

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780024076.6

[43] 公开日 2009年7月8日

[11] 公开号 CN 101479375A

[22] 申请日 2007.5.3

[21] 申请号 200780024076.6

[30] 优先权

[32] 2006.5.3 [33] US [31] 60/796,867

[32] 2006.6.1 [33] US [31] 60/809,821

[32] 2006.9.5 [33] US [31] 60/842,009

[86] 国际申请 PCT/US2007/010690 2007.5.3

[87] 国际公布 WO2007/130493 英 2007.11.15

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.26

[71] 申请人 科罗拉多州立大学董事会

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 R·凯德尔 P·J·桑切斯

C·豪卢兹扎克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 罗菊华

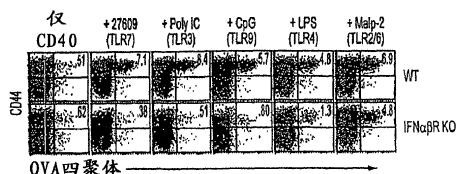
权利要求书 7 页 说明书 47 页 附图 18 页

[54] 发明名称

CD40 激动剂抗体/1 型干扰素协同佐剂组合、
包含前述的结合物及其作为增强细胞免疫的
治疗剂的用途

[57] 摘要

提供了包含协同有效量的至少一种 1 型干扰素和至少一种 CD40 激动剂的协同佐剂，其中这些部分可以在相同或单独的组合物中。此外，提供了包含 1 型干扰素/CD40 激动剂/抗原组合的融合蛋白和 DNA 结合物。还提供了这些组合物、蛋白质和 DNA 结合物作为用于治疗各种慢性疾病(如 HIV 感染)和用于增强疫苗(预防性和治疗性)的效力的免疫佐剂的用途。



1. 一种核酸构建体，其包含：

- (i) 至少一种编码 CD40 激动剂的核酸序列；
- (ii) 任选编码期望的抗原的核酸序列；和
- (iii) 编码 1 型干扰素的核酸序列；

其中所述序列 (i)、(ii) (如存在) 和 (iii) 可操作地连接至相同或不同的转录调节序列，且进一步其中所述序列 (i)、(ii) 和 (iii) 任选地通过连接体序列和/或 IRES 隔开。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其中所述多肽 1 型干扰素选自干扰素 α 、 β 、 τ 、 ε 、 ζ 和 ω 。

3. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其中所述 1 型干扰素是 α 干扰素。

4. 根据权利要求 3 所述的核酸构建体，其中所述 1 型干扰素是 β 干扰素。

5. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其中所述 CD40 激动剂是抗 CD40 抗体或激动性 CD40 抗体片段。

6. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其中所述 CD40 激动剂是 CD40L。

7. 根据权利要求 6 所述的核酸构建体，其中所述 CD40L 是人、鼠科、大鼠或灵长类 CD40L。

8. 根据权利要求 7 所述的核酸构建体，其中所述 CD40L 是人 CD40L 或可溶性人 CD40L 片段、可溶性 CD40L 低聚物或结合人 CD40 的 CD40L 变体或结合物。

9. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体，其中所述抗体是嵌合抗体。

10. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体，其中所述抗体是人源化抗体。

11. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体，其中所述抗体是人抗体。

12. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体，其中所述抗体是单链免疫

球蛋白。

13. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体, 其中所述抗体包含人重链和轻链恒定区。

14. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体, 其中所述抗体选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

15. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体, 其中所述抗体由可操作地连接至相同启动子的编码免疫球蛋白轻链的核酸序列和编码免疫球蛋白重链的核酸序列编码。

16. 根据权利要求 15 所述的核酸构建体, 其中所述免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链序列被 IRES 间插。

17. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体, 其中所述抗原序列(ii) 编码病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原。

18. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体, 其中所述抗原序列(ii) 编码人抗原。

19. 根据权利要求 18 所述的核酸构建体, 其中所述人抗原是癌症抗原、自身抗原或其表达与慢性人类疾病相关或有关的其他人抗原。

20. 根据权利要求 17 所述的核酸构建体, 其中所述病毒抗原特异于选自下列的病毒: HIV、疱疹病毒、乳头瘤病毒、依波拉病毒、小 RNA 病毒、肠道病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、禽流感病毒、狂犬病毒、VSV、登革病毒、肝炎病毒、鼻病毒、黄热病毒、布尼亚病毒、多瘤病毒、冠状病毒、风疹病毒、艾柯病毒、痘病毒、水痘带状疱疹病毒、非洲猪瘟病毒、流感病毒和副流感病毒。

21. 根据权利要求 3 所述的核酸构建体, 其中所述 α 干扰素是任选可 PEG 化的人 α 干扰素。

22. 根据权利要求 17 所述的核酸构建体, 其中所述细菌抗原来源于选自下列的细菌: 沙门氏菌属 (Salmonella)、埃希氏菌属 (Escherichia)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、弧菌属 (Vibrio)、弯曲杆菌属 (Campylobacter)、螺杆菌属 (Helicobacter)、欧文氏菌属 (Erwinia)、疏螺旋体属 (Borrelia)、

暗杆菌属 (Pelobacter)、梭菌属 (Clostridium)、沙雷氏菌属 (Serratia)、黄单胞菌属 (Xanthomonas)、耶尔森氏菌属 (Yersinia)、伯克霍尔德氏菌属 (Burkholdia)、利斯特氏菌属 (Listeria)、志贺氏菌属 (Shigella)、巴斯德氏菌属 (Pasteurella)、肠杆菌属 (Enterobacter)、棒状杆菌属 (Corynebacterium) 和链球菌属 (Streptococcus)。

23. 根据权利要求 17 所述的核酸构建体, 其中所述寄生虫抗原来源于选自下列的寄生虫: 巴贝虫属 (Babesia)、阿米巴属 (Entamoeba)、利什曼原虫属 (Leishmania)、疟原虫属 (Plasmodium)、锥虫属 (Trypanosoma)、弓形虫属 (Toxoplasma)、贾第虫属 (Giardia)、扁虫和蛔虫。

24. 根据权利要求 17 所述的核酸构建体, 其中所述真菌抗原来源于选自下列的真菌: 曲霉菌属 (Aspergillus)、球孢子菌属 (Coccidioides)、隐球菌属 (Cryptococcus)、念珠菌属 (Candida)、诺卡氏菌属 (Nocardia)、肺孢子虫属 (Pneumocystis) 和衣原体属 (Chlamydia)。

25. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体, 其中所述抗原是肿瘤抗原。

26. 根据权利要求 25 所述的核酸构建体, 其中所述肿瘤抗原是肺肿瘤抗原。

27. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体, 其中所述抗原是由选自下列的人类癌症表达的癌症抗原: 前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肺癌 (小细胞或大细胞)、骨癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、睾丸癌、皮肤癌、淋巴瘤、白血病、结肠癌、甲状腺癌、宫颈癌、头颈癌、肉瘤、神经胶质癌和胆囊癌。

28. 根据权利要求 1 所述的核酸构建体, 其中所述抗原是自身抗原, 所述自身抗原的表达与自身免疫疾病相关。

29. 一种表达载体, 其包含根据权利要求 1 所述的核酸构建体。

30. 根据权利要求 29 所述的表达载体, 其选自质粒、重组病毒和

附加型载体。

31. 一种重组宿主细胞或非人动物，其表达根据权利要求 1 所述的核酸构建体。

32. 根据权利要求 31 所述的重组宿主细胞，其选自细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、禽细胞和两栖动物细胞。

33. 根据权利要求 31 所述的重组宿主细胞，其是人细胞。

34. 一种蛋白质结合物，其由于根据权利要求 1-30 中任一项所述的核酸构建体或载体的表达而产生。

35. 根据权利要求 34 所述的蛋白质结合物，其包含抗 CD40 抗体、人 α 干扰素和抗原，所述抗原的表达与疾病病症相关。

36. 根据权利要求 35 所述的蛋白质结合物，其中所述疾病选自癌症、过敏症、自身免疫疾病、感染性疾病和炎性病症。

37. 根据权利要求 36 所述的蛋白质结合物，其包含 HIV 抗原。

38. 根据权利要求 37 所述的蛋白质结合物，其中所述 HIV 抗原是 Gag。

39. 一种诱发增强的细胞免疫反应的方法，所述方法通过施用根据权利要求 1-28 中任一项所述的核酸构建体或包含所述核酸构建体的载体或宿主细胞实现。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述施用导致下列的至少一种：

(i) 相对于施用仅编码 CD40 激动剂或 1 型干扰素的 DNA，增强的初级和记忆性 CD8⁺ T 细胞反应；

(ii) 诱导抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的指数扩增；

(iii) 在 CD4 缺陷型宿主中产生与正常(非 CD4 缺陷型)宿主相当的保护性免疫反应；和

(iv) 诱导 CD70 在树突状细胞上的表达。

41. 根据权利要求 39 所述的方法，其中增强的细胞免疫反应特异针对选自病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、自身抗原、变应原和癌症抗原的抗原。

42. 根据权利要求 41 所述的方法, 其中所述抗原是 HIV 抗原。

43. 根据权利要求 42 所述的方法, 其中所述 HIV 抗原是 gag 或 env。

44. 根据权利要求 41 所述的方法, 其中所述抗原是人肿瘤表达的抗原。

45. 一种在有相应需要的受试者中诱发增强的 CD8+ T 细胞免疫反应的方法, 所述方法包括施用协同有效量的 (i) 至少一种 CD40 激动剂、(ii) 至少一种 1 型干扰素和任选 (iii) 至少一种其表达与特定疾病相关的抗原, 或包含这些部分的多肽结合物, 其中这些部分包含在相同或单独的药学上可接受的组合物中。

46. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述 CD40 激动剂、1 型干扰素和如果存在的抗原包含在相同的组合物中。

47. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述 CD40 激动剂和 1 型干扰素包含在单独的组合物中。

48. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述 CD40 激动剂是抗 CD40 抗体。

49. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述 CD40 激动剂是 CD40L 多肽。

50. 根据权利要求 49 所述的方法, 其中所述 CD40L 多肽包括可溶性 CD40L 多肽、其片段或低聚化 CD40L 多肽或包含前述任一项的结合物。

51. 根据权利要求 50 所述的方法, 其中所述 CD40L 包括人 CD40L 或可溶性片段、低聚物或与人 CD40 结合的包含前述的结合物。

52. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述 1 型干扰素选自 α 、 β 、 α/β 、 ϵ 、 τ 、 ω 或 ζ 干扰素或其变体或片段或 PEG 化形式。

53. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述疾病选自癌症、过敏症、炎性疾病、感染性疾病和自身免疫疾病。

54. 根据权利要求 53 所述的方法, 其中所述感染性疾病由病毒、细菌、真菌或寄生虫引起。

55. 根据权利要求 54 所述的方法, 其中所述病毒是 HIV。

56. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述施用导致下列的至少一种:

(i) 相对于仅施用 CD40 激动剂或 1 型干扰素, 诱发实质上增强的初级和记忆性 CD8+ T 细胞反应;

(ii) 诱导抗原特异性 CD8+ T 细胞的指数扩增; 和

(iii) 在 CD4 缺陷型宿主中产生与正常(非 CD4 缺陷型)宿主相当的保护性免疫反应; 和

(iv) 诱导 CD70 在树突状细胞上的表达。

57. 根据权利要求 56 所述的方法, 其用于治疗病毒感染或癌症。

58. 根据权利要求 39 所述的方法, 其中通过粘膜、局部、口服、静脉内、肌内、鼻内、阴道、直肠、瘤内、鞘内或眼内施用所述核酸构建体。

59. 根据权利要求 42 所述的方法, 其中通过粘膜、局部、口服、静脉内、肌内、鼻内、阴道、直肠、瘤内、鞘内或眼内施用所述多肽结合物。

60. 一种适于用于人治疗中诱发增强的 CD8+ T 细胞免疫反应的组合物, 其包含协同有效量的 (i) 至少一种 CD40 激动剂、(ii) 至少一种 1 型干扰素和 (iii) 任选至少一种抗原。

61. 根据权利要求 60 所述的组合物, 其中所述 CD40 激动剂是激动性抗 CD40 抗体或激动性抗 CD40 抗体片段。

62. 根据权利要求 61 所述的组合物, 其中所述激动性抗 CD40 抗体是人、嵌合、人源化或单链抗体。

63. 根据权利要求 61 所述的组合物, 其中所述激动性抗 CD40 抗体是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

64. 根据权利要求 60 所述的组合物, 其中所述 CD40 激动剂是 CD40L 多肽。

65. 根据权利要求 64 所述的组合物, 其中所述 CD40L 多肽是可溶性人 CD40L 片段、其低聚物或包含前述的结合物。

66. 根据权利要求 60 所述的组合物, 其包含人肿瘤抗原或自身抗

原。

67. 根据权利要求 60 所述的组合物，其包含细菌、病毒或真菌抗原。

68. 根据权利要求 60 所述的组合物，其中所述 1 型干扰素是人 α 或 β 干扰素。

69. 根据权利要求 68 所述的组合物，其中所述干扰素是共有 α 干扰素或 PEG 化的 α 或 β 干扰素。

70. 根据权利要求 60 所述的组合物，其包含变应原。

71. 一种增强疫苗组合物的效力的方法，其包括与至少一种 CD40 激动剂和至少一种 1 型干扰素结合添加或施用所述疫苗。

72. 根据权利要求 71 所述的方法，其中所述 CD40 激动剂是 CD40 激动性抗体或其片段。

73. 根据权利要求 71 所述的方法，其中所述 1 型干扰素是人 α 干扰素或人 β 干扰素。

74. 根据权利要求 71 所述的方法，其中所述添加或组合的施用诱导增强的特异针对包含在所述疫苗中的抗原的 CD8⁺ T 细胞免疫。

75. 根据权利要求 74 所述的方法，所述方法诱导 CD70 在树突状细胞上的表达。

76. 一种减轻 CD40 激动剂的毒性的方法，所述方法通过施用与一定量的 1 型干扰素或 TLR 激动剂结合的所述激动剂实现，所述量足以相对于当在缺少所述 1 型干扰素或 TLR 激动剂下施用 CD40 激动剂时减少或消除肝毒性。

77. 根据权利要求 76 所述的方法，其中所述 CD40 激动剂是 CD40 激动性抗体或片段或 CD40L 多肽。

78. 根据权利要求 76 所述的方法，其中减少的肝毒性基于肝转氨酶水平测定。

79. 根据权利要求 76 所述的方法，所述方法提供了所述 CD40 激动剂的最大耐受剂量 (MTD)，其比在缺少所述 1 型干扰素或 TLR 激动剂下导致肝转氨酶水平的相同增加的 MTD 高约 1.5-10 倍。

CD40 激动剂抗体/1 型干扰素协同佐剂组合、包含前述的结合物及其作为增强细胞免疫的治疗剂的用途

相关申请

本申请涉及于 2006 年 5 月 3 日提交的序列号 60/796,867、于 2006 年 6 月 1 日提交的序列号 60/809,821 和于 2006 年 9 月 5 日提交的序列号 60/842,009 美国临时申请,所有这些申请以其全部内容通过引用并入本文。同时,本申请涉及于 2006 年 3 月 1 日提交的美国临时申请 60/777,569,该申请也通过引用并入本文。

发明领域

[0001]本发明主要涉及协同佐剂 (synergistic adjuvant) 组合,所述组合可用于增强有相应需要的受试者的免疫。更具体地,本发明涉及特定的协同佐剂组合,其包含 (i) 1 型干扰素和 (ii) CD40 激动剂,例如激动性抗 CD40 抗体或 CD40L 多肽或 CD40L 片段或包含 CD40L 的结合物,且任选进一步包括 (iii) 靶抗原。

[0002]此外,本发明涉及包含或编码所述协同佐剂组合的新型蛋白或 DNA 结合物,例如包含或编码 (i) CD40 激动性抗体或可溶性 CD40L 蛋白或 CD40L 片段或 CD40L 结合物和 (ii) 1 型干扰素以及任选 (iii) 期望的抗原的蛋白和 DNA 结合物。

[0003]本发明又进一步提供了新型免疫疗法,其包括施用这种协同佐剂组合或 DNA 或蛋白质结合物来增强抗原特异性细胞免疫,例如 CD8⁺免疫。特别地,还阐述了包含这些新型佐剂组合和/或多肽结合物和 DNA 结合物的组合物用于治疗各种慢性疾病(包括癌症,例如表达 CD40 抗原的肿瘤)和用于治疗感染性疾病(如 HIV 感染)、自身免疫性疾病、过敏性和炎性疾病以及用于增强疫苗的效力的用途。

[0004]本发明还提供了用于减轻 CD40 激动剂(如 CD40L 多肽和结

合物或激动性 CD40 抗体)的毒性的新型方法,所述方法通过共施用这种 CD40 激动剂和一定量的 1 型干扰素,所述量足以减轻或预防毒性,如肝毒性,否则该毒性将会由仅施用 CD40 激动剂而导致。这促进 CD40 激动剂在治疗剂量下的施用,否则该治疗剂量会基于毒性而被排除。

发明背景

[0005] 抗微生物的机体防御系统和对抗其他慢性疾病(如影响细胞增殖的那些疾病)的机体防御通过先天性免疫系统的早期反应以及通过适应性免疫系统的晚期反应来介导。先天性免疫包括识别例如具有微生物病原体的特征和在哺乳动物细胞上不存在的结构的机制。这种结构的例子包括细菌脂多糖(LPS)、病毒双链 DNA 以及未甲基化的 CpG DNA 核苷酸。先天性免疫反应系统的效应细胞包括嗜中性粒细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)。除先天性免疫之外,脊椎动物(包括哺乳动物)已经发展免疫防御系统,所述免疫防御系统通过接触感染性因子(infectious agent)而被刺激,并随着每次连续接触特定抗原而使量级(magnitude)和有效性增加。由于其适应特异性感染或抗原损伤的能力,这种免疫防御机制被描述为适应性免疫。有两种类型的适应性免疫反应 - 称为体液免疫(包括由 B 淋巴细胞产生的抗体)和细胞介导的免疫(由 T 淋巴细胞介导)。

[0006] 已经描述主要 T 淋巴细胞的两种类型, CD8+ 细胞毒性淋巴细胞(CTL)和 CD4 辅助细胞(Th 细胞)。CD8+ T 细胞是效应细胞,它经由 T 细胞受体(TCR)识别通过在例如受病毒或细菌感染的细胞上的 I 类 MHC 分子呈递的外源抗原。识别外源抗原后, CD8+ 细胞经受活化、成熟和增殖的过程。这种分化过程导致 CTL 克隆,所述克隆具有破坏显示外源抗原的靶细胞的能力。另一方面, T 辅助细胞与体液和细胞介导的效应子免疫反应形式有关。就体液或抗体免疫反应而言,通过与 Th 细胞的相互作用由 B 淋巴细胞产生抗体。特别地,细胞外抗原(如循环微生物)由专门的抗原呈递细胞(APC)接纳,并进行处理,然后与 II 类主要组织相容性复合物(MHC)分子结合呈递给 CD4+Th 细胞。这些

Th 细胞转而活化 B 淋巴细胞，导致抗体产生。相比之下，细胞介导的或细胞的免疫反应用于中和例如在成功感染靶细胞后居住于细胞内位置的微生物。外源抗原如微生物抗原在受感染的细胞内合成，并在这些与 I 类 MHC 分子相关的细胞的表面上呈递 (resented)。这些表位的呈递导致上述 CD8+CTL 的刺激 - 该过程转而也受 CD4+ Th 细胞刺激。Th 细胞由至少两种不同的亚群组成，称为 Th1 和 Th2 细胞。所述 Th1 和 Th2 亚型表示 Th 细胞的极化群，其在接触抗原后从共同的前体分化。

