(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104244975 A
(43)申请公布日 2014.12.24

(21)申请号 201380020366.9
(22)申请日 2013.03.01
(30)优先权数据
12382078.9 2012.03.02 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/054121 2013.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/127976 EN 2013.09.06
(71)申请人 埃斯特韦实验室有限公司
地址 西班牙巴塞罗纳
申请人 私人艾滋病研究基金会-银行
(72)发明人 费莉佩·加西亚阿尔凯德
特里萨·加拉特
努里亚·克利门特维达尔
克里斯蒂娜·吉尔罗达
约瑟夫·马里亚·加特利阿蒂加斯
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏
(51)Int.Cl.
A61K 39/21(2006.01)
C12N 5/0786(2006.01)
A61P 31/18(2006.01)
C12N 5/0784(2006.01)

权利要求书2页 说明书27页 附图6页

(54)发明名称

用于制备树突细胞疫苗的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于获得载有抗原之树突细胞的方法，所述载有抗原之树突细胞表现出更高的生存力以及向淋巴结迁移的能力。本发明还涉及包含所述树突细胞的疫苗及其用于治疗感染性疾病（特别是AIDS）的用途。

CN 104244975 A

1. 一种用于获得载有抗原的树突细胞的体外方法，其包括：使未成熟树突细胞在足以使所述未成熟树突细胞成熟的条件下并且在防止细胞附着于基底的条件下与包含所述抗原的免疫原接触。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其还包括回收所述载有抗原的树突细胞。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述足以使所述未成熟树突细胞成熟的条件包括与 GM-CSF 和 IL-4 的组合接触。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其中所述足以使所述未成熟树突细胞成熟的条件还包括与促炎性细胞因子混合物接触。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述促炎性细胞因子混合物至少包含 IL-1 受体的激动剂、利用 gp130 的细胞因子以及 TNF 超家族成员。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述 IL-1 受体的激动剂是 IL-1β，其中所述利用 gp130 的细胞因子是 IL-6 和 / 或其中所述 TNF 超家族成员是 TNF-α。

7. 根据权利要求 4 至 6 中任一项所述的方法，其中所述促炎性细胞因子混合物还包含前列腺素。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述前列腺素是前列腺素 E_2(PGE_2)。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中介质的组成为：300IU/mL 的 IL-1β、1000IU/mL 的 TNF-α、1000IU/mL 的 IL-6 和 1μg/mL 的 PGE_2。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法，其中所述防止细胞附着于基底的条件包括使用低附着基底。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法，其中所述未成熟树突细胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法，其中所述免疫原是 HIV 免疫原。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述 HIV 免疫原是失活的 HIV 颗粒。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述失活的 HIV 颗粒选自热失活的 HIV 颗粒、化学失活的 HIV 颗粒和光化学失活的 HIV 颗粒。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述失活的 HIV 颗粒是使用干扰 CCHC 锌指之试剂获得的化学失活的 HIV 颗粒。

16. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述失活的 HIV 颗粒是热失活的 HIV 颗粒。

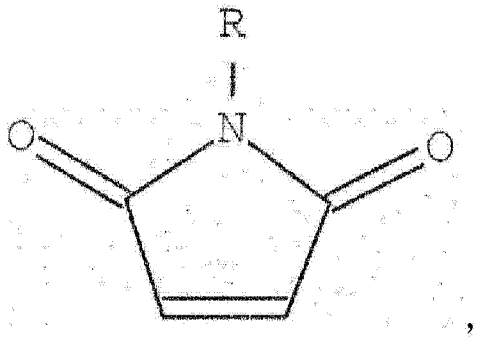
17. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述干扰 CCHC 锌指的试剂选自：

(i)C- 亚硝基化合物，

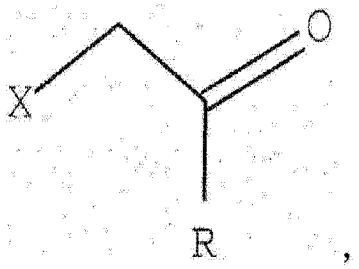
(ii) 偶氮二甲酰胺，

(iii) 具有 R-S-S-R 结构的二硫化物，

(iv) 具有以下结构的马来酰亚胺



(v) 具有以下结构的 α - 卤代酮



(vi) 具有式 R-NH-NH-R 的酰肼，

(vii) 一氧化氮及包含 NO 基团的其衍生物，

(viii) 铜离子以及包含 Cu^{2+} 的配合物，

(ix) 铁离子以及包含 Fe^{3+} 的配合物，

其中 R 是任意原子或分子，并且 X 选自 F、I、Br 和 Cl。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述二硫化物是双硫仑或 aldrithiol-2(2,2' - 二硫二吡啶)。

19. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述失活的 HIV 颗粒是使用补骨脂素化合物并在能够活化所述补骨脂素化合物的波长下辐照获得的光化学失活的 HIV 颗粒。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述补骨脂素化合物是氨托沙林。

21. 根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的方法，其中所述 HIV 是 HIV-1。

22. 可通过权利要求 1 至 21 中任一项所限定的方法来获得的抗原脉冲的树突细胞。

23. 一种树突细胞疫苗，其包含根据权利要求 22 所述的抗原脉冲的树突细胞。

24. 根据权利要求 23 的树突细胞疫苗，其用于医疗。

25. 根据权利要求 24 的树突细胞疫苗，其用于治疗或预防 HIV 感染或与 HIV 感染有关的疾病，其中所述免疫原是 HIV 免疫原。

用于制备树突细胞疫苗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于获得载有抗原之树突细胞的方法，所述载有抗原之树突细胞表现出更高的生存力以及向淋巴结迁移的能力。本发明还涉及包含所述树突细胞的疫苗及其用于治疗感染性疾病（特别是人类免疫缺陷病毒，HIV）的用途。

背景技术

[0002] 虽然组合抗逆转录病毒治疗（cART）在抑制HIV-1复制以及允许重建CD4T细胞数方面有效，但是其不能根除HIV-1。此外，cART不能恢复HIV-1特异性T细胞免疫应答。事实上，HIV-1的复制迅速回弹至与治疗前水平相近，甚至更高。结果，HIV对象不得不终身接受cART，考虑到顺应性、发展出抗病毒物质抗性的风险、价格以及副作用，这是一个特别难以负担的选择，所述副作用包括严重代谢异常，例如脂肪再分布综合征。参见Martínez E等，Lancet 2001；357：592-598。

[0003] 有证据表明，针对HIV-1的强的并且特异性的CD4+辅助T细胞应答是取得持续、有效并且特异性的CD8+细胞毒性T淋巴细胞（CTL）应答的关键，而后者能够控制HIV-1在猕猴和人中的复制。这些发现与最近在小鼠模型中的慢性病毒性感染的数据一致。虽然在大多数HIV-1感染的个体中可发现分泌干扰素γ（IFN-γ）的HIV-1特异性CD8+T细胞和CD4+T细胞，但是不存在CD4+T细胞的增殖性应答，同时CD8T细胞的溶细胞活性存在缺陷。一些数据表明，在HIV-1感染的对象中，树突细胞（DC）的抗原呈递细胞（APC）功能也受损，这可能导致HIV-1特异性辅助应答和CTL应答功能紊乱。

[0004] 已经提出了将治疗性免疫接种作为一种方法来限制对持续的终身性cART的需求。髓样树突细胞(myeloid dendritic cell)是最有效的专职性APC，其具有诱导对CD4+T细胞和CD8+T细胞二者的初级免疫应答和次级免疫应答的独特能力。体内和体外实验数据都表明，DC能够吞噬外源可溶蛋白、肿瘤细胞裂解物、失活的病毒以及凋亡的受病毒感染细胞，对这些材料进行加工并呈递衍生的抗原肽。除了通过II类MHC通路将抗原呈递至辅助CD4+T细胞（Th）外，DC还可通过I类MHC通路将抗原呈递至细胞毒性CD8+T淋巴细胞（CTL），这种现象称为“交叉引发（cross-priming）”或“交叉呈递（cross-presentation）”。参见Banchereau，Nature 392(1998)：245-252和Annu.Rev.Immunol.(2000)18；767-811，以及Larsson M等，Curr.Top.Microbiol.Immunol.2003；276：261-275。

[0005] 在人类传染病和肿瘤的实验小鼠模型中，用多种失活病原体和肿瘤抗原离体脉冲的自体髓样DC（例如单核细胞衍生的DC，MDDC）表现为诱导强效保护性免疫。一些动物研究表明，载有HIV-1病毒裂解物、包膜糖蛋白、失活病毒或纳米颗粒的DC引起强的针对HIV-1的免疫应答。

[0006] 迄今，已经刊载了一些基于DC的疫苗接种对于人类HIV-1感染的临床试验。参见Kundu S等，AIDS Res.Hum.Retroviruses 1998；14：551-560，Lu w等，Nat.Med.2004；10：1359-1365，García F 等，J.Infect.Dis.2005；195：1680-1685，Ide F 等，J.Med.Virol.2006；78：711-718，Connolly N 等，Clin.Vaccine Immunol.2008；15：284-292，

Gandhi R 等，Vaccine 2009 ;27 :6088-6094，Kloverpris H 等，AIDS 2009 ;23 :1329-1340，Routy J 等，Clin. Immunol. 2010 ;134 :140-147，以及 Garcia F 等，J. Infect. Dis. 2011 ;203 :473-478。还有一些使用 DC 作为治疗性疫苗的临床试验正在进行。遗憾的是，可能由于所选择的免疫原、失活方法、DC 的培养和脉冲条件以及疫苗的施用方案广泛变化，所报道的结果并不一致。本领域仍然需要在能增强其安全性和效力特性的标准化方法下制备的基于树突细胞的 HIV-1 疫苗。

发明内容

[0007] 在第一个方面，本发明涉及用于获得载有抗原的树突细胞的体外方法，其包括使未成熟树突细胞在足以使所述未成熟树突细胞成熟的条件下和防止细胞附着于基底的条件下与包含所述抗原的免疫原接触。

[0008] 在另一个方面，本发明涉及可通过根据本发明的方法获得的抗原脉冲的树突细胞。

[0009] 在另一个方面，本发明涉及包含根据本发明的抗原脉冲之树突细胞的树突细胞疫苗。

[0010] 在另一个方面，本发明涉及根据本发明的树突细胞疫苗用于医疗。

[0011] 在另一个方面，本发明涉及根据本发明的树突细胞疫苗用于治疗或预防 HIV 感染或与 HIV 感染有关的疾病，其中所述免疫原是 HIV 免疫原。

附图说明

[0012] 图 1. 从经治疗的 HIV 对象中分离的 MDDC 中的 CD80 和 CD83 表达水平。

[0013] 图 2. 从经治疗的 HIV 对象中分离的 MDDC 的生存力和数量。

[0014] 图 3. 从经治疗的 HIV 对象中分离的 MDDC 的趋化性特性。

[0015] 图 4. 从经治疗的 HIV 对象中分离的 MDDC 的 T 细胞特异性 HIV 应答。

[0016] 图 5. 在免疫接种和抗逆转录病毒治疗第二次中断后 pVL 由基线（进行任何抗逆转录病毒治疗之前）的改变。(A) 中值。(B) 单个值。底部的数字表示有风险的患者。在第 0、8、12、24、36 和 48 周时示出 Mann-Whitney U 检验的 P 值。曲线下面积 (AUC) 的 P 值也示出。(C) 在接种疫苗 8、12、24、36 和 48 周后经治疗的 HIV 对象中的 HIV 病毒载量。针对分支 (ARM) I、分支 II 和分支 III，示出了一些周 (-4、-2、0、8、12、24、36 和 48) 的值。

[0017] 图 6. 临床试验设计方案。对三十六位进行了抗逆转录病毒治疗的慢性 HIV-1 感染患者随机接受三次免疫接种，其中至少 107 个为用热失活的自体病毒脉冲的 MD-DC（每次剂量 109 拷贝）。在第一次免疫接种后对患者随访 48 周。将第二次中断 cART 的那天（第二次停止）视为第 0 周。DC-HIV-1 组在 -4、-2 和 0 周时有 12 位患者接受免疫接种，且在 0、2 和 4 周时有 12 位患者接受免疫接种。选择这两个不同的时间表以评估 cART 能否对免疫接种的应答产生任何影响。由于这两个时间表之间在 pVL 改变或 HIV 特异性 T 细胞应答方面没有观察到显著差异，所以将接受免疫接种的患者作为单个组来分析。DC 对照组患者在 -4、-2 和 0 周时接受注射。

具体实施方式

[0018] 本发明公开了用于用基本失活的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的裂解物脉冲单核细胞衍生之树突细胞 (MDDC) 的新的和有利的方法。具体地，将本发明的经脉冲 MDDC 培养在含有由 IL-1-β、IL-6、TNF-α 和 PGE_2 构成之成熟化混合物 (maturation cocktail) 的超低附着烧瓶中。细胞黏着性的缺乏与培养基的组合显著提高了 MDDC 中成熟标志物 (即，CD80、CD83) 的表达，以及经脉冲 MDDC 的总量和生存力。本发明的方法还提高了 MDDC 的离体迁移能力，并改进了其向 T 细胞的 HIV-1 抗原呈递，因此有利于针对 HIV-1 的更高的特异性免疫应答。由此脉冲的 MDDC 可用作树突细胞疫苗用于人类健康。

[0019] 1. 一般术语和表述的定义

[0020] 本文所用术语“AIDS”是指 HIV 感染的症状阶段，包括获得性免疫缺陷综合征 (通常称为 AIDS) 和“ARC”或 AIDS 相关复合征。参见 Adler M 等，Brit.Med.J.1987 ;294 : 1145-1147。AIDS 的免疫学表现和临床表现在本领域是公知的，包括例如因免疫缺陷导致的机会性感染和癌症。

[0021] 术语“佐剂”是指在添加至免疫原性药剂中时，非特异地增强或加强暴露于该混合物后的接受者宿主对所述药剂的免疫应答的物质。

[0022] 本文所用术语“IL-1 受体的激动剂”是指充当白细胞介素 -1 受体 (IL-1R) 的激动剂的细胞因子。IL-1 受体的激动剂包括但不限于 IL-1α 和 IL-1β。

[0023] 本文所用术语“aldrithiol-2”或“2,2′ - 二硫二吡啶”是指一种也称为“aldrithiol”或 AT-2 的化学试剂，其为温和的氧化剂，能通过优先对内部病毒体蛋白 (特别是核衣壳蛋白) 的半胱氨酸的游离巯基进行共价修饰来消除 HIV 的感染性。经 AT-2 失活的病毒体没有感染性，但是能够与细胞表面受体以及树突细胞相互作用。

[0024] 本文所用术语“氨托沙林 (amotosalen)”是指可逆地插入 DNA 和 RNA 螺旋区域的合成的补骨脂素化合物。因为氨托沙林是光活化 (photoactive) 化合物，需要使用长波长紫外 (UVA) 照明对 HIV 进行光化学处理。通过用 320nm 至 400nm 的 UVA 光照明，氨托沙林与核酸中的嘧啶碱基形成共价键。通过这种方式交联的病原体和白细胞的基因组不再具有功能，也不能进行复制。

[0025] 本文所用术语“抗原”是指当引入身体时，通过免疫系统诱导特异性免疫应答 (即，体液的或细胞的) 的任何分子或分子片段。抗原具有结合于抗体的抗原结合位点的能力。抗原通常是蛋白质或多糖。适于本发明的抗原是细菌、病毒、寄生物和其他微生物的一部分，例如外壳、荚膜、细胞壁、鞭毛、纤毛和毒素。根据本发明的抗原的实例包括来自以下的抗原 ：小核糖核酸病毒、冠状病毒、囊膜病毒、黄病毒 (flavirvirus)、棒状病毒、副粘病毒、正粘病毒、布尼亚病毒、沙粒病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、痘病毒、嗜肝 DNA 病毒 (hepadnavirus) 以及海绵状病毒家族 ；或者来自其他病原体，例如锥虫、绦虫、蛔虫、蠕虫或疟疾。适合的病毒抗原的实例非限制地有 ：来自人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的逆转录病毒抗原，包括 gag 基因、pol 基因、env 基因和 nef 基因的基因产物，以及其他 HIV 组分 ；肝炎病毒抗原，例如乙肝病毒的 S 蛋白、M 蛋白和 L 蛋白，乙肝病毒的前 S 抗原，和其他肝炎的 (例如，甲肝、乙肝和丙肝，病毒组分例如丙肝病毒 RNA) ；流感病毒抗原，例如血凝素和神经氨酸酶，以及其他流感病毒组分 ；麻疹病毒抗原，例如麻疹病毒融合蛋白和其他麻疹病毒组分 ；风疹病毒抗原，例如 E1 蛋白和 E2 蛋白，以及其他风疹病毒组分 ；轮状病毒抗原，例如 VP7sc 和其他轮状病毒组分 ；巨细胞病毒抗原，例如包膜糖

