



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123732 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200980128872. 3

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 19

A61K 31/7105(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395(2006. 01)

61/074, 582 2008. 06. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/047987 2009. 06. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02009/155535 EN 2009. 12. 23

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 J·H·桑普森 D·A·米切尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

A61K 39/12(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

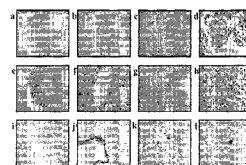
权利要求书 4 页 说明书 81 页 附图 19 页

(54) 发明名称

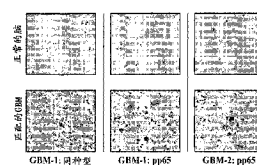
用于引发免疫应答的组合物, 方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及用于引发针对由癌细胞表达的至少一种 CMV 抗原的免疫应答, 尤其是用于治疗及预防癌的组合物, 方法, 及试剂盒。也提供 CMV 确定方法, 组合物, 及试剂盒。



A



B

1. 在受试者中引发针对表达巨细胞病毒 (CMV) 抗原的细胞的免疫应答的方法, 所述方法包括:

给所述受试者施用药学可接受的组合物, 所述药学可接受的组合物包括:

- 至少一种 CMV 抗原, 或
- 编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,

其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述细胞的免疫应答。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述细胞特征在于是癌前细胞, 癌细胞, 或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞 - 类型。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述药学可接受的组合物以足以预防或治疗所述受试者中与 CMV 相关的癌的预防或治疗有效量提供。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述至少一种 CMV 抗原对应于选自下列的多肽, 或其免疫原性片段: 壳体多肽, 体被多肽, 及包膜多肽。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述至少一种 CMV 抗原对应于选自下列的多肽, 或其免疫原性片段: 磷蛋白独特长 83 (ppUL83 ;a/k/app65), 糖蛋白 UL55 (gpUL55 ;a/k/a gB), UL123 立即早期 1 (IE1) 蛋白, UL122 IE2 蛋白, UL111A (a/k/a mtrII), US28, ppUL32, ppUL65, ppUL80a, ppUL82, ppUL98a, ppUL99, gpUL4 (a/k/a gp48), gpUL16, gpUL18 (a/k/a MHC), gpUL75 (a/k/a gH), gpUL100, gpUL110 (a/k/a gM), gpUL115 (a/k/a gL), pUL46, pUL48, pUL56, pUL86 (a/k/a MCP), 糖蛋白独特短 10 (gpUS10), gpUS11, 糖蛋白复合物 II (gcII), gp65, 及 gp93。

6. 权利要求 1 的方法, 其中所述编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸是 RNA。

7. 权利要求 1 的方法, 其中所述编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸是 cDNA。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述至少一种 CMV 抗原是全 CMV 抗原, 全灭活的 CMV 病毒, 或其级分。

9. 权利要求 1 的方法, 其中所述药学可接受的组合物还包括至少一种佐剂, 或编码所述佐剂的核酸。

10. 权利要求 9 的方法, 其中所述佐剂是选自下列的细胞因子: GM-CSF, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, TNF- α , 及 M-CSF。

11. 权利要求 9 的方法, 其中所述佐剂包括弗氏不完全佐剂 (Montanide ISA 51) 或粒状棒状杆菌 P40。

12. 药学可接受的组合物, 其包括至少一种 CMV 抗原, 或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸, 其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

13. 权利要求 12 的药学可接受的组合物, 其还包括: 生理学可接受的载质, 稀释剂, 或赋形剂。

14. 权利要求 12 的药学可接受的组合物, 其还包括佐剂。

15. 权利要求 14 的药学可接受的组合物, 其中所述佐剂是细胞因子。

16. 权利要求 14 的药学可接受的组合物, 其中所述佐剂是选自下列的细胞因子: GM-CSF, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, TNF- α , 及 M-CSF。

17. 权利要求 14 的药学可接受的组合物, 其中所述佐剂包括弗氏不完全佐剂

(Montanide ISA 51) 或粒状棒状杆菌 P40。

18. 预防或治疗有效量的权利要求 12 ~ 17 中任一项的药学可接受的组合物。

19. 在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法, 所述方法包括:
给受试者施用组合物, 所述组合物包括: 有效量的抗原呈递细胞, T- 淋巴细胞, 或两者,

其中所述抗原呈递细胞及 T 淋巴细胞已用致敏 - 有效量的至少一种 CMV 抗原体外致敏,

其中所述有效量的抗原呈递细胞, T 淋巴细胞, 或两者足以引发针对所述表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述细胞特征在于是癌前细胞, 癌细胞, 或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞 - 类型。

21. 权利要求 19 的方法, 其中所述抗原呈递细胞或 T 淋巴细胞是自体的。

22. 制备抗原呈递细胞的方法, 所述方法包括:

在对于至少一种 CMV 抗原被所述抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下, 使抗原呈递细胞与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触, 其中所述抗原呈递细胞呈递至少一种 CMV 抗原。

23. 组合物, 其包括在对于至少一种 CMV 抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下, 与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触的抗原呈递细胞。

24. 制备淋巴细胞的方法, 所述方法包括:

(a) 在对于至少一种 CMV 抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下, 使抗原呈递细胞与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触; 及

(b) 在足以产生淋巴细胞的条件下使所述淋巴细胞与步骤 (a) 的抗原呈递细胞接触, 其中所述淋巴细胞能引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

25. 权利要求 24 的方法, 其中所述细胞特征在于是癌前细胞, 癌细胞, 或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞 - 类型。

26. 权利要求 24 的方法, 其中所述淋巴细胞是 T 淋巴细胞。

27. 组合物, 其包括 T 淋巴细胞, 所述 T 淋巴细胞在足以产生能引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的 T 淋巴细胞的条件下与抗原呈递细胞接触, 其中所述抗原呈递细胞已在对于至少一种 CMV 抗原被所述抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触。

28. 权利要求 27 的组合物, 其中所述细胞特征在于是癌前细胞, 癌细胞, 或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞 - 类型。

29. 用于治疗或降低受试者中癌的严重性的方法, 所述方法包括: 给受试者施用治疗或预防有效量的权利要求 23 或 28 的组合物。

30. 在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法, 所述方法包括:
给所述受试者施用药学可接受的组合物, 所述药学可接受的组合物包括用至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸离子体装载的树突细胞,

其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述细胞特征在于是癌前细胞,癌细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌的细胞 - 类型。

32. 处理表达 CMV 抗原的细胞的方法,所述方法包括:给受试者施用治疗或预防有效量的药学可接受的组合物,以降低或抑制所述受试者中所述细胞的生长或扩展,其中所述组合物包括:

- (a) 至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的多核苷酸;
- (b) 抗 -CMV 抗体;
- (c) 呈递至少一种 CMV 抗原的抗原呈递细胞,针对所述 CMV 抗原激发的淋巴细胞,或两者;或
- (d) 它们的组合。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述细胞特征在于是癌前细胞,癌细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌的细胞 - 类型。

34. 在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法,所述方法包括:

给受试者施用组合物,所述组合物包括:有效量的抗原呈递细胞,淋巴细胞,或两者,其中所述抗原呈递细胞及淋巴细胞已用致敏 - 有效量的至少一种 CMV 抗原体外致敏,其中所述有效量的抗原呈递细胞,淋巴细胞,或两者足以引发针对所述表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述细胞特征在于是癌前细胞,癌细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌的细胞 - 类型。

36. 权利要求 34 的方法,其中所述抗原呈递细胞,淋巴细胞或两者是自体的。

37. 处理表达 CMV 抗原的细胞的方法,所述方法包括:给受试者施用组合物,所述组合物包括:有效量的抗原呈递细胞,淋巴细胞,或两者,

其中所述抗原呈递细胞已在对于至少一种 CMV 抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触,

其中所述淋巴细胞已与呈递至少一种 CMV 抗原的抗原呈递细胞接触。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述细胞特征在于是癌前细胞,癌细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌的细胞 - 类型。

39. 权利要求 37 的方法,其中所述淋巴细胞是 T 淋巴细胞。

40. 在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法,所述方法包括:给所述受试者施用药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括抗 -CMV 抗体。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述细胞特征在于是癌前细胞,癌细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌的细胞 - 类型。

42. 权利要求 40 的方法,其中所述抗体缀合到毒性部分,其中所述抗体将细胞毒性剂量的所述毒性部分有效递送到所述细胞。

43. 权利要求 40 的方法,其中所述毒性部分是放射性同位素,其中所述抗体将所述细胞毒性剂量作为粒子辐射有效递送到所述细胞。

44. 试剂盒,其包括药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括:至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

45. 权利要求 44 的试剂盒,其还包括佐剂。

46. 权利要求 44 的试剂盒,其还包括化学治疗剂。

47. 权利要求 1,19,30,32,34,37,40 中任一项的方法,还包括扩增来自受试者的生物样品的核酸分子,以获得扩增子,其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触,其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述扩增子长度为 200 个碱基对 (bp) 或以下。

49. 权利要求 47 的方法,其中所述扩增步骤还包括提供包括可检测的标记物的核酸探针。

50. 所述权利要求 49 的方法,

其中所述第一引物包括如 SEQ ID NO :67 中所示的第一引物序列,

其中所述第二引物包括如 SEQ ID NO :68 中所示的第二引物序列,

其中所述探针具有如 SEQ ID NO :69 中所示的探针序列。

用于引发免疫应答的组合物,方法及试剂盒

[0001] 【相关申请的交叉引用】

[0002] 本申请根据 35USC § 119 要求提交于 2008 年 6 月 20 日的美国临时申请 No. 61/074,582 的优先权,将其通过引用整体并入本文。

[0003] 【政府权益】

[0004] 美国政府通过来自国家健康学会,国家癌学会,及国家神经性障碍及中风学会的资金具有本申请中的某些权利(脑癌中的 NINDS 孢子 P50-CA1-0876;恶性神经胶质瘤的 NCI 树突细胞免疫治疗 R01 CA97222)。

【技术领域】

[0005] 本发明涉及用于引发针对表达巨细胞病毒(CMV)抗原的细胞的免疫应答的组合物,方法,及试剂盒。本发明也涉及用于确定 CMV 的方法,组合物,及试剂盒。

【背景技术】

[0006] 用于治疗癌的方法包括使用化学治疗剂,放射治疗,及手术。许多肿瘤抗原的鉴定导致旨在开发基于细胞的治疗。一些方法依赖于首先鉴定肿瘤抗原,即,相对于非-肿瘤细胞,优先在肿瘤细胞中表达的多肽。例如,几种人肿瘤抗原已从黑色素瘤患者分离,及鉴定的及表征。

[0007] CMV 是 β -疱疹病毒。人巨细胞病毒(HCMV)在人群中是地方性的,及已报道,除了在免疫妥协的宿主中之外,该病毒通常不导致临床疾病。一些人疱疹病毒已牵涉许多人恶性肿瘤,包括淋巴瘤,鼻咽癌,子宫颈癌,及卡波西肉瘤。最近,已报道在一些肿瘤中出现完整病毒的 HCMV 抗原表达及检测。

[0008] 尽管攻击性多科性治疗包括手术,辐射,及化学治疗,患癌的患者预后仍相对差。而且,常规治疗对癌的非特异性性质常导致周围的正常及全身组织无能力损坏。因此,有开发靶向癌细胞的有效诊断以及治疗及预防策略的需求。

[0009] 【发明概述】

[0010] 一方面,本发明提供在受试者中引发针对表达巨细胞病毒(CMV)抗原的细胞的免疫应答的方法。所述方法包括:给所述受试者施用药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述细胞的免疫应答。

[0011] 另一方面,本发明提供药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括:至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

[0012] 一些方面,本发明提供预防或治疗有效量的药学可接受的组合物,其中所述药学可接受的组合物包括:至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

[0013] 其他方面,本发明提供在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方

法,所述方法包括:

[0014] 给受试者施用组合物,所述组合物包括:有效量的抗原呈递细胞,T-淋巴细胞,或两者,其中所述抗原呈递细胞及T淋巴细胞已用致敏-有效量的至少一种CMV抗原体外致敏,其中所述有效量的抗原呈递细胞,T淋巴细胞,或两者足以引发针对所述表达CMV抗原的细胞的免疫应答。

[0015] 一方面,本发明提供制备抗原呈递细胞的方法,所述方法包括:在对于至少一种CMV抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下,使抗原呈递细胞与至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的核酸体外接触,其中所述抗原呈递细胞呈递至少一种CMV抗原。

[0016] 再一方面,本发明提供组合物,所述组合物包括在对于至少一种CMV抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下,与至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的核酸体外接触的抗原呈递细胞。

[0017] 一些方面,本发明提供制备淋巴细胞的方法,所述方法包括:

[0018] (a) 在对于至少一种CMV抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下,使抗原呈递细胞与至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的核酸体外接触;及

[0019] (b) 在足以产生淋巴细胞的条件下使所述淋巴细胞与步骤(a)的抗原呈递细胞接触,其中所述淋巴细胞能引发针对表达CMV抗原的细胞的免疫应答。

[0020] 其他方面,本发明提供组合物,所述组合物包括:在足以产生能引发针对表达CMV抗原的细胞的免疫应答的T淋巴细胞的条件下与抗原呈递细胞接触的T淋巴细胞,其中所述抗原呈递细胞已在对于至少一种CMV抗原被所述抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下与至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的核酸体外接触。

[0021] 一方面,本发明提供用于治疗或降低受试者中癌的严重性的方法。所述方法包括:给受试者施用治疗或预防有效量的组合物,所述组合物包括在足以产生能引发针对表达CMV抗原的细胞的免疫应答的T淋巴细胞的条件下与抗原呈递细胞接触的T淋巴细胞,其中所述抗原呈递细胞已在对于至少一种CMV抗原被所述抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下与至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的核酸体外接触。

[0022] 另一方面,本发明提供在受试者中引发针对表达CMV抗原的细胞的免疫应答的方法。所述方法包括:

[0023] 给所述受试者施用药学可接受的组合物,所述药理学可接受的组合物包括用至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的核酸离体装载的树突细胞,其中所述药理学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述表达CMV抗原的细胞的免疫应答。

[0024] 一些方面,本发明提供处理表达CMV抗原的细胞的方法,所述方法包括:给受试者施用治疗或预防有效量的药理学可接受的组合物,以降低或抑制所述受试者中所述细胞的生长或扩展,其中所述组合物包括:

[0025] (a) 至少一种CMV抗原或编码所述至少一种CMV抗原的多核苷酸;

[0026] (b) 抗-CMV抗体;

[0027] (c) 呈递至少一种CMV抗原的抗原呈递细胞,针对所述CMV抗原激发的淋巴细胞,或两者;或

[0028] (d) 它们的组合。

[0029] 其他方面,本发明提供在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法,所述方法包括:

[0030] 给受试者施用组合物,所述组合物包括:有效量的抗原呈递细胞,淋巴细胞,或两者,其中所述抗原呈递细胞及淋巴细胞已用致敏-有效量的至少一种 CMV 抗原体外致敏,其中所述有效量的抗原呈递细胞,淋巴细胞,或两者足以引发针对所述表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

[0031] 一方面,本发明提供处理表达 CMV 抗原的细胞的方法,所述方法包括:给受试者施用组合物,所述组合物包括:有效量的抗原呈递细胞,淋巴细胞,或两者,其中所述抗原呈递细胞已在对于至少一种 CMV 抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触,其中所述淋巴细胞已与呈递至少一种 CMV 抗原的抗原呈递细胞接触。

[0032] 另一方面,本发明提供在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法,所述方法包括:

[0033] 给所述受试者施用药学可接受的组合物,所述药理学可接受的组合物包括抗-CMV 抗体。

[0034] 在各其他方面,本发明提供在受试者中确定 CMV 核酸(优选血或其他生物流体中的 CMV DNA)(例如从自受试者获得的血样品中确定亚临床的病毒血症)的组合物及方法。因此,所述组合物及方法提供弥补各种诊断性和/或治疗性过程的诊断,监控,及预后测试/测定,及包括本文所述的方法的治疗,例如,预防性和/或治疗性处理与癌前细胞,癌细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞-类型相关的疾病或病情。

[0035] 其他方面,本发明提供试剂盒,所述试剂盒包括药理学可接受的组合物,所述药理学可接受的组合物包括至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,其中所述药理学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

【附图说明】

[0036] 图 1 显示:(A) 人巨细胞病毒 (HCMV) 蛋白的免疫组织化学检测:(a) 阴性对照(无第一抗体;物镜 $\times 10$);(b) 抗平滑肌肌动蛋白(小鼠 IgG2a mAb; $\times 10$);(c) 用抗-HCMV IE1 染色的成胶质细胞瘤多形性(GBM) 样本 1(小鼠 IgG2a mAb, $\times 10$);(d) 更高放大倍率的抗-IE1 染色显示阳性肿瘤细胞及内皮细胞,但阴性淋巴细胞及血管内膜($\times 20$);(e) 用抗-HCMV IE1 染色的 GBM 样本 2 显示血管周肿瘤细胞染色,但坏死区内缺失检测($\times 10$);(f) 用抗-IE1mAb 染色的血管周肿瘤细胞($\times 20$);(g 及 h) 用抗-HCMV pp65mAb 染色的 GBM 样本 3 显示贯穿 GBM 样本的肿瘤细胞散布的细胞核及核周染色($\times 10$ 及 $\times 20$, 分别);(i 及 j) 用抗平滑肌肌动蛋白 mAb 染色的感染 CMV 的肺($\times 10$);(k) 用抗-HCMV IE1 染色的感染 CMV 的肺($\times 20$);(l) 用抗-HCMV pp65mAb 染色的感染 CMV 的肺($\times 20$);及(B) 匹配的 GBM 及正常脑中的 HCMV 检测。染色自含正常脑及肿瘤区的 2 个 GBM 样本的代表性的组织化学切片用于使用同种型对照抗体(患者 1, 左栏),或抗-HCMV pp65(患者 1 肿瘤,中栏;患者 2, 右栏)检测。贯穿肿瘤涉及区观察到针对 HCMVpp65 抗体的反应性病灶区,但正常脑缺乏针对 HCMV- 特异性抗体的免疫反应性(IE1 染色呈现与肿瘤中 IE1 的更普遍检测相同的发现,未显示)。以 $\times 40$ 物镜放大倍率获取全部照片。

[0037] 图 2 显示恶性神经胶质瘤样本中 HCMV 的聚合酶链式反应 (PCR) 检测。泳道 1: 100bp 阶梯, 泳道 2-E: MG 样本; 泳道 4: MG 样品 4+100bp 阶梯; 泳道 F: 阴性对照 (无 DNA 模板)。

[0038] 图 3 显示对于 CMV 血清阳性及血清阴性的受试者中从有或无自体淋巴细胞转移 (ALT) 的治疗性 TMZ- 诱导的淋巴细胞减少恢复期间, 对于患新 - 诊断的 GBMs 的受试者使用 CMV pp65-LAMP RNA- 装载的 DCs 疫苗接种流程的示意图。

[0039] 图 4 是显示对于用 CMV pp65RNA 装载的 DCs 处理的患新 - 诊断的 GBM 的患者的时间进展的坐标图。用靶向 CMV pp65 的 DC 疫苗处理 13 名患 GBM 的患者。时间进展相比组织对照有利 ($P = 0.0008$)。

[0040] 图 5 是显示用 CMV pp65RNA 装载的 DC 疫苗处理的患 GBM 的患者的总体生存的坐标图。

[0041] 图 6 是显示对于患 GBM 的 33 岁的雌性受试者 pp65RNA 装载的 DC 疫苗接种期间接近完全的放射摄影反应的磁共振图像 (MRI)。

[0042] 图 7 显示多功能 T 细胞与 CMV pp65 反应的分析。在 HIV 疫苗试验网络的免疫学监控核心实验室 (Immunologic Monitoring Core laboratory of the HIV Vaccine Trials Network) 将自 CMV 血清阳性供体的外周血单核细胞 (PBMCs) 用 CMV pp65 肽混合剂体外刺激, 及使用确认的 11- 色彩多色流式细胞仪分析来分析。功能和布尔选通软件用于测定多功能 T 细胞比例 (分泌多个细胞因子及展示粒酶活化标记物 CD107a)。已显示多功能免疫应答以区别有 HIV 感染的发展者对比非 - 发展者, 及相比分泌特定细胞因子的细胞的绝对数或百分率, 良好相关于病毒感染中的免疫保护。

[0043] 图 8 是显示通过用 pp65 mRNA 脉冲的自体树突细胞接受疫苗接种的患新 - 诊断的 GBM 的患者中 pp65 抗体反应的增加的坐标图。左图显示 pp65- 特异性单克隆抗体结合用重组 pp65 蛋白包被的珠的标准曲线。右图显示存在于患者血清稀释液的抗体与用重组 pp65 包被的珠的特异性结合。前 - 疫苗血清含低滴度的 pp65- 特异性抗体, 及在 #5 疫苗增加滴度 (如用抗 - 人 IgG 荧光抗体检测后平均倍数增加 (MFI) 所示) 及通过 #9 疫苗进一步增加。此外, 在替莫唑胺循环期间诱导这些反应, 展示并行的化学治疗施用期间诱导有力的体液反应的能力。

[0044] 图 9 是显示通过用 pp65 mRNA 脉冲的自体树突细胞接受疫苗接种的患新 - 诊断的 GBM 的患者中延迟型超敏 (DTH) 反应增加的条形图。将针对 pp65 及对照抗原 (破伤风及念珠菌) 疫苗接种之前及之后的展示阳性 DTH 反应 ($= 10\text{mm}^2$) 的患者比例显示在左边; 及疫苗接种之前及之后的皮肤红斑面积显示在右侧。此外, 替莫唑胺循环期间诱导这些反应, 展示并行的化学治疗施用期间诱导细胞 DTH 反应的能力。

[0045] 图 10 是荧光 - 活化的细胞分选 (FACS) 特征。自 PBMCs 的非粘连细胞使用抗 -CD3- 包被的平板体外刺激 72 小时, 及收获, 洗涤, 及用编码绿色荧光蛋白 (GFP) 或 CXCR2 趋化因子受体 2 (CXCR2) 的 RNA ($2\mu\text{g}$ 的 RNA/ 10^6 细胞) 电穿孔, 如以下实施例 10&11 中所述。细胞在培养基 (AIM-V 培养基, 2% AB 血清, hIL-2 [$100\text{U}/\text{ml}$]) 培养 48 小时, 洗涤, 及通过施用缀合别藻毒素 (APC) 的 CXCR2- 特异性单克隆抗体及流式细胞术分析 GFP 表达及 CXCR2。上部: 未转染的 T 细胞表达 GFP (左上部) 及 CXCR2 (右上部)。底部: 用 GFP RNA 电穿孔后 GFP 表达 (左下部), 及用 CXCR2 RNA 电穿孔后 CXCR2 表达 (右下部)。此实验重复两次, 有

类似结果。

[0046] 图 11 是 FACS 特征。将自 HLA-A2- 阳性供体的 PBMCs 通过用 HLA-A2- 限制的 pp65 肽 (N9V) 脉冲的自体 DCs 刺激 7 天, 收获, 及用 GFP RNA 电穿孔。48 小时之后, 在 N9V- 四聚体 - 阳性对比 N9V 四聚体 - 阴性 CD8+T 细胞中检查 GFP 表达。左: 对母细胞样淋巴细胞 (R1; 顶部) 及 CD8+T 细胞 (R2; 底部) 选通。中: 用对照 RNA (CXCR2) 转染的细胞内无 GFP 表达。右: 24.57% 的 CD8+T 细胞中 GFP 表达 (右上部), 如四聚体染色所示的, 其几乎完全由 pp65- 特异性 T 细胞构成 (对淋巴细胞 (R1) 及 CD8+ 细胞 (R2) 选通的) (右下部)。

[0047] 图 12 是显示表达 GFP 的细胞的百分率及 FACS 谱的坐标图。(A) 用 DCs 刺激的 RNA- 转染的 T 细胞中的 GFP 表达的动力学。如以下实施例 10&11 中所述, 将 PBMCs 利用用 pp65mRNA 脉冲的自体 DCs 体外刺激 11 天。细胞收获及用 GFP RNA ($2 \mu\text{g}/10^6$ 细胞) 转染。电穿孔后 24 小时开始评价四聚体 - 阳性 (HLA-A2B) 及四聚体 - 阴性细胞中的 GFP 表达, 及监控直到第 7 天的后电穿孔。(B) 分选的 GFP RNA- 转染的 T 细胞的扩展。如材料及方法中所述, 将 PBMCs 利用用 pp65mRNA 脉冲的自体 DCs 体外刺激 11 天。收获细胞, 及用 GFP RNA ($2 \mu\text{g}/10^6$ 细胞) 转染。48 小时之后, 通过基于 GFP 表达的流式细胞术分选细胞 (GFP+ 及 GFP-), 及放回入含高 - 剂量 IL-2 的培养基。通过锥虫蓝染色及每 3 ~ 4 天计数等份的细胞来评价细胞扩展。此实验用自另一供体的 PBMCs 重复, 得到类似结果。(C) HLA-A2- 及 HLA-B7- 限制的 pp65- 特异性 T 细胞的四聚体分析。一组四聚体用于鉴定有针对可通过四聚体检测的 pp65 的多于一种类型的单体型 - 限制的 T 细胞反应性的患者。左: GFP- 级分中 HLA-A2- 及 HLA-B7pp65- 特异性 T 细胞的频度。右: GFP 级分中四聚体 - 阳性细胞的频度。(D) 通过 RNA 电穿孔分离 CMV 抗原 - 特异性 CD4T 细胞。如前所述产生利用 pp65RNA 脉冲的 DCs 刺激的 PBMCs, 及在 DC 刺激后第 11 天用 GFP RNA 电穿孔。细胞分选为 GFP+ 及 GFP- 级分, 及 48 小时之后通过细胞内细胞因子流式细胞术分析暴露于无抗原, SEB ($1\text{Bg}/\text{ml}$), 或 CMV pp65 肽混合剂 (Beckman Coulter) 后 IFN- γ 产生。左: GFP-CD4+T 细胞中的 IFN- γ 表达。右: GFP+CD4+T 细胞中的 IFN- γ 。

[0048] 图 13 是 FACS 特征。RNA 电穿孔后 pp65- 特异性 T 细胞中 CXCR2 的选择性表达。如实施例 10&11 中所述, 将 PBMCs 利用用 pp65 mRNA 脉冲的自体 DCs 体外刺激 11 天。收获细胞, 及用 CXCR2 RNA ($2 \mu\text{g}/10^6$ 细胞) 转染。48 小时之后, 收获细胞, 及分析四聚体 - 阳性 (HLA-A2- 限制的供体) 及四聚体 - 阴性 CD8+ 细胞中 CXCR2 表达。CXCR2 的活化的 CD8+T 细胞中的基线表达大致为 10% (数据未显示)。结果显示, RNA 电穿孔导致仅 CMV- 特异性 T 细胞中增加的 CXCR2 表达, 在 49.1% 的四聚体 - 阳性细胞中表达, 然而, 在 DC 刺激后四聚体 - 阴性细胞中观察到相比基线的表达无增加。

[0049] 图 14 是坐标图。(A) CXCR2 及 GFP RNA- 转染的 T 细胞向 IL-8 的体外趋化性。如实施例 10&11 中所述, 将 PBMCs 用固定的抗 -CD3 抗体 - 介导的刺激体外活化 4 天。收获细胞, 及用 CXCR2 或 GFP RNA ($2 \mu\text{g}/10^6$ 细胞) 转染。48 小时之后, 收获细胞, 计数, 及如实施例 10&11 中所述以一式三份放入过滤室培养板。在下室中指定的浓度的 IL-8 的存在下培养 45 分钟后, 评定未转染的, GFP RNA 转染的, 及 CXCR2RNA- 转染的 T 细胞响应增加浓度的 IL-8 的迁移。结果显示 CXCR2RNA 转染的 T 细胞相比未转染的及 GFP RNA- 转染的细胞的增强的趋化反应 (* $p < 0.05$; t 检验)。此实验已重复几次, 得到相同结果。(B) CXCR2 及 GFP RNA- 转染的 T 细胞向 GRO- α 的体外趋化性。如上所述针对过滤室板下室内增加浓度的

GRO- α 测定细胞。CXCR2- 转染的 T 细胞呈现显著增加的响应 GRO- α 的趋化活性,然而 GFP RNA- 转染的及未转染的 T 细胞呈现响应 GRO- α 的迁移中无显著的变化 (* $p < 0.05$; t 检验)。(C)CXCR2 及 GFP RNA 转染的 T 细胞向 UL146 的体外趋化性。如上所述针对过滤室板下室内增加浓度的 CMV- 分泌的趋化因子 UL146 测定细胞。CXCR2- 转染的 T 细胞呈现显著增加的响应 UL146 的趋化活性,然而 GFP RNA- 转染的及未转染的 T 细胞呈现在响应 UL146 的迁移中无变化 (** $p < 0.01$; t 检验)。

[0050] 图 15 是坐标图及 FACS 特征。(A)CXCR2RNA- 转染的 T 细胞迁移进入腹腔。如以下实施例 10&11 中所述,将 PBMCs 利用用 pp65mRNA 脉冲的自体 DCs 体外刺激 11 天。收获细胞,及用 CXCR2RNA (2Bg/10⁶ 细胞) 转染。48 小时之后,收获未转染的及 CXCR2RNA- 转染的细胞,及在 PBS 中用 CFSE (对于未转染的细胞是 1 μ M, 及对于 CXCR2RNA- 转染的细胞是 10BM) 区别标记 5 分钟,洗涤,混合,及静脉内注射到 SCID 小鼠 (2 $\times$ 10⁷ 细胞 / 小鼠, n = 3/ 组)。T 细胞注射后每 8 小时给小鼠腹膜内注射仅 PBS, 或 PBS 中的 1 μ g/ml 趋化因子 (GRO- α , IL-8, 或 UL146) 24 小时。处死后通过经腹膜灌洗及离心收获淋巴细胞,及通过流式细胞仪分析评价未转染的及 CXCR2 RNA- 转染的细胞的相对蓄积。PBS- 处理的动物中 CFSE^高细胞 (CXCR2RNA 转染的 T 细胞) 及 CFSE^低细胞 (未转染的 T 细胞) 的蓄积用作与细胞因子 - 处理的动物中细胞的蓄积比较的基线。数据显示为相比 PBS- 处理的动物的倍数变化。(B)CXCR2RNA- 转染的 T 细胞迁移进入 CNS。如实施例 10&11 中所述,将 PBMCs 利用用 pp65mRNA 脉冲的自体 DCs 体外刺激 11 天。收获细胞,及用 CXCR2RNA (2 μ g/10⁶ 细胞) 转染。48 小时之后,收获未转染的及 CXCR2RNA- 转染的细胞,及在 PBS 中用 CFSE (5 μ M) 标记 5 分钟,洗涤,及注射静脉内到 SCID 小鼠 (1 $\times$ 10⁷ 细胞 / 小鼠, n = 3/ 组)。麻醉的小鼠随后经右顶叶注射 CMV 趋化因子 UL146 (5 μ l 的 PBS 中 1 μ g), 及经左顶叶注射仅 PBS。解剖脑半球及从顶叶制备单个 - 细胞消化物后,6 小时之后通过流式细胞术评定右及左顶叶中 CFSE- 标记的细胞的蓄积。用 CXCR2RNA- 转染的 T 细胞注射的小鼠的代表性的流式细胞点图显示注射了 CXCR2 配体 UL146 的右顶叶中淋巴细胞的更大蓄积。(C)CXCR2- 转染的 T 细胞的体内迁移。通过流式细胞术及人 T 细胞每 100,000 事件点图评定右 (UL146- 注射的) 及左 (PBS- 注射的) 顶叶中 T 细胞蓄积。结果显示 CNS 内响应 UL146 的 CXCR2RNA- 转染的 T 细胞的显著的蓄积,然而未转染的 T 细胞未呈现任何优先蓄积 (* $p < 0.05$; t 检验)。

[0051] 图 16 是显示来自患 GBM 的患者的外周血及肿瘤的 CMV gB (UL55)DNA 的扩增的电泳凝胶。A:泳道 1:100bpDNA 阶梯;泳道 2 ~ 12:在初次切除肿瘤的时间获取的来自 11 名患新 - 诊断的 GBM 的患者的外周血样品在 11 名患者中 6 名显示强病毒 DNA 检测,及 11 名患者中 3 名显示适当尺寸的弱条带。B:泳道 1:100bp DNA 阶梯;泳道 2-F:来自 14 名患高度星形细胞瘤的患者的 GBM 肿瘤样品 (11GBM, 3AA) 显示,14 名患者中 11 名的适当尺寸的清晰条带。泳道 4 具有与用于扩增的条带比对的样品混合的 100bp DNA 阶梯。

[0052] 图 17 是从 GBM 患者血清 HCMV gp64 实时 PCR 的熔解曲线坐标图。

[0053] 图 18 是从 GBM 患者血清的 HCMV gp64 实时 PCR 的 PCR 扩增循环坐标图。

[0054] 图 19 显示序列同源性。通过在 Duke DNA 测序核心设备中进行的 DNA 测序评价来自 22 个新鲜切除的 GBM 样本的扩增的 gB (UL55)DNA。使用 Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行序列比对。通过 NCBI DNA 数据库的 BLAST 评价与鉴定的 CMV 株的同源性。样品之间的序列变异区以蓝色显示,核苷酸差异以白色亮显。黄色显

示全部 22 样本之间的保守的同一性。白色及蓝色显示序列变化区。

[0055] 【发明详述】

[0056] 申请人发现,可使用包括涉及例如,疫苗的免疫治疗的 CMV- 特异性免疫学技术靶向表达 CMV 抗原的细胞。本发明可应用,但不限于开发用于诊断及治疗表达 CMV 抗原的细胞的组合物,方法,及试剂盒。

[0057] I. 定义

[0058] 本文中的术语“免疫应答”指免疫系统针对抗原或抗原决定簇的任何反应。例示免疫应答包括体液免疫应答(例如抗原-特异性抗体的产生(中和或别样地))及细胞-介导的免疫应答(例如淋巴细胞增殖)。

[0059] II. 方法及组合物

[0060] 一方面,本发明提供在受试者中引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法。所述方法包括:给所述受试者施用药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述细胞的免疫应答。

[0061] 表达 CMV 抗原的细胞可为任意类型的细胞。细胞可特征在于是癌细胞,癌前细胞,或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞-类型。癌包括但不限于:脑癌(例如,神经胶质瘤),肺癌,肝癌,子宫颈癌,软组织肉瘤,内分泌肿瘤,造血癌,黑色素瘤,膀胱癌,乳腺癌,胰腺癌,前列腺癌,结肠癌,及卵巢癌。癌也可特征在于是良性或恶性的。在一实施方式中,癌是高度神经胶质瘤。在另一实施方式中,高度神经胶质瘤是成胶质细胞瘤多形性,间变性星形细胞瘤,或少突神经胶质瘤。

[0062] 一般而言,免疫应答可包括体液免疫应答,细胞-介导的免疫应答,或两者。例如,通过涉及 MHC II 蛋白或直接 B- 细胞刺激的免疫学通路的抗原呈递可产生体液反应;而通过涉及 MHC I 蛋白的通路呈递的抗原可引发免疫系统的细胞臂。

[0063] 体液反应可通过标准免疫测定就来自接受药学可接受的组合物的受试者的血清样品中的抗体水平来测定。细胞免疫应答是涉及 T 细胞的反应,及可体外或体内测定。例如,全身细胞免疫应答可作为施用药学可接受的组合物后适宜时间从受试者采样的细胞(例如,外周血白细胞(PBLs))内的 T 细胞增殖活性来测定。例如,PBMCs 与刺激物温育适当的时期后,可测定 [³H] 胸苷合并。增殖的 T 细胞子集可使用流式细胞术测定。也可测定 T 细胞细胞毒性(CTH)。

[0064] 在一实施方式中,引发的免疫应答足以预防性或治疗性处理肿瘤形成疾病,或与其相关的症状,特别是与 CMV 相关的癌。因此,药学可接受的组合物的有利效果将通常至少部分是免疫-介导的,尽管免疫应答不需阳性展示,以使本文所述的组合物及方法落入本发明的范围内。

[0065] 施用给人及非-人脊椎动物二者认为在本发明的范围内。也考虑兽医学应用。一般而言,受试者是可引发免疫应答的任何活体。受试者之例包括但不限于:人,家畜,狗,猫,小鼠,大鼠,及其转基因物种。

[0066] 受试者可患肿瘤形成疾病(例如,肿瘤),或有风险发展肿瘤形成疾病。受试者可通过临床标准表征,例如,有晚期肿瘤形成疾病或呈现临床上可测量的肿瘤的高肿瘤负荷的那些。临床上可测量的肿瘤是可基于肿瘤质量(例如,通过触诊,MRI,CAT 扫描,X 射线)

检测的肿瘤。因此,例如,根据本发明的药学可接受的组合物可施用于有加重的疾病的受试者,旨在缓和它们的病情。优选地,降低肿瘤质量作为施用本发明的药学可接受的组合物的结果发生,但任何临床改善构成益处。临床改善包括降低的风险或进展速度或肿瘤病理后果的降低,例如。

[0067] 作为另一实施例,受试者可为曾患癌及已付诸另一模式治疗者。其他治疗可包括例如,手术切除,放射治疗,化学治疗,及其他模式的免疫治疗,其中,作为其他治疗的结果,受试者不呈现临床上可测量的肿瘤。但是,受试者可测定为有癌复发或进展风险者,接近原肿瘤位点,或通过转移。所述受试者可进一步分类为高-风险及低-风险受试者。细分化可基于初始治疗之前或后观察的特征进行。这些特征临床领域已知,及对各不同癌被适宜定义。特征为典型的高风险亚组的是肿瘤侵袭相邻组织,或显示涉及淋巴结的那些。因此,例如,本发明的药学可接受的组合物可施用于受试者,以引发主要作为对抗复发的预防测量的抗-癌反应。优选地,施用组合物延缓癌复发,或更优选地,降低复发风险(即,提高治愈率)。所述参数可相比其他患者群及其他治疗模式测定。

[0068] 药学可接受的组合物可在任何适当的时间施用。例如,施用可在具有肿瘤负荷的受试者的传统治疗之前或期间进行,且在肿瘤变得临床上不可检测后持续。施用也可在显示复发迹象的受试者中持续。

[0069] 药学可接受的组合物可以治疗或预防有效量单独或与一或多种其他抗原组合施用,其中所述药学可接受的组合物包括至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸。将本发明的药学可接受的组合物施用给受试者可使用已知的过程及以足以实现期望效果的剂量及时间进行。例如,治疗或预防有效量的药学可接受的组合物可根据因素例如受试者年龄,性别,及重量而变化。本领域技术人员可调整剂量方案,以引发期望的免疫应答,包括提供治疗或预防效应的免疫应答。

