

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039664.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月28日

[11] 公开号 CN 1921882A

[22] 申请日 2004.4.20

[21] 申请号 200480039664.3

[30] 优先权

[32] 2003.12.30 [33] DE [31] PCT/DE03/04299

[86] 国际申请 PCT/DE2004/000859 2004.4.20

[87] 国际公布 WO2005/063280 德 2005.7.14

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.30

[71] 申请人 莫洛根股份公司

地址 德国柏林

[72] 发明人 托米斯拉夫·多布里克

布格哈特·维蒂希

曼努埃尔·施密特

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书4页 说明书18页 附图3页

[54] 发明名称

同种异基因肿瘤治疗剂

[57] 摘要

本发明涉及一种用于治疗肿瘤疾病的基于同种异基因肿瘤细胞的疫苗，以及一种用于制备这种疫苗的方法，此外还涉及用作疫苗的转染的人肿瘤细胞。

1. 用于治疗患有肿瘤疾病的患者的疫苗，所述疫苗包括同一物种的遗传学不一致的（不同的）供体的（同种异基因）肿瘤细胞，其中所述肿瘤细胞先前已经离体转染了编码白介素-7（IL-7）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、CD40L/CD154 和 B7.1/CD80 的核酸分子。

2. 用于治疗患有肿瘤疾病的患者的疫苗，所述疫苗包括同一物种的遗传学不一致的（不同的）供体的（同种异基因）肿瘤细胞，其中所述肿瘤细胞先前已经离体转染了编码白介素-7（IL-7）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和 CD40L/CD154 的核酸分子。

3. 权利要求 1 或 2 的疫苗，其中编码核酸分子以一或多种表达构建体的形式存在。

4. 权利要求 3 的疫苗，其中表达构建体是：

a) 质粒；

b) 线性双链共价闭合表达盒，其仅由 CMV 启动子、内含子、编码基因序列和聚腺苷酸化序列构成，双链的两个末端均通过单链核苷酸残基短环而闭合。

5. 权利要求 1 到 4 中任一项的疫苗，其中所述疫苗包括附加的免疫调节寡脱氧核苷酸作为佐剂。

6. 权利要求 5 的疫苗，其中所述免疫调节寡脱氧核苷酸

a) 包括一个具有碱基序列 $N^1N^2CGN^3N^4$ 的序列，其中 N^1N^2 是选自包括 GT、GG、GA、AT 或 AA 的组的元件， N^3N^4 是选自包括 CT 或 TT 的组的元件，以及 C 是脱氧胞苷，G 是脱氧鸟苷，A 是脱氧腺苷和 T 是脱氧胸苷，

b) 以及包括具有部分互补的反向平行碱基序列的环状链脱氧核糖核酸并具有哑铃状的形状。

7. 权利要求 6 的疫苗，其中具有碱基序列 $N^1N^2CGN^3N^4$ 的序列位于寡脱氧核苷酸的单链区，并包括 40 到 200 个核苷酸。

8. 权利要求 1 到 7 中任一项的疫苗，其中所述疫苗包括一种可药用的载体。

9. 权利要求 1 或 2 的疫苗，其中同种异基因肿瘤细胞选自结直肠癌、小细胞或非小细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾细胞癌和恶性黑色素瘤。

10. 权利要求 1 到 9 中任一项的疫苗，其中肿瘤细胞来源于保藏在 DSMZ 的保藏号为 DSM ACC 2635 的肾细胞癌。

11. 制备权利要求 1 到 10 中任一项的用于治疗患有肿瘤疾病的患者的疫苗的方法，其中用编码 a) 白介素-7 (IL-7)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、CD40L/CD154 和 B7.1/CD80，或 b) 白介素-7 (IL-7)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 CD40L/CD154 的核酸分子离体转染同一物种的遗传学不一致的（不同的）供体的肿瘤细胞，随后将所述肿瘤细胞转移到合适的药物组合物中。

12. 权利要求 11 的方法，其中附加地采用免疫调节寡脱氧核苷酸作为佐剂。

13. 权利要求 12 的方法，其中免疫调节寡脱氧核苷酸包括具有部分互补的反向平行碱基序列的环状链寡脱氧核糖核酸并具有哑铃状的形状。

14. 权利要求 12 或 13 的方法，其中免疫调节寡脱氧核苷酸包括一个具有碱基序列 $N^1N^2CGN^3N^4$ 的序列，其中 N^1N^2 是选自包括 GT、GG、GA、AT 或 AA 的组的元件， N^3N^4 是选自包括 CT 或 TT 的组的元件，以及 C 是脱氧胞苷，G 是脱氧鸟苷，A 是脱氧腺苷和 T 是脱氧胸苷。

15. 权利要求 14 的方法，其中具有碱基序列 $N^1N^2CGN^3N^4$ 的序列位于寡脱氧核苷酸的单链区，并包括 40 到 200 个核苷酸。

16. 权利要求 11 的方法，其中核酸分子以一或多种表达构建体的形式存在。

17. 权利要求 11 到 16 中任一项的方法，其特征在于转染方法是弹道转移、聚阳离子转染、磷酸钙沉淀、微注射、原生质融合、脂质体融合、病毒转染系统、脂染和/或电穿孔。

18. 权利要求 11 的方法，其中同种异基因肿瘤细胞选自结肠直肠癌、小细胞或非小细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾细胞癌和恶性黑色素瘤。

19. 权利要求 12 的方法，其中肿瘤细胞来源于具有相同病症的多个患者。

20. 权利要求 11 到 19 中任一项的方法，其中使用的是保藏在 DSMZ 的保藏号为 DSM ACC 2635 的肾细胞癌细胞系的肿瘤细胞。

21. 人肿瘤细胞，其以编码 a) 白介素-7 (IL-7)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、CD40L/CD154 和 B7.1/CD80，或 b) 白介素-7 (IL-7)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 CD40L/CD154 的核酸分子离体转染，并包括相应的表达构建体。

