



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104168903 B

(45)授权公告日 2017.05.31

(21)申请号 201280063973.9

(22)申请日 2012.12.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104168903 A

(43)申请公布日 2014.11.26

(30)优先权数据

11382392.6 2011.12.22 EP

61/579,242 2011.12.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.06.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/075831 2012.12.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/092509 EN 2013.06.27

(73)专利权人 埃斯特韦实验室有限公司

地址 西班牙巴塞罗那

专利权人 探索艾滋病研究所私人基金会-

储蓄银行

加泰罗尼亚语第一高级研究所

海德尔堡鲁普雷希特-卡尔斯综

合大学

(72)发明人 努里亚·伊斯基耶多·乌塞罗斯

汉斯-格奥尔格·克罗斯利德

马耶尔·洛里扎泰

哈维尔·马丁内斯·皮卡多

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理

有限公司 11467

代理人 王金双

(51)Int.Cl.

A61K 31/7016(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

审查员 李微

权利要求书1页 说明书49页 附图19页

(54)发明名称

用于治疗由包膜病毒导致的疾病的抑制剂、
组合物和疫苗

(57)摘要

本发明涉及通过抑制包含在病毒包膜神经节苷酯中的唾液乳糖分子至CD169/唾液酸粘附素受体的结合来预防病毒进入表达CD169/唾液酸粘附素表面受体的细胞的方法和组合物。本发明还涉及基于负载目标抗原的树突细胞的疫苗组合物,由此,与组合物一起提供的疫苗能够预防病毒进入表达CD169/唾液酸粘附素的细胞内。此外,本发明涉及可被特别地传递至包膜病毒的诊断和治疗组合物,其中,诊断/治疗试剂被结合至CD169/唾液酸粘附素。

1. 一种唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂,用于治疗或预防与由包膜病毒导致的感染相关的疾病,其中,所述抑制剂为包含包含唾液乳糖部分的分子的囊泡,包含唾液乳糖部分的分子为具有少于四个唾液酸的神经节苷脂。

2. 根据权利要求1所述使用的抑制剂,其中,所述包膜病毒的包膜内的至少某些脂质包含唾液乳糖。

3. 根据权利要求1所述使用的抑制剂,其中,所述包膜病毒选自由逆转录酶病毒和丝状病毒科的病毒组成的组。

4. 根据权利要求3所述使用的抑制剂,其中所述逆转录病毒为HIV。

5. 根据权利要求4所述使用的抑制剂,其中,所述HIV为HIV-1。

6. 根据权利要求3所述使用的抑制剂,其中,与由HIV感染相关的疾病为AIDS。

7. 一种组合物或试剂盒组件,包含负载抗原的抗原呈递细胞和唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂,其中,所述抑制剂为包含包含唾液乳糖部分的分子的囊泡,包含唾液乳糖部分的分子为具有少于四个唾液酸的神经节苷脂。

8. 根据权利要求7所述的组合物或试剂盒组件,其中所述抗原呈递细胞为树突细胞。

9. 根据权利要求7所述的组合物或试剂盒组件,其中所述抗原为病毒抗原。

10. 根据权利要求9所述的组合物或试剂盒组件,其中所述病毒抗原为HIV抗原。

11. 一种免疫原或疫苗,包含根据权利要求7至9任一项所述的组合物或试剂盒组件。

12. 根据权利要求7至9任一项所述的组合物或试剂盒组件,用于治疗需要对抗原产生免疫应答的疾病,所述抗原被负载于抗原呈递细胞中。

13. 根据权利要求7至9任一项所述的组合物或试剂盒组件,用于诱导针对抗原的免疫应答的方法中,所述抗原被负载于抗原呈递细胞中。

用于治疗由包膜病毒导致的疾病的抑制剂、组合物和疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及通过抑制在病毒包膜神经节甘酯中的唾液乳糖分子至CD169受体的结合来防止病毒进入表达CD169细胞表面受体的细胞中的方法。本发明还涉及这种结合的抑制剂,以及包含本发明抑制剂的药物组合物,其制备方法和诊断应用。

背景技术

[0002] 树突细胞(DC)捕捉黏膜中的病菌并随后迁移至次级淋巴组织,它们在那里会获得需要用以有效诱导适应性免疫反应的成熟表型。用于提取抗原呈递的成熟DC(mDC)的潜在作用暗示了有效的抗原捕捉并传递至抗原呈递通路内。内吞作用的下调被认为是DC成熟的特点,但是有越来越多的证据指明在炎性条件下,mDC捕捉、处理和呈递抗原不完全依赖于在先的病菌暴露。参见Mellman I,等,Cell 2001;106:255-258,Platt C,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2010;107:4287-4292和Drutman S,等,J.Immunol. 2010;185:2140-2146。这种情况可能与慢性感染特别相关,例如由HIV-1所导致的感染,增加的肠腔细菌迁移会系统地刺激DC并促使持续性的抗病毒免疫反应。参见Brenchley J,等,Nat.Med. 2006;12:1365-1371。

[0003] 反常的是,HIV-1捕捉至mDC内还通过在DC-T细胞突触内传染性病毒至T细胞的有效表达而表现出极大地增强了病毒在淋巴组织中的传播,由此通过反式感染而促使发病和疾病发展。体外研究已经示出当HIV在低MOI下使用T细胞培养的时候,包含DC导致更加有效的T细胞感染。反式感染的机理已经成为某些辩论的主题。基于DC成熟而上调的病毒结合和吸收的HIV-1gp120-独立机制在本领域中已被在先确立。参见Izquierdo-Useros N,J.Virol. 2007;81:7559-7570。此外,HIV-1Gag eGFP表达荧光病毒样颗粒(VLP_{HIV-Gag-eGFP})与mDC中的野生型HIV-1具有相同的运输路径,并由此分享通用的管控进入至mDC中的分子模式。参见Izquierdo-Useros N,等,Blood 2009;113:2732-2741。然而,HIV-1通过其而被内在化并累积至mDC中的精确机理迄今为止是未知的。

[0004] 据此,通过DC发生的吸收HIV的机理的确定将允许用于防止所述吸收的有用工具的研发,由此降低CD4+T细胞通过CD的反式感染。

[0005] 发明概述

[0006] 在第一方面,本发明涉及唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂,用于治疗或预防与通过包膜病毒导致的感染相关的疾病。

[0007] 在另一方面,本发明涉及组合物或试剂盒组件,包含负载抗原的抗原呈递细胞和唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂。

[0008] 在又一方面,本发明涉及用于在试样中检测或分离包膜病毒的方法,包括:

[0009] (i) 使所述试样与唾液酸粘附素或其基本上保持结合唾液乳糖能力的功能等效变体接触,和

[0010] (ii) 检测或分离结合至所述唾液酸粘附素或其功能等效变体的病毒。

[0011] 在又一方面,本发明涉及一种试剂盒组件,其包含固定的唾液酸粘附素或其基本

上保持结合唾液乳糖能力的功能等效变体。

[0012] 在另一方面,本发明涉及包含固定的唾液酸粘附素或其基本上保持结合唾液乳糖能力的功能等效变体的轭合物,以及治疗剂或诊断剂。

[0013] 在又一方面,本发明涉及用于将目标化合物传递至抗原呈递细胞的体外方法,其包含使所述的抗原呈递细胞与包含所述目标化合物的脂质微粒相接触,其中所述的脂质微粒包含至少一个包含唾液乳糖片段的分子。

附图说明

[0014] 图1. 神经节苷脂为用于由mDC调节的病毒捕捉所需要的。脂质中的神经节苷脂检测从MT4衍生的HIV_{NL4.3}提取。(A)表示由UPLC/TOF ESI (+)分析获得的三种不同的病毒分离体的相应于5.3和6.5min范围的色谱的部分质谱(850至1550amu)。对于识别的每种目标化合物,其[M+H]⁺和[M+Na]⁺离子被指示出。每种化合物的保留时间紧挨着其缩写而给出。所选择的时间范围相应于N十六酰(N-C16)类。(B)在5.56min获得的GD1的精确质量离子簇。(C)具有电荷态为2的相应于通式C₈₂H₁₄₄N₄O₃₉的精确质量离子簇。也观察到N-C22、N-C24和N-C24:1类。(D)对比VLP_{HIV-Gag-eGFP}和包含Cer、GM3、GM2、GM1或PS的不同的荧光LUV_{HIV-tRed}的mDC捕捉。总共2×10⁵的DC在37℃下使用0.2ml的100μM的LUV或者75ng VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag脉冲4h,使用PBS冲洗并通过FACS评估以获得tRed或eGFP阳性细胞的百分比。数据显示出五个独立试验的均值和SEM,包括至少六个供体的细胞。包含GM3的LUV_{HIV-tRed}比Cer或Ø LUV_{HIV-tRed}具有显著更大量的成熟DC捕捉(P<0.0001,配对t检验)。包含GM1的LUV_{HIV-tRed}比带负电的PS-LUV_{HIV-tRed}具有显著更大量的成熟DC捕捉(P=0.0081,配对t检验)。(E)75ng的VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag和降低量(μM)的包含GM2的LUV_{HIV-tRed}之间的捕捉竞争。作为对照组,我们使用最大浓度的LUV_{HIV-tRed}(100μM),具有或不具有Cer。细胞在37℃下培养4小时,冲洗并通过FACS分析来确定eGFP-和tRed-阳性细胞的百分比。数据显示三个独立试验的平均值和SEM,包括来自至少四个供体的细胞。在存在更大量的包含GM2的LUV_{HIV-tRed}(P<0.0001,配对t检验)时,mDC捕捉更少的VLP_{HIV-Gag-eGFP}。

[0015] 图2. 包含神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}在mDC内作为VLP_{HIV-Gag-eGFP}传递至相同的隔间。(A)在VLP_{HIV-Gag-eGFP}或包含神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}独立挑战4小时后具有不同捕捉图形的mDC百分比。数据示出了5个不同供体的大于100个细胞的平均值和SEM。(B)与包含神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}共同定位的VLP_{HIV-Gag-eGFP}的量化百分比并且反之亦然,通过分析3个不同供体的mDC的至少10个囊泡获得的。

[0016] 图3. 独立于通过mDC的包含神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}捕捉的液体次序。(A)包含或不包含Cer、GM3、GM2或GM1的LUV_{P0PC-tRed}的mDC捕捉对比。总共2×10⁵的DC在37℃下使用100μM的LUV脉冲4h,使用PBS冲洗并通过FACS评估以获得tRed阳性细胞的百分比。数据显示出三个独立试验的均值和SEM,包括来自至少六个供体的细胞。包含GM3的LUV_{P0PC-tRed}比Cer或LUV_{P0PC-tRed}具有显著更大量的成熟DC捕捉(P值在图形上,配对t检验)。(B)在包含神经节苷脂的LUV_{P0PC-tRed}挑战4h后具有不同的脂质体捕捉的mDC百分比图形。

[0017] 图4. 复合神经节苷脂的mDC捕捉图形。(A)包含GM1、例如GD1b、GT1b和GQ1b的多聚唾液酸神经节苷;PS和Cer的不同的LUV_{HIV-tRed}的mDC捕捉对比。总共2×10⁵的DC在37℃下使用100μM的LUV脉冲4小时,使用PBS冲洗并通过FACS评估以获得tRed阳性细胞的百分比。数据

显示出两个独立试验的均值和SEM,包括来自六个供体的细胞。包含GM1的LUV_{HIV-tRed}比包含GQ1b的LUV_{HIV-tRed}具有显著更大量的成熟DC捕捉($P<0.0001$,配对t检验)。在这些实验中所采用的LUV中的神经节苷脂的示意图邻近本说明示出。(B)使用75ng的VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag和100 μ M不同的多聚唾液酸神经节苷脂LUV_{HIV-tRed}脉冲的mDC之间的捕捉竞争。细胞在37℃下培养4小时,冲洗并通过FACS分析来确定eGFP和tRed阳性细胞的百分比。数据显示出两个独立试验的均值和SEM,包括来自六个供体的细胞。在存在包含GM1的LUV_{HIV-tRed}时,与存在相同浓度的包含GQ1b的LUV_{HIV-tRed}相比,mDC捕捉更少的VLP_{HIV-Gag-eGFP} ($P<0.0001$,配对t检验)。

[0018] 图5.存在于神经节苷脂的病毒附着域的识别。(A)包含Cer、GM1或缺乏唾液酸的GM1(缺乏唾液酸基的GM1)的不同的LUV_{HIV-tRed}的mDC捕捉对比。总共 2×10^5 的DC在37℃下使用100 μ M的LUV脉冲4小时,使用PBS冲洗并通过FACS评估以获得tRed阳性细胞的百分比。数据显示出三个独立试验的均值和SEM,包括来自九个供体的细胞。包含GM1的LUV_{HIV-tRed}比包含缺乏唾液酸基的GM1的LUV_{HIV-tRed}具有显著更大量的成熟DC捕捉($P<0.0001$,配对t检验)。(B)包含GM3的LUV_{HIV-tRed}和利用神经氨酸酶处理以移除唾液酸或未处理的VLP_{HIV-Gag-eGFP}的mDC捕捉对比。总共 2×10^5 的DC在37℃下使用25 μ M的LUV和75ng利用产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)神经氨酸酶ON处理的或未处理的VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag脉冲2小时,使用PBS冲洗并通过FACS评估以获得tRed和eGFP阳性细胞的百分比。数据显示出两个独立试验的均值和SEM,包括来自五个供体的细胞。未处理颗粒比神经氨酸酶处理的颗粒具有显著更大量的成熟DC捕捉(P值在图形上,配对t检验)。(C)包含GalCer、GM4、GM3或GM1的不同的LUV_{HIV-tRed}的mDC捕捉对比。总共 2×10^5 的DC在37℃下使用100 μ M的LUV脉冲4小时,冲洗并通过FACS评估以获得tRed阳性细胞的百分比。数据显示出三个独立试验的均值和SEM,包括来自九个供体的细胞。包含GM1的LUV_{HIV-tRed}比包含GalCer或GM4的LUV_{HIV-tRed}具有显著更大量的成熟DC捕捉($P<0.0001$,配对t检验)。对于这些试验来说,存在于LUV中的分子的示意图在底部说明中示出。(D)通过mDC来相对捕捉包含GM3的LUV_{HIV-tRed}和VLP_{HIV-Gag-eGFP}的图形表示,其使用10mM的可溶乳糖或者5至10mM的GM3碳水化合物极性端基预培养,标准化至通过模拟处理的mDC的LUV/VLP捕捉的水平(以100%设定)。基于利用GM3极性端基的处理,mDC捕捉少量的颗粒(P值在图形上,配对t检验)。数据显示出三个独立试验的均值和SEM,包括来自至少九个供体的细胞。

[0019] 图6.神经节苷脂结构。在本研究中所使用的无唾液酸神经节苷脂、单唾液酸神经节苷脂、二唾液酸神经节苷脂、三唾液酸神经节苷脂和四神经节苷脂的2D模型。

[0020] 图7.包含Texas Red的LUV的对比荧光。包含在图形中所示分子的LUV_{HIV-tRed}或LUV_{P0PC-tRed}在608nm的最大发射荧光。(A)在图1和2中使用的LUV_{HIV-tRed}的对比,(B)在图3中使用的LUV_{P0PC-tRed}的对比,(C)在图4中使用的LUV_{HIV-tRed}的对比,(D)在图5中使用的LUV_{HIV-tRed}的对比。数据显示出至少两个不同的LUV制备的独立测量值的均值和SEM。

[0021] 图8.在CHO细胞系中产生的VLP的捕捉。在CHO细胞系中产生的VLP_{HIV-Gag-eGFP}的捕捉,其仅能够合成神经节苷脂至GM3。总共 2×10^5 的DC在37℃下使用75ng的蔗糖小球VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag脉冲4小时,冲洗并通过FACS评估以获得eGFP阳性细胞的百分比。数据显示出两个代表性试验之一的平均值和SEM,包括来自三个供体的细胞。

[0022] 图9.Raji B细胞中凝集素的转染。由Raji细胞捕捉的VLP_{HIV-Gag-eGFP}通过所示的表达质粒被转染,用于凝集素或模拟转染。转染的Raji细胞使用10 μ g/ml的指示mAbs预培养并

暴露至VLP。数据显示出两个试验的平均值和SEM,包括来自四个转染的细胞。

[0023] 图10.唾液乳糖的阻塞效应。通过Siglec-1表达质粒或模拟转染被转染的Raji细胞的VLP_{HIV-Gag-eGFP}捕捉。细胞使用指示浓度的唾液乳糖或可溶乳糖预培养并暴露至VLP。数据示出三次平行转染的平均值和SEM。

[0024] 图11.在LPS mDCs中表达的Siglec-1捕捉包含不同神经节苷脂的囊泡,例如HIV-1病毒样微粒,脂质体和外来体。通过使用降低浓度的 α -Siglec-1mAb7D2在VLP暴露之前在37℃下预培养30分钟的LPS mDCs捕捉VLP_{HIV-Gag-eGFP}。数据示出三个试验的平均值和SEM,包括来自六个供体的细胞。

[0025] 图12.通过LPS mDCs捕捉VLP_{HIV-Gag-eGFP},所述LPS mDCs使用或不使用2 μ g/ml的 α -Siglec-1mAb7D2预培养,所述 α -Siglec-1mAb7D2使用至少100倍摩尔过量的指示人类重组蛋白预先处理或不处理。值得注意的是,Siglec-14与Siglec-5在V设定域分享100%氨基酸同源性。数据示出三个试验的平均值和SEM,包括来自九个供体的细胞。

[0026] 图13. α -Siglec-1mAb7-239的阻塞效应。(A)通过LPS mDC捕捉 VLP_{HIV-Gag-eGFP},在VLP暴露之前,所述LPS mDC使用降低浓度的 α -Siglec-1mAb7-239在37℃下预培养30分钟。数据示出四个供体的平均值和SEM。(B)通过LPS mDC捕捉VLP_{HIV-Gag-eGFP},在VLP暴露之前,所述LPS mDC使用10 μ g/ml的指示mAbs在37℃下预培养3小时。数据示出两个实验的平均值和SEM,包括来自七个供体的细胞。

[0027] 图14.Siglec-1沉默阻止病毒捕捉和反式感染,而SIGLEC1的再次表达挽救其。Siglec-1的干涉。对CD14,HLA-DR,Siglec-1或VLP捕捉呈活性的LPS mDCs百分比紧随模拟转导或非目标转导或两个不同的Siglec-1特异的shRNAs。数据示出四个试验的平均值和SEM,包括至少来自四个供体的细胞。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明清楚地确定了新的角色,用于在病毒或者囊泡的膜内唾液酸化神经节苷脂,作为通过mDC进行特定捕捉的决定因素。这种捕捉取决于暴露的唾液乳糖片段,其在这里首次定义为新的病原体相关的分子模型。神经节苷脂是在所有的包膜病毒中存在的质膜磷脂的重要组分,其由受感染细胞的质膜发育出,可以通过所记载的机理而被捕捉至mDC内,除非它们不包括包含神经节苷脂的唾液乳糖。

[0030] 携带神经节苷脂的囊泡或病毒的有效捕捉提供了一种例如在本发明中揭示的模型,其中存在于mDC(及其他可能的细胞)细胞表面上的特定受体,例如CD169细胞表面受体,识别出病毒或囊泡膜上的唾液乳糖部分。囊泡的神经节苷脂的特定识别随后将触发被吸收至细胞内部分。相继地,内在化材料可被回收至表面(作为HIV-1至T细胞的传输)或可被供给至抗原呈递通路内。

[0031] 1.通用术语和表达的定义

[0032] 在这里所使用的术语“AIDS”指的是HIV感染的产生症状的阶段,并且包括获得性免疫缺陷综合症(俗称AIDS)和“ARC”、或者AIDS相关 综合征。参见Adler M,等,Brit.Med.J.1987;294:1145-1147。AIDS的免疫学和临床表现为现有技术已知的并且包括例如机会感染和由免疫缺陷导致的癌症。

[0033] 本文使用的术语“抗体”指的是由一种或多种基本上通过全部或部分公认的免疫球蛋白基因来编码的蛋白质构成的蛋白质,包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体及其抗

原结合片段,例如F(ab')₂和Fab片段,以及单链抗体。术语抗体包括任意种类已知的抗体,例如多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体,例如嵌合抗体、人源化抗体、灵长类抗体、人类抗体和双特异性抗体。

[0034] 本文使用的术语“抗HIV剂”、“HIV抑制剂”和“HIV抗病毒剂”指的是能够抑制HIV在例如为哺乳动物细胞的细胞内的复制,或者有效治疗、预防或推迟HIV感染或AIDS或疾病或产生其的条件或与之相关的发病或恶化的任意化合物及其药学上可接受的盐。根据本发明使用的合适的抗HIV试剂包括但不限于HIV蛋白酶抑制剂、HIV逆转录酶抑制剂、HIV进入抑制剂和HIV免疫原。

[0035] 本文所使用的术语抗体的“抗原结合区域”还包括结合至特定抗原的合成或基因工程多肽,例如由轻链可变区域构成的多肽,由重链和轻链可变区域构成的“Fv”片段,其中轻链和重链可变区域通过肽键而被连接的重组单链多肽分子(“scFv蛋白质”),和由模仿高变区的氨基酸残基构成的最小识别单元。

[0036] 本文使用的术语“抗原负载”指的是通过培养树突细胞或祖细胞将抗原传递至树突细胞的方法,其利用肽、多肽、脂肽、DNA(裸DNA或者在质粒运载体内的DNA)或RNA;或者利用抗原表达重组细菌或病毒(例如牛痘、腺病毒或慢病毒),从而使得其抗原表位在细胞表面上通过MHC而被负载和表达。

[0037] 本文使用的术语“抗原呈递细胞(APC)”指的是能够通过MHC分子(MHC I类或MHC II类分子)处理和呈递抗原的任何细胞。APC能够通过MHC I类或MHC II类分子处理和呈递抗原。特别地,抗原呈递细胞包含树突细胞、巨噬细胞、B细胞、上皮细胞、纤维原细胞、胶质细胞和可由本领域技术人员确定的其它细胞。优选地,APV为树突细胞。

[0038] 本文使用的术语“抗逆转录病毒剂”包括任何已被证明能够逆转录病毒的药物、生物或细胞剂。

[0039] 术语“反义核酸”指的是与癌基因编码的DNA和RNA的碱基序列互补的寡核苷酸。当在靶细胞中表达的时候,反义核酸特别地结合至它们的目标核酸并干预转录、RNA加工、转运和/或翻译。具有多肽的靶向双链(ds)DNA导致三螺旋的形成;靶向RNA将导致双螺旋形成。

[0040] 本文使用的术语“自体同源”指的是源自供体并随后再引入至相同个体的任何材料。

[0041] 本文使用的术语“组合物”指的是包含至少两个组分以及由不同组分的组合以任意量直接或间接地获得的任何产物的物质组合物。本领域技术人员将观察到组合物可被配制为单一的配方或者可被表示为每个组分的单独配方,其可被组合以作为联合制剂组合使用。组合物可以是试剂盒组件,其中每个组分被单独地配制并包装。

[0042] 本文使用的术语“包含”还揭示了根据专利实践通常可接受的“由……构成”。

[0043] 本文使用的术语“轭合物”指的是两种或多种共价连接的化合物以使得每种化合物的功能被保持为共轭的。

[0044] 本文所使用的术语“树突细胞(DC)”为抗原呈递细胞,存在于体内、体外、来自体内或在宿主或患者内,或者其可以源自造血干细胞或单核细胞。树突细胞及其前体细胞可以从多种淋巴器官(例如脾脏、淋巴结)以及骨髓和周边血液中分离。DC具有在多个方向远离树突细胞体延伸的薄层(层形足板)的特征形态。典型地,树突细胞表达高水平的MHC和共刺

激(例如 B7-1和B7-2)分子。树突细胞可以包括体外T细胞的抗原特异性分化,并且能够在体外和在体内激发原始T细胞应答。术语“树突细胞”包括分化的树突细胞,无论是成熟的还是不成熟的树突细胞。这些细胞可以通过特定细胞表面标记(例如CD11c、MHC II类以及至少低水平的CD80和CD86)的表达来表征。此外,树突细胞可以通过它们刺激同种异体应答的能力以及混合淋巴细胞反应(MLR)来功能性地表征。表述“树突细胞制备”指的是包含可在适用于所述细胞脉冲的介质中获得自主体的树突细胞的组合物。

[0045] 本文所使用的表述“与HIV感染相关的疾病”包括其中所述主体具有发展的AIDS的状态以及其中受到HIV感染的受试者并未显示出任意的疾病迹象或症状的状态。由此,当施加至未出现临床感染迹象的受试者的时候,本发明的组合物可以具有预防活性,因为它们可以预防该疾病的发生。所述组合物能够预防或减缓健康CD4+T细胞在这样的受试者中的感染和毁坏。其还指的是预防和减缓获得性免疫缺陷病的症状的发生,例如极低的CD4+T细胞含量和通过例如分枝杆菌属(*Mycobacteria* spp.)、卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)和卡氏肺隐球菌(*Pneumocystis cryptococcus*)的条件致病菌的重复感染。有益的或期望的临床结果包括但不限于绝对的天然CD4+T细胞量的增加(范围10-3520),CD4+T细胞相对于总循环免疫细胞的百分比的增加(范围1-50%),和/或CD4+T细胞量相对于未受感染主体中的正常CD4+T细胞量的百分比的增加(范围1-161%)。“治疗”还指与所期望的存活相比,感染受试者的延长的存活,如果受试者并不接受任何的HIV靶向治疗。

[0046] 本文使用的“双链RNA”或“dsRNA”指的是由双链组成的RNA分子。双链分子包括由自身折回以形成双链结构的单个RNA分子所组成的那些。例如,祖分子的茎环结构,单链miRNA源自于祖分子,被称为前体miRNA(Bartel等,2004.*Cell*1116:281-297),包含dsRNA分子。

[0047] 本文使用的表述“与由包膜病毒导致的感染相关的疾病”包括但不限于:

[0048] 1)由属于丝状病毒科的包膜病毒导致的疾病,包括但不限于由马堡病毒导致的马堡病毒病(马堡出血热或MHF),以及由埃博拉病毒导致的埃博拉病毒病(埃博拉出血热或EHF),和

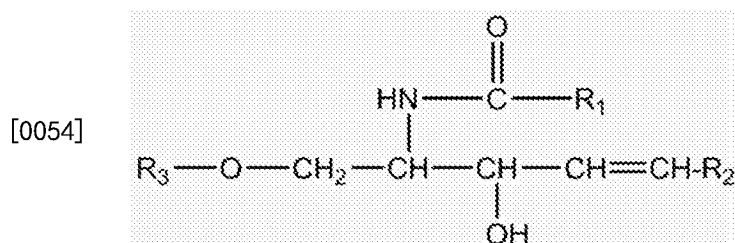
[0049] 2)由属于逆转录病毒科的包膜病毒导致的疾病。由包膜病毒感染导致的其它疾病包括但不限于登革热、登革出血热(DHF)、黄热病、登革热、急性和慢性丙型肝炎、委内瑞拉出血热、巴西出血热、玻利维亚出血热、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎、拉沙热、汉坦病毒肺综合征(HPS)、脑膜炎和流行性感冒。

[0050] 本文使用的术语“包膜病毒”指的是具有外膜或包膜的任何动物病毒,其为包含病毒蛋白质的脂质双层,包围病毒外壳。示例性的包膜病毒包括但不限于痘病毒科、肝脱氧核糖核酸病毒科、披膜病毒科、沙粒病毒科、黄病毒科、正粘病毒科、副黏液病毒科、布尼亚病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、冠状病毒科、逆转录病毒科和博尔纳病病毒科的病毒家族成员。

[0051] 本文使用的术语“表位”指的是能够特定结合至免疫球蛋白或者能够由主要组织相容性复合体(MHC)蛋白质(例如I类或II类)呈递至T细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常为适配在MHC分子沟槽内的5-30个氨基酸长的短肽,所述MHC分子将特定的氨基酸侧基呈递至T细胞受体,并且在所述沟槽内具有特定的其它残基(例如由于所述沟槽的特定的电荷特征),肽侧基和T细胞受体。

[0052] 本文使用的术语“神经节苷脂”或“唾液酸神经节苷脂”指的是鞘糖脂，每分子包含数个单糖单元。包含在神经节苷脂或者神经节苷脂衍生物中的合适的单糖单元的例子为D-半乳糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、葡萄糖和N-乙酰神经氨酸。特别优选的神经节苷脂为鞘氨醇(2-氨基-4-十八烯-1,3-二醇,天蛾-4-锦葵色素-3-葡萄糖苷)的衍生物,特别地,其具有通过氧的方式而被结合至C-1的糖残基和短链(特别是C₂-C₁₈)脂肪酸,其可以是饱和的或者不饱和的,通过C-2上的氮的方式而被结合。进一步给出的优选的神经节苷脂包含:

[0053] (i) N-酰基鞘氨醇(神经酰胺),其具有通用结构:



[0055] 其中,R₁为长链脂肪酸残基,特别是C₆-C₃₀、更优选C₈-C₂₄脂肪酸残基,R₂为长链烷基残基,特别是C₆-C₃₀、更优选C₈-C₂₄烷基残基,并且R₃为H,和

[0056] (ii) 寡糖链,承载链接至神经酰胺的终端伯羟基的一个或多个N-乙酰神经氨酸(例如N-乙酰神经氨酸,NANA,唾液酸)。所述N-乙酰神经氨酸残基或多个残基可以通过唾液酸内任意可能的位置结合至寡糖,并结合至寡糖分子内任意可能的位置。在优选的实施方式中,N-乙酰神经氨酸通过唾液酸的位置2的羟基连接至寡糖(唾液酸结构的编号开始于羧酸盐碳并继续围绕该链)。在另一优选的实施方式中,唾液酸通过形成寡糖一部分的半乳糖残基的位置3或6的羟基被连接至寡糖。在优选的实施方式中,“N-乙酰神经氨酸”形成α2,3-唾液酸化或者α2,6-唾液酸化寡糖。

[0057] 本文使用的术语“HIV”包括HIV-1和HIV-2以及SIV。“HIV-1”是指1型人类免疫缺陷病毒。HIV-1包括但不限于细胞外病毒微粒以及与HIV-1感染细胞相关的HIV-1的形式。HIV-1病毒可以代表任意已知的主要亚型(A、B、C、D、E、F、G和H型)或者外围亚型(O组),包括实验室毒株和主要隔离种群。“HIV-2”是指2型人类免疫缺陷病毒。HIV-2包括但不限于细胞外病毒微粒以及与HIV-2感染细胞相关的HIV-2的形式。术语“SIV”是指猿猴免疫缺损病毒,其为感染猴子、黑猩猩和其它非人类灵长目动物的HIV样病毒。SIV包括但不限于细胞外病毒微粒和与SIV感染细胞相关的SIV的形式。

[0058] 本文使用的术语“HIV免疫原”指的是衍生自HIV的蛋白质或肽抗原,其能够在主体中产生免疫应答。用于根据本发明的HIV免疫原可以选自任意的HIV隔离种群(例如任何原生的或培养的HIV-1、HIV-2或HIV-3隔离种群、株或分支)。

[0059] 本文使用的术语“HIV感染”指的是已被证实的HIV抗体、HIV抗原或HIV核酸在受试者中的存在,其通过使用本领域技术人员已知的HIV试验(例如HIV EIA、蛋白质印记、PCR试验)检测病毒的存在而被证明。

[0060] 本文使用的术语“免疫原”指的是能够单独地或者与佐剂联合诱导免疫应答的物质或材料(包括抗原)。正如将被理解的,通过疫苗产生的免疫应答可以是体液或细胞免疫应答。本文使用的术语“体液免疫应答”用于描述抵抗外来抗原的免疫应答,其由T细胞和它们的分泌产物介导。本文使用的术语“细胞免疫应答”用于描述抵抗外来抗原的免疫应答,其通过由B细胞产生的抗体介导。疫苗为全身或者局部施用。所述疫苗可以通过单独施用的

方式来施用,或者通过先描述的用于施用本发明组合物的多次施用的方式来增加施用。本文使用的术语“预防”指的是减少病变细胞在动物内的产生。预防可以是完全的(例如在受试者内完全不存在病变细胞)。所述预防还可以是局部的,从而使得例如病变细胞在主体内的产生小于不通过本发明而发生的。预防还指降低临床症状的易感性。

