(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116322740 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202180055679.2
(22)申请日 2021.07.13
(30)优先权数据
20305798.9 2020.07.13 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/069463 2021.07.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/013221 EN 2022.01.20
(71)申请人 特兰斯吉恩股份有限公司
地址 法国伊克什格拉芬斯特丹
(72)发明人 G·安绍斯普 P·马丁
S·梁上龙 K·勒鲁-桑托拉里亚
A·埃夫拉乔夫 C·A·库佩
A·雷 C·迪布瓦
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 区斌
(51)Int.Cl.
A61K 38/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书58页
序列表8页 附图42页

(54)发明名称

免疫抑制的治疗

(57)摘要

本发明属于免疫疗法领域。本发明提供了包含编码至少具有IL-7活性的多肽的核酸分子的非增殖型病毒载体，其中所述非增殖型病毒载体用于治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒疾病诱导的免疫抑制。

CN 116322740 A

1.一种包含编码至少一种具有IL-7活性的多肽的核酸分子的非增殖型病毒载体，其中所述非增殖型病毒载体用于治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制。

2.用于权利要求1所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述病毒载体选自痘病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、水疱性口炎病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、Maraba病毒和病毒样颗粒。

3.用于权利要求1至2任一项所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述病毒载体是非增殖型痘病毒，优选地是非增殖型痘苗病毒，以及更优选地是MVA。

4.用于权利要求1至2任一项所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述病毒载体是腺病毒，优选地是人腺病毒，甚至更优选地是选自B、C和D种的人腺病毒，例如选自血清型5、11、26和35的腺病毒。

5.用于权利要求1至4任一项所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述多肽选自鼠IL-7、人IL-7、与Fc结构域融合的鼠IL-7，以及与Fc结构域融合的人IL-7。

6.用于权利要求5所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述鼠IL-7包含与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具有至少70％、优选地至少80％、更优选地至少90％、以及甚至更优选地至少95％相同性的氨基酸序列。

7.用于权利要求5所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述人IL-7包含与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列具有至少70％、优选地至少80％、更优选地至少90％、以及甚至更优选地至少95％相同性的氨基酸序列。

8.用于权利要求5所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述与Fc结构域融合的鼠IL-7包含与SEQ ID NO:3所示氨基酸序列具有至少70％、优选地至少80％、更优选地至少90％、以及甚至更优选地至少95％相同性的氨基酸序列。

9.用于权利要求5所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述与Fc结构域融合的人IL-7包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列具有至少70％、优选地至少80％、更优选地至少90％、以及甚至更优选地至少95％相同性的氨基酸序列。

10.用于权利要求1至9任一项所述用途的非增殖型病毒载体，其中所述病毒载体包含在宿主细胞或对象中表达具有IL-7活性的多肽所必需的调控元件。

11.包含权利要求1至10任一项定义的非增殖型病毒载体和可接受的药物载体的组合物，其用于治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制。

12.用于权利要求11所述用途的组合物，其中所述组合物包含在约10^6和约10^{12}pfu之间、更优选地在约10^7和约10^{11}pfu之间、甚至更优选地在约10^8和约10^{10}pfu之间的剂量，优选地10^9pfu的剂量的非增殖型痘病毒。

13.用于权利要求11所述用途的组合物，其中所述组合物包含在约10^6和约10^{14}vp之间、优选地在约10^7和约10^{13}vp之间、更优选地在约10^8和约10^{12}vp之间、更优选地在约10^9和约10^{11}vp之间的剂量的非增殖型腺病毒。

14.用于权利要求11至13任一项所述用途的组合物，其中所述组合物通过肠胃外途径施用，更优选地通过静脉内、皮下或肌内途径施用，以及甚至更优选地通过静脉内途径施用。

15.用于权利要求11至14任一项所述用途的组合物，其中所述组合物优选地在以下施

用:(i)在早期阶段,优选地在免疫抑制期开始后的第一个月内施用,(ii)在免疫抑制期开始后约1个月至约6个月的不同时间段内施用,或(iii)在免疫抑制期开始后6个月至6年内的较晚阶段施用,或(iv)上述阶段的任何组合。

16.用于权利要求1至15任一项所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中所述用途包括在免疫抑制期开始后施用1至10次所述非增殖型病毒载体或组合物,优选地在免疫抑制期开始后施用1至5次,更优选地在免疫抑制期开始后施用1至3次,甚至更优选地在免疫抑制期开始后施用1次。

17.用于权利要求11至16任一项所述用途的组合物,其中所述免疫抑制由脓毒症诱导。

18.用于权利要求11至16任一项所述用途的组合物,其中所述免疫抑制由冠状病毒诱导,优选地由SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV2、229E、NL63、OC43或HKU1诱导。

19.用于权利要求1至18任一项所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,所述用途在施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中增加功能性的先天和/或适应性免疫系统。

20.用于权利要求1至18任一项所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,所述用途在施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中增加选自以下的与免疫相关的至少一种类型的细胞的水平:CD4T细胞、CD8 T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞和中性粒细胞。

21.用于权利要求1至18任一项所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,所述用途在施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中增加选自以下的与免疫相关的至少一种类型的激活的细胞的水平和/或百分比:激活的CD4 T细胞、激活的CD8 T细胞、激活的B细胞和激活的NK细胞。

22.用于权利要求1至18任一项所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,所述用途在施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中增加选自IFNγ、TNFα、IL-6和IL-1β的至少一种类型的细胞因子的水平。

23.用于权利要求1至18任一项所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中所述用途是用于治疗展示与免疫相关的细胞数量减少和/或与免疫相关的激活的细胞水平降低相关的一种或多种生物标志物的免疫抑制对象。

24.用于权利要求23所述用途的非增殖型病毒载体或组合物,其中所述一种或多种生物标志物选自循环单核细胞上的HLA-DR表达、循环IL-10、绝对CD3 T细胞计数、一些免疫抑制性淋巴细胞亚群包括调节性T细胞的测量,以及抑制性受体如PD-1、PD-L1、CTLA-4、Lag3和BTLA的表达。

25.一种在有此需要的对象中治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制的方法,包括一次或多次施用根据权利要求1至10任一项的非增殖型病毒载体或根据权利要求11至18任一项的组合物。

免疫抑制的治疗

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明属于免疫疗法领域。本发明提供包含核酸分子的病毒载体，所述核酸分子编码至少用于治疗免疫抑制的多肽。更确切地说，本发明的病毒载体是非增殖型病毒载体，所述多肽具有IL-7活性，以及免疫抑制是由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的。本发明特别适用于治疗脓毒症诱导的免疫抑制。

背景技术

[0003] 免疫抑制(Immunodepression)(也称为免疫抑制(immunosuppression)或免疫麻痹)是免疫应答暂时或永久功能障碍的状态。它是免疫系统受损的结果，导致对病原体的易感性增加，并使患者面临感染、脓毒症和随后死亡的更高风险。许多功能障碍与影响宿主防御的特异性和非特异性组分的免疫抑制状态相关，包括免疫效应细胞的异常活性、免疫刺激性T细胞的激活减少、抑制性T细胞功能增加和细胞因子水平改变。

[0004] 许多文献示出由脓毒症、创伤、大手术、烧伤、衰老和冠状病毒诱导的免疫抑制之间存在相似性，包括创伤和脓毒症患者单核细胞增多症和单核细胞表面低HLA-DR的诱导(Heftrig et al.,2017,Mediat Infla mM,article ID 2608349)，在衰老期间和手术或创伤后促炎细胞因子(例如TNFα、IL-6和IL-8)的大量产生(Jia et al.,2019,Eur J Trauma Emerg S,https://doi.org/10.1007/s00068-019-01271-6;Kovac et al.,2005,Exp Gerontol.,40(7):549-55)，患有脓毒症、烧伤或创伤患者血浆中IL-10水平持续升高(Thomson et al.,2019,Military Medical Research,6:11)，以及患有创伤和冠状病毒患者的影响所有淋巴细胞亚群的严重淋巴细胞减少症，mHLA-DR降低和血浆细胞因子水平适度升高，同时示出炎症(IL-6)和免疫抑制(IL-10)性应答(Monneret et al.,2020,Intensive Care Med,46:1764-1765)。

[0005] 脓毒症被定义为由宿主对感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍，死亡率仍然很高。如今，脓毒症是重症监护病房中死亡的主要原因，并被宣布为全球卫生优先事项：通过了改善其预防、诊断和管理的决议(Venet and Monneret,2017,Nat Rev Nephrol.,14(2):121-137)。

[0006] 在脓毒症中，促炎介质的释放诱导血液动力学不稳定、终末器官功能障碍和凝血异常(Meisel et al.,2009,Am J Respir Crit Care Med.,180(7):640-8)。因此，直到几年前，临床试验都集中于在脓毒症病程早期阻断炎症以抑制宿主免疫系统应答。然而，阻断炎症未能改善脓毒症结果(Hamers et al.,2015,Minerva Anestesiol.,81(4):426-439)。很明显，相当一部分脓毒症患者并没有死于压倒性的免疫应答，并且抑制免疫系统在应用于所有脓毒症患者时并不是一种有效的策略(Peters van Ton et al.,2018,Front I mMunol,9:1926)。

[0007] 进行了调查研究以了解脓毒症病理生理学并降低脓毒症相关死亡率。似乎脓毒症期间和之后的宿主免疫应答极其复杂：其随时间变化，伴随着促炎和抗炎机制的发生，并且无法恢复至稳态(Venet and Monneret,2017,Nat Rev Nephrol.,14(2):121-137)。占脓毒

症相关死亡的大部分的,似乎不是最初的过度炎症状态,而是免疫系统的深度抑制状态,称为脓毒症诱导的免疫抑制、脓毒症相关免疫抑制或脓毒症相关免疫麻痹(Hamers et al.,2015,Minerva Anestesiol.,81(4):426-439)。

[0008] 脓毒症诱导的免疫抑制的特征在于先天性和适应性免疫应答受损,包括CD8+和CD4+淋巴细胞增强的凋亡和功能障碍、吞噬功能受损、单核细胞失活伴HLAII类表面表达减少,以及改变的离体细胞因子产生(Meisel et al.,2009,Am J Respir Crit Care Med.,180(7):640-8)。

[0009] 许多患者在脓毒症的初始过度炎症阶段幸存下来,但死于免疫抑制状态。免疫抑制使脓毒症患者更容易受到继发机会性感染、潜伏感染的再激活(Hamers et al.,2015,Minerva Anestesiol.,81(4):426-439)和并存疾病(例如恶性肿瘤、心血管疾病、糖尿病、肾功能不全、呼吸功能不全等)的伤害。

[0010] 与脓毒症相关的累积死亡率在第一周后为10%(早期死亡率),在脓毒症后28天为20%至40%(延迟死亡率),以及在脓毒症3年后为50%至70%(长期死亡率)(Venet and Monneret.,2017,Nat Rev Nephrol.,14(2):121-137)。

[0011] 因此,评估了旨在刺激免疫功能的新型治疗策略,以治疗脓毒症引起的免疫抑制患者(Venet and Monneret.,2017,Nat Rev Nephrol.,14(2):121-137),其中人们对开发基于免疫调节的方法越来越感兴趣。

[0012] 在这方面,测试了许多免疫刺激分子:将GM-CSF、IFNγ、抗PD-1和抗PD-L1施用于脓毒症免疫抑制患者,并用如细胞凋亡抑制剂等药物在动物模型中进行了初步研究。然而,尽管在少数接受治疗的患者或动物中观察到对免疫系统的一些影响(例如单核细胞免疫能力的恢复、促炎细胞因子产生的增强、T和NK细胞存活率的增加或细胞凋亡的有效抑制),但所述结果未在大型临床试验中得到证实(Peters van Ton et al.,2018,Front I mMunol,9;1926)。

[0013] 白介素7对于适应性免疫系统的发育和稳态至关重要(Shindo et al.,2015;43(4):334-343)。因此,提议将IL-7用于旨在改善淋巴细胞减少症后T细胞重建的治疗(Ponchel et al.,2011,Clinica Chimica Acta 412,7-16)。对超过390名肿瘤和淋巴细胞减少症患者的临床试验表明,IL-7是安全的,并且可以增加CD4+和CD8+淋巴细胞计数(François et al.,2018,JCI Insight.;3(5):e98960)。

[0014] 进行了临床前和临床研究以评估IL-7在脓毒症诱导的免疫抑制状态下恢复免疫功能的能力。重组IL-7的潜在治疗效果首先在两种相关的脓毒症动物模型中进行了研究,分别是盲肠结扎穿孔(CLP)诱导的小鼠腹腔内腹膜炎模型(Unsinger et al.,2010,J I mMunol;184:3768-3779)和CLP继发白色念珠菌(Candida albicans)感染的二次打击脓毒症模型(Shindo et al.,2015Shock.;43(4):334-343)。后一种模型被认为模拟了患有继发院内真菌感染的持久性脓毒症患者的受损的免疫状态(真菌生物是许多重症监护病房中血流感染的第三到第四大常见原因)。在这些研究中使用特征在于长循环半衰期的两种rhIL-7:一种是用抗IL-7抗体稳定的rhIL-7(R&D系统),另一种是完全人源化、糖基化的低免疫原性rhIL-7(称为CYT-107,由Cytheris,Rockville,MD开发)。Unsinger报告说,这两种rhIL-7改善了许多被认为是脓毒症致死性的关键病理生理过程,包括逆转脓毒症引起的CD4+和CD8+T细胞耗竭、增强免疫效应细胞(例如淋巴细胞)募集到感染部位,和恢复IFNγ的产生,

以及在CLP后48小时内施用2或3次rhIL-7治疗的动物中提高动物存活率(Unsinger et al.,2010,J I mMunol;184:3768-3779)。

[0015] 相反,Shindo等人报告在白色念珠菌注射后24小时开始连续5天皮下注射CYT-107后的二次打击脓毒症模型(CLP及随后白色念珠菌)中对小鼠存活没有作用(Shindo et al.,2015Shock.43(4):334-343)。

[0016] 对从脓毒症患者收集并与rhIL-7一起孵育的PBMC进行的离体测定证实了IL-7恢复脓毒症诱导的淋巴细胞改变的能力(Venet et al.,2012,J I mMunol November 15,189(10)5073-5081)。

[0017] 最近,在感染性休克和严重淋巴细胞减少症患者中对rhIL-7治疗进行了临床研究。27名患者通过肌内途径接受多达8次CYT-107rhIL-7注射,持续4周。重组IL-7具有良好的耐受性,没有诱导细胞因子风暴或恶化炎症或器官功能障碍的迹象,但是在注射部位特别观察到1-3级皮疹。rhIL-7导致绝对淋巴细胞计数和循环CD4+和CD8+T细胞增加,并增加T细胞增殖和激活。然而,与接受安慰剂治疗的患者相比,rhIL-7治疗并未改善死亡率(François et al.,JCI Insight.2018;3(5):e98960)。

[0018] 与用可溶性重组rhIL-7进行的上述研究相反,因此需要强力的稳定性以改善其循环半衰期(例如:加入糖基化位点)和多次施用以提供治疗效果,本发明人提出了一种基于载体化IL-7的免疫抑制治疗。在脓毒症引起的免疫抑制领域已经进行了一些载体化免疫调节剂的研究。特别是,Chen等人在盲肠结扎穿孔(CLP)后,局部或全身性在小鼠体内施用编码肿瘤坏死因子(TNF)的腺病毒(Ad),并同时用铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)攻击小鼠。Ad TNF的局部施用显著提高了小鼠的存活率。然而,如果全身施用Ad TNF,则该效果消失甚至逆转:这个施用途径增加了小鼠死亡率(Chen et al.,2000,J I mMunol,165:6496-6503)。Ad TNF尚未进一步开发。

[0019] 如上所述,一些文献显示脓毒症、创伤、大手术、烧伤、衰老和冠状病毒诱导的免疫抑制之间存在相似性。冠状病毒是一组具有正义单链RNA基因组和螺旋对称核衣壳的包膜病毒。冠状病毒在哺乳动物和鸟类中引起疾病:在牛和猪中引起腹泻,而在小鼠中引起肝炎和脑脊髓炎;在人类和鸟类中引起从轻微到致命的呼吸道感染。在人类中的轻症包括一些普通感冒病例,而更致命的变种可导致SARS、MERS和COVID-19。COVID-19是由SARS-Cov2引起的传染性疾病。COVID-19的症状多种多样,但通常包括发热、咳嗽、头痛、疲劳、呼吸困难以及嗅觉和味觉丧失。在先前COVID-19中描述的免疫改变的最前沿,患者同样地表现出严重的淋巴细胞减少症:淋巴细胞计数与COVID-19疾病严重程度增加有关,因为据报道死于COVID-19的患者淋巴细胞计数显著低于幸存者。

[0020] Monneret等人对入住重症监护病房的COVID-19患者进行了前15天的免疫监测。这项研究表明,对SARS-CoV-2感染的免疫应答与细菌性脓毒症中的免疫抑制延迟阶段表现出相似性,包括影响所有淋巴细胞亚群的严重淋巴细胞减少症、mHLA-DR降低和血浆细胞因子水平适度升高,同时表现出炎症性(IL-6)和免疫抑制性(IL-10)应答。这些观察结果强调了在COVID-19期间在进入重症监护室后持续免疫抑制的潜在问题(Monneret et al.,2020,Intensive Care Med,46:1764-1765)。许多治疗方法已经针对COVID-19进行了测试,但还没有一种能给出令人满意的结果。在这里,本发明人提出了一种基于载体化IL-7的免疫抑制治疗方法。

[0021] 技术问题

[0022] 目前尚无治疗脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制的药物解决方案，可以预计这种免疫抑制将继续成为严重的全球健康威胁。

[0023] 因此，有强烈的医疗需求来恢复这种免疫抑制患者的免疫功能，从而降低相关死亡率。更具体地，需要用于治疗所述病症的IL-7多肽的替代物。

[0024] 在本发明的上下文中，本发明人发现被工程化以表达IL-7的非增殖型病毒载体是IL-7多肽的替代物，对免疫系统恢复具有有希望的作用。

[0025] 令人惊讶的是，单次施用所述非增殖型病毒载体似乎在对象体内诱导了IL-7浓度，该浓度足以恢复与脾细胞数量和激活的增加相关的功能免疫性，并改善了首次接受试验的小鼠的脾和胸腺中免疫细胞的Bcl2表达。在CLP模型中，所述非增殖型病毒载体的施用诱导了正常脾细胞计数和至少部分T细胞计数的恢复，血液免疫细胞计数的改善，脾、肺和血液中一些免疫细胞群的激活，T细胞功能的增强，能产生TNFα、IL2或IFNγ、TNFα和IL2等中的2或3种细胞因子的细胞出现频率的增加。此外，在CLP模型中，施用所述非增殖病毒载体显著增加了宿主存活率，表明病毒载体和表达的IL-7对免疫系统的联合作用可以诱导免疫恢复。在COVID患者、衰老创伤患者、ICU创伤患者和ICU大手术患者中，所述非增殖型病毒载体诱导STAT5磷酸化和/或T细胞功能增强，这也表明在这些模型中病毒载体和表达的IL-7对免疫系统的组合作用可以诱导免疫恢复。

[0026] 此外，由于原位载体介导的IL-7产生，还可以期望所述载体将解决IL-7多肽遇到的问题。我们的候选物可以改善患者的依从性，例如减少施用治疗的次数。还可以改善治疗安全性，降低与重复注射相关的感染风险。

[0027] 所述技术问题通过提供如权利要求中定义的实施方案来解决。

[0028] 本发明的其它和进一步的方面、特征和优点将从本发明的当前优选实施方案的以下描述中显而易见。

[0029] 发明概述

[0030] 本发明的一方面涉及包含编码至少具有IL-7活性的多肽的核酸分子的非增殖型病毒载体，其中所述非增殖型病毒载体用于治疗脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制(即由本文列举的任何一种免疫抑制诱导剂或其任何组合诱导)。

[0031] 在一个实施方案中，用于本发明所述用途的非增殖型病毒载体是选自痘病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、水疱性口炎病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、Maraba毒和病毒样颗粒的载体。

[0032] 在又一个实施方案中，用于本发明所述用途的非增殖型病毒载体编码至少一种多肽，所述多肽选自鼠IL-7、人IL-7、与Fc结构域(Fc，可结晶片段)融合的鼠IL-7，以及与Fc结构域融合的人IL-7。

[0033] 另一方面，本发明还提供了一种组合物，其包含非增殖型病毒载体和可接受的药物载体。在一个实施方案中，非增殖型病毒载体或其组合物用于治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制(即由本文列举的任何一种免疫抑制诱导剂或其任何组合诱导)。在另一个实施方案中，其组合物通过静脉内、皮下、粘膜或肌内途径施用。

[0034] 在另一个实施方案中，与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比，所

述非增殖型病毒载体或组合物用于增加施用了所述非增殖型病毒载体或组合物的对象的功能性先天免疫和/或适应性免疫。在另一个实施方案中，与在施用所述非增殖型病毒载体或组合物之前的所述对象免疫应答相比，所述非增殖型病毒载体或组合物用于增加施用了所述非增殖型病毒载体或组合物的对象的功能性先天免疫和/或适应性免疫。

[0035] 在一个优选的实施方案中，与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比，在施用了所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中所述用途是用于增加与免疫相关的至少一种类型的细胞的水平，所述细胞选自CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞、NK T细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞。在另一个实施方案中，与施用所述非增殖型病毒载体或组合物之前所述对象的免疫性相关的细胞水平相比，在施用了所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中所述用途是用于增加与免疫相关的至少一种类型的细胞的水平，所述细胞选自CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。

[0036] 在另一个优选的实施方案中，与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比，施用了所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中所述用途是增加与免疫相关的选自以下至少一种类型的激活和/或成熟细胞的水平或百分比：激活的CD4 T细胞、激活的CD8 T细胞、激活的B细胞、激活的NK细胞、单核细胞和巨噬细胞。在另一个实施方案中，与施用所述非增殖型病毒载体或组合物之前所述对象中与免疫相关的激活细胞水平相比，在施用了所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中所述用途是用于增加与免疫相关的选自以下至少一种类型的激活和/或成熟细胞的水平或百分比：激活的CD4 T细胞、激活的CD8 T细胞、激活的B细胞、激活的的NK细胞、单核细胞和巨噬细胞。

[0037] 在进一步的实施方案中，将所用的非增殖型病毒载体或组合物施用于展示与免疫相关细胞水平和/或免疫相关激活细胞水平降低相关的一种或多种生物标志物的对象。

[0038] 另一方面，本发明还提供了在有需要的对象中治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制(即由本文列举的任何一种免疫抑制诱导剂或其任何组合诱导)，包括一次或多次施用如本文所述用途的非增殖型病毒载体或组合物。

[0039] 附图简述

[0040] 图1:MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)表达hIL-7-Fc的体外分析和功能评估

[0041] A.Western印迹分析.将A549细胞在体外用空白MVA白(MVATGN33.1，阴性对照)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)感染，并收集上清液和细胞。在存在或不存在β-巯基乙醇的条件下，通过Western印迹分析在细胞中表达并在上清液中分泌的hIL-7-Fc。产生的IL-7通过抗IL-7抗体(特异于人IL-7的兔单克隆抗体)检测。B.在体外感染后通过ELISA分析hIL-7-Fc表达.将COS7细胞用空白MVA白(MVATGN33.1)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)以MOI 0.3、1或3进行感染。在感染后48至72小时收集感染细胞上清液并在ELISA之后检测表达的hIL-7。根据使用的MOI和载体，检测到的IL-7的浓度(以ng/mL表示)显示在图表上。黑色条对应于感染MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的细胞，空心条代表了空白MVA感染的细胞。C.使用PB1细胞对产生的IL-7进行功能评估.通过评估上清液对PB1细胞的作用来测试上清液中产生的IL-7的功能，PB1细胞是一种增殖依赖于IL-7的细胞系。温育72小时后，使用MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物)测定法评估反映细胞增殖活性的细胞代谢活性。根据上清液测试稀释度，在MTT测定结束时测量的OD(光密度)显示在图表上。OD值越高，诱

导的PB1增殖越多。在MOI 0.3、1和3的来自空白MVA上清液观察到的OD分别由空心三角形、空心正方形和空心圆表示，在MOI 0.3、1和3的来自MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的上清液的OD分别由黑色三角形、黑色正方形和的黑色圆表示。

[0042] 图2：注射2种不同剂量的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的健康C57BL6/J小鼠中的循环人IL-7和鼠IFNγ药代动力学(实验1)

[0043] 使用人IL-7ELISA和小鼠IFNγELISA使用注射小鼠的血清样本测量循环hIL-7和mIFNγ。在第0、2、6、24、48、72、96小时、8、15和21天收集血样。所有组在每个时间点采样三只小鼠。检测到的hIL-7的平均浓度(ng/mL)由黑色方块表示，检测到的mIFNγ的平均浓度(ng/mL)由空心方块表示。点较大的虚线表示mIFNγELISA的定量限，点最小的虚线表示hIL-7ELISA的定量限。图2A显示了在一次IV注射空白MVA(1.10^8pfu)后随着时间观察到的循环hIL-7和mIFNγ的平均浓度值。图2B显示了在一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(1.10^7pfu)后随着时间观察到的循环hIL-7和mIFNγ的平均浓度值。图2C显示了在一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)(1.10^8pfu)后随着时间观察到的循环hIL-7和mIFNγ的平均浓度值。

[0044] 图3：注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的健康C57BL6/J小鼠中的循环人IL-7和鼠IFNγ药代动力学(实验2)

[0045] 使用人IL-7ELISA和小鼠IFNγELISA使用注射小鼠的血清样本测量循环hIL-7和mIFNγ。在第0、6、24、48、72、96小时、7和9天收集血样。所有组在每个时间点采样三只小鼠。检测到的hIL-7的平均浓度(ng/mL)由黑色方块表示，检测到的mIFNγ的平均浓度(ng/mL)由空心方块表示。点较大的虚线表示mIFNγELISA的定量限，点最小的虚线表示hIL-7ELISA的定量限。图3A显示了在一次IV注射空白MVA后随着时间观察到的循环hIL-7和mIFNγ的平均浓度值。图3B显示了在一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后随着时间观察到的循环hIL-7和mIFNγ的平均浓度值。

[0046] 图4：一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后健康C57BL6/J小鼠中脾细胞总数分析

[0047] 在注射后第1、3、9和29天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性，每组处死3只小鼠并对脾取样以计数脾细胞总数。每组平均值和时间点+/-SD在图表上表示。未治疗的小鼠的平均值用白色条表示，用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的平均值用灰色条表示，用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的平均值用黑色条表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值，p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示，p值<0.0001用****表示。

[0048] 图5：在健康C57BL6/J小鼠中一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后，脾中总CD4+T细胞和4个亚群(幼稚型、急性效应型、效应记忆型和中央记忆型)数量的分析

[0049] 在注射后第1、3、9和29天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性，处死每组3只小鼠并对脾取样以表征CD4+T细胞和以下每个亚群的总数：幼稚型CD4+T细胞(CD3+CD4+CD62L+CD44-)、CD4+效应记忆型T细胞(CD3+CD4+CD62L-CD44+)、CD4+中央记忆型T细胞(CD3+CD4+CD62L+CD44+)和CD4+急性效应型T细胞(CD3+CD4+CD62L-CD44-)。如材料和方法章节部分所述对细胞进行制备、染色和分析。图5A、5B、5C、5D和5E分别表示每个脾脏的CD4+T细胞、幼稚型CD4+T细胞、CD4+效应记忆型T细胞、

CD4+中央记忆型T细胞和CD4+急性效应型T细胞的绝对数量。每组和时间点的平均值+/-SD在图表上表示。未治疗的小鼠的平均值用白色条表示，用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的平均值用灰色条表示，用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的平均值用黑色条表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值，p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示，p值<0.0001用****表示。

[0050] 图6:在健康C57BL6/J小鼠中一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后，脾中总CD8+T细胞和4个亚群(幼稚型、急性效应型、效应记忆型和中央记忆型)数量的分析

[0051] 在注射后第1、3、9和29天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性，处死每组3只小鼠并对脾取样以表征CD8+T细胞和以下每个亚群的总数:幼稚型CD8+T细胞(CD3+CD8+CD62L+CD44-)，CD8+效应记忆型T细胞(CD3+CD8+CD62L-CD44+)，CD8+中央记忆型T细胞(CD3+CD8+CD62L+CD44+)和CD8+急性效应型T细胞(CD3+CD8+CD62L-CD44-)。如材料和方法章节部分所述制备、染色和分析细胞。图6A、6B、6C、6D和6E分别表示每个脾脏的CD8+T细胞、幼稚型CD8+T细胞、CD8+效应记忆型T细胞、CD8+中央记忆型T细胞和CD8+急性效应型T细胞的绝对数量。每组和时间点的平均值+/-SD在图表上表示。未治疗的小鼠的平均值用白色条表示，用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的平均值用灰色条表示，用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的平均值用黑色条表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值，p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示，p值<0.0001用****表示。

[0052] 图7:在健康C57BL6/J小鼠中一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后，分析脾和胸腺细胞内CD4+和CD8+T细胞中Bcl2蛋白(抗凋亡蛋白)的表达

[0053] 在注射后1天和3天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性，处死每组3只小鼠并对脾和胸腺取样以表征来自脾和胸腺细胞的T细胞上的Bcl2。表达水平表征为在脾中的CD4+T细胞(图7A)、脾中的CD8+T细胞(图7B)和胸腺细胞(图7C)上观察到的Bcl2染色的平均荧光强度(MFI)。如材料和方法章节部分所述制备、染色和分析细胞。每组和时间点的平均值+/-SD在图表上表示。未治疗的小鼠的平均值用白色条表示，用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的平均值用灰色条表示，用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的平均值用黑色条表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值，p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示，p值<0.0001用****表示。

[0054] 图8:在健康C57BL6/J小鼠中一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后胸腺内细胞亚群的比例

[0055] 在注射后1天和3天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性，处死每组3只小鼠并采集胸腺样本以表征通常存在于胸腺中的4个细胞亚群:双阴性(DN)细胞(CD4-CD8-)、双阳性(DP)细胞(CD4+CD8+)、单阳性(SP)CD4+细胞(CD4+CD8-)和单阳性(SP)CD8+细胞(CD4-CD8+)。如材料和方法章节部分所述制备、染色和分析细胞。每个细胞亚群的比例在这里显示为每组和每个时间点的平均百分比(第1天示于图8A，第3天示于图8B)。DP细胞由白色部分表示，DN细胞由黑色垂直阴影部分表示，SP CD4+细胞由方格图

案部分表示,SP CD8+细胞由黑色垂直阴影部分表示。

[0056] 图9:在健康C57BL6/J小鼠中一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后脾中嗜中性粒细胞和髓样树突状细胞(mDC)总数分析

[0057] 在注射后第1、3、9和29天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性,处死每组3只小鼠并对脾取样以表征中性粒细胞(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G+)和髓样树突状细胞(B220-、NK1.1-、CD11b-、CD11c+)。如材料和方法章节部分所述制备、染色和分析细胞。图9A和9B分别代表每个脾中嗜中性粒细胞和mDC的绝对数量。每组和时间点的平均值+/-SD在图表上表示。未治疗的小鼠的平均值用白色条表示,用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的平均值用灰色条表示,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的平均值用黑色条表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值,p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示,p值<0.0001用****表示。

[0058] 图10:在健康C57BL6/J小鼠中一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后,脾中单核细胞亚群(Ly6C^{high}、Ly6C^{int}和Ly6C^{low})数量的分析

[0059] 在注射后第1、3、9和29天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性,处死每组3只小鼠并对脾取样以表征分为3个亚群的单核细胞:Ly6C^{high}单核细胞(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G、Ly6C^{high})是促炎和介导吞噬作用单核细胞,Ly6C^{int}单核细胞(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G-、Ly6C^{int})是促炎单核细胞,Ly6C^{low}单核细胞(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G-、Ly6C^{low})是巡视单核细胞。如材料和方法章节部分所述制备、染色和分析细胞。图10A、10B和10C分别表示每个脾的Ly6C^{high}、Ly6C^{int}和Ly6C^{low}单核细胞的绝对数量。每组和时间点的平均值+/-SD在图表上表示。未治疗的小鼠的平均值用白色条表示,用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的平均值用灰色条表示,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的平均值用黑色条表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值,p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示,p值<0.0001用****表示。

[0060] 图11:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠的存活率

[0061] 将小鼠在第0天接受CLP并在CLP后第4天为小鼠在眶后窦经静脉内注射一次100μL的1×10^{8}pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)。示出在假手术(Sham)小鼠(黑色圆和虚线)、未治疗的CLP小鼠(黑色圆)和用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠(灰色方块和灰色线)中在用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗前和治疗后的存活曲线。MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的时间由垂直虚线表示。示出了两个独立实验的组合结果。使用对数秩检验进行统计分析(SAS®9.4),然后使用Tukey多重性调整检验进行组间ad-hoc比较。

[0062] 图12:CLP小鼠中经MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗后的循环hIL-7水平

[0063] 通过hIL-7ELISA评定假手术小鼠(白色条,N=5)、CLP小鼠(黑色条,N=7)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条,N=15)血清中hIL-7的水平。2个组合实验的结果表示为hIL-7的平均值±SD值,单位为pg/mL。

[0064] 图13:CLP小鼠中在经MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗后的循环IFNγ水平

[0065] 通过U-PLEX多重测定评估假手术小鼠(白色条,N=5)、CLP小鼠(黑色条,N=7)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条,N=15)的血清中IFNγ水平。2个组

合实验的结果显示为平均值±SD值，以pg/mL表示。使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析，然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较：p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示。

[0066] 图14：用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠脾中的免疫细胞亚群

[0067] 使用假手术小鼠(白色条，N＝5)、CLP小鼠(黑色条，N＝7)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条，N＝15)的脾细胞，通过流式细胞术评估总脾细胞(A)、T细胞($CD3^+$)(B)、CD4T细胞($CD3^+NK1.1^-CD4^+$)(C)和CD8 T细胞($CD3^+NK1.1^-CD8^+$)(D)的数量。2个组合实验的结果显示为以每个脾10^6个细胞表示的平均值±SD值。使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析，然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较：p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示。

[0068] 图15：用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠脾中免疫细胞的激活状态

[0069] 来自假手术小鼠(白色条，N＝5)、CLP小鼠(黑色条，N＝7)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条，N＝15)的脾细胞的激活状态通过评估细胞表面CD69表达来确定。对于B细胞($CD19^+$)(A)、CD4 T细胞($CD3^+NK1.1^-CD4^+$)(B)、CD8 T细胞($CD3^+NK1.1^-CD8^+$)(C)和NK细胞($CD3^-CD19^-NK1.1^+$)(D)，2个组合实验的结果显示为$CD69^+$细胞数的平均值±SD值，以每个脾10^6个细胞表示，使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析，然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较：p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示。

[0070] 图16：用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠血液中的循环免疫细胞亚群

[0071] 通过流式细胞术评估用MVA-hIL-7-Fc治疗(灰色条，N＝8)或未治疗(黑条，N＝3)的CLP小鼠血液中总$CD3^+$($CD45^+CD3^+$)(A)、CD4 T($CD45^+CD3^+NK1.1^-CD4^+$)(B)、CD8 T($CD45^+CD3^+NK1.1^-CD8^+$)(C)、NKT($CD45^+CD3^+NK1.1^+$)(D)、NK($CD45^+CD3^-CD19^-NK1.1^+$)(E)、B($CD45^+CD19^+$)(F)、$CD11c^+$($CD45^+CD19^-CD3^-NK1.1^-CD11c^+$)(G)和$CD11b^+$($CD45^+CD19^-CD3^-NK1.1^-CD11b^+$)(H)细胞的数量。一个实验的结果显示为每μL血液的细胞数的平均值±SD值。使用Mann-Whitney检验进行统计分析：p值<0.05用*表示。

[0072] 图17：用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中免疫血细胞的激活状态

[0073] 通过评估细胞表面CD69表达来确定用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗(灰色条)或未治疗(黑色条)的CLP小鼠中血细胞的激活状态。对于CD4 T细胞($CD45^+CD3^+NK1.1^-CD4^+$)(A)、CD8 T细胞($CD45^+CD3^+NK1.1^-CD8^+$)(B)、B细胞($CD45^+CD19^+$)(C)和NK细胞($CD45^+CD3^-CD19^-NK1.1^+$)(D)，结果显示为每μL血液的$CD69^+$细胞数量的平均值±SD值(一个实验，CLP：N＝3，及CLP+MVA-hIL-7-Fc：N＝8)。使用Mann-Whitney检验进行统计分析：p值<0.05用*表示。

[0074] 图18：MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗增加了CLP小鼠中产生IFNγ的T细胞的频率

[0075] 使用与抗CD3和抗CD28抗体一起培养的假手术小鼠(白色条，N＝5)、CLP小鼠(黑色条，N＝4)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条，N＝7)的脾细胞，通过IFNγ ELISpot测定评估IFNγ斑点形成细胞。一个实验的结果表示为每10^5个细胞的斑点形成单位的平均值±SD值(A)和以$10^{-3}mm^2$表示的斑点大小的平均值±SD值(B)。使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析，然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较：p值<0.05

用*表示,p值<0.01用**表示。

[0076] 图19:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中所有产生细胞因子的CD4和CD8 T细胞

[0077] 通过三重细胞内细胞因子染色测定测量在用抗CD3和抗CD28抗体进行体外刺激后,在假手术小鼠(白色条,N=5)、CLP小鼠(黑色条,N=8)和用MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠(灰色条,N=15)中产生IFNγ、TNFα和IL2中至少一种细胞因子的CD4 T细胞($CD4^+$)(A)和CD8 T细胞($CD8^+$)(B)的出现频率。2个组合实验的结果表示为细胞因子阳性细胞出现频率的平均值±SD值。使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示。

[0078] 图20:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中产生细胞因子的CD4T细胞

[0079] 通过三重细胞内细胞因子染色测定法测量在体外用抗CD3和抗CD28抗体刺激后产生IFNγ、TNFα和/或IL2的假手术小鼠(白色条,N=5)、CLP小鼠(黑色条,N=8)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条,N=15)脾中CD4 T细胞的出现频率。图中示出产生IFNγ/TNFα(A)、IL2/TNFα(B)或IFNγ/IL2/TNFα(C)的CD4 T细胞($CD4^+$)的出现频率。结果表示为所有CD4 T细胞群中每个细胞因子阳性细胞亚群出现频率的平均值±SD值。使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示。

[0080] 图21:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中产生细胞因子的CD8T细胞

[0081] 通过三重细胞内细胞因子染色测定法测量在体外用抗CD3和抗CD28抗体刺激后产生IFNγ、TNFα和/或IL2的假手术小鼠(白色条,N=5)、CLP小鼠(黑色条,N=8)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条,N=15)脾中CD8 T细胞的出现频率。图中示出了仅产生IFNγ(A)、IFNγ/TNFα(B)和IFNγ/IL2/TNFα(C)的CD8 T细胞($CD8^+$)的出现频率。结果表示为所有CD8 T细胞群中每个细胞因子阳性细胞亚群出现频率的平均值±SD值。使用单因素ANOVA检验对重复测量进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示。

[0082] 图22:在MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗后激活T细胞产生的促炎和抗炎细胞因子

[0083] 将来自假手术小鼠(白色条,N=5)、CLP小鼠(黑色条,N=7)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色条,N=15)的总体脾细胞在抗CD3抗体预包被平板中培养,通过U-PLEX多重测定测量上清液中释放的IL-1β(A)、IL-6(B)、TNFα(C)、IFNγ(D)和IL-10(E)。2个组合实验的结果显示为每种细胞因子的平均值±SD值,以pg/mL表示。使用针对重复测量的单因素ANOVA检验进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示。

[0084] 图23:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA(MVATGN33.1)治疗的CLP小鼠的存活率

[0085] 小鼠在第0天接受CLP,并在CLP后第4天在眶后窦经静脉内注射一次100μL的1×10^8pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA(MVATGN33.1)。图中示出了在用空白MVA(黑色圆和黑色虚线)治疗的CLP小鼠和用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠(灰色方块和灰色线)中,在治疗之前(A)和之后(B)的存活曲线。MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA

(MVATGN33.1)治疗的时间由垂直虚线表示。

[0086] 图24:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA(MVATGN33.1)治疗的CLP小鼠血液中的循环免疫细胞亚群

[0087] 通过流式细胞术评估在经空白MVA(黑色方块,N=6)或MVA-hIL-7-Fc(灰色圆圈,N=9)治疗的CLP小鼠的血液中脾的各种细胞亚群。图中示出了CD8 T($CD45^+CD3^+NK1.1^-CD8^+$)(A)、NKT($CD45^+CD3^+NK1.1^+$)(B)和$CD11b^+$($CD45^+CD19^-CD3^-NK1.1^-CD11b^+$)(C)细胞的数量,以及每μL血液的细胞数的平均值±SD值。使用针对重复测量的单向ANOVA检验进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示。

[0088] 图25:用空白MVA(MVATGN33.1)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中产生细胞因子的CD4 T细胞

[0089] 通过三重细胞内细胞因子染色测定法测量在用抗CD3和抗CD28抗体体外刺激后在用空白MVA治疗的CLP小鼠(黑色方块,N=6)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色圆,N=9)脾中产生IFNγ、TNFα和/或IL2的CD4 T细胞的出现频率。图中示出了产生至少一种细胞因子的所有CD4 T细胞($CD4^+$)(A)、产生IFNγ的所有CD4 T细胞、产生TNFα的所有CD4 T细胞和产生IL2的所有CD4 T细胞(B)、特别是产生IFNγ和TNFα或产生IFNγ和IL2或产生IL2和TNFα或产生IFNγ和IL2和TNFα的CD4 T细胞(C)的出现频率。以单个值和平均值±SD示出。使用针对重复测量的单向ANOVA检验进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示。

[0090] 图26:用空白MVA(MVATGN33.1)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中产生细胞因子的CD8 T细胞

[0091] 通过三重细胞内细胞因子染色测定法测量在用抗CD3和抗CD28抗体体外刺激后在用空白MVA治疗的CLP小鼠(黑色方块,N=6)和用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠(灰色圆圈,N=9)脾中产生IFNγ、TNFα和/或IL2的CD8 T细胞的出现频率。图中示出了产生至少一种细胞因子的所有CD8 T细胞($CD4^+$)(A)、产生IFNγ的所有CD8 T细胞、产生TNFα的所有CD8 T细胞和产生IL2的所有CD8 T细胞(B)、特别是仅产生IFNγ的CD8 T细胞和仅产生TNFα的CD8 T细胞(C),或产生IFNγ和TNFα或产生IL2和TNFα,或产生IFNγ和IL2和TNFα的CD8 T细胞(D)的出现频率。以单个值和平均值+/-SD表示。使用针对重复测量的单向ANOVA检验进行统计分析,然后使用Mann-Whitney检验进行组间比较:p值<0.01用**表示。

[0092] 图27:在一次IV注射空白MVA(MVATGN33.1)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)后,健康C57BL6/J小鼠的肺细胞和激活的(CD69+)NK、CD8+和CD4+T细胞总数分析

[0093] 在注射后第3天和第9天评估空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物活性,处死每组10只小鼠并采集肺部样本以在对肺制备后计数肺细胞总数(图27A)。激活的NK细胞(图27B)和激活的CD8+(图27C)和CD4+(图27D)T细胞数量也通过流式细胞术监测。实验进行了两次,并将结果汇总。每组和时间点的个体值和平均值以+/-SD示于图表中。未治疗小鼠的个体值由空心圆表示,用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠的个体值由空心方块表示,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的个体值由实心黑色方块表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值,p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示,p值<0.0001用****表示。

[0094] 图28:一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或hIL-7-Fc蛋白后,健康C57BL6/J小鼠肺细胞和激活的(CD69+)NK、CD8+和CD4+T细胞的总数分析

[0095] 在注射后第3天和第9天评估MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)和hIL-7-Fc蛋白的生物活性,处死每组6只小鼠并采集肺部样本以在对肺制备后计数肺细胞总数(图28A)。激活的NK细胞(图28B)和激活的CD8+(图28C)和CD4+(图28D)T细胞数量也通过流式细胞术监测。每组和时间点的个体值和平均值+/-SD示于图表中。未治疗小鼠的个体值由空心圆表示,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的个体值由实心黑色方块表示,用IL-7-Fc蛋白治疗的小鼠的个体值由实心黑色三角形表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值,p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示,p值<0.0001用****表示。

[0096] 图29:在一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或hIL-7-Fc蛋白后,健康C57BL6/J小鼠的脾和肺中产生细胞因子的CD8 T细胞

[0097] 通过三重细胞内细胞因子染色测定法评估在用抗CD3和抗CD28抗体进行体外刺激后,未经治疗或经IV注射一次MVATG18897或hIL-7-Fc蛋白的C57BL6/J健康小鼠的脾和肺中产生IFNγ、TNFα和/或IL2的CD8 T细胞的出现频率。图中示出了在脾(图29A)或肺(图29B)中仅产生IFNγ的CD8+T细胞,在脾(图29C)或肺(图29D)中产生IFNγ和TNFα的CD8+T细胞以及在脾(图29E)或肺(图29F)中产生IFNγ、TNFα和IL2的CD8+T细胞。每组和时间点的个体值和平均值+/-SD示于图表中。未治疗的小鼠的个体值由空心圆表示,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的个体值由实心黑方块表示,用IL-7-Fc蛋白治疗的小鼠的个体值由实心黑三角形表示。使用GraphPad Prism进行使用两因素ANOVA的统计分析。使用Bonferroni校正多重比较检验计算P值,p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示,p值<0.0001用****表示。

[0098] 图30:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或hIL-7-Fc蛋白治疗的CLP小鼠的存活率

[0099] 小鼠在第0天接受CLP,并在CLP后第4天在眶后窦经静脉注射一次100μL的1×10^7pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或5μg hIL-7-Fc蛋白。图中示出了未治疗的CLP小鼠(实心黑色方块和黑线)、用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠(实心半圆和虚线)或用hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠(空心圆和虚线)的存活曲线。用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或hIL-7-Fc蛋白治疗的时间由垂直虚线表示。作为对照,幼稚和未治疗小鼠的存活率用实心黑色菱形和虚线表示。

[0100] 图31:一次IV注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或hIL-7-Fc蛋白后,CLP小鼠中激活的(CD69+)CD8+T和B细胞的分析

