



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118667885 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202410980017.1

(22) 申请日 2019.05.03

(30) 优先权数据

62/666,355 2018.05.03 US

(62) 分案原申请数据

201980030083.X 2019.05.03

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国

申请人 约翰·霍普金斯大学

(72) 发明人 何有文 孙合强 T·奥古斯特

刘钧 韦亚东

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 刘晓东

(51) Int.Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书41页  
序列表(电子公布) 附图42页

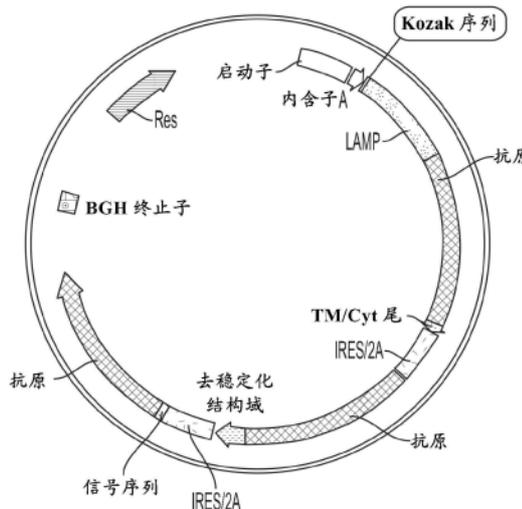
(54) 发明名称

用于增强的抗原特异性疫苗接种的疫苗组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了疫苗设计,多顺反子疫苗构建体,组合物和方法,包含核酸(DNA, RNA),肽,蛋白质及其衍生物,包括细胞和细胞系,用于增强的抗原特异性疫苗接种。

DNA 疫苗构建体示意图



1. 一种用于表达靶抗原以引发增强的抗原特异性T细胞应答的核酸载体,所述载体编码包含所述靶抗原和去稳定化结构域(D.D.)的融合多肽,其中所述D.D.是人FKBP12的去稳定化突变体。

2. 根据权利要求1所述的核酸载体,其中所述融合多肽进一步包含LAMP结构域。

3. 根据权利要求1所述的核酸载体,其中所述靶抗原衍生自病原体、人自身蛋白、肿瘤抗原或恶性肿瘤。

4. 根据权利要求3所述的核酸载体,其中所述靶抗原是巨细胞病毒(CMV)pp65。

5. 根据权利要求1所述的核酸载体,其中所述融合多肽进一步包含信号序列(s.s.)。

6. 根据权利要求1所述的核酸载体,其中所述核酸载体包含DNA构建体、RNA构建体或其任何组合。

7. 根据权利要求3所述的核酸载体,其中所述肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原或新抗原。

8. 根据权利要求3所述的核酸载体,其中所述靶抗原是选自下述的肿瘤抗原:5T4、AIM2、AKAP4 2、Art-4、Aura A1 (AURKA)、Aura B1 (AURKB)、BAGE、BCAN、B-细胞周期蛋白、BSG、CCND1、CD133、CDC45L、CDCA1 (TTK)、CEA、CHI3L2 (几丁质酶3样蛋白2)、CSPG4、EpCAM 4、Epha2、EPHX1、Ezh2、FABP7、Fos11 (Fra-1)、GAGE、GalT-3、G250 (CA9)、gBK、glast、GnT-V、gp100 (人gp100)、HB-EGF、HER2、HNPRL、HO-1、hTERT、IGF2BP3、IL13-Ra2、IMP-3、IQGAP1、ITGAV、KIF1C、KIF20A、KIF21B、KIF3C、KK-LC-1、LAGE-1、Lck、LRRC8A、MAGE-1 (MAGEA1)、MAGE-2 (MAGEA2B)、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-C1 (CT7)、MAGE-C2、MAGE-C3、Mart-1、MELK、MRP3、MUC1、NAPSA、NLGN4X、Nrcam、NY-ESO-1 (CTAG1B)、NY-SAR-35、OFA/iLRP、PCNA、PIK3R1、Prame、PRKDC、PTH-rP、PTPRZ1、PTTG1 2、PRKDC、RAN、RGS1、RGS5、RHAMM (RHAMM-3R)、RPL19、Sart-1、Sart-2、Sart-3、SEC61G、SGT-1、SOX2、Sox10、Sox11、SP17、SPANX-B、SQSTM1、SSX-2、STAT1、STAT3、生存素、TARA、TNC、Trag-3、TRP-1、TRP2、酪氨酸酶、URLC10 (LY6K)、Ube2V、WT1、XAGE-1b (GAGED2a)、YKL-40 (CHI3L1)、ACRBP、SCP-1、SSX-1、SSX-4、NY-TLU-57、CAIX、Brachyury、NY-BR-1、ErbB、间皮素、EGFRvIII、IL-13Ra2、MSLN、GPC3、FR、PSMA、GD2、L1-CAM、VEGFR1、VEGFR2、KOC1、OFA、SL-701、突变体P53、DEPDC1、MPHOSPH1、ONT-10、GD2L、GD3L、TF、PAP、BRCA1、DLC1、XPO1、HIF1A、ADAM2、CALR3、SAGE1、SCP-1、ppMAPkkk、WHSC、突变体Ras、COX1、COX2、FOXP3、IDO1、IDO2、TDO、PDL1、PDL2和PGE2。

9. 根据权利要求8所述的核酸载体,其中所述肿瘤抗原是人gp100肿瘤相关抗原。

10. 根据权利要求3所述的核酸载体,其中衍生自病原体的所述靶抗原是病毒病原体。

11. 根据权利要求10所述的核酸载体,其中所述病毒病原体选自流感病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、登革热病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)。

12. 根据权利要求1所述的核酸载体,其中所述人FKBP12的去稳定化突变体包含选自下述的FKBP12突变:F15S、V24A、L30P、E60G、M66T、R71G、D100N、E102G、K105I、E107G、L106P及其任何突变或组合。

13. 根据权利要求12所述的核酸载体,其中FKBP12的去稳定化突变体包括L106P突变。

14. 一种疫苗组合物,其包含根据权利要求1-13中任一项所述的核酸载体。

15. 根据权利要求14所述的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物进一步包含:

(a) 编码包含所述靶抗原和溶酶体相关膜蛋白 (LAMP) 结构域的融合多肽的核酸载体；  
和/或

(b) 编码包含所述靶抗原和信号序列 (s.s.) 的融合多肽的核酸载体。

16. 根据权利要求14所述的疫苗组合物, 其中人FKBP12的去稳定化突变体包括选自下述的FKBP12突变: F15S、V24A、L30P、E60G、M66T、R71G、D100N、E102G、K105I、E107G、L106P, 及其任何突变或组合。

17. 一种调节受试者中免疫应答的方法, 其中包括施用根据权利要求14-16中任一项所述的疫苗组合物。

18. 一种在受试者中引发增强的抗原特异性疫苗接种的方法, 其中包括施用根据权利要求14-16中任一项所述的疫苗组合物。

## 用于增强的抗原特异性疫苗接种的疫苗组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2019年5月3日、发明名称为“用于增强的抗原特异性疫苗接种的疫苗组合物和方法”的中国发明专利申请No.201980030083.X的分案申请。

[0002] 交叉引用的申请

[0003] 本申请要求于2018年5月3日提交的美国临时申请号62/666,355的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含序列表,该序列表已经通过EFS-Web以ASCII格式提交,并且通过引用将其全部内容并入本文。所述ASCII副本于2019年5月1日创建,名为D1181200W0\_Sequence\_Listing,大小为52KB(52,000字节)。

### 技术领域

[0006] 本发明总体上涉及设计成用于增强的抗原特异性疫苗接种的疫苗设计、多顺反子疫苗构建体、疫苗组合物及其使用方法。前述多顺反子疫苗构建体,疫苗组合物和方法还涉及用于复制或表达所述核酸构建体或用于疫苗递送的相关细胞和细胞系。

### 背景技术

[0007] 核酸疫苗是用于预防和治疗感染性疾病以及诸如癌症,过敏,自身免疫性疾病和药物依赖性之类的病症的新兴替代品。这些疫苗在已免疫(已接种)的受试者体内诱导编码的抗原性/治疗性蛋白质或肽(例如,衍生自病原体,人自身蛋白或恶性肿瘤)的表达,并引发适应性免疫应答,包括体液和细胞免疫应答,以及激活先天免疫应答。

[0008] 就安全性,易于制造和稳定性而言,核酸疫苗提供了优于常规疫苗的独特优势。然而,核酸疫苗的普遍挑战是其免疫原性差,因此缺乏效力和临床功效。因此,需要开发设计成具有改进的免疫原性的核酸疫苗及其使用方法,以提供有效的抗原特异性免疫。

[0009] 其他当前形式的疫苗(包括减毒的病原体,蛋白质和肽疫苗)的免疫原性需要进一步改善。例如,目前的乙型肝炎疫苗(HBV)在健康人群中的保护率约为80%,目前的流感疫苗其功效据报道为10%至60%。

[0010] 如本文所讨论,本发明的方面通过提供尤其是多顺反子疫苗构建体(DNA, RNA, 蛋白质, 肽),核酸疫苗组合物/制剂,肽或蛋白质疫苗组合物以及其使用方法,以同时引发适应性免疫应答的三个方面(CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T淋巴细胞(CTL), CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞(HTL)和抗体)的增强激活来解决上述挑战和未满足的需求。特别地,本发明提供的多顺反子疫苗构建体表达至少一种靶抗原,并包含可操作地连接至单个启动子的多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码包含靶抗原和至少一个决定所述抗原的加工和呈递的特定结构域的框内融合蛋白的修饰的靶抗原。在某些实施方式中,所述结构域包含去稳定化结构域(D.D.),溶酶体相关膜蛋白(LAMP)结构域和信号序列(s.s.)。此外,本发明提供了DNA和RNA构建体及其使用方法,以增强由树突细胞(DC)疫苗和其他细胞疫苗(例如外周血单核细胞(PBMC),红细胞,B淋巴细胞, $\gamma$   $\delta$ T淋巴细胞,单核细胞和朗格汉斯细胞作为特定抗原的细胞

载体)诱导的表达。

## 发明内容

[0011] 本发明提供了用于表达至少一种靶抗原的多顺反子疫苗构建体,该构建体包含与单个启动子可操作地连接的多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码修饰的靶抗原,所述修饰的靶抗原包含该靶抗原和选自去稳定化结构域(D.D.)、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)结构域和信号序列(s.s.)的至少一个特定结构域的框内融合蛋白。在某些实施方式中,所述多顺反子疫苗构建体还包含对应于5'非翻译区(5'UTR)、包括poly A尾的3'非翻译区(3'UTR)、以及任选地包含由小环状序列分隔的两个互补单链RNA序列的末端免疫-增强(IE)序列的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述IE序列包含跨越50-5000个碱基对的3'-末端双链RNA。在特定的实施方式中,所述双链RNA包含polyG:C或polyA:U。在某些实施方式中,所述双链RNA是包含A、U、G和C的组的随机序列,其中所述随机序列被优化为与任何内源哺乳动物RNA序列没有或几乎没有序列相似性。在某些实施方式中,所述启动子是哺乳动物启动子,病毒启动子,T3启动子,T7启动子或SP6启动子。在某些实施方式中,在本文所述的任何多顺反子疫苗构建体中,所述靶抗原衍生自病原体,人自身蛋白,肿瘤抗原或其任意组合。在特定的实施方式中,所述肿瘤抗原包含肿瘤特异性抗原,肿瘤相关抗原或新抗原。在某些实施方式中,所述肿瘤抗原选自本文所述的任何肿瘤抗原。在特定的实施方式中,所述肿瘤抗原包含含有人gp100的肿瘤相关抗原。在某些实施方式中,所述靶抗原包含病毒病原体。在特定的实施方式中,所述病毒病原体选自流感病毒,人乳头瘤病毒(HPV),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV),登革热病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)。在特定的实施方式中,在本文所述的任何多顺反子疫苗构建体中,所述独立的顺反子通过一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)或基于框内2A自剪切肽的切割位点而可操作地连接。在特定的实施方式中,所述IRES包含衍生自脑心肌炎病毒的核酸序列。在某些实施方式中,在本文所述的任何多顺反子疫苗构建体中,所述至少一个特定结构域在N末端、C末端或在N末端和C末端与所述靶抗原融合。

[0012] 在某些实施方式中,本文所述的任何多顺反子疫苗构建体包含至少两个独立的顺反子。在特定的实施方式中,所述独立的顺反子之一编码包含D.D.结构域的修饰的靶抗原,另一个独立的顺反子编码包含LAMP结构域的修饰的靶抗原。在特定的实施方式中,所述独立的顺反子之一编码包含D.D.结构域的修饰的靶抗原,另一个独立的顺反子编码包含s.s.结构域的修饰的靶抗原。在某些实施方式中,所述D.D.结构域包含经历蛋白酶体介导的降解的野生型人蛋白,突变人蛋白,细菌蛋白,病毒蛋白或其任何变体/衍生物。在某些实施方式中,所述D.D.结构域包含去稳定化序列,该去稳定化序列是从来自内源蛋白突变体库的筛选测定中鉴定的。在特定的实施方式中,所述去稳定化突变体选自人FKBP12,F15S,V24A,L30P,E60G,M66T,R71G,D100N,E102G,K105I,E107G,L106P以及其任何突变或组合。在特定的实施方式中,所述D.D.结构域包含细胞周期蛋白A,细胞周期蛋白C,细胞周期蛋白D或细胞周期蛋白E。在特定的实施方式中,所述D.D.结构域包含I $\kappa$ B,其中所述I $\kappa$ B在被表面信号激活后经历磷酸化依赖性多泛素化和蛋白酶体介导的降解。在某些实施方式中,所述蛋白酶体介导的降解是配体诱导的。在某些实施方式中,所述人蛋白(其包含D.D.结构域)是小分子配体的已知受体,并且其中所述配体与和E3泛素连接酶或衔接蛋白相互作用以诱导蛋

白酶体介导的降解的化合物缀合。在特定的实施方式中,所述衔接蛋白是cereblon,与所述配体缀合的化合物是沙利度胺,泊马度胺,来那度胺或结构相关的化合物。在特定的实施方式中,所述E3泛素连接酶是VHL,要缀合至所述配体的化合物是结合VHL的小分子。在某些实施方式中,本文所述的任何多顺反子疫苗构建体包含三个独立的顺反子。在特定的实施方式中,所述第一独立的顺反子编码包含LAMP结构域的修饰的靶抗原,第二独立的顺反子编码包含D.D.结构域的修饰的靶抗原,第三独立的顺反子编码包含s.s.结构域的修饰的靶抗原。

[0013] 在某些实施方式中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含本文所述的任何多顺反子疫苗构建体。在特定的实施方式中,所述疫苗组合物包含DNA疫苗。在特定的实施方式中,所述疫苗组合物包含RNA疫苗。在某些实施方式中,所述RNA疫苗是通过在体外转录所述DNA构建体,然后对RNA进行5'加帽而产生的。在某些实施方式中,所述RNA包含化学修饰的核苷酸构件以增强体内稳定性和细胞摄取。在某些实施方案中,本文所述的任何疫苗组合物包含将所述DNA或RNA配制成纳米颗粒用于递送。

[0014] 在某些实施方式中,本发明提供了一种在受试者中调节免疫应答的方法,其包含施用本文所述的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在某些实施方式中,本发明提供了一种用于在受试者中提供增强的抗原特异性疫苗接种的方法,其包含施用本文所述的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在某些实施方式中,本发明提供了一种诱导针对衍生自病原体,人自身蛋白或恶性肿瘤的靶抗原的治疗性免疫应答的方法,其包含施用本文所述的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在本发明提供的任何方法的特定的实施方式中,该方法包含CD8+细胞溶解性T淋巴细胞(CTL),CD4+辅助T淋巴细胞(HTL),抗体或其组合的增加。在任何前述方法的特定的实施方式中,该方法包括选自下述的一种或多种细胞因子的产生的增加:白介素-2(IL-2),穿孔素,粒酶B,干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白介素4(IL-4),白介素5(IL-5),白介素6(IL-6)和白介素10(IL-10)。

[0015] 在某些实施方式中,本发明提供了用于表达靶抗原以引发增强的抗原特异性T细胞应答的核酸载体,该载体编码包含所述靶抗原和去稳定化结构域(D.D.)的融合多肽。在某些实施方式中,所述融合多肽(由所述核酸载体编码)还包含LAMP结构域。在某些实施方式中,所述靶抗原(由所述核酸载体编码)衍生自病原体,人自身蛋白或恶性肿瘤。在特定的实施方式中,所述靶抗原是巨细胞病毒(CMV)pp65。

[0016] 在某些实施方式中,本发明提供了一种制造载有mRNA的树突细胞的方法,该方法包含以下步骤:(a)提供树突细胞;和(b)用从本文所述的任何多顺反子疫苗构建体或从本文所述的核酸载体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类转染未成熟的树突细胞。在所述方法的某些实施方式中,通过将自体外周血单核细胞转分化为未成熟的树突细胞来提供所述树突细胞。在特定的实施方式中,所述方法包含培养所述未成熟的树突细胞以获得成熟的树突细胞(mDC)。

[0017] 在某些实施方式中,本发明提供了分离的树突细胞,其包含从本文所述的任何多顺反子疫苗构建体或从本文所述的核酸载体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类。在某些实施方式中,本发明提供了一种树突细胞疫苗组合物,其包含本文所述的分离的树突细胞。在某些实施方式中,本发明提供了一种治疗组合物,其包含本文所述的分离的树突细胞。

[0018] 在某些实施方式中,本发明提供了包含第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞的树突细胞疫苗组合物,其中所述第一树突细胞和第二树突细胞各自包含从本文所述的任何多顺反子疫苗构建体或从本文所述的核酸载体在体外转录的一种或多种信使RNA (mRNA) 种类。在特定的实施方式中,所述第一分离的树突细胞的mRNA种类或核酸载体不同于第二分离的树突细胞的mRNA种类或核酸载体。在某些实施方式中,本发明提供了一种治疗组合物,其包含本文所述的第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞。

[0019] 在某些实施方式中,本发明提供了用于增强疫苗诱导的T淋巴细胞应答的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本文所述的任何树突细胞疫苗或本文所述的治疗组合物。在所述方法的特定的实施方式中,所述方法的T淋巴细胞应答包括CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T淋巴细胞(CTL)、CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞(HTL)或其组合的增加。

[0020] 在某些实施方式中,本发明提供了引发针对表达肿瘤抗原的癌细胞的免疫应答的方法,其包含向有此需要的受试者施用有效量的本文所述的任何树突细胞疫苗或本文所述的治疗组合物,其中所述组合物的有效量足以引起针对表达所述肿瘤抗原的癌细胞的免疫应答。在所述方法的某些实施方式中,所述受试者患有选自下述的肿瘤:胶质母细胞瘤,膀胱癌,乳腺癌,卵巢癌,胰腺癌和胃癌,宫颈癌,结肠癌,子宫内膜癌,头颈癌,肺癌,黑色素瘤,多发性骨髓瘤,白血病,非霍奇金淋巴瘤,前列腺癌,直肠癌,恶性黑色素瘤,消化道/胃肠道癌,肝癌,皮肤癌,淋巴瘤,肾癌,肌肉癌,骨癌,脑癌,眼癌,直肠癌,结肠癌,宫颈癌,膀胱癌,口腔癌,良性和恶性肿瘤,胃癌,子宫体,睾丸癌,肾癌,喉癌,急性淋巴细胞性白血病,急性髓性白血病,尤因肉瘤,卡波西肉瘤,基底细胞癌和鳞状细胞癌,小细胞肺癌,绒毛膜癌,横纹肌肉瘤,血管肉瘤,血管内皮瘤,威尔姆斯瘤,神经母细胞瘤,口腔/咽癌,食道癌,喉癌,神经纤维瘤,结节性硬化症,血管瘤和淋巴管生成。在所述方法的某些实施方式中,所述免疫应答包含CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T淋巴细胞(CTL),CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞(HTL)或其组合的增加。

[0021] 在某些实施方式中,本发明提供了引发针对病毒抗原的免疫应答的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的本文所述的任何树突细胞疫苗或本文所述的治疗组合物,其中所述组合物的有效量足以提供针对所述病毒抗原的疫苗接种。在该方法的特定的实施方式中,所述病毒抗原选自流感病毒,人乳头瘤病毒(HPV),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV),登革热病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)。

[0022] 在某些实施方式中,本发明提供了递送本文所述的任何疫苗组合物的方法,其包含将两种或更多种DNA构建体、RNA构建体或其任意组合作为混合物共同施用。在特定的实施方式中,该方法包含将选自polyIC,polyICLC,CpG和其他TLR配体的免疫佐剂共同施用以激活树突细胞。

[0023] 在某些实施方式中,本发明提供了增强免疫应答和疫苗接种效力的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用包含本文所述的任何分离的树突细胞的组合物,或疫苗组合物,树突细胞疫苗,或治疗组合物。在特定的实施方式中,所述方法包含共同施用激活树突细胞的佐剂。在特定的实施方式中,所述佐剂选自polyIC,polyICLC,CpG和其他TLR配体。

## 附图说明

[0024] 图1A-1E:设计用于提供增强的适应性免疫应答的核酸(DNA)多顺反子疫苗构建体。(A)DNA疫苗构建体的示意图;(B)DNA疫苗有九种构造,其选择性抗原序列作为独立的顺

反子重复了三遍,其区别在于添加的特定序列-去稳定化结构域(D.D.),溶酶体相关膜蛋白结构域(LAMP)和信号序列(s.s.)——它们决定所述抗原蛋白的加工和呈递。(C)DNA疫苗有六种构造,其中包含去稳定化结构域(D.D.)和LAMP结构域,而省略了信号序列结构域。(D)DNA疫苗有六种构造,其包含去稳定化结构域(D.D.)和信号序列(s.s.),省去了LAMP结构域。(E)DNA疫苗有两种构造,其包含LAMP和信号序列结构域,而省略了去稳定化结构域(D.D.)。

[0025] 图2A-2E:mRNA疫苗构建体的示意图。编码区的侧翼是对应于5'末端的5'7-甲基鸟苷三磷酸(m<sup>7</sup>G)帽和5'非翻译区(5'UTR)以及3'末端的包括poly A尾的3'非翻译区(3'UTR),以及可选地3'-免疫增强元件(IE)的序列。图2B-2E描述了十个示例性多顺反子RNA疫苗构建体,其选择性(靶标)抗原序列作为独立的顺反子重复了两次或三次,其区别在于添加的特定序列-去稳定化结构域(D.D.),溶酶体相关膜蛋白结构域(LAMP)和信号序列(s.s.)——它们决定所述抗原蛋白的加工和呈递,设计成用于提供增强的适应性免疫应答。

[0026] 图3:用于MHC-I(CTL)活化的一个示例性去稳定化结构域(D.D.)的氨基酸序列。

[0027] 图4:用于MHC-II(HTL)活化的一个示例性LAMP结构域(417aa)的氨基酸(aa)序列。(氨基酸残基1-382:腔内(luminal)结构域;氨基酸残基383-417:跨膜结构域和细胞质尾。)

[0028] 图5:一个示例性信号序列的氨基酸序列(24个氨基酸)。

[0029] 图6:来自脑心肌炎病毒的内部核糖体进入位点(IRES)的核苷酸序列(575个碱基)。

[0030] 图7:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白(OVA)抗原的示例性多顺反子构建体免疫的小鼠的白介素-2(IL-2)应答。y轴显示OVA()刺激后的IL-2水平(pg/ml),x轴显示构建体:(1)s.s.OVA;(2)LAMP/OVA;(3)OVA/D.D.;(4)LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物;(5)LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物;(6)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.

[0031] 图8:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白(OVA)抗原的示例性多顺反子构建体免疫的小鼠的干扰素(IFN) $\gamma$ 应答。y轴显示OVA()刺激后的IFN $\gamma$ 水平(pg/ml),x轴显示构建体:(1)LAMP/OVA;(2)OVA/D.D.;(3)LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物;(4)LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物;(5)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.;(6)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.-IRES-s.s.OVA。

[0032] 图9:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白(OVA)抗原的示例性多顺反子构建体免疫的小鼠的粒酶B应答。y轴显示OVA()刺激后的粒酶B水平(pg/ml),x轴显示构建体:(1)LAMP/OVA;(2)OVA/D.D.;(3)LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物;(4)LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物;(5)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.;(6)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.-IRES-s.s.OVA。

[0033] 图10:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白(OVA)抗原的示例性多顺反子构建体免疫的小鼠的白介素10(IL-10)应答。y轴显示OVA()刺激后的白介素10(IL-10)水平(pg/ml),x轴显示构建体:(1)LAMP/OVA;(2)OVA/D.D.;(3)LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物;(4)LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物;(5)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.;(6)多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.-IRES-s.s.OVA。

[0034] 图11:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白(OVA)抗原的示例性多顺反子构

建体免疫的小鼠的白介素6 (IL-6) 应答。y轴显示OVA ( ) 刺激后的白介素6 (IL-6) 水平 (pg/ml), x轴显示构建体: (1) LAMP/OVA; (2) OVA/D.D.; (3) LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物; (4) LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物; (5) 多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.; (6) 多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.-IRES-s.s.OVA。

[0035] 图12:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白 (OVA) 抗原的示例性多顺反子构建体免疫的小鼠的白介素4 (IL-4) 应答。y轴显示OVA ( ) 刺激后的白介素4 (IL-4) 水平 (pg/ml), x轴显示构建体: (1) LAMP/OVA; (2) OVA/D.D.; (3) LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物; (4) LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物; (5) 多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.; (6) 多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.-IRES-s.s.OVA。

[0036] 图13:通过ELISA测定法测量的,用编码卵清蛋白 (OVA) 抗原的示例性多顺反子构建体免疫的小鼠的白介素5 (IL-5) 应答。y轴显示OVA ( ) 刺激后的白介素5 (IL-5) 水平 (pg/ml), x轴显示构建体: (1) LAMP/OVA; (2) OVA/D.D.; (3) LAMP/OVA和OVA/D.D.的DNA混合物; (4) LAMP/OVA和OVA/D.D.和s.s.OVA的DNA混合物; (5) 多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.; (6) 多顺反子LAMP/OVA-IRES-OVA/D.D.-IRES-s.s.OVA。

[0037] 图14A-D:设计成用于增强人树突细胞疫苗诱导的T淋巴细胞应答的示例性核苷酸构建体。(A) CMV pp65抗原 (巨细胞病毒, CMV)。(B) D.D.-CMV pp65。(C) CMV pp65-LAMP。(D) D.D.-CMV pp65-LAMP。

[0038] 图15:树突细胞表型的流式细胞术测量。将健康供体的外周血单核细胞在37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养2小时。然后在AIM-V培养基中用800IU/ml GM-CSF和500IU/ml IL-4刺激贴壁细胞6天,以生成未成熟的树突细胞 (iDC)。在第6天,加入160ng/ml IL6, 5ng/ml TNF- $\alpha$ , 5ng/ml IL-1 $\beta$ 和1 $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>。在第7天,收获成熟的树突细胞 (mDC)。通过流式细胞术测量未成熟的树突细胞 (iDC) 和成熟的树突细胞 (mDC) (CD14, CD11c, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC和HLA-DR) 的表型。

[0039] 图16A-B:树突细胞中CMV pp65抗原的表达水平。通过电穿孔将D.D.-CMV pp65 mRNA或CMV pp65 mRNA分别转染到树突细胞中。然后,通过流式细胞术测量CMV pp65抗原在树突细胞中的表达水平。(A) 有代表性的FACS图。(B) 一个概述性的波, n=3。D.D.-CMV pp65组和CMV pp65组之间没有观察到显著差异。(p>0.05)。

[0040] 图17A-D:CMV pp65特异性T细胞应答。在第0天和第7天,分别用载有D.D.-CMV pp65 mRNA或载有CMV pp65 mRNA的树突细胞刺激来自健康供体的PMBC两次。(A) 在第14天通过流式细胞术测量CD8 T细胞IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 和CD4 T细胞IFN- $\gamma$  应答。(B-D) CD8T细胞IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 或CD4 T细胞IFN- $\gamma$  应答的总结。使用配对样本T检验。n=6。

[0041] 图18:由载有mRNA抗原的成熟的树突细胞 (mDC) 诱导的CMV pp65特异性T细胞应答。用载有D.D.-CMV pp65 mRNA, 载有CMV pp65-LAMP mRNA, 载有混合 (D.D.-CMV pp65:CMV pp65-LAMP=1:1) mRNA或载有D.D.-CMV pp65-LAMP mRNA的成熟的树突细胞分别在第0天和第7天两次刺激来自健康供体的PMBC。在第14天通过流式细胞术测量CD8 T细胞IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 和CD4 T细胞IFN- $\gamma$  应答。

[0042] 图19:由载有mRNA抗原的未成熟的树突细胞诱导的CMV pp65特异性T细胞应答。将D.D.-CMVpp65 mRNA, CMVpp65-LAMP1mRNA, 混合 (D.D.-CMV pp65:CMV pp65-LAMP1=1:1) mRNA或D.D.-CMVpp65-LAMP1 mRNA分别转染到未成熟的树突细胞 (iDC) 中。然后将未成熟的

树突细胞 (iDC) 进一步培养成为成熟的树突细胞 (mDC)。用上述载有 mRNA 的成熟的树突细胞分别在第 0 天和第 7 天两次刺激来自健康供体的 PMBC。在第 14 天通过流式细胞术测量 CD8T 细胞 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 CD4 T 细胞 IFN- $\gamma$  应答。

[0043] 图 20A-C: 由载有 mRNA 抗原的树突细胞诱导的人 gp100 特异性 T 细胞应答。将人 gp100, LAMP-gp100, D.D.-gp100, S.S.-gp100 或 LAMP-gp100-IRES-D.D.-gp100-IRES-S.S.-gp100 mRNA 分别转染到未成熟的树突细胞 (iDC) 中。然后将未成熟的树突细胞 (iDC) 进一步培养成为成熟的树突细胞 (mDC)。用上述载有 mRNA 的成熟的树突细胞分别在第 0 天, 第 7 天和第 13 天三次刺激来自健康供体的 PMBC。在细胞培养过程中, 加入了 1 $\mu$ g/ml 抗人 PD-L 和 PD-L2 抗体。在第 14 天通过流式细胞术测量 CD3+T 细胞 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 、CD8 T 细胞 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  以及 CD4 T 细胞 IFN- $\gamma$  应答。

[0044] 图 21: 在树突细胞中由纳米颗粒递送的 CMV-pp65 mRNA 的表达。通过纳米颗粒递送系统将 CMV-pp65 mRNA 或模拟对照以 1 $\mu$ g mRNA/1 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞的浓度转染到树突细胞中。树突细胞在 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 分别在 6h, 12h 和 24h 收获。为每种条件设置重复的孔。通过流式细胞术测量 CMV-pp65 在树突细胞中的表达。

[0045] 图 22A-B: 通过将 OVA 偶联至去稳定化结构域 (D.D.) 增强了 MHC I 类表位呈递。用 p43-ova, p43-S.S./ova, p43-D.D./ova 或 p43-mLamp/ova 转染 24h 后, 用流式细胞术分析用 25D1.16 抗体染色的 BMDC 以测量 SIINFEKL/H2-Kb 复合物。(A) 显示了代表性的等值线图和中值荧光强度 (MFI), 并描绘了单个百分比。(B) MFI 数据代表三个独立实验的平均值  $\pm$  SEM。

[0046] 图 23A-B: D.D. 修饰方法与其他方法对 MHC-1/肽抗原呈递的效果比较。用 p43-D.D./ova, p43-GTN/ova, p43-P62/ova 或 p43-UBT/ova 转染 24h 后, 用流式细胞术分析用 25D1.16 抗体染色的 BMDC 以测量 SIINFEKL/H2-Kb 复合物。(A) 显示了代表性的等值线图和中值荧光强度 (MFI), 并描绘了单个百分比。(B) MFI 数据代表三个独立实验的平均值  $\pm$  SEM。

[0047] 图 24: 由不同形式的 OVA 抗原介导的抗肿瘤免疫。在第 0 天将 B16/F10/mOVA 黑色素瘤细胞 (5 $\times$ 10<sup>4</sup>/小鼠) 皮下接种 ( ) 到 C57BL/6 小鼠的右肋腹中。然后在单治疗组中在第 7 天和第 14 天通过腹腔注射 (i.p. injection) PBS 或用 p43-ova, p43-D.D./ova 或 p43-mLAMP/ova 电穿孔的 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个树突细胞免疫小鼠。在联合治疗组中, 注射用 p43-D.D./ova 电穿孔的 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个树突细胞和用 p43-mLAMP/ova 电穿孔的 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个树突细胞。从第 5 天开始每天监测肿瘤的生长。显示这些小鼠中的肿瘤直径和重量 (n=每组 1-5 只小鼠)。

## 具体实施方式

[0048] 除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开相关的领域普通技术人员通常理解的含义。例如, (The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第 2 版, 2002, CRC Pres.s.); (The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第 3 版, 1999, Academic Pres.s.); (The Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2000 修订, Oxford University Pres.s.) 为本领域技术人员提供了本文中使用的许多术语的通用词典。另外, 在 ( ) (Molecular Cloning: A laboratory manual, M.R.Green and J.Sambrook (eds.), 第 4 版, 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Pres.s., New York) 中提供了常用的分子生物学术语、方法和方案 (protocol)。在本文的详述部分阐述了其他定义。

[0049] 本发明总体上涉及疫苗设计,多顺反子疫苗构建体(DNA,RNA,肽,蛋白质),疫苗组合物及其设计成用于增强的抗原特异性疫苗接种的方法。特别地,本发明提供的多顺反子疫苗构建体表达至少一种靶抗原,并包含多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码修饰的靶抗原,所述修饰的靶抗原包含靶抗原和至少一个决定所述抗原的加工和呈递的特定结构域的框内融合蛋白。在某些实施方式中,所述特定结构域包含去稳定化结构域(D.D.),溶酶体相关膜蛋白(LAMP)结构域和信号序列(s.s.)。本发明提供的多顺反子疫苗构建体可以包含任何靶抗原,因此,本发明提供的疫苗(DNA,RNA或蛋白质)可以用于调节或增强针对任何种类的抗原的免疫应答。本发明还提供了其使用方法,借助由所述特定结构域(例如LAMP,D.D.和s.s.结构域)赋予的特定机能以引发适应性免疫应答的三个方面(CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T淋巴细胞(CTL),CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞(HTL)和抗体)的每个的增强激活。此外,本发明提供了用由多顺反子构建体编码的mRNA来增强树突细胞(DC)疫苗诱导的T细胞应答的使用方法。本发明还提供了用于细胞治疗的方法,该方法包含工程化的树突细胞(例如,载有mRNA的树突细胞)。