[0070] 药学可接受的组合物可施用于受试者的任何适宜位点,例如远离或接近原发性肿瘤的位点。施用途径可为肠胃外,肌内,皮下,真皮内,腹膜内,鼻内,静脉内(包括经内在导管),经传入淋巴管,或通过从肿瘤形成疾病治疗及受试者的病情的观点适宜的任何其他途径。优选地,将以在造成所需反应中有效的一定量及一定时间施用的剂量是引发免疫应答或预防性或治疗性处理肿瘤形成疾病和/或与其相关的症状的剂量。

[0071] 药学可接受的组合物可随后,先于或同时于其他治疗给予,所述其他治疗包括也在所述受试者中引发免疫应答的治疗。例如,受试者可之前或同时通过化学治疗(例如,通过烷化剂例如替莫唑胺),放射治疗,及其他形式的免疫治疗来治疗,所述其他治疗优选以旨在不干扰本发明的组合物的免疫原性的方式提供。

[0072] 施用可由照护者(例如,医师,兽医)选择恰当的时机,及可取决于受试者的临床状况,施用目的,和/或也考虑或施用其他治疗。在一些实施方式中,可施用初始剂量,及监控受试者的免疫学或临床反应,优选两者。免疫学监控的适宜手段包括使用患者的外周血淋巴细胞(PBL)作为反应者,及肿瘤形成细胞作为刺激物。免疫学反应也可通过在施用位点延迟的炎症反应来测定。如适当,初始剂量随后可给予一或多个剂量,一般每月,每半月,或优选每周,直到实现期望效果。然后,可根据需要给予额外的辅助或维持剂量,特别当免疫学或临床益处似乎减退时。

[0073] A. CMV 抗原

[0074] 在一实施方式中,至少一种 CMV 抗原是多肽,或由 CMV 基因编码的其免疫原性片段。如上所述,本文中的术语“CMV”包括任何感染动物(例如哺乳动物,例如人及猴)的病毒株。感染人的 CMV 株一般称为人 CMV (HCMV)。来自 HCMV 的 ORFs 和/或它们的相应多肽可指使用例如, Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 154:125 (1990) 及 Spaete et al., J. General Virology, 74:3287 (1994) 所述的命名法,各均通过引用就它们的所述多肽及它们的命名法的教导并入本文。参考所述来自 CMV 的阅读框及多肽也可指见于不同株的相应序列及位置同源物,包括任何天然存在的 CMV 株中的序列,及对所述株的突变以及间接变体。

[0075] 不同 CMV 株的基因序列以及 ORFs 及编码的多肽为本领域所知,包括,无限制地, HCMV AD169 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC) #VR 538), HCMV Towne (ATCC #VR 977), HCMV Davis (ATCC #VR 807), HCMV Toledo (Quinnan et al, Ann. Intern. Med., 101:478-83 (1984)), 猴 CMV Rh68.1 (ATCC #VR 677), 猴 CMV CSG (ATCC #VR 706), 大鼠 CMV Priscott (ATCC #VR 991), 及小鼠 CMV Smith (ATCC #VR 1399)。作为另一实施例, HCMV AD169 株的基因及多肽序列信息也被 GENBANK 登录号 No. BK000394.2 及 X17403.1 描述,各均通过引用整体并入本文。而且,对应于一种 CMV 株(例如, HCMV AD169 株)的已知的序列信息可用于测定另一 CMV 株的基因及多肽的序列信息。例如,可测定的同源物包括共有共同的进化起源,结构/功能,及编码具有至少约 20%,例如,约 20 到约 100%,约 30 到约 90%,约 40 到约 80%,约 50 到约 70% 序列同一性的氨基酸序列同一性的多肽的产物的基因。同源物可通过本领域中已知的方法,例如使用计算机程序(例如 BLAST)比较彼此的核酸或氨基酸序列,或通过设计为检测预定量的序列之间的错配的在严格条件下杂交来鉴定。而且,可采用基于同源性的序列信息分离及表征特定分离物的序列,例如使用引物及聚合酶链式反应 (PCR)。

[0076] 在一些实施方式中,至少一种 CMV 抗原是由 HCMV 基因或其同源物的开放阅读框 (ORF) 编码的多肽或其免疫原性片段。在一实施方式中,多肽或其免疫原性片段由对应于 GENBANK 登录号 No. BK000394.2 或 X17403.1 所示的 CMV 株的基因编码。

[0077] 在其他实施方式中,至少一种 CMV 抗原对应于选自下列的多肽或其免疫原性片段: 磷蛋白独特长 83 (ppUL83; a/k/a pp65), 糖蛋白 UL55 (gpUL55; a/k/a gB), UL123 立即早期 1 (IE1) 蛋白, UL122IE2 蛋白, UL111A (a/k/a mtrII), US28, ppUL32, ppUL65, ppUL80a, ppUL82, ppUL98a, ppUL99, gpUL4 (a/k/a gp48), gpUL16, gpUL18 (a/k/a MHC), gpUL75 (a/k/a gH), gpUL100, gpUL110 (a/k/a gM), gpUL115 (a/k/a gL), pUL46, pUL48, pUL56, pUL86 (a/k/a MCP), 糖蛋白独特短 10 (gpUS10), gpUS11, 糖蛋白复合物 II (gcII), gp65, 及 gp93。

[0078] 在一实施方式中,至少一种 CMV 抗原包括对应于来自 CMV 的相同抗原或不同抗原的一或多个表位的氨基酸序列。在一些实施方式中,一或多个表位可特征在于局限于或不局限于单个 I 类 MHC 单体型。在其他实施方式中,所述一或多个表位特异于足够数量的 I 类 MHC 分子,以提供覆盖至少约 5% 的一般群,例如,至少约 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 及 100% 的一般群,无关于种族起源或种族。本领域技术人员将容易在一个位置测定需要于使用 HLA 特异性实验提供任何给定群的覆盖的个体 HCMV 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 表位的数。任选地,一或多个表位还显示 HLA 超型特异性和/或包括足以辅助受试者中的 T 辅助细胞功能的一或多个 CD4⁺ 决定簇。

[0079] CMV 表位之例包括但不限于包括如 Trivedi et al., Blood, 105:2793 (2005) 及美国专利申请公开 No. 2005/0019344 所述的氨基酸序列的肽, 各均通过引用就它们的 CMV 表位教导并入本文。在一实施方式中, 所述至少一种 CMV 抗原是多肽, 或其抗原性片段, 包括 SEQ ID NO:1, 2, 或 3 的氨基酸序列。

[0080] 在另一实施方式中, 至少一种抗原包括通过显性 HLA 等位基因限制的一或多个 CMV CTL 表位。例如, 疫苗接种策略可涉及有模拟已知被 CMV- 诱导的 CTL 反应识别的免疫显性的表位的合成的肽制剂的 CD8+T- 细胞库产生, 例如通过混合多个肽, 或者通过使用可融合以构建重组或合成的多表位多肽的最小 CTL 表位。而且, 基于来自潜在的抗原的 CTL 表位的疫苗设计可针对 CMV- 转化的潜在感染的细胞, 以及也用于 CMV- 血清阴性移植物受体, 因为它们增加的针对 CMV 病毒- 诱导的条件的感受性。

[0081] 在其他实施方式中, 至少一种抗原对应于一组肽。在一实施方式中, 所述一组肽包括至少约 8- 聚体氨基酸序列, 例如, 约 8- 聚体到约 30- 聚体, 约 9- 聚体到约 25- 聚体, 约 10- 聚体到约 20- 聚体, 约 11- 聚体到约 18- 聚体, 约 12- 聚体到约 16- 聚体, 及约 13- 聚体到约 15- 聚体, 其中所述肽序列具有至少约 6 个氨基酸重叠, 例如, 约 6 到约 20, 约 7 到约 19, 约 8 到约 18, 约 9 到约 17, 约 10 到约 16, 及约 11 到约 14 个氨基酸重叠, 其中所述一组肽涵盖至少约 10% 的 HCMV 蛋白, 例如, 约 10 到约 100%, 约 20 到约 90%, 约 30 到约 80%, 约 40 到约 70%, 及约 50 到约 60% 的 HCMV 蛋白。

[0082] 在一实施方式中, HCMV 蛋白是 IE-1 蛋白 (例如, HCMV 株 AD169 的 IE-1 蛋白; 见, 例如, Swiss-Prot 登录号 No. P13202, 将其通过引用整体并入本文)。在另一实施方式中, HCMV 蛋白是 pp65 蛋白 (例如, HCMV 株 AD169 的 pp65 蛋白; 见, 例如, Swiss-Prot 登录号 No. P06725, 将其通过引用整体并入本文)。

[0083] 在其他实施方式中, 所述一组肽包括 11 个氨基酸重叠的 15- 聚体氨基酸序列, 覆盖一或多种 HCMV 蛋白的完全或基本上完全序列。一些实施方式中, 一或多种 HCMV 蛋白是 IE-1 蛋白或 pp65 蛋白。例如, 在一些实施方式中, 所述一组肽包括 PepTivator™ CMV pp65 (Miltenyi Biotec, Gladbach, 德国) 或 PepTivator™ CMV IE-1 (Miltenyi Biotec, Gladbach, 德国)。

[0084] 在一些实施方式中, 使用肽表位可使其更容易制备现代优良生产实践 (cGMP) 级的产品。因此, 在一些实施方式中, 本发明提供包括所述一组肽的免疫原性组合物。

[0085] 因此, 一些方面, 本发明提供一或多种免疫学活跃的肽, 及其功能变体, 能引发针对表达 CMV 抗原的细胞的细胞免疫应答。例如, 细胞可特征在于是癌细胞, 癌前细胞, 或易感于发展与 CMV 相关的癌变的细胞- 类型。在一些实施方式中, 肽能引导 CTL 识别及裂解所述细胞。所述免疫学活跃的肽, 结合 I 类 MHC 分子, 可被具有潜在的或活跃的 HCMV 感染的个体的 CTL 识别。

[0086] 所述肽 (例如, 所述一组肽) 可以肽或脂肽疫苗的形式施用, 任选含佐剂。在一些实施方式中, 肽可以细胞疫苗的形式通过已体外处理以在它们的表面呈递所述组的肽的自体或同种异体抗原呈递细胞或树突细胞的施用来施用。在另一实施方式中, T 细胞可从个体除去, 及用所述肽体外处理, 其中所述得到的 CTL 再自体或同种异体输注到受试者。在各种其他实施方式中, 本发明的肽也可以多核苷酸疫苗的形式施用于受试者, 或体外施用于 T 细胞, 其中将一或多种适宜基因转移载体, 例如含在适当的表达调控序列的控制下的编码

所述肽片段的 DNA 的质粒或经加工的病毒载体,施用于受试者或体外施用于 T 细胞。

[0087] 一组肽被例如, Kiecker et al., Hum Immunol. 65 :523-36 (2204) 公开, 将其通过引用就其一组肽及使用一组肽用于刺激 T 细胞的教导并入本文。

[0088] 至少一种 CMV 抗原也可通过本领域中已知的常规实验使用技术测定。例如, 可使用库及表达载体克隆及表征被免疫系统识别的特定 CMV 株的抗原决定簇。例如, 可从 HCMV DNA 的粘粒库产生 DNA 随机片段。可选择各长度 (例如, 约 50 ~ 600bp 长度) 的片段, 及克隆进开放阅读框 (ORF) 表达载体, 以创建代表整个病毒基因组或指定的亚区的 ORF- 库。分离克隆, 及免疫学筛选由偶联于报告子 (例如, 大肠杆菌 β -半乳糖苷酶分子) 的 CMV 序列编码的抗原性肽构成的融合蛋白的合成。动物中产生的抗 -CMV 血清以及人超免疫球蛋白可用于集落筛选。不同组的抗原性融合蛋白可被不同抗血清识别。给出与免疫血清强反应的克隆可定位在 CMV 基因组, 及确定 CMV 插入子序列。可在小鼠或兔中产生针对融合蛋白的抗体, 以鉴定相应的 CMV 蛋白。

[0089] 在其他实施方式中, 至少一种 CMV 抗原还包括一或多种信号序列, 例如, 但不限于, gp96 内质网靶向肽信号序列, LAMP-1 溶酶体的靶向肽信号序列等。信号序列可增强 I 类和 II 类 MCH 抗原加工及呈递, 以及提供其他靶向性质。在其他实施方式中, 至少一种 CMV 抗原可缀合到载质蛋白 (例如, 匙孔青贝血蓝蛋白 (KLH), 或通过核酸编码序列的重组合成为融合蛋白。

[0090] 如下进一步阐释, 药学可接受的组合物可包括至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸。

[0091] A. 核酸

[0092] 一般而言, 受试者可用包括核酸的药学可接受的组合物通过任何肠胃外途径接种。例如, 受试者可通过静脉内, 腹膜内, 真皮内, 皮下, 吸入, 或肌肉途径接种, 或通过使用基因枪粒子轰击。优选地, 肌肉组织可为用于递送及表达多核苷酸的位点。一剂量的多核苷酸可通过多个和 / 或重复的注射施用进肌肉, 例如, 以长时间延长施用。因此, 肌肉细胞可用编码至少一种 CMV 抗原的多核苷酸注射, 及表达的抗原可在主要组织相容性复合物的抗原的环境中被肌肉细胞呈递, 以引发针对至少一种 CMV 抗原的免疫应答。

[0093] 表皮可为用于递送及表达多核苷酸的另一有用的位点, 例如通过直接注射或粒子轰击。一剂量的多核苷酸可施用于表皮, 例如通过多个注射或轰击, 以长时间延长施用。例如, 皮肤细胞可用编码至少一种 CMV 抗原的多核苷酸注射, 及表达的抗原可在主要组织相容性复合物的抗原的环境中被皮肤细胞呈递, 以引发针对至少一种 CMV 抗原的免疫应答。

[0094] 受试者也可通过粘膜途径接种。多核苷酸可通过各种方法, 包括含多核苷酸的鼻 - 滴液, 吸入剂, 栓剂, 微球 - 包裹的多核苷酸, 或通过用多核苷酸 - 包被的金粒子轰击来施用于粘膜表面。例如, 可将编码至少一种 CMV 抗原的核酸施用于呼吸系统粘膜表面。

[0095] 任何适当的生理相容的培养基, 例如注射用盐水, 或用于粒子轰击的金粒子适宜于将多核苷酸导入受试者。

[0096] 1. RNA

[0097] 在一些实施方式中, 药学可接受的组合物包括编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸, 其中所述核酸是 RNA。RNAs 包括可翻译的 RNA 模板, 以引导提供至少一种 CMV 抗原的氨基酸链的细胞内合成。编码至少一种 CMV 抗原的 RNAs 也可体外转录, 例如, 反转录, 以产生

cDNAs,其可然后通过 PCR 扩增,如果需要,及随后体外转录,有或无克隆 cDNA。本领域技术人员可用许多方法制备编码至少一种 CMV 抗原的 RNAs。因此,例如,常规体外转录技术及细菌聚合酶可用于产生体外转录的 RNAs,或体外转录的 RNAs 可从编码至少一种 CMV 抗原的克隆的 DNA 序列合成。

[0098] 2. DNA

[0099] 在另一实施方式中,编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸包括具有编码至少一种 CMV 抗原的开放阅读框的 DNAs。例如,包括具有编码至少一种 CMV 抗原的 DNA 开放阅读框的表达载体的药学可接受的组合物可施用于受试者。

[0100] 包括编码至少一种 CMV 抗原的开放阅读框的基因组 DNA 片段和 / 或 cDNAs 可用于本发明的方法。cDNAs 可从上述编码至少一种 CMV 抗原的 RNAs,使用本领域技术人员已知的技术制备。如果需要, DNA 可片段化,例如通过物理片段化,或优选地,通过酶促切割,即使用限制性内切酶。片段化方法为本领域技术人员熟知,及可变化(例如,通过使用不同限制性内切酶或组合及消化时间)以获得在尺寸及组成方面不同的片段。具有编码至少一种 CMV 抗原的开放阅读框的 DNAs 或其片段可通过本领域中已知的方法及试剂克隆进表达载体。

[0101] 可采用标准克隆载体,其具有可选择的标记物(例如,氨苄西林)及,优选复制原点(例如,ori)及适宜启动子。然后可用载体转化细菌(例如,大肠杆菌)或其他适宜宿主,及通过标准方法培养转化体,及通过所述如层析或有机分离的方法分离质粒 DNA。例如,质粒可用于克隆进一个位点,其可将由开放阅读框表达的至少一种 CMV 抗原引导至 MHC I 或 II。用于引发免疫应答的表达载体及使用所述表达载体的方法描述于美国专利申请公开 No. 20040241140,将其就其用于引发免疫应答的表达载体及使用所述表达载体的方法的教导并入本文。

[0102] 当被细胞(例如,肌肉细胞,抗原呈递细胞(APC)例如树突细胞,巨噬细胞等)摄取时, DNA 分子可存在于细胞内,作为染色体外分子和 / 或可整合进染色体。DNA 可以可保持作为分离的遗传物质的质粒的形式导入细胞。或者,可将可整合进染色体的线性 DNAs 导入细胞。任选地,当将 DNA 导入细胞,可加入促进 DNA 整合进染色体的试剂。

[0103] 因此,优选 DNAs 包括必要于表达开放阅读框的调控元件。所述元件可包括,例如,启动子,起始密码子,终止密码子,及多聚腺苷酸化信号。此外,可包括增强子。如本领域技术人员所知,这些元件优选运作性连接到编码至少一种 CMV 抗原的序列。优选选择在待被施用的受试者物种中运作的调控元件。优选包括与编码序列在同一框内的起始密码子及终止密码子。

[0104] 启动子之例包括但不限于来自下列的启动子:猿猴病毒 40(SV40),小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子,人免疫缺陷病毒(HIV),例如 HIV 长末端重复(LTR)启动子,莫洛尼病毒,巨细胞病毒(CMV),例如 CMV 立即早期启动子,爱泼斯坦巴尔病毒(EBV),劳斯肉瘤病毒(RSV),以及来自人基因(例如人肌动蛋白,人肌球蛋白,人血红蛋白,人肌肉肌酸,及人金属硫蛋白)的启动子。适宜多聚腺苷酸化信号之例包括但不限于 SV40 多聚腺苷酸化信号及 LTR 多聚腺苷酸化信号。

[0105] 除了 DNA 表达需要的调控元件之外,其他元件还可包括在 DNA 分子内。所述额外的元件包括增强子。增强子包括上文所述的启动子。优选的增强子 / 启动子包括,例如,人

肌动蛋白,人肌球蛋白,人血红蛋白,人肌肉肌酸及病毒增强子,例如来自 CMV,RSV 及 EBV 的那些。

[0106] 任选地,DNAs 可运作性合入载质或递送载体。有用的递送载体包括但不限于:可生物降解的微胶囊,免疫刺激复合物 (ISCOMs) 或脂质体,及遗传加工的衰减的活载质,例如病毒或细菌。

[0107] 在一些实施方式中,载体是病毒载体,例如:慢病毒,反转录病毒,疱疹病毒,腺病毒,腺伴随病毒,痘苗病毒,杆状病毒,鸡痘病毒,AV-痘病毒,修饰的安卡拉痘病毒 (MVA) 及其他重组病毒。例如,痘苗病毒载体可用于感染树突细胞。

[0108] 因此,编码至少一种 CMV 抗原或其免疫原性片段的载体可使用病毒载体或通过直接导入 DNA 体内,离体,或体外导入。靶向的组织中的表达可通过靶向转基因载体到特异性细胞来实现,例如用病毒载体或受体配体,或通过使用组织-特异性启动子,或两者。

[0109] 病毒载体通常用于体内或离体靶向,及疫苗接种过程是基于 DNA 的载体及反转录病毒载体。构建及使用病毒载体的方法为本领域所知(见,例如,Miller and Rosman, BioTechniques, 7:980-990,1992)。优选地,病毒载体是复制缺陷型,即,它们不能在靶细胞内自主复制。优选地,复制缺陷型病毒是最小病毒,即,其仅保持其必要于壳体化基因组来产生病毒粒子的基因组的序列。

[0110] DNA 病毒载体包括衰减的或缺陷型 DNA 病毒,例如但不限于:单纯疱疹病毒 (HSV),乳头瘤病毒,爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV),腺病毒,腺伴随病毒 (AAV),痘苗病毒等。特定载体之例包括但不限于:缺陷型疱疹病毒 1 (HSV1) 载体 (Kaplitt, et al., Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330,1991; 国际专利公开 No. WO 94/21807,1994 年 9 月 29 日公开; 国际专利公开 No. WO 92/05263,1994 年 4 月 2 日公开); 衰减的腺病毒载体,例如由 Stratford-Perricaudet 等人 (J. Clin. Invest. 90:626-630,1992; 也见 La Salle, et al., Science 259:988-990,1993) 描述的载体; 及缺陷型腺伴随病毒载体 (Samulski, et al., J. Virol. 61:3096-3101,1987; Samulski, et al., J. Virol. 63:3822-3828,1989; Lebkowski, et al., Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996,1988)。病毒载体也可商购。

[0111] 任选地,DNAs 也可用提高细胞摄取遗传物质的试剂提供。例如,DNA 可用摄取辅助剂配制,或连同摄取辅助剂施用,所述摄取辅助剂选自:苯甲酸酯类,酰苯胺类,脘类,及氨基甲酸乙酯类。

[0112] B. 树突细胞

[0113] 本领域技术人员将认可,体外产生树突细胞 (DCs) 的能力也可根据本发明用于用至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸离体装载 DCs,及施用 DC 疫苗作为引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的策略。临床前研究显示 DCs 是 B 及 T 淋巴细胞中新及回忆应答的有效活化子。

[0114] 在一些实施方式中,本发明提供在受试者中引发针对表达 CMV 的细胞的免疫应答的方法,所述方法包括给所述受试者施用药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括用至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸离体装载的树突细胞,其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述细胞的免疫应答。

[0115] 因此,本发明的 CMV 抗原-激发的抗原呈递细胞及用这些抗原呈递细胞产生的 CMV 抗原-特异性 T 淋巴细胞可用于预防性或治疗性应用的免疫调节组合物中的活性化合

物。如下述,在一些实施方式中,本发明的抗原-激发的抗原呈递细胞可用于产生用于过继转移给受试者的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) (例如, CD8+ 或 CD4+CTL)。

[0116] C. 组合物

[0117] 其他方面,本发明提供药学可接受的组合物,所述药学可接受的组合物包括至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸。所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。本发明的药学可接受的组合物可作为用于预防性或治疗性处理所述受试者中肿瘤形成疾病或其症状,特别用于预防或治疗 CMV- 相关的癌 (例如,肿瘤) 的疫苗组合物有用。

[0118] 在一些实施方式中,药学可接受的组合物还包括生理学可接受的载质,稀释剂,或赋形剂。配制及施用技术也可见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版。

[0119] 本领域中已知的药学可接受载质包括但不限于,无菌水,盐水,葡萄糖,右旋糖,或缓冲溶液。试剂,例如稀释剂,稳定剂 (例如,糖类及氨基酸),防腐剂,润湿剂,乳化剂, pH 缓冲剂,增强粘度的添加剂等。优选地,培养基或载质将产生最小或无不利效果。

[0120] 在其他实施方式中,药学可接受的组合物还包括生理学可接受的佐剂。优选地,采用的佐剂提供增加的免疫原性。佐剂可为提供抗原的缓慢释放的试剂 (例如,佐剂可为脂质体),或其可为在其所在处有免疫原性,由此与抗原协同发挥作用的佐剂。例如,佐剂可为已知的佐剂或促进核酸摄取,募集免疫系统细胞到施用位点,或辅助应答淋巴样细胞的免疫活化的其他物质。佐剂包括但不限于,免疫调节分子 (例如,细胞因子),油及水乳液,氢氧化铝,葡聚糖,葡聚糖硫酸酯,氧化铁,藻酸钠,细菌-佐剂,合成的聚合物,例如聚氨基酸及氨基酸共聚物,皂苷,石蜡油,及胞壁酰二肽。

[0121] 在一实施方式中,佐剂是免疫调节分子。例如,免疫调节分子可为重组蛋白细胞因子,趋化因子,或免疫刺激剂或编码细胞因子的核酸,趋化因子,或设计为的增强免疫应答的免疫刺激剂。

[0122] 免疫调节细胞因子之例包括:干扰素类 (例如, IFN α , IFN β 及 IFN γ), 白细胞介素类 (例如, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 及 IL-20), 肿瘤坏死因子类 (例如, TNF α 及 TNF β), 红细胞生成素 (EPO), FLT-3 配体, gIp10, TCA-3, MCP-1, MIF, MIP-1 α , MIP-1 β , Rantes, 巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF), 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF), 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 以及前述之任何的功能片段。任何结合趋化因子受体的免疫调节趋化因子,即, CXC, CC, C, 或 CX3C 趋化因子受体,也可使用在本发明中。趋化因子之例包括但不限于, Mip1 α , Mip-1 β , Mip-3 α (Larc), Mip-3 β , Rantes, Hcc-1, Mipif-1, Mipif-2, Mcp-1, Mcp-2, Mcp-3, Mcp-4, Mcp-5, 嗜酸性粒细胞趋化因子, Tarc, Elc, I309, IL-8, Gcp-2Gro- α , Gro- β , Gro- γ , Nap-2, Ena-78, Gcp-2, Ip-10, Mig, I-Tac, Sdf-1, 及 Bca-1 (B1c), 以及前述之任何的功能片段。

[0123] 在另一实施方式中,佐剂是选自下列的细胞因子:GM-CSF, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, TNF- α , 及 M-CSF。在一些实施方式中,佐剂包括弗氏不完全佐剂 (Montanide ISA 51) 或粒状棒状杆菌 P40。

[0124] 本领域技术人员将认同,这些之一些佐剂不可从载体表达,所述情况中,佐剂,当使用时,可同时或依次,以任何顺序施用。

[0125] 本领域技术人员知道,本发明的方法及组合物可用作部分联合治疗,例如方法和/或组合物包括一或多种其他试剂,例如,但不限于,化学治疗剂,免疫治疗剂,免疫调节剂,抗-血管生成剂,抗-病毒试剂,及激素试剂。

[0126] 抗-病毒试剂之例包括但不限于,更昔洛韦(例如,**CYTOVENE®**),缙更昔洛韦(例如,**Valcyte®**),膦甲酸(例如,**FOSCAVIR®**),西多福韦(例如,**VISTIDE®**,HPMPC),阿德福韦(例如,PMEA,**PREVEON®**,**HEPSERA®**),阿昔洛韦(例如,**ZOVIRAX®**),伐昔洛韦(例如,VALTrex™,ZELITREX™),多聚阴离子,及蛋白激酶C抑制剂(例如,双-咪唑基马来酰亚胺)。在一实施方式中,与本发明的组合物及方法联合采用的抗-病毒试剂是更昔洛韦,缙更昔洛韦,西多福韦,或膦甲酸。

[0127] 在其他实施方式中,一或多种其他试剂实现CMV抗原表达,优选通过增强CMV抗原表达,优选通过增强潜在感染的细胞中(优选在神经胶质瘤细胞中)的CMV抗原表达。在一实施方式中,一或多种试剂选自:视黄酸(RA),阿仑珠单抗(CamPATH-1H),及免疫抑制剂(例如,环磷酰胺,环孢菌素)。在另一实施方式中,照射和/或免疫耗竭与本发明的组合物及方法组合提供。

[0128] 在各种实施方式中,一或多种其他试剂可为化学治疗剂,天然存在的或合成的,例如,如“Cancer Chemotherapeutic Agents”,American Chemical Society,1995, W. O. Foye Ed. 中所述。

[0129] 在一实施方式中,化学治疗剂选自小分子受体拮抗剂,例如:瓦他拉尼, SU 11248 或 AZD-6474, EGFR 或 HER2 拮抗剂,例如吉非替尼,厄洛替尼, CI-1033 或赫赛汀,抗体例如贝伐珠单抗,西妥昔单抗,利妥昔单抗, DNA 烷化药物,例如顺铂,奥沙利铂或卡铂,蒽环类抗生素例如多柔比星或表柔比星,抗代谢剂,例如 5-FU,培美曲塞,吉西他滨或卡培他滨,喜树碱,例如伊立替康或托泊替康,抗-癌药物,例如紫杉醇或多西他赛,表鬼臼毒素,例如依托泊苷或替尼泊苷,蛋白酶体抑制剂,例如硼替佐米或抗-炎症药物,例如塞来考昔或罗非考昔,任选以药学可接受的盐的形式,以水合物和/或溶剂化物的形式及任选以个体旋光异构体,个体对映异构体或其外消旋体的混合物的形式。

[0130] 在另一实施方式中,化学治疗剂选自小分子 VEGF 受体拮抗剂,例如瓦他拉尼(PTK-787/ZK222584), SU-5416, SU-6668, SU-11248, SU-14813, AZD-6474, AZD-2171, CP-547632, CEP-7055, AG-013736, IM-842 或 GW-786034, 双 EGFR/HER2 拮抗剂,例如吉非替尼,厄洛替尼, CI-1033 或 GW-2016, EGFR 拮抗剂,例如易瑞沙(ZD-1839),塔西法(OSI-774), PKI-166, EKB-569, HKI-272 或赫赛汀,促细胞分裂原-活化的蛋白激酶的拮抗剂,例如 BAY-43-9006 或 BAY-57-9006, 喹唑啉衍生物,例如 4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-6-[[4-(N,N-二甲基氨基)-1-氧代-2-丁-烯-1-基]氨基]-7-(-四氢呋喃-3-基氧基)喹唑啉或 4-[(3-氯-4-氟-苯基)氨基]-6-[[4-(均吗啉-4-基)-1-氧代-2-丁-烯-1-基]氨基]-7-[-(四氢呋喃-3-基)氧基]-喹唑啉,或其药学可接受的盐,蛋白激酶受体拮抗剂,其分类于合成的小分子,例如阿曲生坦,利妥昔单抗,西妥昔单抗, Avastin™(贝伐珠单抗), IMC-1C11, 爱必妥(C-225), DC-101, EMD-72000, vitaxin, 伊马替尼, 蛋白酪氨酸激酶抑制剂,其为融合蛋白,例如 VEGFtrap, 烷化剂或铂化合物,例如美法仑,环磷酰胺,氧氮磷环类,顺铂,卡铂,奥沙利铂,沙铂,四铂,异丙铂,丝裂霉素,链佐星,卡莫司汀(BCNU),洛莫司汀(CCNU),白消安,异环磷酰胺,链佐星,塞替派,苯丁酸氮芥,氮芥,例如氮芥,乙烯亚

胺化合物, 烷基磺酸盐, 柔红霉素, 多柔比星 (阿霉素), 多柔比星脂质体 (doxil), 表柔比星, 伊达比星, 米托蒽醌, 安吡啶, 更生霉素, 偏端霉素或其衍生物, 纺锤菌素, pibenzimol, 丝裂霉素, CC-1065, 多卡米星, 普卡霉素, 色霉素, 橄榄霉素, 酞酰苯胺, 例如普罗帕胺或茛菪胺, 安曲霉素, 吡丙啶, 亚硝基脲或其衍生物, 嘧啶或嘌呤类似物或拮抗剂, 或核苷二磷酸还原酶的抑制剂, 例如阿糖胞苷, 5-氟尿嘧啶 (5-FU), 培美曲塞, 替加氟 / 尿嘧啶, 乌拉莫司汀, 氟达拉滨, 吉西他滨, 卡培他滨, 疏嘌呤, 克拉屈滨, 硫鸟嘌呤, 甲氨喋呤, 喷司他丁, 羟基脲, 或叶酸, 腐草霉素, 博来霉素或其衍生物或盐, CHPP, BZPP, MTPP, BAPP, 似博霉素 (liblomycin), 吡啶或其衍生物, 利福霉素, 放线菌素, 甲烯土霉素, 喜树碱, 例如伊立替康 (camptosar) 或托泊替康, 安吡啶或其类似物, 三环甲酰胺, 组蛋白脱乙酰基酶抑制剂, 例如 SAHA, MD-275, 曲古抑菌素 A, CBHA, LAQ824, 或丙戊酸, 来自植物的抗 - 癌药物, 例如紫杉醇 (泰素), 多西他赛或泰素帝, 长春花生物碱, 例如诺维本, 长春碱, 长春新碱, 长春地辛或长春瑞滨, 环庚三烯酚酮生物碱, 例如秋水仙碱或其衍生物, 大环内酯, 例如美坦辛, 安丝菌素或根霉素, 抗有丝分裂肽, 例如拟茎点霉毒素或多拉司他汀, 表鬼臼毒素或鬼臼毒素的衍生物, 例如依托泊苷或替尼泊苷, 斯的甘辛, 抗有丝分裂氨基甲酸酯衍生物, 例如考布他汀或 amphetinile, 丙卡巴肼, 蛋白酶体抑制剂, 例如硼替佐米, 酶, 例如天冬酰胺酶, 聚乙二醇化的天冬酰胺酶 (培天冬酶) 或胸苷 - 磷酸化酶抑制剂, 孕激素或雌激素, 例如雌莫司汀 (T-66) 或甲地孕酮, 抗 - 雄激素, 例如氟他胺, 康士得, 尼鲁米特或环丙孕酮乙酸盐, 芳香酶抑制剂, 例如氨鲁米特, 阿那曲唑, 福美坦或来曲唑, GnRH 类似物, 例如亮丙瑞林, 布舍瑞林, 戈舍瑞林或曲普瑞林, 抗 - 雌激素, 例如他莫昔芬或其柠檬酸盐, 屈洛昔芬, 曲沃昔芬, 雷洛昔芬或秦咪昔芬, 17 β - 雌二醇的衍生物, 例如 ICI 164,384 或 ICI 182,780, 氨鲁米特, 福美坦, 法倔唑, 非那雄胺, 酮康唑, LH-RH 拮抗剂, 例如亮丙立德, 甾类, 例如泼尼松, 泼尼松龙, 甲泼尼龙, 地塞米松, 布替耐德, 氟可龙或曲安西龙, 干扰素例如干扰素 β , 白细胞介素例如 IL-10 或 IL-12, 抗 - TNF α 抗体例如依那西普, 免疫调节药物, 例如沙利度胺, 其 R- 及 S- 对映异构体及其衍生物, 或 revimid (CC-5013), 白三烯拮抗药, 丝裂霉素 C, aziridoquinone, 例如 BMY-42355, AZQ 或 EO-9, 2- 硝基咪唑, 例如米索硝唑, NLP-1 或 NLA-1, 硝基吡啶, 硝基喹啉, 硝基吡啶咪唑啉, " 双官能 " 硝基芳族, 例如 RSU-1069 或 RB-6145, CB-1954, 氮芥的 N- 氧化物, 例如氧氮芥, 氮芥的金属络合物, 抗 - CD3 或抗 - CD25 抗体, 耐受性诱导试剂, 双磷酸或其衍生物, 例如米诺膦酸或其衍生物 (YM-529, Ono-5920, YH-529), 唑来膦酸一水合物, 伊班膦酸钠水合物或氯膦酸二钠, 硝基咪唑, 例如甲硝唑, 米索硝唑, 苄硝唑或尼莫唑, 硝基芳基化合物, 例如 RSU-1069, 硝酰基或 N- 氧化物, 例如 SR-4233, 卤化嘧啶类似物, 例如溴脱氧尿苷, 碘脱氧尿苷, 硫代磷酸酯, 例如 WR-2721, 光 - 化学活化的药物, 例如卟菲尔钠, 光敏素, 苯并卟啉衍生物, 脱镁叶绿甲酯酸衍生物, 部花青 540 (MC-540) 或锡 etioporphyrin, 反模板或反义 RNA 或 DNA, 例如奥利美生, 非甾族炎症药物, 例如乙酰水杨酸, 美沙拉秦, 布洛芬, 萘普生, 氟比洛芬, 非诺洛芬, 芬布芬, 酮洛芬, 吲哚洛芬, 吡洛芬, 卡洛芬, 奥沙普秦, 普拉洛芬, 咪洛芬, 硫噻洛芬, 舒洛芬, 阿明洛芬, 噻洛芬酸, 氟洛芬, 吲哚美辛, 舒林酸, 托美丁, 佐美酸, 萘丁美酮, 双氯芬酸, 芬氯酸, 阿氯芬酸, 溴芬酸, 异丁芬酸, 醋氯芬酸, 阿西美辛, 芬替酸, 环氯茛酸, 依托度酸, 奥昔平酸, 甲芬那酸, 甲氯芬那酸, 氟芬那酸, 尼氟酸, 托芬那酸, 二氟尼柳, 氟苯柳, 吡罗昔康, 替诺昔康, 氯诺昔康, 尼美舒利, 美洛昔康, 塞来考昔, 罗非考昔, 或非甾族炎症药物的药学可接受的盐, 细

胞毒性抗生素,靶向癌细胞表面分子的抗体,例如 apolizumab 或 1D09C3,金属硫蛋白酶抑制剂,例如 TIMP-1 或 TIMP-2,锌,癌基因抑制剂,例如 P53 及 Rb,稀土元素络合物,例如镧系元素的杂环络合物,光-化学治疗剂,例如 PUVA,转录因子复合物抑制剂 ESX/DRIP130/Sur-2,HER-2 表达抑制剂,例如热激蛋白 HSP90 调节剂格尔德霉素及其衍生物 17-烯丙基氨基格尔德霉素或 17-AAG,或治疗剂,选自:IM-842,四硫钼酸盐,角鲨胺,combrestatin A4, TNF-470,马立司他,新伐司他,比卡鲁胺,阿巴瑞克,oregovomab,米妥莫单抗,TLK-286,阿仑珠单抗,替伊莫单抗,替莫唑胺,地尼白介素 2,阿地白介素,达卡巴嗪,氟尿苷,普卡霉素,米托坦,哌泊溴烷,普卡霉素,他莫昔芬及甾内酯。优选的化合物包括小分子 VEGF 受体拮抗剂,例如瓦他拉尼 (PTK-787/ZK222584),SU-5416, SU-6668, SU-11248, SU-14813, AZD-6474, EGFR/HER2 拮抗剂,例如 CI-1033 或 GW-2016, EGFR 拮抗剂,例如易瑞沙 (吉非替尼, ZD-1839),塔西法 (厄洛替尼, OSI-774), PKI-166, EKB-569, HKI-272 或赫赛汀,促细胞分裂原-活化的蛋白激酶拮抗剂,例如 BAY-43-9006 或 BAY-57-9006,阿曲生坦,利妥昔单抗,西妥昔单抗,阿瓦斯丁.TM. (贝伐珠单抗), IMC-1C11,爱必妥 (C-225), DC-101, EMD-72000, vitaxin,伊马替尼,烷化剂或铂化合物,例如美法仑,环磷酰胺,顺铂,卡铂,奥沙利铂,沙铂,柔红霉素,多柔比星 (阿霉素),多柔比星脂质体 (doxil),表柔比星,伊达比星,嘧啶或嘌呤类似物或拮抗剂或核苷二磷酸还原酶抑制剂,例如阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶 (5-FU),培美曲塞,替加氟/尿嘧啶,吉西他滨,卡培他滨,疏嘌呤,甲氨喋呤,抗-癌药物,例如紫杉醇 (泰素) 或多西他赛,长春花生物碱,例如诺维本,长春碱,长春新碱,长春地辛或长春瑞滨,抗有丝分裂肽,例如多拉司他汀,表鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物,例如依托泊苷或替尼泊苷,甾族炎症药物,例如美洛昔康,塞来考昔,罗非考昔,靶向癌细胞表面分子的抗体,例如 apolizumab 或 1D09C3 或热激蛋白 HSP90 调节剂格尔德霉素及其衍生物 17-烯丙基氨基格尔德霉素或 17-AAG。