[0101] 在注射后第3天(CLP后7天)评估MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)和hIL-7-Fc蛋白的生物活性,在CLP后第7天处死每组中存活的小鼠。对脾取样并通过流式细胞术监测激活的CD8+T(图31A)和B(图31B)细胞数量。每组和时间点的个体值和平均值+/-SD示于图表中。未治疗的小鼠的个体值由实心黑色圆表示,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠的个体值由实心黑色方块表示,用IL-7-Fc蛋白治疗的小鼠的个体值以实心黑色三角形表示。对重复测量使用单因素ANOVA检验进行统计分析,然后使用Dunns检验进行组间比较:p值<0.05用*表示,p值<0.01用**表示,p值<0.001用***表示。

[0102] 图32:用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或hIL-7-Fc蛋白治疗的CLP小鼠中产生细胞

因子的CD8 T细胞

[0103] 通过三重细胞内细胞因子染色测定法评估用抗CD3和抗CD28抗体在体外刺激后，在未经治疗的CLP小鼠(实心黑色圆)、用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)(实心黑色方块)或用hIL-7-Fc蛋白(实心黑色三角形)治疗的CLP小鼠的脾中至少产生IFNγ(仅或与其它细胞因子一起)(图32A)，仅产生IFNγ(图32B)，产生IFNγ和TNFα(图32C)或产生IFNγ和TNFα以及IL2(图32D)的CD8 T细胞的出现频率。图中示出单个值和平均值+/-SD。对重复测量使用单因素ANOVA检验进行统计分析，然后使用Dunns检验进行组间比较：p值<0.05用*表示，p值<0.01用**表示，p值<0.001用***表示。

[0104] 图33：MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897或MVATG19791)对hIL-7-Fc表达的体外分析

[0105] A和B：Western印迹分析。将鸡胚胎成纤维细胞(CEF)(A)或A549细胞(B)在体外用空白MVA(MVATGN33.1，阴性对照)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897或MVATG19791)感染，并收集上清液和细胞。在存在或不存在β-巯基乙醇的条件下，通过Western印迹分析在细胞中表达及在上清液中分泌的hIL-7-Fc。产生的IL-7通过抗IL-7抗体(特异于人IL-7的兔单克隆抗体)检测。C.体外感染后通过ELISA分析hIL-7-Fc表达。收集感染细胞(CEF或A549细胞)的上清液并根据ELISA检测表达的hIL-7。图中示出了检测到的IL-7的浓度(以ng/mL表示)。灰色条对应于MVATG18897感染的细胞，黑色条代表MVATG19791感染的细胞，空白条对应于MVATGN33.1感染的细胞，但在图表上不可见，因为在这些上清液中未检测到IL-7。

[0106] 图34：在用MVA-IL-7-Fc感染细胞的上清液进行离体刺激后，COVID19+患者全血CD3+T细胞中pSTAT5表达的分析

[0107] 通过流式细胞术分析在用来自MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA(MVATGN33.1)感染或未感染的原代肝细胞的上清液刺激后，CD3+T细胞中的pSTAT5表达。如材料和方法直接部分所述，对全血进行刺激、染色和分析。如下所述计算比率：将用来自MVATG18897或MVATGN33.1或未感染细胞的上清液获得的值通过未刺激条件的值进行归一化。6名患者的比率平均值+/-标准偏差显示在图表上。来自MVA-IL-7-Fc(SN IL-7-Fc)感染细胞的上清液的平均值由黑色条表示，而来自空白MVA(SN N33)或未感染细胞(SN NI细胞)的上清液由灰色条表示。

[0108] 图35：用MVA-hIL-7-Fc感染细胞的上清液刺激后，COVID19+患者全血中CD4+T细胞产生的总IFNγ和IFNγ-TNFα-IL-2的分析

[0109] 除了来自MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA(MVATGN33.1)感染或未感染的原代肝细胞的上清液外，在用Duractive 1离体刺激3小时后，通过细胞内染色分析CD4+T细胞的功能。如材料和方法部分所述，对全血进行刺激、染色和分析。图中示出了产生IFNγ(A)或IFNγ-TNFα-IL-2(B)的CD4+T细胞的百分比。如下所述计算比率：Duractive 1+MVATG18897或MVATGN33.1感染或未感染细胞上清液的值通过Duractive 1条件的值归一化。6名患者的比率平均值+/-标准偏差显示在图表上。MVA-IL-7-Fc上清液(DA+SN IL-7-Fc)的平均值用黑条表示，空白MVA(DA+SN N33)或未感染细胞上清液(DA+SN NI细胞)的平均值用灰色条表示。

[0110] 图36：来自衰老对照和髋部骨折患者的PBMC上CD8 T细胞中CD57表达的分析

[0111] 如材料和方法章节部分所述，将来自衰老对照和髋部骨折患者(HF)的PBMC解冻、染色并通过流式细胞术进行分析。图中示出了CD8 T细胞中CD57表达的平均值+/-标准差。

[0112] 图37:用来自MVA-hIL-7-Fc感染细胞的上清液刺激的衰老创伤患者PBMC的评估

[0113] A.pSTAT5分析。通过流式细胞术分析了未刺激的CD3+细胞中以及用空白MVA(MVATGN33.1,图中的SN N33)或MVA-hIL-7-Fc(MVATG19791,图中的SN IL-7-Fc)感染细胞的上清液进行离体刺激的CD3+细胞中的pSTAT5表达。如材料和方法章节部分所述,对来自衰老对照和髋部骨折患者(HF)的PBMC进行解冻、刺激、染色和分析。B.T细胞增殖。通过流式细胞术分析未刺激的CD3+细胞和用来自空白MVA(SNN33)或MVA-hIL-7-Fc(SNIL-7-Fc)感染细胞的上清液离体刺激后的增殖比例。将来自衰老对照和髋部骨折患者(HF)的PBMC解冻和染色,刺激5天,然后按照材料和方法中的描述进行染色和分析。图中示出平均值+/-标准偏差。

[0114] 图38:在存在来自MVA-hIL-7-Fc感染细胞的上清液的条件下进行离体刺激后,对来自创伤患者的PBMC的产生总IFNγ和IFNγ-TNFα-IL-2的CD4+T细胞的分析

[0115] 除了来自MVA-hIL-7-Fc(黑色)或空白MVA(灰色)感染原代肝细胞的上清液或作为对照的培养基(白色)之外,在用PMA-离子霉素、抗-CD3/抗-CD28刺激或未刺激对照后,通过细胞内染色分析CD4+T细胞的功能。如材料和方法章节部分所述,对解冻的PBMC进行刺激、染色和分析。图中示出了产生IFNγ(A)或IFNγ、TNFα和IL-2(B)的CD4+T细胞的百分比。3名患者的平均值和+/-标准偏差显示在图表上。SN IL-7-Fc:MVA-IL-7-Fc(MVATG19791)上清液;SN N33:空白MVA(MVATGN33.1)上清液;对照:培养基。

[0116] 图39:在来自MVA-hIL-7-Fc感染细胞的上清液存在下进行离体刺激后,对来自大手术患者的PBMC的产生总IFNγ和IFNγ-TNFα-IL-2的CD4+T细胞的分析

[0117] 除了来自MVA-hIL-7-Fc(黑色)或空白MVA(灰色)感染的原代肝细胞上清液或作为对照的培养基(白色)之外,在用PMA-离子霉素、抗-CD3/抗-CD28或未刺激的对照刺激后,通过细胞内染色分析CD4+T细胞的功能。

[0118] 如材料和方法章节部分所述,对解冻的PBMC进行刺激、染色和分析。图中示出产生IFNγ(A)或IFNγ、TNFα和IL-2(B)的CD4+T细胞的百分比。3名患者的平均值和+/-标准偏差显示在图表上。SN IL-7-Fc:MVA-IL-7-Fc(MVATG19791)上清液;SN N33:空白MVA(MVATGN33.1)上清液;对照:培养基。

[0119] 发明详述

[0120] 本文提供的许多定义将有助于理解本发明。然而,除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员普遍理解的相同含义。本文引用的所有参考文献均通过引用整体并入。

[0121] 一般定义

[0122] 如在整个申请书中所使用的,术语“一个”和“一种”意味着“至少一个”、“至少第一个”或“多个”所提及的组件或步骤的意义上使用,除非上下文显然另有规定。例如,术语“一种非增殖型病毒载体”包括多种非增殖型病毒载体,包括其混合物。

[0123] 术语“一个或多个”是指一个或一个以上的数字(例如2、3、4、5个等)。

[0124] 本文使用的术语“和/或”包括“和”、“或”和“由所述术语连接的元素的所有或任何其它组合”的含义。例如,“先天性和/或适应性免疫系统”是指先天性免疫系统或适应性免疫系统或先天性和适应性免疫系统。

[0125] 如本文所用,当用于定义产物、组合物和方法时,术语“包含”(以及任何语法形式

的包含)、“具有”(以及任何语法形式的具有)、“包括”(以及任何语法形式的包括)或“含有”(以及任何语法形式的含有)是开放式且不排除额外的、未列举的要素或方法步骤。“由…组成”是指除外具有任何重要意义的其它成分或步骤。因此,由所述组分组成的组合物不除外痕量污染物和药学上可接受的载体。

[0126] 在本发明的上下文中,术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”和“核苷酸序列”可互换使用并且定义任何长度的聚脱氧核糖核苷酸(DNA)(例如cDNA、基因组DNA、质粒、载体、病毒基因组、分离的DNA、探针、引物,及其任何混合物)或聚核糖核苷酸(RNA)(例如mRNA、反义RNA、SiRNA)或混合聚核糖-聚脱氧核糖核苷酸的聚合物。其包括单链或双链、线性或环状、天然或合成的、修饰或未修饰的多核苷酸。

[0127] 术语“多肽”应理解为是至少九个氨基酸残基通过肽键键合的聚合物,无论其大小和是否存在翻译后组分(例如糖基化)。对多肽中包含的氨基酸的最大数目没有限制。一般而言,该术语是指短聚合物(在本领域通常称为肽)和较长聚合物(在本领域通常称为多肽或蛋白质)。这个术语包括天然多肽、修饰的多肽(也称为衍生物、类似物、变体或突变体)、多肽片段、多肽多聚体(例如二聚体)、融合多肽等等。该术语还指从编码所述多肽的多核苷酸序列表达的重组多肽。通常,这涉及将编码核酸翻译成mRNA序列,并通过将多核苷酸序列递送至的细胞的核糖体机制进行翻译。

[0128] 术语“相同性”是指两个多肽或核酸序列之间的氨基酸与氨基酸或核苷酸与核苷酸的对应关系。两个序列之间的相同性百分比是所述序列共享的相同位置数量的函数,同时考虑到全局最佳比对需要引入的缺口数量和每个缺口的长度。本领域可使用各种计算机程序和数学算法来确定氨基酸序列之间的相同性百分比,例如在NCBI可获得的Blast程序或Atlas of Protein Sequence and Structure中的ALIGN(Dayhoffed,1981,Suppl.,3:482-9)。用于确定核苷酸序列之间相同性的程序也可在专门的数据库中获得(例如Genbank、Wisconsin Sequence Analysis Package、BESTFIT、FASTA和GAP程序)。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括实现待比较序列的最大比对所需的任何算法。出于示例说明目的,“至少80%相同性”是指80%的相同性或更高(81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性),而“至少90%相同性”是指90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性,以及“至少95%相同性”是指95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性。

[0129] 术语“得自”、“源自”或“来源于”及其任何等同词是用于识别组分(例如多肽、核酸分子、病毒、载体等)的原始来源,但并不意味着限制制备所述组分的方法,例如可以通过化学合成或重组方法。

[0130] 如本文所用,术语“宿主细胞”应该广义地理解,而没有关于组织、器官或分离细胞中的特定组构的任何限制。这种细胞可以是一种独特类型的细胞或一组不同类型的细胞,例如培养细胞系、原代细胞和分裂细胞。这个术语还包括可以是或已经是用于本发明的非增殖型病毒载体的受体的细胞,以及这种细胞的后代。

[0131] 术语“对象”通常指需要或可能受益于本文所述的任何非增殖型病毒载体、组合物和方法的生物体。通常,所述生物体是哺乳动物,特别是选自家畜、农场动物、运动动物和灵长类动物的哺乳动物。优选地,对象是已被诊断患有免疫抑制或处于患有免疫抑制风险中

的人。术语“对象”和“患者”在指代人类生物体时可以互换使用，包括男性和女性。待治疗的对象可以是新生儿、婴儿、青年、成人或老年人。

[0132] 本文所用的术语“治疗”(以及任何语法形式的治疗)包括预防(例如，处于待治疗的并由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制风险中的对象中的预防措施)和/或疗法(例如在被诊断为患有由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制的对象中)，任选与常规治疗方法组合。治疗的结果是减缓、治愈、改善或控制免疫抑制的进展。例如，如果在施用本文所述的非增殖型病毒载体后，对象显示其先天和/或适应性免疫或免疫应答和/或恢复的可观察到改善，则所述对象被成功地治疗了由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制。

[0133] 如本文所用，术语“先天免疫”或“非特异性免疫”是指针对外来病原体的非特异性第一道防线。所述先天免疫由包括树突细胞(DC)、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞的细胞介导。其它因素如皮肤的防御机制、胃酸和血液中的化学物质也是先天免疫的一部分。

[0134] 如本文所用，术语“适应性免疫”或“特异性免疫”是指由B淋巴细胞、CD4+辅助T淋巴细胞、表达抗原特异性受体的CD8+细胞毒性T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞介导的病原体特异性免疫。所述适应性免疫产生记忆并容许灵活和广泛的应答所有组成成分。

[0135] 如本文所用，术语“施用”(或任何语法形式的施用)是指为对象递送预防剂或治疗剂例如本文描述的非增殖型病毒载体。

[0136] 本文所用，术语“组合”或“联合”指各种组分(例如本文所述的非增殖型病毒载体和一种或多种有效改善先天和/或适应性免疫或免疫应答的物质)的任何可能的安排。这种安排包括所述组分的混合物以及用于伴随或顺序施用的单独组合。本发明涵盖包含等摩尔浓度的各组分的组合以及具有非常不同浓度的组合。应当理解，所述组合的每个组分的最佳浓度可以由本领域技术人员确定。

[0137] 本发明的一方面涉及包含编码至少具有IL-7活性的多肽的核酸分子的非增殖型病毒载体，其中所述非增殖型病毒载体用于治疗脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制。

[0138] 病毒载体

[0139] 术语“病毒载体”、“病毒”、“病毒粒”、“病毒颗粒”和“病毒载体颗粒”可互换使用，是指当根据允许产生病毒颗粒的合适条件将基因组核酸转导到合适的细胞或细胞系中时形成的病毒颗粒。

[0140] 术语“非增殖型病毒载体”是指在宿主细胞或组织中不能增殖的病毒载体。这些病毒载体可能是复制缺陷型或复制受损型载体(例如遗传失能的病毒载体)，这意味着它们无法在正常细胞中进行任何显著复制，尤其是在正常人类细胞中，从而阻碍病毒载体的增殖。复制功能的损害或缺陷可以通过常规方法评估，例如通过测量非允许细胞中的DNA合成和/或病毒效价进行评估。通过部分或全部缺失或失活对病毒复制至关重要的区域，可以使病毒载体具有复制缺陷。这种复制缺陷或受损的病毒载体通常需要增殖、允许细胞系来产生或补充缺失/受损的功能。这些病毒载体也可以是具有复制能力或复制选择性的载体(例如，被设计为在特定宿主细胞中更好地或选择性地复制)，其能够在宿主感染的细胞中产生第一代病毒颗粒，但其中所述第一代病毒颗粒无法感染新宿主的细胞，从而阻碍病毒载体

的增殖。这种损害可能是各种过程的结果，如减少或损害DNA产生、减少或损害病毒蛋白产生、抑制支架组装蛋白、病毒颗粒不完全成熟、所述病毒颗粒无法从宿主细胞排出或进入新的宿主细胞等。

[0141] 用于本发明的合适病毒的代表性实例产生自各种不同的病毒科(例如腺病毒科、乳头瘤病毒科、多瘤病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科、嗜肝DNA病毒科、小核糖核酸病毒科、冠状病毒科、丝状病毒科、副粘病毒科、弹状病毒科、正粘病毒科、沙粒病毒科、布尼亚病毒科、逆转录病毒科、呼肠孤病毒科、细小病毒科、黄病毒科等)。

[0142] 在一个实施方案中，用于所述用途的本发明的非增殖型病毒载体选自痘病毒、腺病毒(Ad)、腺病毒相关病毒(AAV)、水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、Maraba病毒和病毒样颗粒。尽管可以使用野生型或天然病毒(即在自然界中发现)，但在本发明的上下文中优选病毒样颗粒和遗传工程化病毒(即与所述病毒的野生型毒株相比被修饰的病毒，例如通过截短、缺失、取代和/或插入一个或多个在病毒基因组内连续或不连续的核苷酸进行修饰，特别是在病毒复制所需的一个或多个基因中修饰)。修饰可以在内源性病毒基因(例如编码和/或调节序列)内和/或在基因间区域内进行，优选产生修饰的病毒基因产物。可以使用常规分子生物学技术以本领域技术人员已知的多种方式进行修饰。

[0143] 优选地，与没有这种修饰的病毒载体相比，本发明所涵盖的修饰影响例如病毒载体的毒力、毒性或致病性，但至少在允许细胞中不完全抑制新病毒颗粒的感染和产生。所述修饰优选导致缺陷蛋白的合成(或合成不足)，从而不能保证未修饰基因在正常条件下产生的蛋白质的活性。其它合适的修饰包括插入外源基因(即外源是指在天然病毒基因组中未发现)，例如编码至少具有如下文所述的IL-7活性的多肽的核酸分子。

[0144] 用于本发明的特别合适的非增殖型病毒载体得自痘病毒。如本文所用，术语“痘病毒”是指属于痘病毒科(Poxviridae)的病毒，优选针对脊椎动物宿主的脊椎动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae)，其包括几个属，例如正痘病毒属(Orthopoxvirus)、羊痘病毒属(Capripoxvirus)、禽痘病毒(Avipoxvirus)、副痘病毒属(Parapoxvirus)、兔痘病毒属(Leporipoxvirus)和猪痘病毒属(Suipoxvirus)。在本发明的上下文中优选正痘病毒以及禽痘病毒，包括金丝雀痘病毒(例如ALVAC)和鸡痘病毒(例如FP9载体)。各种痘病毒科病毒的基因组序列在本领域中可在专业数据库例如Genbank中获得。例如，痘苗病毒株Western Reserve病毒、Copenhagen病毒、牛痘病毒(Cowpoxvirus)和金丝雀痘病毒(Canarypoxvirus)基因组可在Genbank中获得，登录号分别为NC_006998、M35027、NC_003663、NC_005309。

[0145] 在优选的实施方案中，用于本发明的非增殖型病毒载体属于正痘病毒属，甚至更优选属于痘苗病毒(VV)种。在自然背景下，痘苗病毒是大型、复杂的包膜病毒，具有长度约200kb的线性双链DNA基因组，编码许多病毒酶和因子，使病毒能够独立于宿主细胞机制进行复制。存在两种不同的感染性病毒颗粒，细胞内IMV(细胞内成熟病毒粒子)被单一脂质包膜包围，保留在受感染细胞的胞质中直至裂解，以及双包膜EEV(细胞外包膜病毒粒子)，其从受感染细胞中出芽。任何痘苗病毒株都可用于本发明的上下文中，包括但不限于MVA(改良痘苗病毒安卡拉)、NYVAC、Copenhagen(Cop)、Western Reserve(WR)、Wyeth、Lister、LIVP Tashkent、Tian Tan、Brighton、Ankara、LC16M8、LC16M0毒株等及其任何衍生物。本文使用的基因命名法是Copenhagen痘苗毒株的命名法。除非另有说明，否则本文也将其用于其它

痘病毒科的同源基因。然而，基因命名法可能因痘病毒株而异，但Copenhagen病毒株与其它痘苗病毒株之间的对应关系通常可在文献中找到。

[0146] 工程化的痘病毒可以与旨在提高安全性(例如增加减毒)和/或功效和/或所得病毒的趋向性的修饰一起使用。还可以列举的是缺陷修饰，即在胸苷激酶(J2R;参见Weir和Moss,1983,Genbank登录号AAA48082)、脱氧尿苷三磷酸酶(F2L)、病毒血凝素(A56R)、核糖核苷酸还原酶的小亚单位(F4L)和/或大亚单位(I4L)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(B13R/B14R)、补体4b结合蛋白(C3L)、支架组装蛋白(D13L)以及如K1L、C7L、A39R和B7R-B8R等基因内的缺陷修饰。

[0147] 由于其高度减毒的表型，用于本发明的一种特别合适的非增殖型病毒载体是MVA(Mayr et al.,1975,Infection 3:6-14;Sutter and Moss,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10847-51)。出于示例说明目的，MVA是通过在鸡胚成纤维细胞的连续传代产生的。对其基因组的序列分析表明，通过改变其基因组，它已失去其亲本病毒安卡拉绒毛膜尿囊痘苗病毒(Chorioallantois Vaccinia virus Ankara)的致病性(Antoine et al.,1998,Virol.244:365-96及Genbank登录号U94848)。MVA已安全有效地用于十万多人的天花疫苗接种。所述病毒在人类细胞中的复制潜能有缺陷，但在鸡胚胎细胞中没有。本领域可获得多种细胞系统可用于生产大量病毒，特别是在基于鸡蛋的生产过程中(例如WO2007/147528)。所述MVA也特别适用，因为与非减毒载体相比，其在感染后产生更显著的1型IFN应答，以及文献(Antoine et al.,1998,Virol.244:365-96)及Genbank(登录号U94848)中其基因组序列的可用性。

[0148] 在本发明的上下文中使用的另一种特别合适的非增殖型病毒载体是NYVAC，这也是出于其高度减毒表型的原因(Tartaglia et al.,1992,Virol.188(1):217-32)。出于示例说明目的，NYVAC是一种高度减毒的痘苗病毒株，通过从病毒基因组中精确缺失18个开放阅读框(ORF)而衍生自Copenhagen疫苗株的噬斑克隆分离株。

[0149] 在本发明的上下文中使用的又一种合适的非增殖型病毒载体是工程化为非增殖型的痘苗病毒，特别优选具有D13L缺失的Copenhagen毒株的非增殖型痘苗病毒。

[0150] 用于本发明上下文中的又一种合适的非增殖型病毒载体是腺病毒(Ad)，优选源自人或动物的腺病毒(例如犬、羊、猿等)。可以使用任何血清型。理想地，所述腺病毒载体源自人腺病毒或黑猩猩腺病毒。黑猩猩Ad的代表性实例包括但不限于ChAd3(Peruzzi et al.,2009,Vaccine 27:1293)、ChAd63(Dudareva et al.,2009,Vaccine 27:3501)、AdC6、AdC7(Cervasi et al.,2015,J.of Virology,87(17):9420-9430;Chen et al.,2015,J.of Virology,84(20):10522-10532)、ChAdOx1(Dicks et al.,2012,PLoS One.,7(7):e40385)及本领域所述的任何那些腺病毒(见例如WO03/000283;WO03/046124;WO2005/071093;WO2009/073103;WO2009/073104;WO2009/105084;WO2009/136977和WO2010/086189所述)。优选地，所述使用的非增殖型病毒载体是人腺病毒，优选选自A、B、C、D、E、F和G种，优选B、C和D种。所述人腺病毒优选选自血清型1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15、16、17、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、53、54、55、56和57，更优选选自血清型5、11、26和35。

[0151] 复制缺陷型腺病毒可如本领域所述获得，例如通过缺失腺病毒基因组的至少一个区域或其对病毒复制必不可少的部分，特别优选部分或全部缺失包含E1编码序列的E1区

(E1A和/或E1B)。本发明还包括在腺病毒基因组中具有额外的缺失/修饰的病毒(例如在全部或部分区域,如E3区域的非必需区域,或如E2和E4的必需区域,如Lusky et al.,1998,J.Virol 72:2022;WO94/28152;WO03/104467;Capasso et al.,2014,Viruses,6,832-855;Yamamoto et al.,2017,Cancer Sci 108(2017)831-837所述)。在一个优选的实施方案中,用于本发明的非增殖型病毒载体是E1功能缺陷的人腺病毒5(例如,对于GenBank登录号为M_73260和Chroboczek et al.(1992,Virol.186:280)所述的人Ad5序列而言,缺失从大约459位延伸到3510位或从455位延伸到3512位),以及在E3区域内进一步缺失(例如参考相同Ad5序列缺失从大约28591位延伸到30469位)。

[0152] 具有白介素-7活性的多肽

[0153] 在一个实施方案中,根据本发明使用的非增殖型病毒载体包含编码至少具有IL-7活性的多肽的核酸分子。术语“IL-7”、“IL7”、“白介素-7”或“白介素7”在本文中可互换使用。

[0154] IL-7是一种在适应性免疫系统中具有中心活性的细胞因子(Gao et al.,2015,Int J Mol Sci.;16(5):10267-10280)。它刺激多能造血干细胞分化为淋巴样祖细胞,在淋巴细胞发育的特定阶段发挥重要作用,更具体地说是T系、B系和自然杀伤细胞。IL-7是T细胞发育和扩增以及维持和恢复成熟T细胞稳态所必需的。IL-7通过三种免疫调节途径调节不同发育阶段的T细胞稳态:胸腺分化、外周扩张和胸腺外分化。IL-7还可以驱动T细胞增殖并促进外周幼稚和记忆T细胞的存活。为了再生外周T细胞,IL-7指导胸腺中的T细胞分化和成熟。IL-7在早期B细胞分化中也很重要,因为它促进共同淋巴样祖细胞向B谱系的定型。它还与转录因子协同作用,以调节原-B细胞和早期前-B细胞阶段的免疫球蛋白基因重排。成功重排的细胞随后应答IL-7和其它细胞因子而增殖(Vanloan et al.,2017,J.ImMunol.Res.,Article ID 4807853)。

[0155] 与细胞因子γ链(γc-CD132)家族的其它成员一样,IL-7通过与其独特的α受体IL-7Rα(CD127)和常见的γc受体形成的三元复合物发出信号。这种相互作用刺激Janus激酶(JAK)和信号转导和转录激活因子(STAT)蛋白,随后激活磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/Akt或Src途径以促进靶基因转录。IL-7对这一早期途径的参与最终导致T细胞存活和增殖的增加。所述受体在各种免疫细胞上表达,包括未成熟的B细胞、早期胸腺细胞祖细胞和大多数成熟的T淋巴细胞。更特别地,这种受体在大多数静息人T细胞上持续表达,在幼稚和中央记忆细胞上表达水平高,在T-reg上表达水平低。IL-7R信号转导在指导免疫细胞(包括B、T和自然杀伤细胞)的分化、增殖和存活方面很重要。

[0156] 具有IL-7活性的多肽是指提供天然IL-7的至少一种免疫效应功能的多肽,特别是选自免疫细胞(包括B细胞、T细胞和自然杀伤细胞)分化、增殖、激活和存活等的至少一种免疫功能。具有IL-7活性的多肽的代表性实例包括天然IL-7多肽(例如天然存在的IL-7多肽)、修饰的IL-7多肽(例如修饰的IL-7、包含一个或多个氨基酸修饰的天然存在的IL-7的衍生物、类似物、变体或突变体)、IL-7多肽片段(例如截短的IL-7)、IL-7多肽多聚体(例如二聚体)、IL-7融合多肽,及其类似物,条件是这些多肽保留了大量的IL-7活性(至少50%的野生型对应物活性)。大量的IL-7类似物在本领域中是可用的并且可以在本发明的上下文中使用。特别合适的类似物包含IL-7与Fc结构域的融合(IL-7-Fc),以提高IL-7的稳定性,如Seo et al.,2014J.of Virology 88(16):8998-9009;Choi et al.,2016,Clin Cancer

Res;22(23):5898-5908;和Nam et al.,2010,Eur.J.I mMunol.,40:351-358所述。Fc结构域或片段可结晶片段结构域是免疫球蛋白的尾区,能够与称为Fc受体的细胞表面受体和补体系统的某些蛋白质相互作用。Fc结构域可源自A类(IgA)、D(IgD)、E(IgE)、G(IgG)或M(IgM)类免疫球蛋白。优选地,选择Fc同种型以诱导低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如鼠IgG1、人IgG2)。

[0157] 在一个实施方案中,由用于本文的非增殖型病毒载体编码的IL-7具有促进对象的先天性和/或适应性免疫应答的能力。

[0158] IL-7可源自任何生物体,优选源自鼠科动物(NP_032397和NP_000871)、猿猴(例如G7PC28_MACFA、G7MZL5_MACMU)或人(IL7RA_HUMAN)生物体。

[0159] 人IL-7基因座长度为72kb,位于染色体8q12-13,编码具有177个氨基酸、分子量为20kDa的蛋白质。虽然小鼠IL-7基因的长度为41kb,但其编码的蛋白质具有154个氨基酸,分子量为18kDa。野生型鼠IL-7和人IL-7的一级蛋白质序列在Genbank中分别以登录号NP_032397和NP_000871公开。在天然情况下,IL-7是高度糖基化的,分子量为25kDa。

[0160] 基于本文提供的信息和技术人员的常识,可以通过克隆、PCR或化学合成容易地获得编码IL-7的核酸分子。用于本文的编码IL-7的核酸分子可以是天然的IL-7编码序列(例如cDNA)或其通过突变、缺失、取代和/或加入一个或多个核苷酸衍生自后者的类似物。此外,可以优化编码IL-7的核酸分子以提供蛋白质的高水平表达,和/或改善其持久性和/或延长其在特定宿主细胞或对象中的半衰期,如下文所述。

[0161] 在一个优选的实施方案中,用于所述用途的本发明的非增殖型病毒载体编码选自以下的多肽:鼠IL-7(mIL-7),人IL-7(hIL-7)、与Fc结构域融合的鼠IL-7(mIL-7-Fc),以及与Fc结构域融合的人IL-7(hIL-7-Fc)。优选地,所述鼠IL-7包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%相同性。优选地,所述人IL-7包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%且甚至更优选至少95%相同性。优选地,所述鼠IL-7-Fc包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:3所示氨基酸序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%相同性。优选地,所述人IL-7-Fc包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%相同性。可以通过本领域技术人员熟知的技术优化密码子以改良在鼠或人细胞中的mIL-7、mIL-7-Fc、hIL-7或hIL-7-Fc蛋白质表达。

[0162] IL-7编码核酸分子可以插入非增殖型病毒载体基因组中的任何位置。在MVA基因组的任何缺失I到VII中插入是特别合适的,优先插入在缺失II或缺失III中,后者是优选的。将编码所述鼠或人IL-7或IL-7-Fc的核酸分子置于下文所述的适当调控元件的控制下以允许其在宿主细胞或对象中表达。在E1区的插入特别适合腺病毒,尽管也可以设想在E2区、E3区、E4区或基因间区中的插入。将编码所述鼠或人IL-7或IL-7-Fc的核酸分子置于下文所述的适当调控元件的控制下以允许其在宿主细胞或对象中表达。优选地,编码IL-7或IL-7-Fc的核酸分子以有义方向插入以替代腺病毒E1区。

[0163] 在一个更优选的实施方案中,本发明涉及编码鼠IL-7(例如SEQ ID NO:1)或人IL-7(例如SEQ ID NO:2的)或鼠IL-7-Fc(例如SEQ ID NO:3)或人IL-7-Fc(例如SEQ ID NO:4)的MVA(例如具有如前所述的缺失II或缺失III,优选具有缺失III),其用于治疗由脓毒症、

烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制。

[0164] 其它感兴趣的分子

[0165] 在一个实施方案中，用于所述用途的本发明的非增殖型病毒载体还包含编码至少一种感兴趣的多肽的一种或多种核酸分子。所述感兴趣的多肽的实例包括：细胞因子，集落刺激因子(例如GM-CSF、C-CSF、M-CSF等)，免疫刺激多肽(例如B7.1、B7.2等)，免疫检查点抑制剂(例如抗PD1、抗PD-L1、抗CTLA4等)，一种能够抑制细菌、寄生虫或病毒感染或其发展的多肽(例如，抗原性多肽、抗原性表位、通过竞争抑制天然蛋白质的作用的反式显性变体等)，或本领域公认的可用于治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制的任何其它感兴趣的多肽。

[0166] 编码至少具有IL-7活性的多肽和其它感兴趣的多肽的核酸分子可以置于非增殖型病毒载体基因组的相同或不同位置，例如置于缺失II或在缺失III中。所述核酸分子可以包含在相同或不同的表达盒中。在其包含在同一表达盒中的情况下，所述核酸分子的排列顺序可以是任意的；其也可以通过接头或自切割肽融合。所述核酸分子可以位于相对于所讨论区域的天然转录方向的有义或反义方向。

[0167] 编码IL-7的核酸分子的表达

[0168] 如前所述，为了在特定宿主细胞或对象中提供高水平表达，可以优化待插入用于本文所述用途的非增殖型病毒载体基因组中的IL-7编码核酸分子。确实已经观察到生物体的密码子使用模式是高度非随机的，并且密码子的使用在不同基因、细胞和宿主之间可能明显不同。因此，核酸可能具有不适合在高等真核细胞(例如人)中有效表达的密码子使用模式。通常，密码子优化是通过用一个或多个编码更频繁使用的相同氨基酸的密码子置换对应于感兴趣的宿主生物体中不常使用的密码子的一个或多个“天然”密码子来进行的。没有必要置换对应于不常用密码子的所有天然密码子，因为即使部分替换也可以实现增加的表达。

[0169] 进一步优化密码子使用，可通过核酸序列的其它修饰进一步改善在宿主细胞或对象中的表达。例如，防止稀有、非最佳密码子聚集在集中区域和/或抑制或修饰预期对表达水平产生负面影响的“负面”序列元件可能是有利的。这样的负面序列元件包括但不限于具有非常高(>80％)或非常低(<30％)GC含量的区域；富含AT或富含GC的序列节段；不稳定的正向或反向重复序列；和/或内部隐秘调控元件，例如内部TATA盒、chi位点、核糖体进入位点，和/或剪接供体/受体位点。

[0170] 根据本发明，使用的非增殖型病毒载体包含在宿主细胞或对象中表达具有IL-7活性的多肽所必需的调控元件。术语“调控元件”或“调节序列”是指允许、有助于或调节在给定宿主细胞或对象中表达的任何元件。调控元件被排列成使得其为其预期目的而协同作用，例如，对于启动子，以在允许的宿主细胞中实现核酸分子从所述核酸分子的转录起始到终止子的转录。在一个优选的实施方案中，用于本发明的非增殖型病毒载体包含一个或多个表达盒，每个表达盒包含位于核酸分子(例如编码具有IL-7活性的多肽)5’端的至少一个启动子和位于所述核酸分子3’端的一个聚腺苷酸化序列。

[0171] 本领域技术人员应理解，调节序列的选择可取决于诸如核酸分子本身、其插入之中的非增殖型病毒载体、待治疗的宿主细胞或对象、所需的表达水平等因素。启动子特别重要。在本发明的上下文中，启动子可以是在许多类型宿主细胞中指导编码产物(例如具有

IL-7、mIL-7、hIL-7、mIL-7-Fc、hIL-7-Fc活性的多肽)表达的组成型启动子,或特异于某些宿主细胞的启动子(例如肝特异性调节序列),或应答特定事件或外源因素(例如通过温度、营养添加剂、激素等)而调节的启动子或根据病毒周期的阶段的启动子(例如晚期或早期)。还可以使用在应答特定事件或外源因素的生产步骤期间被抑制的启动子,以优化病毒载体生产并避免所表达的多肽在产生细胞中的潜在毒性。

[0172] 本领域已知的各种启动子可用于本发明的上下文中。痘苗病毒启动子特别适用于非增殖型痘病毒载体(例如MVA)。代表性实例包括但不限于痘苗病毒p7.5K、pH5R、p11K7.5(Erbs et al.,2008,Cancer Gene Ther.15(1):18-28)、TK、p28、p11、B2R、pF17R、pA14L、pSE/L、A35R和K1L启动子,合成启动子,如Chakrabarti et al.(1997,Biotechniques 23:1094-7;Ha mMond et al,1997,J.Virol Methods66:135-8;和Kumar and Boyle,1990,Virology 179:151-8)所述那些启动子,以及早期/晚期嵌合启动子。可以使用其它启动子,选自巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子(US 5,168,062)、双向CMV启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、腺病毒主要晚期(MLP)启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子(Adra et al.,1987,Gene 60:65-74)、EF1α、单纯疱疹病毒(HSV)-1的胸苷激酶(TK)启动子、T7聚合酶启动子(WO98/10088)和诱导型启动子(例如其转录活性受乙醇、四环素、类固醇、金属、糖等存在与否调节的启动子)。CMV启动子特别适用于非增殖型腺病毒载体(例如Ad5、Ad11、Ad26、Ad35)。

[0173] 根据待表达的核酸分子的数量,所用的非增殖型病毒载体可以含有一个或多个启动子。优选地,当病毒载体编码具有IL-7活性的多肽和另一种感兴趣的分子时,每个编码核酸分子都置于单独的启动子控制之下。或者,可以使用双向启动子。在一个优选的实施方案中,编码具有IL-7活性的多肽的核酸分子被置于pH5R启动子的控制之下。

[0174] 本领域技术人员将理解,控制核酸表达的调控元件可进一步包含其它元件,用于正确起始、调节和/或终止转录(例如转录终止序列),mRNA转运(例如核定位信号序列、聚腺苷酸化序列),加工(例如剪接信号、自切割肽如T2A、P2A、E2A、F2A、接头),稳定性(例如,内含子,如16S/19S或嵌合人β珠蛋白/IgG,以及非编码5'和3'序列),翻译(例如起始子Met、三联前导序列、IRES核糖体结合位点、信号肽等),靶向序列,接头(例如由甘氨酸和丝氨酸等柔性残基组成的接头),转运序列,分泌信号,以及参与复制或整合的序列。所述序列在文献中已有报道,且可由本领域技术人员很容易获得。

[0175] 非增殖型病毒载体的产生和产生细胞

[0176] 一旦产生,可使用常规技术产生/扩增用于本文的非增殖型病毒载体。

[0177] 通常,这种病毒载体通过包括以下步骤的方法产生,(a)将病毒载体引入合适的产生细胞系,(b)在合适的条件下培养所述细胞系以允许产生/扩增所述病毒载体,(c)从所述细胞系的培养物中回收产生的病毒载体,和(d)任选地纯化所述回收的病毒载体。

[0178] 产生细胞的选择取决于待扩增的非增殖型病毒载体的类型。例如,MVA严格受限于宿主,通常在禽类细胞上扩增,即原代禽类细胞(如从得自受精卵的鸡胚制备的鸡胚成纤维细胞(CEF))或无限增殖化的禽类细胞系。用于MVA生产的合适禽细胞系的代表性实例包括但不限于用鸭TERT基因无限增殖化的疣鼻栖鸭(Cairina moschata)细胞系(参见例如WO2007/077256、WO2009/004016、WO2010/130756和WO2012/001075);用病毒和/或细胞基因组合无限增殖化的禽细胞系(参见例如WO2005/042728),自发无限增殖化的细胞(例如US5,

879,924中公开的鸡DF1细胞系),或通过渐进分离自生长因子和饲养层从胚胎细胞衍生的无限增殖化细胞(例如WO2005/007840和WO2008/129058中公开的Ebx鸡细胞系,例如Olivier et al.,2010,mAbs 2(4):405-15中描述的Eb66)。

[0179] 对于其它痘苗病毒或其它痘病毒株,除了禽类原代细胞(如CEF)和禽类细胞系外,还有许多其它非禽类细胞系可供生产,包括人细胞系,如HeLa(ATCC-CRM-CCL-2™或ATCC-CCL-2.2™),MRC-5,HEK-293;仓鼠细胞系,例如BHK-21(ATCC CCL-10)和Vero细胞。在优选的实施方案中,非MVA痘苗病毒在HeLa细胞中扩增(参见例如WO2010/130753)。

[0180] 对于腺病毒,更特别是对于E1缺失的腺病毒载体,合适的细胞系包括293细胞(Graham et al.,1997,J.Gen.Virol.36:59-72)以及PER-C6细胞和HER96(例如Fallaux et al.,1998,Human Gene Ther.9:1909-1917;WO97/00326),或这些细胞系的任何衍生物。但是本领域描述的任何其它细胞系也可用于本发明的上下文中,尤其是用于生产供人使用的产品的任何细胞系,例如Vero细胞、HeLa细胞和禽细胞。这种细胞可以调适为表达缺陷病毒所缺乏的E1基因。

[0181] 可以在传统的发酵生物反应器、培养瓶和培养皿中培养产生细胞。培养可以在适合给定宿主细胞的温度、pH和氧含量下进行。此处将不尝试详细描述各种原核和真核宿主细胞以及已知用于生产用于本发明的非增殖病毒载体的方法。产生细胞优选在不含动物或人源产物的培养基中培养,使用不含动物或人源产物的化学定义的培养基。特别地,虽然可能存在生长因子,但其优选是重组产生而不是从动物材料中纯化。根据所选的产生细胞,本领域技术人员可以容易地选择合适的无动物源培养基。这样的培养基是可商购的。特别地,当CEF用作产生细胞时,可以将其在VP-SFM细胞培养基(Invitrogen)中培养。在感染前,将产生细胞优选在30℃和38℃之间(更优选在约37℃)的温度下培养1到8天(对于CEF优选培养1到5天,对于无限增殖化细胞优选培养2到7天)。如果需要,可以进行1至8天的数次传代以增加细胞总数。

[0182] 用于本发明的非增殖型病毒载体感染产生细胞系是在适当的条件下进行的(特别是使用适当的感染复数(MOI))以允许产生细胞的产生性感染。

[0183] 然后在本领域技术人员熟知的适当条件下培养感染的产生细胞,直到产生子代病毒载体。受感染的产生细胞的培养也优选在不含动物或人源产物的培养基(其与用于产生细胞培养和/或感染步骤的培养基可以相同或不同)中在30℃至37℃的温度下培养1至5天(使用化学定义的培养基,不含动物或人类来源的产物)。

[0184] 可从培养物上清液和/或产生细胞系中收集用于本发明的非增殖型病毒载体。所述细胞培养上清液和产生细胞可以合并或单独收集。从产生细胞(以及任选也从培养物上清液)中回收可能需要使得产生细胞膜破坏以允许病毒载体释放的步骤。本领域技术人员可使用多种技术,包括但不限于冷冻/解冻、低渗裂解、超声治疗、微流化或高速均质化等技术。根据优选的实施方案,产生的病毒载体的回收步骤包括裂解步骤,其中产生细胞膜被破坏,优选地通过使用高速均质器进行。高速均质器可商购自Silverson Machines lnc(East Longmeadow,USA)或Ika-Labotechnik(Staufen,Germany)。根据特别优选的实施方案,所述高速均质器是SILVERSON L4R。

[0185] 然后可以使用本领域熟知的纯化步骤进一步纯化用于本发明的非增殖型病毒载体。可以设想各种纯化步骤,包括澄清、酶治疗(例如核酸内切酶、蛋白酶等)、层析和过滤步

骤。适当的方法在本领域中有描述(例如WO2007/147528;WO2008/138533、WO2009/100521、WO2010/130753、WO2013/022764所述)。在优选的实施方案中,纯化步骤包括切向流过滤(TFF)步骤,其可用于将病毒与其它生物分子分离,以浓缩和/或脱盐病毒悬液。根据待过滤的体积,本领域可利用各种TFF系统和设备,包括但不限于Spectru mLabs、Pall Corp、PendoTech和New Pellicon等。

[0186] 然后可以通过本领域已知的任何方法保护用于本发明的非增殖型病毒载体,以延长病毒载体在对象血液循环中的持久性。所述方法包括但不限于聚乙二醇化等化学防护(Tesfay et al.,2013,J.of Virology,87(7):3752-3759;N'Guyen et al.,2016,Molecular Therapy Oncolytics,3,15021)、病毒栓塞术(viroembolization)(WO2017/037523)等。

[0187] 宿主细胞

[0188] 另一方面,本发明还涉及包含用于本发明的非增殖型病毒载体的宿主细胞。这种宿主细胞包括上述产生细胞。

[0189] 病毒组合物

[0190] 本发明还涉及用于在怀疑患有或鉴定为患有免疫抑制的对象中治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导(即由本文列举的任何一种免疫抑制诱导剂或其任何组合诱导)的这种免疫抑制的组合物,其中所述组合物包含至少治疗有效量的如本文所述的或根据本文所述方法制备的非增殖型病毒载体。优选地,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0191] "治疗有效量"对应于足以产生一种或多种有益结果的非增殖型病毒载体的量。这样的治疗有效量可以作为各种参数的函数而变化,例如施用方式、疾病状态、对象的年龄和体重、对象对治疗的反应能力、同时治疗的种类和/或治疗频率。病毒载体的合适剂量可由从业者根据相关情况常规确定。适当地,所述病毒载体的个体剂量可在约10^3至约10^{12}vp(病毒颗粒)、iu(感染单位)或pfu(噬菌斑形成单位)的范围内变化,这取决于病毒载体的类型和所使用的定量技术。样品中存在的病毒载体的量可以通过常规滴定技术来确定,例如通过计数允许细胞(例如BHK-21、CEF或HEK-293)感染后的噬斑数量(pfu效价)、免疫染色定量免疫荧光(例如使用抗病毒抗体)(iu效价)、HPLC(vp效价)确定。出于示例说明的目的,非增殖性痘病毒载体的合适剂量包括在约10^6pfu和约10^{12}pfu之间、更优选在约10^7pfu和约10^{11}pfu之间的剂量;甚至更优选约10^8pfu至约10^{10}pfu(例如5×10^8至6×10^9、6×10^8至5×10^9、7×10^8至4×10^9、8×10^8至3×10^9、9×10^8至2×10^9pfu)的剂量便于人类使用,个体剂量优选包含大约10^9pfu的痘病毒载体。仍出于示例说明的目的,非繁殖性腺病毒载体的合适剂量包含在约10^6和约10^{14}vp之间,优选在约10^7和约10^{13}vp之间,更优选在约10^8和约10^{12}vp之间,并且甚至更优选在约10^9和约10^{11}vp之间(例如10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、10^{11}vp的剂量)。

[0192] 术语"药学上可接受的载体"旨在包括与在哺乳动物特别是人类对象中施用相容的任何和所有载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、吸收剂等。

[0193] 用于本文的非增殖型病毒载体可以独立地置于适合人或动物使用的溶剂或稀释

剂中。所述溶剂或稀释剂优选是等渗、低渗或弱高渗的并且具有相对低的离子强度。代表性的实例包括无菌水、生理盐水(例如氯化钠)、Ringer's溶液、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、Hank's溶液和其它生理平衡盐水溶液(例如参见最新版的Remington:The Science and Practice of Pharmacy,A.Gennaro,Lippincott,Williams&Wilkins)。

