN- γ R激动剂发信号的树突细胞发信号,以产生CCR7⁺成熟的树突细胞;其中CD40L多肽基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸残基21-261组成,或是与SEQ ID NO:2的氨基酸残基21-261具有至少80%序列同一性的多肽。优选地,第一种信号包含IFN- γ 、TNF- α 和PGE₂,且步骤(b)包括用编码所述CD40L多肽的RNA转染所述树突细胞

[0033] 序列表简述

[0034] SEQ ID NO:1是人CD40L cDNA。核苷酸40-825表示编码区,包括ATG翻译起始密码子和TGA翻译终止密码子。

[0035] SEQ ID NO:2是关于全长人CD40L蛋白质的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:3是人CD40cDNA。核苷酸67-522表示编码区,包括ATG翻译起始密码子和TAG翻译终止密码子。

[0037] SEQ ID NO:4是关于人CD40(关于CD40L的受体)的氨基酸序列。

[0038] SEQ ID NO:5是人IFN- γ cDNA。核苷酸109-609表示编码区,包括ATG翻译起始密码子和翻译终止密码子。

[0039] SEQ ID NO:6是关于人IFN- γ 的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO:7是人TNF- α cDNA。核苷酸170-971表示编码区,包括ATG翻译起始密码子和TGA翻译终止密码子。

[0041] SEQ ID NO:8是关于人TNF- α 的氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO:9是小鼠CD40L cDNA。核苷酸13-795表示编码区,包括ATG翻译起始密码子和TGA翻译终止密码子。

[0043] SEQ ID NO:10是关于全长小鼠CD40L蛋白质的氨基酸序列。

[0044] SEQ ID NO:11是CD40L5'引物。

[0045] SEQ ID NO:12是CD40L3'引物。

[0046] SEQ ID NO:13是对应于最优化人CD40L mRNA的DNA序列。

[0047] SEQ ID NO:14是CD40受体3'UTR。

[0048] SEQ ID NO:15是人 β -肌动蛋白3'UTR的最终外显子的非翻译区。

[0049] SEQ ID NO:16是人 β -肌动蛋白3'UTR的最小功能元件。

[0050] SEQ ID NO:17是猿猴轮状病毒基因63'UTR。

[0051] SEQ ID NO:18是猿猴轮状病毒基因63'UTR的最小功能元件。

[0052] SEQ ID NO:19是人Hsp705'UTR(HSPA1A)。

[0053] SEQ ID NO:20是小鼠VEGF5'UTR。

[0054] SEQ ID NO:21是小鼠VEGF5'UTR的最小功能元件。

[0055] SEQ ID NO:22是脾脏坏死病毒LTR RU5区。

[0056] SEQ ID NO:23是烟草蚀斑病毒5'前导序列。

[0057] SEQ ID NOs:24-26分别是HLA-A201限制的MART-APL肽、天然肽和PSA-1肽。

[0058] SEQ ID NO:27 是人 α -珠蛋白 3' UTR。

[0059] SEQ ID NO:28 是人 β -珠蛋白 3' UTR。

[0060] SEQ ID NO:29 是人 β -珠蛋白 3' UTR, 减去富含嘌呤的元件 3。

[0061] SEQ ID NO:30 显示在多腺苷酸化之前, 对应于由 Δ XE-met1 质粒转录的 CD40L RNA 的 cDNA 序列。

[0062] SEQ ID NO:31 显示由 SEQ ID NO:30 的 RNA 翻译的 CD40L 多肽的序列, 且等价于 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261。

[0063] SEQ ID NO:32 显示对应于由 CD40L Δ XE+ 轮状病毒基因 63' UTR 质粒转录的 RNA 的 cDNA 序列。

[0064] SEQ ID NO:33 显示对应于由 CD40L Δ XE-met1+ 轮状病毒基因 63' UTR 质粒转录的 RNA 的 cDNA 序列。

[0065] SEQ ID NO:34 显示 pARG CD40L MET1 的序列。CD40L MET1RNA 的 +1 在核苷酸残基 3566 处。CD40L MET1 转录物的 3' 末端在核苷酸残基 4480 处。翻译起始密码子在核苷酸残基 3666-3668 处。

[0066] 附图简述

[0067] 图 1 显示用 IFN- γ 然后可溶性 CD40L 顺次使 DCs 成熟导致最佳的 IL-12p70 分泌。DCs 用细胞因子混合物、单独的可溶性 CD40L、或用可溶性 CD40L 加 IFN- γ 进行成熟。未成熟的 DCs 与 1000U/ml IFN- γ 预温育 18 小时, 随后添加可溶性 CD40L 进行另外 18 小时, 导致最大的 IL-12p70 释放。发觉首先应用可溶性 CD40L, 随后为 IFN- γ 为阴性信号, 具有伴随 IL-10 的最小的 IL-12p70 释放。

[0068] 图 2 显示用编码 CD40L 且具有 >100 个核苷酸的聚腺苷酸尾的 mRNA 转染的 HELA 细胞表达细胞表面蛋白, 如通过用抗 CD40L (CD154) 抗体的 FACS 分析定义的。

[0069] 图 3 显示来自 CD40L mRNA 转染的细胞的 IL-12p70 分泌与转染有效负载的大小成比例。DCs 用 CD40L mRNA 的滴定随后立即通过添加 1000U/ml IFN- γ 进行转染。IL-12p70 的显著水平使用 2 μ g-4 μ g CD40L mRNA/ 百万 DCs 得到释放。

[0070] 图 4 显示 IFN- γ 浓度对通过用 4 μ g CD40L mRNA/ 百万细胞转染, 随后立即与指示量的 IFN- γ 温育的 DCs 的 IL-12 和 IL-10 分泌的作用。IL-12p70 和 IL-10 在 24 小时后在培养上清液中进行测量。约 100U/ml 以及更高浓度的 IFN- γ 与 CD40L mRNA 有效负载协同以诱导最大的 IL-12p70 分泌。

[0071] 图 5A 显示由 CD40L/IFN- γ 诱导的 IL-12p70 分泌在 DCs 转染和在 IFN- γ 的存在下培养后 20 小时和 24 小时时间点上发生。DCs 用 4 μ g CD40L mRNA/ 百万细胞进行转染, 且立即与 1000U/ml IFN- γ 一起培养。上清液在指定时间由复制培养物进行收集, 且就 IL-12p70 和 IL-10 含量进行测定。

[0072] 图 5B 显示给 CD40L mRNA 转染的 DCs 添加 TNF- α 导致产生 IL-12p70, 但表达水平小于用 IFN- γ 作为共成熟试剂达到的那种。

[0073] 图 5C 显示与使用 IFN- γ 比较, 使用 TNF- α 作为共成熟因子也导致升高水平的 IL-10。

[0074] 图 6A-C 显示如通过用抗 CD40L (CD154) 抗体的 FACS 分析定义的, 用编码 CD40L 的 mRNA 转染的 DCs 证实细胞表达。DCs 用 4 μ g CD40L mRNA/ 百万细胞进行转染, 且在各个时

间点上进行分析。图 6A 显示如通过其中表面表达显著更低的 4 小时时间点证实的,大多数 CD40L 位于细胞内区室内。图 6B 显示显著的细胞内表达在 60 分钟时是明显的,具有 27% 的阳性 DCs 且在 3 小时前增至 79%。图 6C 显示用 CD40L 编码 mRNA 转染 DC 后 CD40L 蛋白质的瞬时表达。

[0075] 图 7 显示尽管存在过量封闭抗 CD40L 抗体,用 CD40L mRNA 转染且在 IFN- γ 的存在下培养的 DCs 分泌 IL-12p70,指出 CD40/CD40L 相互作用在“细胞内”区室内起作用。DCs 用 4 μ g CD40L mRNA 进行转染,且立即在 10 或 50 μ g/ml 封闭抗 CD40L 抗体的存在下与 1000U/ml IFN- γ 一起培养。IL-12p70 释放减少仅 50%,指出细胞内发信号而不是细胞间发信号是用于诱导 IL-12p70 的主要途径。

[0076] 图 8 显示用 CD40L mRNA 转染且与 IFN- γ 一起共培养的 DCs 要求 PGE₂ 的存在,以使得趋化因子依赖性迁移成为可能。DCs 用 CD40L

[0077] mRNA 的滴定进行转染,且立即与 1000U/ml IFN- γ 和 1 μ g/mL PGE₂ 一起温育。用 eGFP 转染且用包含 PGE₂ 的细胞因子混合物成熟的 DCs 表示阳性对照。成熟 18 小时后,来自每种培养条件的 DCs 在“transwell”迁移测定中针对淋巴结归巢趋化因子——CCL19 和 21 进行测试。DC 迁移与 CD40L mRNA 有效负载的大小成比例。

[0078] 图 9 显示当与在“细胞因子混合物”的存在下成熟的 DCs 比较时,经由用 CD40L mRNA 转染且在 IFN- γ 和 PGE₂ 的存在下培养成熟的 DCs 引起有效的 T 细胞“回忆应答”。DCs 用 2 μ g flu M1 mRNA/百万细胞作为抗原有效负载和 4 μ g eGFP mRNA 对照进行共转染,且随后用细胞因子混合物进行成熟。可替代地,DCs 用 2 μ g flu M1 mRNA/百万细胞作为抗原有效负载,和 4 μ g CD40L mRNA 作为成熟有效负载进行共转染。这些后面的细胞立即在 1000U/ml IFN- γ 和 1 μ g/ml PGE₂ 中进行培养以完成成熟过程。在 24 小时后,如通过应答性 T 细胞分泌 IFN- γ 的频率测定的,每个 DC 群体在 ELISpot 测定中用于招募抗 flu M1 回忆应答。通过在 IFN- γ 和 PGE₂ 的存在下用 CD40L mRNA 转染成熟的 DCs 引起更有效的抗 flu 应答。

[0079] 图 10 显示当与在“细胞因子混合物”的存在下成熟的 DCs 比较时,经由用 CD40L mRNA 转染且在 IFN- γ 和 PGE₂ 的存在下培养成熟的 DCs 引起更有效的“初次 T 细胞应答”。DCs 用 2 μ g MART-APL mRNA/百万细胞作为抗原有效负载进行转染,且随后用细胞因子混合物进行成熟。可替代地,DCs 用 2 μ g MART-APL mRNA/百万细胞作为抗原有效负载,和 4 μ g CD40L mRNA 作为成熟有效负载进行共转染。这些后面的细胞立即在 1000U/ml IFN- γ 和 1 μ g/ml PGE₂ 中进行培养以完成成熟过程。在 24 小时后,每个 DC 群体用于产生针对 MART-APL 肽序列的 T 细胞应答,所述 MART-APL 肽序列由转染的 MART-APL mRNA 有效负载产生,通过在 0.2U/ml IL-2 的存在下自身幼稚 CD8+T 细胞共培养 7 天。在这种第一轮刺激后,收获 T 细胞且在 IL-2ELISpot 测定中确立,并且用适当成熟的、抗原负载的 DCs 进行再刺激。如通过应答者 CD8+T 细胞分泌 IL-2 的频率测定的,通过在 IFN- γ 和 PGE₂ 的存在下用 CD40L mRNA 转染成熟的 DCs 引起更有效的抗 MART-APL 应答。

[0080] 图 11 显示通过表达 MART-APL mRNA 的 DCs 诱导细胞毒性 T 细胞。图 11a 显示添加可溶性干扰素- γ /PGE₂,使用与作为抗原来源的 MART-APL mRNA 和 CD40L mRNA 一起共转染的 DCs 成熟引起有效的 CTL 应答,而图 11b 显示用 MART-APL mRNA 转染,但用‘细胞因子混合物’成熟的 DCs 则不是。T2-PSA:用作为阴性对照靶的来自前列腺特异性抗原 (PSA) 的

HLA-A2 限制肽脉冲的 T2 细胞。MART-T2 :用以其天然序列的 HLA-A2 限制 MART 表位脉冲的 T2 细胞。MART-APL-T2 :用作为优选的‘改变的肽配体’的 HLA-A2 限制 MART 表位脉冲的 T2 细胞。

[0081] 图 12 显示在 transwell 测定中 PME-CD40L 成熟的 DCs 对淋巴趋化因子 CCL19 和 21 的迁移能力。4 种独立的健康供体进行平行测试,其中每种 DC 制剂用 1 μ g 扩增的总 RCC 肿瘤 RNA,连同 4 μ g CD40L RNA/百万 DCs 进行转染。迁移测定在用 mRNA 有效负载转染后 24 小时建立。

[0082] 图 13 显示来自健康供体针对黑素瘤相关抗原 MART-1 的 CTL 应答的诱导。制备 DCs 且装载 MART-1RNA 并且经由‘CD40L 基础过程’进行成熟,或使用 PME-CD40L 过程制备 DCs。DCs 和纯化的 CD8T 细胞以 1:10 的比进行共培养,经历在 IL-2 的存在下的 3 轮刺激。数据显示使用 MART-1 肽脉冲的 T2 靶细胞在一系列效应物-靶比率的 ^{51}Cr 释放细胞毒性测定。

[0083] 图 14 显示针对装载总扩增的 RCC 肿瘤 RNA 的 DCs、PME-CD40L 成熟的 DCs 的完全自身 CTL 应答的诱导。DCs 和纯化的 CD8T 细胞以 1:10 的比进行共培养,经历在 IL-2 的存在下的 3 轮刺激。在最后一次刺激后 5 天,CD8T 细胞用由下述转染的 DCs 进行再刺激:总扩增的 RCC RNA、hTERTRNA、存活蛋白 RNA、G250 RNA 或由 eGFP RNA 转染的阴性对照 DCs。数据通过对于活化标记 CD69 的细胞表面染色,以及细胞内 IFN- γ 和 IL-2 的同时检测由鉴定应答者 T 细胞获得。细胞内细胞因子应答进行再分,以鉴定来自 IFN- γ /IL-2 双重阳性(记忆 T 细胞)的 IFN- γ 单个阳性(效应 T 细胞)。

[0084] 图 15 显示通过用 KRN7000 或载体脉冲的,MART-1RNA 转染的 CD40L 基础过程成熟的 DCs 扩增 NKT 细胞(a)和 MART-1 反应性 CTLs(b)。数据明确显示如通过 CD1d/KRN7000 四聚体染色定义的,KRN7000 脉冲的 DC 可以扩增 NKT 细胞,和如通过用 MART-1/HLA-A2 四聚体的四聚体染色定义的,NKT 细胞的扩增群体的存在可以增加原代 CTLs 对 MART-1 的伴随招募。

[0085] 图 16 显示人(SEQ ID NO:1)和小鼠(SEQ ID NO:9)CD40L cDNAs 的比对。图 16A、16B 和 16C 表示 SEQ ID NO:1 和 2 的比对的 3 个连续页。

[0086] 图 17 显示人(SEQ ID NO:2)和小鼠(SEQ ID NO:10)CD40L 蛋白质的比对。

[0087] 图 18 显示通过使用 mMessage mMachine T7 Ultra 试剂盒(Ambion)在 100 μ g 规模(Delta X-E1)或 1mg 规模(Delta X-E2)转录反应中用由 pCR2.1 CD40L WT Delta X-E 质粒转录的 mRNA 转染的 DC 的 IL-12 表达水平。参考 RNA 由质粒 pCR2.1 CD40L WT 进行转录。转录的 CD40L RNAs 通过使用 Poly(A)Plus Kit(Epicentre)添加聚腺苷酸尾进行修饰。将 RNAs 转染到 DCs 内。转染后约 20 小时,IL-12 的量使用 Elisa 在成熟的 DCs 的上清液中进行测量。阴性对照:在不用任何 CD40L RNA 电穿孔的 DCs 的上清液中测量的 IL-12 表达。

[0088] 图 19 显示在用各种 RNA 构建体转染的 DC 培养物的上清液中的 IL-12 水平。为了评估各种 5' UTR 序列对 CD40L 蛋白质表达和 IL-12 细胞因子诱导的影响,使用 mMessage mMachine T7 Ultra 转录试剂盒由质粒 pCR2.1CD40L WT、pCR2.1 CD40L Δ XE 和 pCR2.1 CD40L+5UTR 产生 3 种 RNAs。转录的 RNAs 使用 RNeasy 试剂盒(Qiagen)进行多腺苷酸化和纯化。将纯化的 RNAs 转染到成熟的 DCs 内。在 DC 培养中的 IL-12 细胞因子诱导通过 ELISA 在收集的上清液中进行测量。

[0089] 图 20 显示体外翻译的 [³⁵S]- 甲硫氨酸标记的 CD40L 蛋白质的 SDS-PAGE 分离, 所述 CD40L 蛋白质衍生自包含各种 5' UTRs 的 RNAs。

[0090] 图 21 显示由 mRNAs 体外翻译的 [³⁵S]- 甲硫氨酸标记的 CD40L 蛋白质的 SDS-PAGE 分离, 所述 mRNAs 包含正常和突变的起始密码子。

[0091] 图 22 显示用各种 CD40L RNAs 转染且用抗 CD154 (CD40L) 抗体染色的树突细胞。左图: 4 小时后 CD40L 阳性细胞的百分比。右图: CD40L 染色的平均荧光强度。CD40L WT, 原始 RNA 构建体, 充当阳性对照。GFP RNA 转染的细胞充当阴性对照。

[0092] 图 23 显示在用各种 CD40L RNAs 转染的 DC 中的 IL-10 和 IL-12 表达概况。

[0093] 图 24 显示衍生自各种 CD40L mRNAs 的体外翻译产物的同工型。这个图中的表格显示由用这些 CD40L mRNAs 转染的树突细胞表达的 IL-12 细胞因子的量。

[0094] 图 25 显示通过用指示的经修饰的 CD40L RNAs 转染的树突细胞的 IL-10 和 IL-12 分泌。

[0095] 图 26 显示由指示的 CD40L RNAs 产生的 CD40L 多肽的翻译产物的 SDS-PAGE 分离。

[0096] 图 27 显示通过用指示的经修饰的 CD40L RNAs 转染的树突细胞的 IL-10 和 IL-12 分泌水平。

[0097] 图 28 显示在与用 PME-CD40L 过程产生的 DC 共培养第 10 天时 Mart-1 反应性 CTL 增加的百分比, 这与其他产生 DC 的方法比较, 例如用 CD40LRNA 和 Mart-1RNA 电穿孔且与 IFN- γ 和 PGE₂ (CD40L) 培养 4 小时的 DC, 或用细胞因子 (TNF α 、IFN- γ 和 PGE₂) 过夜成熟随后用 Mart-1 RNA 电穿孔且培养 4 小时 (TIP) 的 DC, 或用 MART-1 RNA 电穿孔且与细胞因子混合物 (IL-6、IL-1 β 、TNF α 、IFN γ 、PGE₂) 共培养 4 小时 (细胞因子) 的未成熟的 DC。

[0098] 图 29 显示在与 DCs 共培养的 MART-1CTL 中的 CD28 受体表达的时间过程, 所述 DCs 通过 PME-CD40L 过程、TIP 过程、CD40L 基础过程或细胞因子混合物过程制备。

[0099] 图 30 显示与其他产生成熟的 DCs 的方法形成对比, PME-CD40L 产生的 DC 能够致敏保留生产 IL-2 和 IFN- γ 的能力的 MART-1 特异性 CTL。

[0100] 图 31 显示作为由 Mart-1CTL 生产的细胞因子总体水平测量的 IFN- γ 阳性 CTL 的平均荧光强度 (MFI)。

[0101] 图 32 显示来自 Om1A 或 Om1A rot 6 RNAs 的体外翻译产物的蛋白质印迹分析。M: 蛋白质标记, 泳道 1: 来自 Om1A RNA 的翻译产物, 泳道 2: 来自 Om1A rot6 RNA 的翻译产物, 泳道 C: 不含任何 RNA 模板的对照反应。

[0102] 图 33 显示 S-35 标记的 Om1A 或 Om1A Rot 6 的体外翻译研究。泳道 1: 衍生自编码 Om1A 的 RNA 的产物, 泳道 2: 衍生自 Om1A Rot 6 的产物。泳道 C: 包含 RNA 模板的对照反应。20ng 或 40ng 总蛋白质如所示的在 SDS-PAGE 上分离。

[0103] 图 34 上图: 用抗 Tryp-2 抗体染色的百分比阳性细胞。下图: 用 Tryp-2 抗体染色的细胞的染色强度。

[0104] 图 35 显示在 IL-4RNA 中的轮状病毒基因 6 3' UTR 序列对百分比阳性细胞 (小图 A)、细胞内染色强度 (小图 B) 和 IL-4 细胞因子分泌 (小图 C) 的作用。

[0105] 图 36 显示在 IL-4RNA 中的轮状病毒基因 6 3' UTR 序列对百分比阳性细胞 (小图 A)、细胞内染色强度 (小图 B) 和通过 ELISA 测量的 IL-4 细胞因子分泌 (小图 C) 的作用。

[0106] 用于执行本发明的方式

[0107] 在本公开内容自始至终,各种出版物、专利和公开的专利说明书通过鉴定引用进行参考。这些出版物、专利和公开的专利说明书的公开内容通过引用到本公开内容内在此特别引入,以更充分地描述本发明所属领域的状态。

[0108] 除非另有说明,本发明的实践使用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述常规技术在本领域技术内。此种技术在参考文献中得到充分说明。这些方法在下述出版物中得到描述。参见,例如, Sambrook 等人 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第 2 版 (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel 等人编辑 (1987)); 系列 METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson 等人 IRL Press at Oxford University Press (1991)); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (MacPherson, Hames 和 Taylor 编辑 (1995)); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow 和 Lane 编辑 (1988)); USING ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow 和 Lane 编辑 (1999)); 和 ANIMAL CELL CULTURE (Freshney 编辑 (1987))。

[0109] 定义

[0110] 如说明书和权利要求中使用的,单数形式“一个 (a)”、“一种 (an)”和“该 (the)”包括复数参考,除非上下文明确指出并非如此。例如,术语“一个细胞 (a cell)”包括多个细胞,包括其混合物。

[0111] 如本文所使用的,术语“包含”意指组合物和方法包括所述要素,但不排除其他要素。“基本上由……组成”当用于定义组合物和方法时,应意欲排除对组合具有任何基本显著性的其他要素。因此,如本文所定义的,基本上由要素组成的组合物将不排除来自分离和纯化法的痕量污染物和药学上可接受的载体,例如磷酸缓冲盐水、防腐剂等。“基本上由给定氨基酸序列组成”的多肽或蛋白质在本文中定义为,在蛋白质或多肽的氨基末端和羧基末端的任一个或两者上包含不超过 3 个、优选不超过 2 个、和最优选不超过 1 个、或无另外氨基酸。例如,基本上由序列 X 组成的多肽将包括但不限于, NNNXNNN; NNNX; XN; X 等,其中 N 是任何氨基酸。“基本上由给定核酸序列组成”的核酸或多核苷酸在本文中定义为,在核酸序列的 5' 末端和 3' 末端的任一或两者上包含不超过 10、9、8、7, 优选不超过 6、5、4, 更优选不超过 3、2, 和最优选不超过 1 个、或无另外核苷酸。“由……组成”应意欲不只是排除其他成分和用于施用本发明的组合物的基本方法步骤的痕量要素。由各个这些转变术语定义的实施方案在本发明的范围内。

[0112] 所有数字指定,例如, pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围是以 0.1 的增量改变 (+) 或 (-) 的近似值。应当理解,尽管不总是明确陈述,本文描述的试剂仅是示例性的,且此种等价物是本领域已知的。

[0113] 术语“抗原”是本领域众所周知的,并且包括免疫原性的物质,即免疫原。应当理解任何抗原的使用设想用于在本发明中使用,且因此包括但不限于自身抗原(无论是正常还是疾病相关的)、传染性抗原(例如,微生物抗原、病毒抗原等)、或一些其他外来抗原(例如,食物组分、花粉等)。术语“抗原”或可替代地“免疫原”应用于超过一种免疫原的集合,从而使得针对多种免疫原的免疫应答可以同时进行调节。此外,该术语包括多种免疫原或抗原的不同制剂中的任何一种。

[0114] “天然”或“自然”或“野生型”抗原是包含表位的多肽、蛋白质或片段,其已从天然

生物来源中分离,且可以与抗原受体特异性结合,当在受试者中呈递为 MHC/ 肽复合物,特别是 T 细胞抗原受体 (TCR) 时。

[0115] 术语“肿瘤相关抗原”或“TAA”指与肿瘤相关的抗原。众所周知的 TAA 的例子包括 gp100、MART 和 MAGE。

[0116] 术语“主要组织相容性复合物”或“MHC”指编码细胞表面分子的基因的复合物,其是对 T 细胞的抗原呈递和快速的移植物排斥所需的。在人中, MHC 也称为“人白细胞抗原”或“HLA”复合物。由 MHC 编码的蛋白质称为“MHC 分子”且分类成 I 类和 II 类 MHC 分子。I 类 MHC 分子包括由与 $\beta 2$ -微球蛋白非共价连接的 MHC 中编码的 α 链组成的膜异二聚蛋白质。I 类 MHC 分子由几乎所有的具核细胞表达且已显示在对 $CD8^+$ T 细胞的抗原呈递中起作用。I 类分子包括在人中的 HLA-A、B 和 C。II 类 MHC 分子还包括由非共价结合的 α 和 β 链组成的膜异二聚蛋白质。II 类 MHC 分子已知在 $CD4^+$ T 细胞中起作用,并且在人包括 HLA-DP、-DQ 和 -DR。

[0117] 术语“抗原呈递细胞 (APCs)”指这样的细胞类别,其能够以可由免疫系统的特定效应细胞识别的肽-MHC 复合物形式呈递一种或多种抗原,且从而诱导针对被呈递的一种或多种抗原的有效的细胞免疫应答。APCs 可以是完整的全细胞例如巨噬细胞、B 细胞、内皮细胞、活化的 T 细胞和树突细胞;或天然存在的或合成的其他分子,例如与 $\beta 2$ -微球蛋白复合的纯化的 MHC I 类分子。尽管许多类型的细胞可能能够在其细胞表面上呈递抗原用于 T 细胞识别,但只有树突细胞具有以有效量呈递抗原以活化幼稚 T 细胞用于细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答的能力。

[0118] 术语“树突细胞 (DCs)”指在多种淋巴和非淋巴组织中发现的形态学类似的细胞类型的不同群体,Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9 :271-296。树突细胞构成生物中最有效和优选的 APCs。尽管树突细胞可以由单核细胞和 $CD34^+$ 细胞分化,但它们具有不同的表型。例如,特定分化标记 CD14 抗原在树突细胞中未发现但由单核细胞拥有。同样,成熟的树突细胞不是吞噬性的,而单核细胞是强吞噬细胞。已显示成熟的 DCs 可以提供 T 细胞活化和增殖所需的所有信号。

[0119] 术语“免疫效应细胞”指能够结合抗原且介导免疫应答的细胞。这些细胞包括但不限于, T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs),例如 CTL 系, CTL 克隆,和来自肿瘤、炎症或其他浸润的 CTLs。

[0120] “幼稚”免疫效应细胞是从未暴露于能够活化那种细胞的抗原的免疫效应细胞。幼稚免疫效应细胞的活化需要肽:MHC 复合物的识别和经由专职 APC 同时递送共刺激信号,以增殖且分化成抗原特异性装备的效应 T 细胞。

[0121] “免疫应答”泛指淋巴细胞针对外来物质的抗原特异性应答。可以引起免疫应答的任何物质被说成是“免疫原性的”且称为“免疫原”。所有免疫原都是抗原,但是,并非所有抗原都是免疫原性的。本发明的免疫应答可以是体液(经由抗体活性)或细胞介导的(经由 T 细胞活化)。

[0122] 如本文所使用的,术语“驯化的、抗原特异性免疫效应细胞”是如上文定义的免疫效应细胞,其先前已遇到抗原。与其幼稚配对物形成对比,驯化的、抗原特异性免疫效应细胞的活化不需要共刺激信号。肽:MHC 复合物的识别是足够的。

[0123] “活化的”当关于 T 细胞使用时,暗示细胞不再在 G_0 期中,且开始产生一种或多种

细胞毒素、细胞因子和细胞类型（例如，CD8⁺ 或 CD4⁺）特有的其他相关的膜相关蛋白，且能够识别并结合在其表面上展示特定的肽/MHC 复合物的任何靶细胞，且释放其效应分子。

[0124] 如本文所使用的，术语“在受试者中诱导免疫应答”是本领域理解的术语，且指相对于在抗原（或表位）引入受试者内前的免疫应答（如果存在），在针对抗原（或表位）的免疫应答中至少约 2 倍、或可替代地至少约 5 倍、或可替代地至少约 10 倍、或可替代地至少约 100 倍、或可替代地至少约 500 倍、或可替代地至少约 1000 倍或更多的增加，所述免疫应答可以在抗原（或表位）引入受试者内后进行检测或测量。针对抗原（或表位）的免疫应答包括但不限于，抗原特异性（或表位特异性）抗体的产生，和在其表面上表达与抗原（或表位）特异性结合的分子的免疫细胞的产生。测定针对给定抗原（或表位）的免疫应答是否已诱导的方法是本领域众所周知的。例如，抗原特异性抗体可以使用本领域已知的多种免疫测定中的任何一种进行检测，包括但不限于 ELISA，其中例如样品中的抗体与固定化抗原（或表位）的结合用可检测标记的第二种抗体（例如，酶标记的小鼠抗人 Ig 抗体）进行检测。

[0125] “共刺激分子”涉及在抗原呈递细胞和 T 细胞表面上表达的受体-配体对之间的相互作用。在过去几年中累积的研究已有说服力地证实静息 T 细胞需要至少 2 种信号用于诱导细胞因子基因表达和增殖 (Schwartz, R. H. (1990) *Science* 248 :1349-1356 和 Jenkins, M. K. (1992) *Immunol. Today* 13 :69-73)。赋予特异性的一种信号可以通过 TCR/CD3 复合物与合适的 MHC/肽复合物的相互作用而产生。第二种信号不是抗原特异性的且称为“共刺激”信号。这种信号最初定义为由骨髓衍生的佐细胞如巨噬细胞和树突细胞，所谓的“专职”APCs 提供的活性。几种分子已显示增强共刺激活性。这些是耐热抗原 (HSA) (Liu, Y. 等人 (1992) *3. Exp. Med.* 175 :437-445)、硫酸软骨素修饰的 MHC 不变链 (Ii-CS) (Naujokas, M. F. 等人 (1993) *Cell* 74 :257-268)、细胞内粘附分子 1 (ICAM-1) (Van Seventer, G. A. (1990) *Immunol.* 144 :4579-4586)、B7-1 和 B7-2/B70 (Schwartz, R. H. (1992) *Cell* 71 :1065-1068)。这些分子各自似乎通过与其在 T 细胞上的同源配体相互作用来辅助共刺激。共刺激分子介导共刺激信号，所述共刺激信号在正常生理条件下是必需的，以达到幼稚 T 细胞的完全活化。1 个示例性受体-配体对是 APC 表面上的共刺激分子的 B7 家族及其在 T 细胞上的反受体 CD28 或 CTLA-4 (Freeman 等人 (1993) *Science* 262 :909-911 ;Young 等人 (1992) *Clin. Invest.* 90 :229 和 Nabavi 等人 (1992) *Nature* 360 :266-268)。其他重要的共刺激分子是 CD40 和 CD54。术语“共刺激分子”包含任何单个分子或分子组合，所述分子当连同由 T 细胞表面上的 TCR 结合的 MHC/肽复合物一起发挥作用时，提供达到结合肽的 T 细胞活化的共刺激效应。该术语因此包含在抗原呈递基质例如 APC 上的 B7、或其他共刺激分子、其片段（单独、与另一种分子复合、或作为融合蛋白的部分），其连同 MHC 复合物与同源配体结合且导致 T 细胞活化，当 T 细胞表面上的 TCR 特异性结合肽时。尽管不总是明确陈述，但它意指具有与野生型或纯化的共刺激分子（例如，重组产生的或其突变蛋白）相似的生物活性的分子意欲在本发明的精神和范围内使用。

[0126] 如本文所使用的，术语“细胞因子”指对细胞发挥多种效应例如诱导生长或增殖的众多因子中的任何一种。可以在本发明的实践中单独或组合使用的细胞因子的非限制性例子包括，白细胞介素 -2 (IL-2)、干细胞因子 (SCF)、白细胞介素 -3 (IL-3)、白细胞介素 -6 (IL-6)、白细胞介素 -12 (IL-12)、G-CSF、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF)、

白细胞介素-1 α (IL-1 α)、白细胞介素-1L(IL-11)、MIP-11、白血病抑制因子 (LIF)、c-kit 配体、血小板生成素 (TPO) 和 flt3 配体。本发明的一个实施方案包括其中有效量的 IL-1 β 和 / 或 IL-6 从培养基中排除的培养条件。细胞因子是从几个厂商商购可得的, 例如 Genzyme (Framingham, MA)、Genentech (South San Francisco, CA)、Amgen (Thousand Oaks, CA)、R&D Systems (Minneapolis, MN) 和 Immunex (Seattle, WA)。尽管不总是明确陈述, 但它意指具有与野生型或纯化的共刺激分子 (例如, 重组产生的或其突变蛋白) 相似的生物活性的分子意欲在本发明的精神和范围内使用。

[0127] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”可互换使用以指聚合形式的任何长度的核苷酸。多核苷酸可以包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和 / 或其类似物。核苷酸可以具有任何三维结构, 且可以执行已知或未知的任何功能。术语“多核苷酸”包括, 例如单链、双链和三股螺旋分子、基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针和引物。除了天然核酸分子外, 本发明的核酸分子还可以包含经修饰的核酸分子。如本文所使用的, mRNA 指可以在树突细胞中翻译的 RNA。此种 mRNAs 一般是加帽的且具有核糖体结合位点 (Kozak 序列) 和翻译起始密码子。

[0128] 术语“肽”以其最广泛的含义使用以指 2 个或更多亚单位氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物 (peptidomimetics) 的化合物。这些亚单位可以通过肽键连接。在另一个实施方案中, 亚单位可以通过其他键例如酯、醚等连接。如本文所使用的, 术语“氨基酸”指天然和 / 或非天然或合成氨基酸, 包括甘氨酸以及 D 和 L 光学异构体、氨基酸类似物和肽模拟物。如果肽链短, 那么 3 个或更多氨基酸的肽通常称为寡肽。如果肽链长, 那么肽通常称为多肽或蛋白质。

[0129] 术语“基因改造”意欲包含和 / 或表达外来基因或核酸序列, 其依次修饰细胞或其后代的基因型或表型。换言之, 它指对细胞的内源核苷酸的任何添加、缺失或破坏。

[0130] 如本文所使用的, “表达”指多核苷酸通过其转录成 mRNA 且 mRNA 翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸衍生自合适的真核生物宿主的基因组 DNA, 那么表达可以包括 mRNA 的剪接。表达所需的调节元件包括启动子序列以结合 RNA 聚合酶和转录起始序列用于核糖体结合。例如, 细菌表达载体包括启动子例如 lac 启动子以及 Shine-Dalgarno 序列和起始密码子 AUG 用于转录起始 (Sambrook 等人 (1989) 同上)。类似地, 真核生物表达载体包括用于 RNA 聚合酶 II 的异源或同源启动子、下游多腺苷酸化信号、起始密码子 AUG、和用于核糖体脱离的终止密码子。此种载体可以商购获得或通过本领域已知的方法中描述的序列装配, 例如本文下文用于构建一般的载体的方法。

[0131] “在转录控制下”是本领域理解的术语, 且指示多核苷酸序列通常 DNA 序列的转录, 依赖于其与促成转录起始或促进转录的元件可操作地连接。“可操作地连接”指其中元件以允许其起作用的排列的并列。

[0132] “基因递送载体”被定义为可以携带插入的多核苷酸进入宿主细胞内的任何分子。基因递送载体的例子是脂质体, 生物相容性聚合物, 包括天然聚合物和合成聚合物; 脂蛋白; 多肽; 多糖; 脂多糖; 人工病毒包膜; 金属颗粒; 和细菌或病毒, 例如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒, 噬菌体, 粘粒, 质粒, 真菌载体和一般在本领域使用的其他重组载体, 其已描述用于在多种真核和原核宿主中表达, 且可以用于基因疗法以及单种蛋白质表达。

[0133] 如本文所使用的,“基因递送”、“基因转移”、“转染”等是指外源多核苷酸引入宿主细胞内的术语,与用于引入的方法无关。转染指任何核酸递送至细胞的内部。基因递送指可以整合到宿主细胞的基因组内,或可以独立于宿主细胞基因组复制的核酸的递送。基因递送或基因转移不指 mRNA 引入细胞内。转染方法包括多种技术如电穿孔、基于蛋白质、基于脂质和基于阳离子的核酸递送复合物、病毒载体、“基因枪”递送和本领域技术人员已知的各种其他技术。引入的多核苷酸可以稳定维持在宿主细胞中或可以瞬时表达。在优选实施方案中,mRNA 引入 DC 内且瞬时表达。稳定维持一般要求引入的多核苷酸包含与宿主细胞相容的复制起点,或者整合到宿主细胞的复制子例如染色体外复制子(例如,质粒)或核或线粒体染色体内。如本领域已知和本文描述的,许多载体能够介导基因至哺乳动物细胞的转移。

[0134] “病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒颗粒,其包含在体内、先体外后体内或体外待递送到宿主细胞内的多核苷酸。病毒载体的例子包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、甲病毒载体等。甲病毒载体例如基于塞姆利基森林病毒的载体和基于新培斯病毒的载体,已开发用于在基因疗法和免疫疗法中使用。参见, Schlessinger 和 Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5 :434-439 和 Zaks 等人 (1999) Nat. Med. 7 : 823-827。在其中基因转移由逆转录病毒载体介导的方面,载体构建体指包含逆转录病毒基因组或其部分和治疗基因的多核苷酸。如本文所使用的,“逆转录病毒介导的基因转移”或“逆转录病毒转导”具有相同含义,且指基因或核酸序列通过其稳定转移到宿主细胞内的过程,其由于病毒进入细胞且将其基因组整合到宿主细胞基因组内实现。病毒可以经由其正常感染机制进入宿主细胞,或这样修饰从而使得它与不同的宿主细胞表面受体或配体结合以进入细胞。如本文所使用的,“逆转录病毒载体”指通过病毒或病毒样进入机制能够将外源核酸引入细胞内的病毒颗粒。

[0135] 逆转录病毒以 RNA 形式携带其遗传信息;然而,一旦病毒感染细胞, RNA 就逆转录成整合入受感染细胞的基因组 DNA 内的 DNA 形式。整合的 DNA 形式称为原病毒。

[0136] 在其中基因转移由 DNA 病毒载体例如腺病毒 (Ad)、假腺病毒 (pseudoadenoviral) 或腺伴随病毒 (AAV) 介导的方面,载体构建体指包含病毒基因组或其部分和转基因的多核苷酸。腺病毒 (Ads) 是相对充分表征的、病毒的同质组,包括超过 50 个血清型。(参见,例如 W095/27071)。Ads 易于生长且不需要整合入宿主细胞基因组内。重组 Ad 衍生的载体,特别是减少关于野生型病毒重组和产生的潜力的那些已被构建。(参见, W0 95/00655 和 W0 95/11984)。野生型 AAV 具有整合入宿主细胞基因组内的高感染性和特异性。(参见, Hermonat 和 Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6466-6470 和 Lebkowski 等人 (1988) Mol. Cell. Biol. 8 :3988-3996)。

[0137] 包含启动子和多核苷酸可以可操作地连接到其内的克隆位点的载体是本领域已知的。此种载体能够在体外或体内转录 RNA,且从诸如 Stratagene (La Jolla, CA) 和 Promega Biotech (Madison, WI) 的来源商购可得。为了最优化表达和 / 或体外转录,可能必须去除、添加或改变克隆的 5' 和 / 或 3' 非翻译部分,以消除另外的、潜在在不合适的可变翻译起始密码子或可能在转录或翻译水平上干扰或减少表达的其他序列。可替代地,共有核糖体结合位点可以紧插入起始密码子的 5' 以增强表达。

[0138] 基因递送载体还包括几种非病毒载体,包括 DNA/ 脂质体复合物,和靶向的病毒蛋

白质-DNA 复合物。还包含靶向抗体或其片段的脂质体可以在本发明的方法中使用。为了增强至细胞的递送,本发明的核酸或蛋白质可以与结合细胞表面抗原例如 TCR、CD3 或 CD4 的抗体或其结合片段缀合。

[0139] “杂交”指其中一种或多种多核苷酸反应以形成复合物的反应,所述复合物经由核苷酸残基的碱基之间的氢键合得到稳定化。氢键合可以通过沃森-克里克碱基配对、Hoogsteen 结合、或以任何其他序列特异性方式发生。复合物可以包含形成双链体结构的 2 条链、形成多链复合物的 3 条链或更多条链、单条自身杂交链、或这些的任何组合。杂交反应可以构成更广泛过程中的步骤,例如 PCR 反应的起始、或多核苷酸经由核酶的酶促切割。

[0140] 严格杂交条件如下:包含目的核酸的滤器的预杂交于 65°C 在缓冲液中进行 8 小时至过夜,所述缓冲液由 6xSSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% Ficoll、0.02% BSA 和 500 μ g/ml 变性鲑精 DNA 组成。滤器于优选的杂交温度 65°C 在预杂交混合物中杂交 48 小时,所述预杂交混合物包含 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA 和 5-20 $\times 10^6$ cpm³²p- 标记的探针。随后,滤器洗涤于 37°C 在包含 2xSSC、0.01% Ficoll 和 0.01% BSA 的溶液中进行 1 小时,随后为于 50°C 在 0.1xSSC 中洗涤 45 分钟。洗涤步骤后,杂交探针可通过放射自显影术检测。此种方法是本领域众所周知的且在 Sambrook 等人,1989;和 Ausubel 等人,1989 中引用。

[0141] 术语“序列同一性”意指 2 个多核苷酸或氨基酸序列在比较窗上是相同的(即,在核苷酸-核苷酸或残基-残基基础上)。术语“序列同一性百分比”(例如,80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或超过 99%)通过下述进行计算:在比较窗上比较 2 个最佳比对的序列,测定相同的核酸碱基(例如,A、T、C、G、U 或 I)或残基存在于 2 个序列中的位置数目以产生匹配位置数目,将匹配位置数目除以比较窗中的位置总数目(即,窗口大小),且将结果乘以 100 以产生序列同一性百分比。最佳比对后,序列可以在至少 21 个邻接核苷酸或 7 个邻接氨基酸的比较窗上与参考序列进行比较,通常在至少 150 个邻接核苷酸或 50 个邻接氨基酸的窗口上,其中序列同一性百分比通过在比较窗上使参考序列与可包括总计为参考序列的 20%或更少的缺失或添加的序列比较进行计算,

[0142] 用于比较的序列比对法是本领域众所周知的。用于比对比较窗的最佳序列比对可以通过下述来进行:Smith 和 Waterman Adv. Appl. Math. 2:482(1981) 的局部同源性算法,Needleman 和 Wunsch J. Mol. Biol. 48:443(1970) 的同源性比对算法, Pearson 和 Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85:2444(1988) 的搜索相似性方法,这些算法的计算机化实现 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)), Geneworks 或 MacVector 软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA),或人工比对或目测检查(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等人,编辑 1995 增刊)),并且选择通过各种方法产生的最佳比对(即,导致在比较窗上最高的同源性百分比)。百分比同源性或序列同一性优选使用众所周知的 BLAST 或 BLAST 2.0 算法和缺省参数进行测定,其分别在 Altschul 等人, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402(1977) 和 Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215:403410(1990) 中得到描述。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)使用字长(wordlength) (W) 11、期望(E) 10、M = 5、N = 4 和 2 条链的比较作为缺省值。对于氨基酸序列,BLASTP 程序使用字长 3、期望(E) 10、和 BLOSUM62 评分矩阵(参见 Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989)) 比对 (B) 50、期望(E) 10、M = 5、N = 4 和 2 条链的比较作为缺省值。这些程序和软件的细节可通过