蛋白 B 和其他巨细胞病毒抗原组分；呼吸道合胞病毒抗原，例如 RSV 融合蛋白、M2 蛋白以及其他呼吸道合胞病毒抗原组分；单纯性疱疹病毒抗原，例如立即早期蛋白、糖蛋白 D 以及其他单纯疱疹病毒抗原组分；水痘带状疱疹 (varicella zoster) 病毒抗原，例如 gpI、gpII，以及其他水痘带状疱疹病毒抗原组分；日本脑炎病毒抗原，例如蛋白 E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2A、80％ E，以及其他日本脑炎病毒抗原组分；狂犬病病毒抗原，例如狂犬病毒糖蛋白、狂犬病毒核蛋白以及其他狂犬病病毒抗原组分。另一些病毒抗原实例参见 Fields B，Knipe D 编辑，“Fundamental Virology”，第二版 (Raven Press，New York，NY，US，1991)。

[0026] 本文所用术语“载有抗原的抗原呈递细胞”是指捕获了抗原并将其加工以分别呈递至与 II 类 HLA 分子和 I 类 HLA 分子缔合的 CD4 辅助 T 细胞和 CD8 细胞毒性 T 淋巴细胞的树突细胞。

[0027] 本文所用术语“抗逆转录病毒治疗”或“ART”是指施用一种或更多种抗逆转录病毒药物以抑制 HIV 的复制。一般来说，ART 包括施用至少一种抗逆转录病毒试剂（或通常施用抗逆转录病毒试剂的混合物），例如，核苷逆转录酶抑制剂（例如齐多夫定、AZT、拉米夫定 (3TC) 和阿巴卡韦）、非核苷逆转录酶抑制剂（例如奈韦拉平和依法韦仑），以及蛋白酶抑制剂（例如茚地那韦、利托那韦和洛匹那韦）。术语高效抗逆转录病毒治疗（“HAART”）是指旨在强烈抑制病毒复制以及 HIV 疾病进展的治疗方案，通常由三种或更多种不同药物组成，例如，两种核苷逆转录酶抑制剂和一种蛋白酶抑制剂。

[0028] 本文所用术语“自体”意为 HIV-1 病毒颗粒和树突细胞的供体和受体是同一对象。

[0029] 本文所用术语“细胞”等同于“宿主细胞”，旨在表示被引入了本发明的病毒基因组、载体或 HIV-1 病毒颗粒的细胞。应理解，该术语不仅表示特定的对象细胞，还表示该细胞的后代细胞或可能的后代细胞。由于突变或环境影响，在随后的世代中可能存在某些修饰，因此，这样的后代细胞可能事实上与亲代细胞不同，但仍然可以包括在本文所用术语的范围内。

[0030] 根据普遍接受的专利实践，本文所用术语“包括”或“包含”还涵盖“由 ..... 组成”。

[0031] 本文所用表述“足以成熟的条件”是指在适合于使所述细胞达到成熟的条件下培养未成熟树突细胞。成熟的适合条件是为本领域技术人员所公知的。成熟树突细胞可通过使未成熟树突细胞与有效量或有效浓度的树突细胞成熟化试剂接触来制备（即，成熟化）。树突细胞成熟化试剂可包括例如，BCG、IFN-γ、LPS、单磷酰基脂质 A(MPL)、eritoran(CAS 号 185955-34-4)、TNF-α 及其类似物。BCG 的有效量通常为约 10^5cfu 至 10^7cfu 每毫升组织培养基。IFN-γ 的有效量通常为约 100U 至 1000U 每毫升组织培养基。卡介杆菌 (BCG) 是牛分枝杆菌 (M.bovis) 的无毒株。本文所用的 BCG 是指完整 BCG、以及细胞壁组分、BCG 来源的脂阿拉伯甘露聚糖 (lipoarabidomannan)，以及与诱导 2 型免疫应答有关的其他 BCG 组分。BCG 任选地是失活的，例如热失活的 BCG 或福尔马林处理的 BCG。通常使未成熟的 DC 与有效量的 BCG 和 IFN-γ 接触约 1 小时至约 48 小时。合适的培养基包括 **AIM-V®**、RPMI 1640、DMEM 或 X-VIVO15™。可在组织培养基中补充氨基酸、维生素、细胞因子（例如 GM-CSF) 或二价阳离子来促进细胞的成熟。通常使用约 500 单位 /mL 的 GM-CSF。

[0032] 本文所用表述“适合免疫原加工和通过抗原呈递细胞呈递的条件”是指在合适的介质中孵育树突细胞以使得能够捕获免疫原并加工，并将所述免疫原呈递给免疫系统的其

他细胞。

[0033] 本文所用术语“接触”是指在预期载入至树突细胞之免疫原存在下孵育未成熟树突细胞。未成熟的 DC 能够捕获并内化所述免疫原从而成为载有抗原的树突细胞（也称为抗原脉冲的树突细胞）。未成熟 DC 的抗原捕获是通过大胞饮作用、受体介导的抗原捕获以及对凋亡小体的内吞来介导的。优选地，所述孵育在 37℃下进行 6 小时。抗原载入步骤或脉冲的成功可通过以下来评估：洗涤经脉冲的树突细胞以去除未捕获的免疫原，并裂解所述经脉冲的树突细胞以通过 ELISA 测定来测量胞内抗原含量。例如，当免疫原是 HIV 病毒颗粒时，可测定展示于病毒颗粒衣壳表面的 $p24^{Gag}$ 抗原的胞内含量。

[0034] 本文所用的术语“树突细胞”是指在淋巴组织或非淋巴组织中发现的多样化的形态类似之细胞类型的群中的任意成员。树突细胞是一类“专职性”抗原呈递细胞，并且具有高的使 HLA 限制性 T 细胞敏化的能力。具体地，树突细胞包括例如，浆细胞样树突细胞、髓样树突细胞（通常使用的树突细胞，包括未成熟树突细胞和成熟树突细胞）、郎格汉斯细胞（作为皮肤中抗原呈递细胞的重要的髓样树突细胞）、交错突细胞（分布在淋巴结以及脾 T 细胞区中，并且其被认为起到将抗原呈递给 T 细胞的作用）。所有这些 DC 群都来源于髓样造血细胞。树突细胞还包括滤泡树突细胞，其为重要的针对 B 细胞的抗原呈递细胞，但是其并非来源于髓样造血细胞。树突细胞可通过功能或表型（特别是细胞表面的表型）来识别。这些细胞以其独特的形态（细胞表面上具有幕状突起）、中至高水平的表面 II 类 HLA 表达以及将抗原呈递给 T 细胞（特别是幼稚 T 细胞）的能力为特征。参见 Steinman R 等，Ann. Rev. Immunol. 1991 ;9 :271-196。树突细胞的细胞表面以表达细胞表面标志物 CD1a+、CD4+、CD86+ 或 HLA-DR+ 为特征。

[0035] 本文所用术语“树突细胞成熟化试剂”是指这样的化合物：当用所述化合物孵育树突细胞时能够使所述树突细胞成熟。

[0036] 本文所用术语“树突细胞前体”是指能够在合适的细胞因子（即，G-CSF、GM-CSF、TNF-α、IL-4、IL-13、SCF(c-kit 配体)、Flt-3 配体或其组合）存在下分化成未成熟树突细胞的任何细胞。树突前体细胞的实例包括但不限于髓样树突前体细胞、淋巴树突前体细胞、浆细胞样树突前体细胞以及特别是单核细胞。由多种亚群的树突前体细胞表达的表型表面标志物在本领域是公知的，并且可用于鉴定目的，例如通过流式细胞术或使用免疫组化技术。

[0037] 本文所用术语“树突细胞疫苗”是指包含树突细胞的疫苗，所述树突细胞载有免疫反应所期望针对的抗原。

[0038] 本文所用表述“HIV 感染相关的疾病”包括对象已发展成 AIDS 的状态，同时也包括感染了 HIV 的对象未表现出任何疾病的病征或症状的状态。

[0039] 本文所用表述“需要针对载于抗原呈递细胞中之抗原的免疫应答的疾病”是指能够通过施用抗原来预防或治疗的任何疾病。合适的疾病包括但不限于感染性疾病（例如 HIV）和癌症。

[0040] 本文所用术语“双硫仑 (disulfiram)”是指也被称为 **Antabuse®** 或二硫化四乙基秋兰姆二硫化物的化学药剂，其是 FDA 批准的广泛用于治疗酒精中毒的药物。所述化合物还促使金属从 HIV 核衣壳蛋白锌指结构域中排出。

[0041] 本文所用术语“GM-CSF”是指来自任意物种或来源的粒细胞巨噬细胞集落刺激因

子(granulocyte macrophage colony stimulating factor 或 granulocyte macrophage colony stimulation factor),并且包括小鼠 GM-CSF(GenBank NM 009969)和人 GM-CSF(GenBank BC108724)的全长蛋白质以及蛋白质的片段或部分。在一个实施方案中,所述 GM-CSF 来自人或小鼠。在另一个实施方案中,所述 GM-CSF 蛋白与全长 GM-CSF 相比缺少最后 10 个羧基端氨基酸序列。本文所用术语"GM-CSF 片段"意为 GM-CSF 肽的一部分,其包括能够刺激干细胞产生粒细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)和单核细胞的 GM-CSF 多肽全长的至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

[0042] 本文所用术语"利用 gp130 的细胞因子(gp130utilizing cytokine)"是指通过包含 gp130 的受体来转导信号的细胞因子。信号转导组件糖蛋白 130(gp130)也称为 CD130,是形成 IL-6 受体家族中的 I 型细胞因子受体的一个亚单位的跨膜蛋白。可用于本发明的利用 gp130 的细胞因子(也称为 IL-6 样细胞因子)包括:白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 11(IL-11)、白细胞介素 27(IL-27)、睫状神经营养因子(CNTF)、心肌营养蛋白-1(CT-1)、心肌营养蛋白样细胞因子(CLC)、白血病抑制因子(LIF)、抑癌蛋白 M(OSM)以及卡波西肉瘤相关的疱疹病毒白细胞介素 6 样蛋白(KSHV-IL6)。

[0043] 本文所用术语"HIV 免疫原"是指来源于 HIV 的能够在对象中产生免疫应答的蛋白质抗原或肽抗原,并且还指 HIV 病毒颗粒,所述颗粒是完整的病毒颗粒或缺少一个或更多个病毒组分但保留了产生免疫应答能力的病毒颗粒。根据本发明使用的 HIV 免疫原可选自任何 HIV 分离株(例如,任何原代的或培养的 HIV-1、HIV-2 或 HIV-3 分离株、毒株或分化株)。现在 HIV 分离株被归类为分立的遗传亚型。已知 HIV-1 包含至少十种亚型(A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、PL F2、G、H、J 和 K)。参见 Taylor B 等,New Engl. J. Med 2008;359(18):1965-1966。已知 HIV-2 包括至少五个亚型(A、B、C、D 和 E)。B 亚型与在世界范围的男同性恋以及静脉内药物使用者中的 HIV 流行有关。大多数 HIV-1 免疫原、实验室适应分离株、试剂和绘制的表位都属于 B 亚型。在撒哈拉以南的非洲、印度和中国这些新增 HIV 感染发生率高的地区中,HIV-1B 亚型仅占感染的小部分,而 HIV-1C 亚型表现为最常见的感染亚型。因此,在某些实施方案中,可优选从特定的亚型(例如,HIV-1B 亚型或 C 亚型)中选择免疫原。可期望在单个的免疫学组合物中包含来自多个 HIV 亚型(例如,HIV-1B 亚型和 C 亚型,HIV-2A 亚型和 B 亚型,或 HIV-1、HIV-2 或 HIV-3 亚型的组合)的免疫原。

[0044] 本文所用术语"HIV-1 病毒颗粒"是指约 120nm 直径的大致球形的结构,其由被锥形衣壳封装的两个拷贝的正单链 RNA 构成,所述衣壳由 2,000 个拷贝的病毒蛋白 p24 构成,所述 RNA 编码病毒的九个基因。单链 RNA 与核衣壳蛋白 p7 以及病毒体发育所需的酶(例如逆转录酶、蛋白酶、核糖核酸酶和整合酶)紧密结合。由病毒蛋白 p17 构成的基质包围衣壳以确保病毒体颗粒的完整性。即,在新形成的病毒颗粒从细胞出芽时,其进而被由两层获自人细胞膜的被称为磷脂的脂肪分子构成的病毒包膜包围。包埋于病毒包膜中的是来自宿主细胞的蛋白质,以及约 70 个拷贝的穿过病毒颗粒表面而突出的复合 HIV 蛋白。该蛋白称为 Env,其由三个被称为糖蛋白(gp)120 的分子构成的帽以及将该结构锚定在病毒包膜内的由三个 gp41 分子组成的主干组成。该糖蛋白复合物使得病毒附着于靶细胞上,并与靶细胞融合,以起始感染周期。

[0045] 本文所用术语"人类免疫缺陷病毒"或"HIV"意为包括 HIV-1 和 HIV-2。"HIV-1"

意为 1 型人类免疫缺陷病毒。HIV-1 包括但不限于胞外病毒颗粒以及与被 HIV-1 感染的细胞相关联的 HIV-1 形式。“HIV-2”意为 2 型人类免疫缺陷病毒。HIV-2 包括但不限于胞外病毒颗粒以及与被 HIV-2 感染的细胞相关联的 HIV-2 形式。优选地，HIV 是 HIV-1。

[0046] 本文所用术语“未成熟树突细胞”是指与成熟状态的树突细胞相比具有显著低的 T 细胞活化能力的树突细胞。特别地，未成熟树突细胞可具有的抗原呈递能力为低于 1/2，优选低于 1/4 的通过添加 LPS(1μg/mL) 并培养两天所诱导成熟之树突细胞的抗原呈递能力。抗原呈递能力可使用例如异型 (allo)T 细胞活化能力（混合淋巴细胞测试）来量化：在 1 ：10 的 T 细胞：树突细胞比率下，或优选在不同的比率下，将异型 T 细胞和树突细胞进行共培养；在培养结束前 8 小时添加 3H- 胸腺嘧啶，并基于整合进 T 细胞 DNA 中 3H- 胸腺嘧啶的量来评估 T 细胞生长能力。参见 Jonuleit H 等，Gene Ther. 2000 ;7 :249-254。可替选地，可通过使用肽测试诱导特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL) 的能力来评估，其中向树突细胞添加某种抗原的已知的 I 类限制性肽；将树突细胞与由采集所述树突细胞的同一健康供体的外周血中得到的 T 细胞共培养（在第三天或更晚的时候添加 25U/mL 或优选 100U/mL 的 IL-2)。优选在 21 天期间用树突细胞刺激 T 细胞三次，更优选在 14 天期间用树突细胞刺激两次。将所得到的效应细胞与 51Cr 标记的靶细胞（肽限制性的 I 类阳性肿瘤细胞）以 100 ：1 至 2.5 ：1(100 ：1、50 ：1、25 ：1、20 ：1、12.5 ：1、10 ：1、5 ：1 或 2.5 ：1) 的比率、优选 10 ：1 的比率共培养 4 小时；量化从靶细胞释放的 51Cr。参见 Hristov G 等，Arch. Dermatol. Res. 2000 ;292 :325-332。此外，未成熟树突细胞优选具有对抗原的吞噬能力，并且更优选示出低表达（例如比上述由 LPS 诱导的成熟 DC 显著更低）或阴性表达诱导共刺激 T 细胞活化的受体。未成熟树突细胞表达可用于通过流式细胞术或免疫组化染色来鉴定该类细胞的表面标志物。

[0047] 本文所用术语“免疫原”是指如果将其本身注入的话能够引发适应性免疫应答的抗原。所有免疫原也都是抗原，但并非所有抗原都是免疫原。

[0048] 本文所用术语“免疫原性组合物”是指在对象中引发免疫应答的组合物，所述免疫应答为针对特异性免疫原产生抗体或细胞介导的免疫应答。免疫原性组合物可制备为例如可注射物，例如液体溶液剂、混悬剂和乳剂。术语“抗原组合物”是指可被宿主免疫系统识别的组合物。例如，抗原组合物包含能够被宿主免疫系统的体液组分或细胞组分识别的表位。

[0049] 本文所用术语“失活的 HIV 病毒”是指完整的、失活的 HIV 病毒。失活的 HIV 是指不能感染或复制的病毒。完整的失活 HIV 病毒一般保持天然的病毒抗原结构，以维持免疫原性，并刺激针对天然病毒的免疫应答。

[0050] 本文所用术语“孵育”是指将树突细胞的培养物在成熟化介质中保持特定的时间，优选 48 小时，直至未成熟树突细胞转化成成熟树突细胞。术语“介质”是包含合适的培养基、一种或更多种成熟化试剂以及任选其他补充剂的成熟化基质。