[0050] 在一些方面,本发明提供了包含本发明的多顺反子疫苗构建体或由其编码的核酸疫苗(DNA和RNA/mRNA)。核酸疫苗是含有由DNA或RNA(mRNA)编码的抗原的疫苗。在某些实施方式中,核酸疫苗作为疫苗组合物提供。将本发明提供的多顺反子DNA疫苗构建体施用于宿主(受试者)并由宿主细胞内化,通过宿主细胞功能在核中转录,在细胞质中翻译。所得的蛋白质在D.D.,LAMP或分泌的构建体的环境(context)下加工,由此CTL和HTL抗原序列在主要组织相容性复合体(MHC)分子的环境下最终呈现在宿主抗原呈递细胞(APC)的表面上。这可以通过用DNA直接转染抗原呈递细胞或从非抗原呈递细胞交叉呈递到抗原呈递细胞来实现。肽-MHC复合物被抗原特异性T细胞识别,从而导致细胞性的宿主免疫应答。靶向分泌的蛋白质产物被定向到转染细胞的表面,在此处分泌它们以活化B细胞和抗体合成。本发明提供的多顺反子RNA疫苗包含信使RNA(mRNA),其通过使用噬菌体RNA聚合酶从人工合成的多顺反子构建体或mRNA通过体外转录(IVT)合成。一旦施用于宿主细胞并被其内化,mRNA转录物就会直接在细胞质中翻译,然后像DNA疫苗一样,产生的抗原被呈递给抗原呈递细胞以刺激免疫应答。

[0051] 关于DNA和RNA疫苗,主要的改进是溶酶体相关膜蛋白(LAMP)结构域的使用。LAMP蛋白与MHC II类蛋白共定位在专门的抗原呈递细胞的内体/溶酶体区室中,并且具有作为LAMP腔内结构域的嵌合体合成的病原体序列的疫苗大大增强了向这个区室的运输,在这里抗原性结构域被加工,来自它的肽与主要组织相容性(MHC)II类分子(MHC-II)结合展示于细胞表面上,从而增强CD4<sup>+</sup>T细胞活化(参见,例如,美国专利号5,633,234;8,318,173;8,445,660;和9,499,589,其每一个都整体并入本文)。

[0052] 然而,现有疫苗接种技术的主要局限性在于缺乏MHC I类(MHC-1)介导的刺激和CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T细胞应答(CTL)的激活。本发明的方面通过提供多顺反子疫苗构建体来解决该挑战,所述多顺反子疫苗构建体尤其包括去稳定化结构域(D.D.),以促进蛋白酶体加工修饰的(融合的)抗原,从而增强抗原的MHC-I类呈递。这导致刺激CD8<sup>+</sup>CTL应答。特别地,本发明提供的疫苗构建体的多顺反子设计及其编码的mRNA具有使用单个构建体同时激活适应性免疫应答的所有三个方面的优点。

[0053] 在一些方面,本发明提供了基于mRNA的抗原呈递细胞(APC),例如,基于mRNA的树

突细胞(工程化的树突细胞)和包含本发明提供的一种或多种所述多顺反子疫苗构建体(例如,图2A-2E)或融合构建体(例如,图14A-D)的树突细胞疫苗组合物。

[0054] 在一些方面,本发明提供了在受试者中调节免疫应答的方法,该方法包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在一些方面,本发明提供了用于在受试者中提供增强的抗原特异性疫苗接种的方法,其包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在一些方面,本发明提供了诱导针对衍生自病原体,人自身蛋白或恶性肿瘤的靶抗原的治疗性免疫应答的方法,其包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。

[0055] 在某些方面,本发明提供了制备载有mRNA的抗原呈递细胞(APC)的方法,例如,制备载有mRNA的树突细胞的方法,该方法包含以下步骤:(a)提供树突细胞细胞;(b)用一种或多种从本发明提供的多顺反子核酸载体构建体体外转录的信使RNA(mRNA)种类转染未成熟的树突细胞。在一些方面,本发明提供了增强疫苗诱导的T淋巴细胞应答的方法,该方法包含向有此需要的受试者施用包含分离的树突细胞的组合物,该树突细胞包含一种或多种从本发明提供的多顺反子核酸构建体体外转录的信使RNA(mRNA)种类。在其他方面,本发明提供了增强疫苗诱导的T淋巴细胞应答的方法,该方法包含向有此需要的受试者施用包含第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞的组合物,所述第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞各自包含一种或多种从本发明提供的多顺反子疫苗构建体或核酸构建体体外转录的信使RNA(mRNA)种类。在特定方面,所述第一和第二分离的树突细胞包含本发明提供的不同的信使RNA(mRNA)种类或核酸构建体。在某些实施方式中,并入DNA编码抗原表达盒/构建体的病毒载体(例如,腺病毒,慢病毒, $\gamma$ -逆转录病毒)或细菌载体(例如,单核细胞增生性李斯特菌,鼠伤寒沙门氏菌)也可用于将抗原递送至树突细胞或直接给患者。

[0056] 在一些方面,本发明提供了包装的物品(article),例如制品(article of manufacture),诸如试剂盒或系统,其包含任何疫苗构建体,疫苗组合物,细胞或任何与本发明提供的任何方法(例如,本文所述的疫苗组合物的施用和递送方法)有关的任何组分。所述包装的物品可以任选地包括标签和/或使用说明。此类说明包括指导或促进(包括宣传)所述制品的使用。

[0057] 核酸,载体和蛋白质

[0058] 如本文所用,术语“核酸”,“多核苷酸”,“多核苷酸分子”,“多核苷酸序列”和复数形式可互换使用,以指代多种分子,包括单链和双链DNA和RNA分子,cDNA序列,外显子和内含子的基因组DNA序列,化学合成的DNA和RNA序列以及有义链和相应的反义链。本发明的多核苷酸还可以包含天然核苷酸的已知类似物,其与参考(reference)天然核酸具有相似的性质。

[0059] 本发明的多核苷酸可以是克隆的,合成的,改变的,诱变的或其组合。用于分离和修饰核酸的标准重组DNA和分子克隆技术是本领域已知的。用于产生碱基对改变,缺失或小的插入的位点特异性诱变在本领域中也是已知的(参见例如MR Green和J.Sambrook(编)Molecular Cloning:A laboratory manual,第4版,2012,Cold Spring Harbor Laboratory Pres.s.,New York);Silhavy等人,Experiments with Gene Fusions,1984,Cold Spring Harbor Laboratory Pres.s.,Cold Spring Harbor,New York;Glover和Hames,DNA Cloning:APractical Approach,第2版,1995,IRL Pres.s.at Oxford

University Press., Oxford/New York; Ausubel (编), Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, 1995, Wiley, New York)。

[0060] 如本文所用,多核苷酸或多核苷酸区域(或者多肽或多肽区域)与另一序列具有一定百分比(例如,至少约50%,至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约99%)的“序列同一性”是指在使用本领域常规软件程序最大程度地比对时,在所比较的两个序列中有所述百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。

[0061] 当在DNA序列的限定长度上至少约50%,至少约60%,至少约70%,至少约75%,和至少约80%,和至少约90%或至少约95%的核苷酸匹配时,两个序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。类似地,当在多肽序列的限定长度上至少约50%,至少约60%,至少约66%,至少约70%,至少约75%和至少约80%,和至少约90%或至少约95%的氨基酸残基匹配时,两个多肽序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。可以通过使用序列数据库中可用的标准软件比较序列来鉴定基本上同源的序列。基本上同源的核酸序列也可以在例如针对该特定系统规定的严格条件下进行的Southern杂交实验中鉴定。确定合适的杂交条件在本领域技术范围内。

[0062] 在核酸序列的情形下,术语“保守修饰的变体”是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列,或当核酸不编码氨基酸序列时,指基本相同的序列的那些核酸。具体而言,简并的密码子取代可通过产生其中一个或多个选定(或全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷(deoxyinosine residues)取代的序列来实现(Batzer,等人(1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka,等人(1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Ros. s. olini等人(1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

[0063] 术语“载体”或“表达载体”在本文中用于说明书和权利要求书的目的是指根据本发明在细胞中用作引入和表达所需基因产物(例如,抗原)的运载工具(vehicle)。如本领域技术人员已知的,这样的载体可以容易地选自质粒,噬菌体,病毒和逆转录病毒。通常,与本发明相容的载体将包含选择标记、合适的限制位点以促进所需基因的克隆以及进入真核或原核细胞和/或在真核细胞中复制的能力。

[0064] “表达载体”是指工程化的核酸(DNA)构建体,其包含与下游基因、顺反子或RNA编码区可操作地连接的至少一个启动子。在本发明的多顺反子疫苗构建体中,启动子可以可操作地连接至一个或多个基因或顺反子,每个基因或顺反子均由起始密码子起始,随后是终止密码子。将表达载体转染到受体细胞,即真核细胞(例如哺乳动物细胞,真菌细胞,酵母细胞),可使细胞表达由表达载体编码的抗原。表达载体包括例如质粒载体和病毒载体。本发明提供的表达载体构建体包括嵌合(融合)构建体和多顺反子载体构建体。

[0065] 如本文所用,“病毒载体”是指病毒或病毒颗粒,其包含将以体内,离体或体外方式递送到宿主细胞中的多核苷酸。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒载体,腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。在由腺病毒载体介导的基因转移的某些方面,载体构建体是指包含腺病毒基因组或其一部分,以及与腺病毒衣壳蛋白相关的选择的非腺病毒基因的多核苷酸。

[0066] 如本文所用,“可操作地连接”或“在转录控制下”是指通过表达控制元件和编码序列的适当并置来控制的多核苷酸序列的表达(例如,转录或翻译)。在某些方面,当表达控制序列控制和调节DNA序列的转录时,该DNA序列以5'至3'的方向“可操作地连接”至表达控制

序列。

[0067] “启动子”是指足以在原核或真核细胞中指导转录的最小序列。该定义包括足以使依赖于启动子的基因表达以细胞类型特异性,组织特异性,或时间特异性(temporal-specific)的方式可控,或者可以通过外部信号或试剂诱导的启动子元件,这样的元件可以位于特定基因的5'或3'或内含子序列区域中。本发明使用的示例性启动子包括但不限于病毒启动子,哺乳动物启动子,噬菌体启动子和酵母启动子以提供高水平表达,例如哺乳动物巨细胞病毒(CMV)启动子,劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子,延伸因子-1 $\alpha$ (EF1 $\alpha$ )启动子,CMV早期增强子/鸡 $\beta$ 肌动蛋白(CAG)启动子,泛素C(UbC)启动子,MC1启动子, $\beta$ 肌动蛋白启动子,酵母醇氧化酶,磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子,乳糖诱导型启动子,半乳糖苷酶启动子,腺相关病毒启动子,杆状病毒启动子,痘病毒启动子,逆转录病毒启动子,腺病毒启动子,SV40启动子,HMG(羟甲基戊二酰辅酶A)启动子,TK(胸苷激酶)启动子,7.5K或H5R痘病毒启动子,腺病毒2型MPC晚期启动子, $\alpha$ -抗胰蛋白酶启动子,因子IX启动子,免疫球蛋白启动子,CFTR表面活性蛋白启动子(CFTR surfactant promoter),白蛋白启动子,转铁蛋白启动子,噬菌体T3启动子,噬菌体T7启动子和SP6启动子。除启动子外,本发明中使用的质粒还可包含额外的调节元件,例如腺病毒IRT元件,以增强免疫应答,以及强的聚腺苷酸化(polyadenylation)/转录终止信号,例如牛生长激素或兔 $\beta$ -球蛋白聚腺苷酸化序列。

[0068] “顺反子”是指编码单个蛋白质或多肽的“编码序列”或核酸序列。

[0069] 如本文所用,术语“多顺反子载体”,“多顺反子表达载体”,“多顺反子载体构建体”或“多顺反子疫苗构建体”是指由来自单个转录本的两个或更多个不同(独立)顺反子(即多顺反子mRNA)编码,允许同时表达两种或更多种不同基因产物(例如,抗原)的表达载体。

[0070] 如本文所用,术语“多肽”,“蛋白质”和复数形式可互换使用,是指由通过肽键连接的氨基酸单链组成的化合物。本发明的多肽可包含天然存在的氨基酸,合成氨基酸,遗传编码的氨基酸,非遗传编码的氨基酸及其组合。多肽可以包括L型和D型氨基酸。多肽可包括野生型蛋白的“生物活性片段”,“生物活性形式”,“生物活性等同物”和“功能衍生物”,其具有与野生型蛋白至少基本上相等(例如,没有明显差异)的生物活性,该生物活性通过使用适合检测所述活性的测定法测量。

[0071] 可使用技术人员已知的多种标准技术来纯化和表征本发明的分离的多肽(参见,例如,**Schröder**等人,The Peptides,1965,Academic Press.,New York;Bodanszky,Principles of Peptide Synthesis,修订第2版,1993,Springer-Verlag,Berlin/New York;Ausubel(ed.),Short Protocols in Molecular Biology,第3版,1995,Wiley,New York)。

[0072] 多顺反子疫苗构建体

[0073] 在某些方面,本发明提供的疫苗构建体表达至少一种需要对其进行免疫应答的靶抗原,其中该构建体包含可操作地连接至单个启动子的以5'至3'方向的多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码包含靶抗原和至少一个决定所述抗原的加工和呈递的特定结构域的框内融合蛋白的修饰的靶抗原。

[0074] 如本文所用,“靶抗原”,“免疫原”或“抗原材料”是指分子或物质,包括其片段、表位或衍生物,还包括来自一种或多种源蛋白(source protein)的融合多肽(例如,由富含甘氨酸的多肽接头隔开的多种抗原的框内融合)其在宿主中诱导特异性免疫应答。“表位”,

“抗原性表位”，“抗原性片段”或“免疫反应性片段”可以互换使用，定义为通常由短肽序列或寡糖组成的结构，所述短肽序列或寡糖被免疫系统的组分特异性识别或特异性结合。如本文所用，“修饰的靶抗原”是指通过将一个或多个抗原性（免疫原性）序列（框内）融合至一个或多个其他序列，例如功能结构域（诸如，LAMP，D.D.，s.s.）以修饰其免疫原性而对靶抗原进行的修饰。在一些实施方式中，多顺反子疫苗构建体可包含两个靶抗原，三个靶抗原，四个靶抗原，五个靶抗原，六个靶抗原，七个靶抗原，八个靶抗原，九个靶抗原，十个靶抗原或十个以上靶抗原。本文所述的多顺反子疫苗构建体可涵盖任何靶抗原，包括但不限于衍生自病原体，人自身蛋白或肿瘤抗原（包括恶性肿瘤）的抗原。术语“肿瘤抗原”包括在肿瘤细胞中产生的任何抗原物质，其在宿主中触发免疫应答。术语肿瘤抗原包括例如肿瘤特异性抗原（TSA），肿瘤相关抗原（TAA），新抗原，组织分化抗原，突变蛋白抗原，致癌病毒抗原，肿瘤-睾丸抗原和血管或基质特异性抗原。示例性靶抗原包括但不限于任何肿瘤抗原，例如，使用基因组测序从患者中鉴定出的新抗原，人gp100肿瘤抗原，移植抗原，哺乳动物细胞上发现的细胞表面蛋白，癌症特异性蛋白，与异常生理反应相关的蛋白，细菌、原生动物或真菌的蛋白质，包括尤其是在这些生物的细胞壁或细胞膜中发现的蛋白质，以及由病毒基因组编码的蛋白质，包括逆转录病毒（如HIV和肝DNA病毒），病毒抗原（衍生自传染性病毒），流感病毒血凝素（HA蛋白），合成抗原（例如合成抗原肽表位）改变的抗原，以及上述任何靶抗原的具有免疫原性的混合物、组合、衍生物、抗原性片段。

[0075] 在本发明范围内的其他示例性靶抗原包括但不限于由引起或与肝炎，狂犬病，疟疾（例如恶性疟原虫展示的表位）或寄生虫感染（诸如，例如血吸虫病），癌症，艾滋病，黄热病，登革热，日本脑炎，西尼罗河热，麻疹，天花，炭疽，埃博拉，马脑炎，裂谷热（Rift valley fever），猫抓挠热（cat scratch fever），病毒性脑膜炎，瘟疫（plague），兔热病（tularemia），以及其他致病生物引起的疾病相关的生物的基因组编码的抗原。病毒抗原包括由对人类，马，牛，猪，骆驼，长颈鹿，狗，猫或鸡致病的病毒的基因组编码的病毒编码蛋白。非限制性示例包括来自流感核蛋白的由残基365-80（NP365-80），NP50-63和NP147-58组成的肽和来自流感血凝素HA202-21和HA523-45的肽。其他示例性抗原包括但不限于HIV编码的多肽，例如Gag，Env，Rev，Tat和/或Nef多肽，gp160等；乳头瘤病毒核心抗原；HCV结构蛋白和非结构蛋白；以及CMV结构蛋白和非结构蛋白。

[0076] 在本发明范围内的示例性肿瘤抗原包括但不限于5T4，AIM2，AKAP4 2，Art-4，Aura A1（AURKA），Aura B1（AURKB），BAGE，BCAN，B-周期素，BSG，CCND1，CD133，CDC45L，CDCA1（TTK），CEA，CHI3L2（几丁质酶3样2），CSPG4，EpCAM 4，Epha2，EPHX1，Ezh2，FABP7，Fos11（Fra-1），GAGE，Galt-3，G250（CA9），gBK，glast，GnT-V，gp100，HB-EGF，HER2，HNPRL，HO-1，hTERT，IGF2BP3，IL13-Ra2，IMP-3，IQGAP1，ITGAV，KIF1C，KIF20A，KIF21B，KIFC3，KK-LC-1，LAGE-1，Lck，LRRCSA，MAGE-1（MAGEA1），MAGE-2

[0077]（MAGEA2B），MAGE-3，MAGE-4，MAGE-6，MAGE-10，MAGE-12，MAGE-C1（CT7），MAGE-C2，MAGE-C3，Mart-1，MELK，MRP3，MUC1，NAPSA，NLGN4X，Nrcam，NY-ESO-1（CTAG1B），NY-SAR-35，OFA/iLRP，PCNA，PIK3R1，Prame，PRKDC，PTH-rP，PTPRZ1，PTTG1 2，PRKDC，RAN，RGS1，RGS5，RHAMM（RHAMM-3R），RPL19，Sart-1，Sart-2，Sart-3，SEC61G，SGT-1，SOX2，Sox10，Sox11，SP17，SPANX-B，SQSTM1，S.S.X-2，STAT1，STAT3，生存素，TARA，TNC，Trag-3，TRP-1，TRP2，酪氨酸酶，URLC10（LY6K），Ube2V，WT1，XAGE-1b（GAGED2a），YKL-40（CHI3L1），ACRBP，SCP-1，

S.S.X-1, S.S.X-4, NY-TLU-57, CAIX, Brachyury, NY-BR-1, ErbB, 间皮素, EGFRvIII, IL-13Ra2, MSLN, GPC3, FR, PSMA, GD2, L1-CAM, VEGFR1, VEGFR2, KOC1, OFA, SL-701, 突变体P53, DEPDC1, MPHOSPH1, ONT-10, GD2L, GD3L, TF, PAP, BRCA1, DLC1, XPO1, HIF1A, ADAM2, CALR3, SAGE1, SCP-1, ppMAPkkk, WHSC, 突变体Ras, COX1, COX2, FOXP3, IDO1, IDO2, TDO, PDL1, PDL2, 和PGE2。

[0078] 在本发明范围内的示例性新抗原包括但不限于与任何肿瘤/癌症有关的新抗原, 例如肺癌(MTFR2 D326Y, CHTF18 L769V, MYADM R30W, HERC1 P3278S, FAM3C K193E, CSMD1 G3446E, SLC26A7R117Q, PGAP1 Y903F, HELB P987S, ANKRD K603T); 黑色素瘤(TMEN48 F169L, TKT R438W, SEC24A P469L, AKAP13 Q285K, EXOC8 Q656P, PABPC1 R520Q, MRPS5 P59L, ABCC2 S1342F, SEC23A P52L, SYTL4 S363F, MAP3K9 E689K, AKAP6 M1482I, RPBPM P42L, HCAPG2 P333L, H3F3C T4I, GABPA E161K, SEPT2Q125R, SRPX P55L, WDR46 T300I, PRDX3 P101L, HELZ2 D614N, GCN1L1 P769L, AFMID A52V, PLSCR4 R247C, CENPL P79L, TPX2H458Y, SEC22C H218Y, POLA2 L420F, SLC24A5 mut); 间皮瘤(NOTCH2 G703D, PDE4DIP L288M, BAP1 V523fs, ATP10B E210K, NSD1 K2482T); 胶质瘤/胶质母细胞瘤(IDH1 R132H, POLE L424V); 乳腺癌(mPALB2, mROB03, mZDHC16, mPTPRS, RBPJ H204L); 胆管癌((ERBB2IP E805G); 和宫颈癌(MAPK1 E322K, PIK3CA E545K, PIK3CA E542K, EP300 D1399N, ERBB2 S310F, ERBB3 V104M, KRAS G12D)。新抗原可包含含有新抗原表位的全长多肽(蛋白质), 或可通过产生融合蛋白或通过本文针对任何靶抗原所述的接头(例如2A, IRES)连接, 并入本发明提供的多顺反子疫苗构建体。

[0079] 在本发明范围内的其他示例性靶抗原包括但不限于与以下传染病相关的病毒病原体: 获得性免疫缺陷综合症(AIDS)(人类免疫缺陷病毒(HIV)); 阿根廷提根热(Argentine Teagan fever)(Junin病毒); 星状病毒感染(星状病毒科); BK病毒感染(BK病毒); 玻利维亚出血热(Machupo病毒); 巴西出血热(Sabiá病毒); 水痘(水痘带状疱疹病毒(VZV)); 基孔肯雅热(Chikungunya)(甲病毒); 科罗拉多蜱传热(Colorado tick fever)(CTF)(科罗拉多蜱传热病毒(Colorado tick fever virus)(CTFV)); 普通感冒, 急性病毒性鼻咽炎, 急性鼻炎(通常是鼻病毒和冠状病毒); 巨细胞病毒感染(巨细胞病毒); 登革热(登革热病毒(DEN-1, DEN-2, DEN-3和DEN-4)和其他黄病毒, 包括但不限于西尼罗河病毒(西尼罗河热), 黄热病病毒(黄热病); 寨卡病毒(寨卡热)和蜱传脑炎病毒; 埃博拉出血热(埃博拉病毒(EBOV)); 肠病毒感染(肠病毒种); 感染性红斑病(第五种病)(细小病毒B19); 幼儿急疹(Exanthem subitum)(第六种病)(人类疱疹病毒6(HHV-6)和人类疱疹病毒7(HHV-7)); 手足口病(HFMD)(肠病毒, 主要是柯萨奇A病毒和肠病毒71(EV71)); 汉坦病毒肺综合征(Hantavirus Pulmonary Syndrome, HPS)(Sin Nombre病毒); 甲型肝炎(甲型肝炎病毒); 乙型肝炎(乙型肝炎病毒); 丙型肝炎(丙型肝炎病毒); 丁型肝炎(丁型肝炎病毒); 戊型肝炎(戊型肝炎病毒); 单纯疱疹(单纯疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2)); 人博卡病毒感染(人博卡病毒(HBoV)); 人间质性肺炎病毒感染(人间质性肺炎病毒(hMPV)); 人乳头瘤病毒(HPV)感染(人乳头瘤病毒(HPV)); 人副流感病毒感染(人副流感病毒(HPIV)); 爱泼斯坦-巴尔病毒传染性单核细胞增多症(Mono)(爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)); 人流感病毒(甲型流感, 包括但不限于H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N9, 乙型流感和正黏病毒科的其他成员); 拉沙热(拉沙病毒); 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)); 马尔堡出血热(MHF)(马尔

堡病毒);麻疹(麻疹病毒);中东呼吸综合征(MERS)(中东呼吸综合征冠状病毒);传染性软疣(MC)(传染性软疣病毒(MCV));猴痘(猴痘病毒);流行性腮腺炎(流行性腮腺炎病毒);诺如病毒(Norovirus)(儿童和婴儿)(诺如病毒);脊髓灰质炎(脊髓灰质炎病毒);进行性多灶性白质脑病(JC病毒);狂犬病(狂犬病病毒);呼吸道合胞病毒感染(呼吸道合胞病毒(RSV));鼻病毒感染(鼻病毒);裂谷热(RVF)(裂谷热病毒);轮状病毒感染(轮状病毒);风疹(风疹病毒);带状疱疹(Shingles)(带状疱疹(Herpes zoster))(水痘带状疱疹病毒(VZV));天花(Smallpox)(天花(Variola))(大天花或小天花);亚急性硬化性全脑炎(麻疹病毒);委内瑞拉马脑炎(委内瑞拉马脑炎病毒);委内瑞拉出血热(瓜纳里托病毒);病毒性肺炎多种病毒。患有任何上述疾病或有患任何上述疾病的风险的受试者将从本文所述的组合物和方法中受益,并且在本发明的范围内。

[0080] 多顺反子疫苗构建体编码至少一种靶抗原并且包含多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码经修饰的靶抗原,其中所述经修饰的靶抗原包含靶抗原和至少一个决定所述抗原的加工和呈递的特定结构域的框内融合蛋白。在某些实施方式中,所述结构域包含去稳定化结构域(D.D.),溶酶体相关膜蛋白(LAMP)结构域和信号序列(s.s.)。在某些实施方式中,所述结构域可以包含D.D.结构域,LAMP结构域和信号序列(s.s.)的任何组合(例如,融合)。本发明的多顺反子疫苗构建体可包括但不限于任何数量的独立顺反子,例如,至少两个独立顺反子,两个独立顺反子,三个独立顺反子,三个独立顺反子,四个独立顺反子,独立顺反子,六个独立顺反子,七个独立顺反子,八个独立顺反子,九个独立顺反子,十个独立顺反子,十一个独立顺反子,十二个独立顺反子,十三个独立顺反子,十四个独立顺反子,十五个独立顺反子,独立顺反子,十六个独立顺反子,十七个独立顺反子,十八个独立顺反子,十九个独立的顺反子,二十个独立的顺反子或大于二十个独立的顺反子。本发明的多顺反子疫苗构建体所包含的特定结构域提供了有助于增强对靶抗原的免疫应答的特定功能特征。本发明提供的多顺反子疫苗构建体可包括但不限于修饰的靶抗原,其包含任何数目的特定结构域,包括在单个多顺反子构建体中的两个或更多个相同结构域(例如,两个D.D.结构域)。本发明提供的示例性多顺反子疫苗构建体显示在图1A-1E和2A-2E中,并说明了DNA疫苗构建体与mRNA疫苗构建体的设计差异。例如,用于DNA疫苗的多顺反子疫苗构建体包含合适的哺乳动物启动子,以允许编码的mRNA的转录(图1A-1E),而用于mRNA疫苗的多顺反子疫苗构建体包含一个编码区,其侧翼是对应于5'末端的5'7-甲基鸟苷三磷酸(m<sup>7</sup>G)帽和包括Kozak序列的5'非翻译区(5'UTR)以及3'末端的包括poly A尾的3'非翻译区(3'UTR),以及可选地3'-免疫增强元件(IE)的序列(图2A-2E)。IE序列可包含两个由小环状序列分隔的互补单链RNA。在某些实施方式中,所述IE序列包含跨越约50-5000个碱基对(bp)的3'-末端双链RNA。在某些实施方式中,所述IE序列为约50bp,约100bp,约200bp,约300bp,约400bp,约500bp,约1000bp,约2000bp,约3000bp,约4000bp,直至约5000bp。双链RNA可以包含polyG:C或polyA:U。在某些实施方式中,双链RNA是A,U,G,C的随机组合,其可以被优化为与任何内源哺乳动物RNA序列没有或几乎没有序列相似性。正如针对poly T序列报道的那样,IE序列很可能刺激树突细胞。

[0081] 用于MHC-1(CTL)活化的去稳定化结构域(D.D.):在本发明的某些实施方式中,在本发明提供的多顺反子疫苗构建体中,所选的(靶)抗原在氨基(-N)或羧基(-C)末端通过添加蛋白质去稳定化结构域而被修饰,该结构域通常是107个氨基酸序列,其赋予整个蛋白质

(与之融合的蛋白质)以不稳定性,有助于其快速蛋白质组学降解(proteosomal degradation)(Navarro,R.等人(2016)ACS Chem Biol.Aug19;11(8):2101-4)(Figure 3)(图3)。因此,D.D.中的任何引起去稳定化的突变均在本发明的范围内,并且可以用于疫苗设计中。筛选和/或识别蛋白质D.D.突变体的方法描述于例如Banaszynski等人,Cell,v126:995-1004;美国专利申请公开号20090215169和美国专利号8173792。在本发明范围内的示例性D.D.结构域可以包括但不限于:图3以及实施例1和5所示的D.D.序列;包含经历蛋白酶体介导的降解的野生型或突变型人蛋白,细菌蛋白或病毒蛋白(人蛋白避免不需要的免疫原性)的D.D.;包含从来自任何内源蛋白突变体库的筛选测定中鉴定的去稳定化序列的D.D.;包含人FKBP12的去稳定化突变体(例如,包括但不限于F15S,V24A,L30P,E60G,M66T,R71G,D100N,E102G,K105I,E107G,L106P突变及其任何组合)的D.D.;和衍生于已知的野生型蛋白,其通过蛋白酶体降解而被转化,例如包括但不限于细胞周期蛋白A,C,D和E的D.D.;包含I $\kappa$ B,其在被包括toll样受体激活的各种表面信号激活后经历磷酸化依赖性多泛素化和蛋白酶体介导的降解的D.D.;包含经历配体诱导的蛋白酶体介导的降解的野生型或突变型人蛋白质、细菌蛋白质或病毒蛋白质的D.D.。在某些实施方式中,经历配体诱导的蛋白酶体介导的降解的野生型或突变型人蛋白质、细菌蛋白质或病毒蛋白质是小分子配体的已知受体,并且该配体缀合至与E3泛素连接酶相互作用的化合物或衔接蛋白以诱导蛋白酶体介导的降解。在某些实施方式中,衔接蛋白是cereblon,与所述配体缀合的化合物是沙利度胺,泊马度胺,来那度胺或结构相关的化合物。在某些实施方式中,E3泛素连接酶是VHL,要缀合至配体的化合物是VHL结合小分子。与本文所述的任何D.D.结构域序列具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,或至少99%的核酸或氨基酸序列同一性的D.D.结构域也在本发明的范围内。

[0082] 表:示例性D.D.蛋白质

| D.D. 蛋白质  | Genbank 号   | 蛋白质号                              |
|---|---|-----------------------------------|
| FKBP12*   | HGNC: <a href="#">3711</a><br>Entrez Gene: <a href="#">2280</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000088832</a>                                 | UniProtKB: <a href="#">P62942</a> |
| 细胞周期蛋白 A  | HGNC: <a href="#">1578</a><br>Entrez Gene: <a href="#">890</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000145386</a><br>OMIM: <a href="#">123835</a>  | UniProtKB: <a href="#">P20248</a> |
| 细胞周期蛋白 B  | HGNC: <a href="#">1579</a><br>Entrez Gene: <a href="#">891</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000134057</a><br>OMIM: <a href="#">123836</a>  | UniProtKB: <a href="#">P14635</a> |
| 细胞周期蛋白 D1   | HGNC: <a href="#">1582</a><br>Entrez Gene: <a href="#">595</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000110092</a><br>OMIM: <a href="#">168461</a>  | UniProtKB: <a href="#">P24385</a> |
| 细胞周期蛋白 D2   | HGNC: <a href="#">1583</a><br>Entrez Gene: <a href="#">894</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000118971</a><br>OMIM: <a href="#">123833</a>  | UniProtKB: <a href="#">P30279</a> |
| 细胞周期蛋白 E1   | HGNC: <a href="#">1589</a><br>Entrez Gene: <a href="#">898</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000105173</a><br>OMIM: <a href="#">123837</a>  | UniProtKB: <a href="#">P24864</a> |
| 细胞周期蛋白 E2   | HGNC: <a href="#">1590</a><br>Entrez Gene: <a href="#">9134</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000175305</a><br>OMIM: <a href="#">603775</a> | UniProtKB: <a href="#">O96020</a> |
| I $\kappa$ B $\alpha$ (I-Kappa-B-Alpha)             | HGNC: <a href="#">7797</a><br>Entrez Gene: <a href="#">4792</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000100906</a><br>OMIM: <a href="#">164008</a> | UniProtKB: <a href="#">P25963</a> |
| I $\kappa$ B $\beta$ (I-Kappa-B-Beta)               | HGNC: <a href="#">7798</a><br>Entrez Gene: <a href="#">4793</a><br>Ensembl: <a href="#">ENSG00000104825</a><br>OMIM: <a href="#">604495</a> | UniProtKB: <a href="#">Q15653</a> |
| * 注: 野生型(天然存在的)FKBP12 不是 D. D. FKBP 需要突变才能转换为 D. D. |   |                                   |

[0085] 用于MHC-II (HTL) 活化的LAMP结构域: 在本发明的某些实施方式中, 在本发明提供的多顺反子构建体中, 通过编码溶酶体相关膜蛋白 (LAMP) 的腔内结构域中的抗原序列 (图4) 来修饰选择的 (靶) 抗原, 以运输到溶酶体区室, 在那里它与专业抗原呈递细胞的MHC-II