在下述环球网网址上找到的国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 获得 :ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0143] 术语“分离的”意指与其中多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然界中正常与之结合的组成成分、细胞或其他方面分开。例如,就多核苷酸而言,分离的多核苷酸是和染色体中正常与之结合的 5' 和 3' 序列分开的多核苷酸。如对于本领域技术人员显而易见的,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段,不需要“分离”以区分其与其天然存在的配对物。此外,“浓缩的”、“分开的”或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段可与其天然存在的配对物区分,因为分子浓度或数目 / 体积与其天然存在的配对物的那种相比大于“浓缩的”或小于“分开的”。在其一级序列中或例如通过其糖基化模式不同于天然存在的配对物的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段无需以其分离的形式存在,因为它可通过其一级序列,或可替代地通过另一个特征例如其糖基化模式与其天然存在的配对物区分。尽管没有对本文公开的本发明各自明确陈述,但应当理解用于下文公开的每种组合物和在合适条件下的所有上述实施方案由本发明提供。因此,非天然存在的多核苷酸作为与分离的天然存在的多核苷酸分开的实施方案提供。在细菌细胞中生产的蛋白质作为与天然存在的蛋白质分开的实施方案提供,所述天然存在的蛋白质从它在自然界中由其生产的真核细胞中分离。哺乳动物细胞例如树突细胞是分离的,如果它从其中它在生物中发现的解剖部位中取出的话。

[0144] “宿主细胞”、“靶细胞”或“受体细胞”意欲包括任何个别细胞或细胞培养物,其可以或已是关于载体或整合入外源核酸分子、多核苷酸和 / 或蛋白质的受体。它还意欲包括单个细胞的后代,且由于天然、偶然或故意的突变,后代可能不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学上或在基因组或总 DNA 互补体中)。细胞可以是原核或真核的,且包括但不限于细菌细胞、酵母细胞、动物细胞和哺乳动物细胞,例如鼠、大鼠、猿猴或人。

[0145] “受试者”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于鼠、猿猴、人、耕作动物、运动动物和宠物。

[0146] “对照”是在实验中用于比较目的的可替代受试者或样品。对照可以是“阳性”或“阴性的”。例如,当实验的目的是测定免疫应答与特定培养条件的关联时,一般优选使用阳性对照和阴性对照。

[0147] “癌症”意指显示出相对自主生长的细胞的异常存在,从而使得癌细胞显示特征在于细胞增殖控制的显著丧失的异常生长表型。癌细胞可以是良性或恶性的。在各种实施方案中,癌症影响膀胱、血液、脑、乳房、结肠、消化管、肺、卵巢、胰、前列腺或皮肤的细胞。如本文所使用的,癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞,还包括衍生自癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移癌细胞、以及衍生自癌细胞的体外培养物和细胞系。癌症包括但不限于实体瘤、液体肿瘤、血液恶性肿瘤、肾细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫颈癌、胃癌、食管癌、胰癌、肺癌、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤、成视网膜细胞瘤、白血病(包括慢性淋巴细胞性白血病)、骨髓瘤、淋巴瘤、肝癌、腺瘤、肉瘤、癌、胚细胞瘤等。当提及通常表现为实体瘤的癌症类型时,“临床上可检测的”肿瘤是在肿瘤块基础上可检测的肿瘤;例如,通过此种程序如 CAT 扫描、磁共振成像 (MRI)、X 射线、超声或触诊。单独的生物化学或免疫学发现可以不足以符合这个定义。

[0148] 术语“培养”指细胞的体外维持、分化、和 / 或繁殖或在合适的培养基中。“富集”

意指包含以大于其中它们存在于生物中的组织中发现的总细胞百分比存在的细胞的组成。例如，与其中它们存在于生物中的组织（例如，血液、皮肤、淋巴结等）中的百分比相比较，通过本发明方法制备的 $CD83^+ CCR7^-$ DCs 和 $CD83^+ CCR7^+$ DCs 的富集培养物和制剂以更高的总细胞百分比存在。

[0149] “组合物”意指活性剂和惰性（例如，可检测试剂或标记）或活性的另一种化合物或组合物例如佐剂的组合。

[0150] “药物组合物”意欲包括活性剂与惰性或活性载体的组合，从而使得组合物适合于体外、体内或先体外后体内诊断或治疗用途。

[0151] 如本文所使用的，术语“药学上可接受的载体”包含任何标准药学载体，例如磷酸缓冲盐水溶液、水和乳剂，例如油 / 水或水 / 油乳剂、和各种类型的湿润剂。组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。关于载体、稳定剂和佐剂的例子，参见 Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 第 18 版 (Mack Publ. Co., Easton(1990))。

[0152] “有效量”是足以实现有利或所需结果的量，例如增强的免疫应答，医学状况（疾病、感染等）的治疗、预防或改善。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用。合适的剂量将依赖于体重、年龄、健康、待治疗的疾病或状况和施用途径而变。

[0153] 如本文所使用的，“发信号”意指使未成熟的或成熟的树突细胞与 $IFN-\gamma$ 受体激动剂、 $TNF-\alpha$ 受体激动剂、CD40L 多肽或其他 CD40 激动剂接触。在一个实施方案中，此种激动剂外部提供（例如，在细胞培养基中）。在另一个实施方案中，多肽激动剂经由用编码多肽的核酸转染未成熟的或成熟的树突细胞来提供。可替代地，核酸适体激动剂可以在培养基中或通过转染来提供。在其中一种或多种多肽通过用编码多肽的核酸转染树突细胞来提供的情况下，发信号在编码多肽的 mRNA 翻译后而不是用核酸转染后实现。在一个方面，本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的富集群体的方法，所述成熟的树突细胞在体内和 / 或体外诱导有效的免疫刺激应答。如本文所使用的，术语“成熟的树突细胞”意指与未成熟的 DCs (iDCs) 比较，证实共刺激分子 CD83 升高的细胞表面表达的树突细胞。本发明的成熟的 DCs 包括 $CD83^+ CCR7^-$ DCs 和 $CD83^+ CCR7^+$ DCs。第二种信号 CD40 激动剂可以给予未成熟的 $CD83^- CCR7^-$ DCs 或 $CD83^+ CCR7^-$ 成熟的 DCs。

[0154] 文献 (Schafft2005, Bonehill2004) 暗示 DCs 用抗原编码 RNA 的成熟后电穿孔导致具有引起免疫应答的更大效力的 DCs。因此，开发了通过改变 CD40L 发信号对 $CD83^+ CCR7^-$ 成熟的 DCs (表型后成熟) 的时间选择来改变 ‘CD40L 基础过程’ (顺次 $IFN-\gamma$ 发信号随后为 $CD83^- iDCs$ 的 CD40L 发信号) 的方法。在这个实施方案中，DCs 首先通过向培养基中添加 ‘炎症介质’—— $IFN-\gamma$ 和 $TNF-\alpha$ 和任选地 PGE_2 进行表型成熟，且随后约 12-30 小时 (优选约 18 小时) 后用 CD40L mRNA、和任选地抗原编码 mRNA 电穿孔。这种新过程命名为 ‘PME-CD40L’，关于用 CD40L 的成熟后电穿孔 (Post Maturation Electroporation with CD40L)，以产生 $CD83^+ CCR7^+$ 成熟的 DCs。在电穿孔后收获且制备为疫苗的细胞在体外测定中显示介导最大的免疫能力 (参见实施例)。在一个实施方案中，在电穿孔后约 5 分钟至 3 天时、或在电穿孔后约 2-6 小时、或在电穿孔后约 4 小时时将细胞配制成疫苗。通过 PME-CD40L 过程制备的树突细胞在表型上不同于现有技术树突细胞。例如，产生 DC 的 PME-CD40L 过程能够支持长期抗原特异性 CTL 效应子功能且诱导效应记忆 CTL 的优选表型，其保留扩增、产生细胞因子和杀伤靶细胞的能力，介导强长期 CTL 效应子功能的所有关键

事件。因此,在一个实施方案中,本发明提供了树突细胞,其由抗原特异性 T 细胞群体优先诱导 $CD28^+ CD45RA^-$ 记忆 / 效应 T 细胞群体。抗原特异性 T 细胞可以是幼稚 T 细胞或经历抗原的 T 细胞。效应 / 记忆 T 细胞产生 $IFN\gamma$ 、IL-2,且可以杀伤靶细胞。效应 T 细胞产生 $IFN\gamma$ 且可以杀伤靶细胞,但不产生 IL-2。记忆 T 细胞产生 $IFN\gamma$ 和 IL-2,但不杀伤靶细胞。

[0155] 作为另外进一步的增强,DCs 可以用关于 NKT 细胞的活化配体即 α -半乳糖神经酰胺进行脉冲,以便将这个效应细胞群体招募至免疫应答。NKT 细胞展示 T 辅助和 T 细胞毒性细胞的方面:NKT 细胞可以分泌 $IFN-\gamma$ 、展示 CD40L、且可以分泌粒酶 B,后者在靶细胞中诱导凋亡。因此,由于另外的 NKT 细胞 CD40L/DC-CD40 相互作用,NKT 细胞招募可以导致增强的 DC 功能,或通过分泌辅助细胞因子、和 / 或促成对靶细胞的直接裂解作用来扩增细胞介导的免疫应答。

[0156] 用第一种信号 ($IFN-\gamma$ 受体激动剂和 / 或 $TNF-\alpha$ 受体激动剂) 给 iDCs,和第二种信号 (CD40 激动剂) 给 $CD83^- CCR7^-$ iDCs 或 $CD83^+ CCR7^-$ 成熟的 DCs 顺次发信号后,所得到的 DCs 证实 (i) 共刺激分子 CD80、CD83 和 CD86 升高的细胞表面表达, ii) 是 $CCR7^+$, 和 iii) 分泌 IL-12p70 多肽或蛋白质,和 / 或分泌显著减少水平的 (例如,0-500pg/ 百万 DCs) IL-10。在优选实施方案中,本发明的成熟的 $CD83^+ CCR7^+$ DCs 产生至少 1000pg IL-12/ 10^6 DCs, 优选至少 2000、3000、4000、5000 或 6000pg IL-12/ 10^6 DCs,更优选至少 7000、8000、9000 或 10,000pg IL-12/ 10^6 DCs,最优选至少 12,000、15,000、17,000 或 20,000pg IL-12/ 10^6 DCs。IL-10 和 IL-12 水平可以通过在 DC 成熟诱导后最高达 36 小时由未成熟的 DCs 收集的培养上清液的 ELISA 进行测定。Wierda 等人 (2000) Blood 96:2917. Ajdary 等人 (2000) Infection and Immunity 68:1760。

[0157] 未成熟的 DCs 可以由包含 DC 前体细胞的合适的组织来源进行分离或制备,且在体外分化以产生未成熟的 DC。例如,合适的组织来源可以是一种或多种骨髓细胞、外周血祖细胞 (PBPCs)、外周血干细胞 (PBSCs)、和脐带血细胞。优选地,组织来源是外周血单核细胞 (PBMC)。组织来源可以是新鲜的或冷冻的。在另一个方面,细胞或组织来源用有效量的生长因子进行预处理,所述生长因子促进非干细胞或祖细胞的生长和分化,其随后更容易地与目的细胞分开。这些方法是本领域已知的,且在 Romani 等人 (1994) Exp. Med. 180:83 和 Caux, C. 等人 (1996) Exp. Med. 184:695 中简要描述。在一个方面,未成熟的 DCs 从外周血单核细胞 (PBMCs) 中分离。在优选实施方案中,在白细胞介素 4 (IL-4) 和 / 或 IL-13 的存在或不存在下, PBMCs 用有效量的粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 进行处理,从而使得 PBMCs 分化成未成熟的 DCs。最优选地, PBMCs 在 GM-CSF 和 IL-4 的存在下培养约 4-7 天,优选约 5-6 天,以产生未成熟的 DCs。在优选实施方案中,第一种信号在第 4、5、6 或 7 天时,和最优选在第 5 或 6 天时给予。此外,GM-CSF 以及 IL-4 和 / 或 IL-13 可以在第一次和 / 或第二次发信号时存在于培养基中。

[0158] 为了增加动物包括人中的树突前体细胞的数目,人们可以用刺激血细胞生成的物质预处理受试者。此种物质包括但不限于 G-CSF 和 GM-CSF。待施用的造血因子的量可以通过监控因子待施用于其的个体的细胞分化由本领域技术人员进行测定。一般地,因子例如 G-CSF 和 GM-CSF 的剂量将类似于用于治疗由用细胞毒性剂处理恢复的个体的剂量。作为例子, GM-CSF 或 G-CSF 可以在取出来源组织前以标准剂量施用 4-7 天,以增加树突细胞

前体的比例。美国专利号 6,475,483 教导每天 300 微克 G-CSF 的剂量 5-13 天,和每天 400 微克 GM-CSF 的剂量 4-19 天导致树突细胞的相当大产量。

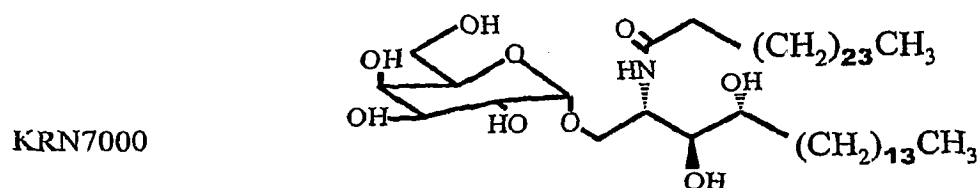
[0159] 本发明的方法产生其为有效的免疫刺激剂的成熟的 $CD83^+ CCR7^+$ 树突细胞的富集群体。具体地,本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的方法,其包括下述顺次步骤:(a) 用包含干扰素 γ 受体 (IFN- γ R) 激动剂,和任选地 TNF- α R 激动剂的第一种信号给分离的未成熟的树突细胞 (iDCs) 发信号,以产生 IFN- γ R 激动剂发信号的树突细胞;和 (b) 用包含有效量的 CD40 激动剂的第二种瞬时信号给所述 IFN- γ R 激动剂发信号的树突细胞发信号,以产生 $CCR7^+$ 成熟的树突细胞。本发明进一步提供了 $CD83^+ CCR7^+$ 成熟的 DCs 和 $CD83^+ CCR7^+$ 成熟的 DCs。在优选实施方案中,本发明的 $CD83^+ CCR7^+$ 成熟的 DCs 和 / 或 $CD83^+ CCR7^+$ 成熟的 DCs 瞬时表达 CD40L 多肽。优选地,CD40L 主要是细胞内定位,而不是在细胞表面上。最优选地,至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 的 CD40L 多肽细胞内定位。

[0160] 在可替代的实施方案中,未成熟的树突细胞用有效量的 TNF- α 受体激动剂发信号随后用 CD40 激动剂发信号。因此,本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的方法,其包括用包含肿瘤坏死因子 α 受体 (TNF- α R) 激动剂的第一种信号随后为包含 CD40 激动剂的第二种信号给分离的未成熟的树突细胞顺次发信号,其中所述发信号是在不存在有效量的 IL-1 β 和 / 或 IL-6 的情况下的。

[0161] 对于任一实施方案 (IFN- γ R 激动剂或 TNF- α R 激动剂作为第一种信号),第二种 CD40 激动剂信号可以给予 $CD83^- CCR7^-$ iDCs 或 $CD83^+ CCR7^+$ 成熟的 DCs。在优选实施方案中,使未成熟的 DCs 和 / 或成熟的 DCs 与 PGE₂ 接触。优选使细胞在其接受第一种信号 (IFN- γ R 激动剂或 TNF- α R 激动剂) 的同时与 PGE₂ 接触。在优选实施方案中,在树突细胞接受第一种和第二种信号的时候,GM-CSF 和 IL-4 或 IL-13 中的至少一种存在于培养基中。在进一步的实施方案中,该方法进一步包括使未成熟的树突细胞、发信号的树突细胞、和 / 或 $CCR7^+$ 树突细胞与 NKT 细胞配体接触,所述 NKT 细胞配体可以活化受 CD1d- 限制的 NKT 细胞,并且因此增强先天性和继承性免疫。在优选实施方案中,NKT 细胞配体是选自下述的化合物: α -半乳糖神经酰胺、 α -葡萄糖神经酰胺、 α -6-脱氧半乳糖神经酰胺、 α -6-脱氧吡喃型半乳糖神经酰胺、 β -6-脱氧吡喃型半乳糖神经酰胺、 β -阿拉伯糖神经酰胺、 α -C-半乳糖神经酰胺和 α -S-半乳糖神经酰胺。优选化合物是称为 KRN7000 ((2S,3S,4R)-1-O-(α -D-吡喃型半乳糖基)-2-(N-二十六烷基氨基)-1,3,4-十八烷三醇) 的 α -半乳糖神经酰胺。

[0162] 日本专利 3068910 中公开的 Agelasphins 是在海洋海绵动物中最初发现的一类化合物,其具有 α -半乳糖神经酰胺 (α -GalCer) 结构以及免疫刺激和抗肿瘤活性。KRN7000 是在 U.S. 5,767,092 中公开的 agelasphins 有效的合成类似物,所述专利的内容引入作为参考。agelasphins 另外的有用的类似物公开于 U.S. 5,936,076 中,所述专利的内容引入作为参考。KRN7000 的结构显示于下文:

[0163]

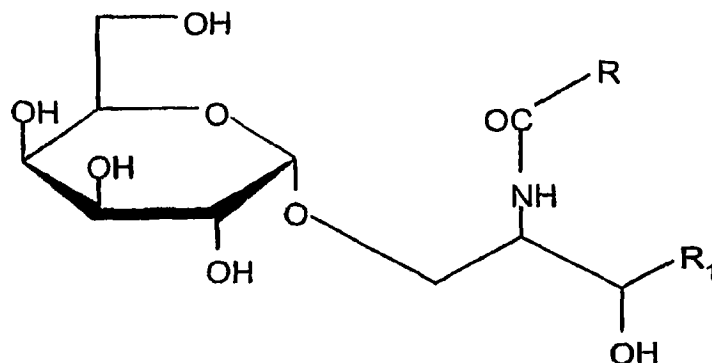


[0164] KRN7000 的糖基神经酰胺类似物 (例如, α -半乳糖神经酰胺、 α -葡萄糖神经酰胺、

α -6-脱氧半乳糖神经酰胺、 α -6-脱氧呋喃型半乳糖神经酰胺、 β -6-脱氧呋喃型半乳糖神经酰胺、 β -阿拉伯糖神经酰胺) 公开于 U. S. 5, 849, 716, 所述专利的内容引入作为参考。其内容引入作为参考的 U. S. 5, 780, 441 公开了 KRN7000 的寡糖(二、三、四、五) 衍生物。关于使用 KRN7000 和相关类似物以生产 KRN7000 抗原装载的 DCs, 和活化人 NKT 细胞的方法公开于美国系列号 09/721, 768 和 U. S. 6, 531, 453 中, 所述文献的内容各自特别引入作为参考。

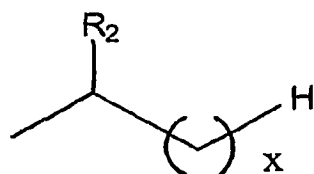
[0165] 其内容引入作为参考的 U. S. 5, 936, 076 公开了由下式表示的 α -半乳糖神经酰胺化合物:

[0166]



[0167] 其中脂肪酸链, R 表示:

[0168]



[0169] 其中 R_2 表示 H 或 OH, 且 X 指示 0-26 的整数, 或 R 表示 $-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$ 且

[0170] R_1 表示由下述 (a)-(e) 定义的取代基中的任何一个

[0171] (a) $-CH_2(CH_2)_YCH_3$

[0172] (b) $-CH(OH)(CH_2)_YCH_3$

[0173] (c) $-CH(OH)(CH_2)_YCH(CH_3)_2$

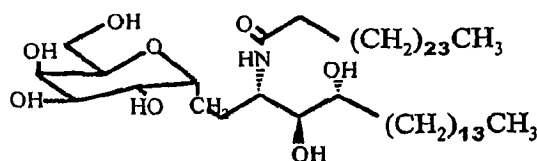
[0174] (d) $-CH=CH(CH_2)_YCH_3$

[0175] (e) $-CH(OH)(CH_2)_YCH(CH_3)CH_2CH_3$

[0176] 其中 Y 指示 5-17 的指数。

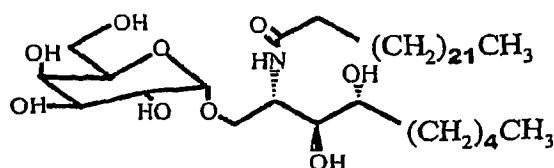
[0177] 其内容引入作为参考的 WO 03/105769、U. S. 2004/0127429 和 Shimiegi J. 等人, (2003) J. Exp. Med. 198:1631-1641 公开了 α -C-糖脂的结构, 其中 α -糖基神经酰胺例如 α -半乳糖神经酰胺和 α -葡萄糖神经酰胺的糖苷键上的氧原子由碳原子替换。代表性化合物的结构显示于下文。

[0178]

C-GalCer

[0179] 其内容引入的 WO 03/016326 公开了具有截短的神经酰胺例如“C4”或“OCH”的 KRN7000 类似物,具有下述结构:

[0180]

C4 (OCH)

[0181] 其内容引入作为参考的 U. S. 6, 635, 622 公开了 α -C-、N 或 S-糖脂,其中半乳糖神经酰胺的糖苷键上的氧原子由 $-(CH_2)_a-CH=CH-(CH_2)_{a'}$ 、 $-(CH_2)_a-S(O)_{0-2}-CH_2-$ 或 $-NHCH_2-$ 替换,其中 a 和 a' 各自指示 0-5 的整数,且 $a+a'$ 是 5 或更少。

[0182] 在优选实施方案中,IFN- γ R 激动剂是 IFN- γ 或其生物学活性片段。优选地,IFN- γ 是哺乳动物 IFN- γ ,最优选人 IFN- γ 。IFN- γ 的 cDNA 和氨基酸序列分别显示于 SEQ ID NOs : 5 和 6 中。优选地,IFN- γ 具有 SEQ ID NO :6 中所示的序列,或其片段。在一个实施方案中,IFN- γ R 包含与 SEQ IDNO :6 具有至少 80% 序列同一性的多肽。优选地,IFN- γ R 激动剂与 SEQID NO :6 具有至少 85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 序列同一性。用于测试 IFN- γ R 激动剂的活性的方法是本领域技术人员已知的,且这些方法中的一些在下文描述。未成熟的 DCs 可以通过向培养基中加入 IFN- γ R 激动剂,或通过向树突细胞中表达 IFN- γ R 激动剂来发信号。在一个实施方案中,DCs 用编码 IFN- γ R 激动剂的 mRNA,例如 SEQ ID NO :6 或其生物学活性片段进行转染。发信号随后在 mRNA 在树突细胞内翻译后发生。最优选地,将 IFN- γ R 激动剂加入包含未成熟的 DCs 的培养基中。在优选实施方案中,培养基进一步包含 PGE₂ 和 / 或 GM-CSF 加 IL-4 或 IL-13。

[0183] 关于 IFN- γ 的受体具有 2 个亚单位:IFN- γ R1,配体结合链(也称为 α 链)和 IFN- γ R2,信号转导链(也称为 β 链或辅助因子 1)。这些蛋白质由位于不同染色体上分开的基因(分别为 IFNGR1 和 IFNGR2)编码。因为配体结合(α)链与 IFN- γ 相互作用,所以它们二聚化且变得与 2 条信号转导(β)链结合。受体装配导致 Janus 激酶 JAK1 和 JAK2 的活化以及 IFN- γ R1 的胞内结构域上的酪氨酸残基的磷酸化。这导致 STAT1(‘信号转导及转录激活蛋白’)的招募和磷酸化,所述 STAT1 形成同二聚体且易位至核以活化广泛范围的 IFN- γ 应答基因。发信号后,配体结合链被内在化且解离。链随后再循环至细胞表面。Bach 等人(1997)Ann. Rev. Immunol. 15,563-591;和 Lammas, Casanova 和 Kumararatne(2000) ClinExp Immunol 121,417-425。人 IFN- γ 与 IFN- γ R α 的可溶性、糖基化细胞外部分(sIFN- γ R α)的复合物的晶体结构已使用多波长不规则衍射法在 2.9 Å 分辨率时进行测定。Thiel 等人 Structure 8:927-936(2000)。

[0184] 在一个测定中,IFN- γ 受体激动剂例如 IFN- γ 以时间和浓度依赖性方式减少人

肠上皮 Caco-2 细胞中的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性可以测定为总和乌本苷敏感性 ATP 酶之间的差异。用 $\text{IFN-}\gamma$ 处理增加磷酸-STAT1 的表达,且伴随 p38MAPK 的活化。p38MAPK 激酶活性可以通过蛋白质印迹使用 p38MAPK 激酶抗体(例如,使用可从 New England Biolabs 获得的 p38MAPK 激酶测定试剂盒)进行分析。总和磷酸化的 STAT1 蛋白质水平可以使用 Stat1 抗体(例如可从 New England Biolabs 获得的在 PhosphoPlus[®] Stat1 Antibody Kit 中的那些)进行检测。 $\text{IFN-}\gamma$ 转导机制涉及 PKC 下游 STAT1 磷酸化以及 Raf-1、MEK、ERK2 和 p38MAPK 途径的活化。参见, Magro 等人, Br J Pharmacol advance online publication, July 26, 2004; doi:10.1038/sj.bjp.0705895, 其内容引入作为参考。

[0185] 为了举例说明的目的,用 $\text{IFN-}\gamma$ 受体激动剂、 $\text{TNF-}\alpha$ 受体激动剂和/或 CD40 激动剂发信号可以通过使细胞分别直接与 $\text{IFN-}\gamma$ 多肽和/或蛋白质和/或 $\text{TNF-}\alpha$ 多肽或蛋白质和/或 CD40 激动剂接触来提供。可替代地,用 $\text{IFN-}\gamma$ R 激动剂、 $\text{TNF-}\alpha$ R 激动剂或 CD40 激动剂给细胞发信号可以在编码此种多肽或蛋白质的 mRNA 在树突细胞内翻译后发生。因此,发信号在 $\text{IFN-}\gamma$ R 激动剂、 $\text{TNF-}\alpha$ R 激动剂和 CD40 激动剂多肽和/或蛋白质表达后发生。

[0186] 在本发明方法中使用的第二种信号是使用 CD40 激动剂的瞬时信号。CD40 激动剂多肽的持续表达,例如如由 Koya 等人同上述的 CD40L 来自慢病毒载体的组成型表达,不视为瞬时表达。作为非限制性例子,如果包含 CD40 激动剂的培养基从 DCs 中取出,或如果 DCs 装载编码 CD40 激动剂的 mRNA,那么信号将视为瞬时的。如果 DCs 装载编码 CD40 激动剂的表达载体/用编码 CD40 激动剂的表达载体转染,那么 CD40 激动剂信号也可以视为瞬时的,前提是:1) 驱动 CD40 激动剂表达的启动子在 DCs 中不是组成型的,或 2) 表达载体不整合到 DC 基因组内或以其他方式在 DCs 中复制。

[0187] 在优选实施方案中,CD40 激动剂是 CD40L 多肽或 CD40 激动性抗体。一般而言,结合 CD40 的配体可以充当 CD40 激动剂。申请人已证实包含 CD40L 的第二种信号通过用 CD40L mRNA 转染未成熟的或成熟的 DCs 对细胞的施用导致成熟的 DCs 的产生,其诱导免疫刺激应答而不是免疫抑制应答。在一个实施方案中,CD40L mRNA 转染的树突细胞紧在 CD40L mRNA 转染后和 CD40L mRNA 翻译前在包含 $\text{IFN-}\gamma$ (以及优选地 PGE_2) 的培养基中培养,以产生有效量的 CD40L 信号。在这个实施方案中,尽管 $\text{IFN-}\gamma$ 在用 CD40L mRNA 转染后添加,但树突细胞在信号在 CD40L mRNA 翻译后产生前接受 $\text{IFN-}\gamma$ 信号。因此,其中试剂递送给细胞的顺序是重要的,仅因为 CD40L 发信号必须在 $\text{IFN-}\gamma$ 发信号后发生。如下文更详细地描述的,DCs 的发信号可以在体内或先体外后体内发生,或可替代地一个或多个组可以先体外后体内发生且该方法的剩余步骤可以在体内发生。

[0188] 在一个实施方案中,CD40 激动剂是结合 CD40 的适体。类似地, $\text{IFN-}\gamma$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 可以由具有类似生物活性的适体、抗体等替换。最优选地,CD40 激动剂作为编码 CD40L 的 mRNA 递送。

[0189] 如本文所使用的,“CD40 配体”(CD40L) 应包含特异性识别并且活化 CD40 受体和活化其生物活性的任何多肽或蛋白质。该术语包括跨膜和可溶形式的 CD40L。在优选实施方案中,CD40 激动剂是哺乳动物 CD40L,优选人 CD40L。人和小鼠 cDNAs 和蛋白质的比对分别显示于图 16 和 17 中。人 CD40L cDNA 和相应的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID NOS:1 和 2 中。关于 CD40L 的可读框由 SEQ ID NO.1 的核苷酸 40-822 表示,而 TGA 终止密码子在位置

823-825 上。在本发明的任何 CD40L 多核苷酸序列中,可以使用 CD40L 序列中的第 102 个密码子 (SEQ ID NO:1 的核苷酸 343-345) 的沉默突变 (由于密码子简并的变体),所述沉默突变使“AAA”密码子变成“AAG”密码子,这 2 个密码子都编码 Lys。在本发明方法中还有用的是截短的 CD40 配体,包括但不限于 SEQ ID NO:2 的残基 47-261 (由 SEQ ID NO:1 的核苷酸残基 178-825 编码);和由 SEQ ID NO:1 的核苷酸 43-825、SEQ ID NO:1 的 181-825、SEQ ID NO:1 的 193-825、SEQ ID NO:1 的 376-825、SEQ ID NO:1 的 379-825 和 SEQ ID NO:1 的 400-825 编码的 CD40L 片段。在某些实施方案中,CD40L 多肽选自:a) 包含 SEQ ID NO:2 的多肽;b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 47-261 的多肽;c) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 51-261 的多肽;d) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 120-261 的多肽;e) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 113-261 的多肽;f) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 112-261 的多肽;g) 包含 SEQ ID NO:10 的多肽;h) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 35-261 的多肽;i) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 34-225 的多肽;j) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 113-225 的多肽;k) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 120-225 的多肽;和 l) (a) 至 (k) 中的任何一个的多肽的片段,其中所述片段结合 CD40。最优选地,CD40L 多肽由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成,或基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成。在另一个实施方案中,CD40L 多肽由与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基具有至少 80% 序列同一性的多肽组成,或基本上由与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基具有至少 80% 序列同一性的多肽组成。在优选实施方案中,序列同一性是至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99%。在一些实施方案中,当与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 比较时,CD40L 多肽具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸置换。优选地,氨基酸置换是保守置换。

[0190] 在各种实施方案中,CD40L 多肽由包含选自下述的多核苷酸的 mRNA 编码:a) SEQ ID NO:1 的多核苷酸;b) 包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸 40-822 的多核苷酸;c) 包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸 178-822 的多核苷酸;d) 包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸 190-822 的多核苷酸;e) 包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸 397-822 的多核苷酸;f) 包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸 376-822 的多核苷酸;g) SEQ ID NO:9 的多核苷酸;h) SEQ ID NO:13 的多核苷酸;i) 与 (a) 至 (h) 中的任何多核苷酸具有至少 80% 序列同一性的多核苷酸;j) 在严格条件下与 (a) 至 (h) 中的任何多核苷酸杂交的多核苷酸;和 k) (a) 至 (j) 中的多核苷酸,其进一步包含选自 SEQ ID NO:14、15、16、17 或 18 的核酸的 3' 非翻译序列,和 / 或选自 SEQ ID NO:19、20、21、22 或 23 的核酸的 5' 非翻译序列。优选地,这些 RNAs 是加帽的和多腺苷酸化的。

[0191] 可替代地,CD40L 多肽是与选自下述的多肽具有至少 77% 序列同一性的多肽:a) 包含 SEQ ID NO:2 的多肽;b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 47-261 的多肽;c) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 51-261 的多肽;d) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 120-261 的多肽;e) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 113-261 的多肽;f) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 112-261 的多肽;g) 包含 SEQ ID NO:10 的多肽;h) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 35-261 的多肽;i) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 34-225 的多肽;j) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 113-225 的多肽;k) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 120-225 的多肽;和 l) (a) 至 (k) 中的任何一个的多肽的片段,其中所述片段结合 CD40。

[0192] 最优选地,CD40L 多肽是本文提供的新 CD40L 多肽,其由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成,或基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成,或与其具有至少 80%,

更优选至少 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或最优选至少 99% 同源性的多肽。优选地，CD40L 多肽由对应于 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:33 的 cDNA 的 RNA，或由于密码子简并而不同的变体编码。如本文所使用的，对应于 cDNA 序列的 RNA 指具有与 cDNA 序列相同的序列的 RNA 序列，除了核苷酸是核糖核苷酸而不是脱氧核糖核苷酸，因为 DNA 中的胸腺嘧啶 (T) 碱基由 RNA 中的尿嘧啶 (U) 碱基替换。优选地，RNAs 是加帽的和多腺苷酸化的。因此，本发明提供了 CD40L 多肽，其由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成，或基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成。在另一个方面，本发明提供了编码 CD40L 多肽的核酸，所述 CD40L 多肽由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成，或基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成。还提供了用此种核酸转染的树突细胞，以及包含此种树突细胞的疫苗。优选地，树突细胞用编码本发明的这些新 CD40L 多肽的 RNA 进行瞬时转染。

[0193] 在另一个方面，本发明提供了用于制备成熟的树突细胞 (DCs) 的方法，其包括下述顺次步骤：(a) 用包含干扰素 γ 受体 (IFN- γ R) 激动剂，和任选地 TNF- α R 激动剂的第一种信号给分离的未成熟的树突细胞 (iDCs) 发信号，以产生 IFN- γ R 激动剂发信号的树突细胞；和 (b) 用包含有效量的 CD40L 多肽的第二种瞬时信号给所述 IFN- γ R 激动剂发信号的树突细胞发信号，以产生 CCR7⁺ 成熟的树突细胞；其中所述 CD40L 多肽基本上由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 组成，或是与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 具有至少 80% 序列同一性的多肽。

[0194] CD40 首先表征为在 B 淋巴细胞上表达的受体。Schonbeck 和 Libby (2001) Cell Mol. Life Sci. 58:4。随后发现 B 细胞 CD40 与在活化的 T 细胞上表达的 CD40L 接合对于 T 细胞依赖性 B 细胞活化（即，增殖、免疫球蛋白分泌和类别转换）是必需的。随后揭示功能 CD40 表达在除 B 细胞外的多种细胞类型上，包括造血祖细胞、T 淋巴细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞 / 巨噬细胞、树突细胞、上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、角质形成细胞、成纤维细胞和癌。Schonbeck 和 Libby (2001) 同上。

[0195] CD40 配体在 1993 年进行克隆且由 Gauchat 等人 (1993) FEBS Lett. 315:259 报告。Graf 等人将其作图至染色体 Xq26.3-q27.1 (Graf 等人 (1992) Eur. J. Immunol. 22:3191-3194)。已描述 CD40 配体的细胞结合全长 39kDa 形式的较短可溶形式具有分子量 33 和 18kDa。Graf 等人 (1995) Eur. J. Immunol. 25:1749; Ludewig 等人 (1996) Eur. J. Immunol. 26:3137; Wykes 等人 (1998) Eur. J. Immunol. 28:548。经由细胞内蛋白酶剪切产生的 18kDa 可溶形式保留与 CD40 受体结合的能力且因此是 CD40 受体发信号试剂的例子，所述 18kDa 可溶形式缺乏胞质尾、跨膜区和部分细胞外结构域，但保留 CD40 结合结构域。Graf 等人 (1995) 同上。

[0196] 美国专利号 5,981,724 公开了编码人 CD40 配体 (CD40L) 的 DNA 序列以及载体、和用于产生 CD40L 多肽目的的转化的宿主细胞。美国专利号 5,962,406 公开了编码可溶形式的人 CD40L 的 DNA 序列。

[0197] 关于 CD40L 的哺乳动物同源物的示例性序列具有下述 Genbank 登记号：NM_204733 (红原鸡 (*Gallus gallus*) (鸡))；DQ054533 (绵羊 (*Ovis aries*) (羊))；Z48469 (牛 (*Bos taurus*) (牛))；AY333790 (狗 (*Canis familiaris*) (狗))；豚尾猴 (*Macaca nemestrina*) (豚尾猴))；AF344844 (普通狢 (*Callithrix jacchus*) (白毛丛耳狢猴 (white-tufted-ear marmoset)))；AF34481 (煤黑白眉猴 (*Cercopithecus atys*))

(乌白眉猴 (sooty mangabey))) ;AF344860 (夜猴 (Aotustrivirgatus) (夜猴)) ;AF344859 恒河猴 (Macaca mulatta) (猕猴)) ;AF116582 (Rattus nevegicus (挪威大鼠 (Norway rat))) ;和 AF079105 (猫 (Felus catus) (猫))。

[0198] CD40 受体还可以通过使用 CD40 激动剂抗体、抗体片段、其衍生物和变体进行活化。CD40 激动剂抗体可以购自商业厂家例如 Mabtech (Nacka, 瑞典)。产生这些试剂的例子和方法也在下文提供。文献还提供了 CD40 激动剂抗体和抗体片段的例子。参见, 例如, Osada 等人 (2002) 25 (2) :176 和 Ledbetter, J. A. 等人 (1997) Crit. Reviews in Immunol. 17 :427。

[0199] 如上所述, 具有 CD40L 的生物活性的试剂可以是由编码 CD40L 的外源多核苷酸 (mRNA 或 DNA) 翻译的多肽。例如, CD40L mRNA 具有 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 的序列。可替代地, 细胞用有效量的 CD40L 蛋白质和 / 或多肽发信号, 例如具有 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4 的序列的那些。经修饰的 CD40L 也可以在本发明的方法中使用。例如, CD40L 包括已通过任何数目的氨基酸的添加、减去或置换保守或非保守改变的那些分子, 前提是所得到的蛋白质结合在 DC 表面上的 CD40。“保守改变”是导致具有类似电荷密度、亲水性或疏水性、大小和 / 或构型 (例如, Val 替换 Ile) 的可替代氨基酸的改变。比较起来, “非保守改变”是导致具有不同电荷密度、亲水性或疏水性、大小和 / 或构型 (例如, Val 替换 Phe) 的可替代氨基酸的改变。制备此种修饰的方法是本领域众所周知的, 且还可以通过商购可得试剂盒和载体 (例如, 可从 New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass. ;Clontech, Palo Alto, Calif. 获得的那些) 来完成。

[0200] 当试剂作为编码试剂的多核苷酸或基因递送时, 有效量的多核苷酸可以通过本领域已知的任何方法进行复制。PCR 技术是复制 DNA 的一种方法, 并且是美国专利号 4,683,195 ;4,800,159 ;4,754,065 ;和 4,683,202 的主题, 且在 PCR :THE POLYMERASE CHAIN REACTION (Mullis 等人 eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) 和其中引用的参考文献中得到描述。产生多核苷酸的另外方法在下文提供。

[0201] 在本发明的实施方案中, 其中未成熟的树突细胞用 TNF- α 受体的激动剂进行刺激, 随后用 CD40 激动剂刺激, 该方法在不存在有效量的白细胞介素 1- β (IL-1 β) 和或白细胞介素 6 (IL-6) 的情况下进行。用于检测蛋白质例如 IL-1 β 和 IL-6 的存在的方法是本领域已知的。

[0202] 本领域技术人员可以通过从群体中取样细胞或 DCs 的小群体就表达 CD40L mRNA 和 / 或 CD40L 多肽的成熟的 DCs 存在测定该方法的目的何时已满足。在进一步的方面, 本发明成熟的 CD83⁺CCR7⁺ DCs 表达白细胞介素 12 (IL-12) p35 蛋白质。在进一步的方面, 成熟的 CD83⁺CCR7⁺ DCs 表达 IL-12p70 蛋白质, 和 / 或表达有限的 IL-10 (不超过 500pg/ml/10⁶DCs)。

[0203] 该方法的步骤可以在体内或先体外后体内进行实践。当先体外后体内实践时, 该方法可以在开放或封闭系统中进行实践。用于培养和富集细胞群体的方法和系统是本领域已知的。参见, 美国专利公开号 2004/0072347 的实施例 1 和 2。还参见美国专利公开号 2003/0235908, 其描述了用于细胞扩增的封闭系统。

[0204] 在本发明的进一步的方面, 上述方法通过添加给未成熟的或成熟的 DCs 递送有效量的抗原进行修改, 所述抗原随后将由成熟的 DCs 进行加工和呈递。因此, 本发明的方法进一步包括将一种或多种抗原或编码一种或多种抗原的多核苷酸引入 iDCs、发信号的 DCs 或

CCR7⁺成熟的 DCs 内,以产生抗原装载的 CCR7⁺成熟的 DCs。抗原或抗原编码多核苷酸可以在所述第一种信号前引入。可替代地,抗原或抗原编码多核苷酸在所述第一种信号后和所述第二种信号前递送。在另一个实施方案中,抗原或多核苷酸在所述第二种信号后或与所述第二种信号基本同时递送。

[0205] 例如,抗原包括但不限于病原体、病原体裂解物、病原体提取物、病原体多肽、病毒颗粒、细菌、蛋白质、多肽、癌细胞、癌细胞裂解物、癌细胞提取物、癌细胞特异性多肽。抗原可以是天然存在的或重组产生的。免疫原可以使用本领域已知的方法作为多肽、蛋白质或作为核酸递送给细胞,所述方法在下文简要描述。优选地,将编码一种或多种抗原的一种或多种多核苷酸引入 iDCs、发信号的 DCs 或 CCR7⁺成熟的 DCs 内。多核苷酸可以通过本领域技术人员已知的方法引入 DCs 内。在优选实施方案中,多核苷酸通过电穿孔引入。最优选地,多核苷酸是 mRNA。在优选实施方案中,抗原或抗原编码 mRNA 连同编码 CD40 激动剂的 mRNA 或与 CD40 激动剂发信号基本上同时引入。

[0206] 该方法可以通过使细胞与有效量的细胞因子或共刺激分子例如 GM-CSF、IL-4 和 PGE₂ 接触进一步修改。在其中未成熟的 DCs 用 TNF α R 激动剂(在不存在 IFN γ R 激动剂的情况下)发信号,随后用 CD40 激动剂发信号的实施方案中,有效量的 IL-1 β 和 / 或 IL-6 从培养中特别排除。

[0207] 抗原可以以其“天然”形式递送,因为在制备抗原或诱导其以进入其中它遇到 APC 的环境中不涉及人为干预。可替代地或另外地,抗原可以包含粗制剂,例如在常规变态反应注射或肿瘤裂解物中通常施用的类型。抗原可以可替代地是基本上纯化的,例如至少约 90% 纯。

[0208] 当抗原是肽时,它可以例如通过分离的蛋白质的蛋白酶剪切产生。多种切割试剂中的任何一种都可以使用,包括但不限于胃蛋白酶、溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等。可替代地,肽可以化学合成,优选在自动合成仪上,如本领域可用的。同样,重组技术可以用于生成编码目的肽的核酸,和在所需条件下表达那种肽。