22. 权利要求 21 的人肿瘤细胞，其中表达构建体是

a) 质粒；或

b) 线性双链共价闭合表达盒，其仅由 CMV 启动子、内含子、编码基因序列和聚腺苷酸化序列构成，双链的两个末端均通过单链核苷酸残基短环而闭合。

23. 权利要求 21 和 22 的人肿瘤细胞，其中所述肿瘤细胞是肾细胞癌细胞系的同种异基因肿瘤细胞。

24. 权利要求 23 的人肿瘤细胞，其中肿瘤细胞是保藏在 DSMZ 的保藏号为 DSM ACC 2635 的肾细胞癌细胞系。

25. 权利要求 21 到 24 中任一项的人肿瘤细胞，用于作为治疗肿瘤疾病的疫苗。

同种异基因肿瘤治疗剂

本发明涉及一种用于治疗肿瘤疾病的基于同种异基因肿瘤细胞的疫苗，以及一种制备这种疫苗的方法。此外，本发明还涉及转染的人肿瘤细胞作为疫苗的用途。

除了治疗癌性疾病的传统方法（如放疗和化疗，从 20 世纪 50 年代以来它们就构成了治疗进展性和播散性肿瘤疾病的唯一选择）之外，当面对着转移性肿瘤时，免疫治疗似乎是一种很有前途的方法。

免疫治疗的目的是通过来源于基因技术领域的修饰技术来增强对抗肿瘤疾病的天然应答，据此增加免疫系统对癌细胞的“警惕性”，并提高肌体本身对抗肿瘤的防御反应。

一些恶性疾病例如进展性肾细胞癌似乎对免疫治疗的干预是相当敏感的，但是利用细胞因子（例如 IL-2 和 IFN- α ）的全身治疗有时伴有严重的副作用。因此，已经发展出了其他的免疫治疗方案。

目前绝大多数的临床研究都依赖于取出肿瘤、随后用治疗基因在离体转染肿瘤细胞、照射肿瘤细胞群以及随后重新植入经修饰的肿瘤细胞。通过这样的肿瘤疫苗接种，可以不同程度地增加抗肿瘤效应，增加的程度依赖于所转染的治疗基因。

根据这种方法以及试验动物研究的结果，已经批准了多个 I 期和 II 期临床研究（Finke et al., 1997; Wittig et al., 2001）。

但是，这些研究的初步结果表明除了对治疗的较好的耐受性之外，仅仅在少数病例中观察到了部分或完全反应。

基因转移 CD40L/CD154 能在结肠癌小鼠模型中诱导肿瘤的根除和免疫力（Sun 等，2000）。

本发明的申请者/受让人发现，向肿瘤细胞内转移人白介素 7 (IL-7) 的表达质粒导致了肿瘤细胞对免疫系统的效应细胞的敏感性的增加，尤其是自体转移 (Finke et al., 1997, *Cancer Gene Ther.* 4: 260-268)。相似地，本发明者证实，向自体肿瘤细胞内转移进两种治疗基因 (IL-7、GM-CSF) 之后，可以在 50% 患者中观察到显著的临床反应 (WO02/060476)。

从 US 5,681,562 的阐述中已知，给患有某些癌症的患者体内注射已经以编码细胞因子的 DNA 或 RNA 转染的细胞，可刺激患者的免疫系统对抗肿瘤抗原。在专利说明书中，描述了其中用编码 IL-2 的逆转录病毒载体转染小鼠成纤维细胞的试验。也描述了一个体内试验，其中在小鼠的结肠癌模型中测试了治疗的疗效。与对照组比较，经皮下注射转染的成纤维细胞的小鼠表现出明显更慢的肿瘤生长。利用人转染成纤维细胞的体外试验显示其显著增加了 IL-2 的表达水平。除了缺乏小鼠模型以外的临床数据外，在这些试验中被采用作为表达载体的病毒载体也被认为是不利的载体。减毒疫苗株的不稳定性不能确保其不被逆转成为有毒株，以及病毒组分本身可以是免疫原性的，这将使得患者的免疫系统减弱它们的疗效。在此所列的这些缺点仅仅是病毒系统的缺点的一部分，这明显削弱了该系统作为基因治疗载体的用途。

一些文章显示用细胞因子基因联合生长因子 GM-CSF 获得了最佳的治疗效果 (Paillard, 1998, *Hum. Gene Ther.* 9: 2457-2458; Schadendorf et al., 1995, *J. Mol. Med.* 73: 473-477)。GM-CSF 在肿瘤抗原接种中的重要性也体现在其增强针对肽疫苗接种的临床及免疫学的抗肿瘤应答 (Jäger et al., 1996)。呈递抗原的树突状细胞的活化以及对效应细胞群的刺激似乎在这个方面起到了关键作用。

但是，至今还不清楚哪个细胞因子基因联合免疫原性制剂和 GM-CSF 能触发最有效的抗肿瘤应答。

在小鼠试验中，显示用编码 IL-7 的表达构建体的接种生成了抗肿瘤效应（Miller et al., 1993, Blood 18: 3686-3694; Murphy et al., 1993, J. Clin. Invest. 92: 1918-1924）。也显示细胞毒淋巴细胞（CTL）与 IL-7 或 IL-7 转染的细胞进行孵育导致了小鼠体内的肿瘤消退（Jicha et al., 1991; Hock et al., 1993），以及用 IL-7 和 B7.1/CD80 的转染导致了 CD28⁺CD25⁺ T 细胞的浸润及免疫力（Cayeux et al., 1995）。

至今还没有实现治疗的成功，甚至在小鼠模型中也没有成功。

此外，在涉及通过利用质粒 DNA 或寡核苷酸序列的基因治疗而刺激免疫应答的试验中，观察到某些包括 CpG 基序（CpG = 未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸）的核酸序列具有巨大的免疫刺激作用（Schmidt-Wolf et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 185-189）。基于这个原因，在非常早的时候，免疫刺激序列（ISS）就已经在基于 DNA 的抗感染性病原体的免疫接种方案中被用作佐剂。在小鼠试验中，证实了注射富含 CpG 的 DNA 序列导致了对 B 细胞的强烈激活并刺激了某些细胞因子（例如 IL-6 和 GM-CSF）的表达。在小鼠模型中也显示，在肿瘤接种前 3 天，用 CpG 寡脱氧核苷酸（ODN）与融合蛋白的共同免疫接种可以阻止小鼠体内的肿瘤生长（Liu et al., 1998）。在 WO 98/18810 中详细地解释了对含有免疫刺激性 CpG 的 ISS 的用途及合成的阐述。