[0194] 在其它实施方案中,所述病毒组合物经适当缓冲以供人类使用。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液(例如PBS)、碳酸氢盐缓冲液和/或Tris缓冲液,其能够维持生理或弱碱性pH(例如从约pH 7到约pH 9)。

[0195] 所述组合物还可以含有其它药学上可接受的赋形剂,以提供所需的药学或药效学性质,包括例如渗透压、粘度、透明度、颜色、无菌性、稳定性、所述制剂的溶解速率、修改或维持释放或吸收到人或动物对象中,促进运输穿过血液屏障或渗透到特定器官。

[0196] 在进一步的实施方案中,所述组合物可以与可溶佐剂组合,所述佐剂包括但不限于明矾、矿物油乳剂和相关化合物例如WO2007/147529中描述的那些、多糖例如Adjuvax和角鲨烯、水包油乳剂例如MF59、双链RNA类似物例如聚(I:C)、单链磷酸胞嘧啶鸟苷寡脱氧核苷酸(CpG)(Chu et al.,1997,J.Exp.Med.,186:1623;Tritel et al.,2003,J.I mMunol.,171:2358)及阳离子肽如IC-31(Kritsch et al.,2005,J.Chromatogr.Anal.Technol.Biomed.Life Sci.,822:263-70)。

[0197] 在一个实施方案中,可以以改良其稳定性为目标来配制所述组合物,特别是在制备和在冷冻(例如-70℃、-20℃)、冷藏(例如4℃)或环境温度下长期储存条件下的稳定性(即至少6个月,优选至少两年)。本领域可获得冷冻、液体形式或冻干形式的各种病毒制剂(例如WO98/02522、WO01/66137、WO03/053463、WO2007/056847和WO2008/114021等所述)。冻干组合物通常通过涉及真空干燥和冷冻干燥的方法获得。出于示例说明目的,包含NaCl和/或糖的缓冲制剂特别调适用于保存病毒(例如S01缓冲液:342.3g/L蔗糖、10mM Tris、1mM $MgCl_2$、150mM NaCl、54mg/L Tween 80;ARME缓冲液:20mM TRIS,25mM NaCl,2.5%甘油(w/v),pH 8.0)。

[0198] 施用

[0199] 根据本发明用于所述用途的非增殖型病毒载体或组合物可以单剂量或多剂量施用。如果考虑多次施用,可以通过相同或不同的途径施用并且可以发生在相同部位或不同部位并且可以包含以指定间隔的相同或不同的剂量。每次施用之间的间隔可以是数小时至8周(例如24小时、48小时、72小时、每周、每2或3周、每月等)。间隔也可以是不规则的。也可以通过在休息期后重复的顺序施用周期进行(例如,每周3至6次或每两周一次施用的周期,然后是3至6周的休息期)。每次施用的剂量可在上述范围内变化。

[0200] 任何常规施用途径都适用于本发明的上下文,包括经肠胃外、局部或粘膜施用途径。肠胃外途径旨在作为注射或输注施用,包括全身和局部途径。局部施用仅限于身体的局部区域(例如腹膜内或胸膜内施用)。常见的肠胃外注射类型是静脉内(进入静脉)、动脉内(进入动脉)、皮内(进入真皮)、皮下(在皮肤下)和肌内(进入肌肉)注射。输注通常通过静脉内途径进行。可以使用透皮方式(例如贴剂等)进行局部施用。粘膜施用包括但不限于经口腔/消化道、鼻内、气管内、肺内、阴道内或直肠内途径。在一个优选的实施方案中,所用组合物通过肠胃外途径施用,更优选通过静脉内、皮下或肌内途径,甚至更优选通过静脉内途径施用。在另一个实施方案中,所述组合物通过粘膜施用,优选通过鼻内或肺内途径施用。

[0201] 施用可以使用常规注射器和针头(例如Quadrafuse注射针头)或本领域可用的能够促进或改进所述病毒载体或组合物在对象中的递送的任何化合物或装置进行。

[0202] 出于示例说明的目的,合适的组合物包含10^8pfu至10^{10}pfu(例如约10^9pfu)的个体病毒剂量的编码人IL-7-Fc的MVA,优选地通过静脉内途径用于有此需要的对象(例如患有脓毒症引起的免疫抑制的对象)。

[0203] 用途和方法

[0204] 本发明提供了一种如本文所述的非增殖型病毒载体或组合物,用于在有此需要的对象中治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导(即由本文列举的任何一种免疫抑制诱导剂或其任何组合诱导)的免疫抑制。本发明还提供了一种治疗方法,包括以足以治疗所述免疫抑制的量施用如本文所述的病毒载体或组合物。

[0205] 术语“免疫抑制(immune depression)”、“免疫抑制(immunodepression)”、“免疫抑制(immune suppression)”、“免疫抑制(immunosuppression)”、“免疫麻痹(immune paralysis)”或“免疫麻痹(immunoparalysis)”可以互换使用。它们指的是免疫应答暂时或永久功能障碍的状态。它们还指机体免疫系统无法有效工作,无法抵抗感染和其它疾病。免疫系统的失能可能是部分的或完全的。

[0206] 脓毒症是由于宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍。脓毒症诱导的免疫抑制可能会伴随一段超免疫应答,包括急剧增加的细胞因子产生。所述免疫抑制的状态是危及生命的,因为免疫防御在很大程度上不起作用。

[0207] 烧伤是由于接触干热(例如火)、湿热(例如蒸汽或液体)、化学品、电、闪电或辐射而导致的组织损伤。

[0208] 创伤是由外在因素引起的活组织损伤。大手术是进行更广泛切除的任何侵入性手术程序(例如进入体腔、移除器官、改变正常解剖结构)。一般来说,如果间充质屏障被打开(胸膜腔、腹膜、脑膜),则该手术就被认为是大手术。

[0209] 衰老是发生在所有物种中的变老过程,其特征是新陈代谢逐渐减慢和组织分解,通常伴随内分泌变化。

[0210] 冠状病毒会引起不同的冠状病毒疾病,包括严重急性呼吸系统综合症(SARS)、中东呼吸系统综合症(MERS)和2019冠状病毒病(COVID-19)。已鉴定的冠状病毒包括SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV2、229E、NL63、OC43和HKU1。

[0211] 由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制显示出重要的相似性,例如创伤和脓毒症中单核细胞增多和单核细胞表面低HLA-DR的诱导(Heftrig et al.,2017,Mediat Infla mM,文章ID 2608349,第12页),在衰老期间和手术或创伤后促炎细胞因子(例如TNFα、IL-6和IL-8)的大量产生(Jia et al.,2019,Eur J Trauma Emerg S,https://doi.org/10.1007/s00068-019-01271-6;Kovac et al.,2005,Exp Gerontol.,40(7):549-55),或者脓毒症、烧伤或创伤患者血浆中IL-10水平持续升高(Thomson et al.,2019,Military Medical Research,6:11)以及创伤和新冠病毒患者中影响所有淋巴细胞亚群的严重淋巴细胞减少症、mHLA-DR降低和血浆细胞因子水平适度升高,同时表现出炎症(IL-6)和免疫抑制(IL-10)应答(Monneret et al.,2020,Intensive Care Med,https://doi.org/10.1007/s00134-020-06123-1)。

[0212] 更一般地说,由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制

可以是特征在于免疫细胞凋亡和/或抑制淋巴细胞和巨噬细胞并抑制促炎细胞因子产生的高水平抗炎细胞因子,和/或高水平的调节性T细胞和/或骨髓来源的抑制细胞(MDSC)和/或抑制性分子(例如PD-1、PD-L1、CTLA4)。

[0213] 免疫抑制也可以得自在由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制期间发生的继发感染(例如院内感染)。非限制性地,所述感染可能由以下原因引起:

[0214] -细菌(例如不动杆菌属(Acinetobacter spp.)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、大肠杆菌(Escherichia coli)、克雷伯氏菌属(Klebsiella spp.)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、肠球菌属(Enterococcus spp.)、军团菌属(Legionella spp.));

[0215] -病毒(例如乙型肝炎和丙型肝炎病毒、流感病毒、HIV、轮状病毒、单纯疱疹病毒);

[0216] -真菌(例如念珠菌属(Candida spp.)、曲霉属(Aspergillus spp.)、镰刀菌属(Fusarium spp.)、毛霉菌属(Mucorales spp.)、赛多孢菌属(Scedosporium spp.).

[0217] 优选地,本发明提供编码至少具有IL-7活性的多肽的非增殖型病毒载体或包含所述病毒载体的组合物,用于治疗脓毒症诱导的免疫抑制。

[0218] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种编码至少具有IL-7活性的多肽的非增殖型病毒载体或包含所述病毒载体的组合物,用于治疗由SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV2、229E、NL63、OC43或HKU1诱导的免疫抑制。

[0219] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种编码至少具有IL-7活性的多肽的非增殖型病毒载体或包含所述病毒载体的组合物,用于治疗由创伤(例如多发性创伤、髋部骨折)、大手术和衰老诱导的免疫抑制。

[0220] 在一个实施方案中,所述非增殖型病毒载体或其组合物在由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制阶段开始后的4小时至6年内施用。在一个实施方案中,用于治疗免疫抑制的组合物在早期施用,优选在免疫抑制阶段开始后的第一个月内施用,例如在免疫抑制阶段开始之后的第28天、21天、14天、7天、6天、5天、4天、3天、2天,甚至前24小时内(例如4、6、8、12、16、20小时)施用。在另一个实施方案中,用于治疗免疫抑制的组合物在免疫抑制阶段开始后约1个月至约6个月的时间段内(例如180天、150天、120天、100天、90天、80天、70天、60天、50天、40天、35天、30天或29天)施用。在另一个实施方案中,用于治疗免疫抑制的组合物在免疫抑制阶段开始后的较晚阶段施用,优选在免疫抑制阶段开始后的6个月至6年内施用(例如6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年)。还可以考虑在由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒诱导的免疫抑制的不同阶段施用所述组合物的任何组合。出于示例说明的目的,合适的方案可以包括在免疫抑制阶段开始后的第一个月内的早期阶段的一次或多次施用,以及在免疫抑制阶段开始后的1个月至6个月内或6个月至6年内的后期阶段的一次或多次施用,或均在免疫抑制阶段开始后1个月至6个月内或6个月至6年内施用。

[0221] 优选地,在脓毒症诱导的免疫抑制阶段开始后4小时至6年的时间内施用所述非增殖型病毒载体或其组合物。在一个实施方案中,用于治疗由脓毒症诱导的免疫抑制的组合物在早期施用,优选在免疫抑制阶段开始后的第一个月内施用,例如在免疫抑制阶段开始

之后在28天、21天、14天、7天、6天、5天、4天、3天、2天，甚至前24小时内(例如4、6、8、12、16、20小时)施用。在另一个实施方案中，用于治疗脓毒症诱导的免疫抑制的组合物在免疫抑制阶段开始后约1个月至约6个月的时间段内(例如180天、150天、120天、100天、90天、80天、70天、60天、50天、40天、35天、30天或29天)施用。在又一个实施方案中，用于治疗由脓毒症诱导的免疫抑制的组合物在免疫抑制阶段开始后的后期阶段施用，优选在免疫抑制阶段开始后在6个月至6年内(例如6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年)施用。还可以考虑在脓毒症诱导的免疫抑制的不同阶段施用所述组合物的任何组合。出于示例说明的目的，合适的方案可以包括在免疫抑制阶段开始后的第一个月内的早期阶段的一次或多次施用，以及在免疫抑制阶段开始后在1个月至6个月内或6个月至6年内的后期阶段一次或多次施用，或者均在脓毒症诱导的免疫抑制阶段开始后1个月至6个月内或6个月至6年内施用。

[0222] 在一个优选的实施方案中，所述非增殖型病毒载体或组合物的使用包括在免疫抑制阶段开始后施用所述病毒载体或组合物1至10次，优选在免疫抑制阶段开始后施用1至5次，更优选在免疫抑制阶段开始后施用1至3次，甚至更优选在免疫抑制阶段开始后施用1次。在一个更优选的实施方案中，所述一次或多次施用是通过静脉内、皮下或肌内注射施用所述非增殖型病毒载体或其组合物。

[0223] 如本文所述或本发明的方法使用的非增殖型病毒载体或组合物提供的有益效果可以通过临床状态相对于基线状态的改善或者相对于如果不根据本文描述的方式治疗的预期结果的改善加以证实。临床状态的改善可以由医生和熟练医护人员通过通常使用的任何相关临床测量以及通过实验室常规使用的技术容易地评估。所述临床有益效果也可以通过适当的测量来证实，例如血液测试、生物体液分析，例如使用各种可用的抗体来识别参与免疫应答的不同免疫细胞群。这种测量是在医学实验室和医院中进行常规评估，并且大量试剂盒可商购。所述测量可以在施用前(基线)以及治疗期间和治疗停止后的不同时间点进行。在本发明的上下文中，所述临床有益效果可以但不限于与功能性先天免疫和/或适应性免疫的增加、与免疫相关的至少一种类型的细胞水平的增加、至少一种与免疫相关的激活的细胞的水平增加，以及免疫稳态恢复相关(Takeyama et al.,2004,Critical Care 20048(Suppl1):P207)。与免疫相关的细胞包括但不限于CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞。

[0224] 在本发明的上下文中，所述治疗益处可以是短暂的(停止施用后持续一天或数天、数周或数月)或持续的(数月或数年)。由于临床状态的自然过程可能因对象而异，因此不需要在每个接受治疗的对象中观察到治疗益处，但在相当数量的对象中应观察到治疗益处(例如，两组之间的统计学显著差异可以通过本领域已知的任何统计学检验确定，如Tukey参数检验、Kruskal-Wallis检验、根据Mann和Whitney的U检验、Student's t-检验、Wilcoxon检验等)。

[0225] 在一个实施方案中，本文所述的非增殖型病毒载体或组合物的特别合适的用途是与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比，在治疗的对象的血液循环中提供增加浓度的具有IL-7活性的多肽(例如hIL-7-Fc)。

[0226] 在一个特定实施方案中，所述有益效果可与以下一项或多项相关：

[0227] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比，施用所述非增殖型病毒

载体或组合物的对象的功能性先天和/或适应性免疫增加;和/或

[0228] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中选自以下的免疫相关的至少一种类型的细胞水平的增加:CD4 T细胞(例如幼稚CD4 T细胞、CD4+效应记忆细胞、CD4+中央记忆细胞、CD4+急性效应记忆细胞等),CD8 T细胞(例如幼稚CD8 T细胞、CD8+效应记忆细胞、CD8+中央记忆细胞、CD8+急性效应记忆细胞等)、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞和中性粒细胞。优选地,所述用途增加优选至少2种、更优选至少3种、更优选至少4种与免疫相关的细胞的水平;和/或

[0229] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,在施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中与选自以下的至少一种类型的免疫相关的至少一种类型的细胞的激活状态增加(导致与至少一种类型的免疫相关的激活的细胞的数量和/或百分比增加):激活的CD4细胞,激活的CD8 T细胞、激活的B细胞和激活的NK细胞。优选地,所述用途增加优选至少2种、更优选至少3种、更优选至少4种免疫相关细胞的激活状态;和/或

[0230] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物或施用IL-7蛋白的对象相比,肺中细胞水平的增加,更特别是选自CD4 T细胞、CD8 T细胞和NK细胞的免疫相关的至少一种类型的细胞的水平增加;和/或

[0231] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象或施用IL-7蛋白治疗的对象相比,施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象的肺中与至少一种类型的免疫相关的至少一种类型的细胞的激活状态增加(导致与至少一种类型的免疫相关的激活的细胞的数量和/或百分比增加),所述细胞选自激活的CD4 T细胞、激活的CD8 T细胞和激活的NK细胞;和/或与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,在施用所述非增殖病毒载体或组合物的对象中选自IFNγ、TNFα、IL-6和IL-1β的至少一种类型的细胞因子水平的增加;和/或

[0232] -与未施用所述非增殖病毒载体或组合物的对象相比,在施用所述非增殖病毒载体或组合物的对象中脾和/或血液CD4 T细胞、脾和/或血液CD8 T细胞和/或胸腺细胞上的Bcl2基因表达增加;和/或

[0233] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,在施用所述非增殖病毒载体或组合物的对象中血液和/或脾和/或胸腺内CD4+和CD8+双阳性细胞百分比的降低及CD4+和CD8+单一阳性细胞百分比的增加;和/或

[0234] -与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象或用IL-7蛋白治疗的对象相比,用所述非增殖型病毒载体或组合物治疗的对象的存活增加。

[0235] 在又一个实施方案中,如本文所述的非增殖型病毒载体或组合物用于治疗免疫抑制的对象,所述对象展示与免疫相关的细胞水平降低和/或与免疫相关的激活的细胞水平降低的一种或多种生物标志物。在一个优选的实施方案中,所述一种或多种生物标志物选自循环单核细胞上的HLA-DR表达、循环IL-10、绝对CD3 T细胞计数、包括调节性T细胞在内的一些免疫抑制淋巴细胞亚群测量,以及如PD-1、PD-L1、CTLA-4、Lag-3和BTLA等抑制性受体的表达。

[0236] 在一个实施方案中,与未施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象相比,本文所述的非增殖型病毒载体或组合物用于在施用所述非增殖型病毒载体或组合物的对象中增加功能性先天和/或适应性免疫系统。在一个优选的实施方案中,所述非增殖型病毒载体

或组合物用于提高与先天免疫相关的至少一种类型的细胞的水平和/或与先天免疫相关的至少一种类型的激活的或成熟细胞的水平，所述细胞优选选自NK细胞和单核细胞。在另一个优选的实施方案中，所述非增殖型病毒载体或组合物用于增加与适应性免疫相关的至少一种类型的细胞的水平和/或与适应性免疫相关的至少一种类型的激活的细胞的水平，所述细胞优选选自CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞和NK细胞。对于一般指导，功能性先天免疫和/或适应性免疫的增加可以常规评估，例如通过分析生物体液或通过使用实施例部分中描述的合适抗体的标记物进行评估。

[0237] 本发明还涉及一种在有此需要的对象中治疗由脓毒症、烧伤、创伤、大手术、衰老和/或冠状病毒引起的免疫抑制的方法，包括一次或多次施用本文所述的或根据本文所述方法制备的非增殖型病毒载体或组合物。

[0238] 组合疗法

[0239] 在本发明的任何实施方案中，根据本发明用于所述用途的非增殖型病毒载体或其组合物可以单独施用或与可用于治疗免疫抑制的任何常规治疗方式联合施用。例如，所述病毒载体或组合物可与免疫治疗产品结合使用。代表性的实例包括免疫检查点调节剂，影响细胞表面受体调节的药剂，例如阻断表皮生长因子受体的单克隆抗体、阻断血管内皮生长因子的单克隆抗体和TLR激动剂(例如TLR9激动剂、TLR4激动剂)。适用于本发明的这种免疫治疗产品的其它代表性实例是表达载体(例如质粒DNA载体、痘苗病毒、腺病毒、慢病毒、疱疹病毒等)、重组多肽和非肽佐剂等。

[0240] 所有上文引用的专利、出版物和数据库条目的公开内容通过引用整体并入本文。本发明的其它特征、目的和优点从说明书、附图和权利要求中将显而易见。结合以下实施例来说明本发明的优选实施方案。然而，根据本公开，本领域技术人员应当理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可以对所公开的具体实施方案进行改变。

实施例

[0241] 1.材料和方法

[0242] 下面描述的构建是根据Maniatis等人详述的通用基因工程和分子克隆技术进行的(1989年，Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor NY或后续版本)或者当使用商业试剂盒时根据供应商的建议进行。PCR扩增技术是本领域技术人员已知的(参见例如PCR protocols-Aguide to methods and applications，1990，由Innis，Gelfand，Sninsky and White，Academic Press出版)。

[0243] 1.1载体构建

[0244] 1.1.1 MVATG18897

[0245] 下文描述的MVATG18897(也被命名为MVA-hIL-7-Fc)被工程化为在pH5R启动子控制下表达与人IgG2的Fc序列(SEQ ID NO:4)融合的人白介素-7。

[0246] 通过合成方式产生含有pH5R启动子和融合IL-7-Fc的DNA片段，该DNA片段被与痘苗病毒转移质粒同源的约40bp序列围绕，并插入质粒15ABXMTP_IL-7中。在用PsiI和ScaI限制该质粒后，通过In-Fusion克隆(In-Fusion HD克隆试剂盒，Clontech)将该片段插入由NotI和BglII消化的痘苗病毒转移质粒pTG18626中，产生pTG18897。

[0247] MVA转移质粒pTG18626被设计为允许在MVA基因组的缺失III中插入要通过同源重

组转移的核苷酸序列。它起源于质粒pUC18,其中克隆了围绕MVA缺失III的侧翼序列(BRG3和BRD3)(Sutter and Moss,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10847)。

[0248] 使用含有编码mCherry荧光蛋白的基因的亲本MVA进行同源重组,使其进入缺失III(MVA mCherry)。MVAmCherry的优点是区分由成功整合表达盒的重组病毒感染的细胞与由最初的起始MVA mCherry病毒(亲本病毒)感染的细胞。事实上,如果所述表达盒成功重组在缺失III中,则mCherry基因被移除,病毒噬斑显示为白色。

[0249] MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)是通过使用MVA-mCherry作为亲本病毒和转移质粒pTG18897通过同源重组在鸡胚成纤维细胞(CEF)上产生的。CEF分离自12日龄无特定病原体(SPF)胚胎卵(Charles River)。胚胎被机械撕开,溶解在Tryple Select溶液(Invitrogen)中,并在补加5% FCS(Gibco)和2mM L-谷氨酰胺的MBE(Eagle Based Medium;Gibco)中培养分离的细胞。

[0250] 转移质粒pTG18897和亲本MVA-mCherry之间的同源重组能够产生重组痘苗病毒,这些病毒失去mCherry表达盒并获得IL-7-Fc表达盒,选择是通过分离白色非荧光噬斑进行。

[0251] 将MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的病毒原液在两个F175烧瓶中的CEF上进行扩增,以生成适当的病毒原液。将病毒原液在DF1细胞上滴定,感染效价以pfu/mL表示。使用适当的引物对通过PCR分析该原液以验证表达盒和重组臂的完整性。还通过表达盒的测序分析了原液。测序结果比对显示与理论预期序列具有100%的同源性。如果需要,使用常规技术纯化病毒制备物。简而言之,病毒扩增是在37℃、5% CO_2条件下进行72小时。然后将感染的细胞和培养基沉淀并冷冻。使用高速均质器(SILVERSON L4R)破坏粗收获物并进行纯化过程(例如WO2007/147528中所述)。简而言之,裂解的病毒制备物可以通过过滤澄清,并通过切向流过滤(TFF)步骤进行纯化。将纯化的病毒重悬于合适的病毒制备物缓冲液(例如5%(w/v)蔗糖,50mM NaCl,10mM Tris/HCl,10mM谷氨酸钠,pH8)中。

[0252] 1.1.2 MVATG19791

[0253] MVATG19791被工程化为在pH5R启动子控制下表达与人IgG2 Fc序列(SEQ ID NO:4)融合的人白介素-7。编码hIL-7-Fc的核苷酸序列经过密码子优化,以提高重组蛋白在人细胞中的表达。在ATG起始密码子之前加入Kozak序列(ACC),在终止密码子之后加入转录终止子(TTTTTNT)。此外,开放读框中的一些模式被排除在外:TTTTTNT、GGGGG、CCCCC,其对痘病毒的表达是有害的。

[0254] 通过合成方式产生了含有优化的融合IL-7-Fc的DNA片段。通过In-Fusion克隆(In-Fusion HD克隆试剂盒,Clontech)将该片段插入由PvuII消化的痘苗病毒转移质粒pTG19349中,产生pTG19791。

[0255] MVA转移质粒pTG19349设计用于允许插入待通过同源重组转移到MVA基因组的缺失III中的核苷酸序列。其起源于质粒pUC18,其中克隆了围绕MVA缺失III的侧翼序列(BRG3和BRD3)。其还包含pH5R启动子。

[0256] MVATG19791是通过使用MVA-mCherry作为亲代病毒和如上所述的转移质粒pTG19791经同源重组在鸡胚成纤维细胞(CEF)上生成的。

[0257] 1.2.体外评估MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897和MVATG19791)

[0258] 作为第一步,在用病毒载体感染的A549细胞中评估MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)表

达hIL-7-Fc基因的能力。收集细胞和上清液并进行Western印迹，使用特异于人IL-7的兔单克隆抗体评估hIL-7-Fc检测。将其与用不编码任何外来蛋白质的空白MVA(MVATGN33.1)转导的细胞进行比较。

[0259] 还评估了MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)表达功能性hIL-7的能力。将COS7细胞以MOI(感染复数)为0.3、1和3感染，48至72小时后收集上清液。通过ELISA评估分泌的IL-7的数量，并使用PB1细胞(ATCC)评估IL-7的功能，该细胞的增殖依赖于hIL-7。将上清液在PB1细胞上温育72小时，并进行旨在测量细胞代谢(反映细胞增殖)的MTT测定。

[0260] 作为第二步，在用病毒载体感染的CEF和A549细胞中评估和比较MVATG18897和MVATG19791表达hIL-7-Fc基因的能力。收集细胞和上清液并进行Western印迹，使用特异于人IL-7的兔单克隆抗体评估hIL-7-Fc检测。将其与用不编码任何外来蛋白质的空白MVA(MVATGN33.1)转导的细胞进行比较。上清液中hIL-7-Fc的量也使用hIL-7ELISA进行量化。

[0261] 1.3.在健康C57BL6/J小鼠模型中的药动学和生物学活性

[0262] 1.3.1动物

[0263] 在从Charles River Laboratories购买的C57BL/6J小鼠中施用后，评估了由MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)表达的与人IgG2 Fc结构域融合的人白介素-7(hIL-7-Fc)的药动学。

[0264] 1.3.2.施用方案

[0265] 1.3.2.1MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)和空白MVA(MVATGN33.1)注射方案

[0266] 实验1：小鼠在眶后窦静脉内(IV)注射1×10^{7}或1×10^{8}pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或1×10^{8}pfu的MVATGN33.1(用作对照的空白MVA)(15只小鼠/组)。

[0267] 实验2：小鼠在眶后窦静脉内(IV)注射1×10^{8}pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或2×10^{8}pfu的空白MVA(MVATGN33.1)(15只小鼠/组)。

[0268] 实验3：小鼠在眶后窦静脉内(IV)注射1×10^{8}pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或1×10^{8}pfu的空白MVA(MVATGN33.1)。实验进行了两次，并合并结果。

[0269] 实验4：小鼠在眶后窦静脉内(IV)注射一次1×10^{7}pfu的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或5μg由Geneart在CHO细胞上产生的重组IL-7-Fc蛋白。

[0270] 1.3.3hIL-7-Fc和mIFNγ的药动学

[0271] 1.3.3.1采集血样

[0272] 实验1：为了测量循环hIL-7-Fc和mIFNγ，在以下时间点对注射的小鼠的血液进行采样：0小时、2小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时、8天、15天和21天(每个时间点每组3只小鼠)。

[0273] 实验2：为了测量由MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)注射产生的循环hIL-7-Fc和循环mIFNγ的量，在以下时间点对注射的小鼠的血液进行取样：0小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时、7天和9天(每个时间点每组3只小鼠)。

[0274] 1.3.3.2制备血清

[0275] 将血样在取样后在4℃下保存约1小时。然后将其离心(在4℃以10000rpm离心5分钟)并将血清收集在新管中储存在-20℃直至进行ELISA。

[0276] 1.3.3.3 hIL-7和mIFN-γELISA

[0277] 对于hIL-7-Fc药动学，根据供应商的说明，使用来自R&D systems的人IL-7Duoset

ELISA进行ELISA。值得注意的是,在整个检测过程中,使用的样品和各种试剂的体积仅为50μL。根据样品和IL-7浓度,将样品稀释为1/3至1/6561。然后使用R&D System建立和提供的标准曲线计算每个样品的浓度,涵盖从7.81pg/mL至500pg/mL的值。

[0278] 对于mIFNγ的给药,使用来自Biolegend的小鼠IFN-γELISAMAX™ Deluxe根据供应商的说明进行ELISA。值得注意的是,除了包被步骤外,在整个检测过程中,使用的样品和各种试剂的体积仅为50μL。根据样品和IFN-γ浓度,将样品稀释为1/3至1/6561。然后使用Biolegend建立和提供的标准曲线计算每个样品的浓度,涵盖从15.62pg/mL至1000pg/mL的值。

[0279] 1.3.4生物学活性评估t

[0280] 实验1中未评估生物学活性。

[0281] 实验2:为了测量MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物学活性,在第1、3、9和29天每组处死3只小鼠,收集脾和胸腺。

[0282] 制备脾细胞和胸腺细胞,裂解红细胞。洗涤后,使用以下抗体和试剂对收集的细胞进行染色:Fc阻断剂溶液(抗CD16-32(2.4G2)),抗CD3 APC,抗CD4 APC-H7,抗CD8 PE-CY7或抗CD8-PRCP,抗CD19-PE,抗B220-APCH7,抗NK1.1 PercpCy-5,抗CD11c-PE,抗CD11b-V500,抗Ly6G-FITC,Ly6C-APC,抗Bcl2-FITC,抗-CD62L-PECy7,抗-CD44-FITC,抗-CD127-PE,存活力标记(LiveDead LV450),所有这些试剂均购自Becton Dickinson,除了来自Invitrogen的存活力标记之外。与Fc阻断剂溶液的温育是在与抗体温育之前完成。然后将细胞与3种不同的抗体混合物/组一起温育:

[0283] *T细胞:抗CD3、抗CD8、抗CD4、抗CD44、抗CD62L、LV450

[0284] *骨髓细胞:抗B220、抗NK1.1、抗CD11b、抗CD11c、抗Ly6G、抗Ly6C、LV450

[0285] *细胞凋亡:对于脾,抗-CD4、抗-CD8、抗-CD3、抗-Bcl2、LV450;对于胸腺,相同的抗体混合物,但不包括CD3

[0286] 将洗涤过的染色样品在FACSCanto II细胞仪上运行。使用BD diva软件分析数据。

[0287] 实验3(进行两次并且合并):为测量MVATG18897和MVATGN33.1对肺的生物学活性,在注射后第3天和第9天每组处死5只小鼠并收集肺。

[0288] 制备肺细胞,裂解红细胞。洗涤后,使用Muse细胞分析仪对收集的细胞进行计数,并使用以下抗体和试剂进行染色:Fc阻断剂溶液(抗CD16-32(2.4G2)),抗CD3 APC,抗CD4 APC-H7,抗CD8PE-CY7,抗NK1.1 PercpCy-5,抗CD69-FITC,存活力标记(LiveDead LV450),除了来自Invitrogen的存活力标记外,所有这些试剂均购自Becton Dickinson。在与抗体温育之前进行与Fc阻断剂溶液的温育。通过流式细胞术(FACSCanto II)分析染色。

[0289] 实验4(进行两次,一次用于脾分析,一次用于肺分析):为了测量MVATG18897和hIL-7-Fc蛋白的生物学活性,在每个实验中注射后第3天和第9天每组处死6只小鼠,收集脾或肺。

[0290] 制备脾细胞和肺细胞,裂解红细胞。洗涤后,使用Muse细胞分析仪对收集的细胞进行计数,并使用以下抗体和试剂进行染色:Fc阻断剂溶液(抗CD16-32(2.4G2)),抗CD3 APC,抗CD4 APC-H7,抗CD8 PE-CY7,抗NK1.1 PercpCy-5,抗CD69-FITC,存活力标记(LiveDead LV450),除了来自Invitrogen的存活力标记外,所有这些试剂均购自Becton Dickinson。在与抗体温育之前进行与Fc阻断剂溶液的温育。通过流式细胞术(FACSCanto II)分析染色。

[0291] 还使用脾细胞和肺细胞进行了细胞内细胞因子染色测定。在Golgi Plug(最终稀释度1/1000)存在下,使用各1μg/mL的抗CD3(最终稀释度为1/1000)和抗CD28(最终稀释度为1/1000)抗体刺激细胞4小时30分钟。温育后,使用以下抗体和试剂对细胞进行染色:Fc阻断剂溶液(CD16/32),抗CD4-APC-H7,抗CD8-V500,存活力标记(Live/Dead LV450)。在与抗体温育之前进行与Fc阻断剂溶液的温育。然后,将细胞固定并透化,并使用以下抗体进行细胞内细胞因子染色:抗CD3-PerCP,抗IFNγ-Alexa488,抗TNFα-APC和抗IL2-PE。将样品在BD Biosciences FACSCanto II细胞仪上运行。使用BD Biosciences Diva软件分析数据。

[0292] 1.3.5统计学分析

[0293] 为了评估生物学活性,使用两因素ANOVA和重复测量(混合模型)检验进行统计学分析(GraphPad Prism软件),如果显著($p<0.05$),则通过Bonferonni检验后进行逐组比较。由于多重比较,对p值进行了校正。如果Bonferonni检验后和校正后的p值低于0.05,则两组之间观察到的差异被认为是显著的。

[0294] 1.4.在脓毒症小鼠模型中的生物学活性

[0295] 1.4.1.盲肠结扎穿孔术(CLP)

[0296] 为了诱发多种微生物腹膜炎,对8至11周龄的C57BL/6雄性小鼠进行盲肠结扎穿孔术(CLP),该手术是对Restagno等人描述的方案(2016,PLoS One,11(8):e0162109)加以修改。简而言之,用甲苯噻嗪和氯胺酮混合物麻醉小鼠。暴露盲肠,在其外三分之一处结扎,并用21号针刺破两次以形成两个单孔。挤出少量粪便以诱发轻度脓毒症。对照组是未经治疗的小鼠和接受剖腹手术的假手术小鼠,仅暴露盲肠,无CLP。所有手术小鼠在手术前均接受镇痛(丁丙诺啡)。手术结束时,所有手术小鼠均经皮下注射5%葡萄糖盐水溶液。手术后大约6小时,然后在接下来的两天内每12小时,对所有接受手术的小鼠进行腹膜内注射抗生素(亚胺培南/西司他丁)和皮下注射丁丙诺啡以控制疼痛。然后每天两次监测小鼠直至研究结束。定义临床评分,如果评分高于预定阈值,则对小鼠实施安乐死。观察到不能起身、呼吸困难、厌食或体温低于30℃,将动物安乐死。然后确定存活率直到手术后第7天。

[0297] 1.4.2.施用方案

[0298] 比较假手术、未治疗的CLP和MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠的实验:CLP后4天,一组CLP小鼠在异氟醚吸入麻醉后在经眶后窦静脉内(IV)注射一次在100μL S08缓冲液中的1×10^8pfu的MVATG18897(MVA-hIL-7-Fc)。

[0299] 比较空白MVA和MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的实验:CLP后4天,一组CLP小鼠在异氟醚吸入麻醉后在眶后窦经静脉内(IV)注射一次在100μL S08缓冲液中的1×10^8pfu的MVATG18897(MVA-hIL-7-Fc)。第二组以完全相同的方式进行治疗,但是使用空白MVA。

[0300] 比较MVA-hIL-7-Fc和hIL-7-Fc蛋白的实验(2个实验):CLP后4天,一组CLP小鼠在异氟醚吸入麻醉后在眶后窦经静脉内(IV)注射一次在100μL S08缓冲液中的1×10^7pfu的MVATG18897(MVA-hIL-7-Fc)。第二组以完全相同的方式进行治疗,但是使用5μg hIL-7-Fc。

[0301] 1.4.3.生物学活性评估

[0302] 1.4.3.1.血液

[0303] 1.4.3.1.1.制备血清

[0304] 在研究结束时,将血液收集到收集管中(Microvette®CB 200Z-Gel,Sarstedt)。血样在取样后在4℃下保存约1小时。然后,将其离心(在4℃以10000rpm离心5分钟)并将血清收

集在新管中并储存在-20℃直至进行ELISA和多重测定。

[0305] 1.4.3.1.2.制备细胞悬浮液

[0306] 血液取自眶后窦。用1％乙酸溶液裂解少量全血，混合并在固定时间内以BD FACSCanto II的中等速度(1μL/秒)采集。计数相应于非裂解细胞核的事件数，从而给出每微升全血的有核细胞浓度。为了进一步的流式细胞术分析，将剩余的全血用10mL的Red Blood裂解缓冲液(BioLegend)裂解约15分钟。洗涤后，对细胞进行与脾细胞相同的染色。

[0307] 1.4.3.2.脾

[0308] 为测量MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的生物学活性，在MVA-hIL-7-Fc注射后三天(即CLP后7天)处死小鼠，并收集脾。分离脾并获得细胞悬浮液。在红细胞裂解后，收集脾细胞，计数并进行下述免疫测定。

[0309] 1.4.3.3.hIL-7 ELISA

[0310] 根据供应商的说明，使用来自R&D Systems的人IL-7DuoSet®ELISA显色系统进行ELISA。值得注意的是，所有试剂体积均除以2。血清以1/3稀释，然后连续5次三倍稀释。然后使用R&D Systems建立和提供的标准曲线计算每个样品的浓度，涵盖从7.81pg/mL至500pg/mL的值。

[0311] 1.4.3.4.多重测定

[0312] 对血清和刺激的脾细胞的上清液进行测定。将脾细胞以每孔0.5×10^6个细胞接种，将所述孔用抗CD3抗体(1μg/mL)预包被。24小时后，收集上清液并储存在-20℃。根据供应商的说明，使用MSD(Meso Scale Discovery)的U-PLEX多重测定对血清和上清液进行多重测定，以评估以下细胞因子：IL-1β、IL-6、IL-10、TNFα和IFNγ。然后使用由MSD建立和提供的标准曲线计算每个样品的浓度。

[0313] 1.4.3.5.IFNγELISpot测定

[0314] 将脾细胞以每孔25×10^3个细胞接种，并与抗CD3抗体(1μg/mL)和抗CD28抗体(1μg/mL)培养过夜(约20小时)。通过来自CTL(MIFNGP-1M/5)的小鼠IFNγ单色酶促ELISpot(酶联免疫斑点)测定法对产生IFNγ的T细胞进行定量。从含有抗CD3/CD28抗体的实验孔中检测到的斑点数中减去阴性对照孔中的斑点数(相应于产生IFNγ的T细胞)。

[0315] 1.4.3.6.流式细胞术分析

[0316] 1.4.3.6.1.细胞表型分型

[0317] 使用以下抗体和试剂对脾细胞进行染色：Fc阻断剂溶液(抗CD16/32，克隆2.4G2)，抗CD45-PE-Cy7，抗CD3 APC，抗CD4 APC-H7，抗CD8 V500，抗CD19-PE，抗CD69-FITC，抗NK1.1PercpCy-5，存活力标记(LiveDeadLV450)，除购自Invitrogen的存活力标记外，所有试剂均购自Becton Dickinson。与Fc阻断剂溶液的温育之前完成与抗体温育。然后将样品在FACSCanto II细胞仪上运行，并使用BD Diva软件分析数据。

[0318] 1.4.3.6.2.三重细胞内细胞因子染色测定

[0319] 在Golgi Plug(1/1000)存在下，用抗CD3抗体(1μg/mL)和抗CD28抗体(1μg/mL)刺激脾细胞4小时。然后使用以下抗体和试剂对细胞进行染色：Fc阻断剂溶液(抗CD16/32，克隆2.4G2)，抗CD4V500，抗CD8 APC-H7，存活力标记(LiveDead LV450)。在与抗体温育之前进行与Fc阻断剂溶液的温育。洗涤后，将细胞固定并透化。使用以下抗体进行细胞内细胞因子染色：抗CD3 PerCP，抗IFNγAlexa488，抗TNFαAPC和抗IL2 PE。然后洗涤样品并在

FACSCanto II细胞仪上运行。使用BD Diva软件分析数据。

[0320] 1.4.3.7.统计学分析

[0321] 对于存活研究,使用对数秩检验进行统计分析(SAS®9.4软件),然后使用Tukey多重性调整检验进行组间ad-hoc比较。

[0322] 为了评估在比较假手术、未治疗的CLP和MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠的实验以及比较空白MVA和MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的实验中的生物学活性,进行了统计分析(GraphPad Prism软件),使用单因素ANOVA Kruskal-Wallis检验,如果显著($p<0.05$),则通过成对Mann-Whitney检验进行逐组比较。如果通过Mann-Whitney检验获得的p值低于0.05,则两组之间观察到的差异被认为是显著的。

[0323] 为了评估比较MVA-hIL-7-Fc和hIL-7-Fc蛋白质的实验中的生物学活性,使用单因ANOVA Kruskal-Wallis检验进行统计学分析(GraphPad Prism软件),如果显著($p<0.05$)则通过成对Dunns检验以逐组比较。如果用Dunns检验获得的p值低于0.05,则两组之间观察到的差异被认为是显著的。

[0324] 1.5.在ICU Covid-19免疫抑制患者中的生物学活性

[0325] 从参加观察性临床研究RICO(REA-I MMUNO-COVID)的SARS-COV-2感染患者中获得全血,该研究经伦理委员会(Comitéde Protection des Personnes Ile de France 1-N° IRB/IORG#:IORG0009918-agreement 2020-A01079-30)批准并在ClinicalTrials.gov注册,编号为NCT04392401(里昂临终关怀重症监护病房)。在进入ICU后的第3天和第5天之间,获得了6名入院时SOFA评分大于或等于5的患者的样本。

[0326] 评估了用含有hIL-7-Fc的上清液刺激后的STAT5磷酸化。使用来自MVATG18897或MVATGN33.1感染的稀释上清液(1/2.5、1/5和1/10稀释)和未感染细胞上清液(1/2.5稀释)刺激全血10分钟。将细胞用抗人CD3 Pe-Cy7和抗人CD45 APC-H7染色。使用Perfix-Expose试剂盒进行固定、红细胞裂解和透化步骤。透化后,将细胞用抗人pSTAT5(pY694)染色。在CantoII流式细胞仪上分析细胞,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0327] CD4+T细胞的功能通过细胞因子的细胞内染色来确定。除了来自MVATG18897或MVATGN33.1感染或未感染细胞上清液的上清液外,还根据供应商的说明使用Duractive1刺激试剂盒刺激全血。将上清液以1/2和1/10稀释以刺激细胞。根据供应商的说明,使用Duraclone IF T激活试剂盒对CD4+T细胞进行细胞内染色。在CantoII流式细胞仪上分析细胞,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0328] 1.6.在老年创伤患者中的生物学活性

[0329] 一项包括在PitiéSalpêtrière医院急诊科收治的年龄超过75岁的髋部骨折患者的前瞻性观察性临床研究HIPAGE获得了伦理委员会(CPP Pitié-Salpêtrière,法国巴黎)的批准。此外,还招募了年龄匹配的衰老对照患者。包括的所有参与者都被告知并表示同意。对5名衰老患者和手术后48至72小时获得的10名衰老髋部骨折患者的冷冻保存的PBMC进行了分析。

[0330] 进行了免疫表型分析以评估CD8 T细胞中CD57的表达,其是一种众所周知的免疫衰老标记物(Kared et al.,2016,J I mMunol I mMunother,65(4):441-52)。将PBMC解冻并用Fixable Viability Dye(eFluor 780)、抗人CD3-Pe-Cy7、抗人CD8-BV650和抗人CD57-FITC染色。使用BD-LSRFortessa流式细胞仪分析细胞,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0331] 在解冻的PBMC上评估用含有hIL7-Fc的上清液刺激后的STAT5磷酸化。使用来自MVATG19791感染细胞的稀释上清液(稀释度相应于12.5ng/mL IL-7-Fc)或来自MVATGN33.1感染细胞的稀释上清液(具有相同稀释度)将PBMC刺激10分钟。同时使用具有培养基的未刺激对照。使用BD-CytofixBuffer进行固定,使用BD-Perm Buffer III进行透化。透化后,用抗人CD3 Pacific Orange、抗人pSTAT5(pY694)对细胞进行染色。使用BD-LSRFortessa流式细胞仪分析细胞,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0332] 在解冻的PBMC上评估T细胞增殖。将PBMC用细胞增殖染料(eFluor 450)染色,并使用来自MVATG19791感染细胞的稀释上清液(稀释度相应于12.5ng/mL IL7-Fc)或来自MVATGN33.1感染细胞的稀释上清液(具有相同稀释度)刺激5天。同时使用具有培养基的未刺激对照。然后,用Fixable Viability Dye(eFluor 780)和抗人CD3-Pe-Cy7对PBMC进行染色。在BD-LSRFortessa流式细胞仪上分析细胞,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0333] 1.7.ICU中创伤和大手术患者中的生物学活性

[0334] 冷冻保存的PBMC是从一组重症监护病房的重症患者中获得的,这些患者在创伤性窒息或重型手术后被收治。在入住ICU后第3至5天采集入院时SOFA评分高于或等于4分的患者的血液。立即制备PBMC并冷冻直至分析。PBMC由Transhit Biomarker公司提供,具有伦理条件保证,包括患者和/或周围家庭的同意。分析了三名接受过重型手术的患者和三名强多发性创伤性窒息后的患者。

[0335] CD4+T细胞的功能是通过对3名创伤患者和3名手术患者的PBMC进行细胞因子的细胞内染色来确定的。解冻和过夜静置后,在蛋白质转运抑制剂(Brefeldin A(GolgiPlug BD))存在下使用PMA3ng/mL-离子霉素0.3μg/mL或抗CD3/抗CD28抗体(1μg/mL)对PBMC刺激5小时。同时使用未刺激的对照。对于每种刺激条件,加入来自MVATG19791(相应于60ng/mL IL7-Fc的稀释度)或来自MVATGN33.1(具有相同稀释度)感染细胞的上清液,并与仅使用培养基的对照进行比较。

[0336] 然后,将PBMC固定和透化(BD cytofix/cytoperm),并用针对CD3-PECy7、CD4-BV510、CD8-APC-H7、IFNγ-BB700、IL2-PE、TNFα-A488的单克隆抗体染色。在CantoII流式细胞仪上分析细胞,并使用Flow Jo软件分析数据。

[0337] 2.结果

[0338] 2.1在用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)进行细胞转导后体外评估hIL-7-Fc表达和功能

[0339] 在第一个实验中,将A549细胞用空白MVA(MVATGN33.1,阴性对照)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)转导。收集细胞和上清液并通过Western印迹进行分析(图1A)。用空白MVA(MVATGN33.1)转导的细胞和上清液没有检测到特异性条带,而用MVA-hIL-7-Fc转导的细胞和相应的上清液,可以清楚地检测到特异性信号。在没有β-巯基乙醇的情况下,细胞和上清液均出现拖尾,在存在β-巯基乙醇的情况下,细胞和上清液出现一条清晰的单一条带,其由于蛋白质糖基化略高于43kDa,正如预期的那样。