[0209] 抗原可以可替代地具有不同于任何天然存在的化合物的结构。在本发明的某些实施方案中,抗原是“经修饰的抗原”,其中抗原具有与天然存在的抗原的那种基本上相同的结构,但包括与天然存在的化合物的精确结构的一个或多个差异。例如,当天然存在的抗原是蛋白质或多肽抗原时,与那种蛋白质或多肽抗原相比较,经修饰的抗原将具有这样的氨基酸序列,其在一个或多个氨基酸的添加、置换或缺失中不同于天然存在的抗原的那种,和 / 或将包括一个或多个氨基酸,其通过与氨基酸共价连接的一个或多个化学部分的添加、置换或缺失不同于天然存在的抗原中的相应氨基酸。在一个方面,天然存在的和经修饰的抗原共享至少约 75% 相同的至少 5 个氨基酸的至少一个区域。本领域技术人员将理解,在比较 2 个氨基酸序列以测定其同一性程度方面,相同氨基酸的序列段(stretch)(即,至少 2 个的区域)之间的间隔无需总是精确保持。天然存在的和经修饰的蛋白质或多肽抗原在关于至少 5 个氨基酸的至少一个区域的氨基酸序列中可以显示至少约 80% 的同一性、更可替代地 85%、90%、95% 或大于 99% 的同一性。通常,这对于氨基酸序列长得多的区域(例如,10、20、50 或 100 或更多氨基酸)可以是有用的,以显示指定的同一性程度。

[0210] 在优选实施方案中,抗原作为编码抗原的多核苷酸或基因递送,从而使得基因的表达导致在待治疗的个体(当体内递送)或细胞培养系统(当体外递送时)中的抗原生产。

用于产生核酸包括可表达基因,和用于将此种核酸引入表达系统内的技术是本领域已知的且在下文简要描述,在所述表达系统中将生产由可表达基因编码的任何蛋白质。优选地,将编码抗原的 mRNA 引入 DC 内。

[0211] 在一个实施方案中,免疫原在所述第一种信号前递送,其中第一种信号是 IFN γ R 激动剂或 TNF- α R。可替代地,免疫原在所述第一种信号后和所述第二种信号前递送,或免疫原在所述第二种信号后递送。在另一个实施方案中,免疫原与所述第二种信号基本上同时递送。

[0212] 在任何具体组合物或应用中使用的抗原的量将依赖于具体抗原和其待使用的应用的性质,如本领域技术人员将容易理解的。

[0213] 抗原装载的树突细胞对于引起针对抗原的免疫应答是有用的。因此,在一个方面,本发明提供了引起受试者中的免疫应答的方法,其包括给受试者施用有效量的免疫原装载的 CCR7⁺ 成熟的 DCs。装载的 DCs 对于受试者可以是同种异体或自身的。

[0214] 本发明进一步提供了刺激免疫效应细胞的方法,其包括在通过本发明方法产生的抗原装载的 CCR7⁺ 成熟的 DCs 存在下培养所述细胞,以产生受刺激的免疫效应细胞。在另一个实施方案中,本发明提供了增强受试者中的免疫的方法,其包括给受试者施用有效量的此种受刺激的免疫效应细胞。

[0215] 在本发明的进一步的方面,有效量的细胞因子和 / 或共刺激分子在体外或体内递送给细胞或患者。这些试剂可以作为多肽、蛋白质或可替代地作为编码其的多核苷酸或基因递送。细胞因子、共刺激分子和趋化因子可以作为不纯的制剂(例如表达细胞因子基因的细胞的分离物,对于细胞是内源的或外源的)或以“纯化的”形式提供。纯化的制剂优选是至少约 90% 纯的,或可替代地,至少约 95% 纯的,或再进一步地,至少约 99% 纯的。可替代地,可以提供编码细胞因子的基因或诱导剂,从而使得基因表达导致在待治疗的个体或另一种表达系统中(例如,体外转录 / 翻译系统或宿主细胞)中的细胞因子或诱导剂产生,表达的细胞因子或诱导剂可以由所述表达系统获得用于施用于个体。

[0216] 当细胞因子和抗原都将递送给个体时,它们可以一起或分开提供。当它们作为多肽或蛋白质递送时,它们可以以常见的包裹设备或通过物理结合例如共价键、氢键合、疏水相互作用、范德瓦尔斯 (van der Waals) 相互作用等进行递送。在可替代的实施方案中,化合物可以一起提供,提供编码两者的基因。例如,关于两者的基因可以作为相同核酸分子的部分提供。在一些实施方案中,这种核酸分子可以这样制备,从而使得 2 种因子都由单个邻接多核苷酸表达,作为其中细胞因子和抗原经由肽键彼此共价连接的融合蛋白。可替代地或另外地,基因可以与相同或等价对照序列连接,从而使得 2 种基因变得在响应于相同刺激的个体内表达。在不同条件下在不同宿主细胞中有活性的广泛多样的不同对照序列是本领域已知的。这些对照序列,包括组成性对照序列、诱导型对照序列和阻遏型对照序列可以依照本发明使用,尽管诱导型或阻遏型序列对于其中希望基因表达的时间选择进行另外的控制的应用是特别优选的。

[0217] 本领域技术人员理解,细胞因子和 / 或抗原的施用可以任选与任何其他所需免疫系统调节因子例如佐剂或其他免疫调节化合物的施用组合。

[0218] 抗原还可以以编码抗原的多核苷酸或基因的形式递送。抗原还可以通过借助于肽键使来自第一种多肽(例如,第一种抗原)的序列的部分与来自第二种多肽(例如,第二种

抗原、信号序列、跨膜结构域、纯化柄 (handle) 等) 的序列的部分连接进行修饰。本领域普通技术人员将理解依照本发明使用的此种融合蛋白的多样性。重组技术进一步允许通过氨基酸序列的置换、缺失、添加或逆转现成修饰多肽或蛋白质抗原的氨基酸序列。

[0219] 当免疫原是抗原的片段时,它可以例如通过分离的蛋白质的蛋白酶剪切来产生。多种切割试剂中的任何一种都可以使用,包括但不限于,胃蛋白酶、溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等。可替代地,肽可以化学合成,优选在自动合成仪上,如本领域可用的(参见,例如,Stewart 等人,Solid Phase Peptide Synthesis,第 2 版,Pierce Chemical Co.,1984。同样,重组技术可以用于生成编码目的肽的核酸,和在所需条件下表达那种肽(例如,在它可以从中容易地纯化的宿主细胞或体外表达系统中)。

[0220] 在优选实施方案中,抗原来自癌细胞或病原体。优选地,赘生性细胞是肾癌细胞、多发性骨髓瘤细胞或黑素瘤细胞。优选的病原体是 HIV 和 HCV。在优选实施方案中,抗原以从赘生性细胞或病原体中分离或衍生的 RNA 的形式递送给抗原呈递细胞。用于从任何细胞(例如,赘生性细胞或病原体细胞)中提取的 RNA 的 RT-PCR 和体外转录的方法公开于共同未决的 WO 2006/031870 和 WO 2005/052128 中,所述申请的内容引入作为参考。

[0221] 依照本发明使用的抗原可以是天然存在的化合物,或可以可替代地具有不同于任何天然存在的化合物的结构。在本发明的某些实施方案中,抗原是“经修饰的抗原”,因为抗原具有与天然存在的抗原的那种基本上相同的结构,但包括与天然存在的化合物的精确结构的一个或多个差异。

[0222] 本发明还提供了通过本文描述的任何方法制备的成熟的 DCs 的富集群体。通过本发明的方法制备的成熟的 DCs 具有增强的免疫刺激特征。在另一个方面,本发明提供了用于储藏成熟的 DCs 的富集群体的方法,其包括在合适的条件下使本发明的富集的树突细胞群体与合适的深低温保藏剂接触。

[0223] 本文描述的组合物通过给受试者施用有效量的细胞的富集群体对于引起受试者中的免疫应答是有用的,所述细胞例如 DCs、经修饰的 DCs、或驯化的免疫效应细胞。细胞可以是同种异体或自身的。它们可以施用于受试者以引起或诱导受试者中的免疫应答,其包括给受试者施用有效量的如上所述的富集群体。细胞对于受试者可以是同种异体或自身的。它们还可以通过在本发明成熟的 DCs 的存在下和以本发明成熟的 DCs 为代价培养免疫效应细胞,用于驯化免疫效应细胞例如 T 细胞。驯化的效应细胞也可以通过给受试者递送有效量的这些细胞用于增强受试者中的免疫。

[0224] 用于产生和递送多核苷酸的方法

[0225] 本发明的某些实施方案要求使用多核苷酸。这些可以使用本领域已知的任何方法来产生和复制,例如本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业 DNA 合成仪以复制 DNA。可替代地,它们可以通过提供多核苷酸的线性序列、合适的引物分子、化学药品例如酶和说明书来获得,所述说明书用于其复制和以化学方法复制或以合适方向连接核苷酸以获得多核苷酸。在分开的实施方案中,这些多核苷酸得到进一步分离。再进一步地,本领域技术人员可以将多核苷酸插入合适的复制载体内,且将载体插入合适的宿主细胞(原核的或真核的)内用于复制和扩增。如此扩增的 DNA 可以通过本领域技术人员众所周知的方法从细胞中分离。在本文中进一步提供了用于通过这种方法获得多核苷酸的过程以及如此获得的多核苷酸。

[0226] 在一个实施方案中,试剂(例如,CD40L)作为 mRNA 递送。RNA 可以通过首先将 DNA 多核苷酸插入合适的宿主细胞内或优选地通过体外转录来获得。DNA 可以通过任何合适的方法插入,例如通过使用合适的基因递送载体(例如,脂质体、质粒或载体)或通过电穿孔。当细胞复制和 DNA 转录成 RNA 时;RNA 随后可以使用本领域技术人员众所周知的方法进行分离,例如如 Sambrook 等人(1989)同上中所述。例如,mRNA 可以根据 Sambrook 等人(1989)同上中所述的程序使用各种裂解酶或化学溶液进行分离,或根据由制造商提供的附随说明书通过核酸结合树脂进行提取。

[0227] 在优选实施方案中,CD40L 表达盒包含适合于体外转录的启动子,例如 T7 启动子或 SP6 启动子。优选地,体外转录的 CD40L 或 CD40 激动剂 mRNA 就稳定性和翻译效率进行最优化。例如,SEQ ID NO:13 表示最优化的 CD40L mRNA,其中 5' 非翻译区中的 ATG 密码子已进行改变,以避免翻译的不正确起始。在一个实施方案中,CD40L RNA 对应于 SEQ ID NO:31。如本文所使用的,当相应的核糖核苷酸或其类似物代替脱氧核糖核苷酸(例如,核糖腺嘌呤(rA)代替脱氧核糖腺嘌呤(dA);核糖鸟嘌呤(rG)代替脱氧核糖鸟嘌呤(dG);核糖胞苷(rC)代替脱氧核糖胞苷(dC);和(核糖)尿苷(uradine)代替脱氧胸苷(dT))时,RNA“对应于”以 SEQ ID NO 给出的 DNA 序列。

[0228] mRNA 稳定性和/或翻译效率还可以通过在 mRNA 中包括 3'UTRs 和或 5'UTRs 得到增加。3'UTRs 的优选例子包括来自人 CD40、 β -肌动蛋白和轮状病毒基因 6 的那些。5'UTRs 的优选例子包括 CD40L,以及 Hsp70、VEGF、脾脏坏死病毒 RU5 和烟草蚀斑病毒的 5'UTRs 中的翻译增强子。

[0229] 例如,CD40L 表达正常通过 3'UTR 介导的 mRNA 不稳定性得到部分调节,且因此大部分 CD40L 3'UTR 不包括在目前的 CD40L mRNA 中。CD40L 正常在 DCs 中不表达。相比之下,CD40 受体在 DCs 中表达,并且在文献中不存在指示其表达在转录后,特别是在 mRNA 稳定性水平上调节的证据。在 CD40L mRNA 的 3'末端或区域上包括 CD40 受体 3'UTR(SEQ ID NO:14,或其活性片段)将给予类似于天然存在的 CD40 信使的 RNA 3'非翻译序列,而不赋予任何不需要的调节活性。

[0230] β -肌动蛋白是在人非肌肉细胞中丰富表达的基因。人 β -肌动蛋白启动子已广泛用于驱动哺乳动物细胞系和转基因小鼠中的基因表达。 β -肌动蛋白 3'UTR 加侧翼区的包括已证实进一步增加来自包含 β -肌动蛋白启动子的基因表达构建体的 mRNA 积聚水平。Qin 和 Gunning(1997)Journal of Biochemical and Biophysical Methods 36 第 63-72 页。SEQ ID NO:15 表示人 β -肌动蛋白 3'UTR 的最后一个外显子的非翻译区。SEQ ID NO:16 显示这种 3'UTR 的最小区域。

[0231] 猿猴轮状病毒基因 6 的 3'UTR(SEQ ID NO:17)mRNA 在其加帽的、非多腺苷酸化的病毒转录物中充当翻译增强子。3'UTR 也已显示增强兔网织红细胞裂解物中的异源报道 mRNA 的翻译。Yang 等人,2004Archives of Virology 149:303-321。这种 3'UTR 的最小功能元件显示于 SEQ ID NO:18 中。

[0232] 人 hsp70 基因的 5'UTR(SEQ ID NO:19)已显示在不存在应激诱导的情况下增加报道 mRNAs 的翻译且不显著影响信使稳定性。增强子功能已在许多人细胞系中得到证实。Vivinus,等人,2001 European Journal of Biochemistry 268:1908-1917。

[0233] 小鼠 VEGF 5'UTR(SEQ ID NO:20)增强单顺反子报道 RNA 的翻译且还具有 IRES(内

部核糖体进入位点)活性。它的增强子活性已在大鼠、仓鼠和人细胞系中得到证实。全长 5'UTR 是 1014 个核苷酸,但 163 核苷酸突变形式 (SEQ ID NO:21) 显示是更有活性的。Stein 等人,1998 *Molecular and Cellular Biology* 18:3112-3119。

[0234] 脾脏坏死病毒 (SNV) 是禽类逆转录病毒。病毒 5'LTR 的 RU5 区域 (SEQ ID NO:22) 刺激非病毒报道 RNA 在人 293 细胞中的翻译效率。Roberts 和 Boris-Lawrie (2000) *Journal of Virology* 74:8111-8118。

[0235] 烟草蚀斑病毒 RNA 的 143 核苷酸 5' 前导区 (SEQ ID NO:23) 促进报道 mRNAs 在植物和动物细胞系中的帽不依赖性翻译。尽管前导序列不进一步增强加帽转录物的翻译,但在树突细胞中的帽不依赖性 CD40L 表达是体外加帽非常有吸引力的替代方法。Gallie 等人 (1995) *Gene* 165:233-238。Niepel 和 Gallie (1999) *Journal of Virology* 73:9080-9088。Gallie, *Journal of Virology* (2001) 75:12141-12152。

[0236] 人珠蛋白 mRNAs 在红细胞祖细胞中是高度稳定的,具有 16-20 小时的半衰期。 α -和 β -珠蛋白 mRNA 稳定性的顺式作用元件已充分定义且位于每个信使的 3' 非翻译区中 (Holcik 和 Lieberhaber, 1997 *PNAS* 94:2410-2414;和 Yu 和 Russell, 2001, *Molecular and Cellular Biology* 21(17):5879-5888)。人 α -珠蛋白 3' UTR 的序列显示于 SEQ ID NO:27 中。人 β -珠蛋白 3' UTR 的序列显示于 SEQ ID NO:28 中。人 β -珠蛋白 3' UTR、减去富含嘌呤的元件 3 的序列显示于 SEQ ID NO:29 中。

[0237] 树突细胞可以通过本领域已知的方法用核酸进行转染,所述方法包括但不限于磷酸钙沉淀、显微注射或电穿孔。它们可以单独或与合适的载体组合添加,所述载体例如药学上可接受的载体例如磷酸缓冲盐水。可替代地或另外地,核酸可以整合入表达或插入载体内用于整合入细胞内。包含启动子和多核苷酸可以可操作地连接到其内的克隆位点的载体是本领域已知的。此种载体能够在体外或体内转录 RNA,且从诸如 Stratagene (La Jolla, CA) 和 Promega Biotech (Madison, WI) 的来源商购可得。为了最优化表达和/或体外转录,可能必须去除、添加或改变克隆的 5' 和/或 3' 非翻译部分,以消除额外的、潜在在不合适的可替代翻译起始密码子,或可能在转录或翻译水平上干扰或减少表达的其他序列。可替代地,共有核糖体结合位点可以紧插入起始密码子的 5' 以增强表达。载体的例子是病毒,例如杆状病毒和逆转录病毒、噬菌体、腺病毒、腺伴随病毒,粘粒,质粒,真菌载体和一般在本领域中使用的其他重组载体,所述载体已描述用于在多种真核和原核宿主中表达,且可以用于基因疗法以及用于单一蛋白质表达。

[0238] 在这些中是几种非病毒载体,包括 DNA/脂质体复合物、和靶向的病毒蛋白质 DNA 复合物。为了增强给细胞的递送,本发明的核酸或蛋白质可以与结合细胞表面抗原的抗体或其结合片段缀合。还包含靶向抗体或其片段的脂质体可以在本发明的方法中使用。本发明还提供了用于在本文公开的方法中使用的靶向复合物。

[0239] 使用本领域已知的方法将多核苷酸插入载体基因组内。例如,插入片段和载体 DNA 可以在合适的条件下与限制酶接触,以产生在每个分子上的互补末端,所述互补末端可以彼此配对且用连接酶连接在一起。可替代地,合成的核酸接头可以与限制酶切多核苷酸的末端连接。这些合成接头包含对应于载体 DNA 中的具体限制位点的核酸序列。另外地,包含终止密码子和合适限制位点的寡核苷酸可以进行连接,用于插入包含例如下述中的一些或全部的载体内;选择标记基因,例如用于在哺乳动物细胞中选择稳定或瞬时转染子的新霉

素基因 ; 来自人 CMV 的立即早期基因的增强子 / 启动子序列用于高水平的转录 ; 来自 SV40 的转录终止和 RNA 加工信号用于 mRNA 稳定性 ; SV40 多瘤复制起点和 CoIE1 用于正确的附加型复制 ; 通用的多克隆位点 ; 以及 T7 和 SP6RNA 启动子用于有义和反义 RNA 的体外转录。其他方法是本领域已知和可用的。

[0240] 蛋白质和多肽的制备和分离

[0241] 多肽和蛋白质是本发明的各种方法的必需组分。蛋白质和多肽可以通过化学合成使用商购可得的自动化肽合成仪例如由 PerkinElmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430A 或 431A, Foster City, CA, USA 制造的那些来获得。合成蛋白质或多肽可以进行沉淀和进一步纯化, 例如通过高效液相层析 (HPLC)。可替代地, 蛋白质和多肽可以通过如本文描述的已知重组法使用下文描述的宿主细胞和载体系统来获得。

[0242] 本领域技术人员众所周知的是可以对任何肽进行修饰以为其提供改变的性质。如本文所使用的, 术语“氨基酸”指天然和 / 或非天然或合成氨基酸, 包括甘氨酸以及 D 和 L 光学异构体、和氨基酸类似物和肽模拟物。如果肽链短, 那么 3 个或更多氨基酸的肽通常称为寡肽。如果肽链长, 那么肽通常称为多肽或蛋白质。用于在本发明中使用的肽可以进行修饰以包括非天然氨基酸。因此, 肽可以包含 D- 氨基酸, D- 和 L- 氨基酸的组合, 和各种“设计者 (designer)”氨基酸 (例如, β - 甲基氨基酸、C- α - 甲基氨基酸、和 N- α - 甲基氨基酸等) 以对肽赋予特殊性质。另外地, 通过在特定偶联步骤指定特定氨基酸, 可以产生具有 α - 螺旋、 β 转角、 β 折叠、 γ - 转角的肽和环肽。在进一步的实施方案中, 将选择赋予有用的化学和结构性质的肽的亚单位。例如, 包含 D- 氨基酸的肽可以在体内对 L- 氨基酸特异性蛋白酶有抵抗作用。具有 D- 氨基酸的经修饰的化合物可以用以倒序比对的氨基酸合成, 以产生作为逆-反 (retro-inverso) 肽的本发明的肽。此外, 本发明设想制备具有更佳确定的结构性质的肽, 以及肽模拟物和肽模拟物键例如酯键的使用, 以制备具有新性质的肽。在另一个实施方案中, 可以产生掺入还原肽键的肽, 即 $R_1-CH_2NH-R_2$, 其中 R_1 和 R_2 是氨基酸残基或序列。还原肽键可以作为二肽亚单位引入。此种分子将对肽键水解例如蛋白酶活性有抵抗作用。此种分子将提供具有独特功能和活性的肽, 例如由于对代谢断裂或蛋白酶活性的抵抗力在体内延长的半衰期。此外, 众所周知的是在某些系统中, 受约束的肽显示增强的功能活性 (Hruby (1982) Life Sciences 31:189-199 和 Hruby 等人 (1990) Biochem 3. 268: 249-262); 本发明提供了产生在所有其他位置上掺入随机序列的受约束的肽的方法。

[0243] 用于分离干细胞的方法

[0244] 用于分离和扩增 $CD34^+$ 干细胞的许多方法是本领域已知的用于体外扩增和分化成树突细胞。参见例如, 其内容引入作为参考的 U. S. 5, 199, 942。下述说明书仅用于举例说明性目的且决不意欲限制本发明的范围。

[0245] $CD34^+$ 干细胞可以从骨髓细胞中分离或通过用抗体淘选骨髓细胞或其他来源进行分离, 所述抗体结合不需要的细胞, 例如 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ (T 细胞)、 $CD45^+$ (panB 细胞) 和 GR-1。关于这种规程的详细描述, 参见 Inaba 等人 (1992) 3. Exp. Med. 176:1693-1702。人 $CD34^+$ 细胞可以得自多种来源, 包括脐带血、骨髓外植体和动员的外周血。 $CD34^+$ 细胞的纯化可以通过抗体亲和程序来完成。参见, 例如, Paczesny 等人 (2004) 3Exp Med. 199:1503-11; Ho 等人 (1995) Stem Cells 13(suppl. 3):100-105; Brenner (1993) Journal of Hematotherapy 2:7-17; 和 Yu 等人 (1995) PNAS 92:699-703。

[0246] 干细胞分化成未成熟的树突细胞

[0247] CD34⁺ 干细胞可以通过使细胞与合适的细胞因子温育分化成树突细胞。Inaba 等人 (1994) 同上, 描述了通过使干细胞与鼠 GM-CSF 温育的鼠干细胞在体外分化成树突细胞。简言之, 分离的干细胞在标准 RPMI 生长培养基中与 1-200ng/ml 鼠 GM-CSF, 和优选约 20ng/ml GM-CSF 温育。培养基每隔一天用新鲜培养基更换约 1 次。培养约 5-7 天后, 如通过表面标记的表达和形态学评估的, 大部分细胞是树突的。树突细胞通过荧光激活细胞分选术 (FACS) 或通过其他标准方法进行分离。

[0248] 鼠 CD34⁺ 干细胞可以通过使细胞与鼠 GM-CSF 一起培养分化成树突细胞。一般地, 培养物中的 GM-CSF 浓度为至少约 0.2ng/ml, 和优选至少约 1ng/ml。通常范围将为约 20ng/ml-200ng/ml。在许多优选实施方案中, 剂量将是约 100ng/ml。IL-4 任选以类似范围加入用于制备鼠 DCs。

[0249] 人 CD34⁺ 造血干细胞优选通过使细胞与人 GM-CSF 和 TNF- α 一起培养在体外进行分化。参见例如, Szabolcs 等人 (1995) 154 :5851-5861。人 GM-CSF 以类似范围使用, 并且还可以添加 TNF- α 以促进分化。TNF- α 一般也以大约相同的范围添加。任选地, SCF 或其他增殖配体 (例如 Flt3) 以类似的剂量范围添加以使人 DCs 分化。

[0250] 如对于本领域技术人员显而易见的, 用于使干细胞和单核细胞分化成树突细胞的剂量范围是近似的。不同供应商和来自相同供应商的不同细胞因子批次在细胞因子的活性方面不同。技术人员可以容易地滴定用于测定对于任何具体细胞因子的最佳剂量的每种细胞因子。

[0251] 单核细胞分化成树突细胞

[0252] DCs 可以通过在包含 GM-CSF 和 IL-4 或 GM-CSF 和 IL-13 的培养基中培养, 由外周血中常见的但非增殖性 CD14⁺ 前体 (单核细胞) 产生 (参见, 例如, W097/29182)。这种方法在 Sallusto 和 Lanzavecchia (1994) J. Exp. Med. 179 :1109 和 Romani 等人 (1994) J. Exp. Med. 180 :83 中得到描述。简言之, CD14⁺ 前体是丰富的, 从而使得用细胞因子例如 G-CSF (用于增加外周血中的 CD34⁺ 细胞和更定型的前体) 预处理患者被报告在大多数情况下是不需要的 (Romani 等人 (1996) J. Immunol. Methods

[0253] 196 :137)。其他人已报告通过这种方法产生的 DCs 看起来是相当同质的, 且可以以未成熟的或完全分化或成熟的状态产生。显示通过使用自身的单核细胞条件培养基作为成熟刺激可能避免非人蛋白质例如 FCS (胎牛血清), 且获得完全和不可逆的成熟和稳定的 DCs (Romani 等人 (1996) Immunol. Methods 196 :137; Bender 等人 (1996) J. Immunol. Methods 196 :121)。然而, 与本发明形成对比, 这些研究不导致具有增加水平的 IL-12 和/或减少水平的 IL-10 的成熟的 DC。

[0254] 抗原装载

[0255] 使树突细胞装载抗原的方法是本领域技术人员已知的。在一个实施方案中, 树突细胞在包含抗原的培养基中进行培养。DCs 随后在细胞表面上吸收且加工抗原与 MHC 分子结合。优选地, DCs 通过用编码抗原的核酸转染来装载抗原。转染 DCs 的方法是本领域技术人员已知的。

[0256] T 细胞的分离和扩增

[0257] 在本发明的一些方法中, T 细胞从哺乳动物中进行分离, 从而使得它们可以在体外

通过成熟的、经修饰的 DC 进行驯化（或活化）。在一种方法中，Ficoll-Hypaque 密度梯度离心根据确定的程序用于使 PBMC 与红细胞和嗜中性粒细胞分开。细胞用补加有 1% 胎牛血清（FBS）的经修饰的 AIM-V（其由 AIM-V（GIBCO）与 2mM 谷氨酰胺、10 μ g/ml 硫酸庆大霉素、50 μ g/ml 链霉素组成）进行洗涤。T 细胞根据标准技术通过用与柱或磁珠偶联的合适单克隆抗体的负或正选择进行富集。等分试样的细胞就细胞表面表型包括 CD4、CD8、CD3 和 CD14 进行分析。仅用于举例说明性目的，细胞进行洗涤且以约 5×10^5 细胞/ml 如上所述修饰且包含 5% FBS 和 100U/ml 重组 IL-2（rIL-2）的 AIM-V（补加的 AIM-V）的浓度进行重悬浮。当细胞从 HIV⁺ 患者中分离时，将 25nM CD4-PE40（由与铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素 A 的易位和 ADP-核糖基化结构域连接的 HIV-1-结合 CD4 结构域组成的重组蛋白质），或与 HIV 选择性杂交的其他类似重组细胞毒性分子加入细胞培养物中用于细胞扩增的其余部分，以从培养物中选择性去除受 HIV 感染的细胞。CD4-PE40 已显示抑制受 HIV 感染的细胞培养物中的 p24 生产和选择性杀死受 HIV-1 感染的细胞。

[0258] 为了刺激增殖，可以加入 OKT3 单克隆抗体（Ortho Diagnostics）至 10ng/ml 的浓度，并且细胞用 0.5ml/孔在 24 孔板中铺平板。细胞在约 37℃ 下在含 5% CO₂ 的湿润培养箱中培养 48 小时。培养基从细胞中吸出且可以加入 1ml 包含载体的上清液（下文描述），所述上清液补加有 5 μ l/ml 硫酸鱼精蛋白、100U/ml rIL-2、100U/ml 青霉素、0.25 μ g/ml 两性霉素 B/ml 和另外 100 μ g/ml 链霉素（25nM CD4-PE40）。

[0259] 细胞分离和表征

[0260] 在另一个方面，细胞表面标记可以用于分离实践本发明方法所需的细胞。例如，人干细胞一般表达 CD34 抗原，而 DCs 表达 MHC 分子和共刺激分子（例如，B7-1 和 B7-2），缺乏对粒细胞、NK 细胞、B 细胞和 T 细胞特异的标记。表面标记的表达促进这些细胞的鉴定和纯化。这些鉴定和分离法包括 FACS、柱层析、用磁珠淘选、蛋白质印迹、放射显影法、电泳、毛细管电泳、高效液相层析（HPLC）、薄层层析（TLC）、超扩散（hyperdiffusion）层析等，和各种免疫学方法例如流体或凝胶沉淀素反应、免疫扩散（单重或双重）、免疫电泳、放射免疫测定（RIAs）、酶联免疫吸附测定（ELISAs）、免疫荧光测定等。关于一般而言的免疫学和免疫测定程序的综述，参见 Stites 和 Terr（编辑）1991 Basic and Clinical Immunology（第 7 版）和 Paul 同上。关于如何制备对选择的抗原的抗体的讨论，参见 Harlow 和 Lane（1989）同上。

[0261] 用于在细胞纯化期间检测细胞的细胞分离或免疫测定可以以几种构型中的任何一种来进行，例如在下述参考文献中综述的那些：Maggio（编辑）（1980）Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Fla.；Tijan（1985）“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays,” Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam；Harlow 和 Lane, 同上；Chan（编辑）（1987）Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, Fla.；Price 和 Newman（编辑）（1991）Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY；和 Ngo（编辑）（1988）Non-isotopic Immunoassays Plenum Press, NY。

[0262] 细胞可以通过流式细胞术法例如 FACS 分析进行分离和表征。广泛多样的流式细胞术法是已知的。关于荧光激活流式细胞术的一般综述，参见例如，Abbas 等人（1991）Cellular and Molecular immunology W.B. Saunders Company, 特别是第 3 章和

Kuby(1992) Immunology W. H. Freeman and Company, 特别是第 6 章。FACS 机器可从例如 Becton Dickinson 获得。

[0263] 可以用于标记细胞抗原的标记试剂包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、蛋白质或其他聚合物例如亲和基质、碳水化合物或脂质。检测通过任何已知方法来进行, 例如免疫印迹, 蛋白质印迹分析, 放射性或生物发光标记的追踪, 毛细管电泳, 或基于大小、电荷或亲和力追踪分子的其他方法。

[0264] 抗体

[0265] 这个方法的某些方面需要使用抗体。此种抗体可以是单克隆或多克隆的。它们可以是抗体衍生物或抗体变体。它们可以是嵌合、人源化、或全人的。使用蛋白质或多肽, 本领域技术人员可以另外产生与受体特异性结合的抗体。还可以使用抗体的功能片段或衍生物, 包括 Fab、Fab'、Fab2、Fab'2、和单链可变区。抗体可以在细胞培养、噬菌体、或各种动物中产生, 所述动物包括但不限于牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、羊、狗、猫、猴、黑猩猩、猿等。只要片段或衍生物保留关于蛋白质或其片段的结合特异性, 它就可以使用。抗体可以就结合特异性进行测试, 这通过在给定条件组下使与合适抗原的结合和与无关抗原或抗原混合物的结合比较实现。如果抗体与合适抗原的结合为与无关抗原或抗原混合物的至少 2、5、7 和优选 10 倍, 那么它视为特异性的。

[0266] 用于制备此种部分至全人抗体的技术是本领域已知的, 并且任何此种技术都可以使用。根据一个实施方案, 全人抗体序列可以在转基因小鼠中制备, 所述转基因小鼠已进行工程改造以表达人重和轻链抗体基因。已制备此种转基因小鼠的多条链, 其可以产生不同类别的抗体。来自产生所需抗体的转基因小鼠的 B 细胞可以进行融合, 以制备杂交瘤细胞系用于持续生产所需抗体。参见例如, Russel 等人 (2000) Infection and Immunity April 2000 :1820-1826 ; Gallo 等人 (2000) European J. of Immun. 30 :534-540 ; Green (1999) J. of Immun. Methods 231 :11-23 ; Yang 等人 (1999A) J. of Leukocyte Biology 66 :401-410 ; Yang (1999B) Cancer Research 59 (6) :1236-1243 ; Jakobovits (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 31 :33-42 ; Green and Jakobovits (1998) Exp. Med. 188 (3) :483-495 ; Jakobovits (1998) Exp. Opin. Invest. Drugs 7 (4) :607-614 ; Tsuda 等人 (1997) Genomics 42 :413-421 ; Sherman-Gold (1997). Genetic Engineering News 17 :14 ; Mendez 等人 (1997) Nature Genetics 15 :146-156 ; Jakobovits (1996) WEIR' S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, THE INTEGRATED IMMUNE SYSTEM VOL. IV, 194. 1-194. 7 ; Jakobovits (1995) Current Opinion in Biotechnology 6 :561-566 ; Mendez 等人 (1995) Genomics 26 :294-307 ; Jakobovits (1994) Current Biology 4 :761-763 ; Arbones 等人 (1994) Immunity 1 :247-260 ; Jakobovits (1993) Nature 362 :255-258 ; Jakobovits 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :2551-2555 ; Kucherlapati 等人 U. S. Patent No. 6, 075, 181。

[0267] 抗体还可以使用噬菌体展示技术来制备。此种技术可以用于分离最初抗体或产生具有改变的特异性或抗体亲抗原性特征的变体。单链 Fv 也可以方便地使用。需要时, 它们可以由接种疫苗的转基因小鼠制备。

[0268] 本发明的抗体也可以进行修饰以生成嵌合抗体。嵌合抗体是其中抗体的重和轻链的各个结构域由来自超过一个物种的 DNA 编码的抗体。参见, 例如, 美国专利号 :

4, 816, 567。

[0269] 术语“抗体变体”还包括其为具有 2 个抗原结合部位的小抗体片段的“双抗体”，其中片段包含在相同多肽链中与轻链可变结构域 (VL) 连接的重链可变结构域 (VH) (VH VL)。参见例如，EP 404, 097 ;W093/11161 ;和 Hollinger 等人，(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448。通过使用太短而不允许相同链上的 2 个结构域之间配对的接头，结构域被迫与另一条链的互补结构域配对，且产生 2 个抗原结合部位。还参见 Chen 等人的美国专利号 6, 632, 926，所述专利公开了这样的抗体变体，其具有插入亲本抗体的高变区内的一个或多个氨基酸和对于靶抗原的结合亲和力，所述结合亲和力为亲本抗体对于抗原的结合亲和力的至少约 2 倍。该术语还包括对于抗体或片段的线性多肽序列的翻译后修饰。术语“抗体变体”进一步包括“线性抗体”。用于制备此种变体的程序是本领域已知的，且在 Zapata 等人 (1995)Protein Eng. 8(10) :1057-1062 中得到描述。简言之，这些抗体包含串联 Fd 区段对 (VH ~ CH 1-VH-CH1)，其形成抗原结合区域对。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0270] 检测核酸的方法

[0271] 已知用于定量目的基因（例如，CD40L 和 / 或 IL-12p35）的表达的各种方法，且包括但不限于杂交测定（RNA 印迹分析）和基于 PCR 的杂交测定。在关于 mRNA 水平例如 IL-12p35mRNA 或 CD40L mRNA 中的改变的测定中，可以首先提取样品中包含的核酸。例如，mRNA 可以根据 Sambrook 等人 (1989) 同上中所述的程序使用各种裂解酶或化学溶液进行分离，或根据由制造商提供的附随说明书通过商购可得的核酸结合树脂进行提取。提取的核酸样品中包含的 mRNA 随后可以根据标准程序分别使用核酸探针和 / 或引物通过杂交（例如，RNA 印迹分析）和 / 或扩增程序进行检测。

[0272] 具有至少 10 个核苷酸和显示出与待检测核酸的序列互补性或同源性的核酸分子在诊断法中可以用作杂交探针或引物。本领域已知“完美匹配的”探针是特异性杂交所需的。通过小数目碱基的置换、缺失或插入来达到的探针序列中的较小改变不影响杂交特异性。一般而言，可以耐受多达 20% 的碱基对错配（当最佳比对时）。例如，用于检测 CD40LmRNA 的探针与先前鉴定的序列中包含的可比较大小的同源区域至少约 80% 等同，例如，参见 SEQ ID NOS :1 或 3。可替代地，在同源区域的比对后，探针与相应基因序列至少 85% 或甚至至少 90% 等同。片段的总体大小以及互补序列段的大小将依赖于具体核酸区段的预期用途或应用。较小的基因片段一般将在杂交实施方案中找到用途，其中互补区的长度可以不同，例如约 10- 约 100 个核苷酸，或甚至根据希望检测的互补序列是全长。

[0273] 具有在长度超过约 10 个核苷酸的序列段上的互补序列的核苷酸探针将增加杂交物 (hybrid) 的稳定性和选择性，且从而改善获得的具体杂交分子的特异性。人们可以设计具有长度超过约 25 个和甚至更优选超过约 50 个核苷酸，或需要时甚至更长的基因互补序列段的核酸分子。此种片段可以通过下述容易地制备：例如经由化学方法直接合成片段，经由应用核酸复制技术，例如使用如美国专利号 4, 603, 102 中描述的双引发寡核苷酸的 PCRTM 技术，或经由将所选择的序列引入重组载体内用于重组生产。

[0274] 在某些实施方案中，使用本发明的核酸序列与合适的工具例如标记组合用于检测杂交和因此的互补序列将是有利的。广泛多样的合适的指示工具是本领域已知的，包括能够产生可检测信号的荧光、放射性、酶促或其他配体，例如抗生物素蛋白 / 生物素。还可以

使用荧光标记或酶标记例如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶代替放射性或其他不合环境需要的试剂。在酶标记的情况下,比色指示剂底物是已知的,其可以用于提供人眼或分光光度计测量可见的工具,以鉴定与包含互补核酸的样品的特异性杂交。

[0275] 杂交反应可以在不同“严格性”条件下进行。相关条件包括温度、离子强度、温育时间、反应混合物中的另外溶质例如甲酰胺的存在、和洗涤程序。较高的严格条件是例如较高的温度和较低的钠离子浓度的那些条件,这要求杂交元件之间较高的最小互补性用于形成稳定的杂交复合物。增加杂交反应的严格性的条件是本领域广泛已知且公开的。参见 Sambrook 等人 (1989) 同上。人们还可以使用定量 PCR 或高通量分析例如如 Velculescu 等人 (1995) Science 270 :484-487 中描述的基因表达系列分析 (Serial Analysis of Gene Expression) (SAGE) 检测和定量 mRNA 水平或其表达。简言之,该方法包括从怀疑包含转录物的细胞或组织样品中分离多种 mRNAs。任选地,基因转录物可以转变成 cDNA。对基因转录物的取样实施序列特异性分析且定量。这些基因转录物序列丰度针对参考数据库序列丰度,包括关于患病和健康患者的正常数据集进行比较。患者具有该患者的数据集与之最紧密相关的疾病,且对于这种应用包括转录物的差别。

[0276] 在某些方面,可能必须使用多核苷酸作为核苷酸探针或引物用于扩增和检测基因或基因转录物。用于检测差别表达的 mRNA 的引物与可比较大小的基因或多核苷酸的同源区域至少约 80% 等同。为了本发明的目的,扩增意指使用能够以合适的保真度复制靶序列的引物依赖性聚合酶的任何方法。扩增可以通过天然或重组 DNA 聚合酶来进行,例如 T7DNA 聚合酶、大肠杆菌 (*E. coli*) DNA 聚合酶的克列诺 (Klenow) 片段、和逆转录酶。

[0277] 关于 PCR 的一般程序在 MacPherson 等人, PCR :A PRACTICAL APPROACH, (IRL Press at Oxford University Press (1991)) 中教导。然而,用于每种应用反应的 PCR 条件以经验为主进行测定。许多参数影响反应的成功。在它们中有退火温度和时间,扩增时间, Mg^{2+} ATP 浓度, pH, 以及引物、模板和脱氧核糖核苷酸的相对浓度。

[0278] 扩增后,所得到的 DNA 片段可以通过琼脂糖凝胶电泳随后用溴化乙锭染色和紫外线照明显现进行检测。差别表达的目的基因的特异性扩增可以通过证实下述进行验证:扩增的 DNA 片段具有预期大小,显示预期的限制酶切消化模式、和 / 或与正确克隆的 DNA 序列杂交。用于检测基因表达的其他方法是本领域技术人员已知的。参见,例如,国际 PCI 申请号 W097/10365, 美国专利号 5,405,783、5,412,087 和 5,445,934、5,405,783 ;5,412,087 ; 5,445,934 ;5,578,832 ;5,631,734 ; 和 LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 第 24 卷 :Hybridization with Nucleic Acid Probes, Tijssen 编辑 Elsevier, N. Y. (1993)。

[0279] 用于检测和定量蛋白质或多肽的方法

[0280] 多种技术在本领域中可用于蛋白质分析,并且包括但不限于放射免疫测定、ELISA (酶联免疫放射测定)、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、原位免疫测定 (使用例如胶体金、酶或放射性同位素标记)、蛋白质印迹分析、免疫沉淀测定、免疫荧光测定和 PAGE-SDS。

[0281] 先体外后体内治疗

[0282] 如上所述,本发明还提供了使用通过本发明方法产生的树突细胞或驯化 T 细胞的先体外后体内治疗方法。例如,用免疫原转化的树突细胞可以用于在体外活化细胞毒性和

辅助 T 细胞。可替代地,将转化的树突细胞引入哺乳动物内以在体内活化 T 细胞。再进一步地,可以将体外驯化的 T 细胞引入哺乳动物内,在其中它们针对具有抗原肽的靶细胞是细胞毒性的,所述抗原肽对应于 T 细胞进行活化以识别 I 类 MHC 分子上的那些。这些靶细胞一般是癌细胞,或在其 MHC I 类表面上表达独特的抗原肽的受感染细胞。

[0283] 类似地,识别在 MHC II 类背景中的抗原肽的辅助 T 细胞也可以由本发明的 DCs 进行刺激,其包含在 I 类和 II 类 MHC 背景中的抗原肽。辅助 T 细胞还刺激针对靶细胞的免疫应答。如同细胞毒性 T 细胞一样,辅助 T 细胞用重组 DCs 在体外或体内进行刺激。

[0284] 树突细胞和 T 细胞可以从 DCs 和 / 或活化 T 细胞施用到其内的哺乳动物中分离。可替代地,细胞可以是同种异体的,由供体提供的或贮藏于细胞库中(例如,血库)中。

[0285] 体内治疗

[0286] 由本发明的方法生产的 T 细胞或树突细胞可以直接施用于受试者,以产生针对所选择的免疫原有活性的 T 细胞。施用可以通过本领域已知的方法进行以将细胞成功地递送至与受试者的血液或组织细胞最终接触。

[0287] 细胞通常与药学上可接受的载体一起以任何合适的方式进行施用。在本发明的背景中给受试者施用细胞的合适方法是可用的,并且尽管超过一种途径可以用于施用具体细胞组合物,但具体途径通常可以提供比另一种途径更直接和更有效的反应。优选的施用途径包括但不限于皮内和静脉内施用。

[0288] 药学上可接受的载体由施用的具体组合物以及由用于施用组合物的具体方法部分决定。因此,存在广泛多样的本发明的药物组合物的合适制剂。最一般地,进行质量控制(微生物学、产克隆测定、生存力测试)并且将细胞重新输入回受试者,随后施用苯海拉明和氢化可的松。参见例如, Korbling 等人 (1986) Blood 67 :529-532 和 Haas 等人 (1990) Exp. Hematol. 18 :94-98。

[0289] 适合于肠胃外施用(例如通过关节内(关节中)、静脉内、肌内、皮内、腹膜内、结节内和皮下途径)的制剂和载体包括可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期受体的血液等渗的溶质的水性等渗无菌注射溶液,以及可以包括悬浮剂、加溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。皮内和静脉内施用是关于本发明的 DCs 或 T 细胞施用的优选方法。