WO 00/04918 显示了用编码例如干扰素 γ 和 GM-CSF 的基因转染肿瘤细胞。质粒可以被用作为表达载体。该申请阐述了一种用免疫治疗方法治疗肿瘤疾病的概念。没有显示相关的证明要求保护的疫苗的疗效的体内或体外数据或临床结果。需附加说明的是这些没有限定其应用的基于质粒的载体在人体基因治疗中是没有用的，因为除了治疗序列外，它们还包括其复制所必需的遗传学功能单位。它们也包括其选择所需的抗生素耐药基因。结果是非治疗所需的哺乳动物或细菌的蛋白质的持续表达。

尽管研究了多年以及有着有前途的方法，但是通过施用免疫原性物质发展出一种基于对抗肿瘤疾病的免疫功能的有效治疗仍是不可能的。

本发明的目的是提供一种用于治疗与细胞因子有关的疾病（例如癌性疾病）的药物组合物形式的疫苗，它是特异性的和有效的，并特异性地诱导了肿瘤特异性的免疫应答。此外，也将提供了一种制备这种疫苗的方法。

通过独立权利要求的要素实现该目的。

在本发明中，将采用下面的含义：

同种异基因	起源于同一物种的遗传学不一致的个体，与“自体”（来自同一个体的细胞）相反
APC	抗原呈递细胞
B7.1/CD80	分化抗原簇 80
CD40L/CD154	分化抗原簇 40 配体
DC	树突状细胞
dSLIM	<u>双茎环免疫调节寡脱氧核苷酸</u>
GM-CSF	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
IL-7	白介素-7
ISS	免疫刺激核酸序列
MIDGE	<u>最小免疫学定义的基因表达载体</u> （MIDGE [®] 是 Mologen AG 的注册商标）
ODN	寡脱氧核苷酸
TAA	肿瘤相关抗原

在下面所述的内容中，应当如下理解许多常用的术语：

转染的细胞在本发明中的含义是经本发明的编码表达载体在离体处理过的人同种异基因肿瘤细胞，因此，作为这种处理的结果，所述细胞

表达所编码的细胞因子和共刺激因子序列，并能用作肿瘤疾病的一种免疫治疗工具。

在本发明中，术语“共刺激因子”和/或细胞因子代表天然存在的共刺激因子和/或细胞因子、共刺激因子和/或细胞因子的所有修饰体、突变体和衍生物、以及用重组技术制备的含有如倒转、缺失、插入、附着等氨基酸修饰的共刺激因子和/或细胞因子，条件是它们保留了至少一部分野生型共刺激因子和/或细胞因子的基本功能。这些共刺激因子和/或细胞因子可以含有罕见的氨基酸和/或修饰例如烷基化、氧化、巯基修饰、变性和寡聚化等。在本发明中，共刺激因子和/或细胞因子可以是蛋白、肽和/或含有共刺激因子和/或细胞因子的全部或一部分，并与其他蛋白、肽或其一部分结合的融合肽。在本发明的另一个实施方式中，共刺激因子和/或细胞因子是天然存在的共刺激因子和/或细胞因子的截断形式。

上述提及的所有的适用于调节免疫系统的反应的共刺激因子都是如在本发明中所定义的免疫原性物质。因此，本发明的疫苗是一种免疫原性组合物，因为它含有免疫原性物质的组合。在很多性质上，肿瘤细胞都不同于正常细胞，如细胞表面蛋白的不同表达。特别的，肿瘤相关抗原（TAA）的表达理论上容许免疫系统识别并破坏这些细胞。但是，在许多情况中，患者的免疫系统被严重地抑制，以致其不能识别这些突变细胞。

通过提供一种用于治疗患有确定的肿瘤疾病的患者的疫苗解决了这个问题，其中该疫苗包括另一个患者的肿瘤细胞（同种异基因细胞），并且在此之前已经用编码白介素-7（IL-7）、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF 和共刺激因子 CD40L/CD154 和 B7.1/CD80 的表达构建体离体转染了这些肿瘤细胞。在本发明的另一个实施方式中，获得了一种相应的疫苗，其中在此之前用编码白介素-7（IL-7）、粒细胞巨噬细胞

集落刺激因子 GM-CSF 和共刺激因子 CD40L/CD154 的表达构建体转染了肿瘤细胞。

所采用的肿瘤细胞可以来源于具有与所治疗的患者相似的病症的患者，或来源于具有不同于所治疗的患者病症的患者。

疫苗的组分（免疫原性化合物）的组合将保证生成所有信号级联的三个步骤，它们对于诱导特异性的免疫应答是必需的。这三个步骤包括抗原呈递、共刺激以及提供合适的局部环境。

GM-CSF 和 CD40L/CD154 的表达将确保局部募集并激活抗原呈递细胞（APC）和树突状细胞（DC）。因此，观察到对 TAA 呈递的增强。

B7.1/CD80 的表达造成了共刺激活性的增加。这反过来增加了 TAA 组分的抗原性以及增加了被活化的抗 TAA 的 T 淋巴细胞的数目。IL-7 的表达另外还诱导了肿瘤特异性 T 淋巴细胞的增殖。

因此，本发明的疫苗结合肿瘤细胞表面的 TAA 诱导了高浓度的可溶性的刺激增殖的细胞因子和共刺激分子，这导致了在施用部位的肿瘤特异性 T 细胞的增殖。也诱使 APC 和 DC 迁移到施用部位。