蛋白共定位,用于抗原呈递给辅助T细胞(HTL)。LAMP蛋白在August实验室中被首次鉴定(Chen, J.W. et al. (1985) *J. Cell Biol.* 101, 85-95; Chen, J.W. et al., (1986) *Biochem. Soc. Symp.* 51, 97-112; Guarnieri, F.G. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 1941-1946; Raviprakash, K. et al. (2001) *Virology* 290, 74-82; Lu, Y. et al. (2003) *Vaccine* 21, 2187-2198; Anwar, A. et al. (2005) *Virology* 332:66-77; Arruda, L.B. et al. (2006) *J. Immunol.* 177:2265-2275) (另见美国专利号为5,633,234的美国专利,其全部内容通过引用并入本文)。然后显示出在DNA疫苗中编码的作为LAMP嵌合体的抗原引起增强的HTL和抗体反应(Wu, T-C. 等人(1995) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 11671-11675; Rowell, J.F. 等人(1995) *J. Immunol.* 155:1818-1828; Ruff, A.L. 等人(1997) *J. Biol. Chem.* 272:85671-8678; Lu, Y. 等人(2003) *Vaccine*, 21, 2187-2198; Marques, E.T.A. Jr. 等人(2003) *J. Biol. Chem.*, 278:37926-37936; deArruda, L.B. 等人(2004) *Immunology* 112:126-33; Chikhlikar, P. 等人(2006) *PLoS One*, 1:e135; Yang, K. 等人(2009) *Gene Ther.* 16(11):1353-62; Godinho, R.M. 等人(2014) *PLoS One*. Jun 16; 9(6); Macile M. Jr. 等人(2015) *PLoS Negl Trop Dis.* 13; 9(4):e0003693. doi:10.1371/journal.pntd.0003693. eCollection Apr. 13)。如本文所用,“LAMP结构域”是指编码LAMP-1, LAMP-2, CD63/LAMP-3, DC-LAMP或任何溶酶体相关膜蛋白,或同源物,直系同源物,变体(例如,等位基因变体)和修饰形式(例如,包含一个或多个天然存在或工程改造的突变)的多核苷酸序列或多肽序列。在某些实施方式中,LAMP多肽是哺乳动物溶酶体相关膜蛋白,例如人或小鼠溶酶体相关膜蛋白。更一般地,“溶酶体膜蛋白”是指包含在内体/溶酶体区室或溶酶体相关细胞器的膜中发现的结构域的任何蛋白,其还包含腔内结构域。

[0086] 抗体:在本发明的某些实施方式中,在本发明提供的多顺反子构建体中,通过添加信号序列(s.s.)修饰选择的抗原,所述信号序列通常为约16-30个氨基酸(aa)长度,位于新合成蛋白质的N末端,其将抗原序列引导至分泌途径以增强抗体激活。信号序列在疫苗应用中的功能和用途已被广泛报道(Davis, B.S., 等人(2001) *J Virol.* May; 75(9):4040-7.) (图5)。本发明提供的示例性s.s.包含氨基酸序列MGKRSAGSIM WLASLAVVIA CAGA (SEQ ID NO: 3) (图5),保留了将抗原序列引导至分泌途径以增强抗体激活的能力的上述序列的变化(variation)、取代或修饰也在本发明的范围内。在某些实施方式中,s.s.的长度是约16个氨基酸,约17个氨基酸,约18个氨基酸,约19个氨基酸,约20个氨基酸,约21个氨基酸,约22个氨基酸,约23个氨基酸,约24个氨基酸,约25个氨基酸,约26个氨基酸,约27个氨基酸,约28个氨基酸,约29个氨基酸或约30个氨基酸。长度小于16个氨基酸或大于30个氨基酸的s.s.也在本发明的范围内,只要它们具有将抗原序列引导至分泌途径以增强抗体激活的能力即可。

[0087] 内部核糖体进入位点(IRES):在本发明的某些实施方式中,在本发明提供的多顺反子构建体中,通过添加内部核糖体进入位点(IRES),每个修饰的抗原序列作为独立的顺反子翻译,当内部核糖体进入位点存在于感兴趣的基因之间时,其介导翻译的内部起始(Holst, J. 等人(2006) *Nat Protoc.* 1(1):406-17)。因此,与使用不同质粒表达每个转基因相反,IRES序列允许设计多顺反子表达盒,以驱动由相同mRNA编码的几个基因的翻译,伴随稳定的转基因表达和恒定比例的目的蛋白质。在本发明提供的多顺反子构建体中有用的示例性IRES序列包括但不限于衍生自脑心肌炎病毒的核酸序列(图6)。

[0088] 在某些实施方式中,多顺反子构建体的每个独立的顺反子通过框内2A自剪切肽为基础的切割位点可操作地连接。示例性2A自剪切肽为基础的切割位点序列包括但不限于P2A(猪破伤风病-1 2A) (porcine teschovirus-1 2A), T2A(Thoseasigna病毒2A), E2A(马甲型鼻炎病毒(equine rhinitis A virus, ERAV) 2A), F2A(FMDV 2A))。见下表。

[0089] 表: 示例性自剪切肽的序列

|        |     |  |
|--------|-----|--|
| [0090] | T2A | (GSG)EGRGSLLTCTG DVEENPG↓P (SEQ ID NO:5)   |
|        | P2A | (GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPG↓P (SEQ ID NO:6)    |
|        | E2A | (GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPG↓P (SEQ ID NO:7)   |
|        | F2A | (GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPG↓P (SEQ ID NO:8) |
|        |     | * “切割”发生在C末端发现的甘氨酸和脯氨酸残基之间                 |
|        |     | ** (GSG)残基可以添加到肽的5'末端以提高切割效率               |

[0091] 在某些实施方式中,本发明提供的多顺反子疫苗构建体包含独立顺反子的不同的独特的组合(例如,两个独立的顺反子或三个独立的顺反子)。例如,本发明提供的多顺反子疫苗构建体可以包含两个独立的顺反子,其中第一顺反子编码修饰的抗原,该修饰的抗原编码与D.D结构域融合的靶抗原(在靶抗原的N末端或C末端融合),第二顺反子编码与LAMP结构域融合的修饰的靶抗原,或者第二顺反子编码与信号序列(s.s.)融合的修饰的抗原(融合在靶抗原的N末端或C末端)。图1A-1E(对于多顺反子DNA疫苗构建体)和图2A-2E(对于mRNA疫苗构建体)示出了说明独立顺反子的不同组合的示例性多顺反子构建体。

[0092] 宿主细胞

[0093] 根据本发明的核酸多顺反子疫苗构建体可以在多种宿主细胞中表达,所述宿主细胞包括但不限于:原核细胞(例如,大肠杆菌,葡萄球菌属,芽孢杆菌属);酵母细胞(例如,酵母属(Saccharomyces sp.));昆虫细胞;线虫细胞;植物细胞;两栖类细胞(例如非洲爪蟾);禽细胞;和哺乳动物细胞(例如,人类细胞,小鼠细胞,哺乳动物细胞系,原代培养的哺乳动物细胞,例如来自解剖组织的细胞)。可以使用任何本领域公认的方法将核酸多顺反子疫苗构建体引入细胞,包括但不限于病毒介导的基因转移,脂质体介导的转移,转化,转染和转导,例如病毒介导的基因转移(诸如使用基于DNA病毒(如腺病毒,腺相关病毒和疱疹病毒)的载体,以及基于逆转录病毒的载体)。

[0094] 核酸多顺反子疫苗构建体可以在从生物体分离的宿主细胞,作为生物体一部分的宿主细胞或引入生物体的宿主细胞中表达。在某些实施方式中,在体外(例如在培养物中)在宿主细胞中表达。在某些实施方式中,它们在包含体细胞和/或生殖细胞的转基因生物(例如,转基因小鼠,大鼠,兔,猪,灵长类动物等)中表达,所述体细胞和/或生殖细胞包含本发明的任何核酸。用于构建转基因动物的方法是本领域众所周知的并且是常规的。

[0095] 核酸多顺反子疫苗构建体也可以在体外,离体或体内引入细胞,例如干细胞,抗原呈递细胞(APC)诸如树突细胞,巨噬细胞,单核细胞,B细胞,人工产生的抗原呈递细胞,红细胞, $\gamma$   $\delta$ T淋巴细胞,造血细胞(骨髓细胞,例如嗜中性粒细胞,肥大细胞,嗜酸性粒细胞和淋巴细胞)和内皮细胞,或可以将其引入或直接施用于宿主生物。如本文所用,术语“抗原呈递细胞”包括在其表面上呈递与主要组织相容性复合物分子或其一部分,或可选地,一种或多种非经典MHC分子或其一部分相联合的抗原的任何细胞。合适的抗原呈递细胞的例子包括但不限于全细胞,诸如巨噬细胞,单核细胞,树突细胞,B细胞,人工产生的抗原呈递细胞,红细胞, $\gamma$   $\delta$ T淋巴细胞,杂交抗原呈递细胞(hybrid APC)和促进抗原呈递细胞(foster

antigen presenting cell)。相对于宿主生物,细胞可以是异源的或自体的。例如,可以从宿主生物获得细胞,将核酸载体体外引入所述细胞中,然后再重新引入宿主生物中。

[0096] 在抗原呈递细胞的上下文中,“分离的”或“纯化的”细胞群基本上不含与之自然相关的细胞和材料。基本不含或基本纯化的抗原呈递细胞是指至少50%的群体是抗原呈递细胞,优选至少70%,更优选至少80%,甚至更优选至少90%不含在自然中与它们相关的非抗原呈递细胞。

[0097] 适应性免疫应答

[0098] 如上所述,本发明提供的多顺反子疫苗构建体和包含其的疫苗组合物借助由LAMP, D.D. 和s.s. 结构域分别赋予的特定机能能够引发全部三种适应性免疫应答(CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T淋巴细胞(CTL), CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞(HTL)和抗体)的增强激活。本发明提供的多顺反子构建体的特殊设计赋予它们同时激活适应性免疫的所有三个方面的能力,并因此有利地增强了抗原特异性免疫应答。

[0099] 如本文所用,“免疫效应细胞”是指能够结合抗原并介导免疫应答的细胞。这些细胞包括但不限于T细胞, B细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, NK细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL), 例如CTL系, CTL克隆和来自肿瘤、炎性或其他浸润物的CTL。

[0100] 如本文所用,“增强的适应性免疫应答”或“增强的抗原特异性疫苗接种”定义为对由本发明提供的疫苗构建体(嵌合/融合构建体和多顺反子疫苗构建体)编码的特定靶抗原的体液和/或细胞应答的增加,例如通过定性或定量地确定的一种或多种免疫效应物诸如细胞因子(例如白介素-2(IL-2), 穿孔素, 粒酶B, 干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ), 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白介素4(IL-4), 白介素5(IL-5), 白介素6(IL-6)和白介素10(IL-10))的产生的增加,或者抗原特异性CD8<sup>+</sup>细胞溶解性T淋巴细胞(CTL), 抗原特异性CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞(HTL)和抗原特异性抗体的产生或其组合的数量的增加。

[0101] 适应性免疫系统是在脊椎动物中发现的两种主要免疫学策略之一(另一种是先天免疫系统)。适应性免疫力在对特定病原体的初始应答后会产生免疫记忆,并导致对随后与该病原体的接触的增强的应答。获得性免疫力的这一过程是疫苗接种的基础。像先天系统一样,适应性系统包括体液免疫组分和细胞介导的免疫组分。与先天免疫系统不同,适应性免疫系统对特定抗原(例如病原体)具有高度特异性。对于某些抗原,适应性免疫可以提供长期的保护。

[0102] 两个主要方面构成了哺乳动物的适应性免疫系统:体液和细胞系统。体液免疫是由一类专门的淋巴细胞(B细胞)分泌到体液中的可溶性蛋白分子(抗体)介导的。抗体分子的可变(多态性)部分在可溶相中直接与天然和变性抗原(具有多样化化学组成)结合。相反,细胞免疫是由不同种类的淋巴细胞(T细胞)介导的,其仅识别已经在细胞内加工(部分消化)并在抗原呈递细胞(APC)的细胞表面呈递的细胞相关蛋白抗原(在主要组织相容性复合物(MHC)糖蛋白的情形下)。

[0103] 当正确类型的效应因子功能在正确的时间在生物体中“外源”抗原的出现部位以足够的强度递送时,会产生特异性的保护性免疫反应。识别抗原的T淋巴细胞可能表达大量的效应因子分子,例如细胞因子。特定的抗原刺激的克隆仅表达大的潜在库中的一小部分效应分子,即,在特定的T淋巴细胞克隆中仅表达有限的一组效应因子功能,而不产生大多数效应分子。因此,T细胞的特定功能表型以克隆的方式分布(clonally distributed)。该

已知发现对疫苗设计非常重要,因为抗原的制备及其递送方式会严重影响其引发的免疫应答的类型。取决于疫苗接种的方式,用相应病原体天然攻击接种宿主可能会导致稳定的保护或导致疾病和免疫病理的恶化。

[0104] 细胞免疫系统:T细胞系统由两个亚组组成,这两个亚组的表面标志物表达和功能表型以及将抗原性肽呈递给各个T细胞亚组的MHC分子的限制性类别不同。 $CD8^+$ 杀伤性(细胞毒性)T淋巴细胞(CTL)在MHC I类分子的环境下识别抗原,通常具有细胞毒性,并表达干扰素 $\gamma$ 。 $CD4^+$ 辅助T细胞(HTL)在MHC II类分子的环境下识别抗原,表达不同的细胞因子谱(profile),对于帮助CTL活性和抗体产生很重要。I类细胞溶解性T细胞应答发生在所有有核细胞中,并且是MHC I类蛋白质结合细胞蛋白的蛋白质体片段(proteosomal fragments)并将这些序列呈递给细胞溶解性T细胞的结果。MHC II类蛋白质存在于专门的抗原呈递细胞(树突细胞,巨噬细胞,吞噬细胞,B细胞)中,并将这些细胞中蛋白质的蛋白体片段呈递给 $CD4^+$ 辅助T细胞。

[0105] 在MHC中编码的膜糖蛋白控制T细胞的特异性活化。T细胞不识别天然抗原,但对多态性MHC分子在抗原呈递细胞(APC)表面呈递的蛋白质抗原的肽片段作出应答。蛋白质抗原的加工对于特异性刺激T细胞来说是必需的。蛋白抗原的细胞内加工的不同途径控制着 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞应答的激活。在外源(exogenous)加工途径中,细胞外蛋白抗原被APC内吞并在专门的体内区室(endosomal compartment)中被酸性蛋白水解部分降解为12至15个残基的肽。这些肽以单体型特异性(haplotype-specific)结合到MHC II类分子,然后运送到抗原呈递细胞的表面。在此途径中加工的可溶性蛋白抗原优先引发MHC II类限制性 $CD4^+$ T细胞应答。MHC I类限制性 $CD8^+$ T细胞应答受到在替代内源加工途径中加工的蛋白质抗原的刺激。在此途径中,源自胞浆蛋白质的抗原性肽通过肽转运复合物转运到内质网(ER)腔中,在那里与新生的MHC I类重链/ $\beta_2m$ 微球蛋白二聚体结合。这会生成三聚体的、具有运输能力的MHC I类复合物,这些复合物会通过默认分泌途径快速移动到抗原呈递细胞表面。因此,源自外源或内源来源的蛋白抗原在两种替代途径中被加工,用于抗原肽的MHC限制性呈递给T细胞。

[0106] 递送和施用

[0107] 在某些实施方式中,可以将本发明的核酸疫苗构建体配制成疫苗组合物。如本文所用,术语“疫苗组合物”包括包含本文提供的任何多顺反子疫苗构建体(DNA, RNA, 蛋白肽)的组合物,其编码至少一种需要免疫应答的靶抗原,其中所述构建体包含可操作地连接至单个启动子(以5'至3'方向)的多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码修饰的靶抗原,该靶抗原包含靶抗原和至少一个决定抗原的加工和呈递的特定结构域的框内融合蛋白。疫苗组合物可任选地包含可用于在宿主(受试者)中诱导免疫应答的药学上可接受的载体。在一些实施方式中,本发明的疫苗和疫苗组合物作为“多价疫苗”提供。在本文中,术语“多价”是指编码两种或更多种不同抗原或修饰的抗原(例如,包含来自不同来源的两种或更多种不同多核苷酸或多肽,例如两种不同肿瘤抗原或病原体衍生抗原的融合)的疫苗构建体,或包含两种或更多种本发明的不同的多顺反子构建体、以混合物形式共同施用的疫苗组合物。可以通过本文所述的任何方法或递送途径,包括经由纳米颗粒系统的递送,来施用多价疫苗构建体。在疫苗组合物为RNA疫苗形式的某些实施方式中,RNA疫苗是通过DNA载体进行体外转录,然后对RNA进行5'-加帽来制备的。在疫苗组合物为RNA疫苗形式的某些

实施方式中, RNA由化学修饰的核苷酸构件(block)制成以增强稳定性和体内细胞摄取。在某些实施方式中, 本发明的DNA或RNA疫苗组合物可以编码多种不同的DNA或RNA抗原, 并且可以作为混合物共同施用。如本文所用, 术语“药学上可接受的载体(carrier)”和“药学上可接受的运载体”是可互换的, 指用于包含疫苗抗原的运载体(例如, 流体, 脂质, 或颗粒, 病毒和细菌载体), 其可以引入宿主而没有不利影响。本领域已知的合适的药学上可接受的载体包括但不限于无菌水, 盐溶液, 葡萄糖(glucose), 右旋糖(dextrose)或缓冲溶液, 病毒和细菌载体。载体可包括辅助剂, 包括但不限于稀释剂, 稳定剂(例如糖和氨基酸), 防腐剂, 湿润剂, 乳化剂, pH缓冲剂, 增粘添加剂, 色素(color)等。可以咨询标准药物文本, 例如1990年的Remington's Pharmaceutical Science以制备合适的制剂, 而无需进行过多的实验。本发明提供的疫苗组合物可以按照医学或兽医领域技术人员公知的剂量和技术施用, 并考虑诸如受体动物的年龄, 性别, 体重, 种类和状况等因素。本发明的疫苗组合物可以通过多种途径施用, 包括但不限于皮下, 肌内, 静脉内, 鼻内或皮内施用。

[0108] 要引入疫苗接受者中的可表达DNA或转录RNA的量可以根据所使用的转录和翻译启动子的强度而变化。另外, 免疫应答的强度可以取决于蛋白质表达的水平 and 所表达的基因产物的免疫原性。通常, 将有效剂量范围约为1ng至5mg, 100ng至2.5mg, 1 $\mu$ g至750 $\mu$ g和约10 $\mu$ g至300 $\mu$ g的DNA直接施用于身体组织, 例如肌肉或皮肤组织。静脉内施用DNA的示例性剂量是约 $10^6$ - $10^{22}$ 个拷贝的DNA分子。皮下注射, 皮内引入, 通过皮肤的压印(impression through the skin)以及其他施用方式诸如腹膜内, 静脉内或吸入递送也是合适的。例如, 使用基因枪施用DNA, 例如使用氦驱动的基因枪进行基因枪颗粒介导的DNA疫苗接种。用同样的方式施用加强疫苗接种(booster vaccination)。用核酸疫苗接种后, 还可通过施用肽或蛋白质免疫原来增强免疫应答。

[0109] 核酸可以裸露施用, 即与影响受体免疫系统的任何蛋白质, 佐剂或其他试剂不相关联。裸露的DNA在生理可接受的溶液中施用, 诸如无菌盐水(sterile saline)或无菌缓冲盐水(sterile buffered saline)。或者, DNA可以与脂质体诸如卵磷脂脂质体结合或作为DNA-脂质体混合物。也可以使用辅助DNA的细胞吸收的试剂(即转染促进剂), 例如钙离子。用多核苷酸包被的微粒也可用作施用疫苗的手段。在某些实施方式中, 将本文所述的多顺反子疫苗构建体(DNA和RNA)配制成纳米颗粒并通过纳米颗粒递送。预期在本发明范围内的示例性纳米颗粒包括但不限于脂质纳米颗粒(LNP)和改性的树枝状聚合物纳米颗粒(modified dendrimer nanoparticle)(MDNP)。制备纳米颗粒的方法是本领域已知的, 并且可用于提供根据本发明的疫苗制剂。参见, 例如, Oberli M.A.等人(2017) Nano Lett. Mar 8;17(3):1326-1335;Chahal, J.S.等人(2017) Sci Rep. Mar 21;7(1):252;Farris E.等人(2016) Exp Biol Med (Maywood), May;241(9):919-29。由即时感染提供的DNA疫苗也可以使用病毒载体(例如, 腺病毒, 慢病毒,  $\gamma$ -逆转录病毒)和细菌载体(例如, 单核细胞增生李斯特菌, 鼠伤寒沙门氏菌)递送给受试者。

[0110] RNA疫苗

[0111] 在某些实施方式中, 本发明提供了mRNA疫苗和基于mRNA的细胞疫苗。这包括将mRNA疫苗直接递送到人类受试者中, 或将mRNA转染到树突细胞(DC), B细胞, 嗜中性粒细胞, 外周血单核细胞和任何其他细胞群中。

[0112] 在某些实施方式中, 本发明提供的mRNA疫苗是通过从本文所述的任何多顺反子疫

苗构建体(图2A-2E)或任何融合构建体(图14A-D)进行体外转录制备的。在某些实施方式中,通过对任何多顺反子疫苗DNA(转录)构建体进行体外转录,然后对RNA进行5'-加帽来制备RNA疫苗。在某些实施方式中,可以通过完全的体外化学合成来制备mRNA疫苗(例如,合成的mRNA)。在某些实施方式中,RNA疫苗由化学修饰的核苷酸构件制成,以增强稳定性和细胞摄取。

[0113] 基于树突细胞(DC)的疫苗接种是诱导宿主抗肿瘤免疫力的重要方法,并且在治疗某些肿瘤方面已经显示出有希望的临床功效。然而,在癌症治疗中使用树突细胞疫苗的大多数临床试验仅显示出有限的功效,表明需要增强树突细胞疫苗抗原呈递。有效诱导抗肿瘤T细胞应答需要树突细胞疫苗有效地呈递肿瘤相关抗原(TAA)和/或肿瘤特异性抗原(TSA),包括新抗原。本发明提供的多顺反子疫苗构建体被设计成增强树突细胞抗原呈递,以增强抗肿瘤特异性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞应答。用上述设计的表达肿瘤抗原(TAA,TSA,新抗原)的DNA, RNA, 或病毒和细菌载体转染/感染的树突细胞疫苗可通过多种途径(例如静脉内(IV), 肌内(IM), 皮内(ID), 皮下(S.C.), 瘤内或鼻内途径)施用给患者。该方法不限于特定的靶抗原,而适用于任何抗原。

[0114] 在某些实施方式中,本发明提供的mRNA疫苗可以直接递送给患者或通过mRNA疫苗体外转染/电穿孔到患者来源的树突细胞(即自体树突细胞)中,然后再将转染的细胞重新引入患者体内。在某些实施方式中,在将mRNA疫苗施用于患者(静脉内或其他途径)之前,将其加工成纳米颗粒。另外,在两种情况下,疫苗的施用可以通过同时施用免疫佐剂(例如polyI:C, polyIC-LC, CpG和其他TLR配体)来进一步补充,特别是对于mRNA纳米颗粒,以进一步增强抗原呈递。

[0115] 在本发明的某些实施方式中,树突细胞由其自体前体组成,例如外周血单核细胞(PBMC)衍生的单核细胞。在补充了GM-CSF和IL-4的生长培养基(例如CellGro, AIM-V)中培养3-6天后,单核细胞被转分化为未成熟的树突细胞。在本发明的某些实施方案中,未成熟的树突细胞在加载时或加载后成熟。

[0116] 在某些实施方式中,本发明的树突细胞是基于来自人类受试者外周血的自体树突细胞的扩增。通过白细胞去除术收集外周血单核细胞,然后淘析(elutriation)或梯度离心(即Ficoll梯度离心),以增加构成所选树突细胞前体的单核细胞(Mo)级分。这种从个体获得单核细胞的方法确保了高纯度和大量的树突细胞前体,因此可以立即进行培养,而无需中间步骤。此后,在符合GMP的实验室中,用培养基将单核细胞分化为树突细胞,使其不含血清。

[0117] 在某些实施方式中,本发明提供了制备载有mRNA的树突细胞的方法,该方法包括以下步骤:(a)提供树突细胞细胞;和(b)用从本发明提供的多顺反子核酸载体构建体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类转染未成熟的树突细胞。在一些方面,本发明提供了增强疫苗诱导的T淋巴细胞应答的方法,该方法包含向有此需要的受试者施用包含分离的树突细胞的组合物,该树突细胞包含从本发明提供的多顺反子核酸构建体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类。在其他方面,本发明提供了增强疫苗诱导的T淋巴细胞应答的方法,该方法包含向有此需要的受试者施用包含第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞的组合物,所述第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞各自包含从本发明提供的多顺反子疫苗构建体或核酸构建体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类。在特定方面,

第一和第二分离的树突细胞包含本发明提供的不同的信使RNA (mRNA) 种类或核酸构建体。在某些实施方式中,可以将编码抗原的mRNA直接递送给患者。在某些实施方式中,并入DNA编码抗原表达盒/构建体的病毒载体(例如,腺病毒,慢病毒, $\gamma$ -逆转录病毒)或细菌载体(例如,单核细胞增生性李斯特菌,鼠伤寒沙门氏菌)也可用于将抗原递送至树突细胞或直接给患者。

[0118] 在本发明的某些实施方式中,当树突细胞仍然不成熟时,对它们装载核酸分子,随后通过添加一种目前可用的标准混合物(例如Ribomunyl, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2或其组合)的方法使其成熟。通过不同方式(包括电穿孔,脂质体介导的转染,病毒或细菌介导的转导等)加载足够的抗原后,将成熟的树突细胞注入患者体内。可以通过本领域已知的方法(诸如RT-PCR,蛋白质印迹分析和流式细胞术)测量加载的树突细胞中的抗原表达水平。

[0119] 在某些实施方式中,本发明提供了基于mRNA的肿瘤疫苗或包含根据本发明制备的树突细胞的树突细胞疫苗。基于mRNA的疫苗或树突细胞制剂可用于治疗或预防几乎任何类型的癌症/肿瘤。

[0120] 在本发明的某些实施方式中,树突细胞制剂的施用可以伴随免疫刺激剂和/或佐剂的施用。例如,疫苗的施用可以通过同时施用免疫佐剂(包括polyI:C, polyIC-LC和CpG)来进一步补充,特别是对于mRNA纳米颗粒,以进一步增强抗原呈递。

[0121] 肽和蛋白质疫苗

[0122] 在某些实施方式中,肽或多肽从本文所述的任何多顺反子疫苗构建体表达,并且可以用于本文所述的任何方法。本文设计的所有编码传染性和病理性抗原的疫苗构建体(例如但不限于甲型和乙型流感病毒,HPV, HIV)将在体内以肽和/或多肽形式产生翻译产物。以流感为例,疫苗是使用高度保守的HA序列(具有全长M1, M2和NS1序列)作为靶抗原来设计的,翻译产物是编码这些高度保守的HA, M1, M2和NS1序列的多肽。本发明提供的疫苗可以通过本领域公认的任何递送途径递送,包括但不限于口服,肌内(IM),腹膜内(IP),静脉内(IV)途径或通过电穿孔。

[0123] 方法

[0124] 在一些方面,本发明提供了在受试者中调节免疫应答的方法,该方法包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在一些方面,本发明提供了用于在受试者中提供增强的抗原特异性疫苗接种的方法,其包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在一些方面,本发明提供了诱导针对衍生自病原体、人自身蛋白或恶性肿瘤的靶抗原的治疗性免疫应答的方法,其包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体或疫苗组合物。在一些方面,本发明提供了用于预防和/或治疗有需要的受试者中的癌症的方法,其包含施用本发明提供的任何多顺反子疫苗构建体,疫苗组合物或树突细胞(即细胞疗法/细胞免疫疗法)。在整个说明书中阐述了本发明提供的其他方法。

[0125] 在本文中可互换使用的术语“受试者”或“个体”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括例如人,家畜,农场动物以及动物园动物(zoo),竞技动物(sport)或宠物,诸如狗,猫,豚鼠,兔子,大鼠,小鼠,马,牛(cattle)和奶牛(cow)。

[0126] 术语“治疗”(treat)或“治疗”(treatment)是指治疗处理(therapeutic treatment)和预防性或防护性措施(prophylactic or preventative measure),其中目的

是预防或减缓(减轻)不希望的生理变化或病症,诸如癌症的发展或扩散。有益或期望的临床结果包括但不限于症状缓解,疾病程度减轻,疾病状态稳定(即不恶化),疾病进展延迟或减慢,疾病状态改善或减轻,以及缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可以指与未接受治疗的预期生存期相比延长生存期。需要治疗的那些包括已经具有该病症(condition)或疾病的个体以及易于或处于具有该病症或疾病的风险的或要预防该病症或疾病的。这些治疗类型或患者类型中的任何一种也可以排除在外。

[0127] 如本文所用,“有效量”是足以实现有益或期望结果的量,例如,诸如核酸转移和/或表达的有效量,期望的效应子分子(例如,细胞因子)的表达的有效量,和/或达到所期望的治疗终点(例如,肿瘤大小的部分或全部减少)的有效量。有效量可以在一次或多次施用、应用或剂量中施用。一方面,多顺反子核酸构建体的有效量是足以转化/转导/转染包含至少两个细胞的细胞群中的至少一个细胞的量。

[0128] 如本文所用,“治疗有效量”用于指足以预防,校正和/或正常化异常生理反应或期望反应(例如,增强的适应性免疫应答)中的可测量改善的量。一方面,“治疗有效量”是足以减少至少约30%,至少50%,至少70%,至少80%或至少90%的病理学临床显著特征的量,例如肿瘤块的大小,抗体产生,细胞因子产生,减少病原体(例如病毒)负载,发烧或白细胞计数。

[0129] 在本文中,术语“癌症”、“瘤”(neoplasm)和“肿瘤”可互换使用,并且单数或复数形式均指经历了使其对宿主生物具有病理性的恶性转化的细胞。原位癌细胞转化使它们对宿主生物具有病理性。通过成熟的技术,特别是组织学检查,可以容易地将原位癌细胞(即从恶性转化位点附近获得的细胞)与非癌细胞区分开。如本文所用,癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞,而且包括衍生自癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞,以及体外培养物和衍生自癌细胞的细胞系。当提到通常表现为实体瘤的癌症类型时,“临床可检测”的肿瘤是基于肿瘤块可检测的肿瘤,例如,通过诸如CAT扫描,MR成像,X射线,超声或触诊等程序,和/或由于可从患者获得的样品中一种或多种癌症特异性抗原的表达而可检测到。

[0130] 将从本文描述的方法中受益的受试者包括但不限于患有下述或有发展成或患有下述的风险的受试者:胶质母细胞瘤,膀胱癌,乳腺癌,卵巢癌,胰腺癌和胃癌,宫颈癌,结肠癌,子宫内膜癌,头颈癌,肺癌,黑色素瘤,多发性骨髓瘤,白血病,非霍奇金淋巴瘤,前列腺癌,直肠癌,恶性黑色素瘤,消化道/胃肠道癌,肝癌,皮肤癌,淋巴瘤,肾癌,肌肉癌,骨癌,脑癌,眼癌,直肠癌,结肠癌,宫颈癌,膀胱癌,口腔癌,良性和恶性肿瘤,胃癌,子宫体,睾丸癌,肾癌,喉癌,急性淋巴细胞性白血病,急性髓性白血病,尤因肉瘤,卡波西肉瘤,基底细胞癌和鳞状细胞癌,小细胞肺癌,绒毛膜癌,横纹肌肉瘤,血管肉瘤,血管内皮瘤,威尔姆斯瘤,神经母细胞瘤,口腔/咽癌,食道癌,喉癌,神经纤维瘤,结节性硬化症,血管瘤和淋巴管生成。

[0131] 实施例

[0132] 现在参考以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅出于说明的目的,本发明不限于这些实施例,而是涵盖由于本文提供的教导而显而易见的所有变化。

[0133] 实施例1

[0134] 设计成用于增强针对病原体和恶性肿瘤抗原的适应性免疫应答的激活的核酸多顺反子疫苗构建体

[0135] 对于示例性DNA疫苗如图1A-1E所示或对于示例性mRNA疫苗(例如,TRIVAC™疫苗)

如图2A-2E所示设计核酸疫苗构建体。

[0136] 如图1A-1E和2A-2E所示,将由优化密码子编码并由多顺反子元件IRES和/或自剪切肽2A连接的修饰的靶抗原整合到DNA疫苗的表达框架中。为了制备卵清蛋白TriVac构建体,化学合成了编码具有N末端mLAMP腔内结构域和跨膜和细胞质尾、C末端去稳定化结构域、IRES片段、分泌的卵清蛋白结构域的卵清蛋白融合体的DNA序列。通过MluI、BamHI、MunI和NotI限制性位点以LAMP/OVA、IRES、D.D./OVA、IRES、s.s.OVA的顺序将所有DNA片段连接到p43载体中。p43载体描述于:Yang等人,(2009)Gene Ther.Nov;16(11):1353-62,和Kessler,P.D.等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA;93:14082-14087.mLAMP-OVA,D.D.-OVA和s.s.-的序列如下所示。

[0137] mLAMP-OVA (SEQ ID NO:9) (mLAMP腔内和TM/cyt尾的序列用下划线标示;OVA的序列用斜体标示)

10 20 30 40 50 60  
MAAPGARRPL LLLLLAGLAH GASALFEVKN NGTTCIMASF SASFLT<sup>T</sup>TYET ANGSQIVNIS

70 80 90 100 110 120  
LPASAEVLKN GSSCGKENVS DPSLTITFGR GYLLTLNFTK NTTRYSVQHM YFTYNLSDTE

130 140 150 160 170 180  
HFPNAISKEI YTMDSTTDIK ADINKAYRCV SDIRVYMKNV TVVLRDATIQ AYLSSGNFSK

[0138]

