

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815669.5

A61K 39/395

A61K 39/42

A61K 39/40

A61K 39/44

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665533A

[22] 申请日 2003.5.2 [21] 申请号 03815669.5

[30] 优先权

[32] 2002.5.2 [33] US [31] 60/377,483

[86] 国际申请 PCT/US2003/013967 2003.5.2

[87] 国际公布 WO2003/092624 英 2003.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.31

[71] 申请人 康涅狄格大学健康中心

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 P·K·斯里瓦斯塔瓦

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 王景朝

权利要求书 11 页 说明书 62 页

[54] 发明名称 热激蛋白用于增强抗体疗法功效的用途

[57] 摘要

本发明涉及用于预防和治疗任何疾病的方法和药物组合物,其中所述疾病的治疗可以被增强的免疫反应改善,例如感染性疾病、原发性肿瘤性疾病和转移性肿瘤性疾病(即,癌症)或神经变性疾病或淀粉样蛋白病。特别地,本发明涉及包括热激/应激蛋白(HSP)或HSP复合物单独或彼此组合施用,联合免疫反应剂的施用的方法。本发明还提供了包含一种或多种HSP或HSP复合物联合免疫反应剂的药物组合物。此外,本发明涉及本发明的方法和组合物用于增强或改善被动免疫疗法和效应细胞功能的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种免疫治疗方法，所述方法包括对此需要的个体施用纯化的 HSP 制剂和纯化的免疫反应剂。
2. 一种在接受免疫反应剂的个体中改善被动免疫治疗效果的方法，所述方法包括对此需要的个体施用纯化的 HSP 制剂。
3. 一种在对此需要的个体中治疗癌症的方法，所述方法包括对此需要的个体施用纯化的 HSP 制剂和纯化的癌症治疗剂的免疫反应剂。
4. 一种在对此需要的个体中治疗感染性疾病的方法，所述方法包括对此需要的个体施用纯化的 HSP 制剂和纯化的感染性疾病治疗剂的免疫反应剂。
5. 一种在对此需要的个体中治疗神经变性病/淀粉样蛋白病或病症的方法，所述方法包括对此需要的个体施用 HSP 制剂和纯化的神经变性病/淀粉样蛋白病或病症治疗剂的免疫反应剂。
6. 一种免疫治疗方法，所述方法包括如下步骤：
 - (a) 对个体施用识别需要针对其产生免疫反应的组分的抗原的纯化的免疫反应剂；和
 - (b) 对个体施用热激蛋白制剂，其中热激蛋白制剂不表现由所述免疫反应剂识别的所述组分的抗原性；由此在个体中产生免疫反应。
7. 一种通过免疫反应剂在个体中增强或诱导免疫反应的方法，所述方法包括如下步骤：
 - (a) 对个体施用热激蛋白制剂；和
 - (b) 对个体施用识别需要针对其诱导免疫反应的组分的抗原的纯化的免疫反应剂，该免疫反应剂的量在缺少步骤 (a) 的情况下对所述组分是次优的，由此在个体中产生免疫反应，其中热激蛋白制剂不表现组分的抗原性。
8. 一种在对此需要的个体中治疗或预防感染性疾病的方法，所述方法包括如下步骤：
 - (a) 对个体施用能够识别与导致感染性疾病的感染因子相关的抗原的免疫反应剂；和

(b) 对个体施用热激蛋白制剂, 该热激蛋白制剂的量能有效联合步骤(a)从而诱导或增强针对所述感染因子的免疫反应, 其中热激蛋白制剂不表现所述因子的抗原性。

9. 一种在个体中治疗或预防癌症的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用能够识别与癌细胞相关的抗原的免疫反应剂; 和

(b) 对个体施用热激蛋白制剂, 该热激蛋白制剂的量能在个体中有效诱导或增强免疫反应, 其中热激蛋白制剂不表现所述癌细胞的抗原性。

10. 一种治疗或预防个体中神经变性病症的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用能够识别与所述病症相关的分子的免疫反应剂; 和

(b) 对个体施用热激蛋白制剂, 该热激蛋白制剂的量能在个体中有效诱导或增强免疫反应, 其中热激蛋白制剂不表现所述分子的抗原性。

11. 一种免疫治疗方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用识别需要针对其产生免疫反应的组分的抗原的免疫反应剂; 和

(b) 对个体施用热激蛋白制剂, 其中热激蛋白制剂不表现所述组分的抗原性;

由此在个体中产生免疫反应。

12. 一种通过免疫反应剂在个体中诱导免疫反应的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用热激蛋白制剂; 和

(b) 对个体施用识别需要针对其诱导免疫反应的组分的抗原的免疫反应剂, 该免疫反应剂的量在缺少步骤(a)的情况下具有对所述组分较差的免疫原性,

由此在个体中产生免疫反应, 其中热激蛋白制剂表现所述组分的抗原性。

13. 一种在有此需要的个体中治疗或预防感染性疾病的方法, 所

述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用能够识别与导致感染性疾病的感染因子相关的抗原的免疫反应剂; 和

5 (b) 对个体施用热激蛋白制剂, 该热激蛋白制剂的量能有效联合步骤(a)从而诱导或增强针对所述感染因子的免疫反应, 其中热激蛋白制剂表现所述因子的抗原性。

14. 一种治疗或预防个体中癌症的方法, 所述方法包括如下步骤:

10 (a) 对个体施用能够识别与癌细胞相关的抗原的免疫反应剂; 和

(b) 对个体施用热激蛋白制剂, 该热激蛋白制剂的量能在个体中有效诱导或增强免疫反应, 其中热激蛋白制剂表现所述癌细胞的抗原性。

15 15. 一种治疗或预防个体中神经变性疾病的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用能够识别与所述病症相关的分子的免疫反应剂; 和

20 (b) 对个体施用热激蛋白制剂, 该热激蛋白制剂的量能在个体中有效诱导或增强免疫反应, 其中热激蛋白制剂表现所述分子的抗原性。

16. 权利要求 6、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的方法, 其中作为施用所述免疫反应剂结果的在个体中产生的免疫反应相对于缺少步骤(b)时的所述免疫反应增强。

17. 一种免疫治疗方法, 所述方法包括如下步骤:

25 (a) 对此需要的个体施用识别需要针对其产生免疫反应的组分的抗原的免疫反应剂; 和

(b) 对个体施用包含活化的抗原呈递细胞的组合物, 其中已将抗原呈递细胞与热激蛋白制剂接触, 其中热激蛋白制剂表现所述组分的抗原性;

30 由此在个体中产生针对所述组分的免疫反应。

18. 一种通过免疫反应剂在对此需要的个体中诱导免疫反应的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 对个体施用包含活化的抗原呈递细胞的组合物，其中已通过
5 将抗原呈递细胞与热激蛋白制剂接触而将抗原呈递细胞
活化；和

(b) 对个体施用识别需要针对其诱导免疫反应的组分的抗原的
免疫反应剂，所述免疫反应剂的量在缺少步骤(a)的情
况下对于所述组分是次优的，

由此在个体中产生针对所述组分的免疫反应。

19. 一种在有此需要的个体中治疗或预防感染性疾病的方法，所
述方法包括如下步骤：

10 (a) 对个体施用能够识别与导致感染性疾病的感染因子相关的
抗原的免疫反应剂；和

(b) 对个体施用一定量的包含活化的抗原呈递细胞的组合物，
其中已通过将抗原呈递细胞与热激蛋白制剂接触而将抗原
呈递细胞活化，其中包括活化的抗原呈递细胞的组合物的
15 量能有效地联合步骤(a)从而在个体中诱导或增强针对
所述因子的免疫反应。

20. 一种在有此需要的个体中治疗或预防癌症的方法，所述方法
包括如下步骤：

20 (a) 对个体施用能够识别与癌细胞相关的抗原的免疫反应剂；
和

(b) 对个体施用一定量的包含活化的抗原呈递细胞的组合物，
其中已通过将抗原呈递细胞与热激蛋白制剂接触而将抗原
呈递细胞活化，其中包括活化的抗原呈递细胞的组合物的
25 量能有效地联合步骤(a)从而在个体中诱导或增强针对
所述细胞的免疫反应。

21. 一种在有此需要的个体中治疗或预防神经变性疾病的方法，
所述方法包括如下步骤：

(a) 对个体施用能够识别与所述病症相关的分子的免疫反应
剂；和

30 (b) 对个体施用一定量的包含活化的抗原呈递细胞的组合物，
其中已通过将抗原呈递细胞与热激蛋白制剂接触而将抗原
呈递细胞活化，其中包括活化的抗原呈递细胞的组合物的

量能有效地联合步骤 (a) 从而在个体中诱导或增强针对所述分子的免疫反应。

22. 根据权利要求 17、18、19、20 或 21 的方法，其中在施用免疫反应剂之前施用活化的抗原呈递细胞。

5 23. 根据权利要求 17、18、19、20 或 21 的方法，其中在施用免疫反应剂的同时施用活化的抗原呈递细胞。

24. 根据权利要求 17、18、19、20 或 21 的方法，其中在施用免疫反应剂之后施用活化的抗原呈递细胞。

10 25. 根据权利要求 18、19、20 或 21 的方法，其中所述热激蛋白制剂不表现所述组分的免疫原性。

26. 一种免疫治疗方法，所述方法包括如下步骤：

(a) 对个体施用识别需要针对其诱导免疫反应的组分的抗原的免疫反应剂；和

(b) 对个体施用第一热激蛋白制剂；和

15 (c) 对个体施用一定量包含活化的抗原呈递细胞的组合物，其中已通过将抗原呈递细胞与第二热激蛋白制剂接触而将抗原呈递细胞活化，

由此在个体中产生针对所述组分的免疫反应。

20 27. 权利要求 26 的方法，其中第一热激蛋白制剂不表现所述组分的免疫原性。

28. 权利要求 26 的方法，其中第二热激蛋白制剂不表现所述组分的免疫原性。

29. 权利要求 26 的方法，其中第一热激蛋白制剂表现所述组分的免疫原性。

25 30. 权利要求 26 的方法，其中第二热激蛋白制剂表现所述组分的免疫原性。

31. 一种通过免疫反应剂在个体中诱导免疫反应的方法，所述方法包括如下步骤：

(a) 对个体施用第一热激蛋白制剂；和

30 (b) 对个体施用一定量包含活化的抗原呈递细胞的组合物，其中已通过将抗原呈递细胞与第二热激蛋白制剂接触而将抗原呈递细胞活化；和

(c) 对个体施用识别需要针对其诱导免疫反应的组分的抗原的免疫反应剂, 所述免疫反应剂的量在缺少步骤(a)和/或步骤(c)的情况下对所述组分是次优的,

由此在个体中产生针对所述组分的免疫反应。

5 32. 权利要求 31 的方法, 其中第一和第二热激蛋白制剂不表现所述组分的免疫原性。

33. 权利要求 31 的方法, 其中第一和第二热激蛋白制剂表现所述组分的免疫原性。

10 34. 权利要求 31 的方法, 其中第一热激蛋白制剂表现所述组分的免疫原性。

35. 权利要求 31 的方法, 其中第二热激蛋白制剂表现所述组分的免疫原性。

36. 权利要求 31 的方法, 其中第一热激蛋白制剂不表现所述组分的免疫原性。

15 37. 权利要求 31 的方法, 其中第二热激蛋白制剂不表现所述组分的免疫原性。

38. 一种治疗或预防个体中感染性疾病的方法, 所述方法包括如下步骤:

20 (a) 对个体施用能够识别与导致感染性疾病的感染因子相关的抗原的免疫反应剂; 和

(b) 对个体施用第一热激蛋白制剂, 所述第一热激蛋白制剂的量能联合步骤(a)和/或(c)在所述个体中有效诱导或增强针对所述因子的免疫反应; 和

25 (c) 对个体施用一定量包含活化的抗原呈递细胞的组合物, 该组合物能有效联合步骤(a)和/或(b)从而在所述个体中诱导或增强针对所述因子的免疫反应, 其中已通过将抗原呈递细胞与第二热激蛋白制剂接触而将抗原呈递细胞活化,

由此在个体中产生针对所述因子的免疫反应。

30 39. 权利要求 38 的方法, 其中第一和第二热激蛋白制剂不表现所述感染因子的免疫原性。

40. 权利要求 38 的方法, 其中第一和第二热激蛋白制剂表现所

述感染因子的免疫原性。

41. 权利要求 38 的方法，其中第一热激蛋白制剂表现所述感染因子的免疫原性。

5 42. 权利要求 38 的方法，其中第二热激蛋白制剂表现所述感染因子的免疫原性。

43. 权利要求 38 的方法，其中第一热激蛋白制剂不表现所述感染因子的免疫原性。

44. 权利要求 38 的方法，其中第二热激蛋白制剂不表现所述感染因子的免疫原性。

10 45. 一种治疗或预防个体中癌症的方法，所述方法包括如下步骤：

(a) 对个体施用识别所述癌细胞相关抗原的免疫反应剂；和

(b) 对个体施用第一热激蛋白制剂，所述第一热激蛋白制剂的量能联合步骤 (a) 和/或 (c) 在所述个体中有效诱导或增强针对所述癌细胞的免疫反应；和

15 (c) 对个体施用一定量包含活化的抗原呈递细胞的组合物，该组合物能有效联合步骤 (a) 和/或 (b) 从而在所述个体中诱导或增强针对所述癌细胞的免疫反应，其中已通过将抗原呈递细胞与第二热激蛋白制剂接触而将抗原呈递细胞活化，

20 由此在个体中产生针对所述癌细胞的免疫反应。

46. 权利要求 45 的方法，其中第一和第二热激蛋白制剂不表现所述癌细胞的免疫原性。

47. 权利要求 45 的方法，其中第一和第二热激蛋白制剂表现所述癌细胞的免疫原性。

25 48. 权利要求 45 的方法，其中第一热激蛋白制剂表现所述癌细胞的免疫原性。

49. 权利要求 45 的方法，其中第二热激蛋白制剂表现所述癌细胞的免疫原性。

30 50. 权利要求 45 的方法，其中第一热激蛋白制剂不表现所述癌细胞的免疫原性。

51. 权利要求 45 的方法，其中第二热激蛋白制剂不表现所述癌细胞的免疫原性。

52. 一种治疗或预防个体中神经变性病症的方法，所述方法包括如下步骤：

- (a) 对个体施用识别所述神经变性病症相关分子的免疫反应剂；和
- 5 (b) 对个体施用第一热激蛋白制剂，所述第一热激蛋白制剂的量能联合步骤(a)和/或(c)在所述个体中有效诱导或增强针对所述分子的免疫反应；和
- 10 (c) 对个体施用一定量包含活化的抗原呈递细胞的组合物，该组合物能有效联合步骤(a)和/或(b)从而在所述个体中诱导或增强针对所述分子的免疫反应，其中已通过将抗原呈递细胞与第二热激蛋白制剂接触而将抗原呈递细胞活化，

由此在个体中产生针对所述分子的免疫反应。

53. 权利要求 52 的方法，其中第一和第二热激蛋白制剂不表现
15 所述分子的免疫原性。

54. 权利要求 52 的方法，其中第一和第二热激蛋白制剂表现所述分子的免疫原性。

55. 权利要求 52 的方法，其中第一热激蛋白制剂表现所述分子的免疫原性。

20 56. 权利要求 52 的方法，其中第二热激蛋白制剂表现所述分子的免疫原性。

57. 权利要求 52 的方法，其中第一热激蛋白制剂不表现所述分子的免疫原性。

25 58. 权利要求 52 的方法，其中第二热激蛋白制剂不表现所述分子的免疫原性。

59. 包含纯化的 HSP 制剂和一种或多种纯化的免疫反应剂的组合物。

60. 权利要求 60 的组合物，其还包括活化的 APC。

61. 权利要求 60 的组合物，其中所述组合物增强效应细胞功能。

30 62. 一种药盒，其包括：

- (a) 包含纯化的热激蛋白制剂的第一容器，所述纯化的热激蛋白制剂的量能够有效增强由免疫反应剂引发的免疫反应，

所述免疫反应针对免疫反应剂中需要针对其产生免疫反应的组分；和

(b) 包含免疫反应剂的第二容器，所述免疫反应剂为纯化形式且其量，在施用(a)的热激蛋白制剂之前、同时或之后施用，能有效诱导针对所述组分的免疫反应。

5

63. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述免疫反应剂是预防性或治疗性抗体。

64. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述免疫反应剂是单克隆抗体。

10

65. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述免疫反应剂是多克隆抗体。

66. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述免疫反应是增强的效应细胞功能。

15

67. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述免疫反应是增强的细胞因子释放。

68. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述免疫反应是增强的针对具有由所述抗体识别的表位的细胞、病原体或蛋白的抗体-依赖性细胞性细胞毒性作用或抗体-介导的调理作用或吞噬作用。

20

69. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述热激蛋白制剂包括选自 hsp60、hsp70、hsp90、gp96、钙网织蛋白或其组合的热激蛋白。

70. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述热激蛋白制剂包括选自 hsp60-肽复合物、hsp70-肽复合物、hsp90-肽复合物、gp96-肽复合物、钙网织蛋白-肽复合物或其组合的热激蛋白-肽复合物。

25

71. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述热激蛋白制剂包含热激蛋白-肽复合物和纯化的热激蛋白。

72. 权利要求 26、31、38、45 或 52 的方法，其中所述第一热激蛋白制剂和第二热激蛋白制剂各包含选自 hsp60、hsp70、hsp90、gp96、钙网织蛋白或其组合的热激蛋白。

30

73. 权利要求 26、31、38、45 或 52 的方法，其中所述第一热激蛋白制剂和第二热激蛋白制剂各包含选自 hsp60-肽复合物、hsp70-肽复合物、hsp90-肽复合物、gp96-肽复合物、钙网织蛋白-肽复合物或

其组合的热激蛋白肽复合物。

74. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述个体为人而所述热激蛋白制剂包括哺乳动物的热激蛋白。

5 75. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中在施用免疫反应剂之前施用所述热激蛋白制剂。

76. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中在施用免疫反应剂的同时施用所述热激蛋白制剂。

77. 权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法，其中所述热激蛋白是在施用免疫反应剂之后施用的制剂。

10 78. 权利要求 2、8、13、19 或 38 的方法，其中所述感染性疾病由感染因子导致，所述感染因子选自甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流行性感胃、水痘、腺病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、牛痘病毒、鼻病毒、艾柯病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头状瘤病毒、乳多泡病毒、巨细胞病毒、棘状病毒、虫
15 媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、I 型人免疫缺陷病毒 (HIV-I)、II 型人免疫缺陷病毒 (HIV-II)、分枝杆菌、立克次氏体、支原体、奈瑟菌属、军团杆菌属、利什曼原虫、kokzidioa、锥虫和衣原体。

20 79. 权利要求 3、9、14、20 或 45 的方法，其中所述癌症选自纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、
25 肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病，例如急性淋巴细胞性白血病和急性髓细胞性白血病（成髓细胞性白血病、前
30 髓细胞性白血病、粒单核细胞白血病、单核细胞性白血病和红白血病）、慢性白血病（慢性髓细胞（粒细胞）性白血病和慢性淋巴细胞

性白血病)和真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、特发性巨球蛋白血症和重链病。

80. 权利要求 5、10、15、21 或 52 的方法,其中神经变性疾病选自阿耳茨海默氏病、年龄相关性认知能力丧失、老年痴呆、帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化、威尔逊氏病、大脑性瘫痪、进行性核上性麻痹、关岛病、路易小体痴呆、朊病毒病、海绵状脑病、克罗伊茨费尔特-雅各布病、多聚谷氨酰胺病、亨廷顿氏舞蹈病、强直性肌营养不良、弗里德利希共济失调、共济失调、吉累斯·德拉图雷特氏综合征、癫痫发作病症、癫痫、慢性癫痫发作病症、中风、脑外伤、脊髓创伤、
- 5
10
AIDS 痴呆、酒精中毒、孤独症、视网膜缺血、青光眼、自主功能病症、高血压、神经精神病症、精神分裂症或情感分裂性精神障碍。

热激蛋白用于增强抗体疗法功效的用途

本申请要求提交于2002年5月2日的美国临时申请号60/377,483
5 的优先权，所述临时申请全文引入此处作为参考。

1. 发明领域

本发明涉及用于预防和治疗任何疾病的方法和药物组合物，其中
所述疾病的治疗可被增强的免疫反应改善，例如感染性疾病、原发性
和转移性肿瘤性疾病（即，癌症）或神经变性疾病或淀粉样蛋白病。
10 具体来说，本发明涉及包括热激/应激蛋白（HSP）或 HSP 复合物单独
或彼此组合施用，联合免疫反应剂的施用的方法。本发明还提供了包
含一种或多种 HSP 或 HSP 复合物联合免疫反应剂的药物组合物。此外，
本发明涉及本发明的方法和组合物用于增高或改善被动免疫疗法和效
应细胞功能的用途。

2. 发明背景

2.1 免疫反应

生物体的免疫系统对病原体或其它有害因子产生两类反应-体液
反应和细胞介导的反应（参见 Alberts, B. 等, 1994, Molecular Biology
of the Cell. 1195-96）。当静息 B 细胞被抗原激活而增殖并成熟为
20 抗体分泌细胞时，其产生并分泌具有独特抗原结合部位的抗体。已知
该抗体分泌型反应是体液应答。另一方面，T 细胞种类繁多的反应
统称为细胞介导的免疫反应。T 细胞主要有两类，细胞毒性 T 细胞和
辅助性 T 细胞。细胞毒性 T 细胞直接杀死被病毒或某些其它细胞内微
生物感染的细胞。与之对照，辅助性 T 细胞辅助激发其它细胞的反应：
25 例如，它们辅助活化巨噬细胞，树突状细胞和 B 细胞（参见 Alberts,
B. 等, 1994, Molecular Biology of the Cell. 1228）。细胞毒性 T
细胞和辅助性 T 细胞均可识别肽片段形式的抗原，所述肽片段由异源
蛋白抗原在靶细胞内降解而产生，且由此其均依赖主要组织相容性复
合体（MHC）分子，该分子结合这些肽片段，将其携带至细胞表面，
30 然后将其呈递给 T 细胞（参见 Alberts, B. 等, 1994, Molecular Biology
of the Cell. 1228）。一般在抗原呈递细胞（APC）上可发现丰富的 MHC
分子。

除上述获得性免疫外，先天免疫也在生物体的免疫反应中发挥作用。先天免疫系统是抵御疾病的第一道防线并能提供广泛、但相对非特异性的宿主反应，该反应缺乏抗原特异性和免疫记忆特性，而这些特性是获得性免疫的特征。先天免疫的效应机制包括抗微生物肽，粒细胞和吞噬细胞，自然杀伤细胞，树突状细胞和补体旁路，这些机制产生并控制适应性免疫反应。Medzhitov 和 Janeway, 2000, *New England J Med* 343: 338-344; Moretta, 2002, *Nature Reviews Immunology* 2: 957-964.