[0061] 本文使用的表述“唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂”指的是能够抑制唾液酸粘附素和唾液乳糖或者包含唾液乳糖的任意其它化合物之间结合的任何分子或化合物。抑制剂能够通过亲和力特别地结合至唾液酸粘附素和唾液乳糖之一,所述亲和力大于唾液酸粘附素和唾液乳糖之间结合的亲和力。如在本发明中使用的,表述“特异性结合”指的是第一分子通过两个分子的三维结构之间所存在的互补性而特别地结合至第二分子的能力,其对于非特异性结合具有本质上更高的亲和力,从而使得所述第一和第二分子之间的结合优选在任何所述的分子与反应混合物中存在的其它分子相结合之前发生。应当理解在两个分子结合时存在高亲和力,当由所述的结合导致的复合物具有的解离常数(KD)小于 10^{-6} M、小于 10^{-7} M、小于 10^{-8} M、小于 10^{-9} M、小于 10^{-10} M、小于 10^{-11} M、小于 10^{-12} M、小于 10^{-13} M、小于 10^{-14} M或小于 10^{-15} M的时候。

[0062] 本文使用的术语“干扰RNA”指的是通过结合并抑制mRNA加工、例如抑制mRNA翻译或导致mRNA降解的分子通过特定的mRNA的破坏的选择性的后转录基因沉默。合适的干扰RNA包括但不限于siRNA、shRNA、内源性miRNA和人工miRNA。例如,其包括在先定义为siRNA的序列,而无需考虑RNA的下游加工机理(即尽管siRNA被认为具有导致mRNA分解的体内加工的特定方法,在这里描述的侧翼序列的内容中这样的序列可被结合至载体内)。

[0063] 本文使用的术语“分离”指的是从它们被引入的介质部分地或者完全地移除病毒微粒。

[0064] 本文使用的术语“外源凝集素”指的是任何不同于抗体的并且能够结合至碳水化合物或由碳水化合物改性的结构的蛋白质,包括糖蛋白和糖基化纳米结构。

[0065] 本文使用的术语“脂质微泡”或“脂质体”指的是包含外脂质层的微泡,所述外脂质层可以是脂质单层或双层。当外脂质层为脂质单层的时候,脂质体也称为胶团。脂质体可以具有一个或多个脂质膜。本发明考虑也称为单层的单层脂质体和称为多层的多层脂质体。

[0066] 本文中可互换使用的术语“微RNA”或“miRNA”为内源性RNA,其中的某些已知用于以转录后水平调节蛋白质编码基因的表达。内源性微RNA为天然存在于基因组中的小RNA,其能够调制mRNA的高效应用。术语人工微RNA包括除了内源性微RNA之外的能够调制mRNA的高效利用的任何类型的RNA序列。微RNA序列已在文献中有所描述,例如Lim,等,Genes and Development,17,p.991-1008(2003),Lim等Science299,1540(2003),Lee和Ambros Science,294,862(2001),Lau等,Science294,858-861(2001),Lagos-Quintana等,Current Biology,12,735-739(2002),Lagos Quintana等,Science294,853-857(2001),以及Lagos-Quintana等,RNA,9,175-179(2003),其通过引用而被纳入本发明中。多个微RNA还可被引入至前体分子中。此外,miRNA样茎环结构可以作为载体而在细胞中表达用以传递人工miRNA和短干涉RNA(siRNA),用于通过miRNA和/或RNAi路径调制内源性基因的表达的目的。本文使用的术语“包含唾液乳糖部分的分子”指的是在其结构中包含结合至唾液酸片段的 β -D-吡喃型半乳糖-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖片段的任意分子。在优选实施方式中,所述 β -D-吡喃型半乳糖-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖片段形成寡糖的一部分,其中吡喃型半乳糖-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖片段

可以形成链中末端的两个单糖残基或者可在两侧被连接至其它的单糖残基。包含吡喃型半乳糖-(1→4)-D-葡萄糖片段的寡糖可以包含至少3、4、5、6、7、8、9、10或更多的单糖残基。所述寡糖可以如此提供或者形成神经节苷脂的一部分。

[0067] 本文使用的术语“序列同一性%”通过在对比窗口比较两个最优化排列的序列来确定,其中多肽或多核苷酸序列在对比窗口中的片段可以包含增加或删减(例如间隙或突出),与用于两个序列最优化排列的参考序列(其并不包含增加或删减)相比。该百分比通过确定位置数量来计算,在所述位置,在两个序列中出现的相同的氨基酸残基或核酸残基会产生匹配位置的数量,令匹配位置的数量除以对比窗口内位置的总数并将该结果乘以100从而获得序列同一性百分比。对齐序列的运算法则为本领域已知的。用于对比的序列的最优化排列可被实施,例如通过Smith-Waterman局部同源性算法、Needleman-Wunsch同源性比对算法、Pearson-Lipman相似性搜索方法、这些算法的计算机实施或者通过手工排列和视觉检查。参见Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Math. 1981; 2:482-489; Needleman S, Wunsch C, J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453; Pearson W, Lipman D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:2444-2448; Tatusova T, Madden T, FEMS Microbiol. Lett. 1999; 174:247-250; the GAP, BESTFIT, FASTA和TFASTA programs, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, US; Ausubel F, 等., Eds., “Short Protocols in Molecular Biology”, 第四版. (John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, US, 1997)。

[0068] 在这里可互换使用的术语“药学上可接受的载体”、“药学上可接受的稀释剂”、“药学上可接受的赋形剂”或者“药学上可接受的载体”指的是非毒性的固体、半固体或液体填料、稀释剂、包封材料或任何常规类型的配方助剂。制药学可接受的载体为所应用的剂量和浓度对于接受者基本上为非毒性的,并且可以与配方的其它成分相兼容。例如,用于包含多肽的制剂的载体将通常不会包括氧化剂和已知对多肽有毒的其他化合物。

[0069] 本文使用的术语“磷脂”指的是包含一个或多个磷酸基团的脂质。磷脂在性质上为两亲的;即每个分子由亲水性部分和疏水性部分构成。在这里,术语“磷脂”包括药学上可接受的盐和这样的化合物的酯类衍生物。磷脂可以根据磷酸甘油酯(或甘油磷脂)中乙醇的类型来分类,当它们携带甘油主链和鞘脂的时候,其中所述脂质包含鞘氨醇。两个种类均存在于生物膜中。磷酸甘油酯为天然发现的最丰富的磷脂种类,并且包括但不限于磷脂酰胆碱(例如卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油和心磷脂。每种类型的磷酸甘油酯的结构多样性取决于脂肪酸酯基团的链长和饱和度的可变性。

[0070] 本文使用的术语“蛋白酶抑制剂”指的是HIV-1蛋白酶,使病毒多聚蛋白前体(例如病毒GAG和GAG Pol多聚蛋白)溶蛋白性裂解为在感染HIV-1中发现的单功能蛋白质所需要的酶。

[0071] 本文使用的术语“逆转录酶病毒”指的是属于逆转录病毒家族的病毒,其特征在于RNA病毒可在宿主细胞中通过逆转录酶复制以由其RNA基因组产生DNA。

[0072] 本文使用的术语“逆转录酶抑制剂”指的是抑制HIV-1逆转录酶活性的任何化合物,所述酶会催化病毒基因组HIV-1RNA转化为前病毒HIV-1DNA。

[0073] 术语“核酶”指的是RNA基酶,能够靶向并裂解DNA中或者更典型地RNA中特定的碱基序列。

[0074] 本文使用的“shRNA”或“小发夹RNA”（还称为茎环结构）为siRNA类型。在一种实施方式中，这些shRNA由短的、例如约19至约25个核苷酸、反义链，之后约5至约9个核苷酸的核苷酸环以及类似的有义链组成。可替换地，有义链可以位于核苷酸环结构之前并且反义链位于其后。

[0075] 本文使用的“siRNA”指的是形成双链的核酸。

[0076] RNA，其中双链RNA具有降低或抑制基因或靶基因表达的能力，当siRNA作为靶基因sEH而存在于或表达于小细胞中的时候。双链RNA、siRNA可以通过互补链而形成。在一种实施方式中，siRNA指的是可以形成双链siRNA的核酸。siRNA的序列相当于全长度靶基因或其序列。典型地，siRNA为至少约15-50个核苷酸的长度（例如每个双链siRNA的互补序列为约15-50个核苷酸的长度，并且双链siRNA为约15-50个碱基对的长度，优选约19-30个碱基核苷酸，优选约20-25个核苷酸长度，例如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸长度）。在这里可互换使用的术语“唾液酸粘附素”、“唾液酸结合Ig类外源凝集素I”、“唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-1（siglec-1）”、CD169指的是I类外源凝集素，其由17个免疫球蛋白（Ig）域组成，其结合至唾液酸以在高度保留的精氨酸残基和唾液酸的羧基之间形成盐桥。参见May A,等, Mol. Cell 1998; 1: 719-728。根据本发明使用的合适的唾液酸粘附素变体包括人唾液酸粘附素（描述于UniProt数据库，登陆号Q9BZZ2）、猪唾液酸粘附素（描述于UniProt数据库，登陆号A7LCJ3）和鼠唾液酸粘附素（描述于UniProt数据库，登陆号Q62230）。

[0077] 本文使用的术语“唾液酸粘附素抑制剂”指的是导致唾液酸粘附素水平和/或活性降低的任意分子。抑制剂包括但不限于导致唾液酸粘附素蛋白质的量降低的分子，以及导致mRNA编码的唾液酸粘附素的量降低的分子。

[0078] 本文使用的术语“唾液乳糖”指的是包含结合至唾液酸片段的乳糖片段（ β -D-吡喃型半乳糖-（1 $\rightarrow$ 4）-D-葡萄糖）的分子。所述唾液酸可以在唾液酸中任何可能的位置结合至乳糖，并被结合至乳糖分子中任意可能的位置。在优选的实施方式中，所述唾液酸通过唾液酸的位置2上的羟基基团被连接至乳糖（唾液酸结构的编号开始于羧基碳并围绕链延续）。在另一优选的实施方式中，唾液酸通过乳糖分子的位置3或6上的羟基基团连接至乳糖。在优选的实施方式中，“唾液乳糖”为 α 2,3-唾液酸化乳糖或者 α 2,6-唾液酸化乳糖。唾液乳糖可以是源自真核或原核的。优选地，唾液乳糖为源自真核的。真核或原核细胞可以是致病的或非致病的。

[0079] 本文使用的术语“受试者”是指包括所有已示出或者期望具有抗原呈递细胞的动物。在特别的实施方式中，所述受试者为哺乳动物、人类或非人类灵长类动物、狗、猫、马、牛、其它家畜或啮齿类动物（例如小鼠、大鼠、豚鼠）。术语“受试者”和“个体”在这里可互换使用。

[0080] 本文使用的术语“治疗”指的是任意种类的治疗，其目的在于终止、预防、改进或降低对如在这里所述的临床症状的易感性。在优选的实施方式中，术语治疗指的是如在这里所定义的疾病或症状的预防性治疗（即治疗以降低临床症状的易感性）。由此，“治疗”和它们的等义术语指的是获得所期望的药理学或生理学效果，覆盖哺乳动物、包括人类的任意的病理症状或疾病的治疗。所述效果可以是预防性的，其完全地或者局部地预防其疾病或症状，和/或可以是治疗性的，其局部或完全治愈疾病和/或反作用于疾病。也就是说，“治

疗”包括(1)防止疾病在主体中发生或复发,(2)抑制疾病,例如制止其发展,(3)停止或终止疾病或者至少是与之相关的症状,从而使得宿主不再遭受疾病或其症状,例如导致疾病或其症状的退化,例如通过恢复或者修复丧失的、丢失的或有缺陷的功能,或者刺激无效进行,或(4)减轻、缓解或改善疾病或与之相关的症状,其中,改善被用于广泛含义,用以指代至少是参数量级上的降低,例如炎症、疼痛或免疫缺陷。

[0081] 本文使用的术语“疫苗”和“疫苗组合物”指的是包含根据本发明的合适形式的轭合物或组合物的制剂,其用于施用到脊椎动物并诱导保护性免疫应答。所述的轭合物或组合物为足以诱导免疫,从而预防或改善感染或降低感染的至少一种症状或增强本发明轭合物或组合物的另一种剂量的效力。

[0082] 本文使用的术语“阴道乳膏”指的是适用于阴道应用的半固体制剂。本领域已知的多种赋形剂或载体可用于该制剂中。所述赋形剂包含不会反作用于配方组分的天然产生的或源自合成的材料。本文使用的合适的载体包括但不限于纯净水、白凡士林、黏附聚合物、液体石蜡、聚山梨醇酯60、山梨醇硬脂酸酯硅、蜡、石油、胶状物、聚乙二醇和多种其它材料,取决于所使用制剂的特定类型。

[0083] 本文使用的术语“表达载体”指的是由连接至载体上的转录调控序列的序列指导RNA或多肽表达的载体。所表达的序列将通常但不是必须与细胞是异源的。表达载体可以包含额外的元件,例如表达载体可以具有两个复制系统,由此允许其保持在两个有机体中,例如在用于表达的人类细胞中和用于克隆和扩增的原核宿主中。

[0084] 本文使用的术语“病毒进入抑制剂”指的是能够干涉病毒进入至细胞中的任何化合物。

[0085] 本文使用的术语“病毒免疫原”指的是通过本发明的失活处理而获得的全部HIV灭活的病毒粒子。

[0086] 2.使用唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的本发明的治疗方法

[0087] 本发明公开了HIV-1膜中的神经节苷脂对于其通过成熟树突细胞(mDC)的吸收来说是必须的。特别地,存在于特定的病毒神经节苷脂中的唾液乳糖分子被认为是用于mDC吸收的决定部分。此外,本发明还公开了唾液酸粘附素(CD169,siglec-1),位于数个免疫系统细胞表面上的细胞粘附蛋白,例如DC,连接至HIV-1表面中的唾液乳糖分子,从而能够通过mDC摄入病毒。因此,唾液酸粘附素和唾液乳糖的相互作用允许HIV-1进入mDC。结果,这种相互作用的抑制就可用于预防HIV的扩散,通过由mDC阻碍CD4+T细胞的转染。包膜病毒从受感染细胞的膜出芽获得它们的包膜,并因此病毒包膜的组成将反映细胞的组成,其中病毒出芽自所述细胞。因为生物膜包含神经节苷脂,所以预期病毒包膜包含神经节苷脂。此外,先前在HIV-1和数种其它病毒(例如SFV、SV、MuLV)的膜中检测到神经节苷脂GM3。参见Chan R,等,J.Virol.2008;82:11228-11238和Kalvodova L,等,J.Virol.2009;83:7996-8003。因此,在本发明中确定的通过mDC的HIV吸收的机理可以与任何包膜病毒的吸收相联系,并且由此,唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的使用可预防通过任何包膜病毒的感染。由此,第一方面,本发明涉及一种唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂用于治疗或预防与由包膜病毒导致的感染相关的疾病。

[0088] 在另一种实施方式中,本发明涉及唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的应用,其用于制备治疗与由包膜病毒导致的感染相关的疾病的药剂。

[0089] 在另一方面中,本发明涉及一种用于治疗或预防与由主体内的包膜病毒导致的感染相关的疾病的方法,包括给所述受试者施用在唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂。

[0090] 适用于在本发明中使用的抑制剂可以使用用于检测唾液酸粘附素和唾液乳糖或包含唾液乳糖的任意其它化合物之间相互作用的任意已知的试验来确认。举例来说,根据本发明使用的抑制剂可以使用在本发明的实施例5中所描述的试验来确认,基于抑制剂的能力的确定来降低通过包含在它们的结构中具有唾液乳糖的脂质的大的单层囊泡的成熟树突细胞的捕捉。在它们的结构中包含唾液乳糖并且可被结合至大的单层囊泡内的脂质包括单、双和三唾液酸化神经节苷脂,其包含唾液乳糖部分,例如但不限于GM1、GM2、GM3、GD1b和GT1b。

[0091] 根据本发明使用的合适的抑制剂包括但不限于唾液乳糖、包含唾液乳糖部分的分子、抗唾液酸粘附素抗体、抗唾液乳糖抗体和包含唾液乳糖部分的分子的囊泡。

[0092] 在优选的实施方式中,根据本发明使用的抑制剂为唾液乳糖。

[0093] 在优选的实施方式中,包含唾液乳糖部分的分子为具有少于四个唾液酸的神经节苷脂。

[0094] 在表1中描述了适用于用作唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的神

[0095] GM3 aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0096] GM2 bDGalpNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-3)] bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0097] GM2a aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0098] GM1/GM1a bDGalp (1-3) bDGalNAc [aNeu5Ac (2-3)] bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0099] GM1b aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0100] GD3 aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0101] GD2 bDGalpNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3)] bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0102] GD1a aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-3)] bDGalp (1-4) bDG1 cp (1-1) Cer

[0103] GD1α aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-6)] bDGalp (1-4) bDG1 cp (1-1) Cer

[0104] GD1b bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3)] bDGalp (1-4) bDG1 cp (1-1) Cer

[0105] GT1a aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-3)] bDG alp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0106] GT1,GT1b aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3)] bDG alp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0107] OAc-GT1b aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) aXNeu5Ac9Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3)] bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0108] GT1c bDGalp (1-3) bDGalNAc (1-4) [aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3)] bDG alp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer

[0109] GT3 aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGal (1-4) bDG1c (1-1) Cer

[0110] 表1:包含唾液乳糖残基的神经节苷脂,其抑制唾液酸粘附素和唾液乳糖之间的相互作用。 α Neu5Ac=5-乙酰- α -神经氨酸; α Neu5Ac9Ac=5,9-二乙酰- α -神经氨酸; β DGalp= β -D-吡喃半乳糖; β DGalpNAc=N-乙酰- β -D-吡喃半乳糖; β DGlcp= β -D-吡喃葡萄糖及Cer=神经酰胺(通用N-乙酰化鞘氨基醇)。

[0111] 本发明还提出神经节苷脂衍生物的应用,其中,一种或多种如下的功能基被取代或添加至主链,特别是神经酰胺主链:

[0112] 1) 卤原子,结合至烷基、烯基、炔基或芳基自由基,

[0113] 2) 醇基(伯醇、仲醇或叔醇),

[0114] 3) 乙醚基,

[0115] 4) 羰基官能团(例如醛或酮),

[0116] 5) 羧酸基团,

[0117] 6) 羧酸酐基团,

[0118] 7) 氨基甲酰基团,

[0119] 8) 卤甲酰基,

[0120] 9) 氰基、酯基、包括内酯基,

[0121] 10) 苄基、苯基、甲苯磺酰基、甲苯基或磺酰基,

[0122] 11) 氨基(伯氨、仲氨或叔氨),

[0123] 12) 异氰酸酯、氰酸酯、硫代异氰酸酯、硫代氰酸酯、氨基甲酸酯或

[0124] 13) 叠氮化物或重氮基。

[0125] 在另一实施方式中,“唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂”为特异于唾液酸粘附素或唾液乳糖的抗体。

[0126] 本发明还包含如上所述的不同类型的抗体的片段的使用,所述抗体基本上保留了结合唾液酸粘附素的能力并防止其与包含唾液乳糖的分子相互作用。术语“抗体片段”包括例如为Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、单链Fv片段(scFv)、双抗体和纳米抗体的抗体片段。

[0127] 在另一实施方式中,唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂为抗唾液酸粘附素特异性抗体7D2(购自Abcam,产品目录号:ab18619)或其片段。在另一实施方式中,唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂为抗唾液酸粘附素特异性抗体7-239(购自eBioscience,产品目录号:12-1699-41)或其片段。

[0128] 在另一实施方式中,唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂为唾液乳糖结合分子。这种类型的分子能够结合包膜病毒表面上的唾液乳糖,并预防它们与唾液酸粘附素的相互作用。合适的唾液乳糖结合分子包括但不限于唾液乳糖结合凝集素和抗唾液乳糖抗体。合适的唾液乳糖结合凝集素包括但不限于唾液酸粘附素或其胞外域,欧洲接骨木(*Sambucus nigra*) (接骨木)树皮凝集素(对具有 α 2,6-键的唾液乳糖特异)、怀槐(*Maackia amurensis*)凝集素(对具有 α 2,3-唾液酸键的唾液乳糖特异)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)神经氨酸酶或凝集素类结构域。

[0129] 在另一实施方式中,唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂为囊泡,其包含包含唾液乳糖部分的分子。

[0130] 在一种实施方式中,所述囊泡为脂质体、脂质体-DNA复合物或脂质纳米颗粒。在一种实施方式中,所述囊泡为脂质体。脂质体为人工制备的囊泡,其主要由脂质双层组成并可

被用作用于施用营养物质和药物制剂的输送载体。脂质体可以具有不同的大小,例如但不限于直径为数百纳米并且可以包含一系列由狭窄的水性隔间分离的同心双层的多层囊泡 (MLV)、直径小于50nm的小的单细胞囊泡 (SUV)、以及直径介于50至500nm之间的大的单层囊泡 (LUV)。脂质体设计可以包括但不限于调理素或配体以改善脂质体与不健康组织或与活性作用的结合,所述活性作用例如但不限于内吞作用。脂质体可以包含低或高pH以改善药物配方的输送。在优选的实施方式中,所述囊泡为大的单层囊泡。

[0131] MLV可以通过溶剂注射、脂质水合、逆向蒸发、冷冻干燥或通过重复冷冻和熔化来制备。SUV或LUV可以通过例如超声降解法,通过具有所定义孔径的聚碳酸酯过滤器的挤出,通过使用弗式压碎器,即通过使MLV在高压下穿过小孔,或者通过溶解注射方法,利用例如为醚或醇的溶剂来制备。可以形成的其它类型的囊泡包括单层囊泡 (ULV)、大的单层囊泡 (LUV);稳定的多层囊泡 (SPLV),寡层囊泡 (OLV),通过使用透析、柱层析、生物珠SM-2、逆向蒸发 (REV) 移除清洁剂来制备;通过高压挤出形成的中等大小的单层囊泡,或者巨大的多泡囊泡 (MW或GMW,美国专利US6,162,462) 脂质体,直径至少1微米,通过利用合适的盐 (例如硫酸铵) 的水溶液涡流脂质膜、均匀化所获得的悬浮液以形成小的单层囊泡 (SUV) 的悬浮液、并在液氮中重复冷冻-融化所述SUV悬浮液、然后通过水来形成MW而制备。所有的这些和其它的脂质体制备方法均为本领域已知的。

[0132] 根据本发明的合适囊泡包含一个或多个膜,所述膜由至少一种选自由二油酰基磷脂酰乙醇胺 (以下称为“DOPE”)、棕榈酰油酰基甘油胆碱磷酸 (以下称为“POPC”)、胆固醇 (以下称为“CHOL”)、0,0'-二十四烷酰-N-(α -三甲基氨基乙酰基) 二乙醇胺氯 (以下称为“DC-6-14”)、氢化提纯的蛋黄卵磷脂、氢化提纯的大豆卵磷脂、二棕榈酰卵磷脂、二硬脂酰卵磷脂和1-棕榈酰-2-油酰卵磷脂组成的组的磷脂组成。优选地,所述脂质体为包含POPC、DPPC、CHOL和鞘磷脂 (SM) 的LUV。根据本发明LUV中的POPC、DPPC、CHOL、SM和包含唾液乳糖部分的含量比 (摩尔比) 为POPC:DPPC:CHOL:SM:包含唾液乳糖部分=25:16:10:45:4。包含在本发明中使用的可被结合至囊泡中的唾液乳糖部分的合适的分子包括如上所述的任意分子,其包括在表1中提及的任何神经节苷脂,以及其衍生物。在某些实施方式中,在其结构中包含唾液乳糖并可被结合至LUV内的分子包括单、二和三唾液酸化神经节苷脂,所述唾液酸化神经节苷脂包含唾液乳糖部分,例如但不限于GM1、GM2、GM3、GD1b和GT1b。

[0133] 在一种实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由I类丝状病毒科病毒导致的疾病。I类丝状病毒科病毒具有单链、未分段的 (-) 有义RNA基因组,并且其导致人类和非人类灵长类动物的严重出血热。在某些方面中,丝状病毒科病毒为埃博拉病毒,例如科特迪瓦 (Cote d'Ivoire) (CI),苏丹 (Sudan) (S),扎伊尔 (Zaire) (Z) 或莱斯顿 (Reston) (R) 类的埃博拉病毒。在其它方面中,丝状病毒科病毒为马尔堡病毒。

[0134] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由正粘病毒科病毒导致的疾病,例如流感病毒、托高土病毒、多理病毒 (Dhori virus) 或传染性鲑鱼贫血病毒。例如,在某些方面中,在这里提供的方法被用于治疗或预防人体被流感A型病毒、流感B型病毒或流感C型病毒的感染。在某些方面中,流感A型病毒为H1N1、H2N2、H3N2或H5N1亚型。

[0135] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由副黏液病毒科病毒导致的疾病,例如人副流感病毒、人呼吸道合胞病毒 (RSV)、仙台病毒、纽卡斯尔病病毒、腮腺炎病毒、风疹 (麻疹) 病毒、亨德拉病毒、尼帕病毒、禽肺病毒或犬瘟热病毒。

[0136] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由弹状病毒科病毒导致的疾病,例如狂犬病病毒、水泡性口炎病毒(VSV)、莫科拉病毒、狂犬相关病毒、杜梅海格病毒、欧洲蝙蝠病毒、鲑鱼传染性造血坏死病毒、病毒性出血性败血症病毒、鲤鱼春病毒血症病毒或黑鱼弹状病毒。

[0137] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由博尔纳病病毒科病毒导致的疾病,例如博尔纳病病毒。

[0138] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由布尼亚病毒科病毒导致的疾病,例如布尼安维拉病毒、汉坦病毒、克里米亚-刚果病毒、加利福尼亚脑炎病毒、山谷热病毒或白蛉热病毒。

[0139] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由沙拉病毒科病毒导致的疾病,例如旧世界沙拉病毒,拉沙热病毒、伊派病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、莫巴拉病毒、莫佩亚病毒,或新世界沙拉病毒、例如胡宁病毒(阿根廷出血热)、沙比亚病毒(巴西出血热)、阿马帕里病毒、佛雷斯病毒、瓜纳瑞托病毒(委内瑞拉出血热)、马丘坡病毒(玻利维亚出血热)、拉丁美洲病毒、博利瓦病毒、巴拉那病毒、Pichinde病毒, Pirital病毒, Tacaribe病毒, Tamiami病毒或Whitewater Arroyo病毒。在某些方面中,所述沙拉病毒科病毒为淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、拉沙病毒,胡宁病毒,马丘坡病毒,沙比亚病毒或瓜纳瑞托病毒。

[0140] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由虫媒病毒导致的疾病。虫媒病毒包含多于400种包膜RNA病毒的大组,其主要通过节肢动物介质(例如蚊子、沙蝇、跳蚤、蜱类、虱子)来传递。在某些方面中,虫媒病毒为披膜病毒科病毒,例如甲病毒属(例如委内瑞拉马脑脊髓炎病毒或辛德毕斯病毒)或风疹病毒属(例如风疹病毒)。例如,在某些方面中,在这里提供的化合物被施加至孕妇以治疗或预防先天性风疹综合症(CRS)和与之相关的症状,例如出生体重低、耳聋和流产。

[0141] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由黄病毒科病毒导致的疾病,例如黄病毒、瘟病毒、肝炎病毒、黄热病毒、登革热病毒或日本脑炎(JE)病毒。

[0142] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由肝炎病毒导致的疾病,例如丙型肝炎病毒或类丙型肝炎病毒。

[0143] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由亨尼毒导致的疾病,例如亨德拉病毒或尼帕病毒。

[0144] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由布尼亚病毒科(-)-有义RNA病毒导致的疾病,例如布尼亚病毒、汉坦病毒、白蛉病毒或内罗病毒。

[0145] 在另一实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由沙拉病毒科病毒导致的疾病,例如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、拉沙病毒、胡宁病毒、马丘坡病毒或瓜纳瑞托病毒。

[0146] 在某些方面中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由日本脑炎病毒导致的疾病,例如Alfuy病毒、日本脑炎病毒、科科百拉(Kokobera)病毒、Koutango病毒、库宁(Kunjin)病毒、墨累谷(Murray Valley)脑炎病毒、圣路易(St.Louis)脑炎病毒、斯特拉特福德(Stratford)病毒、乌苏图(Usutu)病毒或西尼罗河(West Nile)病毒。

[0147] 在优选的实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由属于逆转录病毒

属科的病毒导致的疾病。在更优选的实施方式中,所述包膜病毒为属于慢病毒属亚科的病毒。在又一优选的实施方式中,所述包膜病毒属于慢病毒属。在更优选的实施方式中,所述包膜病毒为灵长类慢病毒属,并且特别地为人类免疫缺陷病毒(HIV)或类人猿免疫缺陷病毒(SIV)。

[0148] 在某些方面中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由日本脑炎病毒导致的疾病,例如Alfuy病毒、日本脑炎病毒、科科百拉(Kokobera)病毒、Koutango病毒、库宁(Kunjin)病毒、墨累谷(Murray Valley)脑炎病毒、圣路易(St.Louis)脑炎病毒、斯特拉特福德(Stratford)病毒、乌苏图(Usutu)病毒或西尼罗河(West Nile)病毒。

[0149] 在优选的实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由属于逆转录病毒属科的病毒导致的疾病。在更优选的实施方式中,所述包膜病毒为属于慢病毒属亚科的病毒。在又一优选的实施方式中,所述包膜病毒属于慢病毒属。在更优选的实施方式中,所述包膜病毒为灵长类慢病毒属,并且特别地为人类免疫缺陷病毒(HIV)或类人猿免疫缺陷病毒(SIV)。

[0150] 逆转录病毒的例子包括但不限于如下病毒属: α 逆转录病毒(例如禽白血病病毒(ALV)和劳氏肉瘤病毒(RSV))、 β 逆转录病毒(例如鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、SRV、HERV-K和JRSV)、 γ 逆转录病毒(例如鼠白血病病毒(MLV)、猫白血病病毒(FeLV)、GALV、PERV和HERV-W)、 δ 逆转录病毒(例如牛白血病病毒(BLV)和导致癌症的人类T-淋巴细胞病毒(HTLV-1和HTLV-11))、 ϵ 逆转录病毒(例如白斑鱼皮肤肉瘤病毒(WDSV)和SnRV)、慢性病毒(例如人类免疫缺陷病毒1(HIV-1))、人类免疫缺陷病毒2(HIV-2)、类人猿免疫缺陷病毒(SIVmac和SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV、EIAV和MVV)和泡沫病毒(例如类人猿泡沫病毒(SFVcpz和SFVagm)、FFV和BFV)。

[0151] 在优选的实施方式中,包膜病毒为其中所述包膜病毒的包膜内的至少某些脂质包含唾液乳糖的病毒。在更优选的实施方式中,包膜病毒在病毒包膜中包含神经节苷脂,其中所述神经节苷脂包含至少一个唾液乳糖部分。在又一更优选的实施方式中,神经节苷脂包含少于四个唾液乳糖分子。在又一实施方式中,病毒在其包膜中包含一种或多种在表1中所示的神经节苷脂。

[0152] 在优选实施方式中,“与由包膜病毒导致的感染相关的疾病”为与HIV病毒相关的疾病。

[0153] 本发明还涉及预防或减轻与HIV感染相关的症状。这些包括与HIV感染的次要症状阶段相关的症状,包括例如,带状疱疹、皮疹和指甲感染、口腔溃疡、复发性鼻炎和喉部感染以及体重降低。此外,与HIV感染的主要症状阶段相关的症状包括例如,口腔和阴道鹅口疮(念珠菌属)、持久性痢疾、体重降低、持久性咳嗽和复发性肺结核或复发性疱疹病毒感染,例如感冒疮(单纯疱疹)。可以根据本发明来治疗的晚期艾滋病(AIDS)的其它症状包括例如,痢疾、恶心和呕吐、鹅口疮和口腔溃疡、持久性的复发性阴道感染和宫颈癌、持久性全身性淋巴腺病变(PGL)、严重的皮肤感染、疣和癣、呼吸道感染、肺炎、尤其是卡氏肺孢子虫肺炎(PCP)、带状疱疹(或带状疱疹行疹)、神经系统问题,例如疼痛、手脚麻木或“发麻”、神经学异常、卡波济氏肉瘤、淋巴瘤、肺结核或其它类似的机会性感染。

[0154] 本发明抑制剂的有益效果包括例如,预防或延缓暴露至HIV的个体的初次感染,降低受HIV感染个体的病毒载荷,延长HIV感染的无症状阶段,维持HIV感染患者的低病毒负