[0131] 在另一实施方式中,化学治疗剂选自与下列物质相互作用或结合下列物质的化合物:微管蛋白,合成的小分子 VEGF 受体拮抗剂,小分子生长因子受体拮抗剂,EGF 受体和/或 VEGF 受体和/或整联蛋白受体或任何其他分类于合成的小分子的蛋白酪氨酸激酶受体抑制剂,针对 EGF 受体和/或 VEGF 受体和/或整联蛋白受体或任何其他蛋白酪氨酸激酶受体的抑制剂 (其为融合蛋白),与核酸相互作用及分类为烷化剂或铂化合物的化合物,与核酸相互作用及分类为蒽环类抗生素的化合物, DNA 嵌入剂或作为 DNA 交联剂,包括 DNA 小沟结合化合物,抗代谢药,天然存在的,半-合成的或合成的博来霉素类型抗生素, DNA 转录酶抑制剂,及尤其是拓扑异构酶 I 或拓扑异构酶 II 抑制剂,染色质修饰剂,有丝分裂抑制剂,抗有丝分裂剂,细胞周期抑制剂,蛋白酶体抑制剂,酶,激素类,激素拮抗剂,激素抑制剂,甾族生物合成抑制剂,甾族,细胞因子,缺氧-选择性细胞毒素,细胞因子抑制剂,淋巴因子,针对细胞因子的抗体,口服及肠胃外耐受性诱导试剂,支持剂,化学辐射敏化剂及保护剂,光-化学活化的药物,合成的多核苷酸或寡核苷酸,任选修饰的或缀合的,非甾族抗-炎症药物,细胞毒性抗生素,靶向癌细胞表面分子的抗体,靶向生长因子类或它们的受体的抗体,金属硫蛋白酶抑制剂,金属,癌基因抑制剂,基因转录或 RNA 翻译或蛋白表达抑制剂,稀土元素络合物,及光-化学治疗剂。

[0132] 在其他实施方式中,化学治疗剂选自:紫杉醇 (泰素),多西他赛,长春花生物碱,例如诺维本,长春碱,长春新碱,长春地辛或长春瑞滨,烷化剂或铂化合物,例如美法

仑,环磷酰胺,氧氮磷环类,顺铂,卡铂,奥沙利铂,沙铂,四铂,异丙铂,丝裂霉素,链佐星,卡莫司汀(BCNU),洛莫司汀(CCNU),白消安,异环磷酰胺,链佐星,塞替派,苯丁酸氮芥,氮芥,例如氮芥,免疫调节药物,例如沙利度胺,其R-及S-对映异构体及其衍生物,或revimid(CC-5013)),乙烯亚胺化合物,烷基磺酸盐,柔红霉素,多柔比星(阿霉素),多柔比星脂质体(doxil),表柔比星,伊达比星,米托蒽醌,安吡啶,更生霉素,偏端霉素或其衍生物,纺锤菌素,pibenzimol,丝裂霉素,CC-1065,多卡米星,普卡霉素,色霉素,橄榄霉素,酞酰苯胺,例如普罗帕胺或苈胺,安曲霉素,吡丙啶,亚硝基脲或其衍生物,嘧啶或嘌呤类似物或拮抗剂或核苷二磷酸还原酶抑制剂,例如阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶(5-FU),乌拉莫司汀,氟达拉滨,吉西他滨,卡培他滨,巯嘌呤,克拉屈滨,硫鸟嘌呤,甲氨喋呤,喷司他丁,羟基脲,或叶酸,吡啶或其衍生物,利福霉素,放线菌素,甲烯土霉素,喜树碱,例如伊立替康(camptosar)或托泊替康,安吡啶或其类似物,三环甲酰胺,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,例如SAHA,MD-275,曲古抑菌素A,CBHA,LAQ824,或丙戊酸,蛋白酶体抑制剂,例如硼替佐米,小分子VEGF受体拮抗剂,例如瓦他拉尼(PTK-787/ZK222584),SU-5416,SU-6668,SU-11248,SU-14813,AZD-6474,AZD-2171,CP-547632,CEP-7055,AG-013736,IM-842或GW-786034,促细胞分裂原-活化的蛋白激酶拮抗剂,例如BAY-43-9006或BAY-57-9006,双EGFR/HER2拮抗剂,例如吉非替尼,厄洛替尼,CI-1033或GW-2016,EGFR拮抗剂,例如易瑞沙(ZD-1839),塔西法(OSI-774),PKI-166,EKB-569,HKI-272或赫赛汀,喹唑啉衍生物例如4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-6-[-[4-(N,N-二甲基氨基)-1-氧代-2-丁-烯-1-基]氨基]-7-(-四氢呋喃-3-基氧基)-喹唑啉或4-[(3-氯-4-氟-苯基)氨基]-6-[-[4-(均吗啉-4-基)-1-氧代-2-丁-烯-1-基]氨基]-7-[-(四氢呋喃-3-基)氧基]-喹唑啉,或其药学可接受的盐,转录因子复合物抑制剂ESX/DRIP130/Sur-2,HER-2表达抑制剂,例如热激蛋白HSP90调节剂格尔德霉素及其衍生物17-烯丙基氨基格尔德霉素或17-AAG,分类于合成的小分子的蛋白激酶受体拮抗剂,例如阿曲生坦,利妥昔单抗,西妥昔单抗,阿瓦斯丁.TM.(贝伐珠单抗),IMC-1C11,爱必妥(C-225),DC-101,EMD-72000,vitaxin,伊马替尼,及靶向癌细胞表面分子的抗体,例如apalizumab或1D09C3。

[0133] 在一些其他实施方式中,化学治疗剂是降低由一或多种ABC转运子介导的透明质酸糖胺多糖转运的化合物,或药物转运抑制剂,例如:P-糖蛋白(P-gp)抑制剂分子或抑制剂肽,MRP1抑制剂,针对及能封闭ABC转运子的抗体,针对一或多种ABC转运子的反义寡聚体,iRNA,siRNA或适体。根据本发明的P-糖蛋白(P-gp)抑制剂分子之例是zosuquidar(LY 335973),其盐(尤其是三氯化盐)及其同质多象变体,环孢菌素A(也被称为环孢菌素),维拉帕米或其R-异构体,他莫昔芬,奎尼丁,d-a生育酚聚乙二醇1000琥珀酸盐,VX-710,PSC833,吩噻嗪,GF120918(II),SDZ PSC 833,TMBY,MS-073,S-9788,SDZ 280-446,XR(9051)及这些的功能性衍生物,类似物及异构体。

[0134] D. 过继免疫治疗

[0135] 其他方面,至少一种CMV抗原,或编码所述至少一种CMV抗原的核酸,也可提供用于组合物及的方法提供CMV抗原-激发的,抗原呈递细胞,和/或用这些抗原呈递细胞产生的CMV抗原-特异性T淋巴细胞,例如,用作针对表达CMV抗原的细胞的预防性或治疗性应用的免疫调节组合物及方法的活性化合物。

[0136] 因此,一方面,本发明提供制备CMV抗原-激发的,抗原呈递细胞的方法,通过:

[0137] 在对于至少一种 CMV 抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下,使抗原呈递细胞与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触。所述至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸如上所述。

[0138] 至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,可与同质的,基本上同质的,或异质的包括抗原呈递细胞的组合物接触。例如,组合物可包括但不限于全血,新鲜血,或其级分,例如,但不限于,外周血单核细胞,全血的血沉棕黄层级分,红细胞压积,照射的血,树突细胞,单核细胞,巨噬细胞,嗜中性粒细胞,淋巴细胞,天然杀伤细胞,及天然杀伤 T 细胞。如果,任选地,使用抗原呈递细胞前体,可在足以使前体分化成抗原呈递细胞的适宜培养条件下培养所述前体。优选地,抗原呈递细胞(或,任选地,前体)选自单核细胞,巨噬细胞,骨髓细胞系, B 细胞,树突细胞,或郎格尔汉斯细胞。

[0139] 待与抗原呈递细胞接触的至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸的量可由本领域技术人员通过常规实验测定。一般而言,抗原呈递细胞与至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸接触对于细胞而言足够的一定时间,以呈递用于 T 细胞调节的经加工形式的抗原。在一实施方式中,抗原呈递细胞在至少一种 CMV 抗原,或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸的存在下温育小于约一周,例如,约 1 分钟到约 48 小时,约 2 分钟到约 36 小时,约 3 分钟到约 24 小时,约 4 分钟到约 12 小时,约 6 分钟到约 8 小时,约 8 分钟到约 6 小时,约 10 分钟到约 5 小时,约 15 分钟到约 4 小时,约 20 分钟到约 3 小时,约 30 分钟到约 2 小时,及约 40 分钟到约 1 小时。必要于抗原呈递细胞加工及呈递抗原的抗原或编码所述抗原的核酸的时间及量可,例如使用脉冲示踪法测定,其中接触之后是清洗期,及暴露于读取系统,例如,抗原反应性 T 细胞。

[0140] 一般而言,必要于抗原呈递细胞在其表面呈递抗原的时间长度可取决于许多因素变化,包括采用的抗原或抗原形式(例如,肽对比编码多核苷酸),其剂量,及采用的抗原呈递细胞,以及进行抗原装载的条件。这些参数可由本领域技术人员使用常规过程测定。抗原呈递细胞激发效率可通过体外测定 T 细胞细胞毒性活性,或使用抗原呈递细胞作为 CTLs 靶来测定。本发明也考虑其他可检测抗原呈递细胞表面有抗原的方法。

[0141] 已知许多将抗原递送到抗原呈递细胞的内源性加工通路的方法。所述方法包括但不限于涉及 pH- 敏感脂质体,将抗原偶联于有力的佐剂,凋亡细胞递送,将细胞脉冲到树突细胞,将包括抗原的重组嵌合病毒-样粒子(VLPs)递送到树突细胞系的 I 类 MHC 加工通路的方法。

[0142] 在一实施方式中,溶解的 CMV 抗原与抗原呈递细胞温育。在其他实施方式中,至少一种 CMV 抗原可偶联于溶细胞素,以增强抗原转移进用于递送到 I 类 MHC 通路的抗原呈递细胞的胞质溶胶。例示溶细胞素包括:皂苷化合物,例如含皂苷的免疫刺激复合物(ISCOMs),孔隙-形成毒素(例如,a-毒素),及革兰氏阳性细菌的天然的溶细胞素,例如利斯特菌溶血素 O(LL0),链球菌溶血素 O(SLO),及产气荚膜梭菌细胞溶素 O(PFO)。

[0143] 作为另一实施例,在其他实施方式中,抗原呈递细胞,优选树突细胞及巨噬细胞,可根据本领域中已知的方法分离,及通过本领域中已知的将编码 CMV 抗原的核酸导入 APCs 的方法用多核苷酸转染。转染试剂及方法(例如,**SuperFect®**)也可商购。例如,编码 CMV 抗原的 RNAs 可提供在适宜培养基(例如,**Opti-MEM®**),及与 APCs 接触之前与脂质(例如,阳离子脂质)组合。脂质的非限定例包括 LIPOFECTIN™,阳离子脂质体™,DODAC/

DOPE, 及 CHOL/DOPE。然后可使得到的多核苷酸-脂质复合物与 APCs 接触。或者, 可使用技术(例如电穿孔或磷酸钙转染)将多核苷酸导入 APCs。多核苷酸-装载的 APCs 然后可用于体内或离体刺激细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)增殖。在一实施方式中, 离体扩展的 CTL 在过继免疫治疗方法中施用于受试者。多核苷酸-装载的抗原呈递细胞刺激 CTL 反应的能力可通过已知的方法测定, 例如通过测定效应细胞裂解靶细胞的能力。使用用例如, RNA 装载的抗原呈递细胞的方法及组合物描述于美国专利 No. 6, 306, 388, Nair 等人, 将其通过引用就其产生及使用用 RNA 装载的 APCs 的方法的教导并入本文。

[0144] 另一方面, 本发明提供组合物, 其包括已在对于至少一种 CMV 抗原被抗原呈递细胞呈递而言足够的条件下与至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸体外接触的抗原呈递细胞。

[0145] 另一方面, 本发明提供制备淋巴细胞的方法, 所述淋巴细胞特异于至少一种 CMV 抗原。所述方法包括使淋巴细胞与上述抗原呈递细胞在足以产生能引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的 CMV 抗原-特异性淋巴细胞的条件接触。因此, 抗原呈递细胞也可用于提供淋巴细胞, 包括 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞, 用于引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

[0146] 在一实施方式中, 使 T 淋巴细胞制剂与上述抗原呈递细胞接触一定时间, 优选至少约 24 小时, 用于激发 T 淋巴细胞于被抗原呈递细胞呈递的至少一种 CMV 抗原。

[0147] 例如, 在另一实施方式中, 抗原呈递细胞群可与异质的外周血 T 淋巴细胞群伴随至少一种 CMV 抗原或包括至少一种 CMV 抗原的核酸共培养。细胞可共培养一定时间, 及对于待被抗原呈递细胞呈递的 CMV 抗原或它们的经加工形式而言足够的条件下, 及抗原呈递细胞激发 T 淋巴细胞群, 以响应表达 CMV 抗原的细胞。因此, 可制备被激发以响应表达 CMV 抗原的细胞的 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞。

[0148] 如本文所述, 诱导淋巴细胞呈现免疫应答的能力可通过任何方法测定, 包括, 但不限于, 使用例如 CMV 抗原-特异性抗原呈递细胞作为 CMV 抗原-特异性细胞裂解 T 淋巴细胞(CTL)的靶, 体外确定 T 淋巴细胞细胞裂解活性; 测定 CMV 抗原-特异性 T 淋巴细胞增殖; 及使用, 例如, ELISA 方法确定 B 细胞对表达 CMV 抗原的细胞的反应。

[0149] T 淋巴细胞可从任何适宜来源得到, 例如外周血, 脾脏, 及淋巴结。T 淋巴细胞可用作粗制剂或作为部分纯化的或基本上纯化的制剂, 其可通过标准技术得到, 包括, 但不限于, 涉及使用抗体的免疫磁性或流式细胞术技术的方法。

[0150] 也在本发明的范围内考虑的是已遗传修饰而用于特异性识别表达 CMV 抗原的细胞的细胞。(例如, 经遗传加工以在它们的表面表达细胞-特异性抗体的 T-细胞)。在一些实施方式中, 抗原-特异性 T 细胞通过本领域中已知的基因转移技术修饰, 以表达一或多种异源基因, 例如标记物基因或基因产物可增强或附加特定表型或功能到抗原-特异性 T 细胞的基因。因此, 例如, 可在活化的 T 细胞内响应抗原脉冲的树突细胞表达标记物基因, 且使抗原-特异性 T 细胞的选择性富集及修饰。作为另一实施例, 抗原-特异性 T 细胞可修饰为表达受体(例如, 趋化因子受体), 以体外及体内向受体配体迁移。

[0151] 其他方面, 本发明提供组合物, 其包括上述抗原呈递细胞或淋巴细胞, 及药学可接受的载质和/或稀释剂。在一些实施方式中, 所述组合物还包括如上所述的佐剂。

[0152] 另一方面, 本发明提供引发针对所述表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答的方法, 所

述方法包括给受试者以足以引发免疫应答的有效量施用上述抗原呈递细胞或淋巴细胞。在一些实施方式中,本发明提供的方法治疗或预防肿瘤形成疾病或与 CMV 相关的症状,所述方法包括给受试者施用有效量的上述抗原呈递细胞或淋巴细胞。在一实施方式中,抗原呈递细胞或淋巴细胞施用全身,优选通过注射。或者,可局部而非全身施用,例如,经直接注射到组织,优选以贮存器或持续的释放制剂。此外,可在靶向的药物递送系统中施用,例如,在用组织-特异性抗体包被的脂质体中。脂质体可靶向及被组织选择性地摄取。在另一实施方式中,本发明提供抗原呈递细胞或淋巴细胞在制备用于引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答,优选用于治疗或预防癌的药物用途。

[0153] 因此,本发明的抗原-激发的抗原呈递细胞及用这些抗原呈递细胞产生的抗原-特异性 T 淋巴细胞可用于作用于癌的预防性或治疗性应用的免疫调节组合物中的活性化合物。在一些实施方式中,本发明的 CMV 抗原-激发的抗原呈递细胞可用于产生用于过继转移给受试者的 CD8+CTL, CD4+CTL, 和 / 或 B 淋巴细胞。因此,例如,CMV 抗原-特异性 CTLs 可在患恶性肿瘤(例如神经胶质瘤)的受试者中以治疗性目的过继转移。

[0154] 上述抗原呈递细胞和 / 或淋巴细胞可通过本身或组合施用于受试者,用于引发免疫应答,特别用于引发针对表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。因此,所述基于细胞的组合物有用于治疗或预防癌。细胞可通过引发针对表达 CMV 抗原的细胞的期望的免疫应答的任何模式导入受试者。此外,抗原呈递细胞和 / 或淋巴细胞可源于受试者(即,自体细胞)或来自与所述受试者 MHC 匹配的或错配的不同受试者(例如,同种异体)。注射位点可选自皮下,腹膜内,肌内,真皮内,静脉内,或淋巴内。

[0155] 可用由照护者(例如,医师)选择的细胞数及处理进行抗原呈递细胞及淋巴细胞的单个或多个施用。优选地,抗原呈递细胞和 / 或淋巴细胞以药学可接受的载质施用。适宜载质可为细胞生长的生长培养基,或任何适宜缓冲培养基,例如磷酸缓冲盐水。细胞可单独施用或作为附加治疗连同其他治疗剂施用。

[0156] 因此,本发明涉及治疗和 / 或预防表达 CMV 抗原的细胞,优选 CMV- 相关的癌细胞的方法,所述方法包括给需要所述治疗或预防的受试者施用治疗 / 预防有效量的如本文所述的组合物。

[0157] 配制及施用技术可见于 Remington ' s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版。适宜途径可,例如,包括口服,直肠,经粘膜,或肠内施用;肠胃外递送,包括肌内,皮下,髓内注射,以及鞘内,直接心室内,静脉内,腹膜内,鼻内,或眼球内注射。对于注射,本发明的治疗性 / 预防组合物可在水溶液中配制,优选在生理相容的缓冲液,例如 Hank 溶液, Ringer 溶液,或生理盐水缓冲液中配制。

[0158] F. 抗体

[0159] 本发明的组合物也可用于产生靶向表达 CMV 抗原的细胞的抗体。因此,其他方面,本发明的组合物及方法提供一或多种针对表达 CMV 抗原的细胞的抗体,抗体本身具有许多用途,例如,被动免疫或对于效应子的靶-特异性递送,以及诊断性测试及基于免疫学结合的试剂盒的用途。因此,在一些实施方式中,本发明提供可用于治疗性和 / 或诊断性应用的 CMV- 相关的,癌细胞-特异性抗体。

[0160] 本发明的抗体可用于筛选或诊断性应用。本发明的抗体对于体外及体内诊断性目的有价值。例如,抗体可用于蛋白印迹,免疫沉淀,酶联免疫吸附测定 (ELISA), 荧光活化的

细胞分选 (FACS), 间接免疫荧光显微镜检, 免疫组织化学 (IHC) 等。在一实施方式中, 本发明提供确定表达 CMV 抗原的细胞的免疫学的方法, 所述方法包括使细胞与至少一种如本文所述的抗体接触。

[0161] 例如, 抗体可用作测定 CMV 抗原表达细胞检测的诊断剂。本发明的抗体应特别适宜作为给定它们对表达 CMV 抗原的细胞的结合亲和力的诊断剂。基本上, 将包括细胞 (例如, 癌细胞) 的样品与抗体温育足够的时间, 以使免疫学相互作用发生。本领域技术人员会认可, 这些基本过程中有许多变化。这些变化包括, 例如, RIA, ELISA, 沉淀, 凝集, 补体结合及免疫荧光法。优选地, 受试抗体将标记, 以使检测抗体-细胞免疫复合物。而且, 本发明的抗体也对于体外检测及定量表达 CMV 抗原的细胞有用, 或杀及消除来自混合的细胞群的所述细胞作为其他细胞纯化中的一个步骤。

[0162] 用于制备经标记形式的抗体的标记物包括可直接检测的部分, 例如一定反应或衍生待检测的放射性标记物及荧光色素, 以及部分, 例如酶。放射性标记物包括但不限于, ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , 及 ^{111}Ag 。放射性标记物可通过目前可用的计数方法之任何检测。

[0163] 酶标记物可通过目前利用的测热, 分光光度计测量, 荧光分光光度计测量或气体定量技术之任何检测。酶与有桥分子 (例如碳二亚胺, 高碘酸盐, 二异氰酸盐, 戊二醛等) 的抗体组合。可用于这些过程的许多酶已知及可利用。例如 peroxidase, 碱性磷酸酶, β -葡萄糖醛酸糖苷酶, β -D-葡萄糖苷酶, 脲酶, 葡萄糖氧化酶加过氧化物酶, 半乳糖氧化酶, 加过氧化物酶及酸性磷酸酶。可使用的荧光物质包括, 例如, 荧光黄及其衍生物, 若丹明及其衍生物, 金胺, 丹磺酰, 伞形酮, luciferia, 2,3-二氢酞吡嗪二酮, 辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, 溶菌酶, 及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。抗体可通过已知的方法用所述标记物标记。例如, 偶联剂, 例如醛, 碳二亚胺, 二马来酰亚胺, 安他心, 湖泊酰亚胺, 双-重氮化联苯胺等可用于用上述荧光, 化学发光, 及酶标记物标记抗体。各标记技术描述于 Morrison, *Methods in Enzymology*, (1974), 32B, 103; Syvanen et al., *J. Biol. Chem.*, (1973), 284, 3762; and Bolton and Hunter, *Biochem J.*, (1973), 133, 529。

[0164] 抗体及标记的抗体可用于各种免疫成像或免疫测定过程, 以检测受试者中有表达 CMV 抗原的细胞, 或监控所述受试者中所述细胞或癌的状态。当用于监控表达 CMV 抗原的细胞的状态时, 可使用定量免疫测定过程。例如, 如果所述监控测定周期性地, 及比较结果, 可进行有关是否受试者的肿瘤负荷增加或降低的确定, 其中所述肿瘤是 CMV- 相关的肿瘤。可使用的常见的测定技术包括直接及间接测定。

[0165] 例如, 治疗性应用的情况中, 抗体可用于抑制涉及疾病进展的靶或造成靶细胞的细胞毒性死亡。而且, 所述治疗性抗体可抑制信号转导通路或诱导抗体-依赖性细胞-介导的细胞毒性, 补体-依赖性细胞毒性等。

[0166] 本发明的抗体因此提供可 (但不需) 为瞬时或永久偶联于效应子的 (由此形成杂交分子或嵌合部分) 有效靶向部分, 及用于引导效应子到特定靶细胞 (例如, 癌细胞)。

[0167] 效应分子指特异性地转运到靶细胞的分子或分子组。效应分子一般具有待递送到靶细胞的特征性活性。效应分子包括但不限于细胞毒素, 标记物, 放射性核素 (例如, ^{211}At),

配体, 抗体, 药物, 脂质体, 表位标签等。优选的效应子包括细胞毒素 (例如, 假单胞菌属外毒素, 白树毒素, 蓖麻毒素, 相思豆毒蛋白, 白喉毒素等), 如本文所述的免疫调节剂, 或细胞毒性药物或药物前体, 所述情况中, 杂交体分子可发挥特异性地靶向细胞毒素到表达 CMV 抗原的细胞的有力的杀细胞剂的作用。

[0168] 效应子之其他例包括但不限于, 粒酶, 荧光素酶, 血管内皮生长因子, β -内酰胺酶, Tr-apo-1, Ang II, TAT, 烷化剂, 道诺霉素, 阿霉素, 苯丁酸氮芥, 抗代谢药 (例如, 甲氨喋呤), 头孢他啶 A 链, α -八叠球菌, 油桐 (*Aleurites Fordii*) 蛋白, 石竹素蛋白, 美国商陆蛋白 (PAPI, PAPII, 及 PAP-S), 苦瓜 (*Momordica Charantia*) 抑制剂, 麻风树毒素, 巴豆毒素, 肥皂草 (*Saponaria Officinalis*) 抑制剂, 米托洁林, restrictocoin, 酚毒素及依诺霉素。

[0169] 又一实施方式中, 效应子可包括: 包裹药物 (例如, 抗-癌药物, 例如多柔比星, 长春碱, 泰素, 或其他化学治疗剂, 本文所述的) 的脂质体, 由免疫系统成分刺激束缚细胞的识别的抗原, 及特异性结合免疫系统成分及使它们针对表达 CMV 抗原的细胞的抗体等。

[0170] 其他适宜效应分子包括药剂或含各药剂的包裹系统。因此, 杂交体分子的靶向分子可直接附接于待直接递送到表达 CMV 抗原的细胞的药物。所述药物为本领域技术人员所熟知, 及包括但不限于, 多柔比星, 长春碱, 染料木素, 反义分子, 本文所述的其他化学治疗剂等。

[0171] 或者, 效应分子可为包裹系统, 例如病毒壳体, 脂质体; 或含治疗性组合物, 例如药物, 核酸 (例如, 反义核酸) 的微团; 或优选从直接暴露于循环系统隔离的另一治疗性部分。制备附接到抗体的脂质体的方法为本领域技术人员所熟知。见, 例如, 美国专利 No. 4, 957, 735; Connor, J. et al. (1985) *Pharmacol. Ther.*, 28:341-365。

[0172] G. 确定 CMV 核酸

[0173] 其他方面, 本发明提供在受试者中确定 CMV 核酸, 优选在血或其他生物流体中确定 CMV DNA, 例如, 在从受试者获得的血样品中确定亚临床的病毒血症的组合物及方法。因此, 在各种实施方式中, 所述组合物及方法提供补充包括本文所述的方法的各诊断性和/或治疗性过程及治疗, 例如, 预防性和/或治疗性处理与癌前细胞, 癌细胞, 或易感于发展与 CMV 相关的癌的细胞-类型相关的疾病或病情有效诊断性, 监控, 及预后测试/测定。

[0174] 例如, 提供在确定经历同种异体骨髓移植 (aBMT) 的人患者中的 CMV 复活中可靠的, 及有时相比目前使用的临床上获得批准的诊断性 CMV PCR 测定提前病毒复活检测达 6 周的扩增方法。也如本文提供的实施例所述, 来自手术切除的 GBM 样本的 CMV DNA 可使用 PCR 扩增分析, 例如, 横跨 HCMV 基因组中 gB 基因可变区 (区 82801-84180, NCBI GenBank 登录号 No. NC_001347) 及随后的 DNA 测序。

[0175] 在一实施方式中, 本发明提供在受试者中确定 CMV 核酸的方法, 所述方法包括: (a) 扩增来自生物样品的核酸分子, 以获得扩增子, 其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触, 其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下; 及 (b) 确定有扩增子, 其中有扩增子指示所述受试者中的 CMV 核酸。

[0176] 在一些实施方式中, 扩增子长度不大于约 1000bp, 例如, 长度不大于约 900bp, 不大于约 800bp, 不大于约 700bp, 不大于约 600bp, 不大于约 500bp, 不大于约 400bp, 不大于约 300bp, 不大于 200bp, 不大于约 150bp, 不大于约 100bp, 不大于约 90bp, 不大于约 80bp, 不大于约 70bp, 不大于约 60bp, 不大于约 50bp, 及不大于约 40bp。在一些实施方式中, 扩增

子长度为 200 个碱基对 (bp) 或以下。

[0177] 引物对及它们的相应靶基因的非限定例显示于表 1 及 2。

[0178] 表 1 :用于确定 CMV DNA 的人 CMV 引物对

[0179]

名称 (基 因-引物)	引物对序列 (5'到 3') ¹	扩增子尺 寸 (bp)	检测率
gB-E1E2	5'-tcc aac acc cac agt acc cgt-3' (SEQ ID NO: 6) 5'-cgg aaa cga tgg tgt agt tcg-3' (SEQ ID NO: 7)	268	51/223 (22.9%)
gB-ili2	5'-cgc cgc cgc ccc cgc gcc cgc cgc ggc agc acc tgg ct-3' (SEQ ID NO: 8) 5'-gta aac cac atc acc cgt gga-3' (SEQ ID NO: 9)	144	164/223 (73.5%)
gB-i3i4	5'-gcc gcg gca gca cct gcc t-3' (SEQ ID NO: 10) 5'-aac cac atc acc cgt gga-3' (SEQ ID NO: 11)	122	152/223 (68.1%)
gB-5/6	5'-tac ccc tat cgc gtg tgt tc-3' (SEQ ID NO: 12) 5'-ata gga ggc gcc acg tat te-3' (SEQ ID NO: 13)	254	65/223 (29.1%)
gB-5/7	5'-tac ccc tat cgc gtg tgt tc-3' (SEQ ID NO: 14) 5'-cct cct ata acg cgg ctg ta-3' (SEQ ID NO: 15)	320	11/50 (22%)
gB-7B/8	5'-tcc gaa gcc gaa gac tcg ta-3' (SEQ ID NO: 16) 5'-gat gta acc gcg caa cgt gt-3' (SEQ ID NO: 17)	410	26/50 (52%)
gB-9/10	5'-ttt gga gaa aac gcc gac-3' (SEQ ID NO: 18) 5'-cgc gcg gca atc ggt ttg ttg ta-3' (SEQ ID NO: 19)	748	10/50 (20%)
gp64-1/2	5'-ccg caa cct ggt gcc cat gg-3' (SEQ ID NO: 20) 5'-cgt ttg ggt tgc gca gcg gg-3' (SEQ ID NO: 21)	138	7/50 (14%)
gpUL73-1/2	5'-ttc ggt cgg tca aca tcg taa g-3' (SEQ ID NO: 22) 5'-cac cca cgt atg taa acc tta e-3' (SEQ ID NO: 23)	516	6/50 (12%)
IE1-A443/A444	5'-aga aag atg tcc tgg cag aac t-3' (SEQ ID NO: 24) 5'-cct cag gta caa tgt agt tet e-3' (SEQ ID NO: 25)	605	37/223 (16.6%)
IE1-A445/A446	5'-aga aag atg tcc tgg cag aac t-3' (SEQ ID NO: 26) 5'-cct cag gta caa tgt agt tet e-3' (SEQ ID NO: 27)	422	40/223 (17.9%)
IE-1/2	5'-cgt cct tga cac gat gga gt-3' (SEQ ID NO: 28) 5'-att ctt cgg cca act ctg ga-3' (SEQ ID NO: 29)	311	10/50 (20%)
IE-3/4	5'-ccc tga taa tcc tga cga gg-3' (SEQ ID NO: 30) 5'-cat agt ctg cag gaa cgt cgt-3' (SEQ ID NO: 31)	201	12/50 (24%)
IEA1-P1/P2	5'-caa gcg gcc tet gat aac caa gc-3' (SEQ ID NO: 32) 5'-ctc ttc ctc tgg ggc aac ttc ctc-3' (SEQ ID NO: 33)	421	9/50 (18%)
MIE-P1/P2	5'-ggg tgc tgt cct gct atg tct ta-3' (SEQ ID NO: 34) 5'-cat cac tct gct cac ttt ctt cc-3' (SEQ ID NO: 35)	370	29/50 (58%)
pp65-1/2	5'-cac ctg tca cgc ctg cta tat ttg e-3' (SEQ ID NO: 36) 5'-cac cac gca gcg gcc ctt gat ctt t - 3' (SEQ ID NO: 37)	400	10/50 (20%)
pp65-3/4	5'-gac aca aca cgc taa agc-3' (SEQ ID NO: 38) 5'-cag cgt teg tgt ttc e-3' (SEQ ID NO: 39)	278	8/50 (16%)
pp65-11/12	5'-agc gcg tac aca tag atc ga-3' (SEQ ID NO: 40) 5'-gct gat ctt ggt atc gca gta e-3' (SEQ ID NO: 41)	186	12/50 (24%)
pp65-13/14	5'-agt ggt gca cgt tga tgc tg-3' (SEQ ID NO: 42) 5'-teg ctg atc ttg gta teg ca-3' (SEQ ID NO: 43)	232	15/50 (30%)
UL54-S1/AS1	5'-cta cac ggt agc gac gag ac-3' (SEQ ID NO: 44) 5'-atg ttt cta ggc tac tet gac tg-3' (SEQ ID NO: 45)	501	8/50 (16%)
UL89/93 (EcoRI 片段 D-P1/P2)	5'-gat cgc acc cat tgt cta ag-3' (SEQ ID NO: 46) 5'-ggc agc tat cgt gac tgg ga-3' (SEQ ID NO: 47)	152	10/50 (20%)
UL144-1/2	5'-gcc tet gat aat gct cat ctg e-3' (SEQ ID NO: 48) 5'-ggc tag agt atg acg acc gct t-3' (SEQ ID NO: 49)	400	12/50 (24%)
UL144-5/	5'-tcg ttg ttt gtg atg ttg gac gcc-3' (SEQ ID NO: 50)	265	21/50

[0180]

6	5'-tga agt gca act ggg caa tga gtg-3' (SEQ ID NO: 51)		(42%)
UL144-7/ 8	5'-cgt tgt ttg tga tgt tgg acg cct-3' (SEQ ID NO: 52) 5'-tga agt gca actg ggc aat gag tg-3' (SEQ ID NO: 53)	264	23/50 (46%)
UL144-9/ 10	5'-ttg ttt gtg atg ttg gac gcc tgg-3' (SEQ ID NO: 54) 5'-tga agt gca act ggg caa tga gtg-3' (SEQ ID NO: 55)	262	18/50 (36%)
UL144-11 /12	5'-atg gtt ctt agg tgc gca tac ggt-3' (SEQ ID NO: 56) 5'-tga agt gca act ggg caa tga gtg-3' (SEQ ID NO: 57)	223	17/50 (34%)
UL144-13 /14	5'-agg cta gag tat gac gac cgc ttt-3' (SEQ ID NO: 58) 5'-acg gca cgt atg tat cgg gac ttt-3' (SEQ ID NO: 59)	225	19/50 (38%)
US7/8 (HindII I-X 片段 -P1/P2)	5'-gga tcc gca tgg cat tca cgt atg t-3' (SEQ ID NO: 60) 5'-gaa ttc agt gga taa cct gcg gcg a-3' (SEQ ID NO: 61)	406	2/50 (40%)
US28-10/ 11	5'-agc gtg ccg tgt acg t ta e-3' (SEQ ID NO: 62) 5'-ata aag aca agc acg acc-3' (SEQ ID NO: 63)	412	14/50 (28%)

[0181] ¹ 在实验室中用 NTI Advance 10 软件 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 设计引物。

[0182] 表 2 :对自经历同种异体骨髓移植的患者的外周血样品的定量 PCR 结果。

[0183]

基因-引物	引物&探针序列 ¹ 5'到 3'	HCMV 检测率	检测的最低阈值 (拷贝 #/qPCR)	检测 10 个拷贝的 HCMV 的 Ct 值
gB-18/19/20	5'-aaa gag ctg cgt tcc agc aa-3' (SEQ ID NO: 64) 5'-gag gtc gtc cag acc ctt ga-3' (SEQ ID NO: 65) 5'-[FAM]-cat gcg cga att caa ctc gta caa gc-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 66)	9/30 (30%)	10	38.1
gB21/22/23	5'-atc gtg aga cct gta atc tga act gta-3' (SEQ ID NO: 67) 5'-gga agt tgc aaaa aaa tga taag ga-3' (SEQ ID NO: 68) 5'-[FAM]-tga cca tca cta ctg cgc gct cca-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 69)	16/30 (53.3%)	1	31.5
Pp65-1wx/2wx/3wx	5'-ggc tac ggt tca ggg tca ga-3' (SEQ ID NO: 70) 5'-ccg ggc aag gcg tctt-3' (SEQ ID NO: 71) 5'-[FAM]-tgg gac gcc aac gac atc tac cg-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 72)	9/30 (30%)	10	37.4
Pp65-4wx/5wx/6wx	5'-gcg cac gag ctg gtt tg-3' (SEQ ID NO: 73) 5'-aca cct tga cgt act ggt cac cta t-3' (SEQ ID NO: 74) 5'-[FAM]-acg cgc gca acc aag atg cag-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 75)	9/30 (30%)	10	34.5
Pp65-7/8/9	5'-aca cat aga teg aca tgg gct cct-3' (SEQ ID NO: 76) 5'-tgc agg tgc agc aca cgt act tta-3' (SEQ ID NO: 77) 5'-[FAM]-ttg tgc acg ttg acc gac acg ttc t-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 78)	9/30 (30%)	10	35.1
Pp-65-21/22/23	5'-tcg cgc ccg aag agg-3' (SEQ ID NO: 79) 5'-cgg ccg gat tgt gga tt-3' (SEQ ID NO: 80) 5-[FAM]-cac cga cga gga ttc cga caa cg-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 81)	9/30 (30%)	10	35.3
Pp65-24/25/26	5'-gca gcc acg gga teg tac t-3' (SEQ ID NO: 82) 5'-ggc ttt tac ctc aca cga gca tt-3' (SEQ ID NO: 83) 5' [FAM]-cgc gag acc gtg gaa ctg cg-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 84)	11/30 (36.7%)	2	33.9
Pp65-27/28/29	5'-gtc agc gtt cgt gtt tcc ca-3' (SEQ ID NO: 85) 5'-ggg aca caa cac cgt aaa gc-3' (SEQ ID NO: 86) 5'-[FAM]-ccc gca acc cgc aac cct tca tg-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 87)	9/30 (30%)	10	35.7
Pp65-30/31/32	5'-gcg gta aga cgg gca aat ac-3' (SEQ ID NO: 88) 5'-ggc gtc gag atg ttc gta gag-3' (SEQ ID NO: 89) 5'-[FAM]-cac cat cga cac cac acc ctc atg a-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 90)	9/30 (30%)	10	35.2
US28-1/2/3	5'-cag cgt gcc gtg tac gtt act-3' (SEQ ID NO: 91) 5'-gtg caa tct ccg tga taa aac aca-3' (SEQ ID NO: 92) 5'-[FAM]-act gcc tgt ttc tac gtg gct atg ttt gcc-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 93)	10/30 (33.3%)	5	33.1
US28-4/5/6	5'-tgg cta tgt ttg cca gtt tgt g-3' (SEQ ID NO: 94) 5'-cag gcc gat atc tca tgt aaa caa t-3' (SEQ ID NO: 95) 5'-[FAM]-ttt atc acg gag att gca ctc gat cgc t-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 96)	9/30 (30%)	10	37.3
US28-7/8/9	5'-gat gca ata cct cct aga tca caa cte-3' (SEQ ID NO: 97) 5'-gca aac ata gcc acg tag aaa ca-3' (SEQ ID NO: 98)	11/30 (36.7%)	2	32.0