[0007] 每种 T 辅助细胞亚型分泌促进不同的免疫效应的细胞因子，所述免疫效应彼此相反并且交叉调节相互的扩增和功能。Th1 细胞分泌大量的细胞因子 (如干扰素 (IFN) γ 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2) 和 IL-12) 和少量的 IL-4。Th1 相关细胞因子促进 CD8+细胞毒性 T 淋巴细胞 T 淋巴细胞 (CTL) 活性，并且最通常与抗细胞内病原体的细胞介导的免疫反应相关。相比之下，Th2 细胞分泌大量的细胞因子 (如 IL-4、IL-13 和 IL-10)，但是少量的 IFN- γ ，并且促进抗体反应。Th2 反应与体液反应 (如抵抗炭疽的保护) 以及与蠕虫感染的消除特别相关。

[0008] 产生的免疫反应是 Th1 还是 Th2 驱动的，这主要取决于涉及的病原体以及取决于细胞环境的因素，如细胞因子。活化 T 辅助反应或正确的 T 辅助亚组的失败可以不仅导致无能力建立足以抗争特定病原体的反应，而且导致产生抗再感染的弱免疫。很多感染性因子是细胞内病原体，期望在所述病原体中细胞介导的反应 (如通过 Th1 免疫示例) 在保护和/或疗法中起重要的作用。而且，对于很多这些感染，已显示诱导不适当的 Th2 反应将消极影响疾病结果。例子包括结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、曼氏血吸虫 (*S. mansoni*) 和事与愿违的 Th2 样为主 (dominated) 的免疫反应。瘤型麻风似乎也具有普遍但不适当的 Th2 样反应的特征。HIV 感染代表另一个例子。在那点上，已认为 Th1 样细胞与其他 Th 细胞群体的比率的下降可在疾病症状的进展中起关键作用。

[0009] 已经开发作为抗感染性因子的保护手段、用于保护以抗某

些微生物的接种方案 (Vaccination protocols)。抗传染性病原体的接种方案经常受阻于弱疫苗免疫原性、不适当类型的反应 (抗体对细胞介导的免疫)、缺少诱发长期免疫记忆的能力和/或未能产生抗不同血清型的给定病原体的免疫。目前接种策略靶向对给定血清型和对很多普通的病原体 (例如病毒血清型或病原体) 有特异性的抗体的诱发。必须在复发的基础上作出努力以监控哪种血清型在全世界范围内普遍。这样的例子是每年监控被预测为主要传染性菌株的流感 A 血清型的出现。

[0010] 为支持接种方案, 已经进一步开发支持抗特异性感染性疾病的免疫反应的产生的佐剂。例如, 铝盐已用作相对安全且有效的疫苗佐剂来增强对某些病原体的抗体反应。这种佐剂的缺点之一是它们对刺激细胞介导的免疫反应相对无效以及产生主要偏于 Th2 的免疫反应。

[0011] 目前普遍公认保护性免疫的产生不仅取决于与抗原的接触, 而且取决于对抗所述抗原的背景情况。存在很多例子, 其中在非炎性情况下将新型抗原引入至宿主产生免疫耐受性, 而非长期免疫, 然而在炎性剂 (佐剂) 的存在下与抗原的接触诱导了免疫。(Mondino 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 93: 2245 (1996); Pulendran 等, *J. Exp. Med.* 188: 2075 (1998); Jenkins 等, *Immunity* 1: 443 (1994) 和 Kearney 等, *Immunity* 1: 327 (1994))。

[0012] 众所周知调节适应性免疫的天然存在的分子是 CD40。CD40 是 TNF 受体超家族的成员, 它对细胞介导的免疫反应的谱系 (spectrum) 是必要的并且对 T 细胞依赖性体液免疫的发展是必需的 (Aruffo 等, *Cell* 72: 291 (1993); Farrington 等, *Proc Natl Acad Sci.*, USA 91: 1099 (1994); Renshaw 等, *J Exp Med* 180: 1889 (1994))。在它的固有作用中, 在 CD4+ T 细胞上表达的 CD40 配体与在 DC 或 B 细胞上表达的 CD40 相互作用, 促进 APC 活化的增加以及同时进一步活化 T 细胞 (Liu 等, *Semin Immunol* 9: 235 (1994); Bishop 等, *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 297 (2003))。对于 DC, CD40 连接 (ligation) 经典地

导致与通过 TLR 的刺激类似的反应(如上调活化标记物以及产生炎症细胞因子) (Quezada 等, *Annu Rev Immunol* 22:307(2004); O'Sullivan B 和 Thomas R *Crit Rev Immunol* 22:83 (2003))。它在 CD8 反应中的重要性通过研究来证实,所述研究显示 APC 通过 CD40 的刺激在缺少 CD4 细胞的情况下拯救了 CD4 依赖性 CD8+ T 细胞反应 (Lefrancois 等, *J Immunol.* 164:725 (2000); Bennett 等, *Nature* 393:478 (1998); Ridge 等, *Nature* 393:474 (1998); Schoenberger 等, *Nature* 393:474 (1998))。这种发现引起很多推测,即单独的 CD40 激动剂在一些疾病环境中可能潜在地拯救未完成的 CD8+ T 细胞反应。

[0013]然而,其他研究已证明单独的 CD40 刺激不足以促进长期免疫。在一些模型系统中,单独的抗 CD40 治疗不足以促进长期免疫。特别地,单独的抗 CD40 治疗可导致无效的炎性细胞因子产生及抗原特异性 T 细胞的缺失 (Mauri 等, *Nat Med* 6:673 (2001); Kedl 等, *Proc Natl Acad Sci, USA* 98:10811 (2001)) 以及 B 细胞反应的终止 (Erickson 等, *J Clin Invest* 109:613(2002))。同时,可溶性三聚化的 CD40 配体已作为 CD40 途径的激动剂用于临床,而对此极少报道,与下列结论一致:单独的 CD40 刺激未能重建用于长期 CD8+ T 细胞免疫的所有必要的信号 (Vonderheide 等, *J Clin Oncol* 19:3280 (2001))。

[0014]已有不同研究组报道各种激动性抗体。例如,已报道一种 mAb CD40.4(5c3) (PharMingen, San Diego California)使 CD40 与 CD40L 之间的活化增加约 30-40%。(Schlossman 等, *Leukocyte Typing*, 1995, 1:547-556)。同时,在美国专利号 6,843,989 中 Seattle Genetics 宣称提供了使用激动性抗人 CD40 抗体治疗人类的癌的方法。声称他们的抗体传递刺激信号且具有体内肿瘤活性,所述刺激信号使 CD40 与 CD40L 的相互作用增强了至少 45%并且增强了 CD40L 介导的刺激。他们从 S2C6 - 即一种先前显示传递有力的促进生长信号至 B 淋巴细胞的激动性抗人 CD40 抗体取得这种抗体 (Paulie 等, 1989, *J. Immunol.* 142:590-595)。

[0015]由于 CD40 在先天性和适应性免疫反应中的作用,所以已经

探究包括不同 CD40 激动性抗体的 CD40 激动剂作为疫苗佐剂和用于其中期望增强细胞免疫的治疗的用途。最近，由本发明人和别人证实与一些 TLR 激动剂组合的抗原和抗 CD40 治疗的免疫(组合的 TLR/CD40 激动剂免疫)诱导有效的 CD8+ T 细胞扩增，诱发比仅用任一激动剂的免疫高 10-20 倍的反应(Ahonen 等, *J Exp Med* 199:775 (2004))。这第一次证实有效的 CD8+ T 细胞反应可在缺少病毒或微生物剂感染下产生。由组合的 TLR/CD40 激动剂免疫诱发的抗原特异性 CD8+ T 细胞证实了溶解功能、 γ 干扰素产生以及对抗原激发的次级反应增加。在 TLR1/6、2/6、3、4、5、7 和 9 的激动剂下，已显示导致 CD8+ T 细胞扩增的诱导的与抗 CD40 的协同活性。

[0016]如在接种方案中或微生物感染期间，为增加适应性免疫反应的有效性，因此开发新型的更有效的疫苗佐剂是重要的。本发明满足这种需要，并也提供其他优点。

[0017]同时，开发有效的免疫佐剂是重要的，所述佐剂在不诱发副作用如肝毒性的剂量时有效。特别地，已经由 Vanderheide 等, *J Clin. Oncol.* 25(7):876-8833(2007 年 3 月)报道，0.3 mg/kg 是用于示例性的激动性抗体的最大耐受剂量，并且更高的剂量可诱发副作用，包括：静脉血栓栓塞、3 级头痛、导致毒性效应(如寒战等)的细胞因子释放以及短暂的肝毒性。同时，由 Vanderheide 等, *J Clin. Oncol.* 19(23):4351-3 (2001)报道，该文中描述的 hCD40L 多肽的最大耐受剂量是 0.1 mg/kg/日，并且当所述多肽以 0.15 mg/kg/日的更高剂量施用，他们观察到具有以下特征的肝毒性：在治疗的受试者中升高的肝转氨酶水平为 3 级或 4 级。

发明概述

[0018]在一个实施方案中，本发明包括以下发现：组合的某些成分上调树突状细胞上的 CD70 并且诱发免疫上的协同效应，例如它们促进 Th1 细胞免疫和 CD8 T 细胞免疫反应。具体来说，本发明包括以下发现：当以相同或单独的组合物组合施用以及进一步任选与期望的抗

原组合施用, 1型干扰素和CD40激动剂(如激动性CD40抗体或CD40L多肽或CD40L结合物)通过诱导CD70在CD8+树突状细胞上的表达而诱发免疫上的协同效应, 而且诱发CD8+ T细胞的有效扩增和增加的Th1免疫。

[0019]基于此发现, 本发明提供了可以作为增强免疫的手段施用给有相应需要的受试者的新型佐剂组合。并且, 这种佐剂组合可添加至疫苗或与其结合施用以便增强它的效力。

[0020]与所述发现相关, 本发明还提供了编码(i) 1型干扰素和(ii) CD40激动剂的核酸构建体, 所述构建体可任选进一步包括(iii) 编码期望的抗原的核酸序列, 当施用给有相应需要的宿主时, 任选与抗原结合的所述核酸构建体诱发免疫上的协同效应。这种CD40激动剂包括例如, CD40激动性抗体和CD40激动性抗体片段、以及可溶性CD40L和CD40L片段及其结合物与衍生物, 如低聚化的CD40L多肽, 例如三聚化的CD40L多肽和包含前述的结合物。

[0021]本发明还提供了多肽结合物, 其包含(i) 至少一种1型干扰素; (ii) 至少一种CD40激动剂, 如CD40激动性抗体或CD40L多肽或CD40L片段或其结合物或衍生物, 如低聚化的CD40L或包含前述的结合物; 以及任选(iii) 抗原, 其中这些成分可以以任何顺序直接或间接连接, 并且在对有相应需要的受试者施用时诱发免疫上的协同效应。

[0022]更特别地, 本发明提供了核酸构建体, 其包含(i) 编码激动性抗人CD40抗体、或人CD40L多肽或片段、其结合物或衍生物的一种或多种基因和(ii) 编码人1型干扰素(例如人 α 或人 β 干扰素)的基因以及任选(iii) 编码抗原的基因, 其中针对所述抗原期望诱发增强的细胞免疫反应。

[0023]还更特别地, 本发明提供了新型多肽构建体, 其包含(i) 激动(agonize)人CD40/CD40L的至少一种激动性抗人CD40抗体或人CD40L多肽或其片段、人 α 或 β 干扰素、以及任选至少一种抗原, 其中针对所述抗原期望诱发增强的细胞免疫反应。

[0024]又进一步，本发明提供了佐剂多肽组合物，其包含协同有效量的(i) 1型干扰素，优选 α 或 β 干扰素；(ii) CD40激动剂，优选激动性CD40抗体或单体或低聚化的可溶性CD40 L多肽或片段或其结合物；以及任选(iii) 一种或多种抗原。

[0025]本发明还涉及以下发现：如果CD40激动剂与1型干扰素或TLR激动剂结合施用，那么可以潜在地减轻CD40激动剂的毒性。因此，由于CD40激动剂可以以比迄今描述的更高的剂量施用，本发明提供了更有效的CD40激动剂疗法。例如，如果与1型干扰素或TLR激动剂共施用，CD40L多肽的MTD(最大耐受剂量)可超过0.1 mg/kg/日至少1.5倍、更优选至少2-5倍或甚至10倍或更多，因此允许CD40L多肽以至至少约.15 mg/kg/日至1.0 mg/kg/日的范围或更高的MTD量施用。这将导致更有效的CD40L疗法，如导致CD40相关的恶性肿瘤的治疗和本文公开的其他治疗。此外，本发明减少CD40激动剂抗体疗法的毒性并且促进比迄今提出的更高的CD40激动剂抗体剂量的施用。具体来说，如上所述，已报道由Vonderheide等，*J Clin. Immunol.* 25(7):876-883(2007)报道的激动性CD40L抗体的MTD为0.3 mg/kg，并且过量剂量导致短暂的肝毒性、静脉血栓栓塞、3级头痛以及细胞因子释放和相关的毒性和不良副作用(如发烧和寒战等)。与1型干扰素或TLR激动剂结合的CD40激动剂抗体的共施用潜在地允许MTD抗体量大体上增加例如1.5-15倍或甚至5-10倍，而没有副作用。因此，用于CD40激动性抗体的MTD量可增加至约.45 mg/kg至约3.0 mg/kg或甚至更高。因此本发明包括CD40激动剂与一定量的1型干扰素或TLR激动剂的共施用，所述量足以减少在特定的CD40激动剂剂量下另外潜在地产生的毒性作用，如肝毒性。

[0026]此外，本发明提供了新型疗法，其包括施用包含任何前述的蛋白质或DNA结合物或协同佐剂蛋白的组合物。这些疗法包括其作为免疫激动剂(佐剂)以协同增强疫苗的效力的用途以及用于治疗其中期望增强的免疫的病症(如癌症、感染性病症、自身免疫病症、过敏症、炎性病症)和基因疗法的用途。

[0027]如上所述和如下所示,令人惊奇地发现,上述的新型佐剂组合或蛋白质或编码的DNA结合物相对于仅施用CD40激动剂或1型干扰素诱发免疫上的协同效应和/或潜在地减少或预防不良副作用如肝毒性。这种减少的毒性可以例如基于免疫刺激物的组合对肝转氨酶水平的影响来确定。明显地获得这种协同作用,是因为本发明的佐剂组合令人惊奇地诱导(上调)CD70在体内CD8+树突状细胞上的表达从而诱导体内CD8+T细胞有效的扩增。

[0028]至少基于这些令人惊奇的对树突状细胞以及对CD8+T细胞免疫和Th1免疫的协同效应,包含这些佐剂组合、核酸构建体或多肽结合物的组合物可作为一种产生以下效应的手段施用给有相应需要的宿主:

(i) 相对于仅用任一激动剂的免疫,产生增强的(以指数方式更好)初级和记忆性CD8+T细胞反应;

(ii) 诱导抗原特异性CD8+T细胞的指数扩增,和/或

(iii) 产生保护性免疫。

[0029]因此,可包含蛋白质组合物、或编码的核酸构建体或包含前述的多肽结合物的这些佐剂组合可用于治疗任何疾病或病症,其中上述已鉴定的增强的细胞免疫反应在治疗上是期望的,特别是感染性疾病、增殖性病变(如癌症、过敏症、自身免疫病症、炎症病症)和其他慢性疾病,其中增强的细胞免疫是期望的治疗结果。本发明的优选应用特别包括感染性病症如HIV感染和癌症的治疗。

[0030]附图详述

[0031]图1显示了在组合的TLR/CD40激动剂免疫后CD8+T细胞扩增可变地依赖于IFN α/β 。WT(顶行)和IFN $\alpha\beta$ RKO(底行)用卵清蛋白肽、抗CD40和指定的TLR激动剂免疫。7天后,通过四聚体染色和FACS分析测量脾内的卵清蛋白特异性T细胞反应。在右上象限中的数目表明四聚体染色细胞占总CD8+T细胞的百分比。

[0032]图2显示了在用与抗CD40组合的IFN $\alpha\beta$ 依赖性TLR激动

剂免疫后, IFN α β RKO 宿主的 CD4 缺失恢复了 CD8 $^{+}$ T 细胞反应。如所示的 CD40 缺失的或未缺失的 WT 小鼠和 IFN α β RKO 小鼠如上所述用 HSV-1 肽、抗 CD40 和 PolyIC 进行免疫。7 天后, HSV-1 特异性反应通过四聚体 (A) 和 PolyIC IFN γ (B) 染色 PBL 来测定。

[0033] 图 3 显示了抗 IFN 阻断了 PolyIC/CD40 介导的 CD8 反应, 所述反应通过 CD4 缺失来恢复。在有和没有抗 IFN 和/或 CD4 缺失下, 将小鼠免疫以对抗卵清蛋白 (组合的 PolyIC/ α CD40)。对于抗原特异性 T 细胞, 如上所述通过四聚体染色来分析第 7 天 PBL。

[0034] 图 4 显示了在组合的 TLR/CD40 免疫后, 在 CD4 缺失的 IFN α β RKO 宿主中的 CD8 $^{+}$ T 细胞反应很大程度上依赖于 CD70。IFN α β RKO 小鼠缺失 CD4 细胞并且如上所述用 HSV-1 肽、PolyIC 和抗 CD40 进行免疫。如在图 6 中, 用抗 TNF 配体抗体注射小鼠。通过四聚体染色分析第 7 天 PBL。

[0035] 图 5 显示了 IFN 和 CD40 协同以诱发 CD8 $^{+}$ T 细胞的指数扩增。如上所述激发小鼠。初次抗原激发后 7 天, 通过四聚体染色分析 PBL。

[0036] 图 6 包含关于 1 型干扰素和激动性抗体的组合施用的实验的结果, 显示这种组合诱导 CD70 在体内 CD8 $^{+}$ 树突状细胞上的表达, 而仅任一者的施用则不会诱导。用单独的抗 CD40 抗体、作为阳性对照的 PolyIC、重组 1 型干扰素 (1×10^7 U) 或抗 CD40+IFN 注射小鼠。18 小时后, 将脾 DC 分离, 并且分析它们的 CD70 表达。在右上象限的数目表示 CD70 染色的平均荧光强度。数据显示: 与 CD40/PolyIC 注射类似, CD40/IFN 类似地增加了 CD70 在 CD8 $^{+}$ DC 上的表达。

[0037] 图 7 包含显示组合的 1 型干扰素施用和激动性 CD40 抗体对 CD70 在体内 CD8 $^{+}$ DC 上的表达的效应的实验。结果显示只有免疫刺激物组合而非单独的 CD40 激动剂或单独的 IFN 诱导 CD70 在 DC 上的表达。

[0038] 图 8 包含以下实验: 分析抗原特异性 (卵清蛋白 T 细胞) 在施用抗 CD40、IFN α 、PolyIC/CD40、在各种减少的 IFN 剂量下的 IFN α 和抗 CD70 或 IFN α /CD40 的小鼠中的百分比。

[0039]图 9 与在图 7 中的实验类似,显示了组合的 TLR/CD40 激动剂激发在 IFN α β RK0 小鼠中诱导只在 DC 上的 CD70 表达,所述 DC 表达靶向的 TLR。IFN α β RK0 小鼠用单独的抗 CD40 (aCD40) 或与 PolyIC (+PolyIC) 或 Pam3Cys (+Pam3Cys) 组合进行注射。Pam3Cys 是 TLR2 激动剂,并且 PolyIC 是 TLR3 激动剂。24 小时后,将脾 DC 分离,并且如上所述针对 CD70 表达进行染色。CD8⁺ DC 表达 TLR2 和 3, 而 CD11b⁺DC 表达 TLR2 但不是 TLR3。数据表明在缺少 IFN α β 信号转导的情况下,只有直接通过 TLR 和 CD40 两者刺激的 DC 能增加 CD70 表达。