2.2 抗原呈递

抗原呈递细胞 (APC)，例如巨噬细胞和树突状细胞，是先天和适应性免疫反应的关键组分。呈递给 T 细胞的抗原通常存在于其它细胞 (APC) 的表面。APC 能俘获淋巴源性和血源性抗原并 (在内化和降解之后) 将抗原性肽片段 (与主要组织相容性复合物 (MHC) 的细胞表面分子结合的) 呈递给 T 细胞。然后 APC 可活化 T 细胞 (细胞介导的反应) 从而克隆扩增，这些子细胞可以或者发展为细胞毒性 T 细胞，或者发展为辅助性 T 细胞，其顺次活化具有相同的与 MHC 结合的抗原的活化 B (体液应答) 细胞从而克隆扩增并产生特异性抗体 (参见 Alberts, B. 等, 1994, *Molecular Biology of the Cell*. 1238-45)。

已经发现了两类抗原加工机制。第一类包括经由 APCs 胞吞作用的蛋白摄取，抗原在囊泡内片段化，与 II 类 MHC 分子关联以及在细胞表面上的表达。该复合物被表达 CD4 的辅助性 T 细胞识别。另一类用于在细胞内合成的蛋白 (如病毒抗原)，其包括蛋白在细胞质内的片段化。以该方式制备的肽与 I 类 MHC 分子关联并被表达 CD8 的细胞毒性 T 细胞识别 (参见 Alberts, B. 等, 1994, *Molecular Biology of the Cell*. 1233-34)。

T 细胞的刺激涉及 T 细胞和 APC 共同表达的多种辅助分子。共刺激分子是那些促进 T 细胞生长和活化的辅助分子。通过刺激，共刺激分子诱导例如白介素 1 (IL-1) 或白介素 2 (IL-2)、干扰素等的细胞因子释放，所述细胞因子能促进 T 细胞生长和表面受体的表达 (参见 Paul, 1989, *Fundamental Immunology*. 109-10)。

正常情况下，APC 是静息的，其需要活化才能产生功能。鉴定活化 APCs 的信号非常困难，这是尚未解决的问题 (参见 Banchereau 等，

1998, Nature 392: 245-252; Medzhitov, 等, 1998, Curr. Opin. Immunol.10: 12-15).

2.3 被动免疫疗法

被动免疫疗法(也称为被动免疫)是指直接给予患者免疫反应剂, 5 该免疫反应剂例如包括针对病原体、肿瘤或病原性蛋白上表位的抗原结合区和含有 Fc 受体-结合部位, 补体结合部位或介导效应细胞作用区域的结构域分子, 如抗体。该免疫反应剂可预防性地施用以便, 例如抑制感染或治疗性地施用以便减轻或消除感染, 减少或清除癌细胞或清除或移除病原性蛋白, 例如神经变性疾病和/或淀粉样蛋白病 10 中所出现的蛋白聚集或沉积。被动免疫疗法与主动免疫疗法不同, 后者包括用抗原免疫患者从而诱导体内免疫反应, 例如产生抗体或细胞毒性 T 细胞。而在被动免疫疗法中, 将免疫反应剂, 例如抗体给予患者, 导致效应细胞的刺激, 例如具有 Fc 受体的细胞能与给予的抗体或其它免疫反应剂的 Fc 部分(即, Fc 受体结合部位)发生相互作用, 15 从而导致针对具有被抗体识别的表位的细胞、病原体或蛋白的细胞性免疫功能如抗体依赖性细胞性细胞毒性(例如, ADCC)或抗体介导的调理作用和/或吞噬作用。依赖 FcR 效应细胞功能的抗体-介导的肿瘤治疗的疗效可通过使用特定细胞因子而得到修饰。Keler, 等, 2000, J. Immunol.164: 5746-5752。治疗性和/或预防性抗体包括但不限于 20 与细胞表面分子结合并对抗正常功能的抗体(例如, 封闭抗体), 与细胞表面分子结合并模拟正常功能的抗体(抗体激动剂)和螯合抗体。

2.4 CTLA-4

细胞毒性 T 细胞抗原-4 (CTLA-4) 是一种在活化的 T 细胞表面上 25 低水平表达的糖蛋白。CTLA-4 与 CD28 相似, 而对 B7 家族成员(例如 B7-1 和 B7-2) 的亲和力高于 CD28。T 淋巴细胞上 CTLA-4 与 B7 配体的结合介导负性信号, 抑制 IL-2 分泌和细胞增殖。总之, CTLA-4-介导的 T 细胞活化抑制导致 T-细胞调节的免疫反应, 特别是早期 T-细胞活化事件的“转换”。(Brunner, 等, 1999 J. Immunol.162: 5813-5820.)

30 近期发现经抗-CTLA-4 抗体治疗阻断 CTLA-4 功能, 导致多种免疫反应增强并促成诱导肿瘤免疫(Leach, 等, 1996, Science 271: 1734-1736; PCT 公开 WO 00/322231 和 WO 01/14424)。移植了 B16 黑

素瘤细胞的小鼠经过抗-CTLA-4 mAb 和产生 GM-CSF 的肿瘤细胞疫苗的联合治疗显示出肿瘤消退和 CD8⁺T 细胞水平增高。已经公开了以预防性模式（即，在肿瘤攻击之前）给予该联合治疗，即使在无 CD8⁺T 细胞的情况下也能导致完全保护。数据证实在荷瘤小鼠可诱导治疗性自体反应 CD8⁺T 细胞。（Van Elsas, 等, 2001, J. Exp. Med. 194: 481-489）。抗-CTLA-4 抗体联合 GM-CSF 肿瘤细胞疫苗的联合施用已经证明了能有效抵抗已建立的 B16-BL6 黑素瘤细胞，但当各疗法单独施用时已经报道了仅能产生较小效果。（Van Elsas, 等, 1999, J. Exp. Med. 190: 355-366）。此外，已经报道了 CTLA-4 的阻断与辅助性功能的增强相关并诱导 CD4⁺T 细胞扩增。（Hernandez, 等, 2001, J. Immun. 3908-3914）。已经观察到通过施用抗-CTLA-4 抗体的阻断导致宿主对细胞内病原体抗性增强，肝和脾中产生 IFN- γ 和 IL-4 细胞数量增加，以及所导致的肌肉芽肿反应增强（Murphy, 等, 1998, J. Immun. 4153-4160）。

15 2.5 热激蛋白

热激蛋白（HSP）（此处还可互换地指应激蛋白），可选自任何满足下列条件的细胞蛋白。其是当细胞受到应激性刺激时，细胞内浓度升高的蛋白，其能结合其它蛋白或肽，且其能在存在三磷酸腺苷（ATP）或低 pH 的情况下释放结合的蛋白或肽。此外，HSP 包括由应激诱发的蛋白构成性表达的保守性细胞性同系物。已经发现 Hsp-60、Hsp-70 和 Hsp-90 家族由在氨基酸序列与应激蛋白相关（例如具有大于 35% 的氨基酸同一性）的蛋白组成，但它们的表达水平并不因应激性刺激而改变。因此，可以预计如这里所使用的应激蛋白的定义，包括与这三个家族的成员至少具有 35%~55%，优选 55%~75%，最优选 75%~85% 的氨基酸同一性的其它蛋白，其突变蛋白，类似物和变体，所述三个家族的成员在细胞内的表达水平在应答应激性刺激时受到激发。

要鉴别的第一种应激蛋白是 HSP。如其名字所示，HSP 是在对热激的反应中由细胞合成的。迄今为止，根据分子量鉴定了 HSP 的三个主要家族。该家族被称为 hsp60、hsp70 和 hsp90，其中数字表示以千道尔顿计的应激蛋白的大致分子量。后来发现这些家族的多个成员在对包括（但不限于）营养流失，代谢中断（metabolic disruption），氧自由基和细胞内病原体感染的其它应激性刺激中被诱导产生。（参

见 Welch, May 1993, *Scientific American* 56-64; Young, 1990, *Annu. Rev. Immunol.* 8: 401-420; Craig, 1993, *Science* 260: 1902-1903; Gething, 等, 1992, *Nature* 355: 33-45; 和 Lindquist, 等, 1988, *Annu. Rev. Genetics* 22: 631-677), 上述文件公开的内容均引入此
5 处作为参考。预期属于这三个家族的 hsp/应激蛋白可用于实施本发明。

HSP 是高丰度, 可溶性和高度保守的细胞内分子。作为细胞内伴随物 (chaperones), HSP 参与蛋白成熟的许多生物化学途径并在应激和正常细胞自动调节时发挥功能活性。很多应激能破坏细胞蛋白的三
10 维结构和折叠。残留的不正确, 错误折叠的蛋白形成能最终杀死细胞的聚集体。HSP 与这些受损蛋白结合, 辅助其再折叠为其适当的构象。在正常 (非应激性) 细胞自动调节中, 细胞代谢需要 HSP。HSP 辅助新合成的多肽折叠, 由此抑制与其它蛋白的相互作用过早成熟。而且, HSP 辅助蛋白穿过细胞多种区室的转运。

15 主要 HSP 在应激细胞中可积累至非常高的水平, 但其在未受应激的细胞中仅表现为低至中等水平。例如, 在正常温度下很难检测到高度可诱导性哺乳动物的 hsp70, 但在经受热激时其成为细胞内合成最活跃的蛋白 (Welch, 等, 1985, *J. Cell. Biol.* 101: 1198-1211)。与之相反, 正常温度下 hsp90 和 hsp60 蛋白在大多数 (但不是全部)
20 哺乳动物细胞中非常丰富且可被热进一步诱导 (Lai, 等, 1984, *Mol. Cell. Biol.* 4: 2802-2810; van Bergen en Henegouwen, 等, 1987, *Genes Dev.* 1: 525-531)。

HSP 已被发现具有免疫特性和抗原特性。用分离自特定肿瘤的 gp96 或 p84/86 免疫小鼠使小鼠具有针对该特定肿瘤而非针对抗原不同的
25 肿瘤的免疫 (Srivastava, P. K., 等, 1988, *Immunogenetics* 28: 205-207; Srivastava, P. K., 等, 1991, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167: 109-123)。而且, 已经发现 hsp70 能引发针对其分离自的肿瘤的免疫性而不能引发针对抗原不同的肿瘤的免疫性。然而, 发现肽缺乏 hsp70 会丧失其特异性免疫原性活性 (Udono, M., 和
30 Srivastava, P. K., 1993, *J. Exp. Med.* 178: 1391-1396)。这些发现提示热激蛋白实质上具有抗原性, 而是与抗原肽形成非共价复合物, 而该复合物能引发针对抗原肽的特异性免疫 (Srivastava, P. K.,

1993, Adv. Cancer Res. 62: 153-177; Udono, H., 等, 1994, J. Immunol. 152: 5398-5403; Suto, R., 等, 1995, Science 269: 1585-1588). 近年来, 已经发现 hsp60 和 hsp70 能刺激的单核细胞, 巨噬细胞或细胞毒性 T 细胞生成炎症前细胞因子, 如 TNF α 和 IL-6 (Breloer 等, 1999, J. Immunol. 162: 3141-3147; Chen 等, 1999, J. Immunol. 162: 3212-3219; Ohashi 等, 2000, J. Immunol. 164: 558-561; Asea 等, 2000, Nature Medicine, 6: 435-442; Todryk 等, 1999, J. Immunol. 163: 1398-1408). 还已发现 Hsp70 靶向未成熟树突状细胞并使其更能俘获抗原 (Todryk 等, 1999, J. Immunol. 163: 1398-1408). 已经推测 hsp60 和 hsp70 表达的释放或诱导 (例如由于细胞死亡) 可作为免疫反应应被提高的信号 (Chen 等, 1999, J. Immunol. 162: 3212-3219; Ohashi 等, 2000, J. Immunol. 164: 558-561; Todryk 等, 1999, J. Immunol. 163: 1398-1408; Basu 等, 2000, J. Immunol. 12: 1539-1546).

15 美国专利号 5,750,119, 5,837,251 和 6,017,540 中已经公开了 HSP 和肽 (纯化自癌细胞) 的非共价复合物用于治疗 and 预防癌症的用途。

美国专利号 5,985,270 和 5,830,464 中已经公开了体外敏化抗原呈递细胞的 HSP-肽复合物用于过继免疫治疗中的用途。

20 还可从感染了病原体的细胞中分离 HSP-肽复合物并将其用于治疗 and 预防由病原体, 例如病毒和其它细胞内病原体 (包括细菌, 原生动 物, 真菌和寄生虫) 导致的感染; 参见美国专利号 5,961,979 和 6,048,530.

25 还可通过 HSP 和抗原肽的体外结合制备免疫原性 HSP-肽复合物, 所述复合物用于治疗 and 预防癌症和感染性疾病的用途已经公开于美国 专利号 5,935,576 和 6,030,618 中。热激蛋白联合特定抗原用于治疗 癌症和感染性疾病的用途也已公开于 PCT 公开号 W097/06821, 1997 年 2 月 27 日。

从细胞裂解产物中纯化 HSP-肽复合物也已经公开; 参见例如美国 专利号 5,750,119 和 5,997,873.

30 3. 发明概述

本发明涉及用于产生或增强免疫反应的方法和组合物, 其包括施 用热激蛋白 (HSP) 制剂和免疫反应剂。所述方法和组合物可用于改

善单独施用 HSP 制剂和/或单独施用免疫反应剂的个体中的治疗效果。具体而言，本发明提供了用于产生或增强由免疫反应剂引发的免疫反应，和/或改善免疫反应剂功效的方法和组合物，其包括施用 HSP 制剂。因此，所述方法和组合物包括施用 HSP 制剂以便增强被动免疫疗

5 法。在特定实施方案中，所述方法和组合物包括施用 HSP 制剂并可用于增强免疫反应剂激发效应细胞功能的能力。本发明还涉及用于增强由 HSP 制剂引发的免疫反应的方法和组合物，其包括施用免疫反应剂。根据本发明，本发明的方法和组合物可用于疾病或病症的预防和治疗，其中治疗或预防可被增强的免疫反应所改善，例如感染性疾病、

10 原发性和转移性肿瘤性疾病（即，癌症）、神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病。因此，本发明包括用以治疗或预防感染性疾病、原发性肿瘤性疾病和转移性肿瘤性疾病（即，癌症）、神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病的方法和组合物，其包括施用一种或多种免疫反应剂联合 HSP 制剂。

15 在一个实施方案中，本发明提供了通过使用 HSP 制剂产生或增强由免疫反应剂引发的免疫反应的方法，其中所述 HSP 制剂能增强由单独施用时诱导免疫反应次优的免疫反应剂的量所引发的免疫反应。在特定实施方案中，当 HSP 制剂不联合免疫反应剂使用以引发免疫反应时，单独施用所述 HSP 制剂不能产生或增强所述免疫反应。在选择性的

20 实施方案中，HSP 制剂和免疫反应剂均可在单独和/或联合施用时引发免疫反应。

在特定实施方案中，HSP 制剂以累加模式增强免疫反应剂的作用。在优选的实施方案中，HSP 制剂以协同模式增强免疫反应剂的作用。在另一实施方案中，免疫反应剂以累加模式增强免疫反应剂的作用。

25 优选地，以协同模式增强该作用。因此，在特定实施方案中，本发明包括疾病的治疗或预防方法，所述方法能够提供比单独施用 HSP 制剂和/或单独施用免疫反应剂更好的治疗谱。本发明包括具有累加功效或累加疗效并降低或避免不需要的或不良的反应的联合治疗。本发明还包括治疗效果高于累加性的协同性联合，同时能降低或避免不需要的

30 的或不良的反应。在特定实施方案中，本发明的方法能治疗或预防疾病或病症，其中通过增强的免疫反应改善治疗，采用较少和/或较低频率剂量的免疫反应剂和/或 HSP 以便降低由单独施用免疫反应剂和/

或 HSP 导致的不需要的或不良的的发生率，同时保持或增强治疗效果，优选增强患者顺应性，改善治疗和/或减少不需要的或不良的反应。

5 本发明的方法和组合物不仅可用于未治疗的患者还可用于治疗对单独施用 HSP 或单独施用免疫反应剂部分或完全无应答的患者。在多个实施方案中，本发明提供了用于在已经表现出或可能对包括分别或同时施用免疫反应剂和/或 HSP 的治疗具有抗性或无应答的患者中治疗疾病或病症的方法和组合物，其中治疗被增强的免疫反应改善。

10 用于本发明的方法和组合物的 HSP 制剂可包括（但不限于），未结合任何分子的游离 HSP，和 HSP 与另一分子，例如肽的分子复合物。HSP-肽复合物包括与肽共价或非共价结合的 HSP。所述 HSP-肽复合物可包括与肽结合的 HSP，所述肽来源于兴趣肿瘤、病原体或细胞类型和/或患者。在一个实施方案中，所述肽是由免疫反应剂识别的相同靶点或来源于兴趣肿瘤、病原体或细胞类型和/或患者。可选地，HSP-15 肽复合物可包含结合内源性肽的 HSP，而所述肽无须是来自与免疫反应剂的靶点相同的来源。本发明的特定方法不需要 HSP 在施用于个体之前与任何特异性抗原或抗原肽共价或非共价的结合。用于本发明的方法和组合物的 HSP 制剂还包括 HSP 融合蛋白。HSP 融合蛋白可包括与任何抗原肽序列融合的 HSP，其中肽序列来源于兴趣肿瘤、病原体20 或细胞类型和/或蛋白。在一个实施方案中，所述肽序列是与免疫反应剂识别的相同的靶点或来源于兴趣肿瘤、病原体或细胞类型和/或蛋白。

用于本发明的方法和组合物的免疫反应剂可包括（但不限于），抗体、工程化以使其包含抗体的抗原结合部分的分子或蛋白、工程化25 以使其包含介导抗体依赖性免疫反应的抗原结合区域的分子或蛋白、与兴趣抗原特异性相互反应的肽或域，或具有任何与兴趣抗原/抗原表位相互作用的抗原结合区域和介导抗体依赖性免疫反应，如效应细胞反应或过程的抗体的恒定区的域分子。所述抗原结合区域识别特异性靶点而恒定区的域介导抗体依赖性免疫效应细胞反应。

30 在优选的实施方案中，免疫反应剂是抗体，优选用于体内治疗性或预防性用途的抗体，本发明提供了用于增强所述治疗性或预防性抗体的功效的方法和组合物，其包括施用 HSP 制剂。在特定实施方案中，

抗体激发效应细胞功能的能力通过施用 HSP 制剂得以增强。在特定实施方案中，肿瘤细胞或病原体或致病蛋白和致病肽的抗体依赖性细胞性细胞毒性和/或吞噬作用通过治疗性抗体与 HSP 制剂联合使用而得以增强。治疗性抗体优选是细胞毒性抗体和/或调理素化抗体。因此，
5 本发明提供了方法和组合物，其中 HSP 制剂与免疫反应剂联合使用从而增强针对巨噬细胞，自然杀伤 (NK) 细胞和多形核细胞的效应细胞功能 (即，抗体依赖性细胞性细胞毒性和吞噬作用)。所述免疫反应剂优选是抗体，更优选是细胞毒性抗体和/或调理素化抗体。在一个实施方案中，通过刺激效应细胞，即诱导和/或活化所述细胞上的 Fc
10 受体而产生被动免疫疗法的 HSP-介导的增强。

用于本发明的方法的抗体包括 (但不限于)，单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链 Fv (scFv)、单链抗体、Fab 片段、F(ab') 片段、二硫联 Fv (sdFv) 和抗独特型 (抗-Id) 抗体 (包括，例如针对本发明抗体的抗-Id 抗体)，以及上述任何一种的表位-结合片段。特别地，用于本发明的方法的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即
15 包含免疫特异性结合兴趣靶点的抗原结合部位的分子。本发明的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何型 (例如 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 和 IgY)、类 (例如 IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 和 IgA2) 或亚类。
20 类。

不受任何理论限制，浓度增高的 HSP 可诱导细胞因子生成以及抗原呈递分子和共刺激分子的表面表达。因此，对个体施用的 HSP 制剂可通过增加抗原呈递的效率和功效而增强免疫反应剂的功效。

在其它优选的实施方案中，将免疫反应剂施用于接受 HSP 制剂的
25 个体以便改善治疗结果。在特定实施方案中，免疫反应剂增强通过施用 HSP 制剂而引发的免疫反应。