[0051] 本文所用术语“IL-4”是指任意物种的天然或重组的白细胞介素 -4，其具有天然人 IL-4(SEQ ID NO :1) 的 129 个通常存在的氨基酸序列，以及其保持了促进 Th2 细胞分化、免疫球蛋白类型转换和 B 细胞中的抗体产生之能力的变体。参见 Lee F 等，US 5,017,691。IL-4 的活性可通过例如免疫学方法 (例如 ELISA 或 EIA) 来测量。

[0052] 术语“基本失活的 HIV 的裂解物”是指当细胞被破坏时产生的包含 HIV 病毒体的溶

液，其溶液经受使用化学试剂的失活方法，其中至少 20％、至少 30％、至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％或 100％的所述病毒失活。

[0053] 本文所用术语“成熟树突细胞”是与未成熟状态的树突细胞相比对 T 细胞等具有显著较强的抗原呈递能力的细胞。特别地，与通过添加 LPS(1μg/mL) 并培养两天来诱导成熟之树突细胞的抗原呈递能力相比，所述成熟树突细胞可具有一半或更强，优选与其相等或更强的抗原呈递能力。成熟的 DC 显示出共刺激细胞表面分子的上调表达，并且分泌多种细胞因子。具体地，成熟的 DC 表达更高水平的 I 类 HLA 抗原和 II 类 HLA 抗原 (HLA-A、B、C，HLA-DR)，并且对于 CD80、CD83 和 CD86 表面标志物的表达一般是阳性的。

[0054] 本文所用表述“半数组织培养感染剂量”或“TCID50”意为将在 50％的所接种细胞培养物中产生病理学改变的病原体的量。

[0055] 本文所用术语“药剂”应被理解为包含本发明之免疫原性组合物的药物组合物，特别是疫苗。

[0056] 本文所用术语“单核细胞树突细胞前体”或 MoDC 前体包括在其表面上具有 GM-CSF 受体的单核细胞，以及对 GM-CSF 有响应的其他髓样前体细胞。所述细胞可得自它们所存在的任何组织中，特别是淋巴组织，例如脾、髓样、淋巴结和胸腺。单核细胞树突细胞前体还可从循环系统中分离。外周血是单核细胞树突细胞前体的容易获得的来源。脐带血是单核细胞树突细胞前体的另一个来源。

[0057] 本文所用术语“有效 (operably) 连接”旨在表示目的核苷酸序列与一个或更多个调控序列以允许所述核苷酸序列表达的方式连接 (例如，在体外转录 / 翻译系统中，或者当载体被引入宿主细胞中时在宿主细胞中)。参见 Auer H, Nature Biotechnol. 2006 ;24 : 41-43。

[0058] 术语“可药用载体”、“可药用稀释剂”、“可药用赋形剂”或“可药用载剂”在本文中可互换使用，表示任何常规类型的无毒的固体、半固体或液体填料、稀释剂、封装材料或制剂辅料。在所使用的剂量和浓度下，可药用载体对接受者是基本无毒的，并且与制剂的其他成分是可相容的。可药用载体的数量和性质取决于所期望的施用形式。可药用载体是已知的，并且可通过本领域公知的方法来制备。参见 Faulí i Trillo C,“Tratado de Farmacia Galénica”(Ed. Luzán 5, S.A., Madrid, ES, 1993), 以及 Gennaro A 编辑,“Remington : The Science and Practice of Pharmacy” 第 20 版 (Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA, US, 2003)。

[0059] 本文所用术语“预防”意为在感染的初始阶段或早期施用本发明的免疫原性组合物或含有所述组合物的药剂以避免出现临床病征。

[0060] 本文所用表述“促炎性细胞因子混合物”是指能够引起未成熟树突细胞成熟的两种或更多种细胞因子的混合物。这样的细胞因子的实例非限制地有 :IL-1-β、IL-6、TNF-α、IL-18、IL-11、IL-27 和 IFN-α。合适的促炎性细胞因子混合物非限制地有 :TNF-α 与 CD40L 形成的混合物 ;IFN-α 与 TNF-α 形成的混合物 ;IFN-α 与 CD40L 形成的混合物 ; 1FN-α、TNF-α 与 CD40L 形成的混合物 ;TNF-α、IL-1-β 与 IL-6 形成的混合物 ;IL-1β、TNF-α、IFN-α、IFN-γ 与聚 (I :C) 形成的混合物 ;IL-1、IL-6、TNF-α、IFN-α 与 CD40L 形成的混合物。

[0061] 本文所用术语“前列腺素”是指由脂肪酸酶促衍生的一组脂质化合物的成员，并

且在动物体内起着重要作用。每种前列腺素含有 20 个碳原子，包含 5- 碳环。可用于本发明的前列腺素的实例非限制地有：前列环素 I_2(PGI_2)、前列腺素 E_2(PGE_2) 和前列腺素 $F_{2\alpha}$($PGF_{2\alpha}$)。

[0062] 本文所用术语“补骨脂素化合物”是指属于被称为呋喃香豆素 (furocoumarin) 的天然产物家族的化合物，所述呋喃香豆素是光活化化合物。所述化合物插入 DNA 中，并且在暴露于紫外 (UVA) 辐射时，优选可与基因组中的 5′ -TpA 位点处的胸腺嘧啶形成共价的链间交联。

[0063] 本文所用术语“TLR4 配体”或“toll 样受体 4 配体”是指 toll 样受体 4(TLR4) 的配体。TLR4 还被称为 CD284(分化簇 284)，是 Toll 样受体家族的成员，其在病原体识别和先天免疫系统的活化方面起重要作用。

[0064] 本文所用术语“TNF 超家族成员”是指属于肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的细胞因子。TNF 超家族细胞因子表示促炎性细胞因子的多功能群，其激活细胞存活、凋亡、炎性反应以及细胞分化的信号通路。TNF 超家族成员的实例非限制地包括肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、LIGHT、CD40 配体 (CD40L)、4-1BB 配体 (4-1BBL)、APRIL、CD27 配体 (CD27L)、CD30 配体 (CD30L)、Fas 配体、糖皮质激素诱导的 TNFR 相关配体 (GITRL)、淋巴毒素 α (LTα)、淋巴毒素 β (LTβ)、OX40 配体 (OX40L)、NF-κB 配体的受体激活剂 (RANKL)、TNF 家族的 B 细胞激活因子 (BAFF)、TNF 相关的凋亡诱导配体 (TRAIL)、TNF 样弱凋亡诱导物 (TWEAK) 以及 VEG1。

[0065] 本文所用术语“治疗”是指在临床病征出现之前或之后施用本发明的免疫原性组合物或包含该组合物的药剂以控制疾病的发展。对疾病发展的控制应理解为意为有益的或期望的临床结果，其包括但不限于：症状的减少、疾病持续时间缩短、病理状态稳定化 (特别是避免进一步恶化)、延迟疾病的发展、改善病理状态以及缓解 (部分地和完全地二者)。对疾病发展的控制还包括与未施加治疗的预期存活相比延长存活。在本发明的上下文中，术语“治疗”特别是指防止或减缓被 HIV-1 感染之对象中健康的 CD4+T 细胞的感染和破坏。该术语还指防止和减缓获得性免疫缺陷疾病的症状的发作，例如极低的 CD4+T 细胞数以及被机会病原体例如分支杆菌属 (Mycobacteria spp)、卡氏肺孢子虫 (Pneumocystis carinii) 和隐球菌肺孢子菌 (Pneumocystis cryptococcus) 反复感染。有益或期望的临床结果包括但不限于，幼稚 CD4+T 细胞的绝对数的升高 (10 至 3520 的范围)，CD4+T 细胞占总循环免疫细胞百分率的升高 (1％至 50％的范围)，和 / 或 CD4+T 细胞数升高 (1％至 161％的范围) 为未被感染的对象中正常 CD4+T 细胞数的百分率。“治疗”还可意为与没有接受任何 HIV 靶向治疗之对象的预期存活相比延长被感染对象的存活。

[0066] 本文所用术语“疫苗”是指用于向宿主体内施用以提供针对疾病 (特别是病毒性疾病) 之防护的免疫原性组合物，所述宿主可为灵长类宿主，尤其是人宿主。

[0067] 本文所用术语“载体 (vector)”表示线性或环状的核酸分子，其包含编码形成病毒颗粒之所有蛋白质 (除了部分或完整的整合酶蛋白质) 的基因组，所述基因组与为其在目的宿主细胞中的自主复制所提供的额外片段有效连接。优选地，所述载体是表达载体，其被定义为这样的载体，其除了宿主细胞中的自主复制区域外，还包含与本发明的基因组有效连接并且能够增强根据本发明的基因组产物之表达的区域。

[0068] 本文所用术语“病毒颗粒”是指完整的病毒颗粒，而不是指蛋白亚基或肽。病毒颗

粒（也称为病毒体）由两部分或三部分组成：由 DNA 或 RNA 构成的病毒遗传物质；保护这些基因的蛋白质外壳；以及在一些情况下，当它们处于细胞外时包围所述蛋白质外壳的脂质包膜。取决于病毒，病毒颗粒的形状为从单螺旋和二十面体形式至更复杂的结构。

[0069] 2. 用于体外获得载有抗原之抗原呈递细胞的方法

[0070] 在第一个方面中，本发明涉及用于获得载有抗原的树突细胞的体外方法（下文中称为“本发明的第一种方法”），其包括：使未成熟树突细胞在足以使所述未成熟树突细胞成熟的条件下并且在防止细胞附着于基底的条件下与包含所述抗原的免疫原接触。

[0071] 本发明的方法包括在足以 a) 使抗原呈递细胞成熟，以及 b) 防止细胞附着于基底的条件下使未成熟树突细胞与包含抗原的免疫原接触。

[0072] 在一个优选实施方案中，所述免疫原是病毒颗粒，优选 HIV 病毒颗粒，更优选 HIV-1 病毒颗粒。所述病毒颗粒可包含若干抗原。

[0073] HIV-1 病毒的整个基因组表现出异常高度的遗传变异性。序列对比已鉴定了 HIV-1 的三个遗传群，命名为 M、O 和 N。根据 2009 年分离的一株病毒，猜测存在第四群“P”。M 群进一步分为系统发生相关的主要遗传亚型（或分枝），命名为 A、B、C、D、E、F、G、H、J 和 K。不同亚型的共感染产生流行重组型 (CRF)。M 群与流行亚型间重组型 (CRF) 一起包括了当今世界大多数的 HIV-1 变体。本发明的 HIV-1 病毒可表示能够感染人类的任何遗传群或遗传亚型，并且还包括流行重组型、实验室毒株以及原代分离株。因此，在一个优选实施方案中，免疫原是 HIV 免疫原。

[0074] 合适的 HIV 免疫原包括：HIV 包膜 (env；例如 NCBI Ref. Seq. NPJ357856)、gag（例如 p6、p7、p17、p24、GenBankAAD39400. 1)、pol 编码的蛋白酶（例如 UniProt P03366)、nef（例如 GenBank CAA41585. 1，Shugars D 等，J. Virol. 1993；67(8)：4639-4650)，以及其变体、衍生物和融合蛋白。参见 Gómez C 等，Vaccine 2007；25：1969-1992。合适的毒株和组合可由本领域技术人员根据需要来选择。

[0075] 本发明的 HIV 免疫原能够引发免疫应答。特别地，“免疫应答”是指 CD4+T 细胞或 CD8+T 细胞介导的针对 HIV 感染的免疫应答。针对 HIV 的免疫应答可通过测量例如以下因子来确定：病毒载量、T 细胞增殖、T 细胞存活、T 细胞进行的细胞因子分泌或抗原特异性抗体产量（例如，抗体浓度）的增加。

[0076] 所述方法的第一步是在足以使所述抗原呈递细胞成熟的条件下进行的。在一个优选实施方案中，足以使所述未成熟树突细胞成熟的条件包括与 GM-CSF 和 IL-4 的组合接触。

[0077] GM-CSF 可以以 100IU/mL 至 1500IU/mL 的浓度使用，优选 300IU/mL 至 1300IU/mL，更优选 500IU/mL 至 1200IU/mL，例如 700IU/mL 至 1100IU/mL，并且最优选约 1000IU/mL。纯化的 GM-CSF 或重组的 GM-CSF（例如重组人 GM-CSF(R&D Systems，Inc.，Minneapolis，MN，US) 或沙格司亭（**Leukine®**，Bayer Healthcare Pharmaceuticals，Inc.，Wayne，NJ，US)) 都可用于本文所述的方法。

[0078] IL-4 可以以 100IU/mL 至 1500IU/mL 的浓度使用，优选 300IU/mL 至 1300IU/mL，更优选 500IU/mL 至 1200IU/mL，例如 700IU/mL 至 1100IU/mL，并且最优选约 1000IU/mL。

[0079] 在一个优选实施方案中，两种细胞因子 (GM-CSF 和 IL-4) 都以 1000IU/mL 的浓度使用。

[0080] 在再造用于 DC 成熟之生理环境的尝试中，可使用成熟化试剂的一些平衡混合物。

因此，在另一个优选实施方案中，所述细胞成熟化试剂是促炎性细胞因子混合物。在一个优选实施方案中，所述促炎性细胞因子混合物至少包含 IL-1 受体的激动剂、利用 gp130 的细胞因子以及 TNF 超家族成员。所述细胞因子混合物可包含其他化合物。

[0081] 在一个优选实施方案中，所述 IL-1 受体激动剂是 IL-1β。优选地，有效的 IL-1β 浓度为 300U/mL。在另一个优选实施方案中，所述利用 gp130 的细胞因子是 IL-6。优选地，有效的 IL-6 浓度为 1000U/mL 的 IL-6。在另一个优选实施方案中，所述 TNF 超家族成员是 TNF-α。优选地，有效的 TNF-α 浓度为 1000U/mL。

[0082] 最常使用的混合物包含 TNF-α、IL-1β 和 IL-6。因此，在一个优选实施方案中，所述促炎性细胞因子混合物包含 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的混合物。更优选地，所述介质的组成为：300U/mL 的 IL-1β、1000U/mL 的 TNF-α 和 1000U/mL 的 IL-6。

[0083] 已公开，向促炎性细胞因子混合物中添加前列腺素改进了所生成之 DC 的产量、成熟、迁移和免疫刺激能力。参见 Jonuleit H 等，Eur. J. Immunol. 1997；27：3135-3142。因此，在一个优选实施方案中，所述促炎性细胞因子混合物还包含前列腺素。更优选地，所用的前列腺素是前列腺素 E_2(PGE_2)。优选地，有效的 PGE_2 浓度为 1μg/mL。更优选地，所述介质的组成为：300IU/mL 的 IL-1β、1000IU/mL 的 TNF-α、1000IU/mL 的 IL-6 和 1ug/mL 的 PGE_2。

[0084] 在另一个实施方案中，所述接触步骤包括第一步，其中使细胞与 GM-CSF 和 IL-4 的组合接触；以及第二步，其中使所述细胞与上述促炎性细胞因子混合物接触。在另一个实施方案中，所述接触步骤包括第一步，其中使细胞与 GM-CSF 和 IL-4 的组合接触；以及第二步，其中使所述细胞与 GM-CSF 和 IL-4 以及上述促炎性细胞因子混合物的组合接触。

[0085] 本发明的第一种方法还在防止细胞附着于基底的条件下进行。如果细胞可在施加轻柔的机械力（例如轻拍烧瓶）以使弱附着的细胞分离后通过来自培养容器的上清液来收集，则该细胞被视为非黏着的。在一个优选实施方案中，使用低附着性的基底来防止细胞附着于基底。这些基底是广泛可获得的，并且通常由亲水并且电中性的水凝胶形成，从而防止细胞通过与带负电或带正电的表面蛋白质的相互作用或者疏水相互作用而附着。当基底导致单核细胞群的附着比对附着基底（例如聚苯乙烯基底）的附着低至少 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%或更低，则该基底被视为低附着。用于确定表面是否是低附着的合适测定在本领域是已知的。参见 Shen M 等，J. Biomed. Mater. Res. 2001；57：336-345。

[0086] 本发明的方法使用未成熟树突细胞来进行，当与成熟化组合物接触时，其发育成成熟的树突细胞。

[0087] 未成熟树突细胞可从树突细胞前体群得到。优选地，所述树突细胞前体可在四周或更短时间内分化成未成熟树突细胞的细胞，所述时间更优选 20 天或更短时间，甚至更优选 18 天或更短时间，且更优选 16 天或更短时间。在一个优选实施方案中，所述树突细胞前体在 GM-CSF 和 IL-4 的存在下，在小于 7 天内，更优选 5 天内，分化成未成熟树突细胞。

[0088] 在一个优选实施方案中，所述树突前体细胞群是单核细胞树突细胞前体群。更优选地，所述单核细胞树突细胞前体来源于外周血单个核细胞 (PBMC)。PBMC 可从用缓冲盐水 1 ： 1 稀释的全血中得到，或者通过 Ficoll-Paque PLUS（不含内毒素，货号 17-1440-03，Amersham Pharmacia Biotech AB，Uppsala，SE）进行标准离心从白细胞浓缩物（“血沉棕黄层”级分，MSKCC 血库）中得到。MoDC 前体是组织培养塑料附着性的（货号 35-3003，