[0040]图 10 包含比较 IL-2/CD40 激动剂组合和 IFN α /CD40 激动剂组合对来自 PBL 的抗原特异性(卵清蛋白)T 细胞的百分比的效应的实验。包含于其中的结果显示 IL-2/CD40 激动剂组合不会诱发与 IFN α /CD40 激动剂组合相当的对 CD8⁺ T 细胞免疫的协同效应。

[0041]图 11 包含在具有注射的黑素瘤细胞的 C57BI/6 小鼠中的实验,显示 IFN α /CD40 激动剂组合增加了这种转移性黑素瘤动物模型中的存活时间。

[0042]图 12 包含的实验显示了在转移性肺癌的 C57BI/6 动物模型中用 CD40 激动剂和 IFN α 的主题组合佐剂疗法保护小鼠免于转移性肺癌,如通过在用佐剂组合治疗的动物中转移性结节数的减少所显示。

[0043]图 13 包含以下实验:其中 TIL 分析在用主题佐剂组合和适当对照治疗的接种了 B16.F10 黑素瘤细胞的 C57BI/6 小鼠中进行。施用主题佐剂组合的小鼠显示增加的 TIL 数,如图中的数据所示。

[0044]图 14 包含的实验显示了主题 CD40 激动剂/IFN 组合疗法产生抗原特异性效应 T 细胞,所述效应 T 细胞浸润含有肿瘤的小鼠(接种了 B16.F10 黑素瘤细胞的 C57BI/6 小鼠)的肺。

[0045]图 15A 和 15B 包含用于实施例的示例性 CD40 激动性抗体 (FGK. 45) 的轻链和重链序列。

[0046]图 16 包含的示意图显示了用于根据本发明的 CD40 激动性抗体-抗原-1 型 IFN 结合物在杆状病毒表达系统中的表达的 DNA 构建体的构建。这种构建体将导致与选择的抗原(例如 HIV gag)以及与 1

型干扰素(α 干扰素)连接的抗 CD40 抗体的表达。

[0047]图 17 包含用于在杆状病毒表达系统中产生根据本发明的 CD40 抗体-抗原-1 型 IFN 结合物的构建体和用于产生在 DNA 免疫中使用的载体的构建体。

[0048]发明详述

[0049]如上所述,本发明主要涉及协同佐剂组合及其用途。在更详细地叙述本发明之前,提供了下列定义。由于本领域技术人员可以了解,所以不必解释所有术语。

[0050]在本发明中,术语"激动剂"包括直接结合和活化受体或间接活化受体的任何本体(entity),所述间接活化通过与结合该受体的另一个本体形成复合物或通过引起另一种化合物的修饰来实现,所述化合物因此直接结合和活化该受体。

[0051]术语"CD40 激动剂"具体包括激动 CD40/CD40L 和/或增加一种或多种与 CD40 或 CD40L 相关的活性的任何本体。这包括例如,CD40 激动性抗体及其片段、可溶性 CD40L 及其片段和衍生物(如低聚化(例如二价三聚化的 CD40L))和包含前述任一项的融合蛋白及其通过重组或蛋白质合成产生的变体。此外,这种 CD40 激动剂包括小分子以及包含可取代抗体的 RNA 或 DNA 分子的 CD40 适配体。生产的技术及其作为抗原结合部分的用途可参见,例如美国专利号 5,475,046; 5,720,163; 5,589,332 和 5,741,679。这些专利以其全部内容通过引用并入本文。

[0052]在本发明中,术语"CD40L"或如其在本领域中替代性已知的"CD154"包括所有哺乳动物(例如人、大鼠、非人灵长类、鼠科)CD40L 以及其与至少相应的哺乳动物 CD40(例如人 CD40)多肽结合的片段、变体、低聚物和结合物。在本发明中,施用的 CD40L 可包括 CD40L 多肽或编码所述 CD40L 多肽的 DNA。这种 CD40L 多肽和 DNA 包括,特别是如在 Immunex 美国专利号 6,410,711; 美国专利号 6,391,637; 美国专利号 5,981,724; 美国专利号 5,961,974 和美国公开申请号 20040006006 中公开的天然 CD40L 序列及其片段、变体和低聚物,所

有这些专利和申请和其中公开的 CD40L 序列以其全部内容通过引用并入本文。

[0053]在本发明中，术语 4-1BB 激动剂包括激动 4-1BB 受体的任何本体如激动性 4-1BB 抗体和 4-1BB 多肽及其结合物。这种激动剂潜在地能与 1 型干扰素或 TLR 激动剂共施用以诱发免疫上的协同效应。

[0054]在本发明中，术语"1 型干扰素"包括当与 CD40 激动剂紧邻 (proximate) 施用或组合施用时诱发增强的 CD8+ 免疫反应的任何 1 型干扰素。这包括 α 干扰素、 β 干扰素和属于 1 型干扰素的其他类型的干扰素。具体说，这包括 ϵ 干扰素、 ζ 干扰素和 τ 干扰素，如 τ 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10；同时，这包括其变体(如片段)、模拟不同的 1 型干扰素分子的结构的共有 (consensus) 干扰素(如 α 干扰素)、其 PEG 化形式、因重组表达或诱变等具有改变的糖基化的 1 型干扰素等等。本领域技术人员很好地知道包括那些可商业获得的和用作治疗剂的不同 1 型干扰素。优选 1 型干扰素包括人 1 型干扰素，且最优选人 α 干扰素。

[0055]在本发明的上下文中的术语"协同佐剂"或"协同组合"包括两种免疫调节剂如受体激动剂、细胞因子、佐剂多肽的组合，所述组合与仅施用任一者相比诱发免疫上的协同效应。具体来说，本申请公开了包含至少一种 1 型干扰素和 CD40 激动剂或 TLR 激动剂和 CD40 激动剂或 TLR 激动剂或 1 型干扰素和 4-1BB 激动剂的协同组合。这些协同组合在共同施用或彼此紧邻施用后，例如与当 CD40 激动剂或 1 型干扰素在缺少另一部分的情况下施用相比，诱发免疫上更大的效应。例如，可通过在体内树突状细胞上的 CD70 的上调证明更大的效应，当仅施用任一免疫调节剂或激动剂时不会发生所述上调。

[0056]在本发明中的"共施用"是指在一定情况下施用不同本体 - 如 1 型干扰素和 CD40 激动剂或蛋白质结合物或 DNA 结合物或对上述编码的结合物以使所述本体(例如 CD40 激动剂和 1 型干扰素)诱发免疫上的协同效应以及例如导致上调在树突状细胞上的 CD70 和/或减少不良副作用如肝毒性。这些部分可以以相同或不同组合物施用，所述组合

物若单独与另一种组合物紧邻施用，通常在相互的 24 小时内、更通常在相互的约 1-8 小时内、并且甚至更通常在相互的 1-4 小时内或接近同时施用。相对量是实现期望的协同作用的剂量。此外，如果以 DNA 结合物的形式施用，那么激动剂可包含于相同或不同的载体中，如质粒或重组病毒载体(如腺病毒或疫苗载体)。

[0057]"疫苗"是指在单独施用或与本发明的佐剂组合的结合施用时导致免疫上的抗原特异性效应的组合物。这包括赋予保护的预防性疫苗和治疗性疫苗。

[0058]术语"抗体"是指完整抗体或其结合片段，所述结合片段与用于特异性结合的完整抗体竞争。结合片段通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学裂解产生。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv 和单链抗体。这包括，特别是嵌合的、人、人源化的、双特异性的和非人抗体。此外，这些抗体和片段包括其变体，所述变体经改变以影响一种或多种性质如裂解、糖基化、效应子作用等。

[0059]如上所述，非常需要开发和实施能产生有效的抗原-特异性 T 细胞免疫并且不会遭受不期望的副作用如肝毒性的新疫苗佐剂和/或佐剂制剂。

[0060]本发明通过提供可单独施用或与现有疫苗结合施用以增强它们的效力的新型佐剂来满足这种需要。这些佐剂通常包括至少一种 1 型干扰素、优选 α 或 β 人干扰素、至少一种 CD40 激动剂(抗 CD40 抗体或其片段)或可溶性 CD40L 多肽。

[0061]本发明提供了通过施用至少一种 CD40 激动剂(优选 CD40 激动性抗体或可溶性 CD40L)、1 型干扰素(如人 α 或 β 干扰素)和任选靶抗原(例如肿瘤抗原、自身抗原、变应原或病毒抗原)的组合在有相应需要的受试者中诱发增强的细胞免疫反应的方法。这些部分通过诱发在 CD8⁺树突状细胞上的 CD70 表达，诱发细胞免疫上的协同效应。特别是，这种组合诱导下列：(i) 产生的初级和记忆性 CD8⁺ T 细胞反应比单独的任一激动剂的指数增加；(ii) CD8⁺ T 细胞的指数扩增以及(iii) 应诱发保护性免疫。如下文所示，当仅施用任一 CD40 激动性

抗体或 1 型干扰素时，在 CD8+ 树突状细胞上的 CD70 表达的诱导不会发生。因此，CD40 激动剂/IFN 组合令人惊奇地协同诱导在 CD8+ DC 上的 CD70 表达以及体内 CD8+ T 细胞的有效扩增。

[0062] 关于这个发现，本发明进一步提供了编码促进细胞免疫的新型协同激动性多肽结合物的 DNA 构建体，所述构建体包含 (i) 编码 CD40 激动剂、优选 CD40 激动性抗体或其片段或可溶性 CD40L 或片段或衍生物的 DNA 以及 (ii) 编码 1 型干扰素例如 α 或 β 干扰素的 DNA，所述构建体优选进一步包括 (iii) 编码期望的抗原的 DNA。

[0063] 本发明进一步提供了诱发细胞免疫上的协同效应的协同蛋白质结合物，所述结合物包含 CD40 激动剂（优选激动性 CD40 抗体或片段或 CD40L 的片段）、1 型干扰素和任选期望的靶抗原。

[0064] 本发明进一步提供了包含这些 DNA 构建体的组合物，所述组合物当对宿主（优选人）施用时可用于产生增强的抗原特异性细胞免疫反应。

[0065] 本发明进一步提供了包含编码所述新型协同激动性多肽组合的 DNA 构建体的表达载体和宿主细胞，所述构建体包含 (i) 编码特异性 CD40 激动剂、优选 CD40 激动性抗体或抗体片段或 CD40L 的片段的一种或多种 DNA；(ii) 编码 1 型干扰素、优选 α 或 β 干扰素的一种或多种 DNA 以及 (iii) 优选编码抗原（如病毒或肿瘤抗原）的 DNA，其中针对所述抗原期望诱发增强的抗原特异性细胞免疫反应。

[0066] 本发明又提供了使用所述载体和宿主细胞产生包含所述新型协同 IFN/CD40 激动剂/抗原多肽结合物的组合物（优选激动性 CD40 抗体/抗原/1 型干扰素多肽结合物）的方法。

[0067] 进一步本发明提供了对期望在其中诱发抗原特异性细胞免疫反应的宿主施用所述 DNA 构建体或组合物和包含前述任一项的运载体 (vehicle) 的方法，所述宿主是例如在优选减少或消除不期望的副作用（如肝毒性）的情况下患有慢性疾病如癌症或感染性或过敏性病症的人。

[0068] 本发明又进一步提供了包含所述新型协同 IFN/CD40 激动

剂抗原多肽结合物的组合物，所述组合物适于对宿主施用以便诱发增强的抗原特异性细胞免疫反应。

[0069]本发明也提供了适于治疗用途的组合物，其包含至少一种 1 型干扰素、至少一种 CD40 激动剂和任选靶抗原的组合，所述组合物当对需要这种施用的宿主施用诱发细胞免疫上的协同效应。

[0070]本发明也提供了免疫疗法的新方法，所述方法包括对需要这种治疗的宿主施用所述新型协同激动剂-抗原多肽结合物或编码所述多肽结合物的 DNA 或包含至少一种 1 型干扰素、至少一种 CD40 激动剂和任选至少一种靶抗原的一种或多种组合物以诱发增强的（抗原特异性）细胞免疫反应。在优选的实施方案中，将对患有癌症、感染（特别是例如涉及病毒、细菌或寄生虫的慢性感染性疾病）或自身免疫、炎性或过敏性病症或处于发展上述疾病的危险中的受试者施用这些组合物和结合物。例如，本发明可用于诱发抗 HIV 的抗原特异性细胞免疫反应。HIV 是其中保护性免疫几乎确定需要产生有效和长时间的抗病毒的细胞免疫反应的疾病的公认的例子。

[0071]本发明也提供了通过组合或共施用上调树突状细胞上的 CD70 的本发明协同佐剂组合来增强疫苗（特别是用于诱导保护性细胞免疫反应的疫苗）的效力的方法。在优选的实施方案中，这种佐剂包含本文公开的特异性佐剂和任选可进一步包含另一种佐剂如 TLR（例如 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10 或 TLR11）。理想地，这一额外的佐剂将在有相应需要的受试者中进一步诱导树突状细胞的 CD70 表达并且导致进一步增强的免疫反应。

[0072]本发明是发明人早期论证的扩充，所述论证是：在 toll 样受体 (TLR) 和 CD40 二者的激动剂的存在下用抗原的免疫（组合的 TLR/CD40 激动剂免疫）诱发抗原特异性 CD8+ T 细胞的有力扩增。从这种疫苗接种形式诱发的反应以指数方式大于由单独的任一激动剂诱发的反应，并且远远优于通过常规方法进行的疫苗接种。观察到组合的 TLR/CD40 激动剂免疫产生有效的初级和次级 CD8+ T 细胞反应，仅在 2 次免疫后在循环中达到 50-70% 抗原特异性 T 细胞。然而，不同于发明

人的早期发明，本协同组合包含 1 型干扰素和 CD40 激动剂或 4-1BB 激动剂的组合。已经令人惊奇地发现 TLR/CD40 激动性抗体组合和 1 型干扰素/CD40 激动性抗体组合二者都诱导在 CD8+ DC 上的 CD70 表达，并由此诱发体内 CD8+ T 细胞的有效扩增。因此，CD40 途径表面上与提供诱导协同性增强的 DC 活化并由此有效诱导抗原特异性细胞免疫的 TLR 和 1 型 IFN 信号转导途径二者整合 (integrated)。

[0073]为诱发细胞免疫上的协同效应，CD40 激动剂、1 型干扰素和抗原(若存在)优选作为单独 (discrete) 的多肽部分施用，所述部分在导致期望的免疫上的协同效应的情况下可以联合施用或大体上紧邻以任一顺序单独施用或彼此同时施用。是否获得协同作用可通过各种方式来检测，例如基于施用条件下树突状细胞上的 CD70 表达的上调。可选择地，这些部分可以作为单个多肽融合物或包含这两种或三种单独的本体的结合物施用，或以编码所述两种或三种单独的本体的一种或多种 DNA 结合物的形式施用。本发明的后两个实施方案在以多肽或 DNA 为基础的疫苗的情况下有益，因为潜在地仅仅一种活性剂需要进行配制并且对需要治疗的受试者(例如患有 HIV 感染或癌症的个体)施用。

[0074]本发明通过提供可单独施用或与现有疫苗结合施用以增强它们的效力的新型佐剂而满足这种需要。这些佐剂通常包括至少一种 1 型干扰素(优选 α 或 β 人干扰素)、至少一种 CD40 激动剂(抗 CD40 抗体或其片段或可溶性 CD40L 多肽)和优选至少一种抗原(如肿瘤抗原或病毒抗原)，其中针对所述抗原期望诱发增强的抗原特异性细胞免疫。在本发明优选的实施方案中，这些多肽部分将包含于单个多肽结合物中或将通过核酸构建体编码，所述构建体在宿主细胞中体外表达后或在对宿主体内施用后导致所述激动剂和抗原多肽或包含这些多肽的结合物的表达。

[0075]1 型干扰素和 CD40 激动剂(例如激动性 CD40 抗体)的施用量包含在组合或共施用中通过诱导树突状细胞上的 CD70 表达和增加抗原特异性 CD8+ T 细胞数目来产生协同效应的量。理想地，所述剂量

不会导致不良副作用如肝毒性，所述肝毒性例如可基于肝转氨酶水平进行检测。就 1 型干扰素而言，含量可从约 1×10^3 单位的活性 (U) 至约 1×10^{10} U、更通常从约 10^4 U 至约 10^8 U 变化。激动性抗体或 CD40L 多肽的含量可从约 .00001 克至约 5 克、更通常从约 .001 克至约 1 克变化。如上所述，优选的 MTD 超过 0.3 mg/kg 且可在约 0.45 mg/kg 至约 3 mg/kg 的范围内。如果治疗方法涉及抗原的施用，那么这可以在约 .0001 克至约 50 克、更通常从约 .1 克至约 10 克的范围内的量施用。如所述，这些部分可以以相同或不同制剂施用。如果单独施用，这些部分可以以任何顺序通常在相互的几小时内，更通常大体上紧邻及时施用。

[0076] 如所述，CD40 激动剂包括激动 CD40/CD40L 相互作用的任何部分。通常这些部分是 CD40 激动性抗体或激动性 CD40L 多肽。如所述，这些抗体包括，例如人抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体、scFvs、特异性激动 CD40/CD40L 结合相互作用的抗体片段。更优选，抗体包含嵌合的、完全人或人源化 CD40 抗体。

[0077] 人 CD40L 和其他哺乳动物的 CD40L 多肽是众所周知的并且可得的，包括其可溶性形式、低聚化的 CD40L 多肽，如最初由 Immunex (现在 Amgen) 报道的三聚化的 CD40L。人和鼠科 CD40L 的序列也是已知的，并且可商业获得的 (参见上述通过引用并入的 Immunex 专利)。如上所述，CD40L 剂量通常为至少 0.1 mg/kg/日、更通常从至少约 0.15 至 1.0 mg/kg/日。与当 CD40L 多肽在缺少 1 型干扰素或 TLR 激动剂下施用相比，选择 MTD 以便没有观察到不良副作用 (如肝毒性) 和增加的肝转氨酶水平或使它们减至最小或可以忽略不计。

[0078] 如所述，1 型干扰素可以是当与 CD40 激动剂紧邻施用或组合施用诱发细胞免疫上的协同效应的任何 1 型干扰素或变体或片段。这样的干扰素可包括 α 干扰素、 β 干扰素、干扰素 τ (如 $\tau 1$ 、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)、干扰素 ω 、干扰素 ϵ 、干扰素 ζ 等，特别是其变体和片段。这特别包括 PEG 化干扰素和共有干扰素以及具有改变的 (非天然或无糖基化 (aglycosylated)) 糖基化的干扰素。

[0079]尽管本发明人和别人先前已报道 TLR 激动剂与抗 CD40 激动剂协同作用导致 CD8+ T 细胞免疫的极度增强；但是这些早期研究还未提出 1 型干扰素和 CD40 激动剂(如激动性抗体)也产生细胞免疫上的协同效应。令人惊奇的是，本发明人已发现 CD40 途径与用于诱导 DC 活化有效细胞免疫的 TLR 和 1 型 IFN 信号转导途径二者整合。此外，这些早期研究并未揭示 CD70 在此过程中的作用。