载、所述患者的病毒水平已经通过抗逆转录病毒治疗(ART)而被降低,提高CD4T细胞水平或减缓CD4T细胞的增加,HIV-1特异性和非特异性的,在单纯药物患者和利用ART治疗的患者中,提高带有AIDS的个体生命的总体健康或质量并延长带有AIDS的个体的平均寿命。临床医生可以与治疗之前的患者,或者未治疗患者的预期症状,或者使用或未疫苗来治疗的个体的临床试验进行免疫效果比较,从而确定治疗是否对抑制AIDS有效。

[0155] 本发明的组合物可以与一种或多种其它的抗HIV剂或药剂组合用于本发明的方法中。这些其它的化合物可以包含本发明的化合物或者例如已知为用于治疗、预防或减缓HIV感染症状的市售化合物。

[0156] 在非限制性例子中,本发明的化合物可以与一种或多种以下抗HIV药物联合使用:

[0157] 1) 复方药物:依法韦伦、恩曲他滨或富马酸替诺福韦酯(Atripla(R)/BMS, Gilead);拉米夫定或齐多夫定(Combivir(R)/GSK);阿巴卡韦或拉米夫定(Epizicom(R)/GSK);阿巴卡韦、拉米夫定或齐多夫定(Trizivir(R)/GSK);恩曲他滨、富马酸替诺福韦酯(Truvada(R)/Gilead)。

[0158] 2) 进入和融合抑制剂:马拉维若(Celsentri(R), Selzentry(R)/Pfizer);喷他夫西或恩夫韦肽(Fuzeon(R)/Roche, Trimeris)。在某些实施方式中,病毒进入抑制剂为融合抑制剂,CD4受体结合抑制剂为CD4模仿或gp120模仿。在某些其它的实施方式中,病毒进入抑制剂为gp41对抗剂、CD4单克隆抗体或CCR5拮抗剂,包括CCR5拮抗剂亚属,例如锌指蛋白抑制剂。在又一种实施方式中,病毒进入抑制剂为CXCR4共受体拮抗剂。

[0159] 3) 整合酶抑制剂:雷特拉韦或MK-0518(Isentress(R)/Merck)。

[0160] 4) 逆转录酶抑制剂:在根据本发明的组合物中使用的合适的逆转录酶抑制剂为一种或多种选自恩曲他滨、卡普韦林、替诺福韦、拉米夫定、扎西他滨、地拉夫定、奈韦拉平、地丹诺辛、司他夫定、阿巴卡韦、阿洛夫定、齐多夫定、外消旋恩曲他滨、阿立他滨、乙米韦林、艾弗他滨、TMC-278、DPC-083、氨多索韦、(-)- β -D-2,6-二氨基嘌呤二恶茂烷、MIV-210(FLG),DFC(由艾弗他滨)、二恶茂烷胸腺嘧啶核苷、胡桐素A、依曲韦林(TMC-125)、L697639、阿替韦啉(U87201E)、MIV-150、GSK-695634、GSK-678248、TMC-278、KP1461、KP-1212、洛德腺苷(FddA)、5-[(3,5-二氯苯基)硫代]-4-异丙基-1-(4-吡啶基甲基)咪唑-2-甲醇氨基甲酸、(-)-I²-D-2,6-二氨基嘌呤二恶茂烷、AVX-754、BCH-13520、BMS-56190((4S)-6-氯-4-[(1E)-环丙基乙烯基]-3,4-二氢-4-三氟甲基-2(1H)-噻唑酮)、TMC-120和L697639组构成的组的化合物,当以联合治疗使用的时候,所述化合物存在为治疗HIV的有效量。

[0161] 5) 蛋白酶抑制剂:可以与根据本发明的miRNA或多核苷酸编码的miRNA结合的合适的蛋白酶抑制剂选自利托那韦、洛匹那韦、沙奎那韦、安泼那韦、膦沙那韦、阿菲那韦、替拉那韦、印地那韦、阿扎那韦、TMC-126、达芦那韦、莫折那韦(DMP-450)、JE-2147(AG1776)、L-756423、KNI-272、DPC-681、DPC-684、替利那韦(SC-52151)、BMS186318、决昔那韦(SC-55389a)、DMP-323、KNI-227、1-[(2-羟基乙氧基)甲基]-6-(苯基硫代)-胸腺嘧啶,AG-1859,RO-033-4649,R-944,DMP-850,DMP-851和贝卡那韦(GW640385)组成的组。与本发明的化合物联合使用的优选的蛋白酶抑制剂包括沙奎那韦、利托那韦、印地那韦、阿菲那韦、安泼那韦、洛匹那韦、阿扎那韦、达芦那韦、贝卡那韦、膦沙那韦和替拉那韦。特别有用的这样的组合物包括例如AZT+3TC;TDF+3TC;TDF+FTC;ABC+3TC;和阿巴卡韦+3TC。

[0162] 另外,根据本发明的组合物可以进一步包含抗逆转录病毒剂,选自由疫苗、基因疗

法治疗、细胞因子、TAT抑制剂和免疫调节剂组成的组,当以联合治疗使用的时候,其以治疗HIV的有效量存在。

[0163] 另外,根据本发明的组合物可以进一步包含抗感染试剂,选自由抗真菌、抗细菌、抗肿瘤药物(anti-neoplasties,)、抗原生动物、DNA聚合酶抑制剂、DNA合成抑制剂、抗HIV抗体、HIV反义药物、IL-2激动剂、 α -葡糖苷酶抑制剂、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂、凋亡激动剂、凋亡抑制剂和胆碱脂酶抑制剂组成的组,当以联合治疗使用的时候,所述化合物以治疗HIV的有效量存在。

[0164] 另外,根据本发明的组合物可以进一步包含免疫调节剂,其选自由羟乙基磺酸戊烷脒、自体CD8+浸剂、 γ -干扰素免疫球蛋白、胸腺肽、IGF-I、抗Leu3A、自动接种疫苗、生物刺激、体外光分离置换法、环孢霉素、雷帕霉素、FK-565,FK-506,GCSF,GM-CSF、高热疗、异丙肌苷、rVIG,HIVIG,被动免疫治疗和脊髓灰质炎疫苗超免疫组成的组,当以联合治疗使用的时候,所述化合物以治疗HIV的有效量存在。

[0165] 根据本发明抑制剂的和抗HIV试剂的组合物可以导致其抗HIV活性的协同效应。协同效应例如可以使用合适的方法来计算,例如Sigmoid-Emax, Loewe和平均效应方程。参见Holford K,Scheiner L,Clin.Pharmacokinet.1981;6:429-453,Loewe S,Muischnek H,Arch.Exp.Pathol Pharmacol.1926;114:313-326和Chou T,Talalay C,Adv.Enzyme Regul.1984;22:27-55。如上涉及的每个方程均可被用于实验数据以生成相应的图形,从而帮助评估药物组合的作用。与如上涉及的方程相关的相应图形分别为浓度效应曲线、等效线图曲线和联合指数曲线。

[0166] 根据本发明的抑制剂可以进一步包含制药学可接受的载体。合适的载体包括但不限于水、葡聚糖、甘油、生理盐水、乙醇及其组合。所述载体可以包含其它试剂,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂或增强配方效果的佐剂。佐剂例如可以选自由AlK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)、二氧化硅、明矾、Al(OH)₃、Ca₃(PO₄)₂、高岭土、碳、氢氧化铝、胞壁酰二肽、N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酸(thr-DMP)、N-乙酰基-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸(CGP11687,还称为nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1',2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺(CGP19835A,还称为MTP-PE)、RIBI(MPL+TDM+CWS)的2%角鲨烯/Tween-80[®]乳剂、脂多糖及其各种衍生物、包括脂质A、弗氏(Freund's)完全佐剂(FCA)、弗氏非完全佐剂、默克(Merck)佐剂65、多核苷酸(例如多IC和多AU酸)、分支杆菌属的蜡D、肺结核、在棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)、百日咳博代氏杆菌(*Bordetella pertussis*)中发现的物质、和布鲁氏菌(*Brucella*)属的成员,Titermax,ISCOMS,Quil A,ALUN,脂质A衍生物、霍乱毒素衍生物、HSP衍生物、LPS衍生物、合成肽基质或GMDP、白细胞介素1、白细胞介素2、Montanide ISA-51和QS-21、CpG寡核苷酸、多I:C和GM-CSF组成的组。参见Hunter R,US5,554,372和Jager E,Knuth A,W01997028816。

[0167] 根据本发明的抑制剂可以通过本领域技术人员已知的任何方式来施用,例如通过肌肉的、皮下的或静脉内的注射,以及口部、鼻部或肛门给药。参见Banga A,Parenteral controlled delivery of therapeutic peptides and proteins,“Therapeutic Peptides and Proteins”(Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA,US,1995)。为了延长抑制剂发挥其效用的时间,所述抑制剂可被提供为嵌入的、油注射的或者作为微粒体系。所述的微粒体系可以是微颗粒、微胶囊、微球、纳米胶囊或类似颗粒。参见Banga,

1995, 上述。基于合成聚合物的微粒载体已被示出作用为佐剂, 从而除了提供控制释放还增强免疫应答。铝盐也可用作为用以产生免疫应答的佐剂。

[0168] 根据本发明的抑制剂可被配制为杀菌剂组合物。杀菌剂组合物可以以单位剂型来配置, 适用于精确剂量的单独施用。在脉冲剂量中, 提供包括所公开的免疫原的免疫原组合物的 大药丸施用, 随后在一段时间内不对个体施用公开的免疫原, 随后第二次施加大药丸。治疗有效量的抑制剂可以在治疗过程中以单剂量或者以多剂量施加, 例如每天。在特定的非限制性的例子中, 包括所公开的免疫原的免疫原组合物的脉冲剂量在一天中、在一周中、或者在一个月中施加。无论效果是否为需要的 (例如降低的指标、症状或 HIV-1 感染的实验结果), 杀菌剂组合物都可被施加。通常来说, 剂量足以治疗或改善疾病的症状或指标, 而不对个体产生不可接受的毒性。可采用系统或局部给药。

[0169] 所使用的治疗有效量可以根据疾病的严重程度和患者的年龄、体重、一般状态及其它临床因素。由此, 合适的治疗方法的最终确定将通过主治医生来产生。典型地, 在体外使用的剂量可以对原位施加药物组合物的有用的量提供指导, 并且动物模型可被用于确定治疗特定疾病的有效剂量。参见 Gilman R, 等, Eds., “Goodman and Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 第八版 (Pergamon Press, New York, NY, US, 1990), 和 Gennaro A, Ed., “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 第十八版 (Mack Publishing Co., Easton, PA, US, 1990)。典型地, 抑制剂的剂量范围为约 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至约 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。其它合适的范围包括约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至约 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的剂量。在一个实施例中, 所述剂量为约 1.0 μg 至约 50 mg, 例如 1 μg 至 1 mg、例如 1 mg 肽/个体。给药方案可以在每天施用到一年之内尽可能少的施用之间变化, 根据临床因素, 例如个体对于肽的敏感程度以及其疾病的发展速度。因此, 个体可以接受第一剂量所公开的治疗分子, 并且随后在之后的某个时间 (例如至少一天之后, 例如至少一周之后) 接受第二剂量 (或者甚至更多剂量)。

[0170] 本文公开的 药物组合物可以以剂量单位来制备和施加。固体剂量单位包括片剂、胶囊、经皮给药体系和栓剂。治疗量的施加可以通过以单独剂量单位或者以数个更小剂量单位的形式单次施加, 以及通过以特定的间隔多次施加分组剂量。合适的单独或分组剂量包括但不限于约 0.01、0.1、0.5、1、3、5、10、15、30 或 50 μg 蛋白质/kg/天。

[0171] 在治疗应用中, 向受试者施用治疗有效量的抑制剂, 在暴露至 HIV 或受到 HIV 感染之前或之后。当在暴露之前施加的时候, 所述的治疗应用可被称为预防性应用 (例如以疫苗的形式)。组合物的单次或多次施加可以根据需要的剂量和频率以及个体的耐受性来进行。在一种实施方式中, 所述剂量作为大药丸一次施加, 但是在另一实施方式中, 可以周期性地施加直至达到治疗结果、例如保护性免疫应答。通常来说, 剂量足以治疗或改善疾病的症状或指标, 而不对个体产生不可接受的毒性。可采用全身施用和局部施用。

[0172] 有利的是, 在这里公开的杀菌剂组合物可以与其它试剂联合施加, 所述其它试剂例如蛋白质、肽、抗体和其它抗 HIV 试剂。这样的抗 HIV 治疗试剂的例子包括核苷逆转录酶抑制剂, 例如阿巴卡韦、AZT、二脱氧肌苷、恩曲他滨、拉米夫定、司他夫定、替诺福韦、扎西他滨或齐多夫定; 非核苷逆转录酶抑制剂, 例如地拉夫定、依法韦伦或奈韦拉平; 蛋白酶抑制剂, 例如安泼那韦、阿扎那韦、印地那韦、洛匹那韦、阿菲那韦、磷沙那韦、利托那韦、沙奎那韦或替拉那韦; 或融合蛋白抑制剂, 例如恩夫韦肽。在特定的实施方式中, 抑制剂与其它抗 HIV 治疗试剂同时施加。在特定的实施方式中, 免疫原组合物可以与其它抗 HIV 治疗试剂相继施

加,例如在其它试剂之前或之后。本领域技术人员将认识到相继施加意味着在适当的时间之后立即给予,例如数小时、数天、数周、数月或者甚至是数年之后。

[0173] 本发明的药物组合物可以以多种形式而被应用于阴道,包括气溶胶、泡沫、喷雾剂、膏状物、凝胶、胶状物、霜剂、栓剂、片剂、子宫套、卫生棉条或例如为阴道环的装置。它们可以是立即释放或者控制释放的形式。泡沫、霜剂和凝胶为优选的形式。适用于阴道应用的组合物以及它们的制备方法为本领域已知的。参见Vickery B,等,US4,368,186,Gazzani G,US4,371,518,Tice T,等,US4,389,330,Joyce C,等,US4,415,585,和Riley T,等,US4,551,148。

[0174] 在特别优选的实施方式中,药物组合物被局部施用至阴道。典型地,所述的局部施用在阴道性交开始之前进行,适当地在阴道性交开始前0至60分钟,优选0至5分钟。所述施加可被应用于女性阴道内和周围以及阴道区域(例如个体解剖部分,例如大阴唇、小阴唇、阴蒂)。

[0175] 本领域已知的药霜为粘性液体或半固体乳剂,无论是水包油的还是油包水的。霜基为可水洗的,并且包含油相、乳化剂和水相。油相,有时还被称为“内部”相,通常由矿脂和脂肪醇组成,所述脂肪醇例如十六烷醇或十八烷醇;尽管不是必须的,但是水相在体积上通常会超过油相,并且通常包含润湿剂。霜剂配方中的乳化剂通常为非离子、阴离子、阳离子或两性表面活性剂。

[0176] 例如,合适的载体基包括但不限于烃基或油质基,吸收基,水可移除基和水溶性基。在某些实施方式中,载体基为无刺激性的、无色的、稳定的、非pH依赖性的和/或可于本发明的抑制剂相容的。

[0177] 其中载体为固体的适用于直肠给药的制药配方最优选提供为单位剂量栓剂。合适的载体包括可可油和本领域常用的其它材料。栓剂可以通过活性组分与软化的或融化的载体相混合、然后通过模具中急剧冷却并成型容易地形成。

[0178] 在另一实施方式中,本发明涉及将组合物局部施用至肛门。施用至肛门的组合物适当地为泡沫、霜剂或胶状物,例如如上所述的关于阴道应用的那些。在肛门应用的情况下,优选使用涂药器,其将组合物基本上均匀地分布在整個肛门。例如,合适的涂药器为长度为2.5至25cm,优选5至10cm的管,沿着其长度具有规则分布的孔。

[0179] 在另一实施方式中,本发明方法可以通过口服施用药物组合物来进行。口服给药适当地通过以漱口水或含漱剂的形式进行组合物的施用。口服给药特别优选用于预防牙齿处理期间的感染。适当地,组合物仅在牙齿处理开始之前被应用,并定期地用于整个处理。适用于嘴部局部给药的配方包括止咳糖,其在香料基(通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶)中包含活性组分;含片,在惰性基(例如凝胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)中包含活性组分;和漱口水,在合适的液体载体中包含活性组分。

[0180] 应当注意的是到当组合物为栓剂形式(包括阴道栓剂)的时候,所述栓剂将通常为1至5克,优选约3克,并且整个栓剂将被施用。阴道片剂将适当地为1至5克,优选约2克,并且整个片剂将被施用。当组合物为阴道霜剂的时候,适当地为0.1至2克,优选约0.5克的霜剂将被施用。当组合物为水溶性阴道霜剂的时候,适当地为0.1至2克,优选约0.6克被施用。当组合物为阴道泡沫喷雾的时候,适当地为0.1至2克,优选约0.5克的泡沫喷雾被施用。当组合物为肛门霜剂的时候,适当地为0.1至2克,优选约0.5克的霜剂被施用。当组合物为肛门

泡沫喷雾的时候,适当地为0.1至2克,优选约0.5克的泡沫喷雾被施用。当组合物为漱口水或含漱剂的时候,适当地为1至10ml,优选约5ml被施用。

[0181] 本发明的组合物还可以是延时释放组合物的形式。在这种实施方式中,抑制剂被结合至将释放活性组分的组合物中,以将导致所述抑制剂的有效的阴道或肛门浓度的速率。参见Lew D,Ed.,“Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals”(Plenum Press,New York,NY,US1981),Pfister J,等,J.Contr.Rel.1986;3:229-233,Lance W,US5,248,700,Behan J,等,US5,185,155,和Viegas T,等,US5,143,731。

[0182] 本发明组合物还可以是相应于某些情况来释放本发明抑制剂的形式,某些情况例如阴道性交或肛交。例如,所述组合物可以在囊泡或脂质体中包含抑制剂,其通过性交的机械作用而破裂。包含脂质体的组合物为本领域已知的。参见Deamer D,Uster P,Liposome preparation:methods and mechanisms,Ostro M,Ed.,“Liposomes”(Marcel Dekker Inc.,New York,NY,US,1983,第27-51页),Breimer D,Speiser P,Eds.,“Topics in Pharmaceutical Sciences”Elsevier Science Publishers B.V.,New York,NY,US,1985,第345-358页),Sessa J,等,J.Biol.Chem.1970;245:3295-3300,和Janoff A,等,US5,231,112。

[0183] 还应当认识到的是,本发明组合物可以与制品相关联,例如宫内避孕器(IUD)、阴道隔膜、阴道环、阴道海绵、子宫托或安全套。在IUD或隔膜的情况中,延时释放或机械释放的组合物为优选的,而在安全套的情况中,机械释放组合物为优选的。

[0184] 在另一实施方式中,本发明提供新的装置,其对于预防HIV感染是有用的。特别地,本发明装置为当被放置在适当的身体部分上或者合适的体腔内时释放抑制剂的那些。由此,本发明提供了包含抑制剂或与抑制剂相关的IUD、阴道隔膜、阴道海绵、子宫托或安全套。

[0185] 由此,根据本发明的装置可以是IUD,其包含一种或多种抑制剂。参见Ramwell P,US3,888,975和Berthet J,等,US4,283,325。这种装置可以是阴道内海绵,其包含抑制化合物并以时间控制的方式释放抑制化合物。参见Robinson T,US3,916,898和Barrows T,US4,360,013。所述装置还可以是释放抑制剂的阴道分散器。参见Wong P,US4,961,931。

[0186] 本发明装置还可以是安全套,其涂覆有抑制剂。在优选实施方式中,安全套涂覆有润滑剂或渗透增强剂,其包含抑制剂和杀精剂,其任选地选自苯扎氯铵、苄索氯胺、氯化十六烷基胺基吡啶、氯化甲苄乙氧铵、溴化十四烷基三甲铵、苯扎溴铵、壬基酚醚、月桂醚和辛苯昔醇。然而,被推荐的是,安全套的使用应当与合适的润滑剂的使用相关联(既不会降低安全套的机械强度性能并且不会由于乳胶受到冲击时提高其孔隙度)。例如,EP-A-0457127描述了用于处理安全套乳胶的基于硅油的润滑剂,EP-A-0475664描述了润滑剂组合物及其在安全套中的应用,以及FR-A-2666587描述了包含聚二甲基硅氧烷的润滑剂。其它润滑剂和渗透增强试剂的组合物及制备为本领域已知的。参见Copper E,US4,557,934,Cooper E,US4,954,487;James M,等,US4,499,154和Kelly P,US5,208,031。

[0187] 3. 本发明使用唾液酸粘附素抑制剂的治疗方法

[0188] 本发明公开了唾液酸粘附素(CD169,siglec-1),位于数个免疫系统细胞、例如DC表面上的细胞粘附蛋白质,在HIV-1表面粘附至唾液乳糖分子以能够由mDC摄入病毒。由此,通过降低唾液酸粘附素在细胞内的表达可以用于预防HIV-1进入细胞,并因此通过由mDC阻

止CD4+T细胞的反式感染预防HIV的扩散。例如在本发明的实施例7中示出的,其中示出使用唾液酸粘附素特异性shRNA在DC中的沉默唾液酸粘附素表达导致唾液酸粘附素表达的剧烈下降以及通过所述细胞导致包含唾液乳糖的神经节苷脂的VLP捕捉的损失。因此,另一方面,本发明涉及唾液酸粘附素抑制剂,用于治疗或预防与由包膜病毒导致的感染相关的疾病。另一方面,本发明涉及唾液酸粘附素抑制剂的使用,用于制备用于治疗与由包膜病毒导致的感染相关的疾病的药剂。另一方面,本发明涉及用于在需要其的受试者中治疗或预防与由包膜病毒导致的感染相关的疾病的方法,其包括向所述受试者体施用唾液酸粘附素抑制剂。

[0189] 在某些实施方式中,所述的唾液酸粘附素抑制剂为特别是用于唾液酸粘附素的干扰RNA,或者包含多核苷酸编码这样的干扰RNA的载体。

[0190] 在一些实施方式中,所述唾液酸粘附素抑制剂为唾液酸粘附素特异性 siRNA。所述的siRNA可以化学合成或者可以通过体外转录而获得。siRNA典型地由双RNA链构成,其具有15至40个核苷酸的长度并且可以包含具有1至6个核苷酸的3' 和/或5' 突出区域。突出区域的长度不依赖于siRNA分子的总长度。本发明的siRNA与唾液酸粘附素的预选择区域mRNA为基本上同源的。适用于导致所述干扰的siRNA包括由RNA形成的siRNA,以及包含不同化学修饰的siRNA,例如:

[0191] -siRNA中,其中核苷酸之间的键不同于天然生成的那些,例如硫代磷酸键,

[0192] -siRNA链与功能性试剂,例如荧光团的轭合物,

[0193] -siRNA链末端的修饰,特别是3' 末端,通过与不同的位置2' 的羟基官能团的修饰,

[0194] -具有修饰糖的核苷酸,例如在位置2' 的O-烷基化部分,例如2' -O-甲基核糖、对2' -O-氟代核糖,

[0195] -具有修饰碱基的核苷酸,像卤代碱基(例如5-溴代尿嘧啶和5-碘代尿嘧啶),烷基化碱基(例如7-甲基鸟苷)。

[0196] 本发明的siRNA可以使用一系列本领域技术人员已知的技术获得。例如,siRNA可以由亚磷酰胺基团保护的核糖核苷开始在常规DNA/RNA合成器中化学合成。

[0197] 在另一实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂为shRNA(短发夹RNA)。所述shRNA典型地包含短反义序列(具有19至25个核苷酸),其后为5至9个核苷酸的环,再后为有义链。shRNA可以在常规DNA/RNA合成器中由亚磷酰胺基团保护的核糖核苷化学合成,或者可以由多核苷酸通过体外转录来获得。shRNA通过核糖核酸酶Dicer在细胞内被加工,其消除发夹区域产生如上所述的siRNA。shRNA还可以包含如上所述的siRNA的情况中的不同的化学修饰。

[0198] 在另一实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂为miRNA。在本发明中使用的合适的miRNA由19至约24个核苷酸构成,优选为21或22个核苷酸。miRNA可以经设计以使得它们杂交至RNA,高度特异性转录。miRNA经优化设计以使得其显示出与所给出的目标mRNA100%的一致性,或者其示出基本上一致性(即允许至少1个、至少2个、至少3个或更多个不匹配),根据其在miRNA链中的位置,仅一个非互补的核苷酸就会降低抑制水平。miRNA可以经设计以使得它们靶标mRNA的未翻译的5' 区域,编码区域或3' 区域。

[0199] 典型地,miRNA的有效加工和功能仅当所述的miRNA具有特定的结构需求的时候为可能的,所述特定的结构需求例如Zeng等(RNA,2003,9:112-123)描述的那些。本发明的miRNA优选基于mirR-30结构,其中干区已被预选择的mRNA的靶序列替代。miR-30在环区中

的存在,尽管是所需要的,但是并不是绝对必须的,因为其可以容忍特定的变形,从而使得环区相对于miR-30中的环序列具有大于70%、优选大于79%、甚至更优选大于86%,并且甚至更优选大于93%的同一性。同一性百分比的确定可以使用如上所述的任意方法来确定。

[0200] 在另一实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂为多核苷酸编码的唾液酸粘附素特异性的siRNA、shRNA或miRNA。在多核苷酸编码的shRNA或miRNA的情况中,它们包含含有通过发夹或通过茎环区域连接的shRNA和miRNA的有义和反义链的序列。在多核苷酸编码siRNA的情况中,这些包含两个转录单元,每个均通过调节在siRNA中形成的一个链(有义和反义)的转录的启动子来形成。多核苷酸编码siRNA可以包含会聚的或发散的转录单元。在发散的转录多核苷酸中,编码每个形成siRNA的DNA链的转录单元前后位于多核苷酸中从而使得每个DNA链的转录取决于其自己的启动子,所述启动子可以是相同的或不同的(Wang, J. 等, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:5103-5106和Lee, N.S., 等, 2002, *Nat. Biotechnol.*, 20:500-505)。在会聚的转录多核苷酸中,产生siRNA的DNA域形成DNA域的有义和反义链,其两侧是两个反向启动子。在有义和反义RNA链的转录之后,它们将形成相应于功能siRNA的杂交。

[0201] 原则上,任意启动子均可用于表达shRNA、miRNA和siRNA,所提供的启动子与siRNA表达siRNA的细胞相匹配。在优选的实施方式中,多核苷酸编码的唾液酸粘附素特异性的siRNA、shRNA或miRNA包含特别是用于树突细胞的启动子,例如CD11c启动子、DC-STAMP启动子和肌成束蛋白启动子。适用于包含反向的转录单元的多核苷酸的其它启动子组合包括2U6启动子(Tran, N. 等, 2003, *BMC Biotechnol.*, 3:21), 鼠U6启动子和人H1启动子(Zheng, L., 等, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:135-140和W02005026322)以及人U6启动子和鼠H1启动子(Kaykas, A. & Moon, R., 2004, *BMC Cell Biol.*, 5:16)。在优选的实施方式中,有义和反义siRNA链通过不同的启动子来调节。在甚至更优选的实施方式中,两个转录单元以收敛的方式来定向。

[0202] 在某些实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂为对唾液酸粘附素具有特异性的反义寡核苷酸。

[0203] 反义结构可以经设计以结合至启动子和其它控制域、外显子、内含子或者甚至是唾液酸粘附素基因的外显子-内含子边界。反义RNA结构或者DNA编码这样的反义RNA可被采用以抑制宿主细胞内的基因转录或翻译或者二者,体外或是体内,例如在宿主动物内,包括人体。包含“互补核苷酸”的核酸序列为能够根据标准的Watson-Crick互补法则碱基配对的那些。也就是说,更大的嘌呤将与更小的嘧啶碱基配对以仅形成如下仅有的组合:鸟嘌呤与胞嘧啶配对(G:C)及在DNA的情况中腺嘌呤与胸腺嘧啶配对(A:T)或者在RNA的情况中腺嘌呤与尿嘧啶配对(A:U)。

[0204] 虽然所有的或部分的基因序列可被用于反义结构的情况下,但是统计学上,17个碱基长的任意序列应当仅在人类基因组中出现,并且因此足以指定独特的靶向序列。尽管更短的低聚物更易于产生并容易在体内增加,但是在确定杂交的特异性中涉及大量的其它因素。寡核苷酸与其互补目标的结合亲和性和序列特异性随着其长度的增加而增加。预期将使用8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个碱基对的寡核苷酸。人们可以容易地通过在体外简单地测试结构确定所给出的反义核酸是否对靶向相应的宿主细胞基因是有效的,以确定内源基因的功能是否被影响或者具有互补序列的相关基因的表达是否

受到影响。

[0205] 在特定的实施方式中,将希望采用包括其它元素的反义结构,例如包括C-5丙炔嘧啶的那些。包含尿苷和胞啶的C-5丙炔类似物的寡核苷酸已被示出为高亲和性结合RNA并且对于基因表达的反义抑制剂是有效的(Wagner等,Science,260:1510-1513,1993,在这里通过引用而纳入本发明中)。

[0206] 在一些实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂为对唾液酸粘附素特异性的靶向核酶。在本发明优选的实施方式中,核酶为锤头状核酶,衍生自植物类病毒的小的RNA分子(Symons,Ann.Rev.Biochem.61:641-671,1992;Clouet-D'Orval和Uhlenbeck,RNA,2:483-491,1996;Haseloff和Gerlach,Nature334:585-591,1988;Jeffries和Symons,Nucleic Acids Res.17:1371-1377,1989;Uhlenbeck,Nature328:596-600,1987;在这里通过引用而纳入本发明中)。在其它的实施方式中,核酶可以是I型内含子、发夹核酶、VS RNA、丁型肝炎病毒核酶或Rnase P-RNA核酶(与RNA引导序列相关)。发夹图形的例子描述于Hampel等,Nucleic Acids Res.18:299,1990以及Hampel和Tritz,Biochemistry28:4929,1989;丁型肝炎病毒图形的例子描述于Perrotta和Been,Biochemistry31:16,1992;RNAseP图形的例子(与外部引导序列相关)描述于Yuan等,美国专利US5,624,824;脉孢菌VS RNA核酶图形的例子描述于Saville和Collins,Cell61:685-696,1990,Saville和Collins,Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:8826-8830,1991,Collins和Olive,Biochemistry32:2795-2799,1993;I型内含子描述于Cech等,美国专利US5,354,855。如上所述的图形不应当被认为是对于本发明的限定,并且本领域技术人员将认识到在这里可被利用的核酶包含特定的基底结合位点,其与目标mRNA是互补的。这样的核酶还包含将RNA裂解活性赋予分子的酶部分。所述酶部分存在于基底结合位点内或围绕其。

[0207] 可以根据本发明使用唾液酸粘附素抑制剂来治疗和/或预防与由包膜病毒导致的感染相关的疾病,所述疾病包括如述在使用唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的方法的内容中的任何疾病。

[0208] 在一些实施方式中,与由包膜病毒导致的感染相关的疾病为由I型丝状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、副粘病毒科病毒、弹状病毒科病毒、波那病毒科病毒、布尼亚病毒科病毒、沙拉病毒科病毒、虫媒病毒、黄病毒科病毒、肝炎病毒、亨尼病毒、属于逆转录酶病毒科的病毒导致的疾病。在更优选的实施方式中,包膜病毒为属于慢病毒属亚科的病毒。在又一更优选的实施方式中,包膜病毒属于慢病毒属。在更优选的实施方式中,包膜病毒为灵长类动物慢病毒属,并且特别是人类免疫缺陷病毒(HIV)或类人猿免疫缺陷病毒(SIV)。

[0209] 在一些实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂可被用于与一种或多种其它的抗HIV剂相结合。这些其它的化合物可以包含本发明的化合物,例如已知用于治疗、预防或减缓HIV感染症状的市售化合物。合适的抗HIV试剂为在使用唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的方法内容中描述的那些。

[0210] 在一些实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂可用于与抗感染剂相结合。在某些实施方式中,唾液酸粘附素抑制剂可用于与免疫调节剂相结合。

[0211] 合适的药物载体、给药途径、制剂和剂量制度已经在使用唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂的方法内容中详细描述,并可同样地应用于本方法。

[0212] 4. 本发明的组合物及其治疗应用

[0213] 本发明涉及HIV通过树突细胞的摄取。这种摄取已被发现需要在病毒包膜中发现的神经节苷脂和在树突细胞的表面中存在的CD169的相互作用。该内在化的病毒可以在树突细胞的表面上处理并呈递,由此诱导适应性免疫应答或可被传递至CD4+T细胞。由此,通过提供包含负载有目标抗原的树突细胞以及CD169和病毒包膜上神经节苷脂相互作用的抑制剂的组合物,其将能够允许树突细胞促使适应性免疫应答的产生,同时阻止它们内在化HIV并促进CD4+T细胞的反式感染的能力。由此,另一方面,本发明涉及组合物或试剂盒组件,包含负载抗原的抗原呈递细胞和唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂。

