



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105025924 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201480008074. 8

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(22) 申请日 2014. 01. 24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/395(2006. 01)

PCT/EP2013/052485 2013. 02. 07 EP

C12N 5/0784(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/051422 2014. 01. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/122035 EN 2014. 08. 14

(71) 申请人 汉诺威医学院

地址 德国汉诺威

(72) 发明人 雷娜塔·斯特里波克

古斯塔沃·萨尔格罗-洛佩兹

阿努萨拉·登塔那塞马克

阿诺德·甘泽

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

权利要求书2页 说明书61页

序列表6页 附图30页

(54) 发明名称

经诱导树突细胞及其用途

(57) 摘要

本发明涉及被改造为表达至少一种细胞因子和至少一种抗原的细胞,所述至少一种细胞因子诱导树突细胞(DC)祖细胞自主分化为功能性抗原呈递性经诱导DC(iDC)。此外,公开了所述iDC用于在造血干细胞移植之后使免疫系统再生的治疗用途。所述iDC还可用于产生具有功能性内源再生人源化免疫系统的小鼠,所述免疫系统产生抗原特异性T细胞和B细胞应答,所述小鼠可用作研究人适应性免疫应答的动物模型。

1. 被改造为表达以下的经诱导树突细胞 (iDC) :
 - a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和
 - b) 至少一种抗原 ;所述经诱导树突细胞用作药物。
2. 被改造为表达以下的 iDC :
 - a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和
 - b) 至少一种抗原 ;所述 iDC 用于在造血干细胞 (HSC) 移植之后使免疫缺陷对象的免疫系统再生。
3. 根据权利要求 2 所述的 iDC, 其中载体是慢病毒载体。
4. 根据权利要求 3 所述的 iDC, 其中所述慢病毒载体为整合酶缺陷型。
5. 根据权利要求 2 至 4 中任一项所述的 iDC, 其中表达至少一种抗原的所述 iDC 表达至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子。
6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述细胞因子选自 GM-CSF、IL-4、IFN- α 、IL-15、TGF- β 、TNF- α 、FLT3L、IL-3 和 CD40L。
7. 根据权利要求 6 所述的 iDC, 其中所述 iDC 表达选自以下的细胞因子的组合 : (i) FLT3L 和 IL-3 ; (ii) FLT3L 和 CD40L ; (iii) FLT3L 和 IFN α ; (iv) GM-CSF 和 IFN- α 和 IL-15 ; (v) GM-CSF 和 IFN- α 和 TNF- α ; 以及 (vi) GM-CSF 和 IFN- α 和 TGF- β 。
8. 根据权利要求 2 至 7 中任一项所述的 iDC, 其中由所述 iDC 表达的一种抗原是可以诱导细胞毒性免疫应答或体液免疫应答的抗原, 所述细胞毒性免疫应答或体液免疫应答选自异种反应性、同种异体反应性、新反应性或自身免疫。
9. 根据权利要求 2 至 8 中任一项所述的 iDC, 其中所述对象的免疫缺陷是选自以下的免疫缺陷 : 由电离辐射引起的免疫缺陷、由施用至少一种细胞毒性药物引起的免疫缺陷、原发性免疫缺陷和由病原体引起的免疫缺陷。
10. 根据权利要求 2 至 9 中任一项所述的 iDC, 其中所述造血干细胞移植是自体的。
11. 根据权利要求 2 至 10 中任一项所述的 iDC, 其中所述对象是人。
12. 根据权利要求 2 至 9 中任一项所述的 iDC, 其中所述干细胞移植是异源的。
13. 根据权利要求 12 所述的 iDC, 其中所述对象是人。
14. 根据权利要求 13 所述的 iDC, 其中供体和接受者的不同之处在于至少两个初级 HLA 基因座和 / 或至少两个次级 HLA 基因座。
15. 被改造为表达以下的 iDC :
 - a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和
 - b) 至少一种抗原 ;所述 iDC 用于作用于治疗淋巴性扩散的癌症或由嗜淋巴细胞病原体引起的疾病的药物。
16. 包含至少一种整合酶缺陷型慢病毒载体的 iDC, 其中所述载体介导以下的表达 :
 - a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和
 - b) 至少一种抗原。
17. 用于使免疫缺陷对象中的免疫系统再生的方法, 其包括以下步骤 :
 - a) 将造血干细胞移植到所述对象中 ; 以及
 - b) 向所述对象施用经诱导树突细胞 (iDC), 所述经诱导树突细胞被改造为表达至少一

种抗原和至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述对象是小鼠并且 HSC 来源于人。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述小鼠的特征在于存在内源 T 细胞和树突细胞的内源祖细胞。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的方法, 其中所述小鼠品系具有导致适应性免疫系统 (包括 T 细胞和 B 细胞) 功能障碍或不存在的原发性免疫缺陷。

21. 根据权利要求 18 至 20 中任一项所述的方法, 其中所述小鼠选自以下品系: NOD-Rag1^{nu11}IL2Ry^{nu11}-NRG、NOD/LtSz-SCID/IL2Ry^{nu11}-NSG 和 NOD/SCID/IL2Ry^{nu11}-NOG。

22. 根据权利要求 17 至 21 中任一项所述的方法, 其中所述载体介导抗原 pp65 以及细胞因子 (i) GM-CSF 和 (ii) 干扰素- α 和 / 或白介素-4 的表达。

23. 小鼠, 其具有通过根据权利要求 18 至 22 中任一项所述的方法产生的再生免疫系统。

24. 根据权利要求 23 所述的小鼠用于研究人免疫系统或者用于测试药物、植入物或装置在人中之使用的用途。

经诱导树突细胞及其用途

[0001] 本发明涉及被改造为表达至少一种细胞因子和至少一种抗原的细胞,所述至少一种细胞因子诱导树突细胞(DC)祖细胞自主分化为功能性抗原呈递性经诱导DC(iDC)。此外,公开了所述iDC用于在造血干细胞移植之后使免疫系统再生的治疗用途。所述iDC还可用于产生具有功能性内源再生人源化免疫系统的小鼠,所述免疫系统产生抗原特异性T细胞和B细胞应答,所述小鼠可用作研究人适应性免疫应答的动物模型。

[0002] 发明背景

[0003] 造血干细胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)已经成为用于多种恶性造血病症的标准治疗方法,由于供体移植物的长期造血移植和移植物抗白血病作用,导致对于慢性髓样白血病(80%)和急性髓样白血病(65%)具有高的临床成功率。然而,HSCT后的对象在移植后最初100天遭遇严重的细胞免疫缺陷并且仅在HSCT后1年之后才达到完全的T细胞和B细胞重建。较长时期的细胞免疫缺陷与后续的机会性病毒(opportunistic viral)感染和真菌感染以及复发的风险增加(高达40%)相关(Seggewiss, R., 和 H. Einsele, 2010, "Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update." *Blood* 115:3861-3868; Roncarolo, M. G. 等, 2011, "Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Immunological reviews* 241:145-163; Mori, T., 和 J. Kato, 2010, "Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation" *International journal of hematology* 91:588-595)。因此,需要加快具有广泛的T细胞和B细胞应答库(repertoire)之淋巴细胞库的恢复以及诱导在HSCT后移植对象中的优化病毒免疫的策略。

[0004] 在过去十年中,已经开发了在基于被动免疫和主动免疫的免疫缺陷宿主中诱导免疫重建的新的先进治疗方法。然而,解决这样的疗法的效力和生物安全性之合适的体内实验模型仍处于开发阶段。为了在实验上重演在体内HSCT之后的人免疫重建,在亚致死全身辐照(TBI)之后将CD34+造血干细胞(HSC)移植到缺乏通常的白介素-2受体 γ 链(IL2R γ)的多种免疫缺陷小鼠品系(NOD-Rag1nullIL2R γ^{null} -NRG、NOD/LtSz-scid/IL2R γ^{null} -NSG或NOD/SCID/IL2R γ^{null} -NOG)中,导致在CD34+细胞转移之后8周至10周的人造血系的重建(Ishikawa, F. 等, 2005, "Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chainnull mice." *Blood* 106:1565-1573)。重要的是,无论HSC的来源和细胞移植的方法如何,人源化小鼠表现出亚最佳水平的T成熟淋巴细胞和B成熟淋巴细胞重建,缺乏抗原特异性细胞应答和体液应答以及总体的无反应性(Lepus, C. M. 等, 2009, "Comparison of Human Fetal Liver, Umbilical Cord Blood, and Adult Blood Hematopoietic Stem Cell Engraftment in NOD-scid/ γ c-/-, Balb/c-Rag1-/- γ c-/-, and C.B-17-scid/bg Immunodeficient Mice." *Human immunology* 70:790-802; Andre, M. C. 等, 2010, "Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2Rgamma(null)mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells." *J Immunol* 185:2710-2720)。决定人源化

小鼠中的无效淋巴发育的因素包括不存在人组织相容性分子、受损的胸腺功能以及不良的人细胞因子环境。

[0005] 最近已经描述了解决该问题的尝试,包括递送细胞因子 (O' Connell, R. M. 等, 2010, "Lentiviral Vector Delivery of Human Interleukin-7(hIL-7) to Human Immune System(HIS) Mice Expands T Lymphocyte Populations." PLoS One 5; Chen, Q. 等, 2009, "Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice." Proc Natl Acad Sci U S A 106 :21783-21788)、移植胎儿淋巴组织以及 HPC(Hu, Z., 和 Y. G. Yahg, 2012, "Human lymphohematopoietic reconstitution and immune function in immunodeficient mice receiving cotransplantation of human thymic tissue and CD34+ cells" Cell Mol Immunol 9 :232-236; Biswas, S. 等, 2011, "Humoral immune responses in humanized BLT mice immunized with West Nile virus and HIV-1 envelope proteins are largely mediated via human CD5+ B cells." Immunology 134 :419-433) 以及使用组成型表达主要组织相容性分子 (MHC) I 型 (Shultz, L. D. 等, 2010, "Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r γ null humanized mice." Proc Natl Acad Sci U S A 107 :13022-13027) 和 HLA II 型 (Danner, R. 等, 2011, "Expression of HLA Class II Molecules in Humanized NOD. Rag1KO. IL2RgcKO Mice Is Critical for Development and Function of Human T and B Cells" PLoS One 6) 或关键造血细胞因子 (Willinger, T. 等, 2011, "Human IL-3/GM-CSF knock-in mice support human alveolar macrophage development and human immune responses in the lung" Proc Natl Acad Sci U S A 108 :2390-2395) 的转基因品系。这些策略允许针对人病毒攻击的 B 细胞和 T 细胞应答的有限改善。重要的是, 只有少量报道描述了在 HSC 移植小鼠中的重建淋巴结构的存在 (Singh, M. 等, 2012, "An Improved Protocol for Efficient Engraftment in NOD/LTSZ-SCIDIL-2R γ NULL Mice Allows HIV Replication and Development of Anti-HIV Immune Responses" PLoS One 7; Marodon, G. 等, 2009, "High diversity of the immune repertoire in humanized NOD. SCID. gamma c-/- mice" European journal of immunology 39 :2136-2145; Sun, Z. 等, 2007, "Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1" J Exp Med 204 :705-714)。尽管使用了来自人脐带血或胎儿肝的高质量 CD34+HPC, 从而达到高效率的人细胞移植和合理水平的人淋巴细胞, 但是几乎不能观察到淋巴结 (LN)。这些数据表明淋巴器官再生的缺乏可能对人源化小鼠模型中观察到的不良的淋巴样细胞重建起主要作用。

[0006] DC 在诱导适应性免疫应答中起着核心作用。重要的是, DC 引起三级淋巴结构的再生和重构并且在主动免疫应答期间保持 LN 的功能中起着基本作用。

[0007] 使用慢病毒 (LV) 介导的基因转移, 已经开发出产生用于癌症免疫疗法之高度有活力和有效的 DC 的方法 (Pincha, M. 等, 2011, "Lentiviral vectors for induction of self-differentiation and conditional ablation of dendritic cells" Gene therapy 18 :750-764; Koya, R. C. 等, 2007 "Lentiviral vector-mediated autonomous differentiation of mouse bone marrow cells into immunologically potent

dendritic cell vaccines”Molecular Therapy 15 :971-980)。LV 诱导的 DC 表现出高水平的移植和刺激抗原特异性应答并保护抵抗体内黑素瘤的有效能力。目前,证明了人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和干扰素 (IFN)- α 向人单核细胞的整合酶缺陷 (ID) LV 基因递送导致自主分化的且高度有活力的树突细胞 (Daenthansanmak, A. 等, 2012, “Integrase-defective lentiviral vectors encoding cytokines induce differentiation of human dendritic cells and stimulate multivalent immune responses in vitro and in vivo”Vaccine 30 :5118-5131)。

[0008] 因此, 本发明要解决的问题可视为提供在造血干细胞移植之后改善免疫系统再生的手段和方法。

[0009] 所述问题通过在权利要求和以下说明书中所述的实施方案来解决。

发明内容

[0010] 在一个方面中, 本发明涉及被改造为表达以下的经诱导树突细胞 (iDC) :

[0011] a) 至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和

[0012] b) 至少一种抗原 ;

[0013] 所述经诱导树突细胞用作药物。

[0014] 在另一个方面中, 本发明涉及被改造为表达以下的 iDC :

[0015] a) 至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和

[0016] b) 至少一种抗原 ;

[0017] 所述 iDC 用于在 HSC 移植之后使免疫缺陷对象的免疫系统再生。

[0018] 在又一个方面中, 本发明涉及被改造为表达以下的 iDC :

[0019] a) 至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和

[0020] b) 至少一种抗原 ;

[0021] 所述 iDC 用于治疗淋巴性扩散 (spreads lymphatically) 的癌症或由嗜淋巴细胞病原体引起的疾病的药物。

[0022] 在又一个方面中, 本发明涉及用于使免疫缺陷对象中的免疫系统再生的方法, 其包括以下步骤 :

[0023] a) 将造血干细胞移植到所述对象中 ; 以及

[0024] b) 向所述对象施用 iDC, 所述 iDC 被改造为表达至少一种抗原和至少一种诱导 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子。

[0025] 在又一个方面中, 本发明涉及具有由本发明的方法产生的功能性异种基因免疫系统的动物模型。

[0026] 在又一个方面中, 本发明涉及具有由本发明的方法产生的人源化免疫系统的小鼠用于研究人免疫系统或用于测试药物、植入物或装置在人中之使用的用途。

[0027] 在又一个方面中, 本发明涉及包含至少一种整合酶缺陷型慢病毒载体的 iDC, 其中所述载体介导以下的表达 :

[0028] a) 至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子 ; 和

[0029] b) 至少一种抗原。

[0030] 在又一个实施方案中, 本发明涉及用于产生 iDC 的方法, 其包括以下步骤 :

[0031] a) 从来源于合适供体的样品中分离祖细胞；

[0032] b) 将所述细胞改造以实现至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子和至少一种抗原的表达。

[0033] 发明详述

[0034] 在下文详细描述本发明之前,应理解的是,本发明不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以改变。还应理解的是,本文使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案的目的,而不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由所附权利要求限定。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员的通常理解相同的含义。优选地,本文使用的术语如以下文献所述定义: " A multilingual glossary of biotechnological terms:(IUPAC Recommendations) ", Leuenberger, H. G. W, Nagel, B. and **Kölbl**, H. 编辑. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland)。

[0035] 在整个该说明书和其后权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”及变体如“包含”和“含有”将被理解为意指包括所述整体或步骤或者整体或步骤的组,但是不排除任何其他整体或步骤或者整体或步骤的组。

[0036] 在整个该说明书的正文中引用了一些文件。每个本文所引用的文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、说明、GenBank 登录号序列递交等),无论在前还是在后,均通过引用以其整体并入本文。不应将本文的任何内容解释为承认:本发明没有权利由于在先发明而早于这些公开。

[0037] 本发明的 iDC 的描述

[0038] 本发明涉及被改造为表达以下的 iDC:

[0039] a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子;和

[0040] b) 至少一种抗原。

[0041] 可用于以下在本申请中进一步描述的方法和用途的 iDC 是树突细胞,通过表达至少一种细胞因子和至少一种抗原来诱导所述树突细胞的自主分化。

[0042] 术语树突细胞的“自主分化”是指树突细胞从合适的祖细胞发育,其通过内源表达至少一种细胞因子和至少一种抗原来刺激。术语“自主分化”并不排除在分化过程中向生长培养基添加细胞因子。然而,在该过程中需要内源表达诱导 DC 祖细胞自主分化为 DC 的至少一种细胞因子,即,如果未将 iDC 改造以实现至少一种细胞因子的表达,则不发生自主分化。优选地, iDC 的改造是在体外进行的过程。

[0043] 在一个优选的实施方案中,祖细胞分化为树突细胞所需的所有细胞因子和抗原均是由祖细胞和所得 iDC 内源表达的。

[0044] 可分化为树突细胞的任何细胞均是根据本发明 iDC 的合适祖细胞。因此,术语“祖细胞”涵盖多潜能干细胞和造血干细胞。优选地,树突细胞的祖细胞是单核细胞,更优选为外周血单核细胞。优选地,所述单核细胞的特征在于在其细胞表面上存在 CD14。为 CD14⁺CD16 的人单核细胞被认为是典型的单核细胞,而 CD14⁺CD16⁺细胞是非典型的单核细胞。这两种类型的单核细胞均是优选的。单核细胞表达 GM-CSF、M-CSF、G-CSF 的受体和趋化因子受体 CCR1、CCR2 和 CCR5。因此,祖细胞是由至少一种选自以下的基因的表达来定义的:CD14、CD16、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、CCR1、CCR2 和 CCR5。更优选地,祖细胞的特征在于表达至少 2 个、3 个或 4 个前述基因。此外,优选地,祖细胞并不表达 CD3、CD19、CD20 和 CD56,

因为它们 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和天然杀伤细胞的标志物。可通过本领域已知的方法来确定受体或表面标志物的表达,所述方法包括使用与受体或表面标志物特异性结合的标记抗体以及对标记进行检测。可通过多种本领域已知的方法来检测和 / 或量化标记,所述方法包括共聚焦显微术或荧光激活的细胞分选 (FACS)。

[0045] iDC 的祖细胞优选地来源于选自灵长类动物、啮齿类动物、猫、狗、猪、牛和羊的有机体。灵长类动物优选为人、黑猩猩或猕猴,最优选为人。啮齿类动物优选为小鼠或大鼠,最优选为小鼠。

[0046] 在一个特别优选的实施方案中,iDC 来源于造血干细胞的供体。

[0047] 优选地,合适的祖细胞通过选择在细胞表面上表达 CD14 的细胞而来源于骨髓或血液 (外周血或脐带血)。

[0048] 术语“改造”用于指导致表达一种或更多种细胞因子和 / 或一种或更多种抗原的过程,所述细胞因子和 / 或抗原不是被 DC 祖细胞或 DC 天然表达的或者不是在一定水平上天然表达的。在一个优选的实施方案中,通过引入包含编码一种或更多种细胞因子和 / 或一种或更多种抗原的核酸序列的载体来改造细胞。可将这些编码核酸序列包含在一个载体中或包含在分开的载体上,例如,将编码一种或更多种细胞因子的核酸序列包含在一个载体上而将编码一种或更多种抗原的核酸序列包含在另一个载体上。在另一个优选的实施方案中,将 DC 祖细胞或 DC 改造以表达细胞因子和 / 或抗原,所述细胞因子和 / 或抗原是在人类基因组中天然编码的但是其表达通常是沉默的或在 DC 祖细胞或 DC 中被抑制。这可通过本领域已知的方法来实现,所述方法包括将启动子和 / 或增强子序列引入编码各个细胞因子和 / 或抗原的基因附近。如果引入启动子,则优选的是以这些启动子指导内源细胞因子和 / 或抗原表达的方式将其引入各个基因的编码区的上游。优选地,引入强的组成型启动子如病毒启动子,例如,CMV 立即早期启动子或 SV40 启动子或管家基因的启动子。在一个可替换的实施方案中,使用可调节的启动子系统,如果需要的话,其允许调整细胞因子和 / 或抗原的表达和表达水平。这样的可调节启动子系统包括,例如, Tet^{on}、Tet^{off} 或 lac 阻遏物系统。此外,可将不同的启动子系统用于细胞因子和抗原,例如,用于细胞因子的可调节启动子和用于抗原的组成型启动子。可将使用载体的方法与引入异源启动子 / 增强子的方法组合,例如,可通过将合适的启动子 / 增强子引入各个细胞因子基因的附近来改造细胞以表达在人类基因组中被编码的一种或更多种细胞因子并且可用包含编码一种或更多种抗原的核酸序列的载体来转染所述细胞。

[0049] 术语抗原的或细胞因子的“内源表达”是指通过树突细胞本身和 / 或其祖细胞来产生所述分子。所述内源表达可由编码所述细胞因子或抗原的细胞基因的上调或者通过如上所列的细胞因子或抗原的重组表达来介导。

[0050] 优选地,在组织特异性、可诱导的或组成型启动子的控制下通过细胞基因的转录激活来实现细胞基因的上调。还优选的是,用可激活特定基因的转录的核酸或编码诸如转录因子之调节蛋白质的核酸来转染细胞,如果在细胞中表达所述转录因子,则其诱导内源细胞因子基因的转录。然而,使用细胞因子或抗原的重组表达通常是较容易的,并且因此是优选的。

[0051] 术语“重组表达”是指在树突细胞或其祖细胞中的基因的表达,其中所述基因被包含在引入细胞中的核酸分子中。用于将外来核酸分子引入真核细胞的方法是本领域公知

的。原则上,可使用任何这样的方法,只要其导致细胞期望地表达至少一种细胞因子和至少一种抗原而不损害树突细胞的发育或功能即可。

[0052] 因此,在本发明的一个优选的实施方案中,诱导至少一种细胞因子和至少一种抗原表达之 iDC 的改造是将编码所述蛋白质的载体引入 DC 或其祖细胞中,所述至少一种细胞因子诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC。

[0053] 载体

[0054] 优选地,使用用于哺乳动物细胞中的表达载体来引入编码细胞因子和抗原的基因。这样的载体通常包含复制起点(如有必要的话,参见下述)、位于待表达基因前方的启动子、任选地在反向的增强子、以及任何必需的核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止序列。然后,可将这样的表达载体用于介导至少一种抗原和至少一种细胞因子的表达。

[0055] 在一个优选的实施方案中,本发明的表达载体包括以下、基本上由以下组成或由以下组成:质粒;噬菌粒;噬菌体;黏粒;人工染色体,特别是人工哺乳动物染色体;敲除构建体或敲入构建体;病毒,特别是腺病毒、痘苗病毒、减毒痘苗病毒、金丝雀痘病毒、疱疹病毒(特别是单纯疱疹病毒)、逆转录病毒、腺相关病毒、鼻病毒、线状病毒以及上述病毒的改造形式;病毒体;“裸”DNA,脂质体;病毒样颗粒;以及核酸包被颗粒,特别是金球体(gold sphere)。逆转录病毒优选为慢病毒。