[0080]由于涉及 TLR 激动剂/CD40 激动剂组合的早期研究需要抗原、TLR 激动剂和 CD40 激动剂的单独施用，所以早期研究也还未提出主题 DNA 或多肽结合物。相比之下，本发明在某些实施方案中提供了 DNA 构建体和包含两个或三个不同部分的两部分(bipartite)或三部分(tripartite)多肽或在单个 DNA 中编码这两个或三个部分的 DNA 或多肽分子，例如包含 CD40 激动性抗体、 α 干扰素和抗原的结合物。这将使其用于预防或治疗疫苗用途或用于在治疗其中期望增强细胞免疫的疾病(例如癌症或自身免疫病症)中增强细胞免疫的用途简单化(因为仅一种分子本体需要以药学上可接受的形式进行配制与施用)。这在治疗慢性疾病或病症(其中可能需要大量的佐剂用于有效预防或治疗免疫)的情况下特别有利。

[0081]组合的 IFN/CD40 激动剂免疫(仅使用分子试剂)独特地产生一定量级的 CD8+ T 细胞反应，所述量级先前仅在用感染性因子激发后可获得(Ahonen 等, J Exp Med 199:775 (2004))。因此，本发明提供了抗 HIV 和其他慢性感染性疾病(包括病毒、细菌、真菌或寄生虫)以及增殖性疾病(如癌症、自身免疫疾病、过敏性病症和炎症性疾病)的有效疫苗的开发，其中有效的治疗需要仅组合的 IFN(1 型)/CD40 激动剂免疫或上调树突状细胞上的 CD70 表达的其他佐剂组合能产生的细胞免疫的数量和质量。

发明应用

[0082]本发明在本文示例了以蛋白质和 DNA 二者为基础的疫苗，所述疫苗包含下列组合：(i) 至少一种 CD40 激动剂，例如激动性抗

CD40 抗体或 CD40L 多肽; (ii) 任选至少一种靶抗原(例如 HIV Gag) 和 (iii) 至少一种 1 型干扰素(例如 α 干扰素)。HIV Gag40 是适当的模型抗原, 因为 HIV 是其中增强的细胞免疫反应具有显著的治疗潜力的慢性感染性疾病。然而, 本发明包括含有任何抗原的如所述的结合物的构建, 其中针对所述抗原在治疗上期望增强的细胞免疫反应。在优选的实施方案中, 至少一种靶抗原包含于含有至少一种 1 型干扰素和至少一种 CD40 激动剂的施用的组合物中, 或包含于含有这些部分的多肽结合物中或由编码这些部分的 DNA 结合物编码。然而, 在一些实施方案中, 包含 1 型干扰素和抗 CD40 抗体的结合物可与抗原分开单独施用, 或宿主可自然地接触抗原。此外, 在一些实施方案中所有三个部分(即抗 CD40 抗体、1 型干扰素和抗原)可以以单独分离的本体共施用。优选所有这些部分大体上同时施用以便实现期望的细胞免疫的协同增强, 而没有不良副作用如肝毒性、静脉血栓栓塞、细胞因子毒性和/或头痛。然而, 这些部分可以以诱发导致 CD8+ T 细胞扩增增强和诱导在 CD8+ DC 上的 CD70 表达的细胞免疫上的协同效应的任何顺序施用。

[0083] 示例性抗原包括但不限于细菌、病毒、寄生虫、变应原、自身抗原和肿瘤相关的抗原。如果使用以 DNA 为基础的疫苗, 那么抗原通常由施用的 DNA 构建体的序列编码。可选择地, 如果抗原作为结合物施用, 那么抗原通常是包含于施用的结合物中的蛋白质。更进一步, 如果抗原与 CD40 激动剂和 1 型干扰素部分分开施用, 那么抗原可采用任何形式。具体来说, 抗原可包括蛋白抗原、肽、完全灭活的生物体等。

[0084] 可用于本发明的抗原的特定例子包括来自甲型、乙型、丙型或丁型肝炎、流感病毒、利斯特氏菌属(*Listeria*)、肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)、结核病、土拉菌病、重型天花(天花)、病毒性出血热、鼠疫耶尔森菌(鼠疫)、HIV、疱疹、乳头瘤病毒的抗原和其他与感染性因子有关的抗原。其他抗原包括与肿瘤细胞有关的抗原, 与自身免疫病症、过敏症和哮喘有关的抗原。这种抗原与主题激

动剂组合1型干扰素和抗CD40抗体结合的施用可用于治疗性或预防性疫苗，所述疫苗用于赋予抗这些疾病病症的免疫。

[0085]在一些实施方案中，本方法和组合物可通过包括来自感染性因子的抗原用于治疗处于患上感染的危险或患有感染的个体。感染是指归因于外源性生物体或在宿主内复制的因子在宿主中的存在的疾病或病症。处于患有感染的危险的受试者是易于发展感染的受试者。这种个体可包括，例如与感染性生物体或因子具有已知接触或疑似接触的受试者。处于患上感染的危险的受试者也包括患有与建立对感染性因子或生物体的免疫反应的能力受损相关的病症的受试者，例如患有先天性或获得性免疫缺陷的受试者、正经受放射或化疗的受试者、患有烧伤的受试者、患有外伤性损伤的受试者、正经受外科手术或其他侵入性医疗操作或牙科治疗的受试者、或类似免疫受损的个体。

[0086]可用本发明的疫苗组合物治疗或预防的感染包括细菌、病毒、真菌或寄生虫。其他不常见类型的感染也包括立克次体(*rickettsiae*)、支原体(*mycoplasmas*)和病原体(agents)引起的羊瘙痒病(scrapie)、牛海绵样脑病(BSE)以及朊病毒病(例如库鲁病(kuru)和克雅病(Creutzfeldt-Jacob disease))。感染人的细菌、病毒、真菌或寄生虫的例子是已知的。感染可以是急性的、亚急性的、慢性或潜在的，并且它可以是局部的或全身的。此外，感染可在宿主中感染性生物体的因子的生活周期的至少一个阶段期间主要是细胞内或细胞外的。

[0087]可使用主题疫苗和方法对抗的细菌感染包括革兰氏阴性和革兰氏阳性菌。革兰氏阳性菌的例子包括但不限于巴氏杆菌属(*Pasteurella*)物种、葡萄球菌属(*Staphylococci*)物种和链球菌属(*Streptococci*)物种。革兰氏阴性菌的例子包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种和沙门氏菌属(*Salmonella*)物种。感染性细菌的特定例子包括但不限于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺性军团病菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属

(*Mycobacteria*) 物种 (例如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、戈登分枝杆菌 (*M. gordonae*))、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 组链球菌属)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 组链球菌属)、链球菌属 (草绿色组)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌属 (*Streptococcus*) (aerobic spp.)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性弯曲杆菌属 (*pathogenic Campylobacter*) 物种、肠球菌属 (*Enterococcus*) 物种、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 物种、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、类杆菌属 (*Bacteroides*) 物种、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、极细密螺旋体 (*Treponema pertenuis*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*) 和衣氏放线菌 (*Actinomyces israelii*)。

[0088] 引起人类感染的病毒的例子包括但不限于逆转录病毒科 (*Retroviridae*) (例如人类缺陷性病毒, 如 HIV-1 (也称为 HTLV-III)、HIV-II、LAC 或 IDLV-III/LAV 或 HIV-III 以及其他分离株, 如 HIV-LP)、小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) (例如脊髓灰质炎病毒 (*poliovirus*)、甲型肝炎、肠道病毒 (*enteroviruses*)、人类柯萨奇病毒 (*human Coxsackie viruses*)、鼻病毒 (*rhinoviruses*)、艾柯病

毒(*echoviruses*))、杯状病毒科(*Caliciviridae*) (例如导致胃肠炎的菌株)、披膜病毒科(*Togaviridae*) (例如马脑炎病毒(*equine encephalitis viruses*))、风疹病毒(*rubella viruses*))、黄病毒科(*Flaviviridae*) (例如登革病毒(*dengue viruses*))、脑炎病毒(*encephalitis viruses*)、黄热病毒(*yellow fever viruses*))、冠状病毒科(*Coronaviridae*) (例如冠状病毒(*coronaviruses*))、弹状病毒科(*Rhabdoviridae*) (例如水泡性孔病毒(*vesicular stomata viruses*))、狂犬病毒(*rabies viruses*))、纤丝病毒科(*Filoviridae*) (例如依波拉病毒(*Ebola viruses*))、副黏病毒科(*Paramyxoviridae*) (例如副流感病毒(*parainfluenza viruses*))、腮腺炎病毒(*mumps viruses*)、麻疹病毒(*measles virus*)、呼吸道合胞病毒(*respiratory syncytial virus*))、正黏病毒科(*Orthomyxoviridae*) (例如流感病毒(*influenza viruses*))、布尼亚病毒科(*Bunyaviridae*) (例如汉坦病毒(*Hantaan viruses*))、布尼亚病毒(*bunya viruses*)、白蛉热病毒(*phleboviruses*)和 *Nairo* 病毒))、沙粒病毒科(*Arena viridae*) (出血热病毒(*hemorrhagic fever viruses*))、呼肠孤病毒科(*Reoviridae*) (例如呼肠病毒(*reoviruses*))、环状病毒(*orbiviruses*)、轮状病毒(*rotaviruses*))、双 RNA 病毒科(*Bimaviridae*)、嗜肝 DNA 病毒科(*Hepadnaviridae*) (乙型肝炎病毒)、细小病毒科(*Parvoviridae*) (细小病毒(*parvoviruses*))、乳多空病毒科(*Papovaviridae*) (乳头瘤病毒(*papilloma viruses*))、多瘤病毒(*polyoma viruses*))、腺病毒科(*Adenoviridae*) (腺病毒(*adenoviruses*))、疱疹病毒科(*Herpeviridae*) (例如单纯疱疹病毒(*herpes simplex virus*) (HSV) I 和 II、水痘带状疱疹病毒(*varicella zoster virus*)、痘病毒(*pox viruses*)) 和虹彩病毒科(*Iridoviridae*) (例如非洲猪瘟病毒(*African swine fever virus*)) 和未分类病毒(例如海绵状脑病的致病因子(etiological agents)、丁型肝炎的因子、非甲型非乙型肝炎的因子(1 类肠道传播; 2 类胃肠外传播如丙型肝炎); 诺沃克(Norwalk)

及相关的病毒和星状病毒(*astroviruses*)。

[0089]真菌的例子包括曲霉菌属(*Aspergillus*)物种、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)及其他念珠菌属物种、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatidis*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)物种和卡氏肺孢子虫(*Pneumocytis carinii*)。

[0090]寄生虫包括但不限于血源性和/或组织寄生虫,如田鼠巴贝虫(*Babesia microti*)、分歧巴贝虫(*Babesi divergens*)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)、热带利什曼原虫(*Leishmania tropica*)、利什曼原虫属(*Leishmania*)物种、巴西利什曼原虫(*Leishmania braziliensis*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovdni*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、冈比亚锥虫(*Trypanosoma gambiense*)、罗德西亚锥虫(*Trypanosoma rhodesiense*) (非洲睡眠病)、克式锥虫(*Trypanosoma cruzi*) (恰加斯病(Chagas' disease))和刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、扁虫(flat worms)和蛔虫(round worms)。

[0091]如所述,本发明包括主题协同组合或包含或编码这种协同组合的蛋白质或DNA结合物在治疗增殖性疾病如癌症中的用途。癌症是不受控制的妨碍身体器官和系统的正常功能的细胞生长的病症。患有癌症的受试者是具有客观可测量的存在于受试者机体内的癌症细胞的受试者。处于发展癌症的危险中的受试者是易于发展癌症(例如基于家族史、遗传倾向)的受试者、接触放射或其他引起癌症的试剂的受试者。从其原先部位迁移并且接种重要器官的癌症可通过受影响器官的功能退化最终导致受试者的死亡。造血性癌症(如白血病)能竞争得过受试者的正常的造血室,因此导致造血衰竭(以贫血症、血小板减少症和中性粒细胞减少症的形式),最终导致死亡。

[0092]转移是不同于原发性肿瘤部位的癌细胞的区域，由癌细胞从原发性肿瘤散布至身体的其他部分产生。当诊断原发性肿瘤实体的时候，可针对转移的存在对受试者进行监控。除了监控特定症状之外，经常通过磁共振成像(MRI)、计算机断层摄影术(CT)、扫描、血液和血小板计数、肝功能研究、胸部X射线和骨扫描的单独或组合使用，检测转移。

[0093]本发明的组合物、蛋白质结合物和DNA疫苗可通过包含肿瘤相关抗原(TAA)或编码其的DNA用于治疗多种癌症或处于发展癌症(包括表达和不表达CD40的癌症)的危险中的受试者。这是在肿瘤细胞中表达的抗原。这种癌症的例子包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、黑素瘤、结肠癌、胃癌、肝癌、食道癌、肾癌、咽喉癌、甲状腺癌、胰腺癌、睾丸癌、脑癌、骨癌和血癌(如白血病、慢性淋巴细胞性白血病)等。本发明的疫苗接种方法可用于刺激免疫反应以通过抑制或延缓肿瘤的生长或减少肿瘤的大小来治疗肿瘤。肿瘤相关抗原也可以是主要(但不限于)由肿瘤细胞表达的抗原。

[0094]其他的癌症包括但不限于基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统(CNS)癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内肿瘤、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌(小细胞、大细胞)、淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤);黑素瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(例如唇、舌头、口和咽);卵巢癌;胰腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌;肉瘤;皮肤癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫癌;泌尿系统癌;以及其他癌和肉瘤。

[0095]本发明的组合物、蛋白质结合物和DNA也可用于治疗自身免疫疾病，如多发性硬化症、类风湿性关节炎、1型糖尿病、牛皮癣或其他自身免疫病症。潜在地能用本发明的疫苗和免疫佐剂治疗的其他自身免疫疾病包括克罗恩氏病和其他炎性肠疾病(如溃疡性结肠炎)、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫脑脊髓炎、重症肌无力(MG)、桥本甲状腺炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、天疱

疮、格雷夫斯病(Graves disease)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、具有抗胶原抗体的硬皮病、混合性结缔组织病、多发性肌炎(polypositis)、恶性贫血、自发性阿狄森氏病(Addison's disease)、自身免疫相关的不孕症、肾小球肾炎(例如新月体性肾小球肾炎、增殖性肾小球肾炎)、大疱性类天疱疮、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、银屑病关节炎、胰岛素耐受性、自身免疫糖尿病(1型糖尿病;胰岛素依赖性糖尿病)、自身免疫性肝炎、自身免疫性血友病、自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS)、自身免疫性肝炎、自身免疫性血友病、自身免疫性淋巴增生综合征、自身免疫性葡萄膜视网膜炎和格林-巴利综合征(Guillain-Bare syndrome)。近来,动脉硬化和阿尔茨海默病已经公认为自身免疫疾病。因此,在本发明的实施方案中,抗原是自身抗原,其中针对所述抗原宿主诱发不必要的促进组织破坏和正常组织损伤的免疫反应。

[0096]本发明的组合物、蛋白质结合物和DNA疫苗还可用于治疗哮喘和过敏性疾病和炎性疾病。哮喘是呼吸系统病症,其特征在于:炎症以及呼吸道变窄和呼吸道对吸入因子的反应性的增加。哮喘时常(但不限于)与特应性或过敏性症状相关。过敏症是对物质(变应原)的后天性超敏反应。过敏性病症包括湿疹、过敏性鼻炎或鼻炎、花粉热、支气管哮喘、荨麻疹和食物过敏症以及其他特应性病症。变应原是可在易感性受试者中诱导过敏性或哮喘反应的物质。存在很多变应原,包括花粉、昆虫毒液、动物皮屑、粉尘、真菌孢子和药物。

[0097]天然和植物变应原的例子包括特异于下列属的蛋白质:犬属、表皮螨属(Dermatophagoides)、猫属、豚草属(Ambrosia)、黑麦草属(Lotium)、柳杉属(Cryptomeria)、链格孢属(Alternaria)、桤木属(Alder)、赤杨属(Alinus)、桦木属(Betula)、栎属(Quercus)、木犀榄属(Olea)、蒿属(Artemisia)、车前属(Plantago)、墙草属(Parietaria)、小蠊属(Blatella)、蜜蜂属(Apis)、柏属(Cupressus)、桧属(Juniperus)、金钟柏属(Thuja)、扁柏属(Chamaecyparis)、大蠊属(Periplanet)、冰草属(Agopyron)、黑麦属(Secale)、小麦属

(Triticum)、鸭茅属(Dactylis)、羊茅属(Festuca)、早熟禾属(Poa)、燕麦属(Avena)、绒毛草属(Holcus)、黄花茅属(Anthoxanthum)、燕麦草属(Arrhenatherum)、剪股颖属(Agrostis)、梯牧草属(Phleum)、藜草属(Phalaris)、雀稗属(Paspalum)、高粱属(Sorghum)和雀麦属(Bromis)。

[0098]应理解,本发明的组合物、蛋白质结合物和DNA疫苗可与其他用于治疗特定病症(如感染性疾病、癌症或自身免疫病症)的疗法组合。例如在癌症的情况下,本发明方法可与化疗或放射疗法组合。

[0099]制备作为疫苗的组合物的方法为本领域技术人员所公知。蛋白质结合物或DNA的有效量不但可凭经验确定,而且可以在动物模型中的免疫有效量为根据。应考虑的因素包括抗原性、制剂、施用途径、施用的免疫剂量的数量、个体的身体健康状况、体重和年龄等。这类因素为本领域技术人员所公知,并且可由本领域技术人员确定(参见,例如 Paoletti 和 McInnes 编辑, Vaccines, from Concept to Clinic: A Guide to the Development and Clinical Testing of Vaccines for Human Use CRC Press (1999))。如本文所公开,应理解,主题DNA或蛋白质结合物可单独施用或与其他佐剂结合施用。此外,主题佐剂可添加至现有疫苗或与其结合施用以增强它们的效力。例如,这些佐剂可用于增强病毒疫苗(如最近批准的用于宫颈癌的HPV疫苗)的效力。它们也可与其他佐剂组合。

[0100]本发明的DNA和蛋白质结合物可通过本领域已知的任何方法局部或全身施用,所述方法包括但不限于肌内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、鼻内、口服或其他粘膜途径。其他的途径包括颅内(例如脑池内或室内)、眶内、眼、囊内、椎管内和局部施用。本发明的佐剂和疫苗组合物可以在适当的非毒性药物载体中施用,或可以在微囊或持续释放的植入物中配制。本发明的免疫原性组合物可多次施用(若需要)以维持期望的细胞免疫反应。适当的途径、制剂和免疫时间表可由本领域技术人员确定。

[0101]在本发明的方法中,一些例子的抗原和1型IFN/CD40激动

剂结合物可单独施用或组合在相同的制剂中。在一些例子中，包括若干抗原可能是有用的。这些组合物可单独施用或以实现期望的细胞免疫协同增强的任何顺序组合施用。通常，这些组合物在相互的短时间内，即在相互的约几天或几小时内、更通常在约半小时至1小时内施用以促进治疗方案。

[0102] 在一些例子中，在结合物或 DNA 中包括促进亲和纯化的部分可能是有益的。这种部分包括相对小的分子，其不会干扰结合物中多肽的功能。可选择地，标签可通过裂解去除。这类标签的例子包括多组氨酸标签、血凝素标签、麦芽糖酶结合蛋白、凝集素、谷胱甘肽-S 转移酶、抗生物素蛋白等。其他适合的亲和标签包括 FLAG、绿色荧光蛋白 (GFP)、myc 等。

[0103] 主题佐剂组合和蛋白质或 DNA 结合物与生理上可接受的载体如生理盐水一起施用。组合物也可包括另一种载体或赋形剂，如缓冲剂 (例如柠檬酸盐、磷酸盐、醋酸盐和碳酸氢盐)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂类、蛋白质 (如血清白蛋白)、乙二胺四乙酸、氯化钠或其他盐、脂质体、甘露醇、山梨醇、甘油等。本发明的试剂可根据相应的施用途径以各种方法配制。例如可制备液体制剂用于摄取 (ingestion) 或注射，可制备凝胶或程序 (procedure) 用于摄取、吸入或局部应用。用于制备这些制剂的方法众所周知的，并且可参见例如 "Remington's Pharmaceutical Sciences," 第 18 版, Mack Publishing Company, Easton Pa.