[0184]

	5'-[FAM]-cca gcg tgc cgt gta cgt tac tca ctg-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 99)	%) 7%)		
HXFL4 -1/2/3	5'-aag cgc tgg ata cac ggt aca-3' (SEQ ID NO: 100) 5'-gaa tac aga cac tta gag ctc ggg gt-3' (SEQ ID NO: 101) 5'-[FAM]-ctg gcc agc acg tat ccc aac agc a-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 102)	11/30 (36. 7%)	2	32.2
IE-5/6/ 7	5'-caa gaa ctc agc ett ccc taa gac-3' (SEQ ID NO: 103) 5'-tga ggc aag ttc tgc aat gc-3' (SEQ ID NO: 104) 5'-[FAM]-cca atg gct gca gtc agg cca tg-[TAMRA]-3' (SEQ ID NO: 105)	9/30 (30 %)	10	38.0
IE-8/9/ 10	5'-cag att aag gtt cga gtg gac atg-3' (SEQ ID NO: 106) 5'-agg cgc cag tga att tct ctt-3' (SEQ ID NO: 107) 5'-[FAM]-tgc ggc ata gaa tca agg agc aca tg-[Tamra]-3' (SEQ ID NO: 108)	11/30 (36. 7%)	2	33.9

[0185] ¹ 如实时 PCR 中使用的, 探针显示为用荧光团及猝灭剂染料双 - 标记 (5' FAM/3' TAMRA) 的。

[0186] 在一实施方式中, 第一引物及第二引物足以提供对应于 gB (例如, UL55) 或 MIE 基因区的扩增子。但是, 可提供对应于 CMV 核酸的任何区的扩增子的任何引物对也在本发明的范围内。在一些实施方式中, 根据本发明使用的引物包括如 SEQ ID NO :8 ~ 63 中所示的核苷酸序列。

[0187] 在另一实施方式中, 第一引物及第二引物对应于引物对, 其中所述第一引物包括如 SEQ ID NO :8 所示的第一引物序列, 其中所述第二引物包括如 SEQ ID NO :9 所示的第二引物序列。在其他实施方式中, 第一引物及第二引物对应于引物对, 其中所述第一引物包括如 SEQ ID NO :10 所示的第一引物序列, 其中所述第二引物包括如 SEQ ID NO :11 所示的第二引物序列。

[0188] 在另一实施方式中, 第一引物及第二引物对应于引物对, 其中所述第一引物包括如 SEQ ID NO :16 所示的第一引物序列, 其中所述第二引物包括如 SEQ ID NO :17 所示的第二引物序列。在一实施方式中, 第一引物及第二引物对应于引物对, 其中所述第一引物包括如 SEQ ID NO :34 所示的第一引物序列, 其中所述第二引物包括如 SEQ ID NO :35 所示的第二引物序列。

[0189] 在其他实施方式中, 本发明提供在受试者中确定 CMV 核酸的方法, 所述方法包括 : (a) 扩增来自生物样品的核酸分子以获得扩增子, 其中扩增包括使核酸分子与如表 2 中所示的至少一对引物及至少一种相应探针接触。在一实施方式中, 所述一对引物具有如 SEQ ID NO :67 及 68 所示的序列 ; 及所述相应探针具有如 SEQ ID NO :69 所示的序列。

[0190] 在一些实施方式中, 在所述受试者中确定 CMV 核酸的方法还包括使生物样品经历速冻。速冻方法为本领域熟知及可使用各种试剂及技术进行, 包括, 例如, 在液氮或醇 / 干冰 (例如, MeOH/ 干冰) 中速冻。

[0191] 优选地, 方法还速冻步骤之后包括浓缩核酸。在一实施方式中, 浓缩步骤包括在速冻步骤之后沉淀核酸。在另一实施方式中, 沉淀包括使核酸与醇接触 (例如, EtOH 沉淀)。

[0192] 再一实施方式中, 确定有扩增子的步骤通过检测扩增子的任何适宜方法进行, 例如特征在于具有用溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶的至少 10 倍的检测灵敏度的检测方法。

[0193] 其他方面, 本发明提供在受试者中引发针对细胞的免疫应答的方法, 所述方法包

括：

[0194] (a) 扩增来自受试者的生物样品的核酸分子，以获得扩增子，其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触，其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下；

[0195] (b) 确定有扩增子，其中有扩增子指示所述受试者中的 CMV 核酸；及

[0196] (c) 给所述受试者施用药学可接受的组合物，所述药学可接受的组合物包括至少一种 CMV 抗原，或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸，其中所述药学可接受的组合物在施用于受试者时引发针对所述细胞的免疫应答。步骤 (a)，(b)，及 (c) 如上所述。

[0197] 另一方面，本发明提供在受试者中引发针对细胞的免疫应答的方法，所述方法包括：

[0198] (a) 扩增来自受试者的生物样品的核酸分子，以获得扩增子，其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触，其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下；

[0199] (b) 确定有扩增子，其中有扩增子指示所述受试者中的 CMV 核酸；及

[0200] (c) 给受试者施用组合物，所述组合物包括：有效量的抗原呈递细胞，T- 淋巴细胞，或两者，其中所述抗原呈递细胞及 T 淋巴细胞已用致敏 - 有效量的至少一种 CMV 抗原体外致敏，其中所述有效量的抗原呈递细胞，T 淋巴细胞，或两者足以引发针对所述表达 CMV 抗原的细胞的免疫应答。

[0201] 一方面，本发明提供降低或抑制表达 CMV 抗原的细胞生长或扩展的方法，所述方法包括：

[0202] (a) 扩增来自受试者的生物样品的核酸分子，以获得扩增子，其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触，其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下；

[0203] (b) 确定有扩增子，其中有扩增子指示所述受试者中的 CMV 核酸；及

[0204] (c) 给受试者施用治疗或预防有效量的药学可接受的组合物，以降低或抑制所述受试者中所述细胞的生长或扩展。步骤 (a)，(b)，及 (c) 如上所述。

[0205] 再一实施方式中，本发明提供监控对具有表达 CMV 抗原的细胞的受试者治疗的治疗性功效的方法，所述方法包括：

[0206] (a) 在来自受试者的第一生物样品中确定第一量的 CMV 核酸，其中确定包括：扩增来自生物样品的核酸分子以获得扩增子，其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触，其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下，其中有扩增子指示所述受试者中的 CMV 核酸；

[0207] (b) 治疗受试者；

[0208] (c) 适宜时期后在从经治疗的受试者获得的第二样品中确定第二量的 CMV 核酸；及

[0209] (d) 比较第一量与第二量，其中第一量与第二量之间的差异指示治疗有效性。

[0210] 在一些实施方式中，步骤 (b) 中的治疗包括给受试者施用治疗或预防量的如上所述的药物组合物。

[0211] 在其他实施方式中，本发明提供针对对具有针对表达 CMV 抗原的细胞的活性的药

学试剂的确定的测定,所述方法包括:

[0212] (a) 在来自受试者的第一生物样品中确定第一量的 CMV 核酸,其中确定包括:扩增来自生物样品的核酸分子以获得扩增子,其中所述扩增包括使核酸分子与至少一对包括第一引物及第二引物的引物接触,其中所述扩增子长度约为 1000 个碱基对 (bp) 或以下,其中有扩增子指示所述受试者中的 CMV 核酸;

[0213] (b) 用药学试剂治疗受试者;

[0214] (c) 适宜时期后在从经治疗的受试者获得的第二样品中确定第二量的 CMV 核酸;及

[0215] (d) 比较第一量与第二量,其中当第二量小于第一量时,所述药学试剂具有针对细胞的活性。

[0216] III. 试剂盒

[0217] 本发明的组合物可以单元剂量或试剂盒形式供给。试剂盒可包括以分离的容器提供的药学可接受的组合物或其疫苗的各成分,以及包括化学治疗剂的各其他活性成分或试剂。例如,容器可独立地包括至少一种 CMV 抗原或编码所述至少一种 CMV 抗原的核酸,从而当与试剂盒的其他成分组合时一起构成以单元剂量或多个剂型的药学可接受的组合物。优选的试剂盒在分离的容器中至少包括抗原来源(例如,至少一种 CMV 抗原或编码它们的核酸);及一或多种佐剂(例如,细胞因子)。试剂盒可还在分离的容器中包括生理学可接受的载质,稀释剂,或赋形剂。任选地,试剂盒可还包括递送剂,例如纳米粒子或转染试剂。本发明的包装的组合物及试剂盒也可包括有关储存,制备,及施用的使用说明。一或多种核酸引物根据本发明任选包括在试剂盒中,优选在一或多个分离的容器中提供。

[0218] 本发明将通过实施例进一步详述,但需注意,本发明不限于实施例。

【实施例】

[0219] 【实施例 1】恶性神经胶质瘤中的 HCMV 蛋白表达

[0220] 为测定 HCMV 蛋白是否在恶性神经胶质瘤 (MGs) 中表达,通过免疫组织化学 (IHC) 检查选自我们的脑肿瘤银行的来自 45GBM 样本的石蜡切片。

[0221] 以石蜡块得到人 GBM,少突神经胶质瘤,脑膜瘤,室管膜瘤,及正常脑手术样本(有伦理委员会 [IRB] 批准)。要求基于对仅来自 Duke 组织银行的 Preston Robert Tisch 脑肿瘤中心的肿瘤样本的诊断。选择由神经病理学家确证的总 45 个 GBM 病例 (36 个原发性 GBM 及 9 个复发的 GBM)。组由 26 个雄性及 19 个雌性构成,中位年龄 51 岁。将样本进行切片 (6 μ m) 及就内源性过氧化物酶封闭 (3% H₂O₂,持续 12 分钟),及在添加单克隆抗体 (mAb) 之前,用 Fc 受体阻断剂温育(于 20°C 10 分钟;Innovex Biosciences, Richmond, CA, 美国)。使用 3-阶段辣根过氧化物酶检测系统 (BioGenex, San Ramon, CA, USA; Dako, Carpinteria, CA, USA; and Innovex Biosciences) 用以下 mAbs 进行 IHC: 抗-IE1-72 (1:25; BioGenex), 抗-pp65 (1:30; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), 及抗平滑肌肌动蛋白 (1:15; BioGenex)。对于各 mAb 使用 DAB (Innovex Biosciences) 作为色原建立抗体参数(例如,后固定,取回,及温育时间)。将新鲜切除的 GBM 样本建立 14~21 天的原发性神经胶质瘤培养物固定及使用冷甲醇渗透,然后用 10% 中性缓冲的福尔马林后固定 10 分钟。使用生物素阻断及亲和素阻断 (BioGenex) 及 FC 受体阻

断 (Innovex) 进行非特异性结合的阻断。与第一抗体使用同种型对照 (小鼠 IgG1, 小鼠 IgG2a ;Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国), CD45 抗体 (BDBiosciences, San Jose, CA, 美国), pp28 抗体 (Virusys, Sykesville, MD, 美国), 糖蛋白 B(gB ;Virusys), 及 HIV p17 (Virogen, Watertown, MA, 美国) 进行温育 2 小时或于 4℃ 过夜 (1 μ g/ml 抗体浓度), 及使用 BioGenex 3- 阶段辣根检测系统进行检测。

[0222] 使用特异于 HCMV- 编码的抗原的 mAb, IE1-72 进行检测。检测通过 IHC 检查的 45 个中的 42 个 (93%) 样本中的 IE1-72 免疫反应性。在肿瘤细胞中及偶尔还在内皮细胞中 (图 1) 检测到强细胞核及细胞质染色。但是, 浸润淋巴细胞及周围的正常脑区缺乏针对 IE1-72 抗体的免疫反应性。为进一步确认 HCMV 的特异性检测, 检查 45 个病例中的 33 个的对特异于 HCMV 基质蛋白的 mAb, pp65 的反应性。33 个病例中的 30 个 (91%) 对于肿瘤细胞中但非相邻正常脑区中的 pp65 有免疫反应性。pp65 反应性一般而言相比肿瘤细胞中的 IE1-72 检测欠普遍, 但检查的全部样本中的大部分肿瘤细胞显示针对 pp65 抗体的免疫反应性 (图 1 ;表 3)。

[0223] 表 3 :GBM 样本中 HCMV 检测的总结

[0224]

HCMV	GBM 组织样本	原发性 GBM 培养物
IE1 IHC	42/45(93%) ^a	4/4(100%)
pp65 IHC	30/33(91%) ^a	12/12(100%)
HCMV DNA ISH	16/16(选定的病例)	未测试
gB PCR	21/34(61.7%) ^b	13/17(70.6%)
IE1 PCR	8/34(24%) ^b	9/17(53%)

[0225] 缩写 :

[0226] HCMV, 人巨细胞病毒 ;

[0227] GBM, 成胶质细胞瘤多形性 ;

[0228] IHC, 免疫组织化学 ;

[0229] ISH, 原位杂交 ;

[0230] gB, 糖蛋白 B ;

[0231] PCR, 聚合酶链式反应。

[0232] ^a 通过 IHC 测试的其他肿瘤对于 HCMV 为阴性 :少突神经胶质瘤 (n5 = 5) ;一种病例呈现了内皮细胞中 HCMV IE1 的病灶检测, 但在肿瘤薄壁组织内无反应性) ;脑膜瘤 (n = 5) ;室管膜瘤 (n = 5)。

[0233] ^b 从 21gB PCR 反应及 6IE1 PCR 分离 PCR 产物, 及通过 DNA 测序确证特异于 HCMV。

[0234] 为排除肿瘤细胞中非特异性检测的可能性, 用同种型 - 及浓度 - 匹配的对照 mAbs 在肿瘤切片上进行 IHC。以与 HCMV- 特异性 mAbs 同一浓度使用的同种型 - 匹配的, 对照抗体呈现在肿瘤细胞内无免疫反应性, 及针对平滑肌肌动蛋白的同种型 - 匹配的 mAb 展示肿

瘤及正常脑切片内针对血管的反应性(图 1A),但在肿瘤细胞内无反应性。对脑膜瘤($n = 5$),室管膜瘤($n = 5$),及少突神经胶质瘤($n = 5$)的 IE1 及 pp65 检查结果是阴性的,除了在单个病例的少突神经胶质瘤用 IE1 单克隆抗体观察到病灶内皮染色之外(表 3)。

[0235] 【实施例 2】恶性神经胶质瘤样本中 HCMV 的 PCR 检测

[0236] 如中所示图 2,进行 11/13 高度 MGs(9/11GBMS,2/2AAs)中 gB 的 PCR 扩增。使用 gB 特异性引物进行 40 个 PCR 循环,以扩增 122bp 产物。在 32 个阳性样品中的 17 中确证 HCMV gB 序列。

[0237] 【实施例 3】存在于恶变前损伤的 CMV 抗原

[0238] 显示了 CMV IE1 及 pp65 蛋白存在于大于约 75%的恶变前结直肠息肉及大于约 80%的结肠腺癌,但不在相邻非-肿瘤形成结肠活组织检查样品中(见,例如, Harkins 等人, Lancet, 360 :1557(2002))。此外显示,在约 48%的低度神经胶质瘤中有 CMV,其常进展为高度损伤(见,例如, Scheurer et al., Detection of Human Cytomegalovirus in Different Histological Types of Gliomas, Acta Neuropathologica, Epublised March 20, 2008, Springer Berlin/Heidelberg)。因此,也可提供本发明的组合物及方法用于预防或治疗前肿瘤形成,低度,和 / 或恶变前损伤,以及进展为肿瘤形成疾病。

[0239] 【实施例 4】自体 DC 的离体产生

[0240] 白细胞去除术产物(LP)袋内容放入 1L 无菌 corning 瓶中,及加入等体积的磷酸缓冲盐水(PBS)以稀释 LP。使用离心管,将 20ml 的 Histopaque™(Sigma#1077-1)用 30ml 的稀释的 LP 轻轻覆盖,然后以 $1300 \times g$ 旋转 25 分钟。除去界面(每管 1 个界面);加入 PBS 至 50mL;及细胞以 $500 \times g$ 于室温(RT)沉淀 5 分钟。将上清轻轻倒出,及将沉淀重悬浮于 50mL PBS,然后如上沉淀。将上清轻轻倒出,及将 2 个沉淀并入 50mL PBS 中,然后如上沉淀。再次,将上清轻轻倒出,及将 2 个沉淀并入 50mL PBS,然后如上沉淀。合并沉淀,及用 PBS 洗涤直到全部细胞合并入 1 管。

[0241] 进行锥虫蓝排除,以通过利用血细胞计数器测定活及死细胞的数。将细胞以 2×10^8 /mL 重悬浮于含 2%人 AB 血清(HABS)(Valley Biomedical #HP1022)的 AIM V 培养基(Life Technologies#870112dk)中。将 29ml 的含 2% HABS 的 AIM V 培养基及 1ml 的 PBMC 细胞悬浮液加入 T-150 细胞培养瓶。将全部细胞培养瓶放入单个专用的湿润的温育器,于 37°C , 5% CO_2 温育 2 小时,以使单核细胞前体附着。附着期后,除去非-附着的细胞,及其余单层细胞用 PBS 洗涤一次。附着的细胞每瓶补加 30ml 的补充了 800U/mL 重组人 GM-CSF(Berlex Laboratories, Inc.)及 500U/mL 重组人 IL-4(R&D Systems#204-IL/CF)的 AIM-V,及在湿润的温育器中于 37°C , 5% CO_2 温育 7 天。

[0242] 7-天培养期后,附着的 DCs 用冷 PBS 洗涤。加入 10ml 的无酶的解离缓冲液(Life Technologies #13150-016),及将 DCs 于 4°C 温育 10 分钟。附着的 DC 的残留物从瓶冲洗,及与之前收获的 DC 组合,然后于 4°C 以 $500 \times g$ 沉淀 10 分钟。用冷 PBS 洗涤一次后,检查细胞的数量及活力。

[0243] 【实施例 5】RNA 装载 & 树突细胞成熟

[0244] 如上所述产生的树突细胞以 2.5×10^7 细胞 /ml 的 ViaSpan 重悬浮(Belzer UW-CSS, DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE)。然后将 200 μL 的悬浮液伴随 10 μg 的 pp65RNA 放入比色杯(GenePulser Cuvette, Bio-Rad#165-2086),及细胞以 300 伏电穿

孔 (BTXElectro Square Porator#ECM830) 500 μ s。将大致 1×10^8 的电穿孔的细胞转移到含 50ml 的补充了 800U/ml 的重组人 GM-CSF (Berlex 实验室, Inc.) 及 500U/ml 重组人 IL-4 (R&D 系统 #204-IL/CF) 的 AIM V 的 T225 瓶中, 然后于 37°C, 5% CO₂ 温育 1 小时。温育期末, 加入适量的含成熟细胞因子的培养基至成熟混合剂中细胞因子终浓度为 10ng/ml TNF- α (R&D 系统, #210-TA/CF); 10ng/ml IL-1 β (R&D 系统, #201-LB/CF); 及 1000 个单位 / ml IL-6 (R&D 系统, #208-IL/CF)。细胞于 37°C 及 5% CO₂ 温育过夜。

[0245] 在成熟期末除去上清, 及放入在冰上的冷冻的 50ml 圆锥形管中。其余单层细胞用冰冷的 PBS 洗涤; 与上清合并; 然后于 4°C 以 500 $\times$ g 沉淀 5 分钟。将沉淀重悬浮于 10ml 的冰冷的 PBS, 及保持在冰上。加入 10 ~ 20ml 的无酶解离缓冲液 (Life Technologies#13150-016), 及将细胞于 4°C 保持, 及每 5 分钟监控细胞脱离的过程。将瓶用 10ml 的冰冷的 PBS 洗涤两次, 与来自解离缓冲液的细胞合并, 及使用 500 $\times$ g 沉淀。将细胞与其他细胞组合, 及达到 50ml 及计数。

[0246] 【实施例 6】用于疫苗接种的树突细胞的制备

[0247] 在 50mL 圆锥形离心管中的成熟的抗原 - 装载的树突细胞, 及缓慢添加 25ml 的 PBS, 然后将细胞于 22°C 以 200 $\times$ g 沉淀 5 分钟。将细胞重悬浮于 10ml 的 PBS 及, 使用 2ml 移液器除去 100 μ l 悬浮液样品, 及使用血细胞计数器及锥虫蓝对细胞计数, 如上所述。在进行之前, 细胞测定为 = 70% 有活力。将细胞于 22°C 以 500 $\times$ g 沉淀 5 分钟, 及以 5×10^4 细胞 / mL 重悬浮于 0.9% 氯化钠。将细胞装入带 25G 5/8 规格针头的 1cc 注射器。样品在施用之前送革兰氏染色及内毒素测试。

[0248] 【实施例 7】使用 CMV pp65-LAMP RNA- 装载的 DCs 疫苗接种患新 - 诊断的 GBMs 的受试者

[0249] 切除 6 周内募集 25 患新诊断的 GBM 的患者 (各随机化的组内 = 3CMV 血清阳性患者)。评定仅 1 剂量水平的 DCs (2×10^7) 及 1 剂量水平的 ALT (3×10^7 /Kg)。随后试验中升高剂量的决定依赖于此试验中得到的安全性及免疫应答分析。追踪患者直到死亡。如果任何组内的任何 2 名患者经历药物 - 相关的 IV 级或不可逆的 III 级毒性, 则暂停研究。全部患者在切除后经历白细胞去除术, 用于收获 ALT 的 PBLs 及 DCs 产生。图 3 示意疫苗接种流程。

[0250] 患者以 75mg/m²/d 的标准靶向剂量接受放射治疗 (RT) 及并行的 TMZ。辐射期间患进行性疾病及在疫苗接种的时期依赖于补充甾类在生理学水平以上的患者不能耐受 TMZ, 及取代未符合释放标准的其 DCs 或 PBLs。然后其余患者在完成 RT 后以 200mg/m²/d 的标准靶向剂量接受 TMZ 的初始循环 5 天 3 ± 1 周, 及随机化以接受 ALT, 或不同时用 DC#1 疫苗。将 DCs 真皮内供给, 及等分到两个腹股沟区。#2 及 #3 疫苗以 2 周间隔出现。全部患者再次经历白细胞去除术, 用于用基线抗原 - 特异性细胞及体液免疫应答的特异性评定及 #3 疫苗后 4 ± 2 周的后续 DC 代免疫学监控。然后患者每月疫苗接种, 连同随后每 5 ± 1 周 TMZ 循环到 RT 后总 6 个循环。第 1 ~ 5 天给予 TMZ, 及第 21 天 ± 7 天给予 DCs。TMZ 循环后的 DC 疫苗接种持续结束。

[0251] 患者每两个月成像, 不接受任何其他描述的抗 - 肿瘤治疗, 及用疫苗接种持续直到进展。如果需要持续疫苗接种, 患者经历额外的白细胞去除术用于 DCs 产生。在 #4 疫苗, 患者在腹股沟位点随机化到不同皮肤制剂, 及接受 ¹¹¹In- 标记的 DCs, 以比较不同皮肤制剂

对 DC 迁移的效应。当进展发生时,患者在腹股沟区双侧接受最终真皮内疫苗接种,及在颌角用 ^{111}In - 标记的 DCs,以比较不同疫苗接种位点对 DC 迁移的效应。作为对于这些患者的部分标准护理,肿瘤进展之后,参与者可经历立体定向的活组织检查或切除。因为此不是研究过程,独立地得到同意。但是,如果得到组织,其用于组织学确认肿瘤进展,及用于评定免疫学细胞浸润,及在肿瘤位点的 pp65 抗原逸出。

[0252] 研究包含标准包括:年龄 > 18 岁;募集之前 < 6 周有确定的切除的 GBM(WHO IV 级),对于任何轴平面中最大直径 < 1cm 的 CT 或 MRI 切除后的残差放射摄影对比度增强;及 > 80% 的卡诺夫斯基能力状态 (KPS) 及 I ~ IV 的 Curran 组状态。

[0253] 研究排除标准包括:疫苗接种之前任何时间的柔脑膜或多中心疾病的放射摄影或细胞学证据;不同于甾类, RT, 或 TMZ 的现有的常规抗 - 肿瘤治疗;研究期间怀孕的或需要哺育(所需的阴性 β -HCG 测试);对在第一疫苗接种的时间连续的皮质类甾醇类在生理学水平以上的需求;要求处理的活跃的感染或未解明的发热 (> 101.5° F) 病;已知的免疫抑制疾病或人免疫缺陷病毒感染;患不稳定或严重的介入性医学状况(例如严重的心脏或肺疾病)的患者;由于不同于淋巴细胞减少的理由而过敏或不能耐受 TMZ;或经之前腹股沟淋巴结解剖的患者。

[0254] 调差研究的例示过程包括:用于在 DCs 上的产生的白细胞去除术及 ALT;用抗原装载的 DCs 的真皮内免疫;ALT;用 ^{111}In 标记的抗原装载的 DCs 的真皮内免疫及 SPECT 扫描;及对用标准回忆抗原及抗原装载的及幼稚的 DCs 的 DTH 测试。

[0255] 与认为是标准护理活性的流程相关的活性包括:外部光束放射治疗;替莫唑胺 (TMZ);MRI;及复发时的活组织检查。

[0256] 患者在用 25 ~ 50mg 苯海拉明及 650mg 的泰诺前 - 药物治疗以阻止输注反应后,静脉内(通过位于你的静脉的导管)接受它们自身的淋巴细胞。接受输血 45 ~ 90 分钟,依赖于重量及接受的细胞的数。给定小注射体积(在 > 2 个真皮内位置之间分配 1mL)及各注射之前 DCs 严格测试无菌性的事实,感染风险概率相对低。通过生物安全质量保证及测试最小化由于实验室内潜在 DCs 污染的感染风险。在无菌条件下在专用于处理人细胞的核心组织培养设备内操作全部细胞培养物。注射到患者之前,DCs 在巯基乙酸盐肉汤,胰蛋白酶大豆血琼脂,及抑制性萨布罗琼脂中经过无菌性测试。注射后,研究全程监控患者的任何迹象及感染症状。如果怀疑活跃的感染,用适当的抗生素培养及处理患者。

[0257] 用 ^{111}In 放射性标记患者 DCs 用于相关研究。暴露于患者及卫生保健人员的辐射以推荐的剂量最小,及粗略相当于生活在高海拔城市,例如丹佛 13 天,或乘 4 次从纽约到洛杉矶的飞行。因此,不采取特别的辐射预防。得到 SPECT 图像用于分析。

[0258] MRI 期间,患者给予对比度试剂。常规给予试剂,以获得脑的增强的 MRI 扫描。试剂通过静脉施用,及要求布置 IV 导管。导管布置类似于流血,除了导管在试剂活跃地递送期间仍在静脉内之外。

[0259] 【实施例 8】用 CMV pp65RNA 装载的 DCs 治疗的患新 - 诊断的 GBM 的患者的肿瘤进展时间 (TTP) 增加

[0260] DCs 通过用 GM-CSF 及 IL-4 培养 7- 天从白细胞去除术产生体外。对于 DCs 的体外产生而言,PBMCs 通过白细胞去除术得到,及转运到细胞处理设备。对于无足够的白细胞去除术静脉接入的患者而言,插入临时的静脉内导管。

[0261] 产生 DCs 的 7 天温育末, 采取培养基样品用于支原体测试, 及然后收获细胞, 及用 pp65-LAMP mRNA 电穿孔 ($2\mu\text{g}$ RNA/ 百万 DCs)。将 DCs 于 37°C , 5% CO_2 放入有含 GM-CSF+IL-4+TNF- α +IL-6+IL-1 β 的 AIM V 培养基的瓶中 18~20 小时, 以成熟。细胞用 PBS 洗涤两次, 及以 5×10^6 细胞 /mL, 在 90% 自体人 AB 血清 (ValleyBiomedical, Winchester, VA 22602), 10% DMSO 及 5% 葡萄糖中, 在控制速度的冷冻器中, 以 1°C / 分钟的速度冷冻。然后于 -135°C 保存 DCs 直到需要。冷冻后, 将等份的细胞解冻, 及送于耗氧及厌氧细菌培养物 (1×10^6 DCs) 及真菌培养物 (1×10^6 DCs)。

[0262] 对于各疫苗接种, 于 37°C 快速解冻 DCs, 用 PBS 洗涤 3 次, 评定活力, 及计数。为进行, 得到 $\approx 70\%$ 的细胞活力。将细胞浓度调至 4×10^7 细胞 /mL, 及将 DCs 重悬浮于无防腐剂的盐水, 及放入带 27 规格针头的无菌结核菌素注射器中。

[0263] 对于全部 DC 制剂, 将细胞样品在施用之前送革兰氏染色及内毒素测试。不给 DC 疫苗接种, 直到经过内毒素测试 (< 5.0 酶单位 /Kg), 及革兰氏染色为阴性。等份的细胞也送于耗氧及厌氧细菌培养物 (1×10^6 DCs) 及真菌培养物 (1×10^6 DCs)。

[0264] 起始使用自体 pp65RNA 装载的 DCs 的 I/II 期临床试验。此试验募集了 21 名经历总体切除 ($> 95\%$) 然后标准外部光束辐射 (60Gy) 及并行的 TMZ ($75\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$) 6 周, 然后每月 5 天 TMZ ($150\sim 200\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$) 持续 6 个循环的患新诊断的 GBM 的患者。5 名患者辐射期间进展, 及不在流程上治疗。2 名患者基于同情使用流程外治疗。手术切除后及 TMZ 起始之前收获的白细胞去除术用于产生 DCs, 及经 pp65RNA 电穿孔的自体 DCs (2×10^7 DCs i. d.) 在首次 TMZ 循环后头 3 个剂量每 2 周施用, 及然后在各循环的第 21 天每月施用。患者通过 MRI 监控 (每 2 个月) 肿瘤进展及每月收集血用于免疫学监控。对照与在源于 MD Anderson 数据库的 ATTAC 试验募集的患者的同一合格标准年龄, 预后因素符合。

[0265] 结果显示于图 4。在 21 个月的追踪中, 16 名患者中的 13 名仍活 (范围从手术后 7.6 个月~22 个月), 中位 TTP 为 12.5 个月, 及中位总体生存尚未达到但大于 20.1 个月, 其相比组织对照高度有利 (见, 例如, Stupp et al., N. Engl. J. Med. 352 :987 (2005) ;III 期 TMZ/XRT+ 佐剂 TMZ 中位 TTP 为 7.1 个月, 及中位生存为 14.6 个月)。

[0266] 【实施例 9】用 CMV pp65RNA- 装载的 DC 疫苗治疗的 GMB 患者的总体生存增加

[0267] RT 及并行的每天 TMZ ($75\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$) 完成后, 患者随机化为仅接受 DC 疫苗接种的及伴随 ALT 接受第一 DC 疫苗接种的。随机化通过 CMV 血清学状态分隔, 及分配从已由研究统计学家制备的一组连续密封的包膜使用随机数发生器进行。DC 疫苗接种伴随头 5 天 (第 1~5 天) TMZ ($200\text{mg}/\text{m}^2$) 循环开始。在第 21 天 ± 2 天的 TMZ 循环, 两个患者组接受用 2×10^7 pp65-LAMP mRNA 装载的成熟的 DCs 每 2 周总 3 次免疫的真皮内免疫。各免疫等分到腹股沟区。将每侧总体积 $200\mu\text{L}$ 真皮内递送 (SOP-JHS-HDC-CL-012“真皮内施用树突细胞过程”)。过程之细节以适当形式 (FORM-JHS-HDC-CL-012) 记录。注射使用 1.5 英寸 25 规格针头进行。患者免疫后临床监控 30 分钟~1 小时任何不利效果的发展。免疫过程由已完成加强心脏生命支持 (ACLS) 课程的护士或医师监督。当在严重的过敏反应事件中进行这些免疫时, 心脏救护车近旁可用。初始 3 次疫苗以各 2 ± 1 周相隔给予。

[0268] 第三次疫苗后, 患者经历 4- 小时白细胞去除术用于免疫学监控及 DC 产生。随后, 患者在第 21 天 ± 2 天免疫每循环的 TMZ, 其每 5 ± 1 周递送。因此, 除了与辐射并行给予的 TMZ ($75\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$) 之外, 给予总 6 个 TMZ 添加循环 ($200\text{mg}/\text{m}^2$ / 第 1~5 天)。

[0269] 如果完成 TMZ 循环而无进展,每 5 ± 1 周持续 DC 疫苗接种直到临床或放射摄影进展,无任何其他描述的抗-肿瘤治疗。期间,患者在每次访问时用常规物理及神经学检查,及 MMSE 测试,及用约束-增强的 CT 或 MRI 每 8 ± 4 周临床监控。各访问时得到外周血,还免疫学监控。

[0270] 进行 II 期随机化的,预期临床试验,以使用 pp65-RNA 转染的树突细胞 (DCs) 评定患新-诊断的 GBM 的患者中靶向免疫显性的 CMV 外壳蛋白,pp65 的免疫原性及功效。切除及用并行的 TMZ 辐射 ($75\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$) 后,患者接受随后的每月循环的 TMZ ($200\text{mg}/\text{m}^2$) 同时用真皮内疫苗接种,及随机化,以在疫苗接种之前接受 ALT ($3 \times 10^7/\text{Kg}$)。受试者接受疫苗接种,直到有肿瘤进展的迹象。

[0271] 结果显示于图 5。21 名患者同意。5 名在放射治疗期间进展。无疫苗-相关的,可报道的严重不利的事件 (SAEs)。但是, TMZ 治疗在第一 TMZ 循环后在 70% 的患者中诱导 3 级淋巴细胞减少 (500 细胞/ mL)。TMZ 后,免疫抑制调控 T 细胞 (T_{Reg}) ($\text{CD4}^+\text{CD25}^{++}\text{CD45RO}^+\text{CD127-FOXP3}^+$) 水平从 5.2% ($3.3 \sim 7.5$) 增加到 11.8% ($6.9 \sim 13.8$) ($P = 0.0004$; 成对的 t-检验)。观察到一个几乎完全反应。中位 PFS 是 12.5 个月 ($\text{CI}_{95}: 10.0, 8$)。用 CMV pp65RNA 装载的 DC 疫苗处理的患 GBM 的患者的总体生存有利。6PFS (100%; 13 名患者中的 13 名), 12 个月生存 (92.3%; 13 名患者中的 12 名), 及 15 个月生存 (90%; 10 名患者中的 9 名) 有利地比肩于有类似诊断 (见,例如, **Temodar®** (63.7 周) (Stupp et al., N Engl J Med., 352:987 (2005)); 及 Gliadel™ (59.6 周) (Westphal et al., NeuroOncol., 5:79-88 (2003))) 的患者。总体中位生存大于 19.7 个月。如图 6 中所示,患 GBM 的 33 岁雌性几乎有对与自体淋巴细胞转移组合的 CMV pp65RNA- 装载的 DC 疫苗的完全放射摄影反应。MRIs 呈现在增强损伤,校正中线偏移,及神经学症状分辨率中的降低。此患者在 GBM 初次手术切除后 21 个月时仍存活及良好。

[0272] CMV- 特异性多功能细胞及体液免疫应答的初步结果显示患 GBM 的患者具有 CMV- 特异性免疫学缺陷 (图 7 ~ 9)。

[0273] 【实施例 10】抗原-特异性 CD8+ 及 CD4+T 细胞可从响应 CMVpp65 抗原-脉冲的 DCs 的本体培养物分离

[0274] 为鉴定及分离多克隆抗原-特异性 CD4+ 及 CD8+T 细胞群,对利用用编码 CMV 的全长 pp65 抗原的 mRNA 转染的 DCs 刺激的 T 细胞进行绿色荧光蛋白 (GFP) RNA 电穿孔。

[0275] 【树突细胞产生,用肽及 RNA 的抗原装载,及树突细胞成熟】

[0276] 这些实验中使用的全部细胞物质在已给予知情同意后,在 Duke 大学伦理委员会的批准下从正常自愿者及患恶性神经胶质瘤的患者得到。通过白细胞去除术得到外周血单核细胞 (PBMCs), 及于 37°C 在 AIM-V 培养基 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) 中温育 1 小时而使附着到塑料,然后在补充了粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子 (800 个单位/ mL) 及 IL-4 (500 个单位/ mL) 的 AIM-V 培养基中培养 6 天。在第 6 天收获未成熟的树突细胞,洗涤,及以 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 重悬浮于 Opti-MEM (Invitrogen Life Technologies)。将来自 DC 培养物的上清保存为条件培养基,待后期使用。细胞使用方波发生器 (ECM 830 Electro Square Porator; BTX, Genetronics 的分部, San Diego, CA) 在 2-mm 比色杯中对 $200 \mu\text{L}$ 的 DCs (5×10^6 细胞) 300V 电穿孔 500 μs 。DCs 用 $2.5 \mu\text{g}$ 的 RNA/ 10^6 细胞电穿孔。细胞转移到含 1 : 1 条件树突细胞生长培养基与新鲜培养基的组合的 60-mm 组织

培养皿。细胞与 IL-1 β (5ng/ml), 肿瘤坏死因子- α (5ng/ml), IL-6 (150ng/ml), 及地诺前列酮 (1 μ g/ml) 成熟过夜。IL-4, 肿瘤坏死因子- α , IL-1 β , 及 IL-6 从 R&D 系统 (Minneapolis, MN) 得到; 粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子来自 Duke 大学医学中心 (Durham, NC) 的药房, 及地诺前列酮来自 Pharmacia (Erlangen, 德国)。就肽刺激而言, 将成熟的树突细胞洗涤及重悬浮于 1 : 1 条件培养基, 及含 10 μ g/ml 浓度的 HLA-A2- 限制的免疫原性人巨细胞病毒 pp65 肽 NLVPMVATV (pp65₄₉₅₋₅₀₃) (SEQ ID NO : 109) 的新鲜培养基 (AnaSpec, San Jose, CA)。

【0277】 【用 pp65 肽或 mRNA 脉冲树突细胞及 T 细胞的活化】

【0278】 DCs 从 HLA-A2⁺ 正常自愿者及患恶性神经胶质瘤的患者产生, 及于 37°C 在 AIM-V 培养基-2% 人 AB 血清中用 pp65 肽 (10 μ g/ml) 脉冲 3 小时。就用编码 pp65 的 mRNA 装载而言, 将 DCs 洗涤及重悬浮于 Opti-MEM 用于电穿孔。2 μ g 的编码全长 HCMV pp65 的 mRNA 每 1 $\times 10^6$ DCs 用 BTX ECM 830 电穿孔。DCs 用 45ml 的 AIM-V 培养基洗涤一次, 及以 1 : 10 比 (DC : T 细胞) 加入自体反应者淋巴细胞。体积调至 2 $\times 10^6$ 细胞 /ml, 及细胞于 37°C 在含 5% CO₂ 的湿润的气氛中温育。3 天后, 加入等量的含 2% 合并的人 AB 血清加 IL-2 (10U/ml) 的 AIM-V 培养基, 及将细胞以 1ml/ 孔的体积转移到 24 孔平板。然后, 每 2 ~ 3 天评价细胞的生长, 及调至 1 $\times 10^6$ 细胞 /ml。与 pp65- 脉冲的 DCs 共培养 8 ~ 11 天后, 收获 T 细胞, 及用编码 GFP 的 mRNA 电穿孔。或者, T 细胞通过多克隆刺激使用固定的抗-CD3 单克隆抗体 (Ortho Biotech, Raritan, NJ) (2 μ g/ml 在磷酸-缓冲的盐水 [PBS] 中在 T-150 瓶中过夜) 刺激。细胞平铺于 CD3- 包被的平板中的含 2% 人 AB 血清 (10⁶ 细胞 /ml) 的 AIM-V 培养基中, 及在收获之前培养 3 ~ 5 天。