[0340] 在第二个实验中,MVA-hIL-7-Fc用于以各种MOI转导COS7细胞,并在48或72小时收集上清液。然后,对收集的上清液进行ELISA检测人IL-7,以检测用MVA-hIL-7-Fc转导后分泌的人IL-7(图1B)。在用MVA-hIL-7-Fc转导后清楚地检测到HIL-7,而在用空白MVA转导后在COS7细胞的上清液中未检测到信号。在收集的上清液中检测到的IL-7的量明显是剂量/

MOI依赖性的(MOI 0.3为25ng/mL,MOI 1为56ng/mL,MOI 3为66ng/mL)。

[0341] 在PB1细胞上评估上清液中hIL-7的功能,该细胞的生长是hIL-7依赖性的。在将细胞与各种稀释的收集上清液温育72小时后,对PB1细胞进行MTT测定法测量细胞代谢。如图1C所示,空白MVA转导的上清液未检测到活性,而MVA-hIL-7-Fc转导细胞的上清液检测到信号。正如预期的那样,检测到的活性依赖于MOI和上清液稀释度。它证明了细胞感染后MVA-hIL-7-Fc产生的人IL-7的活性/功能。

[0342] 2.2在健康C57BL6/J小鼠模型中体内评价MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)

[0343] 2.2.1实验1:静脉内注射2剂(1×10^7和1×10^8pfu)MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)之后hIL-7的药动学

[0344] 在这个实验中,C57BL6/J小鼠被分成3组,每组15只动物。3组分别注射空白MVA(MVATGN33.1)1×10^8pfu,MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)1×10^7pfu或1×10^8pfu,均为静脉注射。在0小时、2小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时、8天、15天和21天每组取3只小鼠的血液样本(出于伦理考虑,每个时间点的样本小鼠不同)。血清由此被用于使用ELISA确定注射小鼠血液中的hIL-7药动学,以及使用另一ELISA确定循环mIFNγ。

[0345] 图2显示了不同组小鼠血液中循环hIL-7和mIFNγ的检测。图2A显示由于病毒载体本身诱导先天免疫,静脉内注射空白MVA后诱导少量IFNγ(注射后6小时最大10.7ng/mL),而未检测到hIL-7,正如预期的。图2B显示了在以10^7pfu的剂量静脉内注射MVA-hIL-7-Fc后,由于病毒骨架而诱导了相同的少量IFNγ(注射后6小时最大5.1ng/mL)。同时,在注射后2小时即检测到循环hIL-7的峰,最大值在注射后24小时(2.4ng/mL)。随着时间推移,检测到的hIL-7的量缓慢减少:注射后4天仍可检测到(0.1ng/mL),注射后第8天不再检测到。图2C显示了注射10^8pfu MVA-hIL-7-Fc的小鼠呈类似模式,除了最大峰值更高并且在注射后24小时略有延迟(注射后6小时为24.5ng/mL,注射后24小时为61.4ng/mL)。检测到的hIL-7总量比低剂量高约1个对数。至于低剂量,注射后4天仍检测到hIL-7(3.1ng/mL),注射后8天不再检测到。循环mIFNγ的药动学与用相同剂量的空白MVA观察到的相同。

[0346] 这个实验清楚地证明了与空白MVA相比,MVA-IL-7在至少4天内表达可检测水平的循环hIL-7的能力。

[0347] 2.2.2实验2:静脉内注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或空白MVA(MVATGN33.1)后的hIL-7的药动学以及相关免疫学活性

[0348] 在这个实验中,C57BL6/J小鼠被分成2组,每组15只动物。两组分别注射空白MVA(MVATGN33.1),剂量为2×10^8pfu,注射MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897),剂量为1×10^8pfu,均为静脉注射。在0小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时、8天、9天、15天和29天每组取3只小鼠的血液样本(出于伦理考虑,每个时间点的样本小鼠不同)。因此,血清被用于使用ELISA确定注射小鼠血液中的hIL-7的药动学,以及通过另一ELISA对循环mIFNγ定量。此外,在D1、D3、D9和D29每组处死3只小鼠,并对其脾和胸腺取样,以监测免疫细胞、其数量、激活状态和表型。

[0349] 2.2.2.1hIL-7和mIFNγ药动学

[0350] 图3A显示,在整个实验过程中,在通过空白MVA静脉注射的小鼠中没有检测到循环hIL-7,而在注射后的前4天检测到少量循环mIFNγ,在6小时时达到8.5ng/mL的峰值注射后,反映了MVA载体本身诱导的先天免疫反应。

[0351] 图3B显示用MVATG18897(MVA-hIL-7-Fc)治疗的小鼠在注射后6小时就显示循环hIL-7(注射后6小时和24小时的平均值为23ng/mL),随时间略有下降(注射后第2、3和4天的平均值为10、7和5.1ng/mL)。在注射后第8天,不再检测到循环hIL-7。循环mIFNγ的概况与在注射空白MVA的小鼠中观察到的完全可比,因此可能是由于MVA载体本身所致。

[0352] 2.2.2.2MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)的免疫学活性

[0353] 2.2.2.2.1总脾细胞数

[0354] 图4显示了脾细胞的总数依赖于组和时间。与未治疗的小鼠相比,空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)均在第1天诱导了总脾细胞数的轻微减少(因此效应可能由载体本身介导)。在第3天,未治疗的小鼠和MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠显示出相似数量的脾细胞,而空白MVA治疗的小鼠仍然显示出较少数量的脾细胞。在第9天,与空白MVA(平均92×10^6个细胞/脾)和未治疗的小鼠(59×10^6个细胞/脾)相比,MVA-hIL-7-Fc在第9天强烈且显著增加脾细胞数(平均231×10^6个细胞/脾)。在第29天,3组显示出相当的脾细胞总数。

[0355] 图4中呈现的这些结果清楚地显示了能够增加总脾细胞数量的载体MVA的效果和能够在第9天显著增加脾细胞数的IL-7武装的MVA的效果。MVA-hIL-7-Fc概括了载体本身和武装的免疫效应。MVA-hIL-7-Fc增加脾细胞数的能力有望通过让患者的免疫系统更好、更快地对潜在的新感染或攻击做出反应,从而对免疫抑制患者有益。

[0356] 2.2.2.2.2脾中的CD4 T细胞总数和CD4+T细胞亚群

[0357] 图5显示了依赖于组和时间点的脾内CD4 T细胞(图5A)的总数以及每种CD4+T细胞亚群,即幼稚CD4 T细胞(图5B)、CD4+效应记忆细胞(图5C)、CD4+中央记忆细胞(图5D)和CD4+急性效应记忆细胞(图5E)。这4种CD4+T细胞亚群是通过以下标记鉴定的:CD3+CD4+CD62L+CD44-用于幼稚细胞,CD3+CD4+CD62L-CD44+用于效应记忆细胞,CD3+CD4+CD62L+CD44+用于中央记忆细胞,CD3+CD4+CD62L-CD44-用于急性效应细胞。

[0358] 关于脾中的总CD4+T细胞数,所有3组(未治疗、空白MVA治疗和MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠)在第1、3和29天显示相似的数。相反,与未治疗的小鼠相比,用空白MVA(MVATGN33.1)治疗的小鼠在第9天显示总CD4+T细胞数略有增加(20.8×10^6对13.2×10^6)。值得注意的是,与未治疗的小鼠和空白MVA治疗的小鼠相比,在第9天,用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的小鼠脾中的总CD4+T细胞数显著增加(32.1×10^6)。MVA-hIL-7-Fc诱导的更高的总CD4+T细胞数有利于治疗免疫抑制患者,因为这意味着次级淋巴器官中存在更多来自适应性免疫臂的细胞,准备好对新的入侵做出反应。

[0359] 与未治疗的小鼠相比,第1天和第3天脾中的幼稚CD4+T细胞(图5B)似乎因空白MVA和MVA-hIL-7-Fc而略有减少(与MVA载体相关的效应)。相反,与未治疗的小鼠相比,在第9天MVA-hIL-7-Fc治疗显著增加了幼稚CD4+T细胞数(分别为16.9×10^6和9.9×10^6)。在注射后第29天,所有组都显示出相似的幼稚CD4+细胞数。

[0360] 尽管空白MVA和MVA-hIL-7-Fc在注射后第1天都减少了效应记忆CD4+T细胞数(图5C),但与空白MVA治疗小鼠(1.6×10^6个细胞)和第9天(10.6×10^6个细胞)相比,只有MVA-hIL-7-Fc在第3天显著增加了该亚群(3.8×10^6个细胞),(与未治疗(1.8×10^6个细胞)和空白MVA治疗小鼠(5.2×10^6个细胞)相比)。在D29仍然观察到类似的趋势。值得注意的是,空白MVA治疗的小鼠在第9天显示出中等增加的CD4+效应记忆细胞数,这显著高于未治疗的小

鼠，但也显著低于经MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠。对于其他效应群体(急性效应细胞，图5E)，与空白MVA(2×10^6个细胞)和未治疗的小鼠(1.4×10^6个细胞)相比，MVA-hIL-7-Fc在注射后第9天显著增加了这个群体(3.8×10^6个细胞)。

[0361] 与注射后第3天和第9天的空白MVA相比，MVA-hIL-7-Fc还显著增加了CD4+中央记忆细胞数(图5D)(第3天和第9天分别为1×10^6和1.4×10^6对比分别为0.5×10^6和0.8×10^6个细胞)，以及在注射后第9天和第29天与未治疗的小鼠相比也是如此(第9天和第29天MVA-hIL-7-Fc分别为1.4×10^6和1.2×10^6对比未治疗小鼠分别为0.4×10^6和0.6×10^6个细胞)。对于该细胞亚群，与未治疗小鼠相比，空白MVA没有显著影响。

[0362] 与空白MVA相比，MVA-hIL-7-Fc在注射后的一个或多个时间点特异性诱导注射小鼠脾中的CD4+效应记忆、急性效应和中央记忆细胞。这证明了MVA-hIL-7-Fc中编码的IL-7的作用。这种CD4 T细胞亚群的诱导在免疫抑制的治疗中很重要，一个具体的例子是治疗由脓毒症引起的免疫抑制，因为效应记忆和急性效应细胞特别是在二次感染后表现出最快特异性免疫应答的细胞。

[0363] 2.2.2.2.3脾中的CD4 T细胞总数和CD8+T细胞亚群

[0364] 图6显示了依赖于组和时间点的脾内CD8 T细胞的总数(图6A)以及每种CD8+T细胞亚群，即幼稚CD8 T细胞(图6B)、CD8+效应记忆细胞(图6C))、CD8+中央记忆细胞(图6D)和CD8+急性效应记忆细胞(图6E)。这4种CD8+T细胞亚群是通过以下标记鉴定的：CD3+CD8+CD62L+CD44-用于初始细胞，CD3+CD8+CD62L-CD44+用于效应记忆细胞，CD3+CD8+CD62L+CD44+用于中央记忆细胞，CD3+CD8+CD62L-CD44-用于急性效应细胞。

[0365] 与未治疗小鼠相比，空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)在注射后第1天均减少了脾中CD8+T细胞总数。用空白MVA或MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠显示出相当的水平，提示病毒载体本身的作用(图6A)。在第3天和第9天，与空白MVA(第3天和第9天分别为6.8×10^6和10.2×10^6个细胞)和未治疗的小鼠(第3天和第9天分别为9.2×10^6和7.7×10^6个细胞)相比，只有MVA-hIL-7-Fc显著增加了CD8 T细胞总数(第3天和第9天分别为13.2×10^6个和19.4×10^6个细胞)，证明MVA-hIL-7-Fc中编码的IL-7对脾中整体CD8+T细胞群的特异性作用。

[0366] 空白MVA和MVA-hIL-7-Fc在注射后第1天也强烈减少了幼稚CD8+T细胞数(图6B)和CD8+T中央记忆细胞数(图6D)。在注射后第3天，与未治疗的小鼠相比，在幼稚CD8+T细胞上两种MVA仍然检测到这种下降。相反，与空白MVA(分别为10.9×10^6、6.6×10^6和16.5×10^6个细胞)和未治疗的小鼠(分别为4.6×10^6、9.2×10^6和16×10^6个细胞)相比，在同一时间点(第3天)只有MVA-hIL-7-Fc强烈且显著增加了CD8+效应记忆细胞数(36.6×10^6个细胞，图6C)、中央记忆细胞数(21.1×10^6个细胞，图6D)和急性效应细胞数(35.6×10^6个细胞，图6E)。这种效应在注射后第9天仍然被检测到并且显著：对于效应记忆CD8+T细胞，MVA-hIL-7-Fc、空白MVA和未治疗小鼠分别为33.9×10^6对11.2×10^6对2.7×10^6个细胞；对于记忆中央CD8+T细胞，MVA-hIL-7-Fc、空白MVA和未治疗小鼠分别为35×10^6与8.4×10^6与4.3×10^6个细胞；对于急性效应CD8+T细胞，MVA-hIL-7-Fc、空白MVA和未治疗小鼠分别为40.5×10^6对19.7×10^6对21.1×10^6个细胞。在这个时间点，与未治疗的小鼠(48.5×10^6个细胞)相比，MVA-hIL-7-Fc还显著提高了幼稚CD8+T细胞数(88.9×10^6个细胞)。与空白MVA(8.5×10^6个细胞)和未治疗小鼠(7.1×10^6个细胞)相比，MVA-hIL-7-Fc在注射后第29天对CD8+中央记

忆细胞(16.4×10^6细胞)的影响仍然显著(图6D)。值得注意的是,尽管与未治疗的小鼠相比,注射后第3、9和29天空白MVA使CD8+效应记忆细胞数略有增加,但它仍然显著低于MVA-hIL-7-Fc诱导的此类细胞数。

[0367] MVA-hIL-7-Fc对脾的CD8+T细胞有主要效应,其效应主要由武装的人IL-7介导。对于CD4+T细胞,CD8 T细胞亚群的诱导在免疫抑制的治疗中很重要,一个具体的例子是脓毒症后免疫抑制的治疗,因为效应记忆细胞和急性效应细胞特别是表现出二次感染后最快特异性免疫应答的细胞。此外,在注射后第29天诱导CD8+中央记忆T细胞也令人感有趣,因为这些细胞是适应性记忆应答的储存库,用于T细胞增殖和效应T细胞的转化。

[0368] 2.2.2.2.4在脾和胸腺T细胞中的Bcl2表达

[0369] Bcl2是生存基因,相应的蛋白质在抗凋亡过程中发挥作用。在本实验的小鼠脾内的T细胞和胸腺细胞上监测Bcl2表达(图7)。在注射后第1天和第3天以及来自3组中每一组的小鼠上通过流式细胞术分析了平均荧光强度(MFI)。

[0370] 图7显示了以MFI表示的Bcl2在脾中的CD4+T细胞(图7A)、CD8+T细胞(图7B)和胸腺细胞(图7C)上的表达。与显示相似水平的空白MVA(344)和未治疗的小鼠(342)相比,MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)在注射后第1天特异性诱导脾中的CD4+T细胞上更高的Bcl2MFI(442,图7A)。在第1天,在来自脾的CD8+T细胞中表达的Bcl2的MFI(图7B)在用空白MVA治疗的小鼠(630)中也显著高于未治疗的小鼠(483),并且在用MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠(757)中显著高于用空白MVA治疗的小鼠和未治疗的小鼠。在第3天,这3个组看起来具有可比性。在脾中空白MVA和/或MVA-hIL-7-Fc似乎迅速增加Bcl2在CD4和CD8+T细胞上的表达。

[0371] 在胸腺中,空白MVA和MVA-hIL-7-Fc在注射后第3天(分别为227和246)与未治疗的小鼠(131)相比增加了Bcl2的表达。这种观察到的效果对于空白MVA和MVA-hIL-7-Fc是等效的,表明效果主要由MVA本身介导。

[0372] 总体而言,很早地在注射后第1天在脾中的CD4和CD8 T细胞上以及在第3天在胸腺中,空白MVA和/或MVA-hIL-7-Fc提高了抗凋亡蛋白Bcl2的表达。因为有描述在脓毒症中免疫细胞经历大量凋亡,所以MVA-hIL-7-Fc提高抗细胞凋亡蛋白(如Bcl2)的表达是一种令人感兴趣的潜在治疗作用。

[0373] 2.2.2.2.5胸腺内亚群的比例

[0374] 图8表示依赖于时间点(第1天和第3天),3组胸腺内每个细胞亚群的百分比。胸腺细胞分为4个亚群:双阴性细胞(DN,其是CD4-和CD8-),双阳性细胞(DP,其是CD4+和CD8+),单阳性CD4+(SP CD4+,其是CD8-和CD4+)和单阳性CD8+(SP CD8+,其是CD8+和CD4-)。胸腺内的分化途径是首先DN细胞分化为DP细胞,DP细胞分化为SP CD4+或SP CD8+,成熟的SP CD4+和SP CD8+可迁移出胸腺发挥其在机体中的作用。在用空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗后,与未治疗的小鼠相比,注射后第1天4个细胞亚群的比例没有改变(图8A)。相反,在注射后第3天,空白MVA和MVA-hIL-7-Fc以相似的程度降低了DP细胞的百分比(从未治疗小鼠为73%分别降至空白MVA为58%和MVA-hIL-7-Fc为56%),而两种MVA均增加了SPCD4+细胞比例(两种MVA均为22%,未治疗小鼠为12%)和SPCD8+细胞比例(空白MVA和MVA-hIL-7-Fc分别为12%和13%,未治疗小鼠为7%)(图8B)。在第9天和第29天(未显示),所有百分比都恢复到与未治疗小鼠相当的值。这些数据表明MVA(空的或编码IL-7)能够推动T细胞从胸腺分化,因为它看起来增加了单阳性细胞(CD4+或CD8+)的百分比,这有利

于胸腺外成熟T细胞的存在。在脓毒症后免疫抑制的情况下，观察到淋巴细胞减少，并且在这一免疫抑制阶段治疗的目的之一是恢复正常淋巴细胞计数。MVA-hIL-7-Fc对胸腺和T细胞分化的作用预计有利于恢复正常淋巴细胞计数。

[0375] 2.2.2.2.6嗜中性粒细胞和髓样树突细胞数

[0376] 图9表示依赖于治疗和时间点的脾中的嗜中性粒细胞数(图9A)和髓样树突细胞数(mDC)(图9B)。在第1天，与未治疗的小鼠相比，空白MVA(MVATGN33.1)和MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)都倾向于增加嗜中性粒细胞数。值得注意的是，与未治疗的小鼠(第3天为0.49×10^6个细胞，第9天为0.3×10^6个细胞)和/或空白MVA(第3天为0.42×10^6个细胞，第9天为0.6×10^6个细胞)相比，MVA-hIL-7-Fc在注射后第3天(1.9×10^6个细胞)和第9天(1.1×10^6个细胞)诱导中性粒细胞数显著增加。所有3组在第29天都显示出相当的嗜中性粒细胞数。嗜中性粒细胞是重要的细胞，在宿主防御包括感染在内的各种攻击中发挥着关键作用。它们可以在免疫抑制情况下发生改变，例如在脓毒症引起的免疫抑制中。因此，MVA-hIL-7-Fc诱导嗜中性粒细胞的能力代表了实现嗜中性粒细胞稳态恢复的强大资源。

[0377] 同时，与未治疗的小鼠(9.3×10^5个细胞)相比，对脾中mDC的监测显示注射后第3天空白MVA(1.3×10^5个细胞)和MVA-hIL-7-Fc(3.2×10^5个细胞)导致mDC显著减少。这种减少的一个假设是mDC可能被MVA感染，这导致此类细胞凋亡(在被MVA感染后48小时被诱导)，同时它们在脾内表达编码的hIL-7。相反，在第9天，与空白MVA(6.1×10^5个细胞)和未治疗的小鼠(4.6×10^5个细胞)相比，MVA-hIL-7-Fc特异性诱导mDC(14.4×10^5个细胞)显著增加，而未治疗的小鼠和用空白MVA治疗的小鼠的mDC数是相当的(空白MVA诱导的减少得到恢复)。组间第29天的mDC数相当，观察到的作用是瞬时的。在免疫抑制期间，特别是在脓毒症引起的免疫抑制阶段，mDC数减少。MVA-hIL-7-Fc在第9天对这些细胞数的作用对于恢复此类细胞数具有吸引力。

[0378] 2.2.2.2.7单核细胞亚群数

[0379] 在免疫抑制期间，尤其是脓毒症引起的免疫抑制期间，单核细胞明显受到影响。尽管IL-7被更多地描述为对T细胞有活性，但监测了MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)及其对照空白MVA(MVATGN33.1)对单核细胞的影响。特别是已经在小鼠中描述的3个单核细胞亚群被染色：促炎和发挥吞噬作用的亚群(显示$Ly6C^{high}$)(图10A)，仅促炎的亚群($Ly6C^{int}$)(图10B)和那些被描述为组织/巨噬细胞中的巡逻者(显示$Ly6C^{low}$)(图10C)。单核细胞分化的天然方式是从$Ly6C^{high}$阶段到$Ly6C^{low}$阶段。

[0380] 在本实验中，对于上段中描述的其他细胞群，空白MVA和MVA-hIL-7-Fc在第1天诱导脾中3个单核细胞亚群数与在未治疗的小鼠观察到的略有减少，该作用可能由MVA载体介导。对于$Ly6C^{high}$单核细胞，与空白MVA(63.9×10^4个细胞)和未治疗小鼠(36.6×10^4个细胞)相比，MVA-hIL-7-Fc在第3天特异性诱导这些单核细胞显著增加(185.5×10^4个细胞)。这些$Ly6C^{high}$单核细胞数在第9天和第29天在3组之间再次变为相当的。对于$Ly6C^{int}$单核细胞，MVA-hIL-7-Fc在第3天(106.4×10^4个细胞)和第9天(192.5×10^4个细胞)与空白MVA和未治疗小鼠(第3天分别为42.3×10^4和23.3×10^4个细胞以及第9天分别为53.2×10^4和8.8×10^4个细胞)相比也诱导强而显著的增加。值得注意的是，在第9天，与未治疗的小鼠相比，空白MVA也诱导了这些细胞的增加。在第29天，这些单核细胞数在各组之间再次变得相当。对于$Ly6C^{low}$单核细胞，MVA-hIL-7-Fc在第3天(61.1×10^4个细胞)和第9天(68.54×10^4个细胞)与

空白MVA和未治疗小鼠(第3天分别为28.5×10^4和29.1×10^4个细胞,第9天分别为17.4×10^4和11.7×10^4个细胞)相比也特异性诱导这些单核细胞显著增加。与其他单核细胞亚群类似,这些亚群数在第29天时在各组之间变得相当。

[0381] 这些数据表明MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)对单核细胞有活性,这种活性主要是由武装IL-7所致(除了$Ly6C^{inT}$细胞,其似乎是也由空白MVA增加,但是比MVA-hIL-7-Fc增加的水平低)。它首先在注射后第3天诱导$Ly6C^{high}$单核细胞("未成熟单核细胞"),该单核细胞在随后的时间点消失。其他单核细胞$Ly6C^{int}$和$Ly6C^{low}$也在早至第3天就增加,但在第9天显示出相同或甚至更强的增加,而$Ly6C^{high}$单核细胞却恢复到在未治疗小鼠中观察到的"正常"值。这一观察可以提示MVA-hIL-7-Fc诱导单核细胞,然后在第3天和第9天分化成$Ly6C^{int}$和$Ly6C^{low}$单核细胞中。所有组在第29天再次相当,表明这种诱导是瞬时的。关于脓毒症诱导的免疫抑制期间单核细胞特征的改变,观察到的MVA-hIL-7-Fc对单核细胞的作用特别令人感兴趣。

[0382] 2.2.3实验3:MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)和空白MVA(MVATGN33.1)对健康C57B16/J小鼠肺细胞的活性

[0383] 2.2.3.1肺细胞数

[0384] 在制备肺之后,使用Muse细胞分析仪对总回收细胞进行计数(图27A)。在注射后第3天,与未治疗的小鼠相比,MVATGN33.1显著增加了肺细胞数。与未治疗的小鼠相比,MVA-hIL-7-Fc也显著提高了这一细胞数。此外,MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠肺细胞数的增加明显高于用MVATGN33.1治疗的小鼠中观察到的细胞数,提示武装MVA的活性更强。在注射后第9天,与未治疗的小鼠相比,MVATGN33.1治疗的小鼠肺细胞数没有任何增加,而MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠肺细胞数仍显著增加,其显著高于未治疗或MVATGN33.1治疗的小鼠。

[0385] 2.2.3.2肺中的激活的NK,CD8+和CD4+T细胞数

[0386] 通过流式细胞术评估肺细胞中被激活(例如:显示CD69标记)的NK、CD8+和CD4+T细胞数。

[0387] 与未治疗小鼠中激活的NK细胞数相比,MVATGN33.1和MVA-hIL-7-Fc在注射后第3天显著增加了激活的NK细胞数(图27B)。与MVATGN33.1相比,MVA-hIL-7-Fc甚至显著增加了这些激活的NK数,表明武装的显著效果。在注射后第9天,所有3组的CD69+NK细胞数相等同。

[0388] 与未治疗的小鼠相比,MVATGN33.1和MVA-hIL-7-Fc在注射后第3天也显著增加了激活的CD8+T细胞数(图27C)。由MVA-hIL-7-Fc诱导的增加显著强于由MVATGN33.1诱导的增加,再次表明hIL-7-Fc武装对该参数的显著活性。在注射后第9天,与未治疗的小鼠相比,用MVATGN33.1或MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠仍然显示出显著更高的CD69+CD8+T细胞数。尽管如此,在MVA-hIL-7-Fc和MVATGN33.1治疗的小鼠之间没有更显著的统计学差异。

[0389] 对于激活的CD4+T细胞,与未治疗的小鼠和MVATGN33.1治疗的小鼠相比,只有MVA-hIL-7-Fc显示其数量显著增加,表明在这个时间点武装的效果。在注射后第9天,与未治疗的小鼠相比,MVATG18897和MVATGN33.1显示出提高了CD69+CD4+T细胞数,并且,MVATGN33.1和MVA-hIL-7-Fc之间的差异也是显著的,在MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠中细胞数更高。

[0390] 2.2.4实验4:MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)和hIL-7-Fc蛋白对健康C57B16/J小鼠脾和肺细胞的活性

[0391] 2.2.4.1肺细胞数

[0392] 制备肺之后，使用Muse细胞分析仪对总回收细胞进行计数(图28A)。在注射后第3天，hIL-7-Fc和MVATG18897都显著改善了肺中的整体细胞数。尽管如此，在用MVATG18897治疗的小鼠中，细胞数要多得多，而且显著高得多。在注射后第9天，未治疗或治疗的3组显示肺细胞数相似。

[0393] 2.2.4.2肺中激活的(CD69+)NK,CD8+和CD4+T细胞数

[0394] 在注射后第3天，与未治疗的小鼠相比，MVATG18897治疗的小鼠肺中激活的(CD69+)NK细胞数强烈且显著增加(图28B)。这些细胞数在注射后第9天恢复到与未治疗小鼠相当的水平。同时，hIL-Fc蛋白对这些激活的细胞没有显示任何活性，因为在注射后第3天和第9天，此类细胞数量与未治疗小鼠的数量相似。

[0395] 对于CD69+CD8+T细胞，hIL-7-Fc蛋白倾向于在第3天增加它们的数量(尽管这并不显著)(图28C)。这些数量相当于注射后第9天未治疗的小鼠。同时，与未治疗的小鼠和用hIL-7-Fc治疗的小鼠相比，MVATG18897在注射后第3天强烈且显著地增加了细胞数。在注射后第9天，与未治疗的小鼠和hIL-7-Fc蛋白治疗的小鼠相比，MVATG18897治疗的小鼠仍然显示出显著更高的CD69+CD8+T细胞数。

[0396] 对于CD69+CD4+T细胞，与未治疗的小鼠相比，hIL-7-Fc在注射后3天显著提高了细胞数(图28D)。注射后9天不再观察到hIL-7-Fc对这些细胞的作用。MVATG18897在注射后第3天与未治疗的小鼠相比以及与hIL-7-Fc治疗的小鼠相比，强烈且显著地增加了细胞数。在注射后第9天，与未治疗的小鼠和hIL-7-Fc治疗的小鼠相比，MVATG18897仍诱导CD69+CD4+T细胞数的显著增加。

[0397] 在肺中的这3个细胞群中，MVATG18897活性明显显著高于hIL-7-Fc蛋白，表明在此类病毒载体中载体化hIL-7-Fc是感兴趣的。这是特别令人感兴趣的，因为大多数免疫抑制的脓毒症患者的继发感染是肺部感染，并且这些诱导激活的免疫细胞将直接在感染部位迅速启动免疫应答。

[0398] 2.2.4.3CD8+T细胞在脾和肺中产生细胞因子的能力

[0399] 在TCR刺激后通过ICS监测脾和肺中CD8+T细胞的功能。

[0400] 在脾中，在第3天，与未治疗的小鼠(平均值为0.6％)相比，hIL-7-Fc蛋白和MVATG18897显著增加仅产生IFN-γ的CD8+T细胞百分比(图29A)。MVATG18897诱导的增加(平均值6.5％)显著且远高于hIL-7-Fc诱导的增加(平均值2％)。在第9天，经hIL-7-Fc蛋白治疗的小鼠显示出与未治疗小鼠相似的百分比(平均值约为0.6％至0.9％)，而MVATG18897治疗的小鼠仍显示出显著更高的产生IFNγ的CD8+T细胞百分比(平均值为7.5％)。可以对同时产生IFNγ和TNFα的CD8+T细胞进行类似的观察(图29C)。与未治疗的小鼠(平均值为0.2％)相比，hIL-7-Fc在注射后第3天略有但显著增加百分比(平均值为2.3％)，并且在注射后第9天没有更多作用。在第3天，与未治疗的和hIL-7-Fc治疗的小鼠相比，MVATG18897强烈且显著地增加了这些细胞的百分比(平均值为8.5％)。这种作用尽管不太重要但在注射后第9天仍然明显是显著的。对于产生3种细胞因子(IFNγ和TNFα和IL2)的CD8+T细胞(图29E)，hIL-7-Fc蛋白在注射后第3天与未治疗的小鼠(平均值为0.5％)相比显著增加其百分比(平均值为1.2％)，并且在注射后第9天不再观察到这种作用。MVATG18897在注射后第3天和第9天诱导这些多功能细胞的百分比强烈而显著增加，平均值分别为2.6％和1.5％。在脾中，MVATG18897在诱导能够在TCR刺激后产生细胞因子的CD8+T细胞方面显著优于hIL-7-Fc

蛋白。这些由MVAtG18897诱导的功能性T细胞将能够显著有助于控制未来潜在的继发感染。

[0401] hIL-7-Fc虽然在脾中有活性,但在肺中,与未治疗的小鼠相比,在第3天和注射后第9天未能增加产生仅IFNγ或者IFNγ和TNFα或者IFNγ、TNFα和IL2的CD8+T细胞的百分比(图29B、29D和29F)。注射后3天,只能观察到产生IFNγ的CD8+T细胞的轻微趋势(平均值为2.8%,而未治疗小鼠的平均值为1.8%)。相反,与未治疗的小鼠和hIL-7-Fc治疗的小鼠相比,MVATG18897能够在注射后第3天和第9天强烈显著增加肺中的产生IFNγ、IFNγ/TNFα和IFNγ/TNFα/IL2的CD8+T细胞的百分比。

[0402] 在肺中,MVATG18897能够增强CD8+T细胞产生细胞因子的能力,而hIL-7-Fc蛋白对该器官中CD8+T细胞的功能的活性非常低。预计肺中功能性CD8+T细胞的存在在肺部继发感染的情况下具有明显优势,因为这些功能性细胞将能够通过至少产生细胞因子,直接在潜在感染部位快速控制感染。

[0403] 总体而言,MVATG18897和hIL-7-Fc的比较显示hIL-7-Fc对脾中的某些细胞有活性,但MVATG18897在该器官中表现出明显更强的活性。由于MVATG18897,脾中存在大量激活的和功能性免疫细胞表明,在继发感染的情况下,整体免疫系统将能够更快地对抗继发感染。此外,只有MVATG18897对肺部免疫细胞具有强烈且显著的活性,特别是对T细胞的功能有这种活性。准备好直接在潜在的继发感染部位启动快速和强烈的免疫应答的这种细胞的存在是MVATG18897的另一个有利特征。这些证明了MVATG18897在健康小鼠中对hIL-7-Fc的差异和优势。

[0404] 2.3在CLP小鼠中体内评价MVATG18897

[0405] 2.3.1存活

[0406] 在所有CLP小鼠和对照假手术小鼠中,从D0到D4,即在D4的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗之前跟踪小鼠的存活(图11A)。33只CLP小鼠中有25只(76%)在D4时仍然存活,而对照假手术组没有观察到死亡(5/5只小鼠)。在D4,将存活的CLP小鼠分成两组:在D4给予MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠(n=15)和未治疗的对照CLP小鼠(n=10)。在D7,虽然7/10未治疗的CLP小鼠(70%)仍然活着,但用MVA-hIL-7-Fc治疗的所有CLP小鼠都存活了下来(图11B)。

[0407] 这一结果表明MVA-hIL-7-Fc具有活性并显著提高了CLP诱导的脓毒症小鼠的存活率,表明MVA-hIL-7-Fc可以提高宿主免疫系统以对抗感染。

[0408] 2.3.2.循环hIL-7-Fc

[0409] 在D7,即MVA-hIL-7-Fc治疗后3天,通过hIL-7特异性ELISA确定用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的CLP小鼠中产生的循环hIL-7-Fc水平。在MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的血清中测量到显著的人IL-7(9600pg/mL)(图12)。正如预期的那样,在未经治疗的CLP和假手术小鼠的血清中都观察到了hIL-7水平不可检出。这表明MVA-hIL-7-Fc可以在免疫抑制的CLP小鼠中转导细胞,并且hIL-7-Fc转基因由MVA良好表达并在血液中释放到可检测水平

[0410] 2.3.3在CLP小鼠中的生物学活性

[0411] 然后评估MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)恢复或增强CLP诱导的免疫抑制脓毒症小鼠免疫系统的能力。MVA-hIL-7-Fc给药三天后,与未治疗的CLP小鼠和对照假手术小鼠相比,评估了治疗的CLP小鼠的整体炎症状态和免疫细胞区室。

[0412] 2.3.3.1.整体炎症状态

[0413] 通过在用MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗的脓毒症CLP手术小鼠的血清中同时给予促炎和抗炎细胞因子来确定动物的总体炎症状态。

[0414] 手术后7天和MVA-hIL-7-Fc治疗后3天,评估了假手术、未治疗的CLP和MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠血清中的IFNγ水平(图13)。虽然IFNγ水平在假手术小鼠中低于检测下限并且在未治疗的CLP组中处于低值(分别为0.6和1.9pg/mL),但在用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠血清中测量到了显著更高水平的IFNγ(12.4pg/mL)。由于已经报道了IFNγ治疗对危重脓毒症患者的治疗效果,因此通过MVA-hIL-7-Fc治疗诱导循环IFNγ对于改善这些患者的免疫系统特别令人感兴趣。

[0415] 这些结果表明,MVA-hIL-7-Fc不会加剧脓毒症动物的整体炎症状态,显示出在脓毒症诱导后4天给药时无害,除了IFNγ外,血清中测得的细胞因子没有重大变化。令人感兴趣的是,MVA-hIL-7-Fc促进血液中IFNγ的产生,这可能有助于改善受损的宿主免疫系统。

[0416] 2.3.3.2.脾中免疫细胞亚群的鉴定

[0417] 2.3.3.2.1.细胞表型分型

[0418] 通过流式细胞术测定MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗对免疫抑制CLP小鼠脾中受损细胞区室恢复的作用。图14显示了脾中不同细胞亚群的组成。如文献中所观察到的,CLP小鼠在手术后7天出现脾肿大。CLP小鼠的总脾细胞确实比假手术小鼠高2.2倍(分别为144×10^6和73×10^6个细胞;图14A)。MVA-hIL-7-Fc治疗导致与假手术小鼠相似的总脾细胞数(70×10^6个细胞)。这个结果令人感兴趣,因为它表明MVA-hIL-7-Fc有助于脓毒症CLP小鼠的免疫系统恢复正常的生理状况。

[0419] CLP小鼠的总T细胞($CD3^+$)与假手术小鼠相比显著减少(分别为7×10^6和25×10^6个细胞),这是在脓毒症CLP小鼠中诱导的免疫抑制的标志(图14B)。在给予MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠中,T细胞区室显著地部分恢复(12×10^6个细胞)表明MVA-hIL-7-Fc在CLP小鼠中有效,因为IL-7的主要已知作用之一是甚至在免疫抑制对象中诱导T细胞增殖。

[0420] 着眼于CD3+亚群,即C8+和CD4+T细胞,与假小鼠相比,两者在未治疗的CLP小鼠中都大大减少(图14C和D)。与CLP未治疗的小鼠相比,MVA-hIL-7-Fc显著提高了CD8+T细胞数,与假手术小鼠相比部分恢复了它们的数量(图14D)。MVA-hIL-7-Fc对CD4+T细胞群的作用不太明显,尽管这些细胞群有增加的趋势(图14C)。

[0421] MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)能够恢复CLP小鼠脾内的正常细胞数,这与该模型以及人类的脓毒症诱导发病机制有关。更具体地,它还能够部分恢复脾中的T细胞数(整体CD3+T细胞,特别是该群体中的CD8+T细胞),这些细胞数在未经治疗的CLP小鼠中显著下降。总体而言,武装的MVA显示至少部分恢复免疫抑制的脓毒症小鼠脾中T细胞的免疫稳态。

[0422] 2.3.3.2.2.细胞激活

[0423] 通过流式细胞术对表达CD69的细胞进行定量,研究了MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗对免疫细胞激活的作用。图15显示了脾的不同细胞亚群中$CD69^+$细胞数和百分比。

[0424] 与假手术小鼠(0.9×10^6个细胞)和CLP未治疗小鼠(1.9×10^6个细胞)相比,MVA-IL-7-Fc治疗的CLP小鼠(4×10^6个细胞)的脾中$CD69^+$B细胞的绝对计数(图15A)显著增加。

[0425] 对于$CD69^+$CD4 T细胞,虽然它们在假手术小鼠和CLP未治疗小鼠中的数量相似(分别为1.1×10^6和0.8×10^6个细胞),但与未治疗的CLP小鼠相比,在MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP

小鼠中$CD69^+$CD4 T细胞计数显著改善(1.3×10^6个细胞;图15B)。

[0426] 虽然$CD69^+$CD8 T细胞数在假手术小鼠和CLP小鼠之间相似(分别为0.35×10^6和0.25×10^6个细胞;图15C),但在用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠中测量到激活的$CD69^+$CD8 T细胞数显著增加(1.04×10^6个细胞)。

[0427] 在假手术小鼠和CLP未治疗的小鼠中表达激活标记CD69的NK细胞数同样相似(分别为0.2×10^6和0.3×10^6个细胞;图15D),并且在用MVA-hIL-7-Fc治疗后显著增加(0.8×10^6个细胞)。

[0428] 总而言之,这些数据表明,在脓毒症诱导后4天,MVA-hIL-7-Fc治疗诱导了CD4和CD8 T细胞区室的部分恢复,这对于它们在脓毒症免疫抑制的CLP小鼠的脾中具有重要意义。这一结果很重要,因为危重脓毒症患者的主要关注点之一是T细胞区室的恢复。此外,在CLP小鼠中施用MVA-hIL-7-Fc可增加各种细胞亚群中激活的细胞包括T、NK和B细胞数,这可能有助于对抗腹部感染。

[0429] 2.3.3.3.血液中免疫细胞亚群的鉴定

[0430] 2.3.3.3.1.细胞表型分型

[0431] 对于脾,还研究了与未治疗的CLP小鼠相比,在治疗的CLP小鼠中MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)对恢复血液中免疫细胞区室的作用。图16显示了在用或不用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠中每μL血液中不同细胞亚群的绝对计数。

[0432] 与未治疗的CLP小鼠相比,在被给予MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠中测量到显著更高浓度的总$CD3^+$细胞(分别为1310和794个细胞/μL;图16A)。

[0433] 在$CD3^+$细胞中,与未治疗的CLP小鼠相比,MVA-hIL-7-Fc治疗后CD4 T细胞的浓度显著增加(分别为577和336个细胞/μL;图16B)。

[0434] 虽然不显著,但与未治疗的小鼠相比,治疗的CLP小鼠血液中的CD8 T细胞浓度也有所增加(分别为595和396个细胞/μL;图16C)。

[0435] 对于NKT细胞,虽然在血液中检测到的数量很少,但在被给予MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠中测得的该细胞亚群浓度明显高于未治疗的CLP小鼠(分别为29和18个细胞/μL;图16D)。

[0436] 关于血液中的NK细胞也注意到了同样的观察结果。在MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的1μL血液中测得比未治疗的CLP小鼠更多的NK细胞(分别为272和154个细胞/μL;图16E)。

[0437] 与对照CLP小鼠相比,观察到用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠血液中B细胞浓度有所增加(分别为1951和1318个细胞/μL;图16F)。

[0438] 与未治疗的CLP小鼠相比,在治疗的CLP小鼠中也观察到一些$CD11c^+$细胞增加(分别为36和14个细胞/μL;图16G)。

[0439] 最后,与未治疗的CLP小鼠相比,在用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠中观察到特别强烈的$CD11b^+$细胞计数增加(分别为2514和1068个细胞/μL;图16H)。

[0440] 2.3.3.3.2.细胞激活

[0441] 通过流式细胞术对表达CD69的细胞进行定量,研究了MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗对循环免疫细胞亚群激活的作用。图17显示了不同血细胞亚群中$CD69^+$细胞数。与未治疗的CLP小鼠相比,MVA-hIL-7-Fc施用导致CLP小鼠中$CD69^+$CD4 T细胞增加4倍(分别为18.5

和4.7个细胞/μL;图17A)。

[0442] 在MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠中,血液中激活的CD8 T细胞也得到显著改善。在治疗的CLP小鼠中观察到与对照CLP小鼠相比每μL血液的$CD69^+$细胞多5倍(分别为69和14个细胞/μL;图17B)。

[0443] 对于B细胞,每μL MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠血液中$CD69^+$B细胞与未治疗的CLP小鼠相比增加3.7倍(分别为77和21个细胞/μL;图17C)。

[0444] 图17D说明了循环NK细胞的激活状态。治疗的CLP小鼠血液中$CD69^+$NK细胞的浓度与未治疗的CLP小鼠相比增加3.8倍(分别为180和48个细胞/μL)。

[0445] 总体而言,我们示出MVA-hIL-7-Fc显著增强了脓毒症免疫抑制小鼠血液中的T细胞区室,特别是CD4 T细胞计数。该结果具有临床意义,因为脓毒症患者血液中的T细胞数严重受损。此外,在CLP小鼠中施用MVA-hIL-7-Fc后,几种细胞亚群(包括T、B和NK细胞)的激活得到增强。这一结果很有意义,因为MVA-hIL-7-Fc治疗可以通过激活循环免疫细胞来增强危重脓毒症患者受损的免疫系统,从而加速控制新感染和/或预防它们。

[0446] 2.3.3.4.MVA-hIL-7-Fc治疗对T细胞功能的作用

[0447] 脓毒症免疫抑制患者的免疫细胞功能严重受损,对继发感染高度敏感,导致高死亡率。因此,在脓毒症患者中恢复或增强免疫细胞的功能非常重要。随后研究了MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗对CLP诱导的脓毒症小鼠的免疫功能特别是适应性免疫的改善。

[0448] 2.3.3.4.1IFNγELISpot测定

[0449] 图18A显示IFNγELISpot测定响应于用抗CD3抗体刺激总脾细胞的结果。与假手术小鼠和未治疗的CLP小鼠组(分别为17和48个斑点/10^5个细胞)相比,MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗导致CLP小鼠脾中产生IFNγ的T细胞频率显著增加(1314个斑点/10^5个细胞)。

[0450] 图18B示出了三组中每组的斑点大小(平均值)。虽然假手术小鼠和未治疗的CLP组的斑点平均大小相似(分别为5×10^{-3}和$7\times10^{-3}mM^2$),但用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠细胞获得的平均值显著增加2.6倍($18\times10^{-3}mM^2$),反映了来自MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的每个IFNγ产生细胞产生更大量IFNγ的能力(斑点大小与每个细胞产生的IFNγ量成正比)。

[0451] 这一结果很重要,因为脓毒症患者的T细胞IFNγ应答被描述为是受损的。MVA-hIL-7-Fc治疗确实可以增强免疫抑制脓毒症对象的适应性免疫系统,以预防或对抗感染,从而提高他们的生存率。

[0452] 2.3.3.4.2三重胞内细胞因子染色测定

[0453] 还通过确定在用抗CD3和抗CD28抗体刺激后产生IFNγ、IL2和/或TNFα的CD4和CD8 T细胞的百分比评估了T细胞的功能。

[0454] 图19A显示了在总CD4 T细胞中表达一种、两种或三种细胞因子的CD4 T细胞的总百分比。令人感兴趣的是,MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)治疗能够增强CD4应答。用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的脾细胞测量到产生细胞因子的CD4 T细胞的百分比与未治疗的CLP小鼠相比显著更高(分别为27%和20%)。

[0455] 关于CD8 T细胞应答(图19B),令人印象深刻的是,在施用MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠中产生细胞因子的CD8 T细胞的百分比与未治疗的CLP小鼠相比加倍(分别为63%和32%)。

[0456] 图20示出在执行的ICS测定中通过MVA-hIL-7-Fc治疗显著改善的总CD4T细胞群中

双或三细胞因子阳性CD4 T细胞亚群的百分比。与未治疗的CLP小鼠相比，MVA-hIL-7-Fc显著增强了IFNγ$^+$TNFα$^+$(分别为0.2％和0.9％)和IL2$^+$TNFα$^+$(分别为6.9％和9.4％)CD4 T细胞亚群(图20A-B)。平行地，给予MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠中三重IFNγ$^+$IL2$^+$TNFα$^+$CD4 T细胞的百分比高于未治疗的CLP小鼠(分别为2.3％和1.0％;图20C)。