在本发明的一个特定实施方案中，抗体是抗-CTLA-4 抗体。在另一个特定实施方案中，抗体是抗-c-erb-2 抗体，优选是特别用于治疗或预防表达 Her2/neu 癌基因的癌症中的人 rhu 4D5 (Herceptin)。而在另一特定实施方案中，抗体是用于治疗例如 (但不限于) NK-细胞-抗性淋巴瘤的癌症的抗-肿瘤 MoAb (MS11G6)，IgG2a 抗-独特型抗体。
30 体。

5 在一个实施方案中，HSP 制剂与针对癌症的抗-肿瘤或抗-癌抗体治疗联合施用。在可选的实施方案中，HSP 制剂与针对病原体的抗体治疗联合施用。而在另一实施方案中，HSP 制剂与针对病原性或不需要的蛋白或被神经变性疾病或淀粉样蛋白病或病症影响的细胞的抗体治疗联合施用。

10 在其它实施方案中，本发明的方法和组合物可通过对个体施用治疗量的免疫反应剂和 HSP 制剂而用于产生针对与神经变性疾病或淀粉样蛋白病、癌症或感染性疾病因子相关的表位或任何荷有上述疾病相关表位的部分、细胞或分子的免疫反应。在需要针对癌症类型的免疫反应的情况下，使用特异性结合（或“识别”）该癌症类型的抗原，
15 例如肿瘤相关抗原的免疫反应剂。在其它实施方案中，本发明的方法和组合物包括施用特异性结合癌症类型的抗原的免疫反应剂联合 HSP 制剂用于治疗或预防所述癌症类型。在需要引发针对感染性疾病的因子的免疫反应的情况下，施用特异性结合感染性疾病因子的抗原或病理性蛋白（例如，毒素）的免疫反应剂。在选择性的实施方案中，本
20 发明的方法和组合物包括施用特异性结合感染性疾病因子的免疫反应剂联合 HSP 制剂来治疗或预防所述感染性疾病。而在其它实施方案中，本发明的方法和组合物包括施用特异性结合神经变性疾病或淀粉样蛋白病相关抗原性分子的免疫反应剂联合 HSP 制剂来治疗或预防所述神
25 经变性疾病或淀粉样蛋白病。优选地，所述免疫反应剂是抗体。

本发明还包括包含对先前已经接受或目前正在接受其它类型的医学治疗（包括抗癌剂，抗生素和抗-感染性病原体剂）的患者联合施用 HSP 制剂和免疫反应剂的方法和组合物。

25 在另一实施方案中，本发明提供了活化抗原呈递细胞的方法，其包括将 APC 与 HSP 制剂接触以及联合施用所述活化的 APC 和免疫反应剂。因此，本发明提供了增强由免疫反应剂引发的免疫反应的方法和组合物，其包括施用活化的 APC 和/或 HSP 制剂。优选地，HSP 制剂在不施用免疫反应剂时不能有效地引发免疫反应。在特定实施方案中，HSP 制剂不表现被免疫反应剂识别的靶点的免疫原性。在选择性的实
30 施方案中，HSP 制剂的免疫原性表现出被免疫反应剂识别的靶点的免疫原性。HSP 制剂的免疫原性可通过本领域已知的任何方法在体内或体外进行检测。

在特定实施方案中，包括施用免疫反应剂和施用活化的 APC 和/或 HSP 制剂的本发明的方法和组合物可用于治疗任何疾病或病症，其中所述疾病的治疗可通过增强的免疫反应，特别是抗体介导的免疫反应得以改善，例如但不限于感染性疾病、癌症或神经变性疾病或淀粉样蛋白病或病症。

本发明还包括递送与免疫反应剂联合的作为辅助治疗的一种或多种 HSP 的方法；用于给药的药物组合物和配方，其包括一种或多种 HSP 制剂和一种或多种免疫反应剂，包含所述药物组合物的药盒；和采用本发明的预防性或治疗性药物组合物治疗或预防将被增强的免疫反应改善的疾病如感染性疾病、原发性肿瘤性疾病和转移性肿瘤性疾病（即，癌症），神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病的方法。所述方法，药盒和组合物可进一步包括施用活化的 APC。

4. 发明详述

本发明涉及用于产生或增强免疫反应的方法和组合物，其包括施用热激蛋白（HSP）制剂和免疫反应剂。所述方法和组合物可用于改善单独施用 HSP 制剂和/或单独施用免疫反应剂的个体中的治疗效果。特别地，本发明提供了用于改善免疫反应剂的预防效果或治疗效果的方法和组合物。本发明还提供了用于产生或增强由免疫反应剂引发的免疫反应的方法和组合物，其包括施用 HSP 制剂。因此，所述方法和组合物包括施用 HSP 制剂以便增强被动免疫疗法。在特定实施方案中，所述方法和组合物包括施用 HSP 制剂并可用于增强免疫反应剂激发效应细胞功能的能力。本发明还涉及用于增强由 HSP 制剂引发的免疫反应的方法和组合物，其包括施用免疫反应剂。根据本发明，本发明的方法和组合物可用于疾病或病症的预防和治疗，其中治疗或预防可被增强的免疫反应所改善，例如感染性疾病、原发性和转移性肿瘤性疾病（即，癌症），神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病。因此，本发明包括用以治疗或预防感染性疾病、原发性和转移性肿瘤性疾病（即，癌症）、神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病的方法和组合物，其包括联合施用一种或多种免疫反应剂 HSP 制剂。

在一个实施方案中，本发明提供了通过使用 HSP 制剂产生或增强由免疫反应剂引发的免疫反应的方法，其中 HSP 制剂促进免疫反应剂

诱导免疫反应，所述免疫反应剂的量在单独使用时不足以诱导免疫反应。在特定实施方案中，当 HSP 制剂不联合免疫反应剂使用以引发免疫反应时，单独施用所述 HSP 制剂不能产生或增强所述免疫反应。在选择性的实施方案中，HSP 制剂和免疫反应剂均可在单独和/或联合施用
5 用时引发免疫反应。

在特定实施方案中，HSP 制剂以累加模式增强免疫反应剂的作用。在优选的实施方案中，HSP 制剂以协同模式增强免疫反应剂的作用。在另一实施方案中，免疫反应剂以累加模式增强免疫反应剂的作用。优选地，以协同模式增强所述作用。因此，在特定实施方案中，本发
10 明包括方法疾病治疗或预防方法，所述方法能够提供比单独施用 HSP 制剂和/或单独施用免疫反应剂更好的治疗谱。本发明包括具有累加功效或累加疗效而降低或避免不需要的或不良的反应的联合治疗。本发明还包括治疗效果高于累加的协同性联合，同时能降低或避免不需要的或不良的反应。在特定实施方案中，本发明的方法能治疗或预防
15 疾病或病症，其中通过增强的免疫反应改善治疗，采用较少和/或较低频率剂量的免疫反应剂和/或 HSP 以便降低由单独施用免疫反应剂和/或 HSP 而导致的不需要的或不良的的发生率，而同时保持或增强治疗效果，优选增强患者顺应性，改善治疗和/或减少不需要的或不良的反应。

20 本发明的方法和组合物不仅可用于未治疗的患者还可用于治疗对单独施用 HSP 或单独施用免疫反应剂部分或完全无应答的患者。在多个实施方案中，本发明提供了用于治疗已经表现出或可能对包括分别或同时施用免疫反应剂和/或 HSP 的治疗具有抗性或无应答的患者的疾病或病症的方法和组合物，且其中治疗被增强的免疫反应改善。

25 用于本发明的方法和组合物的 HSP 制剂可包括（但不限于），未与任何分子结合的游离 HSP，和 HSP 与另一分子，例如肽的分子复合物。HSP-肽复合物包括与肽共价或非共价结合的 HSP。所述 HSP-肽复合物可包括与肽结合的 HSP，所述肽来源于兴趣肿瘤、病原体或细胞类型和/或患者，优选的所述肽是由免疫反应剂识别的相同靶点。
30 可选地，HSP-肽复合物可由 HSP 与内源性肽结合所组成，而无须是来自与免疫反应剂的靶点相同来源的肽。本发明的特定方法不需要 HSP 在对个体施用之前与任何特异性抗原或抗原肽共价或非共价的结合。

本发明包括包含共价或非共价与体外产生的外源性肽结合的 HSP 的 HSP-肽复合物的用途，以及分离自细胞来源的内源性 HSP-肽复合物的用途。

用于本发明的方法和组合物的免疫反应剂可包括（但不限于），
5 抗体、工程化以使其包含抗体的抗原结合部分的分子或蛋白、工程化以使其包含介导抗体依赖性免疫反应的抗原结合区域的分子或蛋白、与兴趣抗原特异性相互反应的肽或域，或任何与兴趣抗原/抗原表位相互作用的抗原结合区域。所述抗原结合区域优选与介导抗体依赖性免疫反应、免疫效应细胞反应或过程的抗体恒定区的域相关联。所述
10 免疫效应剂优选是纯化的。

在优选的实施方案中，免疫反应剂是抗体，优选用于体内治疗性或预防性用途的抗体，本发明提供了用于增强所述治疗性或预防性抗体的功效的方法和组合物，其包括施用 HSP 制剂。在所述实施方案中，
15 抗体激发效应细胞功能的能力通过施用 HSP 制剂而得以增强。在特定实施方案中，肿瘤细胞或病原体或致病蛋白和致病肽的抗体依赖性细胞性细胞毒性和/或吞噬作用通过使用治疗性抗体联合 HSP 制剂而得以增强。治疗性抗体优选是细胞毒性抗体和/或调理素化抗体。因此，本发明提供了方法和组合物，其中 HSP 制剂与免疫反应剂联合使用从而增强针对巨噬细胞，自然杀伤（NK）细胞和多形核细胞的效应细胞
20 功能（即，抗体依赖性细胞性细胞毒性和吞噬作用）。所述免疫反应剂优选是抗体，更优选是细胞毒性抗体和/或调理素化抗体。在一个实施方案中，通过刺激效应细胞，即诱导和/或活化所述细胞上的 Fc 受体而产生被动免疫疗法的 HSP-介导的增强。

在其它优选的实施方案中，将免疫反应剂施用于接受 HSP 制剂的
25 个体以便改善治疗结果。在特定实施方案中，免疫反应剂增强了施用 HSP 制剂而引发的免疫反应。在其它实施方案中，免疫反应剂能使 HSP 引发的 T 细胞活化成为可能。

在本发明的一个特定实施方案中，抗体是抗-CTLA-4 抗体。在另一个特定实施方案中，抗体是抗-c-erb-2 抗体，优选是特别用于治疗或预防表达 Her2/neu 癌基因的癌症中的人 rhu 4D5（Herceptin）。
30 而在另一特定实施方案中，抗体是用于治疗例如（但不限于）NK-细胞-抗性淋巴瘤的癌症的抗-肿瘤 MoAb（MS11G6），IgG2a 抗-独特型抗

体。在一个实施方案中，所述抗体是 Toll 样受体 (TLR)，例如 TLR 2、7、8 或 9 的激动剂。在另一实施方案中，所述抗体是 41BB (参见例如，Miller 等，2002, J. Immunol. 169: 1792-1800)、OX40、ICOS 或 CD40 的激动剂。而在另一实施方案中，所述抗体是 Fas 配体或 PD1 的拮抗剂。在另一实施方案中，所述抗体是与恒定 NKT 细胞的 T 细胞受体 (TCR) 的 CDR3 环结合并扩增和/或活化这些细胞的 Mab 6B11。参见公开于 2002 年 11 月 7 日的 US 2002/0164331。

在一个实施方案中，HSP 制剂与针对癌症的抗-肿瘤抗体治疗联合施用。在可选的实施方案中，HSP 制剂与针对病原体的抗体治疗联合施用。而在另一实施方案中，HSP 制剂与针对被神经变性疾病或淀粉样蛋白病或病症影响的细胞的抗体治疗联合施用。

不受任何理论的限制，浓度增高的 HSP 可诱导细胞因子的生成和抗原-呈递及共刺激分子的表面表达。因此，对个体施用的 HSP 制剂确信可以通过增建抗原呈递的效率和功效而增强免疫反应剂的功效。在特定实施方案中，HSP 制剂确信能够增强抗体-介导的反应如细胞效应子作用。

在其它实施方案中，本发明的方法和组合物可通过对个体施用治疗量的免疫反应剂和 HSP 制剂而用于产生针对与神经变性疾病或淀粉样蛋白病，癌症或感染性疾病因子相关的表位或任何荷有上述疾病相关表位的一部分、细胞或分子的免疫反应。在需要针对癌症类型的免疫反应的情况下，使用特异性结合 (或“识别”) 该癌症类型的抗原，例如肿瘤相关抗原的免疫反应剂。在其它实施方案中，本发明的方法和组合物包括联合施用特异性结合癌症类型的抗原的免疫反应剂与 HSP 制剂而用于治疗或预防所述癌症类型。在需要引发针对感染性疾病的因子的免疫反应的情况下，施用特异性结合感染性疾病因子的抗原或病理性蛋白 (例如，毒素) 的免疫反应剂。在选择性的实施方案中，本发明的方法和组合物包括联合施用特异性结合感染性疾病因子的免疫反应剂与 HSP 制剂来治疗治疗或预防所述感染性疾病。而在其它实施方案中，本发明的方法和组合物包括联合施用特异性结合与神经变性疾病或淀粉样蛋白病相关的抗原性分子的免疫反应剂与 HSP 制剂来治疗或预防所述神经变性疾病或淀粉样蛋白病。优选地，所述免疫反应剂是抗体。

本发明还包括包含对先前已经接受或目前正在接受其它类型的医学治疗（包括抗癌剂，抗生素和抗-感染剂）的患者施用 HSP 制剂联合免疫反应剂的方法和组合物。

5 在另一实施方案中，本发明提供了活化抗原呈递细胞的方法，其包括将 APC 与 HSP 制剂接触并联合施用所述活化的 APC 和免疫反应剂。因此，本发明提供了增强由免疫反应剂引发的免疫反应的方法和组合物，其包括施用活化的 APC 和/或 HSP 制剂。优选地，HSP 制剂在不施用免疫反应剂时不能有效地引发免疫反应。在特定实施方案中，HSP 制剂不表现被免疫反应剂识别的靶点的免疫原性。在选择性的实施方案中，HSP 制剂的免疫原性表现出被免疫反应剂识别的靶点的免疫原性。HSP 制剂的免疫原性可通过本领域已知的任何方法在体内或体外进行检测。

在特定实施方案中，包括施用免疫反应剂和施用活化的 APC 和/或 HSP 制剂的本发明的方法和组合物可用于任何疾病或病症的治疗，其中所述疾病的治疗将通过增强的免疫反应，特别是抗体介导的免疫反应而得以改善，例如但不限于感染性疾病、癌症或神经变性疾病或淀粉样蛋白病或病症。

本发明还包括递送与免疫反应剂联合的作为辅助治疗的一种或多种 HSP 的方法；用于给药的药物组合物和配方，其包括一种或多种 HSP 制剂和一种或多种免疫反应剂，包含所述药物组合物的药盒；和采用本发明的预防性或治疗性药物组合物治疗或预防将被增强的免疫反应改善的疾病如感染性疾病、原发性和转移性肿瘤性疾病（即，癌症）、神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病的方法。所述方法，药盒和组合物可进一步包括施用活化的 APC。

25 4.1 预防方法/治疗方法

本发明提供了产生或增加由免疫反应剂引发的免疫反应的方法，包括施用联合 HSP 制剂和免疫反应剂。本发明包括治疗或预防疾病或病症的方法，其中治疗或预防可被增强的免疫反应改善。在优选的实施方案中，增强的免疫反应包括例如抗体依赖的细胞性细胞毒性（例如，ADCC）或针对具有抗体识别的表位的细胞、病原体或蛋白的抗体-介导的调理作用和/或吞噬作用和通过效应细胞机制的补体介导的细胞杀伤的增强。在特定实施方案中，HSP 制剂诱导 T-细胞活化而免疫

反应剂，例如抗体，能通过增强 T 细胞活化而增强免疫反应。

在一个实施方案中，“治疗”是指癌症、感染性疾病或神经变性疾病或淀粉样蛋白病或其至少一种可辨别症状的改善。在另一实施方案中，“治疗”是指至少一种与癌症、感染性疾病、神经变性疾病或淀粉样蛋白病相关的可检测的（不一定是个体可辨别的）身体参数的改善。而在另一实施方案中，“治疗”是指抑制癌症、感染性疾病、神经变性疾病或淀粉样蛋白病的进展，可以是身体上的，例如可辨别症状的稳定，生理学上的，例如身体参数的稳定或二者皆有。而在另一实施方案中，“治疗”是指延迟癌症、神经变性疾病或淀粉样蛋白病的发病。

在特定实施方案中，本发明的方法和组合物用作对抗癌症、感染性疾病、神经变性疾病或淀粉样蛋白病的预防性检测。如此处所使用的，“预防”是指降低给定癌症、感染性疾病、神经变性疾病或淀粉样蛋白病的患病风险。在实施方案的一种模式中，本发明的方法和组合物包括施用 HSP 制剂和施用免疫反应剂作为对癌症、感染性疾病、神经变性疾病或淀粉样蛋白病遗传易感的人类个体的预防性检测。在实施方案的另一模式中，本发明的方法和组合物用作对癌症非遗传易感的个体或暴露于感染性疾病因子的个体的预防性检测。

在其它实施方案中，本发明的方法和组合物可用于治疗或预防感染性疾病或神经变性疾病或淀粉样蛋白病的临床表现或发病。

在特定实施方案中，本发明提供了治疗或预防感染性疾病、癌症、神经变性疾病或淀粉样蛋白病或蛋白沉积或淀粉样蛋白病的方法，包括联合施用 HSP 制剂和一种或多种免疫反应剂。在特定实施方案中，将 HSP 制剂与一种或多种免疫反应剂同时施用于哺乳动物，优选人类。

在一个实施方案中，同时施用 HSP 制剂和免疫反应剂。在另一实施方案中，对个体依次并以能使 HSP 制剂与免疫反应剂同时发挥作用以便提供高于其单独施用时的有益效果的时间间隔施用 HSP 制剂和免疫反应剂。例如，各药剂（例如 HSP 制剂和免疫反应剂）可同时或以任何次序在不同的时间点顺次施用；但是，若非同时施用，其在施用时间上应充分接近以便提供需要的治疗性或预防性效果。各药剂可以任何适宜形式和通过任何适宜途径分开施用。在一个实施方案中，HSP 制剂和免疫反应剂以相同的施用模式进行施用。在另一实施方案中，

HSP 制剂和免疫反应剂以不同的施用途径进行施用。各药剂的施用可以在相同或不同的位点，例如手臂和腿部。

在多个实施方案中，预防剂或治疗剂以间隔小于 1 小时、间隔 1 小时、间隔 1 小时~2 小时、间隔 2 小时~3 小时、间隔 3 小时~4 小时、间隔 4 小时~5 小时、间隔 5 小时~6 小时、间隔 6 小时~7 小时、间隔 7 小时~8 小时、间隔 8 小时~9 小时、间隔 9 小时~10 小时、间隔 10 小时~11 小时、间隔 11 小时~12 小时、间隔不超过 24 小时或间隔不超过 48 小时进行施用。在另一实施方案中，预防剂或治疗剂以间隔 1、2、4、8、12、24 或 48 小时进行施用。在其它实施方案中，HSP 制剂和免疫反应剂以间隔 2~4 日、间隔 1 周、间隔 1~2 周、间隔 2~4 周、间隔 1 个月、间隔 1~2 个月或间隔 2 或更多个月进行施用。在优选的实施方案中，对相同的患者随访施用两种或多种组分。优选地，在能使 HSP 制剂和免疫反应剂在相同时间均为活性的时间框架内对个体施用 HSP 制剂和免疫反应剂。本领域技术人员通过测定 HSP 制剂和免疫反应剂的半衰期能够确定所述时间框架。

在特定实施方案中，在施用免疫反应剂之前施用 HSP 制剂。在替代的具体实施方案中，在施用免疫反应剂之后施用 HSP 制剂。

在特定实施方案中，将 HSP 制剂和/或免疫反应剂循环施用于个体。循环治疗包括施用一段时间 HSP 制剂，然后施用一段时间免疫反应剂和/或任何第三药剂然后重复该顺次施用。循环治疗降低了对一种或多种治疗抗性的反展，避免或减少各治疗的副作用，和/或改善治疗效果。在所述实施方案中，本发明预期了施用 HSP 制剂 4~6 日后，优选 2~4 日后，更优选 1~2 日后施用免疫反应剂，随后 4~6 日后，优选 2~4 日后，更优选 1~2 日后施用 HSP 制剂等的交替施用。所述循环可按需重复多次。

在其它实施方案中，以与免疫反应剂合理的相同时间对个体施用 HSP 制剂。优选地，该两种施用在彼此低于 1 分钟~约 5 分钟，约 5 分钟~约 10 分钟，约 10 分钟至 30 分钟，约 30 分钟至约 60 分钟的时间框架内，例如以相同的医师随访实施。

在其它实施方案中，免疫反应剂和 HSP 制剂可同时施用。在特定实施方案中，免疫反应剂和 HSP 制剂作为单一药物组合物施用。在所述实施方案中，本发明的药物组合物以每日一次，每日两次或每次三

次进行施用。在其它实施方案中，按照每周一次、每周二次、每两周一次、每月一次、每六周一次、每两个月一次、每年两次或每年一次施用药物组合物。而且应当认识到用于治疗的免疫反应剂的有效剂量可在具体疗程期间增加或减少。