[0104] 如所述，本发明包括以 DNA 为基础的疫苗。这些 DNA 可以以裸露 DNA 施用，或可包含在表达载体中。此外，主题核酸序列可在移植物的移植之前引入至移植物的细胞中。这种 DNA 优选是人源化的以促进在人受试者中的表达。

[0105] 主题多肽结合物可进一步包括 "标记 (marker)" 或 "报告子 (reporter)"。标记或报告子分子的例子包括 β 内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶、腺苷脱氨酶、氨基糖苷磷酸转移酶、二氢叶酸还原酶、潮霉素 B-磷酸转移酶、胸苷激酶、lacZ 和黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶

等。

[0106]主题核酸构建体可包含于能指导其表达的任何载体中，例如用载体转导的细胞。由于发明人具有非常多的使用杆状病毒载体的经验，他们在本文示例了这种载体。可使用的其他载体包括在细菌中使用的以 T7 为基础的载体、酵母表达载体、哺乳动物表达载体、病毒表达载体等。病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关的载体、疱疹病毒、猿猴病毒 40 和牛乳头状瘤病毒载体。

[0107]可用于促进主题多肽结合物的表达的原核和真核细胞包括例如微生物、植物和动物细胞，例如原核生物 (prokaryote)，如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等；昆虫细胞，如 Sf21 细胞；酵母细胞，如酵母菌属、念珠菌属、克鲁维酵母属、裂殖酵母菌属 (*Schizosaccharomyces*) 和毕赤酵母菌属；以及哺乳动物细胞，如 COS、HEK293、CHO、BHK、NIH 3T3、HeLa 等。本领域技术人员可容易地选择适当的用于特定表达系统的组份，所述组份包括表达载体、启动子、选择标记以及适于期望细胞或生物体的类型。各种表达系统的选择和使用可参见例如 Ausubel 等，"Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, N.Y. (1993)；以及 Pouwels 等，Cloning Vectors: A Laboratory Manual", 1985 Suppl. 1987) 中。还提供了包含并且表达主题 DNA 构建体的真核细胞。

[0108]在细胞移植的情况下，细胞可通过移植程序或用导管介导的注射程序通过血管壁来施用。在一些情况下，细胞可通过释放进入脉管系统来施用，细胞随后从所述脉管系统通过血流分布和/或迁移进入周围组织。

[0109]主题多肽结合物或 DNA 构建体包含或编码激动性抗 CD40 抗体或 CD40L 或其片段，所述片段特异性结合或激动 CD40 和 CD40L 的结合，优选鼠科或人 CD40。从广义上看，本文所用的术语"抗体"用于包括多克隆和单克隆抗体及其抗原结合片段。这包括，例如 Fab、F(ab')₂、Fd 和 Fv 片段。

[0110]此外，术语"抗体"包括天然抗体和非天然存在的抗体如单

链抗体、嵌合抗体、双功能和人源化抗体。优选用于本发明的是嵌合、人源化和完全人抗体。用于合成嵌合、人源化、CDR 嫁接的、单链和双功能抗体的方法为本领域技术人员众所周知。此外，特异针对 CD40 的激动性抗体是广为人知的且可获得的，并且可以通过用 CD40 抗原（优选人 CD40）免疫适合的宿主来制备。

[0111] 抗鼠 CD40 抗体 (FGK45) 的使用在实施例中示例。选择这种抗体，是因为抗人 CD40 抗体不会特异性结合鼠科 CD40 并且体内研究使用啮齿动物。在人治疗的情况下，所选的激动性 CD40 抗体特异性结合人 CD40。特异针对人 CD40 的激动性 CD40 抗体在本领域中也是已知的，并且可通过已知方法来制备。可选择地，CD40 激动剂可包含 CD40L 的片段或包含前述的融合蛋白，其激动人 CD40 与 CD40L 的相互作用。

[0112] 如所述，本发明的协同组合包含至少一种 1 型干扰素或其片段或变体，所述片段或变体与 CD40 激动剂协同作用以诱导在 CD8⁺ DC 上的 CD70 表达并且诱发体内 CD8⁺ T 细胞的有效扩增。这包括，例如 α 干扰素、 β 干扰素、 ω 干扰素、 τ 干扰素、 ζ 干扰素和 ϵ 干扰素等及其功能性变体和片段。

[0113] 应理解，在本文提供的本发明定义内也提供了不会实质上影响本发明各种实施方案的活性的变更。

发明人的理论

[0114] 如上所述，迄今测试的所有 TLR 激动剂与抗 CD40 协同作用诱导 CD8⁺ T 细胞免疫。但是，观察到一些 TLR 激动剂/抗 CD40 组合（对于 TLR 3、7、9）展示为增强 CD8⁺ T 细胞扩增对 I 型干扰素 (IFN α β) 有极大的依赖性，而其他 TLR/CD40 激动剂组合（对于 TLR2 和 5）则没有。令人惊奇的是，CD4 细胞的缺失消除了来自 TLR3-或-7/CD40 激动剂组合的产生 CD8⁺ T 细胞反应的 IFN α β 需求。这些数据共同地向发明人表明在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫后 IFN α β 和 CD4 细胞在调节 CD8⁺ T 细胞反应中的作用。

[0115] 基于这些观察，发明人猜测 DC 上的 TNF 配体的诱导依赖于或独立于 IFN α β ，且这决定了随后 CD8⁺ T 细胞反应对 IFN α β 的依

赖性。因为可通过 CD4 缺失恢复 IFN α β 依赖性 CD8⁺ T 细胞反应，所以猜测通过调节 T 细胞负面影响 CD70 在 DC 上的表达或 CD8⁺ T 细胞反应。因此我们提出了一个机制，藉此，在组合的 TLR (3、7 或 9)/CD40 激动剂免疫后，IFN α β 通过完成一种或多种下列功能来影响 CD8⁺ T 细胞反应：i) 直接扩增对含有 CD70 的 APC 的 CD8⁺ T 细胞反应 (CD8 T 细胞中心)；ii) 直接活化 DC 以表达 TNF 配体 (DC 中心)；iii) 抑制抗 APC TNF 配体表达或 CD8⁺ T 细胞扩增的调节 CD4⁺ T 细胞活性 (Treg 中心)。与抗 CD40 的在诱导 CD8⁺ T 细胞扩增中的协同活性是所有检测的 TLR 激动剂的特性，所述 TLR 激动剂目前包括 TLR 1/2、2/6、3、4、5、7 和 9 的激动剂。这些数据共同地证实了组合的 TLR/CD40 激动剂免疫可重建所有必需的信号以诱发有效的初级 CD8⁺ T 细胞反应。

[0116]为确定 TLR 和 CD40 之间协同作用的细胞和分子需求，通过阻断或用抗体缺失在敲除小鼠和/或缺失各种细胞类型或因子的小鼠中进行很多实验。这些研究证实了完整的 CD40 和 TLR 信号转导途径的必要性 (使用 CD40 KO 和 MyD88 KO 小鼠)。尽管这种协同作用不依赖于 CD4 细胞、IFN γ 、IL-12 或 IL-23，但是观察到协同作用对 IFN α β 的可变的依赖性取决于所用的 TLR 激动剂。Ahonen, C. L., C. L. Doxsee, S. M. McGurran, T. R. Riter, W. F. Wade, R. J. Barth, J. P. Vasilakos, R. J. Noelle 和 R. M. Kedl. 2004. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8⁺ T cell expansion with variable dependence on type I IFN *J Exp Med* 199:775。观察到对 IFN α β 的依赖性程度似乎与给定的 TLR 诱导 IFN α β 的量相关。因此，用抗 CD40 与 TLR 3、7 或 9 的激动剂组合免疫的 IFN α β 受体敲除 (IFN α β R KO) 小鼠未能产生 CD8⁺ T 细胞反应。相反地，用抗 CD40 与 TLR 2 或 5 的激动剂组合免疫的 IFN α β R KO 小鼠确实产生 CD8⁺ T 细胞反应。如在随后的实施例中所示，这些数据向发明人表明 IFN α β 潜在地可能在产生适应性免疫中起远大于先前所认识的作用。

[0117]在开始时，应强调 IFN α β 在产生 T 细胞反应中的精确作用很难预测与阐明。这种困难部分是由于 IFN α β 对 T 细胞功能的很

多影响似乎是间接的。IFN α β 增强了 APC 活化的很多方面, 包括 MHC 分子在大多数细胞类型上的提高。Tough, D. F. 2004. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma* 45:257; Le Bon, A. 和 D. F. Tough. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 14:432. 最近, 已显示 IFN α β 促进外源性抗原的 APC 加工进入 I 类途径 - 称为交叉敏化 (cross-priming) 的过程。Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow 和 D. F. Tough. 2003. Cross-priming of CD8⁺ T cell stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 4:1009. 这允许在施用外源性蛋白抗原后产生 CD8⁺ T 细胞反应。IFN α β 也对 T 细胞活化和增殖有其他的影响。高水平的 IFN α β 也诱导幼稚 CD8 T 细胞的部分活化以及记忆性 CD8 T 细胞的增殖。Tough, D. F., S. Sun, X. Zhang 和 J. Sprent. 1999. Stimulation of naive and memory T cell by Cytokines. *Immunol Rev* 170:39; Sprent, J., X. Zhang, S. Sun 和 D. Tough. 2000. T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:317; Sprent, J. 2003. Turnover of memory-phenotype CD8⁺ T cell. *Microbes Infect* 5:227; Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough 和 J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cell in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591; Tough, D. F. 和 J. Sprent. 1998. Bystander stimulation of T cell in vivo by cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 63:123.

[0118] IFN α β 对幼稚 T 细胞的影响可部分通过 APC 介导, 尽管 IFN α β 直接刺激幼稚 T 细胞存活。Marrack, P., J. Kappler 和 T. Mitchell. 1999. Type I interferons keep activated T cell alive. *J Exp Med* 189:521; Marrack, P., T. Mitchell, J. Bender, D. Hildeman, R. Kedl, K. Teague 和 J. Kappler. 1998. T-cell survival.

Immunol Rev 165:279。这种存活活性依赖于 T 细胞中的 STAT1, 表明必须涉及 T 细胞中的直接 IFN α β 信号转导。Marrack, P., J. Kappler 和 T. Mitchell. 1999. Type I interferons keep activated T cell alive. *J Exp Med* 189:521。最近, 已经显示 IFN α 直接作用于幼稚 CD8⁺ T 细胞(与抗原和 B7 介导的共刺激相呼应)以促进增殖、效应子功能和记忆的发展。Curtsinger, J. M., J. O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins 和 M. F. Mescher. 2005。

[0119] I 型 IFN 提供了对 CD8 T 细胞的第三信号以刺激克隆扩增和分化。 *J Immunol* 174:4465。相比之下, 别人已证实 IFN α β 对 CD8⁺ 记忆性 T 细胞的增殖的影响是间接的。这种增殖通过从其他细胞类型产生 IL-15 而发生, 并且选择性诱导记忆性 CD8 而不是 CD4 T 细胞的增殖。Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough 和 J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cell in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591; Sprent, J., X. Zhang, S. Sun, 和 D. Tough. 1999. T-cell turnover in vivo and the role of cytokines. *Immunol Lett* 65:21。因此, 在 T 细胞活化和增殖的启动中, 已经观察到 IFN α β 对 T 细胞的间接和直接影响。

[0120]相比之下, 关于 I 型 IFN 对调节 T 细胞的发展和功能的影响的数据极少。一份报告证实使用 IFN α 和 IL-10 的组合可体外产生人调节细胞。Levings, M. K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt 和 M. G. Roncarolo. 2001. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 166:5530。

[0121]如上文所述, 且由遵循以下发明性发现的实施例中的数据支持: 1 型干扰素和 CD40 激动剂组合诱发细胞免疫上的协同效应并且上调树突状细胞上的 CD70 并且提供 CD8⁺ T 细胞的指数扩增, 允许更有效的对抗某些疾病的疫苗的开发, 所述疾病的治疗似乎需要主题新型佐剂组合诱发的细胞免疫的数量和质量。

[0122]出于示例的目的，提供下列实施例。但是应理解，本发明的范围由权利要求确定。

在某些下列实施例中使用的材料与amp;方法

[0123]C57BL/6、IFN α β R KO 或 CD4 缺失的 IFN α β R KO 小鼠用模型抗原免疫。简要来说，与 TLR 激动剂(50 μ g Pam3Cys、25 μ g MALP-2、100 μ g PolyIC、150 μ g 27609、50 μ g CpG 1826 或 25 μ g 鞭毛蛋白)、抗 CD40 抗体 FGK45(50 μ g)或两者组合，i.p.注射 0.1-0.5 mg 全蛋白(卵清蛋白或 HSV 糖蛋白 B[HSVgB])或 50 μ g 肽(对于卵清蛋白为 SIINFEKL，对于 HSVgB 为 SSIFFARL，对于痘苗病毒 B8R 为 TSYKSEFV)。卵清蛋白购自 Sigma Corporation (St. Louis, MO)，并且如前所述，使用 TritonX-114 LPS 解毒方法学去除污染的 LPS。Adam, O., A. Vercellone, F. Paul, P. F. Monsan 和 G. Puzo. 1995. A nondegradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides. *Anal Biochem* 225: 321。如前所述并由宾西法尼亚大学的 Dr. Roselyn Eisenberg 友好提供，全 HSVgB 蛋白通过在杆状病毒中表达和在镍柱上纯化来制备。Bender, F. C, J. C. Whitbeck, M. Ponce de Leon, H. Lou, R. J. Eisenberg 和 G. H. Cohen. 2003. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol* 77: 9542。所用的 TLR 激动剂如通过材料运送协议(27609-3M Pharmaceuticals)提供的购买(Pam3Cys-InVivogen、MALP-2-Alexis Biochemicals、PolyIC-Amersham/GE Healthcare、CpG 1826-Invitrogen)，或内部合成(鞭毛蛋白)。已经通过 Limulus 测定法针对 LPS 污染测试每种 TLR 激动剂，并且发现体内注射量的 LPS 活性少于 5 IU(约 50-300 ng)。注射这种量的 LPS 对体内脾树突状细胞没有可观察到的影响(数据未显示)。在内部分离的鞭毛蛋白的情况下，使用如上所述的用于卵清蛋白解毒的相同方案去除污染的 LPS。

[0124]选择这些 TLR 激动剂用于我们的实验出于两个主要原因。其一，次级淋巴组织中的主要 DC 亚群是 CD8⁺和 CD11b⁺DC，且它们表

达共同的和独特的 TLR。所选的 TLR 激动剂直接刺激 CD8⁺ DC (PolyIC-TLR3)、CD11b⁺ DC (27609-TLR7 和鞭毛蛋白-TLR5) 或两种 DC 亚群 (Pam3Cys/MALP-2、TLR2 刺激)。其二, 所选的分子代表与抗 CD40 组合用于诱导 CD8⁺ T 细胞反应的 TLR 激动剂, 所述激动剂为 IFN α β 依赖性 (polyIC、27609、CpG 1826) 或 IFN α β 不依赖性 (Malp-2、Pam3Cys、鞭毛蛋白)。

[0125] 在有或没有阻断 CD70 (FR70)、OX40L/CD134 (RM134L) 或 41BBL/ CD137L (TKS-1) 的抗体的共施用下, 进行所述的免疫。每 2 天 i. p. 施用 250 μ g 抗体足以阻断这些配体/受体相互作用的各种相互作用 (参见图 5)。使用这种方案进行阻断实验, 之后类似的实验用于确定产生对 CD8⁺ T 细胞反应的影响 (如果有) 所必需的阻断抗体的最小量。

[0126] 为了监控抗原特异性 CD8⁺ T 细胞反应, 免疫后 5-7 天, 将外周血和/或脾细胞分离, 并且如先前所述用 H-2K^b/SIINFEKL 或 H-2K^b/SSIFFARL MHC 四聚体染色。Kedl, R. M., M. Jordan, T. Potter, J. Kappler, P. Murrack 和 S. Dow. 2001. CD40 stimulation accelerates deletion of tumor-specific CD8(+) T cell in the absence of tumor-antigen vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10811; Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler 和 P. Murrack. 2000. T cell Compete for Access to Antigen-bearing Antigen-presenting Cells. *J. Exp. Med.* 192:1105; Kedl, R. M., B. C. Schaefer, J. W. Kappler 和 P. Murrack. 2002. T cell down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. 3: 27. 通过作为细胞的效应子细胞因子产生能力的指示剂 (indicator) 的细胞内干扰素 γ (IC IFN γ) 染色, 分析 CD8⁺ T 细胞。IC IFN γ 染色已在文献中广泛利用, 且如所述进行。此外, 作为抗原特异性溶解功能的指示, 分析抗原刺激后的 CD107a 表达。CD 107a (LAMP-1) 是溶解颗粒 (lytic granule) 的膜蛋白成分, 并且抗原刺激后其在 T 细胞的质膜上的识别是溶解颗粒的胞吐作用的指示。如先前所述进行组合的四

聚体和 CD107a 染色。简要来说, 在 37°C 下用 MHC 四聚体温育细胞 30 分钟。然后加入抗原性肽 (1 ug/ml) 和抗 CD107a- FITC 抗体持续一个小时, 之后由于抗体结合的 CD107a 内化至溶酶体, 将 1 ug/ml 莫能菌素 (monensin) 加至细胞以抑制 FITC 荧光的破坏。在 37°C 下将细胞再温育 3-4 小时, 用抗 CD8 的抗体染色, 冲洗, 固定并且用 FACS 分析。如上所述, 在组合的 TLR2-或-5/CD40 激动剂免疫期间 IFN α β R KO 小鼠同样地用 CD70、41BBL、OX-40L 和 CD30L 的阻断抗体注射。CD8⁺ T 细胞反应的量级和功能通过如上所述的四聚体和 IC IFN γ 染色以及 PBL 和/或脾细胞的 FACS 分析来测定。

[0127] 为了测定初次免疫期间 TNF 配体对记忆性 CD8⁺ T 细胞的发展的阻断的影响, 使免疫小鼠休息至少 60 天, 用相同免疫再激发, 且如上所述分析次级反应。在 IFN α β R KO 小鼠、CD4 缺失的 IFN α β R KO 小鼠中进行实验, 正常和 CD4 缺失的 B6 小鼠作为对照。在完整的 IFN α β R KO 小鼠中分析产生 IFN α β 依赖性 CD8⁺ T 细胞反应的 TLR/CD40 组合。在 CD4 缺失的 IFN α β R KO 小鼠中, 测试 IFN α β 依赖性和 IFN α β 独立性的 TLR/CD40 组合两者。在初次免疫后, 使代表性 CD4 缺失的和免疫的小鼠休息至少 60 天, 然后通过组合的 TLR/CD40 激动剂免疫再激发。这些实验用于确定在 IFN α β 缺陷型 (CD4 缺失或未缺失) 宿主免疫后初级和记忆性 CD8⁺ T 细胞反应是否依赖于 CD70 和/或其他 TNF 配体。

实施例 1 :

在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫后 CD8⁺ T 细胞扩增证实对 IFN α β 的可变的依赖性