[0056] 允许产生这样的重组病毒载体之质粒的实例包括 pFastBac1(Invitrogen Corp., Carlsbad CA)、pDCCMV(Wiznerowicz 等,, Double-copy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering:application to melanoma vaccine development.” GeneTher. 1997 Oct ;4(10):1061-8.) 和 pShuttle-CMV(Q-biogene, Carlsbad, California)。特别优选的是病毒载体,如慢病毒载体(LV)、逆转录病毒载体、腺病毒载体。

[0057] LV 提供这样的方法,通过其将有效、持久、非毒性和非免疫原性基因递送到单核细胞中并且可获得 DC。慢病毒可感染非增殖性细胞,由于慢病毒预整合复合物的亲核性质,其允许被细胞核输入机器识别。LV 可转导原代静止细胞、培养中生长停滞的细胞以及终末分化的细胞。慢病毒包装系统最初由 Naldini 等根据三联瞬时感染方案(Naldini L 等,“In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector”. Science. Apr 12 1996 ;272(5259):263-267) 开发,之后演变为“第二代”LV,其中从病毒包装系统中去除了 4 个 HIV 附加基因(vif、vpr、vpu和 nef)而不影响病毒滴度或转导效率(Dull T 等,“A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system”. J Virol. 1998 ;72(11):8463-8471)。因此,在该系统中唯一保留的辅助基因是 rev,其与作为其同源结合序列的 Rev 应答元件(RRE)一起,是病毒产生期间将载体和包装构建体 RNA 从细胞核中有效地输出所需的。因此,在“第二代”LV 中降低了毒性以及重组的可能性两者。在改进包装系统的同时,已经开发了自身灭活(SIN)LV 设计,其通常包含在 3' 长末端重复(LTR)中的 400 个核苷酸缺失(Zufferey R 等,“Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery”. J Virol. Dec1998 ;72(12):9873-9880.)。对于 SIN 载体,显著地降低了具有野生型病毒之载体移动的风险和能够复制之 LV 的后续产生。已经将具有 tat-非依赖型启动子的自身灭活载体

命名为“第三代”LV。在大多数情况下, LV是具有水泡性口炎病毒糖蛋白(VSV-G)的假型(即,用异源包膜蛋白包被),其是报道为与普遍存在的细胞表面磷脂相结合的弹状病毒包膜蛋白,从而实现广泛的宿主范围。

[0058] 因此,在本发明的一个优选的实施方案中,慢病毒载体是第一代LV、第二代LV或第三代LV。在一个特别优选的实施方案中,LV是第三代,即,自身灭活LV,因为该类型的LV具有优良的安全特性。优选地,LV是具有来源于其他病毒的天然包膜的假型或者具有包含靶向特异性细胞感染的分子之经改造的包膜的假型。使用靶向特异性细胞感染的载体提高了安全性,避免非靶向细胞(非DC或非DC前体)感染,因此,是特别优选的。

[0059] 一种特别优选的整合酶缺陷型慢病毒载体具有突变的整合酶,所述突变的整合酶具有如由SEQ ID NO:1所限定的核酸序列。

[0060] 使用整合酶缺陷型慢病毒载体提高了iDC的安全性,因为整合事件可引起后果难以评估的插入诱变。出乎意料地,在本发明的研究中已经发现,即使载体可能在细胞分裂期间丢失并且不能自我复制,整合酶缺陷型载体也仍然允许抗原和细胞因子在分化的DC中稳定和持久地表达。

[0061] 在其中将腺病毒用作表达载体的情况下,可将编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如,后期启动子和三联前导序列。可通过体外或体内重组将目的基因插入到腺病毒的基因组中。在病毒基因组的非必需区(例如,E1区、E3区或E4区)中的插入将导致有活力的并且能够在感染的细胞中表达各个超细胞因子(hypercytokine)的重组病毒。优选的是,修饰所使用的病毒载体以使其不能复制。

[0062] 为了允许转基因的稳定表达,必须向表达载体提供复制起点,其允许独立于细胞基因组的复制,或者必须将表达载体整合到第一细胞和/或第二细胞的基因组中或者可作为非复制细胞核中的附加体(episome)来使其保持稳定。在第一种情况下,将表达载体保持为附加体。合适的复制起点可来源于SV40或其他病毒(例如,Polyoma、Adeno、CMV、VSV、BPV)来源。在第二种情况下,如果将表达载体整合到基因组中,例如,染色体中,则不需要提供复制起点。在后一种情况下,附加体对应于包含逆转录病毒、慢病毒或更特别地HIV的双链DNA拷贝的预整合复合物。因此,在本发明的研究中已经出乎意料地发现,既没有附加体复制也未整合到iDC的基因组中的整合酶缺陷型慢病毒载体适于诱导iDC的自主分化,适于将其生存力保持数周并且适于在HSC移植之后的免疫缺陷型宿主中支持免疫系统的再生。因此,未整合到宿主细胞基因组中的不能复制的载体是特别优选的。

[0063] 为了指导至少一种细胞因子和至少一种抗原的表达,将编码其的基因有效地连接到由细胞的转录机器识别的内部启动子和/或增强子。合适的启动子可来源于哺乳动物细胞的基因组(例如,MHCII启动子、EF1 α 启动子)或者来源于哺乳动物病毒(例如,巨细胞病毒启动子、脾病灶形成病毒SFFV启动子)。特别优选的是能够使上述基因在树突细胞或其祖细胞中表达的启动子。

[0064] 原则上,可将在抗原呈递细胞中转录激活的每个启动子用于构建能够在iDC或其祖细胞中表达抗原和细胞因子的慢病毒载体。因此,启动子优选地选自共刺激配体(B7.1/CD80、B7.2/CD86、CD70)、DC成熟标志物(CD83)和DC标志物(CD1c/BDCA-1、CD141/BDCA-3、CD209、CD40)。

[0065] 用LV转导的小鼠骨髓祖细胞有效地诱导DC在体外和体内自主分化,所述LV表达

由组成型早期巨细胞病毒 (CMV) 启动子或由抗原呈递细胞限制性主要组织相容性复合体 II 型 (MHCII) 启动子驱动的 GM-CSF 和 IL-4 (Pincha 等, 2011) (Pincha M 等. *Lentiviral vectors for induction of self-differentiation and conditional ablation of dendritic cells*. *Gene Ther.* 2011, Aug; 18(8):750-764.)。因此, 这两个启动子是特别优选的。此外, 优选地将其他常用的组成型启动子 (SV40、UBC、EF1 α 、PGK 和 CAGG) 用于产生人 iDC 的 LV 设计。还可使用可被例如多西环素 (doxycycline) 或他莫昔芬诱导的启动子。

[0066] SV40 病毒的早期启动子和晚期启动子是特别有用的, 因为两者均易于作为还包含 SV40 病毒复制起点的片段从病毒中获得。还可使用较小或较大的 SV40 片段, 只要其包含从 HindIII 位点向位于病毒复制起点的 BglIII 位点延伸的约 250bp 序列即可。

[0067] 如本文所使用的, “有效地连接” 意指并入基因构建体以使得表达控制序列有效地控制目的编码序列的表达。

[0068] 编码序列的有效翻译还可能需要特定的起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和邻近序列。可能还需要提供包含 ATG 起始密码子的外源翻译控制信号。本领域普通技术人员将能够容易地对此进行确定并提供必需信号。众所周知, 起始密码子必须为框内 (或相内), 其与所期望的编码序列同处阅读框内以确保整个插入物的翻译。这些外源的翻译控制信号和起始密码子可以是多种来源的, 包括天然的和合成的两者。

[0069] 为了允许由哺乳动物细胞以单个多顺反子 RNA 共表达若干细胞因子和抗原, 可使用包含 “2A” 元件的载体设计。2A 样序列是高度保守的天然存在的病毒元件并且是包含共有基序 (2A, Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly; 2B, Pro) 的短多肽序列 (约 20 个氨基酸长), 导致 2A 甘氨酸与 2B 脯氨酸之间的切割。认为所述切割是通过核糖体 “跳跃 (skipping)” 机制发生的, 其中 2A 元件修饰核糖体活性以跳过甘氨酸与脯氨酸残基之间的多肽键形成, 导致单独的多种蛋白质产物的释放 (Donnelly ML 等, “Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein' cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal' skip' .” *J Gen Virol.* May 2001; 82(Pt 5):1013-1025)。最近的研究利用 2A 样顺式作用水解酶元件 (CHYSEL) 来产生用于从单个开放阅读框 (ORf) 转录本作为单独的蛋白质来同时共表达多个基因的多顺反子载体 (Chinnasamy D 等, “Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI”. *Virol J.* 2006; 3:14; Szymczak AL, Vignali DA. “Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors”. *Expert Opin Biol Ther.* May 2005; 5(5):627-638)。2A 系统在多顺反子载体构建中的一个特别优点是仅使用单个启动子的可行性。由于其的小尺寸, 单个载体构建体可利用若干个 2A 元件来表达多种蛋白质。2A 样元件允许多种蛋白质产物在高效切割下以等摩尔比表达 (de Felipe P. 等, “E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein”. *Trends Biotechnol.* Feb 2006; 24(2):68-75)。载体中的异源性 2A 元件避免了同源重组, 保持慢病毒载体的稳定性。可用于载体的不同类型的 2A 元件包括: 口蹄疫病毒 (F2A)、马甲型鼻炎病毒 (E2A)、Thosea asigna 病毒 (T2A) 和猪捷申病毒 -1 (P2A)。

[0070] 或者, 可使用内部核糖体进入位点 (IRES)。通常, 在真核生物中, 翻译只可在 mRNA 分子的 5' 端起始, 因为翻译起始复合物的组装需要 5' - 帽识别。IRES 是允许通过称为

内部翻译起始的过程在信使 RNA (mRNA) 序列的中间来起始翻译的核苷酸序列。例如在小 RNA 病毒、肝炎病毒或脊髓灰质炎病毒中发现了病毒 IRES。例如在编码成纤维细胞生长因子 (FGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素样生长因子 2 (IGF-II)、C-myc、L-myc、Pim-1、蛋白激酶、p58PITSLRE 或 p53 的 mRNA 中发现了细胞 IRES。类似于 2A 元件, 可将异源 IRES 组合到载体中用于将一个 mRNA 翻译为若干蛋白质产物。

[0071] 因此, 在编码多于一个多肽 (例如抗原和细胞因子) 的载体中, 优选地通过 2A 元件或 IRES 来分离编码多肽的核酸序列。特别优选地用于本发明的 2A 元件是由 SEQ ID NO: 5 和 6 进行限定的。

[0072] 可通过包含适当的转录增强子元件和转录终止子来增强表达效率。在真核生物表达中, 如果其不包含在原始克隆区段内, 则人们通常还期望将适当的多腺苷酸位点 (例如, 5' -AATAAA-3') 并入到转录单位中。通常, 在转录终止之前, 将 poly A 添加位点置于蛋白质终止位点“下游”约 30 个至 2000 个核苷酸的位置处。

[0073] 可在载体中包含自杀基因 (例如 HSV-TK) 使得在施用前药 (例如, 更昔洛韦) 时 iDC 在体内药理学消融 (Pincha M 等, *Lentiviral vectors for induction of self-differentiation and conditional ablation of dendritic cells*. *Gene Ther.* 2011, Aug ;18(8) :750-764), 或者, 可使用经修饰的人胱天蛋白酶 9 与人 FK506 结合蛋白 (FKBP) 融合以允许使用小分子药物的条件二聚化 (Strathoof 等, *An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy*, *Blood*. 2005 June 1 ;105(11) : 4247-4254), 从而提高经改造的 iDC 在体内的安全性。因此, 在一个优选的实施方案中, 载体另外地编码自杀基因。所述基因优选为 HSV-TK 或者与人 FK506 结合蛋白融合的人胱天蛋白酶 9。

[0074] 抗原

[0075] 优选地, 由 iDC 表达的抗原是可以诱导选自以下的细胞毒性免疫应答或体液免疫应答的抗原: 异种反应性、同种异体反应性、新反应性 (neo-reactivity) 或自身免疫。

[0076] 术语“异种反应性”是指诱发针对由来自另一个物种的生物体 (优选为病原体) 表达的蛋白质的免疫应答。

[0077] 术语“同种异体反应性”是指诱发针对由来自相同物种的供体之移植的细胞或组织表达的蛋白质的免疫应答。

[0078] 术语“新反应性”是指诱发针对接收 iDC 之对象的突变蛋白质的免疫应答。优选地, 新反应性针对癌抗原。

[0079] 术语“自身免疫”是指诱发针对在生物体机体中表达的蛋白质的免疫应答, 其中介导所述免疫应答的免疫细胞来源于所述生物体机体。通常, 自身免疫由排除免疫耐受机制所引起。优选地, 自身免疫针对由癌细胞异常地过表达而没有被突变的蛋白质。

[0080] 特别优选的诱导异种反应性的抗原选自 pp65 (来源于人巨细胞病毒)、NS3 (来源于丙型肝炎病毒) 以及 gag 和 env (来源于人免疫缺陷病毒)。

[0081] 特别优选的癌抗原, 即, 诱发新反应性或自身免疫的抗原, 选自 TRP2、MART1、WT1 和酪氨酸酶 (所有均来源于黑素瘤) 以及 WT1、Her2/neu 和 BRCA1/2 (所有均来源于乳腺癌)。

[0082] 特别优选的是使用由 SEQ ID NO: 2 表示的核酸编码的 pp65。应理解, 遗传密码是

简并的以使得不同的三联体编码相同氨基。因此,本发明还涉及编码与 SEQ ID NO:2 相同的氨基酸序列的所有核酸序列。因为编码相同氨基酸的不同三联体在不同物种中以不同效率进行翻译,所以本申请设想通过密码子优化来优化核酸序列。

[0083] 特别优选的是使用实验性抗原鸡卵卵白蛋白,也称为 OVA,作为全长蛋白或作为免疫原性肽表位。

[0084] 此外,载体所包含的由核酸序列编码的至少一种抗原可以是与抗原免疫学相同的前述抗原之一的变体。

[0085] 关于抗原的术语“变体”是指通过从抗原中缺失和/或替换至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、8 个、10 个、15 个或 20 个氨基酸所得到的蛋白质。优选地,变体与抗原具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.7%、99.8% 或 99.9% 的序列同一性。特别优选的是通过在 C 末端和/或 N 末端缺失至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、8 个、10 个、15 个或 20 个氨基酸所得的变体。

[0086] 此外,术语“变体”是指保留全长抗原的至少 5 个、10 个、15 个、20 个、25 个、30 个、40 个、50 个、60 个、70 个、80 个或 90 个氨基酸的上述抗原的片段。

[0087] 优选的是,抗原的所有变体或片段是与所述抗原免疫学相同的。如果两个或更多个抗原由相同的抗体 T 细胞或 B 细胞识别,则其是“免疫学相同的”。相同抗体 T 细胞或 B 细胞对两个或更多个免疫原性多肽的识别也称为所述抗体 T 细胞或 B 细胞的“交叉反应性”。优选地,相同抗体 T 细胞或 B 细胞对两个或更多个免疫学上相同的多肽的识别是由于在所有多肽中存在相同或相似的表位。相似表位共享可被相同抗体或 B 细胞受体的 Fab 区或被相同 T 细胞受体的 V 区结合的足够结构和/或电荷特性。抗体、T 细胞受体或 B 细胞受体的结合特性优选地由受体与所讨论表位的结合亲和力来定义。如果具有较低亲和常数的多肽的亲亲和常数是具有较高亲和常数的多肽的亲亲和常数的至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 或至少 98%,则如本申请所理解的,两个免疫原性多肽是“免疫学相同的”。用于确定多肽与受体的结合亲和力的方法,例如,平衡透析或酶联免疫吸附测定 (ELISA),是本领域公知的。优选地,两个或更多个“免疫学相同的”多肽包含至少一个相同的表位。

[0088] 细胞因子

[0089] 由 iDC 表达的细胞因子是任何细胞因子,其以其自身或与一个或更多个另外的细胞因子组合能够诱导祖细胞分化为树突细胞和/或刺激 T 细胞或 B 细胞发育、保持活力或增加适应性免疫应答。此外,需要的是,表达至少一种细胞因子和至少一种抗原的 iDC 适于在以下本申请中进一步示出的方法和用途。特别地,DC 必须表达在干细胞移植之后支持免疫缺陷性宿主中的功能性免疫系统再生的所有细胞因子。

[0090] 优选地, iDC 表达至少一种选自以下的细胞因子:GM-CSF、IL-4、IFN- α 、IL-15、TGF- β 、TNF- α 、FLT3L、IL-3 和 CD40L。

[0091] 更优选地, iDC 表达选自以下组合的细胞因子的组合:(i)FLT3L 和 IL-3;(ii)FLT3L 和 CD40L;(iii)FLT3L 和 IFN α ;(iv)GM-CSF 和 IFN- α 和 IL-15;(v)GM-CSF 和 IFN- α 和 TNF- α ;以及(vi)GM-CSF 和 IFN- α 和 TGF- β 。

[0092] 更优选地, iDC 表达选自以下组合的细胞因子的组合:(i)GM-CSF 和 IFN- α ;(ii)GM-CSF 和 IL-4;以及(iii)GM-CSF 和 IL-15。

[0093] 在 SEQ ID NO:3 中给出了核酸序列 GM-CSF 并且在 SEQ ID NO:4 中给出了编码 IFN α 的核酸。应理解,遗传密码是简并的以使得不同的三联体编码相同的氨基。因此,本发明还涉及编码与由 SEQ ID NO:3 和 4 编码的氨基酸序列相同的氨基酸序列的所有核酸序列。因为编码相同氨基酸的不同三联体在不同物种中以不同效率进行翻译,所以本申请设想通过密码子优化来优化核酸序列。

[0094] iDC 的产生

[0095] 此外,本发明涉及用于产生 iDC 的方法,其包括以下步骤:

[0096] a) 从来源于合适供体的样品中分离祖细胞;

[0097] b) 将所述细胞改造以实现至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子和至少一种抗原的表达。

[0098] 优选地,上述方法包括以下步骤:

[0099] a) 从来源于合适供体的样品中分离祖细胞;

[0100] b) 在增强基因转移法和/或刺激所述祖细胞发育为树突细胞的细胞因子的存在下,在合适的培养基中孵育所述祖细胞。

[0101] c) 用至少一个载体转染或转导细胞,所述载体适于表达至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子和至少一种抗原。

[0102] 上文给出的所有定义也适用于该实施方案。

[0103] 增强基因转移法的细胞因子是这样的细胞因子,当在转染之前或转染期间添加到生长培养基时其提高摄取外来核酸的效率。为了该目的优选的是 GM-CSF、IL-4 或其组合。

[0104] 可将通过该方法产生的 iDC 培养在合适的培养基中直到进一步使用为止。然而,还可将其冷冻储存直到将其施用至患者为止。用于低温保存活细胞的方法是本领域技术人员已知的。

[0105] 在本发明的一个优选的实施方案中,祖细胞是表达来源于人供体的 CD14 的外周血单核细胞并且用 GM-CSF 和 IL-4 补充或者用 GM-CSF 和 IFN α 补充方法步骤 a) 中的培养基。该实施方案优选地涉及在步骤 c) 中用于表达前述细胞因子和至少一种抗原的整合酶缺陷型慢病毒载体的用途。优选地,抗原是 pp65。在实施例部分更详细地描述了该实施方案。

[0106] 本发明 iDC 的治疗用途

[0107] 此外,本发明涉及如上所述的 iDC,其用作药物。

[0108] 而且,本发明涉及如上所述的 iDC,其用于在造血干细胞(HSC)移植之后使免疫缺陷对象的免疫系统再生。

[0109] 优选地,对象是选自灵长类动物、啮齿类动物、猫、狗、猪、牛和羊的生物体。灵长类动物优选为人、黑猩猩或猕猴,最优选为人。啮齿类动物优选为小鼠或大鼠,最优选为小鼠。

[0110] 小鼠优选地属于选自以下的品系:NOD-Rag1^{null}IL2Ry^{null}-NRG、NOD/LtSz-SCID/IL2Ry^{null}-NSG 和 NOD/SCID/IL2Ry^{null}-NOG。用于产生人源化小鼠的老龄小鼠品系(例如 Balb/c-Rag1^{null}IL2Ry^{null};NOD-SCID、NOD-SCID β 2m^{null})也是优选的。此外,还可使用表达对于小鼠中人细胞发育关键的人 MHC I 或 MHC II 或者人细胞因子(例如,GM-CSF、IL-3、IL-7、IL-15)之较新的转基因或敲入小鼠品系。

[0111] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,小鼠的特征在于:

[0112] (i) 在 Prkdc 基因的两个等位基因中的突变；

[0113] (ii) 在编码 IL2 受体 γ 链的基因的两个等位基因中的突变；以及

[0114] (iii) 在编码 KITt 受体的基因中的突变。

[0115] 突变 (i) 和 (ii) 优选为功能丧失突变,即,防止产生基因产物或引起非功能性基因产物产生的突变。突变 (iii) 优选地导致 KIT 受体的功能受限或者是在确定条件下抑制基因产物形成的条件性无效突变。用于产生条件性无效突变的方法是本领域技术人员公知的。

[0116] 优选地,小鼠是 NOD 小鼠。更优选地,其携带 NOD Sirpa 等位基因。

[0117] 还将该小鼠称为 NSC 小鼠并且在 DE 10 2012 207 453 中描述,其通过引用并入,并且涉及小鼠及其产生。

[0118] 免疫缺陷

[0119] 术语“免疫缺陷”是指对象的免疫系统的任何病症,其特征在与在年龄、性别和通常生活条件(例如,营养状态)方面与所述对象相匹配的相同物种的平均个体相比,受损的免疫应答。所述免疫缺陷优选地由以下所定义的至少一个组的免疫细胞的数量减少或功能受损所引起,导致对象对由细菌、病毒、真菌或其他单细胞真核生物所引起的感染疾病的易感性提高或者提高对恶性肿瘤的易感性。

[0120] 在本领域中,“免疫受损”与“免疫缺陷”患者之间是有区别的,其中,后者示出比前者更弱的免疫应答。然而,如本申请所使用的术语“免疫缺陷”涵盖免疫系统之可能失调的整个谱,所述谱从增加频率的轻度感染到例如可在 X-连锁重度联合免疫缺陷中所观察到的免疫系统的整个分支的几乎完全缺失。

[0121] 免疫系统包括两个主要分支,适应性免疫系统和先天性免疫系统。

[0122] 先天性免疫系统对病原体的应答不特异于给定的病原体。先天性免疫系统相当依赖于特异于大量病原体所共有的分子结构之模式识别受体。介导先天性免疫应答的细胞是肥大细胞、吞噬细胞(树突细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)以及天然杀伤细胞。

[0123] 适应性免疫系统的应答特异于给定的抗原,因此,也受限於该抗原。适应性免疫系统的细胞具有在其成熟期间以随机方式在各细胞中单独形成的抗原受体。因此,适应性免疫系统包含具有许多不同受体的大的细胞库。如果对象遇到病原体,则诱导携带特异于病原体抗原的受体之细胞的那些亚群的增殖。之后,一旦从机体中消除病原体,这些细胞中的一些就形成记忆细胞群,如果再次遇到病原体,则所述记忆细胞群使得免疫应答更快速建立。