5 本发明还提供了另一治疗方法。在该实施方案中，当个体的 APC 需要处于活化状态时，将 HSP 制剂施用于个体。HSP 制剂可在一段时间内规律的施用，例如，每日至数周（1~2 周，2~4 周，4~6 周，最长达两个月），其可在免疫反应剂疗法之前、与之重叠和/或之后。HSP 制剂能改善治疗的效果。不受任何理论或机理的限制，对个体施用 HSP 制剂能例如，通过增加自然杀伤（NK）细胞和/或加速树突状细胞的成熟而增强个体非特异性免疫机制的反应性。在特定实施方案中，经由 HSP 制剂的 APC 活化是体外的且根据本发明的方法和组合物随后施用所述活化的 APC。与要施用的 HSP 制剂相同或不同的 HSP 制剂可用于活化 APC。各 HSP 制剂可以或不表现免疫反应剂所识别的抗原性分子的免疫原性。

15 在另一实施方案中，在施用免疫反应剂后的 1 小时~24 小时的时间框架内对个体施用 HSP 制剂。该时间框架可延长施用低释放（或持续释放）型免疫反应剂。本方法确信可以辅助活化效应细胞，如存在于施用位点或在施用位点附近的尚未经由存在的免疫反应剂而被活化的 APC。

20 而在另一实施方案中，在在施用免疫反应剂前的 1~12 小时、12 小时~24 小时、24~48 小时的时的时间框架内对个体施用 HSP 制剂。该方法确信能在个体 APC 在遭遇免疫反应剂预活化个体的 APC。

25 在其它实施方案中，同时进行疗程，即 HSP 制剂和免疫反应剂各剂量以一定的时间间隔分开施用以便使 HSP 制剂能与免疫反应剂一同发挥作用。例如，可每周一次施用 HSP 制剂联合每两周一次或每三周一次施用免疫反应剂。换言之，即使各药剂不能同时或在相同的患者随访中施用，HSP 制剂和免疫反应剂的给药方案仍要同时实施。

30 在一个实施方案中，在相同的药物组合物中同时施用 HSP 制剂和一种或多种免疫反应剂。在另一实施方案中，在分开的药物组合物中同时施用 HSP 制剂和一种或多种免疫反应剂。在另一实施方案中，在施用一种或多种免疫反应剂之前或之后施用 HSP 制剂。本发明预期了

通过相同或不同的给药途径施用 HSP 制剂联合一种或多种免疫反应剂。在优选的实施方案中，HSP 制剂经皮内给药。在另一优选的实施方案中，免疫反应剂由静脉内给药。在一特别优选的实施方案中，HSP 制剂经皮内给药而免疫反应剂由静脉内给药。在特定实施方案中，当
5 将 HSP 制剂与有可能产生不良的或不需要的副作用（包括但不限于毒性）的免疫反应剂同时施用时，所述免疫反应剂宜于以低于引发不良副作用的阈值的剂量进行施用。

在另一实施方案中，本发明提供了通过次优量的免疫反应剂诱导免疫反应的方法，其中 HSP 制剂促进免疫反应剂诱导免疫反应，所述
10 免疫反应剂的量在单独使用时不诱导免疫反应。所述 HSP 制剂可以表现或可不表现由免疫反应剂识别的抗原性分子的免疫原性。在特定实施方案中，次优量是不足以有效诱导免疫反应或预防上或治疗上所需效果的量。特别地，所述方法包括如下步骤：(a) 对个体施用一定量的热激蛋白制剂；和 (b) 对个体施用需要针对其诱导免疫反应的免
15 疫反应剂，该免疫反应剂的量在缺少步骤 (a) 的情况下是次优的，由此在个体中诱导免疫反应。其中所述 HSP 制剂可以表现或可不表现由免疫反应剂识别的抗原性分子的免疫原性。

而在另一实施方案中，本发明提供了通过次-免疫原性量的 HSP 制剂诱导免疫反应的方法，其中免疫反应剂促进 HSP 制剂诱导免疫反
20 应，所述 HSP 制剂的量在单独使用时不足以诱导免疫反应。所述 HSP 制剂可以表现或可不表现由免疫反应剂识别的抗原性分子的免疫原性。

本发明提供了通过对个体施用包含免疫反应剂和 HSP 的药物组合物来治疗、预防和改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状的
25 方法。在优选的方面，免疫反应剂和 HSP 为基本上纯化的（即，基本上不含限制其功效或产生不需要的副作用的物质）。根据本发明，将本发明的包含免疫反应剂和 HSP 的组合物施用患有癌症、感染性疾病或神经变性疾病或淀粉样蛋白病的人类个体作为治疗。

本发明还涉及采用本发明的组合物治疗感染性疾病、原发性肿瘤
30 性疾病和转移性肿瘤性疾病（即，癌症）、神经变性疾病或淀粉样蛋白病，蛋白沉积/淀粉样蛋白病或可被增强的免疫反应改善的疾病的任何其它治疗的方法。

4.2 患者群

施用 HSP 制剂和免疫反应剂的个体优选是哺乳动物，例如非灵长类（例如牛、猪、马、猫、狗、鼠等）和灵长类（例如猴，如短尾猴和人类）。在优选的实施方案中，个体是人。

5 在其它多种实施方案中，本发明的方法和组合物用于治疗或预防任何疾病或病症，其中治疗性或预防性免疫反应剂用于治疗或预防。疾病或病症优选能顺应通过增强的免疫反应的治疗或预防，更优选为感染性疾病、癌症或神经变性疾病或淀粉样蛋白病

10 所述组合物可用于预防多种癌症，例如，由家族史导致的易感性的个体或由于环境因素而患癌症风险提高的个体，用于预防感染性疾病，例如，暴露于感染性疾病因子风险增高的个体，以及用于预防神经变性疾病或淀粉样蛋白病，例如对神经变性疾病或淀粉样蛋白病遗传易感的个体。

15 本发明的方法和组合物可用于首次治疗的患者、先前接受或目前正在接受 HSP 制剂治疗的患者、先前接受或目前正在接受免疫反应剂治疗的患者或先前接受或目前正在接受其它药剂或组合治疗的患者，所述其它药剂或组合包括但不限于抗癌剂，抗生素，抗菌剂，抗真菌剂和抗病毒剂。在本发明的一个特定实施方案中，将 HSP 制剂施用于先前接受了或目前正在接受免疫治疗剂治疗的患者。在另一实施方案中，将免疫治疗剂施用于先前接受了或目前正在接受 HSP 制剂治疗的患者。而在本发明的另一实施方案中，将 HSP 制剂施用于先前接受了或目前正在接受包括（但不限于），抗癌剂、抗生素、抗菌剂、抗真菌剂或抗病毒剂，任选地与免疫治疗剂联合治疗的患者。在另一实施方案中，将免疫治疗剂施用先前接受了或目前正在接受包括（但不限
20 于），抗癌剂、抗生素、抗菌剂、抗真菌剂或抗病毒剂，任选地联合 HSP 制剂治疗的患者。
25

在优选的实施方案中，将包括免疫反应剂和 HSP 制剂的本发明的药物组合物施用于先前接受了或目前正在接受包括（但不限于），抗癌剂、抗生素、抗菌剂、抗真菌剂或抗病毒剂治疗的患者。

30 本发明的方法和复合物还可用于治疗预先接受 HSP 制剂或免疫反应剂治疗的且目前单独施用的各治疗方法均不能有效治疗的患者。

在一个实施方案中，将包括 HSP 制剂和免疫反应剂的本发明的组

合物施用于对单独 HSP 制剂单因素治疗敏感性不足的患者。在另一实施方案中，将包括 HSP 制剂和免疫反应剂的本发明的组合物施用于对单独免疫反应剂单因素治疗耐受的患者。而在另一实施方案中，将包括 HSP 制剂和免疫反应剂的本发明的组合物施用于对单独施用 HSP 制剂和单独施用免疫反应剂均耐受的但不对二者一起施用耐受的患者。在另一实施方案中，将包括 HSP 制剂和免疫反应剂的本发明的组合物施用于未接受任何形式内科治疗的患者。

4.3 癌症的治疗和预防

本发明包括治疗或预防个体中癌症或癌转移的方法，包括任何次序的下列步骤：对个体施用免疫反应剂，所述免疫反应剂包括识别癌细胞的抗原或表位（如癌症中免疫原性量的抗原，例如但不限于肿瘤特异性抗原，以及肿瘤相关抗原或表现其抗原性的分子）的组分；和对个体施用 HSP 制剂，该 HSP 制剂的量能在个体中有效诱导或增强针对免疫反应剂识别的组分的免疫反应。

在特定实施方案中，本发明的组合物和方法可用于防止、抑制或减少癌细胞的生长或转移。在特定实施方案中，相对于不联合施用所述 HSP 制剂和所述免疫反应剂的生长和转移，联合施用 HSP 制剂和免疫反应剂能抑制或降低至少 99%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20%或至少 10%癌性细胞的生长或转移。

可根据本发明的方法治疗的癌症包括（但不限于），白血病（例如，急性白血病如急性淋巴细胞性白血病和急性髓细胞性白血病）、新生物、肿瘤（例如，非何杰金氏淋巴瘤，纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体

瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤)、重链病(B-细胞淋巴瘤)、转移癌或特征在于不受控制性细胞生长的任何疾病或病症。

肿瘤抗原或肿瘤相关抗原包括癌胚细胞(CG)抗原(MAGE、NY-ES0-1)、突变抗原(MUM-1、p53、CDK-4)、过表达自体抗原(p53、HER2/NEU)、病毒抗原(来自乳头状瘤病毒、Epstein-Barr病毒)、源自非主要开放读码框 mRNA 序列的肿瘤蛋白(NY-ES01、LAGE1)、Melan A、MART-1、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、酪氨酸酶、gp100、gp75、HER-2/neu、c-erb-B2、CEA、PSA、MUC-1、CA-125、Stn、TAG-72、KSA(17-1A)、PSMA、p53(点突变的和/或过表达的)、RAS(点突变的)、EGF-R、VEGF、GD2、GM2、GD3、抗-Id、CD20、CD19、CD22、CD36、II类畸变、B1、CD25(IL-2R)(抗-TAC)或HPV。

在优选的实施方案中,将本发明的方法或组合物用于治疗或预防个体中癌症或癌转移,包括施用HSP制剂和免疫反应剂,其中免疫反应剂是抗-CTLA-4抗体或抗-41BB抗体。在另一优选的实施方案中,将本发明的方法或组合物用于治疗或预防个体中癌症或癌转移,包括施用HSP制剂和免疫反应剂,其中免疫反应剂是抗-抗体单克隆抗体。而在另一优选的实施方案中,将本发明的方法或组合物用于治疗或预防个体中癌症或癌转移,包括施用HSP制剂和免疫反应剂,其中免疫反应剂是Herceptin。

4.4 感染性疾病的治疗

本发明还包括治疗或预防个体中感染性疾病的方法,包括以任何次序的对个体施用免疫反应剂;和对个体施用热激蛋白制剂的步骤,该热激蛋白制剂的量能联合免疫反应剂在个体中有效诱导或增强针对组分的免疫反应。

可通过采用免疫反应剂结合本发明的方法治疗或预防的感染性疾病由包括(但不限于)病毒、细菌、真菌、原生动物和寄生虫的感染性病原体导致。某些通用的针对感染性疾病的免疫反应剂及其适宜剂量和用途是本领域已知的并已在现有技术中公开,例如医师参考手册(56th ed., 2002)。

可根据本发明治疗的感染性病原体包括但不限于病毒,细菌,真菌,和原生动物病的因子。

5 可通过采用免疫反应剂结合本发明的方法治疗或预防的病毒病包括（但不限于）、由甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流行性感胃病毒、水痘病毒、腺病毒、I型单纯疱疹病毒（HSV-I）、II型单纯疱疹病毒（HSV-II）、牛痘病毒、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头状瘤病毒、乳多泡病毒、巨细胞病毒、棘状病毒、虫媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、EB病毒、I型人免疫缺陷病毒（HIV-I）、II型人免疫缺陷病毒（HIV-II）以及病毒病因子如脑膜炎病毒、脑炎病毒、登革热病毒或天花病毒所导致的病毒病。

10 可通过采用免疫反应剂结合本发明的方法治疗或预防的细菌性疾病由包括（但不限于）分枝杆菌、立克次氏体，支原体，奈瑟菌属，肺炎葡萄球菌，博氏疏螺旋体（莱姆病），炭疽杆菌（炭疽），破伤风，链锁状球菌，葡萄球菌，分枝杆菌，破伤风，百日咳病毒，霍乱，痘疫，白喉病毒，衣原体，金黄色酿脓葡萄球菌和军团杆菌属的细菌所导致。

15 可通过采用免疫反应剂结合本发明的方法治疗或预防的原生动物病和/或寄生虫病由包括（但不限于）利什曼原虫，kokzidioa，hypanosoma，疟疾，衣原体，发疹伤寒等的病原体，南美洲锥虫病，丝虫，弓形虫病，血吸虫病和绦虫的原生动物和/或寄生虫所导致。

20 4.5 神经变性疾病的治疗

还可以使用特异性结合细胞或结构例如包括肽和/或蛋白原纤维的细胞外沉积物或斑块（其是神经变性疾病或淀粉样蛋白病的标志）中或上的抗原性分子的免疫反应剂，。优选地，需要治疗或预防神经变性疾病或淀粉样蛋白病时，可使用特异性结合包含神经变性疾病相关抗原分子的表位或淀粉样蛋白病相关抗原分子的表位的分子的免疫反应剂，所述分子包括但不限于原纤维肽或蛋白。所述神经变性疾病相关抗原分子可以是与下列疾病相关的分子：阿耳茨海默氏病、年龄相关性认知能力丧失、老年痴呆、帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化、威尔逊氏病、大脑性瘫痪、进行性核上性麻痹、关岛病、路易小体痴呆（Lewy body dementia）、朊病毒病、海绵状脑病、克罗伊茨费尔特-雅各布病、多聚谷氨酰胺病、亨廷顿氏舞蹈病、强直性肌营养不良、弗里德利希共济失调（Freidrich's ataxia）、共济失调、吉累斯·德

拉图雷特氏综合征、癫痫发作病症、癫痫、慢性癫痫发作病症、中风、脑外伤、脊髓创伤、AIDS 痴呆、酒精中毒、孤独症、视网膜缺血、青光眼、自主功能病症、高血压、神经精神病症、神经分裂症或情感分裂性精神障碍。

- 5 2001年7月26日公开的W001/52890中描述了所述抗原分子的实例，所述文件全文引入此处作为参考，该实例包括（但不限于） β -淀粉样蛋白或其片段、寡聚A β 复合物或其片段、ApoE4-A β 复合物、tau蛋白或其片段、淀粉样前蛋白或其片段、突变体淀粉样前蛋白或其片段、早老素或其片段、早老素突变体或其片段、突触蛋白（synuclein）
10 或其片段或朊病毒蛋白或其片段，以及上述任何蛋白或其片段的抗原性衍生物。淀粉样蛋白病相关抗原分子是与特征在于形成淀粉样沉着物或斑块的蛋白和/或肽原纤维细胞外沉积的疾病相关的分子，所述疾病包括但不限于II型糖尿病以及与慢性炎性或感染性疾病状态和恶性肿瘤，例如骨髓瘤相关的淀粉样变性病。例如但不限于阿耳茨海默氏病和朊病毒病，如克-雅二氏病的特定淀粉样蛋白病，还可以是
15 神经变性疾病。

4.6 HSP 制剂

- 本领域已知的任何HSP或HSP制剂均可以用于本发明的组合物和方法。为了本发明的目的，HSP制剂可包括（但不限于）不与任何分子结合的游离HSP，HSP和其它分子例如肽的分子复合物，以及HSP
20 融合蛋白。HSP-肽复合物包括共接或非共价结合于肽的HSP。HSP-肽复合物可包括与来源于兴趣病原体或细胞类型和/或蛋白（例如，抗体所识别的相同靶点）的肽结合的HSP。可选地，HSP-肽复合物可包括与内源性肽但不一定是与治疗性抗体的靶点相同来源的肽结合的
25 HSP。本发明的方法无须在施用于个体前与任何特异性抗原或抗原肽共价或非共价的结合体。HSP制剂可以从或也可以不从要施用制剂的个体中获得。HSP、HSP-肽复合物或HSP融合蛋白优选是纯化的。HSP制剂可包括包含HSP的粗制细胞裂解产物，裂解产物的量对应于 $100 \sim 10^8$ 细胞等效物。当肽与HSP结合时，肽可以是任何肽，其可以与HSP
30 非共价、共价结合或融合。HSP可合宜地作为与HSP非共价结合的复合物群而从大多数细胞性来源中纯化。HSP可通过暴露于低pH和/或三磷酸腺苷或其它本领域已知方法而非共价结合的肽分离。一般来

说，HSP 制剂与免疫反应剂分开施用。肽可以是与免疫反应剂或所针对的感染性疾病或病症不相关的肽。为了受者的便利和舒适，HSP 制剂可在施用前立即与免疫反应剂混合。

5 在多个实施方案中，HSP 的来源优选是真核生物，更优选是哺乳动物，而最优选是人类。因此，本发明的方法所使用的 HSP 制剂包括真核生物的 HSP，哺乳动物的 HSP 和人类的 HSP。HSP 制剂来源的真核来源和接受 HSP 制剂的个体优选是相同物种。

在本发明的多个实施方案中，HSP 制剂可包括 HSP，所述 HSP 包含但不限于 hsp60、hsp70、hsp90、hsp110、gp96、grp170 或钙网织
10 蛋白(单独或彼此联合)。优选地，HSP 是 hsp60、hsp70、hsp90、hsp110、gp96、grp170 或钙网织蛋白。本发明还包括 HSP-肽复合物，如 hsp60-肽复合物、hsp70-肽复合物、hsp90-肽复合物、hsp110-肽复合物、gp96-肽复合物、grp170-肽复合物或钙网织蛋白-肽复合物。本发明还包括 HSP 融合蛋白，如 hsp60 融合蛋白、hsp70 融合蛋白、hsp90 融合蛋
15 白、hsp110 融合蛋白、gp96 融合蛋白、grp170 融合蛋白或钙网织蛋白融合蛋白。

在优选的实施方案中，HSP 制剂包括单个 HSP、HSP 复合物或 HSP 融合蛋白。在本发明的其它实施方案中，HSP 制剂包括 HSP、HSP 复合物或 HSP 融合蛋白的混合物。优选地，HSP、HSP 复合物和/或 HSP 融
20 合蛋白的混合物包括两种或多种基本上纯的 HSP、HSP 复合物和/或 HSP 融合蛋白。如此处所使用的，“基本上纯的”是指基本上不含正常情况下与天然状态下的 HSP 或 HSP 复合物向伴随的化合物并表现出恒定和可再现性色谱反应，洗脱模式和生物学活性。基本上纯的 HSP 复合物并不除去与 HSP 共价或非共价结合的肽或与 HSP 内源性结合的肽。
25 术语“基本上纯的”不意在排出 HSP、HSP 复合物或 HSP 融合蛋白与其它化合物的人工或合成混合物。下面提供了 HSP、HSP 复合物和 HSP 融合蛋白及其制备方法的大量非限制性实例。

在一个实施方案中，当 HSP 制剂不与免疫反应剂联合施用以便诱导特异性免疫反应时，单独施用 HSP 制剂不能诱导由免疫反应剂所诱导的抗原特异性免疫反应。在另一实施方案中，HSP 制剂能诱导由免
30 疫反应剂所诱导的抗原特异性免疫反应。

预计属于 hsp60、hsp70 和 hsp90 家族的所有 HSP (包括所述 HSP

的片段)均可用于实施本发明。

在本发明中,可使用纯化的未结合 HSP、共价或非共价结合于特异性肽或非特异性肽的 HSP (此处统称为 HSP-肽复合物)、HSP 融合蛋白,及其制剂。下面描述了结合或非结合形式的 HSP 的纯化。此外,5 本领域技术人员可通过重组表达或肽合成(下面也有详述)合成 HSPs 和 HSP 融合蛋白。

在另一实施方案中,预期 HSP 可以是与应激蛋白的三个主要家族成员具有至少 35%~55%,优选 55%~75%,最优选 75%~85%氨基酸同一性的其它蛋白,突变蛋白,其类似物和其变异体,所述应激蛋白响10 应应激性刺激而增强其在细胞中的表达水平。属于 HSP 类的应激蛋白的制备,分离和纯化是本领域已知的并公开于现有技术中,例如钙网织蛋白制备或纯化公开于 Basu 和 Srivastava, 1999 J. Expt. Med. 189: 797-802, 该文献全文引入此处作为参考。本发明还包括制备和纯化 HSPs 和 HSP-肽复合物的方法,该方法描述如下,其以实例性而非15 限制性的方式给出。

4.6.1 Hsp70 或 Hsp70-肽复合物的制备和纯化

hsp70-肽复合物的纯化已在先公开于,参见例如, Udono 等, 1993, J Exp. Med. 178: 1391-1396。可使用下述方法(以示例性而非限制性的方式给出):

20 首先,将人类或哺乳动物的细胞悬浮于 3 体积的包含 5mM 磷酸钠缓冲液(pH 7), 150mM NaCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ 和 1mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)的 1×裂解缓冲液。然后,在冰上对细胞团进行声处理,直至在显微镜下测定 > 99%的细胞裂解。作为声处理的替代方法,可通过机械剪切裂解细胞且在该方法中通常将细胞重悬于 30mM 碳酸氢25 钠(pH 7.5), 1mM PMSF 中,置冰上孵育 20 分钟然后在 Dounce 匀浆器中匀浆直至 > 95%的细胞裂解。