Falcon，Becton-Dickinson Labware Inc.，Franklin Lakes，NJ，US)PBMC，并且可如上所述在 GM-CSF(1000IU/mL) 和 IL-4(500IU/mL) 的存在下，在加有 1％正常人血清 (NHS)（或 10％胎牛血清）的全 RPMI 1640 中进行培养，每两天更换一次培养液。参见 Thurner B 等，J. Immunol. Meth. 1999 ;223 :1-15 以及 Ratzinger G 等，J. Immunol. 2004 ;173 :2780-2791。

[0089] 可在培养之前用 $CD14^+$ 抗体从 PBMC 分离纯化的单核细胞群，以得到未成熟树突细胞。单核细胞通常通过染色的涂片中大的两叶核来鉴定。除了表达 CD14 外，单核细胞还表达一种或更多种以下表面标志物 :125I-WVH-1、63D3、亲脂素 (adipophilin)、CB12、CD1Ia、CD1Ib、CD15、CD54、Cdl63、胞苷脱氨酶和 FIt-I。参见 Feyle D 等，Eur. J. Biochem. 1985 ;147 :409-419，Malavasi F 等，Cell Immunol. 1986 ;97(2) :276-285，Rupert J 等，Immunobiol. 1991 ;182(5) :449-464 ;Ziegler-Heitbrock H，J. Leukoc. Biol. 2000 ;67 :603-606，以及 Pilling D 等，PLoS One 2009 ;4(10) :e-7475。

[0090] 一般而言，单核细胞树突细胞前体可通过标志物（例如 CD13 和 CD33) 的表达来鉴定。髓样树突前体可经 CD14 或 CD1a 通路分化成树突细胞。因此，本发明的树突前体细胞可为 CD14+CD1a- 树突前体细胞或 CD14-CD1a+ 树突前体细胞。在本发明的某些实施方案中，髓样树突前体细胞可以以表达 SCA-1、c-kit、CD34、CD16 和 CD14 标志物为特征。在一个优选实施方案中，髓样树突前体细胞为 CD14+ 单核细胞。所述 CD14+ 单核细胞还可表达 GM-CSF 受体。

[0091] 用作本发明第一种方法的起始材料的未成熟树突细胞可为待治疗对象自体的。在另一些实施方案中，用作本发明方法的起始材料的未成熟树突细胞是异源的树突细胞。例如，如果要治疗移植物抗宿主疾病，用作起始材料的所述未成熟树突细胞是从供体获得的树突细胞。对象可为例如小鼠、大鼠、狗、鸡、马、山羊、驴或灵长类。最优选地，所述对象是人。在一个优选实施方案中，所述未成熟树突细胞是单核细胞来源的未成熟树突细胞。

[0092] 本发明的第一种方法包括 :使未成熟树突细胞在足以使所述抗原呈递细胞成熟的条件下和防止细胞附着于基底的条件下与包含所述抗原的免疫原接触。结果，得到了载有抗原的抗原呈递细胞。

[0093] 在孵育时间结束时得到成熟的载有抗原的树突细胞（即，携带目的抗原的成熟树突细胞）。树突细胞的成熟可通过本领域已知的方法监测。可在例如流式细胞术和免疫组化染色的测定中检测 mDC 表面标志物。还可通过细胞因子的产生（例如通过另一种免疫测定 ELISA，或者通过使用寡核苷酸测定）来监测 mDC。树突细胞的成熟可通过免疫分型来进一步确认。可例如基于选自 CD80 和 CD86 的标志物来区分未成熟树突细胞和成熟树突细胞。未成熟树突细胞这些标志物呈弱阳性，优选阴性，而成熟树突细胞呈阳性。

[0094] 当在含有未成熟树突细胞群的培养物中进行本发明的方法时，足以成熟的条件使得实现至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％或优选 100％的未成熟树突细胞成熟。

[0095] 在一个优选实施方案中，本发明的第一种方法还包括回收免疫原脉冲的树突细胞。所述回收可通过任何本领域已知的方法进行。在一个优选实施方案中，所述免疫原脉冲的树突细胞的回收通过使用对成熟树突细胞标志物特异的抗体免疫隔离 (immunoisolation) 来进行，例如以下的一种或更多种 :CD4、CD8、CD54、CD56、CD66b 和 CD86。

[0096] 在一个优选实施方案中，待载入树突细胞的免疫原是病毒颗粒，优选逆转录病毒颗粒。在另一个优选实施方案中，所述免疫原是慢病毒颗粒，优选HIV病毒颗粒。更优选地，所述免疫原是HIV-1病毒颗粒。

[0097] HIV-1病毒通过使用细胞表面的协同受体来与人CD4细胞结合，随后感染人CD4细胞。不同的HIV-1毒株使用不同的协同受体来进入人CD4细胞。因此，当毒株仅使用C-C趋化因子受体5型(CCR5)协同受体感染CD4细胞时，HIV-1病毒可能是CCR5向性的(CCR5-tropic)；当毒株仅使用C-X-C趋化因子受体4型(CXCR4)协同受体感染CD4细胞时，是CXCR4向性的；并且当毒株既能使用CCR5协同受体又能使用CXCR4协同受体感染CD4细胞时，是双向向性的(dual-tropic)。参见Whitcomb J等，Antimicrob.Agents Chemother.2007；51(2)：566-575。存在若干种可用的测定来区分不同向性的病毒(例如Trofile®，Monogram Biosciences，Inc.，San Francisco，CA，US)。在一个优选实施方案中，所述HIV-1病毒选自CXCR4向性病毒和CCR5向性病毒；优选为CXCR4向性病毒。

[0098] 在另一个实施方案中，所述免疫原是失活的HIV颗粒，或基本失活HIV的裂解物。可使用常规方法使病毒或其裂解物失活，例如加热、化学试剂以及光化学试剂。

[0099] 失活的病毒在体外检测不到感染性。为了量化由所施加的失活方法产生的感染剂量的降低，以及为了量化在失活后的样品中仍然存在的残余感染剂量，对失活的HIV进行测定。可用于该目的的方法在本领域是已知的。参见Agrawal K等，PLoS One.2011；6(6)：e21339。所述方法包括使用失活的上清液来感染允许(permissible)细胞，然后检测新形成的病毒。所述检测可通过测量由细胞产生的HIV RNA拷贝数/mL，或者通过ELISA法来测量每毫升上清液中HIV p24抗原的量来进行。HIV p24抗原的产生的检测可例如通过在本发明的实验部分描述的ELISA来进行。

[0100] 失活步骤进行足够的时间以导致相对于对照上清液(即，未用失活试剂处理的上清液，或者在类似的条件下用本应提供失活试剂的载剂处理的上清液)，所述上清液感染性降低至少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％。适于评估HIV失活的方法包括但不限于，取出血液培养物，然后在T细胞介质中培养，并测量感染性。一种替选方法是在以周期性的方式(例如，每1天至7天)在进行失活尝试或处理之前和之后测定血液中存在的病毒拷贝数。

[0101] 在一个实施方案中，所述免疫原是加热失活的病毒或病毒裂解物。病毒(例如HIV-1)可通过本领域已知的数种方案来加热失活。参见Harper J等，J.Virol.1978；26(3)：646-659，Einarsson R等，Transfusion 1989；29(2)：148-152，以及Gil C等，Vaccine 2011；29(34)：5711-5724。

[0102] 在另一个实施方案中，所述免疫原是化学失活的病毒或病毒裂解物。可通过用化学试剂孵育病毒来实现所述失活。在本发明的另一个方面，对病毒与化学试剂的混合物进行辐照。优选地，用紫外光辐照混合物直至病毒失活。

[0103] 在一个优选实施方案中，所述化学试剂是锌指修饰性化合物。术语“锌指修饰性化合物”是指共价修饰HIV病毒体核衣壳蛋白中必需的锌指，从而使其失去感染性的化合物。这种失活模式的一个优点是，保存了病毒体表面上的蛋白质的构象完整性和功能完整性。已鉴定了多种化合物，其通过多种不同机制以共价修饰核衣壳锌指，导致配位的锌释放并失去感染性来起作用。虽然这些化合物的具体作用机制各不相同，但是其共同的机制特征

涉及对组成核衣壳蛋白锌指的残基中配位锌的半胱氨酸硫进行优先化学攻击。参见 Rossio J 等，J. Virol. 1998 ;72(10) :7992-8001)。

[0104] 用于根据本发明方法的合适锌指修饰性化合物包括但不限于：

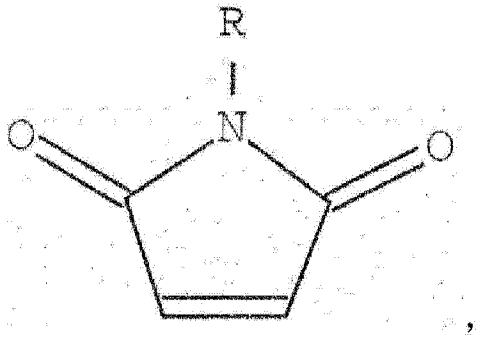
[0105] (i)C- 亚硝基化合物，

[0106] (ii) 偶氮二甲酰胺，

[0107] (iii) 具有 R-S-S-R 结构的二硫化物，

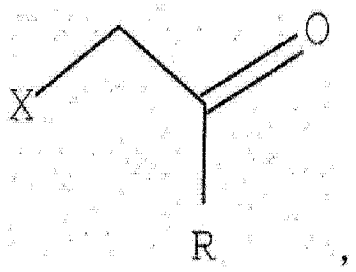
[0108] (iv) 具有以下结构的马来酰亚胺

[0109]



[0110] (v) 具有以下结构的 α - 卤代酮

[0111]



[0112] (vi) 具有式 R-NH-NH-R 的酰肼 (hidrazide)，

[0113] (vii) 一氧化氮以及包含 NO 基团的其衍生物，

[0114] (viii) 铜离子以及包含 Cu^{2+} 的配合物，

[0115] (ix) 铁离子以及包含 Fe^{3+} 的配合物，

[0116] 其中 R 是任意原子或分子，并且 X 选自 F、I、Br 和 Cl。

[0117] 二硫化物化合物的实例包括但不限于以下物质：四甲基秋兰姆二硫化物、四乙基秋兰姆二硫化物、四异丙基秋兰姆二硫化物、四丁基秋兰姆二硫化物、二环戊烷亚甲基秋兰姆二硫化物、异丙基黄原酰二硫化物、O,O- 二乙基二硫双 -(硫代甲酸)、二硫化苯甲酰、苯甲酰甲基二硫化物、甲脒二硫化物 2HCl、2-(二乙基氨基) 乙基二硫化物、aldrithiol-2、aldrithio-4、2,2- 二硫双 (吡啶 N- 氧化物),6,6- 二硫烟碱二酸、4- 甲基 -2- 喹啉基二硫化物、2- 喹啉基二硫化物、2,2- 二硫双 (苯并噻唑)、2,2- 二硫双 (4- 叔丁基 -1- 异丙基)- 咪唑、4-(二甲基氨基) 苯基二硫化物、2- 乙酰胺基苯基二硫化物、2,3- 二甲氧基苯基二硫化物、4- 乙酰胺基苯基二硫化物、2-(乙氧基酰胺基) 苯基二硫化物、3- 硝基苯基二硫化物、4- 硝基苯基二硫化物、2- 氨基苯基二硫化物、2,2- 二硫双 (苄腈)、对甲苯基二亚砜、2,4,5- 三氯苯基二硫化物、4- 甲磺酰基 -2- 硝基苯基二硫化物、4- 甲磺酰基 -2- 硝基苯基二硫化物、3,3- 二硫二丙酸、N,N- 二甲酰 -L- 胱氨酸、反式 -1,2- 二噻烷 -4,5- 二醇、

2- 氯 -5- 硝基苯基二硫化物、2- 氨基 -4- 氯苯基二硫化物、5,5- 二硫双 (2- 硝基苯甲酸)、2,2- 二硫双 (1- 萘胺)、2,4- 二硝基苯基 - 对甲苯基二硫化物、4- 硝基苯基 - 对甲苯基二硫化物,以及 4- 氯 -3- 硝基苯基二硫化甲脒二硫化二盐酸化物。

[0118] 在一个优选实施方案中,所述二硫化物化合物选自双硫仑或 aldrithiol-2(2,2'- 二硫二吡啶)。在另一个优选实施方案中,所述锌指修饰性化合物是 aldrithiol-2。在另一个优选实施方案中,所述锌指修饰性化合物是双硫仑。

[0119] 马来酰亚胺的一个实例是 N- 乙基马来酰亚胺。

[0120] 酰肼的一个实例是 2-(氨基甲酰硫代)- 乙酸 2- 苯基酰肼。

[0121] 在另一个实施方案中,所述失活是光化学的。在一个优选实施方案中,所述光化学失活通过使用补骨脂素化合物并在能够活化所述补骨脂素化合物的波长下辐照病毒与补骨脂素化合物的混合物来进行。

[0122] 可用于失活步骤的补骨脂素类包括补骨脂素和经取代的补骨脂素,其中取代基可为烷基,特别是具有 1 至 3 个碳原子的烷基 (例如甲基);烷氧基,特别是具有 1 至 3 个碳原子的烷氧基 (例如甲氧基);以及具有 1 至 6 个碳原子、更通常地 1 至 3 个碳原子以及 1 至 2 个杂原子的经取代的烷基,其可为含氧的,特别是羟基或具有 1 至 3 个碳原子的烷氧基 (例如,羟甲基和甲氧基甲基),或者氨基,包括具有总共 0 至 6 个碳原子的单烷基氨基和二烷基氨基或氨基烷基 (例如氨基甲基)。可存在 1 至 5 个、通常 2 至 4 个取代基,其通常处于 4、5、8、4′ 和 5′ 位,特别是 4′ 位。

[0123] 补骨脂素类的实例包括 :补骨脂素 ;5- 甲氧基补骨脂素 ;8- 甲氧基 - 补骨脂素 ;5,8- 二甲氧基补骨脂素 ;3- 乙酯基补骨脂素 ;3- 乙酯基 - 假补骨脂素 ;8- 羟基补骨脂素 ;假补骨脂素 ;4,5′,8- 三甲基 - 补骨脂素 ;别补骨脂素 (allopsoralen) ;3- 乙酰 - 别补骨脂素 ;4,7- 二甲基 - 别补骨脂素 ;4,7,4′ - 三甲基 - 别补骨脂素 ;4,7,5′ - 三甲基 - 别补骨脂素 ;异假补骨脂素 ;3- 乙酰异假补骨脂素 ;4,5′ - 二甲基 - 异假 - 补骨脂素 ;5′,7- 二甲基 - 异假补骨脂素 ;假异补骨脂素 ;3- 乙酰 - 假异补骨脂素 (seudoisopsoralen) ;3/4′,5′ - 三甲基 - 氮杂 - 补骨脂素 ;4,4′,8- 三甲基 -5′ - 氨基 - 甲基补骨脂素 ;4,4′,8- 三甲基 - 酞氨基 - 补骨脂素 (4,4′,8-trimethyl-phthalamyl-psoralen) ;4,5′,8- 三甲基 -4′ - 氨甲基补骨脂素 ;4,5′,8- 三甲基 - 溴补骨脂素 ;5- 硝基 -8- 甲氧基 - 补骨脂素 ;5′ - 乙酰基 -4,8- 二甲基 - 补骨脂素 (5′ -acetyl-4,8-dimethyl-psoralen) ;5′ - 乙酰 -8- 甲基 - 补骨脂素 (5′ -aceto-8-methyl-psoralen) ;以及 5′ - 乙酰 -4,8- 二甲基 - 补骨脂素。在一个更优选的实施方案中,所述补骨脂素化合物是氨托沙林,优选为盐形式如氨托沙林盐酸盐 (S-59)。预期没有残余氨托沙林的体内药理学作用。

[0124] UV 辐照的时间将根据光强度、补骨脂素浓度、病毒浓度以及病毒接受的辐照方式而变化,其中辐照强度可根据介质而变化。辐照时间将与光强度成反比。总时间通常是至少约 5 分钟并且不长于约 30 分钟,一般为约 5 分钟至 10 分钟。

[0125] 所采用的光一般具有约 300nm 至 400nm 的波长。通常,与滤波器一起使用紫外光源以除去 UVB 光。强度一般为约 150μW/cm^2 至约 1500μW/cm^2,但是在一些情况下,可为更高强度。

[0126] 可期望从辐照混合物中去除未消耗的补骨脂素或其副产物。这可通过数种标准实验室方法中的一种来容易地完成,例如在完成辐照后经过适当大小的膜透析,或者通过适