[0290] 施用于受试者的细胞(例如,活化 T 细胞或树突细胞)的剂量是随着时间过去有效达到受试者中的所需有利治疗应答,或抑制癌细胞生长或抑制感染的有效量。

[0291] 仅用于举例说明的目的,该方法可以通过在输注前获得且保存来自受试者的血液样品用于随后分析和比较进行实践。一般至少约 10^4 - 10^6 , 和一般 1×10^8 - 1×10^{10} 细胞在约 60-120 分钟静脉内或腹膜内输注到 70kg 患者内。在一个方面,施用经由静脉内输注。通过脉搏血氧定量法紧密监控生命体征和氧饱和。血液样品在输注后 5 分钟和 1 小时获得且保存用于分析。对于 1 年时间段中的总共 10-12 次治疗,细胞重新输入约每月重复。第一次治疗后,输入可以在门诊患者的基础上根据临床医生的判断力来进行。如果重新输入作为门诊患者给予,那么治疗后监控该参与者至少 4 小时。

[0292] 对于施用,当应用于受试者的质量和总体健康时,本发明的细胞可以以由有效剂量、细胞类型的 LD-50(或其他毒性测量)、和在各种浓度时细胞类型的副作用确定的比率施用。施用可以经由单次或分份剂量来完成。本发明的细胞可以补充其他通过已知常规治

疗的对状况的治疗,包括细胞毒性剂、核苷酸类似物和生物应答调节剂。类似地,生物应答调节剂任选加入用于通过本发明的 DCs 或活化 T 细胞的治疗。例如,细胞任选与佐剂,或细胞因子例如 GM-CSF、IL-12 或 IL-2 一起施用。

[0293] 体外测定和试剂盒

[0294] 本发明提供了有商业价值的试剂盒以实践本发明的成熟方法。在一个方面,试剂盒包含 IFN γ 多肽、或用于在体内或体外表达 IFN γ mRNA 的表达盒,和 CD40L 多肽、或用于在体内或体外表达 CD40L mRNA 的表达盒表达 CD40L。在另一个方面,试剂盒包含 TNF α 多肽、或用于在体内或体外表达 TNF α mRNA 的表达盒,和 CD40L 多肽、或用于在体内或体外表达 CD40L mRNA 的表达盒表达 CD40L。试剂盒可以进一步包含 RNA 聚合酶用于体外转录。

[0295] 评估免疫原性的方法

[0296] 通过本发明方法生产的抗原呈递细胞或驯化 T 细胞的免疫原性可以通过众所周知的方法测定,包括但不限于下述:

[0297] ^{51}Cr -释放裂解测定。可以比较肽脉冲的 ^{51}Cr 标记靶经由抗原特异性 T 细胞的裂解。“更活性的”组合物将显示作为时间函数的靶的更大裂解。在固定时间点(例如,4 小时)时的裂解动力学和总体靶裂解可以用于评估性能。Ware 等人 (1983) 3. Immunol. 131 : 1312。

[0298] 细胞因子释放测定。在接触经修饰的 APCs 后由 T 细胞分泌的细胞因子类型和量的分析可以是功能活性的测量。细胞因子可以通过 ELISA 或 ELISPOT 测定进行测量,以测定细胞因子生产的速度和总量。Fujihashi 等人 (1993) J. Immunol. Meth. 160 :181 ;Tanquay 和 Killian (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13 :259。

[0299] 体外 T 细胞驯化。本发明的组合物可以就由正常供体或患者衍生的 PBMC 引起反应性 T 细胞群体的能力进行测定。在这个系统中,引起的 T 细胞可以就裂解活性、细胞因子释放、多克隆性和对抗原表位的交叉反应性进行测试。Parkhurst 等人 (1996) Immunol. 157 : 2539。

[0300] 转基因动物模型。免疫原性可以通过用本发明的组合物给 HLA 转基因小鼠接种疫苗且测定所诱导的免疫应答的性质和量级进行体内评估。可替代地,hu-PBL-SCID 小鼠模型允许通过人 PBL 的过继转移在小鼠中重构人免疫系统。如先前在 Shirai 等人 (1995) J. Immunol. 154 :2733 ;Mosier 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :2443 中提及的,这些动物可以用组合物接种疫苗且就免疫应答进行分析。

[0301] 增殖测定。T 细胞将响应反应组合物而增殖。增殖可以通过测量例如 ^3H -胸苷摄取进行定量监控。Caruso 等人 (1997) Cytometry 27 :71。

[0302] 灵长类动物模型。非人灵长类动物(黑猩猩)模型系统可以用于监控 HLA 限制配体的体内免疫原性。已证实黑猩猩与人 MHC 分子共有重叠的 MHC-配体特异性,从而允许人们就相对体内免疫原性测试 HLA 限制的配体。Bertoni 等人 (1998) Immunol. 161 :4447。

[0303] 监控 TCR 信号转导事件。几个细胞内信号转导事件(例如,磷酸化)与经由 MHC-配体复合物的成功 TCR 接合相关。这些事件的定性和定量分析已与组合物通过 TCR 接合活化效应细胞的相对能力关联。Salazar 等人 (2000) Tnt. J. Cancer 85 :829 ;Isakov 等人 (1995) J. Exp. Med. 181 :375)。

[0304] 依照上述说明书,下述实施例意欲举例说明而不是限制本发明的各个方面。

[0305] 实验实施例**[0306] 试剂**

[0307] Histopaque 1077 和 Tween 20 购自 Sigma(St Louis, MO)。PBS 和 X-VIVO 15 购自 Cambrex(East Rutherford, NJ)。AIM-V 培养基、Iscove 氏修饰的 Dulbecco 氏培养基和 RPMI1640 培养基连同锥虫蓝 (TrypanBlue) 和胎牛血清 (FBS) 购自 Invitrogen(Carlsbad, CA)。Viaspan 购自 Dupont Pharma Labs(Wilmington, DE)。GM-CSF、IL-4、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IFN- γ 全都购自 R&D Systems(Minneapolis, MN)。PGE₂ 购自 Cayman Chemicals(Ann Arbor, CA)。可溶性 CD40L 购自 AlexisBiochemicals(San Diego CA)。人 AB 血清购自 Valley Biochemical(Winchester, VA)。

[0308] 趋化因子 CCL19 和 CCL21 购自 Peprotech(Rocky Hill, NJ)。表型分析抗体 (HLA-ABC、HLA-DR、CD80、CD86、CD83、CD14 和阴性同种型对照), ELISpot 抗体对 (IFN- γ 和 IL-2) ELISA 组 (IL-12 和 IL-10) 和链霉抗生物素蛋白-HRP 连同 BD Opt EIA 试剂组 B pH9.5 全都购自 BDPharmingen(San Diego, CA)。AEC 过氧化物酶底物购自 Vector labs(Vector Labs, Burlingame, CA)。封闭性抗 CD40L 抗体购自 eBioscience。CD1d/ α -半乳糖神经酰胺 (KRN7000) 四聚体和阴性 KRN7000 是来自 KirinBrewery, Pharmaceuticals Division, Tokyo, Japan 的友情馈赠。MART-1/HLA-A201 四聚体购自 Beckman-Coulter(Miami, FL)。

[0309] DC 产生

[0310] 人 PBMCs 从由 Life Blood(Memphis, Tennessee) 提供的健康志愿者的白细胞清除术收集中分离。PBMCs 通过 Ficoll-Histopaque 密度离心进行制备且在 PBS 中在室温下洗涤 4 次。将 2×10^8 PBMCs 重悬浮于 30ml AIM-V 培养基且允许与 150cm³ 塑料瓶于 37°C 贴壁 2 小时。取出非贴壁细胞且剩余细胞在补加有 GM-CSF(1000U/ml) 和 IL-4(1000U/ml) 的 X-VIVO 15 培养基中在 37°C、5% CO₂ 下培养 5-6 天。

[0311] CD40L 的克隆

[0312] T 细胞用溶于 RPMI 的 PMA 刺激 1 小时。收获细胞且用 PBS 洗涤 1 次。总 RNA 使用 QIAGEN RNeasy 程序进行提取。使用 Gene Amp Gold 试剂盒 (Applied Bioscience) 使用高保真度 Advantage Polymerase(Clontech) 将来自活化 T 细胞的 1 微克总 RNA 获取到 1 管 RT-PCR 反应中。关于 CD40L 序列的基因特异性引物对应于 CD40L 序列的碱基 47 和 859 CD40L 5' 引物: 5'-GCATCATCGAAACATACAACC-3' (SEQ ID NO. 11) 和 CD403' 引物: 5'-GTATTATGAAGACTCCCAGCG-3' (SEQ ID NO. 12)。纯化 PCR 片段且使用 T4 DNA 连接酶 (Invitrogen) 亚克隆到 pCR2.1 载体内。CD40L 可读框的序列分析和与 Genbank 共有序列的比对揭示了 2 个突变的存在。一个突变是保守的且不导致氨基酸变化。另一个核苷酸置换导致 Asn 至 Ser 的氨基酸变化。进行定点诱变以使非保守氨基酸变化校正回天冬酰胺。简言之, 10-40ng CD40L PCR2.1 质粒 DNA 在使用定制的 5' 磷酸化的和 HPLC 纯化的引物 (QIAGEN)、PFU Ultra 酶与伴随的 10X PCR 缓冲液 (Stratagene) 和 dNTPs(Clontech) 的定点诱变中使用。PCR 反应后, 加入 Dpn I 限制酶 (Promega) 且于 37°C 温育 1 小时以消化掉亲本模板。随后将 5 微升这种反应物转化到 Oneshot MACH T1R 感受态细胞 (Invitrogen) 内, 且在包含新型制备的氨苄青霉素的 LB 板上铺平板。选择 6 个集落且在包含氨苄青霉素的 LB 中作为 3mL 培养物生长过夜。DNA 使用质粒小量制备 (miniprep) (QIAGEN) 进行分离。将关于每个克隆的纯化 DNA 的等分试样提交给 University of North Carolina(UNC) 测序

机构,用于使用 M13F 和 M13R 引物 (Invitrogen) 的 CD40L 可读框的序列分析。所有克隆随后使用 DNASTAR Seqman 分析软件与关于 CD40L 的共有 Genbank 序列进行比对。选择包含正确诱变的碱基的克隆 #2(重命名为 CD40L WT PCR 2.1)。

[0313] 用于转染 DCs 的 mRNAs 的产生

[0314] CD40L WT PCR 2.1 质粒使用 SpeI 限制酶进行线性化,且通过苯酚/氯仿提取随后为乙醇沉淀进行纯化。线性模板在水中进行重构,并且使用 mMessage mMachine T7 Ultra 试剂盒 (Ambion) 根据制造商的说明进行体外转录。等分试样的 RNA 在进行至多腺苷酸化反应前保存用于最终分析。多腺苷酸化的 RNA 使用 RNeasy 柱 (QIAGEN) 根据用于 RNA 净化的规程进行纯化。RNA 在水中洗脱且以个别大小等分试样贮藏在 -150°C 下。聚腺苷酸尾长度使用 RNA Bioanalyzer 2100 通过非多腺苷酸化的 RNA 和最终产物的比较分析进行测定。

[0315] DCs 的电穿孔

[0316] 在电穿孔前,收获 DCs 且在 PBS 中洗涤,并且以在 0.5ml 中的 $4 \times 10^7/\text{ml}$ 或在 0.2ml 中的 $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ 重悬浮于冷却的 Viaspan[®] (Barr Laboratories) 中且置于冰上。使 DCs 与 mRNA (对于编码抗原的 mRNA1 或 $2 \mu\text{g}/10^6$ 和对于 CD40L mRNA $4 \mu\text{g}/10^6$) 混合,并且置于 4mm 缺口电穿孔杯中且使用 Bio-Rad 装置进行电穿孔。紧在电穿孔后,DCs 在 X-VIVO 15 培养基中进行洗涤,且以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 最终重悬浮于补加有 GM-CSF (800U/ml) 和 IL-4 (500 U/ml) 的 X-VIVO 15 中,并且在低贴壁 6 孔板 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 中于 37°C 培养 4 或 24 小时。下文描述的另外的成熟刺激物也在这个点上加入。

[0317] DC 成熟-细胞因子混合物过程

[0318] 未成熟的 DCs 任选用各种抗原编码 mRNAs 进行转染,且随后用包含 TNF- α (10ng/ml)、IL-1 β (10ng/ml)、IL-6 (100ng/ml) 和 PGE₂ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 的“细胞因子混合物”进行处理,并且在包含 GM-CSF 和 IL-4 的培养基中于 37°C 培养过夜。

[0319] DC 成熟-CD40L 基础过程

[0320] 电穿孔后,用 CD40L mRNA 转染的 DCs 用 IFN- γ (1000U/ml) 或 TNF- α (10ng/ml) 或 IFN- γ 和 PGE₂ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 的组合进行处理。通过比较,未成熟的 DCs 用各种抗原编码 mRNAs 进行转染,且随后用包含 TNF- α (10ng/ml)、IL-1 β (10ng/ml)、IL-6 (100ng/ml) 和 PGE₂ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 或可溶性 CD40L (200ng/ml) 加增强子 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 的“细胞因子混合物”进行处理,伴随同时或顺次添加 1000U/ml IFN- γ 。

[0321] DC 成熟-PME-CD40L 过程

[0322] 未成熟的 DCs 在培养的第 5 天时用 TNF- α (10ng/ml)、IFN- γ (1000U/ml) 和 PGE₂ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 进行表型成熟。在第 6 天时,收获成熟的 DCs 且如上所述用抗原和 CD40L mRNA 电穿孔,并且在收获或配制用于疫苗生产前在包含 800U/ml GM-CSF 和 500U/ml IL-4 的 X-VIVO 15 培养基中培养 4 小时。

[0323] 用 CD40L 基础过程与 α -半乳糖神经酰胺 (KRN7000) 组合的 DC 成熟

[0324] 紧在电穿孔后将 100ng/ml KRN7000 与 500U/ml IFN- γ 和 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PGE₂ 组合脉冲到 CD40L 基础过程 DCs 上培养 24 小时。

[0325] DCs 的流式细胞术分析

[0326] 收获 10^6 DCs 且重悬浮于冷却的 PBS/1% FCS 中。对于 MHC 分子 (HLA-ABC、HLA-DR)、共刺激分子 (CD80、CD86)、成熟标记 (CD83) 和单核细胞标记 (CD14) 特异的藻红蛋白 (PE)

或 FITC 缀合抗体与 1×10^5 DCs/孔在 96 孔板 (BD Biosciences) 中混合, 并且于 4°C 温育最少 15 分钟。同种型匹配的抗体用作对照。彻底洗涤后, 荧光分析使用 CellQuest 软件 (BD Biosciences) 用 FACScalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 来进行。

[0327] CD40L 的细胞内表达如下测定: 在用 CD40L mRNA 转染后的各个时间点上收获 2×10^5 DCs 或 HeLa 细胞, 且于 4°C 重悬浮于 $250 \mu\text{L}$ Cytofix/Cytoperm 溶液 (BD Biosciences) 中最少 10 分钟最高达 2 小时。细胞用 2ml 染色缓冲液 (PBS、BSA、 NaN_3 和 EDTA) 洗涤 2 次, 重悬浮于 0.5ml 染色缓冲液中且于 4°C 贮藏过夜。将细胞重悬浮于 2.0ml Perm/Wash 溶液 (BD Biosciences) 中 15 分钟, 离心且重悬浮于 $100 \mu\text{L}$ Perm/Wash 溶液中。向在各个时间点上收集和透化处理的每个 DC 制剂中加入 $20 \mu\text{L}$ 小鼠抗人 CD40L PE 和抗人 CD40APC (BD Biosciences) 或小鼠 IgG1PE 和 IgG1APC (BD Biosciences), 并且于 4°C 在黑暗中温育 30 分钟。细胞用 1ml Perm/Wash 溶液洗涤 2 次且在流式细胞术分析前重悬浮于染色缓冲液中。

[0328] 细胞内细胞因子染色 (ICS) 如下进行: $1 \times 10^6/\text{ml}$ 致敏的 CD8+T 细胞在第 19 天从共培养物中取出, 并在 37°C ; $5\% \text{CO}_2$ 下在 $200 \mu\text{L}$ R10 培养基中用 PME DC 靶 (RCC、存活蛋白、G250、hTERT 或 eGFP) 刺激 1 小时, 之后加入 $1 \mu\text{L}/\text{ml}$ 的布雷菲德菌素 A (BD GolgiPlug, 目录号 555029)。细胞于 37°C 温育另外 16 小时。细胞进行洗涤, 且重悬浮于具有 $5 \mu\text{L}$ CD8/CP-cy5.5 (BD341051) 的 $150 \mu\text{L}$ FACS 缓冲液中, 并且于 4°C 进行温育。30 分钟后, 将细胞洗涤 2 次且重悬浮于 2% 低聚甲醛 (PFA) 中。细胞随后在 10 分钟后洗涤, 然后在室温 (RT) 下在 0.1% 皂苷中进行透化处理 10 分钟, 之后与 $2 \mu\text{L}$ 封闭抗体、小鼠 IgG1 纯 (BD 349040) 温育。在 RT 下温育 10 分钟后, 向每个样品管中加入 $0.5 \mu\text{L}$ IFN- γ -APC (BD 554681)、 $10 \mu\text{L}$ IL-2-FITC (BD554702) 和 $10 \mu\text{L}$ CD69-PE (BD 555531) 抗体。使样品在黑暗于 RT 温育 30 分钟。在 0.1% 皂苷中最后洗涤后, 将细胞重悬浮于 2% PFA 中。分析通过 FACS cytometry 进行, 收集 100,000 个事件。

[0329] 当在 HeLa 细胞中由 mRNA 表达时的 CD40L 功能分析

[0330] HeLa 细胞在 10% FBS/DMEM 中生长, 然后收获且在 4mm 杯中用 GFP 和 CD40L RNA (各 $20 \mu\text{g}/5 \times 10^6$ 细胞) 电穿孔。转染后回收为 $\sim 70\%$, 并且细胞在 6 孔皿中铺平板且允许生长过夜。过夜温育后, 转染的 HELA 细胞通过刮擦进行收获, 并且用小鼠 IgG1-PE 或抗人 CD40L-PE (两者都来自 BD Biosciences, San Diego, CA) 染色, 以寻找 CD40L 的细胞表面表达。 2×10^5 细胞/管用 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体在 1% FBS/PBS 中于 4°C 染色 30 分钟。细胞使用 FACScaliber 流式细胞仪和 Cellquest 软件 (BD Biosciences) 进行分析。为了分析 HeLa 表达的 CD40L 的功能, 使 1×10^6 未成熟的树突细胞与 1×10^6 HeLa 细胞一起在补加有 $1000\text{U}/\text{ml}$ IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的 5% huAB 血清/RPMI 中在 6 孔皿 (2mL 总体积) 中共培养过夜。封闭性 CD40L 单克隆抗体 (来自 eBioscience 的 24-31) 以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 在匹配孔中温育, 以证实蛋白质的细胞表面表达是刺激树突细胞所需的。在 18-24 小时后收获细胞上清液并且通过 ELISA (BD Biosciences) 分析细胞因子 IL-10 和 IL-12 的表达。

[0331] 迁移测定

[0332] DCs 的趋化性通过 $8 \mu\text{m}$ 孔径聚碳酸酯过滤器在 24 孔 transwell 室 (Corning Costar, Acton, MA) 中通过迁移进行测量。向较下室中加入在包含 $3\text{--}300\text{ng}/\text{ml}$ CCL19、 $5\text{--}250\text{ng}/\text{ml}$ CCL21、两者的组合的 Iscoves 修饰的 Dulbecco 氏培养基或 AIM-V 培养基或单

独的培养基中的 5% 人 AB 血清。将在 0.1ml 中的 $1-5 \times 10^5$ DCs 加入较上室中并且在 37℃ 下温育 2-3 小时。将较下室收获到 5ml 管 (BD Biosciences) 内并且重悬浮于 0.1ml PBS, 且活细胞计数使用锥虫蓝来进行。

[0333] ELISpot

[0334] PVDF 膜 ELISpot 板 (Millipore, Ballerica, MA) 用 $5 \mu\text{g/mL}$ 单克隆抗 IFN- γ 或抗 IL-2 捕获抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) 进行包被, 并且于 4℃ 温育 24 小时。温育后, 板用 PBS/0.05% Tween20 进行洗涤, 并且用 5% 人 AB 血清 /RPMI1640 培养基封闭 1 小时。PBMCs、T 细胞、或 CD8 富集的 T 细胞以 1×10^5 细胞 / 孔铺平板, 并且 mRNA 转染的、抗原装载的 DC 靶以 1×10^4 细胞 / 孔铺平板, 效应物 : 靶比为 10 : 1, 并且在 37℃, 5% CO₂ 下温育最少 16 小时。

[0335] 温育后, 将板洗涤 6 次, 并且将抗 IFN- γ 检测抗体 (BD Pharmingen) 或抗 IL-2 检测抗体 (BD Pharmingen) 以 $1 \mu\text{g/mL}$ 加入合适的板中 2 小时。另外 6 次洗涤后, 向每个孔中加入链霉抗生物素蛋白 -HRP (BD Pharmingen) 1 小时。最后, 另一个洗涤循环后, 显色用 AEC Peroxidase Substrate 进行 5-15 分钟, 并且用水终止。在 CTL Immunospot Plate Reader (CTL, Cleveland, OH) 上分析前使板风干。

[0336] ELISA

[0337] 如 BD Pharmingen 展示的该方法用于 IL-12 和 IL-10 ELISA 组 (BD Pharmingen), 其中使用 BD Opt EIA 试剂组 B pH 9.5。简言之, ELISA 板 (BD Biosciences) 用抗 IL-12p70 或抗 IL-10 ELISA 捕获抗体在包被缓冲液中于 4℃ 包被 24 小时。在加入标准 (BD Pharmingen) 和上清液样品前, 板经历以 $100 \mu\text{L}$ / 孔一式两份地用 $200 \mu\text{L}$ / 孔 10% FCS/PBS 封闭 1 小时, 并且在室温下温育 2 小时。洗涤板并且加入抗细胞因子检测抗体, 温育 1 小时, 洗涤板并且溶液用 $100 \mu\text{L}$ 链霉抗生物素蛋白 -HRP 替换并且在室温下进一步温育 1 小时。再次洗涤板并且显色底物应用 10-20 分钟, 随后用终止溶液停止显色。板分析使用 Bio-Tek 仪器 ELx800 板阅读仪与 KC 初级软件 (Winooski, VT) 来进行。结果显示皮克数 /ml/ 10^6 DCs。因为测定这样设置, 从而使得 1ml 对应于 10^6 DCs, 所以结果还可以表示为皮克数 / 10^6 DCs。例如, 3000pg/ml/ 10^6 DCs 等价于 3000pg/ 10^6 DCs。

[0338] CTL 诱导

[0339] 用 mRNAs 转染的成熟的树突细胞与 CD8 纯化的 T 细胞共培养。所有共培养在 R-10 培养基 (10% FBS, 补加有 10mM HEPES pH 7.4, 1mM 丙酮酸钠, 0.1mM 非必需氨基酸、2mM 谷氨酸钠、55 μM β -巯基乙醇的 RPMI-1640) 中进行。所有细胞培养试剂都来自 Invitrogen (Carlsbad, CA)。CD8⁺ 细胞使用 CD8⁺ T Cell Isolation 试剂盒 II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 由从单核细胞贴壁步骤收获的非贴壁细胞进行纯化。使 CD8⁺ 细胞与如上所述制备的树突细胞以 10 : 1 CD8⁺ : DC 混合。对于前 7 天, 细胞在补加有 0.2U/ml IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的培养基中进行培养, 然后以 1ml (1×10^6 CD8⁺ 细胞) / 孔等分试样到 24 孔组织培养皿内。这最初 7 天温育后, 收获 CD8⁺ 细胞、计数且与新鲜的 DC 刺激物以 10 : 1 在补加有 5U/ml IL-2 的培养基中再培养。再次, 细胞培养 1 周, 然后用新鲜的 DC 和 20U/ml IL-2 再刺激。CTL 测定在第 3 次刺激后 3 或 7 天执行。

[0340] CTL 测定

[0341] T2 细胞 (ATCC 编号 CRL-1992) 先前通过在 FBS/RPMI 培养基中过夜温育用 $10 \mu\text{g/}$

m1 HLA-A201 限制的 MART-APL 肽 (LAGIGILTV ;SEQ ID NO :24) 或天然肽 (AAGIGILTV ;SEQ ID NO :25) 或 PSA-1 肽 (FLTPKKLQCV ;SEQ ID NO :26) 进行脉冲,并且在用作 CTL 靶前进行洗涤。如上所述树突细胞靶用 GFP mRNA、MART-1 APL mRNA 或 Flu-M1 mRNA 进行转染,并且温育过夜而不成熟。脉冲的 T2 细胞与 $100 \mu\text{Ci Na}^{51}\text{Cr}$ (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) 于 37°C 温育 90 分钟。洗掉过量 ^{51}Cr , 并且使 5000 个标记靶与各种 E:T 比的 CD8+ 细胞温育 4 小时。非特异性裂解通过以 25,000 细胞/孔添加未脉冲的 T2 细胞得到减少。释放的 ^{51}Cr 通过闪烁计数在上清液中进行测量。总释放通过向靶中加入 1% Triton X-100 进行计算,同时自发性释放通过加入单独的培养基进行计算。百分比裂解使用式 (释放的样品 cpm- 自发性 cpm)/(释放的总 cpm- 释放的自发性 cpm) 进行计算。

[0342] 使用 KRN7000- 脉冲的 CD40L 基础过程成熟的 DC 诱导 MART-1 特异性 CTLs

[0343] DCs 如上所述使用 ‘CD40L 基础过程’ 产生,并且装载编码 MART-1 的 mRNA。电穿孔后,DCs 与 KRN7000、 $\text{IFN-}\gamma$ 和 PGE_2 温育。DCs 和 PBMCs 在 20U/ml IL-2 的存在下以 1:10 比一起共培养。PBMCs 在相同条件下再刺激 3 次,且 CTL 诱导的频率通过用 MART-1/A2 四聚体染色进行测定,且 NKT 细胞的扩增通过 FACS 使用 KRN7000/CD1d 四聚体进行计数。

[0344] 实验实施例的结果

[0345] 使用干扰素- γ 和 CD40L 的顺次成熟最优化 IL-12p70 分泌

[0346] 未成熟的 DCs 通过贴壁细胞 PBMCs 在包括 GM-CSF 和 IL-4 的 X-VIVO15 培养基中的 6 天培养进行制备。DCs 在第 6 天时进行回收,并且用 $2 \mu\text{g}$ GFP 编码 mRNA/ 百万 DCs 进行电穿孔,并且用 “细胞因子混合物” 成熟 36 小时。可替代地,成熟通过在同时或顺次应用的 $\text{IFN-}\gamma$ 和可溶性 CD40L 的存在下培养 DCs 来达到。DCs 就增加的共刺激分子表达,但最重要的是就 IL-12p70 对 IL-10 的分泌进行监控。图 1 显示与在 36 小时培养时间段进入培养上清液内的 IL-12p70 比较,用细胞因子混合物成熟的 DCs 分泌过量 IL-10。相比之下,用可溶性 CD40L 和 $\text{IFN-}\gamma$ 同时成熟的 DCs 分泌过量 IL-12p70。然而, $\text{IFN-}\gamma$ 顺次应用 18 小时,随后向培养物中直接添加可溶性 CD40L,和另外 18 小时培养时间段导致显著增强水平的 IL-12p70 分泌。出乎意料地,可溶性 CD40L、随后为 $\text{IFN-}\gamma$ 的应用阻止 IL-12p70 的显著分泌。总之,先天性刺激物的顺次递送以 “致敏” DC 成熟 ($\text{IFN-}\gamma$),随后为由可溶性 CD40L 递送的替代 T 辅助细胞信号最优化 DC 成熟用于 IL-12p70 分泌。

[0347] 用编码 CD40L 的 mRNA 转染的 HeLa 细胞与未成熟的 DCs 的共培养导致 DC 递送的 IL-12p70 的诱导。

[0348] 图 2 显示如通过抗 CD40L 抗体和流式细胞术定义的,编码 CD40L 的 mRNA 转染的 HeLa 细胞导致在培养 24 小时后 CD40L 蛋白质的显著细胞表面表达。在 $1000\text{U/ml IFN-}\gamma$ 的存在下,CD40L mRNA 转染的 HeLa 细胞与未成熟的 DCs 一起共培养。表 II 显示当与未成熟的 DCs 一起在 18 小时培养时间段培养时,用扩展的聚腺苷酸尾 (>100 个 ‘A’) 转染的 HeLa 细胞能够诱导显著的 IL-12p70 分泌。重要的是,封闭性抗 CD40L 抗体的包括阻止 IL-12p70 分泌,并且证实由转染的 mRNA 序列编码的蛋白质的同一性和功能重要性。

[0349] 表 II

[0350] 当在 $\text{IFN-}\gamma$ 的存在下与未成熟的 DCs 一起共培养时,用 CD40L 编码 mRNA 转染的 HeLa 细胞导致 IL-12p70 的分泌。在培养中包括 ‘封闭性’ 抗 CD40L 抗体阻止 IL-12p70 的

诱导。

[0351]

	未成熟的 DCs IL-12p70 (pg/ml)	“混合物”成熟的和 再活化的 DCs IL-12p70 (pg/ml)
单独的 DC's	—	4.9
(a) HeLa/>100 聚腺苷酸 + IFN- γ	372	26.3
(b) HeLa/>100 聚腺苷酸 + IFN- γ + 24-31	—	2.5

[0352] (a) HeLa 细胞用具有超过 100 个核苷酸的聚腺苷酸尾的 4 μ g CD40L mRNA 进行转染, 并且在 IFN- γ 的存在下与 DCs 温育

[0353] (b) 如同 (a), 但在封闭性抗 CD40L 抗体 (24-31) 的存在下。

[0354] 用 CD40L mRNA 转染, 并且在 IFN- γ 的存在下培养的树突细胞分泌 IL-12p70。

[0355] 未成熟的 DCs 在与 GM-CSF 和 IL-4 一起培养后 6 天收获, 并且用 CD40L mRNA (>100- 聚腺苷酸) 的滴定转染, 并且立即在 1000U/ml IFN- γ 的存在下培养。图 3 显示在培养 18 小时后收获的上清液包含超过 IL-10 的过量 IL-12p70, 且至少 4 μ g CD40L mRNA/ 百万 DCs 是最佳细胞因子分泌所需的。增加 CD40L mRNA 有效负载超过 4 μ g/ 百万 DCs 导致 DC 产量在成熟后显著减少 (数据未显示)。在平行实验中, 未成熟的 DCs 用 4 μ g CD40L mRNA/ 百万细胞进行转染, 并且 IFN- γ 的滴定立即应用于培养物。图 4 显示至少 100U/ml IFN- γ 是支持 IL-12p70 的最佳诱导所需的。图 5a 显示 IL-12p70 在转染和与 IFN- γ 共培养后 6-8 小时以可检测水平出现, 其中培养上清液中的最佳积聚在 20-24 小时之间记录。相比之下, 10ng/ml TNF- α 代替 IFN- γ 同样支持 IL- 生产, 但处于减少的水平 (图 5b)。此外, IFN- γ 导致比 TNF- α 伴随更低水平的 IL-10 生产 (图 5c)。

[0356] 与细胞-细胞相互作用相反, 通过用 CD40L mRNA 转染的 DCs 诱导 IL-12p70 依赖于“细胞内发信号”。

[0357] 图 2 证实由 mRNA 翻译的 CD40L 蛋白质可以在转染细胞的细胞表面上表达, 并且蛋白质保留适当地给 DCs 发信号的能力用于 IL-12p70 分泌, 这是由于与其在 DCs 上的配对物即 CD40 相互作用的结果。为了测定 CD40L 在转染的 DCs 中的细胞分布, 和为了证实其功能特性, 在转染后的各个时间点上收获 DCs, 测定 CD40L 在细胞表面或细胞内区室的存在。图 6a 和 6b 显示大多数 CD40L 位于细胞内区室内, 且显著的蛋白质表达 (27% DCs CD40L 阳性) 直至转染后 60 分钟才明显。因此, 尽管 IFN- γ 紧在转染后应用, 但成熟事件的递送是顺次的, 其中 IFN- γ 信号在 CD40L 的那种之前。如图 1 中所示, DCs 用 IFN- γ 和 CD40L 的顺次成熟对于 IL-12p70 分泌最优化。此外, 图 7 显示当转染后在过量封闭性抗 CD40L 抗体的存在下培养 18 小时时, CD40L 转染和 IFN- γ 处理的 DCs 仍分泌显著水平的 IL-12p70。这个数据显示这个系统中的 IL-12p70 生产所需的 CD40L/CD40 相互作用, 可以在细胞内区室内发生。

[0358] CD40L 阳性细胞随着时间过去的频率

[0359] 未成熟的 DCs 用 4 μ g CD40L mRNA/10⁶ DC 进行转染, 且用 1000U/ml IFN- γ 共成熟。

可替代地,并且作为关于 CD40L 染色的阴性对照,未成熟的 DCs 用‘细胞因子混合物’进行成熟。最大表达频率在用 CD40LRNA 转染后约 3-4 小时达到(参见图 6b),尽管当细胞进行固定和透化时,80%的 DCs 表达 CD40L,但细胞表面染色仅检测到约 15%的 DCs(图 6c)。这个数据显示大量 CD40L 多肽保留在 DC 内,并且不表达在细胞表面上。CD40L 蛋白质是瞬时表达的,其中大多数 DCs 在转染后 26 小时变成 CD40L 阴性的。当与仅接受‘细胞因子混合物’的 DCs 比较时,关于 CD40L 的同源受体分子——CD40 的表达不由用编码 CD40L 的 mRNA 转染 DCs 改变。

[0360] PGE₂ 是用 CD40L 和 IFN- γ 成熟后诱导 DC 迁移所需的

[0361] 除了分泌 IL-12p70 和显示成熟表型的能力外,所述成熟表型一般定义为细胞表达升高水平的共刺激分子例如 CD80、CD83 和 CD86(参见表 III),DCs 必须显示出迁移的能力,如果它们将能够在体内归巢至淋巴结的话。几项研究已显示 PGE₂ 致敏成熟的 DCs 用于迁移(Luft 等人(2002)Blood100:1362, Scandella 等人(2002)Blood100:1354)。图 8 显示除了 IFN- γ 外 1 μ g/ml PGE₂ 的包括使得成熟 DCs 能够迁移,且这种迁移潜能的获得与 CD40L mRNA 有效负载成比例。因此,CD40L 不仅促成成熟的 DC 表型和显性 IL-12p70 概况(参见表 II),还促成迁移的引发。相比之下,通过用 CD40L mRNA 转染成熟和在 IFN- γ 的存在下但在不存在 PGE₂ 的情况下培养的 DCs 无法迁移(数据未显示),尽管显示趋化因子受体 CCR7 的细胞表面表达。

[0362] 表 III

[0363] 经历由‘细胞因子混合物’或 CD40L 加 IFN- γ 和 PGE₂ 诱导的成熟的 DCs 的表型分析和分泌的细胞因子概况

[0364]

	未成熟的 DC	(a)Flu/eGFP mRNA	(b)Mart-APL mRNA	(c)Flu/CD40L mRNA	(d)Mart- APL/CD40L mRNA
DC 标记		细胞因子 混合物	细胞因子 混合物	IFN-g/PGE ₂	IFN-g/PGE ₂
HLA-ABC	99.7%	98.6%	99.5%	99.9%	99.9%
HLA-DR	95.0%	99.6%	99.7%	99.8%	99.5%
CD83	23.2%	98.3%	99.2%	99.6%	99.3%
CD14	0.3%	1.7%	2.9%	3.2%	4.9%
CD56	2.8%	3.3%	3.2%	2.8%	2.1%
CD19	1.8%	1.1%	2.1%	3.2%	3.2%
CD3	2.8%	2.4%	3.1%	2.8%	3.1%
CD86	59.3%	99.7%	100.0%	100.0%	100.0%
CD80	28.8%	99.0%	99.5%	99.2%	99.5%
CD1a	51.6%	49.1%	52.2%	48.6%	49.9%
CD209	95.8%	95.5%	96.1%	96.4%	95.9%
CCR7	3.2%	47.4%	35.5%	35.4%	36.2%
(θ) IL-12 (pg/ml)	N/A	27.5	59.0	1456.3	1350.0
(f) IL-10 (pg/ml)	N/A	948.8	810.0	187.7	165.5

[0365] DCs 由贴壁的单核细胞进行制备且在 GM-CSF/IL-4 中培养 6 天。收获后,DCs 用各种 mRNA 有效负载进行转染且实施成熟另外 24 小时。再次收获 DCs,且细胞就各种细胞表面标记进行染色,特别是与增加的功能即共刺激和迁移相关的那些。收集来自成熟培养物的上清液且实施 IL-12p70 和 IL-10 细胞因子分析。

[0366] (a) 除了 4 μ g/ 百万细胞 eGFP mRNA 外,DCs 以 2 μ g/ 百万细胞用 f1u mRNA 作为抗原编码有效负载进行转染。在可替代过程中 eGFPmRNA 允许通过 FACS 证实转染,且充当关于 4 μ g/ 百万细胞 CD40LmRNA 成熟有效负载的代替对照。这些 f1u/eGFP 转染的 DCs 在“细胞因子混合物”的存在下进行成熟。

[0367] (b)DCs 以 2 μ g/ 百万细胞用 MART-APL mRNA 作为抗原编码有效负载进行转染,且实施使用“细胞因子混合物”的成熟。

[0368] (c)DCs 以 2 μ g/ 百万细胞用 f1u mRNA 作为抗原编码有效负载,伴随 4 μ g/ 百万细胞 CD40L mRNA 作为成熟有效负载进行转染。如材料与方法中所述,将这些细胞与 IFN- γ 和 PGE₂ 立即置于培养中。

[0369] (d)DCs 以 2 μ g/ 百万细胞用 MART-APL 作为抗原编码有效负载,伴随 4 μ g/ 百万细胞 CD40L mRNA 作为成熟有效负载进行转染。如材料与方法中所述,将这些细胞与 IFN- γ 和 PGE₂ 立即置于培养中。

[0370] (e) 来自经历成熟的 DCs 的 IL-12p70 分泌。

[0371] (f) 来自经历成熟的 DCs 的 IL-10 分泌。

[0372] 经由用 CD40L mRNA 转染和 IFN- γ /PGE₂ 顺次成熟的 DCs 引起有效的 T 细胞回忆应答。

[0373] 为了测定经由 CD40L mRNA 转染和 IFN- γ /PGE₂ 成熟的 DCs 的“免疫能力”,除了 CD40L mRNA 和 IFN- γ /PGE₂ 培养环境外,DCs 用 2 μ g 编码 f1u 基质蛋白的 mRNA/ 百万细胞共转染。转染后 18 小时,收获 DCs、洗涤、且在 IFN- γ ELISpot 测定中与自身 T 细胞一起共培养。图 9 显示如由测定中的 f1u 特异性 IFN- γ 斑点的频率定义的,与用 f1u mRNA 转染且用‘细胞因子混合物’成熟的 DCs 比较,经由 CD40L/IFN- γ /PGE₂ 成熟的 DCs 展示增加的免疫能力。

[0374] 经由 CD40L mRNA 转染和 IFN- γ /PGE₂ 顺次成熟的 DCs 引起初次应答

[0375] 回忆应答例如图 9 中描述的那种较不依赖表达最优化的共刺激分子且支持细胞因子环境的 DCs 的存在。因此,DCs 就其引起针对黑素瘤相关抗原 MART-1 的初次免疫应答的能力进行测试,许多健康供体对其维持高幼稚 T 细胞前体频率。因为优先使用 HLA-A201 供体,所以 DCs 用编码 MART-1 的 mRNA 进行转染,其中 A2 限制的决定簇通过 mRNA 序列的成熟通过定点诱变进行最优化,从而使得在第 27 位上的丙氨酸由亮氨酸置换,并且在此文中称为 MART-APL(Valmori,D 等人 (1998) J. Immunol. 160 :1750)。用 2 μ g MART-APL mRNA 和 4 μ g CD40L mRNA 共转染且立即用 IFN- γ /PGE₂ 脉冲 18 小时的 DCs 与仅装载 MART-APL 且用“细胞因子混合物”成熟过夜的 DCs 相比较。将抗原装载且成熟的 DCs 加入纯化的自身 CD8⁺T 细胞中,并且在 0.2U/ml 人 IL-2 的存在下培养 7 天。这个时间段后,回收 T 细胞并且适当时在 IL-2ELISpot 测定中与第二轮抗原装载的 DC 刺激物共培养。图 10 显示在针对最初在 MART-APL mRNA 序列内编码的最优化 MART-APL 表位的特异性应答中,在经由 CD40L 和 IFN- γ /PGE₂ 成熟的 DCs 的存在下培养的 CD8⁺T 细胞导致能够分泌 IL-2 的 T 细胞中高度显

著地增加。总之,暴露于经由 IFN- γ /PGE₂ 和 CD40L 的顺次成熟的 DCs 在升高初次免疫应答方面比用目前公认的标准“细胞因子混合物”成熟的 DCs 显著更有效。此外,图 11 显示用由‘细胞因子混合物’成熟的 MART-APL 装载的 DCs 产生的 CTLs 无法介导 CD4 不依赖性 CD8 介导的细胞毒性,其针对用合适的 HLA-A2 限制的 MART-APL 肽脉冲的 T2 细胞(图 11b)。相比之下,对于 CD40L/IFN- γ /PGE₂ 成熟的 DCs 产生的 CTLs 是完全活性的,并且杀死 MART-APL 肽脉冲的 T2 靶(图 11a)。

[0376] 在 PME-CD40L 过程下成熟的未成熟的 DCs 的表型分析

[0377] DCs 在第 5 天用本文描述的 PME-CD40L 过程进行成熟。特别地单核细胞在培养基 GM-CSF 和 IL-4 中培养 5 天以产生未成熟的 CD83⁻DCs。在第 5 天时,向未成熟的 DCs 进料包含 TNF α 、IFN γ 和 PGE₂(TIP) 的培养基。在第 6 天时,测定 TIP 后表型(参见表 IV)。如表 IV 中所示,大多数细胞对于 CD80、CD83、CD86 和 CD209 是阳性的。这些 DCs 也是 CCR7 阴性的(数据未显示)。低百分比的 CD14⁺ 细胞表示未分化成树突细胞的单核细胞。在第 6 天时,CD83⁺ CCR7⁻ DCs 用由扩增的肾细胞癌 RNA 制备的 1 μ g mRNA 和 4 μ g CD40L mRNA/百万细胞共转染(经由电穿孔)。CD40L 表达在转染后 4 小时进行测量。细胞在转染后 4 小时时深低温保藏于液氮中。解冻后的回收和生存力紧在解冻后和解冻后 24 小时进行测量。如可见的,在解冻后 24 小时,大多数 DCs 变成 CCR7⁺。CCR7⁺DCs 对于 CD80、CD83 和 CD86 也是阳性的。3 次分开运行的结果显示于表 IV 中。

[0378] 表 IV

[0379]

运行数据	运行 1	运行 2	运行 3
接种密度/瓶	200×10^6	200×10^6	200×10^6
接种的瓶数目	18	20	20
TIP 后回收 (%)	8	24	15
TIP 后生存力 (%)	97	95	93
杯数目	14	15(有限的)	15(有限的)
电穿孔后 4 小时回收 (%)	64	43	73
电穿孔后 4 小时生存力 (%)	91	89	85
来自运行的疫苗剂量数目	13	9	15
解冻后回收 (%)	86	94	85
解冻后生存力 (%)	88	88	78
预测剂量/30 个瓶	21	28	30
4 小时 CD40L 表达	84	76	49
TIP 后 DC 表型			
% CD14	0.8	0.5	12
% CD80	100	100	98
% CD83	99	92	82
% CD86	100	100	100
% CD209	98	99	100
mDC 表型 (解冻后)			
% CD14	3	0.3	1.4
% CD80	99	100	100
% CD83	100	100	98
% CD86	100	100	100
% CD209	98	100	100
% CCR7	53	12	32
解冻后 24 小时 % CCR7	93	93	95
解冻后 24 小时‘洗去(washout)’			
% 生存力	50	67	63
% 回收	36	46	73
解冻后 24 小时 transwell 迁移			
% 迁移-培养基对照	1.1	0.78	1.2
% 迁移-100ng/ml CCL19 和 21	74	107	70