190 200 210 220 230 240  
EETHCTQDGP SPTTGPPSPS PPLVPTNPTV SKYNVTGNNG TCLLASMALQ LNITYLKKDN

250 260 270 280 290 300  
KTVTRAFNIS PNDTSSGSCG INLVTLKVEN KNRALELQFG MNASSSLFFL QGVRLNMTLP

310 320 330 340 350 360  
DALVPTFSIS NHSLKALQAT VGNSYKCNTE EHIFVSKMLS LVFVSVQVQA FKVDSDFGS

370 380 390 400 410 420  
VEECVQDGNN *VDMGSIGAAS* *MEFCFDVFKE* *LKVHHANENI* *FYCPIAIMSA* *LAMVYLGAKD*

430 440 450 460 470 480  
*STRTQINKVV* *RFDKLPFGFD* *SIEAQCGTSV* *NVHSSLRDIL* *NQITKPNDVY* *SFSLASRLYA*

490 500 510 520 530 540  
*EERYPILPEY* *LQCVKELYRG* *GLEPINFQTA* *ADQARELINS* *WVESQTNGII* *RNVLQPSSVD*

550 560 570 580 590 600  
*SQTAMVLVNA* *IVFKGLWEKA* *FKDEDTQAMP* *FRVTEQESKP* *VQMMYQIGLF* *RVASMASEKM*

[0139]

610 620 630 640 650 660  
*KILELPPFASG* *TMSMLVLLPD* *EVSGLEQLES* *IINFEKLT EW* *TSSNVMEERK* *IKVYLPRMKM*

670 680 690 700 710 720  
*EKYNLTSVL* *MAMGITDVFS* *SSANLSGISS* *AESLKISQAV* *HAAHAEINEA* *GREVVGSAAE*

730 740 750 760 770 780  
*GVDAASVSEE* *FRADHPFLFC* *IKHIATNAVL* *FFGRCVSPTS* MLIPIAVGGA LAGLVLIVLI

790  
AYLVGRKRSH AGYQTI

[0140] D.D. -OVA (SEQ ID NO:10) (D.D.的序列用下划线标示;OVA的序列用斜体标示)

10 20 30 40 50 60  
*MGSIGAASME* *FCFDVFKELK* *VHHANENIFY* *CPIAIMSALA* *MVYLGAKDST* *RTQINKVVRF*

70 80 90 100 110 120  
*DKLPGFGDSI* *EAQCGTSVNV* *HSSLRDILNQ* *ITKPNDVYSF* *SLASRLYAEE* *RYPILPEYLQ*

130 140 150 160 170 180  
*CVKELYRGGL* *EPINFQTAAD* *QARELINSWV* *ESQTNGIIRN* *VLQPSSVDSQ* *TAMVLVNAIV*

[0141]

190 200 210 220 230 240  
*FKGLWEKAFK* *DEDTQAMPFR* *VTEQESKPVQ* *MMYQIGLFRV* *ASMASEKMKI* *LLELPPFASGTM*

250 260 270 280 290 300  
*SMLVLLPDEV* *SGLEQLESII* *NFEKLT EWTS* *SNVMEERKIK* *VYLPRMKMEE* *KYNLTSVLMA*

310 320 330 340 350 360  
*MGITDVFS* *ANLSGISSAE* *SLKISQAVHA* *AHAEINEAGR* *EVVGSAAEAGV* *DAASVSEEFR*

370 380 390 400 410 420  
 ADHPFLFCIK HIATNAVLFF GRCVSPEFGV QVETISPGDG RTFPKRGQTC VVHYTGMLGD  
 [0142] 430 440 450 460 470 480  
 GKKVDSSRDR NKPFKFMLGK QEVIRGWEEG VAQMSVGQGA KLTISPDYAY GATGHPGIIP  
 490  
 PHATLVFDVE LLELE

[0143] s.s.-OVA(SEQ ID NO:11) (s.s.的序列用下划线标示;OVA的序列用斜体标示)

10 20 30 40 50 60  
 MGKRSAGSIM WLASLAVVIA CAGACTMGSI GAASMEFCFD VFKELKVHHA NENIFYCPIA  
 70 80 90 100 110 120  
 IMSALAMVYL GAKDSTRTOI NKVVRFDKLP GFGDSIEAQC GTSVNVHSSL RDILNQITKP  
 130 140 150 160 170 180  
 NDVYSFSLAS RLYAEERYPI LPEYLQCVKE LYRGGLEPIN FQTAADQARE LINSWVESQT  
 [0144] 190 200 210 220 230 240  
 NGIIRNVLQP SSVDSQTAMV LVNAIVFKGL WEKAFKDEDT QAMPFRVTEQ ESKPVQMMYQ  
 250 260 270 280 290 300  
 IGLFRVASMA SEKMKILELP FASGTMSMLV LLPDEVSGLE QLESIINF EK LTEWTSSNVM  
 310 320 330 340 350 360  
 EERKIKVYLP RMKMEEKYNL TSVLMAMGIT DVFSSSANLS GISSAESLKI SQAVHAAHAE  
 370 380 390 400 410  
 INEAGREVVG SAEAGVDAAS VSEEFRADHP FLFCIKHIAT NAVLFFGRCV SP

[0145] 实施例2

[0146] 含卵清蛋白抗原的TRIVAC<sup>TM</sup>疫苗构建体的小鼠模型研究

[0147] 用编码卵清蛋白(OVA)抗原的TRIVAC<sup>TM</sup>疫苗进行的小鼠免疫用于比较对TRIVAC<sup>TM</sup>疫苗的免疫应答与对其他卵白蛋白单独和其他DNA疫苗构建体的免疫应答。

[0148] 免疫和脾细胞的分离和刺激:6-8周龄的雌性Balb/c小鼠(Jackson实验室),每组4只小鼠,分别在第1天和第15天肌内(I.M.)免疫两次,每次为每种构建体50 $\mu$ g,在50 $\mu$ l体积中,如图1A-1E所示。在第28天,在培养基(RPMI-1640中添加10%v/v胎牛血清,100U/ml青霉素/链霉素,2mM L-谷氨酰胺,50 $\mu$ M 2-巯基乙醇和0.01M HEPES缓冲液)中分离来自每只小鼠的脾细胞。通过ACK裂解缓冲液(Quality Biological)清除单细胞悬液中的红细胞,并将其以每ml  $1 \times 10^7$ 个细胞重悬于RPMI培养基中。对免疫小鼠的免疫应答以每孔 $1 \times 10^7$ 个脾细胞进行刺激试验,其中脾细胞在12孔板(Corning)中用单独培养基或终浓度为20ug/ml的卵清蛋白培养。在5%CO<sub>2</sub>中于37 $^{\circ}$ C孵育5天后收集培养上清液,以检测分泌的细胞因子,如通过ELISA试剂盒(Invitrogen)按照标准的、推荐的ELISA方案进行测量的。

[0149] 用OVA、LAMP/OVA、D.D./OVA作为单一、混合和IRES多顺反子构建体免疫的小鼠的细胞因子应答。对用以下七种不同疫苗构造免疫的小鼠,通过ELISA测定法对细胞因子应答(IFN  $\gamma$ , 粒酶B, IL-2, IL-10, IL-4, IL-5和IL-6)进行了测量:(1) s.s.OVA(分泌的OVA); (2) LAMP/OVA; (3) D.D./OVA; (4) LAMP/OVA和D.D./OVA的混合物; (5) LAMP/OVA, D.D./OVA和s.s.OVA的混合物; (6) LAMP/OVA-IRES-D.D./OVA的多顺反子构建体; (7) LAMP/OVA-IRES-D.D./OVA-IRES-s.s.OVA的多顺反子构建体。

[0150] ELISA测定结果表明,对于疫苗6和7(两种连接的构建体组)和疫苗4和5(两个DNA混合物组),所有七种细胞因子(IL-2, IFN  $\gamma$ , 粒酶B, IL-10, IL-4, IL-5和IL-6)都高水平产生。LAMP/OVA触发了IFN  $\gamma$  以及IL-5的强劲产生(图8和图13)。D.D./OVA有最高水平的IL-2分泌(图7),其他细胞因子(IFN  $\gamma$ , 粒酶B, IL-10, IL-4, IL-5和IL-6)的应答较低。对于IFN  $\gamma$  和粒酶B观察到对单个构建体(LAMP/OVA)的最高应答。值得注意的是,多顺反子构建体LAMP/OVA-IRES-D.D./OVA-IRES-s.s.OVA产生了多种细胞因子(IL-2, IFN  $\gamma$ , 粒酶B, IL-6和IL-4)的高应答。

[0151] 总的来说,多顺反子构建体LAMP/OVA-IRES-D.D./OVA-IRES-s.s.OVA导致辅助T淋巴细胞(HTL)和细胞溶解性T淋巴细胞(CTL)应答显著加宽,表明多顺反子构建体(CTL, HTL和抗体)将是免疫治疗应用中最有效的疫苗候选物。

[0152] 实施例3

[0153] 增强人树突细胞疫苗诱导的T淋巴细胞应答的构建体

[0154] 树突细胞(DC)是最有效的专门的抗原呈递细胞,能够通过引发T淋巴细胞来启动适应性免疫应答。基于树突细胞的疫苗接种是诱导宿主抗病毒和抗肿瘤免疫力的重要方法,并且在治疗某些肿瘤方面已显示出有希望的临床疗效(De Vleeschouwer, S.等人(2008) Clin Cancer Res. 14(10):3098-3104; Yu, J.S.等人(2004) Cancer Res. 64(14):4973-4979; Cho, D.Y.等人(2012) World Neurosurg. 77(5-6):736-744; Mitchell, D.A.等人(2015) Nature. 519(7543):366-369; Bol, K.F.等人(2015) Oncoimmunology. 4(8):e1019197; Jadidi-Niaragh, F.等人(2017) J. Control. Release. 246:46-59)。然而,尽管已报道了抗原特异性免疫应答,但这些应答的持续时间和强度通常较弱,目标临床应答也受到限制(Elster, J.D.等人(2016) Hum Vaccin Immunother. 12(9):2232-2239; Pajtasz-Piasecka, E.等人(2010) Immunotherapy-UK 2(2):257-268; Kyte, J.A.等人(2016) Oncoimmunology 5(11):e1232237。高抗原呈递效率对于有效的树突细胞疫苗是必要的,那样它才可以诱导强的T细胞应答。设计了与巨细胞病毒pp65抗原连接的D.D.结构域和LAMP结构域构建体。证明了这种新型疫苗构建体可以增强树突细胞抗原呈递并体外诱导强抗原特异性T细胞。

[0155] 构建体和mRNA制备:质粒pSP73-Sph/A64用作mRNA模板载体。将编码选择的抗原CMV pp65和D.D.或/和LAMP的序列克隆到质粒pSP73-Sph/A64中(图14)。用T7 RNA聚合酶(Ambion)进行体外转录以生成mRNA。在RNeasy柱(Qiagen)上进行DNase I(Ambion)消化后,回收转录的mRNA。mRNA质量通过琼脂糖凝胶电泳验证。用分光光度法测量mRNA浓度,并以小等分试样保存在-80°C。

[0156] 实施例4

[0157] 增强人树突细胞疫苗诱导的抗原特异性T淋巴细胞应答的构建体的体外研究

[0158] 材料和方法:

[0159] 树突细胞的制备:将来自健康供体的外周血单核细胞(PBMC)在37°C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2小时。然后在AIM-V培养基中用800IU/ml GM-CSF和500IU/ml IL-4刺激贴壁细胞6天,得到未成熟的树突细胞(iDC)。在第6天,加入160ng/ml IL6、5ng/ml TNF- $\alpha$ 、5ng/ml IL-1 $\beta$ 和1 $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>。在第7天,收获成熟的树突细胞(mDC)。通过流式细胞术测量未成熟的树突细胞和成熟的树突细胞的表型(图15)。

[0160] 具有mRNA的树突细胞的电穿孔:收获树突细胞,并用PBS洗涤一次,用无酚红的Opti-MEM(Invitrogen Life Technologies)洗涤一次。将细胞用Opti-MEM以 $5 \times 10^6$ /ml的浓度重悬。将RNA转移至4mm比色皿中。加入体积为200 $\mu$ l的细胞悬液,并使用Electro Square Porator(ECM630,BTX,San Diego,CA)脉冲。脉冲条件为电压300V;电容150 $\mu$ F;和电阻25 $\Omega$ 。每次电穿孔使用5 $\mu$ g mRNA/10<sup>6</sup>个树突细胞。电穿孔后,立即将细胞转移到培养基中。

[0161] CMV pp65抗原在树突细胞中的表达测量:将D.D.-CMV pp65mRNA和CMV pp65 mRNA通过电穿孔分别转染到树突细胞中。然后在1小时,2小时,4小时,8小时,24小时,48小时和72小时后通过细胞内染色、然后通过流式细胞术测量CMV pp65抗原在树突细胞中的表达水平(图16)。

[0162] 用载有mRNA的树突细胞体外刺激T细胞:用mRNA电穿孔后,将树突细胞在37°C在树突细胞培养基中静置4小时。然后,将载有mRNA的树突细胞与外周血单核细胞在37°C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中以1:10的比例共培养。在第5天,加入50U/ml IL-2。在第7天,用载有mRNA的树突细胞重新刺激外周血单核细胞。每3天供应IL-2和IL-7。在第14天,收获细胞,通过流式细胞术测量CD8 T细胞IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 应答和CD4 T细胞IFN- $\gamma$  应答(图17、18、19)。

[0163] 结果:

[0164] 连接了D.D.的抗原CMV pp65在树突细胞中稳定且持久地表达。由外周血单核细胞制备树突细胞,并通过流式细胞术测量其表型(图15)。CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>群体被选为树突细胞。共刺激分子(CD80、CD83和CD86)和MHC分子(HLA-ABC,HLA-DR)在诱导T细胞应答中至关重要。趋化因子受体CCR7介导树突细胞向淋巴结中的T细胞区域迁移。然后通过电穿孔分别将D.D.-CMV pp65 mRNA或CMV pp65mRNA转染到树突细胞中,并通过用抗pp65 mAb进行细胞内染色来测量CMV pp65的表达(图16)。数据显示,连接或未连接D.D.的抗原CMV pp65在72小时内树突细胞中稳定且持久地表达,表明D.D.不会影响pp65抗原的蛋白质表达水平。

[0165] D.D.增强的人树突细胞疫苗诱导抗原特异性T细胞应答。用载有D.D.-CMV pp65 mRNA或载有CMV pp65 mRNA的树突细胞刺激来自健康供体的外周血单核细胞两次,共14天。测量了CD8+T细胞IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和CD4+T细胞IFN- $\gamma$  应答(图17)。与CMV pp65组相比,D.D.-CMV pp65组显示更强的CD8 T细胞IFN- $\gamma$  ( $p=0.003$ ,使用成对样本T检验, $n=6$ )、TNF- $\alpha$  ( $p=0.063$ )和CD4 T细胞IFN- $\gamma$  ( $p=0.011$ )应答。

[0166] 当D.D.结构域和LAMP结构域都被包括在内时,观察到了进一步增强的抗原特异性T细胞应答。在确定D.D.-CMV pp65诱导的更强的抗原特异性T细胞应答后,如图14中所示产生与D.D.结构域和LAMP结构域二者融合的CMV pp65。将与D.D.或LAMP1单独融合的CMVpp65用作对照。测试了以下构建体诱导抗原特异性T细胞应答的能力:1.D.D.-CMVpp65;2.CMVpp65-LAMP1;3.混合物(D.D.-CMV pp65:CMV pp65-LAMP=1:1);4.D.D.-CMV pp65-

LAMP1两结构域融合体。通过电穿孔将每组的mRNA分别转染到成熟的树突细胞 (mDC, 图18) 或未成熟的树突细胞 (iDC, 图19) 中。比起单独使用D.D.-CMV pp65或CMV pp65-LAMP, 在混合物(D.D.-CMV pp65:CMV pp65-LAMP=1:1) 和D.D.-CMV pp65-LAMP组中观察到更高的CD8<sup>+</sup>效应子T细胞表达IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ , 以及CD4<sup>+</sup>效应子T细胞表达IFN- $\gamma$ 。

[0167] 实施例5

[0168] 由载有mRNA的树突细胞诱导的肿瘤相关抗原gp100特异性T细胞应答

[0169] 用上述的方法生成gp100, LAMP-gp100, D.D.-gp100, s.s.-gp100和LAMP-gp100-IRES-D.D.-gp100-IRES-s.s.-gp100构建体。然后制备树突细胞疫苗并刺激自体外周血单核细胞。通过流式细胞术测量肿瘤相关抗原(TAA) gp100特异性T细胞应答。数据显示, 具有LAMP, D.D., s.s.或LAMP-D.D.-s.s.结构域的构建体比gp100对照诱导更强的T细胞应答。这表明LAMP, D.D.和s.s.结构域在树突细胞疫苗中可以增强肿瘤相关抗原特异性T细胞引发。

[0170] 将人gp100, LAMP-gp100, D.D.-gp100, s.s.-gp100或LAMP-gp100-IRES-D.D.-gp100-IRES-s.s.-gp100 mRNA分别转染到未成熟的树突细胞 (iDC) 中。然后将未成熟的树突细胞 (iDC) 进一步培养成为成熟的树突细胞 (mDC)。来自健康供体的外周血单核细胞在第0天, 第7天和第13天被上述载有mRNA的成熟的树突细胞刺激了3次。在细胞培养过程中, 加入1 $\mu$ g/ml的抗人PD-L和PD-L2抗体。在第14天通过流式细胞术测量CD3<sup>+</sup>T细胞TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$  应答, CD8<sup>+</sup>T细胞TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$  应答以及CD4<sup>+</sup>T细胞IFN- $\gamma$  应答。(参见图20)。人gp 100的全长序列和hLAMP-hgp100、D.D.-hgp100和s.s.-hgp100的序列如下所示。

[0171] 人gp100的全长序列 (SEQ ID NO:12)

|            |            |             |             |             |             |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 10         | 20         | 30          | 40          | 50          | 60          |
| MDLVLRCLL  | HNAVIGALLA | VGATKVP RNQ | DWLGVS RQLR | TKAWNRQLYP  | EWTEAQR LDC |
| 70         | 80         | 90          | 100         | 110         | 120         |
| WRGGQVSLKV | SNDGPTLIGA | NASF SIALNF | PGSQKVL PDG | QVIWVNNTII  | NGSQVWGGQP  |
| 130        | 140        | 150         | 160         | 170         | 180         |
| VYPQETDDAC | IFPDGGPCPS | GWSQKRSEFV  | YVWKTWGQYW  | QVLGGPV SGL | SIGTGRAMLG  |
| 190        | 200        | 210         | 220         | 230         | 240         |

[0172]

THTMEVTVYH RRGSRSYVPL AHSSSAFTIT DQVPFVSVS QLRALDGGNK HFLRNQPLTF  
 250 260 270 280 290 300  
 ALQLHDPSGY LAEADLSYTW DFGDSSGTLI SRALVVTHTY LEPGPVTAQV VLQAAIPLTS  
 310 320 330 340 350 360  
 CGSSPVPGETT DGHRPTAEAP NTTAGQVPTT EVVGTPGQA PTAEPSGTTS VQVPTTEVIS  
 370 380 390 400 410 420  
 TAPVQMPTAE STGMTPEKVP VSEVMGTTLA EMSTPEATGM TPAEVSIVVL SGTAAQVTT

[0173]

430 440 450 460 470 480  
 TEWVETTARE LPIPEPEGPD ASSIMSTESI TGSLGPLLDG TATLRLVKRQ VPLDCVLYRY  
 490 500 510 520 530 540  
 GSFSVTLDIV QGIESAEILQ AVPSGEGDAF ELTVSCQGG L PKEACMEISS PGCQPPAQL  
 550 560 570 580 590 600  
 CQPVLPSAC QLVLHQILKG GSGTYCLNVS LADTNSLAVV STQLIMPGQE AGLGQVPLIV  
 610 620 630 640 650 660 661  
 GILLVLMVV LASLIYRRRL MKQDFSVPQL PHSSSHWLRL PRIFCSCPIG ENSPLLSGQQ V

[0174] hLAMP-hgp100 (SEQ ID NO:13) (人LAMP腔内结构域和TM/cyt尾的序列用下划线标示;人gp100的全长序列用斜体标示。)

10 20 30 40 50 60  
MAAPGSARRP LLLLLLLLLL GLMHCASAAM FMVKNNGTA CIMANFSAAF SVNYDTKSGP  
70 80 90 100 110 120  
KNMTFDLPSD ATVVLNRSSC GKENTS DP SL VIAFGRGHTL TLNFTRNATR YSVQLMSFVY  
130 140 150 160 170 180  
NLSDTHLFPN ASSKEIKTVE SITDIRADID KKYRCVSGTQ VHMNNVTVT L HDATIQA YLS  
 [0175] 190 200 210 220 230 240  
NSSF SRGETR CEQDRPSPTT APPAPPSPSP SPVPKSPSVD KYNVSGTNGT CLLASMGLQL  
250 260 270 280 290 300  
NLTYERKDNT TVTRLLNINP NKTSASGSCG AHLVTLELHS EGTTVLLFQF GMNASSSRFF  
310 320 330 340 350 360  
LOGIQLNTIL PDARDPAFKA ANGSLRALQA TVGNSYKCN A EEHVRVTKAF SVNIFKVWVQ  
370 380 390 400 410 420  
AFKVEGGQFG SVEECLLDEN SMDLV LKRCL LHLAVIGALL AVGATKVPRN QDWLGVS RQL

430 440 450 460 470 480  
 RTKAWNRQLY PEWTEAQRLD CWRGGQVSLK VSNDGPTLIG ANASFIALN FPGSQKVLDP  
 490 500 510 520 530 540  
 GQVIWVNNTI INGSQVWGGQ PVYPQETDDA CIFPDGGPCP SGSWSQKRSF VYVWKTWGQY  
 550 560 570 580 590 600  
 WQVLGGPVSG LSIGTGRAML GHTTMEVTY HRRGSRSYVP LAHSSSAFTI TDQVPFVSIV  
 610 620 630 640 650 660  
 SQLRALDGGN KHFLRNQPLT FALQLHDPSG YLAEADLSYT WDFGDSSGTL ISRALVVTHT  
 670 680 690 700 710 720  
 YLEPGPVTAQ VVLQAAIPLT SCGSSPVPPT TDGHRPTAEA PNTTAGQVPT TEVVGTTPGQ  
 [0176] 730 740 750 760 770 780  
 APTAEPSTGT SVQVPTTEVI STAPVQMPTA ESTGMTPEKV PVSEVMGTTL AEMSTPEATG  
 790 800 810 820 830 840  
 MTPAEVSIVV LSGTTAAQVT TTEWVETAR ELPIPEPEGP DASSIMSTES ITGSLGPLLD  
 850 860 870 880 890 900  
 GTATLRLVKR QVPLDCVLYR YGSFSVTLDI VQIESAEIL QAVPSGEGDA FELTVSCQGG  
 910 920 930 940 950 960  
 LPKEACMEIS SPGCQPPAQR LCQPVLPSA CQLVLHQILK GSGTYCLNV SLADTNSLAV  
 970 980 990 1000 1010 1020  
 VSTQLIMPGQ EAGLGQVPLI VGILLVLMV VLASLIYRRR LMKQDFSVPO LPHSSSHWLR  
 1030 1040 1050 1060 1070  
 LPRIFCSCPI GENSPLLSGQ QVMLIPIAVG GALAGLVIV LIAYLVGRKR SHAGYQTI

[0177] D.D. -hpg100 (SEQ ID NO:14) (D.D.序列用下划线标示;减去信号序列和跨膜结构域的人gp100的序列用斜体标示。)

10 20 30 40 50 60  
 MGVQVETISP GDGRTFPKRG QTCVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM LGKQEVIRGW

[0178]

70 80 90 100 110 120  
 EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGATGHPG IIPPHATLVF DVELLKPEKV PRNQDWLGVS  
 130 140 150 160 170 180  
 RQLRTKAWNR QLYPEWTEAQ RLDCWRGGQV SLKVSNDGPT LIGANASFSI ALNFPGSQKV

190 200 210 220 230 240  
 LPDQQVIWVN NTIINGSQVW GGQPVYPQET DDACIFPDGG PCPSGSWSQK RSFVYVWKTW  
 250 260 270 280 290 300  
 GOYWQVLGGP VSGLSIGTGR AMLGHTMEV TVYHRRGRSRS YVPLAHSSSA FTITDQVPFS  
 310 320 330 340 350 360  
 VSVSQLRALD GGNKHFLRNQ PLTFALQLHD PSGYLAEADL SYTWDFGDSS GTLISRALVV  
 370 380 390 400 410 420  
 THTYLEPGPV TAQVVLQAAI PLTSCGSSPV PGTTDHRPT AEAPNTTAGQ VPTTEVVGTT  
 [0179] 430 440 450 460 470 480  
 PGQAPTAEPS GTTSVQVPTT EVISTAPVQM PTAESTGMTP EKVPVSEVMG TTLAEMSTPE  
 490 500 510 520 530 540  
 ATGMTPAEVS IVVLSGTAA QVTTEWVET TARELPIPEP EGPDASSIMS TESITGSLGP  
 550 560 570 580 590 600  
 LLDGTATLRL VKRQVPLDCV LYRYGSFSVT LDIVQGIESA EILQAVPSGE GDAFELTVSC  
 610 620 630 640 650 660  
 QGGLPKEACM EISSPGCQPP AQRLCQPVLP SPACQLVLHQ ILKGGSGTYC LNVSLADTNS  
 670  
 LAVVSTQLIM PGQEAG

[0180] s.s.-hgp100 (SEQ ID NO:15) (人gp100的信号序列用下划线标示;减去跨膜结构域的人gp100的序列用下划线标示。)

10 20 30 40 50 60  
 MDLVLRCLL HLAVIGALLA VGATKVPRNQ DWLGVSRQLR TKAWNRQLYP EWTEAQRLLC  
 70 80 90 100 110 120  
 WRGGQVSLKV SNDGPTLIGA NASFSIALNF PGSQKVLDPG QVIWVNNTII NGSQVWGGQP  
 [0181] 130 140 150 160 170 180  
 VYPQETDDAC IFPDGGPCPS GSWSQKRSEV YVWKTWGQYW QVLGGPVSGL SIGTGRAMLG  
 190 200 210 220 230 240  
 THTMEVTVYH RRGSRSYVPL AHSSSAFTIT DQVPFVSVS QLRALDGGNK HFLRNQPLTF  
 250 260 270 280 290 300  
 ALQLHDPSGY LAEADLSYTW DFGDSSGTLI SRALVVTHTY LEPGPVTAQV VLQAAIPLTS

310 320 330 340 350 360  
 CGSSPVPGGT DHRPTAEAP NTTAGQVPTT EVVGTTPGQA PTAEPSGTTS VQVPTTEVIS  
 370 380 390 400 410 420  
 TAPVQMPTAE STGMTPEKVP VSEVMGTTLA EMSTPEATGM TPAEVSIVVL SGTAAQVTT  
 [0182] 430 440 450 460 470 480  
 TEWVETTARE LPIPEPEGPD ASSIMSTESI TGSLGPLLDG TATLRLVKRQ VPLDCVLYRY  
 490 500 510 520 530 540  
 GSFSVTLDIV QGIESAEILQ AVPSGEGDAF ELTVSCQGGL PKEACMEISS PGCQPPAQL  
 550 560 570 580 590  
 CQPVLSPAC QLVLHQILKG GSGTYCLNVS LADTNSLAVV STQLIMPGQE AG

[0183] 实施例6

[0184] 基于多顺反子构建体的树突细胞疫苗的制备

[0185] 将来自健康供体的外周血单核细胞 (PBMC) 在37°C下在5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2小时。然后在AIM-V培养基中用800IU/ml GM-CSF和500IU/ml IL-4刺激贴壁细胞6天,以获得未成熟的树突细胞 (iDC)。由结构域修饰的靶mRNA从构建体转录或在体外合成。然后将mRNA转染到上述的未成熟的树突细胞中以获得载有mRNA的未成熟的树突细胞。将载有mRNA的未成熟的树突细胞用800IU/ml GM-CSF、500IU/ml IL-4、160ng/ml IL6、5ng/ml TNF- $\alpha$ 、5ng/ml IL-1 $\beta$ 和1 $\mu$ g/ml PGE2培养过夜,以获得载有mRNA的成熟的树突细胞 (mDC)。收获载有mRNA的成熟的树突细胞,然后用作树突细胞疫苗。

[0186] 实施例7

[0187] 纳米颗粒递送系统

[0188] LNP制剂是根据Chen等人的描述 (Chen等人 (2016) J. Control. Release, 235, 236-244.) (略有修改) 生成的。将脂质以50:10:38.5:1.5 (可离子化的脂质: DSPC: 胆固醇: PEG-脂质) 的摩尔比溶解在乙醇中。使用微流体混合器 (Precision Nanosystems, Vancouver, BC), 以3:1 (水: 乙醇) 的比例向脂质混合物中添加含有mRNA的50mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0)。将所得混合物用PBS (pH 7.4) 透析至少24小时, 然后使用Amicon Ultra Centrifugal Filters (EMD Millipore, Billerica, MA) 浓缩。将浓缩的脂质纳米颗粒溶液通过0.22mm过滤器, 并在使用前储存在4°C下。对所有制剂测试粒径、RNA封装和内毒素, 以确保脂质纳米颗粒在80到100nm之间, 封装率大于90%, 内毒素<1EU/ml。

[0189] 纳米颗粒递送系统: 纳米颗粒由聚合物溶液A、B、C和mRNA制成。首先, 将1 $\mu$ g mRNA溶液添加到3 $\mu$ l聚合物溶液A和3 $\mu$ l聚合物溶液B中。充分混合并在室温下孵育20分钟。其次, 添加2 $\mu$ l聚合物溶液C, 然后添加NaOAc缓冲液达10 $\mu$ l。充分混合, 再孵育20分钟, 以获得最终的多重 (polyplex) 溶液 (纳米颗粒)。在96孔板的一个孔中, 将10 $\mu$ l多重溶液用于1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞。

[0190] 在树突细胞中由纳米颗粒递送的CMV-pp65 mRNA的表达。如上所述制备树突细胞。在96孔板的一个孔中, 将上述10 $\mu$ l多重溶液添加到1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞中。树突细胞在37°C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 在6h, 12h和24h收获。为每种条件设置重复的孔。通过流式细胞术测量CMV-

pp65在树突细胞中的表达。

[0191] 结果:CMV-pp65 mRNA通过纳米颗粒递送系统被递送成功,并在树突细胞中有效表达。数据显示,在测量的时间(6h,12h和24h)中,CMV-pp65阳性细胞的百分比高达80%左右。这表明靶mRNA通过纳米颗粒递送成功被转染到树突细胞中。并且CMV-pp65的高表达效率证明了纳米颗粒递送的靶mRNA表达良好。(参见图21)

[0192] 在树突细胞中由纳米颗粒递送的CMV-pp65 mRNA的表达。通过纳米颗粒递送系统将CMV-pp65 mRNA或模拟对照以1 $\mu$ g mRNA/ $1 \times 10^5$ 个细胞的浓度转染到树突细胞中。树突细胞在37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,在6h,12h和24h收获。为每种条件设置重复的孔。通过流式细胞术测量CMV-pp65在树突细胞中的表达。(参见图21)

[0193] 实施例8

[0194] 由D.D.-修饰增强的MHC-I/肽抗原呈递

[0195] 材料和方法:

[0196] BM衍生的树突细胞(BMDCs)的体外培养:来自小鼠的骨髓细胞用完全培养基(补充有10%热灭活的FBS[BenchMark],L-谷氨酰胺[Gibco],青霉素/链霉素[Gibco],庆大霉素[Gibco],丙酮酸钠[SIGMA],2-巯基乙醇[Gibco]的RPMI-1640)在组织培养物处理过的板中培养。随后,将GM-CSF(Peprotech)和IL-4(Peprotech)添加到培养基中,最终浓度分别为20ng/mL和5ng/mL。将细胞在含有5%CO<sub>2</sub>的培养箱中在37 $^{\circ}$ C培养。每两天移除一半的培养基,并添加新鲜的温热培养基,其中添加了GM-CSF(2x,40ng/ml)和IL-4(2x,10ng/ml)。在第6天,加入脂多糖(100ng/ml),再孵育24小时,以诱导树突细胞成熟。在第7天,汇集通过用PBS洗涤收集的所有细胞。

[0197] 树突细胞表型的流式细胞术分析:将细胞用PBS洗涤,并分成 $5 \times 10^5$ 个细胞/100 $\mu$ l的几个部分。将FITC标记的抗CD11c和抗CD14、PE标记的抗CD80、抗CD83、抗CD86、抗H2kb、抗IA/IE和抗CCR7(均来自Biolegend)添加到悬浮液中,在黑暗中于4 $^{\circ}$ C孵育20分钟。用PBS洗涤细胞两次,并通过流式细胞术分析。荧光标记的IgG同种型用作对照。

[0198] 转染:将总共 $2 - 10 \times 10^6$ 个细胞悬浮在100 $\mu$ l小鼠树突核转染溶液(Mouse Dendritic Nucleofactor Solution)(Lonza)中,并转移到无菌电穿孔比色皿(Lonza)中。添加不同的质粒(用p43表达载体构建),然后通过核转染设备II(Nucleofactor II Device)(Lonza)将细胞电穿孔(Nucleofactor Program AN-001),BMDC与质粒的比例为 $1 \times 10^6$ 个细胞:0.5 $\mu$ g。为了测试转染效率,将BMDC用pmaxGFP平行转染。

[0199] SIINFEKL/H2-Kb复合物表达的流式细胞术分析:用PBS洗涤转染的BMDC,然后将PE标记的25D 1.16抗体(Biolegend)加入悬浮液中,并在黑暗中于4 $^{\circ}$ C孵育20分钟。用PBS洗涤细胞两次,并通过流式细胞术分析。

[0200] 结果:

[0201] 将常用的抗原鸡卵清蛋白(OVA)克隆到表达载体p43中作为对照。通过与s.s.,D.D.或小鼠LAMP1结构域连接来修饰OVA抗原。将这些修饰的OVA抗原分别克隆到p43表达载体中。通过电穿孔将DNA质粒转染到成熟的小鼠树突细胞中。在不同的时间点,通过PE标记的25D 1.16抗体测量MHC-1/OVA肽复合物的树突细胞细胞表面表达。PE标记的25D1.16抗体直接与Kb-SIINFEKL小鼠MHC-1/OVA肽结合。如图22A所示,表面染色显示用D.D./OVA转染的树突细胞具有最多的MHC-1/OVA肽阳性细胞(50.3%)。此外,与p43-OVA对照和其他修饰相

比,D.D./OVA具有MHC-1/OVA肽的最高细胞表面表达,大于未修饰的p43-OVA的表达水平的两倍(图22B)。这些结果表明,OVA的D.D.修饰导致显著增强的MHC-1/OVA肽抗原呈递。

#### [0202] 实施例9

[0203] D.D.-修饰与其他修饰对于MHC-1/OVA肽抗原呈递影响的比较

[0204] 已显示具有不同分子结构的修饰可增强MHC-I/肽抗原呈递。这些包括选择性自噬受体SQSTM1/p62 (Andersen A.N.等人,Front Immunol.2016May 10;7:167), $\gamma$ -微管蛋白(GTN) (Hung C.F.等人,Cancer Res.2003May 15;63(10):2393-8)和泛素(UBT) (Hosoi A.等人,Biochem Biophys Res Commun.2008Jun 27;371(2):242-6)。用已公开的方法修饰OVA,并将其克隆到p43表达载体中。用不同的质粒转染成熟的小鼠树突细胞,并分析表面MHC-1/OVA肽的表达。如图23A所示,在转染后,D.D./OVA修饰导致最多的阳性细胞。此外,D.D./OVA修饰具有最高的Kb-SIIFEKL MHC-1/OVA肽细胞表面表达(图23B)。这些结果表明,OVA的D.D.修饰在增强MHC-1抗原呈递方面优于其他三个已知的修饰。

#### [0205] 实施例10

[0206] D.D.-OVA的体内抗肿瘤功效

[0207] 材料和方法:

[0208] 小鼠、细胞系和肿瘤模型:C57BL/6小鼠来自Jackson实验室(Jackson Laboratory),并在特定的无病原体的屏障设施中繁殖,并在6-12周龄使用。所有研究均得到Duke University Animal Care and Use Committee的批准。Thomas F.TeD.D.er博士(北卡罗来纳州达勒姆杜克大学(Univ. Duke, Durham, NC))友情提供了表达膜结合的OVA(B16/F10/mOVA)的B16/F10黑色素瘤肿瘤细胞系。它是使用表达质粒(pIRES2-EGFP)生产的,该质粒包含编码与跨膜区H-2Db连接的全长OVA蛋白的cDNA。通过多轮基于荧光的细胞分选选择高水平表达GFP的细胞。使细胞最少传代并保存在包含10%FBS、200mg/ml青霉素和200U/ml链霉素的完全RPMI-1640中。为了维持OVA表达,B16F10/mOVA细胞培养物中含有G418(400 $\mu$ g/ml)。将100 $\mu$ l PBS中总计 $5 \times 10^4$ 个B16/F10/mOVA肿瘤细胞皮下接种到6至12周龄的C57BL/6小鼠中。晚期肿瘤在第5或第6天建立,然后开始小鼠疫苗接种。在第7和14天腹腔内注射 $1 \times 10^6$ 个电穿孔的树突细胞(重悬于100 $\mu$ l PBS中)。每天监测肿瘤的发展。在第30天处死小鼠。

[0209] 结果:

[0210] 使用被不同形式的OVA抗原转染的树突细胞进行体内抗肿瘤功效测定。如图24A所示,用D.D./OVA和mLAMP1/OVA质粒转染的树突细胞介导了显著的抗肿瘤应答。这两个处理组的肿瘤重量显著低于PBS处理的对照组。此外,与用单一形式的OVA抗原转染的树突细胞相比,用D.D./OVA或mLAMP1/OVA转染的混合树突细胞的联合治疗具有更好的抗肿瘤效果(图24B)。这些结果表明,当通过D.D.和LAMP1联合MHC-I和MHC-II抗原修饰方法时,具有协同的抗肿瘤效果。

[0211] 本发明涉及以下实施方式:

[0212] 1.一种用于表达至少一种靶抗原的多顺反子疫苗构建体,所述构建体包含与单个启动子可操作地连接的多个独立的顺反子,其中每个独立的顺反子编码修饰的靶抗原,所述修饰的靶抗原包含该靶抗原的框内融合蛋白和至少一个选自去稳定化结构域(D.D.)、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)结构域和信号序列(s.s.)的特定结构域。

[0213] 2. 根据实施方式1所述的多顺反子疫苗构建体,其还包含对应于5'非翻译区(5'UTR)、包括poly A尾的3'非翻译区(3'UTR)、以及任选地包含两个由小环状序列分隔的互补单链RNA的末端免疫-增强(IE)序列的核苷酸序列。

[0214] 3. 根据实施方式2所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述IE序列包含跨越50-5000个碱基对的3'-末端双链RNA。

[0215] 4. 根据实施方式3所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述双链RNA包含polyG:C或polyA:U。

[0216] 5. 根据实施方式3所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述双链RNA是包含A、U、G和C的组的随机序列,其中所述随机序列被优化为与任何内源哺乳动物RNA序列没有或几乎没有序列相似性。

[0217] 6. 根据实施方式1-5中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述启动子是哺乳动物启动子、病毒启动子、T3启动子、T7启动子或SP6启动子。

[0218] 7. 根据实施方式1-6中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述靶抗原衍生自病原体,人自身蛋白,肿瘤抗原或其任意组合。

[0219] 8. 根据实施方式7所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述肿瘤抗原包含肿瘤特异性抗原,肿瘤相关抗原或新抗原。

[0220] 9. 根据实施方式7或8所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述靶抗原包含选自下述的肿瘤抗原:5T4、AIM2、AKAP4 2、Art-4、Aura A1 (AURKA)、Aura B1 (AURKB)、BAGE、BCAN、B-细胞周期蛋白、BSG、CCND1、CD133、CDC45L、CDCA1 (TTK)、CEA、CHI3L2(几丁质酶3样蛋白2)、CSPG4、EpCAM 4、Epha2、EPHX1、Ezh2、FABP7、Fos11 (Fra-1)、GAGE、Gal t-3、G250 (CA9)、gBK、glast、GnT-V、gp100(人gp100)、HB-EGF、HER2、HNPR1、HO-1、hTERT、IGF2BP3、IL13-Ra2、IMP-3、IQGAP1、ITGAV、KIF1C、KIF20A、KIF21B、KIFC3、KK-LC-1、LAGE-1、Lck、LRRC8A、MAGE-1 (MAGEA1)、MAGE-2 (MAGEA2B)、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-C1 (CT7)、MAGE-C2、MAGE-C3、Mart-1、MELK、MRP3、MUC1、NAPSA、NLGN4X、Nrcam、NY-ESO-1 (CTAG1B)、NY-SAR-35、OFA/iLRP、PCNA、PIK3R1、Prame、PRKDC、PTH-rP、PTPRZ1、PTTG1 2、PRKDC、RAN、RGS1、RGS5、RHAMM (RHAMM-3R)、RPL19、Sart-1、Sart-2、Sart-3、SEC61G、SGT-1、SOX2、Sox10、Sox11、SP17、SPANX-B、SQSTM1、S.S.X-2、STAT1、STAT3、生存素、TARA、TNC、Trag-3、TRP-1、TRP2、酪氨酸酶、URLC10 (LY6K)、Ube2V、WT1、XAGE-1b (GAGED2a)、YKL-40 (CHI3L1)、ACRBP、SCP-1、S.S.X-1、S.S.X-4、NY-TLU-57、CAIX、Brachyury、NY-BR-1、ErbB、间皮素、EGFRvIII、IL-13Ra2、MSLN、GPC3、FR、PSMA、GD2、L1-CAM、VEGFR1、VEGFR2、KOC1、OFA、SL-701、突变体P53、DEPDC1、MPHOSPH1、ONT-10、GD2L、GD3L、TF、PAP、BRCA1、DLC1、XP01、HIF1A、ADAM2、CALR3、SAGE1、SCP-1、ppMAPkkk、WHSC、突变体Ras、COX1、COX2、FOXP3、IDO1、IDO2、TD0、PDL1、PDL2和PGE2。

[0221] 10. 根据实施方式9所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述肿瘤抗原包含含有人gp100的肿瘤相关抗原。

[0222] 11. 根据实施方式7所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述靶抗原包含病毒病原体。

[0223] 12. 根据实施方式11所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述病毒病原体选自流感病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、爱泼斯坦-巴尔病毒

(EBV)、登革热病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)。

[0224] 13. 根据实施方式1至12中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述独立的顺反子通过一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)或框内2A自剪切肽为基础的切割位点可操作地连接。

[0225] 14. 根据实施方式13所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述IRES包含衍生自脑心肌炎病毒的核酸序列。

[0226] 15. 根据实施方式1-14中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述至少一个特定结构域在N末端、C末端或在N末端和C末端与所述靶抗原融合。

[0227] 16. 根据实施方式1-15中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其包含至少两个独立的顺反子。

[0228] 17. 根据实施方式16所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述独立的顺反子之一编码包含D.D.结构域的修饰的靶抗原,另一个独立的顺反子编码包含LAMP结构域的修饰的靶抗原。

[0229] 18. 根据实施方式16所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述独立的顺反子之一编码包含D.D.结构域的修饰的靶抗原,另一个独立的顺反子编码包含s.s.结构域的修饰的靶抗原。

[0230] 19. 根据实施方式17或18所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述D.D.结构域包含经历蛋白酶体介导的降解的野生型人蛋白,突变人蛋白,细菌蛋白,病毒蛋白或其任何变体/衍生物。

[0231] 20. 根据实施方式17-19中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述D.D.结构域包含去稳定化序列,该去稳定化序列是从来自内源蛋白突变体库的筛选测定中鉴定的。

[0232] 21. 根据实施方式20所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述去稳定化突变体选自人FKBP12、F15S、V24A、L30P、E60G、M66T、R71G、D100N、E102G、K105I、E107G、L106P以及其任何突变或组合。

[0233] 22. 根据实施方式19所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述D.D.结构域包含细胞周期蛋白A、细胞周期蛋白C、细胞周期蛋白D或细胞周期蛋白E。

[0234] 23. 根据实施方式19所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述D.D.结构域包含I $\kappa$ B,其中所述I $\kappa$ B在被表面信号激活后经历磷酸化依赖性多泛素化和蛋白酶体介导的降解。

[0235] 24. 根据实施方式19所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述蛋白酶体介导的降解是配体诱导的。

[0236] 25. 根据实施方式19所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述人蛋白是小分子配体的已知受体,并且其中所述配体与和E3泛素连接酶或衔接蛋白相互作用以诱导蛋白酶体介导的降解的化合物缀合。

[0237] 26. 根据实施方式25所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述衔接蛋白是cereblon,与所述配体缀合的化合物是沙利度胺,泊马度胺,来那度胺或结构相关的化合物。

[0238] 27. 根据实施方式25所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述E3泛素连接酶是VHL,要缀合至所述配体的化合物是结合VHL的小分子。

[0239] 28. 根据实施方式16所述的多顺反子疫苗构建体,其中所述独立的顺反子之一编码包含LAMP结构域的修饰的靶抗原,另一个独立的顺反子编码包含s.s.结构域的修饰的靶

抗原。

[0240] 29. 根据实施方式1-28中任一项所述的多顺反子疫苗构建体,其包含三个独立的顺反子。

[0241] 30. 根据实施方式29所述的多顺反子疫苗构建体,其中第一个独立的顺反子编码包含LAMP结构域的修饰的靶抗原,第二个独立的顺反子编码包含D.D.结构域的修饰的靶抗原,第三个独立的顺反子编码包含s.s.结构域的修饰的靶抗原。

[0242] 31. 一种疫苗组合物,其包含实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体。

[0243] 32. 根据实施方式31所述的疫苗组合物,其包含DNA疫苗。

[0244] 33. 根据实施方式31所述的疫苗组合物,其包含RNA疫苗。

[0245] 34. 根据实施方式33所述的疫苗组合物,其中所述RNA疫苗是通过在体外转录所述DNA构建体,然后对RNA进行5'加帽而产生的。

[0246] 35. 根据实施方式33所述的疫苗组合物,其中所述RNA包含化学修饰的核苷酸构件以增强体内稳定性和细胞摄取。

[0247] 36. 根据实施方式31-35中任一项所述的疫苗组合物,其包含将所述DNA或RNA配制成纳米颗粒用于递送。

[0248] 37. 一种在受试者中调节免疫应答的方法,其包含施用根据实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式31-36中任一项所述的疫苗组合物。

[0249] 38. 一种用于在受试者中提供增强的抗原特异性疫苗接种的方法,其包含施用根据实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式31-36中任一项所述的疫苗组合物。

[0250] 39. 一种诱导针对衍生自病原体,人自身蛋白或恶性肿瘤的靶抗原的治疗性免疫应答的方法,其包含施用根据实施方式1-29中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式31-36中任一项所述的疫苗组合物。

[0251] 40. 根据实施方式37-39中任一项所述的方法,其包含CD8+细胞溶解性T淋巴细胞(CTL),CD4+辅助T淋巴细胞(HTL),抗体或其组合的增加。

[0252] 41. 根据实施方式37至40中任一项所述的方法,其包括选自下述的一种或多种细胞因子的产生的增加:白介素-2(IL-2)、穿孔素、粒酶B、干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素4(IL-4)、白介素5(IL-5)、白介素6(IL-6)和白介素10(IL-10)。

[0253] 42. 一种用于表达靶抗原以引发增强的抗原特异性T细胞应答的核酸载体,该载体编码包含所述靶抗原和去稳定化结构域(D.D.)的融合多肽。

[0254] 43. 根据实施方式42所述的核酸载体,其中所述融合多肽还包含LAMP结构域。

[0255] 44. 根据实施方式42或43所述的核酸载体,其中所述靶抗原衍生自病原体,人自身蛋白或恶性肿瘤。

[0256] 45. 根据实施方式44所述的核酸载体,其中所述靶抗原是巨细胞病毒(CMV)pp65。

[0257] 46. 一种制造载有mRNA的树突细胞的方法,该方法包含以下步骤:

[0258] (a) 提供树突细胞;和

[0259] (b) 用从根据实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式42-45中任一项所述的核酸载体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类转染未成熟的树突细胞。

[0260] 47. 根据实施方式46所述的方法,其中通过将自体外周血单核细胞转分化为未成熟的树突细胞来提供所述树突细胞。

[0261] 48. 根据实施方式47所述的方法,其包含培养所述未成熟的树突细胞以获得成熟的树突细胞(mDC)。

[0262] 49. 一种分离的树突细胞,其包含从根据实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式42-45中任一项所述的核酸载体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类。

[0263] 50. 一种树突细胞疫苗组合物,其包含根据实施方式49所述的分离的树突细胞。

[0264] 51. 一种树突细胞疫苗组合物,其包含第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞,其中所述第一个树突细胞和第二个树突细胞各自包含从根据实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式42-45中任一项所述的核酸载体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类。

[0265] 52. 根据实施方式51所述的树突细胞疫苗组合物,其中所述第一分离的树突细胞的mRNA种类或核酸载体不同于所述第二分离的树突细胞的mRNA种类或核酸载体。

[0266] 53. 一种治疗组合物,其包含根据实施方式49所述的分离的树突细胞。

[0267] 54. 一种治疗组合物,其包含第一分离的树突细胞和第二分离的树突细胞,其中所述第一树突细胞和第二树突细胞各自包含从根据实施方式1-30中任一项所述的多顺反子疫苗构建体或实施方式42-45中任一项所述的核酸载体体外转录的一种或多种信使RNA(mRNA)种类。

[0268] 55. 根据实施方式54所述的治疗组合物,其中所述第一分离的树突细胞的mRNA种类或核酸载体不同于所述第二分离的树突细胞的mRNA种类或核酸载体。

[0269] 56. 一种增强疫苗诱导的T淋巴细胞应答的方法,其包含向有此需要的受试者施用根据实施方式50-52中任一项所述的树突细胞疫苗或实施方式53-55中任一项所述的治疗组合物。

[0270] 57. 根据实施方式56所述的方法,其中所述T淋巴细胞应答包含CD8+细胞溶解性T淋巴细胞(CTL)、CD4+辅助T淋巴细胞(HTL)或其组合的增加。

[0271] 58. 一种引发针对表达肿瘤抗原的癌细胞的免疫应答的方法,其包含向有此需要的受试者施用有效量的根据实施方式50-52中任一项所述的树突细胞疫苗组合物或实施方式53-55中任一项所述的治疗组合物,其中所述组合物的有效量足以引起针对表达所述肿瘤抗原的癌细胞的免疫应答。

[0272] 59. 根据实施方式58所述的方法,其中所述肿瘤抗原是CMV pp65。

[0273] 60. 根据实施方式58所述的方法,其中所述受试者患有选自下述的肿瘤:胶质母细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和胃癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、恶性黑色素瘤、消化道/胃肠道癌、肝癌、皮肤癌、淋巴瘤、肾癌、肌肉癌、骨癌、脑癌、眼癌、直肠癌、结肠癌、宫颈癌、膀胱癌、口腔癌、良性和恶性肿瘤、胃癌、子宫体、睾丸癌、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、尤因肉瘤、卡波西肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌、小细胞肺癌、绒毛膜癌、横纹肌肉瘤、血管肉瘤、血管内皮瘤、威尔姆斯瘤、神经母细胞瘤、口腔/咽癌、食道癌、喉癌、神经纤维瘤、结节性硬化症、血管瘤和淋巴管生成。

[0274] 61. 根据实施方式58-60中任一项所述的方法,其中所述免疫应答包含CD8+细胞溶解性T淋巴细胞(CTL),CD4+辅助T淋巴细胞(HTL)或其组合的增加。

[0275] 62. 一种引发针对病毒抗原的免疫应答的方法,其包含向有此需要的受试者施用有效量的根据实施方式50-52中任一项所述的树突细胞疫苗组合物或实施方式53-55中任一项所述的治疗组合物,其中所述组合物的有效量足以提供针对所述病毒抗原的疫苗接种。

[0276] 63. 根据实施方式62所述的方法,其中所述病毒抗原选自流感病毒,人乳头瘤病毒(HPV),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV),登革热病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)。

[0277] 64. 一种递送根据实施方式31-36中任一项所述的疫苗组合物,其包含皮下、肌内、静脉内、鼻内或皮内施用所述疫苗组合物。

[0278] 65. 一种递送根据送实施方式31-36中任一项所述的疫苗组合物,其包含将两种或更多种DNA构建体、RNA构建体或其任意组合作为混合物共同施用。

[0279] 66. 根据实施方式64或65所述的方法,其包含将选自polyIC,polyICLC,CpG和其他TLR配体的免疫佐剂共同施用以激活树突细胞。

[0280] 67. 一种增强免疫应答和疫苗接种效力的方法,所述方法包含向有此需要的受试者施用包含根据实施方式48所述的分离的树突细胞或实施方式31-36中任一项所述的疫苗组合物或实施方式50-52中任一项所述的树突细胞疫苗或实施方式53-55中任一项所述的治疗组合物的组合物。

[0281] 68. 根据实施方式67所述的方法,其包含共同施用激活树突细胞的佐剂。

[0282] 69. 根据实施方式68所述的方法,其中所述佐剂选自polyIC,polyICLC,CpG和其他TLR配体。

[0283] 70. 根据实施方式67-69中任一项所述的方法,其中所述受试者患有选自下述的肿瘤:胶质母细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和胃癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、恶性黑色素瘤、消化道/胃肠道癌、肝癌、皮肤癌、淋巴瘤、肾癌、肌肉癌、骨癌、脑癌、眼癌、直肠癌、结肠癌、宫颈癌、膀胱癌、口腔癌、良性和恶性肿瘤、胃癌、子宫体、睾丸癌、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、尤因肉瘤、卡波西肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌、小细胞肺癌、绒毛膜癌、横纹肌肉瘤、血管肉瘤、血管内皮瘤、威尔姆斯瘤、神经母细胞瘤、口腔/咽癌、食道癌、喉癌、神经纤维瘤、结节性硬化、血管瘤和淋巴管生成。

[0284] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容均通过引用全文并入本文。

[0285] 虽然已经参考特定的实施方式公开了本发明,但是显而易见的是,本领域的其他技术人员可以设计本发明的其他实施方式和变形而不脱离本发明的真实精神和范围。所附权利要求包括所有这样的实施方式和等同变形。