[0124] 适应性免疫应答由 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞来介导。

[0125] 有两个主要的 T 淋巴细胞组:(i) T 辅助细胞,其特征在於 CD4 受体在其表面上表达,一旦其受体与合适的抗原相结合,就产生多种细胞因子。该细胞因子激活免疫系统的其他细胞。特别地,刺激通过 B 淋巴细胞的巨噬细胞的杀微生物功能和抗体的分泌。(ii) 细胞毒性 T 细胞(CTL),其特征在於 CD8 受体在其表面上表达,识别并杀伤由病毒或其他病原体感染的细胞并且识别并杀伤肿瘤细胞。由 T 辅助细胞来促进针对由主要组织相容性复合物 I(MHCI) 呈递之抗原的 CTL 激活。

[0126] B 淋巴细胞分泌特异于由其受体识别之抗原的抗体。

[0127] 根据免疫缺陷的原因,其可以是永久的或暂时的。由先天遗传的畸变造成的原发

性免疫缺陷通常是永久的。如果免疫缺陷由电离辐射或细胞毒性药物引起,则其持续时间取决于药物或辐射的剂量。如果剂量高到足以杀伤对象中所有造血干细胞,则免疫缺陷将是永久的。如果仅杀伤一部分造血干细胞,则一旦剩余的造血干细胞能够重新进入(repopulate)不同的造血系,免疫缺陷就消退。

[0128] 优选地,对象的免疫缺陷是由选自以下的免疫缺陷引起的:由电离辐射引起的免疫缺陷、由施用至少一种细胞毒性药物引起的免疫缺陷、原发性免疫缺陷和由病原体引起的免疫缺陷。还设想在对象中可存在两种或更多种前述免疫缺陷。

[0129] 由电离辐射所引起的免疫缺陷可由意外或故意暴露于所述辐射引起。通常,故意暴露于电离辐射因治疗癌症而发生。电离辐射主要杀伤快速分裂的那些细胞。因此,适于治疗多种癌症,因为在许多情况下,癌症细胞的特征在于快速增殖。然而,包括造血干细胞的免疫系统细胞也对电离辐射高度敏感。因此,其可能在癌症的放射治疗过程中受到损伤。该损伤可能是实体瘤的器官特异性或组织特异性辐照的不期望副作用。然而,特别地,在由免疫系统的干细胞退化所引起的白血病的情况下,所有造血干细胞的完全消除通常是最后的选择。在这种情况下,在辐照之后移植同种异体造血干细胞是患者存活所需的。

[0130] 用于癌症的放射治疗之典型类型的电离辐射是 X 射线、电子束(能量为 4MeV 到 20MeV)、粒子辐射(质子、中子、离子化核)和来源于诸如钴-60、镅-226、铯-137 或铀-192 来源的 γ 辐射。

[0131] 原发性免疫缺陷由在对象中损害或完全抑制至少一种类型的免疫细胞发育的遗传缺陷引起。

[0132] 优选地,原发性免疫缺陷选自 X-连锁重度联合免疫缺陷(SCID)、腺苷脱氨酶缺陷和 IL-7R α 链缺陷。优选地,X-连锁 SCID 由 IL-2RG 的突变引起。

[0133] 应理解,由造血干细胞移植所治疗的免疫缺陷还可以是由电离辐射和/或施用至少一种细胞毒性药物所加重的原发性免疫缺陷。

[0134] 由施用至少一种细胞毒性药物所引起的免疫缺陷通常也是癌症治疗的典型作用。用于癌症治疗的细胞毒性药物经常杀伤除了癌细胞之外的免疫细胞(包括造血干细胞)。以通常使用的细胞毒性药物剂量,免疫缺陷通常是暂时的,因为并非患者中的所有造血干细胞都被杀伤。然而,如果将造血干细胞移植设想为对该病症的治愈,则本发明的方法将是有帮助的。

[0135] 在对其他类型的治疗不再有响应的某些癌症(例如,霍奇金淋巴瘤)的严重情况下,使用称为“高剂量化疗”的化疗类型。虽然为了使所产生的免疫缺陷最小化而选择在其他化疗方案中的细胞毒性药物剂量,但是对象免疫系统的完全破坏是高剂量化疗的有计划的作用。出于这一原因,在完成高剂量化疗之后对象接受自体或同种异体造血干细胞移植。

[0136] 典型的细胞毒性药物包括拓扑异构酶 I 或 II 的任何抑制剂,例如,喜树碱(topo I)或依托泊苷(topo II);嵌入(interchelate)DNA 的任何化合物,例如,多柔比星。特别优选的是烷基化物质、抗代谢物、抗生素、埃博霉素、细胞核受体激动剂和拮抗剂、铂化合物、干扰素和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)的抑制剂、环加氧酶和/或脂加氧酶(lipoxygenase)的抑制剂、铂配位络合物、吡丙啶(Ethyleneimenes)、甲基三聚氰胺(methylmelamines)、三嗪、长春花生物碱类、嘧啶类似物、嘌呤类似物、烷基磺酸盐、叶酸类似物、蒽二酮(anthracendiones)、经取代的脒、甲基胍衍生物,特别是氨苯砒乙酸、阿柔比

星、安巴肟、氨鲁米特、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤、博来霉素、白消安、亚叶酸钙、卡铂、卡培他滨 (carpecitabine)、卡莫司汀、塞来考昔、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素氮苯砒、柔红霉素、双溴丙脒、己烯雌酚 (diethylstilbestrol)、多西紫杉醇、多柔比星、烯二炔类、表柔比星、埃博霉素 B、埃博霉素 D、雌黏蛋白磷酸盐 (estramucin phosphate)、依托泊苷、黄酮吡醇 (flavopiridol)、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟甲睾酮 (fluoxymesterone)、氟他胺、己烯雌酚二磷酸酯、呋喃唑酮、吉西他滨、六甲蜜胺、氨甲酰羟基胺、呋喃咪唑酮 (hydroxymethylnitrofurantoin)、己酸孕酮、羟基脲、伊达比星、碘苷、异环磷酰胺、伊立替康、亮丙瑞林 (leuprolide)、洛莫司汀、勒托替康 (lurtotecan)、磺胺米隆磺醇胺 (mafenide sulfate olamide)、氮芥、醋酸甲地孕酮、美法仑、米帕林、巯嘌呤、甲氨蝶呤、甲硝唑、丝裂霉素 C、足叶酸乙酰肼、米托坦、米托蒽醌、光辉霉素、茶啉酸、硝呋拉太、硝呋酚酰肼、呋喃三嗪、硝呋莫司、尼莫司汀、ninorazole、呋喃妥因、氮芥、oleomucin、奥索利酸、喷他脒、喷司他丁、非那吡啶、酞磺胺噻唑、哌泊溴烷、松龙苯芥、preussin、丙卡巴肼、乙胺嘧啶、雷替曲塞、雷帕霉素、罗芬昔布、罗格列酮、柳氮磺吡啶、scriflavinium 氯化物、司莫司汀、链脲酶菌素 (streptozocine)、磺胺脲、磺胺醋酰、磺胺氯哒嗪、磺胺嘧啶、磺胺千里酰、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺异噻唑、磺胺脒、磺胺胍、磺胺胍诺 (sulfaguanole)、磺胺甲二唑、磺胺甲噻唑、复方磺胺甲基异噻唑 (co-trimoxazole)、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺二甲噻唑、氨苯磺胺、磺胺异甲基嘧啶、磺胺苯吡唑、磺胺噻唑、磺胺索嘧啶、星形孢菌素 (staurosporin)、他莫昔芬、紫杉醇、替尼泊苷、tertioside、硫鸟嘌呤、塞替派、替硝唑、拓扑替康、三亚胺醌、苏消安 (treosulfan)、甲氧苄啶、曲磷胺、UCN-01、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春碱、长春瑞滨、以及佐柔比星、或者其各自的衍生物或类似物。

[0137] 由病原体引起的免疫缺陷通过用病毒或细菌感染对象而引起。如果所述病原体直接与免疫系统的细胞相互作用，例如通过使用所述细胞作为宿主细胞，或者通过间接方式作用，则所述病原体引起免疫缺陷。间接方式包括分泌调节免疫细胞活性的物质或者从其祖细胞产生成熟的免疫细胞。此外，病原体可诱导宿主生物体的细胞分泌这样的化合物。在本申请中提及的由病原体引起的免疫缺陷优选地通过人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染来引起。

[0138] 免疫系统的再生

[0139] 术语“使免疫缺陷对象中的免疫系统再生”是指改善免疫缺陷对象的免疫系统的整体功能。

[0140] 优选地，提高了至少一种类型的免疫细胞的数量和 / 或活性。更优选地，提高了适应性免疫系统或先天性免疫系统的活性。还优选地，提高了 B 淋巴细胞或 T 淋巴细胞的活性和 / 或数量。

[0141] 甚至更优选地，提高了免疫系统的两个分支二者中的免疫细胞数量和 / 或活性。

[0142] 最优选地，作为免疫系统再生的结果，在年龄、性别和营养状态匹配的健康个体的免疫系统与已经通过 HSC 移植和施用本发明的 iDC 再生的对象的免疫系统功能之间没有显著差异。因此，最优选地，免疫系统的再生完全治愈了免疫缺陷。

[0143] 然而，设想的是，为了抑制残留的宿主免疫系统对移植的 HSC 的排斥或者为了对抗移植抗宿主病，移植的 HSC 的接受者可能需要免疫抑制治疗。这样的免疫抑制治疗的必要性并没有使得免疫系统的再生不完全，因为如在本申请中所理解的，该术语仅仅是指

来自移植的 HSC 的免疫系统的潜在功能。

[0144] HSC 的移植

[0145] 术语“移植造血干细胞”是指从一个对象（“供体”）取出包含造血干细胞（HSC）的材料并将包含 HSC 的制剂施用给相同或不同对象（“接受者”）的过程。

[0146] 在最简单的情况下，将由供体产生的包含 HSC 的材料施用给接受者，而不需要进一步的步骤。可将来源于外周血、脐带血和骨髓的 HSC 制剂直接施用给对象而不需要富集或消耗（depletion）包含在其中的细胞类型。在这些情况下，包含 HSC 的制剂与取自供体的材料相同。

[0147] 然而，优选的是，通过从来源于供体的材料消耗 T 淋巴细胞来产生施用于接受者的制剂。这可通过从由供体产生的材料中移除 CD8 阳性和 / 或 CD3 阳性的细胞来实现。还优选的是，在施用于对象的 HSC 制剂中富集 CD34 阳性的细胞。如果 HSC 来源于外周血，则优选的是，在向对象施用之前富集 CD34 阳性的细胞。用于消耗或富集携带特异性表面抗原之细胞的手段和方法是本领域中常规的，例如，在实施例部分所描述的。

[0148] 可通过本领域已知的各种方法来产生向对象移植的 HSC。通常，供体的骨髓是用于移植的 HSC 的来源。在该方法中，从供体的大骨中移出 HSC。

[0149] 然而，通过单采血液成分术从外周血中产生干细胞已经成为最常用的方法。在产生 HSC 之前，为了增加外周血中的 HSC 的量，供体接受粒细胞集落刺激因子。将单采血液成分术用于从全血中分离白细胞（包括 HSC）。储存白细胞以用于移植，而将血浆和红细胞返回到供体的循环中。

[0150] HSC 的另一个来源是脐带血。脐带血是在出生之后从胎盘和脐带中产生的。脐带血具有比在成年外周血中正常发现的更高浓度的 HSC。

[0151] 在本发明的上下文中，优选的是，干细胞来源于三种上述来源之一。

[0152] HSC 的移植是自体的或同种异体的。

[0153] 在自体干细胞移植中，HSC 的供体和接受者是相同的，即，包含在施用给对象的制剂中的 HSC 来源于相同的对象。如果对象的免疫缺陷是由高剂量化疗引起的，则 HSC 的自体移植是优选的。在这种情况下，可在高剂量化疗进行之前从对象中产生包含 HSC 的材料并且可在高剂量化疗完成之后将包含 HSC 的制剂施用至对象。

[0154] HSC 的同种异体移植包括从一个或多个对象中产生包含 HSC 的材料并将第一个对象的包含 HSC 的制剂施用给不同的对象。因此，供体和接受者是不同的。HSC 同种异体移植的一个特别情况是 HSC 的异种移植。在这种情况下，HSC 的供体和接受者属于不同物种。例如，在实验上进行 HSC 的同种异体移植以在人源化小鼠中建立人免疫系统模型来进行。

[0155] 如果对象患有白血病、骨髓瘤、重症联合免疫缺陷、再生障碍性贫血或先天性中性粒细胞减少，则通常进行 HSC 的异源移植。在这些情况下，供体选择与接受者共享尽可能多的免疫学性质的供体。特别重要的是相同的 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR 和 HLA-DQB1 基因。因此，在本发明的一个优选的实施方案中，HSC 的移植是同种异体移植，其中供体和接受者是人。

[0156] 与造血干细胞的移植相关的一个显著风险是移植物抗宿主病（GVHD）。这种病症的特征在于移植的免疫细胞针对接受者组织的反应。GVHD 有两个亚型，急性 GVHD 和慢性 GVHD。

[0157] 急性 GVHD 发生在移植之后最初 3 个月期间,而慢性 GVHD 较晚发作。两种类型的不同之处在于所涉及的免疫细胞类型和细胞因子形式。通常,急性 GVHD 比慢性 GVHD 更严重。急性 GVHD 可能需要抑制免疫系统的强力药物。因此,许多患有急性 GVHD 并治疗其的患者发展成威胁生命的感染。

[0158] GVHD 影响若干组织和器官:皮肤、黏膜、胃肠道、肝和肺。慢性 GVHD 还可损害外分泌腺和结缔组织。GVHD 可以是轻度(1 级)、中度(2 级)或重度(3 级和 4 级),取决于涉及器官的数量和程度。患有 1 级 GVHD 的患者通常不需要治疗,而其他等级需要药理学免疫抑制。

[0159] GVHD 的风险随着供体与接受者之间的人白细胞抗原(HLA)错配的数量而提高。出于这个原因,仔细地使 HSC 移植物的供体与接受者的 HLA 类型匹配。遗憾的是,人 HLA 分子的高度可变性和对良好匹配的需求使得为给定接收者寻找合适的供体变得相当困难。在一些情况下,由于在待通过 HSC 移植治疗疾病之前不能找到合适的供体,所以疾病进程治愈希望不大。

[0160] 最佳的供体是具有与接受者相同的人白细胞抗原(HLA)-A、人白细胞抗原(HLA)-B、人白细胞抗原(HLA)-C 和人白细胞抗原(HLA)-DRB1 的个体。然而,前述基因座之一的错配是可以容忍的,特别是在没有患低风险疾病的患者中。低风险疾病优选为在第一慢性期中的慢性粒细胞性白血病、在第一缓解期中的骨髓增生异常综合征亚型难治性贫血或急性白血病。如果分析了另外的 HLA 基因座,则 HLA-DQ、HLA-DP、HLA-DRB3、HLA-DRB4 或 HLA-DRB5 的单个错配是可接受的,而在这些二级基因座处的多个错配降低了存活率(Spellman 等,2012,“A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation”,Blood 120:259-265)。

[0161] 出乎意料的是,在本发明的研究中使用的小鼠在组织学检查时仅示出 GVHD 的轻度(1 级)体征,而没有通过肉眼或临床观察(体重、活动性、皮毛质量)到临床体征。这些结果表明,即使 HSC 的移植是异种的,即,在供体(人)与接受者(小鼠)之间的 HLA 分子错配是巨大的(参见实施例 4),也没有观察到严重的 GVHD。显然,本发明的 iDC 的存在提高了移植的免疫细胞对接受者组织的耐受。

[0162] 因此,在本发明的另一个优选的实施方案中,HSC 的移植是同种异体的,其中供体和接受者是人并且具有比本领域已知的 HSC 移植方法所需更低的 HLA 匹配。

[0163] 特别地,选自以下的基因座的至少 2 个或 3 个错配是可接受的:HLA-A、HLA-B、HLA-C 和 HLA-DRB1。也将该组称为 HLA 基因座的“初级组”。更优选地,在前述组中的 2 个或 3 个错配是可接受的。最优选地,前述 HLA 基因座的 2 个错配是可接受的。

[0164] 优选地,就由 HLA-DQ、HLA-DP、HLA-DRB3、HLA-DRB4 和 HLA-DRB5 组成的组而言,至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个或至少 4 个错配是可接受的。将该组称为 HLA 基因座的“次级组”。更优选地,2 个或 3 个错配是可接受的。并且,最优选地,2 个错配是可接受的。

[0165] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,选自第一组的基因座的至少 2 个错配和选自第二组的基因座的至少 2 个错配是可接受的。

[0166] 在本发明的又一个特别优选的实施方案中,选自第一组的基因座的至少 2 个错配和选自第二组的基因座的至少 3 个错配是可接受的。

[0167] 在本发明的又一个特别优选的实施方案中,选自第一组的基因座的至少 2 个错配

和选自第二组的基因座的至少 4 个错配是可接受的。

[0168] 在本发明的另一个特别优选的实施方案中,选自第一组的基因座的至少 3 个错配和选自第二组的基因座的至少 2 个错配是可接受的。

[0169] 在本发明的又一个特别优选的实施方案中,选自第一组的基因座的至少 3 个错配和选自第二组的基因座的至少 3 个错配是可接受的。

[0170] 在本发明的又一个特别优选的实施方案中,选自第一组的基因座的至少 3 个错配和选自第二组的基因座的至少 4 个错配是可接受的。

[0171] 在另一个优选的实施方案中,HSC 的移植是异种的,其中供体是人而接受者是啮齿类动物,优选为具有原发性免疫缺陷的小鼠,最优选为重度联合免疫缺陷 SCID,例如,X 连锁 SCID(具有在 IL-2RG 中的突变)或者在来源于重组激活基因(RAG-1 和 RAG-2)的酶中。

[0172] 在异种 HSC 移植的一个优选的实施方案中,接受者是本申请上面所述的 NRG 小鼠并且 HSC 的供体是灵长类动物,更优选为人。

[0173] 此外,本发明涉及如上所述的 iDC,其能够在干细胞移植之后使调节性 T 细胞(Treg)内源再生。之前称作抑制性 T 细胞的 Treg 是调节免疫系统、保持对自身抗原耐受和消除自身免疫病的 T 细胞的亚群。小鼠模型已经表明 Treg 的调节可治疗自身免疫病,促进器官移植。小鼠研究已经揭示了具有在体外产生和操作的致耐原性 DC 的治疗性疫苗在抑制实验性自身免疫中的效率。在错配的骨髓移植模型中,供体来源的 CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)调节性 T 细胞(Treg)的过继转移保护小鼠免受移植物抗宿主病。通过一些组记录了来自探索类似策略的人中之第一临床试验的结果并且似乎证实了在同种异体干细胞移植之后,Treg 预防严重并发症(例如,移植物抗宿主病)的效率。在人中,Treg 可以是确定的免疫表型如 CD4⁺/CD127-CD25^{hi}或 CD4⁺/CD127-CD25^{hi}FOXP3⁺细胞。因此,可将本发明的 iDC 用于治疗由 HSC 移植物的接受者所经历的移植物抗宿主病。

[0174] 此外,本发明涉及如上所述的 iDC,其用作用于治疗淋巴性扩散的癌症或由嗜淋巴细胞病原体引起的疾病的药物。

[0175] 本发明的 iDC 优先地经过淋巴管迁移至淋巴结。出于这个原因,其特别适于治疗涉及淋巴结的疾病。

[0176] 癌症的一个标志是其在整个机体全身性地扩散从而导致转移形成的能力。一旦出现转移,原发性肿瘤的手术切除或辐照就不足以治愈疾病。如果转移很少,则可用手术和/或放射治疗来移除所述转移。然而,在大多数情况下,转移的数量太过散布(disseminated)以使得不可通过前述手段移除。在这一点上的癌症疾病,全身治疗(如化疗)是使其保留治愈机会的唯一治疗手段。然而,在许多情况下,化疗无法杀伤所有癌症细胞或者癌症获得针对药物的抗性。因此,至关重要的是防止癌细胞的全身扩散。

[0177] 癌症的全身扩散存在两个主要途径:循环系统和淋巴系统。在后一种情况下,肿瘤细胞迁移至肿瘤位于其中的淋巴管引流区域中。然后,细胞迁移至局部淋巴结。这些淋巴结还被称为“警戒淋巴结”。淋巴结引流特定区域的分析是肿瘤的手术切除的常规部分,在警戒淋巴结中是否存在癌细胞是疾病阶段和选择适当治疗的重要参数。在警戒淋巴结中存在癌细胞与预后不良有关。

[0178] 本发明的 iDC 具有介导杀伤存在于淋巴结中之癌细胞的潜力,从而进一步阻断疾病的淋巴扩散。就 iDC 的该用途而言,优选的是,其表达由所讨论的癌细胞所呈递的抗原。

[0179] 优选的根据本发明来治疗的癌症选自黑素瘤和乳腺癌、恶性血液病（白血病、淋巴瘤）、神经系统恶性肿瘤（神经胶质瘤、胶质母细胞瘤）、前列腺癌、肺癌、结肠癌和肝癌。黑素瘤和乳腺癌的治疗是特别优选的。

[0180] 优选地，用于治疗淋巴性扩散的癌症的 iDC 表达至少一种选自以下的抗原：TRP2、MART1、WT1 和酪氨酸酶（所有均来源于黑素瘤）以及 WT1、Her2/neu 和 BRCA1/2（所有均来源于乳腺癌）。

[0181] 在淋巴系统中存在主要地或甚至唯一地发现的病原体。就在这样的疾病的治疗中的用途而言，iDC 优选地表达至少一种还由各自的病原体表达的抗原。

[0182] 病原体优选地选自病毒、细菌、真菌和单细胞真核生物。更优选地，其为病毒，最优选为 HIV。优选地，用于治疗 HIV 的 iDC 表达抗原 gag 和 env。

[0183] 用于使免疫系统再生的方法

[0184] 此外，本发明涉及用于使免疫缺陷对象中的免疫系统再生的方法，其包括以下步骤：

[0185] a) 将造血干细胞移植到对象中；以及

[0186] b) 向所述对象施用 iDC，所述 iDC 被改造为表达至少一种抗原和至少一种诱导人 DC 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子。

[0187] 上文给出的对于 iDC 的所有定义及其治疗用途也适用于该实施方案。

[0188] 优选地，将上述方法用于产生具有人源化免疫系统的小鼠。因此，对象优选为小鼠。更优选地，小鼠属于选自以下的品系：NOD-Rag1^{null}IL2Ry^{null}-NRG、NOD/LtSz-SCID/IL2Ry^{null}-NSG 和 NOD/SCID/IL2Ry^{null}-NOG。

[0189] 优选地，HSC 来源于人并且抗原是 pp65。此外，优选的是，iDC 表达抗原 pp65 和细胞因子 (i) GM-CSF 和 (ii) 干扰素- α 或白介素-4 或白介素-15。更优选地，该表达通过载体介导，并且最优选地，其通过整合酶缺陷型慢病毒载体介导。