[0214] 适用于本发明的树突细胞可以是不同类型,例如但不限于骨髓DC(myDC)、类浆细胞DC(pDC)、朗格汉斯细胞和间质DC。最有效的专业APC为骨髓源的DC。由此,在优选的实施方式中,DC为骨髓DC。

[0215] 为了获得包含树突细胞前体和/或树突细胞的起始细胞群体,使用本领域已知的方法将包含树突细胞前体或树突细胞的细胞、组织或器官的样本从一个或多个个体分离。这样的起始细胞群体可以从一个个体获得或者可以从多于一个的供体汇集。

[0216] 在一种实施方式中,包含树突细胞或树突细胞前体的起始群体衍生自脾组织。在一种实施方式中,包含树突细胞或树突细胞前体的起始细胞群体衍生自胸腺组织。在一种实施方式中,包含树突细胞或树突细胞前体的起始细胞群体衍生自骨髓。在一种实施方式中,包含树突细胞或树突细胞前体的起始细胞群体衍生自外周血(例如衍生自全血)或者通过使用白细胞分离法。在一种实施方式中,细胞的起始细胞群体包含树突细胞前体。在一种实施方式中,包含树突细胞前体的细胞群体可以使用标准单核细胞白细胞分离法从外周血收集,该技术为本领域已知的。树突细胞前体随后可被收集(例如使用顺序浮力密度离心步骤)。例如,白细胞分离法产物可以在浮力密度溶液(比重=1.077g/mL)中分层,并在1,000g下离心20分钟以耗尽红细胞和粒细胞。界面细胞被收集、冲洗并在第二浮力密度溶液(比重=1.065g/mL)中分层,并在805g下离心30分钟以耗尽血小板和低密度单核细胞和淋巴细胞。所获得的细胞小球富含树突细胞前体。

[0217] 在另一实施方式中,包含树突细胞的细胞起始群体可以使用本领域已知的方法获得。这样的群体可以包含骨髓树突细胞、浆细胞样树突细胞、或者由单核细胞培养生成的树突细胞(例如MO-DC、MDDC)。在一种实施方式中,树突细胞或树突细胞前体还可以衍生自包含这样的细胞的混合细胞群体(例如衍生自循环或衍生自组织或者器官)。在特定的实施方式中,包含DC或树突细胞前体的混合细胞群体为浓缩的以使得DC或树突细胞前体构成大于50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%或更大)的细胞群体。在某些实施方式中,在这里描述的树突细胞通过从细胞群体中的某些或全部非树突细胞中分离来提纯。在示例性的实施方式中,细胞可被提纯以使得包含树突细胞或树突细胞前体的起始群体包含至少50%或更多的树突细胞或树突细胞前体(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%或更大的纯度)。

[0218] 在一种实施方式中,树突细胞可以使用本领域已知的技术来分离。参见Inaba K,等,Curr.Protoc.Immunol.2009;86:3.7.1-3.7.19和Woo J,等,Transplantation1994;58:484-4914。本领域技术人员能够实施对前述分离包含树突细胞或树突细胞前体的细胞的方法的改进,而无需使用过度的试验。在一种实施方式中,树突细胞可以使用荧光活化的细胞

来提纯,所述细胞对存在于它们表面上的抗原进行分类(例如在特定的树突细胞的情况中的CD11c)。在一种实施方式中,存在于细胞起始群体中的DC表达CD11c。在另一实施方式中,存在于细胞起始群体中的DC或树突细胞前体表达II型分子。细胞起始群体可以使用本领域已知的技术进行监测,用于多种细胞表面标记的表达(例如包括CD11c)。

[0219] 在另一实施方式中,包含树突细胞和/或树突细胞前体的细胞群体可以由存在于血液中作为PBMC的多能细胞获得。尽管可以从血液极其容易的获得,但是多能细胞还可以由它们存在于其中的任何组织获得,包括骨髓和脾组织。这些多能细胞典型地表达CD14、CD32、CD68和CD115单核细胞标记,几乎不表达或者不表达CD83、p55或辅助分子,例如CD40和CD86。

[0220] 在一种实施方式中,树突细胞前体可以区分为在方案中使用至少一种试剂处理之前、期间或之后使用本领域已知的方法的树突细胞以制备诱导致耐受性的或者诱导免疫原树突细胞。例如,当在存在例如为GM-CSF和IL-4或IL-13的组成的细胞因子的情况下培养的时候,多能细胞会产生不成熟的树突细胞。在另一种实施方式中,FLT3配体可被用于该目的。例如,在一种实施方式中,包含树突细胞或树突细胞前体的细胞起始群体可在存在一种或多种促使区分DC的试剂的情况下体外培养。在一种实施方式中,一种或多种GM-CSF或IL-4被用于促进DC在体外的发育(例如通过1-15天、2-10天、3-9天、4-8天或5-6天或其它时间的培养,来获得充分的区分)。在一种实施方式中,诱导的树突细胞被完全区分(在诱导之前、期间或之后以产生诱导的致耐受性树突细胞或者诱导的免疫原树突细胞)。

[0221] 在另一实施方式中,包含DC或DC前体的细胞起始群体可以由PBMC获得。从血液获得PBMC的方法,使用例如通过合适的介质来区别沉降的方法,其为已知的并且适用于在本发明中使用。在本发明优选的实施方式中,多能细胞通过减少血小板的PBMC、以及T和B淋巴细胞的群体而获得。多种不同的方法可被用于完成非多能细胞的消除。根据一种方法,标记有对待移除的细胞(例如T或B淋巴细胞)特异的抗体的免疫磁珠可被用于从PBMC群体直接地或间接地移除T和B细胞。T细胞还可以通过用神经氨酸苷酶处理的红血细胞从PBMC群体消除。参见O'Doherty U,等,J.Exp.Med.1993;178:1067-1078。

[0222] 如上所述,不成熟树突细胞的培养可以通过在存在细胞因子的情况下培养多能细胞而获得,所述细胞因子会通过足够的时间促使它们分化以实现所期望的分化水平(例如1-10天、2-9天、3-8天或4-7天)。作为例子,每个浓度在约200至约2000U/ml之间、在约500至1000U/ml之间,或者在约800U/ml (GM-CSF) 至1000U/ml (IL-4) 之间的GM-CSF和IL-4的组合会产生显著量的不成熟树突细胞。GM-CSF (10-200ng/ml) 和IL-4 (5-50ng/ml) 的组合也可被使用。还期望的是在培养的不同阶段改变细胞因子的浓度从而使得新培养的细胞在存在比所确定的培养(在培养两天之后500U/ml IL-4) 更高浓度的IL-4 (1000U/ml) 的情况下培养。其它的细胞因子,例如IL-13被发现用于替代IL-4。在另一种实施方式中,FLT3配体可被用于该目的。用于该目的其它方案为本领域已知的。

[0223] 用于从粘附血液单核部分获得这些不成熟树突细胞的方法为本领域已知的。参见Romani N,等,J.Exp.Med.1994;180(1):83-93和Sallusto F,Lanzavecchia A,J.Exp.Med.1994;179:1109-1118。简略地,淋巴细胞消除的PBMC以约1百万细胞/cm的密度被固定在组织培养板中,在包含例如为GM-CSF和IL-4的细胞因子的完全培养基中,每个浓度在约800至1000U/ml之间并且IL-4以约1000U/ml存在。另一种不成熟树突细胞的来源为

增殖的树突细胞前体的培养。参见Steinman R,等,W01993020185。因为由CD34⁺增殖前体制备的树突细胞对于表达成熟特征的树突细胞是成熟的,所以它们还可能经过发展阶段,其中它们为多能的。

[0224] 在一种实施方式中,包含树突细胞的细胞起始群体可以是浓缩的,对于通过使不成熟树突细胞与树突细胞成熟因子相接触的成熟树突细胞的存在来说。如在这里所涉及的,树突细胞成熟因子实际上可以是一种或多种特定物质,其单独作用或者与其它试剂一起导致不成熟树突细胞成熟,例如与一种或多种佐剂、TLR激动剂、CD40激动剂、炎症活化剂、炎性细胞因子或其组合一起。

[0225] 树突细胞可以在体外由外周血单核细胞(PBMC)使用基本上由在培养瓶中播种PBMC以使得所述细胞的粘附被允许构成的方案来产生。然后,使用白介素4(IL4)和粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子(GM-CSF)处理细胞,导致差异化的细胞在约一周之后成为不成熟的树突细胞(iDC)。任选地,所述细胞可以使用肿瘤坏死因子 α (TNF α)处理而被成熟化。

[0226] 树突细胞可以使用标准方法由多种合适的来源获得。用于分离树突细胞的这些来源包括外周血、脊髓、肿瘤浸润细胞、癌周组织浸润细胞、淋巴结活检、胸腺、脾、皮肤、脐带血、由外周血获得的单核细胞、由外周血获得的CD34⁻或CD14⁻阳性细胞、以及任意其它合适的组织或流体。

[0227] 任选地,树突细胞的稳定的细胞培养可被使用。例如,树突状细胞/肿瘤细胞杂交瘤和数个树突状细胞/肿瘤细胞杂交体可被利用。参见Falo L,等,EP1168924。这些杂交体和杂交瘤由肿瘤细胞和树突状细胞的融合产生。例如,源自自体同源的肿瘤细胞系的永生肿瘤细胞可与自体同源的HLA匹配的异源树突状细胞融合。自体肿瘤细胞系可以由原发性肿瘤及其转移性肿瘤获得。可替换地,自体的永生树突状细胞或者异源的HLA匹配的树突状细胞系可与自体同源的肿瘤细胞融合。参见Fitzpatrick D,等,W02002048167。另一种可被使用的细胞系为CB1。参见Paglia P,等,J.Exp.Med.1993;178:1893-1901。

[0228] 根据本发明的组合物的负载抗原的树突细胞通过树突细胞与包含所期望抗原的产生免疫的组合物接触,在足以使用病毒免疫原脉冲所述细胞的条件下来制备。

[0229] 如在这里所预期的,本发明可以包括任何适用于负载至APC中以引发免疫应答的抗原的使用。在一种实施方式中,微生物抗原可被使用。抗原分子可以是例如但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原、过敏原或环境抗原、分化抗原、肿瘤抗原、胚胎抗原、致癌基因抗原和突变肿瘤抑制因子基因、由染色体易位获得的独特的肿瘤抗原或其衍生物。还可能的是抗原多肽是病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原、过敏原或环境抗原、分化抗原或肿瘤抗原的免疫原片段。合适抗原的例子包括但不限于:

[0230] 1) 病毒抗原:能够对病毒引发免疫应答的病毒抗原包括动物和人逆病毒和慢病毒抗原,例如HIV-1的那些,即HIV-1抗原(例如at,nef,gp120或gp160,gp40,p24,gag,env,vif,vpr,vpu,rev)或者即刻早期蛋白(例如HSV1或HSV2的ICP27,ICP47,ICP4,ICP36),乙型肝炎病毒(例如乙型肝炎表面抗原或肝炎核心抗原),丙型肝炎病毒(例如核心、E1、NS3或NS5抗原),源自副粘病毒(例如呼吸道合胞体病毒,例如F和G蛋白质或其衍生物),源自副流感病毒,源自风疹病毒(例如蛋白质E1和E2),麻疹病毒,腮腺炎病毒,人乳头状瘤病毒(例如HPV6、11、16、18、eg LI、L2、E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7),虫媒病毒(例如黄热病毒、登革热病毒、森林脑炎病毒、日本脑炎病毒),或流感病毒细胞(例如HA、NP、NA或M蛋白质,或其组合),

轮状病毒抗原(例如VP7sc和其它轮状病毒部分),和类似的病毒。参见Fields B,Knipe D.Eds.,“Fundamental Virology”,第二版(Raven Press,New York,NY,1991)。

[0231] 2) 细菌抗原:细菌抗原,例如源自奈瑟菌属(*Neisseria* spp.)的抗原,包括淋病奈瑟菌(*N.gonorrhea*)和脑膜炎奈瑟菌(*N.meningitidis*) (例如转铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PiIC和粘附素);源自化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的抗原(例如M蛋白质或其片段以及C5A蛋白酶);源自无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)的抗原;杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*);莫拉菌属(*Moraxella* spp.),包括卡他莫拉菌属(*M.catarrhalis*),还被称为粘膜炎布兰汉球菌(*Branhamella catarrhalis*) (例如高分子量和低分子量粘附素和侵袭素);源自鲍特杆菌属(*Bordetella* spp.)的抗原,包括百日咳鲍特杆菌(*B.pertussis*),副百日咳鲍特杆菌(*B.parapertussis*)和支气管鲍特杆菌(*B.bronchiseptica*) (例如百日咳杆菌粘附素、百日咳毒素或其衍生物,丝状血凝素、腺苷酸环化酶、菌毛);源自分支杆菌属(*Mycobacterium* spp.)的抗原,包括结核分枝杆菌、牛分支杆菌、麻风病分支杆菌、鸟分枝杆菌、副结核分支杆菌,分枝杆菌球;军团杆菌属(*Legionella* spp.),包括嗜肺军团菌;(例如ESAT6,抗压85A,-B或-C、MPT44、MPT59、MPT45、HSPI0、HSP65、HSP70、HSP75、HSP90、PPD19kDa [Rv3763], PPD38kDa [Rv0934]);源自埃希氏菌属(*Escherichia* spp.)的抗原,包括肠毒性大肠杆菌(例如定居因子、热不稳定毒素或其衍生物、热稳定毒素或其衍生物),源自肠出血性大肠杆菌或致肠病的大肠杆菌的抗原(例如类志贺毒素及其衍生物);源自弧菌属(*Vibrio* spp.)的抗原,包括霍乱弧菌(*V.cholera*) (例如霍乱毒素或其衍生物);源自志贺氏菌(*Shigella* spp.)的抗原,包括宋内志贺氏菌、痢疾志贺菌、弗氏志贺菌;耶尔森氏菌属(*Yersinia* spp.),包括小肠结肠炎耶尔森菌(例如Yop蛋白质);源自鼠疫杆菌、假结合性杆菌的抗原;弯曲杆菌属(*Campylobacter* spp.),包括空肠弯曲菌(例如毒素,粘附素和侵袭素);源自沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)的抗原,包括*S.typhi*,*S.enterica*和*S.bongori*;李斯特菌属(*Listeria* spp.),包括单增李斯特菌属;螺杆菌属(*Helicobacter* spp.),包括幽门螺杆菌(*H.pylori*) (例如脲酶,过氧化氢酶,空泡毒素);源自假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)的抗原,包括铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*);葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.),包括金黄色葡萄球菌(*S.aureus*),表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*);肠球菌属(*Enterococcus* spp.),包括粪肠球菌、尿肠球菌;梭菌属(*Clostridium* spp.),包括破伤风梭菌(例如破伤风毒素及其衍生物);源自C型肉毒杆菌(*C.botulinum*) (即肉毒杆菌毒素及其衍生物)的抗原,源自艰难梭状芽胞杆菌(例如梭菌毒素A或B及其衍生物)的抗原;源自杆状菌属的抗原,包括炭疽杆菌(例如炭疽热毒素及其衍生物);棒状杆菌属(*Corynebacterium* spp.),包括白喉杆菌(例如白喉毒素及其衍生物);源自包柔氏螺旋体属(*Borrelia* spp.)的抗原,包括伯氏疏螺旋体(例如OspA,OspC,DbpA,DbpB);源自伽氏疏螺旋体(例如OspA,OspC,DbpA,DbpB),埃氏疏螺旋体(例如OspA,OspC,DbpA,DbpB)的抗原,源自伯氏疏螺旋体((例如OspA,OspC,DbpA,DbpB)的抗原和源自赫氏疏螺旋体的抗原;源自埃立克体属(*Ehrlichia* spp.)的抗原,包括*E.equ*i和人粒细胞埃立克体病的试剂;发疹伤寒等的病原体(*Rickettsia* spp.),包括立克次(氏)体;衣原体属(*Chlamydia* spp.),包括沙眼衣原体(例如MOMP,肝磷脂结合蛋白);源自肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*) (例如MOMP,肝磷脂结合蛋白)的抗原,源自*C.psittaci*的抗原;螺旋体属(*Leptospira* spp.),包括钩端螺旋体;密螺旋体属

(*Treponema* spp.),包括梅毒螺旋体(例如稀有的外膜蛋白),源自齿密螺旋体、痢疾密螺旋体的抗原,源自结核分枝杆菌(例如Rv2557,Rv2558,RPFs:Rv0837c,Rv1884c,Rv2389c,Rv2450,Rv1009,aceA(Rv0467),PstS1,(Rv0932),SodA(Rv3846),Rv2031c16kDa1.,Tb Ra12,Tb H9,Tb Ra35,Tb38-1,Erd14,DPV,MTI,MSL,mTTC2和hTCC1)的抗原;源自衣原体(例如高分子量蛋白质(HWMP),ORF3(EP366412)的抗原,以及公认的膜蛋白(Pmps);源自链球菌属(*Streptococcus* spp.)的抗原,包括肺炎链球菌(PsaA,PspA,链球菌溶血素,胆碱结合蛋白,蛋白质抗原肺炎球菌溶血素,及其突变解毒衍生物);衍生自嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)的抗原,包括B型流感嗜血杆菌(*H.influenzae* type B)(例如PRP及其轭合物);源自非典型的流感嗜血杆菌(*H.influenzae*)(例如OMP26,高分子量粘附素,P5,P6,蛋白质D和脂蛋白D,以及丝束蛋白及丝束蛋白衍生的肽,或多副本变体或其融合蛋白)的抗原。

[0232] 3) 真菌抗原:真菌抗原,例如源自假丝酵母属(*Candida* spp.)的抗原,包括*C.albicans*;组织胞浆菌属(*histoplasma*)真菌抗原(例如热休克蛋白60(HSP60)和其它的组织胞浆菌属真菌抗原部分);源自隐球酵母属(*Cryptococcus* spp.)的抗原,包括新生隐球菌(例如蒴状多糖和其它的隐球菌真菌抗原部分);球孢子菌属(*coccidioides*)真菌抗原(例如内孢囊抗原和其它的球孢子菌属真菌抗原部分);以及癣真菌抗原(例如发癣菌素核其它的球孢子菌属真菌抗原部分)。

[0233] 4) 原生动物抗原:原生动物抗原,例如源自疟原虫属(*Plasmodium* spp.)的抗原,包括恶性疟原虫(例如裂殖子表面抗原,孢子体表面抗原,环子孢子抗原,配子母细胞/接合体表面抗原,血液阶段抗原pf,55/RESA)和其它的疟原虫抗原部分(例如RTS.S、TRAP、MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、钳合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230和它们在疟原虫属的类似物);源自弓形体属(*Toxoplasma* spp.)和弓形虫(例如SAG2、SAGS、Tg34、p30和其它的弓形体病抗原部分)的抗原;血吸虫(*schistosomae*)抗原(例如谷胱甘肽-S-转移酶,副肌球蛋白,和其它的血吸虫抗原部分);主要利什曼原虫和其它利什曼原虫抗原(例如gp63,磷脂聚糖及其相关的蛋白质和其它的利什曼原虫抗原部分);和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)抗原(例如75-77kDa抗原,56kDa抗原和其它的锥体虫抗原部分),源自内阿米巴属(*Entamoeba* spp.)的抗原,包括痢疾变形虫;巴贝西虫属(*Babesia* spp.),包括果氏巴贝虫;锥体虫属(*Trypanosoma* spp.),包括克氏锥体虫;梨形鞭毛虫属(*Giardia* spp.),包括贾第鞭毛虫;利什曼原虫属(*leishmania* spp.),包括硕大利什曼原虫;肺囊虫属(*Pneumocystis* spp.),包括卡氏肺囊虫;滴虫病属(*Trichomonas* spp.),包括阴道滴虫;血吸虫属(*Schistosoma* spp.),包括*S.mansoni*。

[0234] 5) 过敏原或环境抗原:过敏原或环境抗原例如天然产生的过敏原,像花粉过敏原(例如树、草、杂草和花粉过敏原),昆虫过敏原(例如吸入剂,唾液和毒液过敏原),动物毛发和皮屑过敏原,以及食物过敏原。源自分类学次序的树、草和香草的重要的花粉过敏原为壳目木,木犀目,松木和悬铃木科,包括落叶松(桦木属),桤木(赤杨),榛子(榛属),角树(鹅耳枥属)和橄榄树(洋橄榄属),雪松(日本柳杉和桧属),悬铃木(悬铃木属),禾草目的顺序,包括(例如黑麦草属,猫尾草属,早熟禾属,狗牙根属,鸭茅属,绒毛草属,橘草属,黑麦属和蜀黍属的草),菊目和荨麻目的顺序(例如豚草属,艾属,和墙草属的香草)。可以使用的其它的过敏原抗原包括嗜皮螨属和嗜霉螨属的屋尘螨过敏原,存储螨(例如*Lepidoglyphys*,

Glycyphagus和Tyrophagus), 蟑螂, 蚊和跳蚤(例如Blatella, Periplaneta, Chironomus和Ctenocephalides) 过敏原, 哺乳动物(例如猫, 狗和马) 过敏原, 鸟, 包括源自刺蜚或叮咬昆虫的毒液过敏原(例如源自膜翅目昆虫的分类学次序, 包括蜜蜂(蜜蜂总科), 黄蜂和蚂蚁(蚁科))。还可以使用的其它过敏原抗原包括真菌类呼吸道过敏原(例如源自链格孢属和枝孢属)。

[0235] 6) 肿瘤抗原: 肿瘤抗原例如为MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, 二肽基肽酶IV (DPPIV), 腺苷脱氨基酶结合蛋白 (ADA bp), 亲环蛋白b, 结肠直肠相关抗原 (CRC) -0017-1A/GA733, 癌胚抗原 (CEA) 及其抗原决定部位CAP-1和CAP-2, etv6, aml1, 前列腺特异性抗原 (PSA) 及其抗原决定部位PSA-1, PSA-2和PSA-3, 前列腺特异性膜抗原 (PSMA), T细胞受体/CD3- ζ 链, MAGE属肿瘤抗原(例如MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGEA4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGEC5), GAGE属肿瘤抗原(例如GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 酪氨酸酶, p53, MUC属, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -胎蛋白, E-钙黏着蛋白, α -联蛋白, 13-联蛋白, γ -联蛋白, p120ctn, gp100^{Pme1117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 腺瘤性息肉病大肠杆菌蛋白 (APC), 胞衬蛋白, 联接蛋白37, 免疫球蛋白-个体基因型 (Ig-个体基因型), p15, gp75, GM2和GD2神经节苷脂, 病毒产物, 例如人乳头状瘤病毒蛋白, Smad属的肿瘤抗原, lmp-1, P1A, EBV-编码的核抗原 (EBNA) -1, 脑磷酸化酶, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1和CT-7, 以及c-erbB-2, 急性淋巴细胞白血病 (etv6, 混合型白血病, 亲环蛋白b), B细胞淋巴瘤 (Ig-个体基因型), 神经胶质瘤 (E-钙黏蛋白, α -联蛋白, 13-联蛋白, 7-联蛋白, p120ctn), 膀胱癌 (p21ras), 胆癌 (p21ras), 乳癌 (MUC属, HER2/neu, c-erbB-2), 宫颈癌 (p53, p21ras), 结肠癌 (p21ras, HER2/neu, c-erbB-2, MUC属), 结肠直肠癌 (与结肠直肠相关的抗原 (CRC) -0017-1A/GA733, APC), 绒毛膜癌 (CEA), 上皮细胞癌 (亲环蛋白b), 胃癌 (HER2/neu, c-erbB-2, ga733糖蛋白), 肝细胞癌, Hodgkins淋巴瘤 (lmp-1, EBNA-1), 肺癌 (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), 淋巴细胞衍生的白血病 (亲环蛋白b), 黑素瘤 (p15蛋白质, gp75, 癌胚抗原, GM2和GD2神经节苷脂, MelanA/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gp100^{Pme1117}), 骨髓瘤 (MUC属, p21ras), 非小细胞肺癌 (HER2/neu, c-erbB-2), 鼻咽癌 (lmp-1, EBNA-1), 卵巢癌 (MUC属, HER2/neu, c-erbB-2), 前列腺癌 (前列腺特异性抗原 (PSA) 及其抗原决定部位PSA-1, PSA-2和PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, ga733糖蛋白), 肾癌 (HER2/neu, c-erbB-2), 子宫颈和食道的扁平细胞癌症(例如人乳头状瘤病毒蛋白的病毒产物), 睾丸癌 (NY-ESO-1), 和T细胞白血病 (HTLV-1抗原决定部位)。

[0236] 在优选的实施方式中, 用于获得本发明的负载抗原的树突细胞的抗原为病毒抗原。在更优选的实施方式中, 病毒抗原为HIV抗原。

[0237] 如先前公开的, HIV隔离种群被划分为离散的基因亚型。HIV-1已知为包含至少十个亚型 (A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、PL F2、G、H、j和K)。参见Taylor B, 等, N.Engl. J. Med. 2008;359 (18):1965-1966。HIV-2已知为包括至少五个亚型 (A、B、C、D和E)。亚型B为在同性恋人群中与全世界静脉注射药物使用者中与HIV流行病相关的。绝大多数的HIV-1免疫原、实验室适应的隔离种群、试剂和映射表位属于亚型B。在撒哈拉以南的非洲、

印度和中国,新的HIV感染的影响高,HIV-1亚型B仅占少数的感染,并且亚型HIV-1C表现为更加常见的感染亚型。因此,在特定的实施方式中,优选选择特定亚型的免疫原(例如HIV-1亚型B或C)。需要在单个的免疫学组合物中包括多个HIV亚型(例如HIV-1亚型B和C,HIV-2亚型A和B,或者HIV-1,HIV-2,或HIV-3亚型的组合)的免疫原。

[0238] 合适的HIV免疫原包括HIV包膜(env;例如NCBI参考序列NPJ357856),gag(例如p6、p7、p17、p24、GenBank AAD39400J),由pol(例如UniProt P03366)、nef(例如GenBank CAA4I585J,Shugars D,等,J.Virol.1993;67(8):4639-4650)编码的蛋白酶,以及变体、衍生物及其融合蛋白。参见Gómez C,等,Vaccine2007;25:1969-1992。合适的菌株和组合物可以通过本领域技术人员根据需要来选择。

[0239] 本发明的负载抗原的树突细胞(还被称为“脉冲的树突细胞”),通过将树突细胞在体外或体内暴露至抗原来制备。在树突细胞在体外被脉冲的情况中,树突细胞可被放置在培养皿中并暴露至足够量的抗原中,持续足够的时间来允许抗原结合至树突细胞。需要用以实现抗原结合至树突细胞的用量和时间可以通过使用本领域已知的或者在这里公开的方法来确定。本领域技术人员已知的其它方法、例如免疫测定或结合测定可被用于检测抗原在树突细胞上的存在,在暴露至抗原之后。

[0240] 在本发明的另一实施方式中,树突细胞可以使用载体来转染,所述载体允许特定蛋白质通过树突细胞的表达。通过树突细胞表达的蛋白质随后可被加工并呈递在细胞表面上。转染的树突细胞随后可被用作免疫原组合物,用以对通过载体编码的蛋白质产生免疫应答。载体可被制备为包括特定的多核苷酸,其编码并表达免疫应答所期望的蛋白质。优选地,逆转录病毒载体被用于感染细胞。更优选地,腺病毒载体被用于感染细胞。

[0241] 在另一实施方式中,载体可被靶向至通过改性病毒载体来编码蛋白质或其部分的树突细胞,其中蛋白质或其部分通过树突细胞上的受体来认知,由此,树突细胞受体由载体的占据将启动载体的内吞作用,允许加工并呈递通过病毒载体的核酸编码的抗原。通过病毒传递的核酸对于病毒来说可以是天然的,当在树突细胞上表达的时候,其编码随后在树突细胞的MHC受体上加工并呈递的病毒蛋白质。

[0242] 如在这里所预期的,多种不同的方法可被用于转染多核苷酸至宿主细胞。所述方法包括但不限于磷酸钙沉淀、脂质转染、微粒轰击、微注射、电穿孔、胶体分散体系(即高分子复合物、纳米胶囊、微球、小珠和脂质基体系,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体)。这些方法为本领域所理解的并描述于公开文献中,从而能够使本领域技术人员实施这些方法。

[0243] 在另一实施方式中,多核苷酸编码的抗原被克隆至表达载体内,并且所述载体被引入至树突细胞中从而产生负载的树突细胞。多种不同类型的载体和将核酸引入至细胞中的方法均公开于可提供的公开文献中。例如,表达载体可以通过物理、化学或生物方式被传递至宿主细胞内。参见Brown T,“Gene Cloning”(Chapman&Hall,London,GB,1995);Watson R,等,“Recombinant DNA”,第二版(Scientific American Books,New York,NY,US,1992);Alberts B,等,“Molecular Biology of the Cell”(Garland Publishing Inc.,New York,NY,US,2008);Innis M,等,Eds.,“PCR Protocols.A Guide to Methods and Applications”(Academic Press Inc.,San Diego,CA,US,1990);Ehrlich H,Ed.,“PCR Technology.Principles and Applications for DNA Amplification”(Stockton Press,

New York, NY, US, 1989); Sambrook J, 等, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1989); Bishop T, 等, “Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach” (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., “Maximizing Gene Expression” (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987); Davis L, 等, “Basic Methods in Molecular Biology” (Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, US, 1986); Schleef M, Ed., “Plasmid for Therapy and Vaccination” (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001)。

[0244] 容易理解的是, 引入包含多核苷酸编码的抗原的表达载体会产生脉冲细胞。本发明包括多种不同的用于脉冲树突细胞的方法, 包括但不限于使用蛋白质、cDNA或mRNA形式的全抗原来负载树突细胞。然而, 本发明不应当被构造为对用于脉冲树突细胞的特定形式的抗原的限制。然而, 本发明包括本领域已知的用于产生负载抗原的树突细胞的其它方法。优选地, 通过mRNA编码的定义抗原转染树突细胞。相应于序列已知的基因产物的mRNA可以在体外使用合适的引物而快速地产生, 并且转录反应与逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)相结合。利用mRNA对树突细胞的转染提供了相对于用于产生脉冲APC的其它负载抗原技术的优势。例如, 从微量量的组织(即肿瘤组织)扩大RNA的能力将用于接种疫苗的APC的应用扩展至大量的患者。

[0245] 一旦树突细胞已经利用目标抗原被脉冲, 免疫原脉冲的树突细胞就会被复原。不同的方案可被用于复原免疫原脉冲的树突细胞, 例如使用通过成熟细胞(例如CD80)表达的任何标记的免疫隔离。

[0246] 一旦目标抗原被负载至未成熟的树突细胞中, 所述的细胞就可被提交至体外成熟, 通过细胞因子、TLR(钟状受体)配体和其它试剂。例如, 本领域技术人员已知预发炎细胞因子、IL-1 β 、IL-6和TNF α 与前列腺素E₂组合的混合物可被用于成熟DC, 用于HIV的免疫治疗。另一种替换形式为通过发炎细胞因子、TNF α 、IL-2、IFN γ 和IFN α 以及双链RNA聚I:C(称为 α DCI)的组合成熟DC。所获得的产物适合用作治疗或预防疫苗。

[0247] 细胞表面标记的表达例如可以使用常规方法和仪器通过流式细胞术来确定。例如, 使用市售抗体和本领域已知的常规方案的Calibur FACS(荧光活化的细胞种类, Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, US)体系可被使用。由此, 在流式细胞术中呈递高于背景信号的特异性细胞表面标记的信号细胞可被选择。背景信号被定义为在常规FACS分析中与用于检测每个表面标记的特异性抗体相同类型的非特异性抗体给出的信号强度。为了标记被认为是阳性的, 所观察到的特异性信号不得大于20%, 优选30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、500%、1000%、5000%、10000%或更大的强度, 相对于使用常规方法和仪器的背景信号的强度。

[0248] 所述的树突细胞疫苗优选为与个体自体的。最有效的免疫治疗疫苗利用基于自体同源的HIV的抗原(即对于每个宿主独特的病毒准物种)。迄今为止在抗HIV免疫治疗试验中最有效的结果已经利用衍生自患者的自体同源病毒的负载有完全的、灭活的HIV病毒粒子的树突细胞(DC)。树突细胞还可由相同的患者获得。在优选实施方式中, 树突细胞制备为与CD4⁺T细胞和CD14⁺单核细胞已被分离的个体自体同源的。