DNA 疫苗构建体示意图

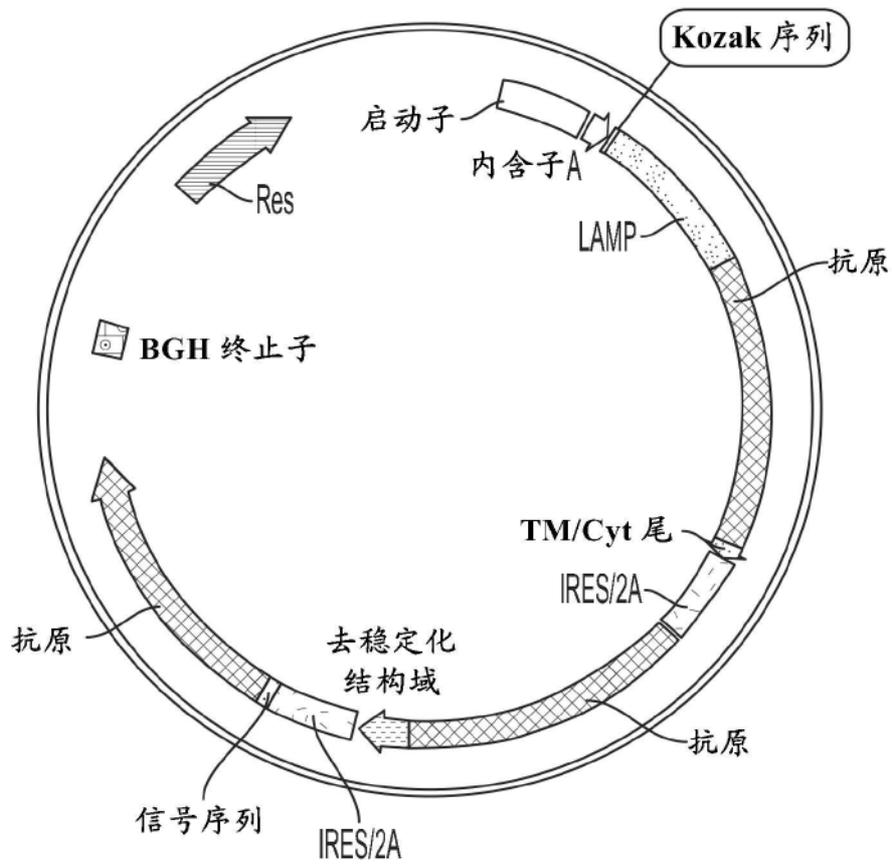


图1A

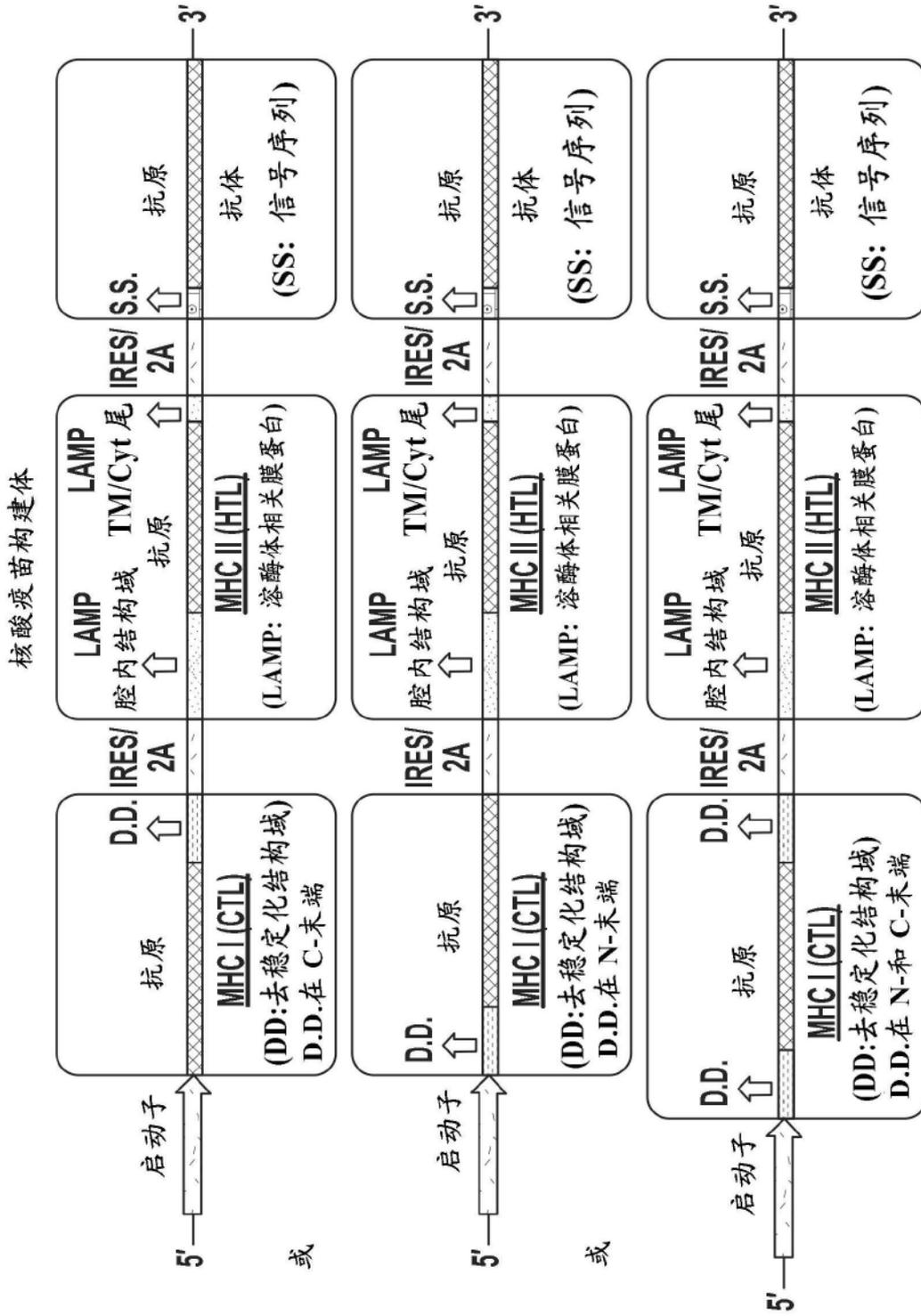


图1B

核酸疫苗构建体

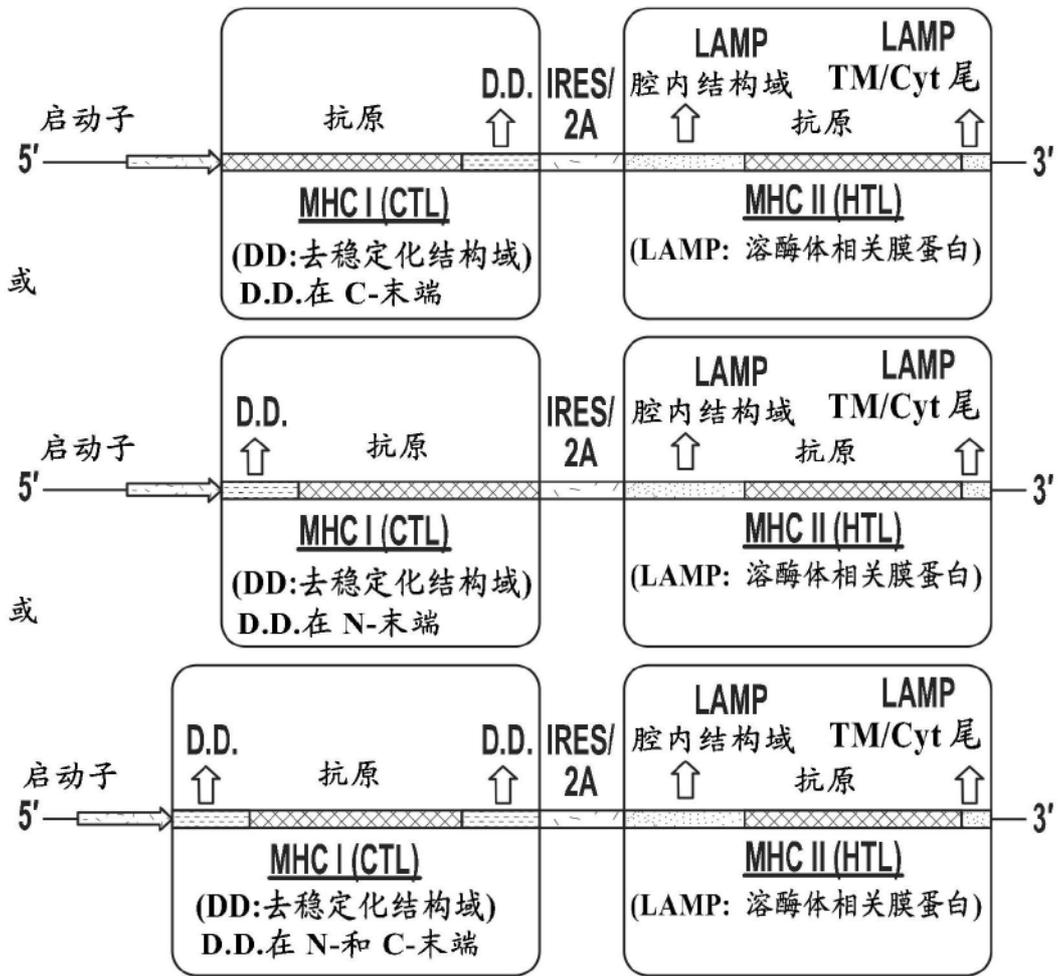


图1C

核酸疫苗构建体

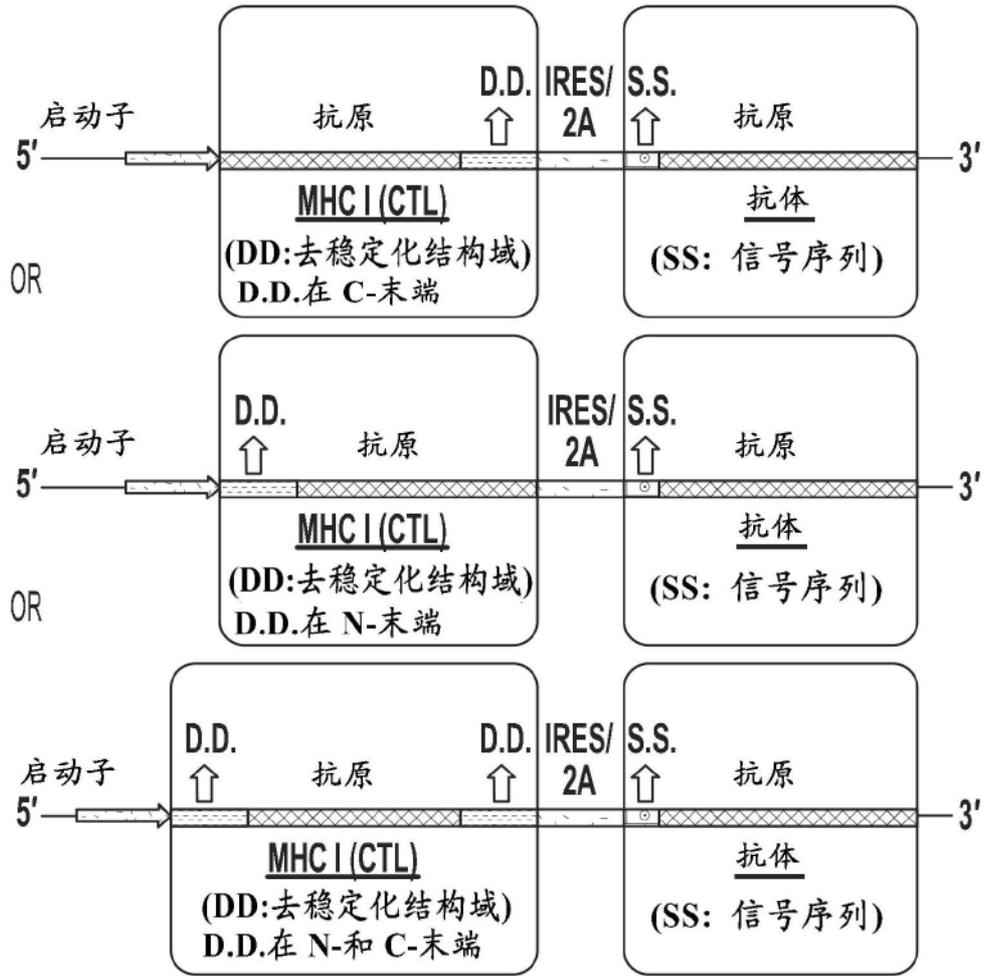


图1D

核酸疫苗构建体

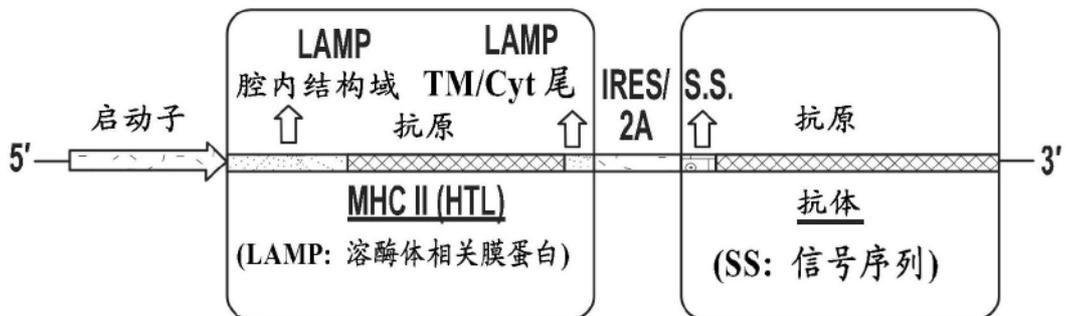


图1E

mRNA疫苗构建体示意图

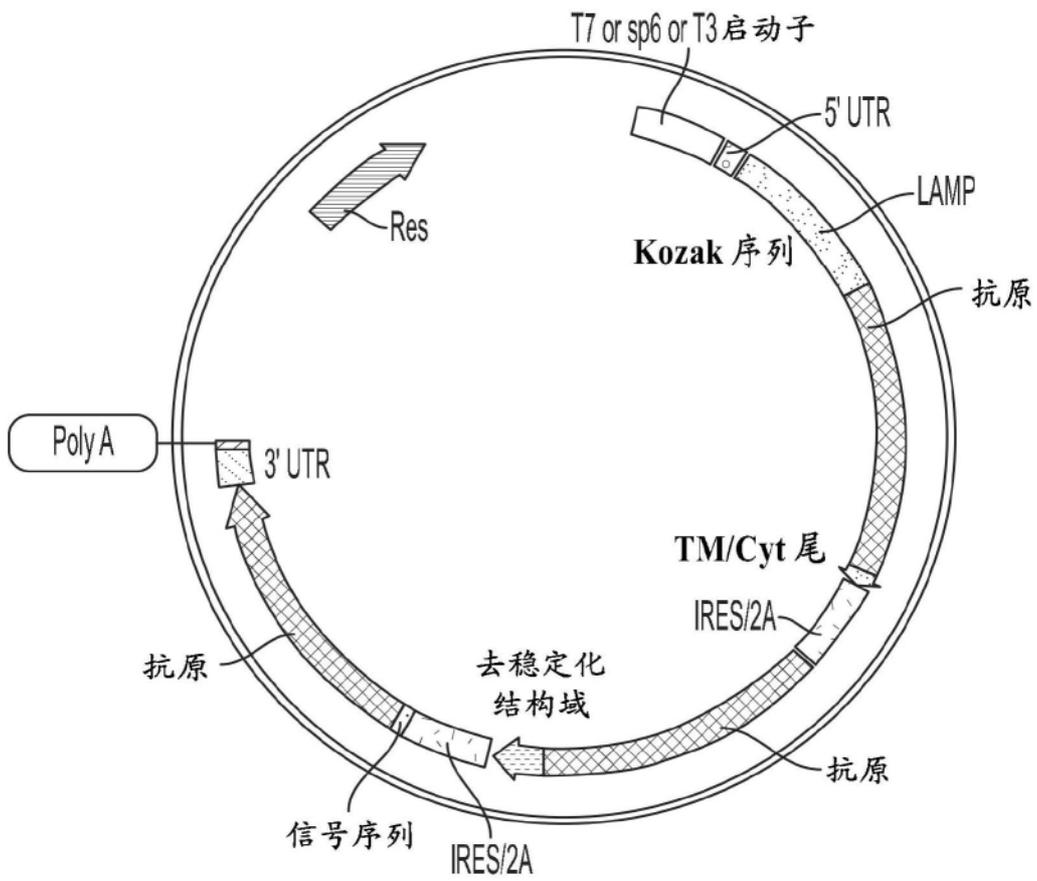


图2A

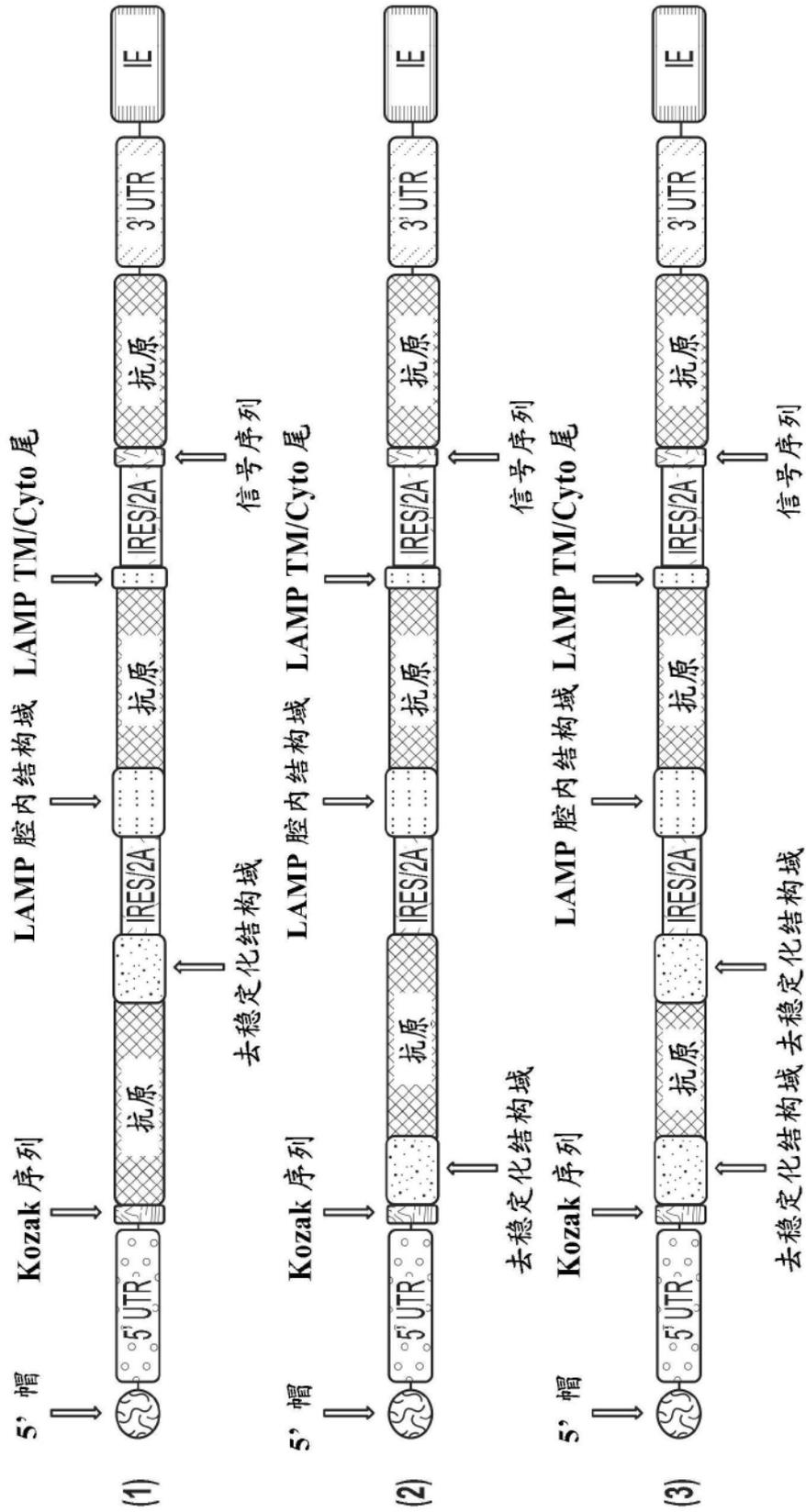


图2B

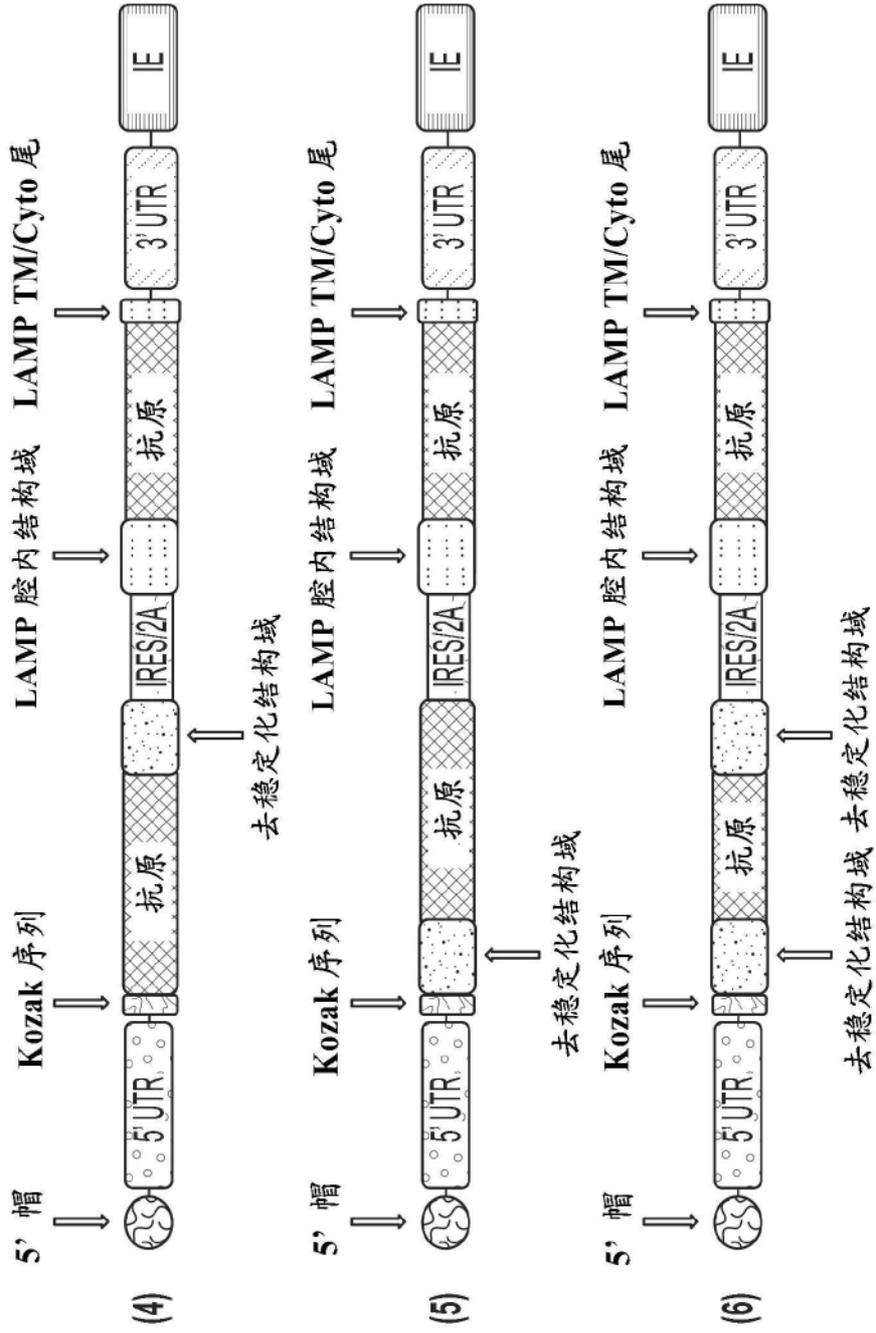


图2C

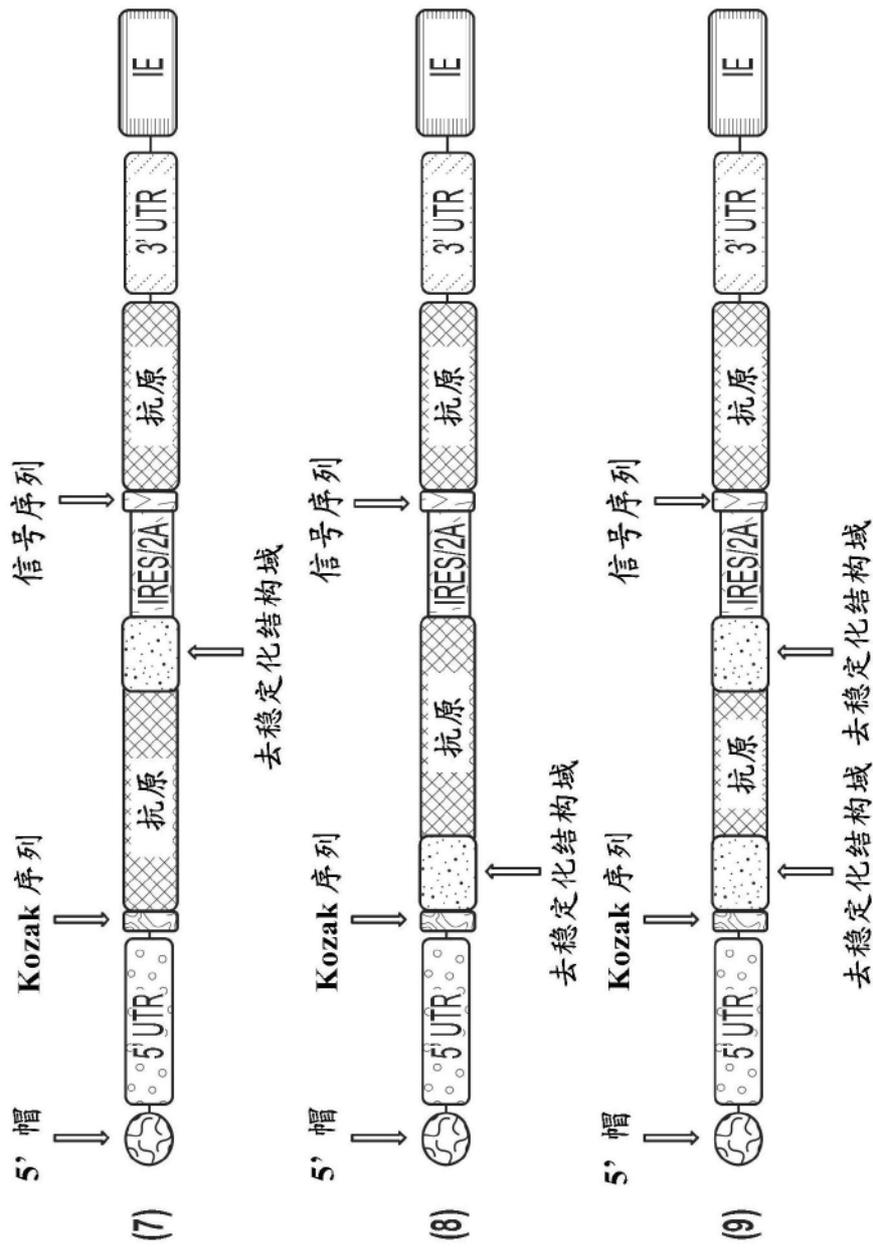


图2D

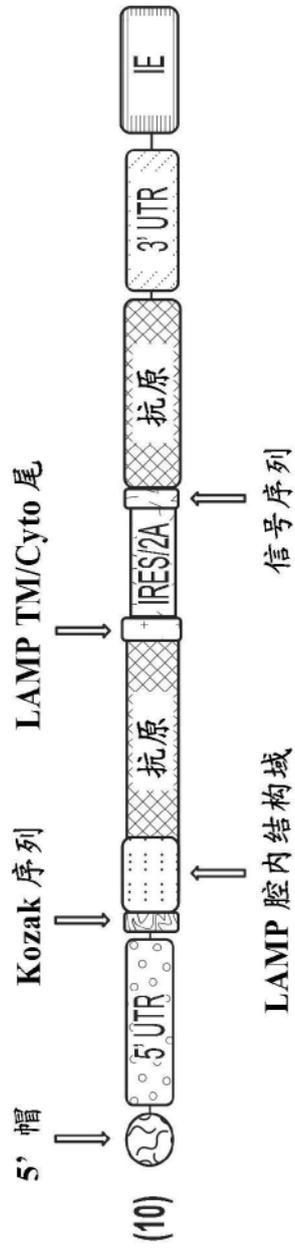


图2E

用于 MHC-I (CTL) 活化的示例性去稳定化  
结构域 (D.D.) 的氨基酸序列

```

10          20          30          40          50
GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TCVVHYTGML GDGKKVDSR DRNKPFKFML
60          70          80          90         100
GKQEVIRGWE EGVAQMSVGQ GAKLTISPDY AYGATGHPGI IPPHATLVFD
107
VELLELE (SEQ ID NO: 1)

```

图3

用于 MHC-II (HTL) 活化的示例性  
LAMP 结构域的氨基酸序列

```

10      20      30      40      50      60
MAAPGSARRP LLLLLLLLLL GLMHCASAAM FMVKNGNGTA CIMANFSAAF SVNYDTKSGP

70      80      90      100     110     120
KNMTFDLPD  ATVVLNRSSC GKENTSDPSL VIAFGRGHTL TLFNTRNATR YSVQLMSFVY

130     140     150     160     170     180
NLSDTHLFPN ASSKEIKTVE SITDIRADID KKYRCVSGTQ VHMNNVTVTL HDATIQA YLS

190     200     210     220     230     240
NSSFSRGETR CEQDRPSPTT APPAPPSPSP SPVPKSPSVD KYNVSGTNGT CLLASMLGLQL

250     260     270     280     290     300
NLTYERKDNT TVTRLLININP NKTSASGSCG AHLVLELHS EGTTVLLFQF GMNASSRRFF

310     320     330     340     350     360
LQGIQLNTIL PDARDPAFKA ANGLRALQA TVGNSYKCNA EEHVRVTKAF SVNIFKVVWVQ

370     380     390     400     410
AFKVEGGQFG SVEECLLDEN SMLPIAVGG ALAGLVLIVL IAYLVGRKRS HAGYQTI
(SEQ ID NO: 2)

```

图4

示例性信号序列 (s.s.) 的氨基酸序列

10 20 24  
MGKRSAGSIM WLASLAVVIA CAGA

(SEQ ID NO: 3)

图5

示例性内部核糖体进入位点  
(IRES) 的核酸序列

```

CGGGATCAAT TCCGCCCCCC CCCTAACGTT ACTGGCCGAA GCCGCTTGA ATAAGGCCGG 60
TGTGCGTTTG TCTATATGTT ATTTCCACC ATATTGCCGT CTTTGGCAA TGTGAGGCC 120
CGGAAACCCTG GCCCTGTCTT CTTGACGAGC ATTCCTAGGG GTCTTCCCC TCTCGCCAAA 180
GGAATGCAAG GTCTGTTGAA TGTCGTGAAG GAAGCAGTTC CTCTGGAAG TTCTTGAAGA 240
CAAACAACGT CTGTAGCGAC CCTTGCAGG CAGCGGAACC CCCCACCTGG CGACAGGTGC 300
CTCTGCGGC AAAAGCCACG TGATAAGAT ACACCTGCAA AGGCGGCACA ACCCCAGTGC 360
CACGTTGTGA GTTGGATAGT TGTGAAAGA GTCAAATGGC TCTCCTCAAG CGTATTCAAC 420
AAGGGCTGA AGGATGCCCA GAAGGTACCC CATTGTATGG GATCTGATCT GGGGCCCTCGG 480
TGCACATGCT TTACATGTGT TTAGTCGAGG TTAATAAAAC GTCTAGGCC CCCGAACCAC 540
GGGACGTGG TTTTCCTTTG AAAACACCGA TAATA 575

```

(SEQ ID NO: 4)