[0128] 当所有 TLR 激动剂与抗 CD40 协同以促进 CD8⁺ T 细胞扩增时, 发明人观察到从某些 TLR 激动剂/抗 CD40 组合中诱发的 CD8⁺ T 细胞反应完全依赖于 IFN α β 。基于此, 如上所述在包含于图 1 和 2 中的实验中, 在不同组合的 TLR/CD40 激动剂的情况下, 发明人用肽抗原免疫干扰素 α β 受体敲除 (IFN α β R KO) 小鼠。

[0129] 在包含于图 1 中的实验中, 组合的 TLR/CD40 激动剂施用之

后,在用卵清蛋白肽、抗 CD40 和指示的 TLR 激动剂免疫的 agomice (底行) 中测量 CD8⁺ T 细胞扩增。7 天后,通过四聚体染色和 FACS 分析在脾中测量卵清蛋白特异性 T 细胞反应。在右上象限的数目表示四聚体染色细胞占总 CD8⁺ 细胞的百分比。

[0130]在包含于图 2 中的实验中,显示在用 IFN α β 依赖性 TLR 激动剂与激动性抗 CD40 的组合免疫后,IFN α β R KO 宿主的 CD4 缺失恢复了 CD8⁺ T 细胞反应。如图 2 所示,WT 和 IFN α β R KO 小鼠(CD4 缺失的或未缺失的)用 HSV-1 肽、激动性抗 CD40 抗体和 polyIC 免疫。7 天后,HSV-1 特异性反应通过四聚体(A)和 IC IFN γ (B) 染色的 PBL 细胞来测定。

[0131]如包含于图 2 中的结果所示,对用 TLR 3、7 或 9 激动剂与抗 CD40 组合的免疫的 CD8⁺ T 细胞反应在这些小鼠中完全消除(图 2)。相比之下,对剩余的 TLR/CD40 激动剂组合的 CD8⁺ T 细胞反应仅仅部分依赖于(TLR4/CD40)或相对独立于(TLR2/6/CD40 激动剂)IFN α β (图 1)。在其他实验中,TLR1/2 激动剂 Pam3Cys 和 TLR5 激动剂鞭毛蛋白当与抗 CD40 组合使用时,在 IFN α β R KO 小鼠中也产生与 Wt 小鼠相当的 CD8⁺ T 细胞反应(数据未显示)。这些结果证实与 TLR 2 或 5 激动剂组合的抗 CD40 诱发 IFN α β 独立性 CD8⁺ T 细胞反应,而与 TLR 3、7 或 9 激动剂组合的抗 CD40 诱发 IFN α β 依赖性 CD8⁺ T 细胞反应。因此,可认为 TLR 2 或 5 激动剂与 CD40 途径的协同作用是 IFN α β 独立性的。相反,可认为 TLR 3、7 或 9 激动剂与 CD40 途径的协同作用是 IFN α β 依赖性的。这些数据向发明人表明 IFN α β 通过信号转导直接经由 T 细胞、含有抗原的 APC 或两者在产生 CD8⁺ T 细胞反应中的作用。

[0132] 实施例 2

在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫后 CD8⁺ T 细胞扩增在 CD4 缺失的 IFN α β R KO 宿主中恢复

[0133]在 IFN α β R KO 小鼠中受限的 CD8⁺ T 细胞反应似乎向发明人表明 IFN α β 在通过上述的某些 TLR/CD40 激动剂组合诱发的反应中的主要作用。如在图 2 的实验中所示,在与组合的 TLR/CD40 激动剂结

合的肽免疫前 1 天，通过注射抗 CD4 抗体 GK1.5 使 Wt 和 IFN α β R KO 小鼠缺失 CD4⁺T 细胞(图 2)。在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫后 7 天，处死小鼠，并且分离 PBL 和脾细胞，然后通过四聚体和细胞内 IFN γ 染色分析。用肽和 PolyIC/抗 CD40 的免疫未能在 IFN α β R KO 小鼠中产生 CD8⁺T 细胞反应。但是，就抗原特异性 T 细胞的数目(占总 CD8⁺T 细胞的百分比，图 2A)和功能(图 2B)而言，CD4 缺失在 IFN α β R KO 小鼠中恢复了 CD8⁺T 细胞反应。这对测试的所有 TLR/CD40 激动剂组合(TLR 2、5 和 7)是真实的，其中对 IFN α β 独立性 TLR/CD40 激动剂组合(即 TLR2)的 CD8⁺T 细胞反应甚至比没有 CD4 缺失的对照增强(数据未显示)。因此，在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫后，IFN α β R KO 小鼠中的 CD8⁺T 细胞反应在 CD4 缺失后增强。

[0134]发明人对这些发现关心的是：它们是否是生理上相关的或仅仅是对 IFN α β R KO 宿主是唯一的。因此在有和没有 CD4 缺失下，在使用阻断 IFN α β 的多克隆兔抗 IFN 抗体的 wt 宿主中进行了实验。

[0135]如在图 3 中所示，抗 IFN 阻断 PolyIC/CD40 介导的 CD8 反应，所述反应通过 CD4 缺失而恢复。在此实验中，在有和没有抗 IFN 和/或 CD4 缺失下，使小鼠免疫抗卵清蛋白(组合的 PolyIC/抗 CD40)。在第 7 天，针对百分比抗原特异性 T 细胞通过在上述材料与方法中所述的四聚体染色来分析 PBL。

[0136]如在图 3 中所示，对于用组合的 PolyIC/ α CD40 免疫的 wt 小鼠，抗 FN α β 抗体显著减少 CD8⁺T 细胞反应的量级(图 3)。与在 IFN α β R KO 小鼠中看到的结果一致，抗 IFN 处理的小鼠的 CD4 缺失完全恢复 CD8⁺T 细胞反应。因此，在 IFN α β R KO 宿主和在用 IFN α β 缺失的抗体注射的 wt 宿主中，在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫之后，CD4 缺失似乎减轻了 CD8⁺T 细胞反应对 IFN α β 的依赖性。这些结果向发明人表明：1) 在用某些 TLR/CD40 激动剂组合免疫后，CD4⁺T 细胞亚群调节 IFN α β R KO 小鼠中的 CD8⁺T 细胞反应；2) 在用这些 TLR/CD40 激动剂组合免疫后，IFN α β 可在抑制该 CD4⁺T 细胞群的调节能力中起作用；和 3) 其他 TLR/CD40 激动剂组合(例如 TLR2 或 5)

能避免由调节 CD4⁺ T 细胞以 IFN α β 独立性的方式的抑制。

[0137] 这些结果证实组合的 TLR/CD40 激动剂免疫能诱发有效的初级和次级 CD8⁺ T 细胞反应，所述细胞反应取决于所用的 TLR 激动剂显示对 IFN α β 令人感兴趣的可变的依赖性。这些发现向发明人表明 IFN α β 在 CD8⁺ T 细胞反应中的作用比先前所认识的更直接。也显示，组合的 TLR/CD40 激动剂免疫独特地诱导了 CD70 在 DC 上的上调，其中在 WT 小鼠中随后的 CD8⁺ T 细胞反应似乎主要依赖于 CD70。这些初步数据表明 CD70 在活化的 APC 上表达的增加以及随后抗原特异性 T 细胞通过 CD27 的刺激是，对组合的 TLR/CD40 激动剂免疫响应的 CD8⁺ T 细胞反应的形成和存活的主要检测点。然而，更令人惊奇的是，我们观察到通过缺失宿主的 CD4⁺ T 细胞，可以拯救 IFN α β R KO (图 2) 和 WT 小鼠 (图 3) 中的 IFN α β 依赖性 CD8⁺ T 细胞反应。这些结果表明 IFN α β 影响 CD8⁺ T 细胞反应可能是出于以下原因：1) 调节 CD8⁺ T 细胞对表达 TNFL 的 APC 的反应；2) 调节 APC 活化和 TNF 配体表达；3) 抑制 CD4⁺ T 细胞调节功能，所述功能抑制 TNF 配体的 APC 表达或对含有 TNFL 的 APC 响应的 CD8⁺ T 细胞扩增；4) 上述的任何组合。下列实施例通过系统性检测以下内容最终确定这些假设的准确性：i) IFN α β 在介导 CD8⁺ T 细胞反应中的作用；ii) IFN α β 在 DC 活化中的作用；以及 iii) IFN α β 在 CD4⁺ 调节细胞功能中的作用，所有检测都在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫之后。

[0138] 实施例 3

用于 IFN α β R KO 中的 CD8⁺ 反应的 TNF 配体的作用

[0139] 如在包含于图 4 中的实验所示，WT 小鼠中通过组合的 TLR/CD40 激动剂免疫产生的 CD8⁺ T 细胞反应依赖于 CD70 (参见图 4)。在此实验中，在组合的 TLR/CD40 免疫之后，在缺失 CD4 的 IFN α β R KO 宿主中测定 CD8⁺ T 细胞反应，并且结果显示其主要依赖于 CD70。IFN α β R KO 小鼠缺失 CD4 细胞，并且如上所述用 HSV-1 肽、PolyIC 和抗 CD40 抗体免疫。然后，如在图 1 中，小鼠用抗 TNF 配体抗体注射。在第 7 天，再通过四聚体染色分析 PBL。

[0140]如在前述实验中所示, IFN α β R KO 小鼠中的 CD8⁺ T 细胞反应是独特的, 因为该细胞反应仅可通过不刺激 IFN α β 的 TLR/CD40 激动剂组合或在 TLR/CD40 激动剂免疫之前通过 IFN α β R KO 宿主的 CD4 缺失来诱发。图 4 中的结果进一步表明 CD70 在 IFN α β R KO 小鼠的 CD8⁺ T 细胞反应中起必要的作用。应注意, 虽然在此实验中抗 CD70 阻断了反应约 10 倍, 但是其他 TNFL 抗体抑制了 CD8⁺ T 细胞反应仅达 2 倍。这表明与 wt 小鼠(图 1)不同, 多 TNF 配体可能对 IFN α β R KO 小鼠中的 CD8⁺ T 细胞反应的量级至少有一些影响。图 4 中显示的数据是用最小量的阻断抗体注射达到的。

[0141] 实施例 4

材料与amp;方法

[0142]最早由 Southampton General Hospital 的 Dr. Aymen Al-Shamkhani 描述的 (Rowley, T. F. 和 A. Al-Shamkhani. 2004. Stimulation by soluble CD70 promotes strong primary and secondary CD8⁺ cytotoxic T cell responses in vivo. *J Immunol* 172: 6039), 可溶性 CD70/Ig 融合蛋白 (sCD70Ig) 的注射通过体内 CD27 成功提供了 T 细胞的激动性刺激物。由 Dr. Al-Shamkhani 友好提供的这种试剂与 TLR 和 CD40 刺激组合注射入 IFN α β R KO 宿主中。开始, 我们尝试通过额外注射 sCD70Ig 试剂来拯救对 IFN α β 依赖性 TLR/CD40 激动剂组合的 CD8⁺ T 细胞反应。在起初抗原激发后第 7 天, 再次分析 CD8⁺ T 细胞反应。Dr. Al-Shamkhani 的实验室的数据已确定: 在抗原激发后第 2-4 天每天 250 ug sCD70Ig 的注射为 CD8⁺ T 细胞扩增提供了最佳的 CD70 介导的信号(私人交流)。我们已证实 sCD70Ig 注射的这一时程在 WT 小鼠中增加了对单独的 TLR 激动剂的 CD8⁺ T 细胞反应(数据未显示)。用抗原和 TLR 激动剂、抗 CD40 或两者在第 0 天 i. p. 激发小鼠。在抗原注射后第 2、3、和 4 天, 我们 i. p. 注射 250 ug sCD70Ig, 然后在初次抗原激发后第 7 天分析血液和/或脾中的 CD8⁺ T 细胞反应。

[0143]根据在图 4 中显示的数据, 清楚的是, IFN α β R KO 宿主

的 CD4 缺失使它们对 TLR/CD40 刺激的任何组合反应。如在图 4 中所示, CD70 阻断消除了 TLR 激动剂和 CD40 激动剂之间诱导 CD8⁺ T 细胞反应的协同作用。在实验中, 小鼠用抗 CD40⁺/TLR-激动剂的指定组合激发。小鼠的代表性亚群用抗 CD70 阻断抗体 FR70 注射(下层的圆点图)。图 4A 显示了代表性四聚体染色, 图 4B 显示了每组 3 只小鼠的平均值和标准偏差, 并且图 4C 显示了其中小鼠如在 5A 中所述进行免疫, 但给予抗 CD70 的 0、1 或 2 次注射。在 24 小时分离 DC, 并且分析每个亚群中的 DC 数(顶部图)和 CD70 染色(底部图)。

[0144]可看到, 在组合的 TLR/CD40 激动剂免疫后 WT 小鼠中的 CD8⁺ T 细胞反应依赖于 CD70(图 4)。上述的以及在图 4 中显示的数据表明对于至少缺失 CD4 的 IFN α β R KO 宿主而言也是这样的。在图 4 中的结果也表明多 TNF 配体可在不同程度上参与 IFN α β R KO 宿主中的 CD8⁺ T 细胞反应。

[0145] 实施例 5

[0146]在 wt 小鼠中在重组 IFN α +/-抗 CD40 后的免疫细胞反应

[0147]为了在用 IFN α β 依赖性 TLR/CD40 激动剂组合免疫后确定单独的 IFN α β 的作用是否足以诱发 CD8⁺ T 细胞扩增, 使用下列材料与完成实验。

材料与方法

[0148]简要说, 从 PolyIC 刺激的 B 细胞 cDNA 中克隆新型 IFN α 序列。在诱导的亚型中选择 IFN α 亚型, 因为它没有糖基化序列, 因此可在昆虫细胞中表达而不必担心异常的糖基化。出于亲和纯化目的, 将 TCR C α 表位标签加至 C 末端, 并且将该序列克隆入 pBac 载体 (Invitrogen) 的 p10 启动子部位。产生重组杆状病毒, 并且在感染 Hi5 细胞后, 通过亲和和尺寸色谱法从上清液纯化重组 IFN α 。基于 I 类 MHC 在 APC 上的上调, 在体外和体内证实 IFN α 的活性(数据未显示)。

[0149]先前已公开重组 IFN α 在疫苗环境 (vaccine setting) 中的用途 (Le Bon, A. 和 D. F. Tough. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*

14: 432) 并且类似的方案最初用于在此提出的研究中。野生型小鼠用与 10^4 - 10^6 单位的 IFN α 结合的抗原和抗 CD40 如上所述进行引发。然后将所得到的 CD8⁺ T 细胞反应与用组合的 TLR (3、7 或 9) /CD40 激动剂免疫的小鼠比较, 以确定是否 IFN α 可以与抗 CD40 协同作用达到与诱发 CD8⁺ T 细胞扩增的 TLR 刺激相同的程度。其他对照小鼠仅用 IFN α 或抗 CD40 注射。如上所述, 分析 CD8⁺ T 细胞反应。

[0150] 如在包含于图 5 中的实验中所示, 所得的数据显示重组 IFN α 和抗 CD40 在免疫上有协同效应。在 3 次注射 1×10^5 单位 IFN、单次注射 1×10^6 单位 IFN、单独的抗 CD40 或与任一 IFN 给药方案结合的抗 CD40 的情况下小鼠用抗原免疫。单独的 IFN 或 CD40 刺激可检测的 CD8⁺ T 细胞反应, 而组合的 IFN/CD40 协同作用产生与对 PolyIC/CD40 免疫响应所观察到的类似的 CD8⁺ T 细胞反应 (图 5)。

[0151] 更特别地, 这个实验揭示了 1 型干扰素和激动性 CD40 抗体的组合施用与单独任一者的施用相比, 诱导抗原特异性 CD8⁺ 和 T 细胞的指数扩增。小鼠用卵清蛋白和抗 CD40、poly IC 或重组 IFN 的指定组合 i. p. 注射。对于 IFN 注射, 给予小鼠 3 次连续的每日 1×10^5 单位 IFN 的注射 (从抗原注射的那天开始), 或抗原注射的同时单一注射 1×10^6 单位 IFN。7 天后, 处死小鼠, 并且来自外周血液或脾的细胞用四聚体进行染色, 以鉴别卵清蛋白特异性 CD8⁺ T 细胞的扩增的量级。通过 FACS 分析细胞, 并且在 CD8+B220 事件上对显示的数据门控 (gated)。在图 5-(A) 中是四聚体染色的圆点盘, 图 5(B) 是两个百分比四聚体和血液中 CD8⁺ 细胞占总 CD8⁺ T 细胞的平均值和标准偏差 (来自 2 只个体小鼠)。

[0152] 包含在图 5 中的数据显示了重组 1 型干扰素与 CD40 协同作用达到与 TLR/CD40 刺激类似的程度, 这些结果进一步证实在杆状病毒中产生的重组 IFN 在体内运行良好。此外, 这些结果显示了组合的 IFN α /CD40 刺激可协同作用达到与 TLR/CD40 刺激在促进 CD8⁺ T 细胞扩增中类似的量级。

[0153] 实施例 6

1 型干扰素和 CD40 抗体的组合施用诱导 CD70+在 DC 上的表达

[0154]包含在前述实验中的数据表明 IFN α β 依赖性是由 DC 和/或 CD4+ Tregs 对 IFN α β 的反应确定。发明人猜测 CD70 涉及以下机理：在组合的 IFN α /CD40 激动剂免疫的情况下，IFN α β 诱发这种有效的 CD8+ T 细胞免疫。先前实施例的结果特别揭示了 CD40 激动剂和 1 型干扰素诱发 CD8+免疫上的协同效应(参见图 5)。这些数据显示了组合的 IFN α /CD40 刺激对相应的 CD8+ T 细胞(而不是 APC)的最终效应。进行下列实验以检测组合的 IFN α /CD40 刺激是否诱导 CD70 和/或其他 TNF 配体在含有抗原的 DC 亚群上表达。

[0155]使用上述的重组 IFN α ， iWT B6 小鼠用与 10^4 - 10^6 单位的 IFN α 结合的抗原和抗 CD40 如上所述进行引发。作为对照，小鼠用单独的抗 CD40、单独的 IFN α 或组合的 PolyIC/抗 CD40(增加 DC 中 CD70 表达的阳性对照)免疫。引发后 6-48 小时，处死代表性小鼠，用胶原酶消化脾，并且对 DC 染色且通过 FACS 分析。就 TNF 配体 CD70、41BBL、OX-40L、CD30L 和 GITRL 的表达评价 DC。将所得的 DC 表型与用组合的 TLR3、7 或 9/CD40 激动剂免疫的小鼠比较，以确定是否 IFN α 可以与抗 CD40 协同作用达到与诱发 CD8⁺ T 细胞扩增的 TLR 刺激相同的程度。其他对照小鼠仅用 IFN α 或抗 CD40 注射。为测定 IFN α 对抗原加工和不同亚群的呈递的影响，如上所述，小鼠用与重组 IFN α +/-抗 CD40 结合的荧光抗原激发。如上所述，测定抗原摄入、抗原呈递、DC 活化和 TNFL 表达。这些实验测定独立的 IFN α 和与抗 CD40 结合的 IFN α 怎样影响抗原呈递、DC TNFL 表达、以及 CD8⁺ T 细胞扩增。

[0156]如在包含于图 6 中的实验中所示，1 型干扰素和激动性 CD40 抗体的组合施用诱导体内 CD8+ T 细胞上的 CD70 表达，而单独任一者的施用没有。在实验中，小鼠用单独的抗 CD40 抗体、PolyIC (阳性对照)、重组 α 干扰素或抗 CD40 抗体和 1 型干扰素注射。18 小时后将脾 DC 分离，并且分析它们的 CD70 表达。在图 7 的右上象限中的数目表示 CD70 染色的平均荧光强度。这数据也显示，与 PolyIC/CD40 激动剂施用类似，CD40/IFN 同样增加了 CD70 在 CD8⁺ DC 上的表达。