表达构建体可以以质粒的形式存在，优选的也可以是最小化免疫学定义的基因表达构建体。有着仅仅由 CMV 启动子、内含子、编码基因序列和聚腺苷酸化序列构成的线性双链共价闭合表达盒。表达盒的两个末端均通过单链核苷酸残基短环而共价闭合。这些共价闭合的最小 DNA 构建体在下文中称为 MIDGE 载体（MIDGE：最小免疫学定义的基因表达载体）；见 EP 0 941 318 B1。MIDGE 构建体所表现出的优点是应用该构建体可以避免非治疗疗效所必需的结构，因此避免了普通基因转移载体的缺点。

通过施用免疫刺激核酸序列（ISS）形式的佐剂提供了容许诱导特异性免疫应答的局部环境。为了实现这个目的，本发明提供了含有附加

的免疫调节寡脱氧核苷酸的疫苗作为佐剂。优选地，疫苗包括免疫调节寡脱氧核苷酸，其包括：

a) 包括碱基序列 $N^1N^2CGN^3N^4$ 的序列，其中 N^1N^2 是选自包括 GT、GG、GA、AT 或 AA 的组的元件， N^3N^4 是选自包括 CT 或 TT 的组的元件，C 是脱氧胞苷，G 是脱氧鸟苷，A 是脱氧腺苷，以及 T 是脱氧胸苷，

b) 和具有部分互补的反向平行碱基序列的环状链脱氧核糖核酸，并且它具有哑铃状的形状。

ISS 的 CpG 基序（见图 2a）增加了 NK 细胞和巨噬细胞的活性并强烈刺激了 TH1 型细胞免疫应答。因此，它们可作为免疫调节剂，容许并增强了肿瘤特异性的免疫应答。在一个优选的实施方式中，使用了如在 WO 01/07055 中所述的长度为 30 个碱基对的共价闭合的 ISS。这些构建体在下面被称作为 dSLIM（双茎环免疫调节寡脱氧核苷酸）。

具有碱基序列 $N^1N^2CGN^3N^4$ 的序列位于寡脱氧核苷酸的单链区，并包括 40 到 200 个核苷酸（见图 2b）。

本发明的主题还涉及一种制备如上所述的用于治疗患有肿瘤疾病的患者的疫苗的方法，其中用编码

a) 白介素-7（IL-7）、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、CD40L/CD154 和 B7.1/CD80，或

b) 白介素-7（IL-7）、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和 CD40L/CD154

的核酸分子离体转染同一物种的遗传学不一致的供体（同种异基因）的肿瘤细胞，随后将肿瘤细胞转移到适用的药物组合物中。上面已经所述的免疫调节寡脱氧核苷酸包括具有部分互补的反向平行碱基序列的环状链脱氧核酸，并具有哑铃状的形状。作为佐剂，它们也是本发明的方法的一部分。

因此本发明提供了一种同种异基因肿瘤细胞，其含有至少 3 种（优选的 4 种）核酸分子，所述核酸分子编码共刺激因子 B7.1/CD80 和 CD40L/CD154 以及细胞因子白介素-7 和 GM-CSF。

因此，本发明的主题也是同种异基因人肿瘤细胞，其相应地被编码

a) 白介素-7 (IL-7)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、CD40L/CD154 和 B7.1/CD80，或

b) 白介素-7 (IL-7)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 CD40L/CD154

的核酸构建体进行离体转染，并且所述肿瘤细胞包括相应的表达构建体。肿瘤细胞包括质粒形式的表达构建体，或在双链的两个末端均经单链核苷酸残基短环共价闭合的仅仅由 CMV 启动子、内含子、编码基因序列和聚腺苷酸化序列构成的线性双链共价闭合表达盒形式的表达构建体。优选地，使用的是肾细胞癌细胞系的同种异基因肿瘤细胞。

对于疫苗，本发明的方法提供了作为一或多种表达构建体形式的核酸分子。因此，可以提供用于多基因表达的 DNA 表达构建体，其

- 由含有线性表达盒的双链区构成，所述线性表达盒至少包括启动子序列和编码序列，

- 且这些双链区通过 DNA 单链或非编码性 DNA 双链而连接，

- 且那些末端未与其他表达盒通过 DNA 单链或非编码性 DNA 双链相连接的表达盒被保护而免于外切核酸酶的降解。

PCT/DE03/02478 已经描述了这种用于多基因表达的 DNA 表达构建体。因此，多个作为本发明的疫苗的对象核酸可以包括在单独一种表达构建体中。

在本发明的一个特别优选的实施方式中，核酸分子是 DNA，特别是 cDNA 或基因组 DNA。显而易见，可以优选的是核酸分子为 RNA 分子。

同种异基因肿瘤细胞来源于患有结直肠癌、小细胞和非细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和肾细胞癌、以及恶性黑色素瘤的患者。

在本发明的描述过程中，具体采用了肾细胞癌细胞系，它特别适合于制备本发明的疫苗。一个优选的肾细胞癌细胞系是作为活培养物保藏于 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (德国微生物菌种保藏中心)) 的保藏号为 DSM ACC 2635 的细胞系。通过经生物的、化学的和/或物理的方法的转染方式将 DNA 表达构建体转移到该细胞系的细胞内，这导致细胞表达所需的基因。将一种佐剂 (优选的是 ISS, 最优选的是 dSLIM (见上)) 加入到转染的同种异基因细胞内。在用伽马射线放射性照射转染的同种异基因肿瘤细胞之后，将本发明的疫苗施用给患有肿瘤疾病的患者。

与自体细胞不同的是，细胞所来源的肌体并非药物组合物所治疗的肌体。一方面，使用同种异基因细胞的优点是细胞可被表征一次并可重复地增殖。另一方面，同种异基因的作用被认作为是附加的佐剂刺激。

被修饰的细胞可以来源于单个 (不同个体) 肌体或可以收集于数个具有相同病症的肌体。

因此，本发明的对象是可被表达的并编码两种细胞因子和一种或两种共刺激因子的三种或四种核酸的组合。

ISS, 优选地是 dSLIM, 可被用作为附加的免疫调节剂。

在原代人细胞系的细胞培养试验中可以验证在转染后为三重或四重阳性的细胞 (见图 1)。“三重”或“四重”在本文中意思是高百分比的被所有的三种或四种编码 GM-CSF、IL-7、CD40L/CD154 和 B7.1/CD80 的基因所成功转染的细胞以及这些细胞表达这三种或四种基因。对于在本试验中所采用的结肠癌细胞系，用 FACS (荧光激活细胞分类术) 分析确定出所有细胞中的 14.4% 是四重阳性的细胞。此外，不论基因的种类，确定出所有细胞中的 20.3% 被一种基因所成功转染，19.9% 的细胞被三种不同的基因所成功转染。确定出在用编码 CD40L/CD154、GM-