图6

用示例性的多顺反子构建体免疫的小鼠  
的白介素-2 (IL-2) 应答

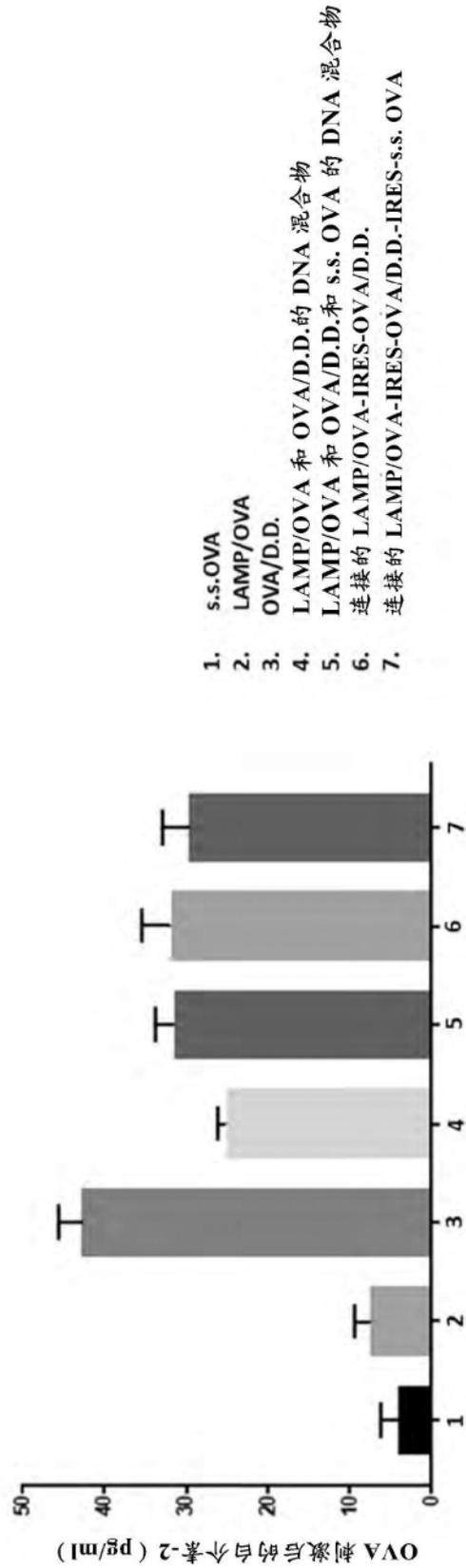


图7

用示例性的多顺反子疫苗构建体免疫的  
小鼠的干扰素 (IFN)  $\gamma$  应答

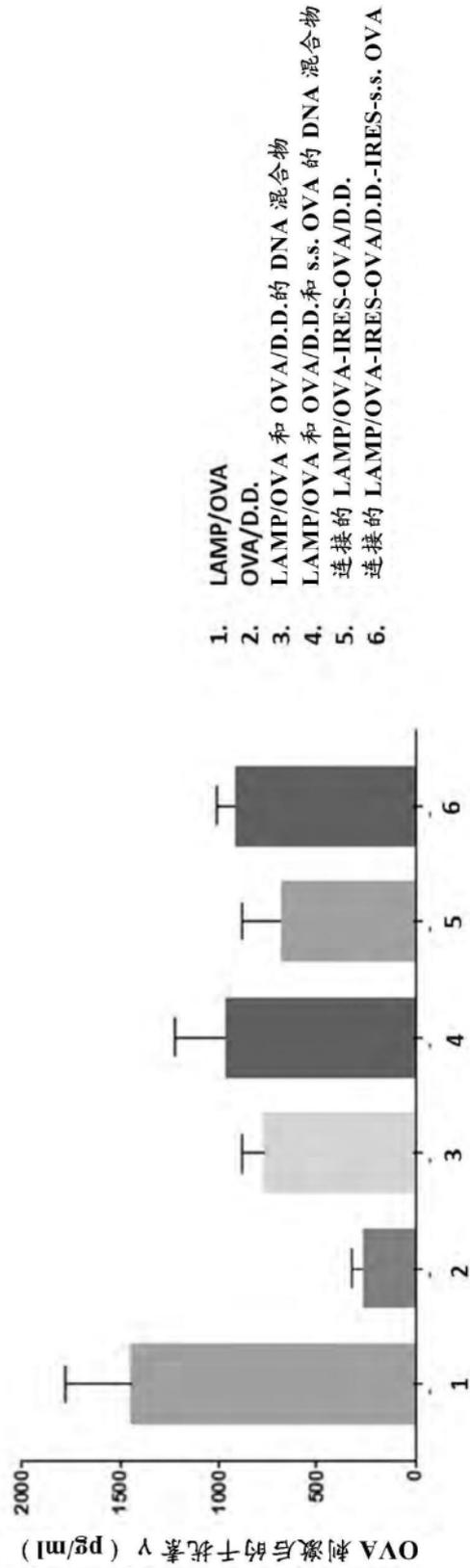


图8

用示例性的多顺反子构建体免疫的  
小鼠的粒酶 B 应答

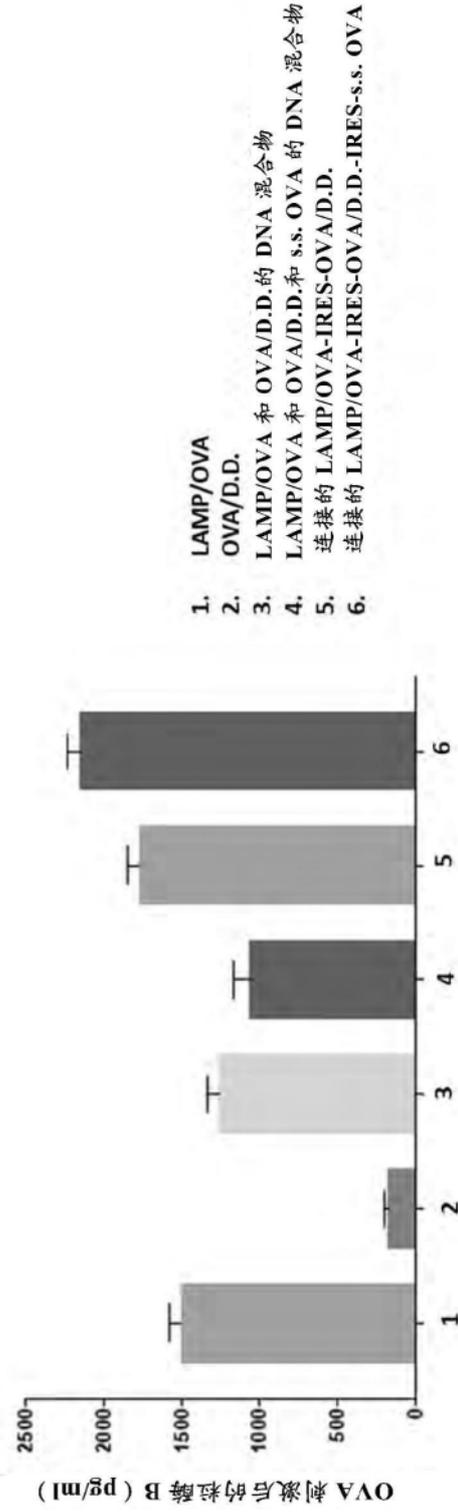


图9

用示例性的多顺反子构建体免疫的小鼠的  
白介素 10 (IL-10) 应答

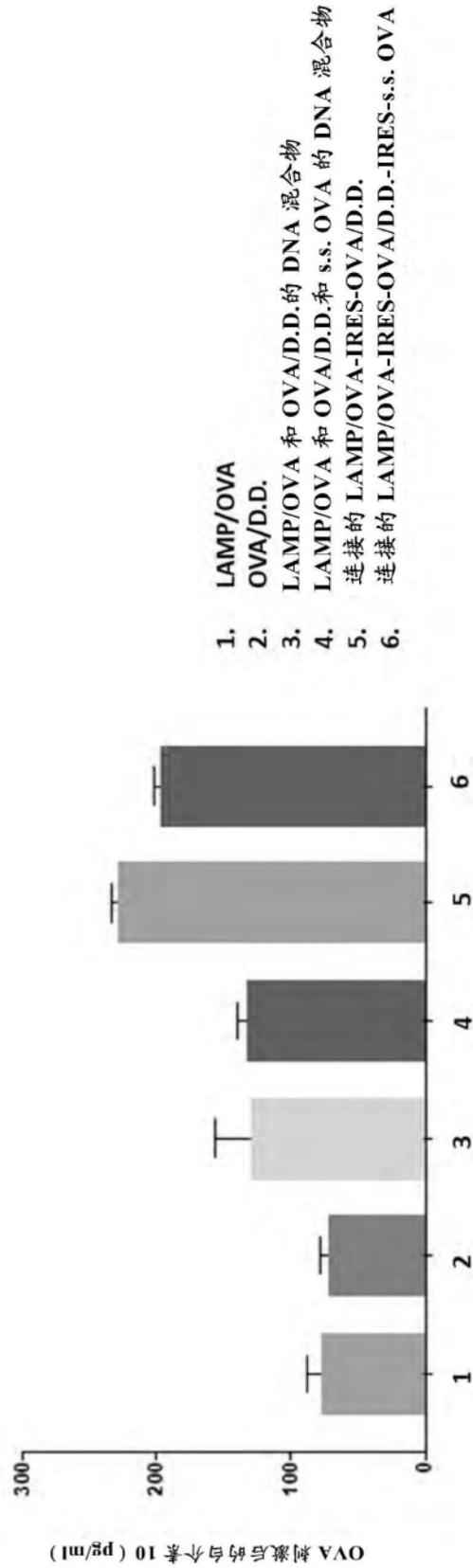


图10

用示例性的多顺反子疫苗构建体免疫的小鼠  
的白介素6 (IL-6) 应答

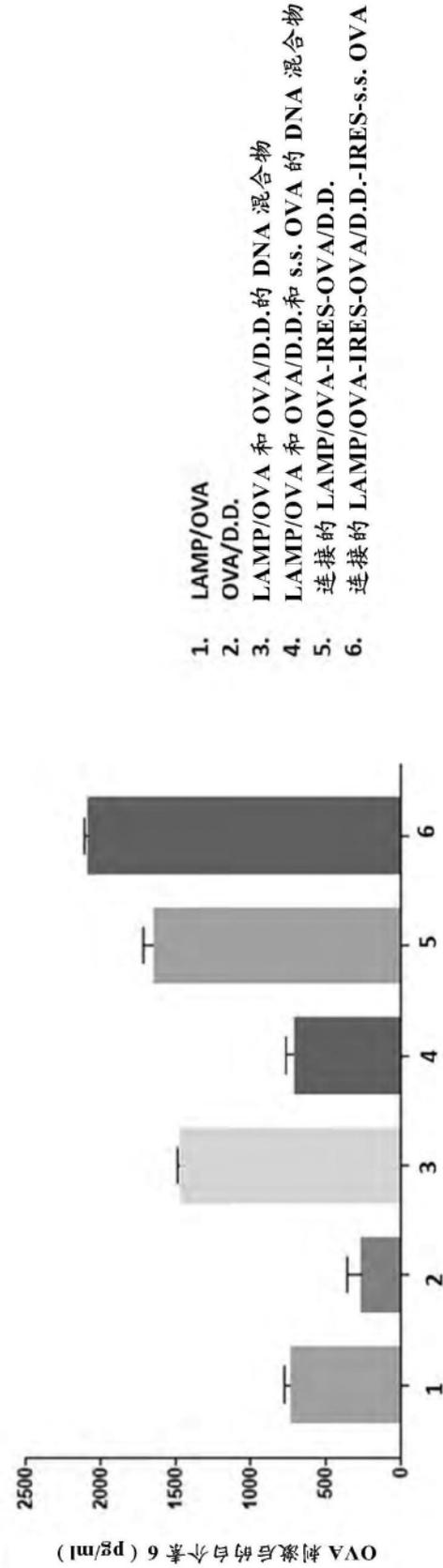


图11

用示例性的多顺反子构建体免疫的小鼠的  
白介素 4 (IL-4) 应答

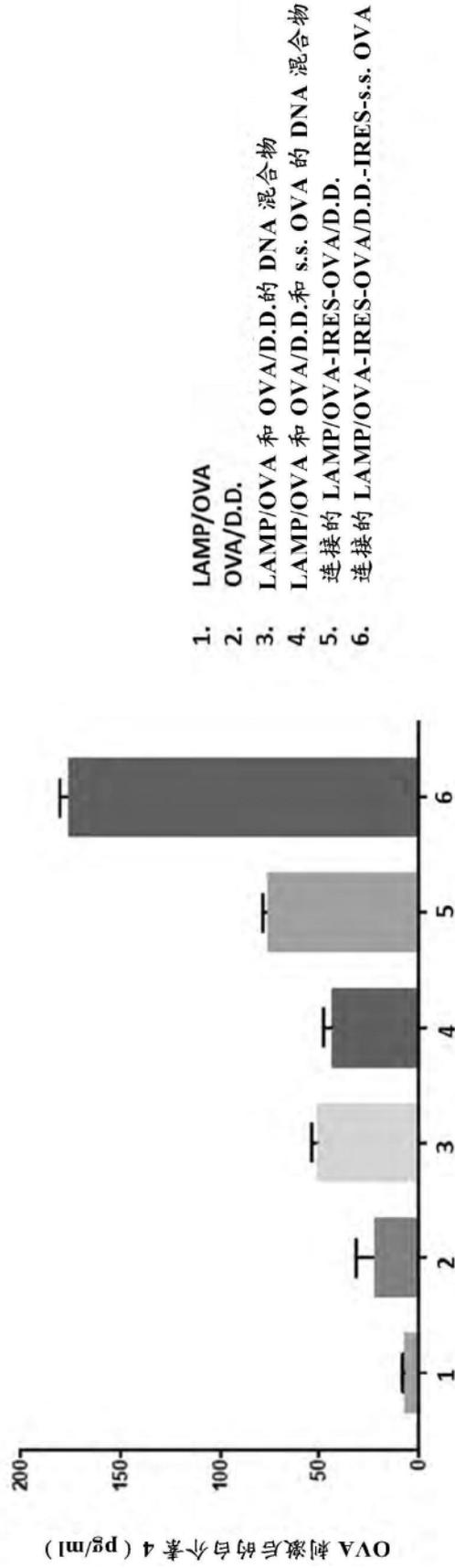


图12

用示例性的多顺反子疫苗构建体免疫的小鼠的  
白介素 5 (IL-5) 应答

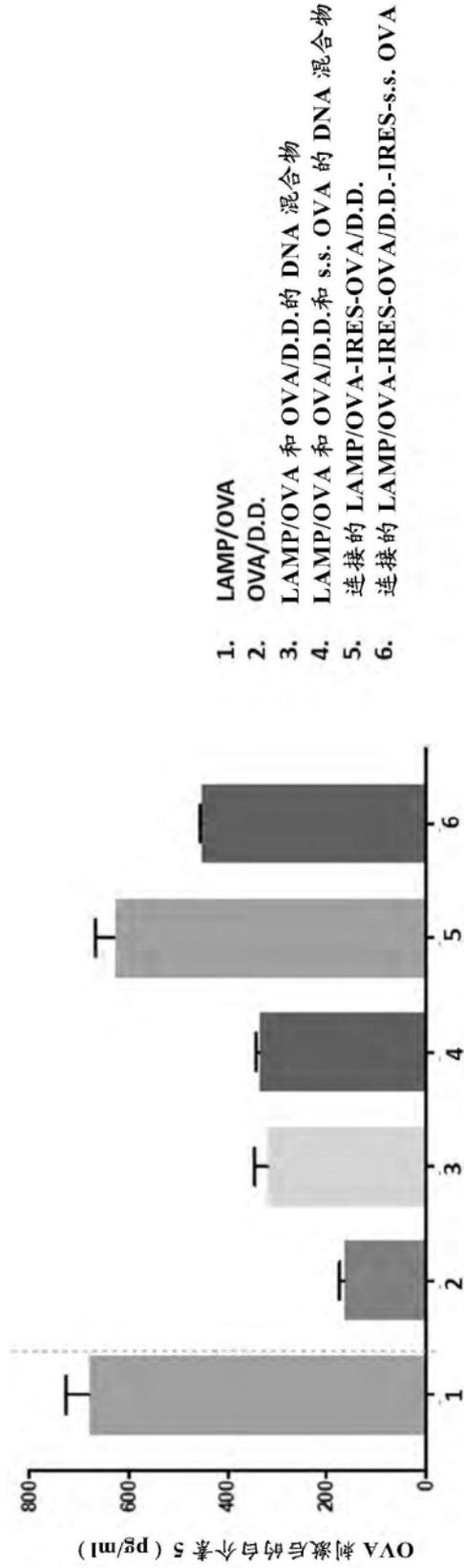


图13

用于增强人树突细胞疫苗诱导的 T 淋巴细胞应答的构建体

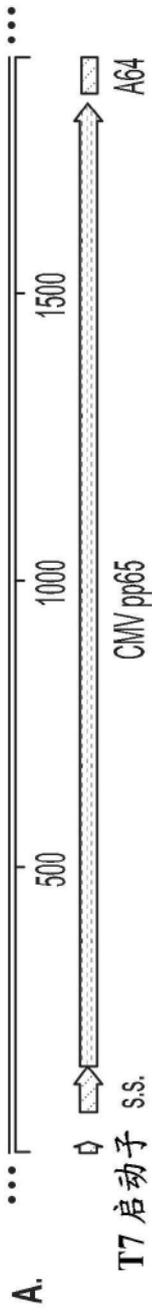


图 14A

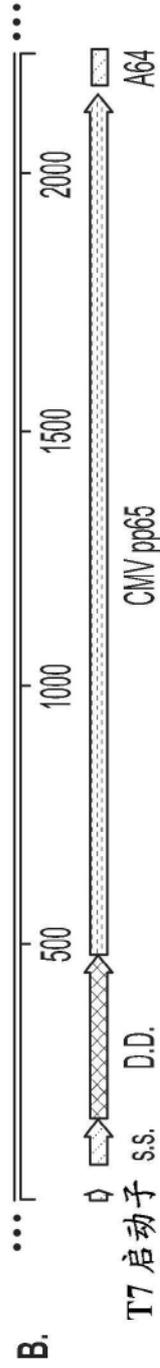


图 14B

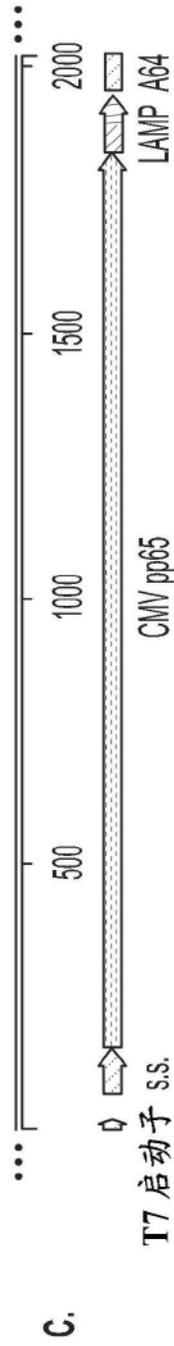


图 14C

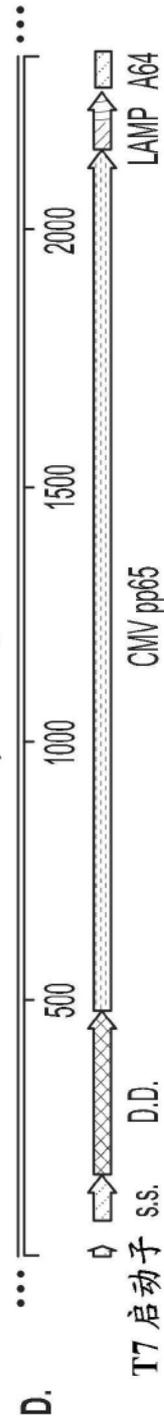


图 14D

流式细胞术用于树突细胞群体表型

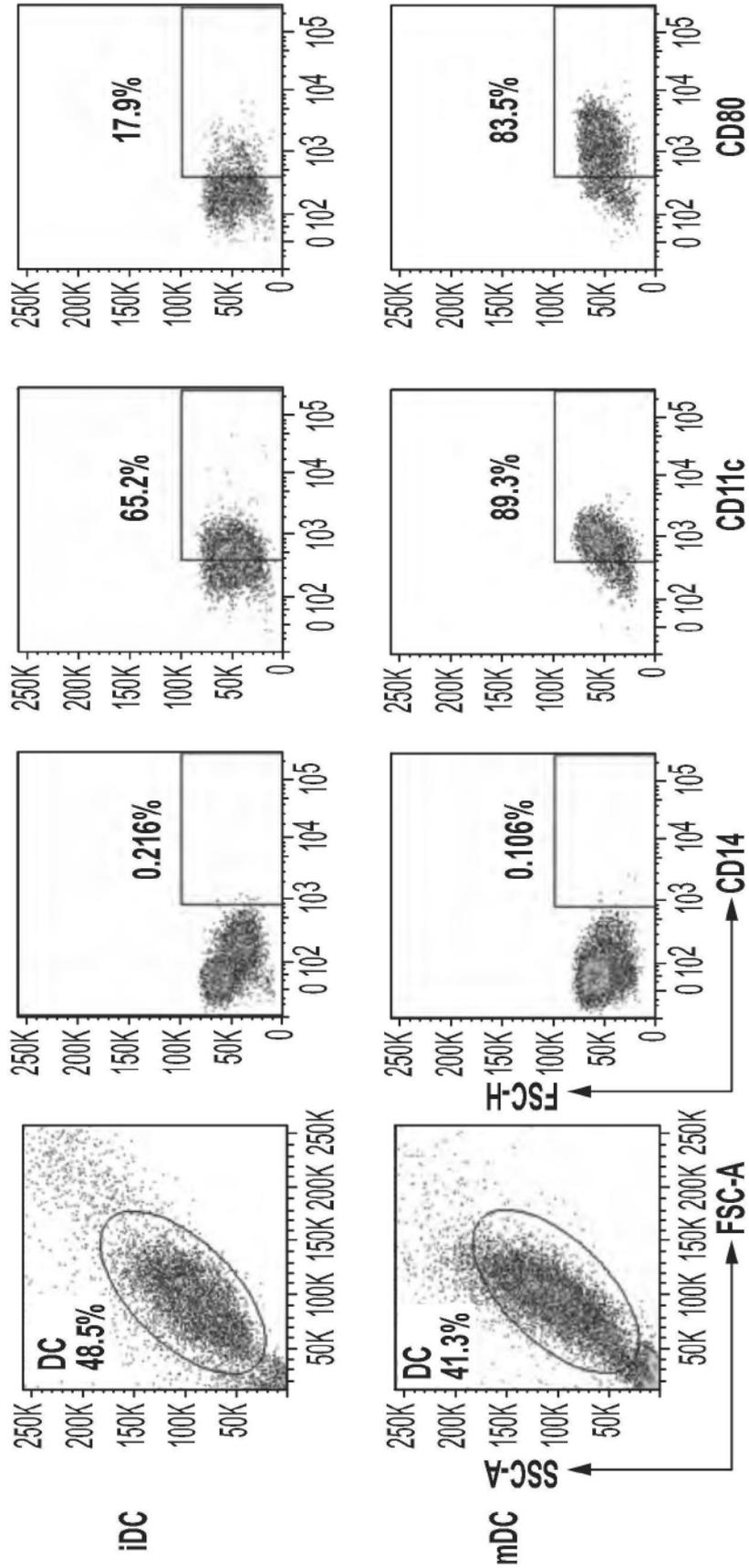


图15

流式细胞术用于树突细胞群体表型

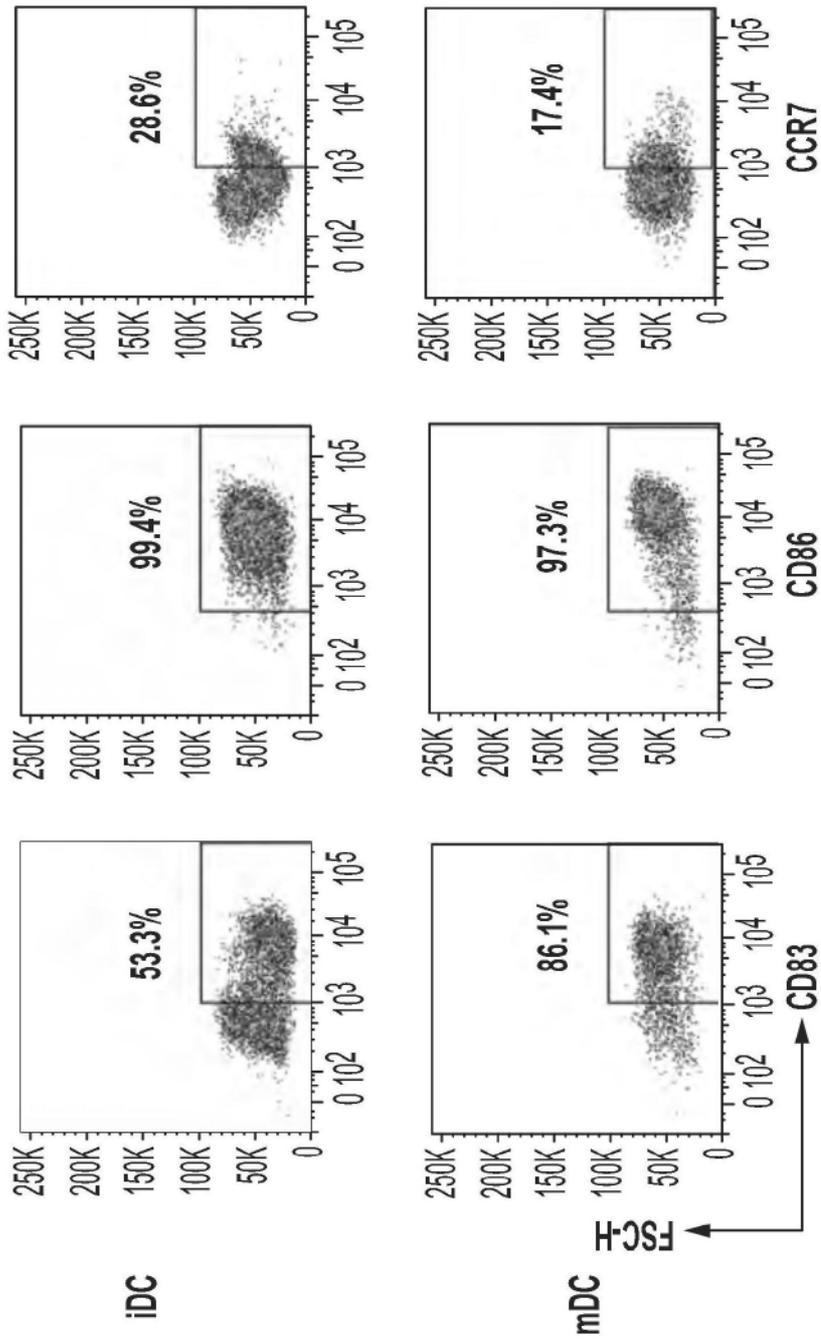


图15续

流式细胞术用于树突细胞群体表型

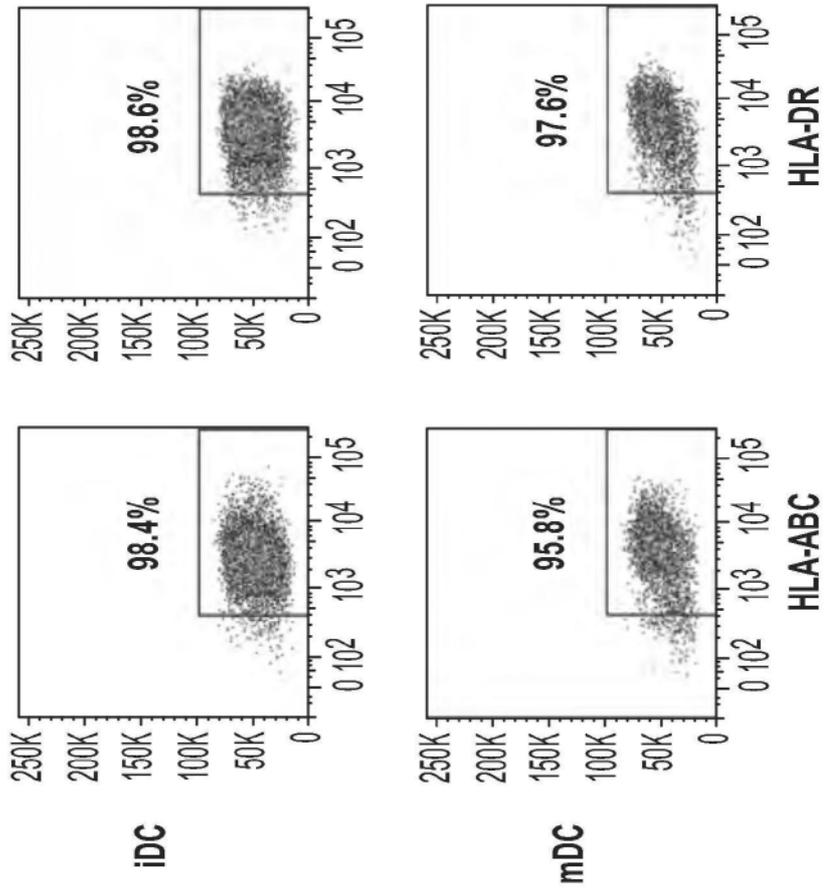


图15续

表达 CMV pp65 的树突细胞的  
流式细胞术测量

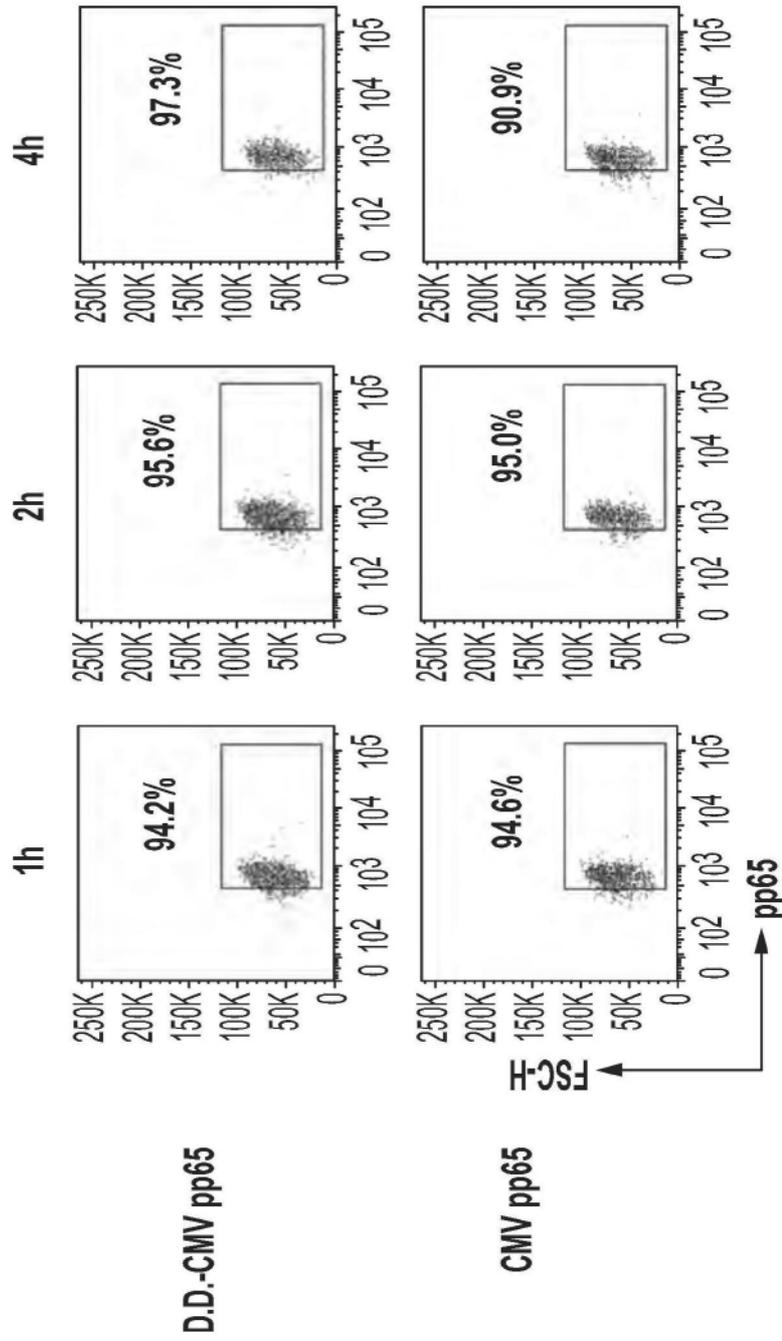


图16A

表达 CMV pp65 的树突细胞的  
流式细胞术测量

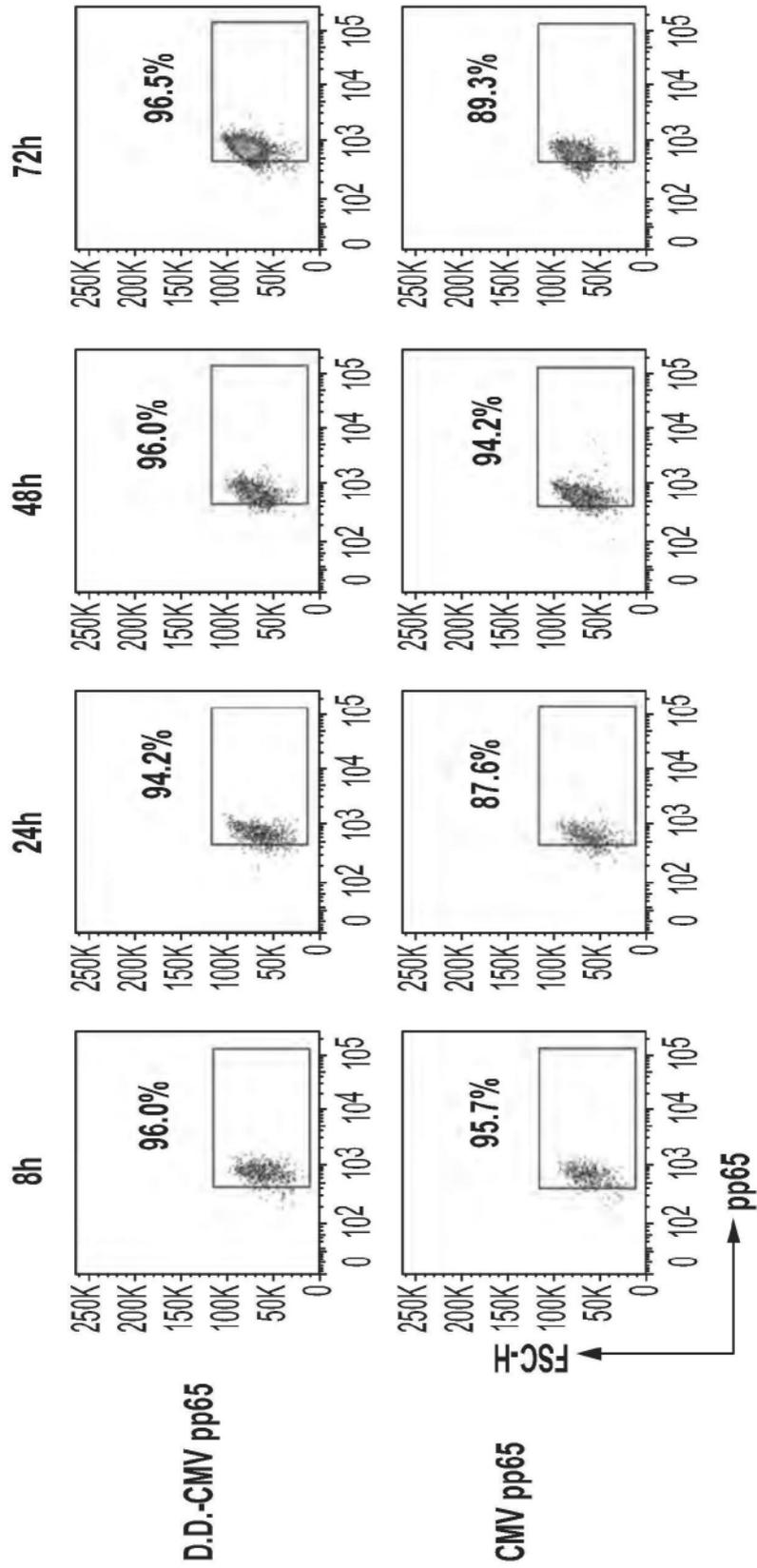


图16A续

树突细胞中 CMV pp65 抗原的表达水平

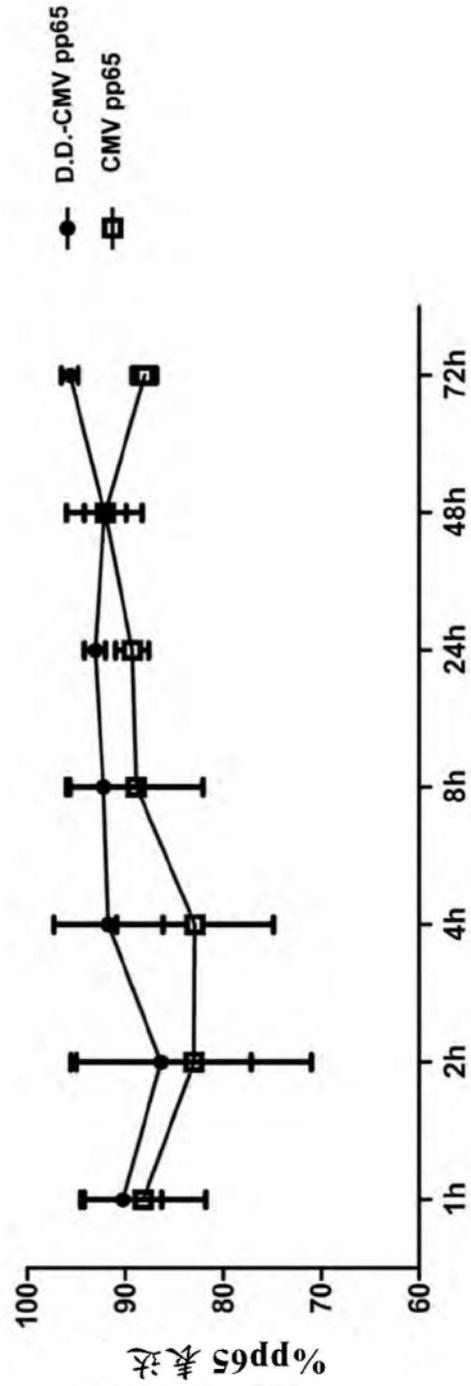


图16B

CMV pp65 特异性 T 细胞应答的流式细胞术测量