[0157]因此,数据(图6)证实 IFN α /CD40 免疫成功地诱发 CD8+ T 细胞反应,并且显示就抗原摄入、抗原呈递和/或 TNFL 上调而言,注射 IFN α /抗 CD40 的小鼠中的 DC 与来自组合 TLR/CD40 激动剂免疫的对照的 DC 类似。特别是,在组合的 IFN α / α CD40 免疫后,在一个或多个 DC 亚群上增加了 CD70,尽管没有用单独的任一刺激物的激发。

[0158] 实施例 7

[0159]在有和没有 CD40 激动性抗体下增加的 IFN α 量的组合施用

[0160]在包含于图 7 中的实验中,如在前述实施例中所述注射小鼠,但是在有和没有激动性 CD40 抗体下用增加量的 1 型干扰素注射。图中的数据表示为两只个体小鼠之间的平均 CD70 MFI,并且误差条表示标准偏差。这些数据同样揭示了 1 型干扰素和 CD40 激动剂的组合施用增加了体内 DC 上的 CD70 表达,而当 1 型干扰素和 CD40 激动剂每种在没有另一种的情况下施用,则没有增加。

[0161] 实施例 8

[0162]抗原特异性 T 细胞在用减少剂量的 IFN α 和 CD40 激动剂或抗 CD70 免疫的小鼠中的百分比

[0163]在包含于图 8 中的实验中,小鼠用抗 CD40 抗体、如本文所述的在不同减少的剂量下的 IFN α 和抗 CD40 抗体、以及 polyIC 与 CD40 抗体、 α 干扰素与抗 CD40 抗体免疫。可从包含于其中的数据看到,抗原(卵清蛋白)特异性 T 细胞的数目随 IFN α 剂量的降低呈指数减少,而用 IFN/PolyIC 和 IFN α /CD40 激动剂的抗原特异性细胞的数目大体上相同(参见图 8)。因此,图 6 和图 7 和图 8 的数据显示外源性添加的 IFN α 可以与抗 CD40 协同作用,并且上调 CD70 在 DC 上的表达,导致抗原特异性 T 细胞的扩增。

[0164] 实施例 9

[0165]来自用 TLR/CD40 激动剂组合的 IFN α β R KO 小鼠的 DC 上的 CD70 表达

为了证明在具有外源性添加的 IFN α 的图 6 和图 7 中所示的结果与外源性 IFN 相关,如在图 9 中所述,在 IFN α β R 小鼠中进行实验。

如在此所示完成实验,其中小鼠用转移的骨髓成功地进行重建(在这种情况下, BM 表达 GFP +/- Bcl-2, 图 9)并且在重建后 8 周免疫后,小鼠产生免疫反应(未显示)。

[0167]如在图 9 的实验中所示,组合的 TLR/CD40 激动剂施用激发在 IFN $\alpha\beta$ R KO 小鼠中诱导了仅在表达靶向 TLR 的 DC 上的 CD70 表达。在实验中,IFN $\alpha\beta$ R 小鼠用单独的抗 CD40 抗体或与 PolyIC 或 Pam3Cys 组合的抗 CD40 抗体注射。Pam3Cys 是 TLR2 激动剂,并且 polyIC 是 TLR3 激动剂。24 小时后,将脾 DC 分离,并且如前所述针对 CD70 表达将其染色。CD8⁺ DC 表达 TLR2 和 TLR3,而 CD11b⁺DC 表达 TLR2 但不表达 TLR3。这些数据表明在没有 IFN $\alpha\beta$ 信号转导下,仅直接通过 TLR 和 CD40 二者刺激的 DC 能增加 CD70 表达。

[0168]这些数据与先前数据组合进一步表明 CD70 表达的这种增加涉及 CD8⁺ T 细胞的共同扩增。

[0169]实施例 10

[0170]1 型 IFN/CD40 组合对抗原特异性 T 细胞数目的效应与 IL-2/CD40 激动剂组合对抗原特异性 T 细胞数目的效应比较

[0171]设计在图 10 中的实验以比较 IL-2(另一种细胞因子)和 1 型干扰素当与 CD40 激动剂组合时的效应。如上所述,认为用 IFN α /CD40 激动剂组合达到的协同效应是真正未意料到的,并且用其他细胞因子/CD40 激动剂组合不能观察到协同效应。

[0172]在此实验中,比较 1 型 IFN/CD40 抗体、IL-2/CD40 抗体、单独的 IL-2、单独的 IFN α 以及单独的 CD40 激动剂的效应。这个包含在图 10 中的结果显示了 IL-2 和 IFN/CD40 组合对抗原特异性 T 细胞免疫细胞的百分比不产生类似的效应。其中,小鼠用与抗 CD40(50 mg)重组 IFN α (1×10^6 U)、IL-2 (1×10^6 U) IL-2 和 CD40、或单独的相同剂量的 IFN 和 CD40 激动剂组合的卵清蛋白(300 mg)注射。7 天后取外周血,并用 Kb/ova 四聚体染色以鉴别抗原特异性 T 细胞的百分比。在圆点图中的数目是在指定的椭圆形图框中的总 CD8⁺ T 细胞的百分比(四聚体⁺)。条线图是 2 只小鼠每次注射的平均值和标准偏差。在此的

结果显示了在相同量的 CD40 激动剂下且当两种细胞因子在相同活性水平下施用,抗原特异性 T 细胞在施用 IFN/CD40 组合的动物中的数目大大高于在施用 IL-2/CD40 组合的动物中的数目。这进一步证明了用 IFN/CD40 激动剂组合实现的协同作用是未意料到的。

[0173] 实施例 11

[0174] IFN α 和 CD40 激动剂对转移性黑素瘤中的存活时间的效应

[0175] 在该实验中,在第 0 天 C57BI/6 小鼠静脉内接种 100,000 B16.F10 黑素瘤细胞。4 天后,小鼠接受 100 微克肿瘤肽(δV)、100 微克的抗 CD40 和 1×10^6 单位 α 干扰素。如在此所示,施用抗 CD40/IFN 组合的小鼠具有实质上更长的存活时间。这些数据进一步支持主题佐剂组合在肿瘤疫苗和癌症疗法中的潜在应用。

[0176] 实施例 12

[0177] CD40 激动剂/IFN α 组合对转移性肺癌 t 的效应

[0178] 在图 12 中的实验显示了主题 CD40 激动剂/IFN α 组合保护小鼠免于转移性肺癌。在这个实验中,在第 0 天 C57BI/6 小鼠静脉内接种 100,000 B16.F10 黑素瘤细胞。四天后,小鼠接受 100 微克肿瘤肽(δV)、100 微克抗 CD40 抗体、100 微克 S-27609 (TLR7 激动剂)和 1×10^6 单位 α 干扰素。肿瘤激发后 21 天处死小鼠,从其中移除肺,并且通过解剖显微镜计数转移性结节。在图的 A 图中显示在肺收获的当天代表性肺的数字图像。在 B 图中显示肺转移的计数,其中 N= 7-8 只小鼠每组。这些结果显示了 CD40 激动剂/IFN α 组合相对于其他治疗的保护性效应。

[0179] 实施例 13

[0180] 含有肿瘤的肺的肿瘤浸润分析

[0181] 进行在图 13 中显示的实验,其中进行含有肿瘤的肺的 TIL (肿瘤浸润淋巴细胞) 分析。在第 0 天 C57BI/6 小鼠静脉内接种 100,000 B16.F10 黑素瘤细胞。五天后,如其中所示,小鼠接受 100 微克肿瘤肽(δV)、100 微克抗 CD40 和 1×10^6 单位干扰素 α 。肿瘤激发后 20 天处死小鼠。移除肺,并且通过 Percoll 梯度离心法分离 TIL。

随后对细胞进行流式细胞分析以研究浸润 CD4 (13A 和 13D)、CD8 (13B 和 13E) 和 FoxP3+细胞 (13 C 和 13F) 的相对和绝对数。在实验中, N= 4 只小鼠每组。

[0182] 实施例 14

[0183] 组合免疫疗法对在含有肿瘤的小鼠中浸润肺的 CD8+ T 细胞的效应

[0184] 在包含于图 14 中的实验中, 分析主题组合免疫疗法对浸润含有肿瘤的小鼠的肺的抗原特异性效应 CD8+ T 细胞的产生的效应。在实验中, 其中在第 0 天 C57BI/6 小鼠静脉内接种 100,000 B16.F10 黑素瘤细胞。五天后, 小鼠接受如所指示的 100 微克肿瘤肽 (δV)、100 微克抗 CD40 和 1×10^6 单位干扰素 α 。肿瘤激发后 20 天处死小鼠并移除肺, 并且通过 Percoll 梯度离心法再次分离 TIL。随后用 1 微克/mL rhIL-2 和布雷菲德菌素 (brefeldin) A 刺激细胞 12-18 小时, 然后进行细胞内细胞因子染色。细胞首先用 CD8 和 CD44 的抗体标记, 然后固定, 且在用 IFN γ 染色之前使之可渗透。阳性细胞通过减去用不相关 (SIINFEKL) 肽对照观察到的背景值来计算, 然后作为 CD8+CD44+IFN γ +T 细胞的百分比阳性 (14A) 或绝对数目 (14B) 绘图。在实验中, N= 4 只小鼠每组。

[0185] 图中的结果揭示了由于主题 IFN/CD40 激动剂组合的施用, 抗原特异性 CD8+ T 细胞的数目增加。这些结果进一步证明了主题佐剂组合在癌症疫苗和其中期望这种免疫增强的其他疗法中的效力。

[0186] 作为最后的注释, 为了进一步描述本发明, 本申请包含图 15, 其包含用于实施例和图 16、17 的示例性激动性抗体的序列, 其中所述图 16、17 图解式地描述了适于产生根据本发明的 DNA 构建体和多肽结合物的方法与材料, 例如使用杆状病毒表达系统。