【0279】 【T 淋巴细胞来源】

【0280】 非粘连 (NA) 细胞在 Duke 大学伦理委员会批准下给予患者知情同意后从来自患恶性神经胶质瘤的患者及正常自愿者的 PBMCs 产生。单核细胞来自通过 Ficol1-Hypaque 梯度分离 (LSM ;MP Biomedicals, Solon, OH) 的外周血分离。

【0281】 【用 GFP 电穿孔 DC- 脉冲的 pp65 肽- 刺激的 T 细胞】

【0282】 编码 GFP 的 mRNA 从 PGEM4Z/GFP/A64 载体 (由 E. Gilboa 友情提供, Duke 大学医学中心) 制备, 如前所述 (Zhao 等人, 血, 102 : 4137 (2003))。如上所述使用用 pp65 肽脉冲的 DCs 刺激自体 T 细胞。细胞保持在含 10U/ml 的 IL-2 的培养基中, 及于 37°C 温育 7 天。就电穿孔而言, 将 0.2ml 的细胞悬浮液 (5 $\times 10^6$) 与 10 μ g 的体外-转录的 GFP mRNA 混合。混合物在 0.4-cm 比色杯 (EquiBio ;PEQLABBiotechnologie, Erlangen, 德国) 中使用电穿孔装置以 300V 及 150Mf 电穿孔。电穿孔后, 将细胞在补充了 2% 人 AB 血清的新鲜 AIM-V 培养基中培养, 及过夜温育。电穿孔后 24 小时, 收获细胞, 及就 CD8 及 HLA-A2 四聚体阳性染色, 及通过流式细胞术分析。

【0283】 【分选的 T 细胞的扩展】

【0284】 使用如上所述的相同刺激及电穿孔方法, 在转染后 24 小时, 在 FACS Vantage SE 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分选 GFP- 阳性及阴性 T 细胞。将细胞放入补充了 100U/ml 的 IL-2 的 AIM-V 培养基中以使扩展。在第 0, 7, 10, 14, 及 17 天, 使用光学显微镜及锥虫蓝染料排除来计数活细胞。

【0285】 【抗-CD3- 活化的 T 细胞中的 GFP 表达】

【0286】 电穿孔之前用固定的抗-CD3 抗体刺激 T 细胞 48 ~ 96 小时导致在 60 ~ 70% 的 T

细胞中高水平的 GFP 表达,如通过流式细胞术分析(图 10A)。

[0287] 【使用 GFP 的 RNA 电穿孔的 CMV 抗原-特异性 CD8+T 细胞的选择】

[0288] 有效 RNA 转染的对于 T 细胞活化的需求可使本体刺激的 PBMC 培养物中的抗原-特异性 T 细胞的鉴定。为测定抗原-特异性 T 细胞中的 RNA 电穿孔效率, PBMCs 用使用 HLA-A2-限制的 pp65 肽脉冲的自体 DCs 刺激 7 天。在第 7 天,将刺激的培养物用 GFP RNA 电穿孔,及使用 HLA-A2pp65 四聚体检查抗原-特异性及非特异性 T 细胞中的 GFP 表达。前向和侧向散射选通揭示母细胞样形态的活化的淋巴细胞细胞(图 11,左上部)。GFP 表达显示于大致 25%的全部 CD8+T 细胞(图 11,右上部),及四聚体分析揭示,表达几乎完全局限于 pp65-特异性 T 细胞内(图 11,右下部)。表达 GFP 蛋白的 T 细胞中,通过四聚体染色 97%鉴定为 pp65 特异性。此外,多于 98%的全部四聚体-阳性 CD8+T 细胞表达 GFP 蛋白,表明 RNA 转染不仅局限于抗原刺激的 T 细胞(展示精确的特异性;97.40%),但此处理也有效鉴定全部相关反应者 T 细胞(展示对于鉴定抗原-特异性 T 细胞的高灵敏度;对于鉴定全部相关细胞的 89.77%灵敏度)。这些结果以 3 个重复实验确认,有 $93.10 \pm 5.87\%$ 的抗原-特异性 T 细胞转染的平均特异性,及 $86.45 \pm 8.45\%$ 的通过 GFP 表达检测全部四聚体-阳性 T 细胞的灵敏度。培养于 IL-2(10U/ml)的 DC-刺激的 T 细胞中的 GFP 表达发现持续 5~7 天(图 12A),表明在快速扩展的 T 细胞中瞬时表达蛋白的能力。

[0289] 【使用 GFP 的 RNA 电穿孔的 CMV 抗原-特异性 CD8+ 及 CD4+T 细胞的富集及扩展】

[0290] 为鉴定及分离多克隆 CMV 抗原-特异性 CD4+ 及 CD8+T 细胞群,在用使用编码全长 pp65 抗原的 mRNA 转染的 DCs 刺激的 T 细胞上进行 GFP RNA 电穿孔。用 pp65RNA 脉冲的 DCs 体外刺激后 11 天时,来自 HLA-A2-阳性患者($n = 3$)的 PBMCs 用 GFP RNA 电穿孔,及通过流式细胞术评价 RNA 表达动力学(图 12A)。基因表达发现在 48 小时处有峰,及通过转染后第 7 天降至基线。因此,在重复的实验中, T 细胞在第 11 天在 DC 刺激后电穿孔,及 48 小时之后通过流式细胞术分选分离 GFP-阳性(GFP+)及 GFP-阴性(GFP-)T 细胞。分选的细胞通过四聚体分析来分析,及细胞因子流式细胞术用于富集 CMV 抗原-特异性 T 细胞。等数量的 GFP+ 及 GFP- 细胞放回入含 IL-2(100U/ml)的培养物,及在分选后第 7, 10, 14, 及 17 天评价扩展。有趣的是,当用 IL-2 培养时,仅 GFP+T 细胞能进一步扩展,表明 RNA 电穿孔可有效分离能从无活性或灭活的 T 细胞用 RNA-脉冲的 DCs 刺激后进一步体外扩展的 T 细胞(图 3B)。为测定是否 GFP 表达是简单分离增殖 T 细胞与无活性细胞,将 GFP+ 及 GFP- 分选的细胞也用由同种异体饲养细胞(来自不匹配的正常供体的 PBMCs),抗-CD3,及高-剂量 IL-2(100U/ml)构成的多克隆扩展平台,在适宜于在 14 天内产生临床规模 T 细胞扩展($\times 1000$ 倍扩展)的快速扩展流程(REP)中刺激。使用 REP 流程, GFP- 及 GFP+T 细胞均有效扩展,展示 RNA 转染不分开功能性与非功能性 T 细胞的能力,而是鉴定在与抗原脉冲的树突细胞共培养以进入有丝分裂细胞周期期间已接受足够的活化的 T 细胞。

[0291] 检查的 3 个患者样品之一展示 HLA-A2- 及 HLA-B7-限制的 pp65-特异性 CD8+T 细胞的用 RNA-脉冲的 DCs 刺激后扩展。RNA 电穿孔及分选后,含 95%的 HLA-A2-限制的 T 细胞及 98%的 HLA-B7-限制的 T 细胞的 GFP+ 级分,在 GFP+ 级分内呈递 20~50 倍富集的抗原-特异性 T 细胞,及展示几乎全部抗原-特异性 CD8+T 细胞的有效鉴定及分离(图 12C)。用 2 名其他仅展示 HLA-A2-限制的 pp65T 细胞反应性的患者得到类似结果。为测定 CMV 抗原-特异性 CD4+T 细胞的富集能力,用未刺激的,葡萄球菌属肠毒素 B(SEB)-刺激的,或 CMV

pp65 肽混合剂-刺激的 T 细胞级分进行细胞因子流式细胞术。阳性对照 (SEB-刺激的 T 细胞) 显示 GFP- 阴性级分中 13.69% 的 CD4+T 细胞分泌的 IFN- γ 及 22.49% 的 GFP+CD4+T 细胞分泌的 IFN- γ , 证实, 两种级分含能响应超抗原的功能性效应子 CD4+T 细胞。但是, 响应 CMV 肽混合剂而由 CD4+T 细胞的 IFN- γ 分泌局限于 GFP+ 级分, 相比 GFP- 级分中 0.31% 的 CD4+T 细胞, 有 14.15% 的分泌细胞因子的 CD4+T 细胞 (图 12D)。

[0292] 结果呈现在分离用 pp65- 脉冲的 DCs 刺激的 T 细胞后, 在 GFP+ 级分中抗原-特异性 CD4+T 细胞的 45 倍富集; 及展示是在用于富集的本体 PBMC 培养物中鉴定抗原-特异性 CD8+ 及 CD4+T 细胞的有效方法。此外, 鉴定及富集多克隆抗原-特异性 CD8+ 及 CD4+T 细胞群的能力提供用广抗原识别产生 T 细胞群的方法及用于过继免疫治疗的效应子功能。

[0293] 【实施例 11】抗原-特异性 T 细胞可修饰为向受体-特异性趋化因子体外及体内迁移

[0294] 树突细胞产生, 用肽及 RNA 的抗原装载, 树突细胞成熟, 用 pp65 肽或 mRNA 脉冲树突细胞, T 淋巴细胞来源, 及 T 细胞活化如以上实施例 7 中所述进行, 除了 CXCR2mRNA 用于电穿孔 DC- 脉冲的 pp65 肽-刺激的 T 细胞之外。CXCR2mRNA 从 pcDNA3.1+ 载体 (Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri University of Science and Technology, Rolla, MO) 制备, 及在 Psp73-sph/A64 载体 (也由 E. Gilboa 友情提供) 中表达 (Nair et al., Blood, 102:964(2003))。

[0295] 就细胞迁移测定而言, 将活化的淋巴细胞 (5×10^5 细胞) 一式三份放入 6 孔过滤室板 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 的上室。将不含细胞因子或含各浓度的 IL-8, GRO- α , 或 UL146 的培养基放入下室, 及细胞于 37°C 温育 45 分钟~1 小时。收集下室中的培养基, 及细胞离心, 及重悬浮于 50ml 的培养基, 及通过锥虫蓝染料排除计数。就测定体内迁移入腹膜腔而言, 将未修饰的或 CXCR2RNA- 转染的 T 淋巴细胞在 PBS 中用羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯 (CFSE; Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 1 μ M (未转染的) 及 10 μ M (CXCR2RNA 转染的) 区别标记 5 分钟, 洗涤, 及以 10^7 细胞 / 小鼠静脉内注射到受者 NOD/SCID 小鼠 (Taconic, Hudson, NY)。将 1ml 的 PBS 中的 1 μ g 的趋化因子 (IL-8, UL146, 或 GRO- α) 在 T 细胞注射后每 8 小时腹膜内注射持续 24 小时。处死小鼠, 通过用 3ml 的 PBS 经腹膜灌洗来收获淋巴细胞, 及细胞通过离心浓缩。细胞用缀合藻红蛋白 (PE) 的抗-人 CD45 (BD Biosciences) 染色, 及通过流式细胞术评价未转染的 (CFSE^低) 及 CXCR2RNA 转染的 (CFSE^高) 细胞的蓄积。T 细胞群的相对蓄积通过使用用于比较对趋化因子注射的反应的 PBS- 处理的动物中的蓄积作为基线来确定。就体内迁移测定到 CNS 而言, 将 5 μ l 的 PBS 中的 1 μ g 的 UL146 使用立体定向的框架注入全身麻醉下的小鼠右顶叶, 及 5 μ l 的 PBS 注入左顶叶。将 CFSE (5 μ M) - 标记的未转染的或 CXCR2RNA- 转染的 T 细胞以 10^7 细胞 / 小鼠注入受者小鼠。6 小时之后, 处死小鼠及收获脑, 及解剖为右及左顶叶。通过于 37°C 胶原酶消化 (在 RPMI 中 1mg/ml) 30 分钟来制备切碎的组织的单个-细胞消化物 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。通过 CFSE- 标记的细胞的流式细胞仪分析评定左及右顶叶的单个-细胞悬浮液中的输注的淋巴细胞蓄积; 收集 100,000 个事件, 及通过 CFSE- 阳性细胞的流式细胞计数来测定浸润 T 细胞的总数。

[0296] 【抗原-特异性 T 细胞内 CXCR2mRNA 的表达】

[0297] 检查了 CXCR2RNA 电穿孔到用 pp65- 脉冲的 DCs 刺激的 T 细胞后, 通过表达趋化因子受体 CXCR2 来调节 T 细胞迁移功能的能力。使用 CXCR2- 特异性抗体及流式细胞术监控四

聚体-阳性对比四聚体-阴性 CD8+T 细胞内的 CXCR2 表达。10 ~ 15% 的刺激 CD8+T 细胞在它们的表面以基线表达 CXCR2 (图 10B), 及 CXCR2RNA 转染后, 大致 50% 的 CMV 抗原-特异性 T 细胞在它们的表面表达 CXCR2 (图 13)。相反, 四聚体-阴性 T 细胞未呈现背景以上的 CXCR2 表达 (10.9%), 表明 RNA 电穿孔后抗原-特异性 T 细胞内趋化因子受体的选择性表达。

【0298】 【CXCR2RNA-修饰的 T 细胞的增强的体外趋化功能】

【0299】 也检查了在 Transwell 迁移测定中响应 CXCR2-特异性配体 IL-8, GRO- α , 及 UL146 的未修饰的, GFP RNA-转染的, 及 CXCR2RNA-转染的 T 细胞的趋化功能 (图 14A ~ C)。CXCR2RNA-转染的 T 细胞相比未修饰的或 GFP RNA-转染的 T 细胞呈现了针对全部 3 种配体的剂量-应答性增强的趋化反应。向在许多肿瘤内高水平分泌的 IL-8 及由人巨细胞病毒产生的趋化因子 UL146, 及专用于 CXCR2 的仅有的配体的趋化反应在 CXCR2-修饰的 T 细胞中增加多于 300 ~ 500%。

【0300】 【CXCR2RNA-修饰的 T 细胞的增强的体内迁移】

【0301】 为测定 CXCR2RNA 是否转染进活化的 T 细胞可体内辅助 T 细胞迁移, 评价了 RNA-修饰的 T 细胞迁移进入已用 CXCR2-特异性趋化因子注射的 SCID 小鼠腹膜腔及 CNS。小鼠输注区别地 CFSE-标记的未转染的或 CXCR2RNA-转染的 T 细胞后每 8 小时用趋化因子 (1 μ g/ml) 腹膜内注射 24 小时。处死小鼠及通过经腹膜灌洗来收获细胞, 及 CXCR2-转染的及未转染的 T 细胞蓄积通过对人 CD45+ 细胞选通, 通过流式细胞术分析, 及评估 CFSE^低细胞 (未转染的) 对比 CFSE^高细胞 (CXCR2RNA 转染的) 的相对蓄积。趋化因子-注射的小鼠中 T 细胞的相对蓄积与 PBS-注射的小鼠比较及显示于图 15A。结果呈现 CXCR2RNA 转染的细胞响应 UL146 及 IL-8 蓄积。最大趋化反应是对 UL146 的, 其与体外研究的发现平行。在此体内测定中观察到无显著的反应 GRO- α 的蓄积。

【0302】 也检查了是否 CXCR2RNA 修饰可导致 T 细胞响应 UL146 在 CNS 内蓄积。免疫缺陷型小鼠在立体定向的框架引导下在左额顶叶施用单个注射的 PBS, 或在右额顶叶施用 UL146 (1 μ g)。静脉内注射 CFSE-标记的未转染的或 CXCR2RNA-转染的 T 细胞, 及注射后 6 小时, 收获左及右脑半球, 制备单个细胞消化物, 及通过流式细胞术评价 CFSE-标记的 T 细胞的检测。如图 15B 中所示, CXCR2RNA-修饰的 T 细胞呈现 UL146-注射的半球相比 PBS-注射的半球增强的浸润, 然而未转染的 T 细胞呈现两侧半球浸润均无显著的差异。CXCR2RNA-修饰的 T 细胞的优先蓄积在后期时间点观察不到, 可能对于通过颅内注射建立的趋化因子的瞬时梯度次要。

【0303】 这些结果显示, CXCR2RNA-修饰的 T 细胞呈现增强的体外及体内趋化功能, 及 T 细胞的基于 RNA 的修饰可用于选择性地鉴定及修饰抗原-特异性 T 细胞。

【0304】 因此, 利用了采用信使 RNA 编码基因的电穿孔的可用于从未转染的 T 细胞群鉴定及分离转染的 T 细胞群, 以及修饰它们的迁移功能的基因转移技术。使用 GFP 作为标记物基因的实例, CMV 抗原-特异性 T 细胞容易从用 pp65-脉冲的 DCs 刺激的培养物鉴定及分离, 及 RNA 转染可用于同时分离抗原-特异性 CD4+ 及 CD8+T 细胞。抗原-特异性 T 细胞的核酸-介导的转染具有在能通过单个策略 (例如趋化因子受体或其他目的表面受体的电穿孔及基于转染的受体表达的细胞分离) 同时富集纯度及修饰抗原-特异性 T 细胞功能的特定优点。编码可调节 T 细胞功能的蛋白 (例如 CXCR2) 的基因的表达可使用例如, 抗原

特异性刺激平台、然后 RNA 电穿孔优先靶向有目的特异性的 T 细胞。增强 T 细胞迁移到发炎,病毒感染,或肿瘤进展位点的基因,例如趋化因子受体,代表表达可显著增强过继转移的淋巴细胞功效的一类蛋白。CXCR2 仅在小级分的 T 淋巴细胞中正常表达,及介导向 IL-8, GRO- α , 及 UL146 的趋化性,后者是 CMV 抗原-特异性趋化因子。IL-8 已显示在发炎位点增加,以及在神经胶质瘤及其他肿瘤内显著升高。GRO- α 在许多恶性肿瘤(包括黑色素瘤,消化道癌,及恶性神经胶质瘤)中表达增加。其神经胶质瘤中的表达与肿瘤级相关,赋予 T 细胞向 GRO- α (跟踪下降侵袭性的高度损伤中有用的效应子)的趋化功能。UL146 是由有对 CXCR2 的特异性的 CMV 合成的趋化因子。通过 UL146-介导的化学吸引将表达 CXCR2 的 CMV 抗原-特异性 T 细胞定位到病毒感染位点可增强免疫治疗功效。

[0305] 附加地,这些研究至少展示, T 细胞可使用编码趋化因子受体或其他趋化受体的 RNAs 定位到,例如目的治疗性位点。这是靶向脑肿瘤,作为 CNS 展示循环免疫细胞的有限的正常运输的特定用途。其中,此方法也可引导抗原-特异性效应子 T 细胞到肿瘤生长,病毒感染位点,或用于优先扩展的疫苗位点。

[0306] 【实施例 12】定性 CMV 检测

[0307] 为开发定性 CMV 检测方法,评价跨 10 种不同 CMV 基因的 29 种不同 PCR 引物(表 1),用于在来自患新-诊断的 GBM 的患者的血样品(来自 45 名患新-诊断的 GBM 的患者的 223 系列血样品)的扩展的同群中检测 CMV DNA。

[0308] 根据 Duke 大学伦理委员会收集来自正常自愿者(对于健康自愿者($n = 11$)中位年龄 42;及对于手术对照患者($n = 6$),年龄 46),患新-诊断的 GBM 的患者(中位年龄 52.5($n = 45$)),及经历同种异体骨髓移植的患者(中位年龄($n = 5$))的外周血。全血等分入冷冻管,及在液氮中速冻,及保存于 -130°C 直到 DNA 提取。通过以 2000g 离心分别肝素化的或非-肝素化的血 20 分钟收集血浆及血清,及在冷冻管中在液氮中速冻及保存于 -130°C 直到 DNA 提取。由患新-诊断的 GBM 的患者知情同意后手术期间收集肿瘤,切碎及在液氮中速冻。样本保存于 -130°C 直到 DNA 提取。DNA 从 10mg 的切碎的組織使用 TissueDirect™ Multiplex PCR 系统(GenScript Corporation, Piscataway, NJ)提取。

[0309] DNA 从 GBM 肿瘤样本及人血或血浆或血清用 TissueDirect™ Multiplex PCR 系统(GenScript Corporation, Piscataway, NJ)提取。对于阳性对照样品,向来自血清阴性自愿者的全血,血清,或血浆添加已知浓度的 CMV 定量的病毒 DNA AD169 株(AdvancedBiotechnologies(Cat#08-925-000), Columbia, MD)。通过将溶液 TD-A 与溶液 TD-B 以 1 : 9 比混合来制备来自 TissueDirect™ Multiplex 试剂盒的裂解溶液。对于 DNA 提取,评价裂解溶液与样品的各体积比,及将 50 μl 的裂解溶液 TD-A/B 每样品加入 10 μl 的血(血清或血浆或肿瘤组织),通过移液器吸吐或敲打/旋转管来良好混合,及短暂旋转。将样品于 95°C 温育 15 ~ 30 分钟,确保保持盖紧,以阻止由于蒸发损失,直到样品被裂解溶液均匀裂解。将 50 μl 的溶液 TD-C 加入各样品,良好混合及以高速在离心机上旋转 1 分钟及收集上清。将 11 μl 的 5M NaAC 或 3M NH_4AC (裂解的样品体积的 1 : 10 体积)及 220 μl 的 100% 醇(EtOH, 2 体积的样品体积)加入上清,用于沉淀 DNA。然后将 DNA 沉淀在离心机中以全速($\sim 14,000\text{rpm}$)离心至少 10 分钟,用 70% EtOH 洗涤两次,及用 10 μl 的无核酸酶的水或 TE 缓冲液复原。全部 DNA 提取在从进行 PCR 反应的分子生物学实验室的分离的实验室进行。将 2 ~ 5 μl 的各样品(相当于从 2 ~ 5 μl 的全血,血浆,或血清提取的 DNA)加入 PCR

反应,用于 CMV 检测。

[0310] 使用 TissueDirect™ Multiplex PCR 系统 (GenScript Corporation, Piscataway, NJ) 根据生产商的使用说明运行定性 PCR 检测,及通过凝胶电泳可视化。跨 10 种 CMV 基因的 29 种不同引物选自公开文献或用 Vector NTI Advance 9 软件 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 设计,及通过整合的 DNA Technologies (IDT, Coralville, IA) 合成。从 2~5 μ l 的样品 (全血,血清,或血浆) 提取 DNA,或将肿瘤组织小心加入各 50 μ l 的 PCR 反应。平行使用来自 CMV 血清阴性供体的样品及无 DNA 酶的水作为 PCR 阴性对照。于 94℃ 在 iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) 上运行 PCR 15 分钟,94℃ 40 秒钟,退火温度 1 分钟及 72℃ 1 分钟的 40 个循环,及通过于 72℃ 延伸 10 分钟来结束。PCR 产物通过在 1×TBE (Bio-Rad, Hercules, CA) 中的标准预凝固的 10% 的聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad (Cat#345-0053), Hercules, CA) 上电泳来可视化,及用 SYBR 金核酸凝胶染色 (Invitrogen (Cat#S11494), Carlsbad, CA) 染色。有关确认 CMV DNA 检测,用 QIAEXII (Qiagen, Valencia, CA), 根据生产商的流程从凝胶分离一些扩增的 DNA 条带,及在 Duke 大学综合癌中心 DNA 测序设备上测序。序列同一性分析使用 NCBI 数据库上的 BLAST,及使用 Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行样本比对分析。

[0311] 如表 1 中所示,患 GBM 的患者的外周血样品中 CMV 病毒血症的检测率变动于 12%~73.5%,取决于 PCR 测定中利用的引物。gB 基因 (例如, B-i1i2) 中的引物发现对于患 GBM 的患者外周血中 CMV 的检测最敏感。在对照泳道 (仅水) 中无病毒 DNA 检测,及正常自愿者外周血在几个重复测定之后对于病毒 DNA 检测为阴性 (包括 11CMV 血清阳性自愿者的 17 个样品中的 0 个; $p = 8.4 \times 10^{-10}$; 费歇尔精确检验)。223 个血样品的扩展的同群中 (223 样品中 164 个阳性) CMV 检测率未显著不同于 20 个阳性血样品中 16 个的初始发现 ($p = 0.603$; 费歇尔精确检验) (数据未显示)。

[0312] 为评估扩增子尺寸对 CMV 检测率的效应,基于单独的扩增子尺寸,通过 Spearman 及 Pearson 相关系数分析比较就全部引物的患 GBM 的患者血中 CMV 的总体检测率。设计为给出 200bp 或以下的扩增子的引物也发现具有 CMV 检测及更可靠的扩增的更低阈值 (表 1)。例如,引物 gB E1E2 (扩增子尺寸 268), gBi1i2 (扩增子尺寸 144), 及 gBi3i4 (扩增子尺寸 122) 全部跨 gB 基因内的相同 DNA 区及区别仅在于引物组之间的距离。还用在其他 CMV 基因内的引物得到了更小的扩增子给出更高检测速度的观察。对于所评估的基因的独立研究的 29 个引物显示扩增子尺寸及检测率之间的反相关。Pearson 相关系数 ($r = -0.37622$) 及 Spearman 相关系数 ($r = -0.41523$ 均显著 (分别 $p = 0.0443$ 及 0.0251)。这些结果显示引物选择及扩增子尺寸对患 GBM 的患者外周血中 CMV DNA 的检测率的深刻的效应。

[0313] 为研究不经 DNA 纯化直接从样品 PCR 扩增的影响,将 BloodReady™ 试剂盒 (GenScript Corporation, Piscataway, NJ) 与 TissueDirect™ 试剂盒 (GenScript Corporation, Piscataway, NJ) 就从全血及肿瘤组织直接扩增 DNA 进行了比较。PCR 扩增可在 DNA 提取后直接从细胞裂解物进行,或从其他存在于细胞裂解物中的有机分子纯化 DNA 后进行。

[0314] 人组织手术后立即保持在冰上,及在小于半小时内切碎成 10mg 尺寸,然后在液氮中速冻,及保存于 -137℃ 直到使用。患者或正常血以每管 10 μ l 等分,及在液氮中速冻,及保存于 -137℃ 直到使用。

[0315] 基因组 DNA 制备：使用的 TissueDirect™ DNA 制备及扩增 PCR 试剂盒 (Cat#L00195 ;GenScript,Piscataway,NJ) :1. 于室温解冻缓冲液 TD-A,TD-B 及 TD-C 及解冻后放置在冰上 ;2. 对于各样品,将 5 μ l 的 TD-A 及 45 μ l 的 TD-B(1 : 9 比)混合,及旋转以产生 50 μ l 的裂解溶液 (TD-A/B) 每样品 ;3. 将 50 μ l 的裂解溶液 TD-A/B 加入各样品 10mg 的组织或 10 μ l 的血 (血清或血浆),及通过移液器吸吐或敲打 / 旋转管良好混合 ;4. 于 65℃ 温育样品至少 10 分钟直到发生样品的完全裂解 ;5. 从温育移出管,将 50 μ l 的 TD-C 加入各管,及良好混合 ;6. 以 ~ 14,000rpm 旋转样品至少 1 分钟 ;7. 于 4℃ 储存上清 (基因组 DNA 提取物) 或用 PCR 扩增处理 ;8. 在每样品 20 μ l 的 PCR 中使用 1.5 μ l 的基因组 DNA 提取物。

[0316] 【PCR 扩增】

[0317] A. 定性测量：用 TissueDirect™ DNA 制备及扩增 PCR 试剂盒 (Cat#L00195 ; GenScript,Piscataway,NJ) 或 HotMaster™ Taq PCR 系统 (Brinkmann, Westbury, NY) 进行 PCR 扩增：

[0318] 预混剂溶液显示于表 4。

[0319] 表 4 :预混剂

[0320]

GenScript Multiplex PCR 系统	1×
PCR H ₂ O	8.2 μ l
正义引物 (1 μ g/ μ l)	0.15 μ l
反义引物 (1 μ g/ μ l)	0.15 μ l
GenScript 2×PCR 预混剂	10 μ l
预混剂体积	18.5 μ l
待加入的基因组 DNA	1.5 μ l
总体积	20 μ l
退火温度	60℃

[0321] 将 1.5 μ l 的基因组 DNA 溶液加入 18.5 μ l 的显示于表 4 的预混剂,以每管给出 20 μ l 的 PCR 溶液。将 PCR 管放入 Bio-Rad iCycler(Bio-Rad,Milpitas,CA) 及如下循环 : 94℃ 5 分钟的 1 个循环 (变性) ;及 40 个循环的 :94℃ 40 秒钟 (变性) /60℃ 40 秒钟 (退火) /72℃ 40 秒钟 (延伸) /1 个循环的 72℃ 10 分钟 (延伸)。

[0322] B. 定量测量：实时 PCR 扩增用 iQ SYBR 绿色超混剂 (对于实时为 2× 混合剂, Bio-Rad Cat. #170-8880) 或 iQ 超混剂 (用于实时的 2× 超混剂, Bio-Rad Cat. #170-8860) :

[0323] 预混剂溶液显示于表 5。

[0324] 表 5 :预混剂

[0325]

GenScript PCR	1×
PCR _{H₂O}	16.7 μl
iQ SYBR 绿色超混剂或有基因特异性探针的 iQ 超混剂	20 μl
正义引物 (1ug/μl)	0.15 μl
反义引物 (1ug/μl)	0.15 μl
预混剂体积	37 μl
待加入的基因组 DNA	5 μl
总体积	40 μl
退火温度	60°C
PCR 产物 bp	

[0326] 将 3 μl 的基因组 DNA 加入 37 μl 的显示于表 5 的预混剂,以产生 40 μl 的 PCR 溶液。将 PCR 溶液放入 Byroad iCycler 及如下循环:1 个循环的 95°C 3 分钟(变性);及 40 个循环:94°C 30 秒钟(变性)/60°C 30 秒钟(退火)/72°C 30 秒钟(延伸)/1 个循环的 72°C 10 分钟(延伸)。

[0327] 扩增后,用标准曲线分析实时 PCR 产物,及数据用持家基因标准化。

[0328] PCR 产物检测:基本上如下使用 TBE (Cat. #345-0053 ;BioRad, Hercules, CA) 中的 Criterion™ 预凝固的 10% 凝胶 (26 孔, 15 μl/ 孔):将 1×TBE 缓冲液加入电泳室达填充线。每样品将 2.5 μl 的 DNA 装载缓冲液与 10 μl 的 PCR 产物混合以产生 12.5 μl 等份。将 1.5 μl 的 EZ DNA 分子量标准品 (100bp MW, BioRad Cat#170-8352, 0.05 μg/μl, 500 μl) 加入凝胶第一孔。将 12.5 μl 等份的 PCR 产物加入孔 2 ~ 26。凝胶于室温 (RT) 以 120 伏运行 2 小时。终结电泳及将各凝胶转移到 1×TBE 中的 25ml 的染色缓冲液 (SYBR 金核酸凝胶染色, Invitrogen/ 分子探针 Cat#511494)。凝胶于室温染色 15 分钟。使用不同曝光时间拍摄凝胶照片以记录及分析 PCR 产物。然后从凝胶切出各正确尺寸的 PCR 产物,及使用 QIAEX II (Qiagen, Valencia, CA) 提取 DNA。提取的 DNA 然后测序。

[0329] 如图 16 中所示, TissueDirect™ 试剂盒对于提供来自全血及肿瘤样品的干净的及不同扩增的条带是可靠的。也将小样品体积 (10 ~ 20 μL) 上使用 TissueDirect™ 试剂盒的 PCR 结果与 2 种商业 DNA 纯化试剂盒: **DNeasy®** (Qiagen, Valencia, CA) 及 **Gentra® PureGene®** (Qiagen, Valencia, CA) (它们对于 DNA 提取要求更大样品体积 (0.2ml ~ 1.0ml 的全血, 血清, 或血浆)) 比较。当使用 TissueDirect™ 试剂盒时, 相比从更大样品体积纯化 DNA, 发现病毒 DNA 检测下限中无差异 (未显示), 表明更简单的及更快的直接 DNA 提取方法等同有效及可优选, 特别是当样品体积有限时。从 GBM 患者血清的 HCMV

gp64 实时 PCR 的溶解曲线坐标图显示于图 17, 及从 GBM 患者血清的 HCMV gp64 实时 PCR 的 PCR 扩增循环坐标图显示于图 18。

[0330] 而且, 使用 1 : 5, 1 : 10, 及 1 : 20 的样品 : 缓冲液比比较了样品与组织裂解缓冲液的比, 及通过使用 gB 引物组 (B-ili2 ; 表 1) 在 34 个已知的阳性样品上 PCR 检测 CMV DNA 来评估。如表 6 中所示, 1 : 5 的样品与缓冲液比给出有适当尺寸 (122bp) 的强, 清晰条带的检测, 而其他比例或者给出降低的强度的条带信号或导致检测出非特异性条带。

[0331] 表 6 : CMV DNA 检测中提取缓冲液及缓冲液 : 样品比的比较。

[0332]

缓冲液	TissueDirect TD-A/B						Blood BR-A Ready		
比 (样品/缓冲液)	2:1	1:1	1:2	1:5	1:10	1:20	1:5	1:10	1:20
血	12/34	17/34	34/34	34/34	34/34	34/34	7/34	16/34	34/34
血浆	17/34	21/34	34/34	34/34	34/34	34/34	12/34	20/34	34/34
血清	20/34	24/34	34/34	34/34	34/34	34/34	14/34	23/34	34/34

[0333] 在全部病例中, 主条带对应于 gB 基因产物。而且, SYBR 金核酸凝胶染色 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 相比溴化乙锭染色给出病毒 DNA 条带的增强的可视化 (未显示)。选择 1 : 5 比用于全部随后分析。

[0334] 本文所述的单个步骤流程内从样品基因组 DNA 提取期间无病毒 DNA 的损失, 及这特异性地对于检测样品中低水平的病毒 DNA 是非常重要的, 由此节省珍贵的患者样品。对于全部血, 血清及组织采用 GenScript TissueDirect™ Multiplex PCR 系统以确保病毒 DNA 完全释放进入裂解缓冲液 (TD-A/B)。因此, 我们能获得无病毒 DNA 损失及限制针对 PCR 的抑制剂。而且, 设计 PCR 引物以制备有高基因特异性的更小的扩增子 (小于 200bp), 及无与人基因组的交叉结合, 用于在高人基因组含量内更有效及敏感的 PCR 扩增, 及无纯化, 以移除针对 PCR 的抑制剂。PCR 条件以非常低水平的靶 DNA 扩增基因特异性产物。相比常规用溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳后检测灵敏度增加至少 10 倍。将 SYBR 金染色及数字照片一并优化, 由此避免将分离的 PCR 产物从琼脂糖凝胶转移到用于基因特异性探针杂交的膜, 以检测病毒 DNA 或 NEST PCR。

[0335] 【实施例 13】定量 CMV 检测

[0336] 为提供用于特异性地测量患者样品中的 CMV DNA 水平的定量 PCR 测定, 就定量 CMV DNA 拷贝数使用实时 PCR 评价了添加了 CMV 全基因组 DNA 的全血中的 15 种基因 - 特异性引物及探针组合 (表 2) 的作为阳性对照标准物。

[0337] 在 **TaqMan®** Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 中根据生产商的使用说明运行实时 PCR 检测。跨 5 种 CMV 基因的 15 种不同基因 - 特异性引物 & 探针组选自公开文献或在实验室用引物 3.0 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 设计, 及通过集成的 DNA 技术 (IDT, Coralville, IA) 合成。将来自 2 ~ 5 μ l 的样品 (全血, 血清, 或血浆) 的 DNA 加入各 50 μ l PCR 反应。PCR 在 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) 上根据生产商的标准流程以指定的退火温度运行。拷贝数用 SDS 2.3 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 基于标准曲线从 CMV 定量的病毒 DNA 分析。

[0338] 如表 2 中所示, gB 引物 / 探针组 gB21/22/23 显示 : 用于使用基因组 CMV DNA 的有限稀释液检测 CMV 标准品的最低阈值, 来自患 GBM 的患者的外周血样本中 CMV DNA 检测的

最大频率,及评估的探针及引物组的最早的对数扩增循环 (Ct 值)。

[0339] 评估的 15 种引物 / 探针组合中有显著不同的 Ct 值, Ct 值变动于 31.5 ~ 38.1。此显示检测血中同一浓度的 CMV DNA 标准品中各引物 / 探针的灵敏度中超过 100 倍的差异。引物 / 探针组之间的灵敏度差异导致使用欠敏感的探针组合以有限水平的 CMV 标准品假阴性及也导致来自患 GBM 的患者的血样品中的假阴性 (表 2)。

[0340] 【实施例 14】经历同种异体骨髓移植物的患者中病毒复活的检测

[0341] 为进一步检查描述于实施例 12 及 13 的定性和 / 或定量 PCR 方法, 就经历同种异体骨髓移植 (aBMT) 后的病毒复活, 评价了连续监控患者中 CMV 病毒血症的检测。

[0342] 使用本发明的定性及定量 PCR 测定, 及也在 Duke 临床微生物学实验室使用 CMV UL54 分析物 - 特异性试剂 (ASR) 测试 (Roche 诊断, Indianapolis, IN) 评价了 aBMT 后从 5 名患者连续得到的 30 个血清样品。测试实验室盲于 ASR 测试结果, 及通过凝胶电泳分析后定性实验室 PCR 测定评价患者样品是否它们是阳性或阴性, 及使用定量实验室 PCR 测定测定了拷贝数 / ml 的血中病毒载量。

[0343] 由 Duke 大学医学中心的临床微生物学实验室进行通过 ASR 测试的 CMV DNA 检测, 及定性及定量 PCR 测试显示于表 7。

[0344] 表 7 : 实验室 PCR 测试与诊断性 PCR 测定的比较

[0345]

#	患者	收集日	Roche UL54 ASR	实验室定量 PCR gB	实验室定性 PCR gB
1	AB	6 月 20 日	1121	424	阳性
2	AB	6 月 27 日	2998	254	阳性
3	AB	7 月 4 日	3150	237	阳性
4	AW	1 月 10 日	0	187	阳性
5	AW	2 月 7 日	0	45	阳性
6	BH	5 月 30 日	0	0	阴性
7	BH	6 月 6 日	0	0	阴性
8	BH	6 月 13 日	0	0	阴性
9	BH	6 月 20 日	0	375	阳性
10	BH	6 月 27 日	0	0	阴性
11	BH	7 月 4 日	0	0	阴性
12	BH	7 月 11 日	0	0	阴性
13	BH	7 月 18 日	0	1781	阳性
14	BH	7 月 25 日	0	196	阳性