[0380] 经由 PME-CD40L 过程成熟的 DCs 响应淋巴结归巢趋化因子 CCL19 和 21 是高度迁移的。

[0381] 在用总扩增的 RCC RNA 和 CD40L RNA 共转染后 24 小时, PME-CD40L 成熟的 DCs 就响应趋化因子 CCL19 和 21 的迁移进行测定。图 12 显示使用 4 个独立供体, PME-CD40L 成熟的 DCs 是高度迁移的, 与在用 PME-CD40L 过程电穿孔后 24 小时达到的极高水平的 CCR7 表达一致 (参见表 IV)。

[0382] 经由 PME-CD40L 过程成熟的 DCs 显示超过用 ‘CD40L 基础过程’ 成熟的 DCs 显著增强的免疫能力。

[0383] 尽管经由 ‘CD40L 基础过程’ 诱导初次免疫应答, ‘成熟后电穿孔 -CD40L’ 过程导致使用 MART 抗原模型系统的 CTL 活性中的显著改善, 通过所述过程在用 CD40L 加抗原编码 mRNA 电穿孔前, DCs 首先用 TNF- α 、IFN- γ 和 PGE₂ 进行成熟 (图 13)。此外, PME-CD40L 过程使用衍生自肾细胞癌患者的完全自身材料就 IFN- γ 和 IL-2 应答的诱导进行测试: 患者 DCs 如上文关于 PME-CD40L 过程所述进行制备, 且用自身的总扩增的 RCC 肿瘤 RNA 电穿孔。抗原装载的 DCs 与自身患者 CD8T 细胞一起培养, 并且所得到的应答 CTL 通过细胞内细胞因子染色进行研究, 其响应于引起的 DC, 以及用肿瘤相关抗原, hTERT, 存活蛋白和 RCC 特异性抗原, G250 转染的个别 DCs。用编码 eGFP 的 mRNA 转染的 DCs 用作阴性对照刺激物。图 14 显示患者 T 细胞响应装载总扩增 RCCRNA 的 DCs, 以及 3 种肿瘤相关抗原, 其中 IFN- γ 和 IL-2 两者频率高于由 eGFP mRNA 转染的阴性对照诱导的那种。(针对 eGFP 的应答从对每种 RCC 相关 DC 靶的总应答中扣除)

[0384] 由 ‘基础 CD40L 过程’ 成熟且用 KRN7000 脉冲的 DCs 可以招募增强原发性 CTLs 诱导的 NKT 细胞。

[0385] 如通过 CD1d/KRN7000- 四聚体染色定义的, 与用载体代替 KRN7000 脉冲的装载相同成熟 RNA 的 DCs 相对, 装载 MART-1 mRNA 的、用 KRN7000 脉冲的、CD40L 基础过程成熟的 DC 增加 PBMC 培养中的 NKT 细胞的频率 (图 15a)。使用关于应答 CTL (MART-1/HLA-A2) 的四聚体分析, 脉冲到 MART-1 mRNA 转染的 DC 上的 KRN7000 的存在显著增加 MART 反应性 T 细胞的频率 (图 15b)。因此, 在 PBMC 培养中 NKT 细胞的扩增提供了可能通过 NKT 细胞衍生的 ‘帮助’ 实现的扩增环, 这可以支持原发性 CD8 CTL 发展。

[0386] CD40L mRNA 的最优化

[0387] 在证实优选的成熟方法的最初 DC 实验中使用的 CD40L RNA 由质粒模板 pCR2.1 CD40L WT 转录。优选的 CD40L RNA 包含 ARCA 帽类似物和聚腺苷酸尾。质粒 pCR2.1 CD40L WT 通过去除位于起始 ATG 密码子 5' 的 XbaI-EcoRV 片段进行修饰。该片段包含载体序列的 32 个核苷酸且包含 3 个隐藏的潜在起始 ATG 密码子。关于这种修饰的原理是通过与正确的 CD40L 翻译起始位点竞争, 这些另外的 ATGs 可能干扰 CD40L 翻译的有效起始。CD40L 的编码序列保持不受这些修饰的影响。如通过 IL-12 表达的诱导测量的, 在 2 次独立 DC 转染实验中, 由经修饰的质粒模板转录的 CD40L RNA 比目前的 CD40L 参考标准 (pCR2.1CD40L WT) 表现更佳。经修饰的质粒称为 pCR2.1CD40L WT Delta X-E。

[0388] 此外, 我们希望测定 CD40L RNA 的表达是否可以通过将 CD40L 5' 非翻译区直接置于 CD40L 起始密码子的上游得到进一步最佳化。pCR2.1CD40L WT Delta X-E 质粒通过将 39bp CD40L 5' 非翻译序列插入位于 CD40L 翻译起始位点紧上游进行进一步修饰, 从而导致产生构建体 pCR2.1 CD40L + 5'UTR。由这种质粒转录的 RNA (pCR2.1CD40L+5'UTR) 不象由 CD40L WT Delta X-E 转录的 RNA 一样表现, 而是表现类似于由 pCR2.1 CD40L WT 转录的目

前 CD40L (图 18 和 19)。对应于由 pCR2.1 CD40L WT Delta X-E 质粒转录的 CD40L RNA 的 DNA 序列显示于 SEQ ID NO:13 中。ATG 起始密码子在 SEQ ID NO:13 的第 41 位上开始。

[0389] CD40L 蛋白质的短同工型

[0390] 各 1 微克如下所述的 CD40L RNAs 使用麦胚提取物 (Promega) 在示踪物 ^{35}S 标记的甲硫氨酸的存在下进行体外翻译。各 5 μL 翻译混合物通过 SDS-PAGE 电泳进行分离且转移至尼龙膜。使该膜暴露于感光成像仪 (Phosphorimager) 屏幕并且使用 Storm Imager (Amersham) 进行扫描。结果显示于图 20 中。泳道 1 和 2 分别表示来自未加帽的和加帽的 pCR2.1CD40L WT mRNA (WT) 的体外翻译产物。泳道 3 和 4-5 分别表示来自未加帽的和加帽的 pCR2.1 CD40L WT Delta X-E mRNA (ΔXE) 的体外翻译产物。泳道 6 表示加帽的 pCR2.1 CD40L+5' UTR mRNA 的体外翻译产物。放射性标记的翻译产物的检查揭示一些 RNAs 产生 2 种主要蛋白质。CD40L 编码区的序列分析揭示,在编码区内的超过 1 个框内甲硫氨酸残基可以产生部分 CD40L 蛋白质序列 (参见 SEQ ID NO:2)。因为截短的蛋白质将在框中,所以它仍将用抗 CD154 抗体染色阳性。来自包含天然存在的 CD40L5'UTR 的构建体 (pCR2.1 CD40L + 5' UTR) 的体外翻译产物分析仅编码 1 种 CD40L 蛋白质 (图 20)。然而,这种 +5' UTRCD40L 构建体还显示最低的 IL-12 增强 (图 19)。相比之下,WT 和 DeltaXE 构建体看起来以与全长产物约相同的比例产生较短的蛋白质产物,并且显示最高的 IL-12 诱导能力。

[0391] 我们假设较低分子量的蛋白质产物由内部甲硫氨酸起始,并且可以是用于诱导 IL-12 细胞因子的更活性形式的 CD40L。这种假设通过下述在接下来的实验组中进行测试,经由使 ATG 起始密码子定点诱变成 GCG 来去除最氨基末端的甲硫氨酸密码子,从而使得翻译将在野生型 CD40L 蛋白质的第二个内部甲硫氨酸上开始。这种构建体称为 pCD40L ΔXE -MET1 (CD40L ΔXE 减第一个甲硫氨酸起始密码子)。由这种质粒转录的 mRNA 显示于 SEQ ID NO:30 中。SEQ ID NO:30 编码 SEQ ID NO:31 的多肽,其与 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 21-261 等价。此外,我们测试另一种构建体,其中来自第一个起始甲硫氨酸的翻译起始通过用共有 Kozak 序列最优化 ATG 密码子得到增强。2 种修饰都在 Delta XE 质粒背景中进行,因为这种质粒模板一贯地编码比 WT 质粒更活性的 CD40L RNA。制备新批次的未修饰的 Delta XE RNA 用于在这个测定中用作对照。来自这些构建体的 RNAs 被产生、多腺苷酸化且纯化。RNAs 在体外在 ^{35}S 标记的甲硫氨酸的存在下进行翻译,并且通过 SDS-PAGE 进行分析。如图 21 中所示,我们证实了 CD40L 蛋白质的 2 种同工型由 WT 和 Delta XE CD40L RNAs 制备的最初观察。CD40L WT RNA 产生 2 种同工型,其中较低的同工型略微超过 50% 所产生的总蛋白质 (图 21,泳道 1)。Delta XE (第二批 RNA) 编码略微更高比的较短形式,而具有天然存在的 5'UTR 的 CD40L RNA 产生占优势地更长的形式 (图 21,泳道 2 和 5)。如预期的,具有在第一个 ATG 周围的最优化 Kozak 序列的新 RNA 产生占优势地更长的形式 (总数的 75%) (图 21,泳道 4)。最重要的是,缺少第一个甲硫氨酸的 CD40L RNA 导致唯一较短形式的蛋白质 (图 21,泳道 6)。与使用加帽酶转录后加帽的 RNA ($\Delta\text{XE}(\text{enz})$) (图 21,泳道 3) 相对,在由共转录加帽的 RNA 产生的蛋白质 (图 21,泳道 2) 中未注意到差异。

[0392] 我们接下来评估在转染的 DCs 中由每种构建体产生的 CD40L (CD154) 蛋白质的量。CD40L 阳性细胞的百分比 (图 22,左图) 在所有测试条件下大致相等,指出关于每种 RNA 的转染效率是相似的。平均荧光强度 (图 22,右图) 与在细胞中产生的 CD40L 蛋白质的量

成比例。如我们已一贯地观察到的,这种测定中的 Δ XE RNA 看起来比野生型对照表现更佳。编码占优势地较大的 CD40L 同工型的 Delta Δ XE+Kozak RNA 令人惊讶地产生最低量的 CD40L 蛋白质,而在体外编码唯一较短的同工型的 Δ XE-Met1 RNA 在转染的 DCs 中产生最高的 CD40L 蛋白质水平。

[0393] 测量 CD40L 蛋白质的表达水平以及长 / 短 CD40L 蛋白质同工型的相对比,以确定是否存在与 IL-12 分泌水平的关联。图 23 显示这种测定中的 IL-12 表达水平与用抗 CD154 抗体染色的细胞的平均荧光强度关联。对于相同数据的更紧密关注呈现于图 24 中。在 DC 转染测定中的 IL-12 表达的绝对量与在体外翻译测定中产生的短 CD40L 蛋白质同工型的量成比例。给 Δ XE 构建体添加轮状病毒基因 6 的 3' UTR (以产生 Rot63' UTR Δ XE 质粒) 导致与对于 Δ XE-Met1 观察到的那些类似的 IL-10 和 IL-12 表达水平 (图 25)。由 Rot6 3' UTR Δ XE 质粒转录的 mRNA 的序列显示于 SEQ ID NO :32 中。编码由 Δ XE-MET1 轮状病毒基因 6 3' UTR 构建体转录的 RNA 的 cDNA 显示于 SEQ ID NO :33 中。

[0394] 假定 Δ XE-MET1 RNA 的翻译在 CD40L CDS 的第二个 ATG 密码子上起始,以产生在 CD40L 的第二个内部甲硫氨酸 (即,SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 21) 上开始的 N 末端 CD40L 截短的蛋白质。为了证实这种假定,对 Δ XE 构建体实施定点诱变以改变前 2 个甲硫氨酸密码子 (Δ XE-MET1,2),前 3 个甲硫氨酸密码子 (Δ XE-MET1-3);或前 4 个甲硫氨酸密码子 (Δ XE-MET1-4)。由这些构建体产生的体外翻译产物显示于图 26 中。经由用这些经修饰的 CD40L RNAs 转染的树突细胞的 IL-10 和 IL-12 的分泌水平显示于图 27 中。 Δ XE-MET1 构建体中的第一个甲硫氨酸的缺失导致来自用这种 RNA 转染的 DCs 的高 IL-12 分泌,而前 2、3 或 4 个甲硫氨酸的缺失导致无 IL-12 生产。因此,用编码 SEQID NO :31 的 CD40L 多肽的 RNA 转染 DCs 导致高水平的 IL-12 表达。相比之下,当它们在 DCs 中表达时,在第 3、4 或 5 个内部 ATG 密码子处起始的 CD40L 多肽不能诱导 IL-12 分泌。

[0395] 在经由 PME-CD40L 过程成熟的 DCs 中在转染后 4 和 24 小时时的 IL-10 和 IL-12 表达

[0396] 未成熟的 DCs 在与 TNF- α (10ng/ml)、IFN- γ (1000U/ml) 和 PGE₂ (1 μ g/ml) 一起培养第 5 天时进行表型成熟。在第 6 天时,收获 DCs 且如上所述用抗原和 CD40L mRNA 进行电穿孔,并且在包含 800U/ml GM-CSF 和 500U/ml IL-4 的 X-VIVO 15 培养基中培养 4 小时或 24 小时。表 V 显示在转染后 4 小时收获的上清液 (疫苗) 产生较少的或无 IL-12p70 或 IL-10,而水平在转染后 24 小时时增加。

[0397] 表 V 来自 PME-CD40L DCs 的细胞因子分泌

[0398]

	IL-10 pg/ml (s. d.)	IL-12 pg/ml (s. d.)
4 小时	0(0)	17(15.4)
24 小时	83.3(26.3)	254.7(21.8)

[0399] n = 3

[0400] 与用 'CD40L 基础过程' 成熟的 DCs 比较,经由 PME-CD40L 过程成熟的 DCs 分泌较低水平的 IL-12p70。

[0401] 为了比较 IL-10 和 IL-12 分泌水平,DCs 使用标准 CD40L 基础过程或 PME-CD40L 过程进行制备,并且在培养基中分泌的细胞因子在电穿孔后 18-24 小时时进行测量。结果显

示于表 VI 中。与‘CD40L 基础过程’比较,‘成熟后电穿孔-CD40L’过程(即,由此 DCs 在用 CD40L 加抗原编码 mRNA 电穿孔前首先用 TNF- α 、IFN- γ 和 PGE₂ 进行成熟)导致较低水平的 IL-12p70,而 IL-10 的水平是相似的。然而,与经由细胞因子混合物过程(IL-6、IL-1 β 、TNF α 和 PGE₂)成熟的 DCs 比较,经由 CD40L 基础过程或 PME-CD40L 过程成熟的 DCs 分泌较低水平的 IL-10 和较高水平的 IL-12。

[0402] 表 VI 来自 PME-CD40L DCs 的细胞因子分泌

[0403]

DC 成熟过程	IL-10 pg/ml (s. d.)	IL-12 pg/ml (s. d.)
CD40L 基础过程	89 (51)	1218 (86)
PME-CD40L 过程	125 (64)	602 (53)

[0404] 细胞表面染色和细胞内细胞因子生产的测量

[0405] DCs 如上所述使用 PME-CD40L 过程来生产,或 DC 用 CD40L RNA 和 MART-1RNA 电穿孔并且与 IFN- γ 和 PGE₂ 一起培养 4 小时,或 DC 用 TNF α 、IFN γ 、PGE₂(TIP) 细胞因子成熟过夜然后用 Mart-1RNA 电穿孔且培养 4 小时,或未成熟的 DC 用 MART-1RNA 电穿孔并且与细胞因子混合物(IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IFN γ 、PGE₂) 共培养 4 小时。DC 和 CD8T 细胞如对于“CTL 诱导”所述的进行共培养。在指定日期时,收获 CTL 并且通过在 FBS/RPMI 培养基中 1 小时温育用 T2 细胞进行刺激,所述 T2 细胞先前用 10 μ g/ml HLA-A201 限制的 MART-APL 肽(LAGIGILTV;SEQ ID NO:24) 或 PSA-1 肽(FLTPKKLQCV;SEQ IDNO:26) 脉冲,洗涤且 CTL 以 10:1 比用 T2 细胞进行刺激。在 1 小时时间点时,加入布雷菲德菌素 A 并且允许培养物温育另外 3 小时。CTL 随后用针对 CD8 受体和 MART-1/A2 五聚体的抗体进行表面染色,以检测抗原特异性 CTL 的频率。CTL 随后用皂苷缓冲液进行透化,以使用细胞因子特异性抗体检测 IL-2 和 IFN- γ 的细胞内生产。在一些情况下,CTL 由共培养物进行收获,并且用针对 CD8 受体、CD28 受体、CD45RA 分子和 MART-1/A2 五聚体的单克隆抗体进行表面染色。

[0406] 经由 PME-CD40L 过程成熟的 DCs 显示超过用‘CD40L 基础过程’和诱导 DCs 成熟的其他过程成熟的 DCs 显著增强的免疫能力。

[0407] 图 28 显示与产生 DC 的其他方法比较,例如用 CD40L RNA 和 MART-1RNA 电穿孔并且与 IFN- γ 和 PGE₂ 一起培养 4 小时的 DC(CD40L),或用细胞因子(TNF α 、IFN γ 和 PGE₂) 成熟过夜然后用 Mart-1 RNA 电穿孔且培养 4 小时的 DC(TIP),或用 MART-1RNA 电穿孔并且与细胞因子混合物(IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IFN γ 、PGE₂) 共培养 4 小时的未成熟的 DC(细胞因子),在与用 PME-CD40L 过程产生的 DC 的共培养中在第 25 天时增加的 Mart-1 反应性 CTL 百分比。MART-1 特异性 CTL 通过用 MART-1/HLA-A2 五聚体和抗 CD8 受体抗体共染色进行鉴定。图 28(下图)和图 29 显示与在其他 DC 制剂的存在下产生的 CTL 比较,在 PME-CD40LDC 的存在下产生的大多数 MART-1 CTL 表达 CD28 受体。

[0408] 在图 29 中描述的 CD28 受体表达的时间过程显示在共培养时间段期间早至第 14 天时,来自 PME-CD40L DC 共培养的 89% MART-1 CTL 表达 CD28 受体。此外,在共培养时间段自始至终 CTL 保持 CD28 受体表达。这与其中 DC28 表达随着时间过去下降的 TIP DC 和细胞因子 DC 共培养形成对比。基于用针对 CD45RA 分子的抗体的特异性染色的缺乏,CD28 受体阳性细胞视为经历抗原的 MART-1 CTL。

[0409] 图 30 显示在培养第 10 天时,与其他 DC 过程 TIP(6.5%)、CD40L(50%) 和细胞因

子(14%)比较,PME-CD40L能够诱导最大数目的产生IFN- γ^{HI} /IL-2 $^{\text{HI}}$ 的CTL(60%)。

[0410] 图31显示作为由Mart-1CTL生产的细胞因子总体水平测量的IFN- γ 阳性CTL的平均荧光强度(MFI)。最高水平的IFN- γ 生产在Mart-1 CTL/PME-CD40L DC共培养中可见。

[0411] 由PME-CD40L过程成熟的DCs优先诱导抗原特异性效应/记忆CTL群体

[0412] 尽管由‘CD40L基础过程’诱导初次免疫应答,但‘PME-CD40L’过程导致使用MART抗原模型系统的CTL活性中的显著改善,通过所述过程在用CD40L加抗原编码mRNA电穿孔前,DCs首先用TNF- α 、IFN- γ 和PGE₂进行成熟(图13)。这些抗原反应性CTL的进一步分析揭示经由PME-CD40L过程成熟的DC诱导比使用如图28中所述的其他方法成熟的DC更大数目的MART-1反应性CTL。此外,与由其他DC共培养测定的MART-1 CTL形成对比,经历抗原的MART-1反应性CTL继续维持CD28受体的表达(图28和29)。这些细胞通过CD45RA分子表达的缺乏定义为经历抗原的CTL(Tomiyama等人J. Immunol. (2002) 168 :5538-5550),但基于CD28受体的表达及其在PME-CD40L DC共培养中增加数目的存在,不视为终末分化的效应CTL。这些CTL不同于已在文献中报道的其他效应/记忆CTL,其中病毒特异性CTL是CD28阴性和弱增殖的(Weekes等人J. Immunol. (1999) 162 :7569-7577)。PME-CD40L DC诱导抗原特异性CTL的新群体,其保留在抗原的存在下增殖的能力。因此这些CTL不同于由产生DC的其他方法产生的CTL类型。这是由幼稚T细胞或抗原特异性T细胞群体优先诱导CD28⁺CD45RA⁻记忆/效应T细胞群体的树突细胞的首次报道。

[0413] 在类似于在某些病毒感染例如CMV(Topp等人J Exp Med(2003) 198 :947-955)和HIV(Lieberman等人2001 Blood 98 :1667-1677)中可见的慢性抗原刺激期间,存在CD28表达的丧失和产生IL-2的能力的丧失。图30显示与产生成熟的DC的其他方法形成对比,PME-CD40L产生的DC能够致敏保留产生IL-2和IFN- γ 两者的能力的MART-1特异性CTL。与其他DC过程TIP(6.5%)、CD40L(50%)和细胞因子(14%)比较,PME-CD40L DC能够诱导最高百分比的IFN- γ /IL-2双阳性CTL(60%)。已报道在HIV特异性CTL上CD28受体的丧失与进行性HIV病毒复制平行(Gamberg等人Immunology and Cell Biology(2004) 82 :38-46)。然而,产生IFN γ /IL-2的HIV特异性CTL能够支持HIV特异性CTL的增殖(Zimmerli等人PNAS(2005) 102 :7239-7244)。尽管这些IFN γ /IL-2生产CTL具有CD45RA阴性效应子表型,但它们不使用CD28受体进行表征。Topp等人(J Exp Med(2003) 198 :947-955)显示通过将CD28受体重新引入CD28阴性CMV或HIV特异性CTL内可以恢复IL-2生产和维持CTL增殖。与产生DC的其他方法不同,产生DC的PME-CD40L过程能够诱导抗原特异性CTL,其是CD28阳性的且保留产生高水平IL-2和IFN- γ 的能力。因此产生DC的PME-CD40L过程能够支持长期抗原特异性CTL效应子功能且诱导效应记忆CTL的优选表型,所述效应记忆CTL保留扩增、产生细胞因子且杀伤靶细胞的能力,介导强长期CTL效应子功能的所有关键事件。

[0414] CD40L MET1体外转录的(IVT)、转录后加帽的和多腺苷酸化的mRNA的大规模制备

[0415] 为了产生用于大规模生产截短的CD40L体外转录的(IVT)mRNA的质粒模板,化学合成pCD40L Δ XE-MET1的全长序列。这种合成构建体命名为pARG CD40L。pARG CD40L的序列显示于SEQ ID NO :34中。IVT CD40L-MET1转录物(在多腺苷酸化前)对应于SEQ ID NO :34的核苷酸残基3566-4480。CD40L-MET1的第一个甲硫氨酸密码子对应于SEQ ID NO :34的核苷酸残基3666-3668。由这种IVT mRNA翻译的CD40L-MET1蛋白质对应于SEQ ID

NO :31。

[0416] 在第一个步骤中,使 pARG CD40L 线性化以产生用于体外转录的最佳模板。简言之,2.5mg pARG CD40L 通过在速度设定为 60rpm 的 Precision Reciprocal Shaking Water Bath 中在 12.5ml 的总体积中用 Spe I Restriction Enzyme (BSA Free) 于 37℃ 消化进行线性化。线性化的质粒随后使用 Qiagen RNeasy™ Maxi Spin 柱进行纯化。特别地,将 62.5ml Qiagen Buffer PB 加入线性化质粒中。将溶于 Buffer PB 的 7.5ml 线性化质粒加入各 10 Qiagen RNeasy™ Maxi Spin 柱中。柱在配备吊桶式转头和 50ml 管衔接头的 SORVALL® RT7 离心机中在 4000rpm 下于 25℃ 离心 3 分钟。弃去流通物 (flow-through) 并且柱用 7.5ml/ 柱的 Qiagen Buffer PB 进行洗涤,在 4000rpm 下于 25℃ 离心 3 分钟,然后用 10ml 含有乙醇的 Buffer PE (与 192ml 100% 无核酸酶乙醇混合的 48ml Buffer PE) 进行洗涤,并且在 4000rpm 下于 25℃ 离心 3 分钟,然后在 4000rpm 下于 25℃ 离心 10 分钟。线性化的 pARG CD40L 通过下述进行洗脱:向每个柱中添加 0.8ml 无核酸酶水,于 30℃ 在干燥培养箱中温育 5-7 分钟,然后通过 4000rpm 下于 25℃ 离心 10 分钟收集洗脱物。线性化的 pARG CD40L 进行等分且贮藏于 -85±10℃。

[0417] 在第二个步骤中,CD40L MET1 RNA 使用来自 Epicentre Biotechnologies AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit 的试剂在体外由线性化 pARG CD40L 进行转录。简言之,溶于 6.8ml 无核酸酶水的 1000 μg 线性化 pARG CD40L 与 2ml T7 10X 反应缓冲液 (Reaction Buffer)、1.8ml 100mM ATP、1.8ml 100mM CTP、1.8ml 100mM GTP、1.8ml 100mM UTP 和 2ml 100mM DTT 混合,然后在添加 2ml AmpliScribe™ T7-Flash™ T7 酶溶液 (Enzyme Solution) 前,在 37±1℃ 振荡水浴中预加温 10 分钟。这种反应混合物在 37±1℃ 振荡水浴中在 60rpm 下温育 60 分钟。pARG CD40L DNA 随后通过加入 1ml 1mg/mL Pulmozyme Enzyme® (链球菌 DNA 酶 α ; Genentech, Inc.) 由 IVT RNA 制剂进行消化,并且在 37±1℃ 振荡水浴中在 60rpm 下继续温育 30-35 分钟。向消化液中加入 60ml 无核酸酶水,随后将其转移至包含 300ml RLT Buffer (Qiagen) 和 3ml 2-巯基乙醇的 1000ml 瓶中。内容物通过回荡进行混合,然后加入 220ml 无核酸酶 100% 乙醇并且通过回荡进行混合。将 15ml 这种 CD40L MET1 IVT RNA 溶液装载到 20 个 Qiagen RNeasy Maxi Column 的每一个上。柱在配备吊桶式转头和 50ml 管衔接头的 SORVALL® RT7 离心机中在 4000rpm 下于 25℃ 离心 3 分钟。弃去流通物且将 12ml 剩余 IVT RNA 装载到 20 个柱的每一个上。柱在 4000rpm 下于 25℃ 再次离心 3 分钟且弃去流通物。柱用 10ml/ 柱含有乙醇的 Qiagen RPE 缓冲液 (85ml Qiagen RPE 缓冲液和 340ml 100% 无核酸酶乙醇) 洗涤 2 次,并且在第 1 次洗涤后在 4000rpm 下于 25℃ 离心 1 次,和在第 2 次洗涤后离心 2 次。IVT RNA 通过下述进行洗脱:向每个柱中添加 1.5ml 无核酸酶水,于 30±1℃ 在干燥培养箱中温育 8-10 分钟,然后通过 4000rpm 下于 25℃ 离心 3 分钟收集洗脱物。IVT RNA 通过下述进行第二次洗脱:向每个柱中添加 1.5ml 无核酸酶水,于 30±1℃ 在干燥培养箱中温育 8-10 分钟,然后通过 4000rpm 下于 25℃ 离心 3 分钟收集洗脱物。将 CD40L MET1 IVT RNA 合并、等分试样且贮藏于 -85±10℃。产量为 ≥ 65mg CD40L MET1 IVT RNA。

[0418] 在第三个步骤中,CD40L MET1 IVT RNA 在体外进行加帽且多核苷酸化。痘苗病毒加帽酶和 2' -O- 甲基转移酶用于生产具有 I 型帽结构的 RNA,其不能与在真核细胞中的 RNA 转录物上形成的帽区别开。简言之,将 40mg CD40L MET1 IVT RNA, 47.566ml 无核酸酶

水, 6.7mL 10X 加帽缓冲液 (Capping Buffer) (0.5M Tris-HCl (pH8.0), 60mM KCl 和 12.5mM $MgCl_2$; 来自 Epicentre Biotechnologies ScriptCap™ Cap 1Capping Kit), 6.7mL 10mM GTP 和 334 μ L 20mM S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 组合在 250mL 瓶中, 且在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 振荡水浴中预加温 15 ± 2 分钟。加入 2.7mL 10,000U/mL ScriptCap™ 加帽酶 (痘苗病毒加帽酶) 和 2.7mL 0.1mg/mL ScriptCap™ 2'-O-甲基转移酶 (两者都来自 Epicentre Biotechnologies), 并且使瓶在速度设定为 60rpm 的 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 振荡水浴中温育 60 ± 5 分钟。这次温育后, 向瓶中加入 33.8mL 无核酸酶水、13.4mL 10X A Plus™ 反应缓冲液 (Reaction Buffer) (0.5M Tris-HCl (pH8.0)、2.5M NaCl 和 100mM $MgCl_2$) 和 13.4mL 10mM ATP, 所述瓶随后在速度设定为 60rpm 的 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 振荡水浴中预加温 15 ± 2 分钟。加入 5.4mL 4000 U/mL A-Plus™ Poly(A) Polymerase (Epicentre Biotechnologies), 并且使瓶在速度设定为 60rpm 的 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 振荡水浴中温育 60 ± 5 分钟。加帽且多腺苷酸化的 RNA 随后使用 RNeasy™ MaxiKits (Qiagen) 进行纯化。具体地, 将包含加帽且多腺苷酸化的 IVT CD40L MET1 RNA 的瓶的内容物转移至包含 500mL RLT 缓冲液 (Qiagen) 和 5mL 2-巯基乙醇的 1000mL 瓶, 并且通过回荡进行混合。加入 367mL 无核酸酶 100% 乙醇, 并且通过剧烈回荡进行混合。将 15mL 这种溶液应用到每个 10RNeasy™ Maxi Columns (Qiagen) 上。柱在配备吊桶式转头和 50ml 管衔接头的 SORVALL® RT7 离心机中在 4000rpm 下于 25°C 离心 3 分钟。弃去流通物且将 15mL 剩余 IVT RNA 装载到 20 个柱的每一个上。柱在 4000rpm 下于 25°C 再次离心 3 分钟且弃去流通物。重复这个过程直至所有剩余 RNA 与柱结合。柱再离心 1 次, 然后用 10ml/柱含有乙醇的 Qiagen RPE 缓冲液 (85ml Qiagen RPE 缓冲液和 340ml 100% 无核酸酶乙醇) 洗涤 2 次, 并且在第 1 次洗涤后在 4000rpm 下于 25°C 离心 1 次 3 分钟, 和在第 2 次洗涤后离心 2 次。IVT 加帽且多腺苷酸化的 CD40L MET1 RNA 通过下述进行洗脱: 向每个柱中添加 1.3mL 无核酸酶水, 于 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 在干燥培养箱中温育 8-10 分钟, 然后通过 4000rpm 下于 25°C 离心 3 分钟收集洗脱物。RNA 通过下述再洗脱 2 次: 向每个柱中添加 1.3mL 无核酸酶水, 于 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 在干燥培养箱中温育 8-10 分钟, 然后通过 4000rpm 下于 25°C 离心 3 分钟收集洗脱物。将 IVT RNA 洗脱物合并且使用无菌 150mL PES 膜滤器真空单元进行过滤, 等分试样且贮藏于 $\leq -150^\circ\text{C}$, 直至在转染树突细胞中使用。产量为 $\geq 41\text{mg}$ 加帽且多腺苷酸化的 CD40L MET1 IVT RNA。在使用 HIV 抗原 RNA 的优选转染规程中, 使 $1\mu\text{g}$ CD40L MET1 RNA 用 $1\mu\text{g}$ HIV Gag RNA、 $1\mu\text{g}$ HIV 截短的 Vpr RNA、 $1\mu\text{g}$ HIV Rev RNA 和 $0.25\mu\text{g}$ HIV Nef RNA/ 10^6 树突细胞共转染。在使用总肿瘤 RNA 的优选转染规程中, 使 $3\mu\text{g}$ CD40L MET1 RNA 用 $2\mu\text{g}$ 总肿瘤 RNA/ 10^6 树突细胞共转染。

[0419] 使用轮状病毒基因 6 3' UTR 以改善 RNA 的翻译

[0420] 轮状病毒基因 6 3' UTR 增强 CD40L 蛋白质的表达的最初观察 (上文) 在许多可替代序列中进行测试。编码肺炎抗原的 OmlA cDNA 由疫苗和传染病组织 (Vaccine and Infectious Disease Organization) (VIDO) 友情提供。将 cDNA 序列亚克隆到在 3' UTR 中含或不含 3' Rot 6 序列的 RNA 表达载体 pGEM4Z64A-SphI 内。RNA 在转录后反应中进行加帽且多腺苷酸化。来自 OmlA 或 OmlA Rot6 RNAs 的体外翻译产物的蛋白质印迹分析检测到在包含 OmlA RNA 模板使用特异性抗-OmlA 抗血清的反应中预期分子量的特定条带。与 OmlA 模板比较, 在来自 OmlA Rot6 模板的条带强度中存在轻微增加 (图 32)。

[0421] 将编码黑素瘤相关抗原的 Tryp-2 编码序列亚克隆到含或不含 Rot6 3' UTR 修饰的

pGEM4Z64A-Sph1 质粒内。RNAs 进行转录且由 ARCA 进行共转录加帽,并且进行转录后多腺苷酸化。³⁵S 标记的 OmlA 或 OmlARot 6 的体外翻译研究显示与 Tryp-2 RNA 的那种比较,来自 Tryp-2 Rot 6 的表达水平较高(图 33)。随后在 DCs 中进行更广泛的分析。各种加帽的 RNAs 由 Tryp-2 或 Tryp-2 Rot 6 模板进行制备。对于所有 ARCARNAs,使用共转录加帽法;对于所有 m7G 帽(0 型或 I 型),使用转录后加帽法。将 RNAs 转染到 DCs 内,并且表达水平使用抗 Tryp-2 特异性抗体在电穿孔后 4 小时或 24 小时进行监控。图 34 显示对于研究的所有帽类型,用 Rot6 3' UTR 达到的表达水平略微高于在不含 Rot63' UTR 的相应配对物中的那种。例如,含 Rot6 3'UTR 的 m7G I 型加帽 RNA 显示更高水平的染色强度和百分比阳性细胞。这种趋势应用于检查的所有类型的帽。

[0422] 将 IL-4 鼠 cDNA 亚克隆到含或不含 Rot6 3' UTR 修饰的 RNA 转录载体内。各种加帽的 RNAs 使用 ARCA 共转录加帽法或 m7G(0 型或 I 型)转录后加帽来合成。所有 RNAs 在转录后多腺苷酸化反应中进行多腺苷酸化。当 RNA 使用 4ug RNA/ 百万 DC 用 ARCA 进行共转录加帽时,轮状病毒基因 6 3'UTR 序列的作用特别显著。当 4ug RNA 用于转染时,该趋势在测试的所有类型的帽中不显著(图 35)。

[0423] 在另外实验中,比较来自具有或不具有 Rot6 3' UTR 的 m7G I 型加帽且多腺苷酸化的 RNA 的 IL-4 表达水平。在 IL-4 RNA 中的轮状病毒基因 6 3' UTR 序列对百分比阳性细胞、细胞内发信号的强度(小图 B)和通过 ELISA 测量的 IL-4 细胞因子的分泌(小图 C)的作用。如图 36,小图 A 中所见,当使用 Rot6 3'UTR 修饰的 RNA 时,在电穿孔后 21 小时时阳性染色的细胞百分比增加。小图 B 显示当 RNA 用 Rot-6 3'UTR 进行修饰时,用抗 IL-4 抗体的细胞内染色的强度在电穿孔后 4 小时时更大。当 IL-4 细胞因子生产的水平在 4 微克 RNA/ 百万 DC 下测量时,轮状病毒基因 63'UTR 序列的作用最显著,其中存在 IL-4 细胞因子水平分泌的显著增加,这在测试的随后时间点上甚至更显著(小图 C)。

SEQUENCE LISTING

<110>Argos Therapeutics, Inc.

Kirin Beer Kabushiki Kaisha

Healey, Don

Tcherepanova, Irina

Adams, Melissa

Hinohara, Atsushi

DeBenedette, Mark

<120>MATURE DENDRITIC CELL COMPOSITIONS AND METHODS FOR CULTURING SAME

<130>ARG030CIPW0

<150>11/400, 774

<151>2006-0407

<160>34

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>1816

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<221>CDS

<222>(40).. (825)

<400>1

cttctctgcc agaagatacc atttcaactt taacacagc atg atc gaa aca tac	54
Met Ile Glu Thr Tyr	
1 5	
aac caa act tct ccc cga tct gcg gcc act gga ctg ccc atc agc atg	102
Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly Leu Pro Ile Ser Met	
10 15 20	
aaa att ttt atg tat tta ctt act gtt ttt ctt atc acc cag atg att	150

Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	Ile	Thr	Gln	Met	Ile	
25				30				35								
ggg	tca	gca	ctt	ttt	gct	gtg	tat	ctt	cat	aga	agg	ttg	gac	aag	ata	198
Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg	Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	
40				45				50								
gaa	gat	gaa	agg	aat	ctt	cat	gaa	gat	ttt	gta	ttc	atg	aaa	acg	ata	246
Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val	Phe	Met	Lys	Thr	Ile	
55				60				65								
cag	aga	tgc	aac	aca	gga	gaa	aga	tcc	tta	tcc	tta	ctg	aac	tgt	gag	294
Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	
70				75				80				85				
gag	att	aaa	agc	cag	ttt	gaa	ggc	ttt	gtg	aag	gat	ata	atg	tta	aac	342
Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Lys	Asp	Ile	Met	Leu	Asn	
90				95				100								
aaa	gag	gag	acg	aag	aaa	gaa	aac	agc	ttt	gaa	atg	caa	aaa	ggt	gat	390
Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	
105				110				115								
cag	aat	cct	caa	att	gcg	gca	cat	gtc	ata	agt	gag	gcc	agc	agt	aaa	438
Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	
120				125				130								
aca	aca	tct	gtg	tta	cag	tgg	gct	gaa	aaa	gga	tac	tac	acc	atg	agc	486
Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	
135				140				145								
aac	aac	ttg	gta	acc	ctg	gaa	aat	ggg	aaa	cag	ctg	acc	gtt	aaa	aga	534
Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln	Leu	Thr	Val	Lys	Arg	
150				155				160				165				
caa	gga	ctc	tat	tat	atc	tat	gcc	caa	gtc	acc	ttc	tgt	tcc	aat	cgg	582
Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr	Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	
170				175				180								
gaa	gct	tcg	agt	caa	gct	cca	ttt	ata	gcc	agc	ctc	tgc	cta	aag	tcc	630
Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser	Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	
185				190				195								
ccc	ggt	aga	ttc	gag	aga	atc	tta	ctc	aga	gct	gca	aat	acc	cac	agt	678
Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	Ala	Asn	Thr	His	Ser	
200				205				210								
tcc	gcc	aaa	cct	tgc	ggg	caa	caa	tcc	att	cac	ttg	gga	gga	gta	ttt	726
Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	
215				220				225								
gaa	ttg	caa	cca	ggt	gct	tcg	gtg	ttt	gtc	aat	gtg	act	gat	cca	agc	774

Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser	
230	235 240 245
caa gtg agc cat ggc act ggc ttc acg tcc ttt ggc tta ctc aaa ctc	822
Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu	
250	255 260
tga acagtgtcac cttgcagget gtggtggagc tgacgtggg agtccttcata	875
atacagcaca gcggttaage ccacccccctg ttaactgcct atttataacc ctaggatcct	935
ccttatggag aactatttat tatacactcc aaggcatgta gaactgtaat aagtgaatta	995
caggtcacat gaaaccaaaa cgggccctgc tccataagag cttatatatc tgaagcagca	1055
acccactga tgcagacatc cagagagtcc tatgaaaaga caaggccatt atgcacaggt	1115
tgaattctga gtaaacagca gataacttgc caagttcagt tttgtttctt tgcgtgcagt	1175
gtctttccat ggataatgca ttgatttat cagtgaagat gcagaaggga aatgggggagc	1235
ctcagctcac attcagttat ggttgactct gggttcctat ggccttggtg gagggggcca	1295
ggctctagaa cgtctaacac agtggagaa cgaaccccc ccccccccc cgcaccct	1355
ctcggacagt tattcattct ctttcaatct ctctctctcc atctctctct ttcagtctct	1415
ctctctcaac ctctttcttc caatctctct ttctcaatct ctctgtttcc ctttgtcagt	1475
ctcttccctc ccccagctct tcttctcaat cccctttct aacacacaca cacacacaca	1535
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacagagt caggccgttg	1595
ctagtcagtt ctcttcttcc caccctgtcc ctatctctac cactatagat gagggtgagg	1655
agtagggagt gcagccctga gcctgccac tcctcattac gaaatgactg tatttaaagg	1715
aaatctattg tatctacctg cagtctccat tgtttccaga gtgaacttgt aattatcttg	1775
ttattttattt ttgaataat aaagacctct taacattaaa a	1816

<210>2

<211>261

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly	
1	5 10 15
Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu	
20	25 30
Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg	
35	40 45
Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val	
50	55 60
Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser	

65	70	75	80
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys			
	85	90	95
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu			
	100	105	110
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser			
	115	120	125
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly			
	130	135	140
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln			
145	150	155	160
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr			
	165	170	175
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser			
	180	185	190
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala			
	195	200	205
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His			
	210	215	220
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn			
225	230	235	240
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe			
	245	250	255
Gly Leu Leu Lys Leu			
	260		

<210>3

<211>1570

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<221>CDS

<222>(67)..(522)

<400>3

```

ggcaggggag tcagcagagg cctcgctcgg gcgcccagtg gtcctgccgc ctggtctcac 60
ctcgcc atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg 108
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu

```

1	5	10	
ctg acc gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag			156
Leu Thr Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln			
15	20	25	30
tac cta ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa			204
Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys			
35	40	45	
ctg gtg agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc			252
Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys			
50	55	60	
ggg gaa agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac ttc cac			300
Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Phe His			
65	70	75	
cag cac aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag			348
Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys			
80	85	90	
ggc acc tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac			396
Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His			
95	100	105	110
tgt acg agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg			444
Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser			
115	120	125	
ccc ggc ttt ggg gtc aag cag att gac atc tgc cag cca cat ttc ccc			492
Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Asp Ile Cys Gln Pro His Phe Pro			
130	135	140	
aag gac cgc ggt ttg aac ctt ctg atg tag atgagctctg acattggaag			542
Lys Asp Arg Gly Leu Asn Leu Leu Met			
145	150		
attctggagt ctgacaagtc acagcagggt gagggtaggg agaaactgca ggtgaggggt			602
gcatgctgaa gtcctgattt ctccagggtcc ccaggatcgg ctgagagccc tgggtggtgat			662
ccccatcatt ttcgggatcc tggtttgcat cctcttggtg ctggtcttta tcaaaaaggt			722
ggccaagaag ccaaccaata aggccccccac cccaagcag gaaccccagg agatcaattt			782
tcccgacgat ctctctggct ccaacactgc tgctccagtg caggagactt tacatggatg			842
ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gagtcgcata tcagtgcagg agagacagtg			902
aggctgcacc caccaggagg tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc cagagagcct			962
ggtgctgctg ctgctgtggc gtgagggtga ggggctggca ctgactgggc atagctcccc			1022
gcttttgcct gcacccctgc agtttagaca ggagacctgg cactggatgc agaaacagtt			1082
caccttgaag aacctctcac ttcacctgg agcccatcca gtctcccaac ttgtattaaa			1142
gacagaggca gaagtttggg ggtgggtggg ttggggatat gtttagtaat atccaccaga			1202

```

ccttccgata cagcagtttg gtgcccagag aggcatacatg gtggcttccc tgcgcccagg 1262
aagccatata cacagatgcc cattgcagca ttgtttgtga tagtgaacaa ctggaagctg 1322
cttaactgtc catcagcagg agactggcta aataaaatta gaatatattt atacaacaga 1382
atctcaaaaa cactgttgag taaggaaaaa aaggcatgct gctgaatgat gggtatggaa 1442
ctttttaaaa aagtacatgc ttttatgtat gtatattgcc tatggatata tgtataaata 1502
caatatgcat catatattga taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1562
aaaaaaaaa 1570