[0249] 术语“唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用的抑制剂”已在上文描述。在优选的

实施方式中,抑制剂选自唾液乳糖、包含唾液乳糖片段和抗唾液酸粘附素抗体的分子组成的组。在另一优选的实施方式中,包含唾液乳糖片段的分子为具有少于四个唾液酸的神经节苷脂。在另一优选的实施方式中,包含唾液乳糖并具有少于四个唾液酸的神经节苷脂选自在表1中所述的任何神经节苷脂或在表1中所示的任何神经节苷脂的组合。在优选的实施方式中,本发明的组合物包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或更多个神经节苷脂,其中所述的神经节苷脂选自表1中的神经节苷脂或者相应于任意其它的携带有唾液乳糖的神经节苷脂。

[0250] 根据本发明的组合物和试剂盒组件可用于在个体中相对于被负载在抗原呈递细胞中的抗原产生免疫应答。抗原呈递细胞将作用为诱导个体中CD4+和CD8+细胞启动的疫苗,而唾液酸粘附素和唾液乳糖之间相互作用抑制剂的存在将阻止该情况,如果个体受到HIV感染,抗原呈递细胞将不会摄取任何病毒并且不会在患者体内再次感染CD4+T细胞。由此,当组合物和试剂盒组件对于治疗与HIV感染相关的疾病(使用负载有HIV抗原或抗原混合物的抗原呈递细胞)特别有用时,它们通过促进对于形成部分导致疾病的细胞的抗原的免疫应答的刺激而对治疗伴随有HIV感染的疾病也是有用的,同时通过防止HIV由形成部分免疫原/疫苗组合物的抗原呈递细胞的吸收来进一步最小化HIV的扩散。

[0251] 由此,另一方面,本发明涉及根据本发明的组合物或试剂盒组件,用于医药中。

[0252] 另一方面,本发明涉及包含根据本发明的组合物或试剂盒组件的免疫原或疫苗。

[0253] 另一方面,本发明涉及根据本发明的组合物或试剂盒组件,用于治疗或预防需要对在抗原呈递细胞中负载的抗原产生免疫应答的疾病。

[0254] 另一方面,本发明涉及根据本发明的组合物或试剂盒组件,用于制备用于治疗个体中的疾病的药剂,所述疾病为与需要对在抗原呈递细胞中负载的抗原产生免疫应答相关的。

[0255] 在优选实施方式中,被给予组合物或试剂盒的受试者为感染HIV的患者。

[0256] 另一方面,本发明涉及治疗患有疾病的个体的方法,所述疾病需要对抗原或者数个抗原产生免疫应答,所述抗原包含向所述个体施加根据本发明的组合物或试剂盒,其中在所述组合物或试剂盒组件中的抗原呈递细胞负载有对其需要免疫应答的所述抗原或数个抗原。

[0257] 本发明的树突细胞疫苗可以是治疗疫苗,也就是说,给予受到HIV感染的已发展为AIDS的个体材料用于通过调节它们的免疫应答来帮助对抗疾病。治疗HIV疫苗作为添加剂或者作为对用于HIV的现有抗逆转录酶病毒治疗选择的替换表现为有前途的方案。

[0258] 本发明的树突细胞疫苗可以是预防疾病的AIDS疫苗,经设计以施用至受到HIV感染的还未发展为AIDS的个体。

[0259] 对HIV的免疫应答的产生可以通过测量来评估,例如病毒负载、T细胞增殖、T细胞存活、T细胞的细胞因子分泌或者抗原特异性抗体生成(例如抗体浓度)的增加。

[0260] 用于检测受刺激的T细胞的方法为本领域技术人员已知的。然而,本领域技术人员可以容易地分析出适用于评估响应于Ag的T细胞的刺激的任何方法均可被使用。在下文描述的步骤提供了数个合适方法的例子:

[0261] 1) 酶联免疫斑点(ELISpot):源自预培养孔的非粘附性细胞被转移至涂覆有所期望的抗细胞因子捕捉抗体(Abs;例如抗-IFN γ 、-IL-10、-IL-2、-IL-4)的板。利用生物素化的

次级Abs和标准色度或荧光检测方法来实现表达,例如链酶亲和素-碱性磷酸酶和NBT-BCIP以及计算的斑点。ELISpot读出随后被表达为斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 PBMCs。

[0262] 2) 上层清液细胞因子试验:在培养上层清液中释放的细胞因子通过不同的技术被测定,例如酶联免疫吸附试验(ELISA)、BD流式细胞小球微阵列术、Biorad Bio-Plex试验等。

[0263] 3) HLA II型四聚物:通过该步骤,认知特定肽表位的Ag反应性T细胞使用市售试剂(例如MHC Class II UltimersTM,ProImmune Ltd,Oxford,GB)或内部生成的试剂(例如Novak E,等,J.Clin.Invest.1999;104:R63-R67)被检测。

[0264] 4) 激活标记(例如CD69,CD25,CD137)的上调:通过该步骤,Ag特异性T细胞反应通过它们在Ag认知后暴露至膜的激活标记的差异性表达被检测。

[0265] 5) 细胞因子捕捉试验:这种体系可以有效地替换ELISpot,从而形象化Ag特异性T细胞,根据他们的细胞因子反应(Miltenyi Biotec GmbH,Bergisch Gladbach,DE)。此外,其允许直接分类并克隆目标T细胞。

[0266] 6) CD 154试验:该步骤被限于检测Ag特异性CD4+T细胞。参见Chattopadhyay P,等,Nat.Med.2005;11:1113-1117和Frentsch M,等,Nat.Med.2005;11:1118-1124。

[0267] 7) CD107试验:该步骤允许形象化具有细胞因子电势的Ag特异性CD8+T细胞。参见Betts M,等,J.Immunol.Methods2003;281:65-78。

[0268] 8) CFSE稀释试验:该步骤检测Ag特异性T细胞(CD4+和CD8+),根据它们在Ag认知后的增殖。参见Mannering S,等,J.Immunol.Methods2003;283:173-183。

[0269] 5.用于检测并分离包膜病毒的方法

[0270] 存在于在包膜病毒的包膜中发现的特定神经节苷脂中的唾液酸粘附素和唾液乳糖片段之间的相互作用的识别允许通过确定它们结合至唾液酸粘附素以及通过从存在于试样中的其它组分中分离结合至唾液酸粘附素的病毒来分离所述病毒的能力来检测所述病毒。本发明的检测和分离方法可以通过使用包膜的脂质标记而不是蛋白质标记来确定HIV病毒粒子。这是重要的,因为病毒蛋白质标记会在感染期间以很大的速率产生变异,从而使得没有单独的病毒检测系统对检测不同患者的病毒感染、或者从个别患者分离出病毒是有效的。因此,这种方法作为用于从试样中检测或分离HIV、以及分离HIV的诊断试验是有用的。因此,在另一实施方式中,本发明涉及一种检测试样中包膜病毒的方法,包括:

[0271] (i) 所述试样与唾液酸粘附素或其功能等效变体接触,所述功能等效变体基本上保留其结合唾液酸乳糖的能力,和

[0272] (ii) 检测结合至所述唾液酸粘附素或其功能等效变体的病毒。

[0273] 术语“功能等效变体”,当指的是唾液酸粘附素的时候,其被理解为通过修饰、插入或消除一个或多个氨基酸衍生自唾液酸粘附素的所有的多肽,提供为结合至唾液乳糖或在它们的主链上包含唾液乳糖的分子的功能被基本上保留。

[0274] 对唾液乳糖保留基本结合活性的唾液酸粘附素的功能等效变体为对唾液乳糖的亲性和至少为 $10^{15}M^{-1}$, $10^{14}M^{-1}$, $10^{13}M^{-1}$, $10^{12}M^{-1}$, $10^{10}M^{-1}$ 或 10^9M^{-1} 的那些。在另一实施方式中,适用于本发明的唾液酸粘附素的功能等效变体包括显示至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%或更小的天然产生的唾液酸粘附素至唾液乳糖或包含唾液乳糖的分子的结合

活性的那些。

[0275] 唾液酸粘附素的合适的功能等效变体可以使用用于确定唾液酸粘附素至唾液乳糖或包含在表面含有唾液乳糖的神经节苷脂的神经节苷脂的细胞的结合亲和力的标准试验来确定。举例来说,唾液酸粘附素的合适的功能等效变体可以通过使用基于固定化的唾液酸粘附素结合至人红血球的能力的固相试验来确定,所述人红血球已被衍生为不同的键(例如NeuAca2-3Galb1-3GalNAc, NeuAca2-3Galb1-3(4)GlcNAc, 或者NeuAca2-6Galb1-4GlcNAc)中包含唾液酸。参见Vinson M,等,J.Biol.Chem.1996;271:9267-9272)。作为试验对照,可以使用未衍生的红血球。可替换地,唾液酸粘附素的合适的功能等效变体可以通过利用固相试验来确定,所述固相试验基于通过包含含有聚丙烯酰胺的糖复合物(例如NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc或NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc)的唾液酸粘附素的固定化融合蛋白的结合的检测。参见Hartnell A,等,Blood2001;97:288-296。

[0276] 功能等效变体还可以是显示出与唾液酸粘附素具有高于至少25%、至少40%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%的一致程度的那些。

[0277] 在第一步中,根据本发明的诊断方法涉及假设包含包膜病毒的试样与唾液酸粘附素的接触。

[0278] 根据本发明方法待分析的试样包括生物学试样,其为流体(例如血清、血液、尿、唾液、胰液、脑脊髓液、精液)以及任何流体生物学试样(例如组织或活检提取物、排泄物的提取物、唾液),还可被用于本发明的试验中。最优选地,进行试验的生物学试样为血清或血浆。

[0279] 基于结合的检测试验典型地涉及检测试剂被结合至其的固相材料的使用,但是可以经调整以涉及非固定化抗原和抗体的结合(即溶液相免疫试验)。反应产物通过从反应混合物移除固相(例如通过冲洗)来从过量试样、试验试剂、和其它物质中分离。由此,在优选的实施方式中,唾液酸粘附素 或其功能等效变体被固定。

[0280] 大量不同的任意的固体载体可被用于本发明的试验。用于固体载体的合适的材料为合成的聚合物,例如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚酰胺或其它合成聚合物,例如为纤维素的天然聚合物,以及衍生的天然聚合物,例如醋酸纤维素或硝基纤维素,以及玻璃,特别是玻璃纤维。所述载体可以采用球形、杆形、管形以及微测定板或微滴定板的形式。例如为条形纸、小板和膜的层状结构也是合适的。载体的表面为可渗透的并且对水溶液是不可渗透的。

[0281] 在优选的实施方式中,包膜病毒选自由HIV或埃博拉病毒组成的组。在又一更优选的实施方式中,HIV为HIV-1。

[0282] 在第二步中,根据本发明的检测方法包括结合至所述唾液酸粘附素或其功能等效变体的包膜病毒的检测。

[0283] 包膜病毒的检测可以使用多种不同的本领域已知的技术来进行,并且包括包膜病毒基因组的检测,并且更优选地,包膜病毒核酸的检测(即RNA或DNA)以及包膜病毒蛋白质的检测。检测RNA和蛋白质表达的方法为本领域已知的,并且在上文已被大体上描述。在一个方面中,包膜病毒为HIV。在另一实施方式中,HIV的检测通过结合抗体和一种或多种HIV蛋白质来进行。可被用于检测的HIV的合适蛋白质包括但不限于存在于HIV包膜中的多肽(env;例如NCBI参考序列NPJ357856),gag(例如p6,p7,p17,p24,GenBank AAD39400.J),pol

编码的蛋白酶(例如UniProt P03366),nef编码的蛋白酶(例如fenBank-CAA4I585J, Shugars,1993,上述)。

[0284] 根据本发明优选的实施方式,唾液酸粘附素或其功能等效变体被结合至固体载体(即固定化),并与测试抗HIV抗体存在的生物学试样接触培养。可添加阻滞剂以降低非特异性结合。

[0285] 将被理解的是,唾液酸粘附素或其功能等效变体可以利用生物学试样以未结合状态来培养,并随后被结合至固体载体(即固定化)。所述载体随后优选地被广泛处理(即通过冲洗)以基本上移除非特异性结合的组分。由于这样处理,就可以形成唾液酸粘附素或其功能等效变体和包膜病毒的复合物。

[0286] 可以根据本发明使用的一种类型的固相试验为夹心试验。在夹心试验中,存在于固相上的标记直接与存在于试样中的分析物含量成比例。这种类型的试验方法通常为优选的,特别是对于低分析物浓度的可视化来说,因为标记在固相上的表现被更加容易地检测。

[0287] 可检测到的标记抗体(能够结合至包膜病毒的部分)随后优选被添加,并且在足以允许抗体结合至可能存在的任意包膜病毒的条件下来培养载体。载体随后优选被广泛处理(例如通过冲洗)以基本上移除任意未结合的抗体。如果包膜病毒存在于测试试样,那么抗体和包膜病毒将形成免疫复合物。在这样的试验中,结合至载体的抗体的检测为指示包膜病毒在所测试的试样中存在。参见Schuurs A,等,US4,016,043以及Pankratz T,等,US5,876,935。抗体可以是来自非人类物种(例如抗人IgG鼠源抗体、抗人IgG山羊抗体、抗人IgM山羊抗体)中分离的天然免疫球蛋白,或者其可以重组地或者合成地制备。其可以是完整的免疫球蛋白或者免疫球蛋白片段(例如FAb,F(Ab)₂)。根据需要,其它的结合分子(能够结合至包膜病毒)可被应用为与这样的抗体相一致或者代替这样的抗体。例如,抗体可以是生物素化的,并且第二抗体可以被标记的抗生物素蛋白或链霉亲和素替代。

[0288] 为了消除束缚-自由分离步骤并减少化学结合试验需要的时间和设备,均匀的试验方法可被替换地采用。在这样的试验中,成对结合的一种组分还可被固定;然而,成对结合的第二组分的存在被检测到,无需束缚-自由分离。均匀的光学方法的例子为EMIT方法(Syva,Inc.,Sunnyvale,CA,US),其通过检测荧光淬灭来进行;激光浊度测定乳胶粒子凝集方法(Behringwerke GmbH,Marburg,DE),通过检测光散射的变化来进行;LPIA乳胶粒子凝集法(Mitsubishi Chemical Industries Ltd.,Tokyo,JP);TDX荧光去极化法(Abbott Laboratories,Inc.,Abbott Park,IL,US);以及荧光能量转移法(CisBio International SA,Paris,FR)。任意这样的试验可以适合用于根据本发明的目的。

[0289] 本发明的结合试验可被构建为竞争试验。在竞争试验中,存在于测试试样中的包膜病毒浓度越高,存在于固相上的标记量越低。

[0290] 在类似于夹心试验的方式中,竞争试验可以通过提供适量的标记包膜病毒并确定所测试的流体是否包含相同类型的包膜病毒来进行,所述包膜病毒将与用于结合至载体的标记抗体相竞争。在这样的竞争试验中,捕捉的标记包膜病毒的量与存在于测试试样中的分析物的量成反比。

[0291] 在所有这样的试验方法中,试验试剂的至少一种组分将优选被标记或者通过光的演化或猝灭被检测。这样的组分可以是第二抗体、抗HIV抗体、或者结合至抗HIV抗体的肽,根据所采用的免疫试验方法。放射性同位素结合试验方法(例如放射性免疫试验)采用放射

性同位元素作为这样的标记;信号可以通过光的演化被检测,在存在荧光或者荧光基团的情况下。参见Lucas F,等,US5,698,411和Landrum E,等,US5,976,822。酶结合试验方法(例如ELISA)采用酶作为标记;信号可以通过颜色或光的演化被检测,在存在显色或荧光基团的情况下。其它标记,例如顺磁标记,用作有色粒子、乳胶粒子、例如硒和金的胶体金属、以及染料粒子的材料,也可被采用。参见Leuvering J,US4,313,734,Gribnau T,等,US4,373,932,和Baugher B,等,US5,501,985。酶(特别是碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或脲酶)作为可检测标记(即酶免疫试验或EM)的使用为优选的。

[0292] 酶标记的存在可以通过使用显色底物(包括散发或吸收荧光、UV、可见光的那些)来检测,其通过酶标记响应催化作用。当酶为碱性磷酸酶的时候,底物可以包括化学发光底物,例如AMPPD^(R)(3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧环乙烷),CDP-star^(R)(二钠4-氯-3-(甲氧基螺{1,2-二氧环乙烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸酯)和CSPD^(R)(二钠3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧环乙烷-3,2-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸酯);显色底物,例如对硝基苯基磷酸酯,5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸酯(BCIP),4-氯化硝基四氮唑蓝(NBT)和碘硝基四唑(INT)。

[0293] 更优选地,可采用化学标记(例如胶体金、乳胶珠标记)。标记的检测可以使用多个检测器、多通道滤波器、光栅或者不同的荧光光谱来完成。参见Ward D,等.,US5,759,781。特别优选的是采用过氧化酶作为酶标记,特别是相应于显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),OPD或ABTS。在将过氧化酶标记抗体用作酶的情况中,能够使用高碘酸盐技术或者异双功能试剂。参见Nakane P,等,J.Histochem.Cytochem.1974;22:1084-1090和Ishikawa E,等,J.Immunoassay.1983;49(3):209-327。

[0294] 用于本发明试验的材料可理想地用于制备试剂盒。这样的试剂盒可以包含一个或多个容器部件,例如瓶或者管;每个容器部件包含一个进行试验测试时使用的分离元素。例如,一个容器部件可以包含唾液酸粘附素或其功能等效变体,第二容器可以包含可溶的、可检测的标记的抗包膜病毒,优选为冻干的形式,或者为溶液的形式。此外,所述试剂盒还可以包含一个或多个容器,每个容器包含(不同的)预定量的包膜病毒或包含神经节苷脂的脂质微粒,所述的神经节苷脂包含唾液乳糖部分。这些在后的容器可被用于制备标准曲线,可以插入至标准曲线中,从包含未知量的包膜病毒的试样获得结果。

[0295] 在使用试剂盒时,使用者仅需要向容器中添加预测定量的疑似试样,所述疑似试样包含可测定的未知量的包膜病毒,预测定量的可检测标记的抗体存在于第二容器中。在培养适当时间之后,免疫复合物形成(如果试样包含包膜病毒)并从上层清液中分离,并且免疫复合物或上层清液流体通过放射性计数、添加酶基底和颜色演化,或者通过包含化学标记(例如胶体金、乳胶珠)被检测。

[0296] 在另一实施方式中,本发明提供了一种从试样中分离包膜病毒的方法,包括:

[0297] (i) 使所述试样与唾液酸粘附素或其功能等效变体接触,所述功能等效变体基本上保留其结合唾液乳糖的能力,和

[0298] (ii) 分离结合至所述唾液酸粘附素或其功能等效变体的病毒。

[0299] 在优选实施方式中,唾液酸粘附素或其功能等效变体可被结合至基质并用于包膜病毒的亲和性纯化,例如从细胞培养基或例如为血液和肝脏的生物组织。唾液酸粘附素或其功能等效变体例如可被粘附或固定至底物或载体上。包含包膜病毒决定子的溶液随后与

固定的唾液酸粘附素在适于形成唾液酸粘附素和包膜病毒的复合物的条件下接触一定的时间。在接触步骤期间所使用的条件被控制(例如通过pH或盐浓度,即溶液中的离子强度)。应当注意不能超过唾液酸粘附素或其变体的用量(即流动应当足够缓慢以获得符合要求的吸附)。在该步骤中,溶液的其它组分基本上畅通无阻地穿过。任选地,基体随后被冲洗(例如利用水溶液),从而移除残留的或松散结合的物质。

[0300] 在接下来的步骤中,未结合的材料从结合的复合物中分离。包膜病毒随后从载体分离。所述分离(即洗脱)通常使用表示为洗脱液的第二溶液来进行,所述洗脱液在提供解吸附的条件下经过基质(即从唾液酸粘附素或其变体释放HIV)。这样的条件通常由pH或盐浓度(例如离子强度、疏水性)的变化来提供。已知不同的洗脱方案,例如梯度洗脱液和分步进行洗脱液。洗脱液还可以通过包含竞争物质的第二溶液来提供,所述竞争物质将替代基质上的HIV。

[0301] 在优选实施方式中,包膜病毒选自由HIV或埃博拉病毒组成的组。在又一更优选的实施方式中,HIV为HIV-1。

[0302] 在另一实施方式中,本发明提供一种包含固定化的唾液酸粘附素或其功能等效变体的试剂盒,所述功能等效变体基本上保留了结合唾液乳糖的能力。固定化的唾液酸粘附素或其功能等效变体对于检测试样中的包膜病毒以及分离包膜病毒是有用的。

[0303] 唾液酸粘附素被结合至其的载体例如可以是单独微粒的形式,优选为多孔的并且基本上为球形的微粒;整料的形式;或者膜的形式。本发明还包括的是适用于进行亲和色谱分析法的体系,其包含使用如上定义的分选基质柱。所述柱体的尺寸可以是适于分析规模或者适于大规模的色谱分析法的。

[0304] 合适的载体材料为已知的。在一种实施方式中,所述载体为天然聚合物(例如琼脂糖、藻酸盐、角叉菜胶、胶质)。这样的天然聚合物被已知为用于在冷却或添加二价金属离子的时候自发地形成物理交联的网络,并且如果需要可以添加化学交联试剂。这些载体为根据标准方法容易制备的,例如反向悬浮胶凝。参见Hjerten S, *Biochim. Biophys. Acta* 1964; 79 (2): 393-398。在另一实施方式中,所述载体由交联的合成聚合物(例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基胺)组成。这样的聚合物也是根据标准方法容易制备的。参见Arshady R, *Chimica e L'Industria* 1988; 70 (9): 70-75。由此,总的来说,载体材料基本上可以是任何材料,所述任何材料允许gp120结合本发明的化合物的共价结合(例如如上所讨论的聚合物、无机材料、例如硅石、陶瓷)。

[0305] 多种已知的方法对于通过合适的功能基将配体固定至载体都是可行的。结合方法的精确选择将根据被固定配体的结构。在一种实施方式中,所述载体具有亲水性表面,并且如果是多孔的话,孔的表面也为亲水性的。这对于避免或者至少是减少任何非特异性的蛋白质的相互作用是有利的。如果表面具有用于结合配体的高密度基团,那么其也为有利的。这样的结合基团通常为羟基、但是还包括其它的自由基,例如具有适用于移植的双键的基团,胺,硫醇或环氧化物。如果载体材料具有不期望的表面特性,那么可以在结合配体之前对其涂覆亲水性多羟基功能材料。用于结合亲和性配体至合适载体来制备分离基质的技术和构思为本领域已知的。参见Berg H, 等, WO1998033572。

[0306] 6. 本发明的轭合物

[0307] 唾液酸粘附素作为用于存在于在包膜病毒的薄膜中发现的神经节苷脂中的唾液

乳糖残基的特异性配体的识别,允许通过结合所述化合物至唾液酸粘附素来使用这种分子来靶向目标化合物的包膜病毒。唾液酸粘附素或其功能等效变体还可被连接(即直接地或者通过间隔分子)至治疗药物或染料、荧光分子、诊断酶或放射性同位素标记的实体以能够识别包膜病毒或者治疗性地靶向包膜病毒。

[0308] 由此,在另一实施方式中,本发明涉及一种包含唾液酸粘附素或基本上保留其结合唾液乳糖能力的功能等效变体的轭合物和治疗剂。

[0309] 在优选实施方式中,治疗剂为抗HIV试剂。在另一优选的实施方式中,抗HIV试剂选自自由进入和融合抑制剂、整合酶抑制剂、反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂组成的组。

[0310] 本发明的轭合物可以使用任何本领域技术人员已知的方法来获得。由此能够通过任何标准方法来获得唾液酸粘附素或所述蛋白质的变体。例如,唾液酸粘附素可以通过从细胞提纯来获得,其中多肽为天然存在的(例如巨噬细胞)或者通过重组的方式由cDNA通过在不同有机体中表达来产生,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。一旦提供足够量的提纯的唾液酸粘附素或其功能等效变体,后者就必须被结合至目标化合物。结合可以通过不同的方式实现。一种可能性为在不会干扰所述组分活性的位置直接结合功能基团至目标试剂。在本发明中应当理解的是,功能基团指的是用于所述分子特有的化学反应的分子中特定原子的基团。功能基团的例子包括但不限于羟基、醛、烷基、烯基、炔基、氨基化合物、氨甲酰、伯、仲、叔和季胺、氨氧基、叠氮化物、含氮的(二酰亚胺)、苄基、碳酸酯、酯、醚、乙醛酰、卤代烷基、卤代甲酰基、亚胺、酰亚胺、酮、马来酰亚胺、异腈、异氰酸酯、碳酰基、硝酸盐、亚硝酸盐、硝基、亚硝基、过氧化物、苯基、磷化氢、磷酸酯、膦酰、吡啶基、硫化物、磺酰基、亚磺酰基、硫酯、硫醇和氧化3,4-二羟基苯基丙胺酸(DOPA)基团。所述基团的例子为马来酰亚胺或乙醛酰基团,其特别地与ApoA分子中的硫醇基团反应,以及氧化的3,4-二羟基苯基丙胺酸(DOPA)基团,其与EDA分子中的伯胺基团反应。

[0311] 另外的可能性为通过使用相同的或不同的双功能基团结合治疗剂至唾液酸粘附素或其功能等效变体。双功能基团可首先被结合至治疗活性化合物,并且随后被结合至唾液酸粘附素,或者可替换地,其能够结合结合双功能基团至唾液酸粘附素,并随后结合后者至治疗剂。这种类型的轭合物的示例性的例子包括已知为酮-肟的轭合物,其中轭合物的第一组分包含氨氧基基团,其被结合至存在于异双功能基中的酮基,酮基反过来被结合至轭合物的第二组分中的氨基。参见Lam K,等,US20050255042。

[0312] 在另一实施方式中,用于结合唾液酸粘附素和治疗剂的试剂可被光分解、化学、热或者酶处理。特别地,可以通过酶而被水解的结合试剂可被用于目标细胞,从而使得治疗活性化合物仅被释放至细胞中。参见McCall J,等,WO 2004054622,Chien H,等,WO 2006107617,Chan C,等,WO2007046893和Govindan S,WO 2007112193。

[0313] 在优选实施方式中,其中治疗活性化合物为包括寡肽、肽和蛋白质的肽性质化合物,能够使用本领域技术人员已知的方法化学修饰多肽链,从而使得蛋白质可被共价连接至第二多肽。由此,用于共价连接两个多肽的合适的方法包括基于通过存在于半胱氨酸片段中的硫醇基团结合的方法,基于通过存在于赖氨酸片段中的伯胺基团结合的方法,基于通过N-和C-端片段结合的方法可被使用。参见Morseman J,等,US 6,809,186。适用于修饰多肽的试剂允许它们结合至其它的化合物,包括:戊二醛(即允许结合化合物至多肽的N

端), 碳二亚胺(即允许结合化合物至多肽的C端), 琥珀酰亚胺酯(例如MBS, SMCC) 其允许激活N端和半胱氨酸片段, 对二氨基联苯(BDB), 其允许激活酪氨酸片段, 和高碘酸盐, 其允许激活被糖基化的那些蛋白质中的碳水化合物部分。

[0314] 在治疗活性化合物为肽性质的特定情况中, 能够在单独的步骤中表达轭合物, 使用本发明的基因构建编码所述轭合物, 所述构建在适用于其在不同的有机体中与转录以及任选地翻译控制元素一起表达的载体中被引入。存在于本发明的表达盒中的转录以及任选地翻译控制元素包括启动子, 其导引它们被有效连接的核苷序列以及必须或适用于转录的其它序列的转录, 并且其在合适的时间和位置调节, 例如启动和终止信号、切割位置、多腺苷酸化信号、复制源、转录增强剂或者转录静默剂。所述的元素以及用于构建表达盒的载体和根据本发明的重组载体通常根据所使用的宿主细胞来选择。

[0315] 本发明的组合物可被施加至待治疗的哺乳动物(包括人), 通过本领域已知的任意方式(例如口服、鼻内、皮下、肌肉、皮内、静脉注射、动脉注射、非肠道或导管插入给药)。

[0316] 本发明进一步涉及包含唾液酸粘附素或其功能等效变体的组合物的应用, 所述组合物作为载体用于靶向一种或多种病毒抑制剂以提供对病毒感染、优选对HIV/AIDS病毒感染的协同作用。在本实施方式框架内, 病毒抑制剂选自自由进入和融合抑制剂、整合酶抑制剂、反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂组成的组。

[0317] 更通用地, 本发明涉及唾液酸粘附素和常规使用的合适的可检测标记的轭合物, 所述可检测标记例如荧光标记、发光标记、化学发光标记、酶标记、放射性标记或吸光率标记。

[0318] 本发明的轭合物可被施加至需要其的个体, 用于治疗或预防与由包膜病毒感染相关的疾病。因此, 在另一方面中, 本发明涉及根据本发明的轭合物, 用于治疗由包膜病毒感染导致的疾病。

[0319] 另一方面, 本发明涉及根据本发明的轭合物的使用, 用于制备用于治疗由包膜病毒感染导致的疾病的药剂。

[0320] 另一方面, 本发明涉及一种用于在需要其的个体中治疗由包膜病毒感染导致的疾病的方法, 包括给所述个体施加根据本发明的轭合物。

[0321] 在优选实施方式中, 由包膜病毒感染导致的疾病选自自由通过丝状病毒科的病毒导致的疾病以及通过逆转录酶病毒导致的疾病组成的组。

[0322] 在优选实施方式中, 包膜病毒为HIV, 在这种情况下, 轭合物被用于治疗与HIV感染相关的疾病。

[0323] 7. 传递目标化合物至抗原呈递细胞的方法

[0324] 在另一实施方式中, 本发明涉及一种传递目标化合物至抗原呈递细胞的方法, 其包括所述的抗原呈递细胞与包含所述化合物的脂质微泡接触, 并且其中所述脂质颗粒包含至少包含唾液乳糖部分的分子。

[0325] 使用本发明的方法而被传递至抗原呈递细胞的化合物包括但不限于:

[0326] 1) 抗原。合适的抗原包括一种或多种如上所述的病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原、过敏原或环境抗原、或者肿瘤抗原。

[0327] 2) 如上所述的抗逆转录病毒剂。优选地, 抗逆转录病毒剂选自自由进入和融合抑制剂、整合酶抑制剂、反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂组成的组。

[0328] 3) 核酸(例如双链RNA、免疫刺激寡核苷酸、质粒、反义和核酶)。

[0329] 4) 放射性同位素,例如¹²⁵I,¹³¹I,¹¹¹In,¹²³I,^{99m}Tc和³²P。这样的组合物例如对治疗患有自体免疫疾病的个体是有用的,所述自体免疫疾病具有异常的树突细胞活性。树突细胞通过毒素的消除可以减轻自体免疫疾病(例如多发性硬化症、风湿性关节炎、自体免疫疾病)。

[0330] 5) 酶活性毒素及其片段,例如白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(源自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)),蓖麻毒素A链,相思豆毒素A链,蒴莲根毒素A链, α 八叠球菌,*Aleurites fordii*蛋白质,石竹素蛋白质,*Phytolacca americana*蛋白质(PAPI,PAPII和PAP-S),*Momordica charantia*抑制剂,毒蛋白,巴豆毒素,*Saponaire officinalis*抑制剂,白树毒素,分裂素,局限曲菌素,酚霉素,伊诺霉素,和单端孢霉烯族化合物。这样的组合物对例如治疗患有自体免疫疾病的个体是有用的,所述自体免疫疾病具有异常的树突细胞活性。树突细胞通过毒素的消除可以减轻自体免疫疾病(例如多发性硬化症、风湿性关节炎)。

[0331] 6) 免疫抑制药物,例如特定的糖皮质激素(例如地塞米松、他克莫司、环孢霉素A),其通过抑制协同刺激分子(即CD80和CD86)的表达和发炎细胞因子(即IL-6和TNF- α)的分泌而抑制DC的成熟和同种异体刺激能力。

[0332] 7) 具有可检测基团的化合物。所述的可检测基团可以是任何具有可检测物理或化学特性的材料,像光谱的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、电的、光的或化学方法。本发明中有用的标记包括荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、Alexa染料、德克萨斯红(Texas red)、玫瑰精),放射性同位素标记和例如为胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶)珠的量热标记。