当大小的中空纤维系统。替选地，可使用亲和法来去除一种或更多种低分子量材料。

[0127] 3. 载有抗原的树突细胞以及树突细胞疫苗

[0128] 根据本发明的方法能够得到抗原脉冲的树突细胞。因此，在另一个方面，本发明涉及可通过使用根据本发明之方法得到的抗原脉冲的树突细胞。

[0129] 适用于本发明的树突细胞可以是不同类型，例如，但不限于，髓样 DC、浆细胞样 DC、朗格汉斯氏细胞以及间质 DC(insterstitial DC)。最强效的专职性 APC 是骨髓来源的 DC。因此，在一个优选实施方案中，所述 DC 是髓样 DC。

[0130] 树突细胞可通过它们特定的细胞表面标志物特征来鉴定。该测定可通过例如流式细胞术使用常规方法和设备来实施。例如，可使用荧光激活的细胞分选 (Becton Dickinson Calibur FACS，Becton-Dickinson Labware Inc.，Franklin Lakes，NJ，US) 系统和市售可得到的抗体，按照本领域完备建立的方案来进行。因此，可选择在流式细胞术中对特异性的细胞表面标志物展示的信号高于背景信号的细胞。背景信号的定义为，在常规 FACS 分析中，由与用于检测每种表面标志物的特异性抗体相同同种型的非特异性抗体发出的信号强度。为了判断标志物的阳性，所观察到的特异性信号必须具有相对于使用常规方法和设备的背景信号强度强多于 20％，优选 30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、500％、1000％、5000％、10000％或以上。

[0131] 树突细胞具有强的诱导和协调 T 细胞免疫性的能力。这使它们成为用于增强针对 HIV 感染的 T 细胞免疫性的免疫治疗策略的理想生物学药剂。因此，在另一个实施方案中，本发明涉及包含可使用根据本发明的方法得到的抗原脉冲的树突细胞的疫苗。

[0132] 所述树突细胞疫苗优选是对象自体的。本文所用术语“自体”意指获得自的对象并随后将再引入同一对象的任何材料。最有效的免疫治疗疫苗利用基于自体 HIV(即，每个宿主独有的准病毒种类）的抗原。迄今在抗 HIV 免疫治疗试验中最令人印象深刻的结果使用了载有完整的失活 HIV 病毒体的树突细胞，所述病毒体来源于对象的自体病毒。所述树突细胞也得自同一对象。在一个优选实施方案中，所述树突细胞制备物是对象自体的，CD4+T 细胞以及 CD14+ 单核细胞从所述对象分离。

[0133] 在另一个方面，本发明涉及根据本发明的树突细胞疫苗用于医疗。

[0134] 在另一个方面，本发明涉及根据本发明的树突细胞疫苗用于治疗或预防 HIV 感染或与 HIV 感染有关的疾病，其中所述免疫原是 HIV 免疫原。

[0135] 在另一个方面，本发明涉及根据本发明的树突细胞疫苗用于制备治疗患有 HIV-1 感染或与 HIV 感染有关之疾病的对象的药剂的用途，其中所述免疫原是 HIV 免疫原。

[0136] 在另一个方面，本发明涉及治疗患有 HIV-1 感染或者与 HIV 感染有关的疾病的对象的方法，所述方法包括将根据本发明的树突细胞疫苗施用于所述对象，其中所述免疫原是 HIV。

[0137] 本发明的树突细胞疫苗可为治疗性疫苗，即，给予已发展成 AIDS 的感染了 HIV 的对象以通过调节他们的免疫应答来帮助对抗该疾病的物质。作为现有针对 HIV 的抗逆转录病毒治疗选择的补充或替代，治疗性 HIV 疫苗代表有前景的策略。

[0138] 本发明的树突细胞疫苗可为设计成施用于尚未发展成 AIDS 的已感染了 HIV 之对象的预防性 AIDS 疫苗。本发明的疫苗不是设计成防止健康对象感染 HIV 的预防性 AIDS 疫苗。

[0139] 在一个优选实施方案中，将本发明的树突细胞疫苗施用于处于抗逆转录病毒治疗(ART)，优选处于高效抗逆转录病毒治疗 (HAART) 中的对象。在另一个优选实施方案中，将本发明的树突细胞疫苗施用于已中断抗逆转录病毒治疗的对象。

[0140] 因此，所述治疗性疫苗可用于降低已被感染对象中 HIV-1 的复制，以及限制接种了疫苗的对象中病毒的感染性。

[0141] 所述树突细胞疫苗可为自体树突细胞疫苗。因此，在一个优选实施方案中，待治疗对象是与从其分离 CD4+T 细胞和 CD14+ 单核细胞的对象为同一对象。

[0142] 将所述树突细胞 HIV 治疗性疫苗组合物再注射于所述对象。树突细胞 HIV 治疗性疫苗的合适递送途径是静脉内、皮下、皮内或鼻内途径。还可为不同途径的组合。

[0143] 本发明的树突细胞疫苗是载有抗原的树突细胞制剂，其包含免疫原性有效量的根据本发明的基本失活 HIV 以及可药用载体。

[0144] 在另一个实施方案中，本发明的基于树突细胞的疫苗可例如通过本领域已知的方法将载有失活的特定亚型的 HIV 的 APC 直接递送（例如，通过皮下注射器）至对象来施用。

[0145] 在另一个实施方案中，用载有特定亚型之失活 HIV 的 APC 来治疗个体。首先离体使 APC 负载失活的 HIV。然后通过任何合适的技术将经负载的 APC 施用于对象。优选地，通过皮下、皮内或肌内向个体注射经负载的 APC，优选通过皮下注射。更优选地，通过预先从处于治疗中的对象采集 PBMC 样品来得到所述 APC。使分离自 PBMC 的单核细胞 (CD14+) 分化成未成熟树突细胞，后者随后发育成成熟树突细胞。这样的方法在本领域是公知的。

[0146] 在另一个实施方案中，失活的完整 HIV 与佐剂组合以诱导针对 HIV-1 的细胞免疫应答。合适的佐剂包括：完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂角苷、矿物凝胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、复合多元醇 (pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳剂或烃乳剂、钥孔戚血蓝蛋白、二硝基苯酚、常规细菌制品（例如霍乱毒素、热不稳定肠毒素、减毒的或杀死的 BCG（卡介杆菌）和短小棒状杆菌 (Corynebacterium parvum)，或 BCG 卡介菌衍生蛋白）、生化分子（例如 TNF-α、IL-1-β、IL-6、PGE_2 或 CD40L)，或包含 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸。先前已经公开了适用于疫苗组合物中的材料实例。参见 Osol A 编辑，Remington′ s Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.,Easton,PA,US,1980，第 1324-1341 页）。

[0147] 可用于本发明的佐剂可为适于激活表达于树突细胞、T 细胞、B 细胞或其他抗原呈递细胞中及其上的病原体识别受体 (PRR) 的任何配体。激活核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 受体通路的配体可适用于本发明的目的。适合这些配体的佐剂可为胞壁酰二肽衍生物。激活 toll 样受体 (TLR) 的配体也可用于本发明的目的。这些受体是 PRR 家族的成员，并且在多种天然免疫细胞中广泛表达，包括在 DC、巨噬细胞、肥大细胞和嗜中性粒细胞中。

[0148] 作为激活 TLR 之配体的实例，可提及的有：对于 TLR4，单磷酰基脂质 A、3-O- 脱酰基单磷酰基脂质 A(3-O-deacytylated monophosphoryl lipid A)、来自大肠杆菌 (E.coli) 的 LPS、紫杉醇、RSV 融合蛋白以及宿主热休克蛋白 60 和 70；对于 TLR2，脂肽例如 N- 棕榈酰基 -S-2,3（双棕榈酰氧基）- 丙基 - 半胱氨酰 - 丝氨酰 -（赖氨酰）3- 赖氨酸 (N-palmitoyl-S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cvsteinyl-seryl-(lysil)3-lysine)、金黄色葡萄球菌 (S.aureus) 的肽聚糖、来自结核分支杆菌 (M.tuberculosis) 的脂蛋白、酿酒酵母 (S.cerevisiae) 酵母聚糖以及高度纯化的牙龈卟啉单胞菌 (P.gingivalis)LPS；对

于 TLR3，dsRNA；TLR5，鞭毛蛋白；TLR7，合成化合物例如咪唑并喹啉；或者对于 TLR9，某些种类的富 CpG DNA。本发明的另一些有用佐剂可为 T 辅助表位。

[0149] 本发明的疫苗可配制成药物组合物（也称为“药剂”）用于治疗慢性 HIV 感染个体。本发明的药物组合物优选为无菌的并且不含致热原，并且还包含可药用载体。合适的可药用载体包括水、盐水溶液（例如，生理盐水）、粘度调节剂以及其他用于配制人用药物组合物的常规药用赋形剂或添加剂。合适的药用赋形剂包括稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂、缓冲剂以及 pH 调节剂。合适的添加剂包括生理学上可生物相容的缓冲剂（例如氨丁三醇盐酸盐）、螯合剂（例如 DTPA、DTPA- 双酰胺）或钙螯合物（例如 DTPA 钙、CaNaDTPA- 双酰胺），或者任选地添加钙盐或钠盐（例如氯化钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙、乳酸钙）。本领域技术人员能够配制本发明的药物组合物。参见 Gennaro，2003，同上。

[0150] 可通过主动疗法的细胞免疫应答减轻之慢性 HIV 感染个体的治疗的典型方案包括：施用有效量的上述疫苗组合物，可作为单次治疗施用，或在长达并包括 1 周至约 24 个月的时间段内重复施用，伴有或不伴有增强剂量或加强剂量。

[0151] 根据本发明，本发明的基本失活的 HIV 或免疫原性组合物的“免疫原性有效量”是足以使对象产生特异性的并且充足的免疫学应答从而向对象提供针对随后 HIV 暴露之保护的量。在这种情况下，有效量引起针对 HIV 的细胞应答或体液应答，优选细胞免疫应答。

[0152] 所述免疫原性有效量导致减轻一种或更多种病毒性病症之症状，或防止病毒性疾病的发展，或者使疾病消退或降低病毒的传播。例如，免疫原性有效量优选是指治疗剂的这样的量：使传播速率降低、HIV 病毒载量降低或受感染细胞数降低至少 5%，优选至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或更多。针对 HIV，免疫原性有效量还指治疗剂的这样的量：使 CD4+ 细胞数升高、发展成 AIDS 的时间增加或存活时间增加至少 5%，优选至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或更多。

[0153] 应理解，所述有效剂量将取决于接受者的年龄、性别、健康状况和体重、共同进行的治疗种类（如果有的话）、治疗频率以及期望效果的性质。最优选剂量将根据个体对象而制定，这是本领域技术人员不需要过多实验就能理解和确定的。参见 Gennaro，2003，同上。

[0154] 本发明的治疗效力可通过不同方法来评估，例如，通过监测被感染对象血液中的病毒载量和 CD4+T 细胞数，或通过测量细胞免疫。

[0155] 对血液中的病毒载量和 CD4+T 细胞数的监测通过标准方法来进行。如果该疫苗是有效的，则病毒载量应存在大于或等于 1 的对数降低，优选应当在治疗开始后的 2 至 4 周内达到低于 10,000 拷贝 /mL HIV-RNA。如果病毒载量实现了小于 0.5 倍的对数降低，或 HIV-RNA 处于 100,000 以上，则应通过添加药物或更换药物来调节该治疗。如果对象的临床状况稳定，则应每 4 至 6 个月重复一次病毒载量测量。如果病毒载量回到治疗前水平的 0.3 至 0.5 倍的对数，则该治疗不再有效，应当改变。在治疗开始的 2 至 4 周内，CD4+T 细胞数应增加至少 30 个细胞 /mm^3。如果达不到这点，则应当改变治疗。在临床稳定期间，应当每 3 至 6 个月监测一次 CD4+T 细胞数，且如果发生的是有症状的疾病，则应更频繁。如果 CD4+T 细胞数降至基线（或低于治疗前升高的 50%），则应当改变治疗。

[0156] 为了测量细胞免疫，使用来自淋巴组织的富含 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞的细胞悬液通过细胞因子特异性 ELISPOT 测定来量化抗原特异性的 T 细胞应答。参见 Wu S 等，1995，1997，同上。这样的测定可测量分泌 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IFN-γ 的抗原特异性 T 细胞的数目。所有 ELISPOT 测定都通过使用市售可获得的捕获 mAb 和检测 mAb(R&D Systems，Inc.，Minneapolis，MN，USA；BD Biosciences Pharmingen，San Diego，CA，USA) 来进行。参见 Wu S 等，1995，1997，同上；Shata M，2001，同上。每种测定包括促细胞分裂原 (motogen) 对照 (Con A) 和卵白蛋白对照。

[0157] 在本发明上下文中，“HIV 抗原”是能够在对象中产生免疫应答的完整的失活 HIV 病毒。所述免疫应答可为抗体的产生或细胞介导的针对该病毒的免疫应答。

[0158] 特别地，“免疫应答”是指 CD8+T 细胞介导的针对 HIV 感染的免疫应答。针对 HIV 的免疫应答可通过测量以下数种参数中的任一种来测定：例如病毒载量、T 细胞增殖、T 细胞存活、T 细胞进行的细胞因子分泌或抗原特异性抗体产量的增加（例如抗体浓度）。

[0159] 因此，本发明的免疫原性组合物可用于预防 HIV 感染或在受感染个体中减缓发展成 AIDS。包含由在化学物质明确、不含蛋白质的培养基中生长的 HIV 产生的 HIV 抗原的组合物以及使用该组合物的方法可用于引发特异性针对保守 HIV 表位的强效的 Th1 细胞免疫应答和体液免疫应答，引发 HIV- 特异性 CD4 辅助 T 细胞，HIV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞活性，刺激产生趋化因子和细胞因子，例如 β - 趋化因子、IFN-γ、白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 7(IL-7)、白细胞介素 15(IL-15) 或者 α - 防御素，以及增加记忆细胞。这样的疫苗可通过多种施用途径来施用。这样的疫苗可用于防止 HIV 的母婴传播，用于新生儿、儿童以及高风险个体的疫苗接种，以及用于受感染个体的疫苗接种。这样的疫苗可任选包含免疫聚体 (immunomer) 或免疫刺激序列 (ISS) 以增强针对 HIV 抗原的免疫应答。这样的疫苗还可与其他 HIV 治疗组合使用，包括采用核酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂以及阻断病毒（例如 T20) 之进入的药剂的多种组合的抗逆转录病毒治疗。参见 Baldwin C 等，Curr.Med. Chem. 2003；10：1633-1642。

[0160] 当施用于没有感染之临床病征的对象时，本发明的免疫原性组合物可具有预防活性，因为它们能够防止疾病的发作。

[0161] HIV 免疫原性组合物与 HIV 感染或 AIDS 症状有关的有益预防性或治疗性效果包括例如：防止或延缓暴露于 HIV 之个体的初始感染；降低感染了 HIV 的个体中的病毒负荷；延长 HIV 感染的无症状阶段；在通过抗逆转录病毒治疗已降低了病毒水平的感染了 HIV 之对象中维持低的病毒负荷；在初次用药 (drug naive) 对象和经 ART 治疗过的对象中提高 CD4T 细胞水平或减少 CD4T 细胞的降低，所述 CD4T 细胞既有 HIV-1 特异性的也有非特异性的；提高患有 AIDS 个体的总体健康状况或生活质量；以及延长患有 AIDS 个体的预期寿命。临床医生可将免疫法的效果与治疗前对象的状况进行比较，或与未经治疗对象的预期状况进行比较，来确定所述治疗是否对抑制 AIDS 有效。

[0162] 在一个优选实施方案中，本发明的免疫原性组合物可为预防性组合物。

[0163] 本发明的免疫原性组合物可用于治疗 HIV-1 感染。虽然所有可被 HIV-1 或其同类物感染的动物都可通过这种方式治疗（例如，黑猩猩、猕猴、狒狒或人），但是本发明的免疫原性组合物特别针对其在人中的治疗用途。通常而言，需要超过一次的施用来获得期望的治疗效果；可通过标准的临床方法来建立精确的方案（剂量和频率）。

[0164] ＊＊＊

[0165] 上文提到的所有出版物均通过引用以其整体并入本文。

[0166] 虽然为了清楚和理解的目的一定程度地详细描述了前述发明，但是本领域技术人员将从对本公开内容的阅读中理解，可进行形式和细节上的多种变化而不脱离本发明及所附权利要求的真正范围。