```

<210>4

<211>151

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>4

```

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

```

<210>5

<211>1193

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<221>CDS

<222>(109).. (609)

<400>5

tgaagatcag ctattagaag agaaagatca gttaagtcct ttggacctgatcagcttgat	60
acaagaacta ctgatttcaa cttcttttggc ttaattctct cggaacg atg aaa tat	117
Met Lys Tyr	
1	
aca agt tat atc ttg gct ttt cag ctc tgc atc gtt ttg ggt tct ctt	165
Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu Gly Ser Leu	
5 10 15	
ggc tgt tac tgc cag gac cca tat gta aaa gaa gca gaa aac ctt aag	213
Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys	
20 25 30 35	
aaa tat ttt aat gca ggt cat tca gat gta gcg gat aat gga act ctt	261
Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu	
40 45 50	
ttc tta ggc att ttg aag aat tgg aaa gag gag agt gac aga aaa ata	309
Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile	
55 60 65	
atg cag agc caa att gtc tcc ttt tac ttc aaa ctt ttt aaa aac ttt	357
Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe	
70 75 80	
aaa gat gac cag agc atc caa aag agt gtg gag acc atc aag gaa gac	405
Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp	
85 90 95	
atg aat gtc aag ttt ttc aat agc aac aaa aag aaa cga gat gac ttc	453
Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe	
100 105 110 115	
gaa aag ctg act aat tat tcg gta act gac ttg aat gtc caa cgc aaa	501
Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys	
120 125 130	
gca ata cat gaa ctc atc caa gtg atg gct gaa ctg tcg cca gca gct	549
Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala	
135 140 145	
aaa aca ggg aag cga aaa agg agt cag atg ctg ttt caa ggt cga aga	597
Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg Arg	

150	155	160	
gca tcc cag taatggttgctc	gcctgcaata tttgaatttt	aaatctaaat	649
Ala Ser Gln			
165			
ctattttatta atattttaaca	ttattttatat ggggaatata	tttttagact catcaatcaa	709
ataagttattt ataatagcaa	cttttgtgta atgaaaatga	atatctatta atatatgtat	769
tattttataat tcctataatc	tgtgactgtc tcacttaatc	ctttgttttc tgactaatta	829
ggcaaggcta tgtgattaca	aggctttatc tcaggggcca	actaggcagc caacctaagc	889
aagatcccat ggggttggtg	tttatttcac ttgatgatac	aatgaacact tataagtga	949
gtgatactat ccagttactg	ccggtttgaa aatatgcctg	caatctgagc cagtgcctta	1009
atggcatgtc agacagaact	tgaatgtgtc aggtgaccct	gatgaaaaca tagcatctca	1069
ggagatttca tgcctgggtc	ttccaaatat tgttgacaac	tgtgactgta cccaaatgga	1129
aagtaactca tttgttaaaa	ttatcaatat ctaatatata	tgaataaagt gtaagttcac	1189
aact			1193

<210>6

<211>166

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>6

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

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
 130 135 140
 Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln
 145 150 155 160
 Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

<210>7

<211>1669

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<221>CDS

<222>(170).. (871)

<400>7

ctccctcagc aaggacagca gaggaccagc taagaggagg agaagcaact acagaccccc 60
 cctgaaaaca accctcagac gccacatccc ctgacaagct gccaggcagg ttctcttcct 120
 ctcacatact gacccacggc tccacctct ctcacctgga aaggacacc atg agc act 178
 Met Ser Thr
 1
 gaa agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg ctc ccc aag 226
 Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala Leu Pro Lys
 5 10 15
 aag aca ggg ggg ccc cag ggc tcc agg cgg tgc ttg ttc ctc agc ctc 274
 Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe Leu Ser Leu
 20 25 30 35
 ttc tcc ttc ctg atc gtg gca ggc gcc acc acg ctc ttc tgc ctg ctg 322
 Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe Cys Leu Leu
 40 45 50
 cac ttt gga gtg atc ggc ccc cag agg gaa gag ttc ccc agg gac ctc 370
 His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu
 55 60 65
 tct cta atc agc cct ctg gcc cag gca gtc aga tca tct tct cga acc 418
 Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr
 70 75 80
 ccg agt gac aag cct gta gcc cat gtt gta gca aac cct caa gct gag 466
 Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu

85	90	95	
ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg gcc aat gcc ctc ctg gcc aat			514
Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn			
100	105	110	115
ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg gtg gtg cca tca gag ggc ctg			562
Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu			
120	125	130	
tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc aag ggc caa ggc tgc ccc tcc			610
Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser			
135	140	145	
acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc agc cgc atc gcc gtc tcc tac			658
Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr			
150	155	160	
cag acc aag gtc aac ctc ctc tct gcc atc aag agc ccc tgc cag agg			706
Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg			
165	170	175	
gag acc cca gag ggg gct gag gcc aag ccc tgg tat gag ccc atc tat			754
Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr			
180	185	190	195
ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag aag ggt gac cga ctc agc gct gag			802
Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu			
200	205	210	
atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt gcc gag tct ggg cag gtc tac			850
Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr			
215	220	225	
ttt ggg atc att gcc ctg tgaggaggacgaa catccaacct tcccaaacgc			901
Phe Gly Ile Ile Ala Leu			
230			
ctccccctgcc ccaatccctt tattaccccc tccttcagac accctcaacc tcttctgget			961
caaaaagaga attgggggct tagggtcgga acccaagctt agaacttta gcaacaagac			1021
caccacttcg aaacctggga ttcaggaatg tgtggcctgc acagtgaagt gctggcaacc			1081
actaagaatt caaactgggg cctccagaac tcaactggggc ctacagcttt gatccctgac			1141
atctggaatc tggagaccag ggagcctttg gtctctggcca gaatgctgca ggacttgaga			1201
agacctcacc tagaaattga cacaagtga ccttaggcct tcctctctcc agatgtttcc			1261
agacttcctt gagacacgga gcccagccct ccccatggag ccagctccct ctatttatgt			1321
ttgcacttgt gattatttat tatttattta ttatttatit atttacagat gaatgtattt			1381
atttgggaga ceggggtatc ctgggggacc caatgtagga gctgccttgg ctacagacatg			1441
ttttccgtga aaacggagct gaacaatagg ctgttcccat gtagccccct ggccctctgtg			1501

```

ccttcttttg attatgtttt ttaaaatatt tatctgatta agttgtctaa acaatgctga 1561
tttggtgacc aactgtcact cattgctgag cctctgctcc ccaggggagt tgtgtctgta 1621
atcgccctac tattcagtgg cgagaaataa agtttgctta gaaaagaa 1669

```

<210>8

<211>233

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>8

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1           5           10           15
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
          20           25           30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
          35           40           45
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
          50           55           60
Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65           70           75           80
Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
          85           90           95
Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
          100          105          110
Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
          115          120          125
Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
          130          135          140
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145          150          155          160
Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
          165          170          175
Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
          180          185          190
Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
          195          200          205
Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
          210          215          220

```

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu

225

230

<210>9

<211>1250

<212>DNA

<213>Mus musculus

<220>

<221>CDS

<222>(13).. (795)

<400>9

ctttcagtcagc atg ata gaa aca tac agc caa cct tcc ccc aga tcc gtg	51
Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser Val	
1 5 10	
gca act gga ctt cca gcg agc atg aag att ttt atg tat tta ctt act	99
Ala Thr Gly Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr	
15 20 25	
gtt ttc ctt atc acc caa atg att gga tct gtg ctt ttt gct gtg tat	147
Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Val Leu Phe Ala Val Tyr	
30 35 40 45	
ctt cat aga aga ttg gat aag gtc gaa gag gaa gta aac ctt cat gaa	195
Leu His Arg Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His Glu	
50 55 60	
gat ttt gta ttc ata aaa aag cta aag aga tgc aac aaa gga gaa gga	243
Asp Phe Val Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu Gly	
65 70 75	
tct tta tcc ttg ctg aac tgt gag gag atg aga agg caa ttt gaa gac	291
Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu Asp	
80 85 90	
ctt gtc aag gat ata acg tta aac aaa gaa gag aaa aaa gaa aac agc	339
Leu Val Lys Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn Ser	
95 100 105	
ttt gaa atg caa aga ggt gat gag gat cct caa att gca gca cac gtt	387
Phe Glu Met Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val	
110 115 120 125	
gta agc gaa gcc aac agt aat gca gca tcc gtt cta cag tgg gcc aag	435

Val	Ser	Glu	Ala	Asn	Ser	Asn	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Lys					
				130				135				140								
aaa	gga	tat	tat	acc	atg	aaa	agc	aac	ttg	gta	atg	ctt	gaa	aat	ggg	483				
Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn	Leu	Val	Met	Leu	Glu	Asn	Gly					
				145				150				155								
aaa	cag	ctg	acg	gtt	aaa	aga	gaa	gga	ctc	tat	tat	gtc	tac	act	caa	531				
Lys	Gln	Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Glu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Thr	Gln					
				160				165				170								
gtc	acc	ttc	tgc	tct	aat	cgg	gag	cct	tcg	agt	caa	cgc	cca	ttc	atc	579				
Val	Thr	Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Phe	Ile					
				175				180				185								
gtc	ggc	ctc	tgg	ctg	aag	ccc	agc	agt	gga	tct	gag	aga	atc	tta	ctc	627				
Val	Gly	Leu	Trp	Leu	Lys	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu					
190				195				200				205								
aag	gcg	gca	aat	acc	cac	agt	tcc	tcc	cag	ctt	tgc	gag	cag	cag	tct	675				
Lys	Ala	Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ser	Gln	Leu	Cys	Glu	Gln	Gln	Ser					
				210				215				220								
gtt	cac	ttg	ggc	gga	gtg	ttt	gaa	tta	caa	gct	ggt	gct	tct	gtg	ttt	723				
Val	His	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Phe					
				225				230				235								
gtc	aac	gtg	act	gaa	gca	agc	caa	gtg	atc	cac	aga	gtt	ggc	ttc	tca	771				
Val	Asn	Val	Thr	Glu	Ala	Ser	Gln	Val	Ile	His	Arg	Val	Gly	Phe	Ser					
				240				245				250								
tct	ttt	ggc	tta	ctc	aaa	ctc	tga	acagtgcgct			gtcctaggct			gcagcagggc		825				
Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu																				
255				260																
tgatgctggc				agtcttcct				atacagcaag				tcagtttagga				cctgccctgt gttgaactgc		885		
ctattttataa				ccctaggatc				ctcctcatgg				agaactatit				attatgtacc cccaaggcac				945
atagagctgg				aataagagaa				ttacagggca				ggcaaaaatc				ccaagggacc ctgctcccta				1005
agaacttaca				atctgaaaca				gcaacccac				tgattcagac				aaccagaaaa gacaaagcca				1065
taatacacag				atgacagagc				tctgatgaaa				caacagataa				ctaatgagca cagttttgtt				1125
gttttatggg				tgtgtcgttc				aatggacagt				gtacttgact				taccagggaa gatgcagaag				1185
ggcaactgtg				agcctcagct				cacaatctgt				tatggttgac				ctgggctccc tgcggcccta				1245
gtagg																				1250
<210>10																				
<211>260																				
<212>PRT																				
<213>Mus musculus																				

<400>10

Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser Val Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Val Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45
 Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60
 Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu Gly Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu Asp Leu Val Lys
 85 90 95
 Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met
 100 105 110
 Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu
 115 120 125
 Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr
 130 135 140
 Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu
 145 150 155 160
 Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val Thr Phe
 165 170 175
 Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe Ile Val Gly Leu
 180 185 190
 Trp Leu Lys Pro Ser Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala
 195 200 205
 Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln Ser Val His Leu
 210 215 220
 Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val
 225 230 235 240
 Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser Phe Gly
 245 250 255
 Leu Leu Lys Leu
 260

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic primer

<400>11

gcatgatcga aacatacaac c

21

<210>12

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic primer

<400>12

ctattatgaa gactcccagc g

21

<210>13

<211>915

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Optimized human CD40L

<400>13

gggcgaattg ggccctctag atctgcagaa ttcggcttgc atgatcgaaa catacaacca	60
aacttctccc cgatctgcgg ccaactggact gcccacacgc atgaaaattt ttatgtattt	120
acttactgtt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca ctttttgctg tgtatcttca	180
tagaagggtg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat gaagattttg tattcatgaa	240
aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc ttactgaact gtgaggagat	300
taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta aacaaagagg agacgaagaa	360
agaaaacagc tttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct caaattgcgg cacatgtcat	420
aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg gctgaaaaag gatactacac	480
catgagcaac aacttggtaa ccctggaaaa tgggaaacag ctgaccgtta aaagacaagg	540

actctattat atctatgccc aagtcacett ctgttccaat cgggaagctt cgagtcaagc	600
tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga ttcgagagaa tcttactcag	660
agctgcaa at acccacagtt ccgcca aacc ttgcgggcaa caatccattc acttgggagg	720
agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggg gtttgtcaat gtgactgatc caagccaagt	780
gagccatggc acttggttca cgctctttgg ctactcaaa ctctgaacag tgtcaccttg	840
caggctgtgg tggagctgac gctgggagtc ttcataatac aagccgaatt ccagcacact	900
ggcggccggtt actag	915

<210>14

<211>251

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>CD40Receptor 3' Untranslated Region

<400>14

ggctgcaccc acccaggagt gtggccacgt gggcaaacag gcagttggcc agagagcctg	60
gtgctgctgc tgctgtggcg tgagggtgag gggctggcac tgactgggca tagtccccg	120
cttctgcctg caccctgca gtttgagaca ggagacctgg cactggatgc agaaacagtt	180
caccttgaag aacctctcac ttcaccctgg agcccatcca gtctcccaac ttgtattaaa	240
gacagaggca g	251

<210>15

<211>597

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>15

gcggactatg acttagttgc gttacaccct ttcttgacaa aacctaactt gcgcagaaaa	60
caagatgaga ttggcatggc tttatttgtt ttttttgttt tgttttggtt tttttttttt	120
ttttggcttg actcaggatt taaaaactgg aacgggtgaag gtgacagcag tcggttggag	180
cgagcateccc ccaaagttca caatgtggcc gaggactttg attgcacatt gttgtttttt	240
taatagtc at tccaaatatg agatgcgttg ttacaggaag tcccttgcca tcctaaaagc	300
caccccaactt ctctctaagg agaatggccc agtcctctcc caagtccaca caggggaggt	360
gatagcattg ctttcgtgta aattatgtaa tgcaaaat ttttaattctt cgccttaata	420
ctttttttatt ttgtttttatt ttgaatgatg agccttcgtg ccccccttc cccctttttt	480

gtcccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggtctccct gggagtgggt ggaggcagcc	540
agggcttacc tgtacactga cttgagacca gttgaataaa agtgcacacc ttaaaaa	597

<210>16

<211>381

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>16

tttgattgca cattgttggt tttttaatag tcattccaaa tatgagatgc gttgttacag	60
gaagtcctt gccatcctaa aagccacccc acttctctct aaggagaatg gcccagtcct	120
ctcccaagtc cacacagggg aggtgatagc attgctttcg tgtaaattat gtaatgcaaa	180
atTTTTTTaa tcttcgcctt aatacttttt tattttgttt tattttgaat gatgagcctt	240
cgtgcccccc ctccccctt ttttgcccc caacttgaga tgtatgaagg cttttggtct	300
ccctgggagt ggggtggagc agccagggt tacctgtaca ctgacttgag accagttgaa	360
taaaagtgca caccttaaaa a	381

<210>17

<211>139

<212>DNA

<213>Simian rotavirus

<400>17

gaccaagcta acaacttggt atccaacttt ggtgagtatg tagctatatc aagctgtttg	60
aactctgtaa gtaaggatgc gtatacgcat tcgctacact gagttaatca ctctgatggt	120
atagtgagag gatgtgacc	139

<210>18

<211>65

<212>DNA

<213>Simian rotavirus

<400>18

gaccaagcta acaacttggt atccaacttt ggtgagtatg tagctatatc aagctgtttg	60
aactc	65

<210>19

<211>179

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>19

tacctttttc gagagtgact cccgttgtcc caaggtttcc cagagcgaac ctgtgcggct	60
gcaggcaccg gcgcgtcgag ttcccgcggt ccggaaggac cgagctcttc tcgcggatcc	120
agtgttccgt ttccagcccc caatctcaga gcggagccga cagagagcag ggaaccggc	179

<210>20

<211>1014

<212>DNA

<213>Mus musculus

<400>20

agcgcagagg cttggggcag ccgagctgca gcgagcgcgc ggcaactgggg gcgagctgag	60
cggcggcagc ggagctctgt cgcgagacgc agcgacaagg cagactatca gcggactcac	120
cagcccggga gtctgtgctc tgggatttga tattcaaacc tcttaatttt tttttcttaa	180
actgtattgt tttacgcttt aatttatatt tgcttcctat tcccccttta aatcgtgcca	240
acggtttgag gaggttgggt cttcactccc tcaaactact tcggattgtg gaaatcagca	300
gacgaaagag gtatcaagag ctccagagag aagtcaagga agagagagag agaccgggtca	360
gagagagcgc gctggcgagc gaacagagag agggacaggg gcaaagtga cttgaccttg	420
cttttggggg tgaccgccag agcgcggcgt gacctcccc ttcgatcttg catcggacca	480
gtcgcgtga cggacagaca gacagacacc gccccagcc ccagcgccca cctcctcgcc	540
ggcgggctgc cgacggtgga cgcggcggcg agccgagaaa ccgaagcccg cgcccggagg	600
cgggttgagg gggtcggggc tcgcgggatt gcacggaaac ttttcgtcca acttctgggc	660
tcttctcgct ccgtagtagc cgtggtctgc gccgcaggag acaaaccgat ccggagctgg	720
gagaaggcta gctcggccct ggagaggccg gggcccagaga agagagggga ggaaggaaga	780
ggagaggggg ccacagtggg cgctcggtc tcaggagccg agctcatgga cgggtgaggc	840
ggccgtgtgc gcagacagtg ctccagccgc gcgcgcgccc caggccccgg cccgggcctc	900
ggttcagaa gggagaggag cccgccaagg cgcgcaagag agcgggctgc ctcgcagtcc	960
ggagccggag agaggagcgc cgagccgccg cggccccgga cggcctccga aacc	1014

<210>21

<211>163

<212>DNA

<213>Mus musculus

<400>21

agcgcagagg cttggggcag ccgagcggca gccaggcccc ggcccgggcc tcggttccag	60
aagggagagg agcccgccaa ggcgcgcaag agagcgggct gcctcgcagt ccgagccgga	120
gagggagcgc gagccgcgcc ggccccggac ggctccgaa acc	163

<210>22

<211>180

<212>DNA

<213>Spleen necrosis Virus

<400>22

ttgctcggcc tcgaggtcgg ggtcgccgtc ctacacattg ttgtttgtgac gtgcggccca	60
gatttgaatc tgtaataaaa cttttttttt tctgaatcct cagattggca gtgagaggag	120
atthttgttcg tgggtgttggc tggcctactg ggtgggcgca gggatcttgg tggcgtgaaa	180

<210>23

<211>143

<212>DNA

<213>Tobacco etch virus

<400>23

aaataacaaa tctcaacaca acatatacaa aacaaacgaa tctcaagcaa tcaagcattc	60
tactttctatt gcagcaatth aaatcatttc ttttaagca aaagcaatth tctgaaaatt	120
ttcaccatth acgaacgata gca	143

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic peptide

<400>24

Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

<210>25

<211>9

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic peptide

<400>25

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

<210>26

<211>10

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic peptide

<400>26

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val

1 5 10

<210>27

<211>109

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>27

gctggagcct cggtagccgt tctcctgcc cgctgggcct cccaacgggc cctcctcccc 60

tccttgcacc ggcccttct ggtctttgaa taaagtctga gtgggcagc 109

<210>28

<211>134

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>28

gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttcctaa gtccaactac 60

taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaat aaaaaacatt 120

tattttcatt gcaa 134

<210>29

<211>107

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>29

gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttcctaa gtccaactac 60

taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcct 107

<210>30

<211>915

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic transcript

<220>

<221>misc_feature

<222>(1)..(38)

<223>Vector-Derived Sequence

<220>

<221>misc_feature

<222>(39)..(881)

<223>CD40L Sequence

<220>

<221>misc_feature

<222>(41).. (42)

<223>Mutation :AT to GC

<220>

<221>misc_feature

<222>(101).. (823)

<223>CD40L open reading frame beginning with methionine#2

<220>

<221>misc_feature

<222>(882).. (925)

<223>Vector-Derived Sequence

<400>30

gggcgaattg ggccctctag atctgcagaa ttcggcttgc gcgatcgaaa catacaacca	60
aacttctccc cgatctgcgg ccactggact gccatcagc atgaaaattt ttatgtattt	120
acttactgtt tttcttata cccagatgat tgggtcagca ctttttgctg tgtatcttca	180
tagaagggtg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat gaagattttg tattcatgaa	240
aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc ttactgaact gtgaggagat	300
taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta aacaaagagg agacgaagaa	360
agaaaacagc tttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct caaattgcgg cacatgtcat	420
aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg gctgaaaaag gatactacac	480
catgagcaac aacttggtta ccctggaaaa tgggaaacag ctgaccgtta aaagacaagg	540
actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat cgggaagctt cgagtcaagc	600
tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga ttcgagagaa tcttactcag	660
agctgcaaat acccacagtt ccgccaaacc ttgcgggcaa caatccattc acttgggagg	720
agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat gtgactgac caagccaagt	780
gagccatggc actggcttca cgtccttttg cttactcaaa ctctgaacag tgcaccttg	840
caggctgtgg tggagctgac gctgggagtc ttcataatac aagccgaatt ccagcacact	900
ggcggccgtt actag	915

<210>31

<211>241

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic CD40L deltaXE-MET#1polypeptide

<400>31

Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met
 1 5 10 15
 Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg Arg Leu Asp Lys
 20 25 30
 Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr
 35 40 45
 Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys
 50 55 60
 Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu
 65 70 75 80
 Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly
 85 90 95
 Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
 100 105 110
 Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
 115 120 125
 Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys
 130 135 140
 Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
 165 170 175
 Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
 180 185 190
 Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
 195 200 205
 Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
 210 215 220
 Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu

<210>32

<211>970

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Transcript

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (38)

<223>Vector-derived sequence

<220>

<221>misc_feature

<222>(39).. (826)

<223>CD40L sequence

<220>

<221>misc_feature

<222>(41).. (823)

<223>CD40L open reading frame

<220>

<221>misc_feature

<222>(827).. (965)

<223>Rotavirus g6 3'-untranslated region

<220>

<221>misc_feature

<222>(966).. (970)

<223>Vector-derived sequence

<400>32

```

gggcgaattg ggccctctag atctgcagaa ttcggttgc atgatcgaaa catacaacca    60
aacttctccc cgatctgcgg ccaactggact gcccatcagc atgaaaattt ttatgtattt    120
acttactgtt tttcttatca ccagatgat tgggtcagca ctttttgctg tgtatcttca    180
tagaagggtg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat gaagattttg tattcatgaa    240
aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc ttactgaact gtgaggagat    300
taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta aacaaagagg agacgaagaa    360
agaaaacagc tttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct caaattgcgg cacatgtcat    420
aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg gctgaaaaag gatactacac    480
catgagcaac aacttggtta ccctggaaaa tgggaaacag ctgaccgtta aaagacaagg    540
actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat cggaagctt cgagtcaagc    600

```

tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga ttcgagagaa tcttactcag	660
agctgcaaat acccacagtt ccgccaacc ttgcgggcaa caatccattc acttgggagg	720
agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat gtgactgac caagccaagt	780
gagccatggc actggcttca cgtcctttgg ctactcaaa ctctgagacc aagctaacaa	840
cttggtatcc aactttggtg agtatgtagc tatatcaagc tgtttgaact ctgtaagtaa	900
ggatgcgtat acgcattegc tacactgagt taatcactct gatggtatag tgagaggatg	960
tgaccactag	970

<210>33

<211>970

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic transcript

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (38)

<223>Vector-derived sequence

<220>

<221>misc_feature

<222>(39).. (826)

<223>CD40L sequence

<220>

<221>misc_feature

<222>(41).. (42)

<223>Mutation :AT to GC

<220>

<221>misc_feature

<222>(101).. (823)

<223>CD40L open reading frame beginning with methionine#2

<220>

<221>misc_feature

<222>(827).. (965)

<223>Rotavirus g63' untranslated region

<220>

<221>misc_feature

<222>(966).. (970)

<223>Vector-derived sequence

<400>33

```

gggcgaattg ggccctctag atctgcagaa ttcggcttgc gcgatcgaaa catacaacca      60
aacttctccc cgatctgcgg ccaactggact gcccatcagc atgaaaattt ttatgtattt      120
acttactgtt ttctttatca ccagatgat tgggtcagca ctttttgctg tgtatcttca      180
tagaaggttg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat gaagattttg tattcatgaa      240
aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc ttactgaact gtgaggagat      300
taaaagccag ttggaaggct ttgtgaagga tataatgtta aacaaagagg agacgaagaa      360
agaaaacagc ttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct caaattgcgg cacatgtcat      420
aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg gctgaaaaag gatactacac      480
catgagcaac aacttggtta ccctggaaaa tgggaaacag ctgaccgtta aaagacaagg      540
actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat cgggaagctt cgagtcaagc      600
tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga ttcgagagaa tcttactcag      660
agctgcaaat acccacagtt ccgccaaacc ttgcgggcaa caatccattc acttgggagg      720
agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat gtgactgac caagccaagt      780
gagccatggc acttgcttca cgtcctttgg ctactcaaa ctctgagacc aagctaacaa      840
cttggtatcc aactttggtg agtatgtagc tatatcaagc tgtttgaact ctgtaagtaa      900
ggatgcgtat acgcattegc tacactgagt taatcactct gatggtatag tgagaggatg      960
tgaccactag                                     970

```

<210>34

<211>4738

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic CD40L

<400>34