然后以 1,000g 离心裂解产物 10 分钟以便除去完整的细胞,细胞核和其他的细胞碎片。所得上清液以 100,000g 离心 90 分钟,收集上清液然后与已用包含 2mM Ca²⁺和 2mM Mg²⁺的磷酸盐缓冲盐水(PBS)平衡的 Con A 琼脂糖混合。当细胞被机械剪切裂解时,可在与 Con A 琼脂糖混合之前,用等体积 2×裂解缓冲液稀释上清液。然后将上清液30 在 4℃与 Con A 琼脂糖结合 2-3 小时。收集未结合的物质用 10mM Tris-

乙酸盐 (pH 7.5), 0.1mM EDTA, 10mM NaCl, 1mM PMSF 透析 36 小时 (三次, 每次 100 体积)。然后将透析液以 17,000 rpm (Sorvall SS34 转子) 离心 20 分钟。然后收集所得上清液并将其上于用 20mM Tris-乙酸盐 (pH 7.5), 20mM NaCl, 0.1mM EDTA 和 15mM 2-巯基乙醇平衡的 Mono Q FPLC™ 离子交换色谱柱 (Pharmacia)。然后对柱子用 20mM ~ 500mM NaCl 梯度进行展开, 然后通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离洗脱级分并使用适宜的抗-hsp70 抗体 (如来自克隆 N27F3-4, 获自 StressGen) 通过免疫印迹进行表征。

合并具有与抗-hsp70 抗体强烈反应性的级分, 用硫酸铵沉淀 hsp70-肽复合物; 具体来说用 50% ~ 70% 硫酸铵沉淀。然后 17,000 rpm (SS34 Sorvall 转子) 离心分离收集所得沉淀物并用 70% 硫酸铵洗涤。然后溶解洗涤的沉淀物, 任何残留的硫酸铵可通过经 Sephadex^AG25 柱 (Pharmacia) 凝胶过滤而被清除。如有需要可将 hsp70 制品如上述经 Mono Q FPLC™ 离子交换色谱柱 (Pharmacia) 再纯化。

采用这种方法能将 hsp70-肽复合物纯化为明显的均质性。从 1 g 细胞/组织中通常可纯化 1 mg hsp70-肽复合物。

纯化 hsp70-肽复合物的修饰方法包括细胞蛋白与附着于固体基质的 ADP 或 ATP 的不可水解的类似物接触, 从而裂解产物中的 hsp70 能与 ADP 或 ATP 的不可水解的类似物结合, 然后洗脱结合的 hsp70。优选的方法使用具有附着于固体基质的 ADP (例如, ADP-琼脂糖) 的柱色谱法。所得 hsp70 制剂的纯度较高且不存在不是与 HSP-肽复合物中 HSP 相关的内源性结合肽的污染蛋白。hsp70 复合物产量还可显著增加约高于 10 倍。可选地, 采用 ATP 的不可水解的类似物 (代替 ADP) 的色谱法可用于纯化 hsp70-肽复合物。以示例性而并非限制性的方式, 可按下述内容实施通过 ADP-琼脂糖色谱法纯化 hsp70-肽复合物:

在低渗缓冲液中均质化处理 Meth A 肉瘤细胞 (5 亿细胞) 然后以 4℃, 100,000 g 离心裂解产物 90 分钟。将上清液上 ADP-琼脂糖柱。在缓冲液中洗柱然后用 5 柱体积的 3mM ADP 洗脱。hsp70-肽复合物在总共 15 级分中级分 2 ~ 10 中洗脱。通过 SDS-PAGE 分析洗脱的级分。采用这种方法可将 hsp70-肽复合物纯化为明显均质性。

从 hsp70-肽复合物分离 HSP 可于存在 ATP 或低 pH 下实施。这两种方法可用于从 hsp70-肽复合物中洗脱肽。第一种方法包括在存在 ATP

下孵育 hsp70-肽复合物制品。另一方法包括在低 pH 缓冲液中孵育 hsp90-肽复合物制品。这些方法和本领域已知的任何其它方法均可用于从 hsp-肽复合物分离 HSP 和肽。

4.6.2 Hsp90 或 Hsp90-肽复合物的制备和纯化

5 可使用下述方法（以示例性而非限制性的方式给出）：

首先，将人类或哺乳动物的细胞悬浮于 3 体积的包含 5mM 磷酸钠缓冲液（pH 7），150mM NaCl，2mM CaCl₂，2mM MgCl₂ 和 1mM 苯甲基磺酰氟化物（PMSF）的 1×裂解缓冲液。然后，在冰上对细胞团进行声处理，直至在显微镜下测定 > 99%的细胞裂解。作为声处理的替代方法，10 可通过机械剪切裂解细胞且在该方法中通常将细胞重悬于 30mM 碳酸氢钠（pH 7.5），1mM PMSF 中，置冰上孵育 20 分钟然后在 Dounce 匀浆器中匀浆直至 > 95%的细胞裂解。

然后以 1,000g 离心裂解产物 10 分钟以便除去完整的细胞，细胞核和其他的细胞碎片。所得上清液以 100,000g 离心 90 分钟，收集上清液然后与已用包含 2mM Ca²⁺和 2mM Mg²⁺的磷酸盐缓冲盐水（PBS）平衡的 Con A 琼脂糖混合。当细胞被机械剪切裂解时，可在与 Con A 琼脂糖混合之前，用等体积 2×裂解缓冲液稀释上清液。然后将上清液在 4℃与 Con A 琼脂糖结合 2-3 小时。收集未结合的物质用 10mM Tris-乙酸盐（pH 7.5），0.1mM EDTA，10mM NaCl，1mM PMSF 透析 36 小时（三次，每次 100 体积）。然后收集所得上清液并将其上于用裂解缓冲液平衡的 Mono Q FPLC™离子交换色谱柱（Pharmacia）。然后用 200mM~600mM NaCl 梯度洗脱蛋白。

洗脱的级分由 SDS-PAGE 分离，并使用如 3G（Affinity Bioreagents）的抗-hsp90 抗体通过免疫印迹鉴定包含 hsp90-肽复合物的级分。采用这种方法能将 hsp90-肽复合物纯化为明显的均质性。从 1 g 细胞/组织中通常可纯化 150~200μg hsp90-肽复合物。

从 hsp90-肽复合物分离 HSP 可于存在 ATP 或低 pH 下实施。这两种方法可用于从 hsp90-肽复合物中洗脱肽。第一种方法包括在存在 ATP 下孵育 hsp90-肽复合物制品。另一方法包括在低 pH 缓冲液中孵育 hsp90-肽复合物制品。这些方法和本领域已知的任何其它方法均可用于从 hsp-肽复合物分离 HSP 和肽。

4.6.3 Gp96 或 Gp96-肽复合物的制备或纯化

可使用下述方法（以示例性而非限制性的方式给出）：

首先，将人类细胞或哺乳动物的细胞团重悬于3体积的包含5mM磷酸钠缓冲液（pH 7）和1mM PMSF的缓冲液，然后，在冰上将细胞膨胀20分钟，然后在Dounce匀浆器（匀浆器的适宜隙宽可根据各细胞类型而变化）中匀浆直至>95%的细胞裂解。

然后以1,000g离心裂解产物10分钟以便除去完整的细胞，细胞核和其他的细胞碎片。然后将获自该离心步骤的上清液以100,000g离心90分钟。纯化的或者从100,000细胞团或者从上清液中纯化gp96-肽复合物。

当从上清液中纯化时，用等体积2×裂解缓冲液稀释上清液，然后将上清液在4℃与用包含2mM Ca^{2+} 和2mM Mg^{2+} 的PBS平衡的Con A琼脂糖混合2-3小时。然后，用该浆液上柱并以1×裂解缓冲液洗涤直至OD280降至基线。然后，用1/3柱床体积溶于包含2mM Ca^{2+} 和2mM Mg^{2+} 的PBS的10% α -甲基甘露糖苷（ α -MM）洗柱，用石蜡膜片封柱，在37℃孵育15分钟。然后将柱冷却至室温，从柱底移去石蜡膜。用5柱体积的 α -MM缓冲液上柱然后通过SDS-PAGE分析洗脱物。通常，所得物质的纯度约为60-95%，但该纯度依赖于使用的细胞类型和组织对裂解缓冲液比率。然后将样品上于用包含5mM磷酸钠（pH 7）的缓冲液平衡的Mono Q FPLC™离子交换色谱柱（Pharmacia）。然后用0-1M NaCl梯度从柱上洗脱蛋白而以400mM-550mM NaCl洗脱gp96级分。

然而，可用两个附加步骤修改该方法，所述附件步骤可单独使用或联合使用，以便始终生成明显均质的gp96-肽复合物。一个可选步骤包括在Con A纯化步骤之前的硫酸铵沉淀而另一可选步骤包括在Con A纯化步骤之后而在Mono Q FPLC™步骤之前的DEAE-琼脂糖纯化。

在第一个任选步骤中，如下面示例性方式所述，通过加入硫酸铵使获自100,000g离心步骤的上清液的终浓度为50%硫酸铵。在置于冰水槽中烧杯中柔和搅拌溶液同时缓慢加入硫酸铵。将溶液在4℃搅拌约1/2-12小时然后以6,000 rpm（Sorvall SS34转子）离心所得溶液。取获自该步骤的上清液，通过加入硫酸铵溶液使其具有70%硫酸铵饱和度，然后以6,000 rpm（Sorvall SS34转子）离心。收集获自该步骤的细胞团然后将其悬浮于包含70%硫酸铵的PBS中以便洗涤细胞团。以6,000 rpm（Sorvall SS34转子）离心该混合物然后将细胞

团溶于包含 2mM Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS。通过 15,000 rpm (Sorvall SS34 转子) 短暂离心移去不溶物质。然后, 将溶液与 Con A 琼脂糖混合, 方法如前。

在第二个任选步骤中, 如下面示例性方式所述, 合并洗脱自 Con A 柱的包含 gp96 的级分, 通过透析或优选通过缓冲液在 Sephadex G25 柱上交换 5mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7), 300mM NaCl。在缓冲液交换后, 将溶液与预先用 5mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7), 300mM NaCl 平衡的 DEAE-琼脂糖™混合。轻柔混合蛋白溶液和珠子 1 小时然后注入柱中。然后, 用 5mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7), 300mM NaCl 洗柱, 直至 280nm 吸光度降至基线。然后, 用 5 体积的 5mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7), 700mM NaCl 从柱上洗脱结合的蛋白。合并包含蛋白的级分然后用 5mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7) 稀释以便将盐浓度降至 175mM。然后将所得物质上于用 5mM 磷酸钠缓冲液 (pH7) 平衡的 Mono Q FPLC™ 离子交换色谱柱 (Pharmacia), 如上述洗脱出与 Mono Q FPLC™ 离子交换色谱柱 (Pharmacia) 结合的蛋白。

然而, 应当认识到本领域技术人员可通过常规试验评估将第二可选步骤并入纯化方法中的益处。此外, 还应认识到添加各可选步骤的益处应依赖于起始物质的来源。

当从 100,000g 细胞团分离 gp96 级分时, 将该细胞团悬浮于包含 1% 去氧胆酸钠或 1% 辛基吡喃葡萄糖苷(而无 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}) 的 5 体积 PBS 中然后于冰上孵育 1 小时。20,000g 离心悬液 30 分钟然后将所得上清液以若干 PBS (仍无 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}) 变化进行稀释以便除去洗涤剂。100,000g 离心稀释液 90 分钟, 收集上清液, 将钙和镁分别加入上清液至终浓度为 2mM。然后通过未修饰或修饰的方法纯化样品从而从 100,000g 上清液中分离 gp96-肽复合物, 如上。

采用这种方法能将 gp96-肽复合物纯化为明显的均质性。从 1g 细胞/组织中可分离 10~20 μg gp96。

从 gp96-肽复合物分离 HSP 可于存在 ATP 或低 pH 下实施。这两种方法可用于从 gp96-肽复合物中洗脱肽。第一种方法包括在存在 ATP 下孵育 gp96-肽复合物制品。另一方法包括在低 pH 缓冲液中孵育 gp96-肽复合物制品。这些方法和本领域已知的任何其它方法均可用于从 hsp-肽复合物分离 HSP 和肽。

4.6.4 Hsp110-肽复合物的制备或纯化

可使用如下方法(以示例性而非限制性的方式给出),其公开于 Wang 等, 2001, J. Immunol. 166 (1): 490-7:

采用 Dounce 匀浆法将细胞或组织(例如肿瘤细胞组织)团块(40-60 ml)在 5 体积的低渗缓冲液(30 mM 碳酸氢钠, pH7.2 和蛋白酶抑制剂)中匀浆。以 4,500 ×g 然后 100,000 ×g 离心裂解产物 2 小时。若细胞或组织来源于肝,则首先将所得上清液上于蓝色琼脂糖柱(Pharmacia)以便除去白蛋白。否则,将所得上清液上于预先用结合缓冲液(20mM Tris-HCl, pH 7.5; 100mM NaCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂; 1 mM MnCl₂ 和 15 mM 2-ME)平衡的 Con A-琼脂糖柱(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。用包含 15% α-D-o-甲基甘露糖苷(Sigma, St. Louis, MO)的结合缓冲液洗提结合的蛋白。

Con A-琼脂糖未结合物质首先以 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 和 15 mM 2-ME 的溶液透析,然后上于 DEAE-琼脂糖柱并以 100-500 mM NaCl 的盐梯度进行洗脱。收集包含 hsp110 的级分,透析然后上于用 20mM Tris-HCl, pH 7.5; 200 mM NaCl; 和 15 mM 2-ME 平衡的 Mono Q (Pharmacia) 10/10 柱。以 200-500 mM NaCl 梯度洗脱结合的蛋白。通过 SDS-PAGE 分析级分然后通过采用对 hsp110 的 Ab 实施免疫印迹,如 Wang 等, 1999, J. Immunol. 162: 3378 中所述。合并的级分通过 Centriplus (Amicon, Beverly, MA) 浓缩然后上 Superose 12 柱(Pharmacia)。通过 40 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 和 15 mM 2-ME 以 0.2 ml/min 的流速洗脱蛋白质。

4.6.5 产生的 Grp170-肽复合物的制备或纯化

可使用下述方法(以示例性而非限制性的方式给出),其公开于 Wang 等, 2001, J. Immunol. 166 (1): 490-7:

采用 Dounce 匀浆法将细胞或组织(例如肿瘤细胞组织)团块(40-60 ml)在 5 体积的低渗缓冲液(30 mM 碳酸氢钠, pH7.2 和蛋白酶抑制剂)中匀浆。以 4,500 ×g 然后 100,000 ×g 离心裂解产物 2 小时。若细胞或组织来源于肝,则首先将所得上清液上于蓝色琼脂糖柱(Pharmacia)以便除去白蛋白。否则,将所得上清液上于预先用结合缓冲液(20mM Tris-HCl, pH 7.5; 100mM NaCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂; 1 mM MnCl₂ 和 15 mM 2-ME)平衡的 Con A-琼脂糖柱(Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ). 用包含 15% α -D-o-甲基甘露糖苷 (Sigma, St. Louis, MO) 的结合缓冲液洗提结合的蛋白。

Con A-琼脂糖未结合物质首先以 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 和 15 mM 2-ME 的溶液透析, 然后上于 Mono Q 柱并以 150~400 mM NaCl 的盐梯度进行洗脱。浓缩合并的级分然后上 Superose 12 柱 (Pharmacia), 收集包含均质 grpl70 的级分。

4.6.6 HSP 的重组表达

可采用本领域已知方法重组制备 HSP。可将编码 HSP 的核酸序列插入表达载体中从而在宿主细胞中增殖和表达。

如此处所使用的, 表达构建体是指能使 HSP 在适宜宿主细胞中表达的一种或多种调节区操作性相关联的编码 HSP 的核苷酸序列。“操作性相关联”是指这样一种关联, 其中调节区和要表达 HSP 以能允许转录和最终表达的方式进行连接和定位。

表达载体可提供 HSP 转录必需的调节区。若要表达的 HSP 基因序列缺少其同源起始, 则还可以提供翻译起始密码子 (ATG)。在适宜的宿主构建系统中, 细胞转录因子 (如 RNA 聚合酶) 可与表达构建体上的调节区结合以便完成在宿主生物体中修饰的 HSP 序列的转录。宿主细胞与宿主细胞之间在基因表达所需的调节区精确特性上可存在变化。一般来说, 需要能够结合 RNA 聚合酶并启动操作性相关联的核酸序列转录的启动子。所述调节区可包括转录和翻译起始所涉及的那些 5' 非-编码序列, 如 TATA 盒, 帽化序列, CAAT 序列等。编码序列的 3' 非编码区的可包含转录终止调节序列, 如终止子和多腺苷酸化位点。

为了将具有调节功能的 DNA 序列 (如启动子) 与 HSP 基因序列连接或将 HSP 基因序列插至载体的克隆位点, 可通过本领域众所周知的技术将提供了适宜的限制位点的联接子和接头连接至 cDNAs 的末端 (Wu 等, 1987, *Methods in Enzymol.* 152: 343-349)。在修饰前可用实施限制性内切酶实施酶切以便在连接前通过单链 DNA 末端中回退消化或填补而形成平端。可选地, 可通过采用包含所需限制性酶切位点的引物的 PCR 进行 DNA 扩增从而将所需限制性酶切位点引入 DNA 片段。

包括与操作性调节区操作性相关联的 HSP 序列的表达构建体可直接导入适宜宿主细胞从而无须进一步克隆而表达和产生 HSP-肽复合物。参见例如, 美国专利号 5,580,859。该表达构建体还可包含易于

将 HSP 序列掺入宿主细胞基因组（例如借助同源重组）的 DNA 序列。此时，不一定使用包括适于适宜宿主细胞的复制起点的表达载体以便在宿主细胞中增殖和表达。

5 可以使用多种表达载体，其包括（但不限于）质粒、粘粒、噬菌体、噬菌粒或修饰的病毒。通常，所述表达载体包括用于载体在适宜的宿主细胞中增殖的功能性复制起点，一种或多种用于插入 HSP 基因序列的限制性内切酶位点，和一种或多种选择标记。该表达载体必须用于来自包括但不限于细菌、酵母、昆虫、哺乳动物和人的原核或真核生物体的适宜的宿主细胞。

10 对于适当加工的 HSP 或 HSP-肽复合物的长期，高产率的生产来说，哺乳动物细胞中的稳定表达是优选的。稳定表达 HSP 或 HSP-肽复合物的细胞系可通过使用包含可选标记载体进行工程化处理。以示例性而非限制性的方式，在导入表达构建体后，工程化细胞可在滋养培养基中生长 1~2 日，然后移至选择性培养基。表达构建体中的可选标记指示对选择的抗性并最佳能使细胞稳定地将表达构建体掺入其染色体并
15 在培养基中生长和在细胞系中播散。所述细胞可长期培养同时 HSP 持续表达。

重组细胞可在温度、培养时间、光密度和培养基组合的标准条件下培养。然而，重组细胞的生长条件可与那些表达 HSP 和抗原性蛋白的不同。还可使用修饰的培养条件和培养基来增强 HSP 的生产。例如，
20 可将包含 HSP 及其同源启动子的重组细胞暴露于热或其它环境应激或化学应激下。可将本领域任何已知的技术用于建立生产 HSP 或 HSP-肽复合物的最佳条件。

4.6.6.1 HSP 融合蛋白的重组表达

25 可采用本领域已知方法重组生产包含热激蛋白序列和抗原肽序列的融合蛋白。为生产所述重组融合蛋白，采用与编码抗原肽的序列融合的编码热激蛋白的核酸序列以本领域已知方法构建表达载体，如上述 4.6.6 节中所描述的方法。然后表达并分离 HSP-抗原肽融合体。所述融合蛋白可用于引发免疫反应。Suzue 等，1997，
30 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 13146-51。通过特异性设计分子的抗原肽部分，所述融合蛋白可用于引发免疫反应和用于针对靶疾病或病症的免疫治疗中。

4.6.7 肽合成

通过重组技术生产 HSP 的一个替代方法是肽合成。例如，完整 HSP 或与 HSP 的部分相应的肽可通过使用肽合成器进行合成。可以使用本领域众所周知的常规肽合成或其它合成方法。

- 5 含有 HSP 或其部分的氨基酸序列的肽可通过固相肽合成法进行合成，所述方法的所使用的步骤与 Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 所公开的步骤相似。在合成期间，具有受保护侧链的 N- α -保护的氨基酸逐次加至通过其 C 端连接的增长的多肽链和不溶性多聚支持物即，聚苯乙烯柱。通过连接 N- α -去保护的氨基酸的氨基至已经
- 10 通过将其与试剂如二环己基碳二亚胺反应而被活化的 N- α -保护的氨基酸的羧基从而合成肽。游离氨基与活化的羧基的连接导致肽键形成。最常用的 N- α -保护性基团包括对酸敏感的 Boc 和对碱敏感的 Fmoc。适宜化学，树脂，保护性基团，受保护的氨基酸和试剂的详细内容是本领域众所周知的故此处不作详述（参见，Atherton, 等，1989, Solid
- 15 Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, 和 Bodanszky, 1993, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2nd ed., Springer-Verlag）。

所得 HSP 的纯化可通过如采用凝胶渗透的制备性 HPLC，分配色谱法和/或离子交换色谱法的常规方法进行实施。适宜基质和缓冲液的选择是本领域众所周知的故此处不作详述。

20

4.7 活化的抗原呈递细胞 (APC)

在上述多个实施方案中，可将活化的 APC 代替 HSP 制剂施用于个体而用于同一目的。本发明包括活化抗原呈递细胞的方法，包括将 APC 与 HSP 制剂接触。在用 HSP 制剂活化 APC 的处理之前，可通过本领域众所周知的方法将细胞任选地进行富集或纯化，和/或体外扩增。APC