[0457] 图21示出通过MVA-hIL-7-Fc显著改善的总CD8 T细胞群中单、双或三重细胞因子阳性CD8 T细胞亚群的百分比。在单细胞因子阳性CD8 T细胞中，与未治疗的CLP小鼠相比，用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠中IFNγ$^+$CD8T细胞亚群的百分比显著增加了2.2倍(分别为7.0％和3.2％)(图21A)。关于双细胞因子阳性CD8 T细胞，与未治疗的CLP小鼠相比，用MVA-hIL-7-Fc治疗CLP小鼠后，IFNγ$^+$TNFα$^+$CD8 T细胞亚群显著增加(分别为18.8％和2.3％)(图21B)。值得注意的是，虽然在假手术小鼠中几乎检测不到三细胞因子阳性CD8 T细胞，但与未治疗的CLP小鼠的细胞相比之下，用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的脾细胞获得了三重IFNγ$^+$IL2$^+$TNFα$^+$CD8 T细胞的重要诱导(分别为7.7％和1.7％)(图21C)。

[0458] 总之，来自ELISPOT和ICS测定的数据表明MVA-hIL-7-Fc能够改善CLP小鼠中CD4和CD8 T细胞的功能。因此，MVA-hIL-7-Fc治疗可能有助于通过提高快速产生细胞因子的T细胞的百分比来帮助重症患者的免疫系统抵抗或预防感染。

[0459] 2.3.3.4.3.T细胞释放的细胞因子

[0460] T细胞的功能也通过确定在体外激活T细胞受体后产生的促炎和抗炎细胞因子的水平来评估。总脾细胞在抗CD3抗体包被的96孔板中培养24小时，收集上清液用于定量细胞因子。

[0461] 测量的细胞因子是IL-1β、IL-6、TNFα、IFNγ和IL-10(图22)。除了IL-6在来自未治疗的CLP小鼠的细胞上清液中已经显著高于假手术小鼠之外(图22B)，来自假手术小鼠和未治疗的CLP小鼠的细胞上清液显示相似量的细胞因子(图22A;C-E)。值得注意的是，来自MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的细胞上清液总是显示比未治疗的CLP和假手术小鼠显著更大量的所有测试细胞因子(图22A-E)。值得注意的是，IL-1β的水平总体上低于其他细胞因子之一。尽管如此，MVA-hIL-7-Fc在刺激的脾细胞上清液中使这种细胞因子的产量增加了6.4倍。对于IL6、TNFα、IFNγ和IL10，与未治疗的CLP小鼠的细胞相比，MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠细胞上清液中的检测量分别增加了4、3、5.5和2.5倍。

[0462] 这个额外的读数清楚地提示表明，与未治疗的脓毒症小鼠相比，MVA-hIL-7-Fc能够提高脓毒症小鼠脾细胞产生和分泌促炎细胞因子和抗炎细胞因子的能力。人们可能期望MVA-hIL-7-Fc可能因此有助于通过改善T细胞功能来帮助宿主免疫系统预防或抵抗感染

[0463] 2.4空白MVA和MVATG18897在CLP小鼠中的体内对比

[0464] 为了确定MVA载体的作用和hIL-7-Fc武装的作用，进行了一个实验来比较用空白MVA(单独的载体活性)和MVATG18897(IL-7活性+载体活性)治疗的CLP小鼠。值得注意的是，未经治疗的健康小鼠被用作免疫学测定的阳性对照，但未在此处显示。

[0465] 第0天，CLP在25只小鼠中诱导了脓毒症。第4天仍然存活的一半小鼠接受空白MVA治疗，另一半接受MVATG18897治疗。小鼠被随访至第7天并处死以进行免疫测定。

[0466] 2.4.1存活

[0467] 在所有CLP小鼠中，从D0到D4，即在D4的MVA-hIL-7-Fc(MVATG18897)或MVATGN33.1(空白MVA)治疗之前，跟踪小鼠的存活(图23A)。25只CLP小鼠中有18只(72％)在D4时仍然存

活。在D4,将存活的CLP小鼠分成两组:在D4给予MVA-hIL-7-Fc的CLP小鼠(n=9)和用空白MVA治疗的CLP小鼠(n=9)。在D7,虽然6/9空白MVA治疗的CLP小鼠(67%)仍然活着,但所有用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠(9/9)都存活(图23B)。

[0468] 该结果表明,与空白MVA相比,MVA-hIL-7-Fc提高了CLP诱导的脓毒症小鼠的存活率,提示存活率不仅是由于MVA活性,而且至少是由于IL-7武装或者甚至是由于MVA载体和IL-7武装的组合。

[0469] 2.4.2.MVA-hIL-7-Fc与空白MVA在血细胞亚群上的作用的比较

[0470] 通过流式细胞术评估经空白MVA和MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠血液中的细胞亚群。图24显示了与空白MVA相比,MVA-hIL-7-Fc显著增加的细胞群。与CLP小鼠中的空白MVA治疗相比,MVA-hIL-7-Fc治疗使循环$CD8^+$T细胞(图24A)以及NKT细胞(图24B)的平均数量几乎翻了一番。值得注意的是,与空白MVA治疗相比,MVA-hIL-7-Fc治疗大大改善了血液中CD11b+细胞数,增加了超过3倍(图24C)。

[0471] 总的来说,这些数据证明了IL-7武装对脓毒症小鼠中这些免疫细胞群的能力。这些细胞数在脓毒症情况下发生了变化,这提示MVA-hIL-7-Fc能够触发此类T细胞数的增加。

[0472] 2.4.3.MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比对CLP小鼠T细胞功能的比活性

[0473] 使用三重ICS测定(IFNγ、TNFα和IL2)评估抗CD3和抗CD28刺激的脾细胞的功能。

[0474] 图25显示在两组中用ICS检测到的产生1、2或3种细胞因子的CD4+T细胞的百分比。图25A显示产生至少一种细胞因子的CD4+T细胞的总百分比。MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比诱导显著更高百分比的CD4+T细胞产生至少一种细胞因子(分别为44%和26%)。图25B显示了所有产生IFNγ的CD4+T细胞,所有产生TNFα的CD4+T细胞,以及所有产生IL2的CD4+T细胞。数据清楚地表明,MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比能够增加这些产生细胞因子的群体中每一个的百分比(对于经空白MVA治疗的小鼠,分别为2.6%、10.1%和15.4%;对于MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠,分别为5.6%、38.7%和28.8%)。关于产生双细胞因子和三细胞因子的细胞,图25C显示与空白MVA相比,这些细胞群中通过MVA-hIL-7-Fc得到显著改善的细胞群。MVA-hIL-7-FC与空白MVA相比强烈增加了产生IFNγ/TNFα(1.22%对0.53%)、IFNγ/IL2(0.45%对0.34%)、IL2/TNFα(20.2%对8.7%)和IFNγ/IL2/TNFα(3.6%对1.7%)的CD4+T细胞。

[0475] 图26显示在两组中用ICS检测到的产生1、2或3种细胞因子的CD8+T细胞的百分比。图26A显示产生至少一种细胞因子的CD8+T细胞的总百分比。,MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比诱导显著更高百分比的产生至少一种细胞因子的CD8+T细胞(分别为64%和28%)。图26B显示所有产生IFNγ的CD8+T细胞,所有产生TNFα的CD8+T细胞,以及所有产生IL2的CD8+T细胞。数据清楚地表明,MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比能够增加这些产生细胞因子的群体中的每一个的百分比(对于经空白MVA治疗的小鼠,分别为8.7%、17.5%和4.3%;对于MVA-hIL-7-Fc治疗的小鼠,分别为29.6%、60.5%和15.1%)。还检测到对于仅产生IFNγ的CD8+T细胞(4.6%对2.2%)和仅产生TNFα的CD8+T细胞(27.9%对17.5%),MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比导致一些显著的增加,如图26C所示。关于产生双细胞因子和三细胞因子的细胞,图26C显示MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比显著改善这些细胞群。MVA-hIL-7-Fc与空白MVA相比显著增加了产生IFNγ/TNFα(16.8%对4.3%)、IL2/TNFα(6.5%对1.6%)和IFNγ/IL2/TNFα(7.9%与2%)的CD8+T细胞。

[0476] 总的来说，该实验比较了MVA-hIL-7-Fc与空白MVA的效果，清楚地证明了MVA表达的hIL-7-Fc的特定活性，因为它在CLP小鼠中进行一次IV注射后改善了小鼠存活率，血液中的CD8+T细胞、NKT细胞和CD11b+细胞计数以及脾中的CD4和CD8+T细胞功能。

[0477] 2.5在CLP小鼠中比较MVATG18897和重组hIL-7-Fc蛋白

[0478] 在CLP小鼠模型中，对MVATG18897和hIL-7-Fc蛋白进行了平行测试。两者均在CLP后4天静脉内注射一次，并跟踪存活情况直至CLP后第7天(对应于产品注射后3天)，并在CLP后第7天监测来自脾的一些免疫细胞。

[0479] 2.5.1存活

[0480] 在第4天仍然存活的小鼠随机分组后(初始(naïve)组5只，MVA-IL-7-Fc或重组IL-7-Fc组5只，CLP未治疗小鼠4只)，观察到所有注射MVA-hIL-7-Fc的小鼠(5/5)在CLP后第7天存活，类似于在初始小鼠中观察到的存活(5/5，未接受任何治疗的非脓毒症小鼠，即：存活的阳性对照)(图30)。相比之下，分别只有3/4和3/5CLP未治疗的小鼠和重组hIL-7-Fc治疗的小鼠存活，表明存活优势与MVA-hIL-7-Fc而非重组可溶性对应物治疗相关。

[0481] 2.5.2在CLP小鼠中的免疫活性

[0482] 2.5.2.1激活的CD8+T细胞和B细胞

[0483] 从未治疗或用MVA-hIL-7-Fc或重组hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠的脾监测展示CD69激活标记的激活的CD8+T和B细胞(图31)。对于CD69+CD8+T细胞(图31A)，用MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠当与未治疗的CLP小鼠相比(增加约3倍)以及与用hIL-7-Fc蛋白治疗的CLP小鼠相比(增加约2倍)时显示显著更高的这些激活的细胞的数量。该结果表明，与重组hIL-7-Fc蛋白相比，MVA-hIL-7-Fc诱导激活的CD8+T细胞的能力更强，在新感染的情况下应该更具反应性。对于CD69+B细胞，经MVA-hIL-7-Fc治疗的CLP小鼠显示这些细胞数显著高于未治疗的小鼠(增加约2倍)。hIL-7-Fc蛋白治疗的CLP小鼠倾向于显示比未治疗的CLP小鼠略多的激活的B细胞，但这并不显著，与MVA-hIL-7-Fc相反。与hIL-7-Fc蛋白相比，MVA-hIL-7诱导的CD69+B细胞数是该蛋白本身诱导的约1.5倍。这提示与蛋白质hIL-7-Fc相比，MVA-hIL-7-Fc在诱导此类细胞方面具有优势，其能够在继发感染的情况下迅速启动免疫应答。

[0484] 2.5.2.2CD8+T细胞的功能

[0485] 对3组小鼠评估了来自脾的CD8+T细胞在TCR刺激后产生IFNγ和/或TNFα和/或IL-2的能力(图32)。与未治疗的CLP小鼠相比，MVA-hIL-7-Fc诱导显著更高百分比的产生IFNγ的CD8+T细胞(图32A)，并且这在所有类型的产生IFNγ的CD8+T细胞中得到验证，即仅产生IFNγ的细胞(图32B)，产生IFNγ和TNFα的细胞(图32C)以及产生IFNγ和TNFα和IL2的细胞(图32D)。蛋白质hIL-7-Fc也倾向于增加所有这些细胞类型，但仅在产生IFNγ和TNFα的CD8+T细胞以及产生IFNγ、TNFα和IL2的CD8+T细胞方面，百分比显著高于未治疗的小鼠。因此，hIL-7-Fc的作用不如MVA-hIL-7-Fc的作用重要，提示MVA-hIL-7-Fc诱导功能性CD8+T细胞的优势。

[0486] 2.6.优化的MVA-hIL-7-Fc

[0487] 设计、构建和产生了两种编码hIL-7-Fc的MVA，即MVATG18897和MVATG19791。它们都在相同的启动子(pH5R)下编码hIL-7-Fc，但在MVATG19791中，密码子针对蛋白质在人类细胞中的表达进行了优化。在体外比较MVATG18897和MVATG19791的hIL-7-Fc表达。如图33A和B所示，CEF或A549细胞被MVATG18897或MVATG19791感染。使用抗IL-7抗体通过Western印

迹检测细胞或上清液中表达的hIL-7-Fc。在两种类型的细胞中，在细胞和上清液中，与MVATG18897相比，MVATG19791检测到更高量的hIL-7-Fc，这是通过更大和更强的条带观察到的。

[0488] 当被MVATG18897或MVATG19791感染时，两种细胞类型产生的hIL-7-Fc的量通过对感染细胞的上清液进行ELISA而测定。如图33C所示，用MVATG19791检测到的hIL-7-Fc的量优于用MVATG18897检测到的量(在两种细胞类型中用MVATG19791检测到的蛋白质高出约1.5倍)，证实了蛋白质hIL-7-Fc通过优化的MVATG19791更强表达。

[0489] 在健康小鼠中，比较了MVATG18897和MVATG19791，它们显示出与预期相当的hIL-7-Fc药动学和免疫活性(数据未显示)。

[0490] 2.7MVA-hIL-7-Fc产生的IL-7参与免疫抑制患者相关免疫途径和恢复免疫活性的能力，其中所述免疫抑制不是脓毒症诱导的

[0491] 为了说明MVA-hIL-7-Fc在不同免疫抑制临床环境中恢复免疫活性的有益价值，使用从不同患者队列获得的全血和/或PBMC进行了一系列分析。

[0492] 待测IL-7-Fc的来源通常是在MVATG18897以MOI为5感染原代人肝细胞后获得，在感染后24小时收获上清液。使用ELISA hIL-7试剂盒对上清液中的hIL-7-Fc进行定量，并储存在-70摄氏度。阴性对照上清液包括在用空白MVA(MVATGN33.1)感染后收集的那些和/或在与MVA-hIL-7-Fc相同的条件下收集的未感染细胞。

[0493] 2.7.1.ICU Covid-19免疫抑制患者

[0494] 2.7.1.1 pSTAT5在CD3+T细胞中的表达

[0495] 细胞因子IL-7识别介导信号传导途径的IL-7受体。IL-7信号传导通过Janus激酶1,3和磷酸肌醇3(PI3k)启动，导致信号转导物和转录激活因子5(STAT5)磷酸化。IL-7对这一早期途径的参与最终导致T细胞存活和增殖的增加。在用来自MVA-hIL-7-Fc感染的上清液刺激后评估经STAT5磷酸化的信号转导，以证明产生的IL-7-Fc的活性。图34显示在用来自MVATG18897或MVATGN33.1感染细胞或未感染细胞的上清液对COVID19+患者的全血进行10分钟离体刺激后在CD3+T细胞中检测到pSTAT5表达，其以比率表示(用MVATG18897或MVATGN33.1感染的或未感染的细胞上清液获得的值通过未刺激条件的值归一化)。测试了来自MVA感染的三种不同的上清液稀释度(1/2.5、1/5和1/10)和未感染的细胞的一种上清液稀释度(1/2.5)。如图所示，MVA-hIL-7-Fc上清液诱导pSTAT5表达的强烈增加，具有稀释效应(稀释度1/2.5、1/5和1/10分别乘以6.5、5.7和4.9)，而用空白MVA或未感染的上清液刺激后，未观察到pSTAT5表达增加。

[0496] 这些数据表明，由MVA-hIL-7-Fc产生的hIL-7-Fc被IL-7受体识别，并且可以通过STAT5的磷酸化启动IL-7信号传导。观察到的hIL-7-Fc介导的信号传导有望增加COVID19+患者T淋巴细胞的增殖并提高他们的生存率。

[0497] 2.7.1.2由CD4+T细胞产生的总IFNγ+和IFNγ+TNFα+IL-2+

[0498] 在用Duractive 1和来自MVA-hIL-7-Fc感染的上清液刺激后，通过对CD4+T细胞产生的IFNγ或IFNγTNFαIL-2进行细胞内染色评估CD4+T细胞的功能。

[0499] 图35A和35B显示了用MVATG18897或MVATGN33.1感染或未感染细胞的上清液离体刺激COVID19+患者全血3小时后，分别产生总IFNγ+或IFNγ+TNFα+IL-2+的CD4+T细胞的百分比，以比率表示(Duractive 1+MVATG18897或MVATGN33.1感染或未感染细胞的上清液的

值通过Duractive 1条件的值归一化)。含有hIL-7-Fc的上清液增加了产生总IFNγ的CD4+T细胞的百分比(图35A),并具有稀释效应(1/2稀释比为1.4,1/10稀释比为1.1)。观察到第一次稀释中来自空白MVA感染的上清液的贡献(1/2稀释比为1.18,1/10稀释比为1.0),表明病毒载体本身的作用。与其它上清液相比,观察到未感染细胞上清液的轻微影响(比率1.09)。上清液中的hIL-7-Fc增加了CD4+T细胞的IFNγ+TNFα+IL-2+产量(图35B),具有稀释效应(1/2稀释比为1.65,1/10稀释比为1.18)。在用来自空白MVA和未感染细胞的上清液以1/2稀释刺激全血细胞后观察到类似的效果(两者的比率均为1.3),表明由培养细胞产生的可溶性分子的作用。在1/10稀释度下没有观察到空白MVA上清液的影响。

[0500] 在ICU的COVID19+患者中,T细胞产生IFNγ的能力被描述为降低。收集的数据表明,MVA-hIL-7-Fc产生的IL-7-Fc促进了IFN-γ的产生,因此有望增强免疫抑制的COVID19+患者抵抗感染的适应性免疫应答并提高他们的生存率。

[0501] 2.7.2.衰老创伤患者

[0502] 2.7.2.1CD8 T细胞中的CD57表达

[0503] 我们所研究的HIPAGE队列中分析了是众所周知的T细胞衰老标志物的CD57的存在。正如预期和图36所示,来自衰老对照和髋部骨折患者的CD8 T细胞高度表达CD57。此外,在髋部骨折患者中观察到该标记物略有增加。

[0504] 2.7.2.2CD3+T细胞中pSTAT5的表达

[0505] 在用来自MVA-hIL-7-Fc感染细胞的上清液刺激后评估通过STAT5磷酸化的信号转导。图37A显示在将解冻的PBMC用MVATG19791(SN IL-7-Fc)或MVATGN33.1(SN N33)的上清液离体刺激或未刺激10分钟后,CD3+细胞中的pSTAT5表达。

[0506] 虽然未刺激的CD3+细胞不表达pSTAT5,但仅在髋部骨折患者中用空白MVA上清液刺激的CD3+细胞略有增加。相反,对于两个患者组,MVA-hIL-7-Fc上清液诱导CD3+细胞中pSTAT5表达的显著增加。

[0507] 这些数据表明,上清液中产生的hIL-7-Fc被IL-7受体识别,并可通过STAT5的磷酸化启动IL-7信号传导。因此,预计hIL-7-Fc介导的信号转导会增加T细胞增殖。

[0508] 2.7.2.3T细胞增殖

[0509] 评估在用来自MVA-hIL-7-Fc感染细胞的上清液刺激后增殖的CD3+细胞的比例。图37B显示在将解冻的PBMC用MVATG19791或MVATGN33.1的上清液离体刺激5天后或未刺激后CD3+细胞中的增殖诱导。

[0510] 虽然在未刺激的CD3+细胞和用空白MVA上清液刺激的CD3+细胞中未诱导T细胞增殖,但MVA-hIL-7-Fc上清液强力诱导T细胞增殖,特别是在髋部骨折患者组中。

[0511] 上清液中产生的hIL-7-Fc增加了T细胞增殖,因此有望参与衰老髋部骨折患者手术后的免疫修复。

[0512] 2.7.3.ICU创伤患者

[0513] 在用PMA/离子霉素或抗CD3/CD28抗体以及MVA-hIL-7-Fc感染的上清液刺激后,通过对CD4+T细胞产生的IFNγ或IFNγTNFαIL-2进行细胞内染色,评估来自重度多创伤患者的CD4+T淋巴细胞的功能。

[0514] 图38A和38B显示了在强力(PMA/离子霉素)或中度(抗CD3/CD28)激活下,对创伤患者的PBMC离体刺激5小时后,分别产生总IFNγ+或IFNγ+TNFα+IL-2+的CD4+T细胞的百分

比。在来自MVATG19791或MVATGN33.1感染的原代肝细胞的上清液存在下进行刺激。

[0515] 含有hIL-7-Fc的上清液大大增加了产生总IFNγ的CD4+T细胞的百分比(图38A)。在用PMA/离子霉素强力激活T细胞后,18%的CD4+T细胞在存在MVA-hIL7上清液的情况下表达IFNγ,而对照组为10.5%。测量了来自空白MVA感染的上清液的贡献(13.7%)。在SN IL7和对照组(分别为3.8%和2.2%)之间用抗CD3/CD28适度激活后进行了相同的观察。在未刺激的细胞中未观察到IFNγ表达。

[0516] 更具体地说,上清液中的hIL-7-Fc增加了表达IFNγ+、TNFα+和IL-2+的多功能CD4+T细胞的百分比(图38B)。在用PMA/离子霉素强力激活T细胞后,13.5%的CD4+T细胞在存在MVA-hIL7上清液的情况下表达IFNγ,而对照组为8%。测量了来自空白MVA感染的上清液的贡献(10.5%)。在SN IL7和对照组(分别为2%和0.9%)之间用抗CD3/CD28适度激活后进行了相同的观察。在未刺激的细胞中未观察到IFNγ表达。

[0517] 这些数据表明,上清液中产生的hIL-7-Fc增加T细胞产生IFNγ的能力,因此有望参与重度多发性创伤性休克后免疫抑制患者适应性免疫应答的恢复。

[0518] 2.7.3.ICU大手术患者

[0519] 在用PMA/离子霉素或抗CD3/CD28抗体以及来自MVA-hIL-7-Fc感染的上清液刺激后,通过对CD4+T细胞产生的IFNγ或IFNγ TNFαIL-2进行细胞内染色,评估来自大手术患者的CD4+T细胞的功能。

[0520] 图39A和39B显示了在强力(PMA/离子霉素)或中度(抗CD3/CD28)激活下,对大手术患者的PBMC离体刺激5小时后,产生总IFNγ+或IFNγ+TNFα+IL-2+的CD4+T细胞百分比。在来自MVATG19791或MVATGN33.1感染的原代肝细胞的上清液存在下进行刺激。

[0521] 含有hIL-7-Fc的上清液大大增加了产生总IFNγ的CD4+T细胞的百分比(图39A)。在用PMA/离子霉素强力激活T细胞后,12.7%的CD4+T细胞在存在MVA-hIL7上清液的情况下表达IFNγ,而对照组为5.5%。在SN IL7和对照组(分别为3.8%和2.2%)之间用抗CD3/CD28适度激活后观察到相同的观察结果。在未刺激的细胞中未观察到IFNγ表达。

[0522] 更具体地说,上清液中的hIL-7-Fc增加了表达IFNγ+、TNFα+和IL-2+的多功能CD4+T细胞的百分比(图39B)。在用PMA/离子霉素强力激活T细胞后,8.2%的CD4+T细胞在存在MVA-hIL7上清液的情况下表达IFNγ,而对照组为2.5%。在SN IL7和对照组(分别为1.5%和0.6%)之间用抗CD3/CD28适度激活后观察到相同的观察结果。在未刺激的细胞中未观察到IFNγ表达。

[0523] 这些数据表明,上清液中产生的hIL-7-Fc增加T细胞产生IFNγ的能力,并因此有望参与大手术后免疫抑制患者适应性免疫应答的恢复,以对抗继发感染并提高他们的生存率。

[0524] 2.8结果的一般结论

[0525] 测试产品的主要效果可归纳如下:

[0526] MVA-hIL-7-Fc诱导循环hIL-7的产生,其在注射后迅速在血液中被清楚地检测到,并且在1次静脉内注射后长达4天仍能检测到。这种注射还诱导了循环IFNγ的瞬时产生,在注射后不久即可检测到。这种IFNγ的产生是由MVA载体本身诱导的。

[0527] 在未经实验的小鼠中,在一次静脉注射MVA-hIL-7后观察到脾细胞数量增加,特别是CD4+T细胞、CD8+T细胞、中性粒细胞、髓样树突细胞(mDC)和单核细胞(所有三种亚群

$Ly6C^{high}$、$Ly6C^{int}$和$Ly6C^{low}$)数量的增加。在来自脾的CD4+和CD8+T细胞中,MVA-hIL-7-Fc尤其增加效应记忆性和中央记忆性CD4+T细胞以及效应记忆性、中央记忆性和急性效应性CD8+T细胞的数量。在这些CD4+和CD8+T细胞中,抗凋亡蛋白Bcl2的表达在一次IV注射MVA-hIL-7-Fc后也得到改善。在MVA-hIL-7-Fc注射后也观察到胸腺细胞中Bcl2表达的增加和胸腺细胞比例的改变(双阳性CD4+/CD8+减少和单阳性CD4+或CD8+增加),这种作用主要由MVA载体本身介导(与空白MVA类似的观察结果)。在未经实验的小鼠中描述的所有这些活性清楚地证明了MVA-hIL-7-Fc的能力,该能力与表达的IL-7和空白MVA骨架的贡献有关,通过提高参与对抗感染的免疫细胞的数量、包括成熟的免疫细胞,并提高这些关键细胞中的基因存活表达,从而激活免疫系统。

[0528] 在未经实验的小鼠中,MVA-hIL-7-Fc显示可诱导肺中的免疫活性,该活性部分归因于所述骨架,部分归因于武装hIL-7-Fc。它提高了激活的T细胞和NK细胞的数量。

[0529] 此外,在脓毒症小鼠模型中,与未治疗小鼠以及用空MVA治疗的小鼠相比MVA-hIL-7示出可以提高存活率,这表明绝对有必要用hIL-7-Fc武装MVA以达到保护作用。在同一模型中,MVA-hIL-7-Fc被证明可以恢复正常的脾细胞计数并至少部分恢复T细胞计数,尤其是CD8+T细胞计数。在血液中,它改善一些免疫细胞的细胞计数。此外,它被证明也可以激活脓毒症小鼠脾和血液中的一些免疫细胞群,这些细胞随后准备好对抗新的感染攻击。MVA-hIL-7-Fc还显示能够增强T细胞的功能,特别是通过提高产生IFNγ的细胞的出现频率,每个细胞也能够产生更高数量的IFNγ。它还提高了能够产生TNFα、IL2或IFNγ、TNFα和IL2中的2或3种细胞因子的细胞的出现频率。对免疫细胞激活的影响似乎主要由MVA载体本身介导,而所有其它活性似乎主要是编码hIL-7-Fc的MVA特有的。

[0530] 当与重组hIL-7-Fc(类似于在MVA-hIL-7-Fc中编码的hIL-7-Fc)的活性相比时,它被证明是更优越的。例如,在未经实验的健康小鼠中,它在肺中诱导了显著更高数量的激活的T和NK细胞,并且在TCR刺激后,它还在脾和肺中诱导了显著更高百分比的产生细胞因子的CD8+T细胞。在CLP小鼠中,MVA-hIL-7-Fc比hIL-7-Fc蛋白具有更高的存活率,并在脾中诱导更强的免疫活性。例如,MVA-hIL-7-Fc诱导更多数量的激活的CD8+T细胞和B细胞,并且在诱导产生IFNγ(+/-其它细胞因子)的CD8+T细胞方面优于hIL-7-Fc蛋白。

[0531] 此外,使用基于来自三组免疫抑制临床状况(ICU Covid-19免疫抑制患者、衰老创伤患者和ICU创伤患者)的全血和/或PBMC的离体测定,我们已经证实由MVA-hIL-7-Fc产生的IL-7-Fc可以修复多种免疫损伤。

[0532] 总体而言,使用MVA-hIL-7-Fc获得的载体化形式的IL-7可诱导广泛的免疫调节,能够恢复和/或改善多种ICU临床状况(脓毒症、创伤、烧伤、大手术和/或冠状病毒引起的免疫抑制)或老年人群(衰老引起的免疫抑制)中的多种免疫抑制途径和功能。免疫应答的恢复和/或改善有助于患者抵抗和/或预防感染并加速整体康复。这些结果清楚地证实了在免疫抑制的情况下施用表达IL-7的非复制型病毒载体的重要性。

[0533] 参考书目

[0534] Adra et al.,1987,Gene 60:65-74

[0535] Antoine et al.,1998,Virol.244:365-96

[0536] Capasso et al.,2014,Viruses,6,832-855

[0537] Cervasi et al.,2015,J.of Virology,87(17):9420-9430

[0538] Chakrabarti et al.(1997,Biotechniques 23:1094-7

[0539] Chen et al.,2000,J I mMunol,165:6496-6503

[0540] Chen et al.,2015,J.of Virology,84(20):10522-10532

[0541] Choi et al.,2016,Clin Cancer Res;22(23):5898-5908

[0542] Chroboczek et al.,1992,Virol.186:280

[0543] Chu et al.,1997,J.Exp.Med.,186:1623

[0544] Dicks et al.,2012,PLoS One.;7(7):e40385

[0545] Dudareva et al.,2009,Vaccine 27:3501

[0546] Erbs et al.,2008,Cancer Gene Ther.15(1):18-28

[0547] Fallaux et al.,1998,Human Gene Ther.9:1909-1917

[0548] François et al.,2018,JCI Insight.;3(5):e98960

[0549] Gao et al.,2015,Int J Mol Sci.;16(5):10267-10280

[0550] Graham et al.,1997,J.Gen.Virol.36:59-72

[0551] Hamers et al.,2015,Minerva Anestesiol.,81(4):426-439

[0552] Ha mMond et al,1997,J.Virol Methods 66:135-8

[0553] Heftrig et al.,2017,Mediat Infla mM,article ID 2608349

[0554] Jia et al.,2019,Eur J Trauma Emerg S,https://doi.org/10.1007/s00068-019-01271-6

[0555] Kared et al.,2016,J I mMunol I mMunother,65(4):441-52

[0556] Kovac et al.,2005,Exp Gerontol.,40(7):549-55

[0557] Kritsch et al.,2005,J.Chromatogr.Anal.Technol.Biomed.Life Sci.,822:263-70

[0558] Kumar and Boyle,1990,Virology 179:151-8

[0559] Lusky et al.,1998,J.Virol 72:2022

[0560] Maniatis et al.,1989,Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor NY or subsequent editions

[0561] Mayr et al.,1975,Infection 3:6-14

[0562] Meisel et al.,2009,Am J Respir Crit Care Med.,180(7):640-8

[0563] Monneret et al.,2020,Intensive Care Med,46:1764-1765

[0564] N'Guyen et al.,2016,Molecular Therapy Oncolytics,3,15021

[0565] Nam et al.,2010,Eur.J.I mMunol.,40:351-358

[0566] Olivier et al.,2010,mAbs 2(4):405-15

[0567] PCR protocols-A guide to methods and applications,1990,Innis,Gelfand,Sninsky and White,Academic Press

[0568] Peruzzi et al.,2009,Vaccine 27:1293

[0569] Peters van Ton et al.,2018,Front I mMunol,9:1926

[0570] Ponchel et al.,2011Clinica Chimica Acta 412,7-16

[0571] Restagno et al.,2016,PLoS One,11(8):e0162109

[0572] Seo et al.,2014 J.of Virology 88(16):8998-9009

[0573] Shindo et al.,2015;43(4):334-343

[0574] Sutter and Moss,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10847-51

[0575] Takeyama et al.,2004,Critical Care 20048(Suppl 1):P207

[0576] Tartaglia et al.,1992,Virol.188(1):217-32

[0577] Tesfay et al.,2013,J.of Virology,87(7):3752-3759

[0578] The Science and Practice of Pharmacy,A.Gennaro,Lippincott,Williams& Wilkins

[0579] Thomson et al.,2019,Military Medical Research,6:11

[0580] Tritel et al.,2003,J.I mMunol.,171:2358

[0581] Unsinger et al.,2010,J I mMunol;184:3768-3779

[0582] Vanloan et al.,2017,J.I mMunol.Res.,Article ID 4807853

[0583] Venet and Monneret,2017,Nat Rev Nephrol.,14(2):121-137

[0584] Venet et al.,2012,J I mMunol November 15,189(10)5073-5081

[0585] Yamamoto et al.,2017,Cancer Sci 108(2017)831-837

[0586] US5,168,062

[0587] US5,879,924

[0588] WO94/28152

[0589] WO97/00326

[0590] WO98/02522

[0591] WO98/10088

[0592] WO01/66137

[0593] WO03/000283

[0594] WO03/046124

[0595] WO03/053463

[0596] WO03/104467

[0597] WO2005/007840

[0598] WO2005/042728

[0599] WO2005/071093

[0600] WO2007/056847

[0601] WO2007/077256

[0602] WO2007/147528

[0603] WO2007/147529

[0604] WO2008/114021

[0605] WO2008/129058

[0606] WO2008/138533

[0607] WO2009/004016

[0608] WO2009/073103

[0609] WO2009/073104

[0610] WO2009/100521

[0611] WO2009/105084

[0612] WO2009/136977

[0613] WO2010/086189

[0614] WO2010/130753

[0615] WO2010/130756

[0616] WO2012/001075

[0617] WO2013/022764

[0618] WO2017/037523

序列表

<110> TRANSGENE

<120> Treatment of immune depression

<130> B379956PCT D41706

<150> 20305798.9
<151> 2020-07-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 154
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

[0001]

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys Asp Lys
20 25 30

Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu
65 70 75 80

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
85 90 95

Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr
100 105 110

Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys
115 120 125

Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr
130 135 140

Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser Ile
145 150

<210> 2
<211> 177
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0002]

<400> 2

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160

[0003] Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His

<210> 3
<211> 381
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys Asp Lys
20 25 30

Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu
65 70 75 80

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
85 90 95

Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr
100 105 110

[0004] Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys
115 120 125

Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr
130 135 140

Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
195 200 205

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
225 230 235 240

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
245 250 255

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
260 265 270

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
275 280 285

[0005] Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
290 295 300

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
305 310 315 320

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
325 330 335

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
340 345 350

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
355 360 365

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 4
<211> 405
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60

[0006]

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu

145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
180 185 190

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
195 200 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
210 215 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225 230 235 240

[0007]

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
245 250 255

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
260 265 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
275 280 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

325 330 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

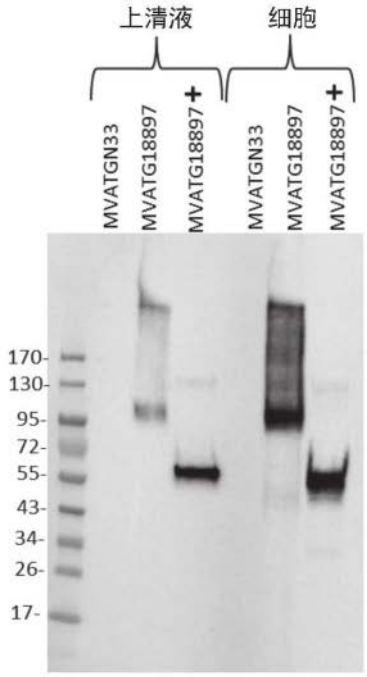
[0008]

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

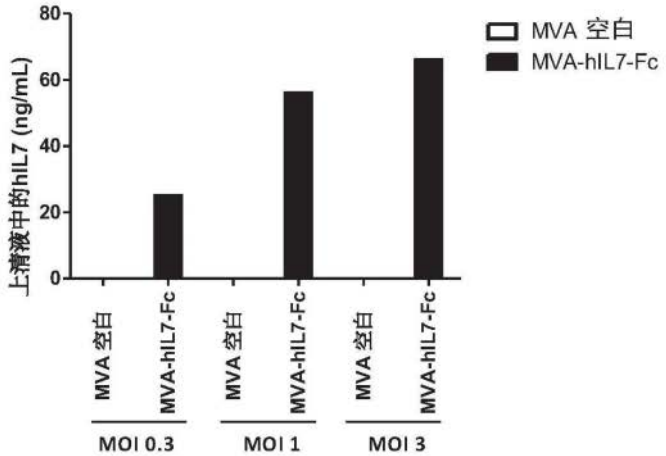
Leu Ser Pro Gly Lys
405

1A



IL-7-Fc IgG2预期大小：43 kDa,
N糖基化的3个位点
+：加入β-巯基乙醇
MVATGN33: MVA- 空白
MVATG18897 : MVA-hIL7-Fc

1B



1C

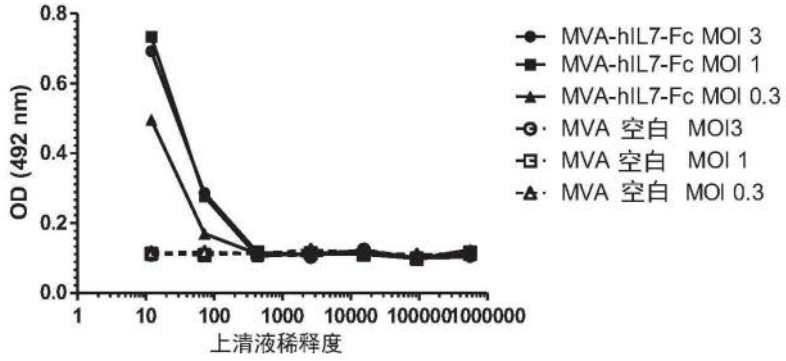
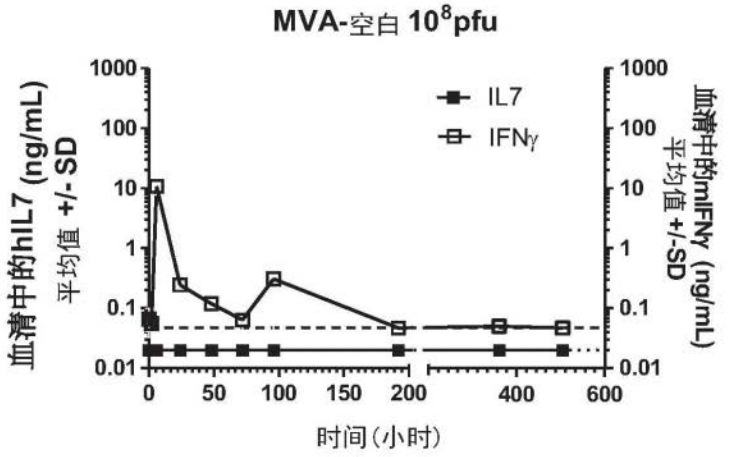
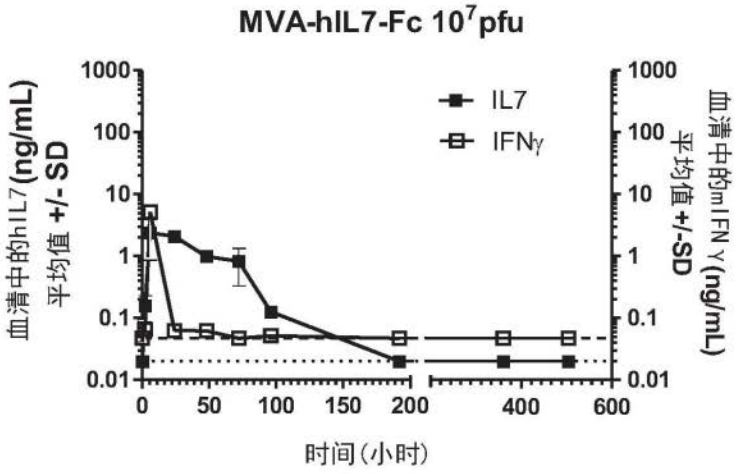


图1

2A


MVA-空白 10^8pfu
血清中的hIL7 (ng/mL)
平均值 +/- SD
血清中的mIFNγ (ng/mL)
平均值 +/-SD
IL7
IFNγ
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
50
100
150
200
400
600
时间(小时)

2B


MVA-hIL7-Fc 10^7pfu
血清中的hIL7(ng/mL)
平均值 +/- SD
血清中的mIFNγ(ng/mL)
平均值 +/-SD
IL7
IFNγ
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
50
100
150
200
400
600
时间(小时)

2C

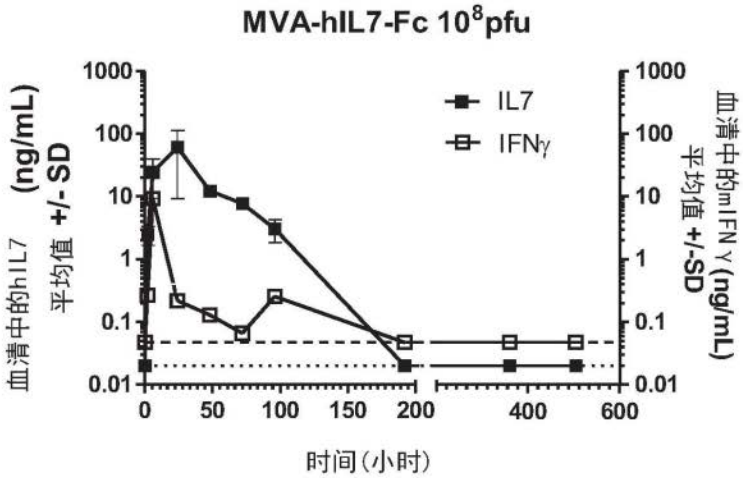
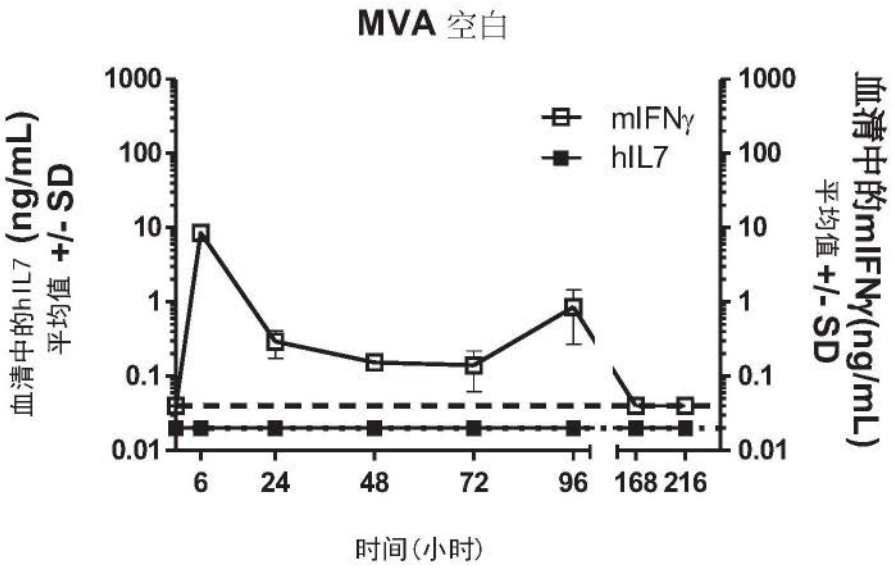

MVA-hIL7-Fc 10^8pfu
血清中的hIL7 (ng/mL)
平均值 +/- SD
血清中的mIFNγ(ng/mL)
平均值 +/-SD
IL7
IFNγ
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
50
100
150
200
400
600
时间(小时)

图2

3A


MVA 空白
血清中的hIL7 (ng/mL)
平均值 +/- SD
血清中的mIFNγ(ng/mL)
平均值 +/- SD
mIFNγ
hIL7
1000
100
10
1
0.1
0.01
6
24
48
72
96
168
216
时间(小时)

3B

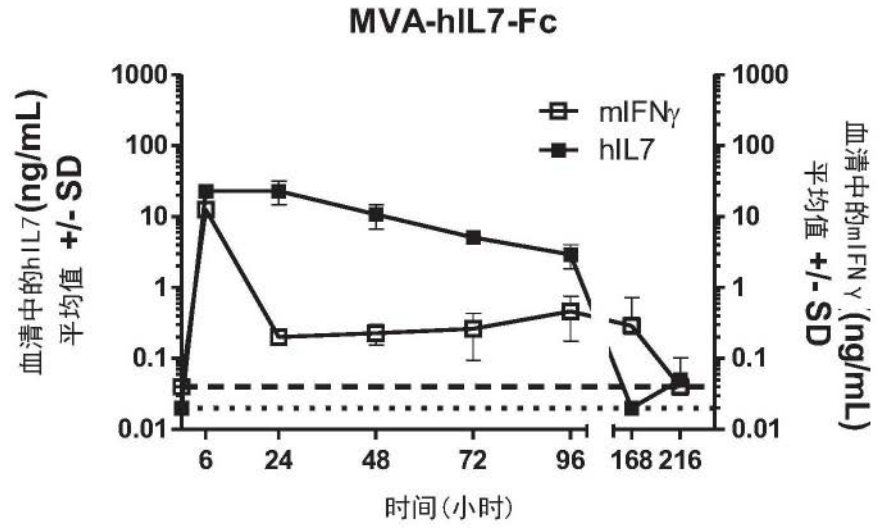

MVA-hIL7-Fc
血清中的hIL7(ng/mL)
平均值 +/- SD
血清中的mIFNγ(ng/mL)
平均值 +/- SD
mIFNγ
hIL7
1000
100
10
1
0.1
0.01
6
24
48
72
96
168
216
时间(小时)