[0333] 在优选的实施方式中,目标化合物为抗原。第二方面,化合物为抗逆转录酶病毒试剂。优选地,化合物为抗原。

[0334] 适用于制备脂质体的试剂包括但不限于磷脂质。所述脂质体可以包含甘油磷脂、神经鞘脂或其组合。

[0335] 适用于制备根据本发明的脂质体的甘油磷脂包括但不限于:

[0336] 1) 包含不饱和脂肪酸的甘油磷脂,例如二硬脂酰-磷脂酰甘油(DSPG),1,2-二硬脂酰-s/z-丙三基-3-胆碱磷酸(DSPC),二油酰磷脂酰胆碱(DOPC),二油酰磷脂酰甘油(DOPG),磷脂酰甘油(PC),磷脂酸(PA),和/或磷脂酰甘油(PG),

[0337] 2) 包含饱和脂肪酸的甘油磷脂,例如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC),二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),二棕榈酰磷脂酸(DPPA),和二棕榈酰磷脂酰甘油(DMPG),也可用于脂质体制备,和

[0338] 3) 包含饱和和不饱和脂质的甘油磷脂,例如1-棕榈酰-2-油酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(POPC)和1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(DPPC)。

[0339] 适用于制备根据本发明的脂质体的神经鞘脂包括但不限于神经鞘磷脂。

[0340] 当阳离子脂质体为优选的时候,十八烷胺可被使用,并且当需要阳离子脂质体为的时候,天然的酸性脂质,例如磷脂酰丝氨酸(PS)、PG、磷脂酰肌醇(PI)、PA和心磷脂(CL)可被添加。在某些实施方式中,可以包括胆固醇来稳定脂质体双层。当使用多元未饱和的中性脂质的时候,可以包括少量的抗氧化剂,包括但不限于 α -生育酚或 β -羟基甲苯胺(BHT)。

[0341] 脂质体大小范围为20纳米至大于1000纳米。据此,脂质体可以是20nm、25nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、950nm,或1000nm。在示例性的实施方式中,脂质体可以是100nm至200nm。脂质体的大小可以通过例如超声波降解和过滤的方法来控制。脂质体为多样化的并且可被形成为不同的大小和脂质组合物。参见Basu S,Basu M,Liposome methods and protocols,methods in molecular biology,第199卷,“Liposome Technology”,第三版,Gregoriadis G,Ed.(Informa HealthCare Inc.,New York,NY,US,2006)。

[0342] 将被理解的是,不同组分的比值可以根据需要来调节。在优选的实施方式中,除了包含唾液乳糖部分的分子,脂质体还包含甘油糖脂、胆固醇和神经鞘磷脂。

[0343] 在优选的实施方式中,甘油糖脂与胆固醇的比值为41/45。在优选的实施方式中,甘油糖脂与神经鞘脂(优选为神经鞘磷脂)的比值为41/10。在另一实施方式中,胆固醇与神经鞘脂的比值为9/2 (w/w)。

[0344] 在优选的实施方式中,甘油脂质为1-棕榈酰-2-油酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(POPC),1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(DPPC)或其组合。在又一更优选的实施方式中,脂质体包含25/16的POPC比DPPC。在另一实施方式中,脂质体包含25mol%的POPC、16mol%的DPPC、45mol%的胆固醇和余量的神经鞘磷脂,其总共达到100mol%。在优选的实施方式中,脂质体包含4% 神经节苷脂,其中神经鞘磷脂含量为10%。

[0345] 适用于在本发明中使用的神经节苷脂包括任何包含唾液乳糖残基和少于四个唾液酸残基的神经节苷脂。在优选的实施方式中,包含唾液乳糖片段的分子为包含少于四个唾液酸基团的神经节苷脂。在更优选的实施方式中,神经节苷脂为如在表1中所示的。在又一更优选的实施方式中,神经节苷脂选自由GM1,GM2,GM3,GD1b和GT1b组成的组。

[0346] 脂质体的核心为水性的并且可被用于保持将被传递至抗原呈递细胞的化合物。在优选的实施方式中,所述化合物为抗原多肽,例如病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动植物抗原、过敏原或环境抗原、分化抗原或肿瘤抗原的免疫原片段。在更优选的实施方式中,抗原为病毒抗原。在又一更优选的实施方式中,抗原为HIV抗原。

[0347] 在优选的实施方式中,抗原呈递细胞为唾液酸粘附素表达细胞。在更优选的实施方式中,抗原呈递细胞为树突细胞。

[0348] 在一种实施方式中,在这里描述的方法被用于间接体内疗法的治疗。例如,包含目标化合物并且其中所述的脂质微粒包含至少一个含有唾液乳糖部分的分子的脂质微泡可以与免疫细胞(例如唾液酸粘附素表达细胞,并且更优选地为树突细胞)在体外接触,从而使得化合物通过细胞而被摄取。所述细胞随后被转移至患者(例如通过注射)以治疗疾病(例如癌症或者自体免疫疾病)。在一种实施方式中,免疫细胞(例如树突细胞)从患者提取,与包含目标化合物的脂质微泡接触,从而使得试剂被摄取至细胞内。

[0349] 可替换地,包含目标化合物的脂质微泡还可被用于在体内将化合物传递至细胞,使用本领域技术人员已知的方法。对于体内施加来说,脂质微泡典型地通过非肠道(即通过关节内、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉或皮下,例如通过植入装置)施加。在特别的实施方式中,药物组合物可以通过快速浓注被静脉注射给药地或者腹膜内给药。参见Stadler J,等,US5,286,634。细胞内核酸传递的方法也是本领域已知的。参见Straubinger K,等,

“Methods in Enzymology” (Academic Press, New York, NY, US, 1983, 第512-527页), Mannino R, 等, Biotechniques 1988; 6: 682-690, Nicolau C, 等, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1989; 6: 239-271. 给予脂质基治疗的其它方法也被在先描述。参见 Rahman Y, 等, US3,993,754, Sears B, US4,145,410, Schneider S, US4,224,179, Papahadjopoulos D, 等, US4,235,871, Lenk R, 等, US4,522,803, 和 Fountain M, 等, US4,588,578。

[0350] 在另一实施方式中, 包含目标化合物的脂质微泡还可被用于在体外传递化合物至细胞。

[0351] 在上文提及的所有公开物均通过引用而被纳入本发明中。

[0352] 现在已经在大体上描述了本发明, 通过参考以下的实施例其将更加容易地理解, 其通过说明的方式被提供, 并非限制本发明, 除非另有所指。

[0353] 通用步骤

[0354] 1. HIV-1的分离和质谱分析

[0355] 利用HIV-1_{NL4-3}感染MT-4细胞并与未感染的细胞共同培养。在观察到细胞病变作用之前, 收集并提纯病毒。参见 Lorizate, 2009, 上述。简单地说, 介质通过过滤被净化, 颗粒通过超速离心通过20% (w/w) 蔗糖的软垫而被浓缩。浓缩的HIV-1通过速度梯度离心以 OptiPrep™ 梯度被进一步提纯 (Axis-Shield PoC, Oslo, NO)。

[0356] 收集可视的病毒组分并通过离心浓缩。最终的小球重新悬浮于10mM Hepes, 150mM NaCl (pH7.4) 缓冲溶液中, 在液氮中快速冷冻并在-80℃下存储。为了进行脂质组合物分析, 试样一旦融化而被重新悬浮于甲醇中, 并随后在结合至具有电喷雾电离接口的正交加速飞行时间质谱仪的UPLC中评价 (LCT Premier; Waters Corp., Milford, MA, US)。使用正离子模式获得数据, 在W模式中的质量范围为50-1500m/z。0.15s的扫描时间和0.01s的中间扫描延迟在11500 (FWHM) 的标称仪器分辨率下使用。亮氨酸-脑啡肽被用作为锁定喷雾校准。

[0357] 2. 原代细胞培养

[0358] 外周血单核细胞 (PBMC) 由HIV-1血清反应阴性的个体获得, 并且单核细胞群体 (>97% CD14⁺) 利用CD14⁺阳性选择磁珠 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE) 来分离。DC在存在1,000U/ml的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和IL-4 (R&D) 的情况下培养这些细胞而获得。mDC通过在存在100ng/ml的脂多糖 (LPS; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) 额外的两天的情况下在培养iDC第五天时分化。如上所述, DC在第七天免疫表型。参见 Izquierdo-Useros, 2007, 上述。由单核细胞至iDC的充分分化基于CD14的减少和DC-SIGN的获得, 同时DC成熟化上调CD83, CD86和HLA-DR的表达。

[0359] 外周血单核细胞 (PBMC) 由HIV-1血清反应阴性的供体获得, 并且单核细胞群体或骨髓DC根据在 Izquierdo-Useros N. 等. (J Virol., 2007, 81: 7559-7570) 中所描述的来分离并培养。单核细胞衍生的成熟DC利用100ng/ml的LPS (Sigma-Aldrich) 或ITIP (CellGenix) 的300IU/ml IL-1 β , 1,000IU/ml IL-6, 1,000IU/ml TNF- α 和Sigma-Aldrich的1 μ g/ml PGE₂ 分化48小时。LPS骨髓DC利用100ng/ml的LPS分化24小时。自体同源的和异体的CD4⁺T细胞使用RossetteSep α -CD8⁺混合物 (干细胞) 而由PBMC富集, 并利用补充有10IU/ml的IL-2 (Roche) 的10%胎牛血清 (FBS, Invitrogen) 而保持在RPM1中。

[0360] 3. 细胞系、质粒和病毒源

[0361] HEK-293T细胞系被保持在D-MEM介质 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, US) 中, 同

时CHO和MT4细胞系被分别保持在 α -MEM和RPMI介质中。所有介质包含10%胎牛血清、100U/ml的青霉素和10 μ g/ml的链霉素(Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA,US)。VLP_{HIV-Gag-eGFP}通过转染分子克隆pGag-eGFP(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program,NIH,Bethesda,MD,US)获得。HEK-293T细胞利用磷酸钙(CalPhos;BD Biosciences Corp.,Franklin Lakes,NJ,US)在T75烧瓶中使用30 μ g的质粒DNA来转染。CHO细胞使用7 $\times 10^6$ 细胞和40 μ g的质粒DNA被电穿孔(0.24Kv和950 μ F)。包含VLP的上清液被过滤(Millex HV,0.45 μ m;Millipore Corp.,Billerica,MA,US)并在-80℃下冷冻直至使用。对于利用浓缩VLP的研究,收集培养基,通过过滤净化,并且颗粒通过20%(w/w)蔗糖超速离心(28,000rpm、2小时、4℃、在SW32转子中)被浓缩。最终的小球被再次悬浮于150mM NaCl,10mM Hepes pH7.4(Hepes-钠缓冲溶液),在液氮中迅速冷冻并在-80℃下存储。受感染的病毒源和VLP_{HIV-Gag-eGFP}的p24^{Gag}含量通过ELISA(PerkinElmer Inc.,Waltham,MA,US)和定量蛋白质印迹来确定。检测利用aLiCoR Odyssey系统来实施,其采用内部研发的兔抗衣壳pAb和提纯的Gag蛋白作为标准。

[0362] HEK-293T和TZM-bl(通过美国国立卫生研究院[NIH]艾滋病研究和参考试剂计划,由JC Kappes,X Wu,和Tranzyme Inc.获得)被保持在D-MEM(Invitrogen)中。Raji B细胞系(由Y.van Kooyk提供)在RPMI(Invitrogen)中培养。Raji DC-SIGN B细胞系(由Y.van Kooyk提供)被保持在具有1mg/ml G418(Invitrogen)的RPMI中。所有培养基包含10%FBS,100IU/ml的青霉素,和100 μ g/ml的链霉素(均来自Invitrogen)。VLP_{HIV-Gag-eGFP}和VLP_{HIV-Gag-Cherry}如上所述地获得(Izquierdo-Useros N.等.Blood113:2732-2741)。HIV_{NL4-3}在分子克隆pNL4-3(M.Martin的NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)的转染之后获得。HIV_{NL4-3-Cherry}在pCHIV和pCHIV mCherry以1:1的比值共转染之后获得(Lampe M.等.Virology360:92~104)。缺乏包膜糖蛋白的HIV_{NL4-3}如在别处所描述地获得(Izquierdo-Useros N.等.上述)。病毒源和VLP的p24Gag含量通过ELISA(Perkin-Elmer)或定量蛋白质印迹来确定(Izquierdo-Useros N.等.PLoS Biol10:e1001315.doi:10.1371/journal.pbio.1001315)。在感染试验中使用的HIV_{NL4-3}采用TZM-bl受体细胞系来滴定,根据在(Li M.等,2005,J.Virol.79:10108-10125)中描述的。

[0363] 4.脂质体的制备

[0364] 根据以下在先描述的挤出方法来制备大的单层囊泡(LUV)。参见Mayer L,等,Vesicles Biochim.Biophys.Acta1986;858:161-168。脂质和神经节苷脂为市售的(Avanti Polar Lipids,Inc.,Alabaster,AL,US;Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Santa Cruz,CA,US)。LUV_{HIV-tRed}脂质组合物为:1-棕榈酰-2-油酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(POPC)25mol%:1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(DPPC)16mol%:脑神经鞘磷脂(SM)14mol%:胆固醇(Chol)45mol%并且当Cer,PS或神经节苷脂存在(4mol%)的时候,SM量被降低至10mol%。LUV_{POPC-tRed}脂质组合物为96mol%POPC,包含或不包含4mol%的Cer、GM3、GM2或GM1。所有的LUV包含2mol%的1,2-二(十六酰)-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺(DHPE)-德克萨斯红(分子探针;Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA,US)。脂质在氯仿:甲醇(2:1)中混合并在氮气下干燥。痕量的有机溶剂通过真空泵移除1至2小时。然后,干燥的脂质膜被分散在10mM Hepes,150mM NaCl(pH7.4)中并在通过具有100nm孔径的两叠聚碳酸酯膜(Nucleopore,Inc.,Pleasanton,CA,US)使用热管挤出机(Lipex挤出机;Northern Lipids,

Inc., Burnaby, CA) 挤出10次之后经历10个冻融循环。为了利用显示类似荧光强度的等浓度LUV进行mDC脉冲, 包含LUV的德克萨斯红浓度在Bottcher磷酸盐确定方法之后被定量, 并且在SLM Aminco系列2分光荧光计 (Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, US) 中在580nm下记录设定激发的荧光发射光谱。参见Bottcher C, 等, Anal. Chimica Acta 1961; 24: 203-204。

[0365] 5. 脂质体和VLP捕捉试验

[0366] 所有的捕捉试验以100 μ M特有的LUV_{tRed}配方和通过蛋白质印迹定量 (2,500pg的VLP_{HIV-Gag-eGFP} p24^{Gag}, 由ELISA确定) 的75ng VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag每2 $\times 10^5$ 细胞的恒定速率在37 $^{\circ}$ C下平行进行脉冲mDC4小时。在大量冲洗之后, 阳性DC通过具有FACSCalibur (Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US) 的FACS使用CellQuest软件 (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, US) 获得, 以分析所收集到的数据。前角和侧向散射光门被用于从所有分析中排除凋亡细胞和碎片。

[0367] 完成竞争试验, 利用75ng的VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag以1 $\times 10^6$ 细胞/ml的最终浓度在37 $^{\circ}$ C下培养2 $\times 10^5$ mDC4小时, 在存在降低量的包含GM2的LUV_{HIV-tRed}或100 μ M包含Cer-和PS-的LUV_{HIV-tRed}的情况下。可替换地, 细胞利用75ng的VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag和100 μ M包括或不包括GM1、GD1b、GT1b、GQ1b、Cer和PS的LUV_{HIV-tRed}培养。随后通过如上所述的FACS分析细胞。

[0368] 6. VLP和LUV的神经氨酸酶处理

[0369] 总共2 $\times 10^5$ DC在37 $^{\circ}$ C下利用25 μ M包含GM3的LUV_{HIV-tRed}和75ng蔗糖-丸状VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag (其在37 $^{\circ}$ C下利用100或50mU源自Clostridium perfringens的神经氨酸酶 (Factor X Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) 处理12小时或不处理) 脉冲2小时。12小时培养在涂覆玻璃的板 (SMI-LabHut Ltd., Churcham, Gloucestershire, GB) 上在Hepes-钠缓冲溶液中完成, 并且反应通过添加包含FCS的RPMI培养基而停止。冲洗细胞并通过FACS评估来获得tRed和eGFP阳性细胞的百分比。

[0370] 7. mDC的乳糖和GM3极性端基处理

[0371] 使用或不使用5或10mM的乳糖 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) 以及可溶的GM3碳水化合物端基 (Carbosynth Ltd., Compton, Berkshire, GB) 在室温下预培养mDC30分钟。细胞随后利用50 μ M包含GM3的LUV_{HIV-tRed}和75ng蔗糖-丸状VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag在37 $^{\circ}$ C下脉冲2小时, 用于化合物试验的最终浓度为5或10mM。通过如上所述的FACS分析细胞。

[0372] 8. 最小化神经节苷脂能量结构和统计学分析

[0373] 使用Chem3D Ultra软件 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, US) 来计算在真空中最小限度的能量结构, 其采用MM2力场和最陡降演算法。最小均方根梯度被设定为0.1; 最小和最大分别移动至0.00001和1.0。使用GraphPad Prism v.5软件 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, US) 进行统计。

[0374] 9. DC的转导

[0375] VSV-G-假病毒SIV3慢病毒载体 (由A. Cimorelli友情提供) 根据Goujon C. 等, Gene Ther., 2006, 13: 991-994) 制备。分离的单核细胞 (5 $\times 10^5$) 利用SIV3微粒感染并利用两个不同的SIGLEC1-特异性或一个非靶向shRNA控制MISSION慢病毒转导微粒 (Sigma-Aldrich) 在MOI=50下转导。转导的单核细胞被分化成为LPS mDC, 并如上所述地对VLP捕捉和HIV-1反感染进行评估。DC充分的表型成熟根据Izquierdo-Useros N. 等. 上述来评价。携带在相同

的pLK0.1-puro载体主链(MISSION TurboGFP控制转导微粒)上克隆的GFP受体基因的慢病毒转导颗粒被用于通过FACS评价转导效率(当采用细胞的时候,在第七天预计为75%-98%)。

[0376] 10.通过FACS的Siglec-1表面表达分析

[0377] DC利用1mg/ml的人IgG(Baxter,Hyland Immuno)阻塞并根据制造商指示利用抗Siglec-1-PE7-239mAb(AbD Serotec)在4℃下染色20分钟。试样利用FACSCalibur(Becton-Dickinson)使用CellQuest和FlowJo软件进行分析以评价收集的数据。

[0378] 11.反式感染试验

[0379] DC利用如上所述的HIV_{NL4-3}处理并脉冲。在大量冲洗之后,细胞与T2M-b1 CD4⁺靶向细胞系共同培养以测量反式感染。脉冲的单核细胞衍生的DC或骨髓DC以1:1或5:1的比值分别以四倍或两倍来共同培养。对于荧光素酶活性,细胞在48小时之后在Fluoroskan Ascent FL光度计(Thermo Labsystems)中检测(BrightGlo Luciferase System;Promega)。对于每个试样,由非HIV-1脉冲的共同培养的或者由单独的报告CD4⁺细胞组成的基准值被减去。为了检测可能的脉冲细胞生产性感染或者反复感染情况,某些DC在0.5μM的蛋白酶抑制剂Saquinavir的存在下被共同培养。

[0380] 12.Siglec构建体的转染

[0381] Raji细胞(2×10^6)利用包含Siglec-1、Siglec-5或Siglec-7的编码区域的载体主干pCMV6-Entry(Origene)使用由制造商推荐的Amaxa核转染来转染。在转染36小时后,细胞对如上所述的VLP捕捉和HIV-1反式感染(比例为2:1)进行评估。当被指示的时候,细胞利用降低浓度的3'-唾液乳糖(Carbosynth)或乳糖(Sigma-Aldrich)在VLP脉冲之前预培养30分钟。在使用有缺陷包膜的病毒的试验中, 5×10^5 细胞利用100ng由ELISA评估的p24^{Gag}在37℃下脉冲4小时,并对如上所述的捕捉和反式感染(比例为2:1)进行评估。HEK-293T细胞使用Fugene HD(Promega)转染并根据对Raji细胞所进行的描述在转染24小时之后进行评估。在不同的光度计(Luminoskan Ascent,Thermo Labsystems)中测试HEK-293T的反式感染,并且所收集的数据被标准化至100%。评估两种细胞类型的转染效率均,利用抗Siglec-1-PE7-239mAb、抗Siglec-7-PE5-386mAb(AbD Serotec)和抗Siglec-5/14-PE1A5mAb(Biolegend)对细胞染色,并通过FACS进行评价。稳定的Raji DC-SIGN细胞利用抗DC-SIGN-PE DCN46mAb(BD Pharmigen)进行标记。

[0382] 13.统计学分析

[0383] 使用配对t检验(在 $p \leq 0.01$ 下认为是显著的)或者与GraphPad Prism v.5软件相关的Spearman进行统计。

[0384] 实施例1

[0385] 在HIV-1或囊胞膜的外部叶状结构中的神经节苷脂可以作用为产生mDC摄取的病毒附着因子

[0386] 鞘糖脂为在筏状质膜域是富集的,HIV-1被认为是由其出芽的。基于这种前提,对于mDC的HIV-1捕捉的鞘糖脂的潜在作用进行研究。GM3在衍生自T细胞系MT-4的HIV_{NL4.3}中的存在通过质谱分析来确定。此外,也检测了HIV-1膜中包括的GM1、GM2和GD1的数个其它神经节苷脂。参见图1A、1B和1C。

[0387] 为了测试在HIV-1或者囊胞膜的外部叶状结构中的神经节苷脂是否可以作用为产

生mDC摄取的病毒附着因子,模仿HIV-1 (LUV_{HIV-tRed}) 的大小和脂质组合物并包含不同的神经节苷脂的德克萨斯红 (Texas Red) (tRed) 标记的大单层囊泡 (LUV) 被制备。参见图6, Lorizate M,等,J.Biol.Chem.2009;284:22238-22247。所有的LUV显示出相等的荧光强度。参见图7。成熟的DC利用LUV_{HIV-tRed}或VLP在37℃下脉冲4小时,并且通过荧光激活细胞分选术 (FACS) 确定荧光细胞的百分比。荧光VLP_{HIV-Gag-eGFP}捕提高百分比的mDC。参见图1D。在CHO细胞系中产生的VLP通过mDC也被有效地捕捉。参见图8。摄取至mDC被进一步观察到,对于小鼠逆转录病毒MuLV来说,其被在先示出为还包含神经节苷脂。参见Chan R,等,J.Virol.2008;82:11228-11238。

[0388] 另一方面,对于包含HIV-1的主要脂质组分的LUV_{HIV-tRed}来说,未观察到明显的mDC摄取,但是缺乏神经节苷脂。参见图1D。对于包含神经酰胺 (Cer) ($P<0.0001$,配对t检验) 的LUV_{HIV-tRed}来说,mDC摄取保持为阴性的。参见图1D。当例如为GM3、GM2或GM1的单唾液酸神经节苷酯被结合至LUV中的时候其为完全不同的;mDC能够捕捉这些脂质体,其为与VLP_{HIV-Gag-eGFP}等效的。参见图1D。为了确保这种捕捉并不仅是由于带负电的神经节苷脂和mDC的表面电荷之间的静电相互作用,平行分析了包含带负电的磷脂酰丝氨酸 (PS) 的LUV_{HIV-tRed},并发现其对mDC捕捉为阴性的 ($P=0.0081$,配对t检验)。参见图1D。这些结果揭示了单唾液酸神经节苷脂通过mDC介导囊泡捕捉,并且碳水化合物端基是该过程中必不可少的。

[0389] 实施例2

[0390] 包含神经节苷脂的大单层囊泡和VLP利用共同入口结构进入至mDC内并在mDC内达到相同的区室

[0391] 为了确定包含神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}和VLP_{HIV-Gag-eGFP} (和HIV-1) 是共同入口结构到达mDC内,进行了数个竞争试验。成熟的DC利用减少量 的包含GM2的LUV_{HIV-tRed}和固定量的VLP_{HIV-Gag-eGFP}在37℃下脉冲4小时。在大量冲洗之后,通过FACS确定eGFP-和tRed-阳性细胞的百分比。包含GM2的LUV_{HIV-tRed}有效地竞争,对于以剂量依赖的方式摄取VLP_{HIV-Gag-eGFP}至mDC内来说 ($P<0.0001$,配对t检验)。参见图1E。对于包含Cer或缺少鞘糖脂的LUV_{HIV-tRed},没有观察到对于VLP摄取的竞争。因此,包含GM的LUV_{HIV-tRed}和VLP_{HIV-Gag-eGFP}使用共同入口结构进入至mDC内,其依赖于碳水化合物端基。

[0392] 然后,无论包含GM的LUV_{HIV-tRed}和VLP_{HIV-Gag-eGFP}是否到达相同的mDC内区室,均使用旋转式圆盘共焦显微镜来进行研究。之前,已描述了用于捕捉至mDC内的HIV-1的三种类型的形式:自由的、极化的或囊状隔间。参见Izquierdo-Useros N,等,J.Virol.2007;81:7559-7570。相同的形式对于包含GM的LUV_{HIV-tRed}和显示不同形式的mDC百分比也被观察到,相类似地无需考虑所使用的颗粒。由此,VLP_{HIV-Gag-eGFP}和包含GM的LUV_{HIV-tRed}不仅仅是为了内在化,还用mDC内类似的区室作交换。为了确定VLP_{HIV-Gag-eGFP}和包含GM的LUV_{HIV-tRed}是否被捕捉至相同的区室内,mDC在37℃下使用包含GM的LUV_{HIV-tRed}预培养3小时,并随后利用VLP_{HIV-Gag-eGFP}额外培养3小时。固定细胞的共聚焦显微镜揭示出VLP广泛地与包含GM的LUV_{HIV-tRed} (包含GM1、GM2或GM3) 在相同的细胞内区室中被共定位。参见图2。

[0393] 实施例3

[0394] 不会影响mDC捕捉的囊泡的横向脂质组织

[0395] 在HIV-1膜内,神经节苷脂被嵌合在液体有序膜中。参见Lorizate,2009和Chan,

2008, 上述。无论颗粒膜的液态次序或特定的脂质组合物(除了神经节苷脂)是否会影响mDC捕捉, 其均因此而被评价。已知神经节苷脂与胆固醇在脂质筏中的相互作用会影响神经节苷脂构造并作为细胞受体改变其活性。参见Lingwood D, 等, Nat. Chem. Biol. 2011; 7: 260-262, Simons K, 等, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011, Simons, 2000和Brown, 2000, 上述。成熟DC利用由具有或不具有不同的神经节苷脂的1-棕榈酰-2-油酰-sn-丙三基-3-胆碱磷酸(POPC)组成的LUV_{POPC-tRed}培养。参见图3A。与LUV_{HIV-tRed}相比, LUV_{POPC-tRed}具有液体无序膜结构。用于LUV_{POPC-tRed}的结果非常类似于具有有效捕捉的LUV_{HIV-tRed}, 如果存在GM1、GM2或GM3, 而对于包含Cer的LUV_{POPC-tRed}或者缺失神经节苷脂的LUV_{POPC-tRed}没有观察到摄取。参见图3A。此外, 显示出被捕捉至自由的、极化的或囊状的隔间内的颗粒的mDC百分比对于不同的颗粒也是非常相似的。参见图3B。这些结果示出包含神经节苷脂的LUV使用与VLP_{HIV-Gag-eGFP}相同的捕捉和导向通路, 而无需考虑它们的横向脂质组织, 并且所提供的是神经节苷脂自身为作为mDC捕捉的关键分子。

[0396] 实施例4

[0397] 具有位于碳水化合物端基不同位置上的多达三个唾液酸的复合神经节苷脂, 其分享mDC摄取的结构决定因素

[0398] 为了获得需要用于通过mDC有效识别的分子结构的进一步观察, 制备了携带更加复杂的神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}。这些LUV在碳水化合物极性端基上包括两个、三个和四个唾液酸基团(二-、三-和四-唾液酸神经节苷脂)。使用等量的包含具有两个或三个唾液酸(分别为GD1b和GT1b)的神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}脉冲的成熟DC, 通过与GM1-LUV_{HIV-tRed}相同的效率来捕捉这些颗粒。对于包含具有四个唾液酸(GQ1b)的神经节苷脂的LUV_{HIV-tRed}, 捕捉近乎完全地丧失。参见图4A。据此, 携带GD1b或GT1b的LUV_{HIV-tRed}对于利用VLP_{HIV-Gag-eGFP}的mDC摄取为有效的竞争, 而对于携带GQ1b, PS或Cer的LUV_{HIV-tRed}, 没有观察到竞争。参见图4B。这些结果表明复合位于碳水化合物端基不同位置上的具有多达三个唾液酸的神经节苷脂对于mDC摄取来说分享共同的结构决定因素。

[0399] 包含Cer的LUV的阴性表型表明碳水化合物端基对于mDC捕捉是特别需要的。唾液酸已被在先确定为用于特定病毒的细胞受体。参见Weis W, 等, Nature 1988; 333: 426-431。其对于mDC捕捉的重要性由此被测试。通过相等浓度的包含Cer, GM1或不具有唾液酸基团的GM1(缺乏唾液酸基的GM1)的LUV_{HIV-tRed}对mDC的培养揭示了唾液酸依赖性的捕捉。参见图5A。此外, 包含GM3的LUV_{HIV-tRed}和VLP_{HIV-Gag-eGFP}的原位神经氨酸酶处理显著地降低了通过mDC的颗粒捕捉。参见图5B。由此, 神经节苷脂中的唾液酸部分对通过mDC的特定识别是必需的。制备包含GM4(缺乏GM3的葡萄糖部分)或GalCer(缺少GM3的葡萄糖和唾液酸部分)的LUV_{HIV-tRed}以评价碳水化合物端基的其它组分的贡献。参见图5C。使用包含GM4或GalCer的LUV_{HIV-tRed}培养的成熟DC仅显示出脂质体捕捉的背景水平, 表明神经鞘脂的葡萄糖部分对于DC捕捉来说也是必需的。参见图5C。

[0400] 实施例5

[0401] 可溶碳水化合物与通过mDC的HIV-1分子识别的竞争

[0402] 如果碳水化合物部分构成用于HIV-1捕捉的分子识别决定因素, 那么可溶碳水化合物就应当竞争VLP和LUV摄取。包含GM3的LUV_{HIV-tRed}或VLP_{HIV-Gag-eGFP}通过mDC的捕捉在存在可溶GM3的情况下被完全阻断, 同时相等浓度的乳糖(缺少唾液酸基团)没有作用。参见图

5D。总的来说,这些数据清楚地示出神经节苷脂的唾液乳糖部分为用于有效的HIV-1识别和通过mDC的捕捉所需要的分子决定因素。在图5D中竞争所需要的高浓度的可溶GM3与LUV中低浓度的神经节苷脂相比较(约小于1000倍;图1C),表明唾液乳糖至膜内Cer的附着提供了更好的结合亲和性。此外,Cer自身的亲水性部分为识别域的一部分,直接提高了与mDC的结合亲和性。

[0403] 为了进一步理解识别域的结构决定因素,构建所测试的神经节苷脂的能量最小化的3D模型。参见图5e。这些模型表明唾液乳糖存在于GM1、GM2、GM3、GD1b和GT1b,但是在GM4和缺乏唾液酸基的GM1中不存在。参 见图6。

[0404] 实施例6

[0405] 表达Siglec-1的细胞可以有效地捕捉VLP_{HIV-Gag-eGFP}

[0406] 缺少Siglec-1的内源性表达并可在没有非特定上调Siglec-1的情况下被有效地转染的Raji B细胞系,可用于转染。Raji B细胞系中的Siglec-1表达载体的转染显著地提高了VLP_{HIV-Gag-eGFP}在Siglec-1阳性细胞群中的捕捉,并且这种作用通过抗Siglec-1mAb7D2的预处理而被消除($p=0.0005$;图9)。在Siglec-1转染细胞的Siglec-1阴性群体中或者Siglec-5或Siglec-7表达质粒的随后转染中没有观察到提高的捕捉(图9)。利用唾液乳糖的预培养也阻碍了VLP在Siglec-1转染的Raji细胞中的捕捉(图10)。抗Siglec-1mAb7D2的滴定显示了VLP捕捉的剂量依赖抑制(图11)。mAb7D2调节抑制的特异性通过利用不同的Siglec蛋白质对这种mAb的预培养被确定。利用纯化的Siglec-1的预培养完全恢复了VLP捕捉,而利用纯化的Siglec-7,-5/14或CD83的预培养却没有效果(图12)。尽管通过7D2mAb的抗原决定部位识别可能不会构成实际病毒结合部位,因为7D2Fab片段不会导致VLP捕捉的阻碍,利用7-239进行滴定,不同的 α -Siglec-1mAb确定VLP捕捉的剂量依赖抑制(图13A)。