[0190] 与在 HSC 移植之前或移植之后没有接受本发明 iDC 的小鼠相比，通过该实施方案产生的小鼠具有功能改善的人源化免疫系统。

[0191] 这种类型的异种 HSC 移植在啮齿类动物（优选小鼠）中建立了人免疫系统。这样的具有人免疫系统的动物是有价值的研究工具，其可用于某些因为伦理或逻辑原因不能在入中进行的实验。遗憾的是，该动物模型有一些缺点。在人 HSC 移植之后，淋巴组织仅仅很差地发育。出乎意料地，在人 HSC 移植之后，向小鼠施用本发明的人 iDC 导致在治疗的小鼠中改善了包含人 T 细胞和 DC 之淋巴结的重建，因此，使得这些小鼠成为人免疫系统的更好模型。

[0192] 目前可用的基于人源化免疫系统 (HIS) 的小鼠模型表现出功能性 T 细胞，特别是功能性细胞毒性 T 细胞的发育不良，所述 T 细胞能够经过主要组织相容性复合物 (MHC) 识别和裂解呈递抗原表位的靶细胞。与此相反，根据本发明产生的具有人免疫系统的小鼠表现出增加的频率和改善的 T 淋巴细胞活性。此外，根据本发明产生的具有人免疫系统的小鼠表现出与人免疫球蛋白（例如，IgM、IgG）和抗原特异性人抗体的产生相关的成熟 B 细胞之频率的增加。此外，根据本发明产生的具有人免疫系统的小鼠表现出胸腺中的人 T 细胞之增强的发育和 Treg 的正常发育。

[0193] 因此，本发明的另一个优选的实施方案涉及通过上述方法产生的具有人源化免疫

系统的小鼠以及该小鼠用于研究人免疫系统或用于测试药物、植入物或装置在人中之使用的用途。一个优选的用途是用该小鼠模型研究人适应性免疫系统。

[0194] 因为不期望植入物在人体中引起炎症,所以在本发明的人源化小鼠模型中的植入物测试是一个特别优选的用途。

附图说明

[0195] 图 1 :Smyle/pp65 产生和表征。(a) 通过磁性选择来分离来自 GCSF 动员 (mobilize) 的健康供体的 CD14⁺ 单核细胞并且对于 Smyle/pp65 用 LV-GM-IFN α 与 LV-pp65 或者对于常规 DC (Con-IFN/pp65) 产生单独使用 LV-pp65 来进行共转导。在重组细胞因子, 即, GM-CSF 和 IFN- α 的存在下, 将 Con-IFN/pp65 DC 始终维持在培养物中。(b) 在不同时间点 (7 天、14 天和 21 天) 在培养的 Smyle/pp65 或 Con-IFN/pp65 中评估由复苏 (recovery) 的平均百分比所表示的细胞生存力。在培养至多三周的 Smyle/pp65 和 Con-IFN/pp65 中通过流式细胞术来分析 (c) CMV-pp65 的表达和 (d) 树突细胞表型的稳定性。数据表示每个时间点的至少三个不同供体的平均值。* $p < 0.05$

[0196] 图 2 :在 Smyle/pp65 (未补充有重组细胞因子) 和 Con-IFN/pp65 (补充有重组 GM-CSF 和 IFN- α) 细胞培养物上清液中累积的细胞因子。(a) 在 7 天之后的细胞因子形式。(b) 在 14 天之后的细胞因子形式。(c) 在 21 天之后的细胞因子形式。

[0197] 图 3 :Smyle/pp65 免疫显著增强了在 HIS-NRG 小鼠的外周血中的人 CD3⁺T 细胞的频率。(a) HIS-NRG 小鼠由人 CD34⁺造血干细胞 (HSC) 的转移产生。在 HSC 重建之后第 10 周和第 11 周在右肋中向小鼠皮下注射 Smyle/pp65 或 Con/pp65。(b) 在 HSCT 之后第 10 周、第 13 周和第 20 周在对照 HIS 小鼠、经 Smyle/pp65 免疫的 HIS 小鼠或经 Con-IFN/pp65 免疫的 HIS 小鼠的外周血中之 CD45⁺/CD3⁺ 人 T 细胞的频率。

[0198] 图 4 :Smyle/pp65 免疫显著增强了 HIS-NRG 小鼠中人 CD3⁺T 细胞和效应记忆细胞毒性 T 细胞的频率。(a) 在获自 HIS-NRG 小鼠的脾的单核细胞中之人 CD45⁺细胞和 CD3⁺细胞的频率。(b) 在 HSCT 之后 20 周在来自 HIS 小鼠的脾中之人 CD4⁺和 CD8⁺淋巴细胞亚群的相对频率以及 CD45RA⁺/CD62L⁺幼稚和效应记忆 CD45RA⁺ CD62L⁺亚群的对应频率。* $p < 0.05$

[0199] 图 5 :在用 Smyle/pp65 免疫 HIS-NRG 之后, 淋巴结的肉眼检测。(a) 在用 Smyle/pp65 细胞免疫的小鼠中的外周淋巴结 (LN) 的肉眼检测。(b) 小鼠示出的在身体不同部分中的可检测之 LN 的频率。

[0200] 图 6 :从野生型 C57BL/6 和经 Smyle/pp65 免疫的 HIS 小鼠中获得的 LN 的免疫荧光分析。人 T 细胞和 DC 填满了 HIS-NRG 小鼠免疫的小鼠中的 LN 原基 (Anlage)。

[0201] 图 7 :用于监测皮下 (s. c.) 施用到之前用 SmyleDC/pp65 免疫的 HIS-NRG 小鼠中之 SmyleDC/pp65-f1UC 迁移的光学成像分析。(a) 实验流程图。(b) 检测 HIS-NRG 小鼠中的生物发光信号。(c) 在其中注射 SmyleDC/pp65-f1UC 的同侧相对于对侧上检测的量化的生物发光信号。

[0202] 图 8 :在 HIS-NRG 免疫之后 CMV 特异性细胞毒性 T 细胞应答的表征。(a) 从用 Smyle/pp65 免疫的 HIS-NRG 中复苏的 LN 中的人 CD45⁺、CD3⁺和 CD19⁺细胞的频率。(b) 人 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞 CD45RA⁺/CD62L⁺幼稚、效应记忆 (EM) CD45RA⁺ CD62L⁺、中枢记忆 (CM) CD45RA⁺ CD62L⁺和 CD45RA⁺/CD62L⁺末端效应 (TE) 的相对频率。(c) 从分离自经 Smyle/pp65

免疫的小鼠之 LN 中获得细胞并将其与自体 Smyle/pp65 或 Smyle (没有抗原) 共培养 7 天。通过用 CMV-pp65 重叠肽孵育过夜来进行再刺激并且对 IFN γ 斑点 (spot) 进行计数。(d) 从获自在 hIL-7 和 hIL-15 的存在下用人抗 CD2、CD3 和 CD28 抗体活化 72 小时的对照、经 Con-IFN/pp65 免疫的 HIS-NRG 和经 Smyle/pp65 免疫的 HIS-NRG 之脾细胞中分选的人 CD3⁺ 细胞。

[0203] 图 9 :在 HIS-NRG 小鼠中的 B 细胞应答。在外周血 (A) 和脾 (B) 中的人 B 细胞的频率以及在 HIS-NRG 血清中的人免疫球蛋白 G 和 M 的检测。

[0204] 图 10 : (A) 从获自 G-CSF 动员的 CD34⁺ 干细胞供体的单核细胞中产生 ConvDC 和 SmyleDC 的流程图。在该研究中,将这两种类型的 DC 用表达 pp65 抗原的慢病毒载体共转导。(B) 人造血干细胞向 NRG 小鼠的移植、免疫和分析的时间表。(C) 用于分析针对在经免疫的 NRG 小鼠中产生之 pp65 的人 T 细胞应答的方法。

[0205] 图 11 :来自 GCSF 动员的供体的人常规 (ConvDC) 和 SmyleDC 的产生与分析。(A) 将编码 CMV-pp65 蛋白质的单顺反子整合酶缺陷型 LV LV-CMV-pp65 单独用于产生 ConvDC,而将 LV-CMV-pp65 加编码人 GM-CSF 和人 IFN- α 的双顺反子 LV 载体用于共转导单核细胞并产生 SmyleDC。(B) 在 SmyleDC 保持培养多至 21 天的上清液中每周测量人 GM-CSF 和 IFN- α 产生。(C) 由每周复苏的活细胞百分比表示的 ConvDC 和 SmyleDC 的细胞生存力,持续至多 21 天。通过流式细胞术每周评估了 (D) CMV-pp65、(E) CD14 的表达以及 (F) 在 DC 培养物中的 DC 分化的稳定性 (通过 CD11c、HLA-DR、CD86、CD83 和 CD80 的表达测量)。(G) 通过 DC1、DC2 和趋化因子的细胞因子珠阵列分析了每周从 ConvDC 和 SmyleDC 获得的细胞上清液。数据表示来自至少三个不同供体的至少三次独立实验的平均值。* $p < 0.05$

[0206] 图 12 :在转导之后那天将由另外的用表达萤火虫荧光素酶的慢病毒载体进行的共转导产生的 SmyleDC 皮下注射入 NRG 小鼠。向小鼠 ($n = 6$) 腹膜内施用荧光素并且进行光学成像分析以定位生物发光信号。在 SmyleDC/ 荧光素酶施用之后第 14 天、第 30 天和第 45 天测量在目的区域中检测到的生物发光并对每只小鼠进行绘图。

[0207] 图 13 :SmyleDC 免疫增加了血浆中的人细胞因子的检测和人 T 细胞的扩增。(A) 在来自对照、经 ConvDC 免疫的 HIS 小鼠或经 SmyleDC 免疫的 HIS 小鼠的血浆中检测人细胞因子 (在 HCT 之后第 20 周)。条表示细胞因子浓度 (pg/mL) 的平均值并且误差条表示 SEM。(B) 在初免 (prime)/ 加强免疫之前 (第 10 周)、在免疫之后 2 周 (第 13 周) 和在免疫之后 8 周 (第 20 周) 进行相对于对照、经 ConvDC 免疫的 HIS 小鼠或经 SmyleDC 免疫的 HIS 小鼠的外周血中之 (C) CD3⁺、(D) CD19⁺、(E) CD4⁺ 和 (F) CD8⁺ 细胞的表达之人 CD45⁺、造血细胞和亚级分的移植分析。数据表示对照 ($n = 10$)、经 ConvDC 免疫的小鼠 ($n = 7$) 和经 SmyleDC 免疫的小鼠 ($n = 22$) 的分布。

[0208] 图 14 :SmyleDC 免疫之后在 HIS-NRG 中的引流淋巴结和淋巴流的再生以及存在于再生的 LN 中的人细胞的表征。(A) 在最后一次 SmyleDC 免疫之后 8 周,腹股沟 LN 和腋窝 LN 的肉眼检测。用 AxioCam 荧光显微镜 (Zeiss) 在 10 倍放大下获得图像并使用 Axiovert 软件 (Zeiss) 进行分析。(B) 在 SmyleDC 注射侧 (IS, 黑色条) 的同侧或对侧 (CL, 空白条) 处,具有再生的 LN 的小鼠的频率,证明了局部淋巴再生和全身性淋巴再生两者。(C) 在从经 SmyleDC 免疫的小鼠中复苏的 LN ($n = 4$) 中 (C) 人 CD45⁺、CD3⁺ 和 CD19⁺ 细胞以及 (D) CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的平均频率。(E、F) 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ LNT 细胞 ($n = 4$) 中的 CD45RA⁺/

CD62L⁺幼稚、CD45RA⁺ CD62L⁺中枢记忆和 CD45RA⁺ CD62L⁺效应记忆亚群的分别表征。(G) 在获自经 SmyleDC 注射的 HIS 小鼠的混合 LN(n = 8) 中分析了在 CD3 中的滤泡 T 辅助细胞 (表达 CD4⁺CXCR5^{hi}PD-1⁺ICOS⁺) 的频率,证实了在小鼠中的人 T 细胞的内源产生。使用人扁桃体细胞用作阳性对照。(H) 在来自混合的人源化 LN 和人扁桃体细胞的 CD19⁺细胞中的 CD24^{hi}CD38^{hi}过渡 (transitional)、IgD⁺CD24^{int}CD38^{int}成熟和 CD27^{hi}CD38^{hi}成浆细胞的相对频率,示出在小鼠中的人 B 细胞的内源产生。

[0209] 图 15 :SmyleDC/ 荧光素酶向邻近淋巴结和对侧淋巴结的迁移。随后,向移植有人 CD34⁺细胞并用 SmyleDC 免疫的 (第 10 周、第 11 周)NRG 小鼠施用 SmyleDC/ 荧光素酶 (在第 20 周)。扩散到预形成的再生 LN 的生物发光信号 (可通过外部成像或通过外植的 LN 分析检测) 证明了 SmyleDC 的迁移能力以及在 LN 中细胞的高生存力 (多至 21 天)。

[0210] 图 16 :在小鼠脾中的人 DC 的检测。从移植有人 CD34⁺细胞并用 SmyleDC 或 ConvDC 免疫的 (第 10 周、第 11 周)或未免疫的对照并且在第 20 周处死的 NRG 小鼠收集脾。通过免疫染色和流式细胞术来分析脾细胞中骨髓 DC (Lin⁻,HLA-DR⁺CD11c⁺) 和类浆细胞 DC (Lin⁻,HLA-DR⁺CD123⁺) 的存在。数据示出在小鼠中内源地产生了人树突细胞。

[0211] 图 17 :脾中人细胞群或 HIS-NRG 小鼠 SmyleDC 的绝对数量的扩增。(A) 表示在 HCT 之后第 20 周,来自对照、经 ConvDC 免疫的小鼠和经 SmyleDC 免疫的小鼠之每个脾的人 CD45⁺、CD3⁺和 CD19⁺细胞的总细胞数的散点图。在 (B)CD4⁺T 细胞和 (C)CD8⁺T 细胞中来自总亚群、CD45RA⁺/CD62L⁺幼稚亚群和 CD45RA⁺ CD62L⁺效应记忆亚群之每个脾的细胞计数。来自对照、经 ConvDC 免疫的小鼠和经 SmyleDC 免疫的小鼠之每个脾中的 (D) CD3⁺CD4⁺CXCR5^{hi}PD-1⁺ICOS⁺滤泡 T 辅助细胞的总细胞数以及 (E)CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}过渡细胞、CD19⁺IgD⁺CD24^{int}CD38^{int}成熟细胞和 CD19⁺CD27^{hi}CD38^{hi}成浆细胞的总细胞计数。条和误差条分别表示平均值和 SEM。* 表示 p < 0.05。数据证明了 SmyleDC 在量上以及潜在地在量上扩增了 (较广的 T 细胞受体和 B 细胞受体库)HIS-NRG 小鼠中的成熟 T 细胞和 B 细胞库。

[0212] 图 18 :在 SmyleDC 免疫之后针对 pp65 HIS-NRG 的人 T 细胞应答和体液应答。(A) 在免疫之后 8 周,来自对照 (n = 4)、经 ConvDC 免疫的 HIS 小鼠 (n = 4) 和经 SmyleDC 免疫的 HIS 小鼠 (n = 6) 的脾细胞中分选人 CD3⁺细胞。在用 SmyleDC 离体扩增 10 天之后,在 CMV-pp65 重叠混合肽的存在 (pp65pp) 和不存在 (无 Ag (NoAg)) 下,在抗 IFN- γ 包被的板上进行过夜的再刺激。条表示 2 $\times$ 10⁴个细胞的 IFN- γ 阳性斑点 (spot) 的平均值。(B) 用从获自经 SmyleDC 免疫的 HIS-NRG (n = 4 小鼠) 的 LN 复苏的效应细胞来进行类似操作,其与获自 CMV 血清阳性人供体的 PBMNC 平行测定。数据表示在 2 $\times$ 10⁴个细胞中的平均 IFN- γ 阳性斑点。(C) 在人 CD19⁺细胞中表达 CD27⁺CD38⁺IgG⁺的细胞的频率。在免疫之后 8 周,在来自对照和经 DC 免疫之小鼠的血浆中的 (D) 总免疫球蛋白 (Ig)G 和 (E) IgM 的量化。在免疫之后 8 周,在来自对照、经 ConvDC 注射的小鼠和经 SmyleDC 注射之小鼠的血浆中的 (F) pp65 特异性 IgG 和 (G)pp65 特异性 IgM 的量化。将来自系统性红斑狼疮 (SLE) 患者的血浆样品用作 pp65 特异性 IgG 和 pp65 特异性 IgM 两者的阳性对照。条和误差条分别表示平均值和 SEM。“nd”代表未检出。* 表示 p < 0.05。数据证明了在小鼠中的功能性人适应性抗原特异性 T 细胞和 B 细胞应答。

[0213] 图 19 :通过重量和组织学分析监测移植抗宿主病 (GVHD)。(A) 在重量增益的时

间内监测移植有人 CD34⁺细胞并用 SmyleDC 或 ConvDC 免疫的（在第 10 周、第 11 周）4 周龄 NRG 小鼠或未经免疫的对照。未观察到显著差异。在处死之后，收获皮肤和结肠试样并分析 GVHD 的体征。(B) 皮肤和结肠的组织学分析（400×H&E 染色）分别示出在用 SmyleDC 免疫的 4 只小鼠中的 2 只和用 SmyleDC 免疫的 4 只小鼠中的 3 只为轻度 1 级 GVHD。可检测到一些凋亡碎片，但是淋巴细胞的局灶（focal）和少量浸润表明没有炎症。该数据证明即使在小鼠中再生了完全适应性人异体移植免疫系统，也未观察到重度或中度的移植物抗宿主病。

[0214] 图 20：通过用缺乏抗原的双顺反子载体（IDLV-GMCSF-2A-IFNa）转导单核细胞来产生 SmyleDC 或者通过用共表达 pp65 抗原的三顺反子载体（IDLV-GMCSF-2A-IFNa-2A-pp65）转导单核细胞来产生 SmyleDC/pp65 的实验流程图。(A) SmyleDC/pp65 产生的流程图。(B) 免疫和分析的时间表。(C) 对在经免疫的小鼠中产生的人 T 细胞应答的分析。

[0215] 图 21：SmyleDC 和 SmyleDC/pp65 的产生。a) 双顺反子和三顺反子慢病毒载体的示意图。b) 活细胞的复苏：相对于在第 0 天的经转导单核细胞的输入之在第 7 天、第 14 天和第 21 天复苏的总活 SmyleDC（灰色）和 SmyleDC/pp65（黑色）（表示为百分比）。c) 在第 7 天、第 14 天和第 21 天由 CD86⁺/HLA-DR⁺细胞的 FACS 分析的 DC 表面抗原表达的稳定性。d) 在第 7 天、第 14 天和第 21 天由 SmyleDC/pp65 的细胞内染色分析的 pp65 表达的持续性。e) 在第 7 天的相关 DC 免疫表型标志物（CD14、HLA-DR、HLA-ABC、CD80、CD86、CD83、CD11c 和 CD123）的表达（表示为百分比）。f) 使用细胞因子珠阵列在第 7 天于 SmyleDC 和 SmyleDC/pp65 上清液中可检测到的分泌的细胞因子（IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p70、IFN- γ 、MCP-1、TNF- α ）以及转基因细胞因子（GM-CSF 和 IFN- α ）。用从三个不同供体获得的单核细胞作为独立的三份来进行所有分析。数据证明了全 pp65 抗原的共表达并未改变 iDC 的特性。

[0216] 图 22：使用从脐带血中获得的单核细胞来产生 SmyleDC/pp65 并进行免疫表型分析。(a) 用第 7 天的 SmyleDC/pp65 进行流式细胞术分析的代表性实例。(b) 免疫表型标志物阳性细胞（n = 4）的频率。数据证明了从用于干细胞移植的人脐带血材料中产生 SmyleDC 是可行的并且是可重现的。

[0217] 图 23：整合酶活性（integrase competent, IC）和整合酶缺陷型（integrase defective, ID）慢病毒载体的整合分析。a) 在第 10 天、第 20 天和第 30 天收获的每个用 IC-LV 或 ID-LV 产生的 SmyleDC/pp65 之细胞的整合的 LV 拷贝数，并通过 qPCR 分析 DNA。b) 将 LAM-PCR 用于分析从基因 +/-10kb 分布的整合位点的频率。IC-LV（灰色）和 ID-LV（黑色）。c) 相对于在基因阅读框的任意上游的转录起始位点（TSS）之整合位点的频率。d) 在基因座中可检测到的 10 个主要整合位点（灰色框表示回归的基因间或基因内分析）以及描述在每个基因中的相对插入频率的动力学分析。数据证明了对于 ID-LV，很少观察到慢病毒整合，并且整合模式并未指示致癌发展的热点。

[0218] 图 24：用 HCMV 进行的慢病毒载体化 DC 的感染。a) 通过从 0d. p. i 至 10d. p. i 的 GFP 表达示出 HCMV 感染（MOI = 1）动力学的流式细胞术分析。人成纤维细胞（HF）为阳性对照并且比较包括表达 GMCSF/IL4 的 iDC（SmartDC）、表达 GMCSF/IFNa 的 iDC（SmyleDC）或表达 GMCSF/IFNa/pp65 的 iDC（SmyleDC/pp65）。b) 示出在 HCMV 感染之后在若干 d. p. i. 处

的 CD80 表达之改变的流式细胞术分析。百分比表示比较未感染的细胞（模拟，左图）与 HCMV 感染（右图）之 CD80⁺细胞的分析。c) 在细胞上清液中释放的 HCMV 病毒体的检测。在第 0 天、第 2 天、第 4 天、第 6 天、第 8 天和第 10 天收集来自各感染细胞培养物的上清液并将其用于感染 HF 细胞。通过噬斑形成测定来确定新产生的病毒。在各时间点测定噬斑数并表示为 pfu/ml。数据证明了由于在细胞中 IFN- α 的表达，SmyleDC 并不扩散 HCMV。

[0219] 图 25 : 用 SmyleDC/pp65 进行的 T 细胞体外刺激。a) 不刺激从 HCMV 血清阳性供体 ($n = 3$) 获得的 CD3⁺T 细胞, 将其用 pp65 肽或 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 在体外刺激 16 小时。CD4⁺和 CD8⁺T 细胞产生 IFN- γ ⁺的平均频率 ($n = 3$), * $p < 0.05$ 并且示出了来自一个供体的代表性点印迹分析。b) 在微量培养中的 CD8⁺T 细胞扩增。在 IL-2、IL-7、IL-15 细胞因子和经辐照的饲养细胞的存在下, 以 10 : 1 的比用 APC (SmyleDC 或 SmyleDC/pp65) 在体外刺激 CD8⁺T 细胞两个周期。将没有 APC 的 T 细胞用作对照。左边条形图 : 通过台盼蓝排除来测定各组中扩增的 T 细胞的绝对数量。右边条形图 : 用针对 pp65 表位反应的五聚物来染色扩增的 T 细胞 (A * 0201-NLVPMVATA : 白色 / B * 07-TPRVTGGGAM : 黑色), * $p < 0.05$ 。c) 细胞毒性测定。将用 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 扩增的 CD8⁺T 细胞与靶细胞 (表达 HLA * A2 或 HLA * B7+/-pp65 的 K562) 以不同的效应物 : 靶标 (E : T) 比接种并共培养 4 小时。通过测量偶联酶促测定来评估细胞上清液的 LDH 释放。数据证实了 SmyleDC/pp65 体外扩增对 pp65 有反应性的记忆 T 细胞的功能。