25 可获自个体，虽然也可以使用非自体 APC，但个体优选是与再施用经处理 APC（即使用自体 APC）的个体相同的个体。非自体 APC 可以是同源的（即，来自与施用活化的 APC 的个体同卵双生的个体）；或同种的（即，与施用活化的 APC 的个体共有至少一个相同 MHC 等位基因的

30 个体）。

可采用本领域众所周知的技术，例如但不限于第 6 节中描述的用于检测 CD11b⁺ 细胞的方法监测 APC 的活化。在特定实施方案中，活

化的 APC 可在体内用于产生或增强由在适宜的相同时间给予个体的免疫反应所引发的免疫反应剂。活化的 APC 可以替代性地在上述多种时间框架例如但不限于在施用免疫反应剂之前或之后 1~24 小时的时间框架内施用，或周期性施用数日或比使用缓慢-或持续-释放型免疫反应剂更晚施用。优选地，将经处理的 APC 用在施用免疫反应剂的位点或施用免疫反应剂的位点的附近。活化的 APC 的施用可通过本领域任何已知的技术实施。

4.8 免疫反应剂

免疫反应剂包括抗体、工程化以使其包含抗体的抗原结合部分的分子或蛋白、工程化以使其包含识别兴趣靶抗原的抗原结合区域和介导抗体依赖性免疫反应的恒定区的分子或蛋白、与兴趣抗原特异性相互反应的肽或域或任何与兴趣抗原/抗原表位相互作用的抗原结合区域和介导抗体依赖性免疫反应，如效应细胞反应或过程的抗体的恒定区的域。Ab 恒定区内可用于本发明的所述域或区域的实例包括下述文件中公开的内容，Reddy 等，2000, *J. Immunol.* 164 (4): 1925-33; Coloma 等，1997, *Nat. Biotechnol.* 15(2): 159-63; Carayannopoulos 等，1994, *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(18): 8348-52; Morrison, 1992, *Annu. Recombinant Expression Vector Immunol.* 10: 239-65; Traunecker 等，1992, *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 51-2; Gillies 等，1990, *Hum. Antibodies Hybridomas* 1 (1): 47-54; 上述文件均全文引入此处作为参考。

优选地，本发明的免疫反应剂包括 1) 抗原结合区和 2) 介导一种或多种抗体依赖性免疫过程的区。抗原结合区可包括或由抗体的抗原结合区组成。抗原结合区可包括与兴趣抗原特异性作用的任何肽或区域。例如，抗原结合区可以是配体或其它兴趣抗原的特异性结合部分或可以是所述配体或结合部分的片段或可来自所述配体或结合部分。

介导一种或多种抗体依赖性免疫过程的区域可包括如下区域或由如下区域组成：能够结合 Fc 受体的区域，例如结合 Fc 受体的抗体部分或结合部分的区域，例如抗体的补体结合部位。该区域还可以是结合 Fc 受体或补体的抗体的抗原结合区域。

所述抗体依赖性过程包括（但不限于）抗体依赖性细胞性细胞毒

性、补体活化、调理作用和吞噬作用。介导特定抗体依赖性过程的效应细胞包括单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和多形核细胞。不受特定机理的限制，应当理解 HSP 能够提高效应细胞上负责介导抗体依赖性反应的受体。这些受体包括 Fc α 和 Fc γ 受体，其亚型或其任何组合。因此，在特定实施方案种，介导一种或多种抗体依赖性免疫过程的免疫反应剂的区域包括如下区域或由如下区域组成：区域是 Fc 受体，优选 Fc α 受体和 Fc γ 受体或二者的配体。在另一实施方案中，介导一种或多种抗体依赖性免疫过程的免疫反应剂的区域包括如下区域或由如下区域组成：所述区域能刺激免疫效应细胞，优选是单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、多形核细胞或两种或多种所述细胞的任何组合的功能，由此实现预防性和/或治疗性效果。在特定实施方案中，当 HSP 制剂诱导免疫反应如细胞因子释放和/或 T 细胞活化时，免疫反应剂促成或共刺激所述免疫反应。

在优选的实施方案中，免疫反应剂是抗体或包括抗体或多个抗体的组合物如血清。在特定实施方案中，免疫反应剂是 IgA、IgG 或 IgM 抗体或包括其片段。在一特别优选的实施方案中，免疫反应剂是单克隆抗体或包括单克隆抗体的片段。免疫反应剂还可包括或由治疗乙型肝炎的人免疫球蛋白、治疗 RSV 的 Respigam、免疫球蛋白冻干粉、或免疫球蛋白 IV (IGIV) 组成。在另一实施方案中，免疫反应剂不针对任何单个表位，而是针对包括一种或多种与表位结合的分子的混合物。所述免疫反应剂的实例是血清或从血清或血浆中浓缩的抗体。所述血清或血浆可来自以特定抗原免疫的个体或来自未以此方式免疫的个体。

用于本发明的方法的抗体包括（但不限于），单克隆抗体，多克隆抗体，合成抗体，多特异性抗体，人抗体，人源化抗体，嵌合抗体，单链 Fvs (scFv)，单链抗体，Fab 片段，F(ab') 片段，二硫键联 Fvs (sdFv)，和抗独特型（抗-Id）抗体（包括，例如，针对本发明的抗体的抗-Id 抗体），以及上述任何一种的表位-结合片段。特别地，用于本发明的方法的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即，包含免疫特异性结合兴趣靶点的抗原结合部位的分子。本发明的免疫球蛋白分子可以是任何型（例如，IgG，IgE，IgM，IgD，IgA 和 IgY），类（例如，IgG₁，IgG₂，IgG₃，IgG₄，IgA₁ 和 IgA₂）或免

疫球蛋白分子的亚类。

在另一实施方案中，免疫反应剂是含有两种具有不同特异性的抗原结合区（即一个识别靶细胞或蛋白上的表位，而另一个识别效应细胞的表位，例如 FcR 的表位）的双特异性分子。在另一实施方案中，
5 免疫反应剂是含有两种针对靶细胞/蛋白上不同表位的抗原结合区域，和介导抗体依赖性免疫反应的域的双特异性分子。靶向癌细胞或病原体的所述双特异性分子及其疗效已经在体内和体外均进行了检测（例如，Wallace 等，2001, J. Immunol. Methods 248 (1-2): 167-82; Sundarapandiyam 等，2001, J. Immunol. Methods 248 (1-2):
10 113-23; Honeychurch 等，2000, Blood 96 (10): 3544-52; Negri 等，1995, Br J Cancer 72 (4): 928-33; Wang 等，1994, Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 16 (2): 83-7, Chinese) (上述文件均全文引入此处作为参考)。

在优选的实施方案中，免疫反应剂是纯化的。如此处所使用的描述特定肽、抗体、分子、蛋白、抗原、HSP、HSP-肽复合物等的“纯化的”是指分子、蛋白、抗原等从高于 1%，5%，10%，20%，30%，40%，
15 50%，60%，70%，80%，90%，95%或 99%的正常情况下肽、抗体、分子、蛋白、抗原、HSP、HSP-肽复合物等天然与置相伴随的蛋白、多糖和/或脂质中分离的状态。如果分离的分子、蛋白、抗原、HSP、HSP-肽复合物等是合成的，其被低于 50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%或
20 0.1%的化学前体物或用于合成分子、蛋白、抗原、HSP、HSP-肽复合物等的合成试剂所污染。在优选的实施方案中，肽、抗体、分子、蛋白、抗原、HSPs、HSP-肽复合物等的纯度为至少 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或 100%。如此处所
25 使用的，术语“%纯度”是指由兴趣分子制成的总组合物重量百分比。故此，包含 50 克兴趣分子的 100 克组合物相对于兴趣分子而言是 50%纯度的。

单克隆抗体可使用本领域已知的多种技术（包括杂交瘤、重组和噬菌体展示技术，或其组合）进行制备。例如，单克隆抗体可采用包括本领域已知和教导的内容的杂交瘤技术进行制备，例如，Harlow 等，
30 Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.1988); Hammerling, 等, in: monoclonal and T-Cell

Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (上述文件均全文引入此处作为参考)。此处所使用的术语“单克隆抗体”并不限于经杂交瘤技术制备的抗体。术语“单克隆抗体”是指来自单个克隆包括真核、原核或噬菌体克隆的抗体，而非制备其的方法。

5 4.8.1 免疫反应剂的制备

本发明的免疫反应剂可通过本领域已知用于抗体合成的任何方法，特别通过化学合成或优选通过重组表达技术进行准备。下面参照抗体免疫反应剂描述了所述方法，但也易于制备其它免疫反应剂。

10 采用杂交瘤技术制备和筛选特异性抗体的方法是常规且本领域众所周知的。在非限制性实施例中，可用兴趣抗原或表达所述抗原多细胞免疫鼠。一经检测到免疫反应，例如在小鼠血清中检测到特异性针对抗原的抗体，其取小鼠脾脏并分离脾细胞。然后采用适于任何适宜的骨髓瘤细胞的众所周知的技术融合脾细胞。通过有限稀释选择并克隆杂交瘤。然后通过本领域已知方法检测杂交瘤克隆分泌能够结合抗
15 原的抗体的细胞。可通过用阳性杂交瘤克隆经腹膜内接种小鼠生成腹水（通常包含高水平抗体）。

可通过已知的技术生成识别特异性表位的抗体片段。例如，可过采用如木瓜蛋白酶（产生 Fab 片段）或胃蛋白酶（产生 $F(ab')_2$ 片段）的酶的免疫球蛋白分子的溶蛋白性裂解来制备 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。
20 $F(ab')_2$ 片段包含完整轻链，以及重链的可变区，CH1 区和铰链区。

例如，还可采用多种本领域已知的噬菌体展示方法产生抗体。在噬菌体展示法中，功能性抗体域在携带了表面其的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上展示。在特定实施方案中，所述噬菌体可用于展示
25 从全套或组合抗体文库（例如，人或鼠）中表达的抗原结合区域，如 Fab 和 Fv 或二硫键稳定化的 Fv。表达结合兴趣抗原的抗原结合区域的噬菌体可用抗原进行选择或鉴定，例如，采用标记的抗原或结合于固体表面或珠或被固体表面或珠俘获的抗原。用于这些方法的噬菌体通常是丝状噬菌体，包括 fd 和 M13。抗原结合区域作为与噬菌体基因 III
30 或基因 VIII 蛋白重组融合的蛋白表达。可用于准备本发明的免疫球蛋白或其片段的噬菌体展示法的实例包括如下文件公开的内容，Brinkman 等，1995, J. Immunol. Methods 182: 41-50; Ames 等，1995,

J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettleborough 等, 1994, Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic 等, 1997, Gene 187: 9-18; Burton 等, 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; PCT 公开号 PCT/GB91/01134; PCT 公开号 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; 5 WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; 美国专利号 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 和 5,969,108; 上述文件均全文引入此处作为参考。

10 如上述参考文件所述,在噬菌体选择后,可分离来自噬菌体的抗体编码区并用于生成完全抗体,包括人抗体或任何其它所需片段,在任何缩写宿主中表达,包括哺乳动物细胞,昆虫细胞,植物细胞,酵母和细菌,例如下述内容。例如,重组制备 Fab, Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术可采用本领域已知方法进行实施,所述方法例如是下述文件公开的方法: PCT 公开号 WO 92/22324; Mullinax 等, 1992, BioTechniques 12(6): 864-869; 和 Sawai 等, 1995, AJRI 34: 26-34; 15 和 Better 等, 1988, Science 240: 1041-1043, 上述文件均全文引入此处作为参考。可用于制备单链 Fvs 和抗体的技术的实例是美国专利号 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等, 1991, Methods in Enzymology 203: 46-88; Shu 等, 1993, PNAS 90: 7995-7999; 和 Skerra 等, 1988, 20 Science 240: 1038-1040 中公开的方法。

对于某些用途(包括抗体在人体内的用途),优选使用嵌合、人源化或人抗体。嵌合抗体其中不同的抗体部分来源于不同动物物种的分子,例如抗体含有来源于鼠单克隆抗体的可变区和来源于人免疫球蛋白的恒定区。制备嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见例如, 25 Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi 等, 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies 等, 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; 美国专利号 5,807,715; 4,816,567; 和 4,816,397, 上述文件均全文引入此处作为参考。人源化抗体是来自非人源性的能结合所需抗原的 30 抗体分子,其含有一种或多种来自非人物种的互补决定区(CDRs)和来自人免疫球蛋白的框架区。通常,人框架区中的框架残基将被来自 CDR 供体抗体的相应残基所替代从而改变,优先改善抗原结合性。这

些框架替代可通过本领域众所周知的方法进行鉴定，例如通过对 CDR 和框架残基的相互作用建模从而鉴定对抗原结合重要的框架残基以及与特定位置的罕见框架残基进行序列对比。参见例如，Queen 等，美国专利号 5,585,089；Reichmann 等，1988, Nature 332: 323，所述文件全文引入此处作为参考。抗体可采用本领域已知的多种方法进行人源化，所述方法包括，例如 CDR-移植 (EP 239,400；PCT 公开号 WO 91/09967；美国专利号 5,225,539；5,530,101 和 5,585,089)，胶合或表面重建 (EP 592,106；EP 519,596；Padlan, 1991, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498；Studnicka 等，1994, Protein Engineering 7 (6): 805-814；Roguska 等，1994, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 91: 969-973)，和链替换 (美国专利号 5,565,332)，上述文件由此均全文引入作为参考。

治疗性和/或预防性抗体的长期使用会可受到引发宿主免疫反应的抗体的免疫原性的限制，该免疫原性限制了抗体的功能表现和用途。已经发展了修饰单克隆抗体的策略 (包括 TolerMab™ 技术 (TolerRx, Cambridge, MA)) 以便降低抗体免疫原性，由此延长和/或重复施用抗体疗法同时避免了宿主免疫系统的中和作用。因此，保持对靶抗原的能力的同时能引发对其自身耐受性的“耐受的”单克隆抗体及其在体内发挥功能是根据本发明治疗性或预防性处理患者所需要的。Gilliland 等，1999, J. Immunol. 162: 3663-71。

完全人抗体特别适用于人类患者的治疗性或预防性治疗。人抗体可通过多种本领域已知方法进行制备，所述方法包括上述采用来自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示法。参见美国专利号 4,444,887 和 4,716,111；和 PCT 公开号 WO 98/46645；WO 98/50433；WO 98/24893；WO 98/16654；WO 96/34096；WO 96/33735；和 WO 91/10741，上述文件均全文引入此处作为参考。

还可采用不能表达功能性内源免疫球蛋白的，但能表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备人抗体。关于该制备人抗体技术的综述，可参见 Lonberg 和 Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93。而对于该制备人抗体和人单克隆抗体的技术以及制备所述抗体方法步骤的详细描述，参见例如，PCT 公开号 WO 98/24893；WO 92/01047；WO 96/34096；WO 96/33735；欧转专利号 0 598 877；美国专利

号.5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771 和 5,939,598, 上述文件均全文引入此处作为参考。此外, 可从例如 Abgenix, Inc. (Freemont, CA), MedarexX (NJ) 和 Genpharm (San Jose, CA) 等公司订购采用与上述相似的技术直接针对选择抗原的人抗体。

可采用被称为“引导选择”的技术生成识别选择表位的完全人抗体。在该方法中, 将所选非人类单克隆抗体, 例如小鼠抗体, 用于引导选择识别相同表位的完全人抗体(Jespers 等, 1988, Bio/technology 12: 899-903)。

在优选的实施方案中, 抗体具有体内治疗性和/或预防性用途。治疗性和预防性抗体的实例包括(但不限于)MDX-010 (Medarex®, NJ) 其是目前用于临床治疗前列腺癌的人源化抗-CTLA-4 抗体; SYNAGIS® (MedImmune®, MD), 其是用于治疗 RSV 感染患者的人源化抗-呼吸道合胞病毒 (RSV) 单克隆抗体; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech®, CA), 其是用于治疗转移性乳腺癌患者的人源化抗-HER2 单克隆抗体; REMICADE® (infliximab) (Centocor®, PA), 其是用于治疗克隆氏病 (Crohn's disease) 患者的嵌合抗-TNF α 单克隆抗体; REOPRO® (阿昔单抗) (Centocor®), 其是用于预防血栓形成的抗-血小板上糖蛋白 IIb/IIIa 受体; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals®, Switzerland), 其是用于预防急性肾脏同种异体移植物排斥的免疫抑制性, 人源化抗-CD25 单克隆抗体。其它实例为人源化抗-CD18F(ab')₂ (Genentech®); CDP860, 其是人源化抗-CD18F(ab')₂ (Celltech®, UK); PR0542, 其是与 CD4 融合的抗-HIVgp120 抗体 (Progenics®/Genzyme Transgenics®); Ostavir, 其是人抗乙型肝炎病毒抗体 (Protein Design Lab®/Novartis®); PROTOVIR™, 其是人源化抗-CMV IgG1 抗体 (Protein Design Lab®/Novartis®); MAK-195 (SEGARD®), 其是鼠抗-TNF- α F(ab')₂ (KnollPharma®/BASF®); IC14, 其是抗-CD14 抗体 (ICOS Pharm®); 人源化抗-VEGF IgG1 抗体 (Genentech®); OVAREX™, 其是鼠抗-CA 125 抗体 (Altarex®); PANOREX™, 其是鼠抗-17-IA 细胞表面抗原 IgG2a 抗体 (Glaxo Wellcome®/Centocor®); BEC2, 其是鼠抗-独特型 (GD3 表位) IgG 抗体 (ImClone System®); IMC-C225, 其是嵌合抗-EGFR IgG

抗体 (ImClone System®); VITAXIN™, 其是人源化抗- $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白抗体 (Applied Molecular Evolution®/MedImmune®); Campath 1H/LDP-03, 其是人源化抗 CD52 IgG1 抗体 (Leukosite®); Smart M195, 其是人源化抗-CD33 IgG 抗体 (Protein Design Lab®/Kanebo®);

5 RITUXAN™, 其是嵌合抗-CD20 IgG1 抗体 (IDEC Pharm®/Genentech®, Roche® /Zettyaku®); LYMPHOCIDE™, 其是人源化抗-CD22 IgG 抗体 (Immunomedics®); Smart ID10, 其是人源化抗-HLA 抗体 (Protein Design Lab'®); ONCOLYM™(Lym-1)是放射标记的鼠抗-HLA DIAGNOSTIC REAGENT 抗体 (Techniclone®); ABX-IL8 是人抗-IL8 抗体

10 (Abgenix®); 抗-CD11a 是人源化 IgG1 抗体 (Genentech®/Xoma®); ICM3 是人源化抗-ICAM3 抗体 (ICOS Pharm®); IDEC-114 是灵长源抗-CD80 抗体 (IDEC Pharm®/Mitsubishi®); ZEVALIN™ 是放射标记的鼠抗-CD20 抗体 (IDEC®/Schering AG®); IDEC-131 是人源化抗-CD40L 抗体 (IDEC®/Eisai®); IDEC-151 是灵长源抗-CD4 抗体 (IDEC);

15 IDEC-152 是灵长源抗-CD23 抗体 (IDEC®/Seikagaku®); SMART 抗-CD3 是人源化抗-CD3 IgG (Protein Design Lab®); 5G1.1 是人源化抗-补体因子 5 (C5) 抗体 (Alexion Pharm®); D2E7 是人源化抗-TNF- α 抗体 (CAT®/BASF®); CDP870 是人源化抗-TNF- α Fab 片段 (Celltech®); IDEC-151 是灵长源抗-CD4 IgG1 抗体 (IDEC Pharm® /SmithKline

20 Beecham®); MDX-CD4 是人抗-CD4 IgG 抗体 (Medarex®/Eisai®/Genmab®); CDP571 是人源化抗-TNF- α IgG4 抗体 (Celltech®); LDP-02 是人源化抗- $\alpha 4 \beta 7$ 抗体 (LeukoSite®/Genentech®); OrthoClone OKT4A 是人源化抗-CD4 IgG 抗体 (OrthoBiotech®); ANTOVA™ 是人源化抗-CD40L IgG 抗体 (Biogen®); ANTEGREN™ 是人源化抗-VLA-4 IgG 抗体

25 (Elan®); MDX-33 是人抗-CD64 (Fc γ R) 抗体 (Medarex®/Centeon®); SCH55700 是人源化抗-IL-5 IgG4 抗体 (Celltech®/Schering®); SB-240563 和 SB-240683 分别是人源化抗-IL-5 和 IL-4 抗体 (SmithKline Beecham®); rhuMab-E25 是人源化抗-IgE IgG1 抗体 (Genentech® /Norvartis®/Tanox Biosystems®); ABX-CBL 是鼠抗

30 CD-147 IgM 抗体 (Abgenix®); BTI-322 是鼠抗-CD2 IgG 抗体 (Medimmune®/Bio Transplant®); Orthoclone/OKT3 是鼠抗-CD3 IgG2a 抗体 (ortho Biotech®); SIMULECT™是嵌合抗-CD25 IgG1 抗

体 (Novartis Pharm®); LDP-01 是人源化抗-β2-整联蛋白 IgG 抗体 (LeukoSite); 抗-LFA-1 是鼠抗 CD 18 F (ab')₂ (Pasteur-Merieux®/Immunotech®); CAT-152 是人抗-TGF-β2 抗体 (Cambridge Ab Tech®); 而 Corsevin M 是嵌合抗-因子 VII 抗体 (Centocor®)。上面列出的免疫反应剂, 以及任何其它的免疫反应剂, 可根据本领域技术人员已知的任何给药法 (包括免疫反应剂供应者推荐的给药法) 进行施用。