图3

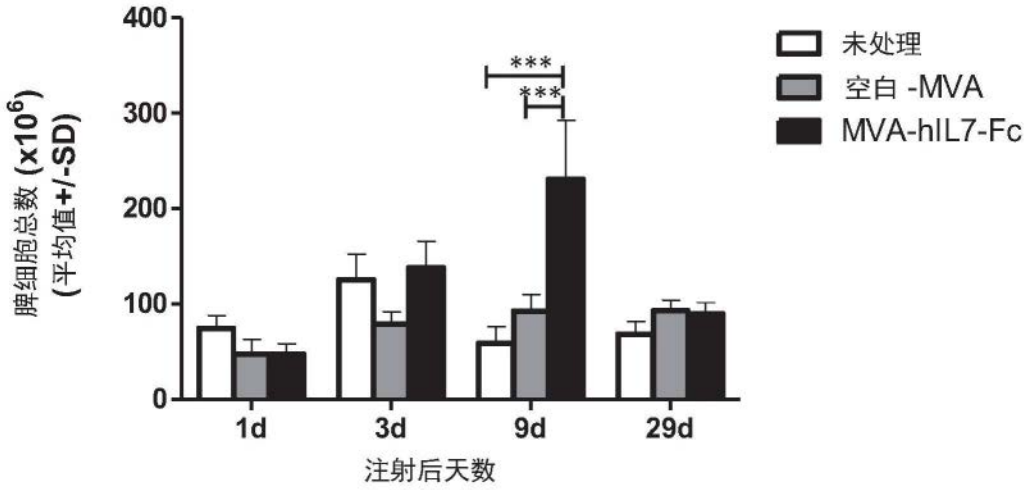
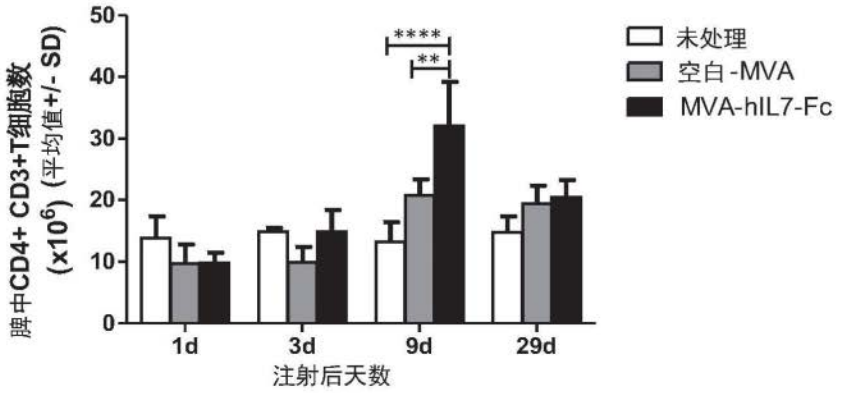
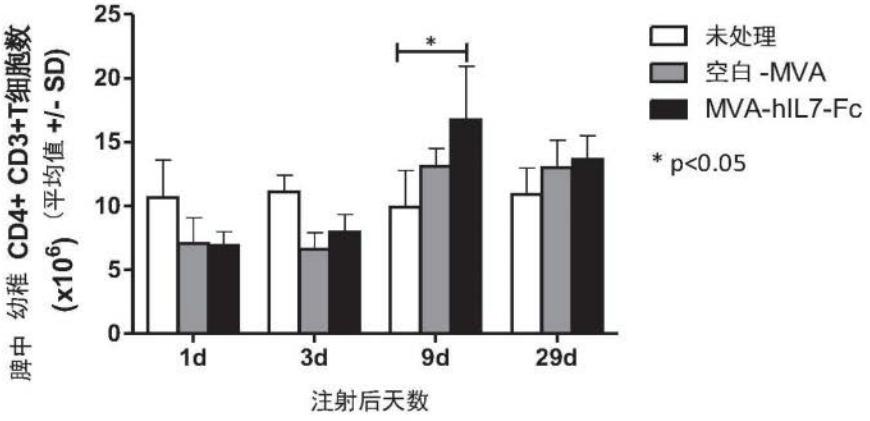

400
300
200
100
0
脾细胞总数 (x10^6)
(平均值+/-SD)
***
***
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

图4

5A


脾中CD4+ CD3+T细胞数
(x10^6) (平均值+/- SD)
50
40
30
20
10
0
****
**
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

5B


脾中 幼稚 CD4+ CD3+T细胞数
(x10^6) (平均值 +/- SD)
25
20
15
10
5
0
*
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc
* p<0.05

5C

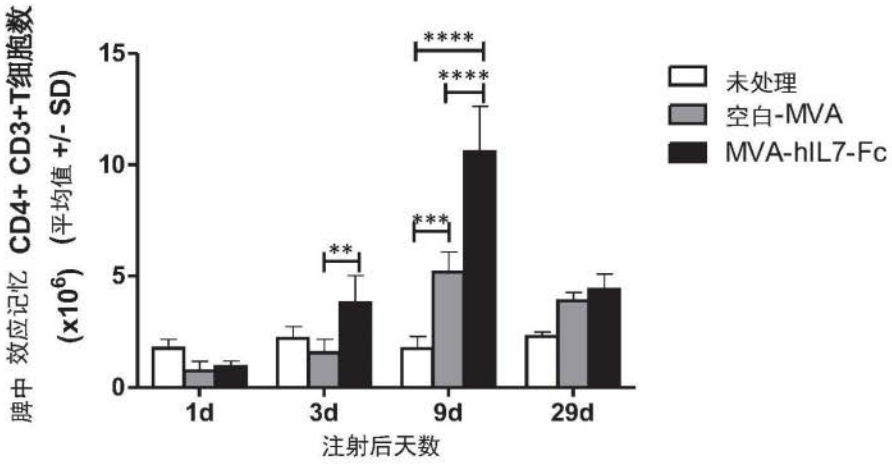
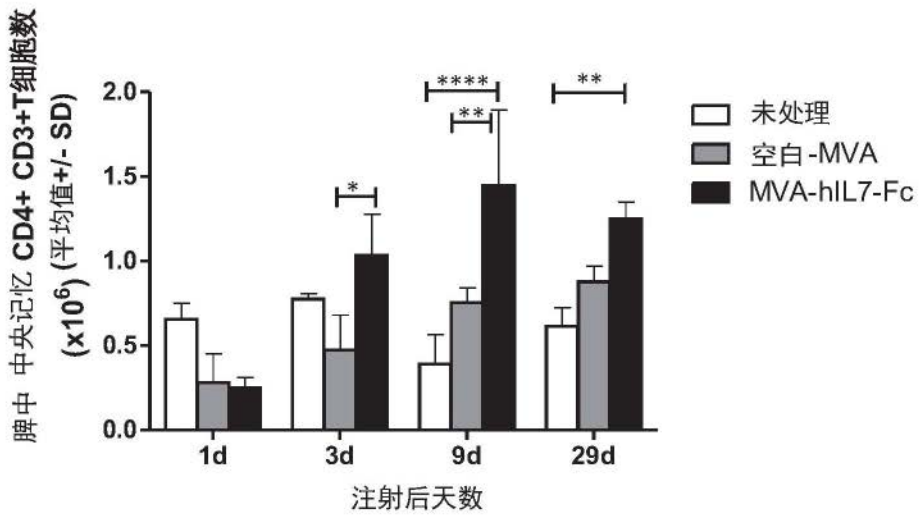

脾中 效应记忆 CD4+ CD3+T细胞数
(x10^6) (平均值 +/- SD)
15
10
5
0
****
****
***
**
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

图5

5D


脾中 中央记忆 CD4+ CD3+T细胞数
(x10^6) (平均值+/- SD)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1d
3d
9d
29d
注射后天数
****
**
*
**
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

5E

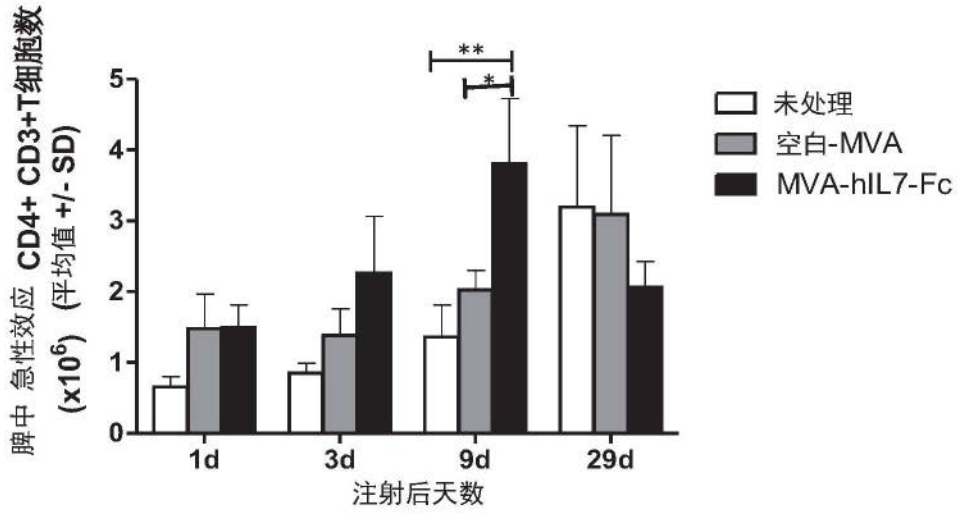
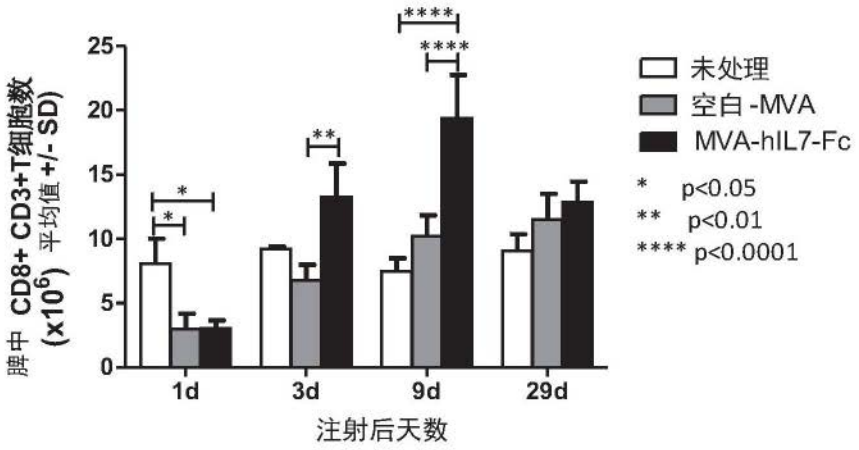
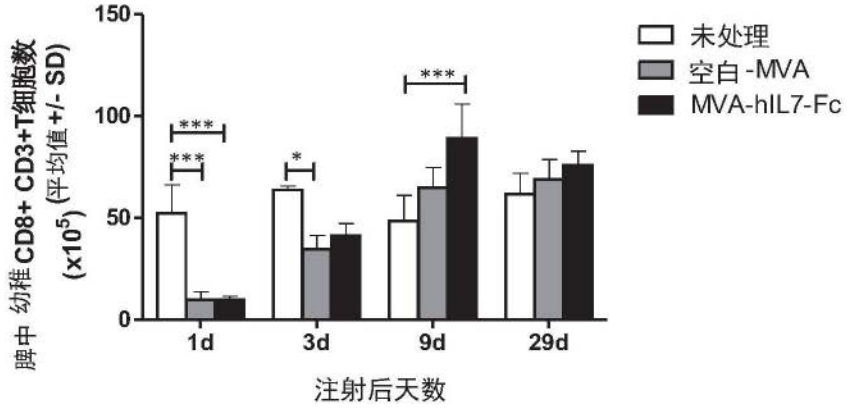

脾中 急性效应 CD4+ CD3+T细胞数
(x10^6) (平均值 +/- SD)
5
4
3
2
1
0
1d
3d
9d
29d
注射后天数
**
*
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

图5

6A


脾中 CD8+ CD3+T细胞数
(x10^6) 平均值 +/- SD)
25
20
15
10
5
0
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc
* p<0.05
** p<0.01
**** p<0.0001

6B


脾中 幼稚 CD8+ CD3+T细胞数
(x10^5)(平均值 +/- SD)
150
100
50
0
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

6C

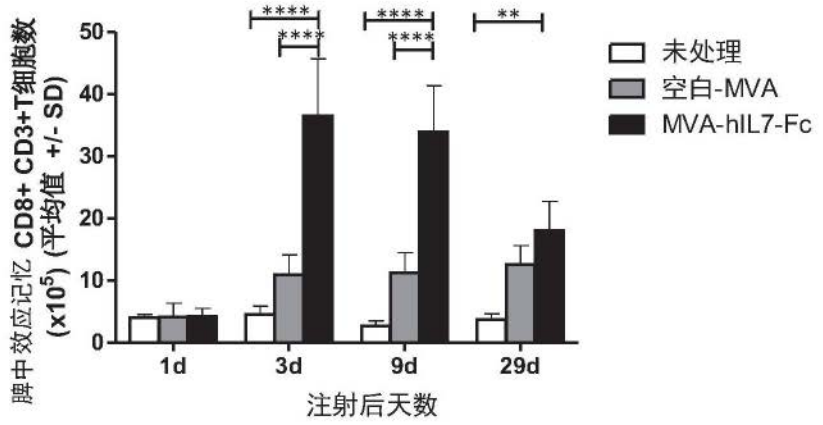
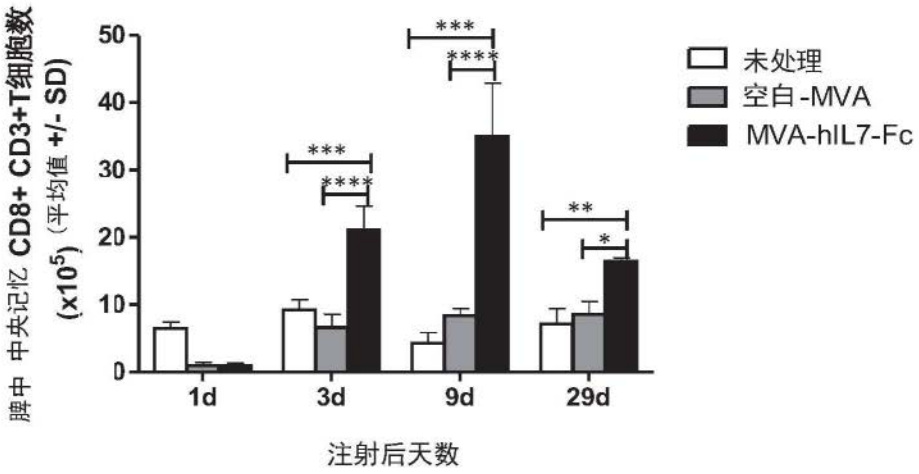

脾中效应记忆 CD8+ CD3+T细胞数
(x10^5) (平均值 +/- SD)
50
40
30
20
10
0
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

图6

6D


脾中 中央记忆 CD8+ CD3+T细胞数
(x10^5) (平均值 +/- SD)
50
40
30
20
10
0
***
****
***
****
**
*
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

6E

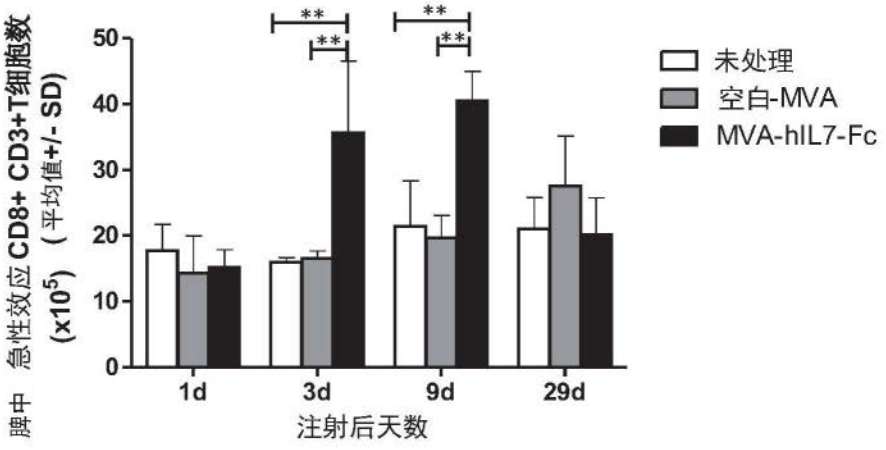
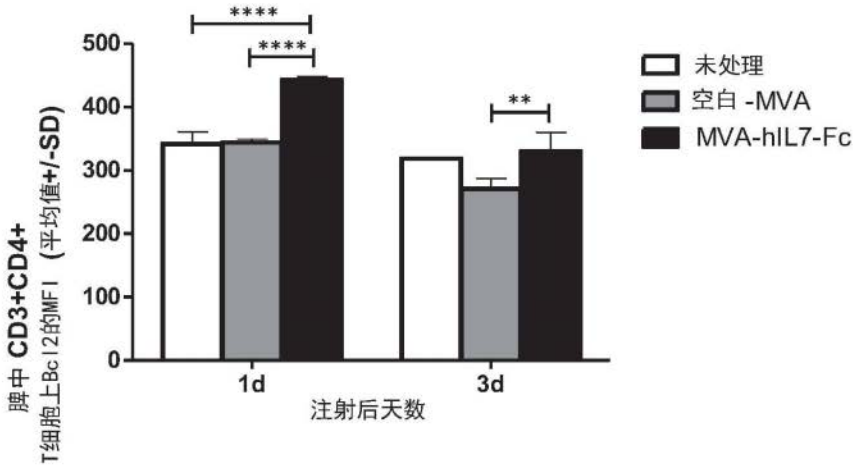
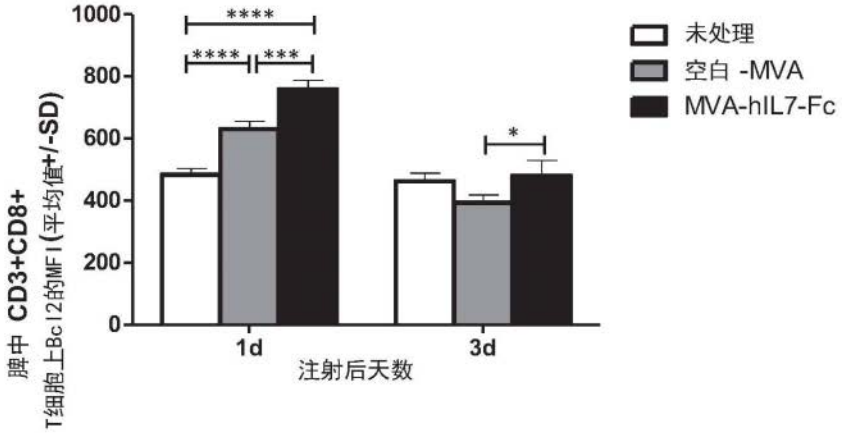

脾中 急性效应 CD8+ CD3+T细胞数
(x10^5) (平均值+/- SD)
50
40
30
20
10
0
**
**
**
**
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

图6

7A


****
****
**
500
400
300
200
100
0
脾中 CD3+CD4+
T细胞上Bcl2的MFI (平均值+/-SD)
1d
3d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

7B


****
****
***
*
1000
800
600
400
200
0
脾中 CD3+CD8+
T细胞上Bcl2的MFI(平均值+/-SD)
1d
3d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

7C

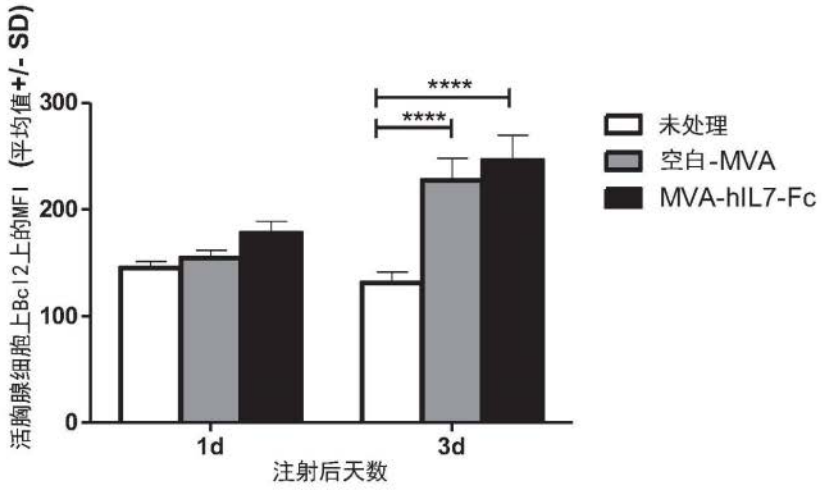

****
****
300
200
100
0
活胸腺细胞上Bcl2上的MFI (平均值+/- SD)
1d
3d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

图7

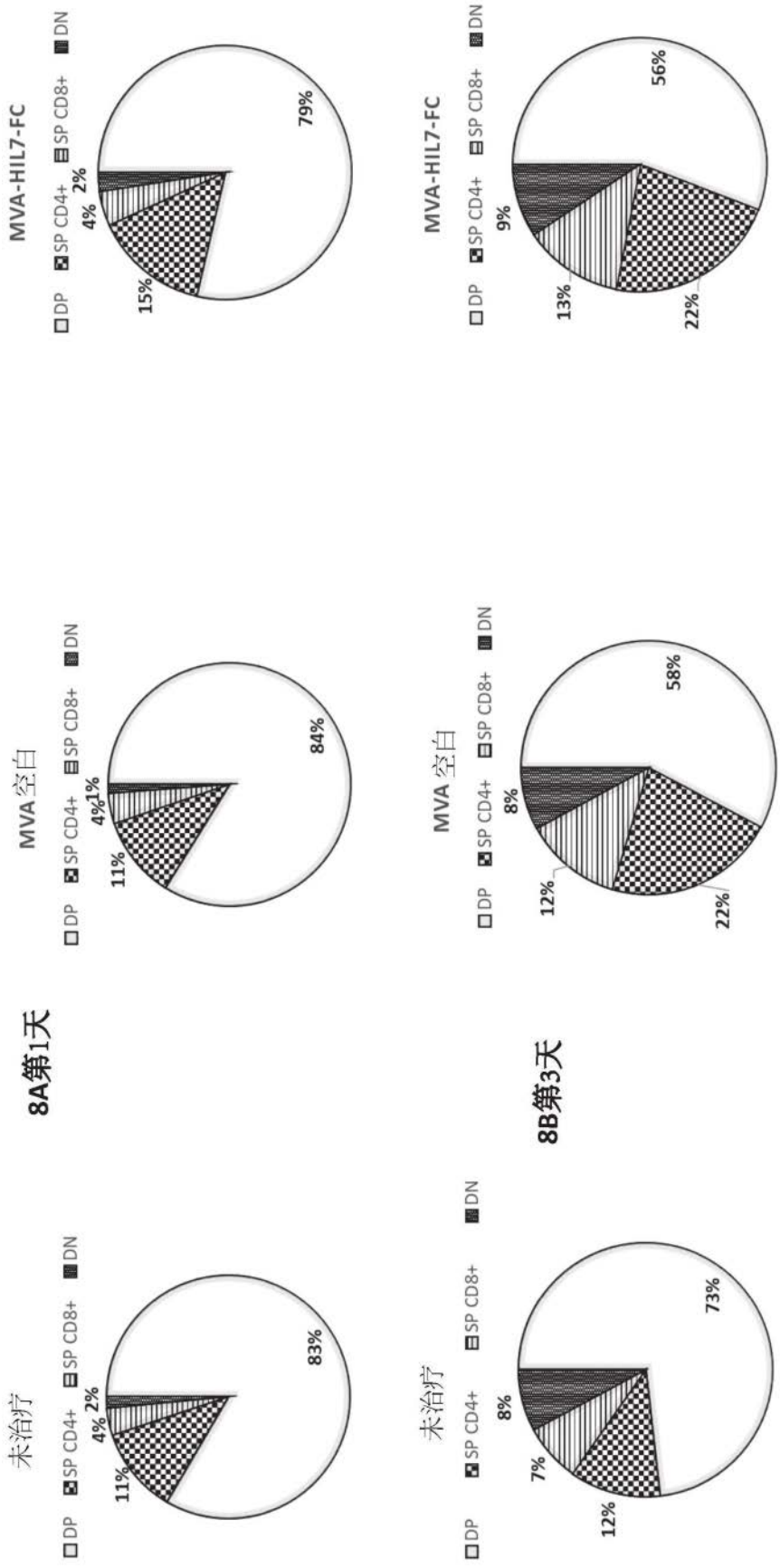
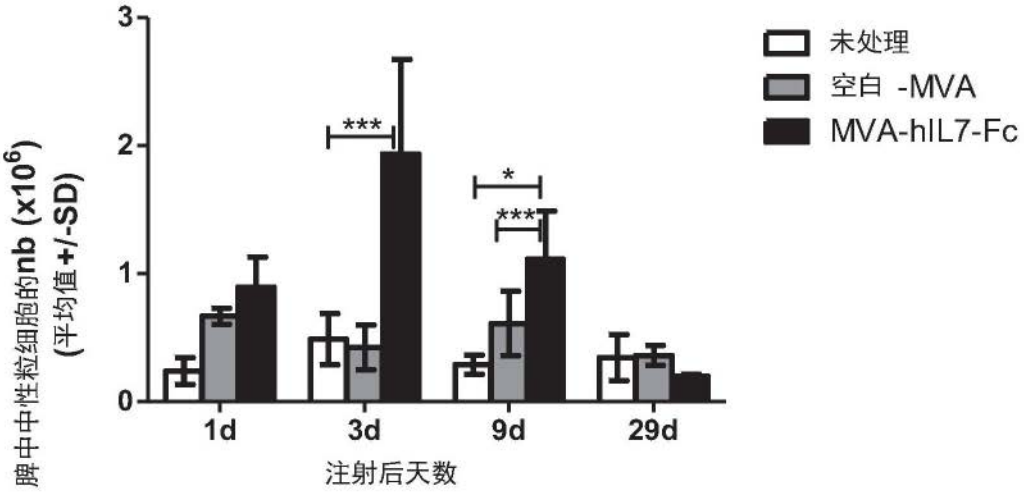

8A第1天
8B第3天
未治疗
MVA 空白
MVA-HIL7-FC
DP
SP CD4+
SP CD8+
DN
83%
11%
4%
2%
84%
11%
4%
1%
73%
12%
7%
8%
58%
22%
12%
8%
79%
15%
4%
2%
56%
22%
13%
9%

图8

9A


脾中中性粒细胞的nb (x10^6)
(平均值+/-SD)
3
2
1
0
***
*
***
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

9B

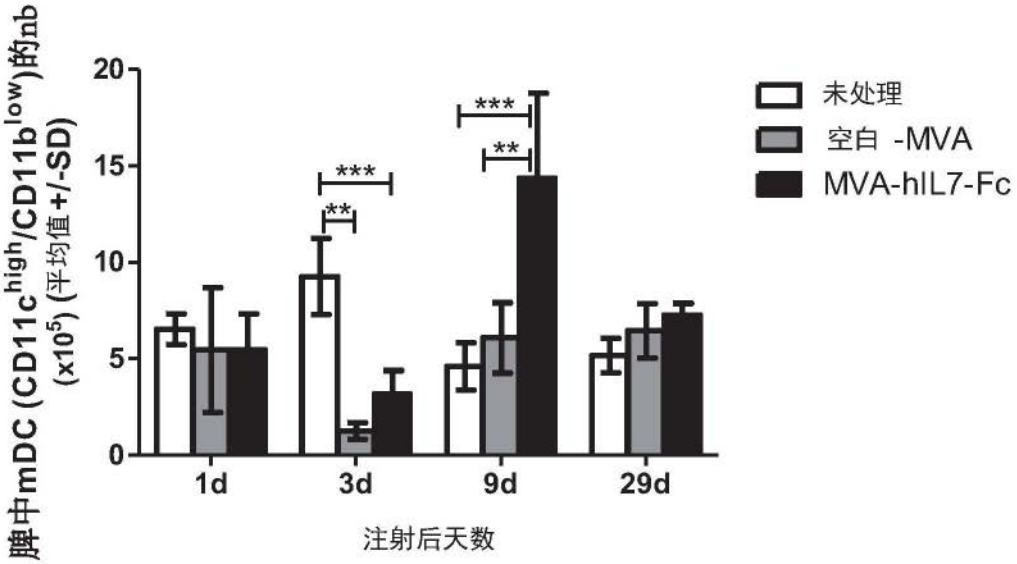
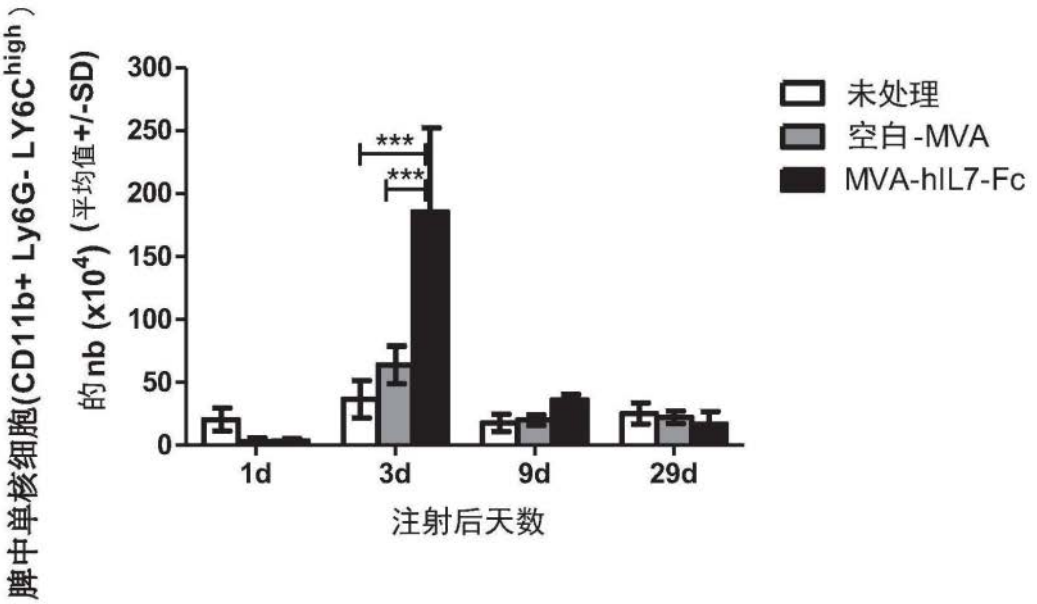

脾中mDC (CD11c^high/CD11b^low)的nb
(x10^5) (平均值+/-SD)
20
15
10
5
0
***
**
***
**
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

图9

10A


脾中单核细胞(CD11b+ Ly6G- LY6C^high)
的nb (x10^4) (平均值+/-SD)
300
250
200
150
100
50
0
***
***
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

10B

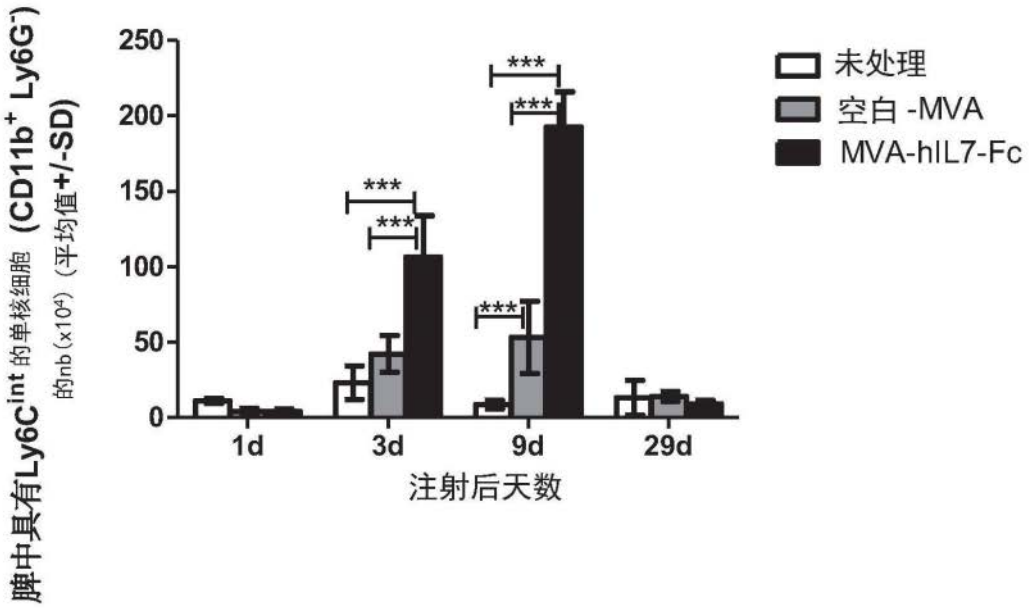

脾中具有Ly6C^int 的单核细胞 (CD11b+ Ly6G-)
的nb (x10^4) (平均值+/-SD)
250
200
150
100
50
0
***
***
***
***
1d
3d
9d
29d
注射后天数
未处理
空白-MVA
MVA-hIL7-Fc

图10

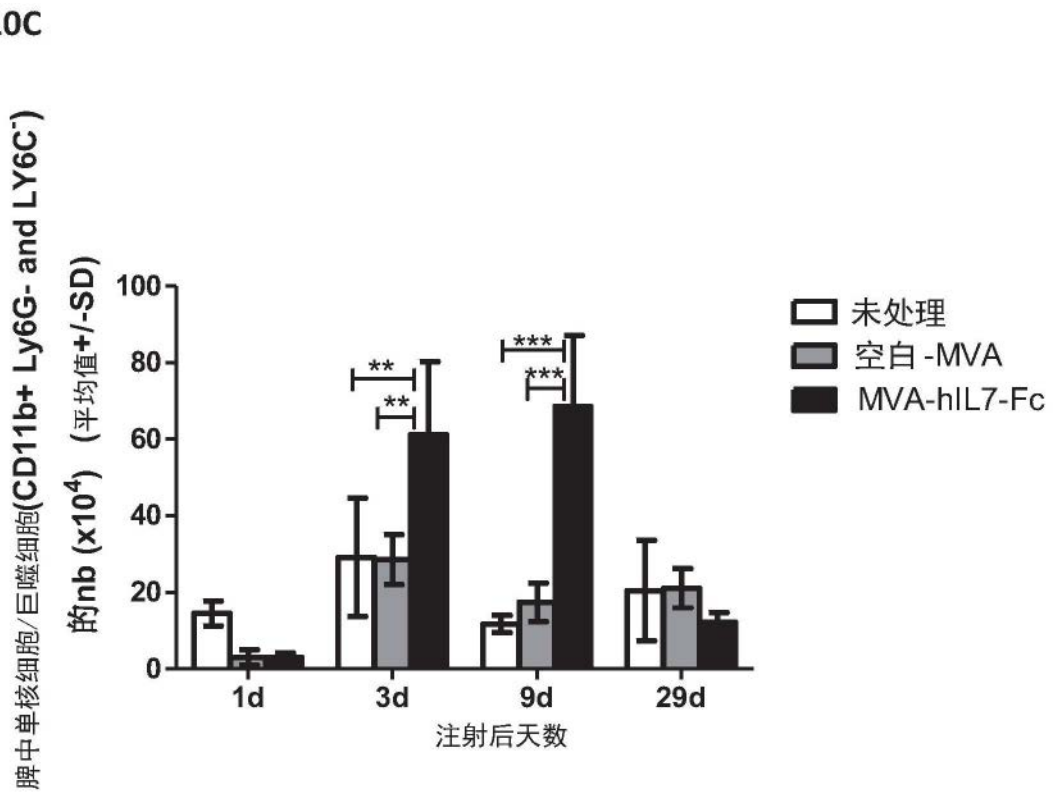
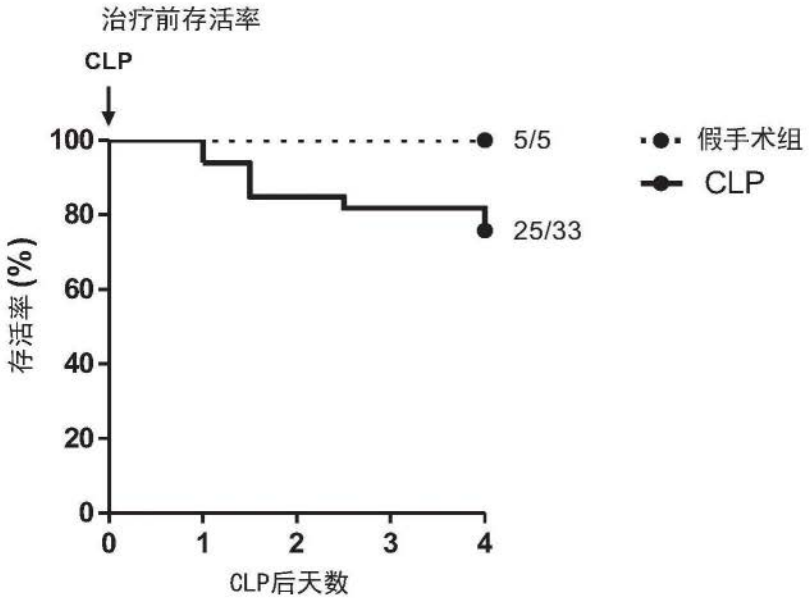

10C
脾中单核细胞/巨噬细胞(CD11b+ Ly6G- and LY6C-)
的nb (x10^4) (平均值+/-SD)
100
80
60
40
20
0
1d
3d
9d
29d
注射后天数
**
**
***
***
未处理
空白 -MVA
MVA-hIL7-Fc

图10

11A


治疗前存活率
CLP
100
80
60
40
20
0
存活率(%)
0
1
2
3
4
CLP后天数
5/5
25/33
假手术组
CLP

11B

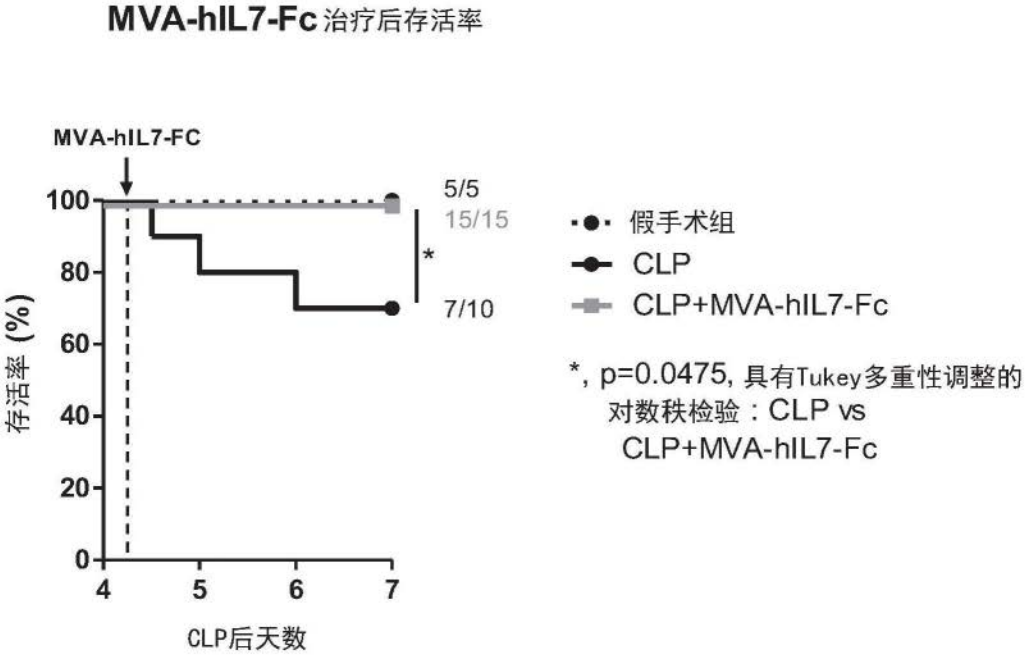

MVA-hIL7-Fc治疗后存活率
MVA-hIL7-FC
100
80
60
40
20
0
存活率(%)
4
5
6
7
CLP后天数
5/5
15/15
*
7/10
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc
*, p=0.0475, 具有Tukey多重性调整的
对数秩检验：CLP vs
CLP+MVA-hIL7-Fc

图11

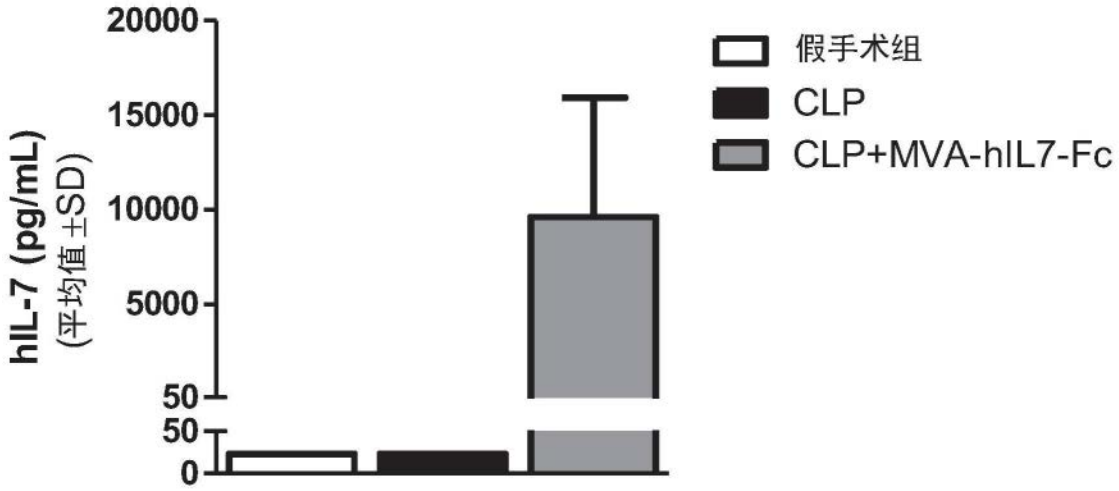

20000
15000
10000
5000
50
50
0
hIL-7 (pg/mL)
(平均值±SD)
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc

图12

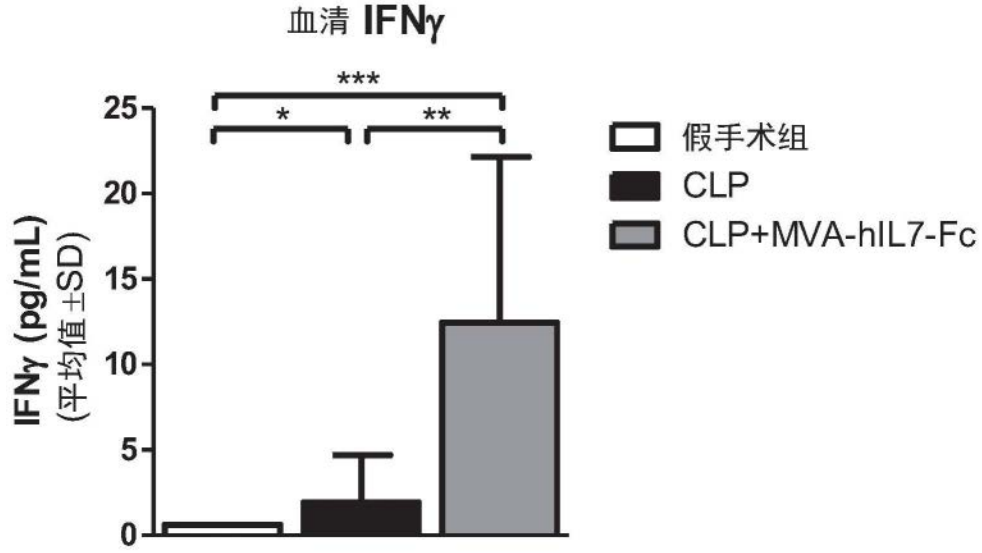

血清 IFNγ
***
*
**
25
20
15
10
5
0
IFNγ (pg/mL)
(平均值±SD)
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc

图13

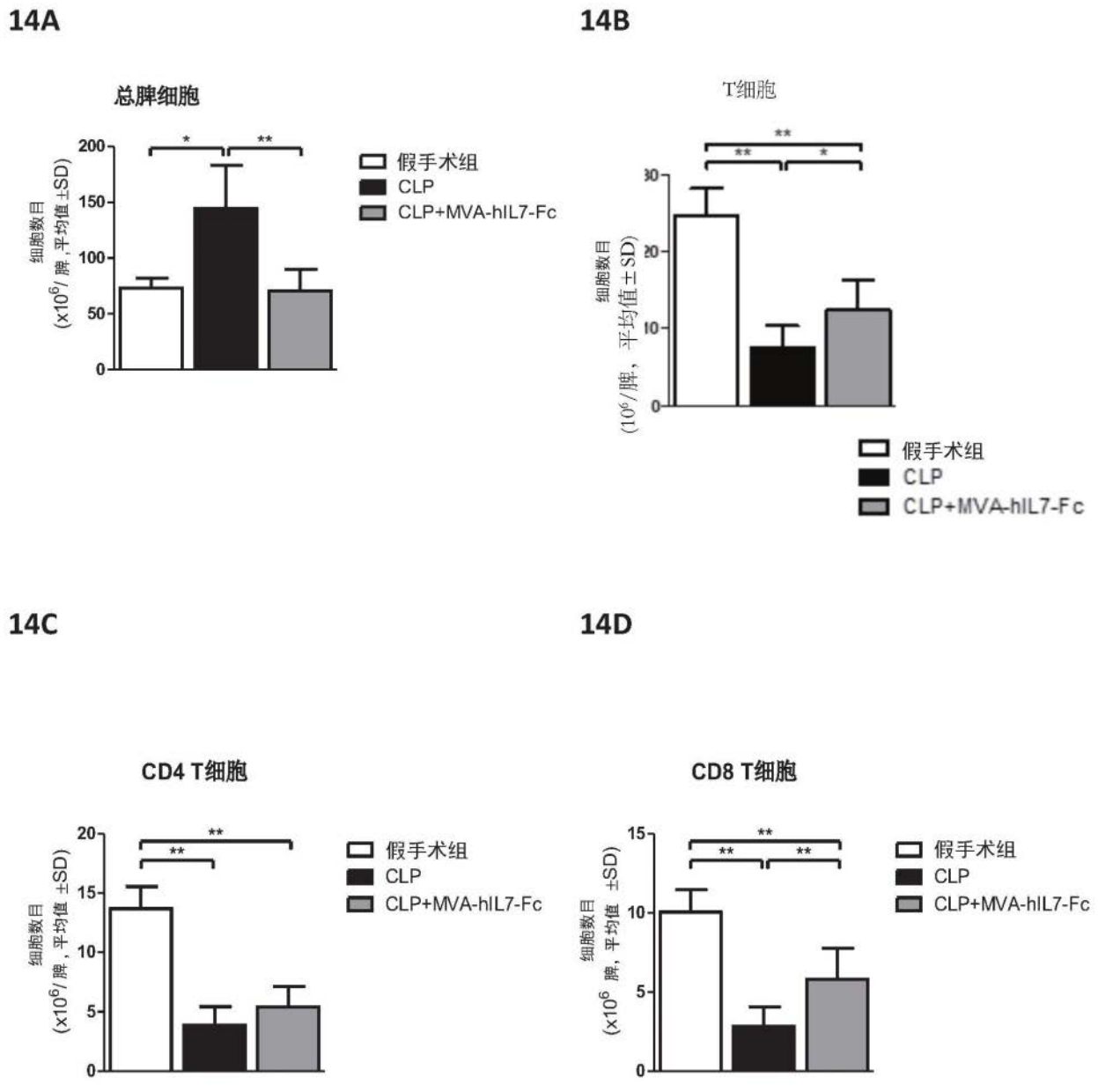
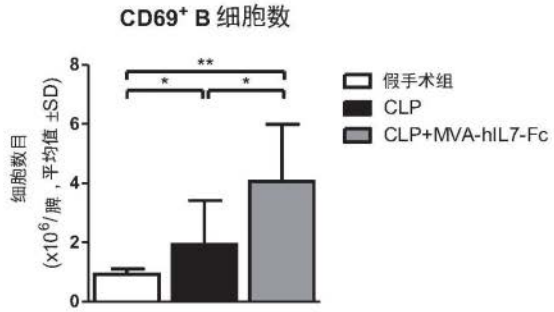
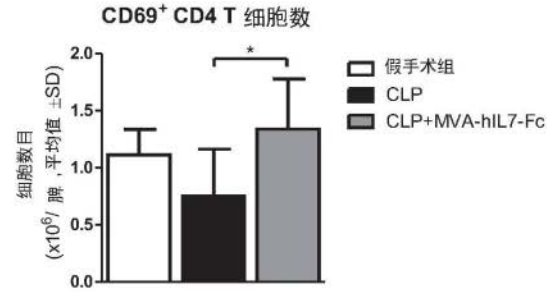