[0220] 图 26 : 免疫植入有来自 G-CSF 供体之 CD34⁺HSC 的 NRG 小鼠以评估 pp65 在 SmyleDC/pp65 中共表达的作用。a) 实验流程图。在移植之后第 10 周和第 11 周用 SmyleDC 或者 SmyleDC/pp65 来免疫移植有 G-CSF 动员的干细胞的 4 周龄经辐照 NRG 小鼠。在第 20 周收集血液、血浆、脾和骨髓。b) 在外周血中的人淋巴细胞扩增的动力学。在第 10 周、第 13 周和第 20 周, 于 DC 免疫之前和之后测定血液中的 T 辅助细胞 (CD45⁺/CD4⁺) 和 CTL (CD45⁺/CD8⁺) 的频率。c) 在外周血中的人 B 细胞扩增的动力学。通过 FACS 分析在经免疫的 NRG 小鼠的血液中测定人 B 细胞 (CD45⁺/CD19⁺) 细胞的频率。d) 左边条形图 : 通过 FACS 测定的在脾中的 CD4⁺、CD8⁺和 CD19⁺细胞的绝对数量 ; 右边条形图 : 在从用 SmyleDC ($n = 5$) 和 SmyleDC/pp65 ($n = 2$) 免疫的小鼠中复苏的 CD4⁺和 CD8⁺群中测定的 T 细胞亚群 : 幼稚 (N, 白色)、T 中枢记忆 (TCM, 灰色) 和 T 效应记忆 (TEM, 黑色)。数据表明 SmyleDC/pp65 产生内源再生的成熟辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的能力。

[0221] 图 27 : 植入有成年 CD34⁺细胞并用 SmyleDC/pp65 免疫之 NRG 小鼠的功能性作用。a) 在移植有成年 HSC 并用 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 免疫之 NRG 小鼠的血浆中可检测的人细胞因子 (pg/ml)。b) 将从移植有成年 HSC 并用 SmyleDC/pp65 免疫的小鼠 ($n = 3$) 中获得的混合并分选的 CD4⁺或 CD8⁺脾细胞用 SmyleDC/pp65 在体外扩增并用无关的肽库 (TRP2) 或用 pp65 肽库在 IFN- γ ELISPOT 板测定上进行脉冲。c) 与获自人供体 ($n = 3$) 的血浆相比, 在移植有成年 HSC 并用 SmyleDC ($n = 5$) 或 SmyleDC/pp65 ($n = 5$) 免疫之 NRG 小鼠的血浆中可检测的人免疫球蛋白 (ng/ml) : IgA、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄和 IgM。e) 通过 ELISA 测量的获自用 SmyleDC ($n = 3$) 或 SmyleDC/pp65 ($n = 3$) 免疫之小鼠的小鼠血浆 IgM 和 IgG 对 pp65 的反应性。数据证明了需要 pp65 来再生功能性人免疫应答 (细胞因子和免疫球蛋白) 以及抗原特异性应答 (T 辅助细胞、CTL、IgG)。

[0222] 图 28 : 植入有 UCB CD34⁺HSC 的 NRG 小鼠的免疫。a) 实验流程图。移植有 UCB 干细

胞的 4 周龄经辐照的 NRG 小鼠对照 ($n = 7$)、在移植之后在第 10 周和第 11 周用 SmyleDC/pp65 免疫两次 ($n = 8$) 或者在第 6 周、第 7 周、第 10 周和第 11 周免疫四次的 4 周龄经辐照的 NRG 小鼠 ($n = 4$)。将未经免疫的小鼠用作对照。在第 16 周收集血液、血浆、脾和胸腺。b) 在外周血中的人淋巴细胞重建的动力学。通过 FACS 分析在经免疫小鼠的血液中测定人 T 辅助细胞 ($CD45^+/CD4^+$)、CTL ($CD45^+/CD8^+$) 和 B 细胞 ($CD45^+/CD19^+$) 的频率。c) 测定为人 T 辅助细胞或 CTL 的绝对数量之脾中的 T 细胞亚群的发育动力学：幼稚 (N)、T 中枢记忆 (TCM) 和 T 效应记忆 (TEM)。d) 在胸腺发育不同阶段的 T 细胞分析。DP： $CD45^+/CD4^+/CD8^+$ ，CD4SP： $CD45^+/CD4^+/CD8^-$ ，CD8SP： $CD45^+/CD4^-/CD8^+$ ，CD3^{lo}： $CD45^+/TCR\alpha\beta^-/TCR\gamma\delta^-$ ，CD3 $\alpha\beta$ ^{hi}： $CD45^+/TCR\alpha\beta^+$ ，CD3 $\gamma\delta$ ^{hi}： $CD45^+/TCR\gamma\delta^+$ 。f) 在血液中作为 $CD4^+/CD127^+CD25^{hi}$ 或 $CD4^+/CD127^+CD25^{hi}FOXP3^+$ 测定的 Treg 的频率。数据证明了 SmyleDC 免疫还刺激了来源于新生儿脐带血干细胞的免疫系统的再生。该作用包括在胸腺中的 T 细胞的早期发育并且不影响作为 $\gamma\delta$ T 细胞和 Treg 之耐受细胞的频率。

[0223] 图 29：植入有脐带血 $CD34^+$ 细胞并且用不同剂量的 SmyleDC/pp65 免疫之 NRG 小鼠的功能性作用。将获自移植有脐带血 HSC 并且未经免疫的（对照）、用 SmyleDC/pp65 免疫 2 次的 ($2\times$) 或用 SmyleDC/pp65 免疫 4 次的 ($4\times$) 小鼠 ($n = 2$) 之分选的 $CD3^+$ 脾细胞用 SmyleDC/pp65 在体外扩增并且不进行刺激或者用无关的肽库 (TRP2) 进行脉冲或者用 pp65 肽库进行脉冲。进行 a) $CD4^+/IFN-\gamma^+$ 的细胞内分析和 b) $CD8^+/IFN-\gamma^+$ 的细胞内分析以测定反应性 T 细胞的频率。c) 与用 SmyleDC/pp65 免疫 4 次的经移植小鼠 ($n = 5$) 相比，在移植有脐带血 HSC 的对照 NRG 小鼠 ($n = 5$) 的血浆中可检测的人免疫球蛋白 (ng/ml)：IgA、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 和 IgM。d) 通过 ELISA 测量的获自对照小鼠或用 SmyleDC/pp65 免疫 4 次的小鼠 ($n = 3$) 之小鼠血浆 IgG 对 pp65 的反应性。包括人血浆作为阳性对照。数据证明了可产生作为针对抗原的 T 细胞和 B 细胞应答两者之来源于脐带血干细胞的功能性人免疫系统的内源再生。

[0224] 在第一方面，本发明涉及被改造为表达以下的经诱导树突细胞 (iDC)：

[0225] a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子；和

[0226] b) 至少一种抗原；

[0227] 所述经诱导树突细胞用作药物。

[0228] 在第二方面，本发明涉及被改造为表达以下的 iDC：

[0229] a) 至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子；和

[0230] b) 至少一种抗原；

[0231] 所述 iDC 用于在造血干细胞 (HSC) 移植之后使免疫缺陷对象的免疫系统再生。

[0232] 在第三方面，本发明涉及根据第 2 方面所述的 iDC，其中载体是慢病毒载体。

[0233] 在第四方面，本发明涉及根据第 3 方面所述的 iDC，其中所述慢病毒载体为整合酶缺陷型。

[0234] 在第五方面，本发明涉及根据第 2 方面至第 4 方面中任一个所述的 iDC，其中表达至少一种抗原的所述 iDC 表达至少一种诱导人树突细胞 (DC) 祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子。

[0235] 在第六方面，本发明涉及根据第 5 方面的方法，其中所述细胞因子选自 GM-CSF、IL-4、IFN- α 、IL-15、TGF- β 、TNF- α 、FLT3L、IL-3 和 CD40L。

[0236] 在第七方面,本发明涉及根据第 6 方面所述的 iDC,其中所述 iDC 表达选自以下的细胞因子的组合:(i)FLT3L 和 IL-3;(ii)FLT3L 和 CD40L;(iii)FLT3L 和 IFN α ;(iv)GM-CSF 和 IFN- α 和 IL-15;(v)GM-CSF 和 IFN- α 和 TNF- α ;以及(vi)GM-CSF 和 IFN- α 和 TGF-B。

[0237] 在第八方面,本发明涉及根据第 2 方面至第 7 方面中任一个所述的 iDC,其中通过所述 iDC 来表达的一种抗原是可诱导选自以下的细胞毒性免疫应答或体液免疫应答的抗原:异种反应性、同种异体反应性、新反应性或自身免疫。

[0238] 在第九方面,本发明涉及根据第 2 方面至第 8 方面中任一个所述的 iDC,其中所述对象的免疫缺陷是选自以下的免疫缺陷:由电离辐射引起的免疫缺陷、由施用至少一种细胞毒性药物引起的免疫缺陷、原发性免疫缺陷和由病原体引起的免疫缺陷。

[0239] 在第十方面,本发明涉及根据第 2 方面至第 9 方面中任一个所述的 iDC,其中所述造血干细胞移植物是自体的。

[0240] 在第十一方面,本发明涉及根据第 2 方面至第 9 方面中任一个所述的 iDC,其中所述干细胞移植物是异源的。

[0241] 在第十二方面,本发明涉及根据第 2 方面至第 11 方面中任一个所述的 iDC,其中所述对象是人。

[0242] 在第十三方面,本发明涉及被改造为表达以下的 iDC:

[0243] a) 至少一种诱导人树突细胞(DC)祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子;和

[0244] b) 至少一种抗原;

[0245] 所述 iDC 用作用于治疗淋巴性扩散的癌症或由嗜淋巴细胞病原体引起的疾病的药物。

[0246] 在第十四方面,本发明涉及包含至少一种整合酶缺陷型慢病毒载体的 iDC,其中所述载体介导以下表达:

[0247] a) 至少一种诱导人树突细胞(DC)祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子;和

[0248] b) 至少一种抗原;

[0249] 在第十五方面,本发明涉及用于使免疫缺陷对象中的免疫系统再生的方法,其包括以下步骤:

[0250] a) 将造血干细胞移植到所述对象中;以及

[0251] b) 向所述对象施用经诱导树突细胞(iDC),所述经诱导树突细胞被改造为表达至少一种抗原和至少一种诱导人树突细胞(DC)祖细胞自主分化为 DC 的细胞因子。

[0252] 在第十六方面,本发明涉及根据第 15 方面所述的方法,其中所述对象是小鼠并且 HSC 来源于人。

[0253] 在第十七方面,本发明涉及根据第 16 方面所述的方法,其中所述小鼠的特征在于存在内源 T 细胞和树突细胞的内源祖细胞。

[0254] 在第十八方面,根据第 16 方面或第 17 方面所述的方法,其中所述小鼠品系具有导致适应性免疫系统(包括 T 细胞和 B 细胞)功能障碍或不存在的原发性免疫缺陷。

[0255] 在第十九方面,本发明涉及根据第 16 方面至第 18 方面中任一个所述的方法,其中所述小鼠选自以下品系:NOD-Rag1^{null}IL2Ry^{null}-NRG、NOD/LtSz-SCID/IL2Ry^{null}-NSG 和 NOD/SCID/IL2Ry^{null}-NOG。

[0256] 在第二十方面,本发明涉及根据第 15 方面至第 19 方面中任一个所述的方法,其中所述载体介导抗原 pp65 和细胞因子 (i)GM-CSF 和 (ii) 干扰素- α 和 / 或白介素-4 的表达。

[0257] 在第二十一方面,本发明涉及具有由根据第 16 方面至第 20 方面中任一个所述的方法产生之再生免疫系统的小鼠。

[0258] 在第二十二方面,本发明涉及根据第 21 方面所述的小鼠用于研究所述人免疫系统或用于测试药物、植入物或装置在人使用的用途。

[0259] 以下实施例仅旨在说明本发明,其不以任何方式限制权利要求的范围。

实施例

[0260] 实施例 1

[0261] 材料和方法

[0262] 慢病毒载体构建和整合酶缺陷型慢病毒产生

[0263] 表达 CMV-pp65 和萤火虫荧光素酶 LV- β GLUC 的自失活 (SIN) 慢病毒骨架载体和单顺反子载体此前已有描述 (Salguero, G., 等, 2011, "Preconditioning therapy with lentiviral vector-programmed dendritic cells accelerates the homeostatic expansion of antigen-reactive human T cells in NOD.Rag1-/-IL-2rgammac-/-mice." Hum Gene Ther 22:1209-1224)。构建表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的双顺反子慢病毒载体和间隔有 P2A 元件 (RRL-cPPT-CMV-hGMCSF-P2A-hIL4) 的人干扰素 α (LV-G2 α) 的构建体并按照先前所述对其进行广泛表征 (Daenthanasanmak, A. 等, 2012, "Integrase-defective lentiviral vectors encoding cytokines induce differentiation of human dendritic cells and stimulate multivalent immune responses in vitro and in vivo." Vaccine 30:5118-5131)。通过对启动子和转基因进行限制性消化和测序分析来再确认所有构建体的结构完整性。如前所述通过瞬时共转染人胚肾 293T 细胞来进行大规模慢病毒生产 (Stripecke, R., 2009, "Lentiviral vector-mediated genetic programming of mouse and human dendritic cells." Methods Mol Biol 506:139-158)。为了产生整合酶缺陷型慢病毒,在共转染中使用 4 种包装质粒:含有表达细胞因子之慢病毒载体的质粒、表达含有整合酶基因中 D64V 点突变之 gag/pol 的质粒 (pcDNA3g/pD64V. 4xCTE)、表达 rev 的质粒 (pRSV-REV) 和编码 VSV-G 包膜的质粒 (pMD.G)。收集病毒上清液并通过超速离心浓缩,通过用酶联免疫吸附测定 (ELISA) (Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA) 评估 p24 抗原浓度来评价滴度。1 μ g 的 p24 当量 /ml 对应于约 1×10^7 感染性病毒颗粒 /ml。

[0264] 人 CD34 阳性外周血干细胞分离

[0265] 外周血单核细胞 (PBMC) 获自经受用 G-CSF (Granocyte, Chugai Pharma) 的造血干细胞动员方案之造血成年干细胞移植成年供体的白细胞单采 (leukapheresis)。所有的研究都根据由汉诺威医学院伦理评价委员会 (Hannover Medical School Ethics Review Board) 批准的方案来进行。使用 CD34 磁性细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) 通过 MACS 来阳性选择 CD34+ 细胞。经历两轮的阳性磁性选择后,如通过流式细胞术所评价的,获得的细胞纯度高于 97% 并且 CD3+T 细胞的污染物低

于 0.2%。

[0266] 人常规-IFN α 和 Smyle DC 的产生

[0267] 使用 CD14 分离珠 (Miltenyi Biotech) 使用自体 CD34 阴性 PBMC 级分来进一步阳性选择 CD14⁺单核细胞。对于慢病毒基因转移,在转导之前使单核细胞在重组人 GM-CSF 和 IL-4(分别为 50ng/ml,Cellgenix,Freiburg,Germany) 存在下在含有无血清 Cellgro 培养基的培养物中保持 8 小时。对于 SmyleDC/pp65 的产生,将 5×10^6 CD14⁺单核细胞在 $5 \mu\text{g/ml}$ 硫酸鱼精蛋白 (Valeant,Dusseldorf,Germany) 存在下以及以 5(相当于 $2.5 \mu\text{g/mL}$ p24 当量)的 ID-LV-G2 α 感染复数 (M.O.I.) 转导 16 小时。在转导之后,将 Smyle/pp65 DC 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次并进一步维持在无血清 Cellgro 培养基的培养物中。对于常规 IFN- α -DC 的产生,将单核细胞如上文所述与 ID-LV-pp65 一起孵育。转导 16 小时后,将 LV 除去并使细胞在重组人 GM-CSF (50ng/ml) 和 IFN- α (1000U/ml,PBL InterferonSource,New Jersey,USA) 存在下维持在培养物中。每 3 天补充用于 Con-IFN/pp65 的细胞因子,同时将 SmyleDC 在不含细胞因子的情况下在培养基中孵育。培养 7、14 和 21 天后,收获 iDC。对于小鼠免疫,在转导后第 1 天将 Smyle/pp65 重悬于 PBS 中或者在转导后的第 7 天将 Con-IFN/pp65 DC 重悬于 PBS 中,并用于皮下注射。采用台盼蓝排除来确定活细胞计数的数目。

[0268] 使用人 HSC 进行小鼠移植

[0269] 繁殖 NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1wj1} (NOD ;Rag1^{-/-};IL-2r γ ^{-/-},NRG) 小鼠并将其在无病原体条件下维持在 IVC 系统中 (BioZone, United Kingdom)。涉及小鼠的所有操作都经过 Lower Saxony 的审核和批准并且遵循汉诺威医学院动物研究室 (Animal Facility at Hannover Medical School) 提供的指导方针。对于 HSC 移植,将 4 周龄的小鼠用 ¹³⁷Cs 柱辐照器 (gammacell, company, country) 以亚致死剂量 (450cGy) 辐照。向小鼠接受者的尾静脉中静脉内注射 5×10^5 人 CD34⁺外周血 HSC。在人 HSC 移植后,在不同的时间点 (6、10 和 13) 对小鼠采血以监测人造血细胞植入的状况并在第 20 周将小鼠处死以进行最后的分析。对于 DC 免疫,从培养板收集 Smyle/pp65 或 Con-IFN/pp65 DC 并将其以 5×10^5 细胞的浓度重悬于 $100 \mu\text{L}$ PBS 中。在 HSC 移植后第 10 和第 11 周,使用 27 号针头通过皮下注射到小鼠右后肢中来向 HSC 重建小鼠注射 DC 混悬液。

[0270] 流式细胞术分析

[0271] 使用下列小鼠抗人-抗体在外周血和脾中评价人 HSC 重建小鼠中人造血细胞的植入:PerCP 抗-CD45、Alexa700 抗-CD19、Pacific blue 抗-CD4、APC 抗-CD3、PE-Cy7 抗-CD8、FITC 抗-CD45RA、PE 抗-CD62L (Biolegend)、PE 抗-CD14、FITC 抗-谱系阳性、APC 抗-CD11c、PE 抗-CD123 (Becton Dickinson)。对于外周血分析,将血液如下裂解:将血液与红细胞裂解缓冲液 (0.83%氯化铵/20mMHepes,pH 7.2) 在室温下一起进行两轮的孵育,持续 5 分钟,之后用冷的磷酸缓冲盐水 (PBS) 稳定并以 300g 离心 5 分钟。将细胞与抗体在 4℃下孵育 30 分钟。将收获的脾细胞用红细胞裂解缓冲液 (0.83%氯化铵/20mMHepes,pH 7.2) 处理 5 分钟、用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤并与抗体一起在冰上孵育 30 分钟。在洗涤步骤之后,将细胞重悬于 PBS 中并用 LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 获取。对于 DC 表型表征,使用下列抗人抗体:PE 抗-CD80、PerCP 抗-HLA-DR、APC 抗-CD86、APC 抗-CD83 (Becton Dickinson)。对于 DC 染色,将细胞收集、用 PBS 洗涤一次并与小鼠 IgG ($50 \mu\text{g/mL}$) 一起在冰上孵育 15 分钟,之后与抗体一起孵育。将细胞洗涤、重悬于细胞固定液 (Becton Dickinson) 中并使用

FACSCalibur 细胞仪进行进一步分析。使用 FlowJo 软件进行分析 (Tree Star, Inc.)。

[0272] 对人 T 细胞植入的组织学和免疫组织化学分析

[0273] 从人 HSC 重建 NRG 或 C57Bl6 野生型小鼠收获 LN 并将其包埋在最佳切割温度复合物 (O. C. T. Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) 中以冷冻保存。将冷冻切片 (5 μ m) 经丙酮固定并用单克隆抗 - 小鼠或人 DC3 (eBioscience, San Diego, CA, USA)、抗小鼠或人 CD11c (eBioscience)、抗 - 小鼠 LYVE-1 (Dako)、抗 - CD31 小鼠 (BD Bioscience) 染色。在 AXIOCAM 荧光显微镜 (Zeiss) 中进行免疫荧光分析。

[0274] 体内生物发光成像分析

[0275] 在成像前 5 分钟, 将小鼠用氯胺酮 (100mg/kg, 腹膜内) 和甲苄噻嗪 (10mg/kg, 腹膜内) 麻醉并注射 d- 荧光素 (150mg/kg, 腹膜内) 的水溶液。将小鼠置于电荷耦合器件摄像机 (IVIS 200, Xenogen, Cranbury, NJ, USA) 的暗室中, 并在弱照明下拍摄灰度体表参照图像 (数码照片)。切断光源后, 使用软件程序 Living Image (Xenogen) 作为 Igor (Wavemetrics, Seattle, WA, USA) 上的叠加在至多 5 分钟的限定时间内量化从动物体内的荧光素酶表达细胞发射并通过组织传输的光子。对于解剖学定位, 在 Living Image 中生成表示光强度的伪彩色图像 (蓝色, 强度最小; 红色, 强度最大) 并将其重叠在灰度参照图像上。量化的发光为动物表面上的平均光子辐射并将其表示为光子 / 秒 / cm^2/sr , 其中 sr = 球面度。

[0276] 对从小鼠 LN 和脾复苏的 pp65-CTL 的功能分析

[0277] 对于针对 CMV-pp65 的免疫应答的评价, 收获每组的脾细胞、将其合并、用 APC 缀合的抗人 CD3 染色并用 XDP 细胞分选仪 (Beckman Coulter) 分选。将人 CD3⁺细胞以 10,000 细胞 / 孔的密度接种在抗人 IFN- γ 包被的 96 孔 ELISPOT 板中并在 10 μ g/mL pp65 重叠肽库 (Miltenyi) 存在下孵育过夜。使用对应于 CMV、EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 和流感病毒表位 (PANA Tecs GmbH, Tuebingen, Germany) 的混合物的 CEF 回忆肽库 (recall peptide pool) 作为阳性对照。第二天, 将细胞洗涤并将板进一步与生物素缀合的抗人 IFN- γ 抗体一起孵育, 之后与碱性磷酸酶缀合的链霉抗生物素蛋白一起孵育。将板用 NBT/BCIP 液体底物显影并在 AELVIS ELISPOT 阅读器 (AELVIS GmbH, Hannover, Germany) 中进行分析。对于从 LN 获得的淋巴细胞的分析, 将细胞在 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 存在下离体扩增 7 天并暴露于 ELISPOT 板上的 pp65 重叠肽库, 并且对 IFN- γ 斑点进行计数。