15	BH	8 月 1 日	1561	262	阳性
16	FD	6 月 27 日	0	0	阴性
17	FD	7 月 11 日	0	0	阴性
18	FD	7 月 18 日	0	0	阴性
19	FD	7 月 25 日	6335	649	阳性
20	FD	8 月 1 日	5705	1640	阳性
21	JAG	5 月 10 日	0	0	阴性
22	JAG	7 月 18 日	0	0	阳性
23	JAG	7 月 25 日	0	0	阴性
24	JAG	8 月 1 日	0	305	阴性
25	OptiQuant	5,000	nt	206	阳性
26	OptiQuant	500,000	nt	7739	阳性
27	TB	6 月 27 日	0	0	阳性
28	TB	7 月 6 日	0	0	阳性
29	TB	7 月 25 日	0	0	阴性
30	TB	8 月 1 日	0	0	阴性

[0346] 通过凝胶电泳后分离 DNA 条带及 DNA 测序确认阳性结果,表明通过我们的 PCR 测试无假阳性。分析后,通过 ASR 测试的来自这些患者的临床诊断性评估的结果不盲。PCR 测试在认为是阳性的 CMV 病毒血症的全部病例中是阳性的,通过由临床微生物学实验室进行的 Roche CMV UL54 ASR qPCR 测试表明,通过本发明的 PCR 测试无假阴性。但是,本发明的 PCR 测试在通过临床诊断性测试检测病毒复活之前在几个患者样品中检测病毒 DNA(表 7)。有时,病毒血症在第一阳性结果之前 6 周通过临床诊断性测定检测。这些结果通过扩增的条带的 DNA 测序确认为真阳性,及使用 NCBI DNA 数据库鉴定为 CMV。

[0347] 这些结果显示,本发明的实验室 PCR 方法对于检测 CMV DNA 是精确的,及能检测经历 Roche UL54ASP 测定的检测阈值以下的 aBMT 的患者中的病毒复活。这些结果强调显示此测定作为更容易,更快的,及更敏感检测测定 CMV DNA 检测的实用性,及保证进一步研究以确证此测定用于预防性监控处于 CMV 疾病风险的患者,以及研究 CMV 与疾病(例如恶性肿瘤及动脉粥样硬化)的关联关系(其中检测已有争议)的用途。

[0348] 【实施例 15】来自 GBM 肿瘤样本的 gB(UL55)DNA 测序鉴定病毒基因型

[0349] 通过 gB(UL55)基因的株可变区的 PCR 扩增及 DNA 测序研究与 GBM 肿瘤相关的病毒株同一性。使用 gBi1i2 引物组扩增来自 22 个手术切除的 GBM 样本的 CMV gB DNA,通过

凝胶电泳分析 DNA, 及将扩增的条带切下及使其经历 DNA 测序。使用 NCBI DNA 数据库就序列同一性及与 CMV gB 匹配的全部 DNA 搜索 DNA 序列。通过检查 NCBI 数据库就 DNA 序列同一性测定株同一性及 gB 家族。有最高程度的同源性的株列于表 8。

[0350] 表 8 : 对于 22 名 GBM 患者的 HCMV gB₁₁₁₂ PCR 序列的同一性和株

[0351]

患者	同一性%相比 1T(88bp)	同一性%相比 17T (85bp)	同一性%相比 20T (99bp)	同一性%相比 21T (99bp)	株	gB 亚型
1T	100	99	91	90	Merlin N1	gB1 (97%)
2T	91	92	86	87	Merlin N1	gB1 (86%)
3T	92	94	90	91	Towne	gB1 (90%)
4T	94	96	94	89	AD169 N12	gB2 (92%)
5T	95	99	94	92	Merlin Towne N1	gB1 (94%)
6T	93	95	91	88	AD169 N12	gB2 (93%)
7T	95	96	90	93	Merlin Towne N1	gB1 (92%)
8T	94	95	88	90	Merlin N1	gB1 (97%)
9T	93	95	91	86	AD169 N12	gB2 (96%)
10T	96	98	90	93	Towne	gB1 (96%)
11T	96	100	92	89	Merlin Towne N1	gB1 (93%)
12T	98	96	89	91	Merlin N1	gB1 (95%)
13T	88	90	83	84	Merlin N1	gB1 (92%)
14T	100	99	90	89	Merlin N1	gB1 (96%)
15T	96	100	92	93	Merlin N1	gB1 (97%)
16T	94	96	97	92	AD169 N12	gB2 (95%)
17T	99	100	95	94	Towne	gB1 (97%)
18T	92	94	91	89	AD169 N12	gB2 (91%)
19T	94	98	94	93	Towne	gB1 (95%)
20T	91	95	100	89	AD169 N12	gB2 (94%)
21T	90	94	89	100	Towne	gB1 (93%)
22T	88	90	86	94	Merlin N1	gB1 (93%)

[0352] 来自 GBM 样本的病毒 DNA 序列比对揭示有 DNA 临床分离物之间的序列变化达 17% 的来自 GBM 样本的独特病毒分离物 (图 19 ; 及表 8)。也进行扩增的病毒 DNA gB 序列与 NCBI 数据库内的 gB 基因序列的比较, 及与 gB 基因型的最高程度的同源性列于表 8。揭示了与多于一种 gB 基因型的同源性的同一程度的情况, 病毒株同一性用于测定 gB 基因型。几种

分离物与多于一种株的 CMV 具有相同程度的同源性,及因此列出。来自 GBM 样本的株发现与 Merlin(gB 1 同种型), N1(gB 1 同种型), Towne(gB 1 同种型), AD169(gB 2 同种型), 及 N12(gB 2 同种型) 株的 CMV 同源,表明在肿瘤样本中检测出不同病毒分离物,及也表明 GBM 肿瘤允许被 gB1 及 gB2 家族基因型的 CMV 病毒感染。观察到的 gB 基因型分布是 gB1 16/22(72.7%);gB26/22(27.3%)。

[0353] 这些结果至少展示, GBM 样本更频繁地被 gB1 基因型的 CMV 株感染。几种患者肿瘤样品隔月再分析,始于从冷冻保存的全血或肿瘤样本 DNA 提取,PCR 扩增,及 gB 扩增子的 DNA 测序,及得到同一病毒序列展示这些样品中病毒鉴定的保真度。

[0354] CMV 与各疾病状态之间的关联关系的一致的检测已有争议,以由各实验室对于病理学损伤内有病毒 DNA 及蛋白的报到的冲突的发现。以上实施例说明基于 PCR 的测定及手术切除的 GBM 样本中检测的 22 种 CMV 临床株的株同一性。根据本发明的用于可靠的 CMV 检测的 CMV PCR 测试的开发也可尤其辅助研究 CMV 在神经胶质瘤发展及进展中起到的作用。发现 GBM 肿瘤被匹配 gB1 及 gB2 基因型(主要是 gB1 型)病毒株感染。gB1 基因型是见于美国临床 CMV 感染的最普遍的病毒家族,但缺失任何用匹配 gB3 或 gB4 基因型的临床株的最高程度的同源性的检测提示,可有对于恶性神经胶质瘤的 CMV 感染的限制的向性。

[0355] 肿瘤样本中病毒 DNA 的检测不是平凡的问题,甚至在已良好建立关联关系的肿瘤(例如人乳头状瘤病毒相关的宫颈癌)的情况下,且检测可常在通过标准 PCR 测定的灵敏度限制或其以下。如上所述,测定增强患新-诊断的 GBM 的患者的血及肿瘤中的低水平的病毒 DNA 的检测的几种参数。

[0356] 跨 gB 基因内的相同 DNA 区且区别仅在于引物组之间的距离的引物展示扩增子尺寸依赖性病毒 DNA 检测频度。在此区内具有最小扩增子尺寸的 gBi1i2 及 gB-i3i4 也给出最高检测率,表明假阴性结果可由更大 DNA 片段的无效的扩增所致,且不是当病毒 DNA 可有限时样品中病毒 DNA 的缺乏所致。跨 11 种不同基因的 29 种独立来源的 CMV 引物组的分析展示扩增子尺寸与 CMV DNA 检测率之间的反相关。这些结果提示,通过其他有限量的病毒 DNA 的假阴性 PCR 检测可由于无效的提取及扩增条件所致,且不可必然被认为是结论性的。而且,提取及扩增条件可解释假阴性导致病毒 DNA 检测。

[0357] 大部分扩增产物通过 DNA 测序确认,且在全部病例中,CMV 特异性 DNA 扩增。而且,为从样品更有效释放病毒 DNA,将血在液氮中速冻,然后在添加裂解缓冲液后,以相比推荐的温度 65℃ 的更高温度(95℃),通过 TissueDirect™ 试剂盒温育。也为浓缩 DNA 及消除常存在于粗样品提取物中的 PCR 抑制剂,在 DNA 提取后合并 EtOH 沉淀步骤。就定性 PCR 而言,聚丙烯酰胺凝胶与 SYBR 金染色的组合提供相比用溴化乙锭染色的常规琼脂糖凝胶至少 10 倍的增加的 PCR 检测灵敏度。此增加的灵敏度使不使用更集约化的流程(例如套式 PCR 或印迹的 DNA 的基因特异性探针杂交)而检测。此测定具有能利用小体积的样本(10~20 μL) 的附加的优势,使样品的重复分析及可有限的患者样品的保存。此外,经历骨髓移植的患者中的评估展示测定能相比目前可用的诊断性 PCR 测试早先检测免疫抑制的患者中的病毒复活。

[0358] 已报道, CMV 在许多疾病过程包括癌,动脉粥样硬化,及炎性肠病中具有关联关系及可能的病原性作用。但是,CMV 及这些疾病的检测在研究者的实验室之间有变化显著。可利用小体积的血及组织样本的相对简单及增强的扩增检测方法可使 CMV 与所述疾病过程

的关联关系的更可靠的确定。

[0359] 【序列表】

[0360] <110>Duke University

[0361] Sampson, John

[0362] Mitchell, Duane

[0363] <120> 用于引发免疫应答的组合物, 方法及试剂盒

[0364] <130>D118 1050PCT

[0365] <150>61/074, 582

[0366] <151>2008-06-20

[0367] <160>109

[0368] <170>PatentIn 版 3.5

[0369] <210>1

[0370] <211>561

[0371] <212>PRT

[0372] <213> 人巨细胞病毒

[0373] <400>1

[0374] Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly

[0375] 1 5 10 15

[0376] Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr

[0377] 20 25 30

[0378] Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val

[0379] 35 40 45

[0380] Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp

[0381] 50 55 60

[0382] Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr

[0383] 65 70 75 80

[0384] Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn

[0385] 85 90 95

[0386] Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr

[0387] 100 105 110

[0388] Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val

[0389] 115 120 125

[0390] His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val

[0391] 130 135 140

[0392] Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg

[0393] 145 150 155 160

[0394] Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys

[0395] 165 170 175

[0396] Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp

[0397]	180	185	190
[0398]	Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met		
[0399]	195	200	205
[0400]	Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val		
[0401]	210	215	220
[0402]	Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu		
[0403]	225	230	235
[0404]	Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met		
[0405]	245	250	255
[0406]	Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe		
[0407]	260	265	270
[0408]	Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser		
[0409]	275	280	285
[0410]	His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu		
[0411]	290	295	300
[0412]	Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu		
[0413]	305	310	315
[0414]	Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr		
[0415]	325	330	335
[0416]	Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp		
[0417]	340	345	350
[0418]	Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr		
[0419]	355	360	365
[0420]	Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr		
[0421]	370	375	380
[0422]	Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp		
[0423]	385	390	395
[0424]	Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys		
[0425]	405	410	415
[0426]	Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser		
[0427]	420	425	430
[0428]	Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser		
[0429]	435	440	445
[0430]	Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro		
[0431]	450	455	460
[0432]	Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala		
[0433]	465	470	475
[0434]	Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu		
[0435]	485	490	495

[0436] Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu
 [0437] 500 505 510
 [0438] Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu
 [0439] 515 520 525
 [0440] Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln
 [0441] 530 535 540
 [0442] Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg
 [0443] 545 550 555 560
 [0444] Gly
 [0445] <210>2
 [0446] <211>906
 [0447] <212>PRT
 [0448] <213> 人巨细胞病毒
 [0449] <400>2
 [0450] Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile
 [0451] 1 5 10 15
 [0452] Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr
 [0453] 20 25 30
 [0454] Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln
 [0455] 35 40 45
 [0456] Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser
 [0457] 50 55 60
 [0458] His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp
 [0459] 65 70 75 80
 [0460] Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met
 [0461] 85 90 95
 [0462] Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr
 [0463] 100 105 110
 [0464] Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val
 [0465] 115 120 125
 [0466] Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln
 [0467] 130 135 140
 [0468] Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr
 [0469] 145 150 155 160
 [0470] Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile
 [0471] 165 170 175
 [0472] His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val
 [0473] 180 185 190
 [0474] Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn

[0475]	195	200	205
[0476]	Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr		
[0477]	210	215	220
[0478]	Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp		
[0479]	225	230	235
[0480]	Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr		
[0481]	245	250	255
[0482]	Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp		
[0483]	260	265	270
[0484]	Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser		
[0485]	275	280	285
[0486]	Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr		
[0487]	290	295	300
[0488]	Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg		
[0489]	305	310	315
[0490]	Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile		
[0491]	325	330	335
[0492]	Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser		
[0493]	340	345	350
[0494]	Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser		
[0495]	355	360	365
[0496]	Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met		
[0497]	370	375	380
[0498]	Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu		
[0499]	385	390	395
[0500]	Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly		
[0501]	405	410	415
[0502]	Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln		
[0503]	420	425	430
[0504]	Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg		
[0505]	435	440	445
[0506]	Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Arg Thr Arg Arg Ser Thr Ser Asp Asn		
[0507]	450	455	460
[0508]	Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr		
[0509]	465	470	475
[0510]	Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg		
[0511]	485	490	495
[0512]	Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr		
[0513]	500	505	510

[0514]	Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu
[0515]	515 520 525
[0516]	Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val
[0517]	530 535 540
[0518]	Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val
[0519]	545 550 555 560
[0520]	Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg
[0521]	565 570 575
[0522]	Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly
[0523]	580 585 590
[0524]	Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu
[0525]	595 600 605
[0526]	Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala
[0527]	610 615 620
[0528]	Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser
[0529]	625 630 635 640
[0530]	Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu
[0531]	645 650 655
[0532]	Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
[0533]	660 665 670
[0534]	Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
[0535]	675 680 685
[0536]	Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu
[0537]	690 695 700
[0538]	Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala
[0539]	705 710 715 720
[0540]	Ala Gly Lys Ala Val Gly Val Ala Ile Gly Ala Val Gly Gly Ala Val
[0541]	725 730 735
[0542]	Ala Ser Val Val Glu Gly Val Ala Thr Phe Leu Lys Asn Pro Phe Gly
[0543]	740 745 750
[0544]	Ala Phe Thr Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val Ile Ile Thr Tyr
[0545]	755 760 765
[0546]	Leu Ile Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Leu Cys Thr Gln Pro Leu Gln Asn
[0547]	770 775 780
[0548]	Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser Gly
[0549]	785 790 795 800
[0550]	Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser
[0551]	805 810 815
[0552]	Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala

[0553]	820	825	830
[0554]	Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu		
[0555]	835	840	845
[0556]	Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly		
[0557]	850	855	860
[0558]	Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln Lys		
[0559]	865	870	875
[0560]	Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His		
[0561]	885	890	895
[0562]	Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val		
[0563]	900	905	
[0564]	<210>3		
[0565]	<211>491		
[0566]	<212>PRT		
[0567]	<213> 人巨细胞病毒		
[0568]	<400>3		
[0569]	Met Glu Ser Ser Ala Lys Arg Lys Met Asp Pro Asp Asn Pro Asp Glu		
[0570]	1	5	10
[0571]	Gly Pro Ser Ser Lys Val Pro Arg Pro Glu Thr Pro Val Thr Lys Ala		
[0572]	20	25	30
[0573]	Thr Thr Phe Leu Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu		
[0574]	35	40	45
[0575]	Ser Leu Gly Asp Pro Leu Phe Pro Glu Leu Ala Glu Glu Ser Leu Lys		
[0576]	50	55	60
[0577]	Thr Phe Glu Gln Val Thr Glu Asp Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp		
[0578]	65	70	75
[0579]	Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val		
[0580]	85	90	95
[0581]	Arg His Arg Ile Lys Glu His Met Leu Lys Lys Tyr Thr Gln Thr Glu		
[0582]	100	105	110
[0583]	Glu Lys Phe Thr Gly Ala Phe Asn Met Met Gly Gly Cys Leu Gln Asn		
[0584]	115	120	125
[0585]	Ala Leu Asp Ile Leu Asp Lys Val His Glu Pro Phe Glu Glu Met Lys		
[0586]	130	135	140
[0587]	Cys Ile Gly Leu Thr Met Gln Ser Met Tyr Glu Asn Tyr Ile Val Pro		
[0588]	145	150	155
[0589]	Glu Asp Lys Arg Glu Met Trp Met Ala Cys Ile Lys Glu Leu His Asp		
[0590]	165	170	175
[0591]	Val Ser Lys Gly Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys		

[0592]	180	185	190
[0593]	Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys		
[0594]	195	200	205
[0595]	Tyr Arg Asn Ile Glu Phe Phe Thr Lys Asn Ser Ala Phe Pro Lys Thr		
[0596]	210	215	220
[0597]	Thr Asn Gly Cys Ser Gln Ala Met Ala Ala Leu Gln Asn Leu Pro Gln		
[0598]	225	230	235
[0599]	Cys Ser Pro Asp Glu Ile Met Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile		
[0600]	245	250	255
[0601]	Leu Asp Glu Glu Arg Asp Lys Val Leu Thr His Ile Asp His Ile Phe		
[0602]	260	265	270
[0603]	Met Asp Ile Leu Thr Thr Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr Lys		
[0604]	275	280	285
[0605]	Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu		
[0606]	290	295	300
[0607]	Leu Ser Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr		
[0608]	305	310	315
[0609]	Ser Val Met Leu Ala Lys Arg Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile		
[0610]	325	330	335
[0611]	Ser Val Met Lys Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala		
[0612]	340	345	350
[0613]	Gln Tyr Ile Leu Gly Ala Asp Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val		
[0614]	355	360	365
[0615]	Asp Asp Leu Arg Ala Ile Ala Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile		
[0616]	370	375	380
[0617]	Val Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu		
[0618]	385	390	395
[0619]	Val Ser Pro Pro Glu Ser Pro Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser		
[0620]	405	410	415
[0621]	Val Ile Val Ala Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp		
[0622]	420	425	430
[0623]	Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gln Glu Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser		
[0624]	435	440	445
[0625]	Val Lys Ser Glu Pro Val Ser Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu		
[0626]	450	455	460
[0627]	Glu Glu Asp Gly Ala Glu Glu Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr		
[0628]	465	470	475
[0629]	His Pro Met Val Thr Arg Ser Lys Ala Asp Gln		
[0630]	485	490	

[0631] <210>4
 [0632] <211>79
 [0633] <212>PRT
 [0634] <213> 人巨细胞病毒
 [0635] <400>4
 [0636] Met Leu Ser Val Met Val Ser Ser Ser Leu Val Leu Ile Val Phe Phe
 [0637] 1 5 10 15
 [0638] Leu Gly Ala Ser Glu Glu Ala Lys Pro Ala Thr Thr Thr Thr Ile Lys
 [0639] 20 25 30
 [0640] Asn Thr Lys Pro Gln Cys Arg Pro Glu Asp Tyr Ala Thr Arg Leu Gln
 [0641] 35 40 45
 [0642] Asp Leu Arg Val Thr Phe His Arg Val Lys Pro Thr Leu Val Gly His
 [0643] 50 55 60
 [0644] Val Gly Thr Val Tyr Cys Asp Gly Leu Ser Phe Pro Arg Val Gly
 [0645] 65 70 75
 [0646] <210>5
 [0647] <211>354
 [0648] <212>PRT
 [0649] <213> 人巨细胞病毒
 [0650] <400>5
 [0651] Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
 [0652] 1 5 10 15
 [0653] Asp Glu Asp Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser
 [0654] 20 25 30
 [0655] Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser
 [0656] 35 40 45
 [0657] Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile
 [0658] 50 55 60
 [0659] Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu
 [0660] 65 70 75 80
 [0661] Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His
 [0662] 85 90 95
 [0663] Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr
 [0664] 100 105 110
 [0665] Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp
 [0666] 115 120 125
 [0667] Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala
 [0668] 130 135 140
 [0669] Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile

[0670]	145	150	155	160
[0671]	Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp			
[0672]		165	170	175
[0673]	Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu			
[0674]		180	185	190
[0675]	Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr			
[0676]		195	200	205
[0677]	Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly			
[0678]		210	215	220
[0679]	Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe			
[0680]	225	230	235	240
[0681]	Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu			
[0682]		245	250	255
[0683]	Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala			
[0684]		260	265	270
[0685]	Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro			
[0686]		275	280	285
[0687]	Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys			
[0688]		290	295	300
[0689]	Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp			
[0690]	305	310	315	320
[0691]	Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu			
[0692]		325	330	335
[0693]	Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile			
[0694]		340	345	350
[0695]	Ile Pro			
[0696]	<210>6			
[0697]	<211>21			
[0698]	<212>DNA			
[0699]	<213> 人工序列			
[0700]	<220>			
[0701]	<223> 寡核苷酸			
[0702]	<400>6			
[0703]	tccaacaccc acagtaccg t		21	
[0704]	<210>7			
[0705]	<211>21			
[0706]	<212>DNA			
[0707]	<213> 人工序列			
[0708]	<220>			

[0709]	<223> 寡核苷酸	
[0710]	<400>7	
[0711]	cggaacgat ggtgtagttc g	21
[0712]	<210>8	
[0713]	<211>38	
[0714]	<212>DNA	
[0715]	<213> 人工序列	
[0716]	<220>	
[0717]	<223> 寡核苷酸	
[0718]	<400>8	
[0719]	cgccgcccgc cccgcgcccgc ccgcggcagc acctggct	38
[0720]	<210>9	
[0721]	<211>21	
[0722]	<212>DNA	
[0723]	<213> 人工序列	
[0724]	<220>	
[0725]	<223> 寡核苷酸	
[0726]	<400>9	
[0727]	gtaaaccaca tcacccgtgg a	21
[0728]	<210>10	
[0729]	<211>19	
[0730]	<212>DNA	
[0731]	<213> 人工序列	
[0732]	<220>	
[0733]	<223> 寡核苷酸	
[0734]	<400>10	
[0735]	gccgcggcag cacctggct	19
[0736]	<210>11	
[0737]	<211>18	
[0738]	<212>DNA	
[0739]	<213> 人工序列	
[0740]	<220>	
[0741]	<223> 寡核苷酸	
[0742]	<400>11	
[0743]	aaccacatca cccgtgga	18
[0744]	<210>12	
[0745]	<211>20	
[0746]	<212>DNA	
[0747]	<213> 人工序列	

- [0748] <220>
[0749] <223> 寡核苷酸
[0750] <400>12
[0751] taccctatc gcgtgtgttc 20
[0752] <210>13
[0753] <211>20
[0754] <212>DNA
[0755] <213> 人工序列
[0756] <220>
[0757] <223> 寡核苷酸
[0758] <400>13
[0759] ataggaggcg ccacgtattc 20
[0760] <210>14
[0761] <211>20
[0762] <212>DNA
[0763] <213> 人工序列
[0764] <220>
[0765] <223> 寡核苷酸
[0766] <400>14
[0767] taccctatc gcgtgtgttc 20
[0768] <210>15
[0769] <211>20
[0770] <212>DNA
[0771] <213> 人工序列
[0772] <220>
[0773] <223> 寡核苷酸
[0774] <400>15
[0775] cctcctataa cgcggctgta 20
[0776] <210>16
[0777] <211>20
[0778] <212>DNA
[0779] <213> 人工序列
[0780] <220>
[0781] <223> 寡核苷酸
[0782] <400>16
[0783] tccgaagccg aagactcgta 20
[0784] <210>17
[0785] <211>20
[0786] <212>DNA

[0787]	<213> 人工序列	
[0788]	<220>	
[0789]	<223> 寡核苷酸	
[0790]	<400>17	
[0791]	gatgtaaccg cgcaacgtgt	20
[0792]	<210>18	
[0793]	<211>18	
[0794]	<212>DNA	
[0795]	<213> 人工序列	
[0796]	<220>	
[0797]	<223> 寡核苷酸	
[0798]	<400>18	
[0799]	tttgagaaa acgccgac	18
[0800]	<210>19	
[0801]	<211>23	
[0802]	<212>DNA	
[0803]	<213> 人工序列	
[0804]	<220>	
[0805]	<223> 寡核苷酸	
[0806]	<400>19	
[0807]	cgcgcggaac tcggtttgtt gta	23
[0808]	<210>20	
[0809]	<211>20	
[0810]	<212>DNA	
[0811]	<213> 人工序列	
[0812]	<220>	
[0813]	<223> 寡核苷酸	
[0814]	<400>20	
[0815]	ccgcaacctg gtgcccatgg	20
[0816]	<210>21	
[0817]	<211>20	
[0818]	<212>DNA	
[0819]	<213> 人工序列	
[0820]	<220>	
[0821]	<223> 寡核苷酸	
[0822]	<400>21	
[0823]	cgtttgggtt gcgcagcggg	20
[0824]	<210>22	
[0825]	<211>22	

- [0826] <212>DNA
[0827] <213> 人工序列
[0828] <220>
[0829] <223> 寡核苷酸
[0830] <400>22
[0831] ttcggtcggg caacatcgta ag 22
[0832] <210>23
[0833] <211>22
[0834] <212>DNA
[0835] <213> 人工序列
[0836] <220>
[0837] <223> 寡核苷酸
[0838] <400>23
[0839] caccacgta tgtaaacctt ac 22
[0840] <210>24
[0841] <211>22
[0842] <212>DNA
[0843] <213> 人工序列
[0844] <220>
[0845] <223> 寡核苷酸
[0846] <400>24
[0847] agaaagatgt cctggcagaa ct 22
[0848] <210>25
[0849] <211>22
[0850] <212>DNA
[0851] <213> 人工序列
[0852] <220>
[0853] <223> 寡核苷酸
[0854] <400>25
[0855] cctcaggtac aatgtagttc tc 22
[0856] <210>26
[0857] <211>22
[0858] <212>DNA
[0859] <213> 人工序列
[0860] <220>
[0861] <223> 寡核苷酸
[0862] <400>26
[0863] agaaagatgt cctggcagaa ct 22
[0864] <210>27

[0865]	<211>22	
[0866]	<212>DNA	
[0867]	<213> 人工序列	
[0868]	<220>	
[0869]	<223> 寡核苷酸	
[0870]	<400>27	
[0871]	cctcaggtac aatgtagttc tc	22
[0872]	<210>28	
[0873]	<211>20	
[0874]	<212>DNA	
[0875]	<213> 人工序列	
[0876]	<220>	
[0877]	<223> 寡核苷酸	
[0878]	<400>28	
[0879]	cgtccttgac acgatggagt	20
[0880]	<210>29	
[0881]	<211>20	
[0882]	<212>DNA	
[0883]	<213> 人工序列	
[0884]	<220>	
[0885]	<223> 寡核苷酸	
[0886]	<400>29	
[0887]	attcttcggc caactctgga	20
[0888]	<210>30	
[0889]	<211>20	
[0890]	<212>DNA	
[0891]	<213> 人工序列	
[0892]	<220>	
[0893]	<223> 寡核苷酸	
[0894]	<400>30	
[0895]	ccctgataat cctgacgagg	20
[0896]	<210>31	
[0897]	<211>21	
[0898]	<212>DNA	
[0899]	<213> 人工序列	
[0900]	<220>	
[0901]	<223> 寡核苷酸	
[0902]	<400>31	
[0903]	catagtctgc aggaacgtcg t	21

- [0904] <210>32
[0905] <211>23
[0906] <212>DNA
[0907] <213> 人工序列
[0908] <220>
[0909] <223> 寡核苷酸
[0910] <400>32
[0911] caagcggcct ctgataacca agc 23
[0912] <210>33
[0913] <211>24
[0914] <212>DNA
[0915] <213> 人工序列
[0916] <220>
[0917] <223> 寡核苷酸
[0918] <400>33
[0919] ctcttcctct ggggcaactt cctc 24
[0920] <210>34
[0921] <211>23
[0922] <212>DNA
[0923] <213> 人工序列
[0924] <220>
[0925] <223> 寡核苷酸
[0926] <400>34
[0927] gggtgctgtc ctgctatgtc tta 23
[0928] <210>35
[0929] <211>23
[0930] <212>DNA
[0931] <213> 人工序列
[0932] <220>
[0933] <223> 寡核苷酸
[0934] <400>35
[0935] catcactctg ctcactttct tcc 23
[0936] <210>36
[0937] <211>25
[0938] <212>DNA
[0939] <213> 人工序列
[0940] <220>
[0941] <223> 寡核苷酸
[0942] <400>36

[0943]	cacctgtcac cgctgctata tttagc	25
[0944]	<210>37	
[0945]	<211>25	
[0946]	<212>DNA	
[0947]	<213> 人工序列	
[0948]	<220>	
[0949]	<223> 寡核苷酸	
[0950]	<400>37	
[0951]	caccacgcag cggcccttga tctttt	25
[0952]	<210>38	
[0953]	<211>18	
[0954]	<212>DNA	
[0955]	<213> 人工序列	
[0956]	<220>	
[0957]	<223> 寡核苷酸	
[0958]	<400>38	
[0959]	gacacaacac cgtaaagc	18
[0960]	<210>39	
[0961]	<211>16	
[0962]	<212>DNA	
[0963]	<213> 人工序列	
[0964]	<220>	
[0965]	<223> 寡核苷酸	
[0966]	<400>39	
[0967]	cagcggttcgt gttttcc	16
[0968]	<210>40	
[0969]	<211>20	
[0970]	<212>DNA	
[0971]	<213> 人工序列	
[0972]	<220>	
[0973]	<223> 寡核苷酸	
[0974]	<400>40	
[0975]	agcgcgtaca catagatcga	20
[0976]	<210>41	
[0977]	<211>22	
[0978]	<212>DNA	
[0979]	<213> 人工序列	
[0980]	<220>	
[0981]	<223> 寡核苷酸	

[0982]	<400>41	
[0983]	gctgatcttg gtatcgagt ac	22
[0984]	<210>42	
[0985]	<211>20	
[0986]	<212>DNA	
[0987]	<213> 人工序列	
[0988]	<220>	
[0989]	<223> 寡核苷酸	
[0990]	<400>42	
[0991]	agtggatgcac gttgatgctg	20
[0992]	<210>43	
[0993]	<211>20	
[0994]	<212>DNA	
[0995]	<213> 人工序列	
[0996]	<220>	
[0997]	<223> 寡核苷酸	
[0998]	<400>43	
[0999]	tcgctgatct tggatcgca	20
[1000]	<210>44	
[1001]	<211>20	
[1002]	<212>DNA	
[1003]	<213> 人工序列	
[1004]	<220>	
[1005]	<223> 寡核苷酸	
[1006]	<400>44	
[1007]	ctacacggta gcgacgagac	20
[1008]	<210>45	
[1009]	<211>23	
[1010]	<212>DNA	
[1011]	<213> 人工序列	
[1012]	<220>	
[1013]	<223> 寡核苷酸	
[1014]	<400>45	
[1015]	atgtttctag gctactctga ctg	23
[1016]	<210>46	
[1017]	<211>20	
[1018]	<212>DNA	
[1019]	<213> 人工序列	
[1020]	<220>	

[1021]	<223> 寡核苷酸	
[1022]	<400>46	
[1023]	gatccgaccc attgtctaag	20
[1024]	<210>47	
[1025]	<211>20	
[1026]	<212>DNA	
[1027]	<213> 人工序列	
[1028]	<220>	
[1029]	<223> 寡核苷酸	
[1030]	<400>47	
[1031]	ggcagctatc gtgactggga	20
[1032]	<210>48	
[1033]	<211>22	
[1034]	<212>DNA	
[1035]	<213> 人工序列	
[1036]	<220>	
[1037]	<223> 寡核苷酸	
[1038]	<400>48	
[1039]	gcctctgata atgctcatct gc	22
[1040]	<210>49	
[1041]	<211>22	
[1042]	<212>DNA	
[1043]	<213> 人工序列	
[1044]	<220>	
[1045]	<223> 寡核苷酸	
[1046]	<400>49	
[1047]	ggctagagta tgacgaccgc tt	22
[1048]	<210>50	
[1049]	<211>24	
[1050]	<212>DNA	
[1051]	<213> 人工序列	
[1052]	<220>	
[1053]	<223> 寡核苷酸	
[1054]	<400>50	
[1055]	tcgttggttg tgatgttgga cgcc	24
[1056]	<210>51	
[1057]	<211>24	
[1058]	<212>DNA	
[1059]	<213> 人工序列	

[1060]	<220>	
[1061]	<223> 寡核苷酸	
[1062]	<400>51	
[1063]	tgaagtgcaa ctgggcaatg agtg	24
[1064]	<210>52	
[1065]	<211>24	
[1066]	<212>DNA	
[1067]	<213> 人工序列	
[1068]	<220>	
[1069]	<223> 寡核苷酸	
[1070]	<400>52	
[1071]	cgttggtttgt gatgttggac gcct	24
[1072]	<210>53	
[1073]	<211>24	
[1074]	<212>DNA	
[1075]	<213> 人工序列	
[1076]	<220>	
[1077]	<223> 寡核苷酸	
[1078]	<400>53	
[1079]	tgaagtgcaa ctgggcaatg agtg	24
[1080]	<210>54	
[1081]	<211>24	
[1082]	<212>DNA	
[1083]	<213> 人工序列	
[1084]	<220>	
[1085]	<223> 寡核苷酸	
[1086]	<400>54	
[1087]	ttgtttgtga tgttggacgc ctgg	24
[1088]	<210>55	
[1089]	<211>24	
[1090]	<212>DNA	
[1091]	<213> 人工序列	
[1092]	<220>	
[1093]	<223> 寡核苷酸	
[1094]	<400>55	
[1095]	tgaagtgcaa ctgggcaatg agtg	24
[1096]	<210>56	
[1097]	<211>24	
[1098]	<212>DNA	

[1099]	<213> 人工序列	
[1100]	<220>	
[1101]	<223> 寡核苷酸	
[1102]	<400>56	
[1103]	atggttctta ggtgcgcata cggt	24
[1104]	<210>57	
[1105]	<211>24	
[1106]	<212>DNA	
[1107]	<213> 人工序列	
[1108]	<220>	
[1109]	<223> 寡核苷酸	
[1110]	<400>57	
[1111]	tgaagtgcaa ctgggcaatg agtg	24
[1112]	<210>58	
[1113]	<211>24	
[1114]	<212>DNA	
[1115]	<213> 人工序列	
[1116]	<220>	
[1117]	<223> 寡核苷酸	
[1118]	<400>58	
[1119]	aggctagagt atgacgaccg cttt	24
[1120]	<210>59	
[1121]	<211>24	
[1122]	<212>DNA	
[1123]	<213> 人工序列	
[1124]	<220>	
[1125]	<223> 寡核苷酸	
[1126]	<400>59	
[1127]	acggcacgta tgtatcgga cttt	24
[1128]	<210>60	
[1129]	<211>25	
[1130]	<212>DNA	
[1131]	<213> 人工序列	
[1132]	<220>	
[1133]	<223> 寡核苷酸	
[1134]	<400>60	
[1135]	ggatccgcat ggcattcacg tatgt	25
[1136]	<210>61	
[1137]	<211>25	

[1138]	<212>DNA	
[1139]	<213> 人工序列	
[1140]	<220>	
[1141]	<223> 寡核苷酸	
[1142]	<400>61	
[1143]	gaattcagtg gataacctgc ggcga	25
[1144]	<210>62	
[1145]	<211>19	
[1146]	<212>DNA	
[1147]	<213> 人工序列	
[1148]	<220>	
[1149]	<223> 寡核苷酸	
[1150]	<400>62	
[1151]	agcgtgccgt gtacgttac	19
[1152]	<210>63	
[1153]	<211>18	
[1154]	<212>DNA	
[1155]	<213> 人工序列	
[1156]	<220>	
[1157]	<223> 寡核苷酸	
[1158]	<400>63	
[1159]	ataaagacaa gcacgacc	18
[1160]	<210>64	
[1161]	<211>20	
[1162]	<212>DNA	
[1163]	<213> 人工序列	
[1164]	<220>	
[1165]	<223> 寡核苷酸	
[1166]	<400>64	
[1167]	aaagagctgc gttccagcaa	20
[1168]	<210>65	
[1169]	<211>20	
[1170]	<212>DNA	
[1171]	<213> 人工序列	
[1172]	<220>	
[1173]	<223> 寡核苷酸	
[1174]	<400>65	
[1175]	gaggtegctcc agacccttga	20
[1176]	<210>66	

[1177]	<211>26	
[1178]	<212>DNA	
[1179]	<213> 人工序列	
[1180]	<220>	
[1181]	<223> 寡核苷酸	
[1182]	<400>66	
[1183]	catgcgcgaa ttcaactcgt acaagc	26
[1184]	<210>67	
[1185]	<211>27	
[1186]	<212>DNA	
[1187]	<213> 人工序列	
[1188]	<220>	
[1189]	<223> 寡核苷酸	
[1190]	<400>67	
[1191]	atcgtgagac ctgtaatctg aactgta	27
[1192]	<210>68	
[1193]	<211>25	
[1194]	<212>DNA	
[1195]	<213> 人工序列	
[1196]	<220>	
[1197]	<223> 寡核苷酸	
[1198]	<400>68	
[1199]	ggaagttgca aaaaaatgat aagga	25
[1200]	<210>69	
[1201]	<211>24	
[1202]	<212>DNA	
[1203]	<213> 人工序列	
[1204]	<220>	
[1205]	<223> 寡核苷酸	
[1206]	<400>69	
[1207]	tgaccatcac tactgcgcgc tcca	24
[1208]	<210>70	
[1209]	<211>20	
[1210]	<212>DNA	
[1211]	<213> 人工序列	
[1212]	<220>	
[1213]	<223> 寡核苷酸	
[1214]	<400>70	
[1215]	ggctacggtt cagggtcaga	20

[1216]	<210>71	
[1217]	<211>16	
[1218]	<212>DNA	
[1219]	<213> 人工序列	
[1220]	<220>	
[1221]	<223> 寡核苷酸	
[1222]	<400>71	
[1223]	ccgggcaagg cgtctt	16
[1224]	<210>72	
[1225]	<211>23	
[1226]	<212>DNA	
[1227]	<213> 人工序列	
[1228]	<220>	
[1229]	<223> 寡核苷酸	
[1230]	<400>72	
[1231]	tgggacgcc aacgacatcta ccg	23
[1232]	<210>73	
[1233]	<211>17	
[1234]	<212>DNA	
[1235]	<213> 人工序列	
[1236]	<220>	
[1237]	<223> 寡核苷酸	
[1238]	<400>73	
[1239]	gcgcacgagc tggtttg	17
[1240]	<210>74	
[1241]	<211>25	
[1242]	<212>DNA	
[1243]	<213> 人工序列	
[1244]	<220>	
[1245]	<223> 寡核苷酸	
[1246]	<400>74	
[1247]	acaccttgac gtactggtca cctat	25
[1248]	<210>75	
[1249]	<211>21	
[1250]	<212>DNA	
[1251]	<213> 人工序列	
[1252]	<220>	
[1253]	<223> 寡核苷酸	
[1254]	<400>75	