[0167] 实施例

[0168] 一般方法

[0169] 1. 自体 HIV 的分离和扩增

[0170] 从 HIV 阳性供体对象抽取新鲜血液，并储存于装有 ACD（酸性柠檬酸葡萄糖）、CPD（柠檬酸磷酸葡萄糖）或 EDTA（乙二胺四乙酸）作为抗凝剂的管中。然后通过 Ficoll 密度梯度 (Accuspin **Histopaque®**, Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, US) 从血液中分离外周血单核细胞 (PBMC)。根据制造商的方法通过 CD14 抗体磁性微珠系统（**CliniMACS®** CD14Microbeads, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, DE) 从 PBMC 中选择 CD14+ 单核细胞。然后，根据制造商的方法通过 CD4 抗体磁性微珠系统（**CliniMACS®** CD4Microbeads, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, DE) 从剩余溶液 (PBMC-CD14(-)) 中分离 CD4+T 细胞。最后，将 CD14+ 单核细胞和 CD4+T 细胞混悬于补充有 10％人 AB 血清的不合造血细胞的 X-VIVO15 血清培养基 (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, US) 中。

[0171] 2. CD4+T 细胞与 MΦ 共培养

[0172] 用 CD3(Orthoclone **OKT3®**, Janssen-Cilag, Johnson&Johnson, New Brunswick, NJ, US) 和 IL-2(18.00IU×10^6, **Proleukin®**, Prometheus Labs., San Diego, CA, US) 活化前一步骤的 CD4+T 细胞。使 CD14+ 单核细胞分化成巨噬细胞。然后，将 CD4+T 细胞与巨噬细胞共培养。

[0173] 在开始共培养 CD4+T 细胞与巨噬细胞之前 5 至 7 天，开始用 CD3 活化 CD4+T 细胞的方法。首先，用 5μg/mL CD3 的 DPBS（即杜氏 (Dulbecco, s) 磷酸盐缓冲盐水）溶液预处理培养烧瓶，并在水平位置于 37℃孵育至少 2 小时，以使 CD3 抗体附着于烧瓶壁上。接着弃掉溶液，并用 DPBS 洗涤烧瓶两次。然后，将从 PBMC 得到的 CD4+T 细胞重悬于离体活化培养基中，所述培养基由补充有 10％人 AB 血清和 100U/mL IL-2 的 X-VIVO 15 介质组成。在先前用 CD3 活化的烧瓶中，将所述悬液在水平位置于 37℃和 5％ CO_2 下孵育约 24 小时至 48 小时。

[0174] 在共培养开始之前五天，结束用 CD3 活化 CD4+T 细胞，并添加新鲜的 IL-2。简略而言，将预活化的 CD4+T 细胞重悬在培养基中，并用 DPBS 洗涤两次。然后，以 10^6 细胞 /mL 将细胞重悬在不含 CD3 的活化介质 (X-VIVO 15+10％人 AB 血清 +100U/mL IL-2) 中，并在竖直位置于 37℃和 5％ CO_2 下在烧瓶中再孵育 3 至 5 天，以完成 CD4+T 细胞增殖。

[0175] 在共培养 CD4+T 细胞与巨噬细胞之前的 5 至 7 天还开始使 CD14+ 单核细胞向巨噬细胞分化。将从 PBMC 分离的 CD14+ 单核细胞重悬于离体培养基中，所述培养基由补充有 10％人 AB 血清的 X-VIVO 15 介质组成。在竖直位置于 37℃和 5％ CO_2 下，在 ULA 烧瓶

(Corning®,Cultek SUL,Barcelona,ES) 中孵育该悬液 5 至 7 天,以得到成熟的巨噬细胞。

[0176] 抽取血液后的 5 至 7 天之间开始共培养 CD4+T 细胞与巨噬细胞。在 ULA 烧瓶中共培养 CD4+T 细胞与巨噬细胞,其中发生 CD14+ 单核细胞的分化。在由补充有 10% 人 AB 血清的 X-VIVO15 介质构成的培养基中以 1 ∶ 1 的 CD4+T 细胞∶巨噬细胞关系和 10^6 细胞 /mL 的密度开始共培养。当 CD4+T 细胞数低而不能使共培养物为 1 ∶ 1(CD4+T 细胞∶巨噬细胞) 时,可通过调节介质来使共培养物为 1 ∶ 10 或 1 ∶ 100(CD4+T 细胞∶巨噬细胞),以使共培养物中的细胞密度达到 10^6 细胞 /mL。如果需要,添加 IL-2 以使共培养物中的 IL-2 终浓度为 100IU/mL。在竖直位置于 37℃和 5% CO_2 下孵育烧瓶 7 至 60 天,优选 7 至 21 天。用于分离和产生病毒的 CD4+T 细胞与巨噬细胞的共培养最短为 7 天,并且可延长至 48 至 60 天。当建立共培养后,必须每 7 天换一次介质。

[0177] 在共培养期间监测病毒培养物以分析病毒产量,其通过在细胞共培养的第 7、14、21 天等时间通过 ELISA(Ag HIV®,Innogenetics NV,Ghent,BE) 测试上清液的 HIV-1p24 抗原产量 /mL 上清液以及通过实时 RT-PCR(PCR Real Time COBAS TAQMAN HIV-1Test, v1.5,Roche Diagnostics Inc.,Indianapolis,IN,US) 测试 HIV-1RNA 拷贝数 /mL 上清液来进行。

[0178] 该方法使得在第 7 天,可从具有 > 500CD4 和 4 倍对数拷贝的 HIV-1RNA/mL 血浆的 HIV-1 阳性对象产生微克级的 HIV-1p24 抗原 /mL 上清液。

[0179] 3. HIV 的热失活

[0180] 在先前公开的方案之后,使含在步骤 2 之上清液中的 HIV 热失活,以得到基本失活的 HIV 的裂解物。参见 Gi1,2011,同上。

[0181] a) 停止 cART 的供体对象

[0182] 通过使用热混合器 (model AG 22331,EppendorfAG,Hamburg,DE) 在 56℃下以 750rpm 进行 30 分钟的伴随搅动的热处理来使数个包含 HIV 的 CD4+T 细胞与 MΦ 共培养物上清液的 10mL 等分试样失活。通过使用无菌离心过滤单元 (VivaSpin 20,300kDa,model VS2051,Sartorius AG,Göttingen,DE) 在 21℃下以 6000×g 超滤 60 分钟对热失活的上清液进行浓缩。对于每个供体对象,需要多个 VivaSpin 20 过滤器来进行浓缩,合并的上清液总体积为约 80mL。使用生理盐水溶液洗涤离心过滤浓缩物 (21℃,6000×g,60 分钟,三次)。合并由每个离心过滤器回收的 0.5mL 终体积,并在 4℃下以 15,000×g 离心 (CH 007466rotor and Heraeus Multifuge 1LR,Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA, US)2 小时。将沉淀 (pellet) 重悬并合并在 1mL 生理盐水溶液中,并分成 5 个各自为 0.2mL 的免疫原等分试样。将溶液冻存于 -80℃下待用。

[0183] b) 处于 cART 中的供体对象

[0184] 通过使用热混合器 (model AG 22331,Eppendorf AG,Hamburg,DE) 在搅动下在 56℃下以 750rpm 进行 30 分钟伴随搅动的热处理来使数个包含 HIV 的 CD4+T 细胞与 MΦ 共培养物上清液的 10mL 等分试样失活。热失活的上清液通过超速离心而不是如前一步中的超滤来进行浓缩。使用 T1250fiberlite 转子在无菌异质同晶聚合物瓶 (model S5083,Seton Scientific Inc.,Petaluma,CA,US) 中于 4℃下,以 100,000×g 超速离心 32 分钟,然后使

用F45L-24X1,5fiberlite转子和Sorvall WX Ultra 80离心机(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA,US)在4℃下和无菌1.5mL管(model 357448,Beckman Coulter Inc.,Brea,CA,US)中以192,000×g再超速离心10分钟来对上清液进行浓缩。将最后的沉淀合并到1mL生理盐水中,并分成各自为0.2mL的5个免疫原等分试样。将溶液冻存于-80℃下待用。

[0185] 4.HIV化学失活

[0186] 根据本领域已知的方法使用化学试剂使含在步骤2之上清液中的HIV失活,以得到基本失活的HIV的裂解物。参见2011年11月22日提交的EP 11382358.7。使用以下化学试剂:

[0187] a)Aldrithiol-2(2,2′-二硫二吡啶)

[0188] 根据本领域已知的方案,用aldrithiol-2(2,2′-二硫二吡啶)(AT-2,**Aldrithiol-2®**,货号143049,Sigma-Aldrich Corp.,Saint Louis,MO,US)来处理10mL含有HIV的CD4+T细胞与MΦ的共培养物上清液。参见,Rossio J等,J.Virol.1998;72(10):7992-8001以及Arthur L等,AIDS Res.Hum.Retroviruses 1998;Suppl 3:S311-S319。在连续搅拌下,将上清液与1mM AT-2一起在37℃下孵育2小时或在4℃下孵育24小时。

[0189] b)双硫仑

[0190] 根据Chertova E.等,Preparation of inactivated autologous subject derived HIV-1for therapeutic vaccination,HIV Immunobiology:From Infection to Immune Control(X4)2009,Keystone,Colorado,US,用双硫仑(**Antabuse®**,Odyssey Pharmaceuticals Inc.,East Hanover,NJ,US)处理10mL含有HIV的CD4+T细胞与MΦ的共培养物上清液。将上清液与0.3mM双硫仑一起在37℃下孵育3小时。

[0191] c)偶氮二甲酰胺

[0192] 向由先前步骤得到的含有HIV的上清液添加第一量的偶氮二甲酰胺(ADA)(HPH116,CAS号123-77-3),以使病毒失活,并在37℃下孵育2小时。通过向溶液添加第二量的偶氮二甲酰胺来进一步增强该失活。将溶液孵育2小时,从而完成总时间为4小时的孵育。然后,对溶液进行离心以得到第一沉淀。将第一沉淀溶解于生理盐水溶液中。对所得的溶液进行超速离心以得到第二沉淀。再将第二沉淀溶解于生理盐水溶液中以得到失活HIV的浓缩物。

[0193] d)氨托沙林

[0194] 向由先前步骤得到的含有HIV的上清液添加第一量的氨托沙林(AMT HCl,CAS号161262-45-9,**INTERCEPT®**,CerusCorp.,Concord,CA,US),并孵育30分钟。用紫外辐射处理溶液以使病毒失活。然后,对溶液进行超速离心以得到第一沉淀。将第一沉淀溶解于生理盐水溶液中。对所得的溶液进行离心以得到第二沉淀。再将第二沉淀溶解于生理盐水溶液中以得到失活HIV的浓缩物。

[0195] 5.质量控制

[0196] 为了计算病毒储液的半数组织培养感染量(TCID50)并量化由失活方法导致的感染性降低和在失活方法后样品中剩余的残留感染性,在PBMC中进行滴定HIV的测定。

[0197] 首先，从健康供体获取新鲜血液，并储存于装有ACD（酸性柠檬酸葡萄糖）、CPD（柠檬酸磷酸葡萄糖）、EDTA（乙二胺四乙酸）或肝素作为抗凝剂的管中。在开始滴定前三天，通过Ficoll密度梯度从血液中分离PBMC。HIV-1、HBsAg和HCV抗体以及HCV PCR都为阴性。接着，通过在CO_2孵育器中在含有5μg/mL植物血凝素的RPMI基础培养基（RPMI 1640+20％胎牛血清+抗生素）中于37℃孵育细胞1至3天，用植物血凝素磷酸盐PHA-P(Sigma-Aldrich Corp.，Saint Louis，MO，US)使PBMC活化。

[0198] 然后，将之前用植物血凝素刺激的细胞重悬于病毒培养基（RPMI1640+10IU/mL IL-2+20％胎牛血清+抗生素）中。对200μl浓缩并在生理盐水溶液中稀释至1/15稀释度的失活的自体HIV-1进行分析。所述稀释度与将用于脉冲树突细胞的稀释度相等。此外，在病毒培养基（(RPMI1640+10IU/mL IL-2+20％胎牛血清+抗生素）中分析200μl未失活并且未浓缩的自体HIV-1。细胞与病毒稀释物一起在37℃，CO_2下孵育过夜。

[0199] 使用氨托沙林、双硫仑、aldrithiol-2或偶氮二甲酰胺的失活方法不影响p24蛋白的构象。因此，在感染后，洗涤经病毒孵育的细胞，弃掉上清液中多余的p24蛋白，并使其与感染后产生的新产物区分。然后，在37℃、CO_2下将重悬于病毒培养基中的细胞再孵育10至11天。在第5天或第6天更换培养基。

[0200] 通过ELISA(HIV-1p24抗原-ELISA，货号K1048，Innogenetics NV，Gent，BE)测定抗原p24。上清液样品是阳性还是阴性的推断标准基于来自用来检测p24抗原的试剂盒的HIV p24抗原标准对照的结果，其具有22pg/mL的平均灵敏度。

[0201] 因此，当[（实验孔(problem well)中的OD Ag p24)-（对照孔p24背景中的OD Ag p24)]大于22pg/mL对照所对应的OD时，培养物的上清液被定性为阳性。当[（实验孔中的OD Ag p24)-（对照孔p24背景中的ODAg p24)小于或等于22pg/mL对照所对应的OD时，培养物的上清液被定性为阴性。OD：光密度。

[0202] 根据**Spearman-Kärber**公式来计算TCID50：

[0203] $M = xk+d[0.5-(1/n)(r)]$

[0204] 其中

[0205] xk＝最高稀释度的剂量

[0206] r＝阴性反应的总和

[0207] d＝稀释度之间的间距

[0208] n＝每种稀释度的孔数

[0209] 然后，通过浓缩系数(CF)来校正TCID50值。参见**Kärber** G，Arch. Exper. Pathol. Pharmakol. 1931；162：480-483以及Spearman C，Br. J. Psychol. 1908；2：227-242。

[0210] 实施例1

[0211] 单核细胞衍生的树突细胞(MDDC)的离体产生

[0212] 从携带HIV的供体对象抽取150mL新鲜血液。然后通过Ficoll密度梯度(Accuspin **Histopaque®**，Sigma-Aldrich Corp.，Saint Louis，MO，US)从血液中分离外周血单核细胞(PBMC)。所得的溶液以1200rpm离心5分钟。

[0213] 将悬液分成18mL的等分试样。将这些等分试样倒入处于水平位置的75cm^2的附着培养烧瓶(Corning Inc.，Corning，NY，US)中，并放置于37℃的具有潮湿的5％ CO_2气氛

的孵育器中 2 至 3 小时。通过抽吸分离未附着的细胞（淋巴细胞）。附着的细胞大部分是单核细胞。

[0214] 用 15mL 在 37℃下预热过的 X-VIVO10(cGMP，Biowhittaker Inc.，Walkersville MD,US) 洗涤附着的细胞（单核细胞层）4 次。小心搅拌溶液以在不去除附着的单核细胞的情况下去除因重力沉积而可能存在的淋巴细胞污染物。

[0215] 然后弃掉溶液上清液。以 3 至 4×10^6 细胞 /mL 的浓度将细胞重悬于由补充有 1％失活的自体血清、庆大霉素 (50μg/mL，货号 636183，B.Braun Medical S.A.，Barcelona，ES)、二性霉素 (2.5μg/mL，货号 760645，Bristol-Myers Squibb SL，Elche，ES) 以及 AZT(1μM，**Retrovir®**，GlaxoSmithKline plc，London，GB) 的 X-VIVO15(cGMP，Biowhittaker Inc.，Walkersville MD，US) 构成的介质（“基础培养基）中。

[0216] 附着的单核细胞在同一烧瓶中培养 5 天。18mL 由补充有 1％失活的自体血清、庆大霉素 (50μg/mL，货号 636183，B.Braun Medical S.A.，Barcelona，ES)、二性霉素 (2.5μg/mL，货号 760645，Bristol-Myers Squibb SL，Elche，ES) 以及 AZT(1μM，**Retrovir®**，GlaxoSmithKline plc，London，GB) 的 X-VIVO15(cGMP，Biowhittaker Inc.，Walkersville MD，US) 构成的介质（“基础培养基）。还向每个烧瓶中添加 1000IU/mL IL-4 和 1000IU/mL 重组人 (rh)GM-CSF(cGMP quality CellGenix GmbH，Freiburg，DE)。每两天以相同浓度向培养物添加 IL-4 和 GM-CSF。

[0217] 在培养 5 天后，通过用 15mL X-VIVO10 洗涤烧瓶 4 次来收集 MDDC，以利于去除仍然附着在底部的 MDDC。将 MDDC 收集于 50mL 的管中，并用 50mL X-VIVO10 通过离心 (2000rpm，5 分钟）洗涤两次。将 MDDC 沉淀重悬于 10mL X-VIVO10 中，并储存于 4℃下待用。分离 200μl 等分试样用于质量控制。