CSF、B7.1/CD80 和 IL-7 的表达构建体四重转染之后被成功转染的结肠癌细胞的百分比是 14.4%的细胞。因此，14.4%的细胞被四种不同的基因所转染并能成功地表达这些基因。总之，69.4%的所有细胞被至少一种或多种基因所转染。

利用数个基因的转染是有利的，因为通过这种方式，所表达的细胞因子和共刺激因子以紧密的空间接近性的方式被表达在免疫系统的效应器官内。这种空间接近性是重要的，因为共刺激因子只有效地增强抗原的免疫接种。

对于转染，可以采用基本已知的生物的、化学的和/或物理的方法，例如经弹道转移（ballistischem transfer）的转染（EP 0 686 697）、聚阳离子转染、磷酸钙沉淀、微注射、原生质融合、脂质体融合、病毒转染系统、脂染和/或电穿孔。在本发明的一个优选的实施方式中，用电穿孔实现转染。

另外，有利的方法是生物学转染方法，例如受体介导的基因转移。在此，在一个实例中，编码至少一种（优选的是两种）共刺激因子和两种细胞因子的 DNA 表达构建体与寡肽共价连接，寡肽优选地是猴病毒 SV-40 的核定位信号（NLS）。

通过使用其他的肽（可以是人工合成的肽）进一步地增加转染效率是有可能的。本方法特别适用于在静脉内应用之后的细胞特异性的体内基因转移。

本发明的疫苗以及根据本发明的方法从同种异基因肿瘤细胞中制备的疫苗显示出令人惊讶的作用。其可以纠正肿瘤患者的免疫系统的缺陷并且可以增强针对肿瘤特异性抗原的内在的免疫应答，两者都是在同一时间以及都是以有利的方式进行。

此外，可以采用疫苗作为用于增强和重建针对残余肿瘤细胞或消除已经去除了肿瘤的患者体内的残余肿瘤块的免疫应答的佐剂治疗。因

此，预测经外科手术去除了原发肿瘤且没有可见的转移灶的患者将从可能降低复发率的附加的肿瘤特异性治疗中获益。

本发明的其他有利的实施方式可以来源于独立的权利要求书和说明书。下面在附图和实施例中更详细地描述了本发明（包括本发明的治疗方法如疫苗用于癌症治疗剂的令人惊讶的作用）以及本发明的方法。如附图所示：

图 1：四重转染的人结肠癌细胞的 FACS 强度。通过编码 CD40L/CD154、GM-CSF、B7.1/CD80 和 IL-7 的表达载体的电穿孔实现转染。

图 2a 和 b：免疫调节剂（dSLIM）的图解描述：具有三个 CG 基序的哑铃结构，每个 CG 基序都是图解所示的发夹环结构；I 是环和 II 是茎。

为了证实基因产物，采用了与四种不同的荧光染料相连接的抗体。在图 1 中，它们被称作为：

CD80-FITC

hGMCSF-PE

IL7-PerCP

CD154-APC

荧光激活细胞分类术（FACS）在四个不同的通道中检测这些颜色，在 x 坐标系中分别被称作为 FL1-H、FL2-H、FL3-H 和 FL4-H。x 轴上的指数表示相对荧光强度。y 轴显示近似代表所检测的细胞的数目的计数。用“设门”操作进行分析，其中仅仅计数适合通过某一能量门的细胞。

在下面的表 1 中，给出了在用编码 CD40L/CD154、GM-CSF 和 IL-7 的表达构建体三重转染或用编码 CD40L/CD154、GM-CSF、B7.1/CD80

和 IL-7 的表达构建体四重转染之后被成功转染的同种异基因肾细胞癌细胞的百分比。

表 1:

编码基因	用编码 CD40L/CD154、GM-CSF 和 IL-7 的表达构建体三重转染	用编码 CD40L/CD154、GM-CSF、B7.1/CD80 和 IL-7 的表达构建体四重转染
	转染细胞的百分比 (1 个测定值)	转染细胞的百分比 (2 个测定值)
B7.1/CD80	---	66,3 - 87,6 %
CD40L/CD154	60,8 %	21,6 - 29,5 %
IL-7	21,7 ng/l x 10 ⁶ 细胞	14,9 - 38,2 ng/l x 10 ⁶ 细胞
GM-CSF	698,9 ng/l x 10 ⁶ 细胞	370,6 -1.567,2 ng/l x 10 ⁶ 细胞

通过用荧光标记的抗体染色细胞确定出共刺激因子 B7.1/CD80 和 CD40L/CD154 的转染；通过测定细胞培养物的培养基中的细胞因子的浓度确定出细胞因子 IL-7 和 GM-CSF 的转染程度。

在 7 到 10 天的间隔内，以注射周期的形式（每次都包括两次注射）将由离体转染的同种异基因细胞构成的本发明的疫苗注射到具有转移性实体肿瘤的患者体内。先前已经用编码 IL-7、GM-CSF、CD40/CD154 和/或 B7.1/CD80 的表达载体转染了细胞，以及在其后已经将其与免疫刺激序列（ISS）混和。在第 1 天，将第一次的两次注射施用到左侧和右侧上臂的外侧皮肤的经典接种部位内（皮内），在第 7 天（第 10 天）施用到左侧和右侧大腿的上方皮肤的经典接种部位（皮内）内，在第 14 天（到 20 天）施用到脐右侧和右侧约 30mm 的皮肤下（皮下），以及在第 21 天（到 30 天）再次施用到上臂，只是这次是皮下注射。