[1255]	acgcgcgcaa ccaagatgca g	21
[1256]	<210>76	
[1257]	<211>24	
[1258]	<212>DNA	
[1259]	<213> 人工序列	
[1260]	<220>	
[1261]	<223> 寡核苷酸	
[1262]	<400>76	
[1263]	acacatagat cgacatgggc tcct	24
[1264]	<210>77	
[1265]	<211>24	
[1266]	<212>DNA	
[1267]	<213> 人工序列	
[1268]	<220>	
[1269]	<223> 寡核苷酸	
[1270]	<400>77	
[1271]	tgcaggtgca gcacacgtac ttta	24
[1272]	<210>78	
[1273]	<211>25	
[1274]	<212>DNA	
[1275]	<213> 人工序列	
[1276]	<220>	
[1277]	<223> 寡核苷酸	
[1278]	<400>78	
[1279]	ttgtgcacgt tgaccgacac gttct	25
[1280]	<210>79	
[1281]	<211>15	
[1282]	<212>DNA	
[1283]	<213> 人工序列	
[1284]	<220>	
[1285]	<223> 寡核苷酸	
[1286]	<400>79	
[1287]	tcgcgcccga agagg	15
[1288]	<210>80	
[1289]	<211>17	
[1290]	<212>DNA	
[1291]	<213> 人工序列	
[1292]	<220>	
[1293]	<223> 寡核苷酸	

[1294]	<400>80	
[1295]	cggccggatt gtggatt	17
[1296]	<210>81	
[1297]	<211>23	
[1298]	<212>DNA	
[1299]	<213> 人工序列	
[1300]	<220>	
[1301]	<223> 寡核苷酸	
[1302]	<400>81	
[1303]	caccgacgag gattccgaca acg	23
[1304]	<210>82	
[1305]	<211>19	
[1306]	<212>DNA	
[1307]	<213> 人工序列	
[1308]	<220>	
[1309]	<223> 寡核苷酸	
[1310]	<400>82	
[1311]	gcagccacgg gatcgtact	19
[1312]	<210>83	
[1313]	<211>23	
[1314]	<212>DNA	
[1315]	<213> 人工序列	
[1316]	<220>	
[1317]	<223> 寡核苷酸	
[1318]	<400>83	
[1319]	ggcttttacc tcacacgagc att	23
[1320]	<210>84	
[1321]	<211>20	
[1322]	<212>DNA	
[1323]	<213> 人工序列	
[1324]	<220>	
[1325]	<223> 寡核苷酸	
[1326]	<400>84	
[1327]	cgcgagaccg tggaactgcg	20
[1328]	<210>85	
[1329]	<211>20	
[1330]	<212>DNA	
[1331]	<213> 人工序列	
[1332]	<220>	

[1333]	<223> 寡核苷酸	
[1334]	<400>85	
[1335]	gtcagcgttc gtgtttccca	20
[1336]	<210>86	
[1337]	<211>20	
[1338]	<212>DNA	
[1339]	<213> 人工序列	
[1340]	<220>	
[1341]	<223> 寡核苷酸	
[1342]	<400>86	
[1343]	gggacacaac accgtaaagc	20
[1344]	<210>87	
[1345]	<211>23	
[1346]	<212>DNA	
[1347]	<213> 人工序列	
[1348]	<220>	
[1349]	<223> 寡核苷酸	
[1350]	<400>87	
[1351]	cccgaaccc gcaacccttc atg	23
[1352]	<210>88	
[1353]	<211>20	
[1354]	<212>DNA	
[1355]	<213> 人工序列	
[1356]	<220>	
[1357]	<223> 寡核苷酸	
[1358]	<400>88	
[1359]	gcggtagac gggcaaatac	20
[1360]	<210>89	
[1361]	<211>21	
[1362]	<212>DNA	
[1363]	<213> 人工序列	
[1364]	<220>	
[1365]	<223> 寡核苷酸	
[1366]	<400>89	
[1367]	ggcgtcgaga tgttcgtaga g	21
[1368]	<210>90	
[1369]	<211>25	
[1370]	<212>DNA	
[1371]	<213> 人工序列	

[1372]	<220>	
[1373]	<223> 寡核苷酸	
[1374]	<400>90	
[1375]	caccatcgac accacaccct catga	25
[1376]	<210>91	
[1377]	<211>21	
[1378]	<212>DNA	
[1379]	<213> 人工序列	
[1380]	<220>	
[1381]	<223> 寡核苷酸	
[1382]	<400>91	
[1383]	cagcgtgccg tgtacgttac t	21
[1384]	<210>92	
[1385]	<211>24	
[1386]	<212>DNA	
[1387]	<213> 人工序列	
[1388]	<220>	
[1389]	<223> 寡核苷酸	
[1390]	<400>92	
[1391]	gtgcaatctc cgtgataaaa caca	24
[1392]	<210>93	
[1393]	<211>30	
[1394]	<212>DNA	
[1395]	<213> 人工序列	
[1396]	<220>	
[1397]	<223> 寡核苷酸	
[1398]	<400>93	
[1399]	actgcctggtt tctacgtggc tatgtttgcc	30
[1400]	<210>94	
[1401]	<211>22	
[1402]	<212>DNA	
[1403]	<213> 人工序列	
[1404]	<220>	
[1405]	<223> 寡核苷酸	
[1406]	<400>94	
[1407]	tggtatggtt tgccagtttg tg	22
[1408]	<210>95	
[1409]	<211>25	
[1410]	<212>DNA	

[1411]	<213> 人工序列	
[1412]	<220>	
[1413]	<223> 寡核苷酸	
[1414]	<400>95	
[1415]	caggccgata tctcatgtaa acaat	25
[1416]	<210>96	
[1417]	<211>28	
[1418]	<212>DNA	
[1419]	<213> 人工序列	
[1420]	<220>	
[1421]	<223> 寡核苷酸	
[1422]	<400>96	
[1423]	tttatcacgg agattgcact cgatecgt	28
[1424]	<210>97	
[1425]	<211>27	
[1426]	<212>DNA	
[1427]	<213> 人工序列	
[1428]	<220>	
[1429]	<223> 寡核苷酸	
[1430]	<400>97	
[1431]	gatgcaatac ctccctagatc acaactc	27
[1432]	<210>98	
[1433]	<211>23	
[1434]	<212>DNA	
[1435]	<213> 人工序列	
[1436]	<220>	
[1437]	<223> 寡核苷酸	
[1438]	<400>98	
[1439]	gcaaacatag ccacgtagaa aca	23
[1440]	<210>99	
[1441]	<211>27	
[1442]	<212>DNA	
[1443]	<213> 人工序列	
[1444]	<220>	
[1445]	<223> 寡核苷酸	
[1446]	<400>99	
[1447]	ccagcgtgcc gtgtacgtta ctactg	27
[1448]	<210>100	
[1449]	<211>21	

[1450]	<212>DNA	
[1451]	<213> 人工序列	
[1452]	<220>	
[1453]	<223> 寡核苷酸	
[1454]	<400>100	
[1455]	aagcgctgga tacacggtac a	21
[1456]	<210>101	
[1457]	<211>26	
[1458]	<212>DNA	
[1459]	<213> 人工序列	
[1460]	<220>	
[1461]	<223> 寡核苷酸	
[1462]	<400>101	
[1463]	gaatacagac acttagagct cggggt	26
[1464]	<210>102	
[1465]	<211>25	
[1466]	<212>DNA	
[1467]	<213> 人工序列	
[1468]	<220>	
[1469]	<223> 寡核苷酸	
[1470]	<400>102	
[1471]	ctggccagca cgtatcccaa cagca	25
[1472]	<210>103	
[1473]	<211>24	
[1474]	<212>DNA	
[1475]	<213> 人工序列	
[1476]	<220>	
[1477]	<223> 寡核苷酸	
[1478]	<400>103	
[1479]	caagaactca gccttccta agac	24
[1480]	<210>104	
[1481]	<211>20	
[1482]	<212>DNA	
[1483]	<213> 人工序列	
[1484]	<220>	
[1485]	<223> 寡核苷酸	
[1486]	<400>104	
[1487]	tgaggcaagt tctgcaatgc	20
[1488]	<210>105	

[1489]	<211>23	
[1490]	<212>DNA	
[1491]	<213> 人工序列	
[1492]	<220>	
[1493]	<223> 寡核苷酸	
[1494]	<400>105	
[1495]	ccaatggctg cagtcaggcc atg	23
[1496]	<210>106	
[1497]	<211>24	
[1498]	<212>DNA	
[1499]	<213> 人工序列	
[1500]	<220>	
[1501]	<223> 寡核苷酸	
[1502]	<400>106	
[1503]	cagattaagg ttcgagtgga catg	24
[1504]	<210>107	
[1505]	<211>21	
[1506]	<212>DNA	
[1507]	<213> 人工序列	
[1508]	<220>	
[1509]	<223> 寡核苷酸	
[1510]	<400>107	
[1511]	aggcgccagt gaatttctct t	21
[1512]	<210>108	
[1513]	<211>26	
[1514]	<212>DNA	
[1515]	<213> 人工序列	
[1516]	<220>	
[1517]	<223> 寡核苷酸	
[1518]	<400>108	
[1519]	tgcgcatag aatcaaggag cacatg	26
[1520]	<210>109	
[1521]	<211>9	
[1522]	<212>PRT	
[1523]	<213> 人工序列	
[1524]	<220>	
[1525]	<221> 肽	
[1526]	<222>(1)..(9)	
[1527]	<400>109	