[0407] 实施例7

[0408] 沉默Siglec-1导致通过DC捕捉VLP_{HIV-Gag-eGFP}的下降

[0409] 为了证明在HIV-1捕捉和转染过程中Siglec-1的至关重要的作用,实施补充的试验方案:RNA干扰以降低在LPS mDC中Siglec-1的表达水平,并转染Siglec-1至缺少这种受体的细胞内。在这种方法中,对于不同的shRNA具有慢病毒颗粒编码的DC通过与vpx表达的慢病毒的同时感染被转导,从而反作用限制因子SAMHD1并促进DC有效感染。两种不同的Siglec1特异性shRNA的转导,而不是非靶向shRNA控制,会导致Siglec-1表面表达的急剧减少以及VLP_{HIV-Gag-eGFP}捕捉的同时降低(图14)。

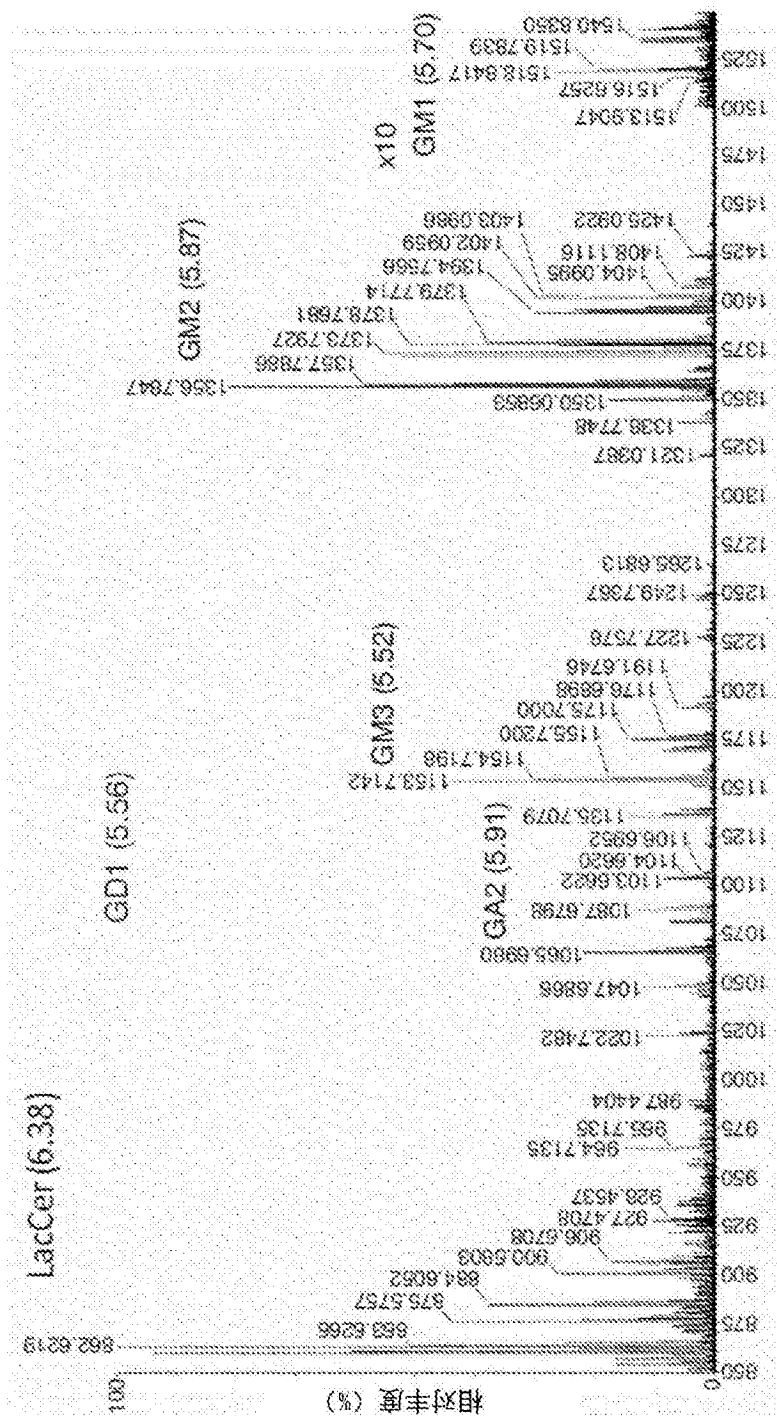


图1A

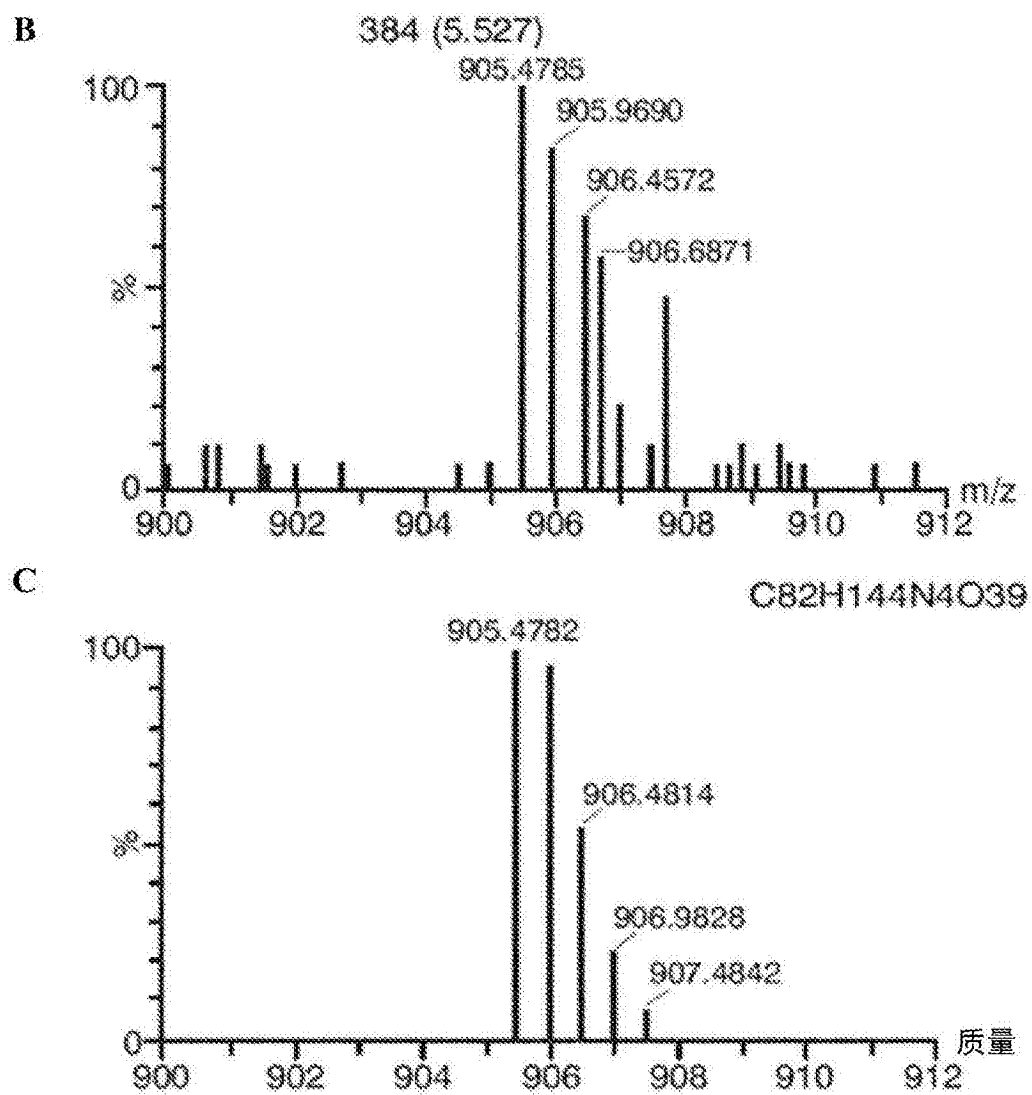


图1 (续)

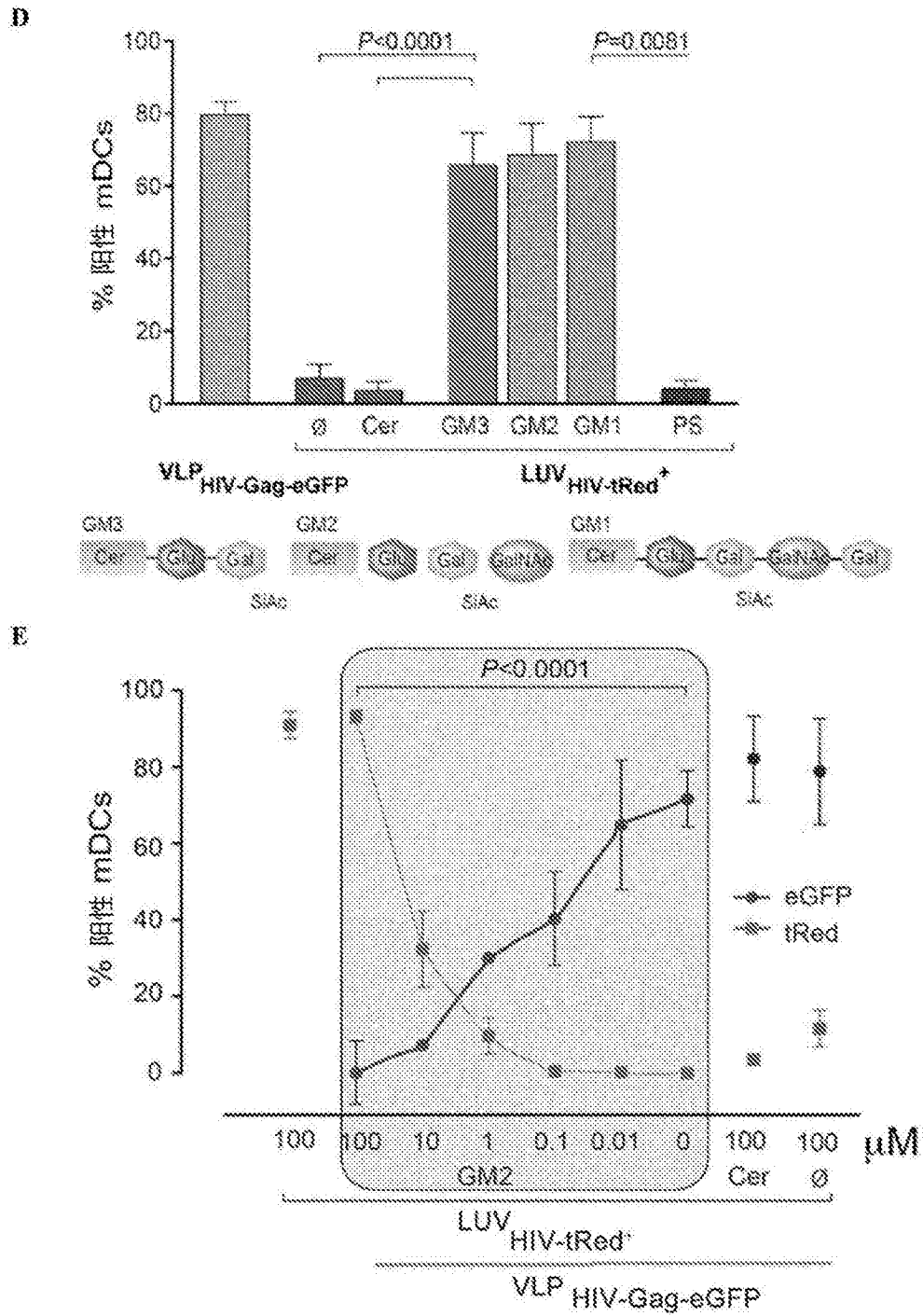


图1 (续)

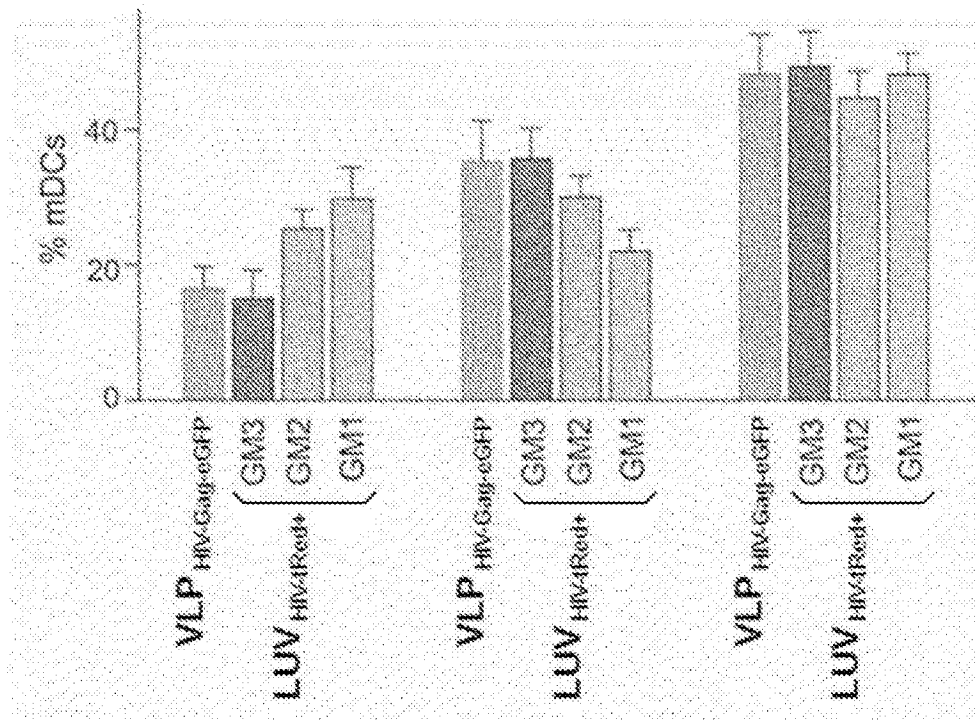


图2A

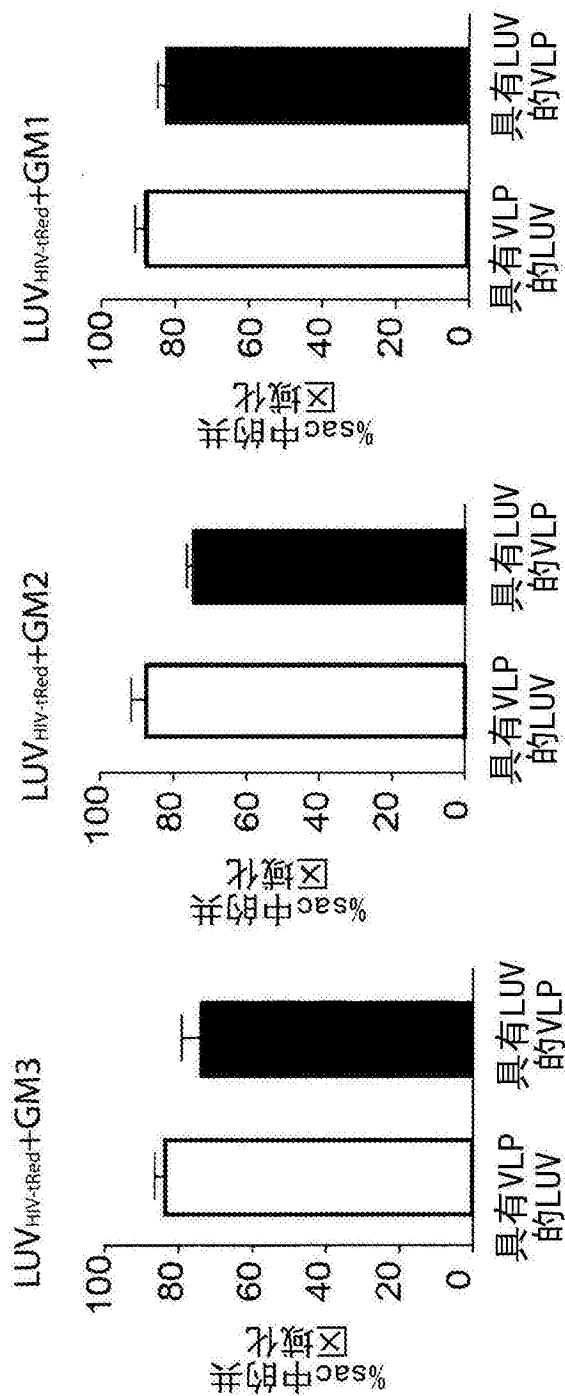


图2B

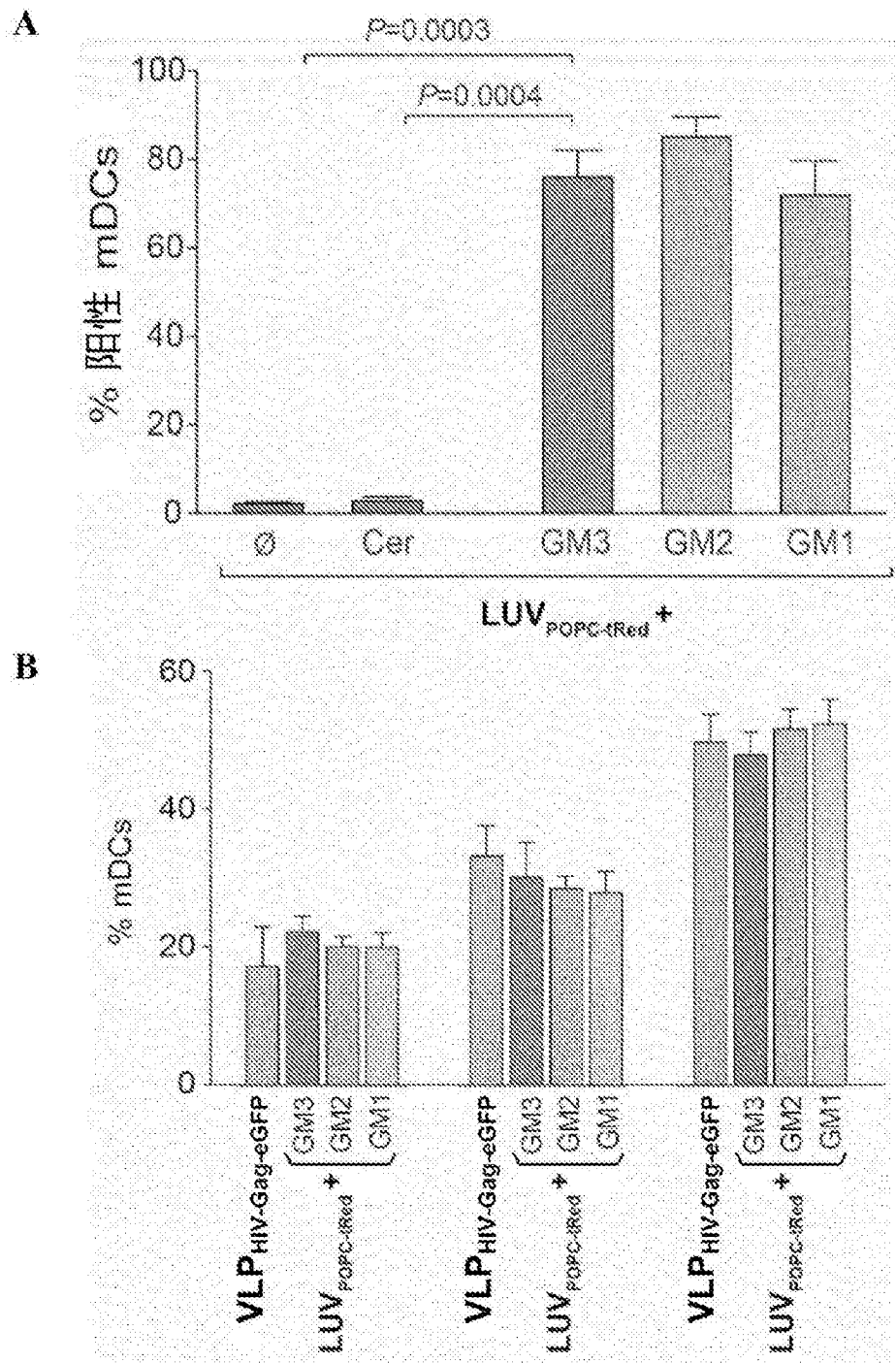


图3

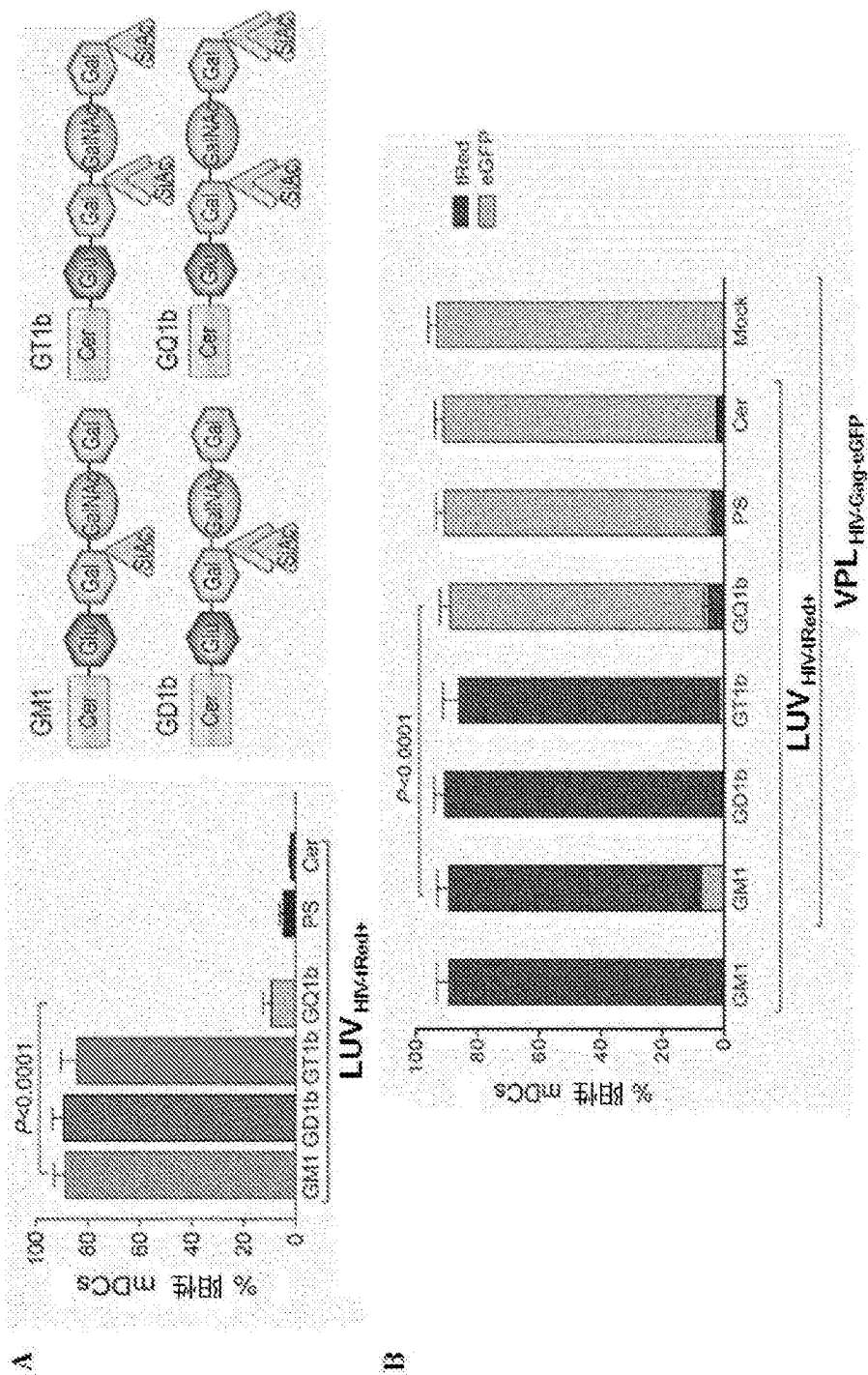


图4

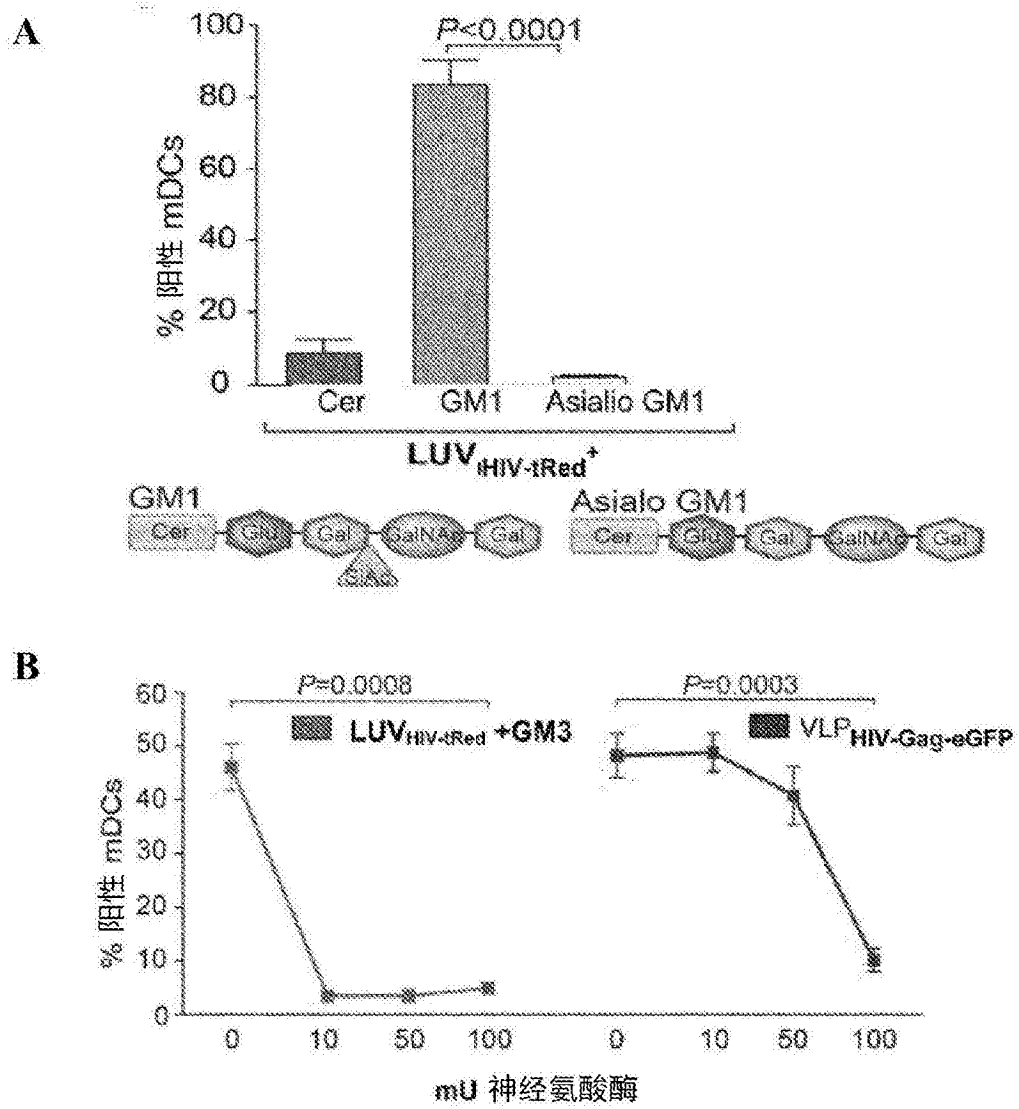


图5(续)

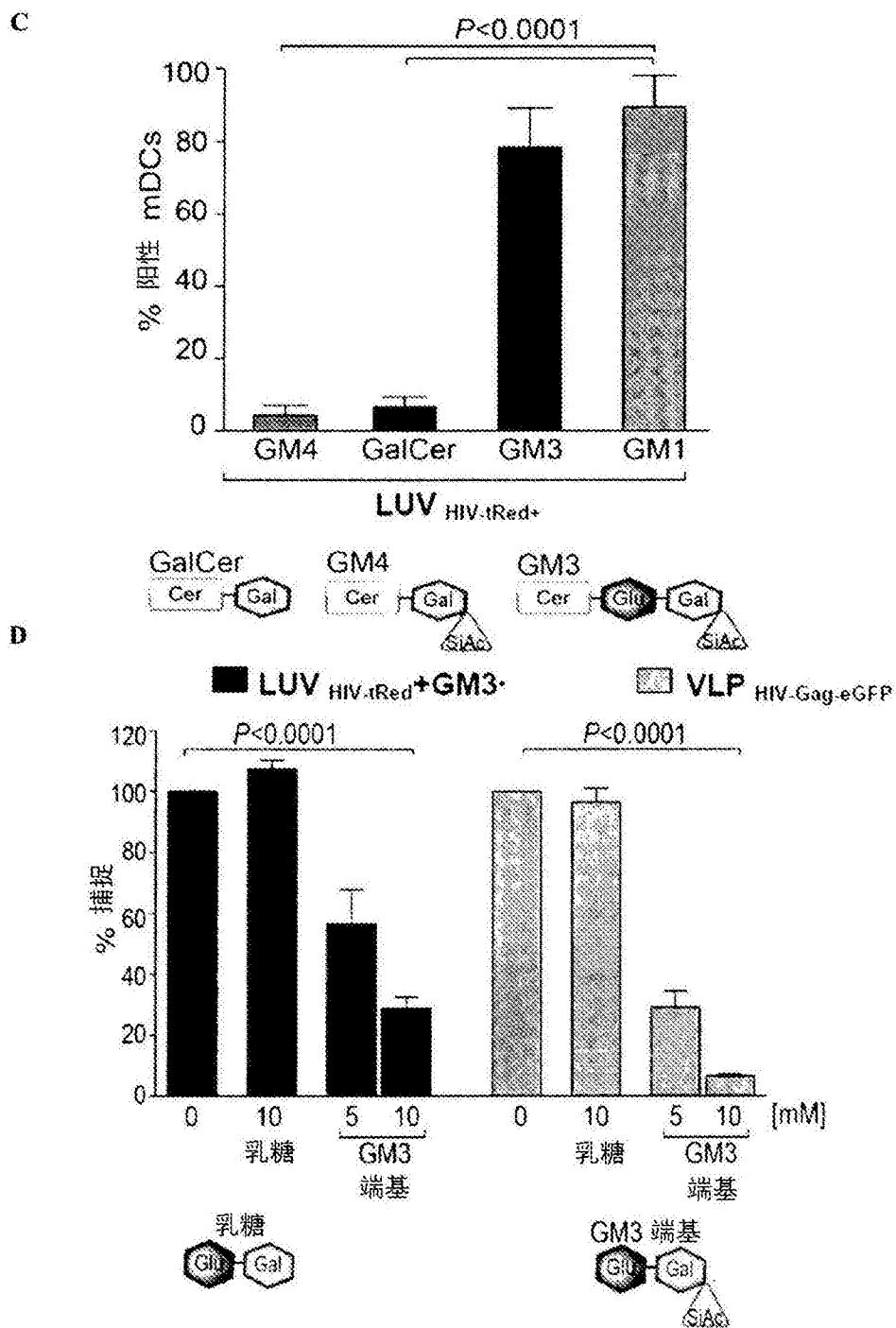


图5(续)