14A
总脾细胞
细胞数目
(x10⁶/脾,平均值±SD)
200
150
100
50
0
*
**
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc
14B
T细胞
细胞数目
(10⁶/脾,平均值±SD)
30
20
10
0
**
**
*
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc
14C
CD4 T细胞
细胞数目
(x10⁶/脾,平均值±SD)
20
15
10
5
0
**
**
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc
14D
CD8 T细胞
细胞数目
(x10⁶ 脾,平均值±SD)
15
10
5
0
**
**
**
假手术组
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc

图14

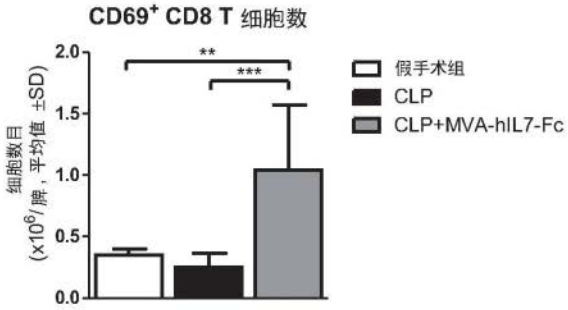
15A



15B



15C



15D

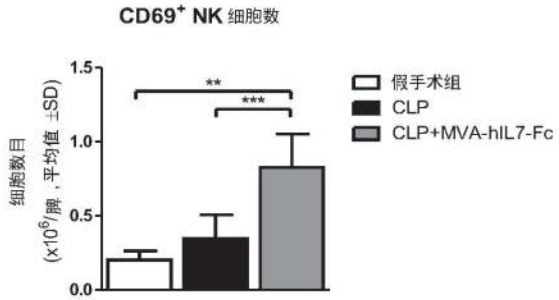
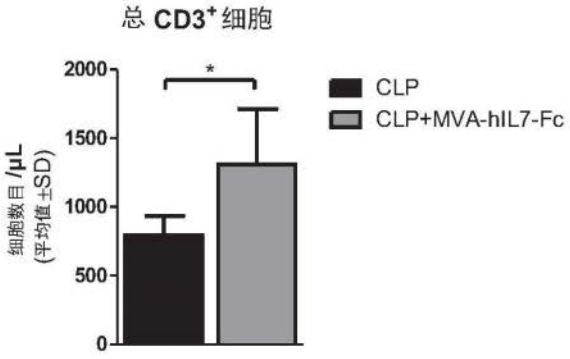
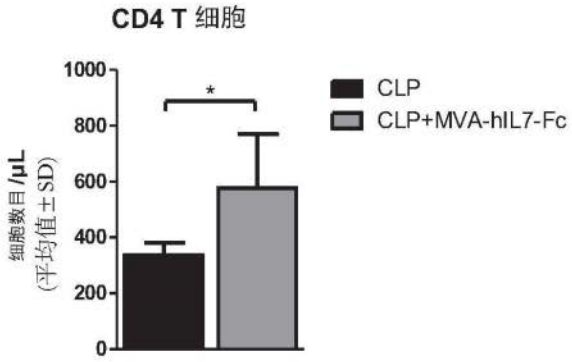


图15

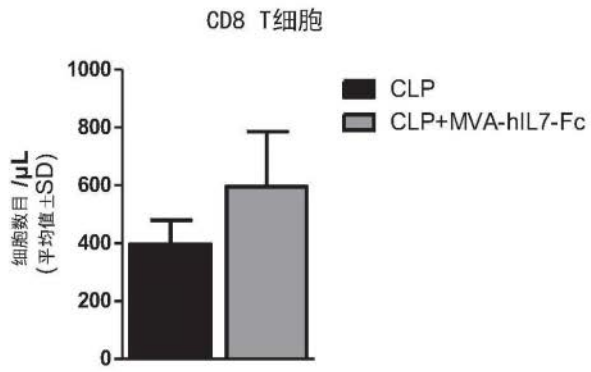
16A



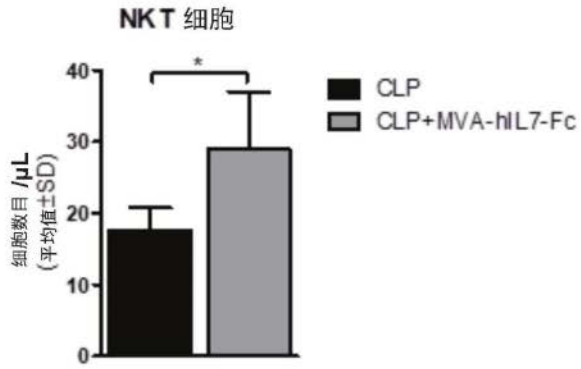
16B



16C



16D



16E

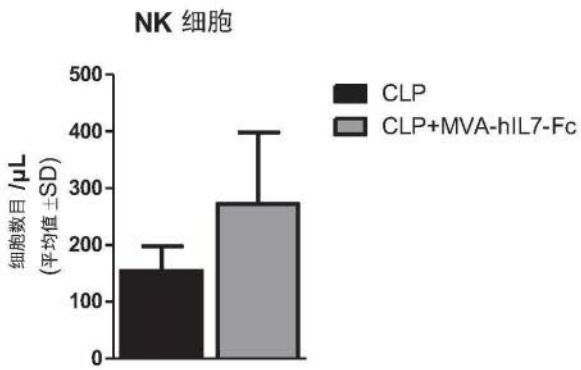
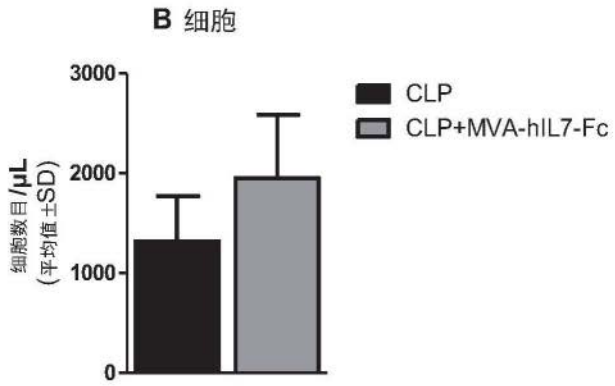
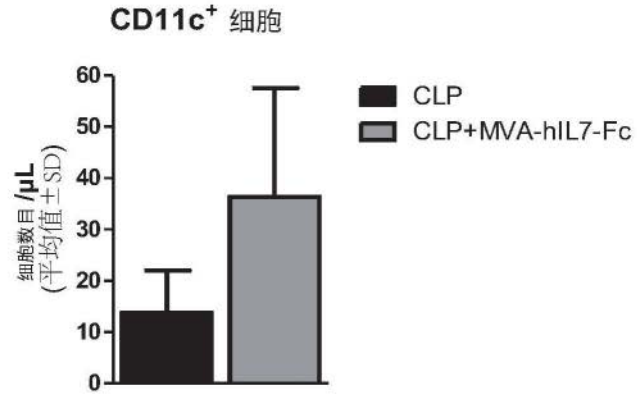


图16

16F



16G



16H

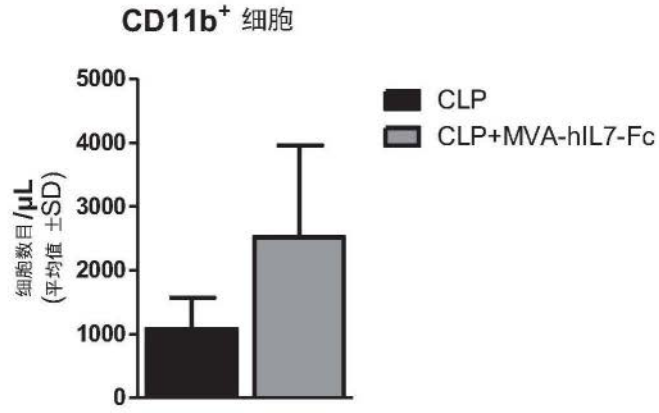
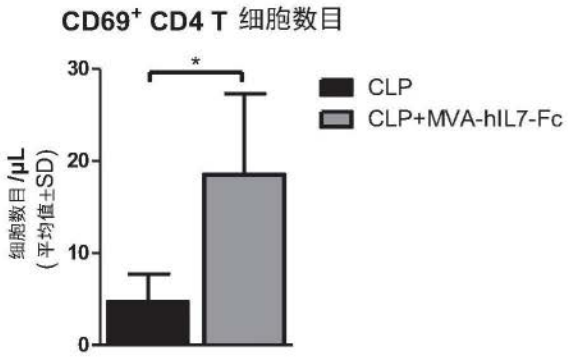
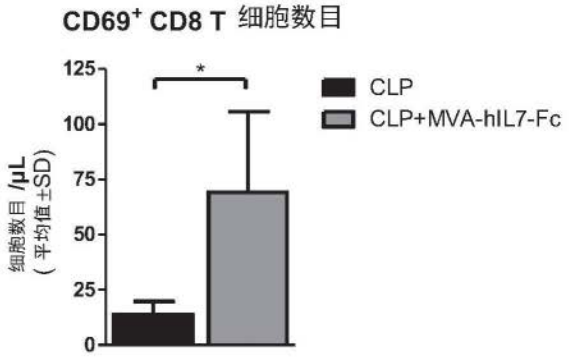


图16

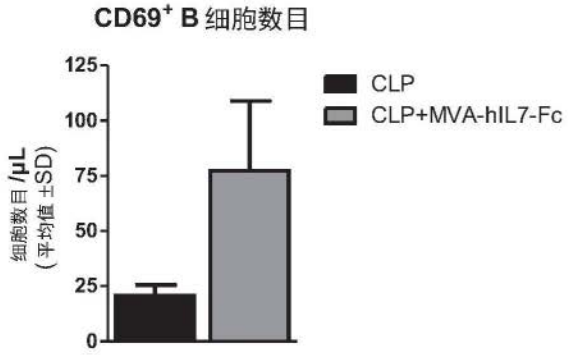
17A



17B



17C



17D

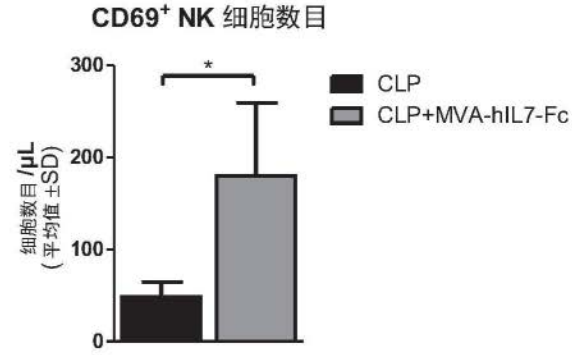
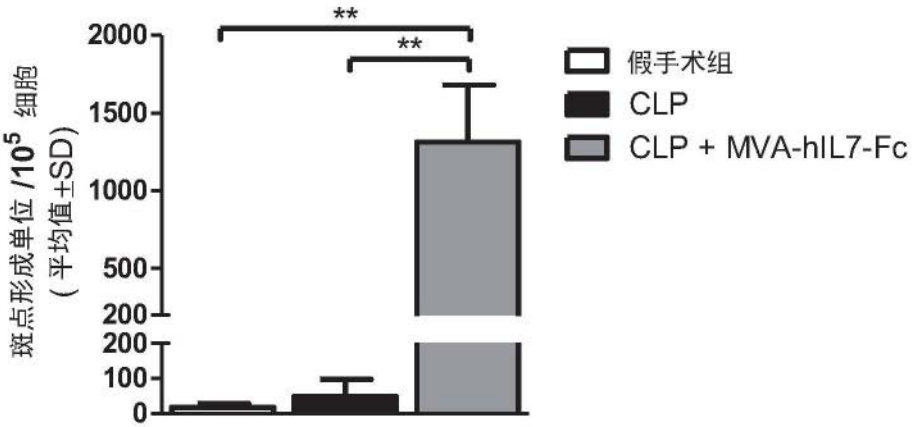


图17

18A


**
**
2000
1500
1000
500
200
200
100
0
斑点形成单位 /10^5 细胞
（平均值±SD）
假手术组
CLP
CLP + MVA-hIL7-Fc

18B

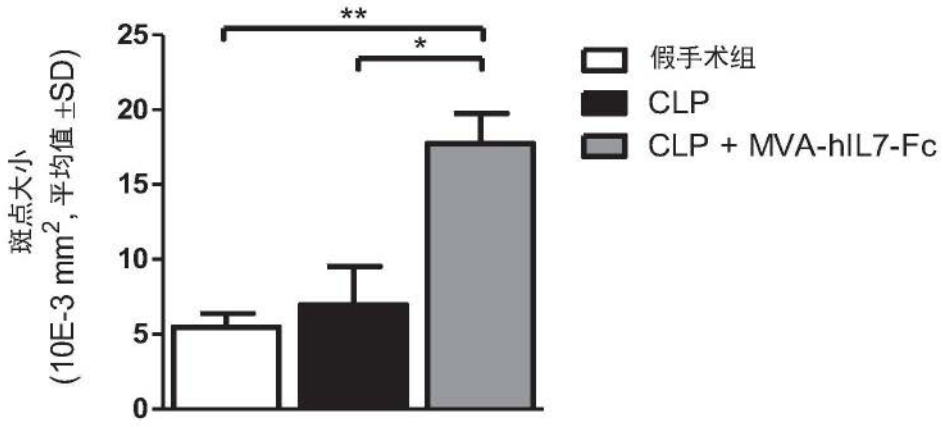
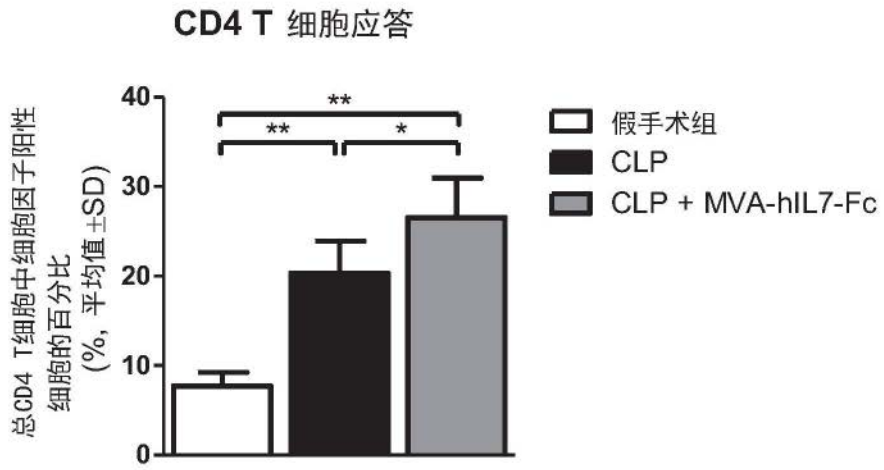

**
*
25
20
15
10
5
0
斑点大小
(10E-3 mm2，平均值 ±SD)
假手术组
CLP
CLP + MVA-hIL7-Fc

图18

19A


CD4 T 细胞应答
总CD4 T细胞中细胞因子阳性细胞的百分比 (%, 平均值±SD)
40
30
20
10
0
**
**
*
假手术组
CLP
CLP + MVA-hIL7-Fc

19B

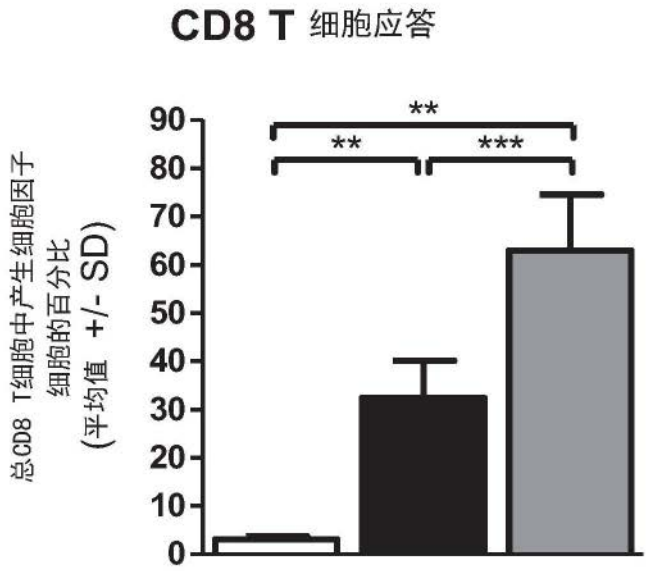
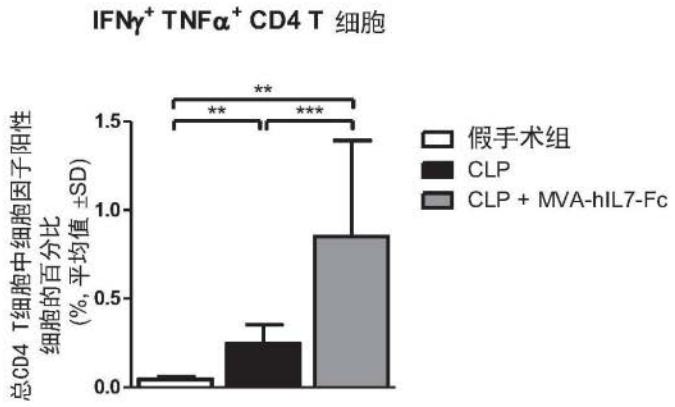
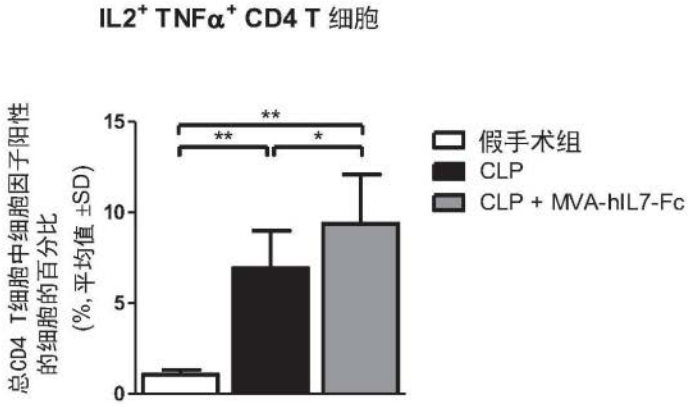

CD8 T 细胞应答
总CD8 T细胞中产生细胞因子细胞的百分比 (平均值 +/- SD)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
**
***

图19

20A



20B



20C

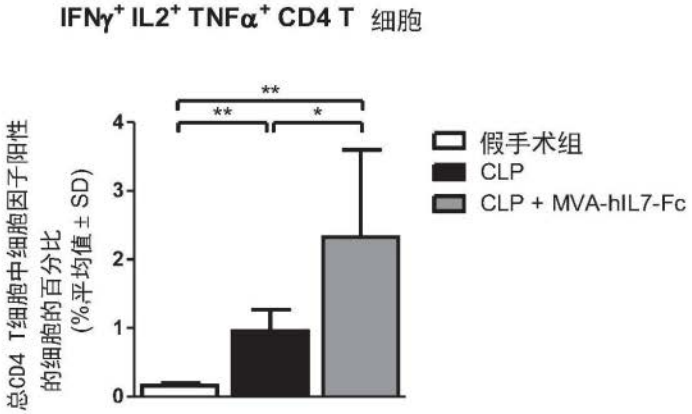
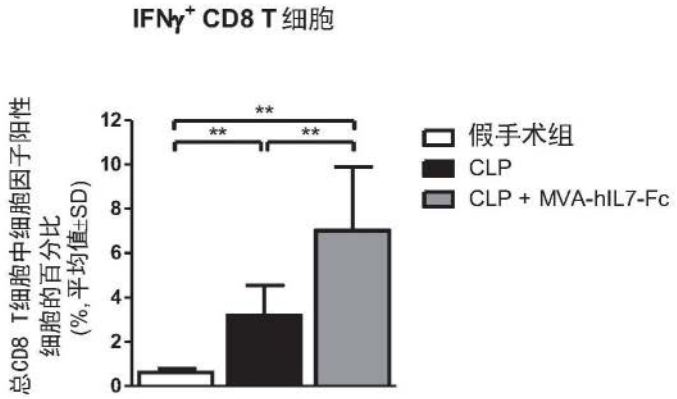
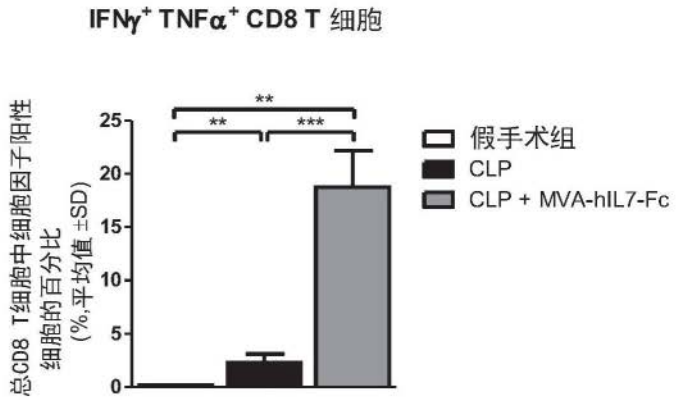


图20

21A



21B



21C

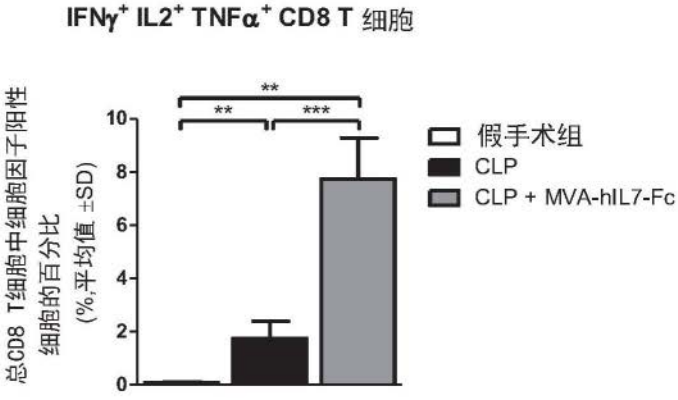
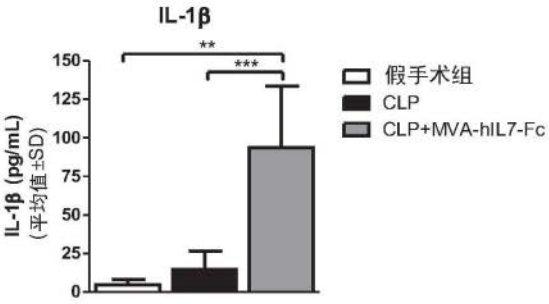
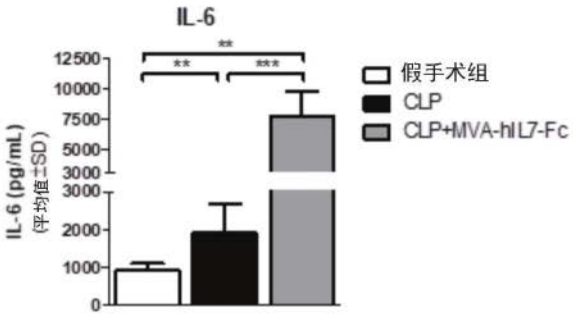


图21

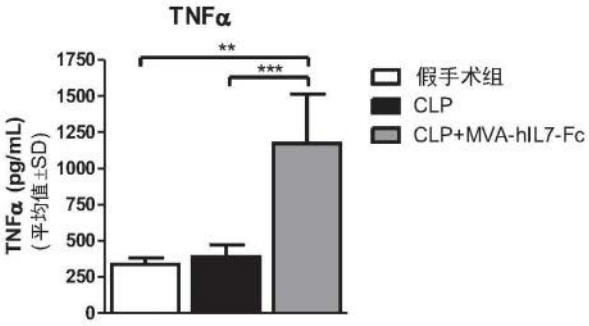
22A



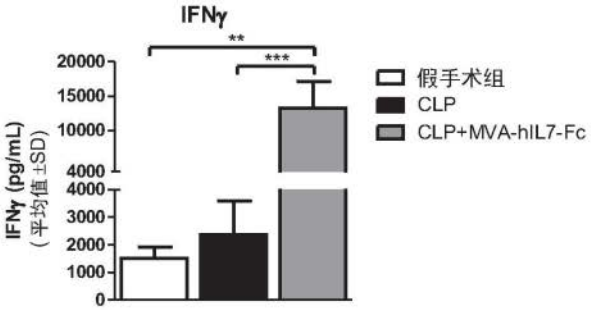
22B



22C



22D



22E

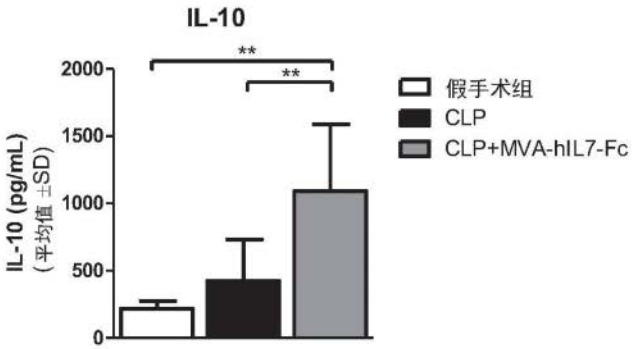
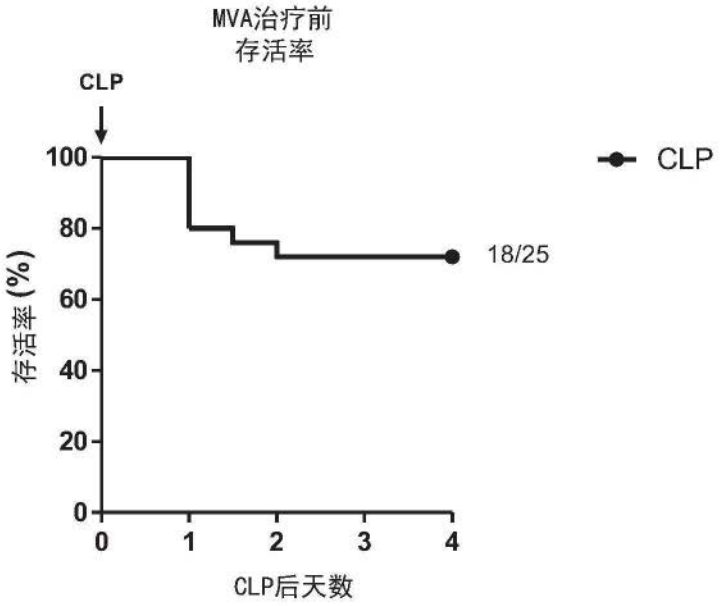


图22

23A


MVA治疗前
存活率
CLP
100
80
60
40
20
0
存活率(%)
0
1
2
3
4
CLP后天数
18/25
CLP

23B

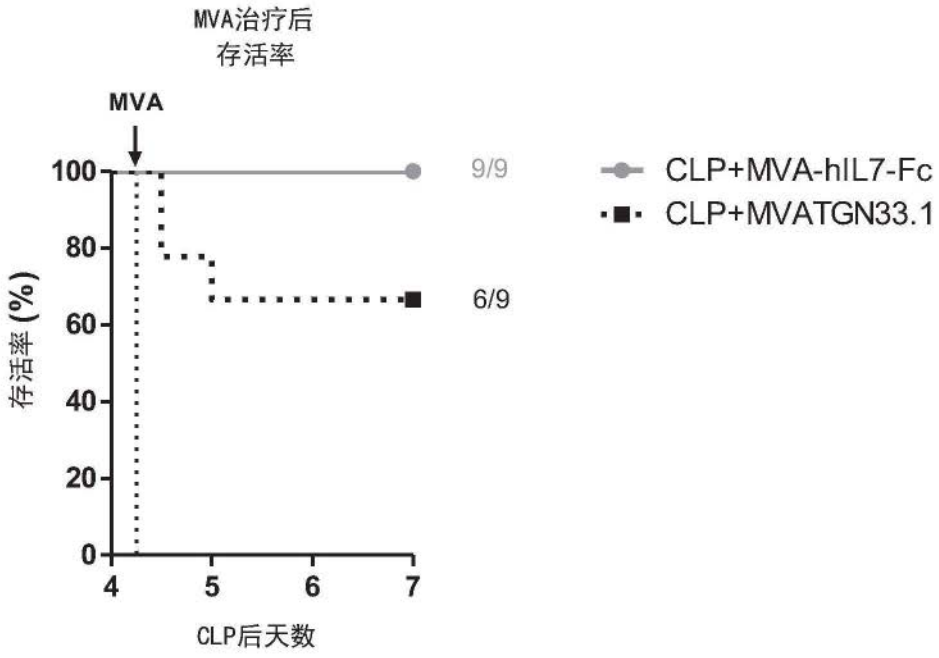
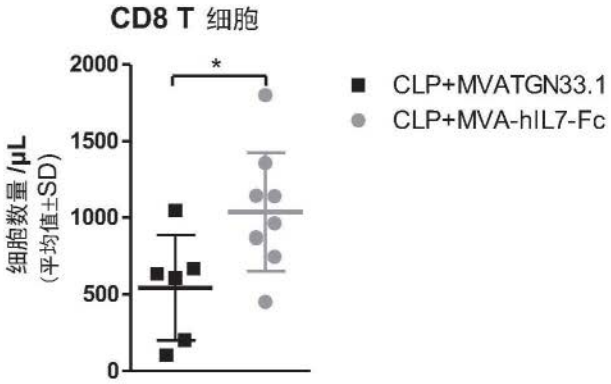
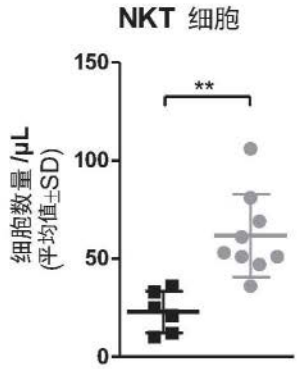

MVA治疗后
存活率
MVA
100
80
60
40
20
0
存活率(%)
4
5
6
7
CLP后天数
9/9
6/9
CLP+MVA-hIL7-Fc
CLP+MVATGN33.1

图23

24A



24B



24C

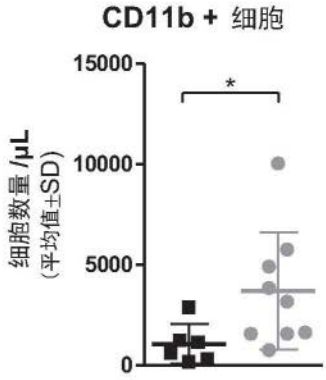


图24

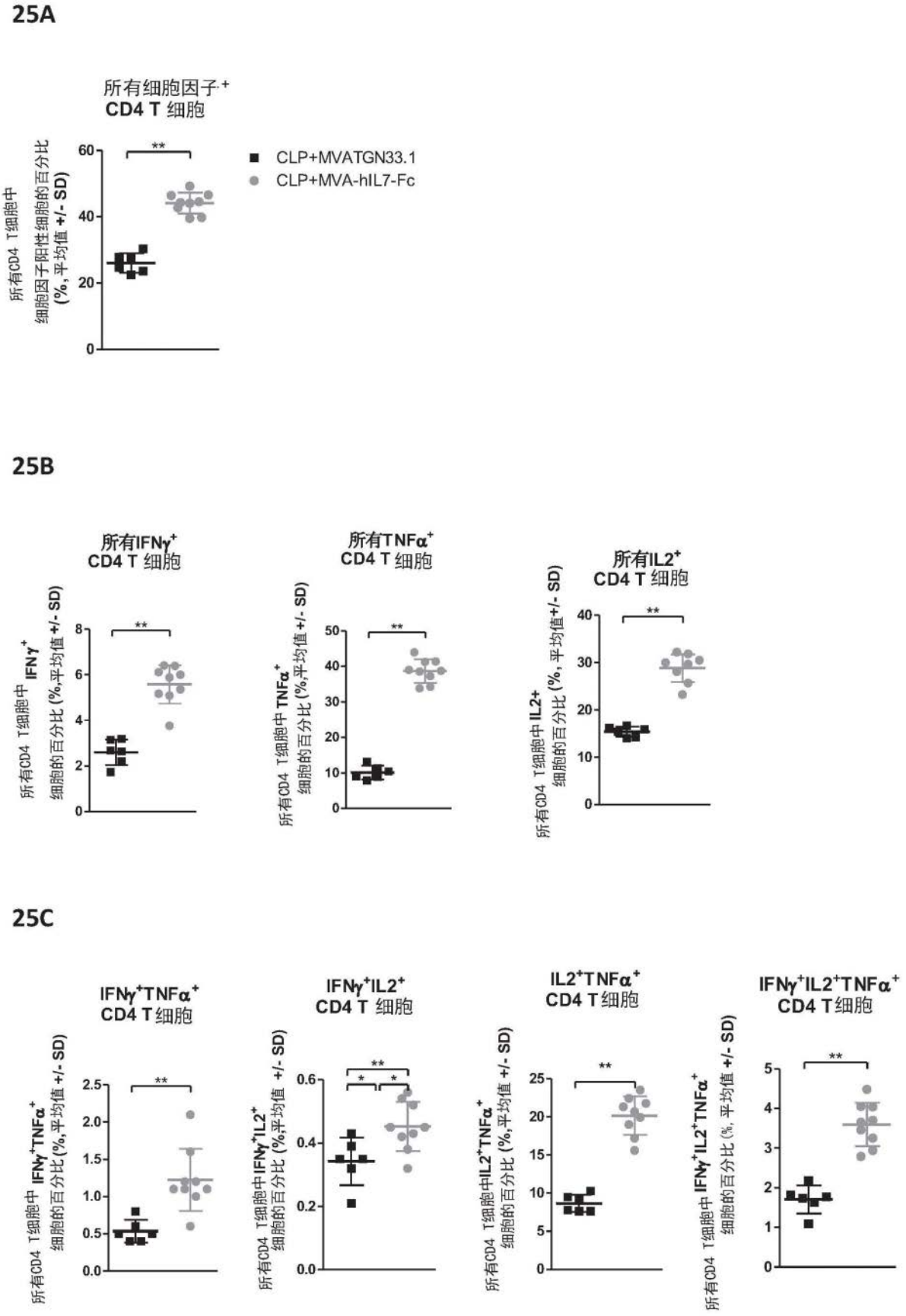

25A
所有细胞因子+
CD4 T 细胞
所有CD4 T细胞中
细胞因子阳性细胞的百分比
(%,平均值 +/- SD)
CLP+MVATGN33.1
CLP+MVA-hIL7-Fc
25B
所有IFNγ+
CD4 T 细胞
所有TNFα+
CD4 T 细胞
所有IL2+
CD4 T 细胞
25C
IFNγ+TNFα+
CD4 T细胞
IFNγ+IL2+
CD4 T 细胞
IL2+TNFα+
CD4 T细胞
IFNγ+IL2+TNFα+
CD4 T细胞

图25

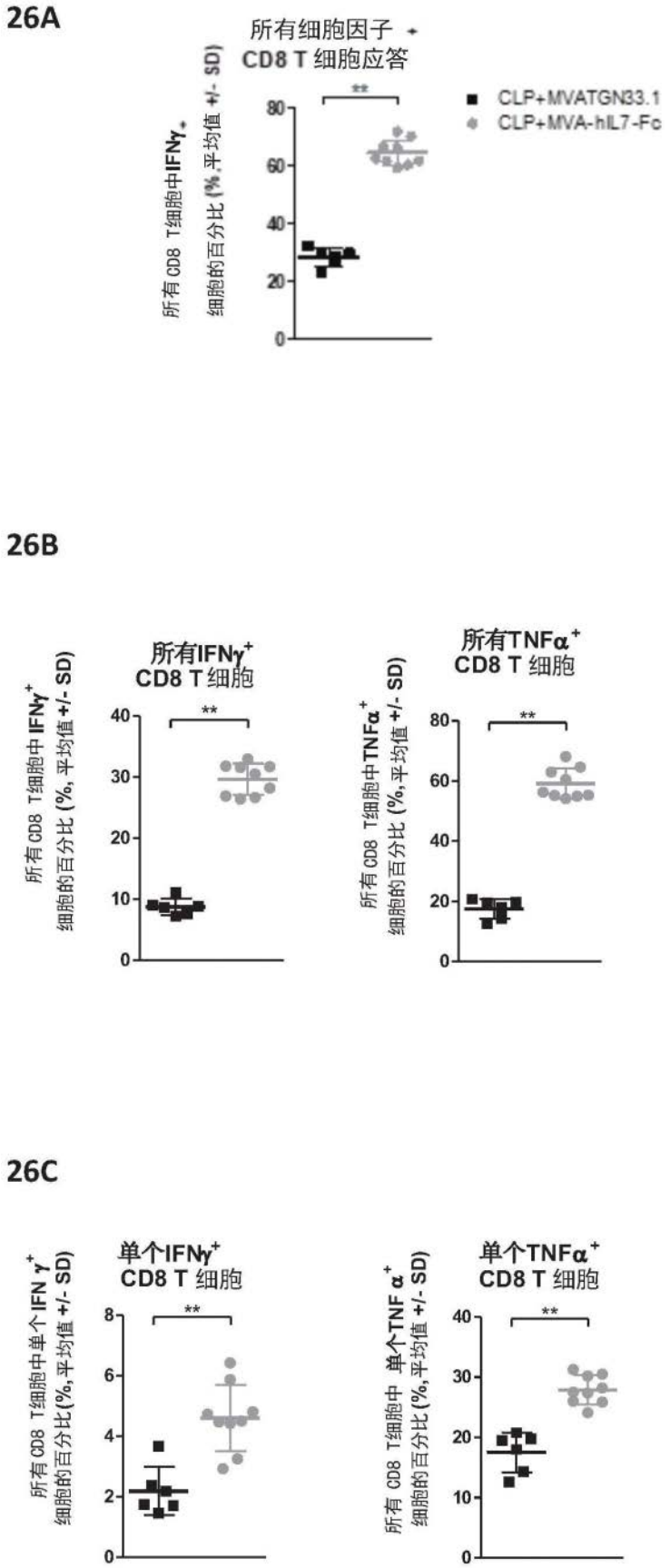

26A
所有细胞因子 +
CD8 T 细胞应答
所有 CD8 T细胞中IFNγ+
细胞的百分比 (%,平均值 +/- SD)
**
CLP+MVATGN33.1
CLP+MVA-hIL7-Fc
26B
所有IFNγ+
CD8 T 细胞
所有 CD8 T细胞中 IFNγ+
细胞的百分比 (%,平均值 +/- SD)
所有TNFα+
CD8 T 细胞
所有 CD8 T细胞中TNFα+
细胞的百分比 (%,平均值 +/- SD)
所有IL2+
CD8 T 细胞
所有CD8 T细胞中 IL2+
细胞的百分比 (%平均值 +/- SD)
26C
单个IFNγ+
CD8 T 细胞
所有 CD8 T细胞中单个 IFN γ+
细胞的百分比(%,平均值 +/- SD)
单个TNFα+
CD8 T 细胞
所有 CD8 T细胞中 单个TNF α+
细胞的百分比(%,平均值 +/- SD)

图26

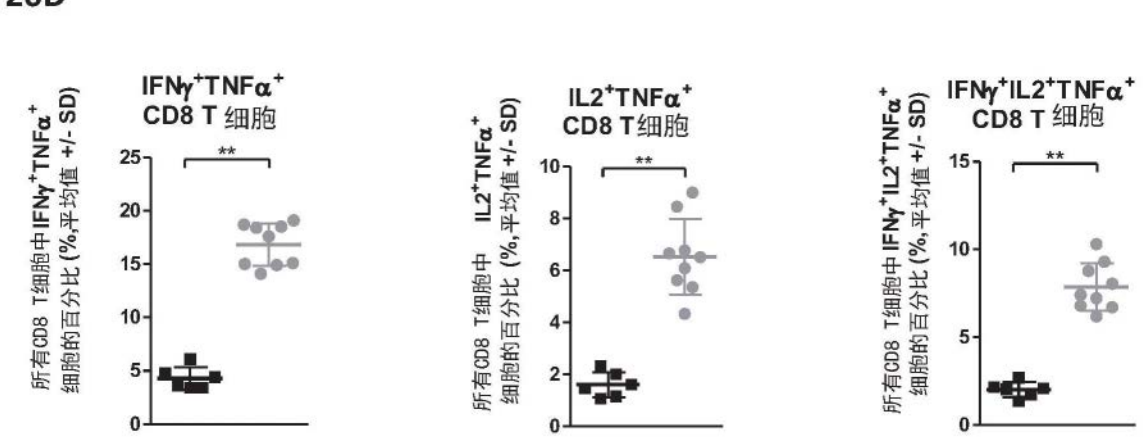

26D
IFNγ+TNFα+
CD8 T 细胞
所有CD8 T细胞中IFNγ+TNFα+细胞的百分比 (%,平均值 +/- SD)
**
IL2+TNFα+
CD8 T细胞
所有CD8 T细胞中 IL2+TNFα+细胞的百分比 (%,平均值 +/- SD)
**
IFNγ+IL2+TNFα+
CD8 T 细胞
所有CD8 T细胞中IFNγ+IL2+TNFα+细胞的百分比 (%,平均值 +/- SD)
**

图26

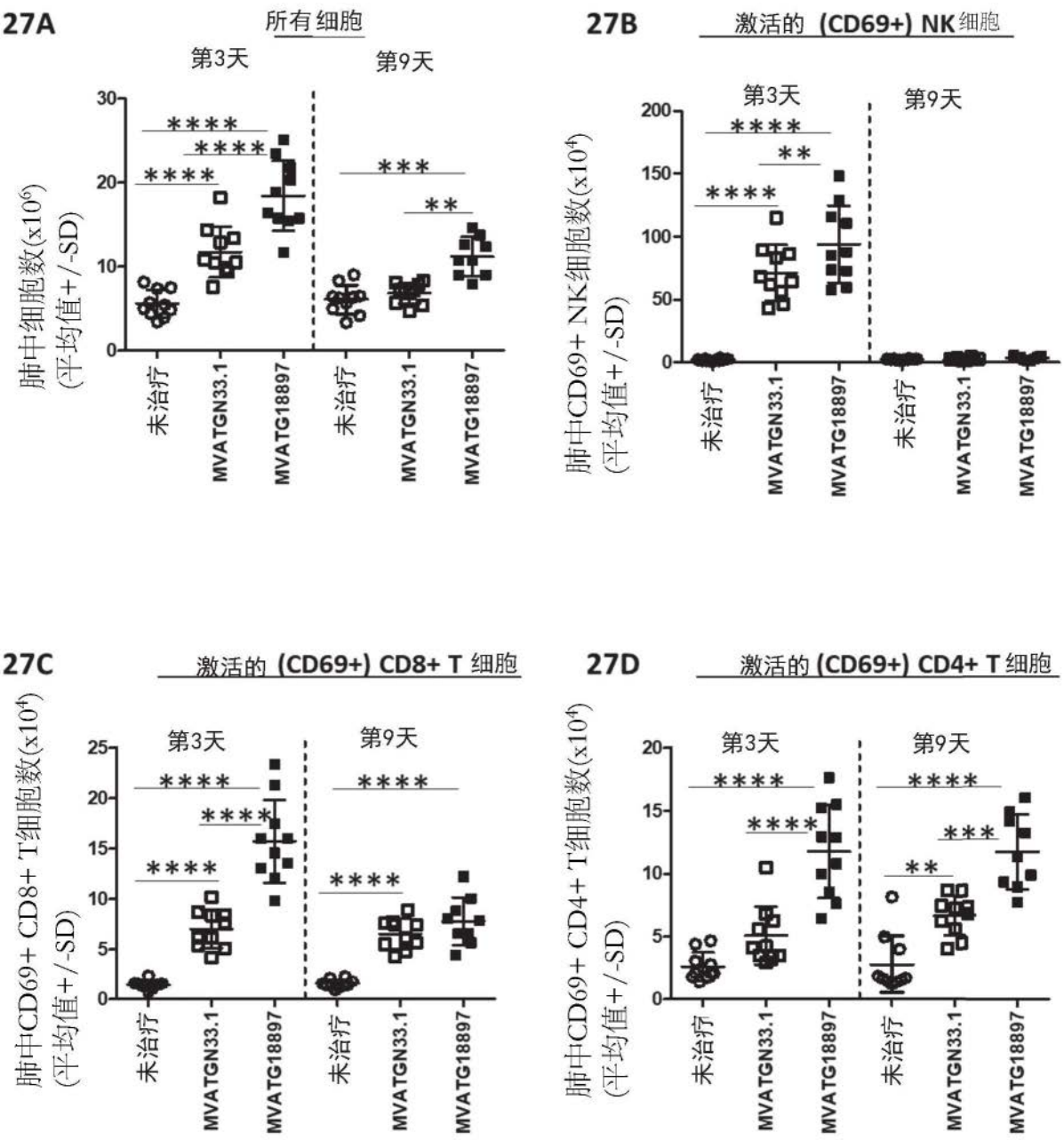

27A
所有细胞
第3天
第9天
肺中细胞数(x10⁶)
(平均值+/-SD)
未治疗
MVATGN33.1
MVATG18897
27B
激活的 (CD69+) NK细胞
肺中CD69+ NK细胞数(x10⁴)
27C
激活的 (CD69+) CD8+ T 细胞
肺中CD69+ CD8+ T细胞数(x10⁴)
27D
激活的 (CD69+) CD4+ T细胞
肺中CD69+ CD4+ T细胞数(x10⁴)