[1528] Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

[1529] 1 5

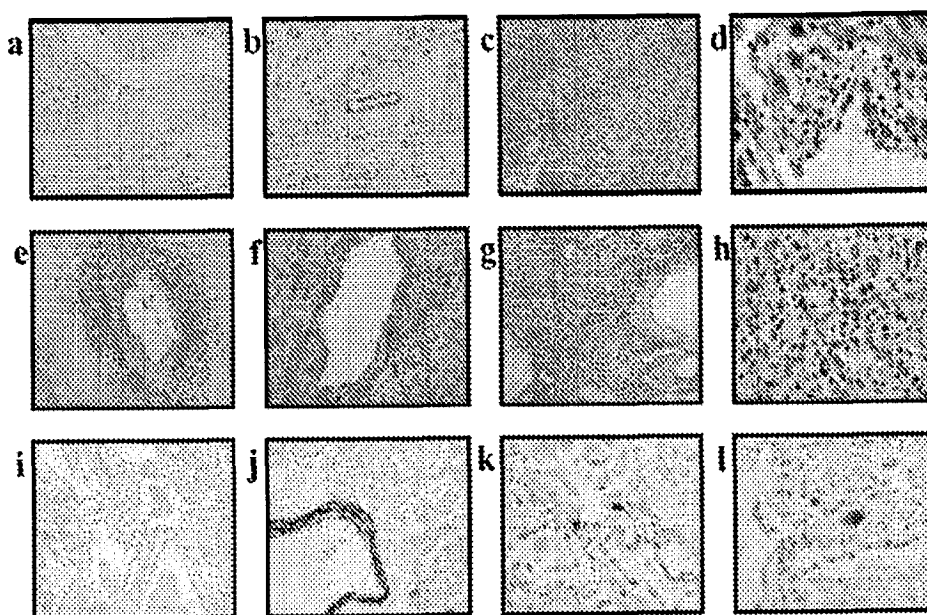


图 1A

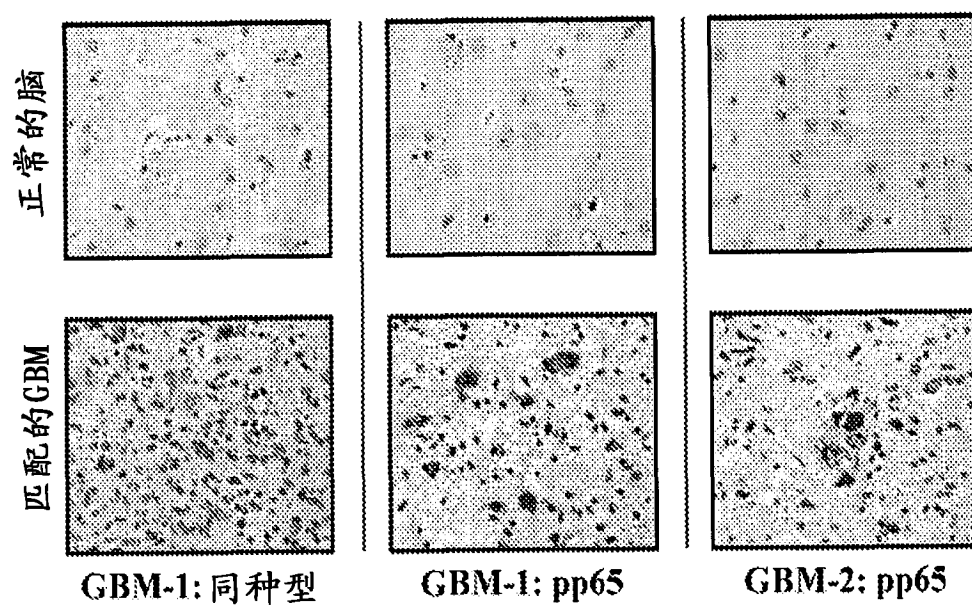


图 1B

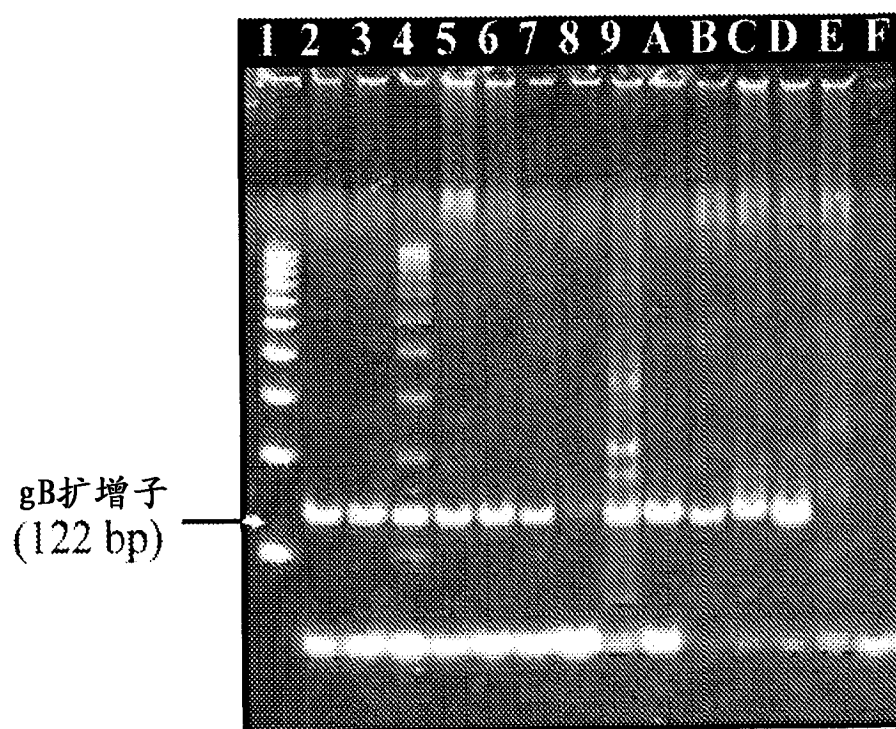


图 2

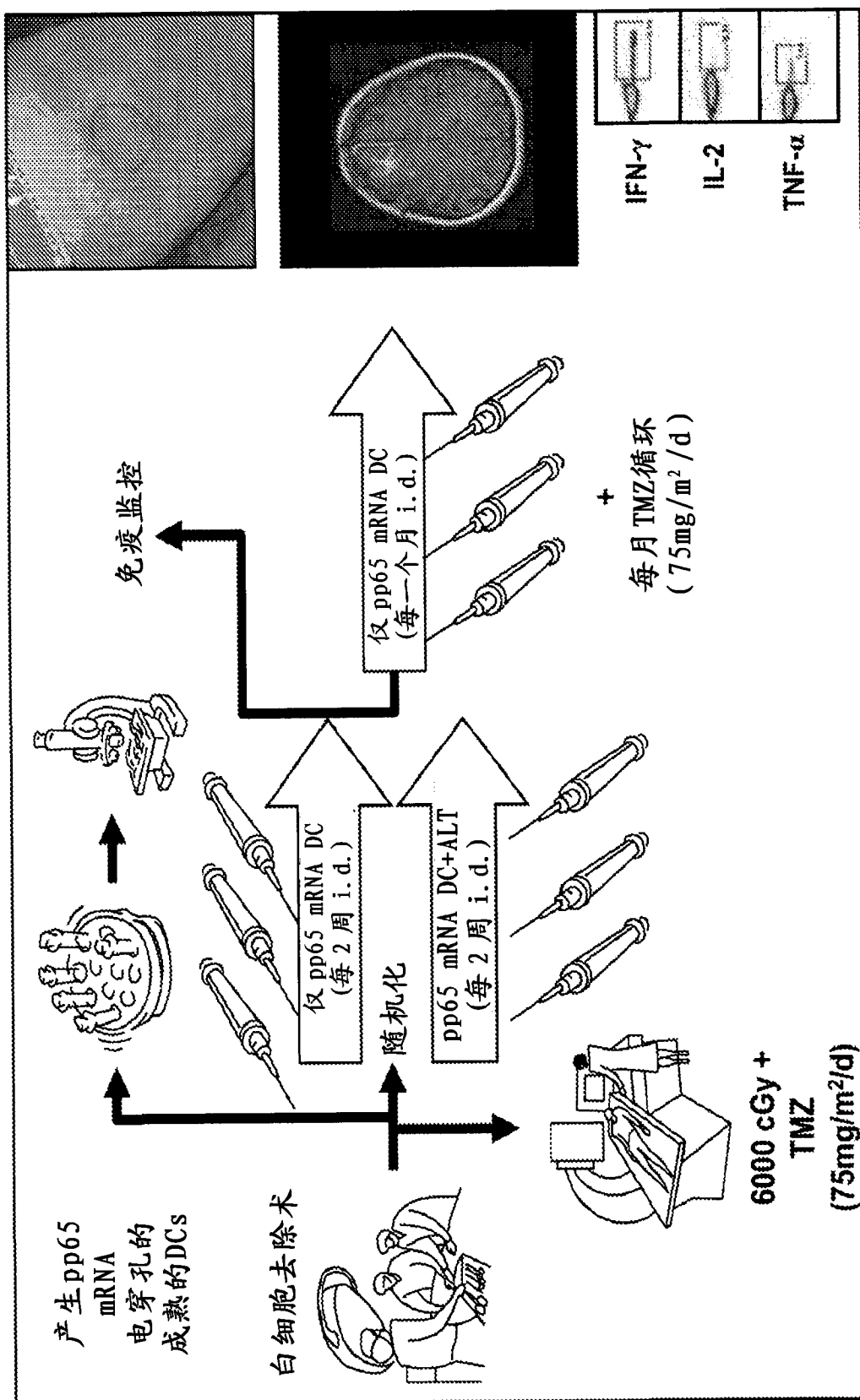


图 3

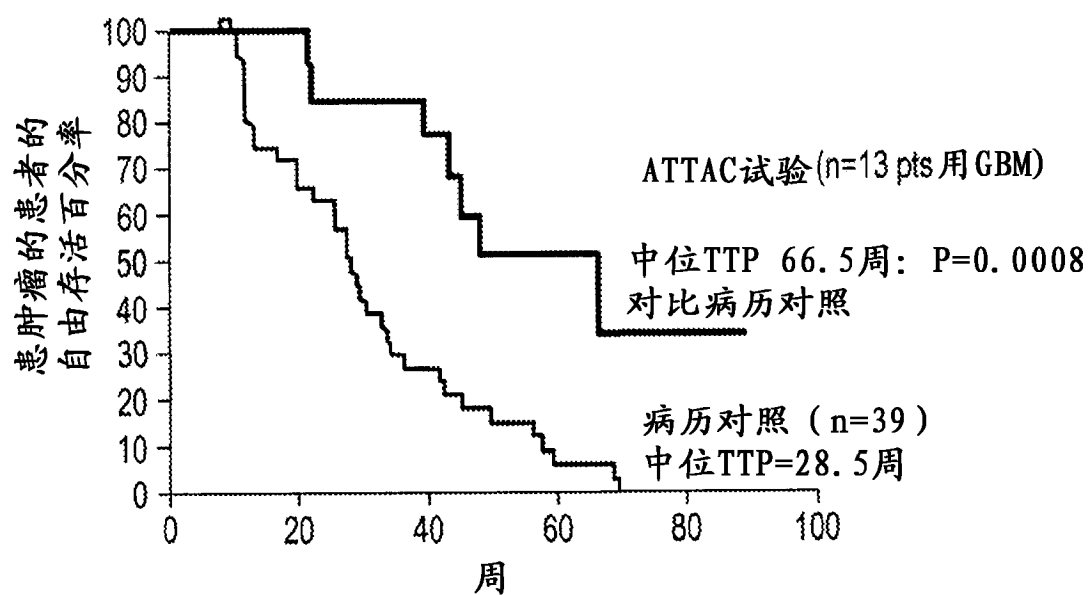


图 4

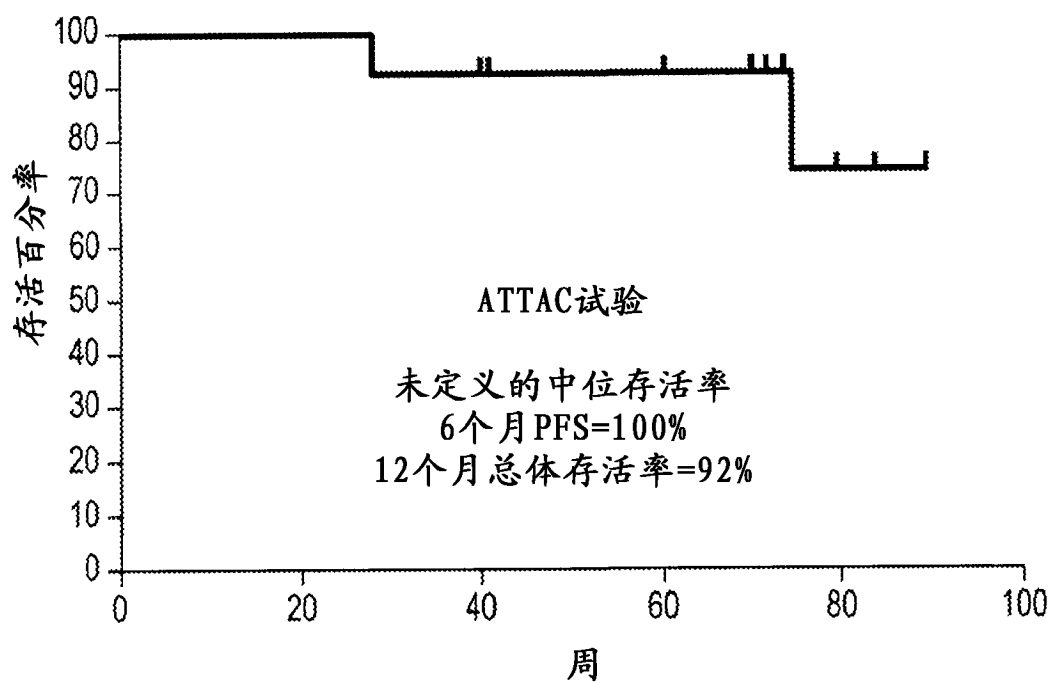


图 5

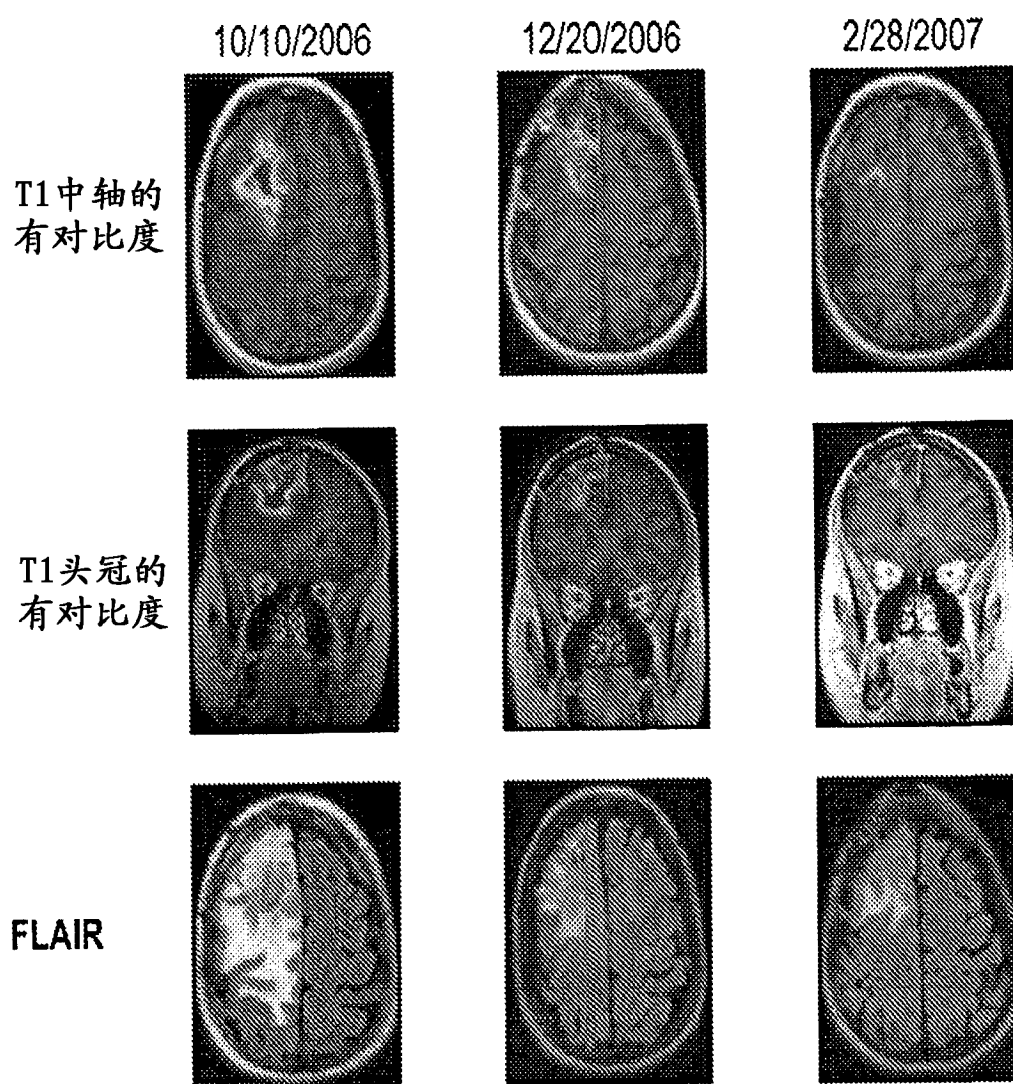


图 6

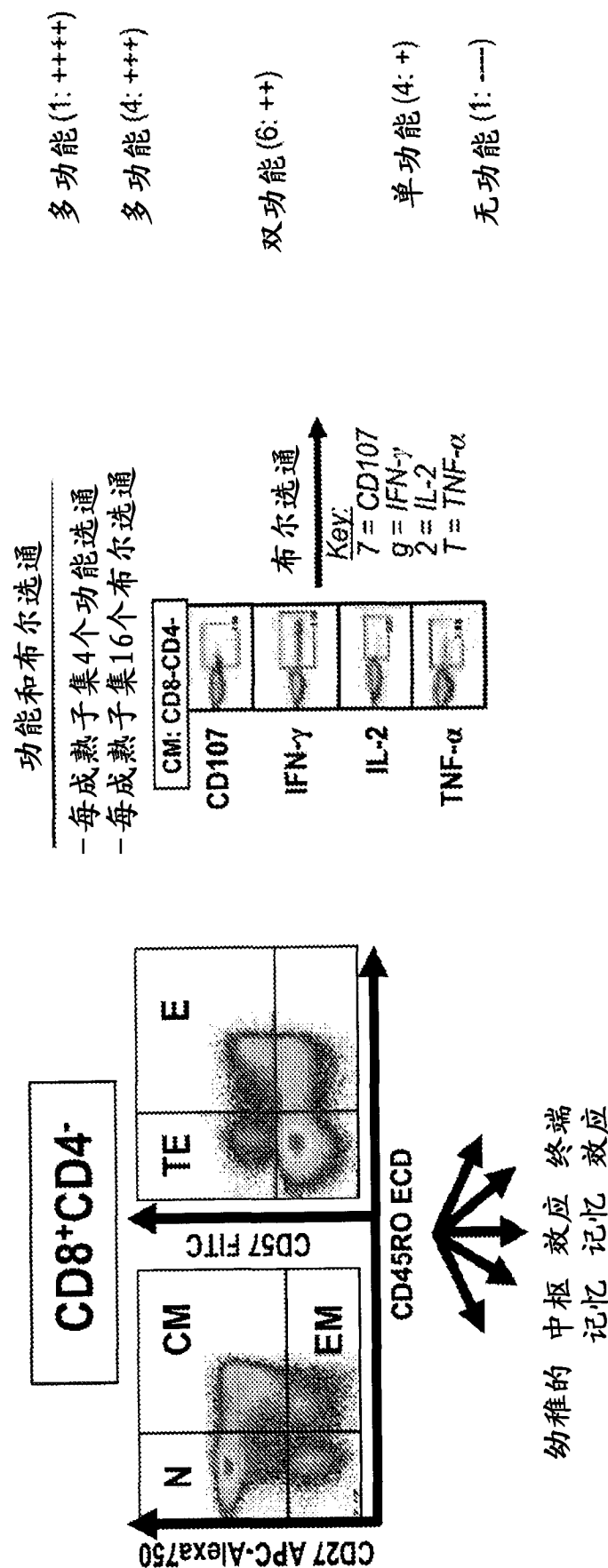


图 7

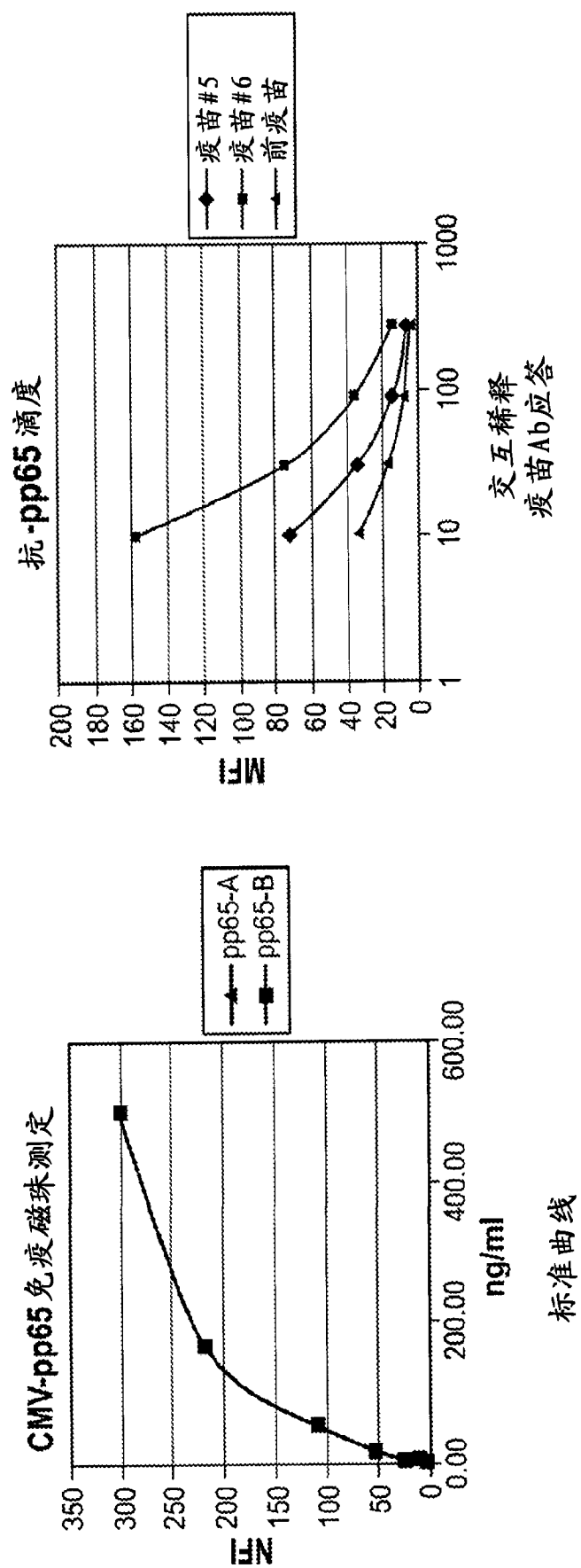


图 8

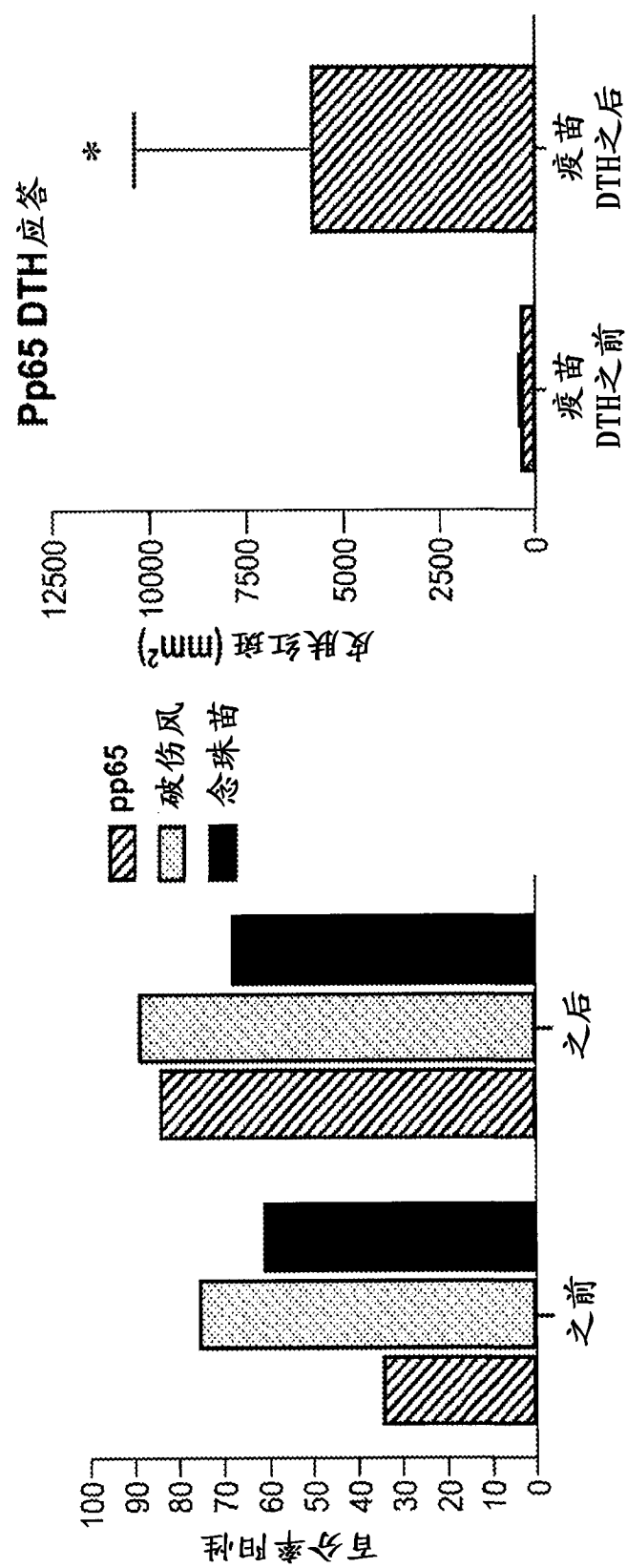


图 9

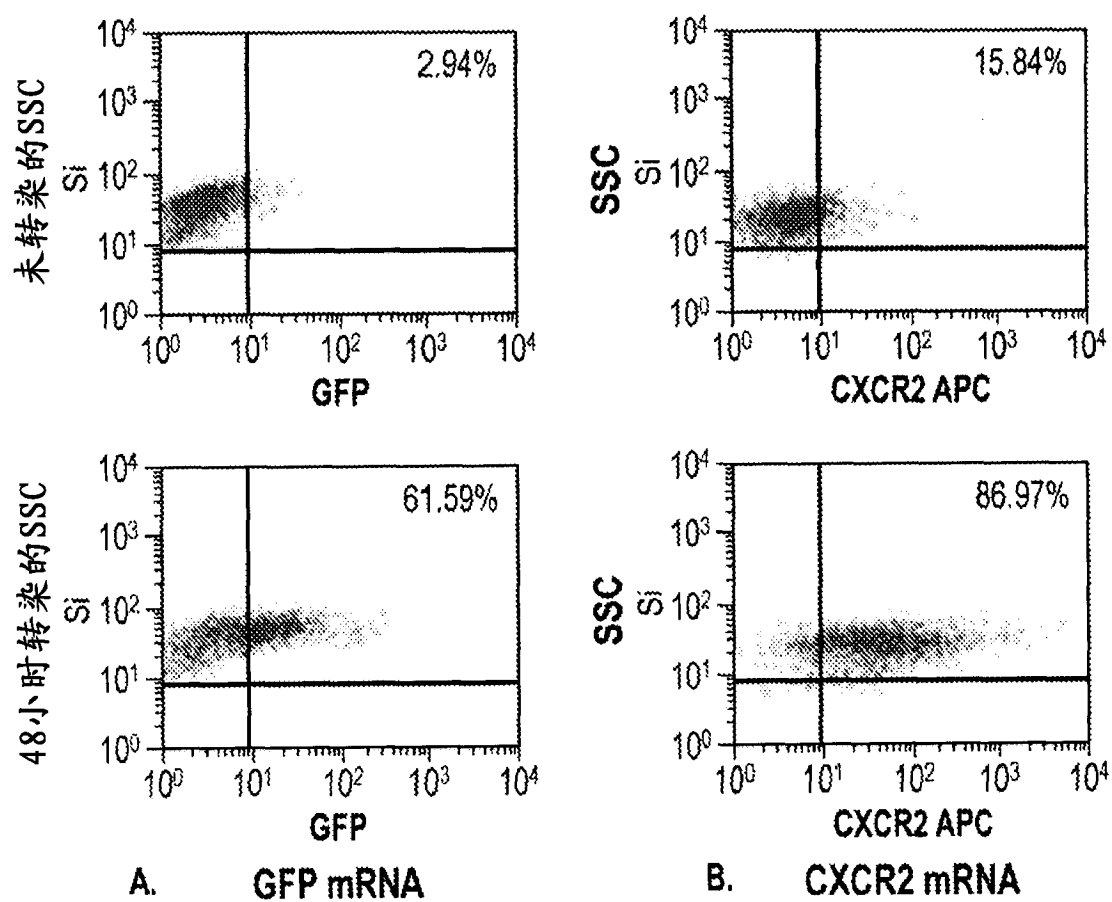


图 10

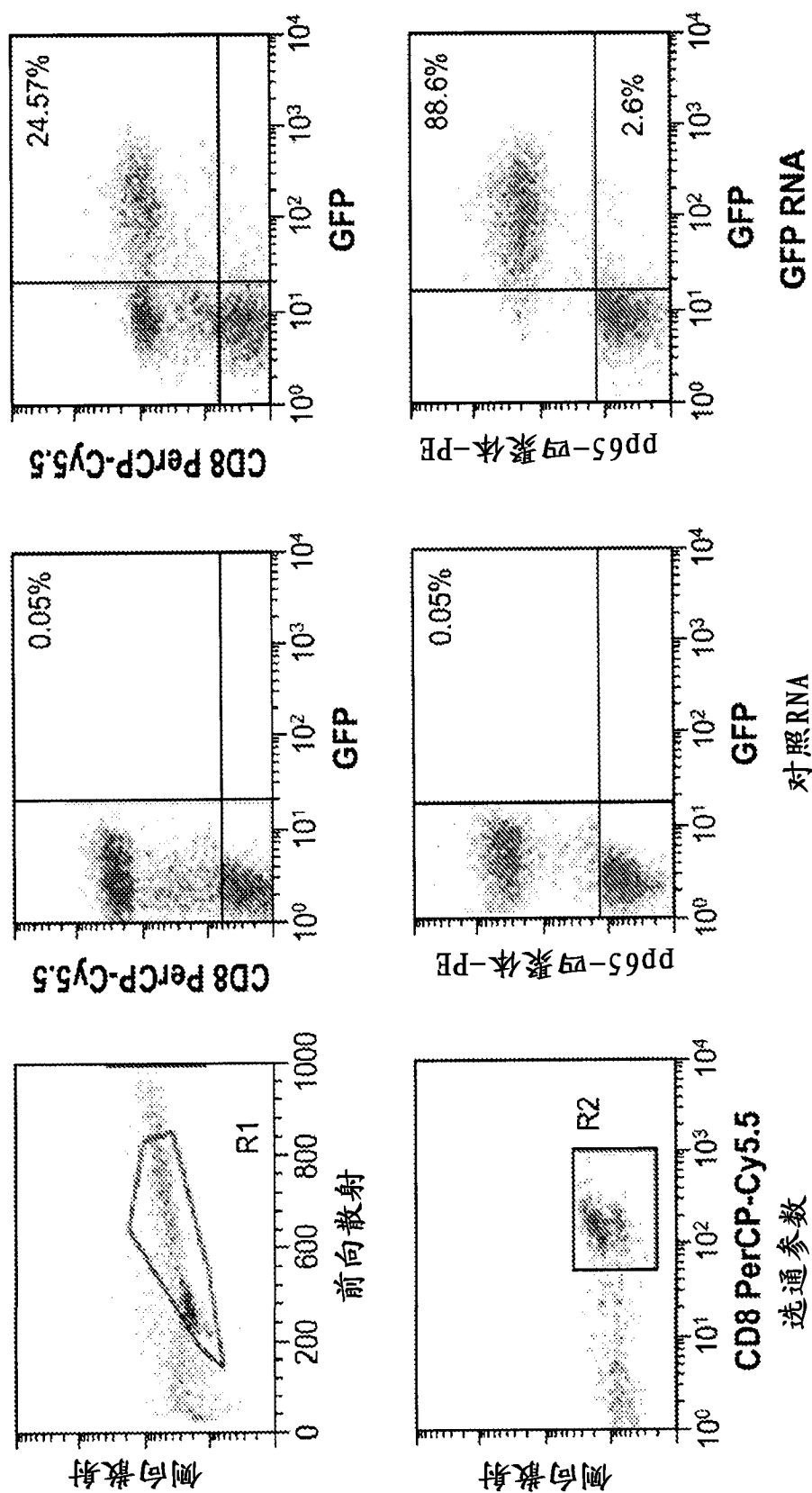


图 11

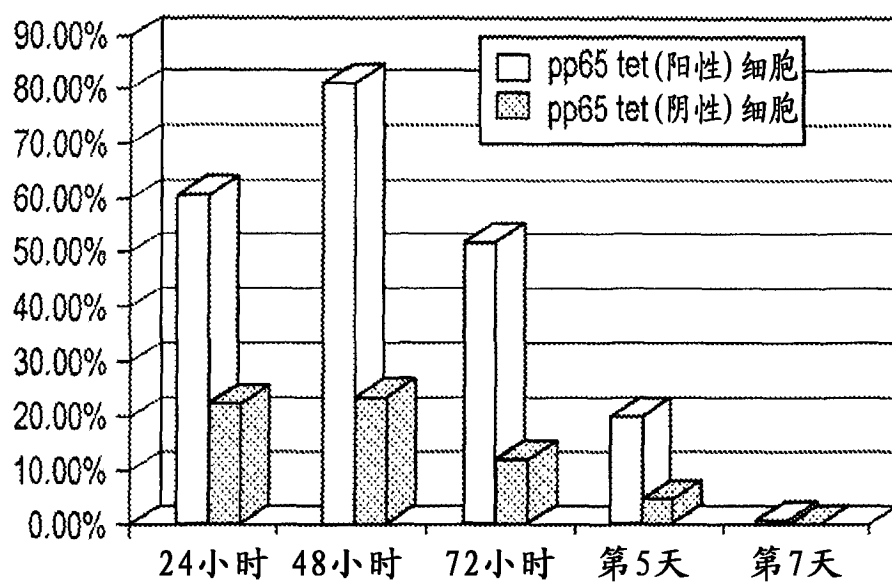


图 12A

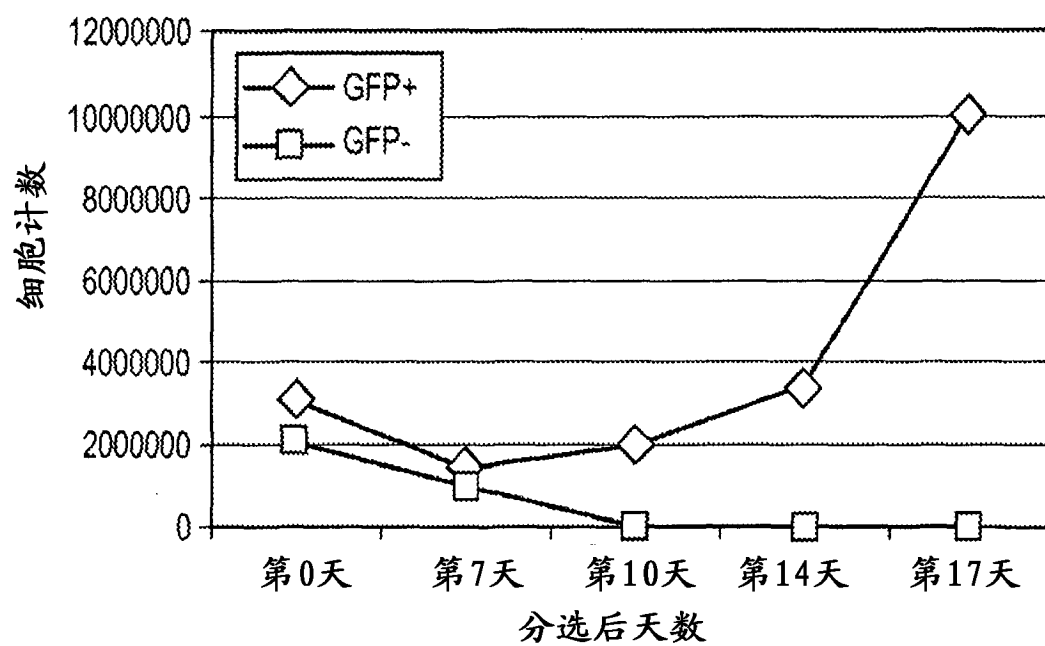


图 12B

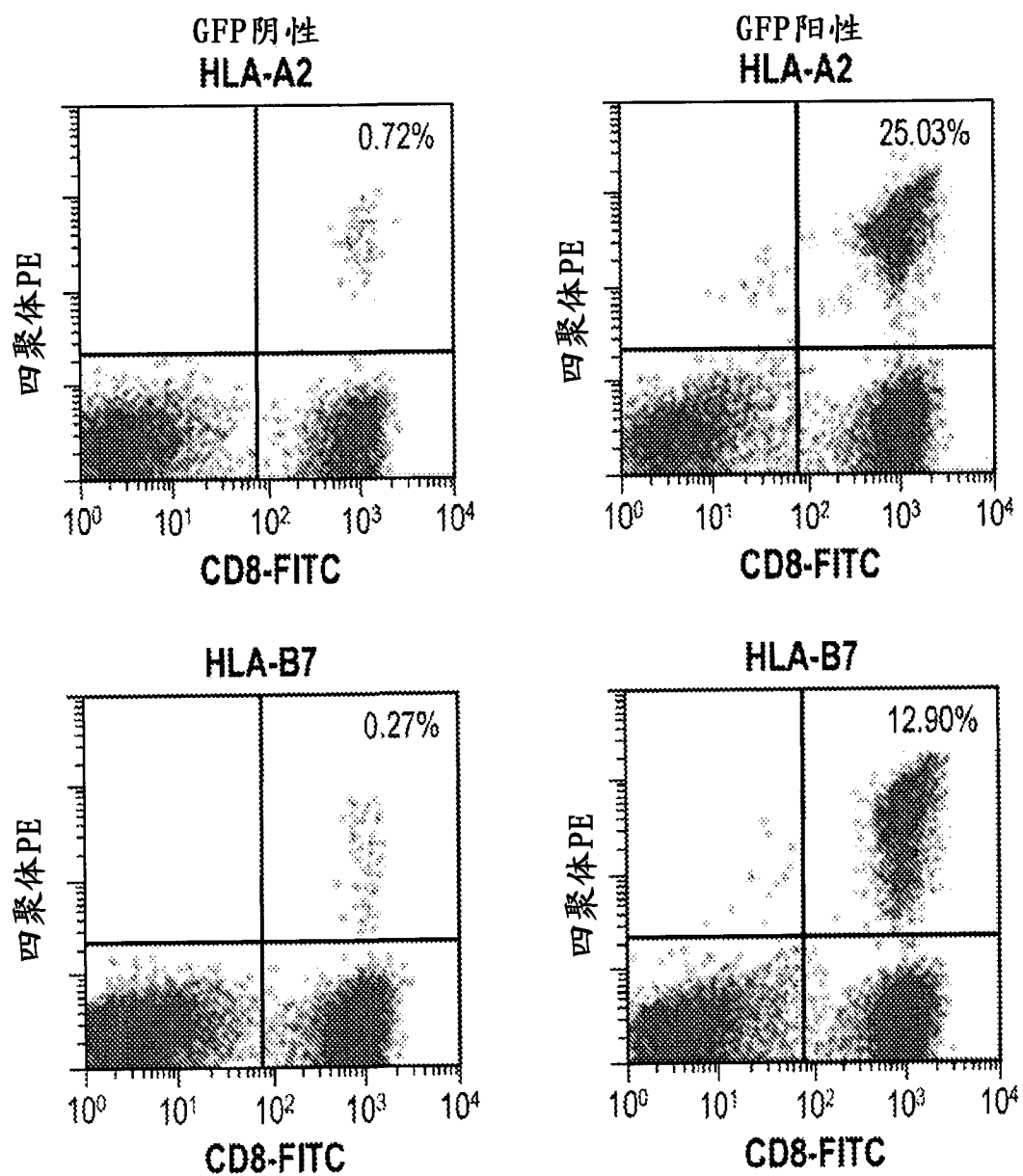


图 12C

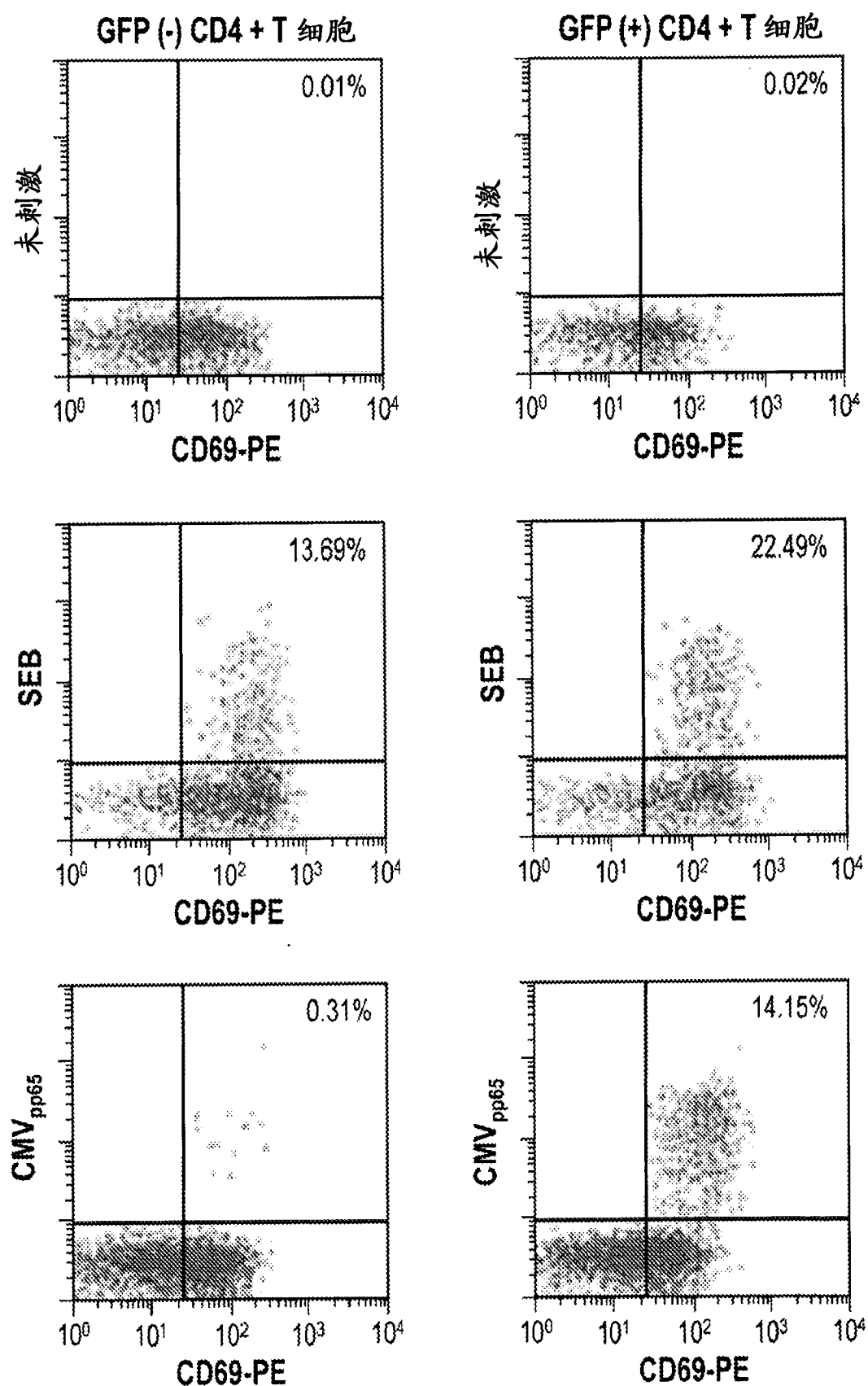


图 12D

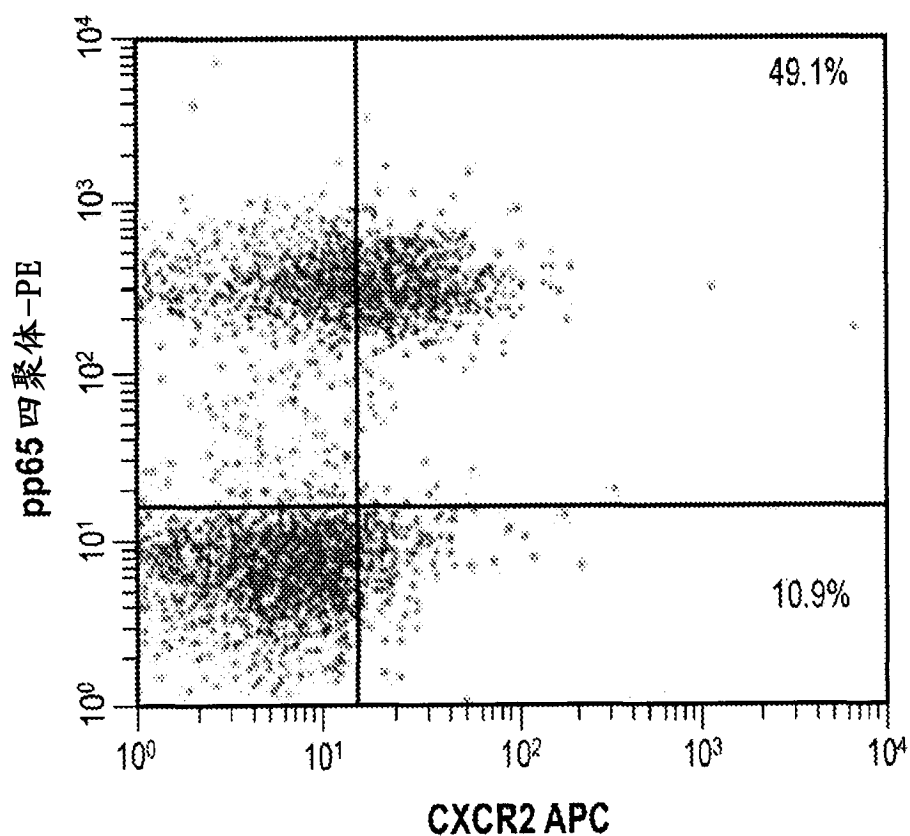


图 13

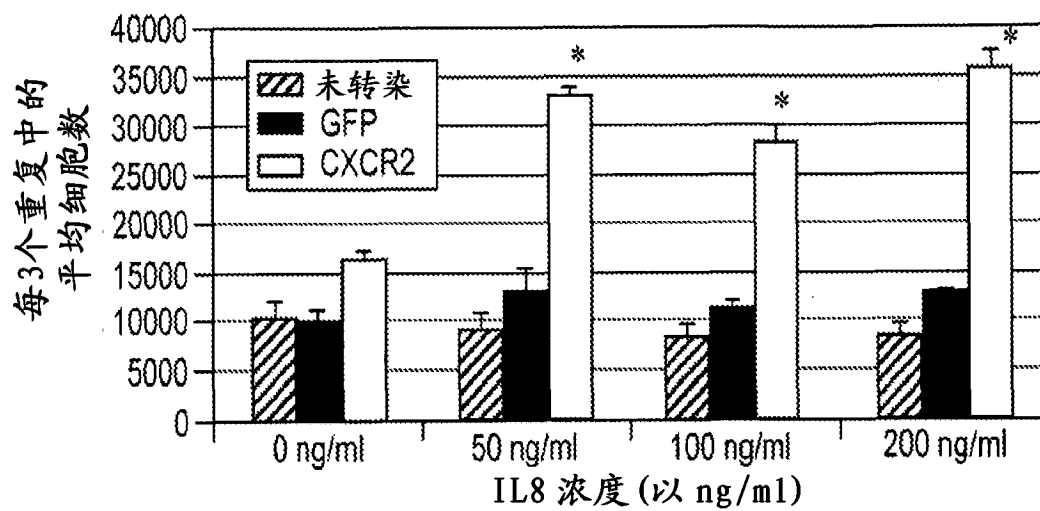


图 14A

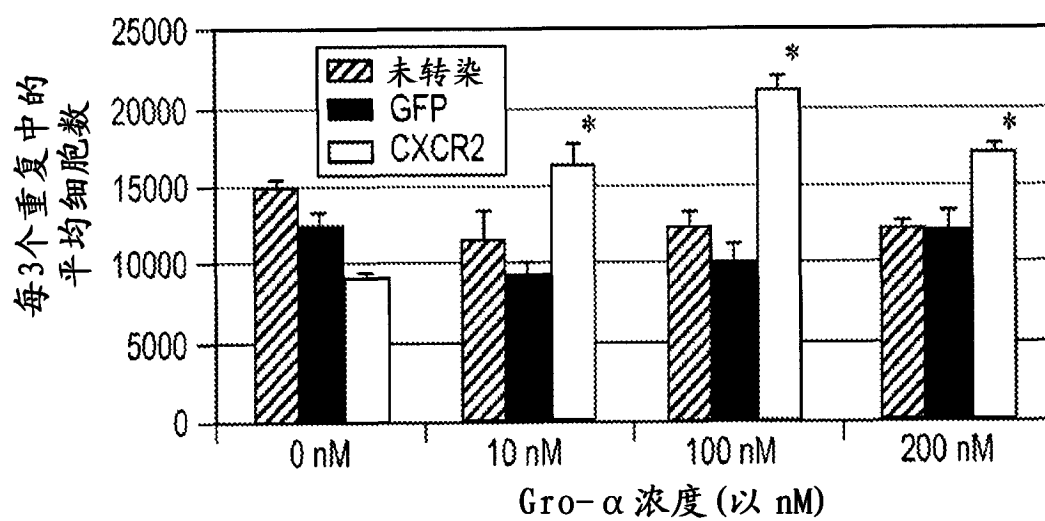


图 14B

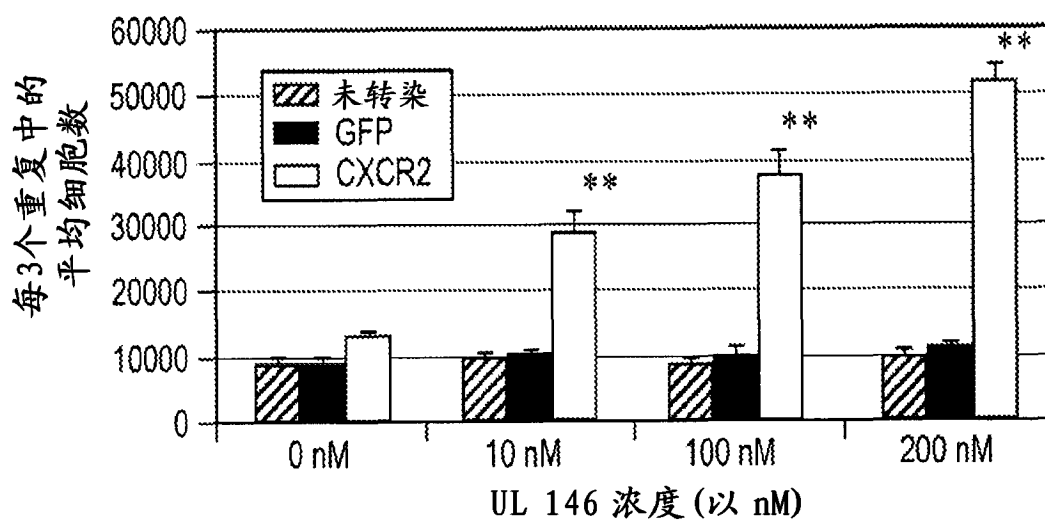


图 14C

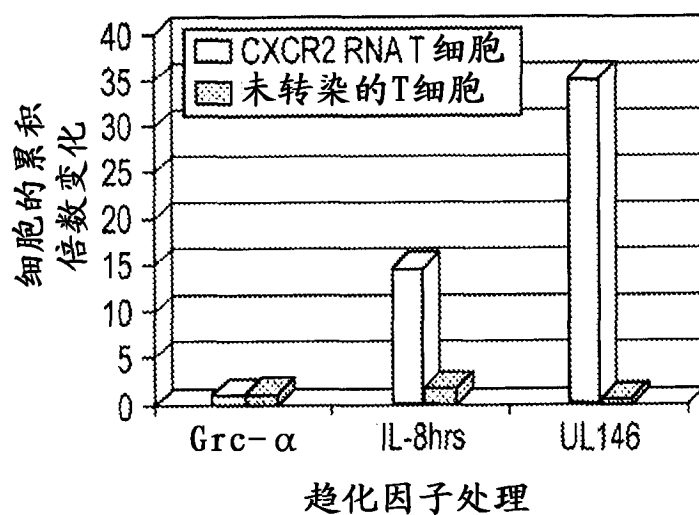


图 15A

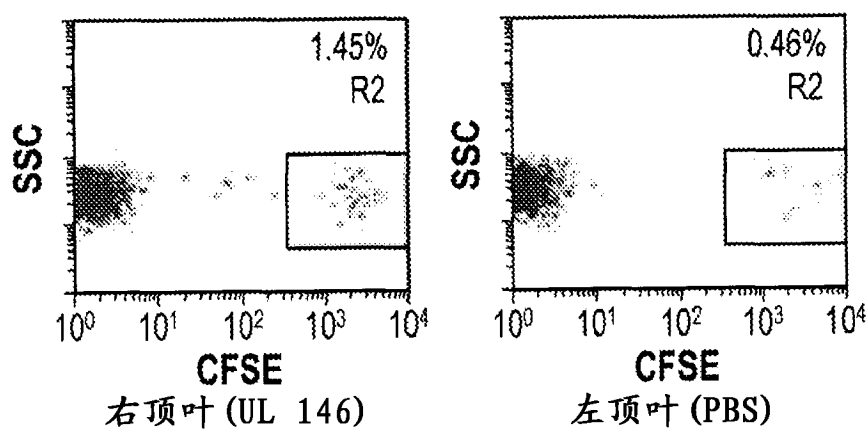


图 15B

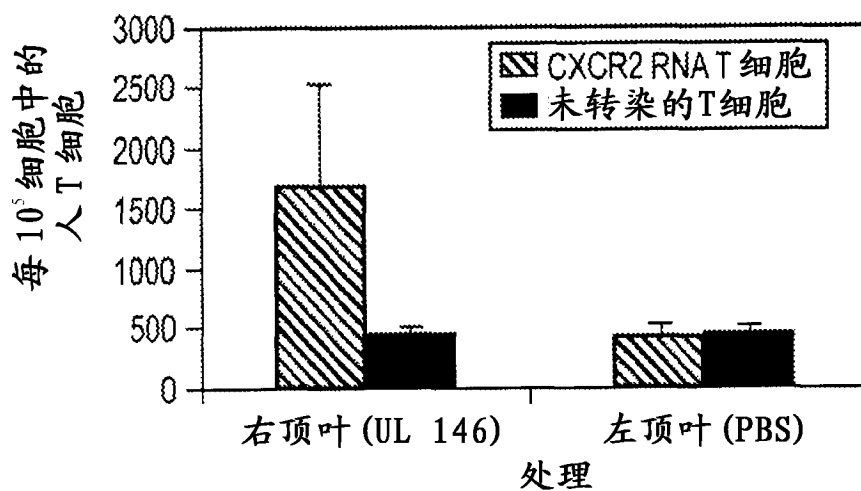


图 15C

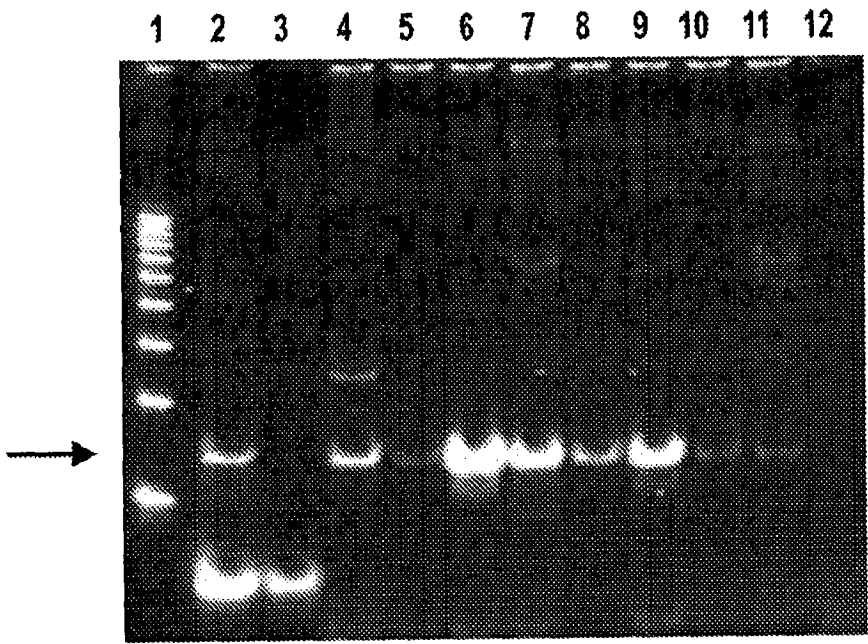


图 16A

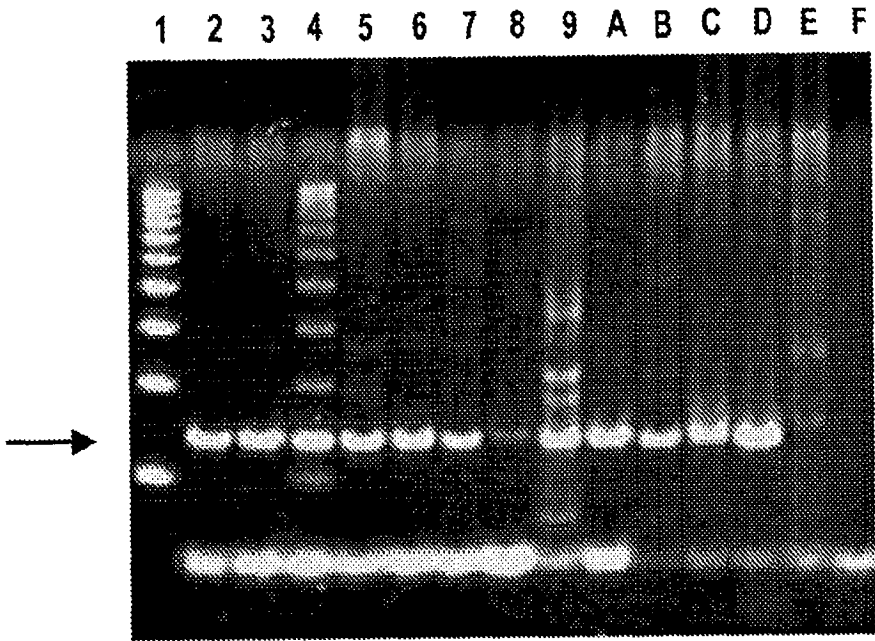


图 16B

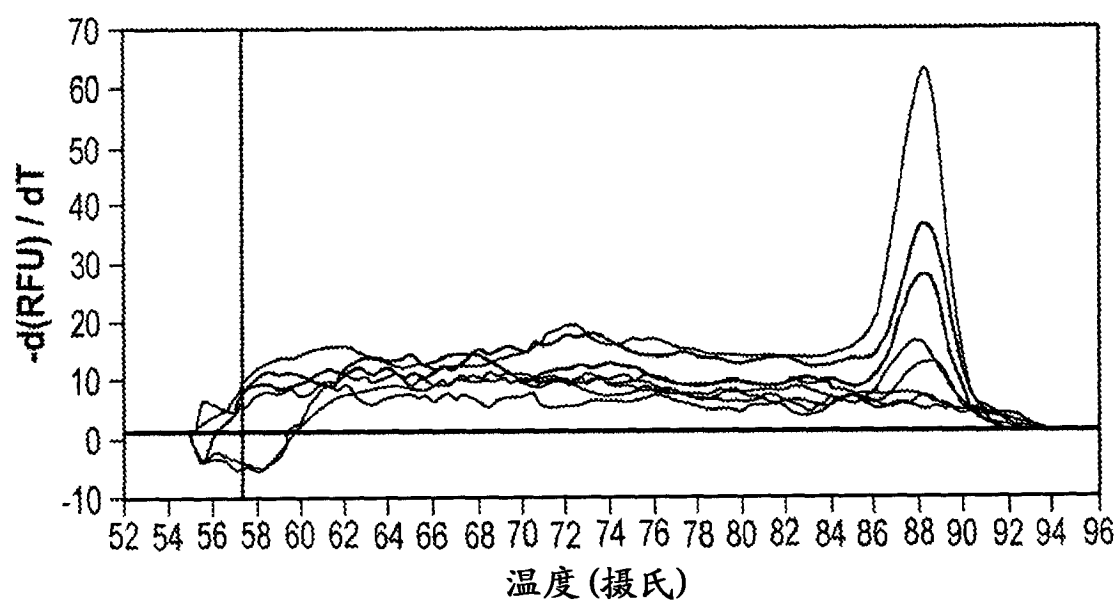


图 17

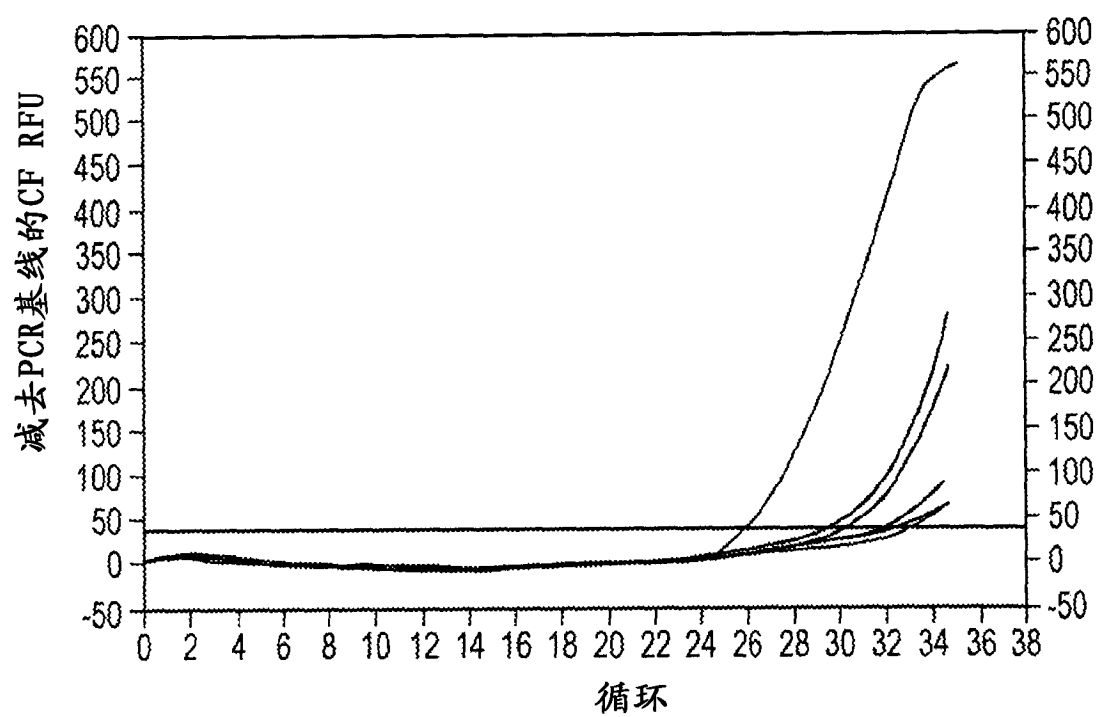


图 18

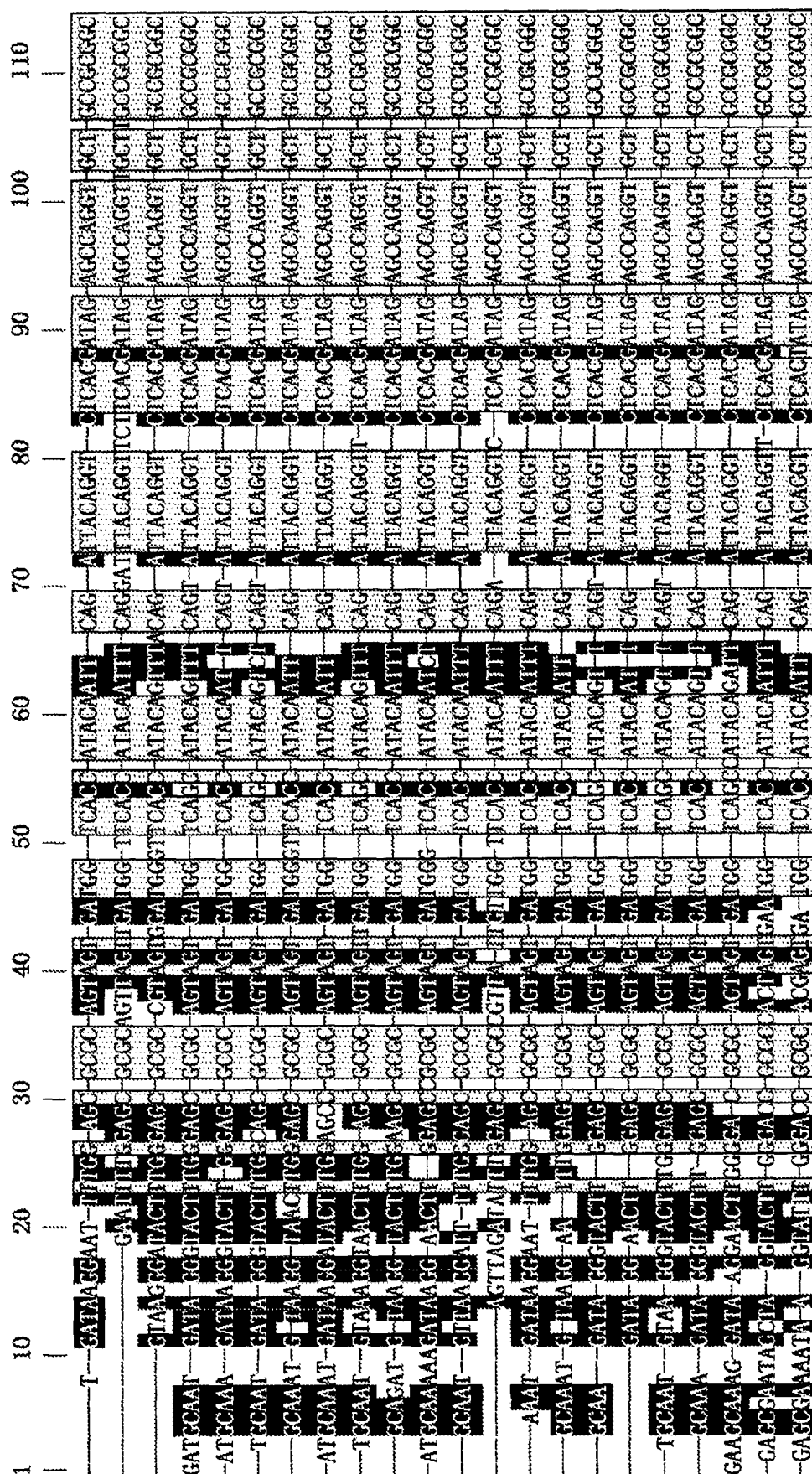


图 19