[0278] HSC-NRG 小鼠中的免疫球蛋白产生

[0279] 在重建后 20 周 (在第二 Smyle 或 IFN-conDC 后 8 周) 从 HSC-NRG 小鼠收获血浆, 并如其他地方所述通过 ELISA 筛选总人 IgM 和总人 IgG 的存在 (Becker, P. D. 等, 2010, "Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated human immune system mice" PLoS One 5)。通过用 AffiniPure F(ab')₂ 片段山羊抗人 IgM (Fc5 μ -特异性的, Jackson ImmunoResearch) 或 AffiniPure 山羊抗人 IgG (Fc γ 片段特异性的; Jackson ImmunoResearch) 包被 96 孔板来进行总 IgM 和 IgG 的确定。使用 IgM (0.8mg/ml) 和 IgG (10.4mg/ml) 浓度已知的对照人血清蛋白校准物 (Dako) 作为标准物来与样品进行比较。在包被后, 将板在 ELISA 洗涤缓冲液 (PBS, 0.5% Tween-20) 中洗涤、用 4% 乳液封闭并进一步与连续稀释的小鼠血浆 (以 1 : 5 的稀释度开始) 一起孵育。对于 HRP 缀合的抗 - IgG, 以 1 : 2500 的稀释度添加酶缀合检测抗体, 而对于 HRP 缀合的抗 - IgM,

以 1 : 5000 的稀释度添加酶缀合检测抗体 (两者均获自 Jackson ImmunoResearch)。使用 TMB 底物 / 终止液 (Biosource) 来进行 ELISA 测定显影。

[0280] 统计学分析

[0281] 进行参数 (t 检验) 和非参数 (Kruskal-Wallis) 统计学分析以比较组间在 HIS-NRG 小鼠中造血细胞系 (hematopoietic lineage) 植入方面的差异。在 Graph prism 第 5 版软件中进行分析。所有的测试都是双侧的并且认为 $P < 0.05$ 是显著的。

[0282] 结果

[0283] LV 诱导的 Smyle/pp65 DC 产生和表征

[0284] 最近, 我们已示出用于促进人单核细胞中人 GM-CSF 和 $IFN\alpha$ 之组成型表达的整合酶缺陷型 (ID)-LV 体内诱导高度存活的具有高激活状态以及高生存力和植入特性的 $IFN\alpha$ -DC (Daenthanasanmak, A. 等, 2012, "Integrase-defective lentiviral vectors encoding cytokines induce differentiation of human dendritic cells and stimulate multivalent immune responses in vitro and in vivo" Vaccine 30 : 5118-5131)。可将这些 LV 诱导的 DC (命名为 "Smyle" (自主分化的、骨髓衍生的、慢病毒诱导的) DC) 另外用 ID-LV 共转导以表达 CMV 被膜 (tegument) 病毒蛋白 pp65。Smyle/pp65 有效地刺激体外和体内抗 CMV 特异性 CTL 应答。在此, 我们的目的是使用从 G-CSF 动员的造血干细胞供体获得的白细胞单采测试 Smyle/pp65 DC 产生的可行性 (图 1A)。简言之, 对于 Smyle/pp65 产生, 通过对从 G-CSF 动员的 HSCT 供体白细胞单采获得的 PBMC 进行磁性选择来分离 $CD14^+$ 细胞, 并将其用 GM-CSF 和 IL-4 预处理, 之后用表达 GM-CSF 和 $IFN-\alpha$ 的双顺反子 LV 和表达 CMV-pp65 的 LV 过夜 LV 共转导。在去除 LV 后, 将 Smyle/pp65 维持在不含细胞因子补充物的培养物中。通过用 LV-pp65 以类似的方式转导单核细胞来产生表达 pp65 的常规 $IFN\alpha$ -DC (Con- $IFN/pp65$), 并将其维持在培养物中, 每隔两天补充重组人 GM-CSF 和 $IFN\alpha$ 。将细胞培养至多 3 周以确定其分化状态、生存力和表型稳定性。在培养的第 7 天, 我们能够复苏可比较水平的 Con- $IFN/pp65$ 和 Smyle/pp65 DC (45% 相对于 35.6%, $p > 0.05$) (图 1B)。重要的是, 在培养的第 14 天, Smyle/pp65 已示出比 Con- IFN 高 3 倍的复苏水平 (35.4% 相对于 14.2% $p = 0.021$)。在培养 DC 后 3 周, Smyle/pp65 和 Con- $IFN/pp65$ 两者均显著丧失生存力, 但与 Con- $IFN/pp65$ 相比, Smyle/pp65 仍示出较高的水平 (17% 相对于 5%, $p < 0.05$)。我们还对 Smyle/pp65 和 Con- $IFN/pp65$ 在整个培养期间的分化状态进行了评价。通过细胞内染色和流式细胞术分析来确认 pp65 的共表达。与在 Con- $IFN/pp65$ DC 中相比, 在 Smyle/pp65 中 CMV-pp65 的表达维持在较高的水平 (55% 相对于 21.2%, $p = 0.014$) (图 1C)。在培养的第 7 天, Smyle/pp65 和 Con- $IFN/pp65$ 两者都展现出典型的 DC 分化表型, 该表型以 CD11c、CD86 和 MHC-II (HLA-DR) 的高表达水平为特征 (图 1D)。如 CD80 和 CD83 表达所示的, 两种细胞类型都呈现出可比较的成熟状态。Smyle/pp65 在 14 和 21 天的较长培养时期内维持免疫表型标志物的稳定表达。尽管在重组细胞因子存在下进行培养, Con- $IFN/pp65$ DC 仍去分化, 从而丧失分化和成熟标志物的表达。

[0285] Smyle/pp65 和 Con- $IFN/pp65$ 两者维持在培养物分泌的数种内源上调细胞因子中, 这些细胞因子累积在培养物上清液中并可通过细胞因子阵列分析检测: $IFN-g$ 、IL-10、IL-12、IL-13、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、MCP-1 和 $TNF-\alpha$ 表现出总体增强的 Con- $IFN/pp65$ 活化 (图 2)。Con- $IFN/pp65$ 培养物具有较高的 IL-1 β 、4、6、8、12 累积

水平,这表明尽管这些细胞持续暴露于高水平的数种细胞因子,但是它们在维持相关免疫表型标志物表达方面的功能降低。

[0286] 在人 HSC 移植后 Smyle/pp65 支持淋巴细胞区室的复苏

[0287] 为了评价在 HSC 移植背景下 Smyle/pp65 诱导免疫重建的潜力,我们首先通过将人 CD34⁺细胞转移到 4 周龄的经亚致死剂量辐照之 NOD. Rag1^{-/-}. IL2r γ ^{-/-} (NRG) 小鼠中建立了人源化免疫系统模型 (HIS)。在 HSCT 后 6 周,我们已在外周血中检测到 CD3⁺人 T 细胞 (0.35%),在 CD34⁺HSC 转移后 20 周达到 8.6% 的平均频率 (数据未示出)。可检测的人 CD45⁺细胞中主要是人 CD19⁺B 细胞,其中其水平从 84% (第 6 周) 变化直至 77% (第 20 周) (数据未示出)。在对 HIS-NRG 进行 HSC 重建后 20 周,人 CD45⁺细胞对应于 3.9% 的总脾细胞并且人 CD19⁺B 细胞表示大部分的人细胞含量 (84%)。人 CD3⁺T 淋巴细胞对应于 7.8% 的人 CD45 表达细胞并且含有 1 : 1 比的 CD4⁺和 CD8⁺ (数据未示出)。

[0288] 接着,我们评价了 Smyle/pp65 免疫是否改善 HIS-NRG 小鼠中的免疫重建。我们采用了初免 / 加强 (prime/boost) 免疫方案,该方案包括在 HSCT 后的第 10 周注射一次 DC,然后在 1 周后进行加强注射。通过皮下注射在 LV 转导后立即收获的 Smyle/pp65 或经 7 天培养的 Con-IFN/pp65 来进行免疫。如先前所述,将 DC 细胞混悬液 (5×10^5) 注射到右肋中 (Salguero, G. 等, 2011, "Preconditioning therapy with lentiviral vector-programmed dendritic cells accelerates the homeostatic expansion of antigen-reactive human T cells in NOD. Rag1^{-/-}. IL-2rgammac^{-/-} mice" Hum Gene Ther 22 :1209-1224)。将未免疫的小鼠用作对照 (图 3A)。首先,我们评价了 DC 注射对外周血中人 CD45⁺细胞之重建的作用。在第 10 周,在免疫之前人 CD45⁺的频率在所有组中都相似。在初免 / 加强免疫后 1 周,与未免疫的对照相比,经 Smyle/pp65 免疫的小鼠表现出显著增强的人 CD45⁺细胞水平 (1.7% 相对于 0.64%, $p = 0.01$)。在经 Con-IFN/pp65 免疫的小鼠中 CD45⁺细胞频率并不显著更高 (与对照相比为 1.6%, $p = 0.09$)。重要的是,与小鼠对照相比,在 Smyle/pp65 免疫后维持 8 周显著增强的 CD45⁺水平 (1.9% 相对于 0.2%, $p = 0.03$)。经 Con-IFN/pp65 疫苗接种的小鼠在血液中也表现出更高但不显著的 CD45⁺细胞水平 (1.3% 相对于 0.2%, $p = 0.08$)。接着,我们对 DC 免疫后的 T 细胞区室进行了分析。与对照小鼠相比, Smyle/pp65 免疫导致外周血中的 CD3⁺频率提前显著提高 (0.16% 相对于 0.03%, $p < 0.04$),并且与对照相比,在 HSCT 后 20 周支持人 T 细胞的长期植入 (1.8% 相对于 0.03%, $p = 0.04$) (图 3B)。明显地, Con-IFN/pp65- 免疫不诱导 HIS-NRG 小鼠中的人 CD3⁺T 细胞水平提前或长期提高 (0.15%, $p = 0.26$ +1 周; 0.37%, $p = 0.31$ +DC 注射后 8 周,相比较于对照)。在 DC 免疫后 8 周对 CD45⁺细胞中之人 T 淋巴细胞的相对频率进行分析,示出与对照 (59.7% 相对于 8.6%, $p = 0.0001$) 和 Con-IFN/pp65 (59.7% 相对于 21.7%, $p = 0.001$) 相比,在经 Smyle/pp65 免疫的小鼠中 CD3⁺区室的频率显著增强,并且证实通过在这些小鼠中人 T 细胞区室的扩增确定人 CD45⁺细胞的长期植入。

[0289] 在 HSC 重建后 20 周,我们进一步分析了经疫苗接种小鼠和对照小鼠的脾的细胞含量 (图 4)。与未免疫的小鼠 (19.1% 相对于 3.1%, $p = 0.007$) 和经 Con-IFN/pp65 免疫的小鼠 (19.1% 相对于 5.9%, $p = 0.01$) 相比,经 Smyle/pp65 免疫的小鼠表现出显著更高的人 CD45⁺植入水平。因此,与对照小鼠相比,在经 Smyle/pp65 免疫的小鼠中观察到较高的人 CD3⁺细胞频率 (10.1% 相对于 0.31%, $p = 0.007$),对应于 40.8% 的总人 CD45⁺细胞 (图

4A)。Con-IFN/pp65 免疫小鼠未能增强 CD3⁺细胞的频率 (0.17%, $p = 0.5$ 相对于对照), 对应于脾中仅 3.9% 的 CD45⁺细胞。在重建的 NRG 小鼠脾中进一步分析了 CD3⁺T 细胞中淋巴细胞亚群的分布 (图 4B)。尽管我们在 3 组中没有观察到 CD3⁺/CD8⁺细胞间具有显著的差异 (对照, 51%; Con-IFN/pp65, 40.9%; Smyle/pp65 44.2%, $p > 0.05$), 但是我们发现与未免疫的对照相比, 经 Smyle/pp65 免疫的脾细胞中 CD8⁺/CD45RA⁺/CD62L⁺幼稚细胞的水平显著降低 (12.3% 相对于 37.49%, $p = 0.03$)。反之, Smyle/pp65 中 CD8⁺/CD45RA⁺ CD62L⁺ 效应记忆 T 细胞的频率显著高于对照 NRG 小鼠 (38.5% 相对于 19.5%, $p = 0.04$)。对于幼稚 (14.5%) 和效应记忆 (24.7%) 群, 在注射有 Con-IFN/pp65 DC 的小鼠中发现相似但不显著的 CD8⁺T 细胞亚群分布。对 CD3⁺/CD4⁺频率的分析并未显示小鼠组间在总 CD4⁺T 细胞方面具有统计学差异 (对照, 44.7%; Con-IFN/pp65 34.7%; Smyle/pp65 50%, $p > 0.05$)。尽管如此, 还观察到与对照相比, 由于 Con-IFN/pp65 和 Smyle/pp65 免疫, 因此幼稚细胞减少而效应记忆 T 细胞增加, 但并不显著。综合考虑这些数据, 在 HSCT 后进行 Smyle/pp65 免疫促进了 T 细胞区室迅速且持续的重建并显著有利于具有主要效应记忆表型之 CD8⁺T- 和 CD4⁺ (以较低的程度) 的扩增。

[0290] Smyle/pp65 免疫诱导外周淋巴结的重建

[0291] 接下来, 在 HSC 重建后 20 周, 我们针对淋巴结 (LN) 的存在对注射有 Smyle/pp65 或 Con-IFN/pp65 DC 的小鼠进行了分析。我们在注射有 Smyle/pp65 的小鼠中检测到高频率的 LN 形成 (65%), 而对照小鼠和注射有 Con-IFN/pp65 的小鼠表现出低 LN 结构发生 (分别为 11% 和 28%) (图 5A)。对动物体不同区域中的 LN 频率的量化揭示了 DC 注射部位与在相应引流部位的 LN 形成之间具有强相关性 (图 5B)。在经 Smyle/pp65 免疫的小鼠中观察到腹股沟 (57%)、髂骨 (35%) 和腋窝 (56%) LN, 相比之下对照小鼠中在同侧则完全不存在 LN。重要的是, Con-IFN/pp65 注射不诱导髂骨 LN 形成并且分别只在 14% 和 28% 的小鼠中诱导腹股沟和腋窝 LN 的形成。

[0292] 接下来, 我们对从经 Smyle/pp65 免疫的 NRG 小鼠获得的 LN 进行了免疫组织分析。与从野生型 C57BL/6 获得的正常野生型 LN 相比, 重建 NRG 的 LN 中的 LN 结构显示缺乏 B 细胞滤泡 (图 6)。人源化 LN 主要由人 CD3⁺T 细胞构成, 并且我们还观察到人 DC (CD11c⁺) 的存在。LN 被对小鼠淋巴血管细胞 (LYVE-1) 呈阳性的细胞层和小鼠内皮血管 CD31 标志物包裹。重要的是, 我们还观察到存在与高内皮小静脉 (HEV) 类似的结构, 该结构对小鼠 CD31 呈阳性, 表明形成中的 LN 中的原基血管组织过程。

[0293] 接下来, 我们对注射的 Smyle/pp65 DC 是否能够迁移至 HIS-NRG 小鼠中形成的重建 LN 进行了评价。将 Smyle/pp65 用表达萤火虫荧光素酶的 LV (LV-fLUC) 共转导, 使得它们在暴露于荧光素后可产生生物发光。在右侧免疫后 6 周, 将 Smyle/pp65-fLUC 注射到 HSC-NRG 小鼠的后肢中, 其中更频繁地发现 LN (图 7)。作为 DC 迁移的对照, 我们在对侧肋中注射了 fLUC-Smyle/pp65。每周, 在 fLUC-Smyle/pp65 植入和迁移后进行体内生物发光成像。与对侧肋中的相同位置相比, 在 DC 注射后的第 21 天我们发现注射侧中的 LN 位置处有生物发光信号的累积。此外, 当对小鼠实施安乐死并使 LN 暴露时, Smyle/pp65 发光位于形成的腹股沟 LN、同侧腋窝 LN 中而不位于腹内 (例如肠系膜) LN 中 (图 7)。该数据表明 Smyle/pp65 DC 能够迁移至区域性引流 LN 原基所在的部位并且触发 LN 形成。

[0294] Smyle/pp65 诱导 HIS-NRG 小鼠中的特异性免疫应答

[0295] 此前,我们已经证明了 Smyle/pp65 刺激外周血淋巴细胞 (PBL) 小鼠模型中的抗 PP65 特异性应答 (Daenthanasanmak, A. 等,2012,“Integrase-defective lentiviral vectors encoding cytokines induce differentiation of human dendritic cells and stimulate multivalent immune responses in vitro and in vivo.”Vaccine 30: 5118-5131)。在此,我们评价了 Smyle/pp65 免疫重建 NRG 小鼠是否可刺激针对 CMV-pp65 的特异性 T 细胞应答。由于我们观察到 Smyle/pp65 在 LN 形成中的显著作用,因此首先,我们希望测试这些发现是否与局部 LN 中对 CMV-pp65 的抗原特异性反应性增强有关。首先,我们通过流式细胞术对 Smyle/pp65 免疫后的重建 LN 细胞含量进行了评价。大部分的 LN 细胞是人 CD45⁺ (77%),其中 73%对应于 CD3⁺T 淋巴细胞,而 3.8%对应于 CD19⁺B 细胞 (图 8A)。在人 CD3⁺细胞中,我们发现 42%是 CD4⁺,而 56%是 CD8⁺,并且这两个 T 细胞亚群中主要是效应记忆表型 (分别为 80%和 76%) (图 8B)。为了测量 CMV-pp65 特异性应答,在免疫后 8 周,分离 LN 细胞并将其在 Smyle/pp65 DC 存在下离体扩增 7 天。将不表达 CMV-pp65 抗原的 SmyleDC 用作对照 (图 8C)。在 DC 共培养后,收集细胞并将其接种在 IFN- γ 包被的板中、用 CMV-pp65 重叠库肽再刺激并通过 ELISPOT 分析 IFN- γ 的产生。使用来自 CMV 反应性健康供体的 PBMC 作为 IFN- γ 产生的阳性对照。明显地,与 Smyle DC 存在而无抗原的 LN 细胞相比,在离体扩增后 LN 细胞对 CMV-pp65 表现出显著的反应性 (53 相对于 18.7 个斑点, $p < 0.021$, $n = 5$ 个小鼠供体) (图 8C)。此外,我们通过从对照、经 Smyle/pp65 免疫的 NRG 小鼠和经 Con-IFN/pp65 免疫的 NRG 小鼠复苏人 CD3⁺T 细胞而对针对 CMV 的全身特异性免疫应答进行了评价 (图 8D)。首先,我们如下促进 T 细胞增殖:将 T 细胞与人抗 -CD2、抗 -CD3 和抗 -CD28 珠在人重组 IL-7 和 IL-15 存在下一起孵育 48 小时,之后再与 Smyle/pp65 DC 在 IL7/IL15 存在下一起共培养 7 天。将与缺乏 CMV-pp65 表达的 Smyle DC 共培养的细胞用作对照。与对照相比,从经 Smyle/pp65 免疫之 HSC-NRG 小鼠的脾复苏并进一步用 Smyle/pp65 进行扩增的 T 细胞表现出显著增加的平均阳性斑点 (33.6 个斑点相对于 0.5, $p < 0.05$) (图 8D)。反之,从经 Con-IFN/pp65 注射之小鼠的脾复苏的 T 细胞具有减少的 CMV-pp65 (平均 15.5 个斑点, $p > 0.05$ 相对于 Smyle/pp65)。

[0296] HSC-NRG 小鼠中的免疫球蛋白产生

[0297] 我们对免疫后的重建 NRG 小鼠 DC 中的 B 淋巴细胞区室进行了表征。之前的免疫,所有组的 CD19⁺B 淋巴细胞 (这是相对早期的 B 细胞群) 频率没有显著差异 (对照、Con-IFN/pp65 和 Smyle/pp6 分别为 1.6%、4.5%和 2%) (图 9A)。在第二次 DC 免疫后 1 周,CD19⁺B 细胞的总体水平下降,而与对照和经 Con-IFN/pp65 注射的小鼠相比,经 Smyle/pp65 注射的小鼠示出更高的 B 细胞频率 (1.1%分别 0 相对于 0.4%和 0.9%, $p = 0.02$)。截止免疫后第 8 周,所有组中的 B 细胞总体频率均低于 1% (对照 0.18%;Con-IFN/pp65 0.1%;Smyle/pp65 0.37%)。我们在免疫后 8 周还能够在脾中复苏 B 细胞并且观察到对照 (2.5%)、经 Con-IFN/pp65 免疫的 NRG 小鼠 (5.1%) 和经 Smyle/pp65 免疫的 NRG 小鼠 (7.8%) 中人 CD19⁺细胞的不显著差异。为了评价重建小鼠中人 B 细胞的功能,在 DC 免疫后 8 周,我们进一步测量了 NRG 小鼠血浆中的免疫球蛋白 (Ig)G 和 M 浓度。明显地,我们发现对照小鼠 (0.78 $\mu\text{g/mL}$) 和经 Con-IFN/pp65 免疫的小鼠中具有几乎不可检测的水平 (0.047 $\mu\text{g/mL}$),而相比之下经 Smyle/pp65 注射的小鼠中具有显著更高的 IgG 水平 (59.6 $\mu\text{g/mL}$)。类似地,与对照和 Con-IFN/pp65 (分别为 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.01 $\mu\text{g/mL}$) 相比,经 Smyle/pp65 注射之

小鼠的血浆中具有更高的 IgM 浓度 (26.6%)。

[0298] 讨论

[0299] DC 在“组织”LN 的发育方面具有关键作用,其是用于刺激适应性 T 和 B 细胞免疫应答的最有效位点。通过使用上述 iDC 形式 (IDLV-SmyleDC/pp65),我们对 DC 疫苗接种在移植有人 HSC 之免疫缺陷小鼠品系中的作用进行了评价。在世界范围内,已经开发了利用经移植的人造血干细胞前体 / 干细胞 (例如 CD34⁺细胞) 的淋巴细胞减少小鼠模型以在小鼠中重建人免疫系统 (Lepus CM 等,“Comparison of Human Fetal Liver,Umbilical Cord Blood, and Adult Blood Hematopoietic Stem Cell Engraftment in NOD-scid/ γ c^{-/-}, Balb/c-Rag1^{-/-} γ c^{-/-}, and C.B-17-scid/bg Immunodeficient Mice”.Human immunology. Oct2009 ;70(10) :790-802)。经探索,这些模型遵循血液学重建的若干步骤,例如骨髓小环境 (nich) 中的 HSC 植入、动员、自我更新、一些谱系的分化。在 HSCT 后,对这些小鼠进行长期 (16-20 周) 跟踪显示 CD8⁺T 细胞维持的普遍受损 (Andre MC 等,“Long-term human CD34⁺stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null)mice show impaired CD8⁺T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells”. J Immunol. Sep 1 2010 ;185(5) :2710-2720)。移植有人 HSC 的小鼠没有发育含有活的功能性 T 细胞的再生 LN。淋巴结是特化组织,其中引流的淋巴被“过滤”以用于免疫监督病原状况 (例如感染物、癌症)。由于其特化的结构,淋巴结允许抗原被最佳呈递至 T 细胞以初免并放大适应性免疫应答。先前的可用方法还没有描述对人源化小鼠中由 LN 产生的抗原特异性 CTL 应答的证明,所述方法例如探索对适应性免疫应答具有关键作用的人细胞因子 (例如 IL-7、IL-15、GM-CSF) 的转基因表达或者通过单个人 MHC I 型或 II 型分子的转基因方法。另一方面,本文所述的 iDC 免疫方法将与由人干细胞移植植物表达的 MHC 分子完美匹配的高度存活的人专职抗原呈递细胞一起带向免疫缺陷宿主,所述人干细胞移植植物表达数种人细胞因子和高免疫原性抗原 (已知刺激数种不同的 MHC 限制性免疫应答) 的组合。因此,基于这些特性,SmyleDC/pp65 免疫引起外周血中循环之人 T 细胞的绝对频率明显增加、产生针对 pp65 CMV 病毒抗原的 CTL 应答和血浆中的高人 IgG 水平,从而证明小鼠中已再生适应性人免疫应答。