所有的患者在治疗开始时都是疾病的进展状态。为了评价临床成效，根据世界卫生组织（1979）使用下面的术语：部分应答（PR）指的是已知肿瘤灶在过去四周内缩小超过 50%，并且没有出现新的肿瘤灶。

疾病稳定（SD）指的是病变持续。混和应答（MR）指的是混和应答，例如转移灶的进展以及另一处转移灶的缩小，完全应答（CR）指的是肿瘤病灶的完全缓解。

下面将通过实施例更详细地解释本发明，本发明并非被限定于这些实施例。

接种

患有小细胞肺癌的男性患者在 7 天的间隔内接受了本发明疫苗的四次序贯接种。已经如上所述的处理同种异基因的肾细胞癌细胞系。在转染后 24 小时进行对表达的控制（control）。通过用荧光标记的抗体染色细胞以及随后用流式细胞术分析进行对共刺激因子 B7.1/CD80 和 CD40L/CD154 的表达的控制。通过用 ELISA 的方式测定相应的浓度进行对细胞因子 IL-7 和 GM-CSF 的表达的确定。

成功转染指的是：活的、阳性细胞。表 1 给出了转染数据。被 B7.1/CD80 成功转染的细胞的百分比的范围是在 66.3 和 87.6%之间。被 CD40L/CD154 成功转染的细胞的百分比的范围是在 21.6 和 29.5%之间。细胞因子 IL-7 的浓度范围是在每 1×10^6 个细胞 14.9 和 38.2ng 之间。GM-CSF 的浓度范围是在每 1×10^6 个细胞 370.6 和 1,567.2ng 之间。

对于用编码 CD40L/CD154、GM-CSF 和 IL-7 的表达构建体的三重接种的转染，被 CD40L/CD154 成功转染的细胞的百分比是 60.8%。细胞因子 IL-7 的浓度是每 1×10^6 个细胞 21.7ng。GM-CSF 的浓度是每 1×10^6 个细胞 698.9ng。

转移性肿瘤疾病的治疗

患者的选择：入选的患者都是年龄 18 到 70 岁以及 Karnofsky 指数为 70-100 的结直肠癌、小细胞和非细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和肾细胞癌、以及恶性黑色素瘤的患者。排除标准是：在不到 28 天前有过先前的细胞因子或化疗的治疗、肌酐值超过 265 微摩尔/L、胆红

素值超过 51 微摩尔/L、失代偿性心功能不全、室性心律失常、重度精神疾病、活动性 A、B 或 C 型肝炎、HIV 感染。

治疗：除了既往病史之外，在治疗前先确定出以下参数：体格检查、血液学（血红蛋白、红细胞压积、白细胞和血小板计数）、以及血液的生化分析和尿液检查。取血确定免疫状态。用 Multitest Merieux assay（Leimen，德国）进行 DHT（延迟型过敏反应）皮肤测试。进行上半身和腹部的 x 线扫描和计算机断层。患者接受四次至少 8×10^6 - 1.4×10^7 个先前经离体处理的肿瘤细胞的细胞的皮下注射。在第 14、28 和 56 天重复全面的免疫学检查、血液学检测和粗略的临床检查（体格检查、超声波检查以及如果需要，则检查下半身）。在第 84 天进行与注册之前进行的检查相当的完整的临床和免疫学检查。

最小免疫学定义的基因表达构建体（MIDGE）

采用共价闭合的最小 DNA 表达载体转染肿瘤细胞。用表达载体表达人白介素-7（IL-7）、人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和共刺激因子 B7.1/CD80 和 CD40L/CD154。在符合 B 级标准的实验室中，根据 SOP 流程以及随后的质量控制合成 MIDGE 载体。

将 IL-7（NCBI 编号 Nr.:J04156）、GM-CSF（NCBI 编号 Nr.:M11220）、B7.1/CD80（NCBI 编号 Nr.:AF177937）和 CD40L/CD154（NCBI 编号 Nr.:S49008，取自国立生物技术信息中心的数据库（www.ncbi.nlm.nih.gov））的编码序列插入到 pMOK 质粒内，并作用为合成 MIDGE 载体的起始材料。质粒 pMOK 包括来自 CMV 病毒的强立即早期启动子、内含子和 SV-40 病毒（MOLOGEN，Berlin）的聚腺苷酸化序列。

用限制性内切酶 Eco31I 在 37°C 下消化过夜以完成对编码 IL-7 的质粒 pMOK 的消化。限制性消化生成了两个 DNA 片段。一个片段是由卡那霉素耐药基因以及在细菌中繁殖质粒所必需的其他序列构成。另一个片段是由作为 MIDGE 载体的一部分的序列构成：增强的 CMV 启动

子、嵌合的内含子、IL-7 的基因序列以及来自 SV-40 的聚腺苷酸化序列。在存在 T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 Eco31I 时，在 37°C 下过夜将 5'-磷酸化的发夹寡脱氧核苷酸（TIB-MolBiol, Berlin, ODN1= 来自 WO 03/031469 A2 (Mologen 等) 的 Seq.ID 5, 无修饰碱基 X, 而 ODN2= 来自 WO 03/031469 A2 (Mologen 等) 的 Seq.ID 6) 连接成 MIDGE 的成形片段。在本文中，引用在 WO 03/031469 A2 (Mologen 等) 中所包含的描述以及在其中所包含的寡脱氧核苷酸的序列。通过加热到 70°C 终止反应。用酶 T7 DNA 聚合酶处理所形成的核酸混和物。用阴离子交换色谱法纯化 MIDGE DNA 并用异丙醇沉淀（见 EP0 941 318 B1）。

类似地进行编码 GM-CSF、B7.1/CD80 和 CD40L/CD154 的载体的合成。

合成与 NLS 连接的 MIDGE

对于 NLS-MIDGE 的合成，引用了在 WO 03/031469 A2 (Mologen 等) 中所包含的描述以及在其中所包含的寡脱氧核苷酸 (ODN) 的序列。首先将 NLS 肽（来自 WO 03/031469 A2 (Mologen 等) 的 Seq.ID 4) 与 ODN 结合。在这个反应中采用了在其发夹环上与氨基修饰的脱氧尿嘧啶 (XT) 连接的 ODN1 以及如在 WO 03/031469 A2 (Mologen 等) 中所述的未修饰的 ODN 2:

首先用硫代 KMUS (5mM) 的 PBS 溶液在室温下激活氨基修饰的寡核苷酸 ODN 1 (0.1mM)。在 120 分钟后，通过加入 50mM 三羟甲基氨基甲烷终止反应，并在乙醇沉淀 (300mM NaOAc, pH 5.2, 5.5 mM MgCl₂, 70% 乙醇)、离心和用 70%乙醇洗涤之后得到了活化的 ODN 1。然后将得到的 ODN 1 (0.1mM) 溶解在 PBS 中，并容许其与 NLS 肽 (0.2mM) 在室温下反应 1 个小时。用凝胶电泳 (3%) 和乙啶染色控制反应。用 HPLC 纯化 NLS 结合的 ODN1, 并将其与如上所述的 ODN 2 一起用于合成 MIDGE-NLS 构建体)。

双链免疫调节寡脱氧核苷酸 (d-SLIM)

双链免疫调节寡脱氧核苷酸是包括 CG 系列的分子。为了获得这些分子，用核苷酸环的方式将线性的寡脱氧核苷酸 (ODN) 共价地闭合，以保护它们避免外切核酸酶的降解。因此，得到了被称作为 dSLIM“双链茎环免疫调节剂”的哑铃状分子 (见图 2)。免疫调节活性依据于通过非甲基化的 CG 序列与 Toll 样受体的结合而非特异地激活免疫系统。dSLIM 中的每个环都含有三个非甲基化的 CG 基序。

在 B 级实验室中，根据 SOP 流程以及随后的质量控制合成了 ISS30 型的双链免疫调节剂 dSLIM。为此，用 T4 DNA 连接酶连接单链的、发夹状的 5'磷酸化的寡脱氧核苷酸 (ODN)。在用 T7 DNA 聚合酶消化起始材料以及用色谱法纯化之后，用乙醇/乙酸镁钠沉淀浓缩 ODN，并将其溶解在 PBS 中。详细的流程可取自 WO 01/07055。图 2b 显示了一种 d-SLIM 分子。

同种异基因肿瘤细胞系的表征

所采用的细胞系来源于一女性患者的原发肾细胞癌。从这些原代细胞中制备出细胞系，并将其作为活体培养物保藏于 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (德国微生物菌种保藏中心))，保藏号为 DSM ACC 2635。在筛选步骤之后，确定出作用为多种原代培养物的基本细胞库 (master cell bank) 的起始材料的细胞。细胞群必须表现出稳定的 TTA 的表达、恒定的和较好的细胞分裂率以及优选的均质生长的特征。也必须保证没有病毒或细菌的污染。

通过合乎标准的实验室测试肾细胞癌细胞系 HI 病毒、B 型和 C 型病毒阴性。也表征了 HLA 型以及 TAA 的表达和细胞因子的释放。至此，已经建立了测定 (例如) TNF- α 、IL-6、GM-CSF 和 IL-7 的不同的技术例如 ELISA。此外，建立了细胞内 FACS 检测和实时 PCR 检测。在转染之后，控制细胞表达表面抗原、信号转导分子和报告基因。用下面的特异性表面标记物的免疫学数值表征细胞系：

EpCAM: 阳性
 Her-2/neu: 阴性
 Cytokeratin 7+8: 阳性
 HLA-A1: 阳性
 HLA-A2: 阳性
 成纤维细胞: 阴性

肿瘤特异性抗原的确定:

PRAME: 阳性	SCP-1: 阳性
MAGE-4: 阴性	Fertilin-beta: 阴性
MAGE-3: 阴性	RAGE-1: 阳性
MAGE-1: 阴性	G250: 阳性

电穿孔

对于肿瘤细胞和对照细胞的核内的离体基因转移，优选的方法是电穿孔。用胰蛋白酶/EDTA 溶液将肿瘤细胞与培养瓶表面分离，并在培养基（无 FCS）或 PBS 中将其细胞浓度调整为每 600 μ l $1-1.5 \times 10^7$ 细胞。将 600 μ l 体积的细胞悬浮液与 5-10 μ g 表达载体混和，将其转移到冷冻的电穿孔管（Eurogentec）内，并在 Easyject 电穿孔设备（EquiBio）中用 300V 电压 1050 微法拉电容进行电穿孔。

然后，将细胞转移到新鲜的培养基（5-20ml）中，并在细胞孵育箱（5% CO₂、37°C、饱和湿度）中孵育 24 个小时。在此之后用四色流式细胞术测定表面分子（CD40L/CD154 和 B7.1/CD80）和细胞因子（GM-CSF 和 IL-7）。同样控制了细胞数目和活力。

在基因转移之后即刻，用 10ml 温的细胞悬浮液培养基覆盖肿瘤细胞，并通过小心移液将其转移到 15ml 离心管内。在 300xG 和 4°C 下沉淀细胞 5 分钟之后，将细胞重悬在培养基内。再次取出一部分进行无菌测定，进行细胞重建和活力的检测、FACS 分析以及进行细胞因子表达

的确定。如文献所述确定了转染效率（Foa et al., 1994, Nat. Immun. 13: 65-75）。

再次弄干转染细胞悬浮液，将其重悬在 1.5ml 冷冻培养基（80% FCS、10% DMSO、10%悬浮培养基）中，并将 8×10^6 到 1.4×10^7 个细胞保存在 2ml 的密封的冷冻管内。将冷冻管以每分钟下降 1°C 冷冻到 -80°C ，并保存在液氮中。

本发明疫苗的完成

在仔细地融化冷冻管之后，再次确定细胞计数，并取出一部分进行无菌测试。在仔细的和重复的洗涤细胞之后，将细胞沉淀重悬在 Dulbecco 磷酸缓冲液（DPBS, Camprex Kat. Nr.:17-512F）中。根据批次，加入 500 微克佐剂 dSLIM。将所完成的疫苗转移到无内毒素的反应器内。以针头向每个注射器内抽吸 750 微克疫苗。