```

cttccgcttc ctgcctcact gactcgctgc gctcggctcg tccgctgcgg cgagcggtat      60
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga      120
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt      180
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt      240
ggcgaaacce gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc      300

```

gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	gataacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	360
gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcggtag	gtcgttcgct	420
ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagccccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	480
actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaaagc	acgacttata	gccactggca	gcagccactg	540
gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	gcggtagctac	agagttcttg	aagtggtagc	600
ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	ttggtatctg	cgtctgctg	aagccagtta	660
ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	ccggcaaaaa	aaccaccgct	ggtagcggg	720
gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	780
tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	840
tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	900
aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	960
aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	1020
tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgcctga	atgataccgc	1080
gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	1140
agcgcagaag	tggctctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	1200
aagctagagt	aagtagttcg	ccagtttaata	gtttgcgcaa	cgttggtgcc	attgctacag	1260
gcacgtgggt	gtcacgctcg	tcgtttggta	tggcttcatt	cagctccggg	tcccaacgat	1320
caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggtagctcc	ttcgggtcctc	1380
cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	1440
ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtgactggg	gagtactcaa	1500
ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	1560
gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	taaaagtgtc	catcattgga	aaacgttctt	1620
cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	tgttgagatc	cagttcgatg	taaccactc	1680
gtgcacccaa	ctgatcttca	gcacctttta	ctttaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	1740
caggaaggca	aaatgccgca	aaaaagggaa	taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	1800
tactcttctt	ttttcaattc	agaagaactc	gtcaagaagg	cgatagaagg	cgatgcgctg	1860
cgaatcggga	gcggcgatac	cgtaaagcac	gaggaagcgg	tcagcccatt	cgccgccaag	1920
ctcttcagca	atatcacggg	tagccaacgc	tatgtcctga	tagcgggtccg	ccacaccag	1980
ccggccacag	tcgatgaatc	cagaaaagcg	gccattttcc	accatgatat	tcggcaagca	2040
ggcatcgcca	tgggtcacga	cgagatcctc	gccgtcgggc	atgcgcgcct	tgagcctggc	2100
gaacagttcg	gctggcgcg	gccccgatg	ctcttcgtcc	agatcatcct	gatcgacaag	2160
accggcttcc	atccgagtac	gtgctcgctc	gatgcgatgt	ttcgcttggg	ggtcgaatgg	2220
gcaggtagcc	ggatcaagcg	tatgcagccg	ccgcattgca	tcagccatga	tggatacttt	2280
ctcggcagga	gcaaggtggg	atgacaggag	atcctgcccc	ggcacttcgc	ccaatagcag	2340
ccagtccttt	cccgttcag	tgacaacgtc	gagcacagct	gcgcaaggaa	cgcccgtcgt	2400
ggccagccac	gatagccgcg	ctgcctcgctc	ctgcagttca	ttcagggcac	cggacaggtc	2460
ggtcttgaca	aaaagaaccg	ggcgccccctg	cgtgacagc	cggaacacgg	cggcatcaga	2520
gcagccgatt	gtctgtttgt	cccagtcata	gccgaatagc	ctctccaccc	aagcggccgg	2580
agaacctgcg	tgcaatccat	cttgttcaat	catgcgaaac	gatcctcctc	ctgtctcttg	2640

atcagatctt gatccccctgc gccatcagat ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac	2700
tttgcagggc tteccaacct taccagaggg cgccccagct ggcaattccg gttcgcttgc	2760
tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg ccatgtaagc ccactgcaag ctacctgctt	2820
tctcttttgcg cttgcgtttt cccttgtcca gatagcccag tagctgacat tcatccgggg	2880
tcagcacctgt ttctgcggaac tggctttcta cgtgttccgc ttccttttagc agcccttgcg	2940
ccctgaattt tgttaaaatt cgcgttaaat ttttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa	3000
taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat agggttgagt	3060
gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggg	3120
cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac catcaccta atcaagtttt	3180
ttggggctga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta aaggagagccc ccgatttaga	3240
gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg	3300
ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg	3360
cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag	3420
ggcgatcggt gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa	3480
ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt ccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca	3540
gtgaattgta atacgactca ctatagggcg aattgggccc tctagatctg cagaattcgg	3600
cttgcgcgat cgaaacatac aaccaactt ctccccgac tgcggccact ggactgcca	3660
tcagcatgaa aatttttatg tatttactta ctgtttttct tatcaccag atgattgggt	3720
cagcactttt tgctgtgtat ctcatagaa ggttggacaa gatagaagat gaaaggaatc	3780
ttcatgaaga ttttgtattc atgaaaacga tacagagatg caacacagga gaaagatcct	3840
tatccttact gaactgtgag gagattaaaa gccagtttga aggctttgtg aaggatataa	3900
tgttaaacaa ggaggagacg aagaaagaaa acagctttga aatgcaaaaa ggtgatcaga	3960
atcctcaaat tgcggcacat gtcataagtg aggccagcag taaaacaaca tctgtgttac	4020
agtgggctga aaaaggatac tacacatga gcaacaactt ggtaaccctg gaaaatggga	4080
aacagctgac cgttaaaaga caaggactct attatatcta tgcccaagtc accttctgtt	4140
ccaatcgga agcttcgagt caagctccat ttatagccag cctctgccta aagtccccg	4200
gtagattcga gagaatctta ctacagagctg caaataccca cagttccgcc aaaccttgcg	4260
ggcaacaatc cattcacttg ggaggagtat ttgaattgca accaggtgct tcggtgtttg	4320
tcaatgtgac tgatccaagc caagtgagec atggcactgg cttcacgtcc tttggcttac	4380
tcaaactctg aacagtgtca ccttgcaggc tgtggtggag ctgacgtgg gagtcttcat	4440
aatacaagcc gaattccagc acactggcgg ccgttactag tggatccgag ctcggtacca	4500
agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt	4560
ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgage	4620
taactecat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc	4680
cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgct	4738

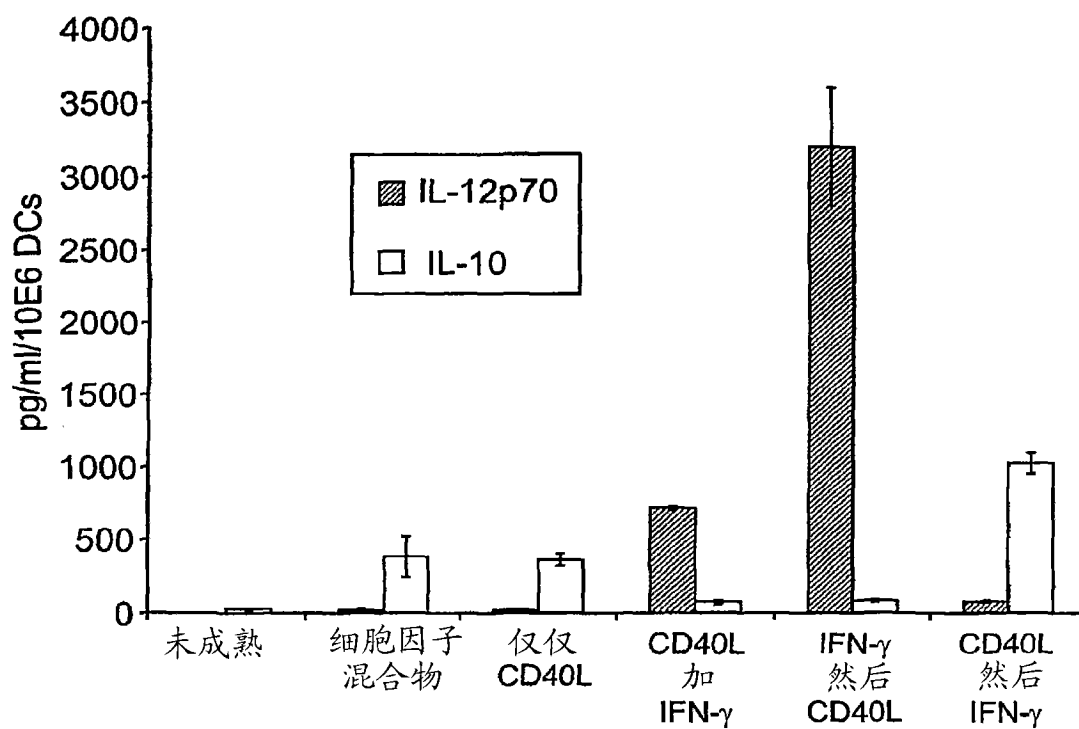


图 1

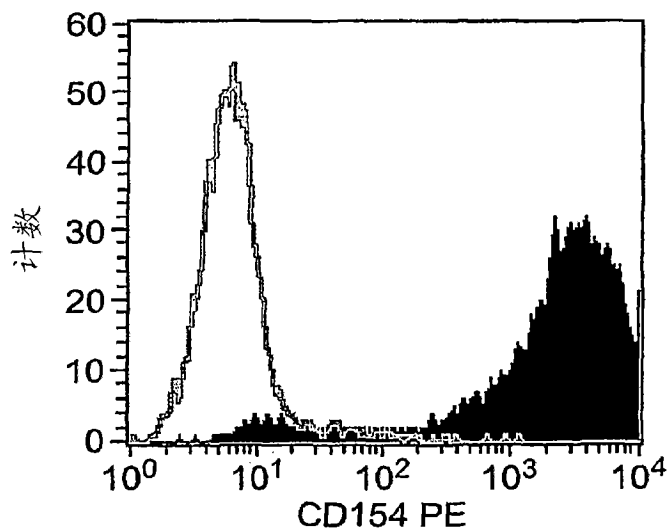


图 2

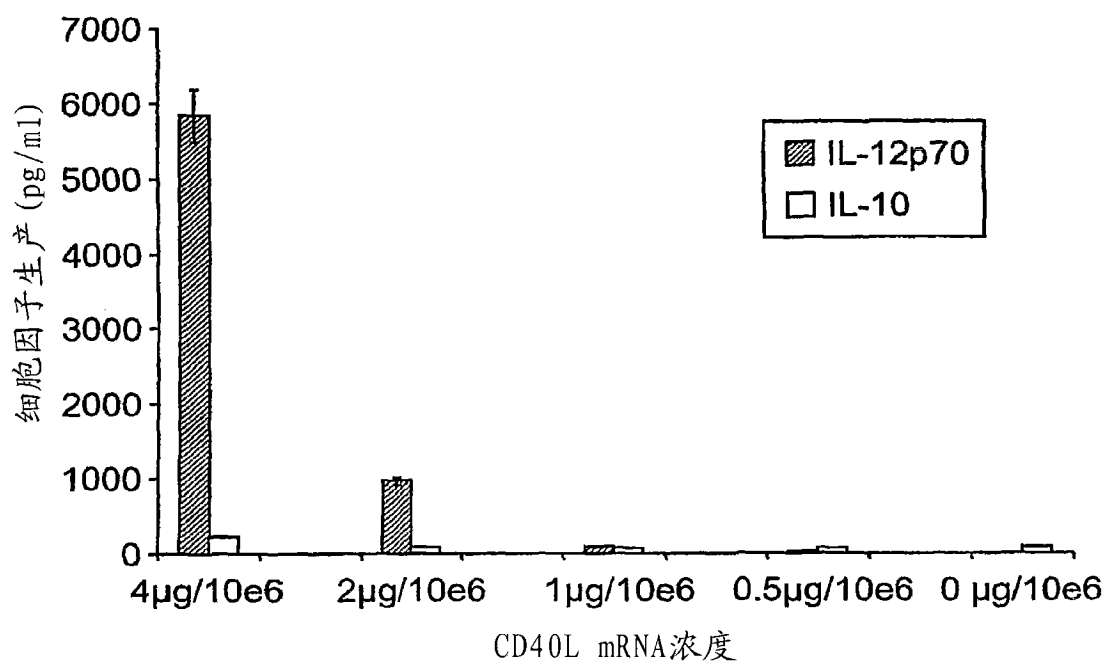


图 3

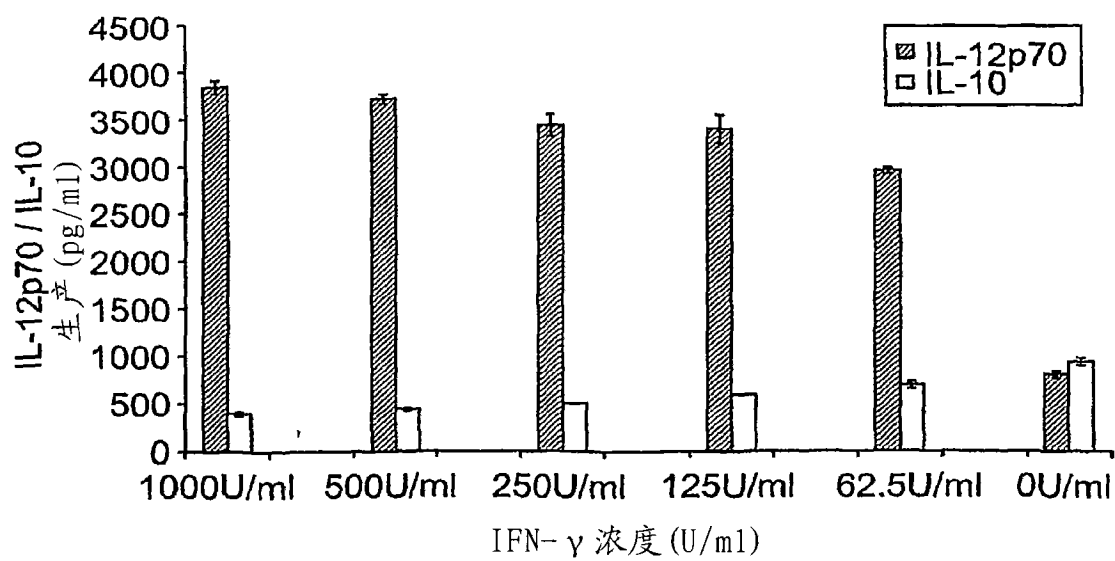


图 4

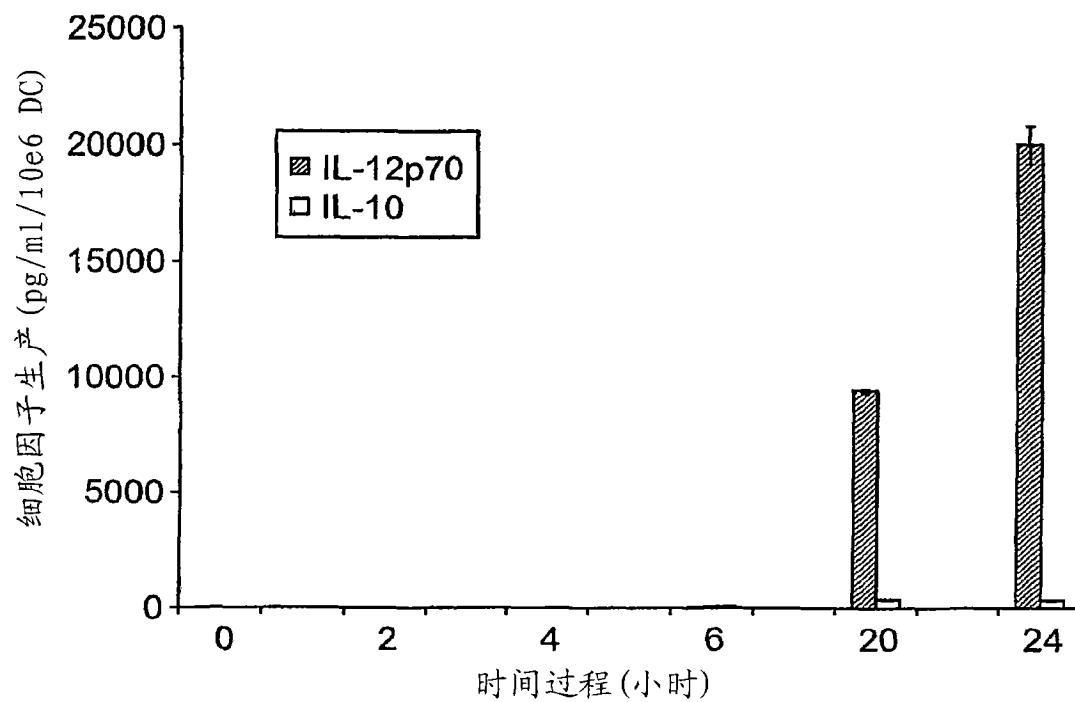


图 5A

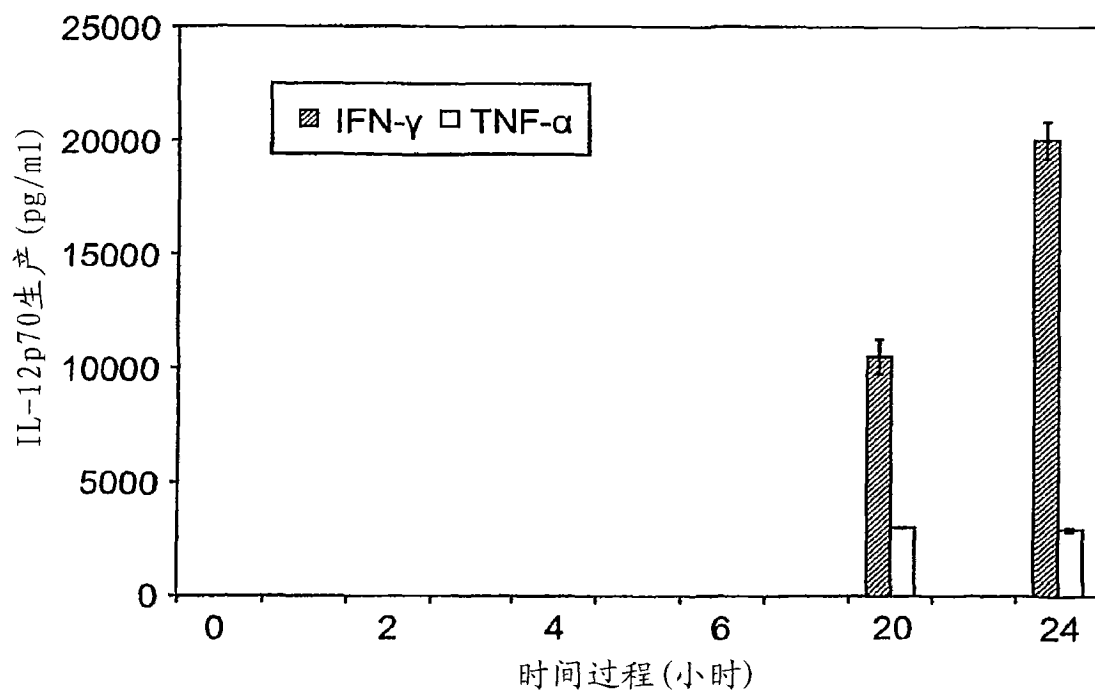


图 5B

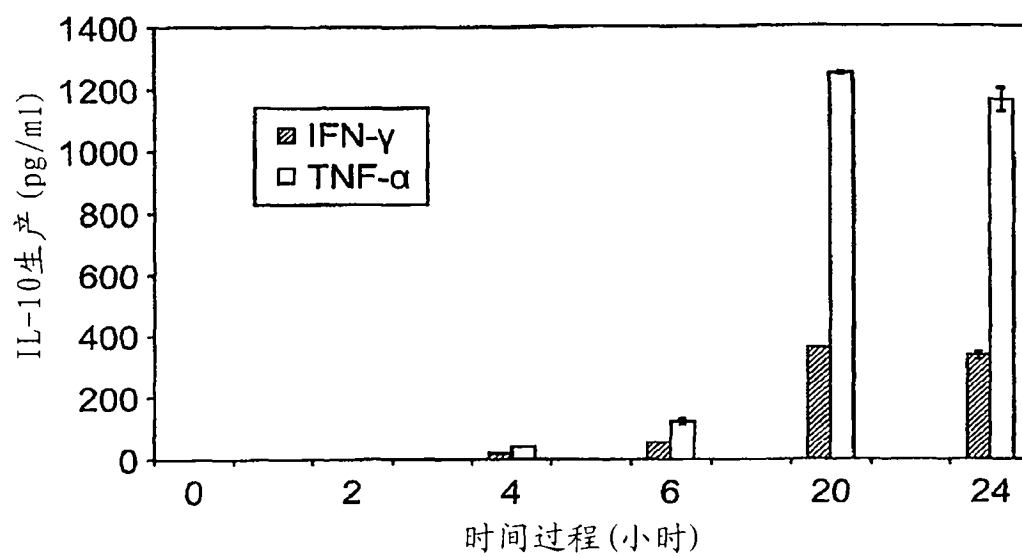


图 5C

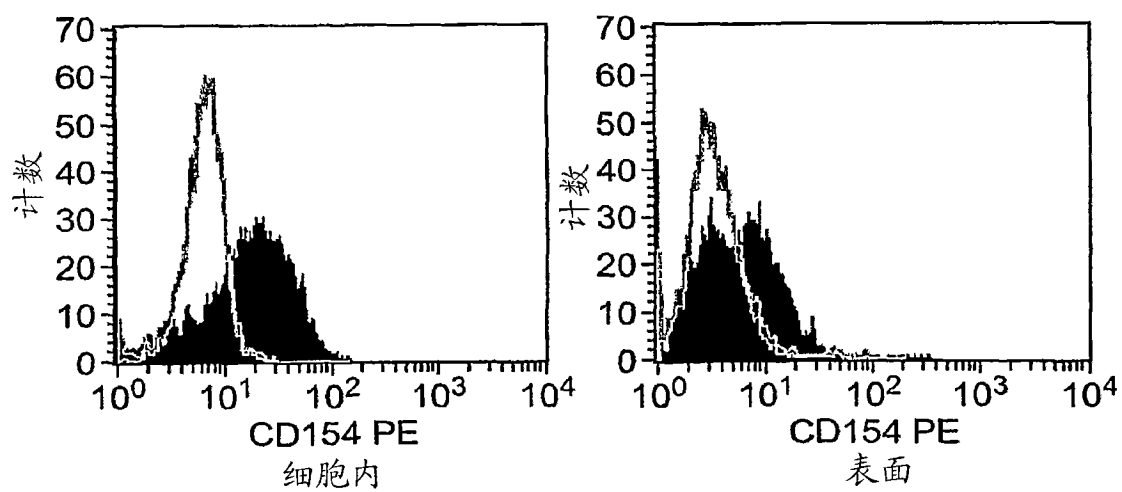


图 6A

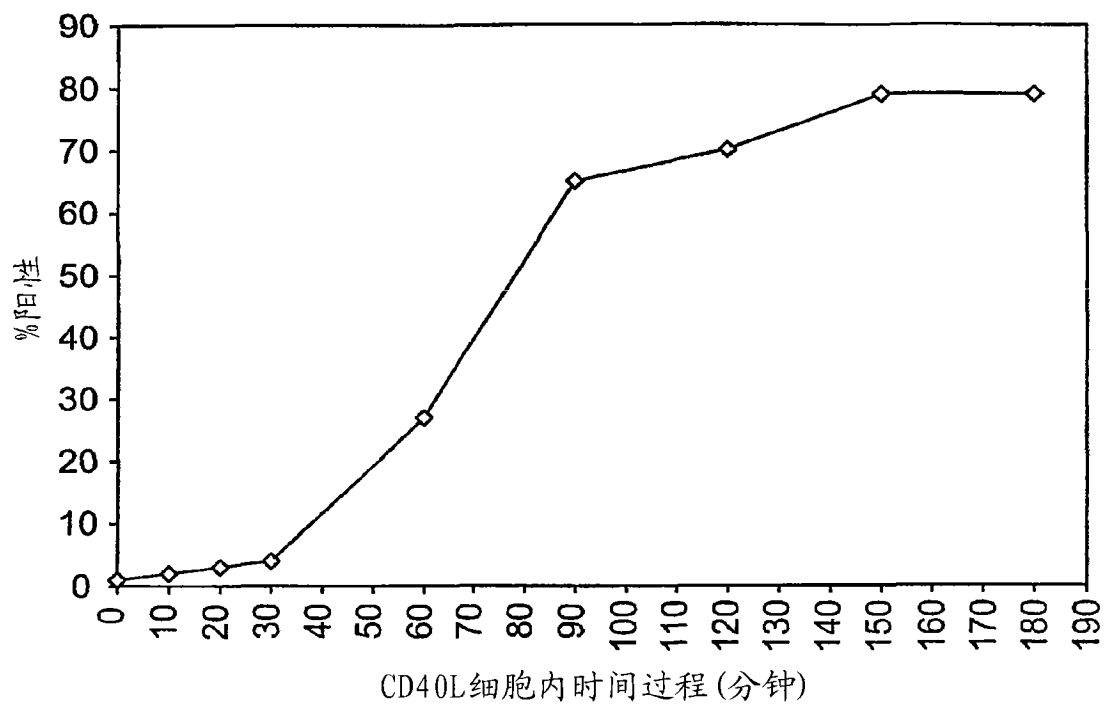


图 6B

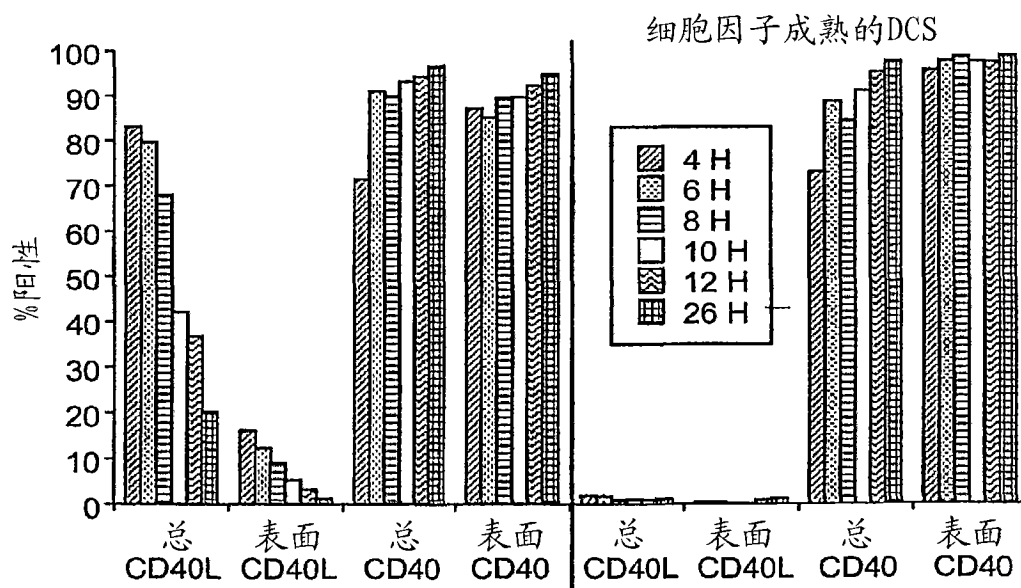


图 6C

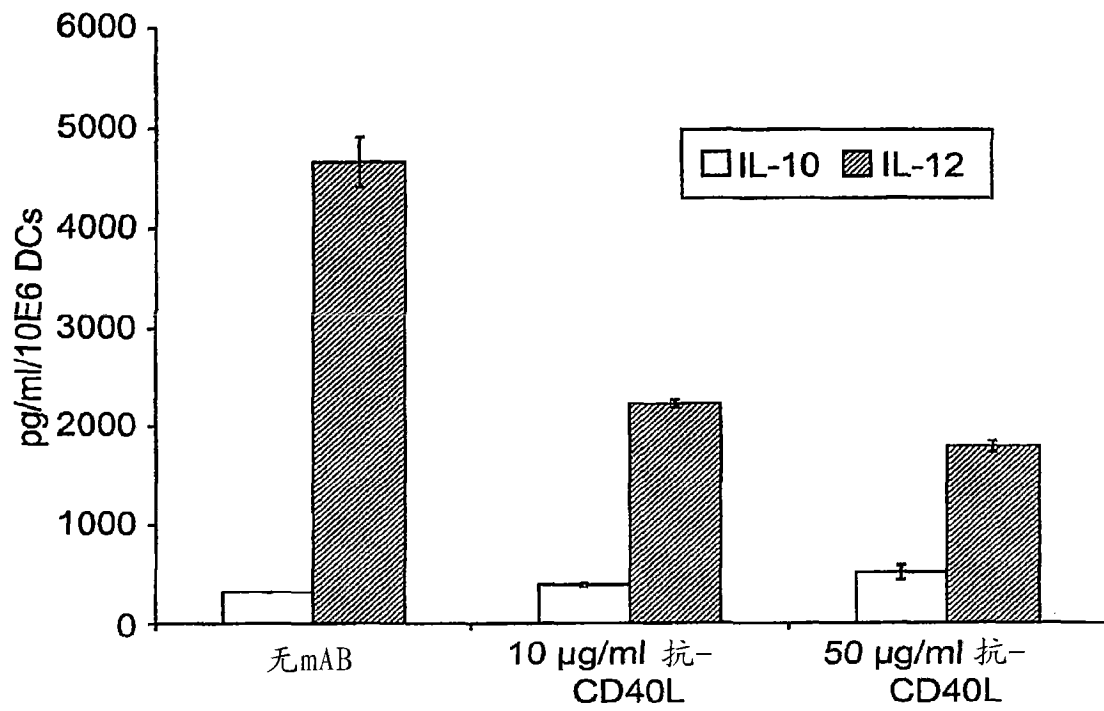


图 7

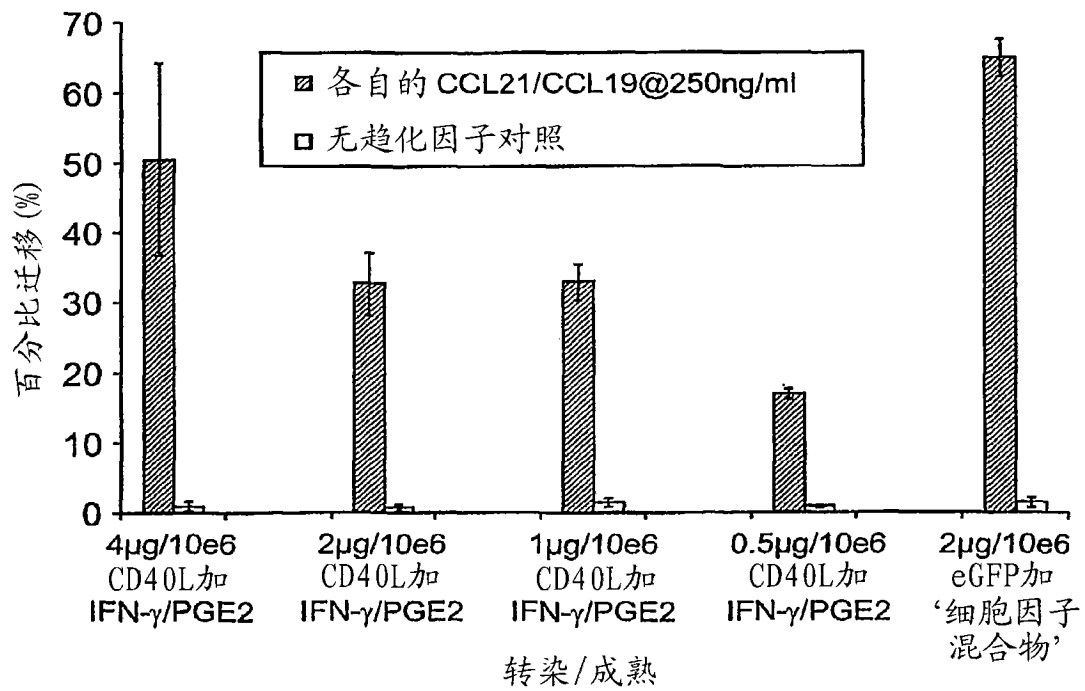


图 8

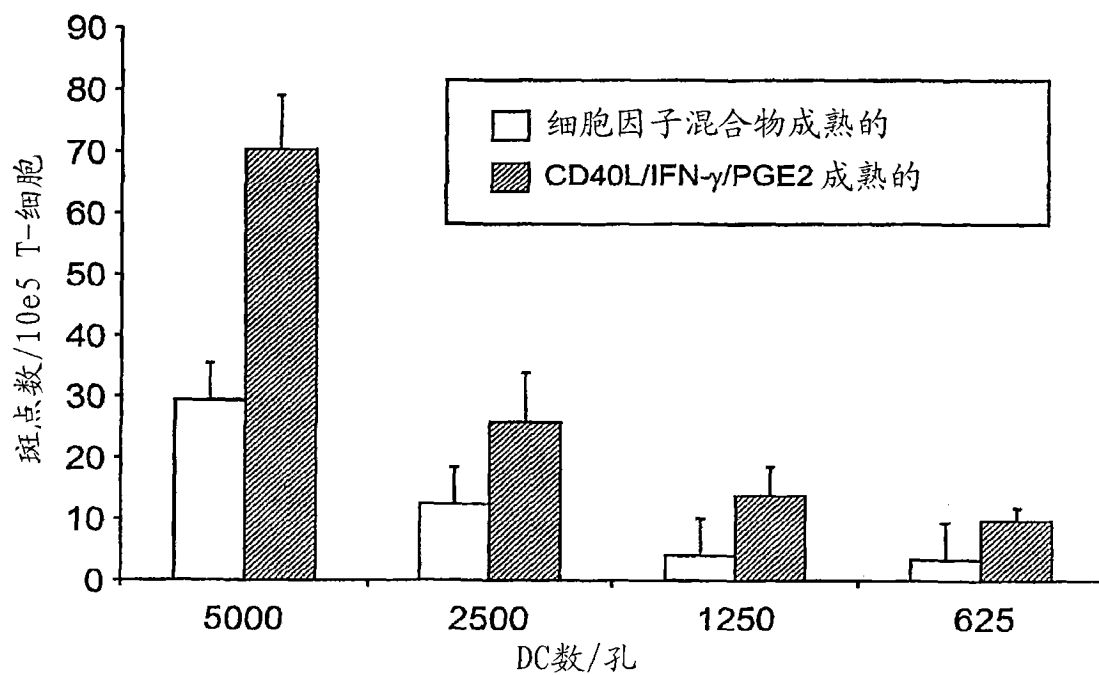


图 9

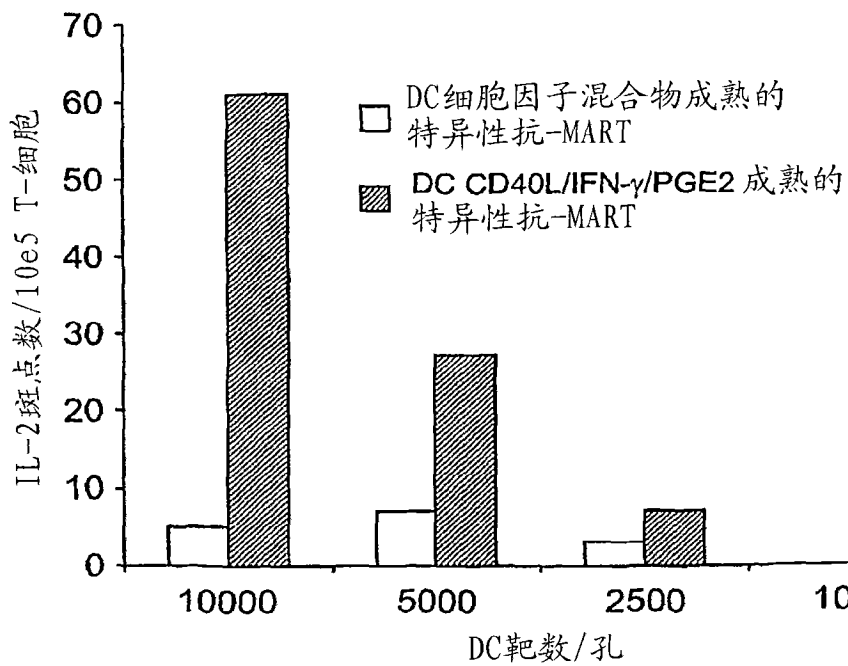


图 10

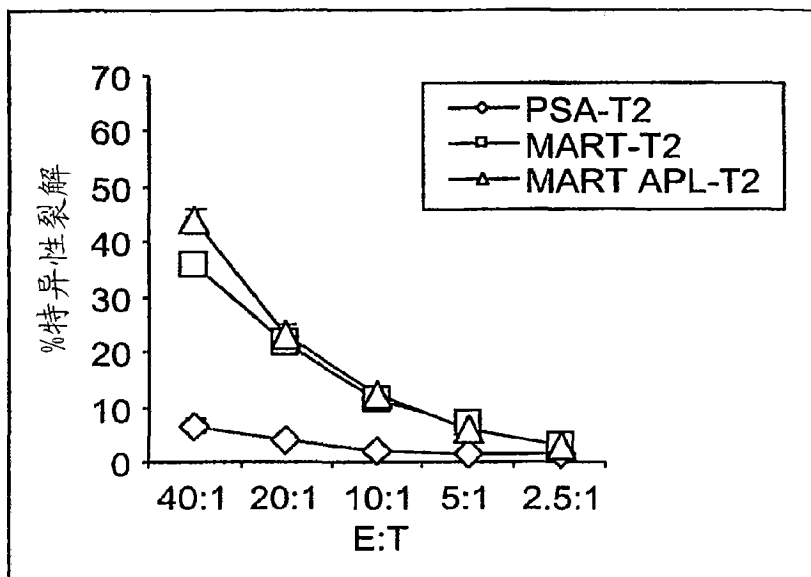


图 11A

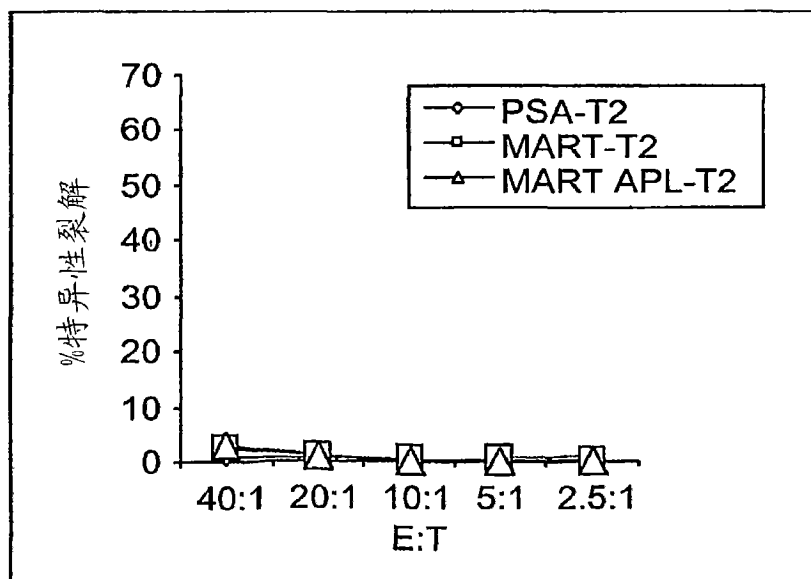


图 11B

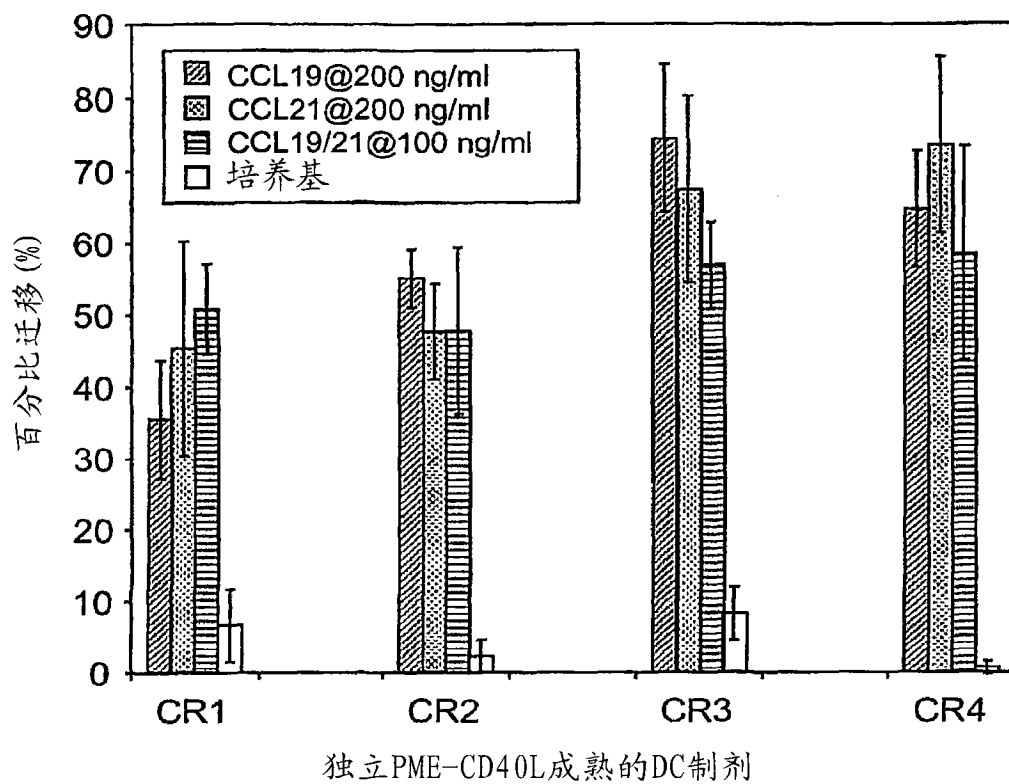


图 12

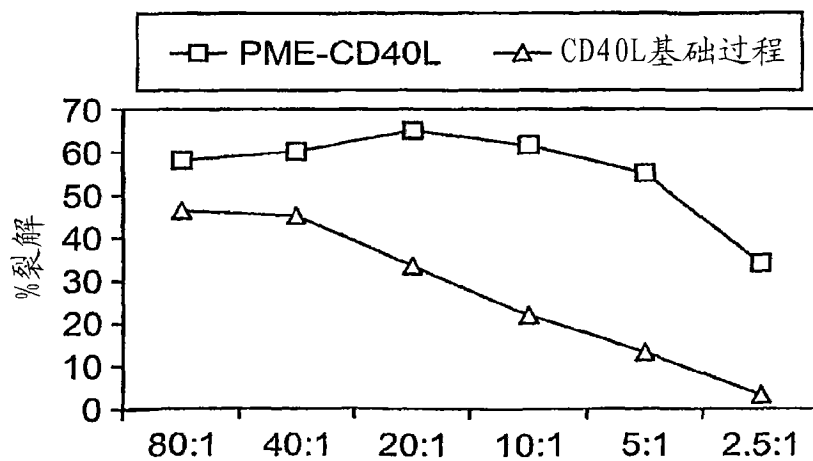


图 13

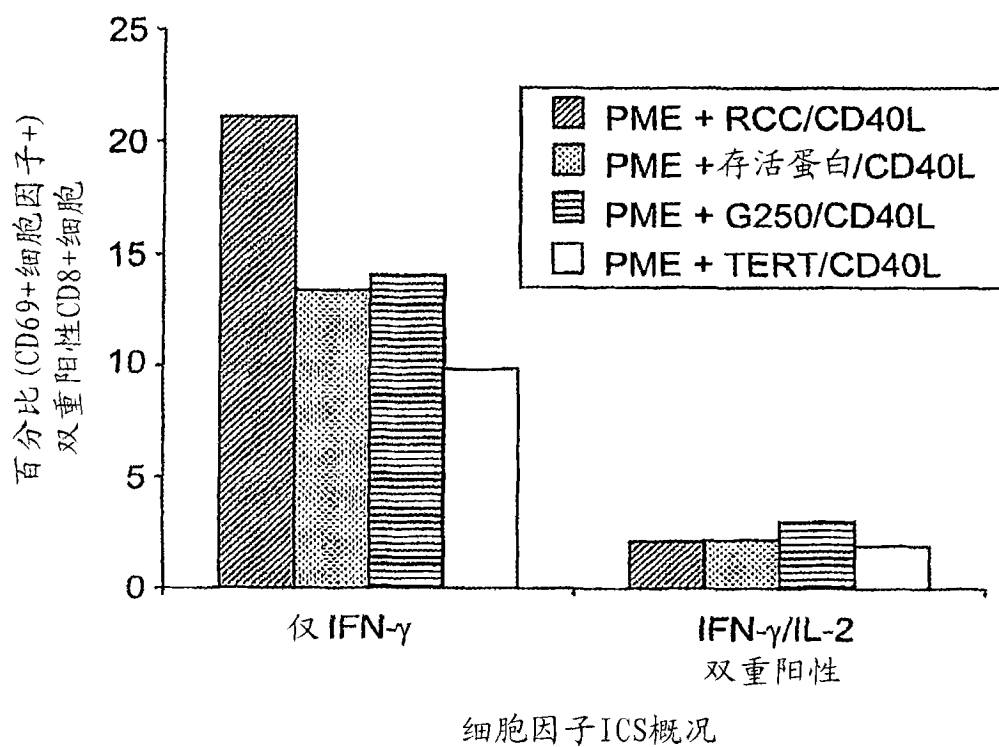


图 14

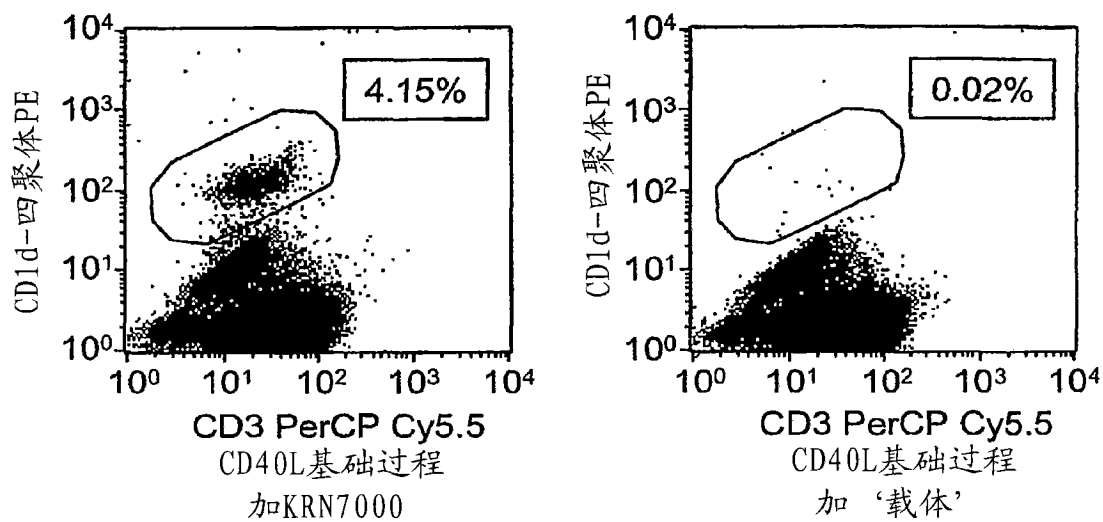


图 15A

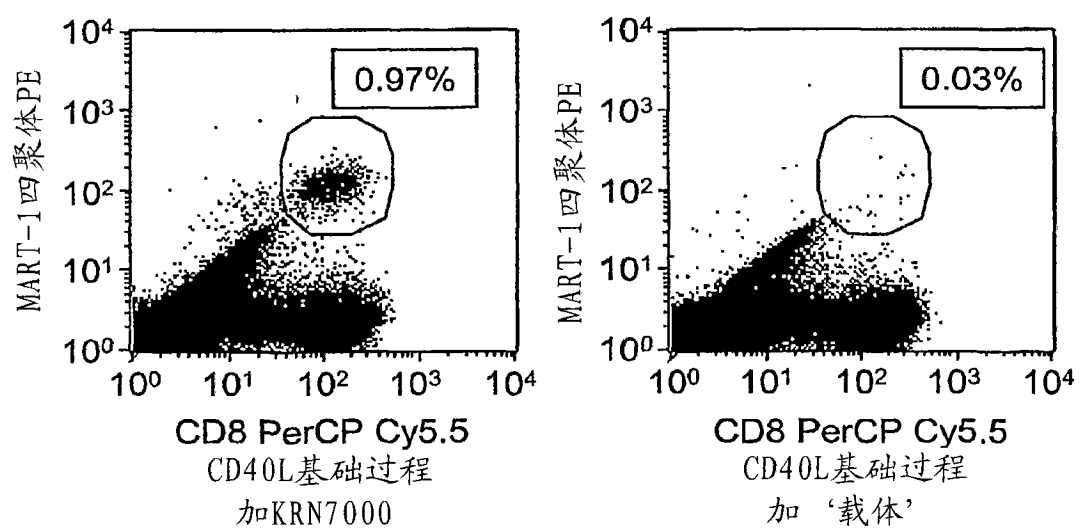


图 15B

```

# Program: needle
# Rundate: Tue Oct 05 21:36:57 2004
# Align_format: srspair
# Report_file: /ebi/extserv/old-work/needle-20041005-21365334534448.output
#####
#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 1836
# Identity: 1033/1836 (56.3%)
# Similarity: 1033/1836 (56.3%)
# Gaps: 606/1836 (33.0%)
# Score: 4085.5
#
#
#=====

HUMAN CD40L      1 cttctctgccagaagataccatttcaactttaacacagcatgatcgaaac      50
                                     |||||..||| |||||..|||
MOUSE CD40L      1 ctttcagtcagcatgatagaaac      23

EMBOSS_001      51 atacaaccaaaactttctcccgatctgcgggccactggactgcccac-agg      99
   |||||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
EMBOSS_001      24 atacagccaaccttccccagatccgtggcaactggact-tccagcgagg      72

EMBOSS_001      100 atgaaaatttttatgtatttacttactgtttttcttatcaccagatgat      149
   |||||..||| ||||| ||||| ||||| |||||..||| ||||| |||||
EMBOSS_001      73 atgaagatttttatgtatttacttactgttttcttatcaccaaaatgat      122

EMBOSS_001      150 tgggtcagcactttttgctgtgtatcttcatagaagggtggacaagatag      199
   |||..|||..||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||..|||..|||
EMBOSS_001      123 tggatctgtgctttttgctgtgtatcttcatagaagattggataagggtcg      172

EMBOSS_001      200 aagatgaaaggaatcttcatgaagattttgtattcatgaaaacgatacag      249
   ||||..|||..|||..||| ||||| ||||| ||||| |||||..|||..|||
EMBOSS_001      173 aagaggaagtaaacccttcatgaagattttgtattcataaaaaagctaaag      222

EMBOSS_001      250 agatgcaacacaggagaaagatccttatccttactgaactgtgaggagat      299
   ||||| |||||..||| |||||..|||..||| ||||| ||||| |||||
EMBOSS_001      223 agatgcaacaaaggagaaggatccttatccttgctgaactgtgaggagat      272

EMBOSS_001      300 taaaagccagtttgaaggctttgtgaaggatataatgttaacaaagagg      349
   ..|||..||| |||||..|||..||| ||||| ||||| ||||| |||||
EMBOSS_001      273 gagaaggcaatttgaagacctgtcaaggatataacgttaacaaagaag      322

EMBOSS_001      350 agacgaagaaagaaaacagctttgaaatgcaaaaagggtgatcagaatcct      399
   ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
EMBOSS_001      323 a---gaaaaagaaaacagctttgaaatgcaaaagggtgatgaggatcct      369

```

图 16A

EMBOSS_001	400	caaattgcgccacatgtcataagtgaggccagcagtaaaacaacatctgt	449
EMBOSS_001	370	caaattgcagcacacgttgtaagcgaagccaacagtaatgcagcatccgt	419
EMBOSS_001	450	gttacagtgggctgaaaaaggatactacaccatgagcaacaacttggttaa	499
EMBOSS_001	420	tctacagtgggccaagaaaggatattataccatgaaaagcaacttggttaa	469
EMBOSS_001	500	ccctggaaaatgggaaacagctgaccgttaaagacaaggactctattat	549
EMBOSS_001	470	tgcttgaaaatgggaaacagctgacggttaaaagagaaggactctattat	519
EMBOSS_001	550	atctatgcccagtgacaccttctgttccaatcggaagcttcgagtgcaa-g	598
EMBOSS_001	520	gtctacactcaagtgacaccttctgttccaatcggaagcttcgagtgcaa-g	569
EMBOSS_001	599	ctccatttatagccagcctctgcctaaagtcccccggttagattcgagaga	648
EMBOSS_001	570	c-ccattcatcgctggcctctgttgaagccagcagtggtgctgagaga	618
EMBOSS_001	649	atcttactcagagctgcaaataccacagttccgccaaccttgccgggca	698
EMBOSS_001	619	atcttactcaaggcggcaaataccacagttccctccagctttgagaga	668
EMBOSS_001	699	acaatccattcacttgggaggagtagtattgaattgcaaccaggtgcttcgg	748
EMBOSS_001	669	gcagtcctgttacttgggaggagtagtattgaattgcaaccaggtgcttcgg	718
EMBOSS_001	749	tgtttgtcaatgtgactgatccaagccaagttagccatggcactggcttc	798
EMBOSS_001	719	tgtttgtcaacgtgactgaagcaagccaagttagccatggcactggcttc	768
EMBOSS_001	799	acgtcctttggccttactcaaactctgaacagtg---tcaccttgaggct	845
EMBOSS_001	769	tcacctttttggccttactcaaactctgaacagtg---tcaccttgaggct	815
EMBOSS_001	846	gtgggtggagctgacgtgggagctcttcataatacagcacag-cgggttaag	894
EMBOSS_001	816	gcagcagggctgatgctggcagctcttcctatacagca-agtcagttagg	864
EMBOSS_001	895	-cccacccctgtt-aactgcctatttataaccctaggatcctccttatg	942
EMBOSS_001	865	acctgccctgtgttgaactgcctatttataaccctaggatcctcctcatg	914
EMBOSS_001	943	gagaactattttatta-tacactccaaggcatgtagaactgtaataagt	990
EMBOSS_001	915	gagaactattttattatgtac-cccaaggcacatagagctggaataagag	963
EMBOSS_001	991	aattacaggtca-catgaaacccaaacggg-cctgctccataagagct	1037
EMBOSS_001	964	aattacagggcaggcaaaaatcccaa-gggaccctgctccctaagaact	1011
EMBOSS_001	1038	tatatatctgaagcagcaacccactgatgcagacatccagagagtccta	1087
EMBOSS_001	1012	taca-atctgaaacagcaacccactgattcagacaacca-----	1050
EMBOSS_001	1088	tgaaaagacaaggccattatgcacaggt---tgaattctgagtaaacagc	1134

图 16B

EMBOSS_001	1051	-gaaaagacaaaagccataatacacagatgacagagctctgatgaaacaac	1099
EMBOSS_001	1135	agataact-tgccaaagttcagttttgt-ttctttgcgtgcagtggtctt	1180
			
EMBOSS_001	1100	agataactaatg---agcacagttttgttggttttatgggt---gtgtcgt	1143
EMBOSS_001	1181	tccatgggataatgcatttgatttatcagtgaagatgcagaagggaaatgg	1230
			
EMBOSS_001	1144	tcaatggacagtgacttgacttaccaggaagatgcagaagggcaactg	1193
EMBOSS_001	1231	ggagcctcagctcacattcagttatgggtgactctgggttcctatggcct	1280
			
EMBOSS_001	1194	tgagcctcagctcacaatctgttatgggtgac-ctgggtc-----cct	1236
EMBOSS_001	1281	tgttggagggggccaggctctagaacgtctaacacagtggaacccgaaa	1330
		. . .	
EMBOSS_001	1237	-----gc-ggccctagtagg	1250
EMBOSS_001	1331	cccccccccccccccccgccacctctcggacagttattcattctctttc	1380
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1381	aatctctctctctccatctctctctttcagttctctctctcaacctctt	1430
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1431	tcttccaatctctcttttcaatctctctgtttccctttgtcagttctt	1480
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1481	ccctccccagttctctcttctcaatccccctttctaacacacacacac	1530
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1531	ac	1580
EMBOSS_001	1251'		1250
EMBOSS_001	1581	agagtcaggccgttgetagtcagttctctctttccacctgtccctatc	1630
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1631	tctaccactatagatgaggggtgaggagtagggagtgagccctgagcctg	1680
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1681	cccactcctcattacgaaatgactgtatttaaaggaaatctattgtatct	1730
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1731	acctgcagttctccattgtttccagagtgaacttgtaattatcttgttatt	1780
EMBOSS_001	1251		1250
EMBOSS_001	1781	tattttttgaataataaagacctttaacattaaaa	1816
EMBOSS_001	1251		1250

图 16C

```
#####  
# Program: needle  
# Rundate: Tue Oct 05 21:40:43 2004  
# Align_format: srspair  
# Report_file: /ebi/extserv/old-work/needle-20041005-21404327122895.output  
#####  
#=====  
#  
# Aligned_sequences: 2  
# 1: EMBOSS_001  
# 2: EMBOSS_001  
# Matrix: EBLOSUM62  
# Gap_penalty: 10.0  
# Extend_penalty: 0.5  
#  
# Length: 261  
# Identity:      202/261 (77.4%)  
# Similarity:    225/261 (86.2%)  
# Gaps:          1/261 ( 0.4%)  
# Score: 1032.0  
#  
#  
#=====
```

```
HUMAN CD40L       1 MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRRL   50  
||| |:|. |||. | |||| . |||||| ||||| ||||| :||| |||||  
MOUSE CD40L     1 MIETYSQSPRSVATGLPASMKIFMYLLTVFLITQMIGSVLF VAVYLHRRRL   50  
  
EMBOSS_001      51 DKIEDERNLHEDFVFMTKIQR CNTGERSLS LLNCEEIKSQFE GFVKDIML   100  
||:::|. | ||||| :| ::| |||. |. | ||||| ||| :|. |.. ||||.  
EMBOSS_001      51 DKVEEEVN L HED F VF IKKL KRCNKGE GSLS LLNCE E M RR Q FEDLVKDITL 100  
  
EMBOSS_001     101 NKEETKKENS FEMQKG DNPQIAAHVISEASSKT T SVLQWAEKGY YTMSN   150  
||| | ||||| ||| :| ::| ||||| :||| : .. | ||| : ||||| :.  
EMBOSS_001     101 NKEE-KKEN S FEMQRGD ED PQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGY YTMKS   149  
  
EMBOSS_001     151 NLVTLENGKQL TVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQP AFIASLCLK SPGR   200  
|||. | ||||| ||||| :||| :|. | ||||| |||. |||. |||. |. |...  
EMBOSS_001     150 NLVMLENGKQL TVKREGLYYVYTQTFT CSNREP SSQRPFI VGLWLKPSSG   199  
  
EMBOSS_001     201 FERILLRAANTHSSAKPCQQSIHLGGV FELQPGASVF VNVDPSQVS HG   250  
. ||||| :| ||||| :.. |. | ||| : ||||| |||. | ||||| ||| :. |||. |.  
EMBOSS_001     200 SERILLKAANTHSSSQLCE QQSVHLGGV FELQAGASVF VNVT EASQVIHR   249  
  