[0300] 此外, iDC 能够在用人 HSC 重建的免疫缺陷小鼠中促进淋巴结再生同时刺激适应性 T 和 B 细胞免疫应答,表明 iDC 具有支持由经移植的人 HSC 普遍再生功能免疫系统的特性。因此,可将 iDC 用于移植有 HSC 的人患者中以加速全功能免疫系统的发育,由此在 HSC 移植后降低对感染性疾病的易感性或恶性肿瘤的复发。

[0301] 实施例 2

[0302] (基于实施例 1 但包含另外的数据和对结果的部分扩展分析)

[0303] 材料和方法

[0304] 慢病毒载体构建以及整合酶缺陷型慢病毒产生

[0305] 表达 CMV-pp65 的自失活 (SIN) 慢病毒骨架载体和单顺反子载体此前已有描述 (Sato, Caux 等 1993 ;Salguero, Sundarasetty 等 2011)。构建表达人粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子的双顺反子慢病毒载体和间隔有 P2A 元件 (RRL-cPPT-CMV-hGM-CSF-P2A-hIL4) 的人干扰素 (huIFN- α) (LV-G2 α) 的构建体并按照先前所述对其进行广泛表征 (Daenthanasanmak, Salguero 等 2012)。通过对启动子和转基因进行限制性消化和测序分

析来再确认所有构建体的结构完整性。如前所述通过瞬时共转染人胚肾 293T 细胞来进行大规模慢病毒生产 (Stripecke 2009)。为了产生整合酶缺陷型慢病毒,在共转染中使用 4 种包装质粒:含有表达细胞因子之慢病毒载体的质粒、表达含有整合酶基因中 D64V 点突变之 gag/pol 的质粒 (pcDNA3g/pD64V. 4xCTE)、表达 rev 的质粒 (pRSV-REV) 和编码 VSV-G 包膜的质粒 (pMD. G)。收集病毒上清液并通过超速离心浓缩,通过用酶联免疫吸附测定 (ELISA) (Cell Biolabs, Inc. San Diego, USA) 评估 p24 抗原浓度来评价滴度。 $1 \mu\text{g}$ 的 p24 当量 / ml 对应于约 1×10^7 感染性病毒颗粒 / ml。

[0306] 人 CD34 阳性外周血干细胞的分离

[0307] 外周血单核细胞 (PBMC) 获自经受用 G-CSF (Granocyte, Chugai Pharma) 之造血干细胞动员方案的造血成年干细胞移植成年供体的白细胞单采。所有的研究都根据由汉诺威医学院伦理评价委员会批准的方案来进行。使用 CD34 磁性细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) 通过 MACS 来阳性选择造血干细胞 (HSC) CD34⁺ 细胞。经历两轮的阳性磁性选择后,如通过流式细胞术所评价的,获得的细胞纯度高于 99% 并且 CD3⁺T 细胞的污染物低于 0.2%。

[0308] 人常规和 Smyle DC 的产生

[0309] 使用 CD14 分离珠 (Miltenyi Biotech) 使用自体 CD34 阴性 PBMC 级分来进一步阳性选择 CD14⁺ 单核细胞。对于慢病毒基因转移,在转导之前使单核细胞在重组人 GM-CSF 和 IL-4 (分别为 50ng/ml, Cellgenix, Freiburg, Germany) 存在下在含有无血清 Cellgro 培养基的培养物中保持 8 小时。对于 SmyleDC 的产生,将 5×10^6 CD14⁺ 单核细胞在 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸鱼精蛋白 (Valeant, Dusseldorf, Germany) 存在下用 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ p24 当量 (感染复数, M. O. I. 为 5) 的 ID-LV-G2 α 和 ID-LV-pp65 两者转导。转导 16 小时之后,将 Smyle 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次并进一步维持在含有无血清 Cellgro 培养基的培养物中。对于常规 (Conv) DC 的产生,将单核细胞如上文所述与 ID-LV-pp65 一起孵育。转导 16 小时后,将 LV 除去并使细胞进一步在重组人 GM-CSF (50ng/ml) 和 IFN- α (1000U/ml, PBL InterferonSource, New Jersey, USA) 存在下在培养物中维持 7 天。每 3 天补充细胞因子。对于小鼠免疫,在转导后直接将 SmyleDC 重悬于 PBS 中或者在培养的第 7 天将 ConvDC 重悬于 PBS 中,并用于小鼠注射。培养 7、14 和 21 天后,评价 Smyle 或 ConvDC 的存活力、DC 免疫表型和细胞因子释放。采用台盼蓝排除来确定活细胞计数的数目。

[0310] 使用人 HSC 进行小鼠移植

[0311] 繁殖 NOD. Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl} (NOD ; Rag1^{-/-}; IL-2r γ ^{-/-}, NRG) 小鼠并将其在无病原体条件下维持在 IVC 系统中 (BioZone, United Kingdom)。涉及小鼠的所有操作都经过 Lower Saxony 的审核和批准并且遵循汉诺威医学院动物研究室提供的指导方针。对于 HSC 移植,将 4 周龄的小鼠用 ¹³⁷Cs 柱辐照器 (Gammacell 3000Elan, Canada) 以亚致死剂量 (450cGy) 辐照。向小鼠接受者的尾静脉中静脉内注射 5×10^5 人 CD34⁺ 细胞。在人 HSC 移植后,在不同的时间点 (6、10 和 13) 对小鼠采血以监测人造血细胞植入的状况并在第 20 周将小鼠处死以进行最后的分析。在 HSC 移植后 10 周进行 DC 注射,之后在第 11 周进行加强。简言之,从培养板收集 Smyle 或 ConvDC,将其以 5×10^5 细胞的浓度重悬于 $100 \mu\text{L}$ PBS 中并用 27 号针头皮下注射到小鼠右后肢中。

[0312] 流式细胞术分析

[0313] 使用下列小鼠抗人抗体在外周血、脾和 LN 中评价人 HSC 重建小鼠中人造血细胞的植入: PerCP 抗 -CD45、Alexa700 抗 -CD19、Pacific blue (PB) 抗 -CD4、APC 抗 -CD3、PE-Cy7 抗 -CD8、FITC 抗 -CD45RA、PE 抗 -CD62L (Biolegend)、PE 抗 -CD14、FITC 抗 -谱系阳性、APC 抗 -CD11c、PE 抗 -CD123 (Becton Dickinson)。至于对人 B 细胞亚群的表征, 使用下列荧光染料缀合抗体: PB 抗 -CD45、Brilliant Violet 605 抗 -CD19、PE 抗 -CD27、PE-Cy7 抗 -CD38、FITC 抗 -IgD、Alexa700 抗 -IgG、APC 抗 -IgM、PerCP-Cy5.5 抗 -CD24 和 APC-C7 抗 -CD3。滤泡辅助性 T 细胞通过用下列抗体染色来表征: PB 抗 -CD45、Alexa700 抗 -CD14/CD19、FITC 抗 -CD3、APC-C7 抗 -CD4、PerCP-Cy5.5 抗 -CXCR5、APC 抗 -PD1 和 PE-Cy7 抗 -ICOS。对于外周血分析, 如下裂解血液: 将血液与红细胞裂解缓冲液 (0.83% 氯化铵 / 20mMHepes, pH 7.2) 在室温下一起孵育 5 分钟, 进行两轮, 之后用冷的磷酸缓冲盐水 (PBS) 稳定并以 300g 离心 5 分钟。将细胞与抗体在 4℃ 下孵育 30 分钟。将收获的脾细胞用红细胞裂解缓冲液 (0.83% 氯化铵 / 20mMHepes, pH 7.2) 处理 5 分钟、用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤并与抗体一起在冰上孵育 30 分钟。在洗涤步骤之后, 将细胞重悬于 PBS 中并用 LSR-II 或 LSR Fortessa 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 获取。对于 DC 表型表征, 使用下列抗人抗体: APC 抗 -CD11c, PE 抗 -CD14、APC 抗 -CD3、PE 抗 -CD80、PerCP 抗 -HLA-DR、APC 抗 -CD86、APC 抗 -CD83 (Becton Dickinson) 和 FITC 抗 -CMVpp65 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)。对于 DC 染色, 将细胞收集、用 PBS 洗涤一次并与小鼠 IgG (50 μ g/mL) 一起在冰上孵育 15 分钟, 之后与抗体一起孵育。将细胞洗涤、重悬于细胞固定液 (Becton Dickinson) 中并用 FACSCalibur 细胞仪进行进一步分析。所有的分析都使用 FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) 软件来进行。

[0314] 淋巴结引流分析

[0315] 对后肢淋巴引流的评价改编自先前所述的方法 (Harrell, Iritani 等 2008)。简言之, 对小鼠的右后肢中皮下注射 20-30 μ L 的 5% 埃文斯蓝。在注射后, 允许淋巴管摄取染料 30 分钟。对小鼠实施安乐死并解剖以定位腹股沟并腋窝引流 LN 和淋巴管。

[0316] 对从小鼠 LN 和脾复苏的 pp65-CTL 的功能分析

[0317] 为了评价针对 CMV-pp65 的 T 细胞免疫应答, 收获脾细胞、将其用 APC 缀合的抗人 CD3 染色并用 XDP 细胞分选仪 (Beckman Coulter) 分选。将人 CD3⁺ 细胞通过人抗 -CD2/CD3/CD28 缀合的磁珠 (Myltenyi Biotec) 以 1 : 2 的珠子 / 细胞比活化, 并在 200ng/mL 人 (IL)-2.5ng/mL 人 IL-7 和 5ng/mL IL-15 存在下在 X-Vivo 培养基中培养。将 T 细胞通过与 SmyleDC 以 1 : 10 的 DC-T 细胞比再共培养 7 天来进一步扩增。还收获 LN 细胞并如上所述直接将其与 SmyleDC 孵育。对于 CMV 特异性 IFN- γ 产生, 将扩增的分离自 CMV 反应性健康供体之脾、LN 或 PBMC 的 T 细胞 (20,000 细胞) 接种在抗人 IFN- γ 包被的 96 孔 ELISPOT 板上并在 10 μ g/mL pp65 重叠肽库 (Miltenyi Biotec) 存在下或者在无肽的情况下孵育过夜。第二天, 将细胞洗涤并将板进一步与生物素缀合的抗人 IFN- γ 抗体一起孵育, 之后与碱性磷酸酶缀合的链霉抗生物素蛋白一起孵育。将板用 NBT/BCIP 液态底物显色并在 AELVIS ELISPOT 阅读器 (AELVIS GmbH, Hannover, Germany) 中进行分析。

[0318] 对人造血细胞植入的组织学和免疫组织化学分析

[0319] 收获人 HSC 重建 NRG 或 C57BL/6 野生型小鼠的 LN 并将其包埋在最佳切割温度复合物 (O. C. T. Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) 中以冷冻保存。将冷冻切片 (5 μ m) 经丙酮

固定并用单克隆抗-人 CD3(eBioscience, San Diego, CA, USA)、抗-人 Pe-Texas Red 缀合的 CD8、抗-人 CD11c(eBioscience)、APC 抗-人 CD19(eBioscience)、抗-小鼠 LYVE-1(Dako)、抗-小鼠 CD31(BD Bioscience) 染色。在 Axiocam 荧光显微镜 (Zeiss) 中进行免疫荧光分析并利用 Axiowert 软件 (Zeiss) 生成图像。

[0320] HSC-NRG 小鼠中的免疫球蛋白产量

[0321] 在重建后 20 周从 HSC-NRG 小鼠收获血浆, 并如其他地方所述通过 ELISA 筛选总人 IgM 和总人 IgG 的存在 (Becker, Legrand 等 2010)。通过用 AffiniPure F(ab')₂ 片段山羊抗人 IgM (Fc5 μ -特异性的, Jackson ImmunoResearch) 或 AffiniPure 山羊抗人 IgG (Fc γ 片段特异性的; Jackson ImmunoResearch) 包被 96 孔板来进行总 IgM 和 IgG 的测定。使用 IgM (0.8mg/ml) 和 IgG (10.4mg/ml) 浓度已知的对照人血清蛋白校准物 (Dako) 作为标准来与样品进行比较。在包被后, 将板在 ELISA 洗涤缓冲液 (PBS, 0.5% Tween-20) 中洗涤、用 4% 乳液封闭并进一步与经连续稀释的小鼠血浆 (以 1 : 5 的稀释度起始) 一起孵育。对于 HRP 缀合的抗-IgG, 以 1 : 2500 的稀释度添加酶缀合检测抗体, 而对于 HRP 缀合的抗-IgM, 以 1 : 5000 的稀释度添加酶缀合检测抗体 (两者均获自 Jackson ImmunoResearch)。使用 MB 底物 / 终止液 (Biosource) 来显色 ELISA 测定。

[0322] 人细胞因子分析:

[0323] 根据生产商的方案 (Millipore) 通过基于荧光珠的 14-plex Luminex 测定来进行 DC 培养物上清液和小鼠血浆中人 Th1/Th2 细胞因子的检测。所述 14-plex 测定测量下列细胞因子: GM-CSF、IL-4、TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1、IL-10、IL-1 β 、IL-5、IL-13、IFN- γ 、IL-7、IL-2 和 IL-12(p70)。通过市售的 ELISA 试剂盒 (Mabtech, Minneapolis, USA) 来进行 DC 培养物上清液和小鼠血浆中 IFN- α 的检测。

[0324] 体内生物发光成像分析

[0325] 在成像前 5 分钟, 将小鼠用氯胺酮 (100mg/kg, 腹膜内) 和甲苄噻嗪 (10mg/kg, 腹膜内) 麻醉并注射 d- 荧光素 (150mg/kg, 腹膜内) 的水溶液。将小鼠置于电荷耦合器件摄像机 (IVIS 200, Xenogen, Cranbury, NJ, USA) 的暗室中, 并在弱照明下拍摄灰度体表参照图像 (数码照片)。切断光源后, 使用软件程序 Living Image (Xenogen) 作为 Igor (Wavemetrics, Seattle, WA, USA) 上的叠加在至多 5 分钟的限定时间内量化从动物体内的荧光素酶表达细胞发射并通过组织传输的光子。对于解剖学定位, 在 Living Image 中生成表示光强度的伪彩色图像 (蓝色, 强度最小; 红色, 强度最大) 并将其叠加在灰度参照图像上。量化的发光为动物表面上的平均光子辐射亮度并表示为光子 / 秒 / cm² / sr, 其中 sr = 球面度。

[0326] 对组织中慢病毒拷贝数的实时 PCR 分析

[0327] 使用 QiaAmp DNA 血液微型试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 根据生产商的使用说明来从脾和淋巴结 (左和右肋) 提取总基因组 DNA。如先前所述通过定量实时 PCR 来确定载体来源的拷贝数 (Maetzig T 等, 2010 和 Rothe M, 等, 2012)。将由上述步骤制备的 100ng/2 μ L 基因组 DNA 添加至 13 μ L 的 RQ-PCR 混合物, 所述 RQ-PCR 混合物含有 7.5 μ L SYBRTaq 混合物与 1 μ L 引物混合物并用 PCR 级无核酸酶水将体积调至 13 μ L, 所述引物混合物针对 wPRE (土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件; wPRE 正向: 5'-GAGGAGTTGTGGCCCGTTGT (SEQ ID NO:9), wPRE 反向: 5'-TGACAGGTGGTGGCAATGCC (SEQ ID NO:10) 或 PTBP2 (多聚嘧啶

序列结合蛋白 2) ;PTBP2 正向 :5' -TCTCCATTCCCTATGTTCAT GC (SEQ ID NO :11), PTBP2 反向 :5-GTTCCCGCAGA ATGGTGAGG TG (SEQ ID NO :12)。将含有这两个扩增子的质粒载体 (pCR4-TOP0, 由汉诺威医学院实验血液学系 (Department of Experimental Hematology, Hannover Medical School) 的 Michael Rothe 慷慨提供) 用于标准曲线, 其中已知稀释度覆盖 4-log。用 StepOnePlus 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems) 分析所有的样品。循环条件是 95°C 10 分钟, 40 个循环 :95°C 15 秒、56°C 20 秒和 65°C 30 秒。如下量化结果 :利用引物对特异性实时 PCR 效率并将样品的 C_t 值与用质粒载体 (pCR4-TOP0) 产生的标准曲线进行比较。通过 StepOnePlus 软件 (Applied Biosystems) 分析数据。

[0328] 对 GVHD 的组织学分析

[0329] 收获皮肤和肠的代表性样品并对其进行常规的福尔马林固定和石蜡包埋。从块上切下 2 μ m 切片并用 HE 染色。有经验的血液病理学家在对处理组动物盲性的情况下检查载玻片。使用半定量得分 (Lerner KG 等 Transplant Proc 19746 :367-371 之后的改良) 来对组织学改变进行评分。GVHD 1 级通过单个或多个凋亡特征 (apoptotic figure) 而无结构改变来限定。2 级表示多个凋亡特征和隐窝或皮肤附属物脱落。3 级表示另外的表面坏死和隐窝或皮肤附属物严重损失。

[0330] 统计学分析

[0331] 进行参数 (t 检验) 和非参数 (Kruskall-Wallis) 统计学分析以比较组间在 NRG 小鼠中造血细胞系植入方面的差异。在 Graph prism 第 5 版软件中进行分析。所有的测试都是双侧的并且认为 $P < 0.05$ 是显著的。

[0332] 结果

[0333] SmyleDC 产生和体外表征

[0334] 使用 ID-LV 将 huGM-CSF、huIFN- α 和 CMV-pp65 病毒抗原基因转移到人单核细胞中在体外和体内产生长期持久的 SmyleDC (Daenthanasanmak, Salguero 等 2012)。在这些条件下, 使用绿色荧光蛋白 (GFP) 作为定量基因报道蛋白, 我们观察到 10% 至 50% 的转导效率。我们使我们的方案适合由从获自 G-CSF 动员之 HSC 供体的 PBMC 复苏的 CD34 级分产生 DC (图 10)。对照 ConvDC 通过用表达 pp65 的 ID-LV 载体转导单核细胞产生 (图 11A) 并将其在重组 huGM-CSF/huIFN- α 存在下维持在培养物中。对于 SmyleDC 产生, 将单核细胞另外用表达 huGM-CSF/huIFN- α 转基因的双顺反子 ID-LV 共转导 (图 11A) 并在不存在细胞因子的情况下维持。在 SmyleDC 之长达 21 天的连续培养物中检测累积的人 IFN- α (2.0ng/mL) 和 GM-CSF (0.3ng/mL) 的水平 (图 11B)。与 ConvDC 相比, SmyleDC 培养物展现出显著较高的细胞生存力 (第 7 天, 45% 相对于 36%, $p > 0.05$; 第 14 天, 35% 相对于 14% $p = 0.021$; 第 21 天 17% 相对于 5%, $p < 0.05$, 图 11C) 和细胞内 pp65 表达 (第 14 天的峰, 55% 相对于 21%, $p = 0.014$, 图 11D)。尽管我们尚未证实 pp65 为 DC 中的定量基因报道蛋白, 但是该数据与我们使用 GFP 作为标记基因的实验相关。培养 21 天后, 两种 DC 型都丧失单核细胞标志物 CD14⁺ 的表达 (图 11E), 而 DC 表面标志物 CD11c、HLA-DR、CD86、CD83 和 CD80 却在 SmyleDC 上持续表达 (图 11F)。对由 ConvDC 和 SmyleDC 分泌的细胞因子的分析揭示化学引诱蛋白 MCP-1 和 IL-8 以 ng/ml 水平高度稳定产生 (图 11G)。ConvDC 还分泌高水平的 DC2 型白细胞介素 IL-6 和 IL-4。对两种培养物还可检测到较低浓度的数种另外的细胞因子 (IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-1 β 、IL-2、IL-5 和 IFN- γ), 表明混合的 DC1- 和 DC2- 型

细胞因子模式。

[0335] 用 SmyleDC/fLuc 免疫 NRG 小鼠并且光学成像分析显示出高体内生存力

[0336] 第 2 天, 将经表达萤火虫荧光素酶之慢病毒载体标记的 SmyleDC 皮下注射到 NRG 小鼠 ($n = 7$) 中并在注射后第 14、30 和 45 天以非侵入方式测量生物发光信号。所有的小鼠在注射部位都表现出可检测的生物发光信号, 直至 45 天 (图 12)。

[0337] 将人 $CD34^+$ 细胞移植到 NRG 中随后进行 SmyleDC 免疫导致 T 细胞扩增增加

[0338] 我们将经两次阳性选择并且纯度高 ($> 99\%$) 的成年 $CD34^+$ HSC 转移到经亚致死剂量辐照的 4 周龄 NRG 小鼠中。在移植 $CD34^+$ 细胞后 10 周, 人造血重建达到平台期并且变得稳定 (2% 至 5% 的 PBMC 对应于人 $CD45^+$ 细胞)。在 DC 免疫之前, 我们未观察到不同研究臂 (arm) 中的 PBL 中具有统计学上显著不同的人 $CD45^+$ 频率 (数据未示出)。因此, 在 HCT 后, 将小鼠随机分配到不同的免疫组, 并通过皮下注射到右后脇中来接受用同一 HCT 供体之单核细胞产生的 DC (5×10^5 细胞) 的初免 + 加强免疫 (图 10B)。相对于经 ConvDC 免疫的小鼠和经用同一 $CD34^+$ 供体之单核细胞产生的 SmyleDC 免疫的小鼠, 我们对未经免疫小鼠的长期 (20 周) 造血和免疫重建进行了比较。在 SmyleDC 免疫后 10 周, 在血浆中检测到 $> 10\text{pg/ml}$ 水平的人 GM-CSF、IL-5、MCP-1 和 IFN- γ 以及较低水平的若干其他人因子 (IL-12、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-8、IL-4、IL-13), 表明 SmyleDC 免疫具有持续效应 (图 13A)。在该时间点, 经 ConvDC 免疫小鼠和对照的血浆中的人细胞因子水平急剧下降。在 20 周终点时, 我们并未观察到对照组和 ConvDC 组之间在人 $CD45^+$ 、B ($CD19^+$) 和 T 细胞 ($CD3^+$) 的频率方面具有显著差异 (图 13B)。然而, 经 SmyleDC 免疫的小鼠具有显著较高的人 $CD45^+$ 细胞频率。值得注意的是, 通过分析人 $CD45^+$ 细胞的含量, 在 SmyleDC 接种后人 T 细胞的相对频率显著升高 (升高至 50%), 而人 B 细胞 (限定为 $CD19^+$) 的相对频率显著下降 (在 SmyleDC 中下降至 30%) (图 13C-D, 表 1)。实际上, 甚至在 SmyleDC 初免 / 加强免疫后 1 周 (HCT 后的第 13 周), T 细胞扩增就已显著升高。在 HCT 后的第 20 周, $CD3^+CD4^+$ 辅助性 T 细胞代表经 SmyleDC 免疫小鼠中频率最高的 T 细胞群 (平均 30%) 并且可明显检测到 $CD3^+CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) (PBL 中有平均 20% 的人 T 细胞) (图 13E-F, 表 1)。