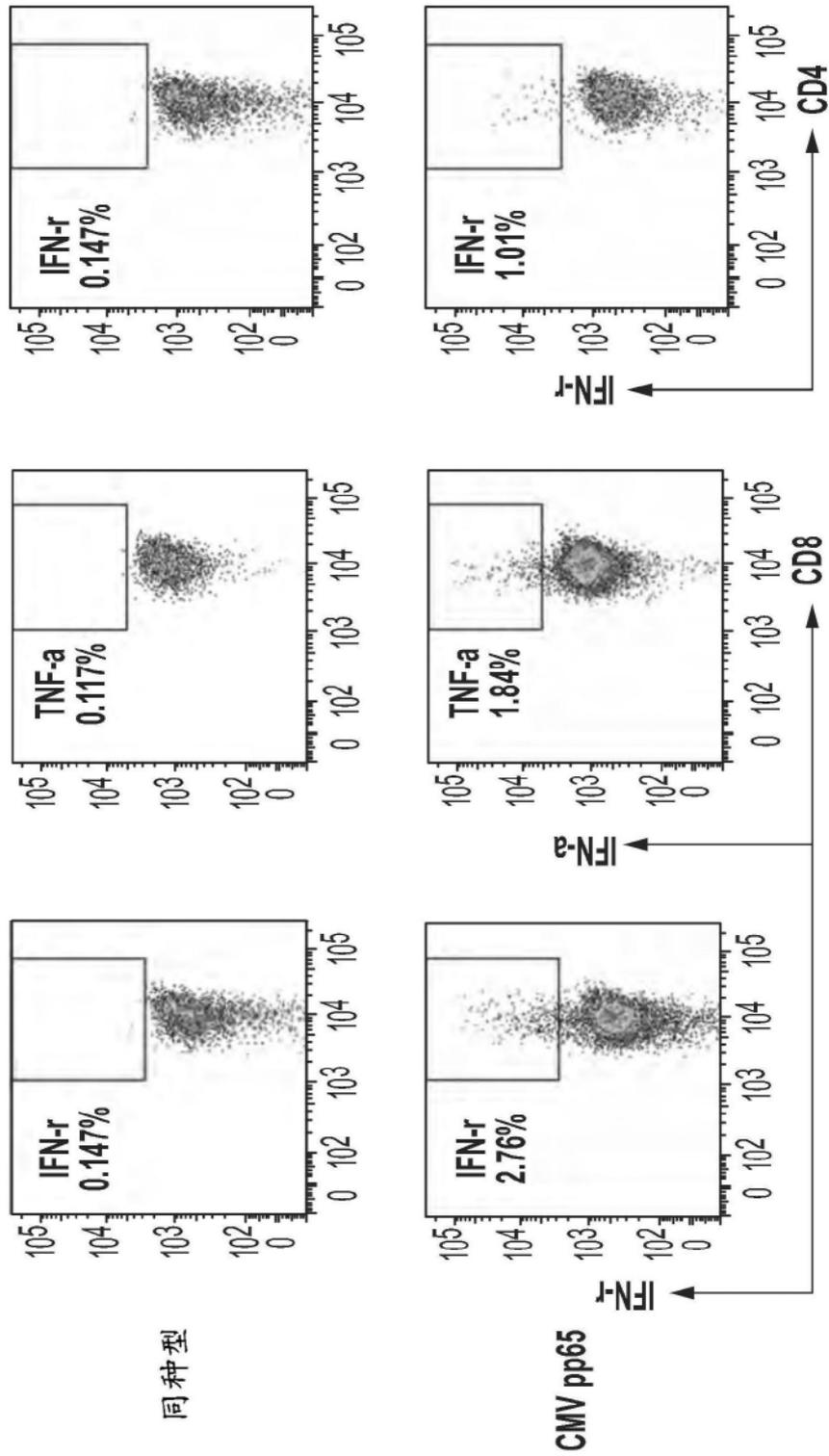


图17A

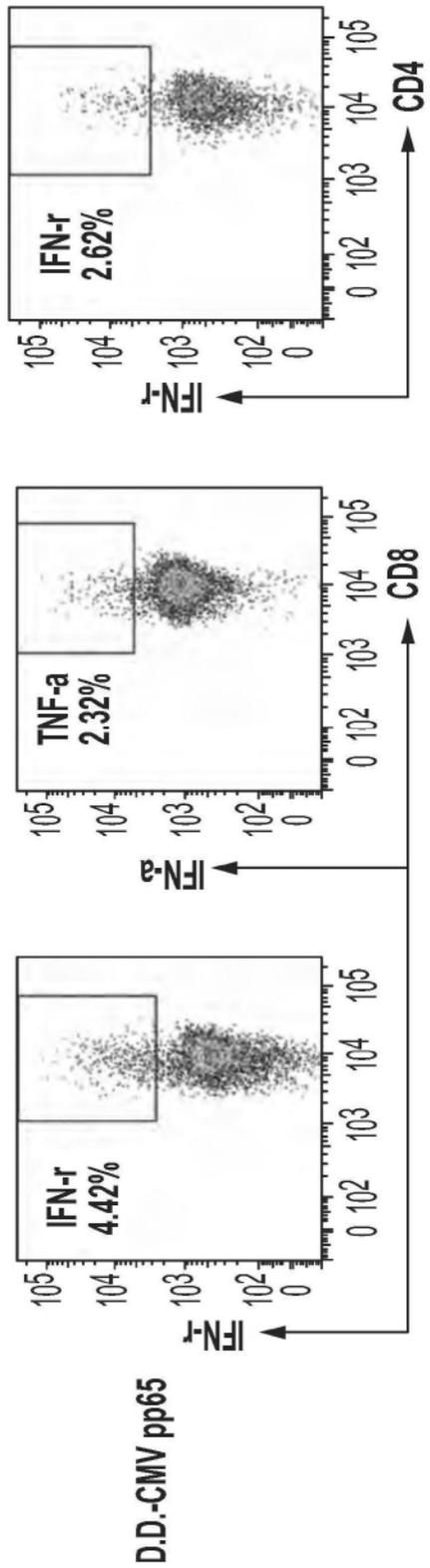


图17A续

CMV pp65 特异性 T 细胞应答

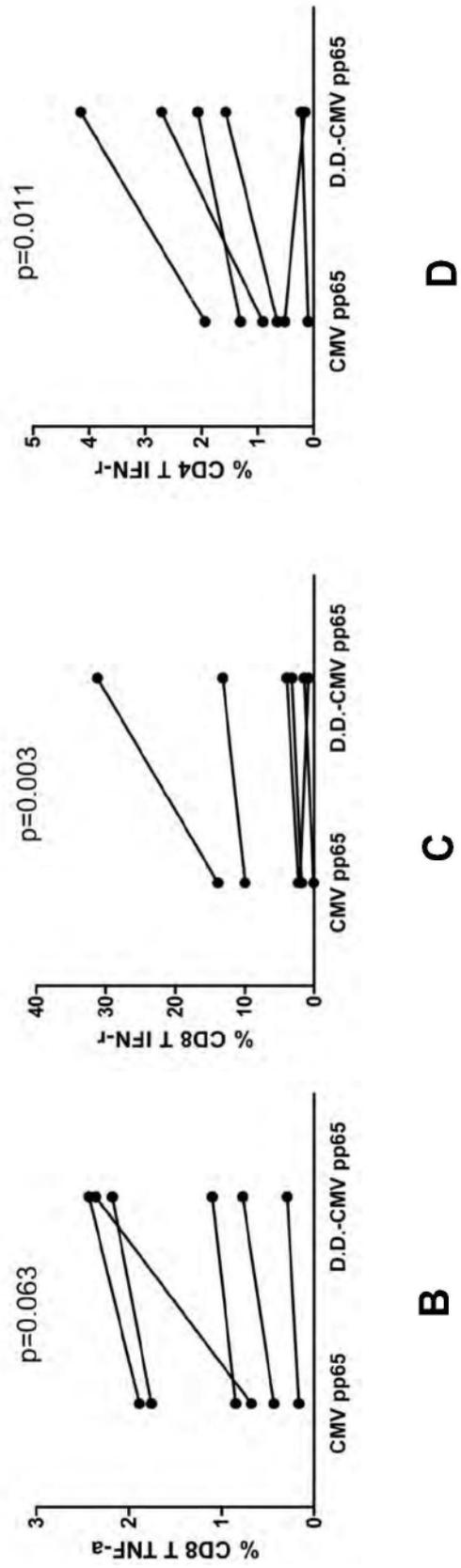


图17B-D

由载有 mRNA 抗原的成熟树突细胞诱导的  
CMV pp65 特异性 T 细胞应答

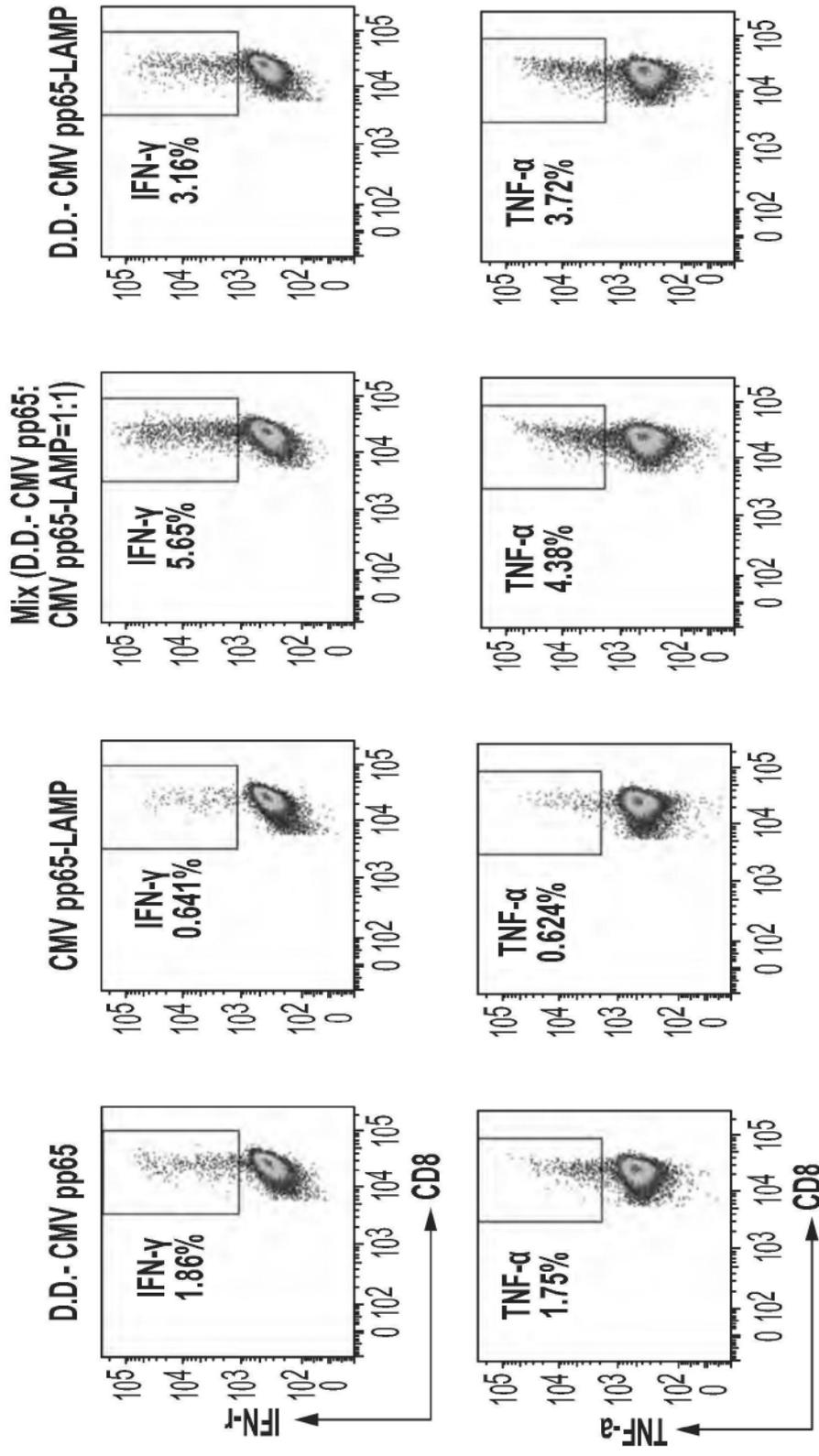


图18

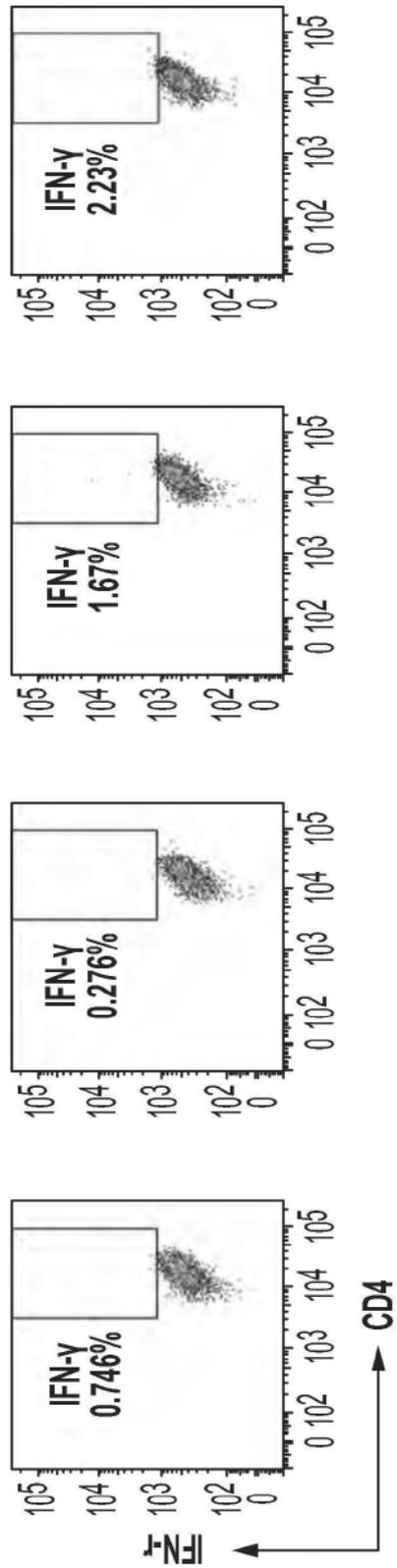


图18续

由载有 mRNA 抗原的未成熟树突细胞诱导的  
CMV pp65 特异性 T 细胞应答

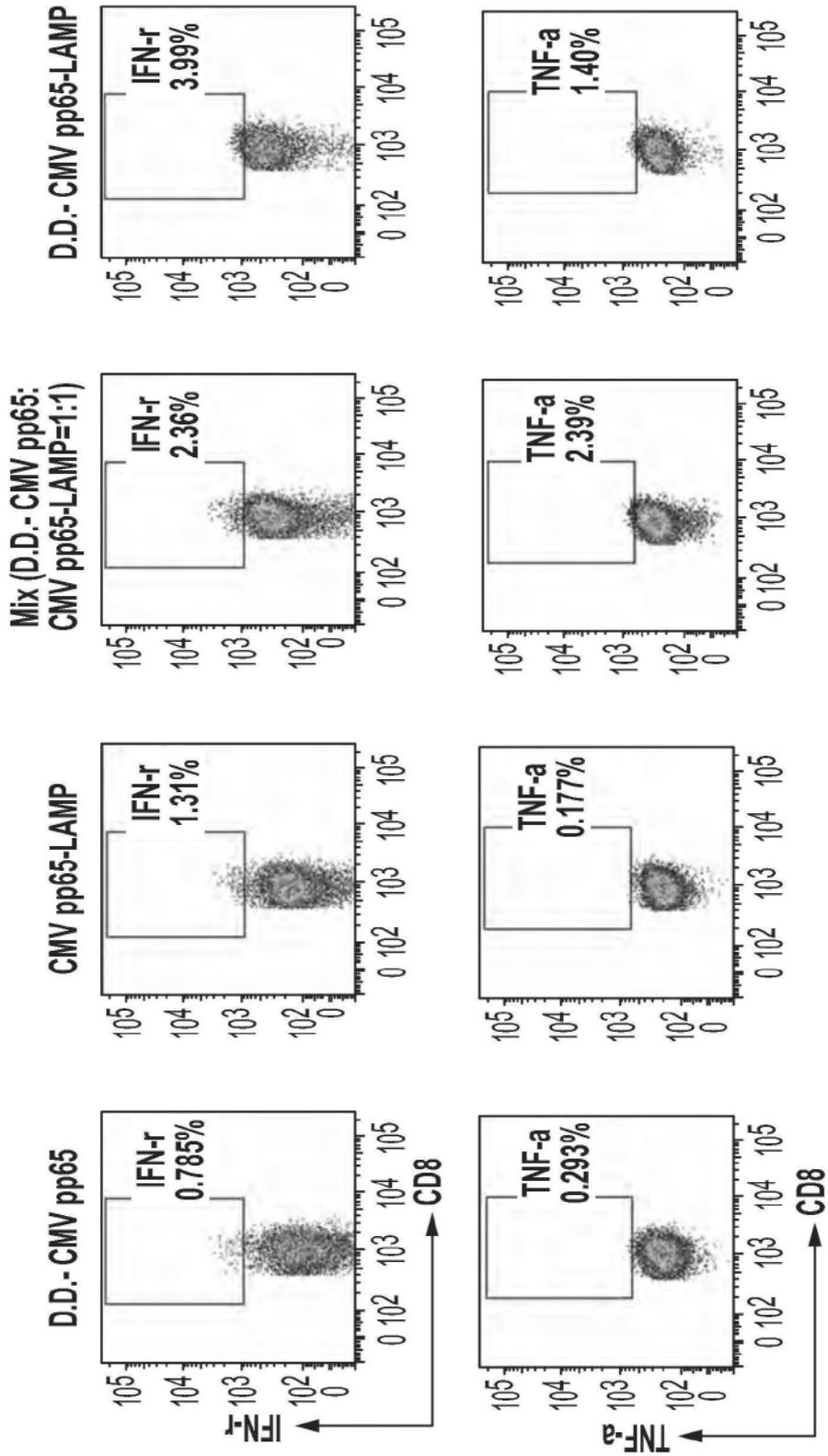


图19

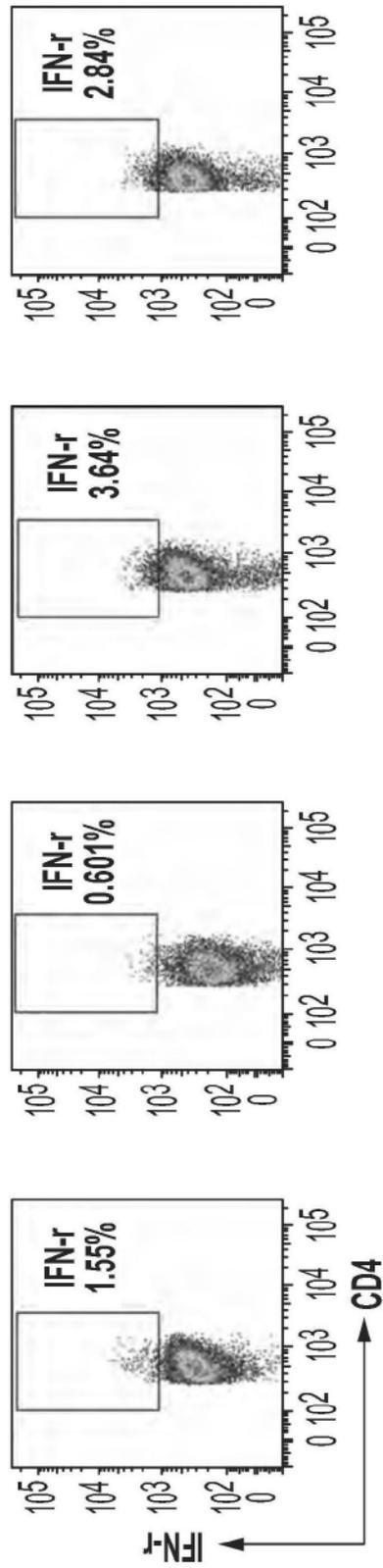


图19续

由载有 mRNA 抗原的树突细胞诱导的人  
gp100 特异性 T 细胞应答

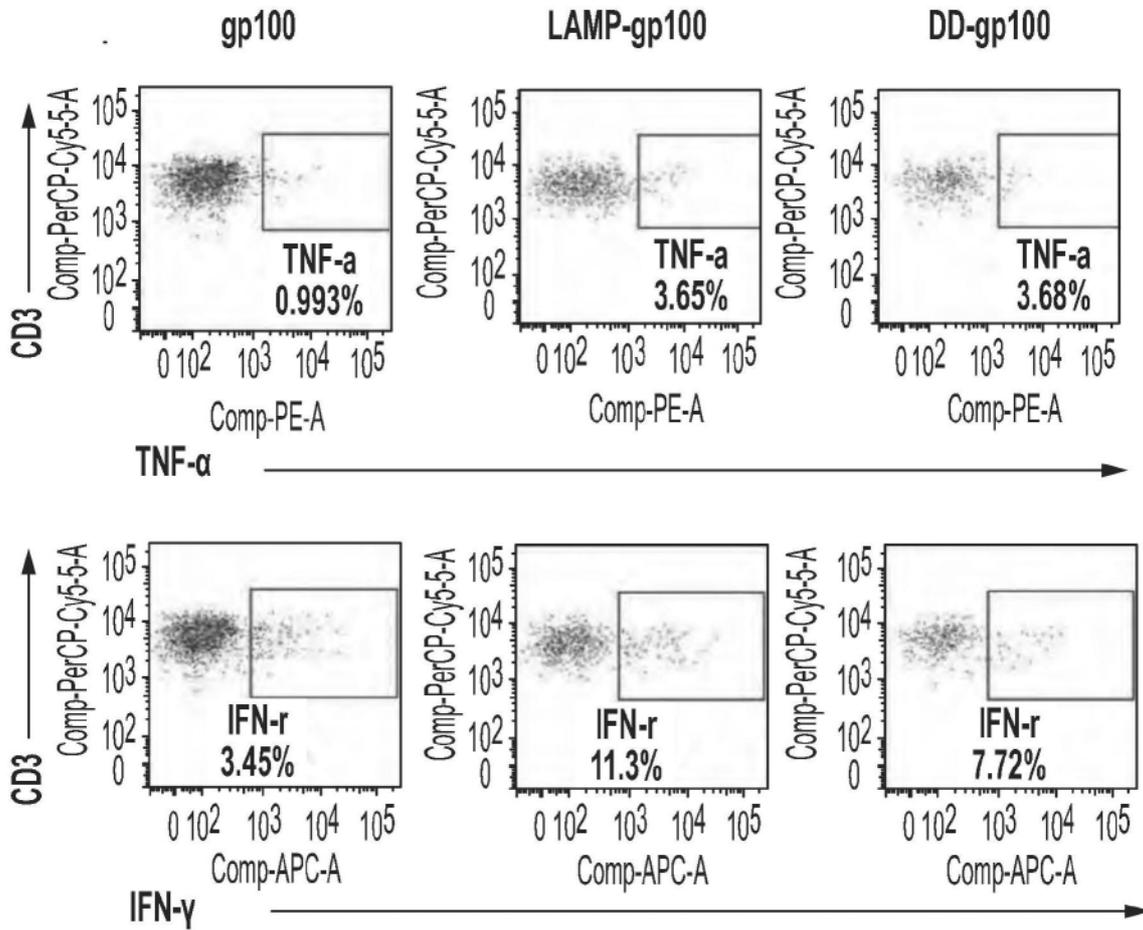


图20A

由载有 mRNA 抗原的树突细胞诱导的人  
gp100 特异性 T 细胞应答

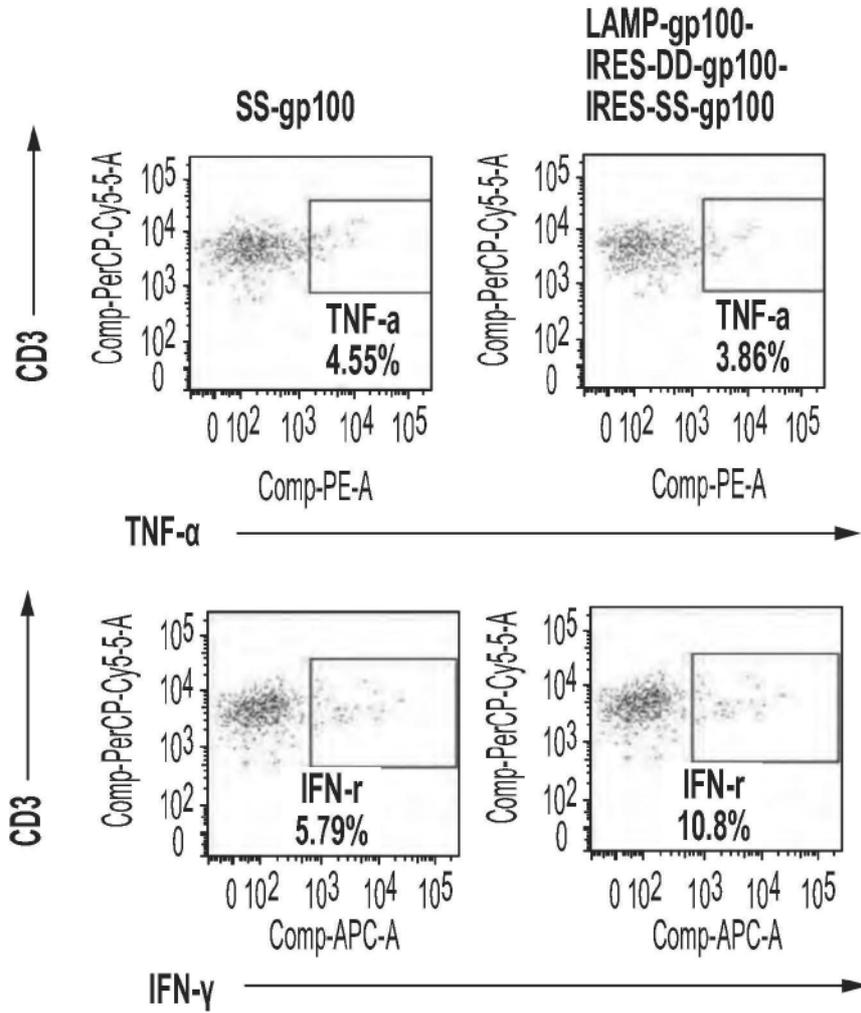


图20A续

由载有 mRNA 抗原的树突细胞诱导的人  
gp100 特异性 T 细胞应答

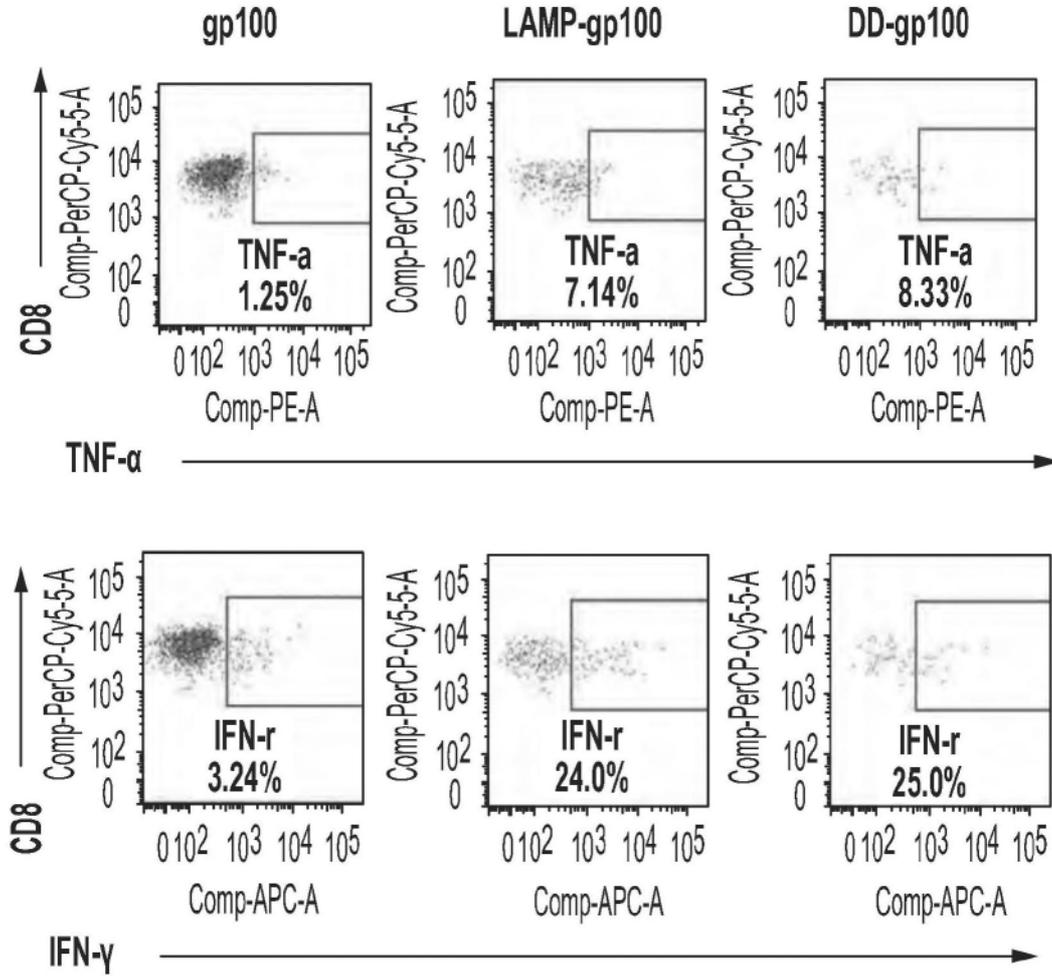


图20B

由载有 mRNA 抗原的树突细胞诱导的人  
gp100 特异性 T 细胞应答

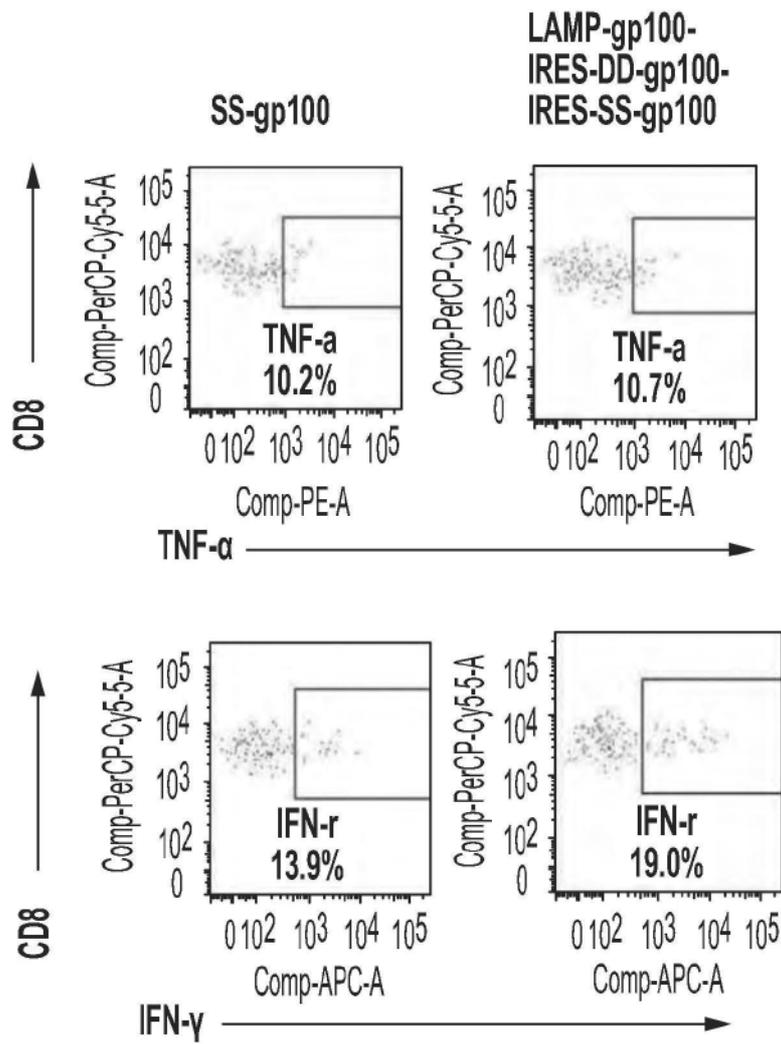


图20B续

由载有 mRNA 抗原的树突细胞诱导的人  
gp100 特异性 T 细胞应答

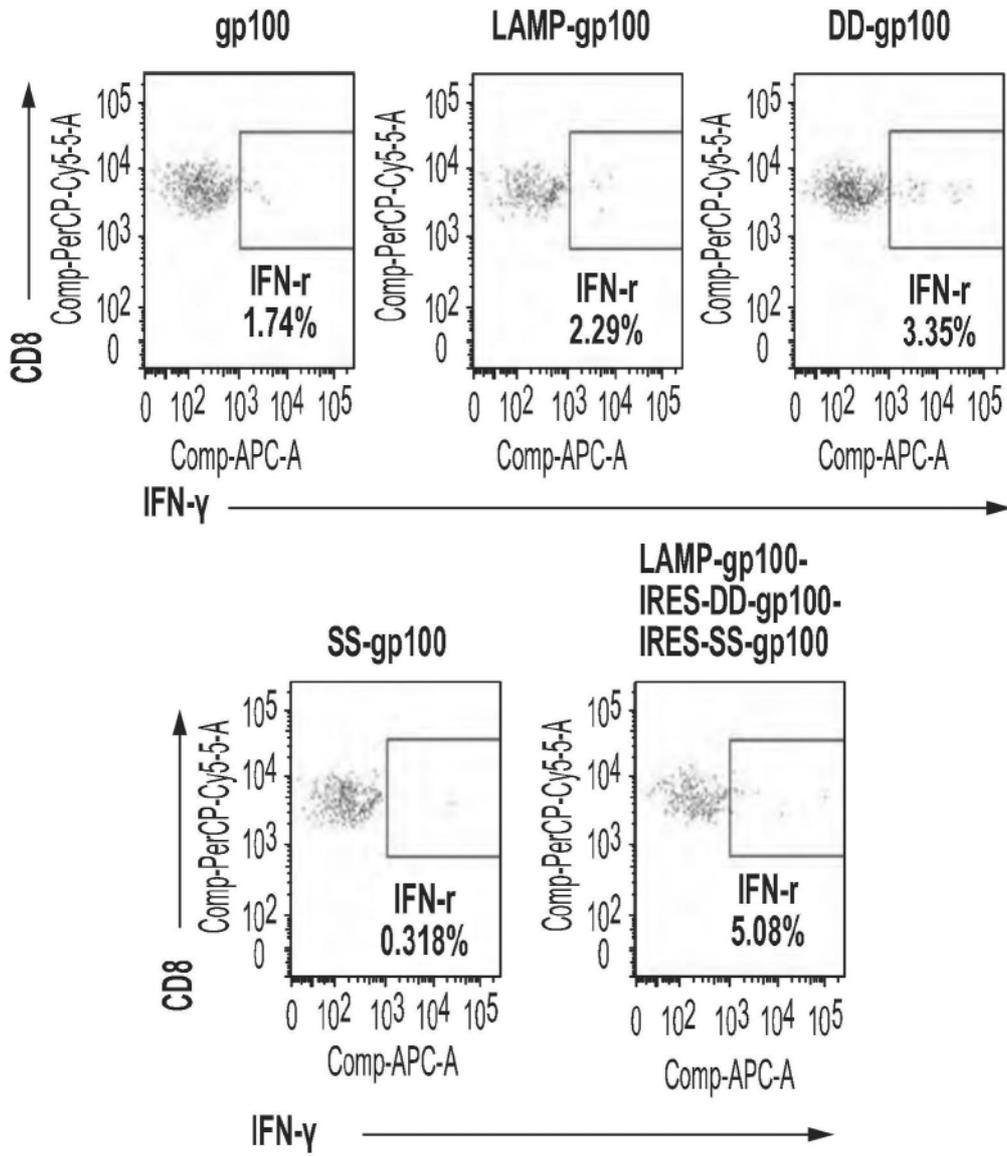


图20C

在树突细胞中由纳米颗粒递送的 CMV-pp65 mRNA 的表达

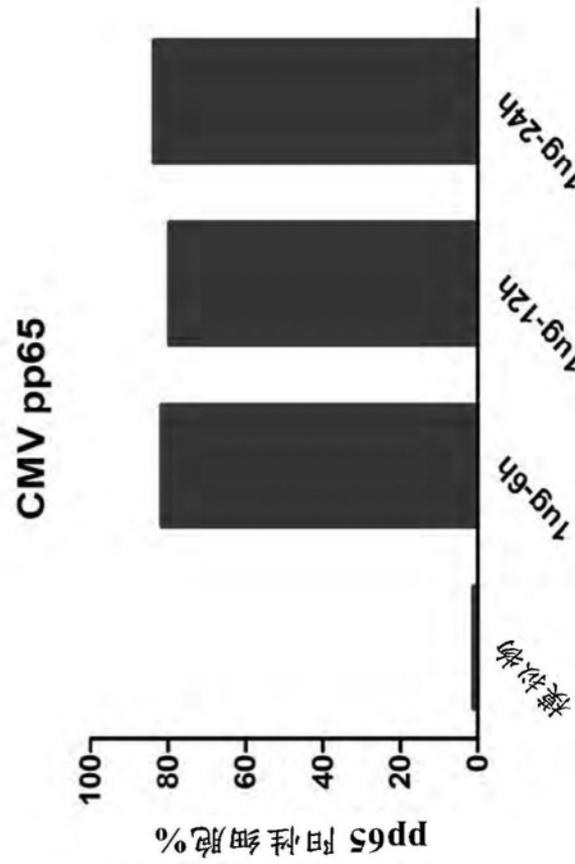


图21

通过将 OVA 与去稳定化结构域 (D.D.) 偶联增强了 MHC I 类表位呈递

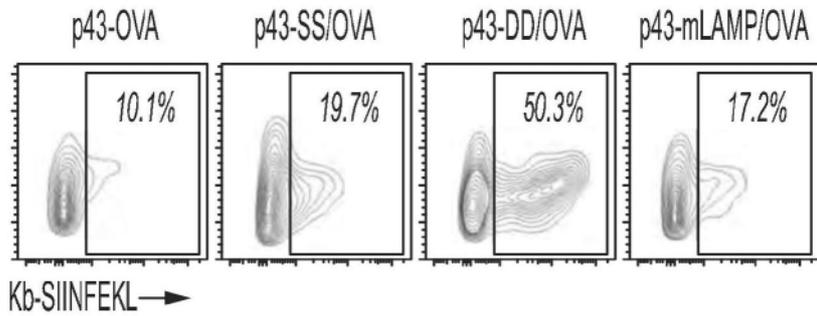


图22A

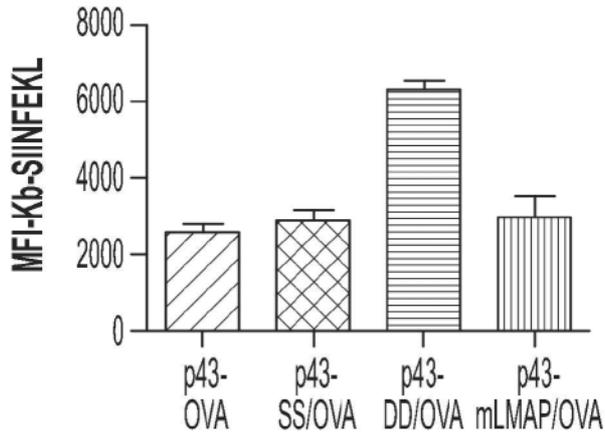


图22B

**D.D.修饰方法与其他方法对 MHC-1/肽抗原呈递的效果比较**

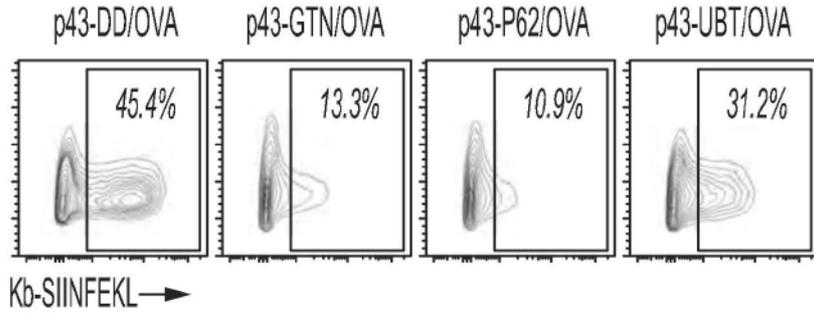


图23A

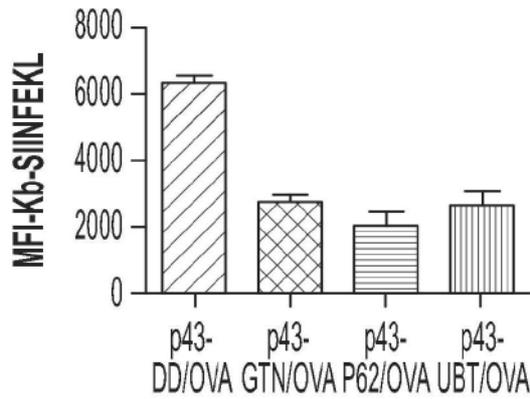


图23B

由不同形式的 OVA 抗原介导的抗肿瘤免疫

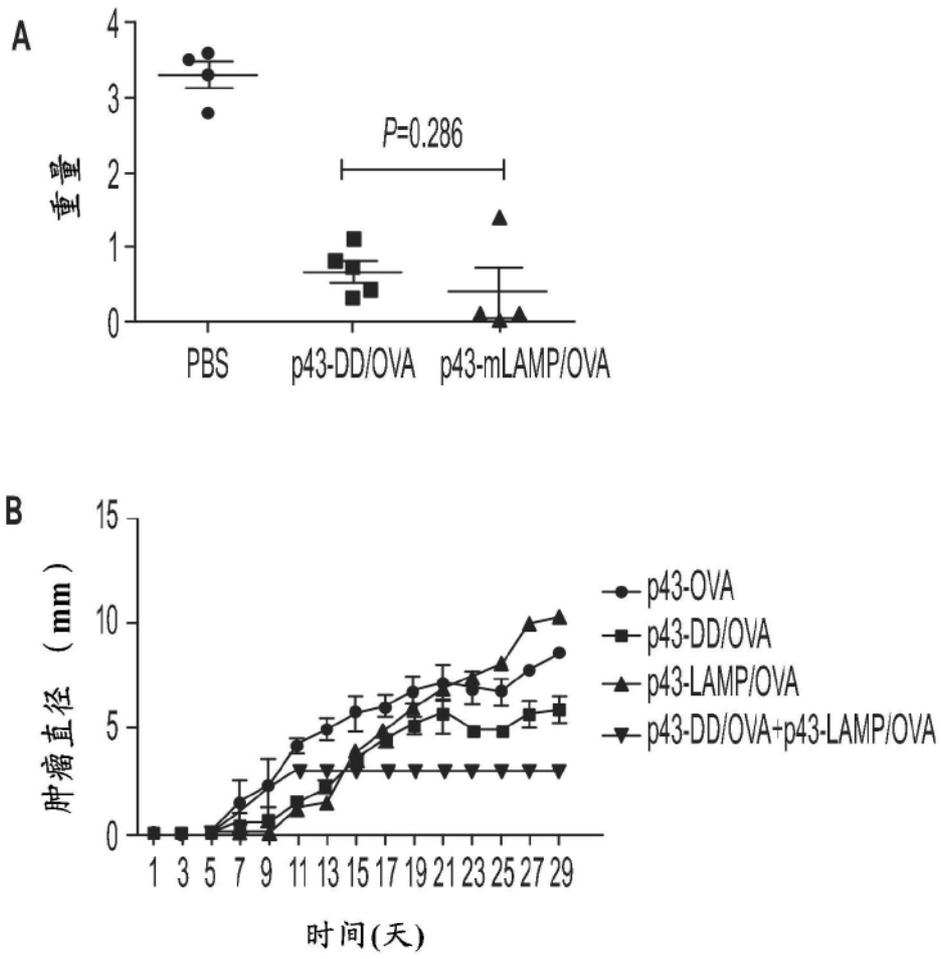


图24