图27

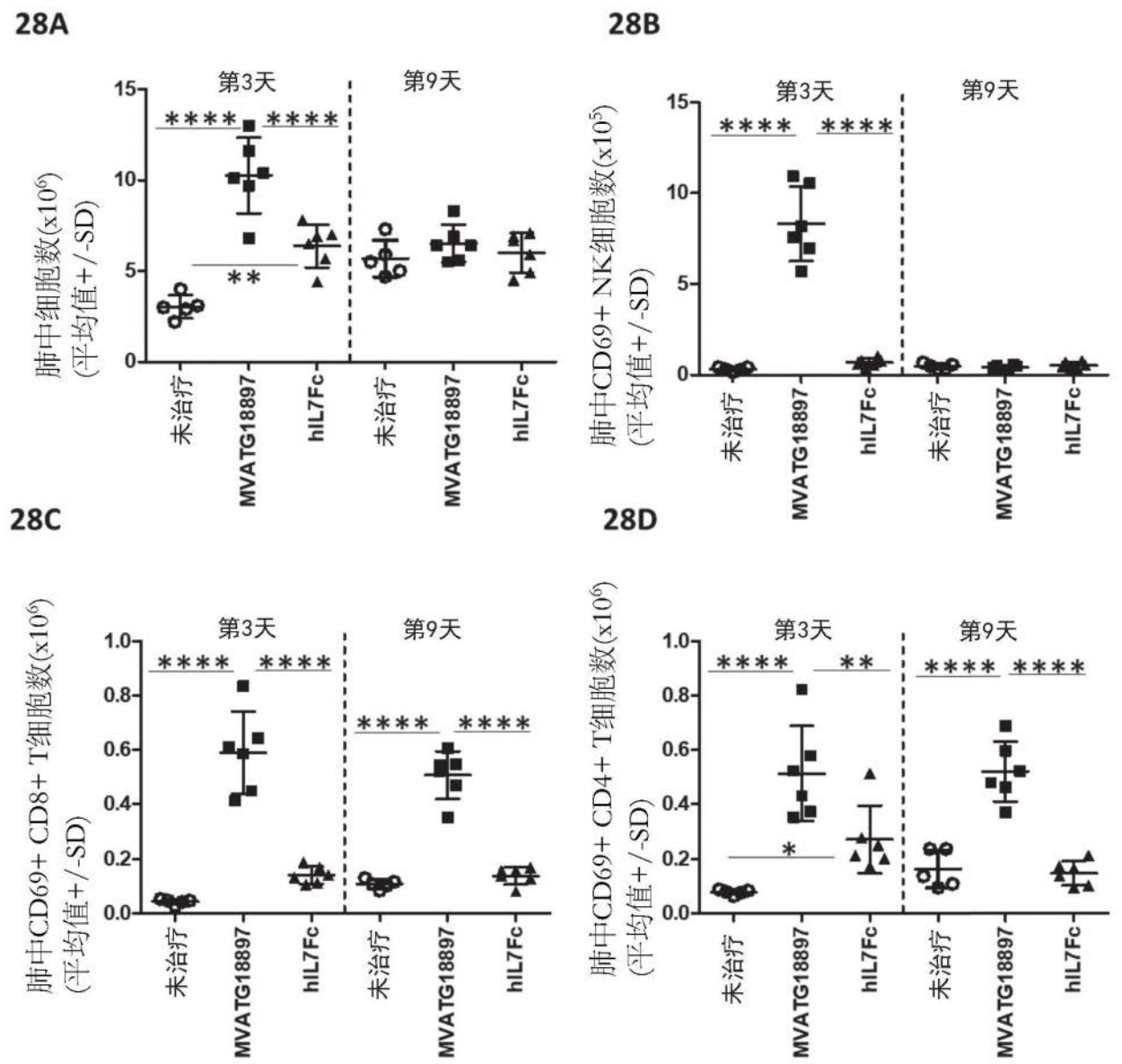

28A
肺中细胞数(x10^6)
(平均值+/-SD)
第3天
第9天
未治疗
MVATG18897
hIL7Fc
28B
肺中CD69+ NK细胞数(x10^5)
(平均值+/-SD)
28C
肺中CD69+ CD8+ T细胞数(x10^6)
(平均值+/-SD)
28D
肺中CD69+ CD4+ T细胞数(x10^6)
(平均值+/-SD)

图28

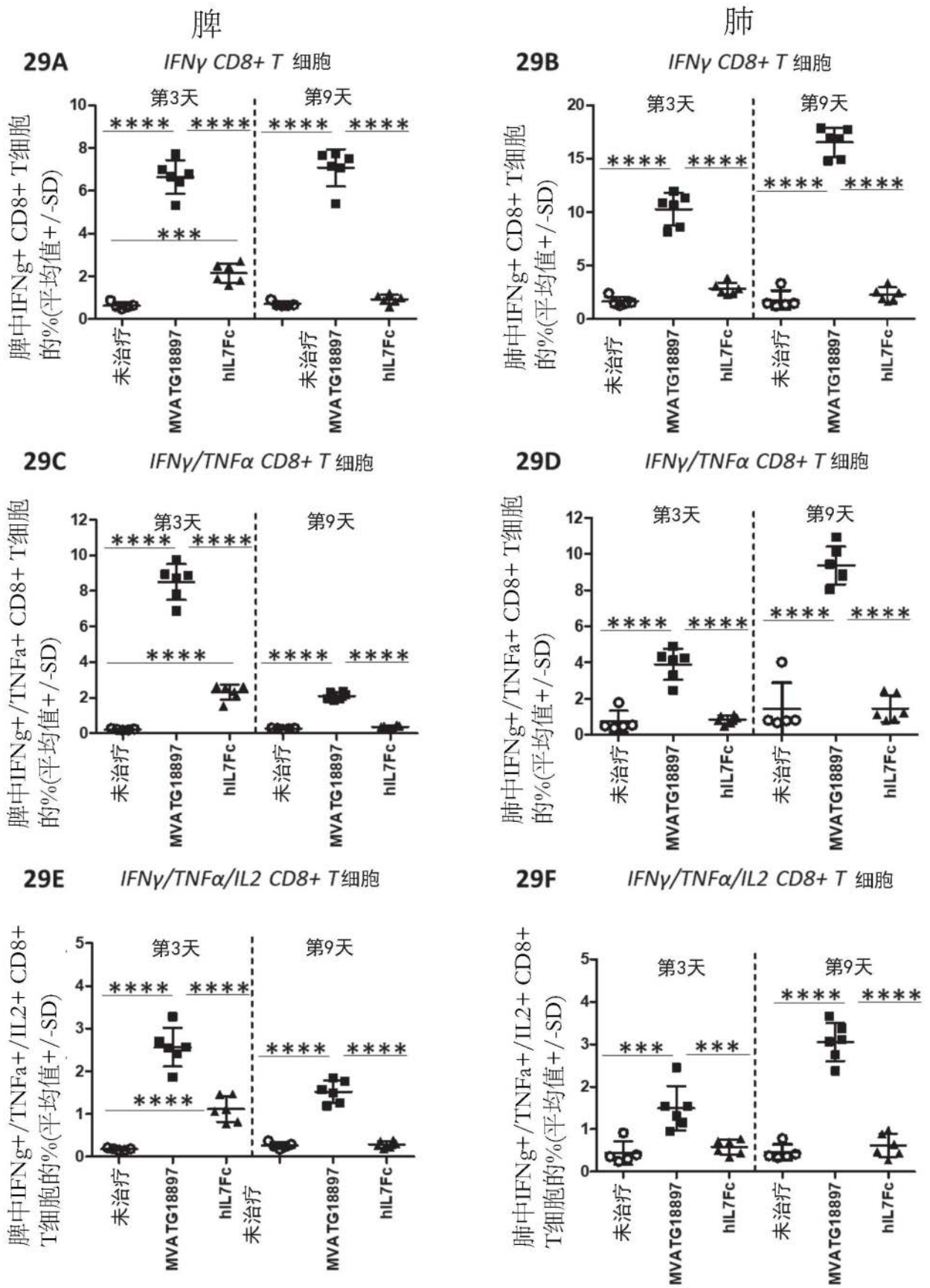

脾
肺
29A
IFNγ CD8+ T 细胞
脾中IFNg+ CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
第3天
第9天
未治疗
MVATG18897
hIL7Fc
29B
IFNγ CD8+ T 细胞
肺中IFNg+ CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
29C
IFNγ/TNFα CD8+ T 细胞
脾中IFNg+/TNFa+ CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
29D
IFNγ/TNFα CD8+ T 细胞
肺中IFNg+/TNFa+ CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
29E
IFNγ/TNFα/IL2 CD8+ T细胞
脾中IFNg+/TNFa+/IL2+ CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
29F
IFNγ/TNFα/IL2 CD8+ T 细胞
肺中IFNg+/TNFa+/IL2+ CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)

图29

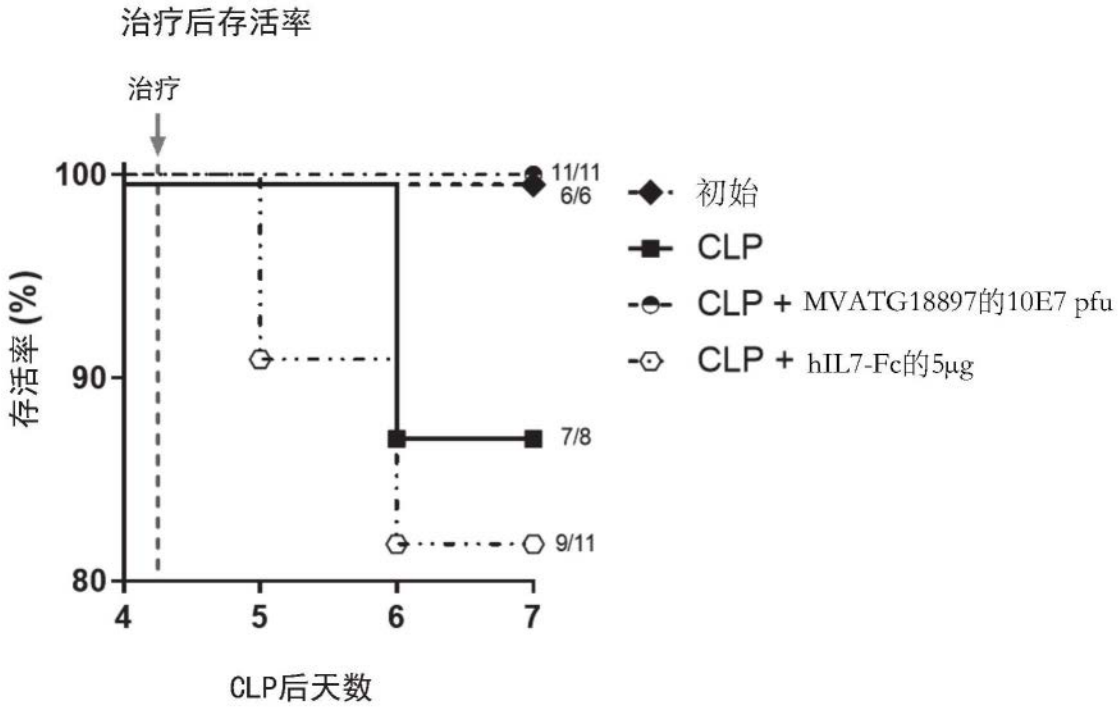
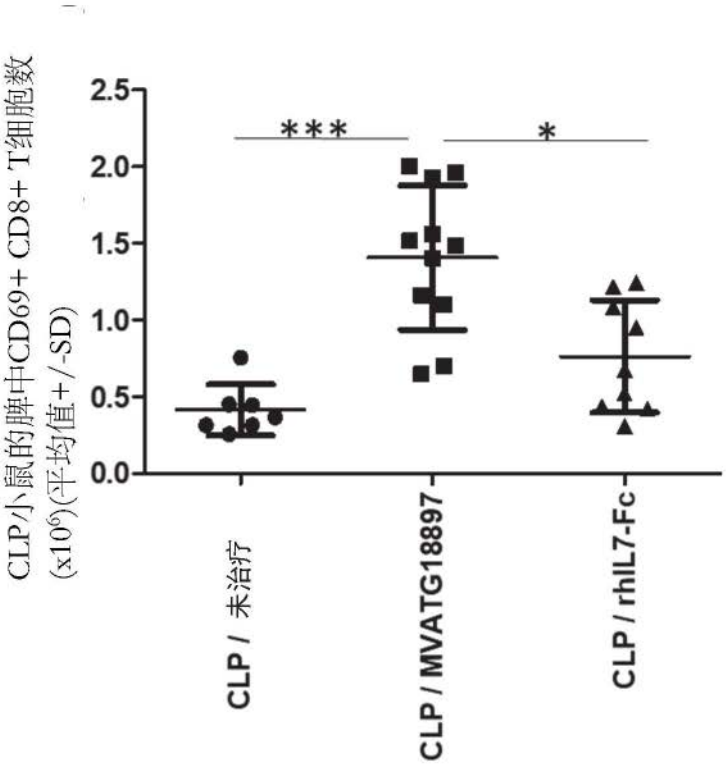

治疗后存活率
治疗
100
90
80
存活率 (%)
4
5
6
7
CLP后天数
11/11
6/6
7/8
9/11
初始
CLP
CLP + MVATG18897的10E7 pfu
CLP + hIL7-Fc的5μg

图30

31A


CLP小鼠的脾中CD69+ CD8+ T细胞数
(x10⁶)(平均值+/-SD)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
CLP / 未治疗
CLP / MVATG18897
CLP / rhIL7-Fc

31B

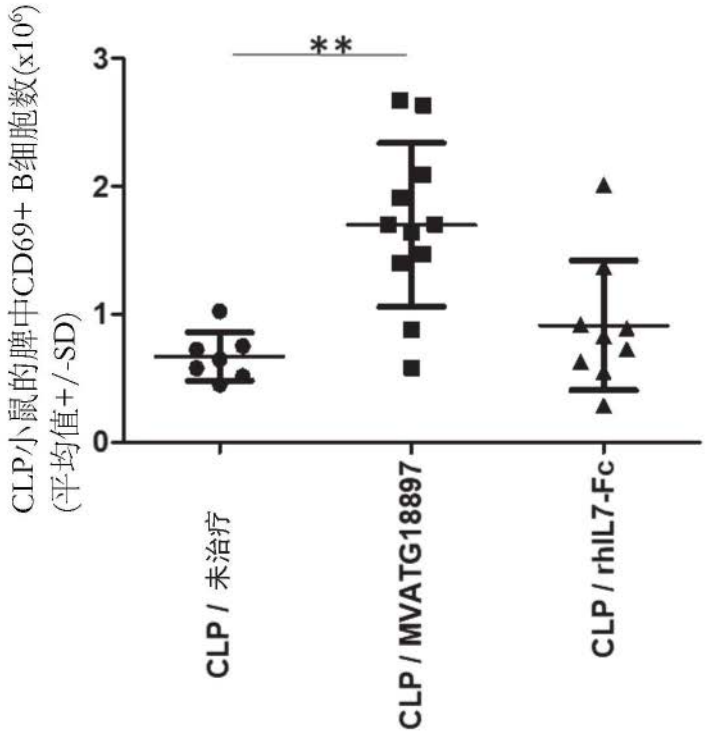

CLP小鼠的脾中CD69+ B细胞数(x10⁶)
(平均值+/-SD)
3
2
1
0
**
CLP / 未治疗
CLP / MVATG18897
CLP / rhIL7-Fc

图31

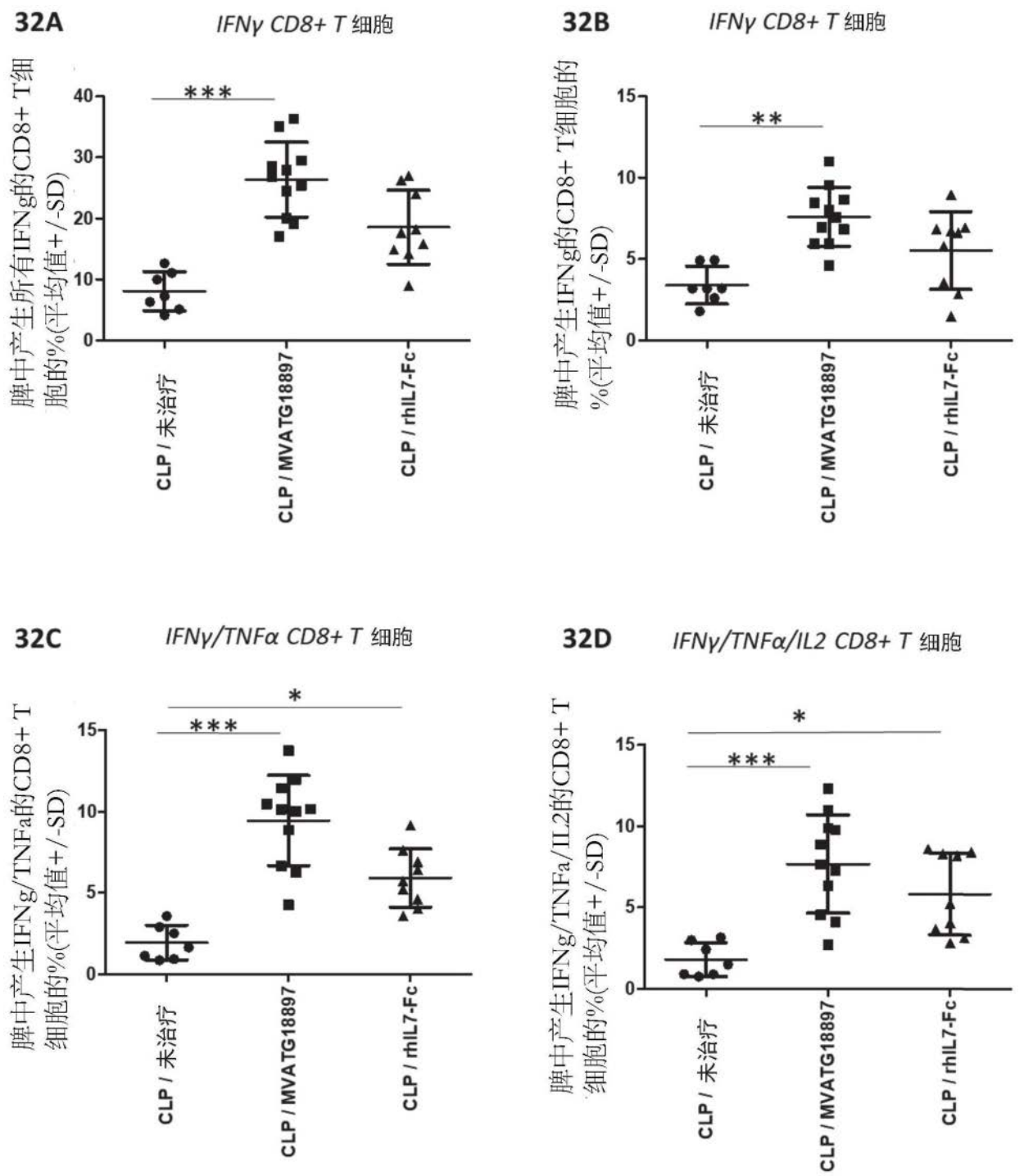
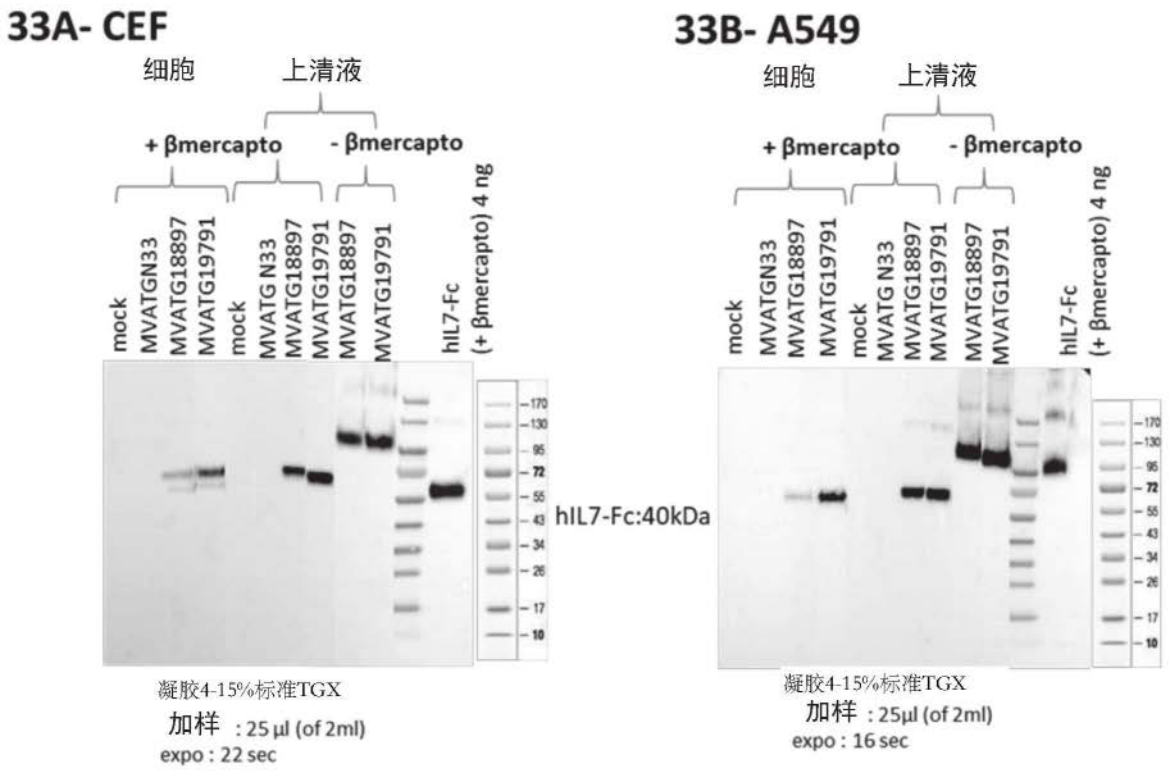

32A
IFNγ CD8+ T 细胞
脾中产生所有IFNg的CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
***
40
30
20
10
0
CLP / 未治疗
CLP / MVATG18897
CLP / rhIL7-Fc
32B
IFNγ CD8+ T 细胞
脾中产生IFNg的CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
**
15
10
5
0
CLP / 未治疗
CLP / MVATG18897
CLP / rhIL7-Fc
32C
IFNγ/TNFα CD8+ T 细胞
脾中产生IFNg/TNFa的CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
*
***
15
10
5
0
CLP / 未治疗
CLP / MVATG18897
CLP / rhIL7-Fc
32D
IFNγ/TNFα/IL2 CD8+ T 细胞
脾中产生IFNg/TNFa/IL2的CD8+ T细胞的%(平均值+/-SD)
*
***
15
10
5
0
CLP / 未治疗
CLP / MVATG18897
CLP / rhIL7-Fc

图32


33A- CEF
细胞
上清液
+ βmercapto
- βmercapto
mock
MVATGN33
MVATG18897
MVATG19791
mock
MVATG N33
MVATG18897
MVATG19791
MVATG18897
MVATG19791
hIL7-Fc
(+ βmercapto) 4 ng
hIL7-Fc:40kDa
凝胶4-15%标准TGX
加样 : 25 µl (of 2ml)
expo : 22 sec
33B- A549
细胞
上清液
+ βmercapto
- βmercapto
mock
MVATGN33
MVATG18897
MVATG19791
mock
MVATG N33
MVATG18897
MVATG19791
MVATG18897
MVATG19791
hIL7-Fc
(+ βmercapto) 4 ng
凝胶4-15%标准TGX
加样 : 25µl (of 2ml)
expo : 16 sec

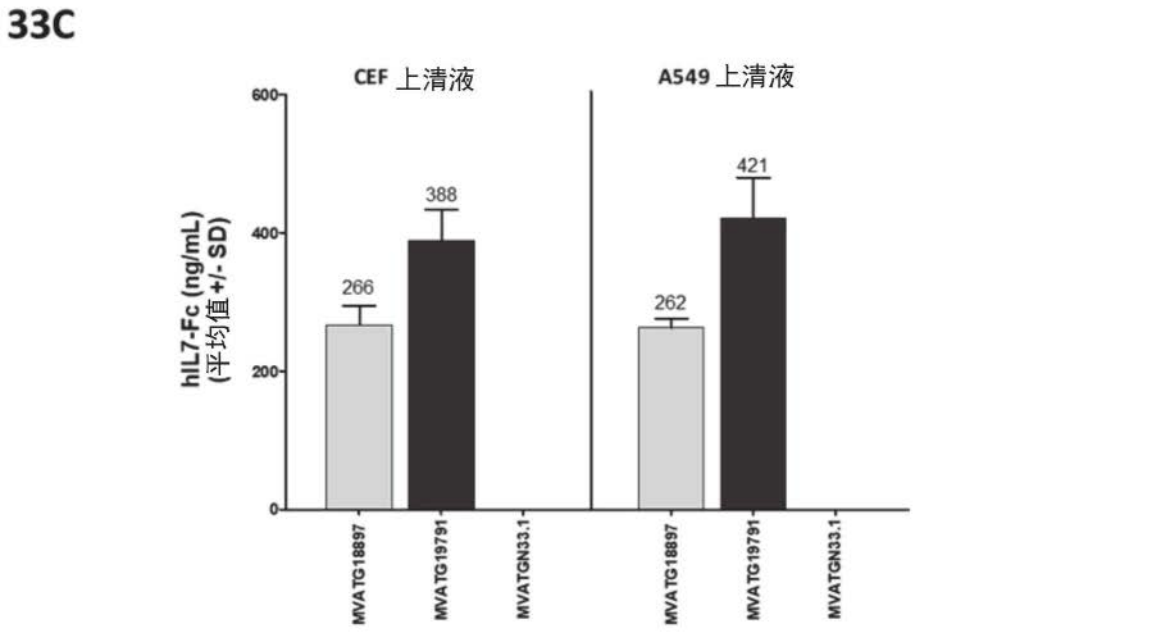

33C
CEF 上清液
A549 上清液
hIL7-Fc (ng/mL)
(平均值+/- SD)
600
400
200
0
266
388
262
421
MVATG18897
MVATG19791
MVATGN33.1
MVATG18897
MVATG19791
MVATGN33.1

图33

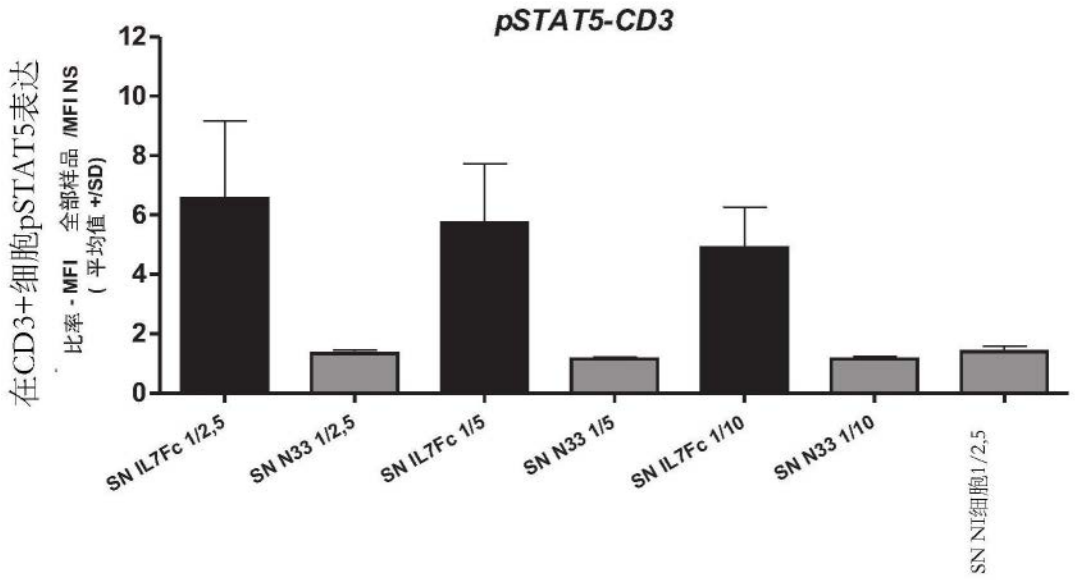

pSTAT5-CD3
在CD3+细胞pSTAT5表达
比率 - MFI 全部样品 /MFI NS
(平均值 +/SD)
12
10
8
6
4
2
0
SN IL7Fc 1/2,5
SN N33 1/2,5
SN IL7Fc 1/5
SN N33 1/5
SN IL7Fc 1/10
SN N33 1/10
SN NI细胞1/2,5

图34

35A

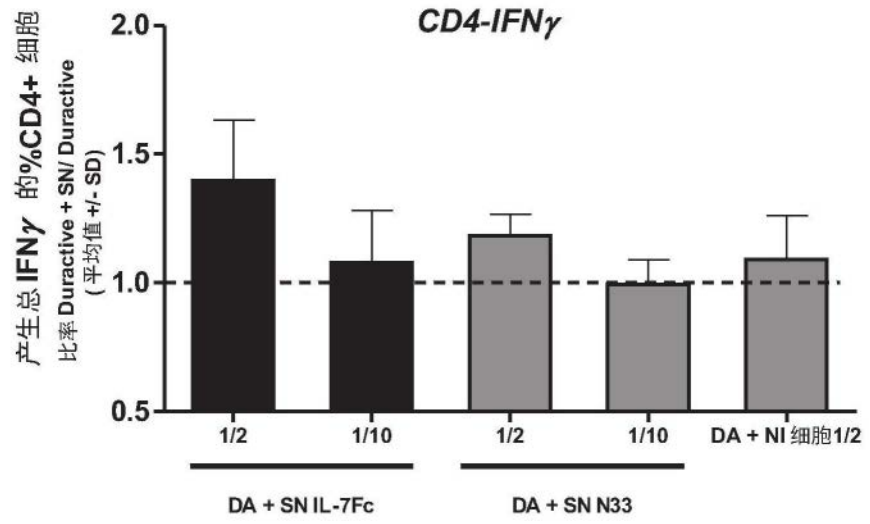

CD4-IFNγ
产生总 IFNγ 的%CD4+ 细胞
比率 Duractive + SN/ Duractive
(平均值 +/- SD)
2.0
1.5
1.0
0.5
1/2
1/10
1/2
1/10
DA + NI 细胞1/2
DA + SN IL-7Fc
DA + SN N33

图35

35B

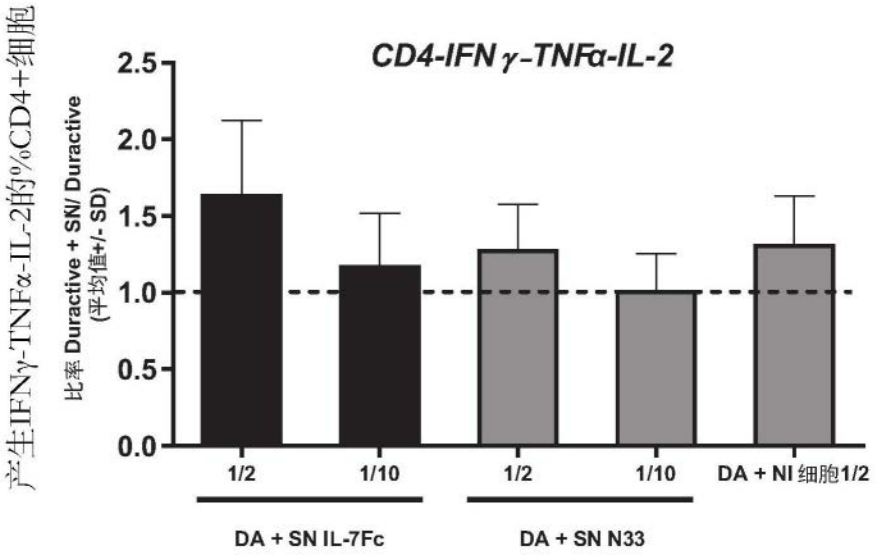

CD4-IFNγ-TNFα-IL-2
产生IFNγ-TNFα-IL-2的%CD4+细胞
比率 Duractive + SN/ Duractive
(平均值+/- SD)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1/2
1/10
1/2
1/10
DA + NI 细胞1/2
DA + SN IL-7Fc
DA + SN N33

图35

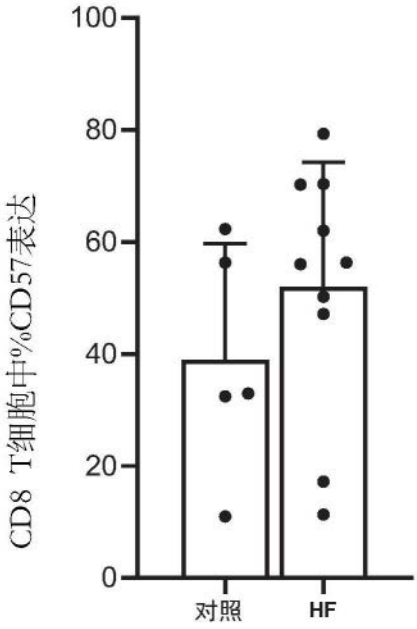
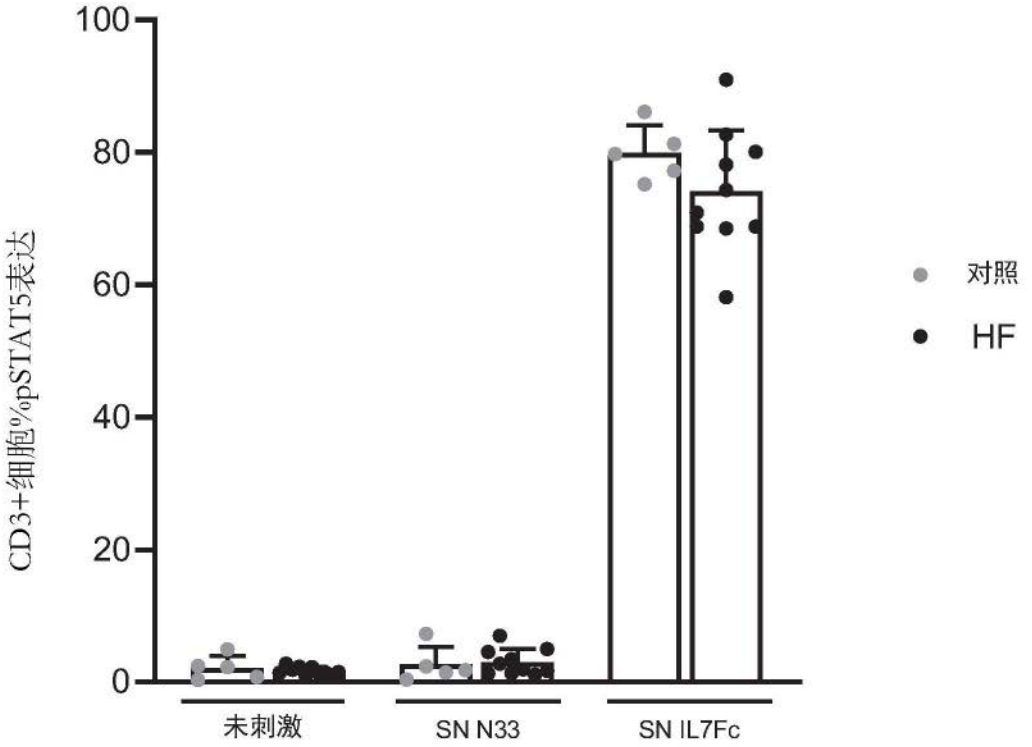

CD8 T细胞中%CD57表达
100
80
60
40
20
0
对照
HF

图36

37A


100
80
60
40
20
0
CD3+细胞%pSTAT5表达
未刺激
SN N33
SN IL7Fc
对照
HF

37B

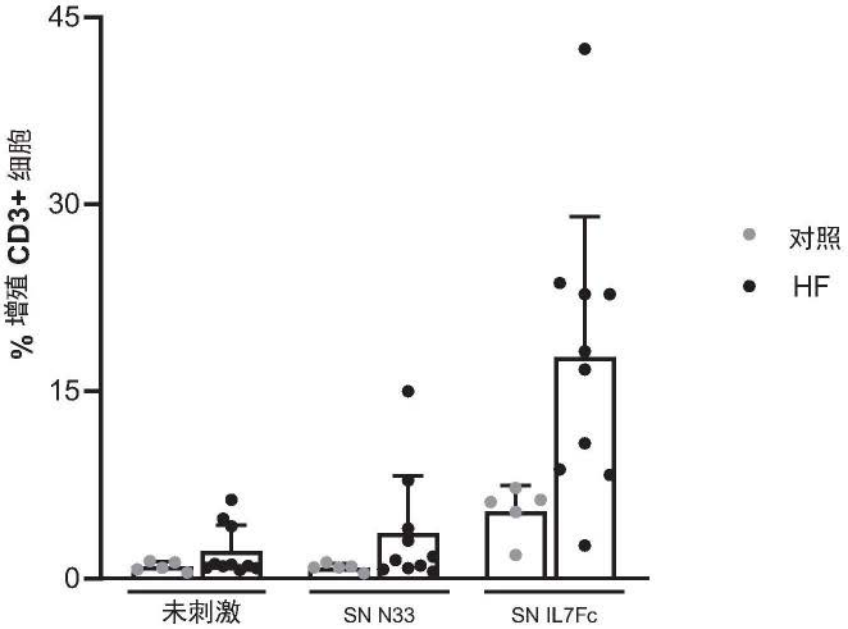
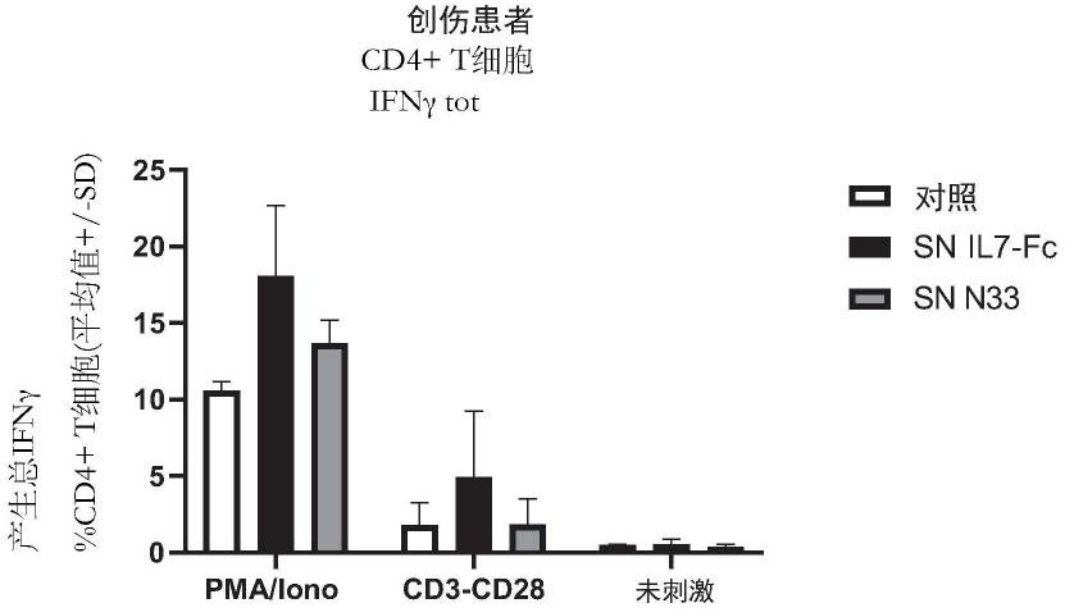

45
30
15
0
% 增殖 CD3+ 细胞
未刺激
SN N33
SN IL7Fc
对照
HF

图37

38A


创伤患者
CD4+ T细胞
IFNγ tot
产生总IFNγ
%CD4+ T细胞(平均值+/-SD)
25
20
15
10
5
0
PMA/Iono
CD3-CD28
未刺激
对照
SN IL7-Fc
SN N33

38B

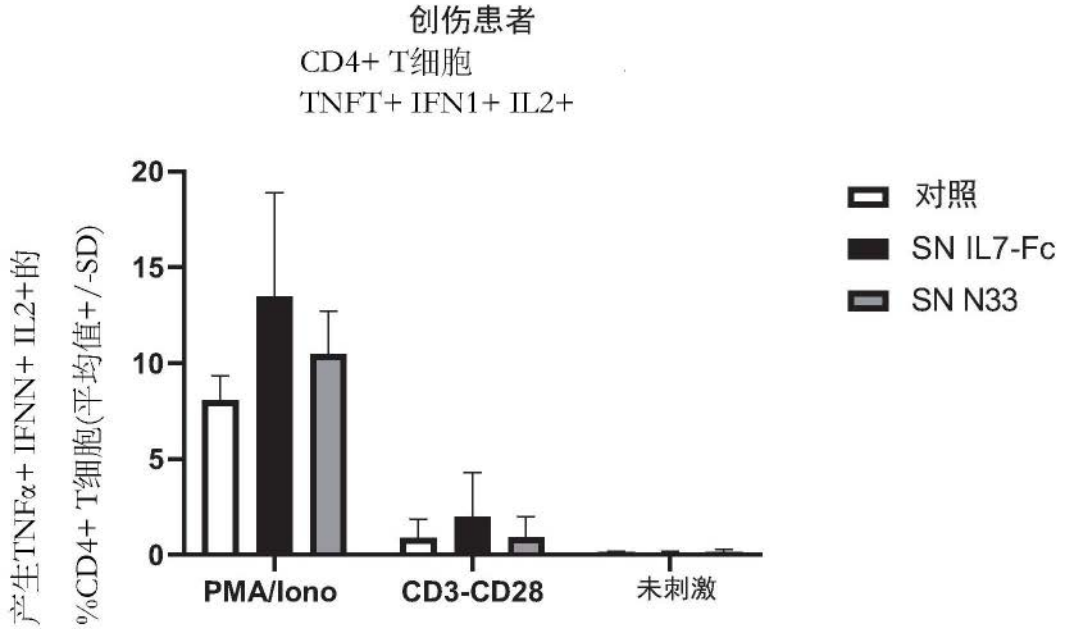
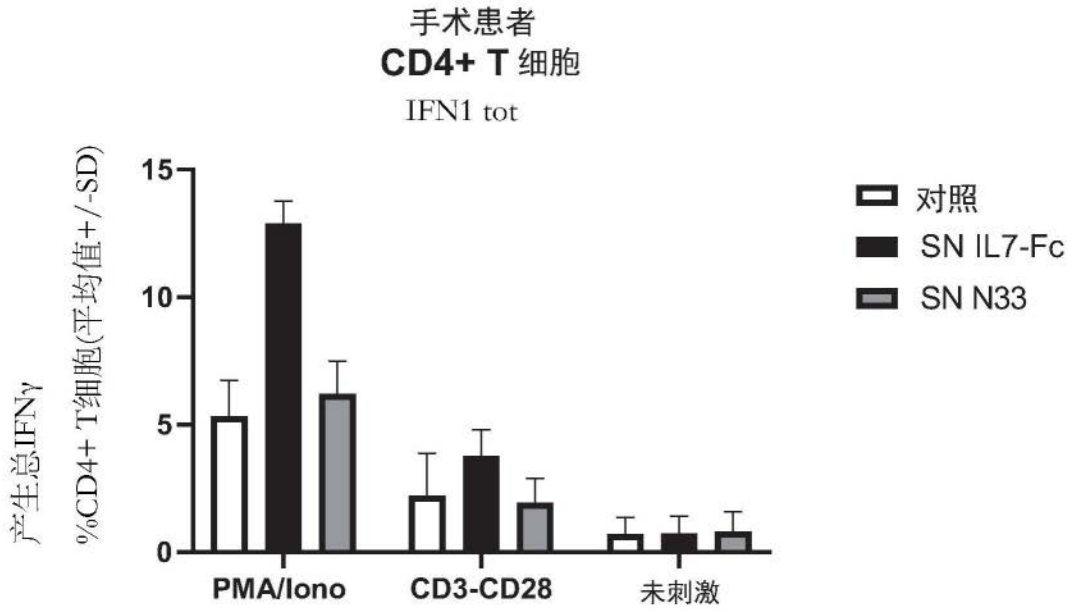

创伤患者
CD4+ T细胞
TNFT+ IFN1+ IL2+
产生TNFα+ IFNN+ IL2+的
%CD4+ T细胞(平均值+/-SD)
20
15
10
5
0
PMA/Iono
CD3-CD28
未刺激
对照
SN IL7-Fc
SN N33

图38

39A


手术患者
CD4+ T 细胞
IFN1 tot
产生总IFNγ
%CD4+ T细胞(平均值+/-SD)
15
10
5
0
PMA/Iono
CD3-CD28
未刺激
对照
SN IL7-Fc
SN N33

39B

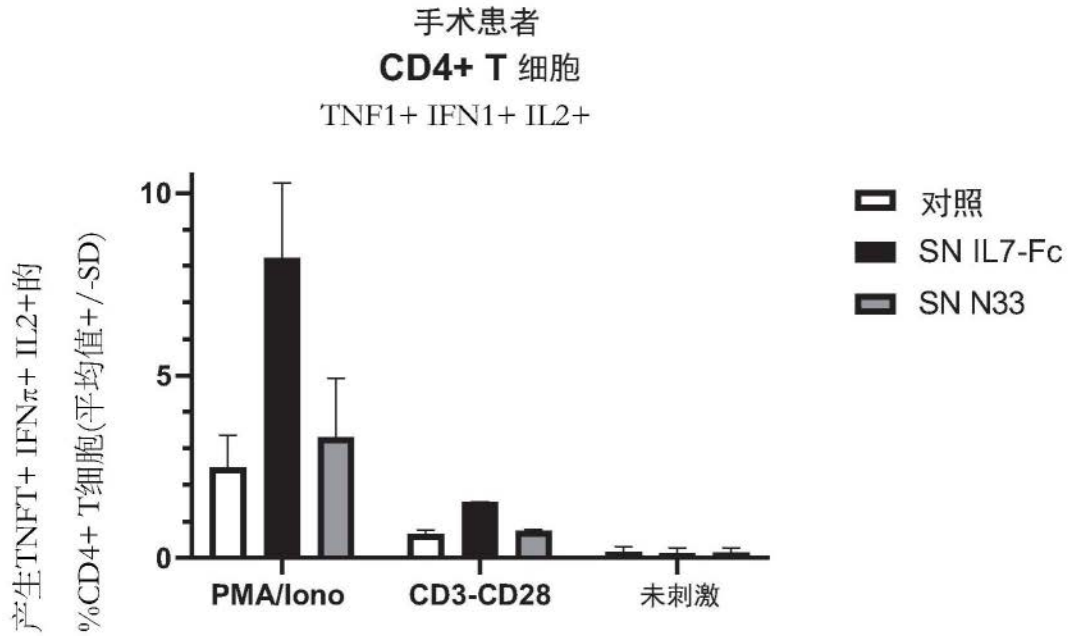

手术患者
CD4+ T 细胞
TNF1+ IFN1+ IL2+
产生TNFT+ IFNπ+ IL2+的
%CD4+ T细胞(平均值+/-SD)
10
5
0
PMA/Iono
CD3-CD28
未刺激
对照
SN IL7-Fc
SN N33

图39