对图5E的任何引用应被认为不存在

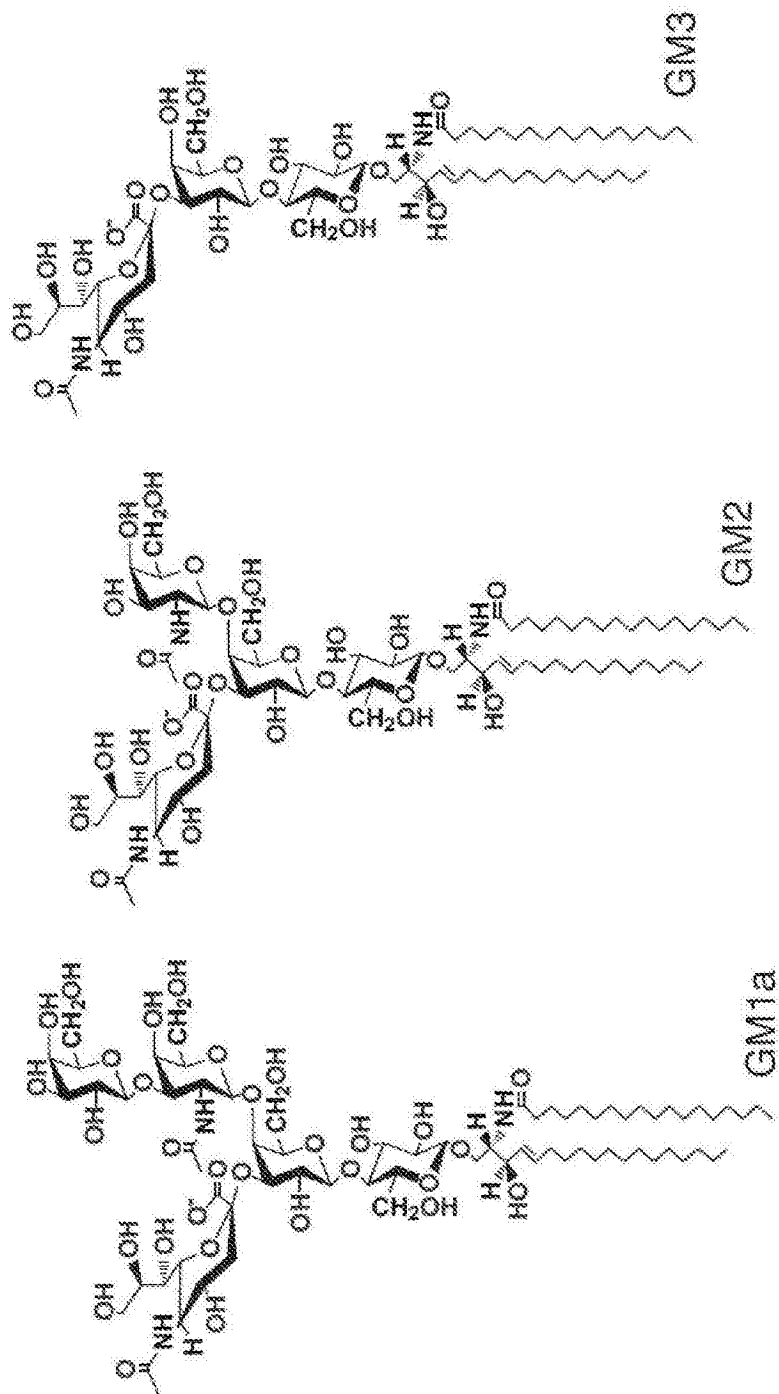


图6

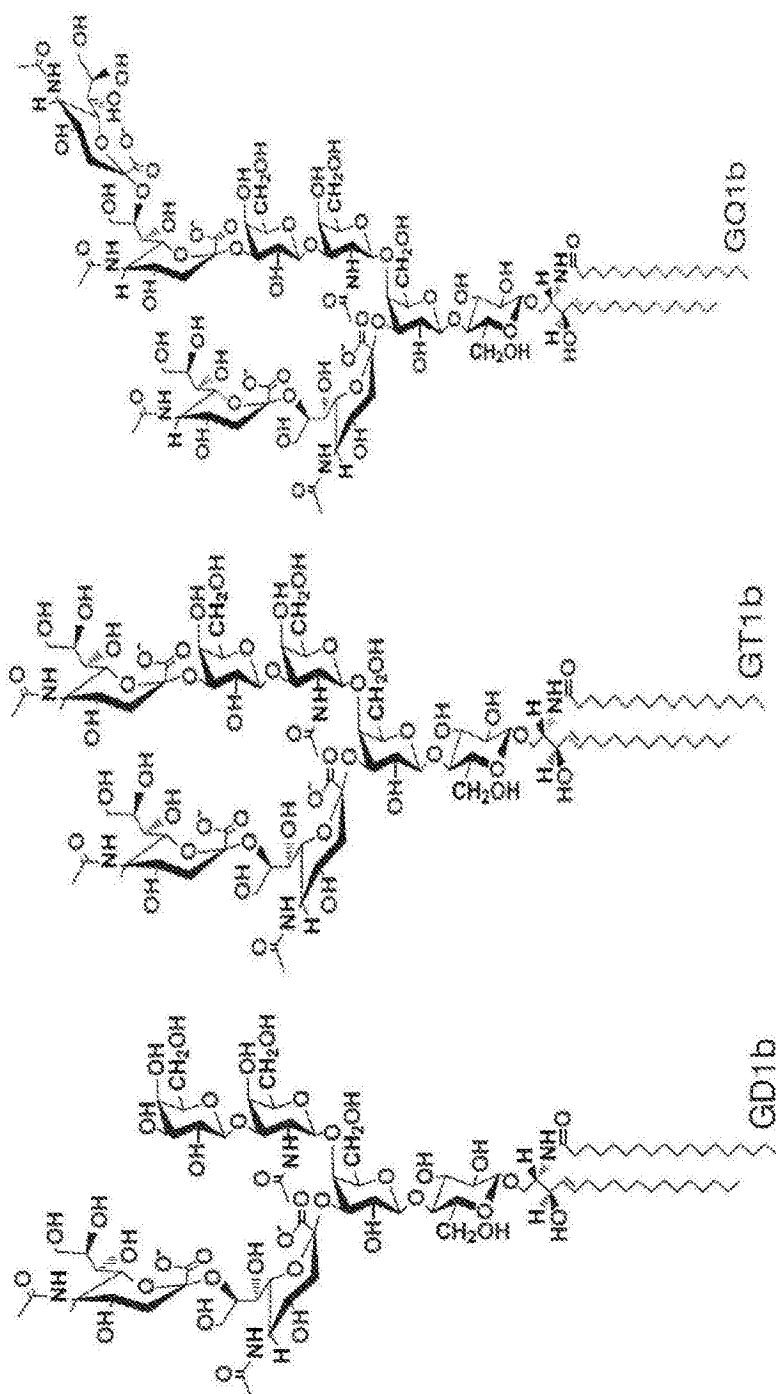


图6(续)

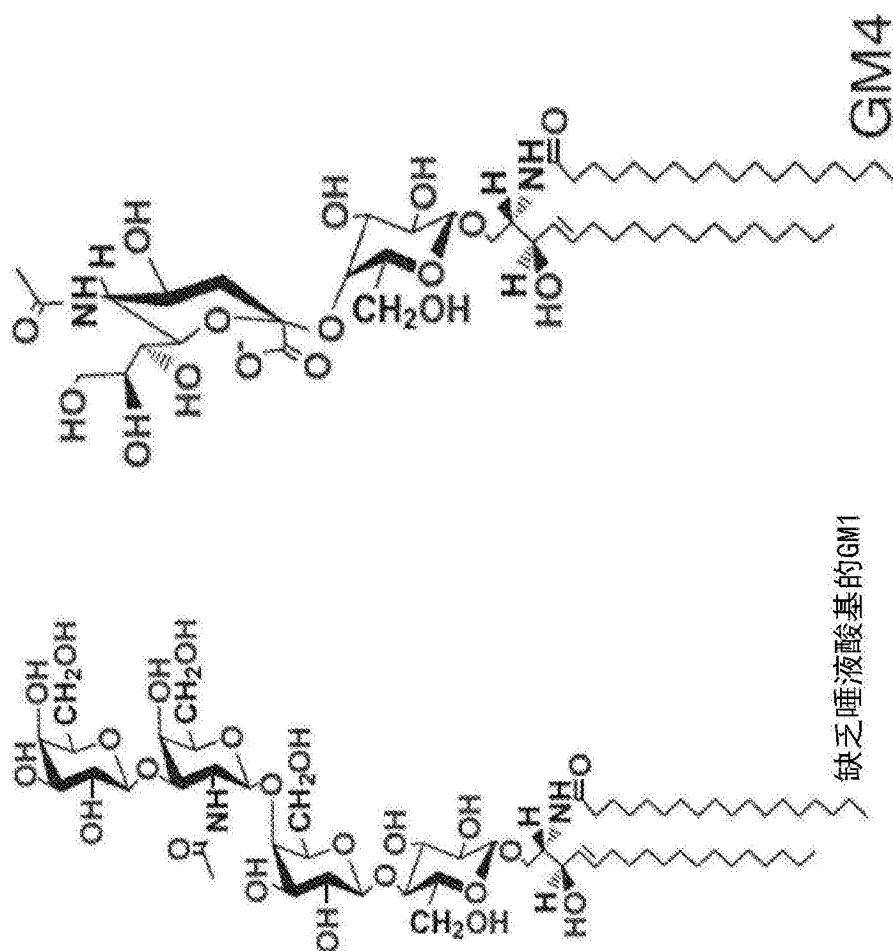


图6 (续)

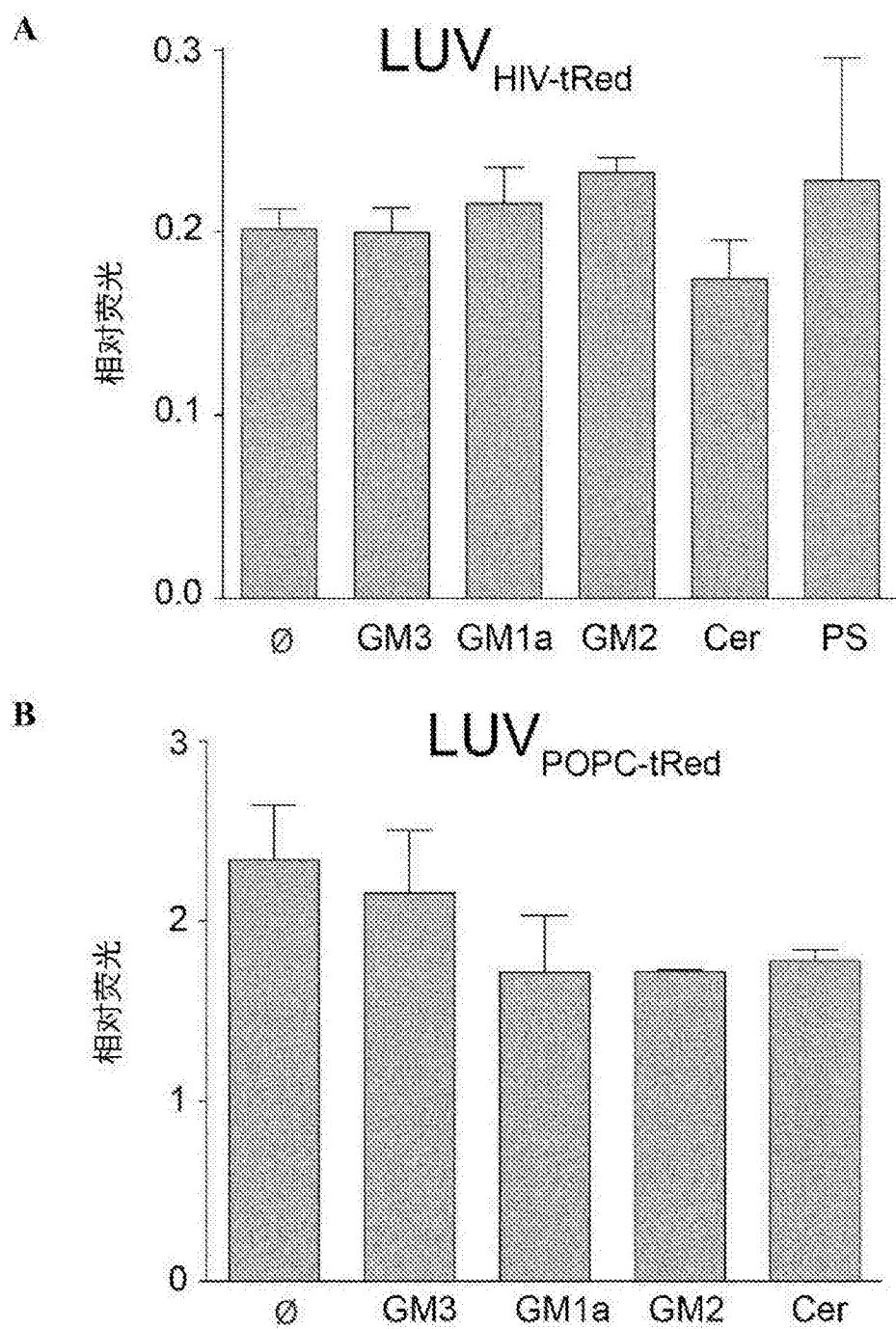


图7

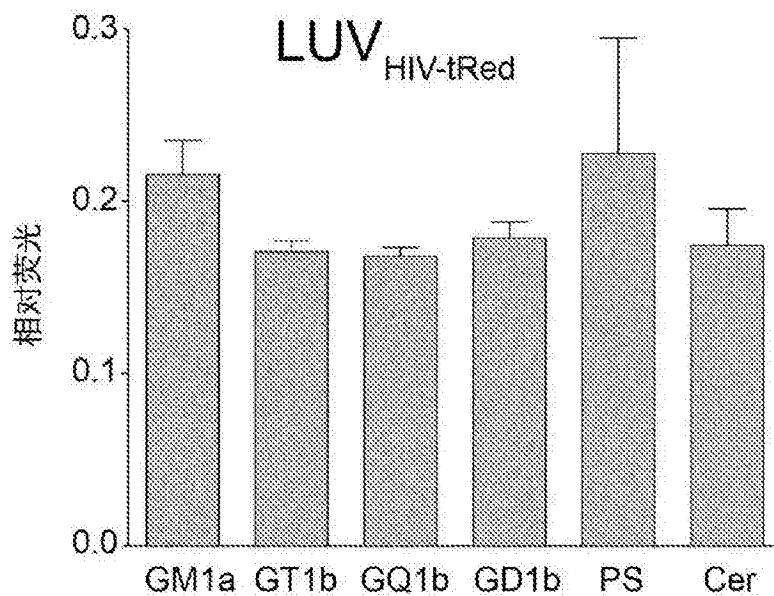
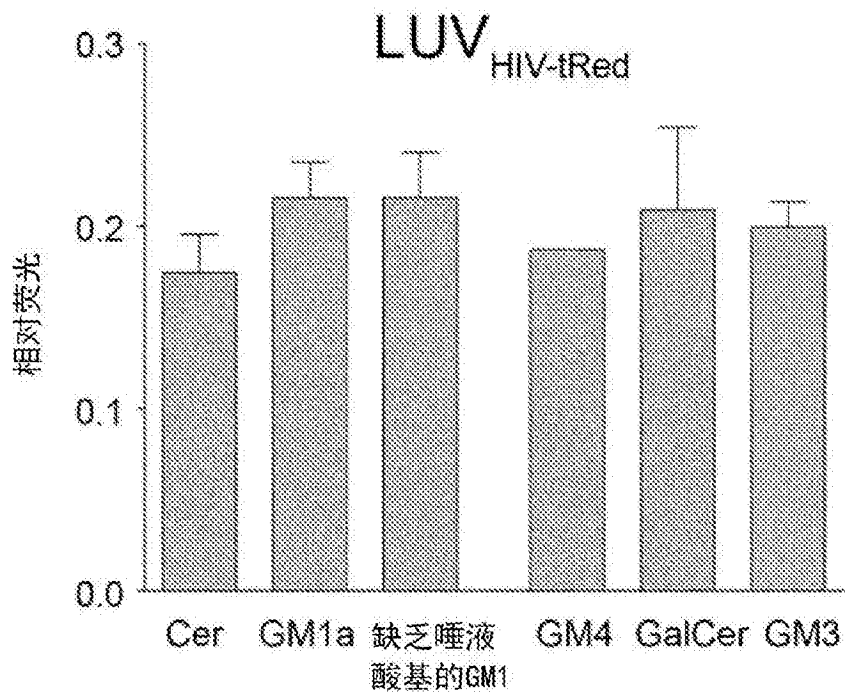
C**D**

图7(续)

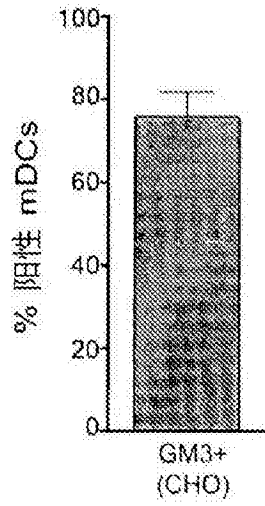


图8

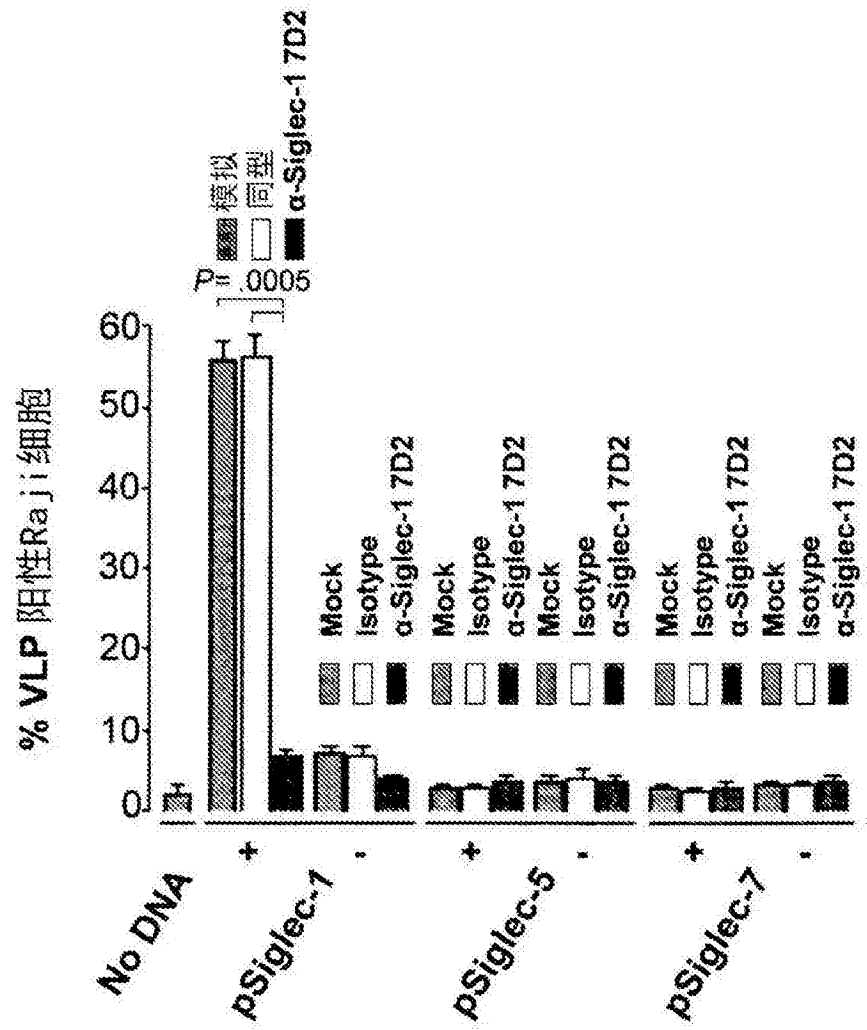


图9

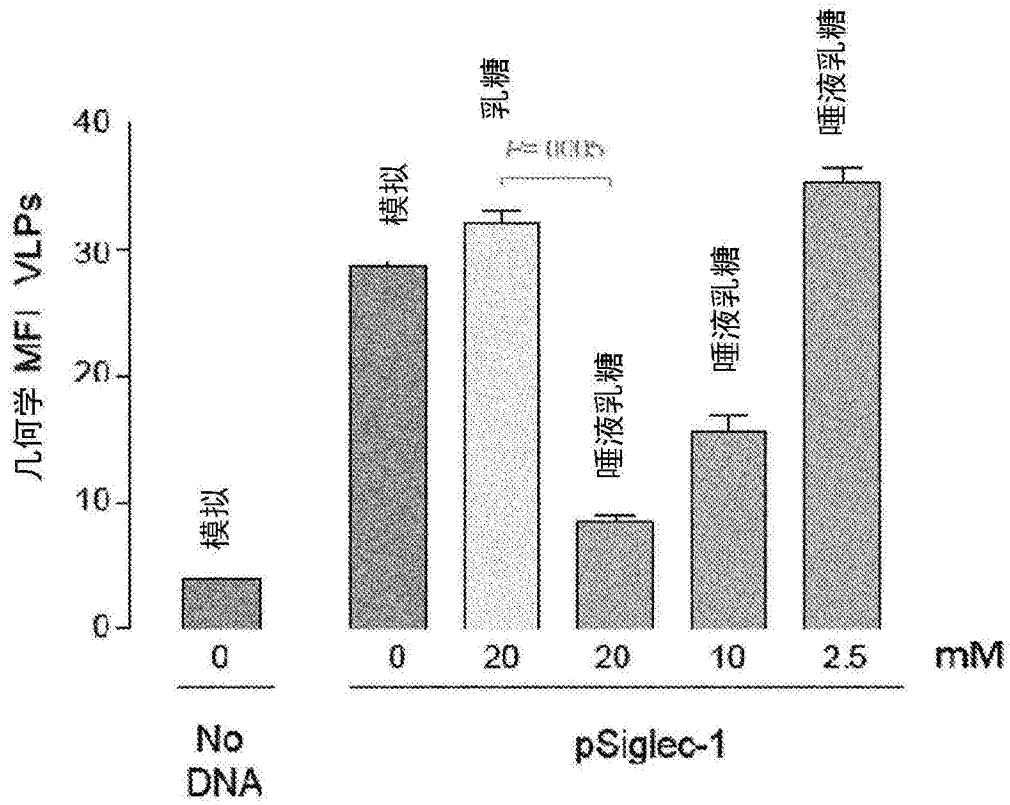


图10

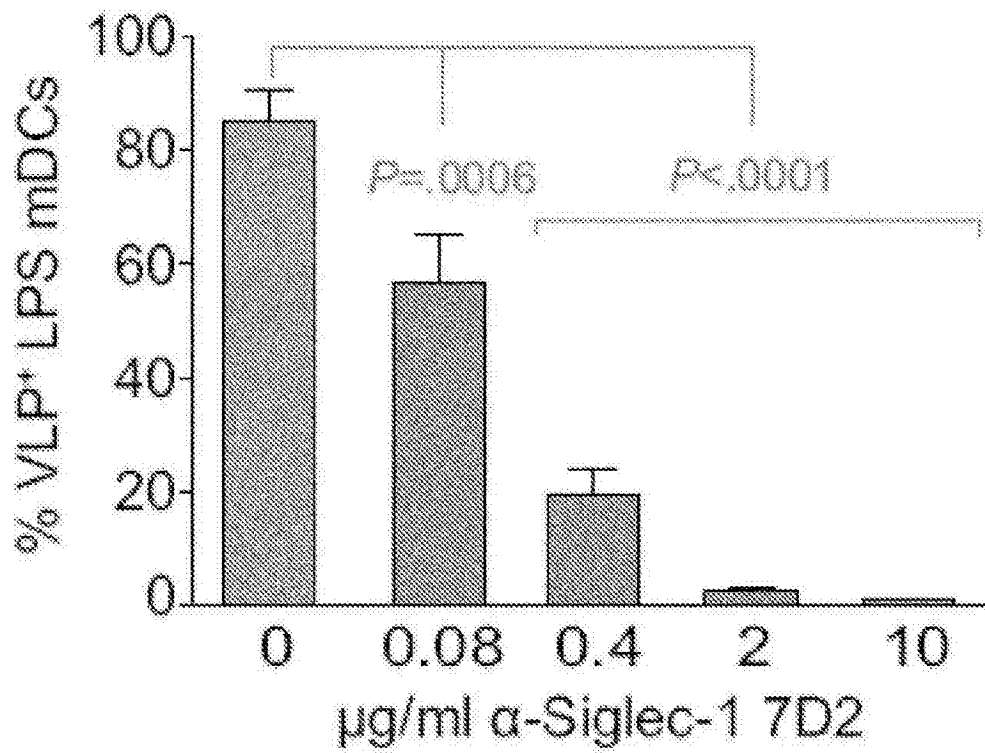


图11

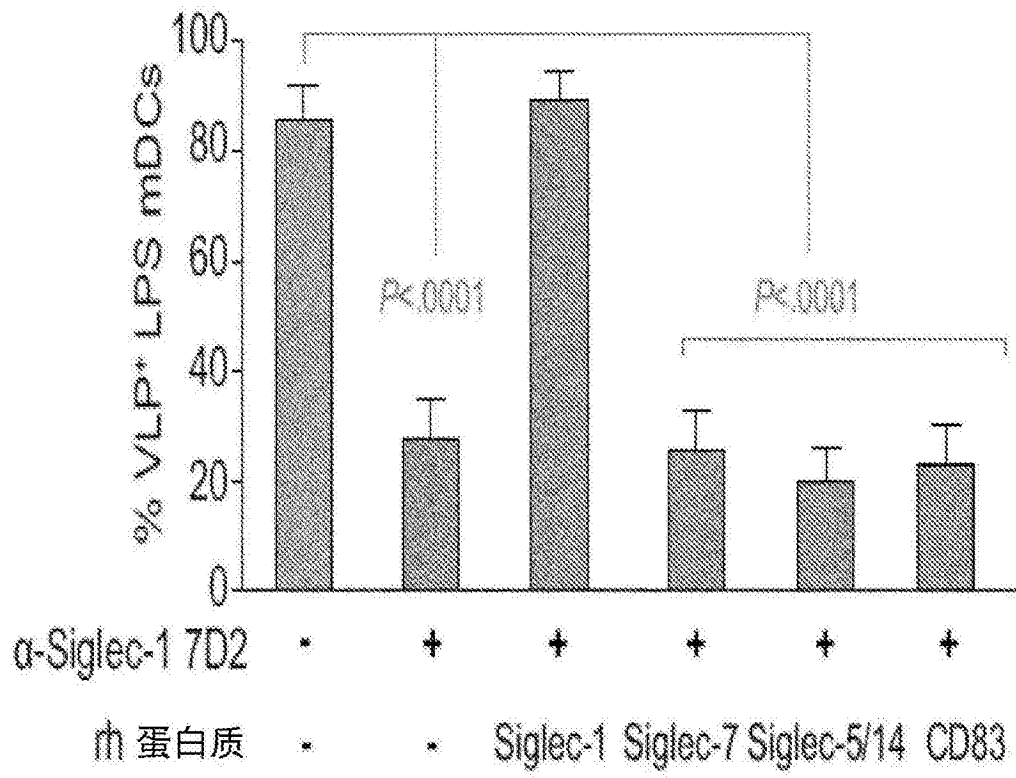


图12

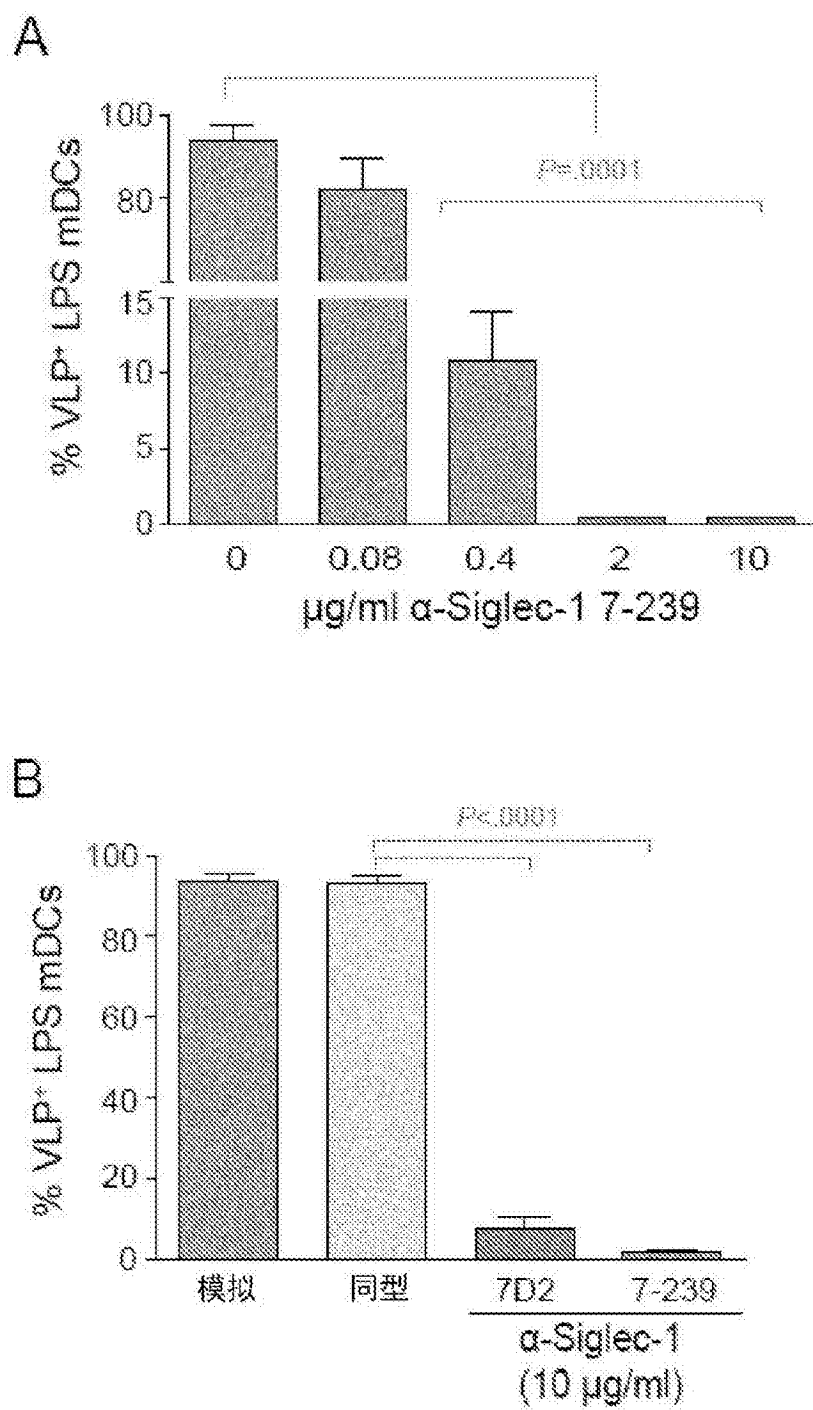


图13

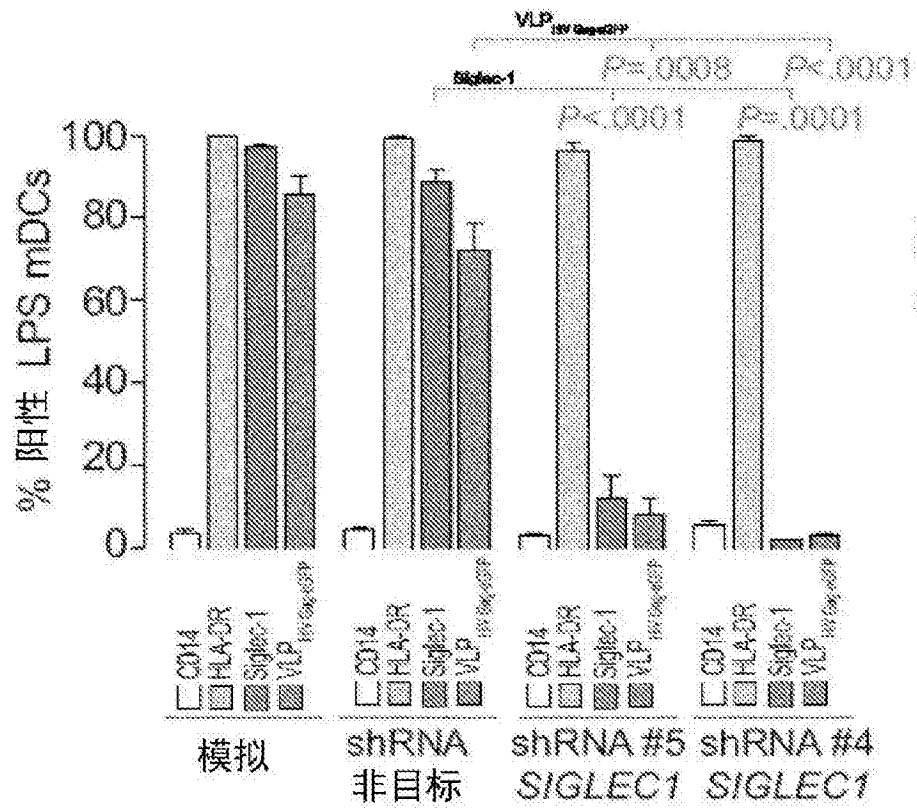


图14