在施用之前，用伽马射线照射注射器 5 次，相应剂量为总剂量 150 Gray。

淋巴细胞制备

利用淋巴细胞分离剂（GIBCO, Karlsruhe）和密度梯度离心从经肝素处理的外周血中制备出外周血单个核细胞（PBMC）。用 PBS 洗涤细胞两次，并在存在超过 20% FCS 时将其在液氮内冻干，用于 ELISPOT 和细胞毒检测。

统计学分析

用 Wilcoxon's 适用的配对和非配对检测分析统计学显著性。p 值小于 0.05 被认为具有显著性。

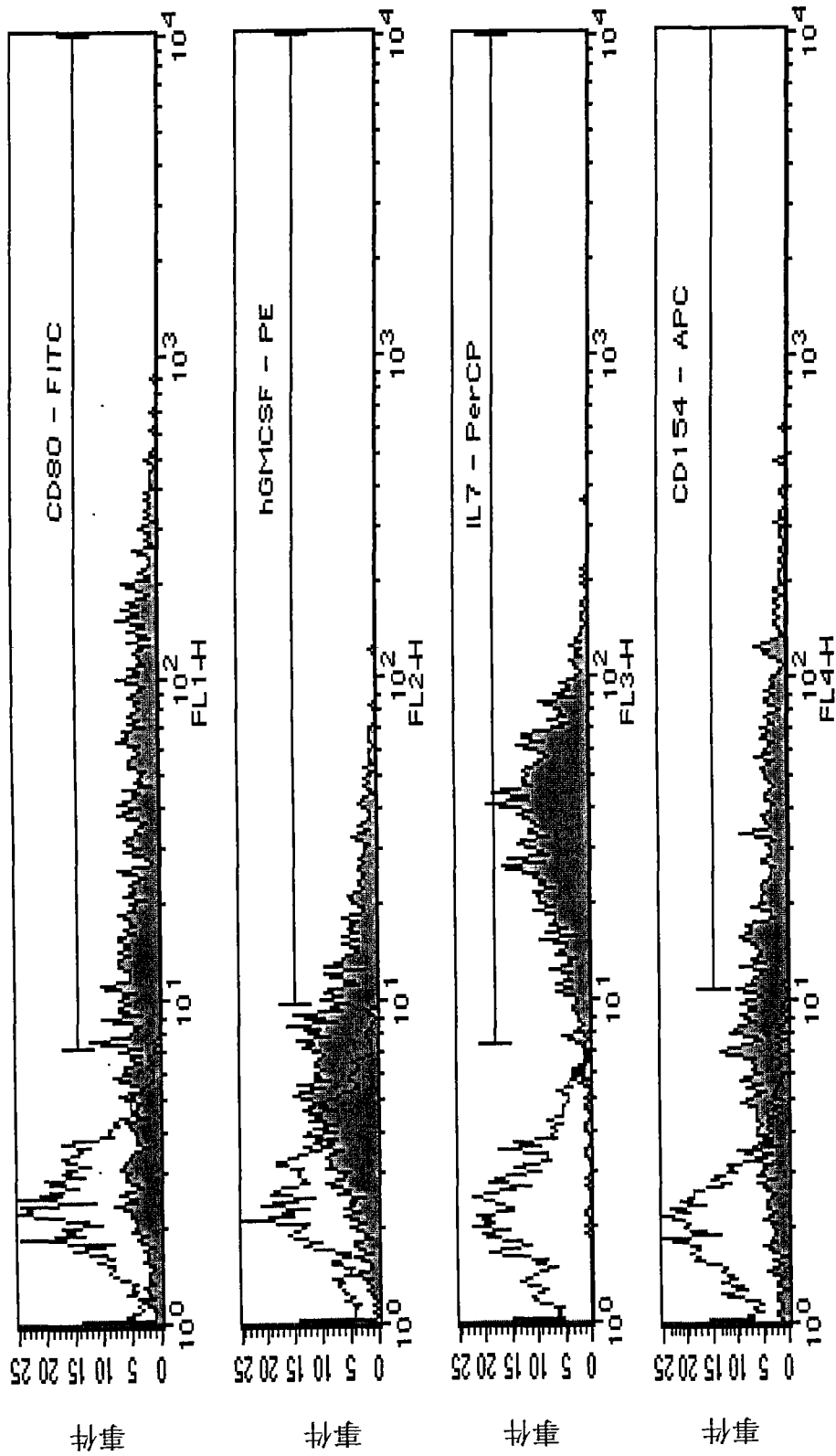


图1

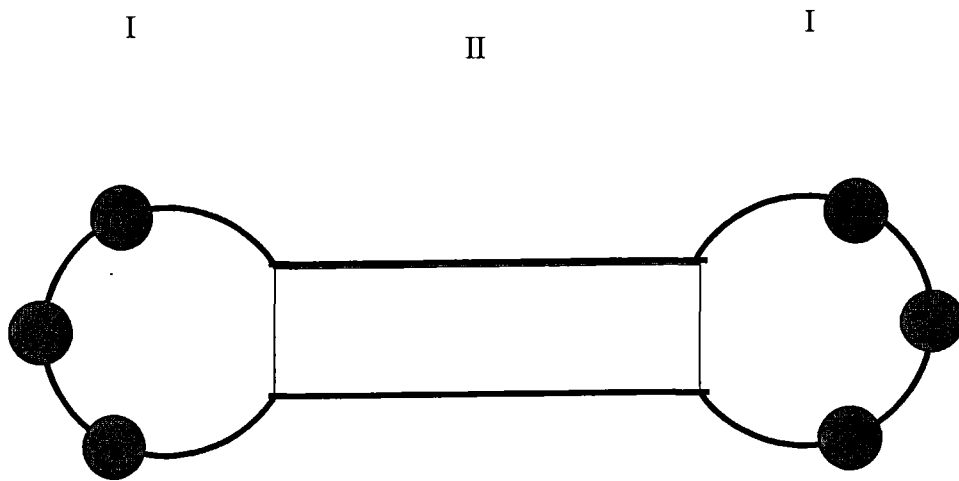


图 2a