[0218] 实施例 2

[0219] 在具有附着表面的烧瓶中进行自体 MDDC 的成熟并

[0220] 用失活的 HIV-1 进行脉冲

[0221] 培养 5 天后，将 1050 万在实施例 1 中得到的 MDDC 以 2000rpm 离心 5 分钟。将沉淀重悬于 2.8mL 基础介质中。参见实施例 1。添加 0.2mL 先前已经用 X-VIVO15 介质重悬的失活 HIV 的等分试样，其包含＞ 10^8 拷贝的 HIV-1RNA。将细胞置于处于竖直并轻微倾斜位置的 $75cm^2$ 的具有附着表面的培养烧瓶上。向每个烧瓶添加 1000IU/mL IL-4 和 1000IU/mL 重组人 (rh)GM-CSF(cGMP quality CellGenix GmbH，Freiburg，DE)，并在 37℃下孵育细胞。

[0222] 孵育后，添加 22mL 基础培养基，其伴有 1000IU/mL 的 GM-CSF 和 IL-4 以及含有分别为每毫升 1000IU、1000IU 和 300IU 的细胞因子 IL-6、TNF-α 和 IL-1-β (cGMP quality，CellGenix GmbH，Freiburg，DE) 的成熟化混合物。在所述介质中再培养细胞 44 小时。

[0223] 培养 48 小时后，取脉冲的 MDDC 的等分试样用于质量控制，其包括：有活力的成熟细胞计数、确定生存的百分比、免疫分型以及通过革兰氏染色进行微生物学对照。

[0224] 将细胞在补充有 1％药用人白蛋白的临床盐水溶液中洗涤三次：通过以 2000rpm 离心 5 分钟和将细胞沉淀重悬于临床盐水溶液中的顺序循环。将细胞重悬于 0.5mL 所述溶液中。

[0225] 实施例 3

[0226] 在超低附着的烧瓶中进行自体 MDDC 的成熟并

[0227] 用失活的 HIV-1 进行脉冲

[0228] 培养 5 天后，将 1050 万 MDDC 以 2000rpm 离心 5 分钟。将沉淀重悬于 2.8mL 基础介质中。参见实施例 1。添加 0.2mL 先前已经用 X-VIVO15 介质重悬的失活 HIV 的等分试样，其包含＞ 10^8 拷贝的 HIV-1RNA。将细胞置于处于竖直并轻微倾斜位置的 75cm^2 的具有超低附着表面的培养烧瓶（ **Corning®**，货号 153814，Cultek，SLU，Madrid，ES）上。向每个烧瓶添加 1000IU/mL IL-4 和 1000IU/mL 重组人 (rh)GM-CSF(cGMP quality CellGenix GmbH，Freiburg，DE)，并用处于轻微倾斜位置的烧瓶在 37℃下孵育细胞 2 至 4 小时。

[0229] 孵育后，添加 22mL 基础培养基，其伴有 1000IU/mL 的 GM-CSF 和 IL-4 以及含有浓度分别为每毫升 1000IU、1000IU 和 300IU 的细胞因子 IL-6、TNF-α 和 IL-1-β 的成熟化混合物。在所述介质中以水平位置再培养细胞 44 小时。

[0230] 培养 48 小时后，取脉冲的 MDDC 的等分试样用于质量控制，其包括：有活力的成熟细胞计数、确定生存的百分比、免疫分型以及通过革兰氏染色进行微生物学对照。

[0231] 将细胞在补充有 1％药用人白蛋白 (Grifols，SA，Barcelona，ES) 的临床盐水溶液中洗涤三次：通过以 2000rpm 离心 5 分钟和将细胞沉淀重悬于临床盐水溶液中的顺序循环。将细胞重悬于 0.5mL 所述溶液中。

[0232] 实施例 4

[0233] PGE_2 以及使用超低附着烧瓶对 MDDC 成熟的影响

[0234] 培养 5 天后，将 1050 万 MDDC 以 2000rpm 离心 5 分钟。将沉淀重悬于 2.8mL 基础介质中。参见实施例 1。添加 0.2mL 先前已经用 X-VIVO15 介质重悬的失活 HIV 的等分试样，其包含＞ 10^8 拷贝的 HIV-1RNA。将细胞置于处于竖直并轻微倾斜位置的 75cm^2 的具有超低附着表面的培养烧瓶（ **Corning®**，货号 153814，Cultek，SLU，Madrid，ES）上。向每个烧瓶中添加 1000IU/mL IL-4 和 1000IU/mL 重组人 (rh)GM-CSF(cGMP quality，CellGenix GmbH，Freiburg，DE)，并用处于轻微倾斜位置的烧瓶在 37℃下孵育细胞 2 至 4 小时。

[0235] 孵育后，添加 22mL 基础培养基，其伴有 1000IU/mL 的 GM-CSF 和 IL-4 以及含有浓度分别为每毫升 1000IU、1000IU、300IU 和 1μg 的细胞因子 IL-6、TNF-α、IL-1-β 和 PGE_2 的成熟化混合物。在所述介质中以水平位置再培养细胞 44 小时。

[0236] 在 48 小时的培养后，取脉冲的 MDDC 的等分试样用于质量控制，其包括：有活力的成熟细胞计数、确定生存的百分比、免疫分型以及通过革兰氏染色进行微生物学对照。

[0237] 将细胞在补充有 1％药用人白蛋白 (Grifols，SA，Barcelona，ES) 的临床盐水溶液中洗涤三次：通过以 2000rpm 离心 5 分钟和将细胞沉淀重悬于临床盐水溶液中的顺序循环。将细胞重悬于 0.5mL 所述溶液中。

[0238] 进行实验以评估向成熟化混合物中添加 PGE_2 是否提高 HIV 阳性对象的 MDDC 中的成熟标志物 CD80 和 CD83（有 PGE_2 或没有 PGE_2，超低附着烧瓶和 IL-15）。参见图 1。在成熟后通过流式细胞术分析细胞。用特异针对相应簇 (cluster) 的抗体来评估标志物 CD80 和 CD83 的荧光强度。与不存在 PGE_2 时相比，用细胞因子和 PGE_2 混合物的成熟诱导了更高数量的 CD80（高近 2 倍）和 CD83（高近 1.5 倍）标志物。组合使用抗附着烧瓶和向成熟化混合

物添加PGE_2在成熟、生存力、产率和总免疫原性效力方面相当大程度地改进了终产物(mDC)的质量,因为脉冲的有活力细胞的更高数目与更强的免疫应答相关联。参见图 1 和 2。令人印象深刻的是,使用抗附着烧瓶(超低附着烧瓶)使所得的 mDC 的量提高了 3 倍。通过应用 Mann-Whitney 非参数统计函数检验,在几种方法(用或没用超低烧瓶、PGE_2和 IL-15)与阶段 II 方法之间观察到显著差异($p < 0.05$)。参见图 2。

[0239] MDDC 必须表达 CCR7 受体等,以使它们能够在成熟后迁移至淋巴结。这是通过数种细胞因子(即,CCL19、CCL21)的作用实现的,所述细胞因子与 CCR7 受体结合并将 MDDC 吸引至淋巴结。

[0240] 为了评估使用了或未使用PGE_2得到的成熟 MDDC 的迁移能力,在 transwell 板(Corning Inc.,Corning,NY, US)中进行离体迁移测定。简言之,用含有或不含PGE_2的细胞因子混合物诱导 4 个 HIV 阳性对象的 MDDC 成熟。使所述 MDDC(50,000 每孔)在孔的上部隔室沉积。MDDC 培养基用作阴性对照,同时在 MDDC 培养基中使用 CCL19 来评估特异性迁移。使 CCL19 趋化因子在下部隔室沉积,并用 5μm 的膜使之与上部隔室分隔。在孵育 3 小时后,收集迁移至下部隔室的 MDDC,并通过流式细胞术来量化(60 秒)。通过使用针对未配对数据的学生 T 统计函数,观察到在这两种方法之间存在显著差异($p \leqslant 0.005$)。当使用含有PGE_2的细胞因子混合物时,CCL19 介导的迁移更多。参见图 3。

[0241] 用来源于具有 HIV 特异性 T 细胞应答的 HIV 阳性对象的 MDDC 进行额外实验来评价通过这两种方法得到的成熟 MDDC 是否能够促进特异性细胞应答。用 HIV Bal 病毒脉冲 MDDC。然后,用含有或不含PGE_2的细胞因子混合物诱导它们成熟。成熟后,洗涤细胞 4 次,并使其在 96 孔板中与自体 T 细胞(来自同一对象)接触。通过测量 MDDC 与淋巴细胞共培养物上清液中由淋巴细胞分泌的 IFN-γ 得到针对 HIV 的特异性应答。通过使用针对未配对数据的学生 T 统计函数,观察到在这两种方法之间存在显著差异($p \leqslant 0.01$)。参见图 4。与不用PGE_2相比,用细胞因子加PGE_2混合物诱导成熟的 MDDC 引发更强的针对 HIV 的特异性应答。

[0242] 实施例 5

[0243] 在停止 cART 的对象中用失活 HIV-1 脉冲的 MDDC 进行疫苗接种

[0244] 将进行了成功 cART 并且具有 > 450 细胞/mm^3CD4+ 的 36 个对象随机化成盲方案(2 : 1)以接受:分支 1(案例组或 DC-HIV-1):用使用约 10^9 自体失活的 HIV-I 病毒体脉冲的外周血 MDDC(10^7 细胞)每两周进行一次免疫接种(总共三次)($n = 24$);或分支 2(DC 安慰剂分支或 DC 对照):未脉冲的 DC($n = 12$)。参见图 6。将中断 cART 的那天认作 W0。初级终点是安全性、当与任何 cART 之前的基线 vs 中断 cART 后第 12 周和第 24 周相比时,病毒载量的改变以及病毒载量降低了 $\geqslant 1\log_{10}$ 的对象比例的改变。第二终点是每个方案规定的需要重启 cART 的对象比例(在相隔 15 天的至少 2 次测定中 CD4T 细胞降至 300 细胞/mm^3 以下),CD4 细胞数的改变和 HIV-1 特异性应答的改变。

[0245] 所述树突细胞疫苗耐受性良好,没有任何显著的副作用。与 cART 前的水平相比,病毒载量的平均降低在案例组和对照中分别是:第 12 周 -1.0 对 $-0.46\log_{10}$,以及第 24 周 -0.86 对 $-0.22\log_{10}$($p = 0.04$ 和 $p = 0.03$)。在第 12 周和第 24 周,分别在案例组和对照中的 10/22(45%)对 2/11(18%)以及 7/20(35%)对 0/10(0%)个对象中观察到 $\geqslant 1\log$ 的病毒载量降低($p = 0.10$,$p = 0.03$)。在曲线下面积(auc)分析中,观察到免疫

接种的对象和对照对象之间在病毒载量改变方面存在显著差异（分别为 -0.72 对 -0.33，p ＝ 0.05）。参见图 5C。

[0246] 分支 1(DC-HIV-1，12 个对象）和分支 3(DC-HIV-1，12 个对象）融合的曲线重新解释了实施例 5 的结果。曲线分支 2 仍然为对照 (DC- 对照，12 个对象）。总计 36 个对象。（参见 www.ScienceTranslational Medicine.org，2013 年 1 月 2 日，第 5 卷，166 期，166ra，1-9 页的出版）。还参见图 5A 和 5B。

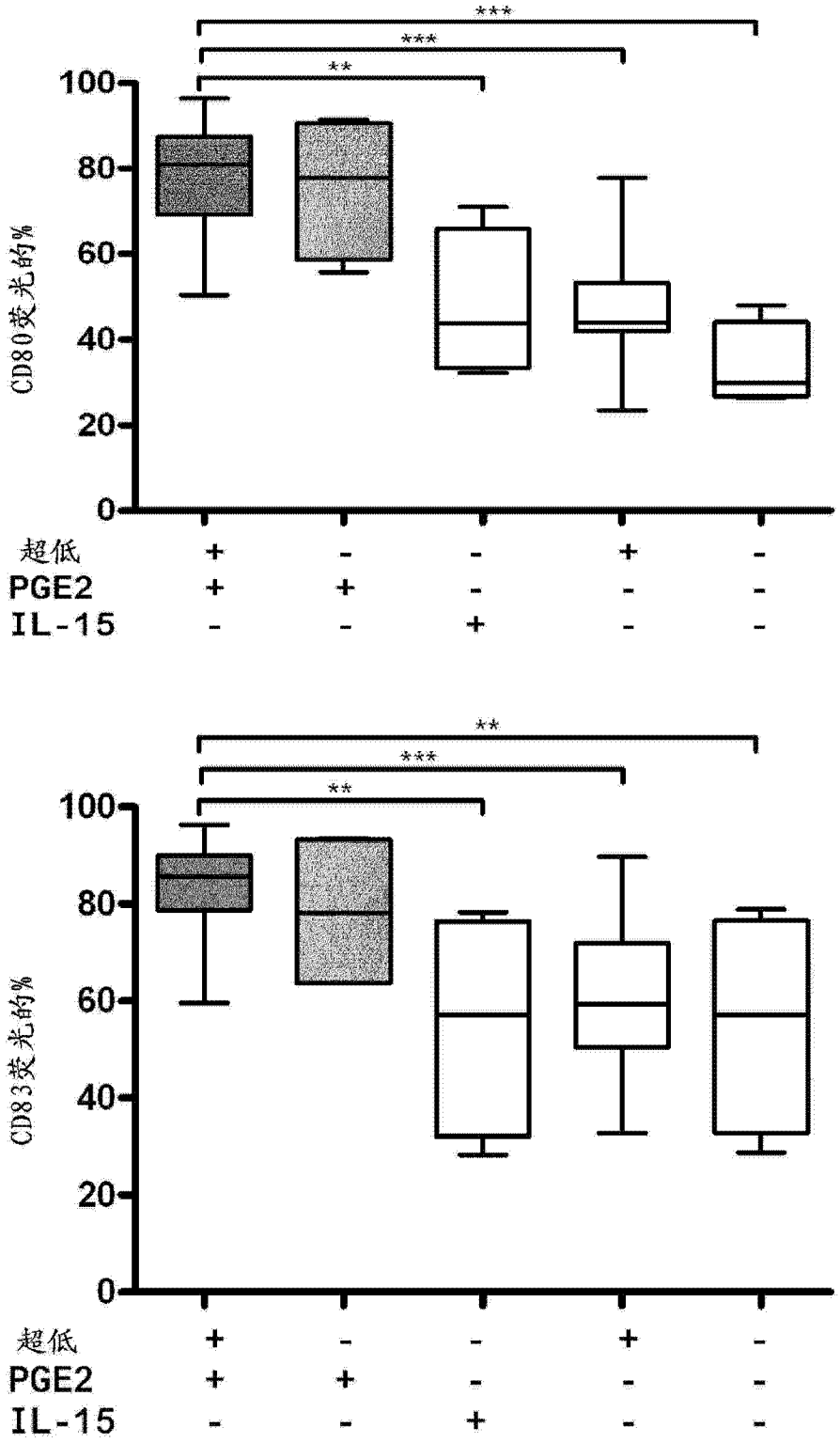

***
***
**
100
80
60
40
20
0
CD80荧光的%
超低 + - - + -
PGE2 + + - - -
IL-15 - - + - -
**
***
**
100
80
60
40
20
0
CD83荧光的%
超低 + - - + -
PGE2 + + - - -
IL-15 - - + - -

图 1

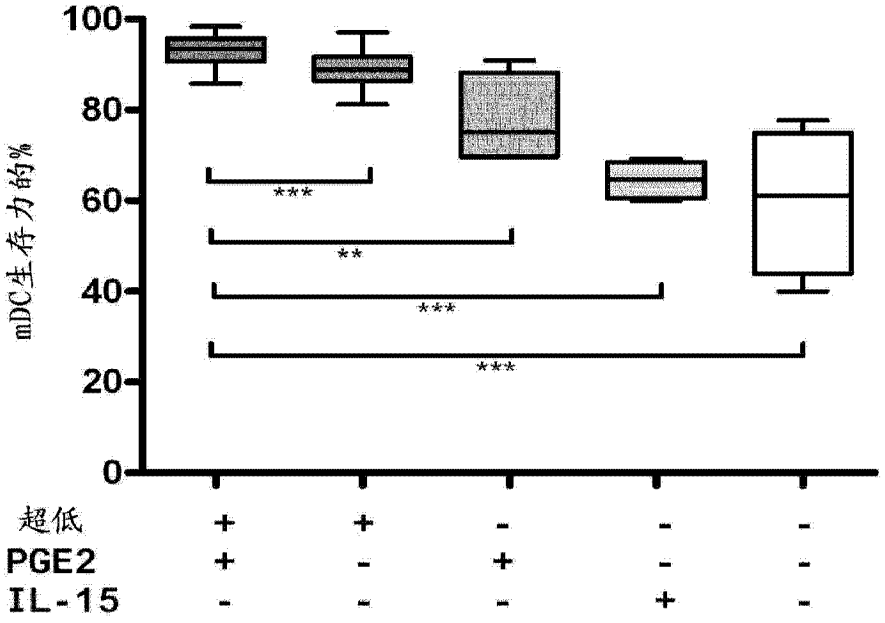

100
80
60
40
20
0
mDC生存力的%
***
**
***
***
超低 + + - - -
PGE2 + - + - -
IL-15 - - - + -