[0187] 应理解, 本发明并不限于上文列出的实施方案, 并且将权利保留至示例性实施方案和在下述权利要求的范围内的所有变更。

[0188] 对本文引用的期刊、专利和其他公开物的各种参考包括了本领域的现状, 并且如同其全部内容通过引用并入本文。

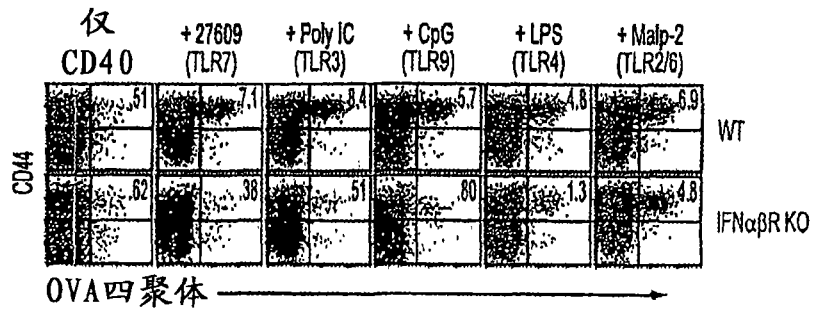


图 1

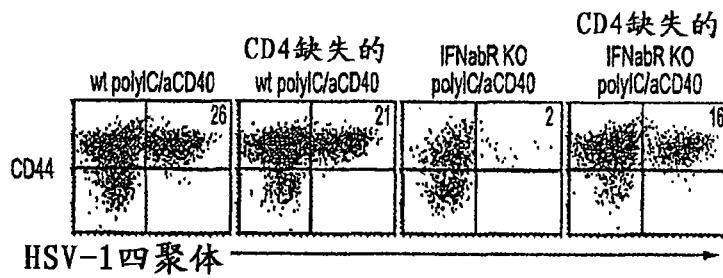


图 2A

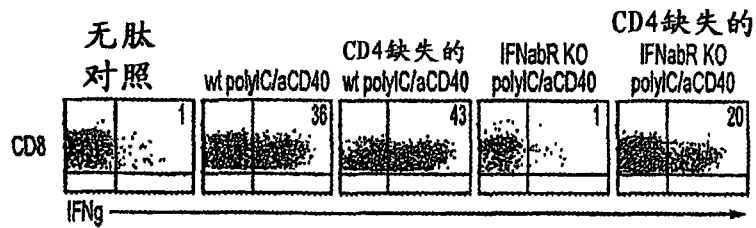


图 2B

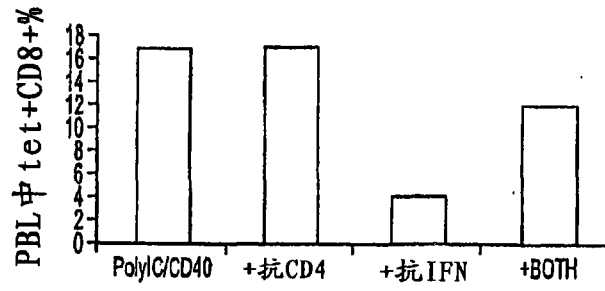


图3

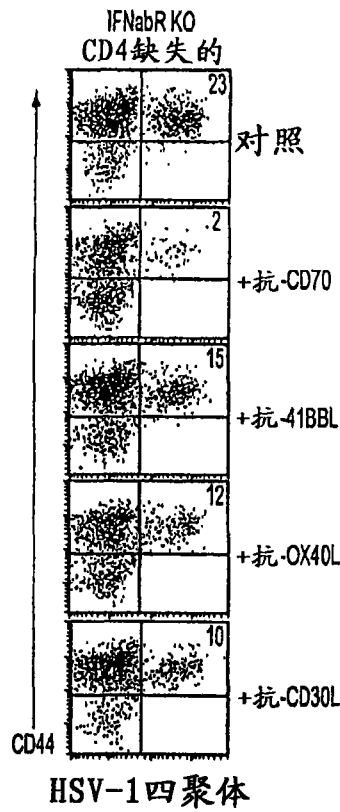


图4

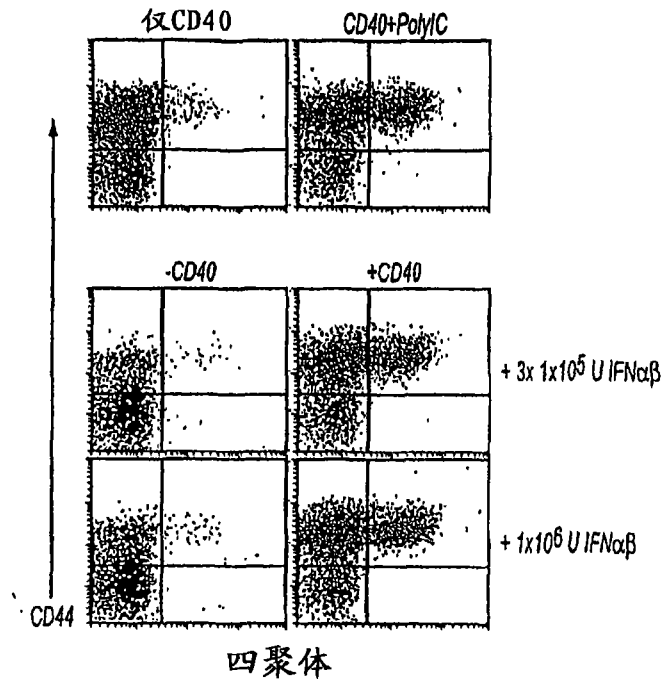


图 5A

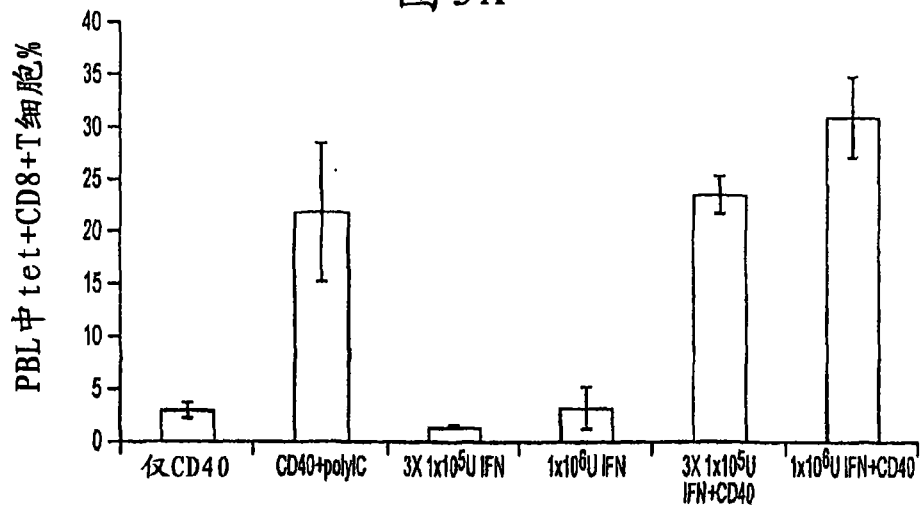


图 5B

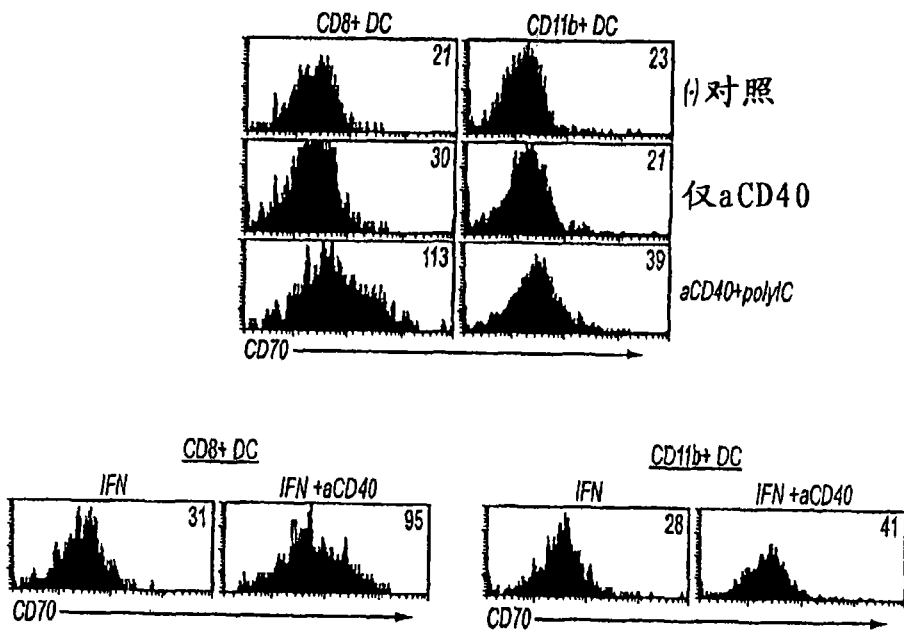


图6

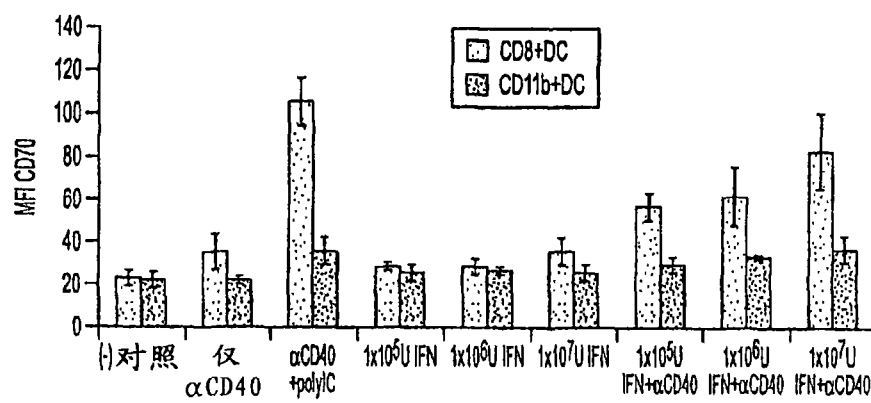


图 7

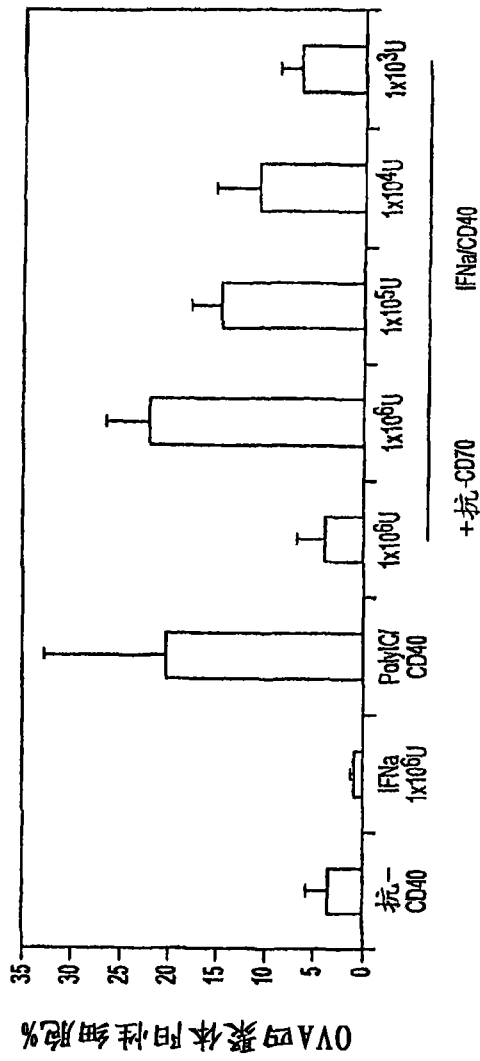


图8

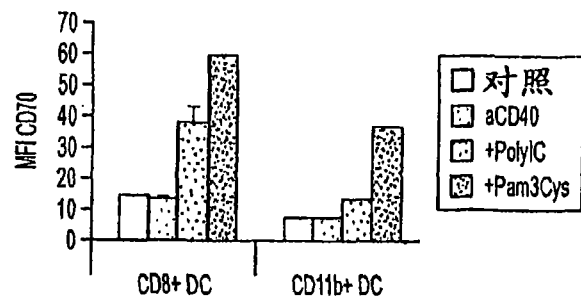


图9

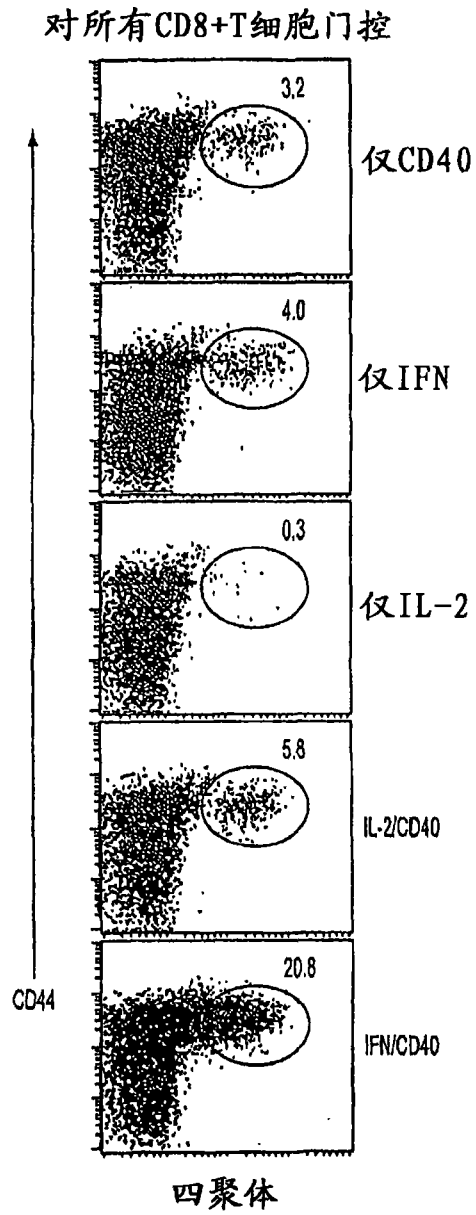


图10A

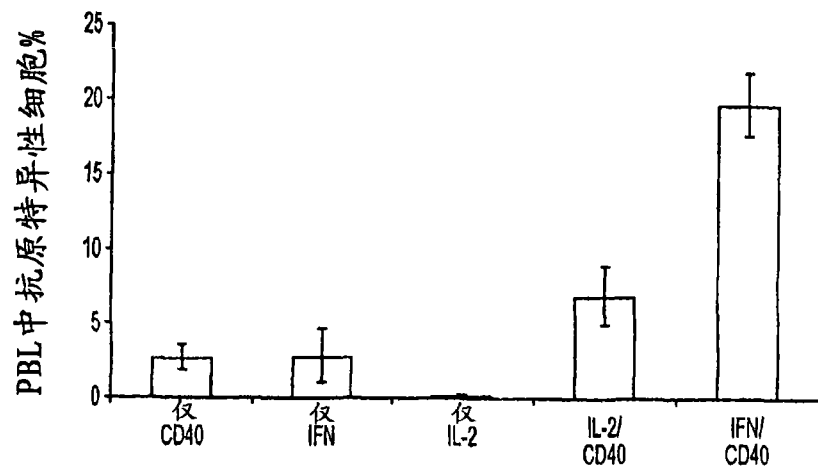


图 10B

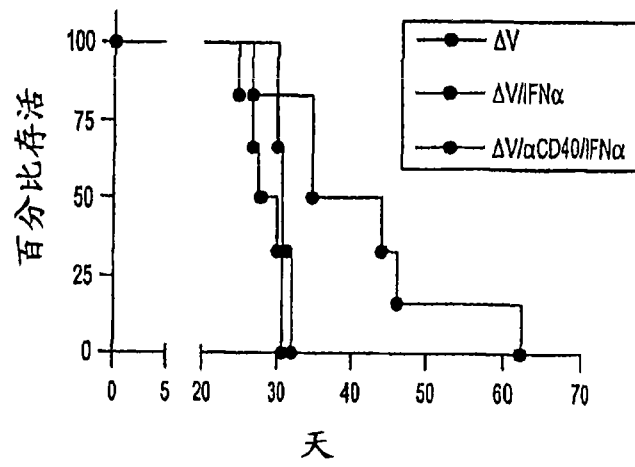


图11

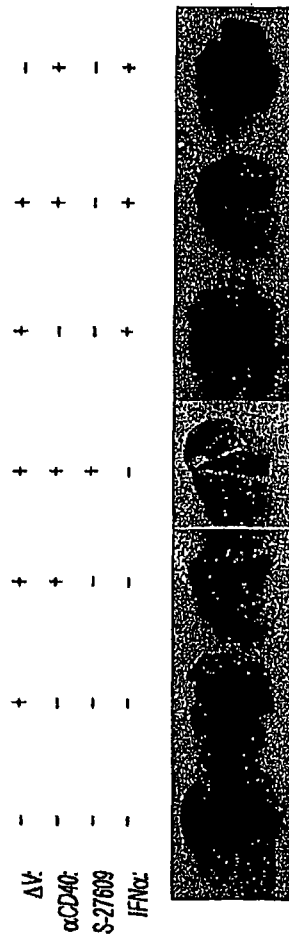


图12A

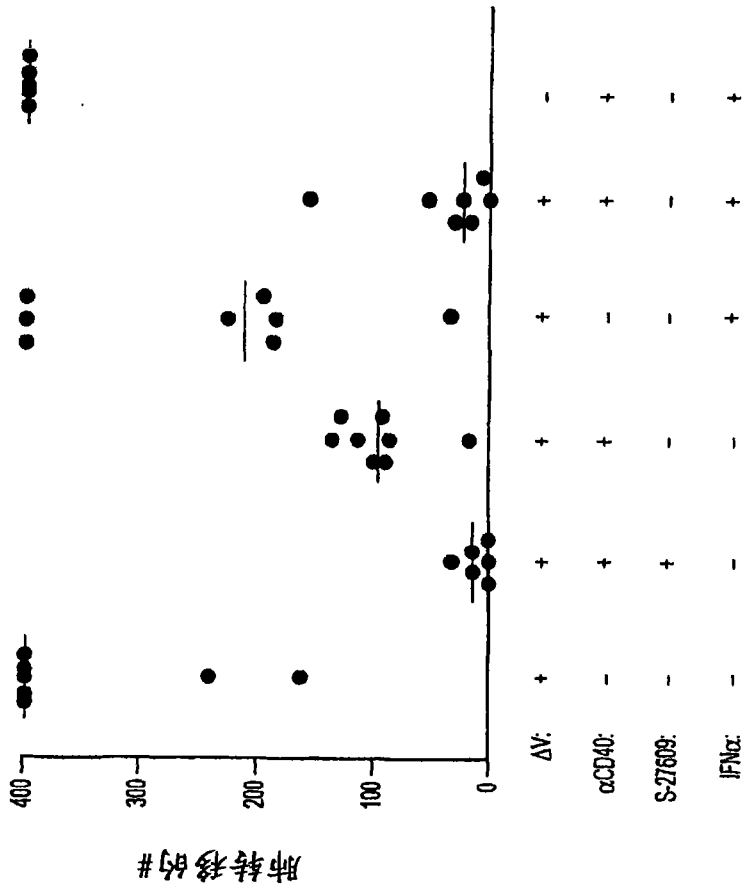


图12B

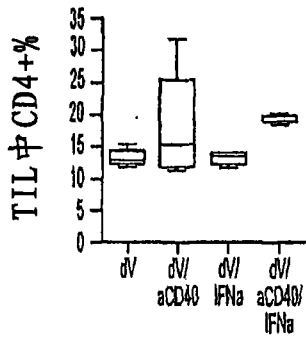


图 13A

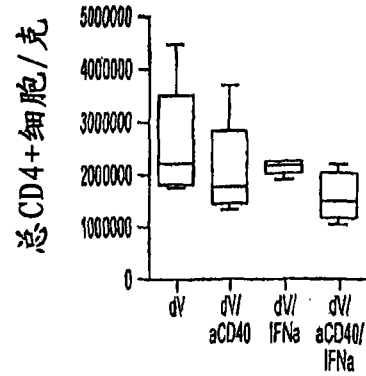


图 13D

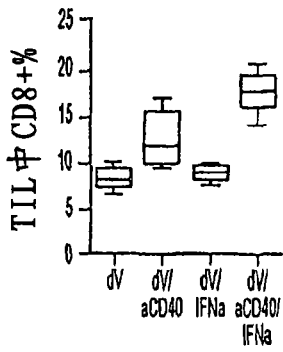


图 13B

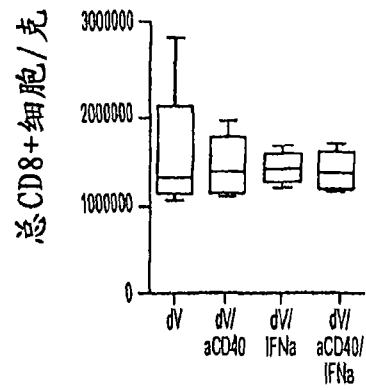


图 13E

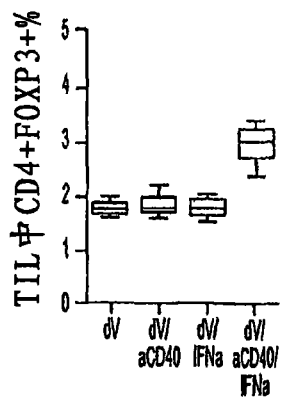


图 13C

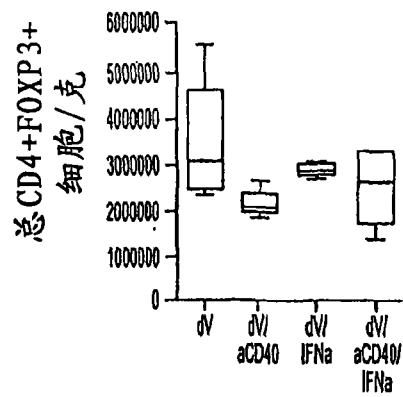


图 13F

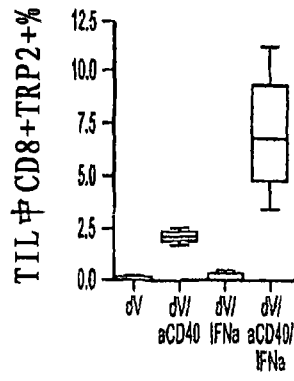


图 14A

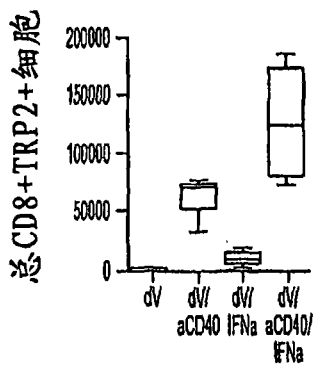


图 14B

FGK.45 Ig-轻链

5' - P10 启动子
<未切割序列>

XhoI

CATG TCAGAGATGGAGACAGACAGACTCCTGCTATGGGTGCTGCTG
 CTCTGGGTGCCAGGCTCCACTGGTGACACTGTACTGACCCAGTCTCCTGCTTT
 GGCTGTGTCTCCAGGAGAGAGGTTACCATCTCCTGTAGGGCCACTGACAGT
 GTCAGTACACTTATGCACCTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCAACCCAAAC
 TCCTCATCTATCTAGCATCACACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACT
 GGCAGTGGGTCTGGACAGACTTCACCCCTCACCATTCATCCTGTGGAGGCTG
 ATGACACTGCAACCTATTACTGTGACAGAGTTGGAATGATCCGTGGAGCTT
 CCGTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA
 TCTATCTTCCACCATCCACGGAACAGTTAGCAACTGGAGTGCCCTCAGTCGT
 GTGCCCTCATGAACAACTTCTATCCAGAGACATCAGTCAAGTGAAGATT
 GATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCCCTGGACAGTCTACTGATCAGGACA
 GCAAAGACAGCACGTACAGCATGAGCAGCACCCCTCTCGTTGACCRAGGCTGA
 CTATGAAAGTCATAACCTCTATACCTGTGAGGTTGTTCAAGACATCATCCT
 CACCCGTCTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGACCC CATG

BspEI

图 15A

FGK.45 Ig-重链

ggagcccagt cctggactct gaggttctcc cactcagtaa tcagtactga
 agcactgcac agactcctca ccatggacat caggctcage ttggtttcc
 ttgtcctttt cataaaaggt gtccagtgtg aagtgcagct ggtggagtct
 ggcggaggct tagtacagcc tggaggctcc ctgaaactct cctgtgcage
 ctcaggattc actttcagtg actataacat ggcctgggtc cggcaggctc
 caaagaaggg tctggagtgg gtcgcaacca tta

tgca acaaaccgat ggttattatt aca

aaaagtaact

ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtc
 accgtgacct ggaactctgg agcctgtcc agcgggtgac acacctccc
 agetgtcctg cagtctggac tctacactct caccagctca gtgactgtac
 cctccagca cctggtccagc caggccgtca cctgcaacgt agcaccaccg
 gccagcayca ccaaggtgga caagaaaatt gtgccaaggg aatgcaatcc
 ttgtgatgt acaggctcag aagtatcacc tgtcttccac tccccccaa

图 1B-1

```
agatgacgtg gaagtccaca cagctcagac tcatgccccg gagaagcagt  
ccaacagcac tttagctca gtcagtgaac tccccatcgt gcaccgggac  
tggctcaatg gcaagacgtt caaatgcaaa gtcaacagtg gagcattccc  
tgccccatc gagaaaagca tetccaaacc cgaaggcaca ccacgaggtc  
cacaggtata caccatggcg cctccaagg aagagatgac ccagagtcaa  
gtcagtatca cctgcatggt aaaaggett tatccccag acattatac  
ggagtggaag atgaacgggc agccacagga aaactacaag aacctccac  
ctacgatgga cacagatggg agttacttcc tctacagcaa gctcaatgta  
aagaaagaaa catggcagca gggaaacact ttcacgtggt ctgtgctgca  
tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagtctctcc cactctcctg  
gtaaatgate ccagagtcca gtggccctc ttggcctaaa ggatgccaac  
acctacctet accaccttc tctgtgtaaa taaagcacc agctctgcct  
tgggaccctg caaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa
```

图 15B-2

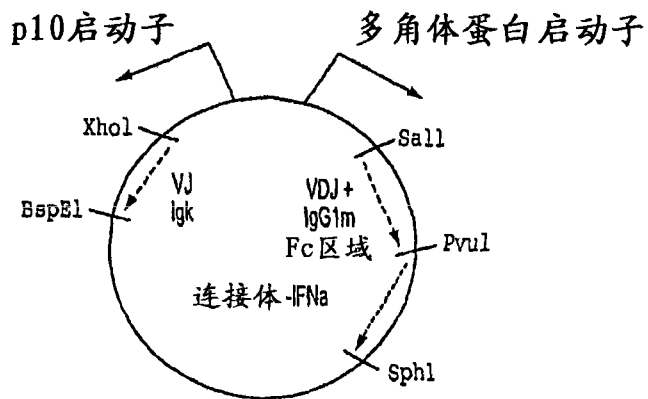


图16A

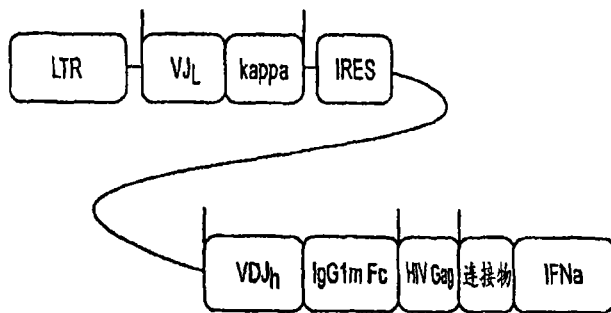


图16B

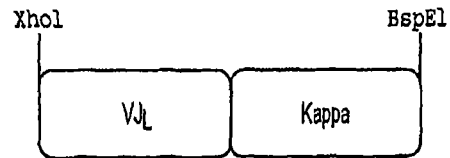


图 17A

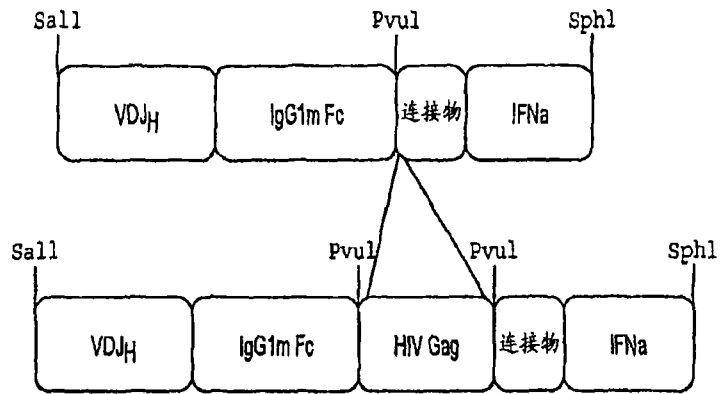


图 17B