EMBOSS_001     251 TGFTSFGLLKL         261  
.| :| |||||  
EMBOSS_001     250 VGFS SFGLLKL        260
```

图 17

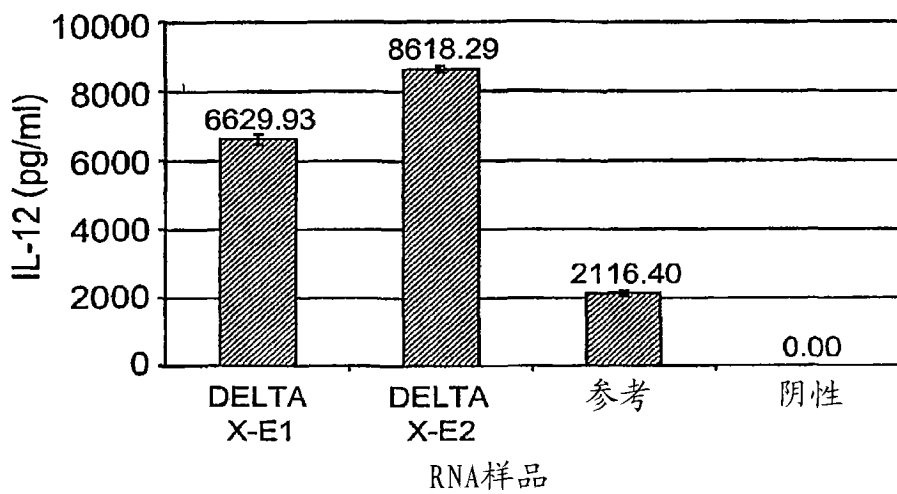


图 18

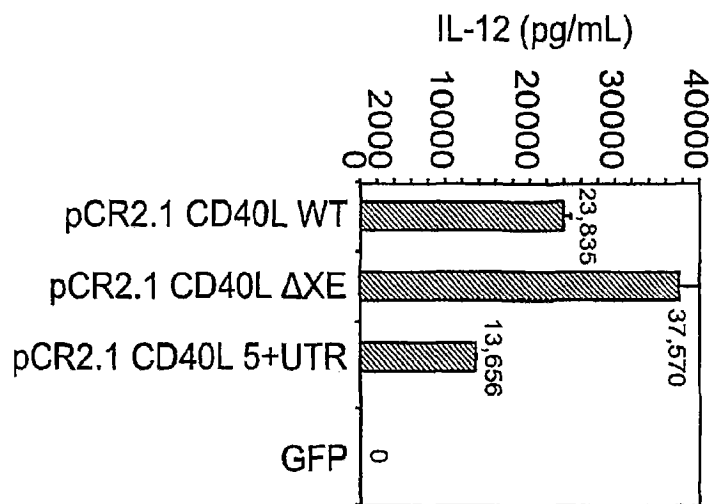


图 19

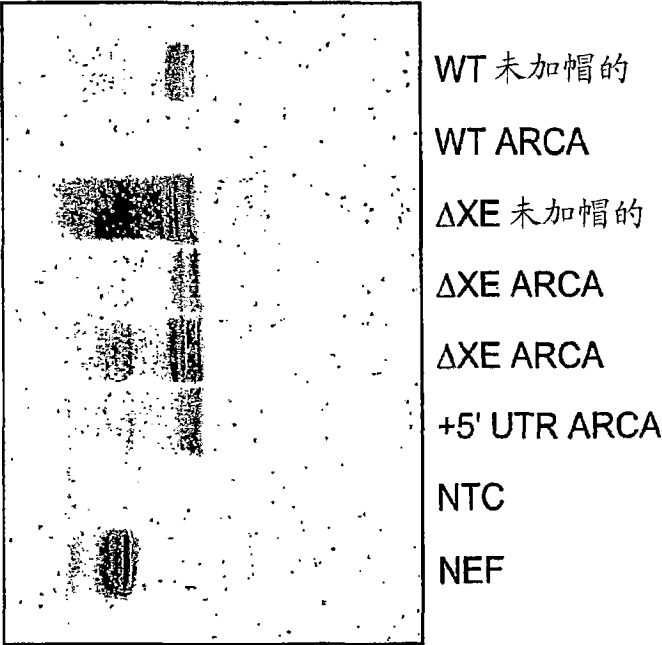


图 20

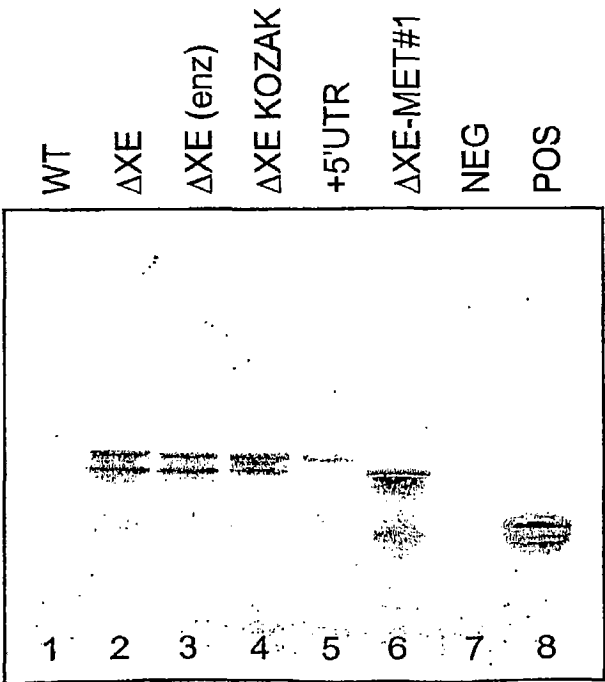


图 21

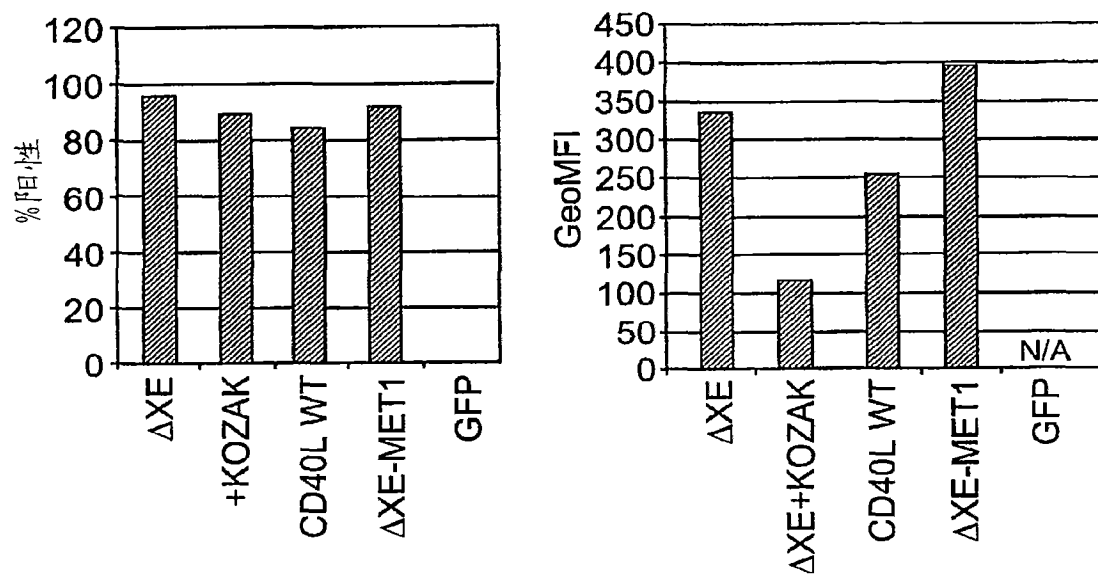


图 22

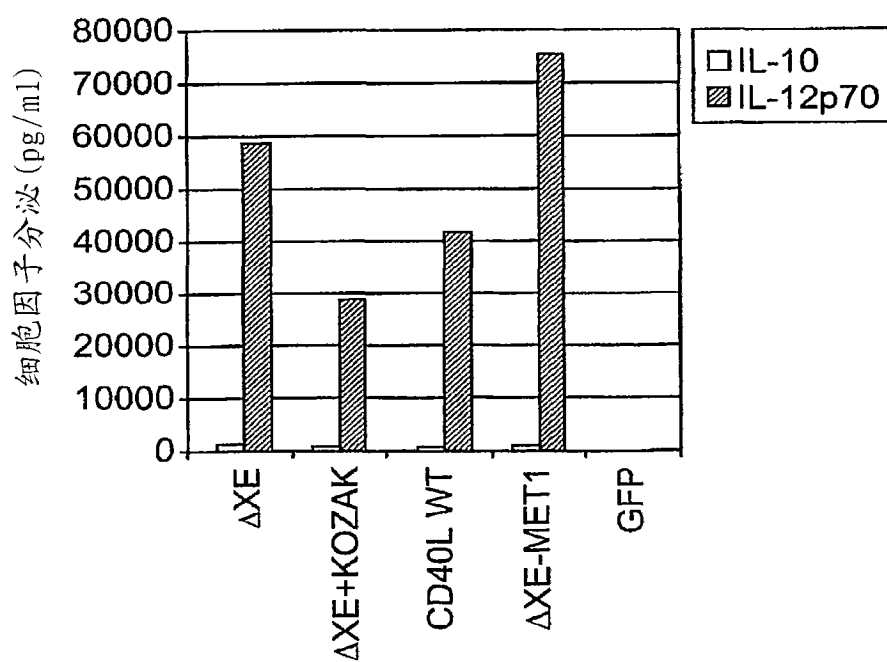


图 23

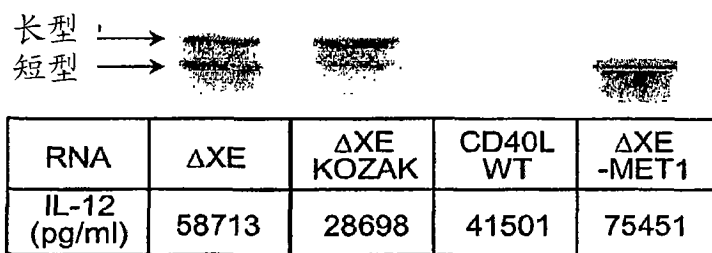


图 24

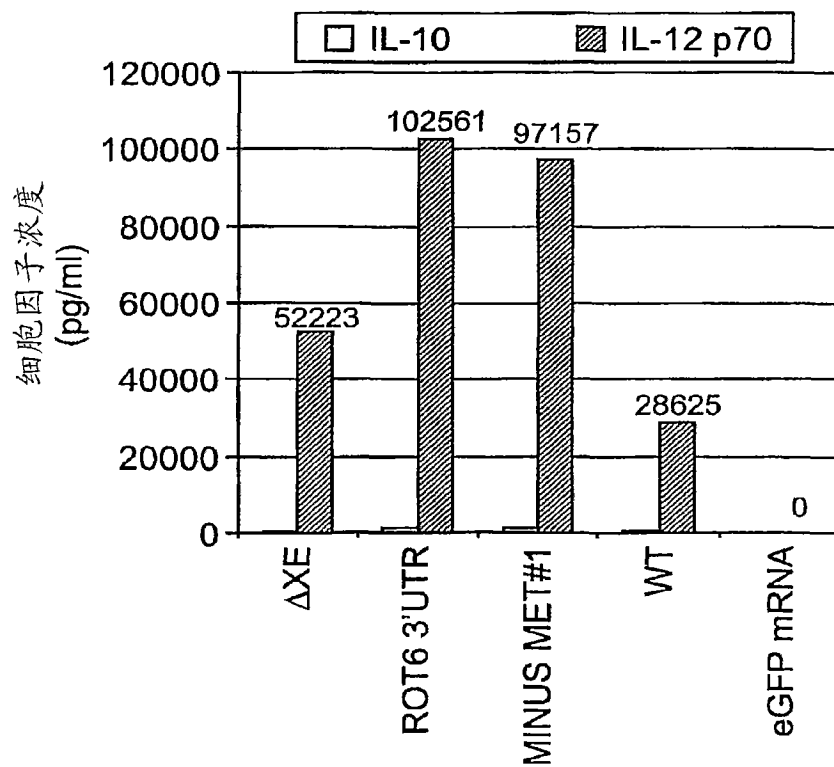


图 25

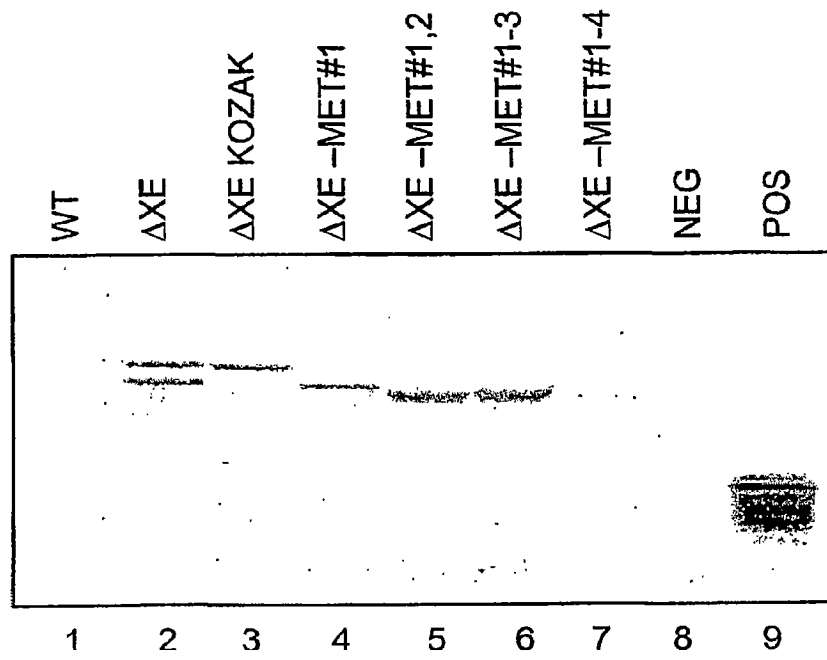


图 26

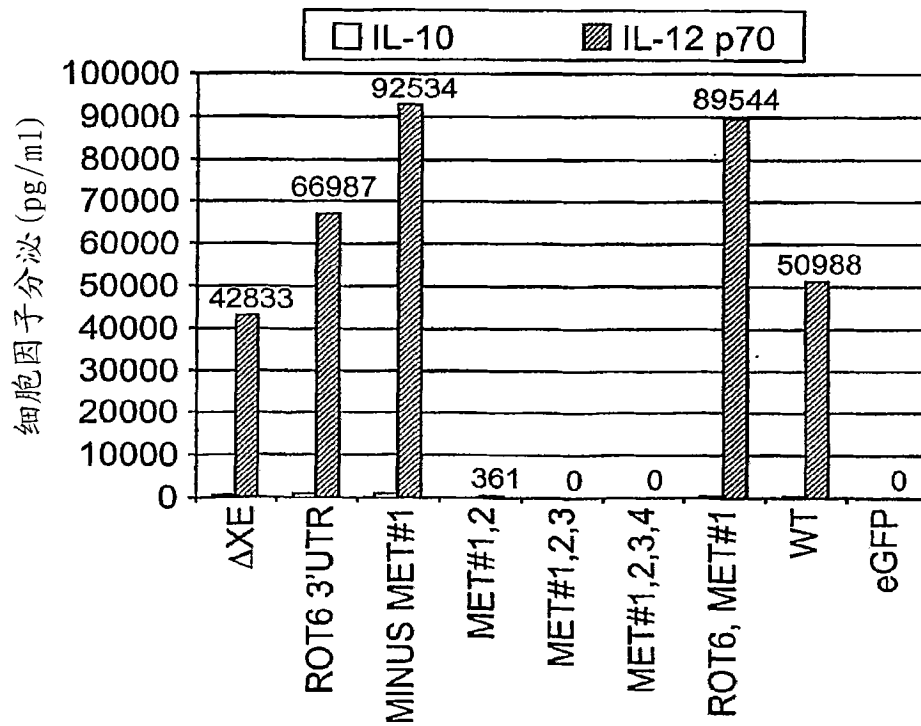


图 27

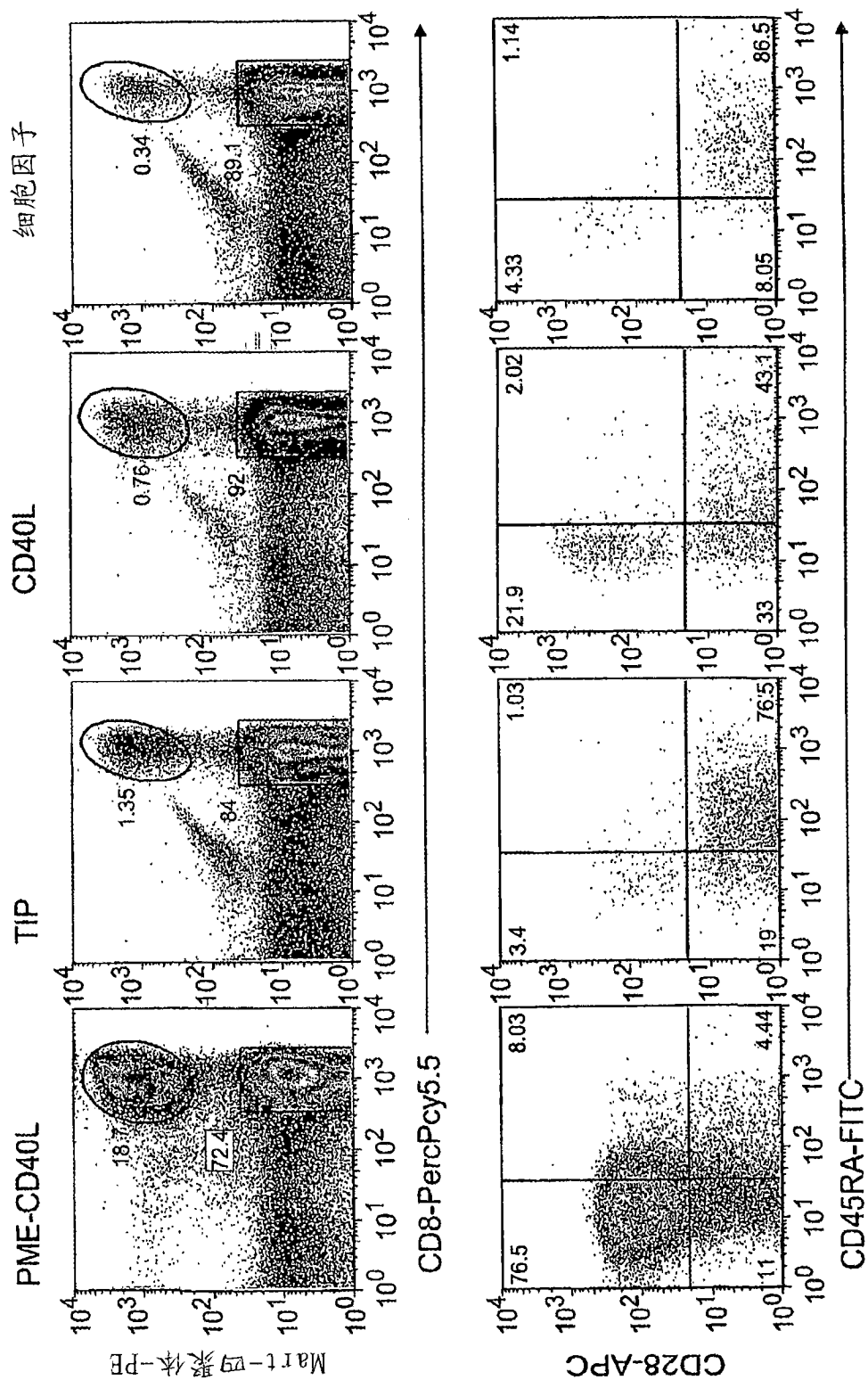


图 28

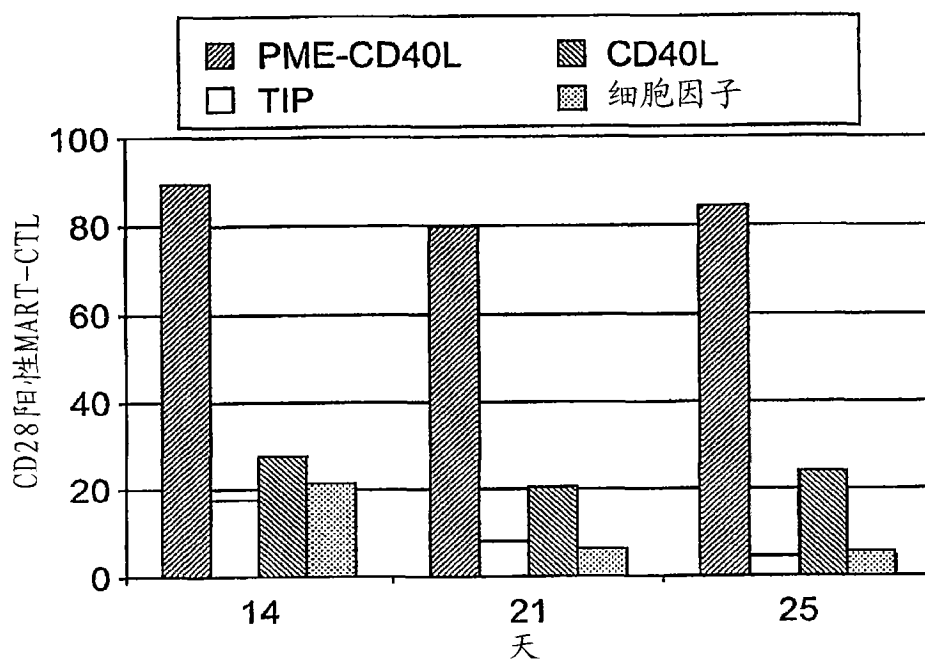


图 29

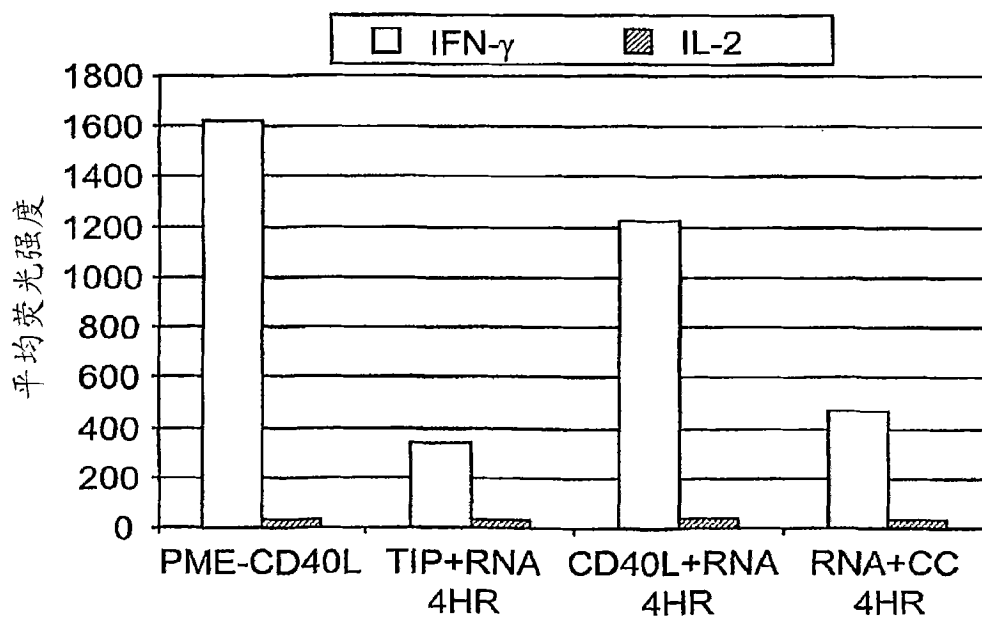


图 31

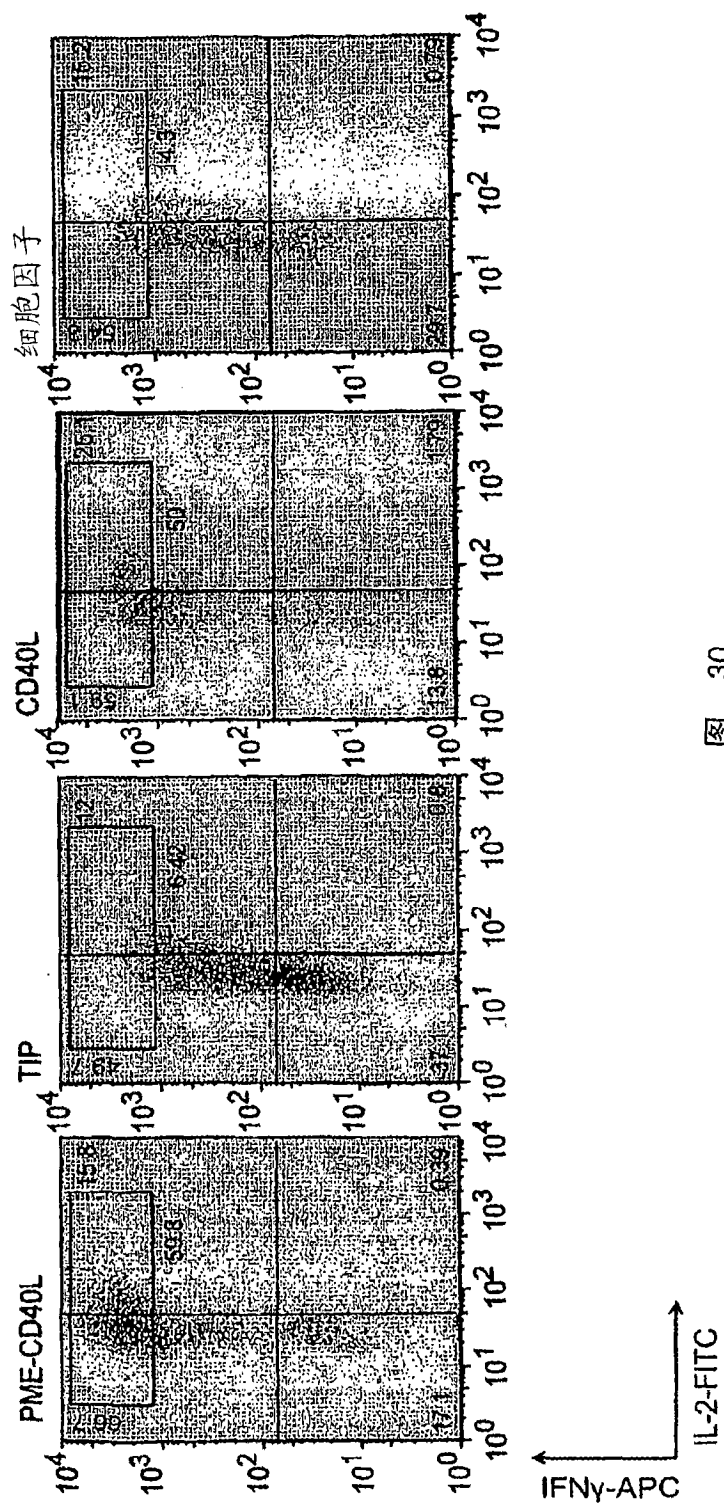


图 30

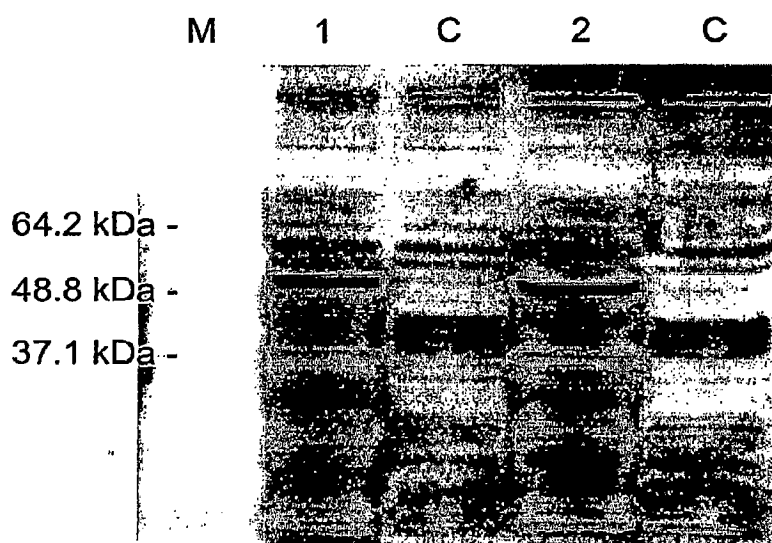


图 32

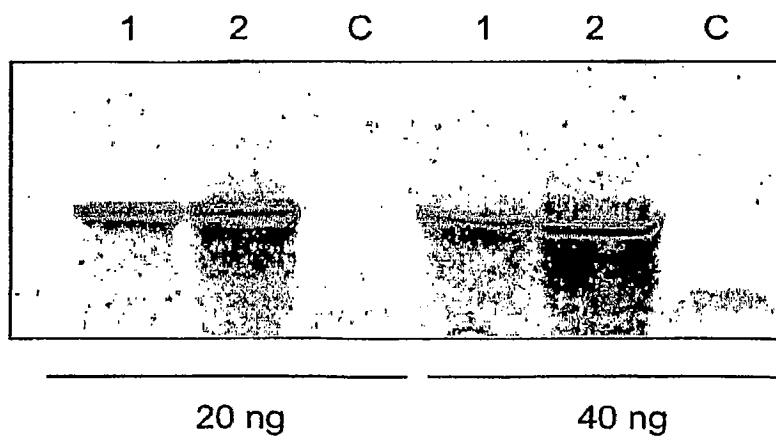


图 33

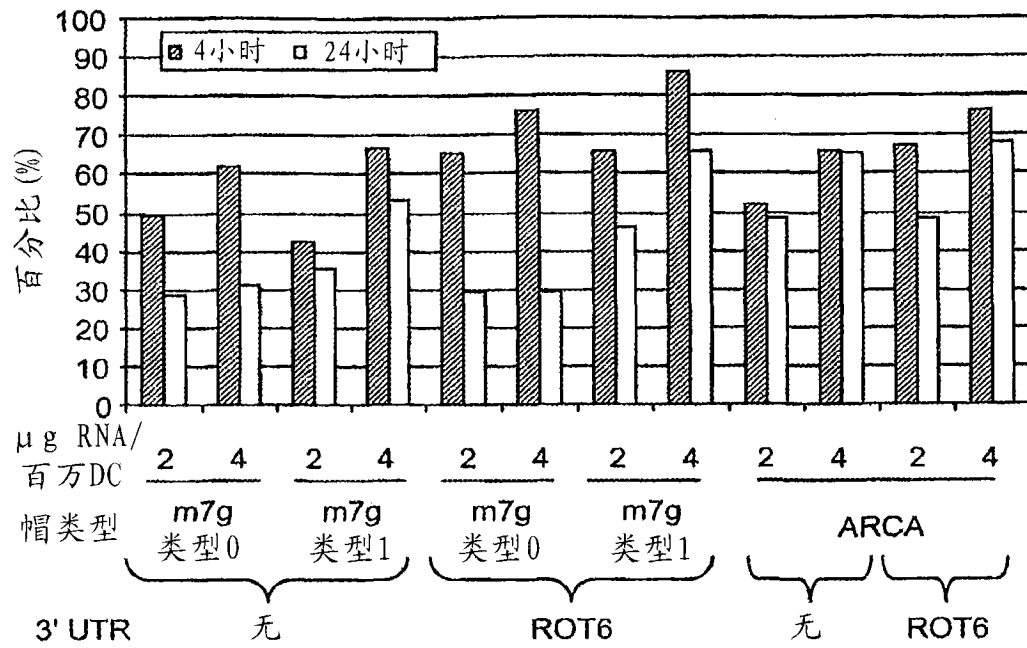


图 34A

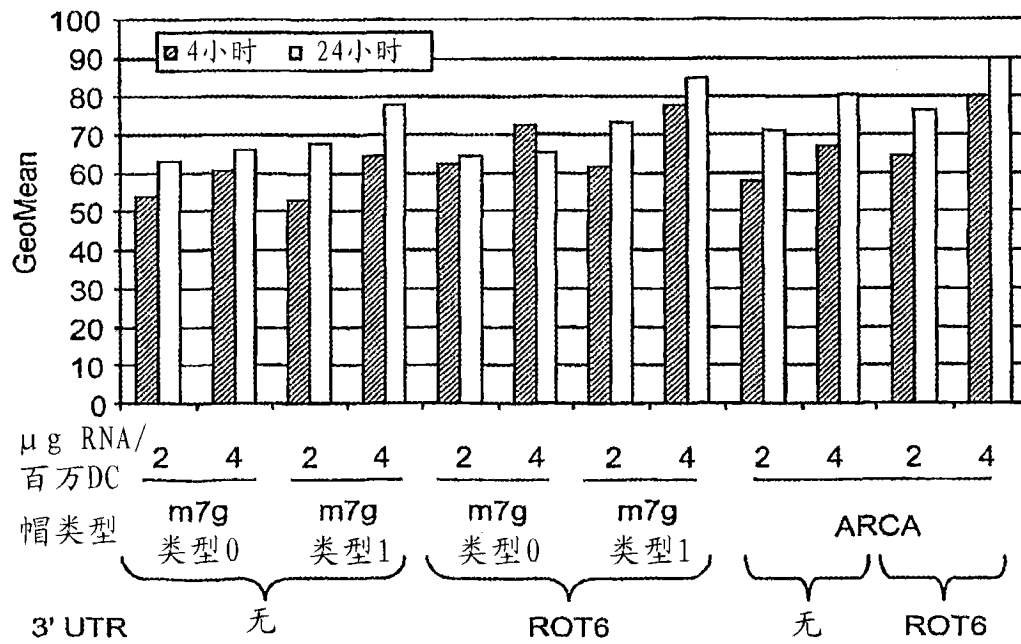


图 34B

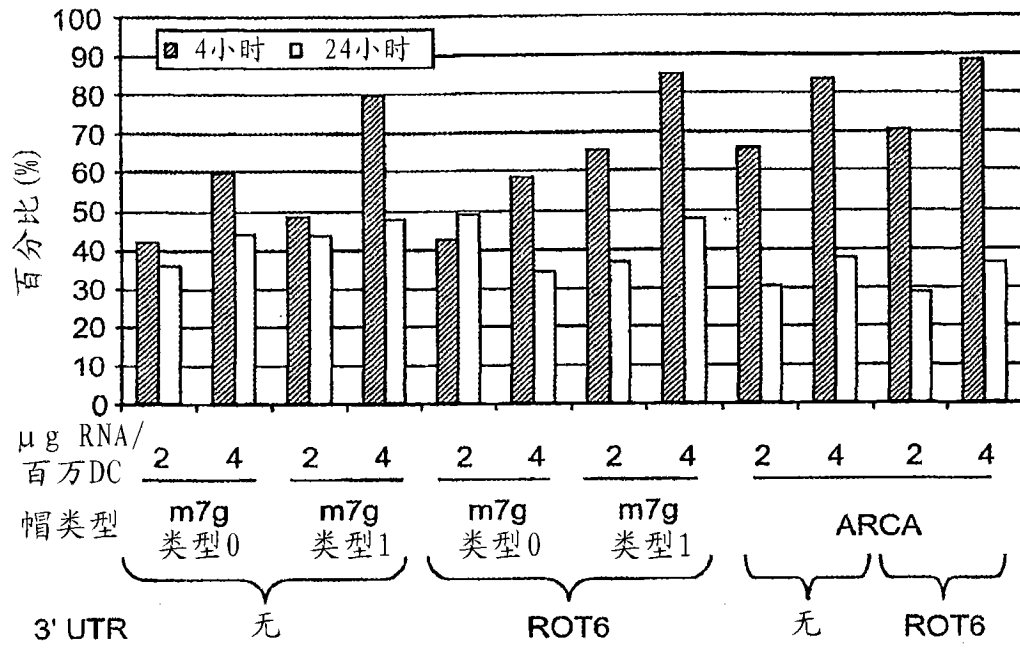


图 35A

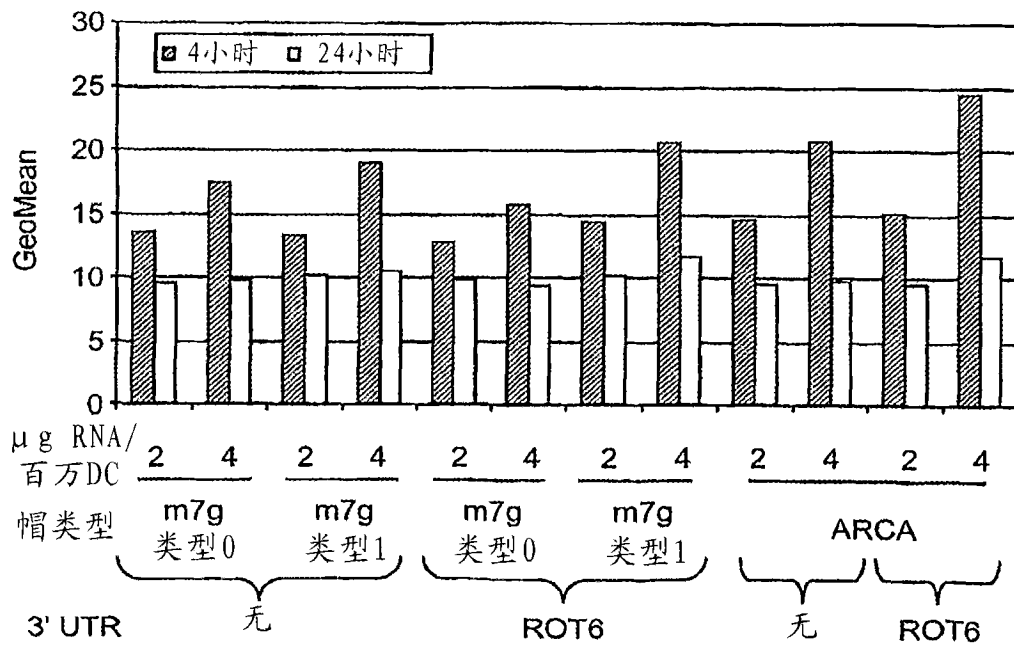
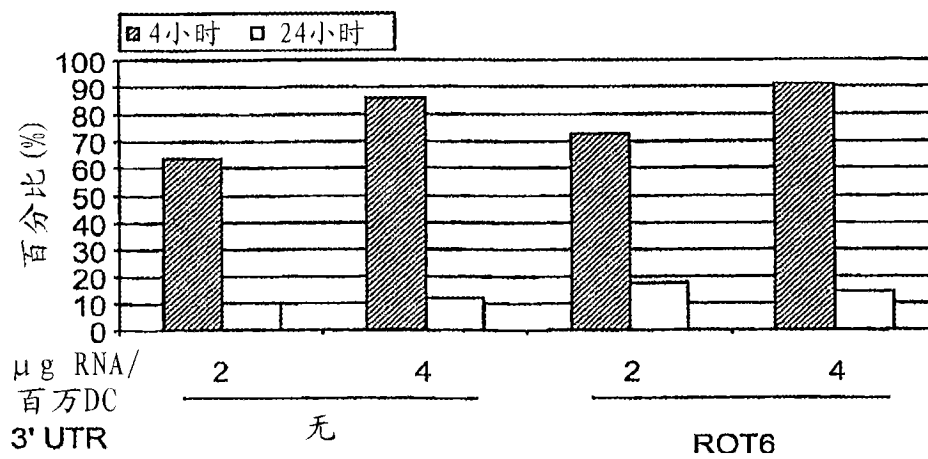
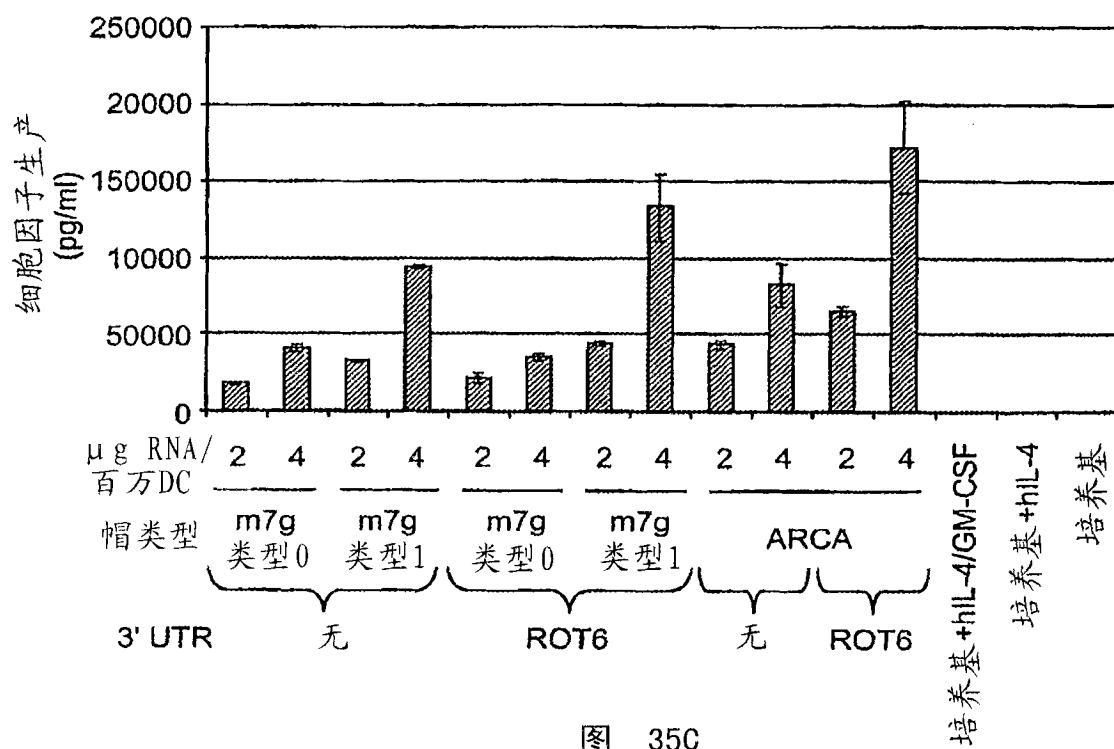


图 35B



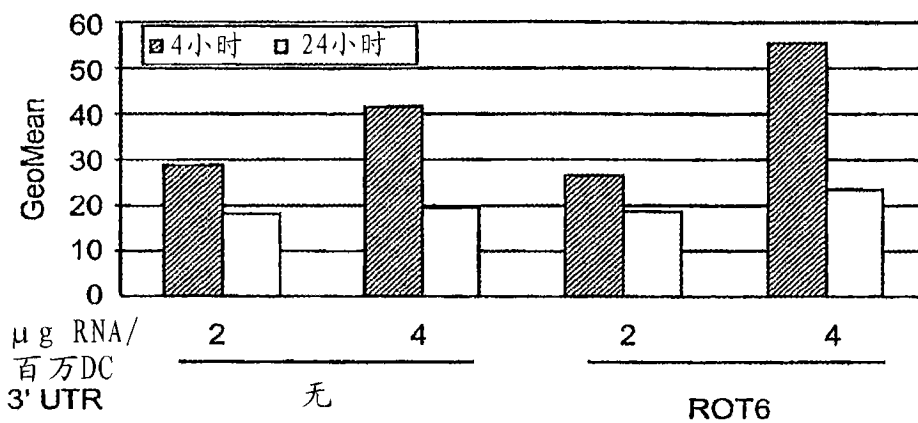


图 36B

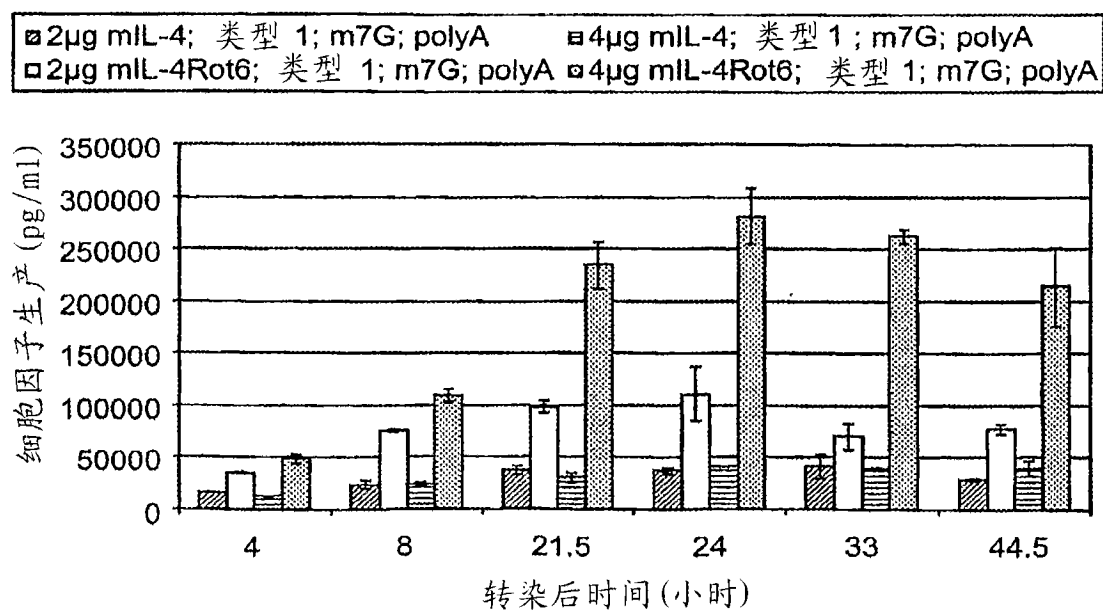


图 36C