编码抗体或其它免疫反应剂的核苷酸序列可获自本领域技术人员可得到的任何信息 (即, 来自 Genbank、现有技术或通过常规克隆)。如果不能得到包含编码特定抗体或其表位-结合片段或其它免疫反应剂的核酸的克隆, 但抗体分子或其表位-结合片段或其它免疫反应剂的序列是已知的, 编码免疫球蛋白或其它免疫反应剂的核酸可化学合成或获自适宜的来源 (例如, 抗体 cDNA 文库、或 cDNA 文库、或核酸, 优选聚 A⁺ RNA, 分离自表达抗体的任何组织或细胞, 如选择的表达抗体的杂交瘤细胞), 通过采用能与序列的 3' 和 5' 端杂交的合成引物的 PCR 扩增或通过采用特异性针对特定基因序列的寡核苷酸探针的克隆以便鉴定, 例如, 来自编码抗体的 cDNA 文库的 cDNA 克隆。然后可采用任何本领域众所周知的方法将通过 PCR 生成的扩增的核酸克隆至可复制的克隆载体。在免疫反应剂天然不存在的情况下, 编码免疫反应剂不同区域的核酸可获自预存文库或已知基因或可被合成。

抗体或其它免疫反应剂的核苷酸序列一经确定, 该抗体或其它免疫反应剂的核苷酸序列即可采用本领域众所周知的操作核苷酸序列的方法进行操作, 所述方法例如, 重组 DNA 技术, 定向诱变, PCR 等 (参见例如下述文件中描述的技术: Sambrook 等, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 和 Ausubel 等, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 上述文件全文引入此处作为参考), 通过例如在与免疫效应细胞相互作用相关的抗体或其它免疫反应剂的表位-结合区域或抗体或其它免疫反应剂的恒定 (Fc) 区中引入氨基酸置换、删除和/或插入而生成具有不同氨基酸序列的抗体或其它免疫反应剂。

抗体或其它免疫反应剂的重组表达需要构建包含编码抗体或其它

免疫反应剂的核苷酸序列的表达载体。编码抗体分子或抗体的重链或轻链或其部分（优选地，但并非必须地，包含重链或轻链可变区）或其它免疫反应剂的核苷酸序列一经获得，即可通过重组 DNA 技术采用本领域众所周知的技术制备用于生产抗体分子或其它免疫反应剂的载体。因此，此处描述了通过表达包含抗体或其它免疫反应剂编码核苷酸序列的多核苷酸从而制备蛋白的方法。可采用本领域技术人员众所周知的方法来构建包含抗体或其它免疫反应剂编码序列以及适宜的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括，例如，体外重组 DNA 技术，合成技术和体内遗传重组。可将编码重链可变或恒定区、轻链可变或恒定区、重链和轻链可变区、重-和/或轻-链可变区的表位结合片段或抗体或其它免疫反应剂的一个或多个互补决定区（CDR）的核苷酸序列克隆至用于表达的所述载体中。通过常规技术将该表达载体转化宿主细胞然后通过常规技术培养转染的细胞。

多种宿主-表达载体系统可用于表达本发明的抗体分子或其它免疫反应剂。所述宿主-表达系统表示通过其可制备兴趣编码序列并随后可被纯化的载体，但也可表示细胞，该细胞在被适宜的核苷酸编码序列转化或转染时，可原位表达本发明的抗体分子或其它免疫反应剂。这些系统包括（但不限于），被包含抗体或其它免疫反应剂编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的微生物例如细菌（例如，大肠杆菌和枯草杆菌）；被包含抗体或其它免疫反应剂编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母（例如，酿酒酵母和毕赤酵母）；被包含抗体或其它免疫反应剂编码序列的重组病毒表达载体（例如，杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；被重组病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；和烟草花叶病毒，TMV）感染或被包含抗体或其它免疫反应剂编码序列的重组质粒表达载体（例如，Ti 质粒）转化的植物细胞系统；和含有包含来自哺乳动物细胞基因组的启动子（例如，金属硫蛋白启动子）或来自哺乳动物的病毒的启动子（例如，腺病毒晚期启动子；痘苗病毒 7.5K 启动子）的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（例如，COS，CHO，BHK，293，3T3 和 NSO 细胞）。优选地，特别适用于表达完整重组抗体分子或其它免疫反应剂的例如大肠杆菌的细菌细胞，而更优选真核细胞用于表达重组抗体或其它免疫反应剂分子。例如，哺乳动物的细胞如中国仓鼠卵巢细胞（CHO），

结合载体如来自人巨细胞病毒的主要过渡早期基因启动子元件是抗体的有效表达系统 (Foecking 等, 1986, *Gene* 45: 101 和 Cockett 等, 1990, *Bio/Technology* 8: 2)。

5 在细菌系统中, 根据预期用于要表达抗体分子或其它免疫反应剂的用途可益于选择许多表达载体。例如, 当要制备大量所述蛋白时, 对于生产抗体分子的药物组合物, 需要能引导易于纯化的高水平融合蛋白产物表达的载体。所述载体包括 (但不限于), 大肠杆菌表达载体 pUR278 (Ruther 等, 1983, *EMBO* 12: 1791), 其中抗体或其它免疫反应剂的编码序列可各自被连接至载体中与 lacZ 编码区的框架内
10 以便生成融合蛋白; 和 pIN 载体 (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109, 和 Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509)。

在昆虫系统中, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 用作表达
15 异源基因的载体。该病毒生长在草地夜蛾细胞中。抗体或其它免疫反应剂的编码序列可各自被克隆至病毒的非必需区 (例如多角体蛋白基因) 并被置于 AcNPV 启动子 (例如多角体蛋白启动子) 的控制下。

在哺乳动物的宿主细胞中, 可使用大量基于病毒的表达系统来表达本发明的抗体分子或其它免疫反应剂。

在腺病毒用作表达载体的情况下, 将兴趣抗体或其它免疫反应剂
20 编码序列连接至腺病毒转录/翻译控制复合物, 例如, 晚期启动子和三联前导序列。然后通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组。在表达基因组非必需区 (例如, E1 或 E3 区) 中的插入将导致重组病毒具有活性并能在感染的宿主中表达抗体分子或其它免疫反应剂 (例如, 参见 Logan & Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
25 81: 355-359)。为有效翻译插入的抗体或其它免疫反应剂编码序列还需要特异性起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和毗邻序列。此外, 起始密码子必须与与所需编码序列的读码框同相以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是多种来源的, 可以是天然的也可以是合成的。通过包含适宜转录增强子元件,
30 转录终止子等可提高转录效率 (参见例如, Bitter 等, 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 516-544)。

此外, 可选择需要以特定方式调节抗体或其它免疫反应剂序列的

表达或修饰和加工抗体或其它免疫反应剂的宿主细胞株。蛋白产物的所述修饰（例如，糖基化）和加工（例如，酶切）具有对于抗体或其它免疫反应剂的功能的重要性。不同的宿主细胞具有蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性和特异性机制。可选择适宜的细胞系或
5 宿主细胞以确保表达的抗体或其它免疫反应剂的正确修饰和加工。为此目的，可以使用具有适于前转录物的加工，基因产物的糖基化和磷酸化的细胞结构的真核宿主细胞。所述哺乳动物的宿主细胞包括但不限于 CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138，尤其是，骨髓瘤细胞如 NSO 细胞和相关细胞系，参见例如，Morrison 等，美国专利号 5,807,715，由此上述文件全文引入此处作为参考。

对于重组抗体或其它免疫反应剂的长期、高产量的生产，优选稳定的表达。例如，可对稳定表达抗体分子或其它免疫反应剂的细胞系进行工程化处理。除使用包含病毒源性复制的表达载体外，可用由适宜的
15 表达控制元件（例如，启动子，增强子，序列，转录终止子，所腺苷酸化位点等）控制的 DNA 和可选标记转化宿主细胞。引入外源 DNA 后，将工程化细胞在滋养培养基中生长 1~2 日，然后移至选择性培养基。重组质粒中的可选标记对选择具有抗性并能使细胞将转录稳定整合至其染色中然后生长形成细胞灶其可被顺次克隆然后扩增为细胞系。本方法还益用于表达抗体分子或其它免疫反应剂的工程化细胞
20 系。所述工程化细胞系可特别用于筛选和评估直接或间接与抗体分子或其它免疫反应剂发生相关作用的组合物。

可以使用许多选择系统，其包括但不限于，可分别用于 tk⁻，hgprt⁻或 aprt⁻的细胞的单纯疱疹病毒胸苷激酶（Wigler 等，1977，Cell 11: 223），次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202）和腺嘌呤磷酸核糖转移酶（Lowy 等，1980, Cell 22: 8-17）基因。而且，抗代谢药抗性可用作选择下述基因的基础：dhfr，其对应于甲氧蝶呤抗性（Wigler 等，1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357，和 O'Hare 等，1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527）；gpt，其对应霉酚酸抗性（Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072）；neo，其对应氨基糖甙 G-418 抗性（Wu 和 Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95；Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596；

Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; 和 Morgan 和 Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; 和 May, 1993, *TIB TECH* 11 (5): 155-215); 和 hygro, 其对应潮霉素抗性 (Santerre 等, 1984, *Gene* 30: 147)。重组 DNA 技术领域众所周知的方法可常规用于筛选重组克隆, 所述方法公开于, 例如 Ausubel 等(编), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; 12 和 13 章, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; 和 Colberre-Garapin 等, 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1, 上述文件均全文引入此处作为参考。

通过载体扩增可以增加抗体分子或其它免疫反应剂的表达水平 (综述参见 Bebbington 和 Hentschel, 1987, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. Academic Press, New York)。当表达抗体或其它免疫反应剂的载体系统中的标记具有可扩增性时, 存在于宿主细胞培养物中的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体或其它免疫反应剂基因相关, 故此抗体或其它免疫反应剂的生成也增加 (Crouse 等, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257)。

宿主细胞可被本发明的两种表达载体, 编码重链源性多肽的第一载体和编码轻链源性多肽的第二载体共转染。该两种载体可包含相同的能使得重链和轻链多肽相等表达的可选标记或不同的可选标记以确保保持两种质粒。可选地, 可使用编码重链和轻链多肽, 且能表达的单个载体。在该情况下, 轻链应置于重链前以避免游离重链的过度毒性 (Proudfoot, 1986, *Nature* 322: 52; 和 Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197)。重链和轻链的编码序列可包括 cDNA 或基因组 DNA。

本发明的抗体或其它免疫反应剂分子一经通过重组表达得以制备后, 其可通过本领域已知用于纯化免疫球蛋白分子或其它免疫反应剂的任何方法, 例如通过层析法 (例如, 离子交换层析法、亲和层析法、特别是在蛋白 A 纯化后对特异性抗原的亲和层析法和大小柱层析法),

离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白的任何其它标准技术进行纯化。此外，本发明抗体或其它免疫反应剂或其片段可与此处描述的或本领域已知的异源多肽序列融合以利于纯化。

本发明还包括与异源多肽（或其部分，优选至少 10、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90 或至少 100 个氨基酸的多肽）重组融合或化学结合（包括共价和非共价结合）以产生融合蛋白的抗体或其片段的用途。该融合不一定是直接的，也可以通过联接序列。例如，通过抗体与特异性针对特定细胞表面受体的抗体融合或结合，抗体可用于体外或体内将异源多肽靶向特定细胞类型。与异源多肽融合或结合的抗体还可采用本领域已知方法用于体外免疫测定法和纯化方法中。参见例如，PCT 公开号 WO 93/21232；EP 439,095；Naramura 等，*Immunol. Lett.* 39: 91-99 (1994)；美国专利 5,474,981；Gillies 等，*PNAS* 89: 1428-1432 (1992)；和 Fell 等，*J. Immunol.* 146: 2446-2452 (1991)，上述文件均全文引入此处作为参考。

本发明还包括包含与抗体片段融合或结合的异源多肽的组合物。例如，异源多肽可与 Fab 片段、Fc 片段、Fv 片段、F(ab')₂ 片段或其部分融合或结合。多肽与抗体部分融合或结合的方法是本领域已知的。参见例如，美国专利号 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, 和 5,112,946；EP 307,434；EP 367,166；PCT 公开号 W096/04388 和 W0 91/06570；Ashkenazi 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539 (1991)；Zheng 等，*J. Immunol.* 154: 5590-5600 (1995) 和 Vil 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11337-11341 (1992)（所述文件均全文引入此处作为参考）。

本发明还包括与治疗剂结合的抗体或其片段的用途。

抗体或其片段可结合于治疗部分如细胞毒素，例如细胞增殖抑制剂或细胞自杀剂、治疗剂或放射性金属离子，例如 α 粒子辐射剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何药剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、菲啶溴红、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、鬼臼噻吩甙、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、dihydroxy anthracin dione、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔

和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗因子包括(但不限于)、抗代谢药(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氮烯咪胺)、烷化剂(例如,氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BCNU)和环己亚硝脒(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺氯氨铂(II)(DDP)、

5 蒽环类抗生素(例如,柔红霉素(之前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,更生霉素(之前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素(AMC))和抗-有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。

此外,抗体或其片段可结合改变特定生物反应的治疗剂或药物部分。该治疗剂或药物部分并非受经典化学治疗的限制进行构建。例如,该药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白或多肽。所述蛋白可包括,例如毒素如相思豆毒素、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生的生长因子、组织纤维蛋白溶酶原激活剂、

10 细胞凋亡剂,例如 TNF- α 、TNF- β 、AIM I(参见,国际公开号 WO 97/33899), AIM II(参见,国际公开号 WO 97/34911), Fas 配体(Takahashi 等,1994, J. Immunol., 6: 1567-1574), 和 VEGI(参见,国际公开号 WO 99/23105), 血栓形成剂或抗-血管生成剂,例如血管抑素或内皮抑素;或生物反应修饰剂例如淋巴因子(例如,白介素-1("IL-1")、白介素-2("IL-2")、白介素-6("IL-6")、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF") 和粒细胞集落刺激因子("G-CSF"))或生长因子(例如,生长激素("GH"))。

15

此外,抗体可结合治疗性部分如放射性金属离子,如 α 发射剂如 ^{213}Bi 或用于将放射性金属离子与肽结合的大环螯合剂,所述放射性金属离子包括但不限于, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm 。在特定实施方案中,大环螯合剂是 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可借助连接分子与抗体连接。所述连接分子是本领域所众所周知的且公开于 Denardo 等,1998, Clin Cancer Res. 4(10): 2483-90; Peterson 等,1999, Bioconjug Chem. 10(4): 553-7;

25 和 Zimmerman 等,1999, Nucl. Med. Biol. 26(8): 943-50, 上述文件均全文引入作为参考。

治疗部分与抗体结合的技术是众所周知的,参见例如,Arnon 等,

“Monoclonal For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,
in Mnonclonal And Cancer Therapy, Reisfeld 等 (eds.), pp. 243-
56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等, “Antibodies For Drug
Delivery”, in Controlled Drug Delivery (2nd ed.), Robinson 等
5 (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibodies
Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in
Monoclonal Antibodies '84 : Biological And Clinical
Applications, pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future
Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In
10 Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection
And Therapy, Baldwin 等 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)
和 Thorpe 等, 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58.

可选地, 按 Segal 在美国专利号 4, 676, 980 中所公开的内容, 可
将抗体结合第二抗体从而形成抗体异结合物, 所述文件全文引入此处
15 作为参考。

4.9 治疗性/预防性应用

确定 HSP 治疗后免疫反应剂的免疫原性

在可选的过程中, 与本发明的 HSP 制剂一同使用的免疫反应剂的
免疫原性的产生或提高可采用本领域众所周知及第 5 节中例举说明的
20 多种方法进行评估。

在其它方法中, “四聚体染色”测定法 (Altman 等, 1996, Science
274: 94-96) 可用于鉴别抗原特异性 T 细胞。例如, 在一个实施方案
中, 包含特异性肽抗原如肿瘤特异性抗原的 MHC 分子被多聚化以便形
成可溶性肽四聚体并被例如通过结合抗生物素蛋白链菌素而被标记。
25 然后将 MHC-肽抗原复合物与获自用免疫反应剂和 HSP 制剂治疗的患者
的 T 细胞群混合。然后对表达兴趣肿瘤特异性抗原的 T 细胞用生物素
染色。

此外, 采用混合的淋巴细胞靶培养测定法, 可在 4 小时 ^{51}Cr -释
放测定中检测 T 细胞的细胞毒性 (参见 Palladino 等, 1987, Cancer Res.
30 47: 5074-5079)。在该测定中, 在靶细胞悬液中加入混合的淋巴细胞
培养物以便产生不同的效应细胞: 靶细胞 (E:T) 比率 (通常是 1:1 至
40:1)。通过在包含 $500\mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ 的培养基中于 37°C 孵育 1×10^6 靶

细胞 1 小时对靶细胞进行预先标记。标记后洗涤细胞三次。每个测定点(E:T比率)以三等份进行实施并包括适宜的对照以便检测自发性⁵¹Cr释放(测定中不加淋巴细胞)和100%释放(用洗涤剂裂解细胞)。细胞培养物孵育4小时后,200g离心5分钟形成细胞片状沉淀。通过γ计数器检测释放至上清液中的⁵¹Cr的量。按检测样品中的cpm值减去自发释放的cpm值再除以总洗涤剂释放的cpm值减去自发释放的cpm值来检测细胞毒性百分数。为了阻滞MHC I类分子级联反应,将来自K-44杂交瘤细胞(抗-MHC I类分子杂交瘤)的浓缩杂交瘤上清液加入检测样品至终浓度12.5%。

10 可选地,ELISPOT测定法可用于检测在用免疫反应剂和HSP制剂刺激后细胞毒性T细胞体外释放细胞因子。采用特异性针对特定细胞因子,如白介素-2、肿瘤坏死因子α或干扰素-γ的抗体检测细胞因子释放(例如,参见Scheibenbogen等,1997,Int. J. Cancer 71: 932-936)。在已预先涂覆了特异性针对兴趣细胞因子的能够俘获T细胞分泌的细胞因子的抗体的微量滴定板中实施测定。在T细胞于涂覆孔中孵育24~48小时后,除去细胞毒性T细胞然后代以识别细胞因子上不同表位的第二标记的抗体。在充分洗涤以除去未结合抗体后,将产生有色反应产物的酶底物加入滴定板。在显微镜下计数产生细胞因子的细胞的数目。该方法的优势在于检测时间短,以及灵敏度无需大量细胞毒性T细胞。

4.10 药物组合物

本发明还提供了药物组合物。所述预防上或治疗上有效的组合物包括免疫反应剂和HSP,以及药学上可接受的载体。在特定实施方案中,术语“药学上可接受的”是指联邦或州政府的管理机构证实或美国药典或其它公知药典所列用于动物,更特别用于人类的。所述术语“载体”是指稀释剂、赋形剂或载体,其可用于施用治疗剂。所述药学载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。但静脉内施用药物组合物时,水是优选的载体。氯化钠水溶液和葡萄糖水和甘油溶液也可用作液体载体,特别用于可注射的溶液。适宜的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、

乙二醇、水、乙醇等。如有需要，组合物还可包含少量的湿润剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物的形式可以是溶液、悬浮液、乳状液、片剂、丸剂、胶囊、散剂、持续释放剂型等。口服剂型可包括标准载体如药品级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。适宜的药学载体的实例公开于 E. W. Martin, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 中。所述组合物可包括预防或治疗有效量的免疫反应剂和 HSP，优选以纯化的形式，联同适宜量的载体以便提供适于施用于患者的形式。剂型应与施用方式相适应。

本发明的免疫反应剂和 HSP 还益于与一种或多种用于治疗疾病、病症或感染的药物，例如抗癌剂、抗炎剂或抗细菌/真菌剂或抗病毒剂联合使用。抗癌剂的实例包括（但不限于）顺铂、卡铂、环磷酰胺、阿霉素、依托泊苷、异磷酰胺、紫杉醇、紫杉烷、依连洛特肯、托泊替康、2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷、长春新碱、长春瑞滨、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶（5-FU）、亚叶酸、左旋咪唑、，氮芥、长春瑞滨、Temodar、长春新碱和红豆杉醇。

已知多种递药系统，其可用于施用本发明包括的治疗剂和预防剂，即免疫反应剂和 HSP，例如包裹于脂质体、微粒、微胶囊、能表达免疫反应剂的重组细胞、HSP 制剂，抗体或抗体片段，受体介导细胞摄取作用（参见例如，Wu 和 Wu, 1997, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432），作为逆转录病毒或其它载体部分的构建核酸等。包含相同物质的免疫反应剂或 HSP 制剂或药物组合物的给药方法包括（但不限于）非消化道给药（例如，皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下）、硬膜外和粘膜（例如，鼻内和经口途径）。在特定实施方案中，免疫反应剂，例如抗体，经肌内、静脉内或皮下给药。给药可以是全身或局部的。此外，还可采用经肺施用方式，例如通过使用吸入器或喷雾器，以及与雾化剂的制剂。参见例如，美国专利号 6,019,968；5,985,320；5,985,309；5,934,272；5,874,064；5,855,913；5,290,540；和 4,880,078；和 PCT 公开号 WO 92/19244；WO 97/32572；WO 97/44013；WO 98/31346；和 WO 99/66903，上述文件均全文引入此处作为参考。在一个实施方案中，采用 Alkermes AIR™ 经肺药物递送技术（Alkermes, Inc., Cambridge, MA）施用治疗剂或预防剂。