图 1（续）

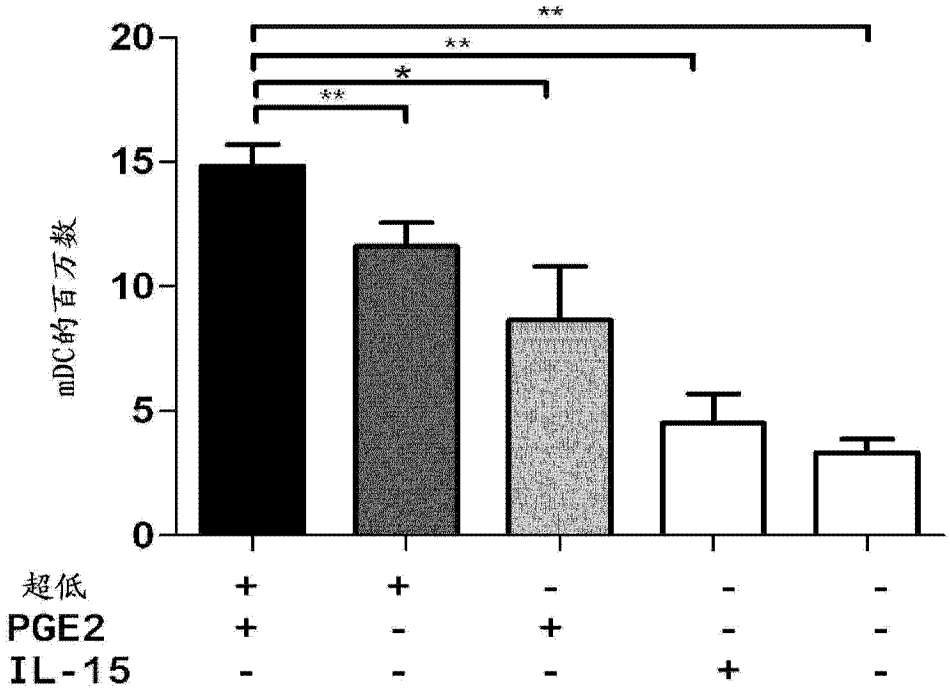

20
15
10
5
0
mDC的百万数
**
**
*
**
超低 + + - - -
PGE2 + - + - -
IL-15 - - - + -

图 2

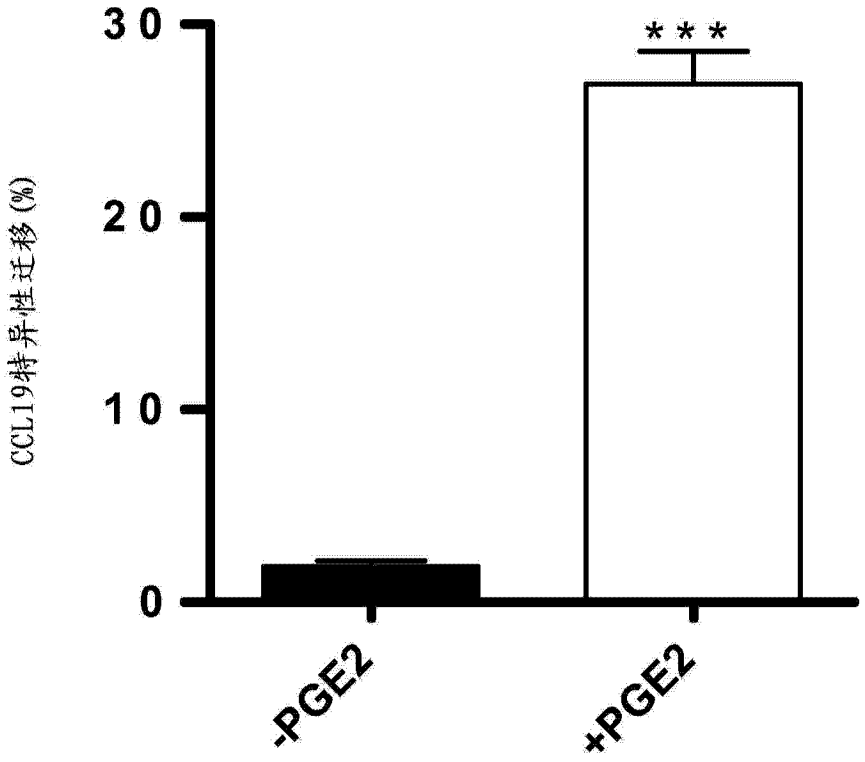

30
20
10
0
CCL19特异性迁移(%)
***
-PGE2
+PGE2

图 3

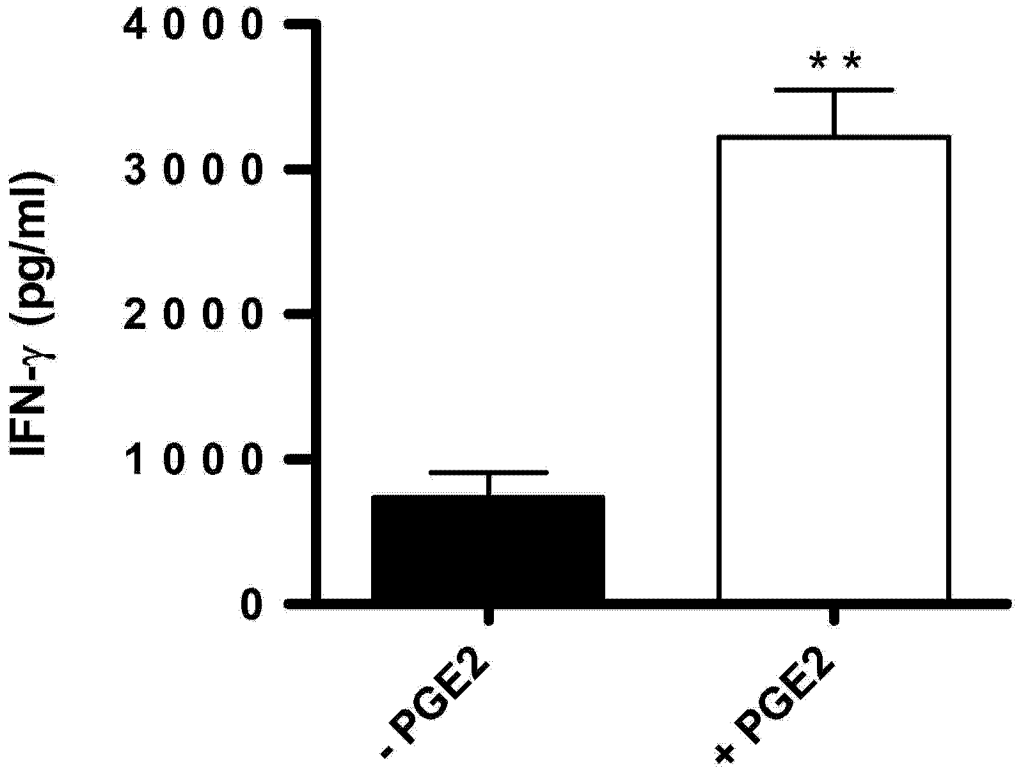
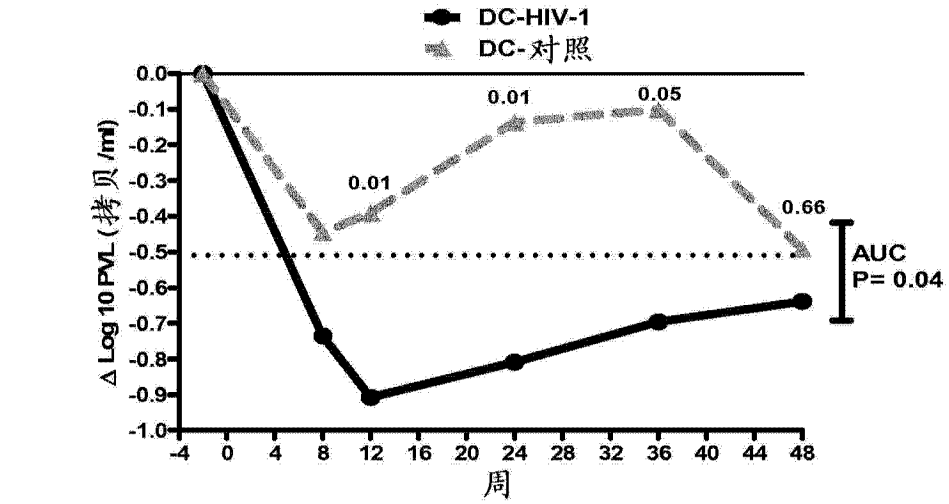

4000
3000
2000
1000
0
IFN-γ (pg/ml)
**
- PGE2
+ PGE2

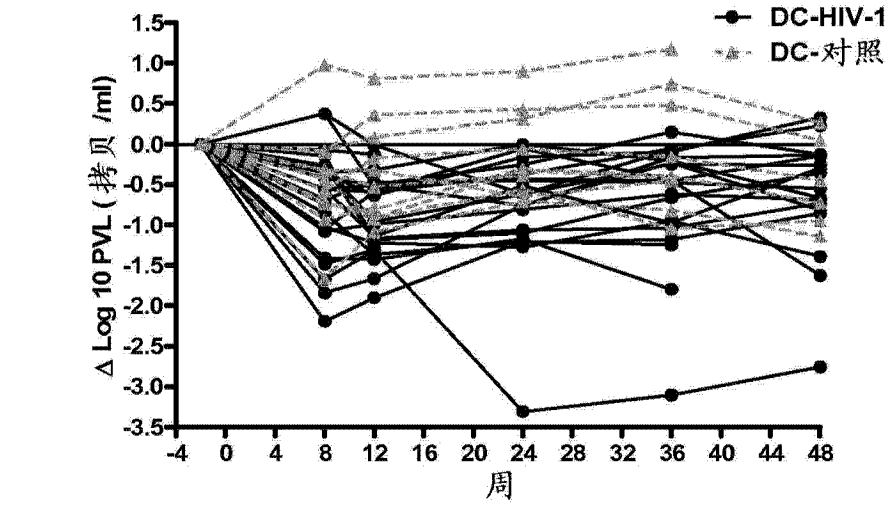
图 4

A



DC-HIV-1	24	23	22	21	20	17
DC-对照	11	11	11	10	9	6

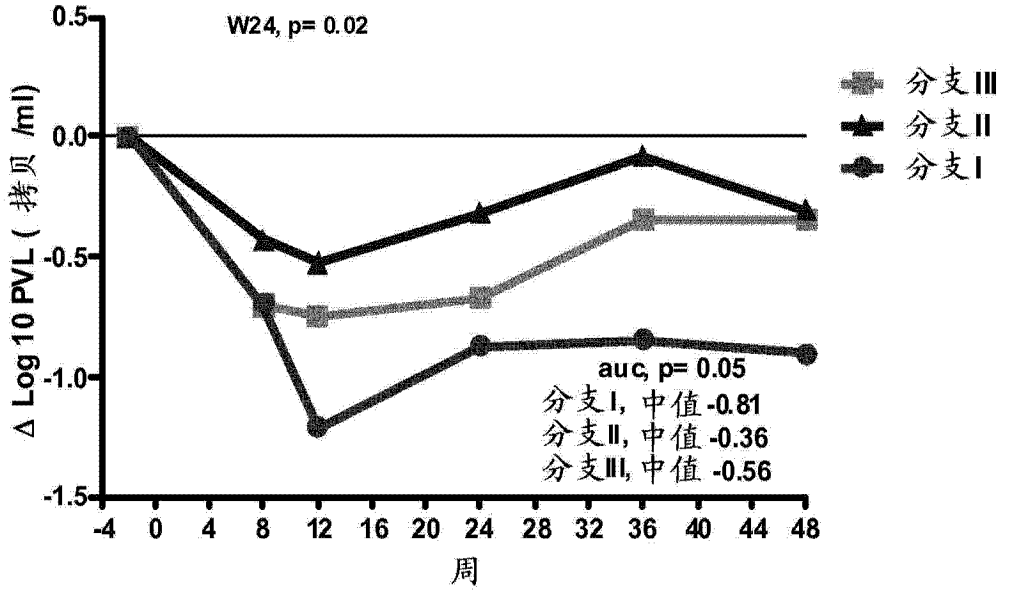
B



DC-HIV-1	24	23	22	21	20	17
DC-对照	11	11	11	10	9	6

图 5

C



分支 I	12	12	11	10	8		8			5			4
分支 II	11	11	11	11	11		10			8			5
分支 III	12	12	12	12	12		12			10			8

图 5(续)

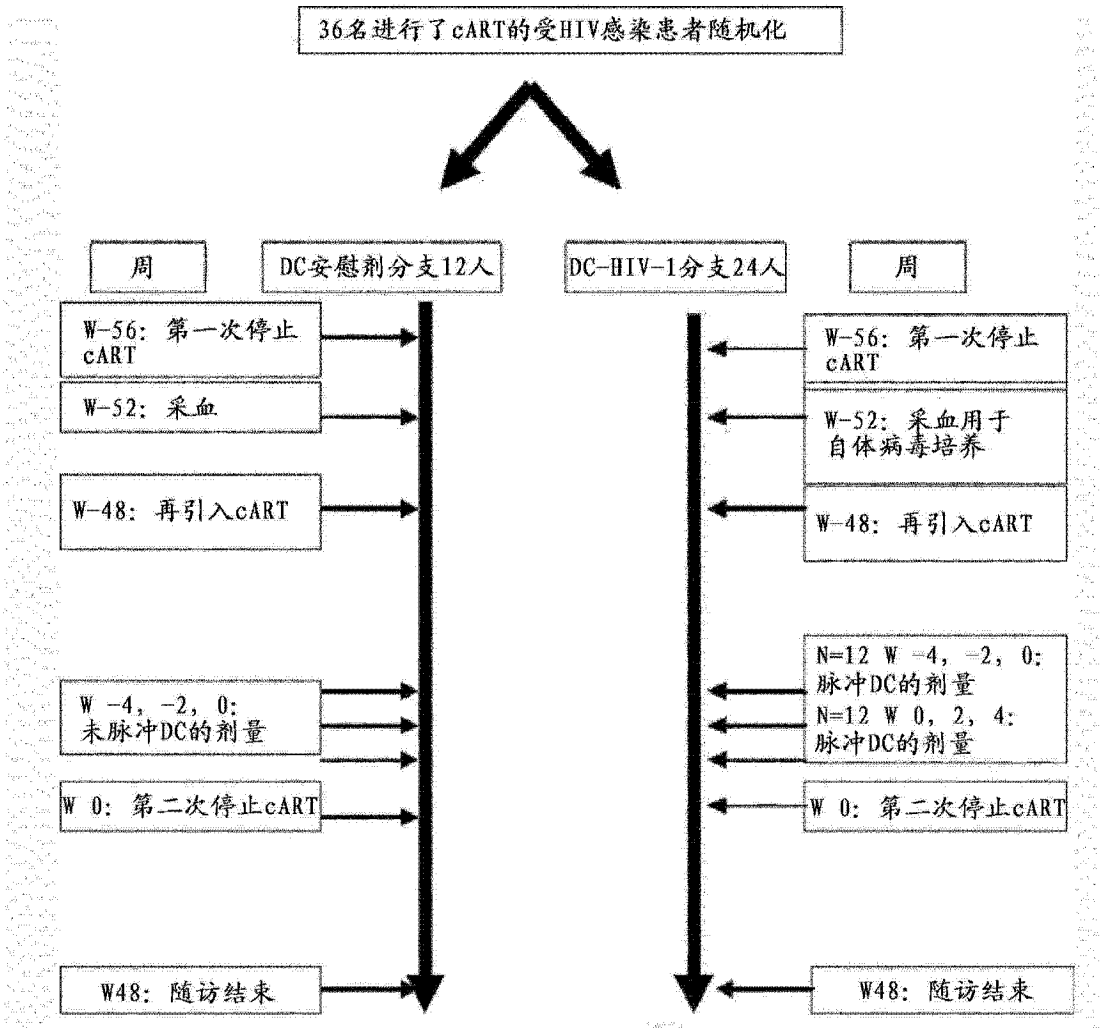

36名进行了cART的受HIV感染患者随机化
周
DC安慰剂分支12人
DC-HIV-1分支24人
周
W-56：第一次停止cART
W-52：采血
W-48：再引入cART
W -4，-2，0：未脉冲DC的剂量
W 0：第二次停止cART
W48：随访结束
W-56：第一次停止cART
W-52：采血用于自体病毒培养
W-48：再引入cART
N=12 W -4，-2，0：脉冲DC的剂量
N=12 W 0，2，4：脉冲DC的剂量
W 0：第二次停止cART
W48：随访结束

图 6