溶解度和施用位点时在选择施用途径时应考虑的因素。施用方式

可以变化, 包括(但不限于), 例如皮下、静脉内、腹膜内、肌内、皮内或粘膜。粘膜途径还可采用经口、直肠和鼻的方式进行施用。考虑到上述因素, 优选在施用第二药剂的位点相同的位置或毗邻位置施用第一治疗剂或预防剂。在治疗肿瘤的方法中, 在肿瘤附近, 最优选通过瘤内注射施用 HSP 制剂。

在本发明的一个实施方案中, 可采用任何需要的给药途径施用 HSP 制剂和免疫反应剂。皮内给药的优点分别包括所用的剂量低和吸收快。皮下或肌内给药的优势分别包括适用于某些不溶性悬浮液和油性悬浮液。粘膜给药途径包括(但不限于), 经口, 直肠和鼻给药。用于粘膜给药的试剂适用于下述多种剂型。

在另一实施方案中, 本发明的治疗剂或预防剂通过肌内、静脉内或皮下给药。组合物可通过任何适宜途径, 例如通过输注或弹丸注射、通过经上皮或粘膜衬层(例如, 口腔粘膜, 直肠和肠粘膜等)的吸收并可与其它生物学活性剂一起施用。

在一特定实施例中, 需要将药物本发明的组合物局部施用于需要治疗或预防的区域。在一个实施方案中, 该治疗或预防可通过, 例如但不限于局部输注、注射或植入物的方式实现, 所述植入物时多孔性、无孔性或凝胶状物质, 包括膜, 如硅胶膜或纤维。优选使用制剂不吸收的物质。

在另一实施方案中, 组合物可在载体, 特别是脂质体中递送(参见 Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat 等, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein 和 Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; 基本同上)。

而在另一实施方案中, 组合物可在控释系统或持续释放系统中递送。本领域技术人员已知的任何技术均可用于制备包含一种或多种抗体, 或一种或多种融合蛋白的持续释放剂型。参见例如, 美国专利号 4, 526, 938; PCT 公开号 WO 91/05548; PCT 公开号 WO 96/20698; Ning 等, 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel, "Radiotherapy & Oncology 39: 179-189; Song 等, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions, " PDA Journal of

Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397; Cleek 等, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for abFGF Antibody for Cardiovascular Application, "Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; 和 Lam 等, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery, "Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760, 1997, 上述文件均全文引入此处作为参考。在一个实施方案中, 可在控释系统中使用泵(参见 Langer, 同上; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 20; Buchwald 等, 1980, Surgery 88: 507; 和 Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574)。在另一实施方案中, 可使用聚合材料来实现免疫反应剂或 HSP 制剂的控释(参见例如, Medical Applications of Controlled Release, Langer 和 Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen 和 Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger 和 Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; 并参见 Levy 等, 1985, Science 228: 190; During 等, 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71: 105); 美国专利号 5,679,377; 美国专利号 5,916,597; 美国专利号 5,912,015; 美国专利号 5,989,463; 美国专利号 5,128,326; PCT 公开号 WO 99/15154; 和 PCT 公开号 WO 99/20253)。而在另一实施方案中, 可将控释系统置于治疗靶点(例如, 肺)附近, 有序仅需要全身剂量的部分(参见例如, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 如上, vol. 2, pp. 115-138 (1984))。

Langer, 1990, Science 249: 1527-1533 中描述了其它控释系统。

在一个优选的实施方案中, 在施用免疫反应剂的同时施用 HSP 制剂。HSP 制剂和免疫反应剂的同时施用是指 HSP 或 HSP-肽复合物作为与免疫反应剂的混合物或与之分开, 但同时进行的共施用。本方法提供了两种施用在彼此低于 1 分钟至约 5 分钟或至 60 分钟的时间框架内, 例如以相同的医师随访实施。

在优选的实施方案中, 本发明提供了在相同位点或非常毗邻位点与免疫反应剂同时导入包括但不限于 hsp60、hsp70、hsp90、hsp110、

gp96、grp170 或钙网织蛋白（单独或彼此联合）的 HSP 制剂至个体的方法。

5 如果预期的治疗剂或预防剂是水溶性的，则其可在适宜缓冲液例如，磷酸盐缓冲盐水或其它生理学上适宜的溶液（优选无菌）中进行配制。可选地，如果所得复合物在水溶剂中具有较弱的溶解度，则其可用离子型表面活性剂如 Tween 或聚乙二醇进行配制。因此，可配制复合物与其生理学上可接受的溶剂合物通过吸入或吹入（或经口或鼻）进行施用，或经口、含服、胃肠外或经施用或（肿瘤的情况下）直接注射至实体瘤中。

10 对于经口给药，药物制剂可以是液体形式，例如溶液、糖浆剂或悬浮液或可以是在使用前可水或其它适宜载体重建的药品。所述液体制剂可通过常规方法用药学上可接受的添加剂如悬浮剂（例如，山梨糖醇浆、纤维素衍生物或氢化食用脂）；乳化剂（例如，卵磷脂或阿拉伯胶）；非水载体（例如，杏仁油，油酯或分级化植物油）；和防腐
15 剂（例如，甲基或丙基-对-羟苯甲酸酯或山梨酸）进行制备。药物制剂可采用如下形式，例如通过常规方法用药学上可接受的赋形剂如粘合剂（例如，预胶化玉米淀粉，聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填充剂（例如，乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如，硬脂酸镁、滑石或二氧化硅）；崩解剂（例如，马铃薯淀粉或淀粉羟乙
20 酸钠）；或湿润剂（例如，十二烷基硫酸钠）制备的片剂或胶囊。可通过本领域众所周知的方法包被片剂。

可适宜地配制经口施用的组合物以便提供有效物质的控释。

对于含服施用，组合物可采取以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

25 可为通过注射，例如通过弹丸注射或连续输注的非消化道给药配制药剂。用于注射的剂型可以是包含附加保存剂的单位剂型，例如安瓿或多剂量容器。制剂可采用如下形式，油性或水性载体的悬浮液、溶液或乳状液，可包括配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可选地，有效成分可以是在使用前要用适宜的载体，例如灭菌无热原水配
30 制的粉剂。

组合物还可配制为直肠制剂如栓剂或保留灌肠，例如包含常规栓剂基质如可可豆脂或其它甘油酯。

除上述剂型外，本发明的药剂还可配制为贮存制剂。所述长效剂型可通过植入（例如，皮下或肌内）或通过肌内进行施用。因此，例如，可用适宜的聚合或疏水性材料（例如，作为可接受油中的乳状液）或离子交换树脂或作为略溶衍生物，例如作为略溶盐配制制剂。脂质体和乳状液是众所周知的递送载体或亲水性药物载体的实例。

对于吸入施用，根据本发明使用的制剂易于来自增压包或喷雾器的喷雾剂，使用适宜的推进剂，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适宜的气体进行递送。在增压气雾剂的情况下，剂量单位可通过提供阀门以便递送确定量的方法进行确定。用于吸入器或吹入器的例如明胶的胶囊和药筒可制备为包含化合物混合粉剂和适宜的粉基如乳糖或淀粉。

包括 HSP 的药物组合物配方及其制备方法可见于引入本文作为参考的现有技术和美国专利中。

本发明还提供了：将免疫反应剂，例如抗体或 HSP 制剂包装在熔封容器如安瓿或标示免疫反应剂量的小药囊中。在一个实施方案中，免疫反应剂和 HSP 在一种或多种熔封容器中以无菌冻干粉剂或无水浓缩物的形式一同或分开提供并例如可用水或盐水重溶至适宜浓度而施用于个体。开始可通过体外检测估计各免疫反应剂的有效剂量，还要依据靶抗原的性质，肿瘤中抗原密度，肿瘤类型，施用方式，其可被本领域技术人员在无须过度试验的情况下进行优化。用于注射的一般有效剂量为约 0.1~5 mg/kg/日、优选约 1~4 mg/kg/日、更优选 2~4 mg/kg/周。优选地，免疫反应剂作为熔封容器中的无菌冻干粉剂，以至少 5 mg、更优选至少 10 mg、至少 15 mg、至少 25 mg、至少 35 mg、至少 45 mg、至少 50 mg 或至少 75 mg 的单位剂量提供。

在特定实施方案中，施用于动物的免疫反应剂是与所述动物物种相同的物种来源或物种反应性。因此，在优选的实施方案中，将人或人源化抗体施用于人类患者从而用于治疗或预防。

根据给药途径和 HSP 制剂中 HSP 的类型，HSP 制剂中 HSP 的量可为，例如，0.1~1000 μ g/施用。gp96 或 hsp70 的优选量为 10~600 μ g/施用而如果皮内施用 HSP 制剂，则为 0.1~50 μ g，优选 10~25 μ g。对于 hsp 90，优选量为约 50~1000 μ g/施用，用于皮内施用时为约 5~50 μ g。

在其它实施方案中，热激蛋白是 hsp60、hsp70、hsp90，gp96 或钙网织蛋白。HSP 制剂的施用剂量很多程度上依赖要治疗个体的状况和尺寸以及免疫反应剂的施用量，治疗频率和给药途径。持续治疗的给药法，包括位点、剂量和频率可通过始初反应和临床诊断进行指导。

5 与本发明的具体组合物使用的具体 HSP 的优选量可进行变化。对给定组合物的具体 HSP 量的优化（如上述实例所证实的）处于本领域技术人员的认识之内。

由于施用 HSP 制剂，在个体中引发免疫反应需要较低量的免疫反应剂。与 HSP 制剂使用的免疫反应剂的量（包括次优范围内的量）可通过用本领域众所周知的方法在动物模型中进行剂量响应试验进行测定。

在优选的实施方案中，热激蛋白是 hsp70。药物组合物中 hsp70 的量优选为 10~600 μg /施用，而如果皮内施用 HSP 制剂则为 0.1~50 μg ，优选为 10~25 μg 。

15 在一特别优选的实施方案中，热激蛋白是 gp96。药物组合物中 gp96 的量优选为 10~600 μg /施用，而如果皮内施用 HSP 制剂则为 0.1~50 μg ，优选为 10~25 μg 。

在可选的实施方案中，在标示了 HSP 和免疫反应剂量和浓度的熔封容器中以液体形式提供免疫反应剂和 HSP。优选地，熔封容器中提供的免疫反应剂的液体形式为至少 1 mg/ml、更优选至少 2.5 mg/ml、至少 5 mg/ml、至少 8 mg/ml、至少 10 mg/ml、至少 15 mg/ml 或至少 25 mg/ml。优选地，熔封容器中提供的 HSP 的液体形式为至少 0.1 mg/ml、更优选至少 1.0 mg/ml、至少 5 mg/ml、至少 10 mg/ml、至少 25mg/ml、至少 50 mg/ml、至少 100 mg/ml 或至少 250 mg/ml。

25 在优选的实施方案中，组合物根据常规方法作为适于静脉施用于人类药物组合物进行配制。典型地，用于静脉施用的组合物是在无菌等渗水缓冲液中的溶液。需要时，组合物还可包括增溶剂和局部麻醉药如利多卡因以便减轻注射点处的疼痛。

通常，本发明组合物的组分可以药盒提供，所述组分可分开或混合于单位剂型中，例如作为熔封容器如安瓿或标示免疫反应剂量的小药囊中的冷冻干燥粉或无水浓缩物。当通过输注施用组合物时，其可在包含无菌药品级水或盐水的输注瓶中配制。当通过注射施用组合物

时，可提供注射用无菌水或盐水安瓿以便在施用前可以混合成分。在另一实施方案中，本发明的药盒还包括用于注射组合物的注射针或注射器，优选无菌包装的，和/或包装的酒精垫。可选地包括医师或患者施用本发明的组合物的说明书。

5 本发明的组合物可配制为中性形式或盐形式。药学上可接受的盐包括来自例如盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐，以及来自例如钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺，三乙胺，2-乙基氨基乙醇，组氨酸，普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

10 本发明的组合物在治疗、预防和改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状中的有效量可通过标准临床技术确定。配方中的精确剂量将依赖给药途径，个体年龄和疾病、病症或感染的严重程度，并应根据执业医师的判断和各患者的状况确定。可从获自体外或动物模型（例如，棉鼠或短尾猴）试验系统的剂量响应曲线中推断出有效剂量。用于评估 HSPs 和抗体或其它免疫反应剂的效应的模型和方法是
15 本领域已知的。（Wooldridge 等，1997，Blood 89（8）：2994-2998，其全文引入此处作为参考）。

对抗体而言，治疗上或预防上施用于个体的有效剂量一般为 0.1 mg/kg ~ 200 mg/kg 个体体重。优选地，对个体施用的剂量为 0.1 mg/kg ~ 20 mg/kg 个体体重而更优选的对个体施用的剂量为 1 mg/kg ~ 10 mg/kg
20 个体体重。但是，剂量将依赖分子的血清半衰期被提高的范围。通常，由于对外源多肽的免疫反应，故而人抗体在人体内的半衰期比来自其它物种的抗体的长。因此，通常可以采用较低剂量的人抗体和较低的施用频率。此外，还可通过提高免疫反应剂的摄取和组织透过（例如，进入肺）例如，通过脂化从而降低免疫反应剂的剂量和施用频率。具
25 体的抗体剂量还可参见关于所述抗体的厂商说明，或医师参考手册（56th ed.，2002）中。

采用治疗上或预防上有效量的免疫反应剂和 HSP 对个体的治疗包括单疗或，优选可包括系列治疗。在优选的实施例，用剂量为约 0.1 ~ 30 mg/kg 体重的免疫反应剂，按每周一次约 1 ~ 10 周，优选 2 ~ 8 周，
30 更优选约 3 ~ 7 周，甚至更优选约 4、5 或 6 周对个体进行治疗。免疫反应剂及其剂量，施用途径和推荐用途是本领域已知的并已经被公开于例如医师参考手册（56th ed.，2002）这样的现有技术中。在优选

的实例中，将 HSP 以约 0.1~1000 mg，更优选 1~500 mg，最优选 2~250 mg，每周一次持续约 1~10 周，优选 2~8 周，更优选约 3~7 周，和甚至更优选 4、5 或 6 周对个体进行治疗。本领域技术人员能认识到适宜的 HSP 剂量要依赖于要治疗的病症和免疫反应剂的施用，以及
5 个体。

在本发明的特定实施方案中，本发明的组合物包括 HSPs 与赋形剂的组合。优选地，热激蛋白是 hsp60、hsp70、hsp90、gp96 或钙网织蛋白，而赋形剂选自非离子型表面活性剂，聚乙烯吡咯烷酮，人血清白蛋白和多种未修饰的及衍生的环糊精。更优选地，在这些实施方案中，非离子型表面活性剂选自聚山梨酯 20、聚山梨酯-40，聚山梨酯-60 和聚山梨酯-80。聚乙烯吡咯烷酮可优选为聚乙烯吡咯烷酮 C15，
10 药物级聚乙烯吡咯烷酮。优选的环糊精是羟丙基- β -环糊精，羟丙基- γ -环糊精，和甲基- β -环糊精。优选地，环糊精是 β -环糊精。优选地，本发明的组合物包括预防上或治疗上有效量的 HSP 制剂或免疫反应剂，和药
15 学上可接受的载体。

在特定实施方案中，术语“药理学上可接受的”是指联邦或州政府的管理机构证实或美国药典或其它公知药典所列用于动物，更特别用于人类的。所述术语“载体”是指稀释剂、佐剂（例如，弗氏佐剂（完全和不完全）、赋形剂或用于施用治疗剂的载体。所述药理学载体
20 可以是无菌液体，如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的油，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。但静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。氯化钠水溶液和葡萄糖水和甘油溶液也可用作液体载体，特别用于可注射的溶液。适宜的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬
25 脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如有需要，组合物还可包含少量湿润剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物可采用溶液、悬浮液、乳状液、片剂、丸剂、胶囊、散剂、持续释放剂等形式。

如有需要，可将制剂置于可包含一种或多种包含 HSP 制剂的单位剂型的药包或分配装置中。药包可例如包括金属或塑料薄膜，如起泡
30 包装 (blister pack)。药包或分配装置可包含使用说明书。

可将本发明的组合物施用动物，优选哺乳动物和最优选人，以便

治疗、预防或改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状。在优选的实施方案中，本发明的组合物存在于身体的外面。优选地，本发明的免疫反应剂已经被确立在缺少热激蛋白时即具有某些治疗益处，以及识别与疾病、病症或感染的病因或症状相关的细胞或分子上的表位。

所述组合物包括免疫反应剂（即，包含抗原结合区和介导一种或多种抗体依赖性免疫过程的区域，例如，Fc受体-结合部位的抗原结合蛋白）和HSP。

每一本发明的组合物应包含至少一种免疫反应剂（如本文所定义的，例如，抗体）和HSP，且本发明的组合物还可与其它治疗形式联合而用于特定的疾病。免疫特异性结合一种或多种靶抗原的一种或多种免疫反应剂可作为预防剂或治疗剂而局部或全身性用于身体。

4.11 药盒

本发明还提供了用于实施本发明方法的药盒。在特定实施方案中，药盒包括第一容器，所述容器包含热激蛋白制剂，所述热激蛋白制剂的量能有效增强由对抗免疫反应剂靶点的免疫反应剂所引发的免疫反应，所述靶点需要免疫反应与其对抗；和第二容器，该容器包含免疫反应剂，所述免疫反应剂的量（在施用第一容器中的热激蛋白制剂之前、同时或之后施用）能有效诱导对抗靶点的免疫反应。

本发明提供的药盒包括在一个容器中能有效治疗或预防疾病或病症的量的免疫反应剂；和在另一容器中能有效提高或增强由免疫反应剂引发的免疫反应的热激蛋白制剂。在一个实施方案中，若不依赖于施用另一容器中的热激蛋白制剂，存在于容器中的免疫反应剂的量对于在个体内诱导免疫反应是次优的。该药盒可任选地附有说明书。

本发明还提供了一种药盒，其包括一个或多个容器，所述容器含有本发明的组合物药物的一种或多种成分。与所述药盒任选相伴随的是以管理生产商，药物制剂或生物制剂的使用或销售的政府机构所规定的形式的公告，该公告应反映出上述机构对于施用于人类的生产、使用或销售的许可。在一个实施方案中，药盒可选地进一步包括预先确定量的免疫反应剂（即，包含抗原结合区和介导一种或多种抗体依赖性免疫过程的区域，例如，Fc受体-结合部位的抗原结合蛋白）和HSP。在优选的实施方案中，药盒包括位于分离容器中的免疫反应剂

和 HSP.

5. 实施例

5.1 抗体介导的体外裂解的增强

5 从原初 (naive) 6-8 周龄小鼠的脾中获取鼠脾细胞 (效应细胞)。将这些效应细胞与适宜量的 HSP 制剂和适宜量的单克隆抗体孵育 24 至 72 小时。在孵育期末, 用 ^{51}Cr 标记靶细胞 (例如 7-OVA 或 M04)。

10 将效应细胞和标记的靶细胞以确定的效应细胞: 靶细胞比率于存在和不存在针对 SIINFEKL/MHC I 类分子 ($1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 的抗体的情况下在 4°C 孵育 30~60 分钟。将存在 HSP 和抗体时的裂解与无 HSP、无抗体或二者皆无的对照进行比较。

5.2 肿瘤攻击模型中保护作用的改善

15 C57B1/6 小鼠经皮下 (SC) 途径在肋腹接种 M04 肿瘤 (1×10^5) 或 EG7-OVA 肿瘤。在接种后 24 至 48 小时, 在有或无适宜量的 HSP 制剂的情况下经静脉内 (IP) 途径或经局部皮下途径对小鼠注射适宜量的针对 SIINFEKL/MHC I 类分子的免疫反应剂 (即, 抗体)。通过监测 30 至 60 日期间肿瘤的生长 (用测径器进行测量) 将联合治疗的抗肿瘤作用与单独抗体治疗的抗肿瘤作用进行比较。测定存活率, 并采用 Cox 回归分析评估关于时间与死亡的显著性。而且每日检测小鼠的毒性症状, 包括活动水平, 皮毛褶皱 (ruffled fur), 腹泻和一般状况。评估抗体或其它免疫反应剂效应的模型和方法是本领域已知的。
(Wooldridge 等, 1997, Blood 89 (8): 2994-2998, 其全文引入此处作为参考)。

5.3 细菌的改善的调理作用

25 通过将 HSP 制剂加入治疗性抗体治疗而产生细菌的改善的调理作用通过孵育效应细胞与 HSP 制剂以实施调理吞噬测定 (HL-60) 而在体外得以证实。评估所述细胞是否在特定抗体滴度下能更有效的调理肺炎葡萄球菌或金黄色酿脓葡萄球菌 (例如分别具有特异性针对肺炎葡萄球菌或金黄色酿脓葡萄球菌的调理活性的人血清样品)。

5.4 Fc 受体的上调

30 在存在或不存在适宜量的 HSP 制剂的情况下孵育单核细胞、自然杀伤细胞或多形核细胞。将胰蛋白酶处理的细胞与特异性针对 Fc α R、

Fc γ R1、Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的单克隆抗体于 4℃ 孵育 60 分钟。然后将细胞与抗-小鼠 IgG FITC 探针孵育，洗涤，低聚甲醛固定，然后用 FACScan 分析。监测这些细胞上 Fc 受体的上调。

此外，还监测了 HSP 制剂对巨噬细胞中 TNF- α ，IL-6 和 MIP-1- α 的上调。

本说明书中引用的所有参考文件均全文引入此处作为参考且其全部目的如同各个申请或专利或专利申请具体而各自地意在将其全文引入作为参考的全部目的一样。

在不背离本发明的精神和范围的情况下可对本发明做出多种修改和变化，这对本领域技术人员来说是显而易见的。本文所描述的具体实施方案仅以实例性方式给出，而本发明仅由所附权利要求以及所述权利要求所赋予的等效形式的全部范围限定。