[0339] SmyleDC 免疫后的淋巴结和淋巴流再生

[0340] 验尸后分析的最惊人发现之一来自对经 SmyleDC 免疫的小鼠中外周淋巴结的检测: 在腹股沟和腋窝部位可清楚地看到 LN (图 14A)。长久以来, 知道缺乏表达常见细胞因子受体 γ 链的 NRG 小鼠表现出缺陷型淋巴样发育和失活的 LN 滤泡 (Cao, Shores 等 1995), 甚至在人 HCT 后, 也不能挽救外周 LN 的再生并且 LN 大部分是小的或者在尸体剖检时鉴定不到。经 SmyleDC 免疫的小鼠分别在多至 90% 和 70% 的群 (cohort) 中表现出显著的活性腋窝和腹股沟 LN。ConvDC 免疫导致频率较低的腋窝 (66%) 和腹股沟 (33%) LN (图 14B)。显著地, 右侧的 SmyleDC 免疫与对应淋巴引流轴相同侧的 LN 形成之间存在强相关性。为了确认在 HCT 后 20 周发生从下躯干 (腹股沟 LN) 引流到上躯干 (远端腋窝引流 LN) 的功能性淋巴引流, 我们在 NRG 小鼠中的 SmyleDC 免疫位点附近皮下注射了 5% 埃文斯蓝。墨水将邻近注射位点的引流腹股沟 LN 染色并且蓝色信号通过淋巴管迁移至远端腋窝 LN。具有正常淋巴系统的免疫活性 C57BL/6 小鼠表现出类似的墨水引流模式, 而未经免疫的小鼠或经 ConvDC 免疫的小鼠表现出受损的引流 (数据未示出)。

[0341] 再生的淋巴结含有处于不同分化阶段的人 T 和 B 细胞

[0342] 对从经 SmyleDC 免疫小鼠外植的 LN 进行免疫组织分析揭示淋巴细胞大量浸润,但只有少数区域与在从野生型 C57BL/6 小鼠获得之正常发育 LN 中观察到的生发中心的解剖结构相似(数据未示出)。免疫荧光分析显示人 CD3⁺T 细胞具有明显的种群恢复(数据未示出)。人 CD11c⁺DC 在皮质中被检测到或者与小鼠淋巴内皮细胞共定位(LYVE-1)。我们还检测到对小鼠内皮 CD31 标志物呈阳性的脉管结构(最可能是高内皮小静脉)。对 LN 的流式细胞术分析揭示了人 CD45⁺细胞(77%)、CD3⁺T 淋巴细胞(73%)和仅 3.8%的 CD19⁺B 细胞(图 14C)。在人 CD3⁺细胞中,56%是 CD4⁺,42%是 CD8⁺(图 14D)。对两个 T 细胞亚群而言显著的是,我们观察到约 80% CD45RA⁺CD62L⁺ 效应记忆细胞、10%至 20%中枢记忆细胞和不到 5%幼稚 T 细胞(图 14E-F)。为了鉴定滤泡 T 辅助细胞(Tfh),将从经 SmyleDC 免疫小鼠外植的 LN 合并,并针对 CD4⁺CXCR5^{hi}PD-1⁺ICOS⁺细胞进行分析,其对应于 4.2%的 CD3⁺群(图 14G)。人扁桃体显示出约 8%的 Tfh 细胞频率(图 14G)。我们还检测了合并 LN 中的 B 细胞亚群并将其与人扁桃体进行了比较(数据未示出)。CD24^{hi}CD38^{hi}过渡型 B 细胞对应于人源化 LN(0.4%)和扁桃体(2.4%)中的总 CD19⁺细胞的一小群(图 14H)。与扁桃体中相比,人源化 LN 中具有较低的幼稚 B 细胞(IgD⁺CD24^{int}CD38^{int})频率(5.9%相对于 43.9%)。意外地,我们发现与扁桃体相比,人源化 LN 中具有显著更高的 CD27^{hi}CD38^{hi}终末分化成浆细胞频率(49.1%相对于 0.7%)(图 14H)。

[0343] SmyleDC 迁移至邻近和远端 LN

[0344] 对经 SmyleDC 免疫并随后注射有经荧光素酶基因标记之 SmyleDC 的小鼠的注射位点进行非侵入式光学成像分析揭示生物发光发射细胞迁移至邻近腹股沟 LN 的部位(图 15)。从注射后的第 7 天至第 21 天,注射位点和 LN 区域中的生物发光信号增加。在 SmyleDC/LUC 注射后 21 天移植的局部和远端 LN 显示出生物发光信号。这些数据证明在免疫再生的 HIS-NRG 小鼠中,SmyleDC 可迁移至局部和远端 LN。这些结果证实,与 ConvDC 和对照中相比,在经 SmyleDC 免疫的小鼠中可以以较高的绝对细胞计数检测到骨髓和类浆细胞 DC(图 16)。这潜在地表明 SmyleDC 在 LN 中具有刺激内源再生的 DC 前体在 LN 中分化成 DC 的旁分泌作用。此外,对邻近 SmyleDC 注射位点的 LN 进行灵敏实时 PCR 分析显示具有可检测拷贝的慢病毒载体(0.78+/-0.43 拷贝/细胞)。在免疫侧对侧的 LN(0.05+/-0.04 拷贝/细胞)中以及脾(0.58+/-0.49 拷贝/细胞)中也检测到 LV 拷贝,证实 SmyleDC 全身性地迁移至淋巴器官。

[0345] 在经 SmyleDC 免疫之小鼠的脾中可检测到成熟 T 和 B 细胞的绝对数增加

[0346] 在 HCT 后 20 周,与未经免疫的小鼠相比,经 SmyleDC 免疫的小鼠显示其脾中的人 CD3⁺T 细胞绝对数(858,487)增加超过 100 倍($p = 0.0028$)(图 17A)。经 ConvDC 免疫的小鼠(6,394 个细胞/脾,低 132 倍, $p = 0.02$ 相对于 SmyleDC)和对照小鼠(4,459 个细胞/脾,低 192 倍, $p = 0.0007$ 相对于 SmyleDC)不能支持 CD3⁺细胞高水平的扩增/CD3⁺细胞向脾的归巢(表 1)。与此前在外周血中评估的较低相对频率相反,经 SmyleDC 免疫的小鼠(406,672 个细胞/脾)比经 ConvDC 免疫的小鼠(82,065 个细胞/脾,低 5 倍, $p = 0.37$)和对照小鼠(15,639 个细胞/脾,低 26 倍, $p = 0.0034$) 在脾中具有显著更高的 CD19⁺B 淋巴细胞绝对含量。在组织学上,发现人 T 和 B 细胞在类似于滤泡的簇内相互作用(数据未示出)。进一步对 T 淋巴细胞亚群的组成进行了分析。SmyleDC 小鼠脾中 Th 和 CTL 细胞的平均数分别是 370,086 个细胞/脾和 81,649 个细胞/脾(图 17B-C)。这显著高于在 ConvDC

免疫后（分别是 13,976 个和 7,937 个细胞 / 脾，相对于 SmyleDCp = 0.0046 和 0.038）和在未经免疫的对照（CD4⁺, 1,943 ; 相对于 SmyleDCp = 0.0035 和 CD8⁺, 52 ; 相对于 SmyleDCp = 0.021）中发现的数目。幼稚和效应 T 辅助细胞两者以及 CTL 在绝对细胞数方面都有所增加（图 17B-C）。在 SmyleDC 免疫后，以平均 9,425 个 Tfh 细胞 / 脾检测到在 HIS-NRG 小鼠的脾中很少观察到的滤泡 T 细胞（与对照组中的仅 12 个细胞 / 脾相比）（p = 0.0023），而在 ConvDC 组中则未检测到 Tfh 群（图 17D）。对脾中的 B 细胞亚群进行详细分析揭示过渡型 B 细胞的数目无显著差异（对照 6,732 个细胞 / 脾，ConvDC 29,028 个细胞 / 脾和 SmyleDC77,454 个细胞 / 脾）（图 17E）。然而，与其他组相比，SmyleDC 免疫导致成熟 B 细胞（83,454 个细胞 / 脾）和成浆细胞 / 浆细胞（91,522 个细胞 / 脾）发生显著明显的扩增。

[0347] SmyleDC 免疫诱导抗 -pp65T 细胞免疫应答

[0348] 此前，我们已表明在进行过继性 huPBL/T 细胞转移之前用 SmyleDC 免疫小鼠增强体内抗 -pp65 特异性 T 应答（Daenthanasanmak, Salguero 等 2012）。在此，我们评价了 SmyleDC 是否可刺激对 pp65 具有 HCT 后反应性的内源发育的人 T 细胞。在 HCT 后 20 周，从脾或 LN FACS- 分选人 CD3⁺ 细胞。为了获得足够用于进行免疫测定的 T 细胞数，将获自脾的 T 细胞在抗 CD2/CD3/CD28 缀合的珠子存在下扩增 3 天并进一步与 SmyleDC 加细胞因子（IL-2、IL-7、IL-15）一起共培养 7 天（图 10C）。在不存在抗原刺激物（NoAg）或具有 pp65 重叠肽库（pp65pp）的情况下将 T 细胞接种在 IFN- γ 包被的板上过夜，并通过 IFN- γ -ELISPOT 进行分析。与经 ConvDC 免疫的小鼠（三次重复试验的平均值：33.6 个斑点相对于 15.5 个斑点，p = 0.25）或对照小鼠（少于 1 个斑点，p < 0.05）相比，来自经 SmyleDC 免疫的小鼠的脾细胞显示出更高的 pp65 反应性 T 细胞频率。从经 SmyleDC 免疫之小鼠（n = 4）的单独 LN 分离并与 SmyleDC 加细胞因子一起培养 7 天的 T 细胞也与 pp65 肽反应（pp65：53 个斑点相对于无抗原：18.7 个斑点，p = 0.021）。使用来自 CMV 反应性供体的 PBMC 作为该测定的阳性对照（图 18B）。

[0349] SmyleDC 免疫诱导免疫球蛋白和 pp65 特异性体液应答

[0350] 我们观察到：与对照组相比，在 SmyleDC 免疫后脾中的 IgG 记忆 B 细胞频率以及血浆 IgM 和 IgG 的产生均显著增加，其中免疫球蛋白水平接近检测界限（图 18C-E）。使用从 CMV 血清阳性的系统性红斑狼疮（SLE）患者获得的血浆作为内部开发的 ELISA 系统的阳性对照来评估特异性针对 pp65 的 Ig 反应性。虽然在经 ConvDC 免疫的小鼠或对照小鼠的血浆中都没有可检测的信号，但是在 4/22 和 11/22 小鼠的血浆中分别发现了抗 -pp65IgG 和抗 -pp65IgM（图 18F-G）。显著地，不管这些功能性的抗原特异性人 T 和 B 细胞应答，我们在这些小鼠中并未检测到 GVHD 的任何体征，如通过从 HCT 后的第 6 周至第 20 周进行体重监测所评价的（图 19A）。使经 SmyleDC 免疫的 10 只小鼠的组群在 HCT 后维持 40 周，并且我们并未观察到迟发型 GVHD 的临床体征或疾病的任何肉眼可见的临床体征。尽管如此，我们通过 H&E 染色和光学显微镜术在组织病理学上对一些小鼠（n = 4）之通常受影响的组织（例如皮肤和肠）中的 GVHD 体征进行了分析。我们在 4 只小鼠中 2 只的皮肤和 4 只小鼠中 3 只的肠中观察到仅为轻度的 1 级 GVHD，与凋亡体检测相一致（图 19B-C）。

[0351] 通过 PCR 检测小鼠组织中 SmyleDC

[0352] 使用含有 3 个拷贝整合的 LV 序列的 293T 细胞系作为标准对照采用定量实时 PCR 方法来检测慢病毒载体中的 WPRE 元件。对 SmyleDC 的分析得到 7.5 拷贝载体 / 细胞。对从

移植有 CD34⁺细胞并经 SmyleDC 免疫的 NRG 小鼠 (n = 4) 收集的脾的分析显示 0.58+/-0.49 拷贝 / 细胞。对从移植有 CD34⁺细胞并经 SmyleDC 免疫的 NRG 小鼠 (n = 4) 收集的 LN 的分析显示邻近 LN 为 0.78+/-0.43 拷贝 / 细胞并且对侧 LN 为 0.052+/-0.041 拷贝 / 细胞。这些数据证实皮肤上注射的 SmyleDC 具有到局部和远端 LN 以及脾的迁移能力 (表 2)。

[0353] 讨论

[0354] 使用 HIS-NRG 模型来证明 SmyleDC 在人 HCT 背景下的效力的这项临床前确认研究超出我们的预期,因为观察到全范围的 T 和 B 细胞终末适应性免疫重建效应,包括外周淋巴结的发育。ConvDC 和 SmyleDC 两者均可用从 G-CSF 动员 HCT 供体分离的单核细胞产生。与 ConvDC 相比, SmyleDC 表现出较高的体外生存力并且持续自分泌活化相关免疫细胞表面标志物和细胞因子的表达。与经 ConvDC 免疫的小鼠或对照小鼠相比, HCT 后 10 周的 SmyleDC 皮下施用和另外 10 周后的血浆分析揭示若干人细胞因子 (GM-CSF、IL-5、MCP-1、IFN- γ 、IL-13、TNF- α 、IL-8、IL-4) 具有显著较高的水平。这与显著较高的人 T 细胞频率、较高的效应记忆 T 细胞绝对数和在血液、脾和 LN 中检测到终末分化的血浆 B 细胞有关。HCT 后 20 周的免疫监测显示这些细胞效应伴随有 pp65 特异性 T 细胞和抗体应答。综合考虑这些数据,尽管与未经免疫的小鼠相比,表达 pp65 之 ConvDC 的免疫表现出一定程度的免疫调节,但是 SmyleDC 的效应明显更强烈。这些差异突出了对涉及有丝分裂后和非复制型抗原呈递细胞的细胞治疗在施用后持续足够久的需求,以有效传导信号、产生细胞因子和趋化因子、迁移、吸引以及与免疫系统中的其他细胞相互作用从而进行稳健的抗原呈递。

[0355] NRG 小鼠中的这些新体内发现还可导致新的进步以改善具有功能免疫系统的人源化小鼠的产生。尽管在过去的十年内已对用于诱导免疫缺陷小鼠中免疫重建的数种转基因和疫苗接种方法进行了评价,但是仍缺乏解决人造血发育成终末和功能性分化 T 细胞和 B 细胞的合适体内实验模型。为了从实验上概述 HCT 后的体内人免疫重建, Schultz、Ishikawa 及其同事开创了将 CD34⁺HSC 移植到缺乏共有白细胞介素 -2 受体 γ 链 (IL2R γ) 的不同类型免疫缺陷小鼠品系中 (NOD/Rag1null/IL2R γ null-NRG、NOD/LtSz-scid/IL2R γ null-NSG 或 NOD/SCID/IL2R γ null-NOG), 导致在 CD34⁺细胞转移后 8 至 10 周人造血细胞系重建 (Ishikawa, Yasukawa 等 2005 ;Shultz, Brehm 等 2012)。然而,不管 HSC 的来源和用于细胞移植的方法,人源化小鼠都表现出非最佳的淋巴细胞重建水平,缺乏或低水平的抗原特异性细胞和体液应答以及总体无反应性 (Lepus, Gibson 等 2009 ;Andre, Erbacher 等 2010)。可能在 HIS 小鼠之低效率淋巴发育中产生影响的因素包括缺乏人组织相容性分子和差的人源化细胞因子环境。为了克服这一缺陷,最近已描述了这样的方法,所述方法包括递送重组细胞因子 (Chen, Khoury 等 2009 ;O'Connell, Balazs 等 2010)、移植胎儿淋巴组织以及 HPC (Biswas, Chang 等 2011 ;Hu 和 Yang 2012) 或者使用组成型表达 I 型 (Shultz, Saito 等 2010) 或 II 型 (Danner, Chaudhari 等 2011) 主要组织相容性分子 (MHC) 或关键造血细胞因子 (Willinger, Rongvaux 等 2011) 的转基因品系。尽管有一些改善,但是这些策略有限地改善针对人病毒攻击的 B 和 T 细胞应答。与此前有关 G-CSF 动员成年造血干细胞之 HCT 移植的报道相一致,我们观察到未经免疫的对照小鼠中相对具有低的 T 淋巴细胞频率 (即,低于 20%),这同样反映了用 ConvDC 免疫获得的结果。反之,也报道了,在对照小鼠中循环人 B 细胞 (在此限定为 CD19⁺细胞) 的相对频率通常高于 80%。SmyleDC/pp65 免疫导致 PBL 中的相对 B 细胞频率降低,但是与脾和淋巴结中的绝对 B 细胞含量增加

有关。值得注意的是,这些组织中 T 和 B 细胞的较高种群恢复率与成熟表型相关的免疫活化有关。重要的是,很少报道描述到 HSC 移植小鼠中存在重建的淋巴结构 (Sun, Denton 等 2007 ;Marodon, Desjardins 等 2009 ;Singh, Singh 等 2012)。

[0356] 尽管可通过使用人脐带血或胎儿肝来改善人 CD34⁺HCT 从而达到比我们研究 (使用 G-CSF 动员成年血液) 中更高的人细胞植入率 (> 60%),但是已报道的 LN 结构是无对照的或者需要非常长的观察时期 (Lang, Kelly 等 2013)。这些数据表明 HCT 后可能需要功能性且长期持久的 DC 以再生外周淋巴结和淋巴流从而朝着人源化小鼠中的全免疫功能激活、动员并最终成熟淋巴细胞。因此,在人源化小鼠模型中加速功能 DC 的存在同时加速 LN 和淋巴发育可能是使用这些模型来预测地研究适应性免疫的必要条件。尽管早期的 T 细胞发育不是我们效力研究的焦点,但是我们预测在脾中发现的较高绝对幼稚和记忆 / 效应 T 细胞计数反映了这些人源化小鼠中真正较高的胸腺生成。最后,“人内源性再生全身淋巴结” (“HERS-LN”) 的这种新形式将允许日后在体内对以下进行更详细的机制研究:人免疫系统的发育、抗原呈递、T 和 B 细胞终末活化以及 HCT 方案、疫苗和免疫调节分子临床前测试的有用解释。

[0357] 用于癌症免疫治疗的经单个三顺反子慢病毒载体产生的慢病毒诱导 DC 的安全性评价、规模扩大和临床发展是我们组的当前任务 (Pincha, Sundarasetty 等 2012 ; Sundarasetty, Singh 等 2013)。正在将共表达 pp65 与单个三顺反子慢病毒载体之 SmyleDC 的产生转化成临床试验,以免疫接受来自 CMV 血清阴性供体的干细胞移植或脐带血的移植患者 (Daenthansanmak, Salguero 等,“实施例 3”中)。此外,日后还可将 SmyleDC/pp65 作为针对神经胶质瘤和乳腺癌的自体细胞免疫治疗产品进行研究,因为最近已表明 HCMV 可作为这些类型癌症的病毒靶标。

[0358] 实施例 3

[0359] 实验目的

[0360] 在本研究中,我们使用两种完全人源化的小鼠 HCT 模型对用临床前单个三顺反子整合酶缺陷型慢病毒载体产生的 SmyleDC/pp65 进行了验证。我们对一些效力和安全性参数进行了测试并且建立了移植有人 CD34⁺干细胞 (G-CSF 动员的成年 HSC 相比较于新生 UCB) 的经辐照 NRG 小鼠中的效力证据。在这些预测性人源化 HCT 小鼠模型中,我们证明 SmyleDC/pp65 的适应性免疫作用促进内源发育的细胞毒性 T 细胞的扩增和针对 HCMV pp65 抗原的体液免疫反应性。

[0361] 结果

[0362] 三顺反子载体对树突细胞复苏、生存力和性质的影响

[0363] 将三顺反子自失活慢病毒载体 ID-LV-G20pp65 (图 21A) 设计成具有异源间隔 2A 元件 (由猪捷申病毒衍生的 P2A 和来自口蹄疫病毒的 F2A)。如 (Daenthansanmak 等, 2012) 所述生产用水泡性口炎 -G 蛋白 (VSV-G) 假型化的第三代整合酶缺陷型慢病毒的大规模批次。通过测量 p24 衣壳蛋白的浓度来确定病毒滴度,从而产生在正常范围内的滴度 (三顺反子: 7 μ g/ml, n = 10 ;双顺反子: 9.4 μ g/ml, n = 10)。通过 western 印记和免疫检测分析裂解物和细胞上清液来确认所有转基因 GM-CSF、IFN- α 和 pp65 在转导 293T 细胞中的表达。主要分泌 GM-CSF 和 IFN- α 并且其在细胞上清液中可检测。Western 印记分析显示 pp65 蛋白排他的细胞内表达,这可通过细胞内染色和流式细胞计量术分析确认。将

从健康供体获得的单核细胞与 ID-LV-G2 α pp65 载体以 5 的感染复数 (MOI) 过夜暴露并随后在不存在重组细胞因子的情况下离体培养 7 天导致平均 20% 用于转导的单核细胞复苏 (与对照双顺反子载体的 32% 相比)。我们观察到 MOI 对细胞复苏具有剂量效应, 并且 MOI = 5 产生最一致的细胞复苏 (数据未示出)。对于双顺反子和三顺反子载体转导, 在进一步培养后, 活细胞的数目可比较地降低 (相对于第 14 天的 8% 输入和第 21 天的 5% 输入), 证明当与分化细胞因子以顺式提供在一个载体中时 pp65 无毒性或转化效应 (图 21b)。对 SmyleDC/pp65 中免疫表型标志物 (HLA-DR⁺/CD86⁺) 的稳定性和细胞内 pp65 表达的可检测水平分析至多 21 天的离体培养时期, 因为细胞最终衰老并在培养约 1 个月后死亡 (图 21c、d)。在 DC 培养的第 7 天, 对活化的单核细胞衍生 DC 的典型免疫表型 DC 标志物组 (高频率的 HLA-DR⁺、HLA-ABC⁺、CD11c⁺、CD80⁺、CD86⁺) 进行另外的详细分析显示 pp65 抗原对免疫学相关标志物的表达无不利影响。观察到低频率的表达推定的单核细胞 (< 10% CD14⁺)、类浆细胞 DC (< 40% CD123⁺) 和终末分化 DC (< 10% CD83⁺) 标志物的细胞 (图 21e)。pp65 的共表达也不影响一些内源上调的细胞因子 (低至中等水平达 10pg/ml : IL-5、IL-12p、IL-10、IL-7、IL-6、IL-4 和 TNF- α ; 高水平 1ng/ml 至 10ng/ml : IL-8 和 MCP-1) 或在载体中共表达的转基因 GM-CSF 和 IFN- α 细胞因子的分泌, 其可分别以平均约 1.0ng/ml 和 4.6ng/ml 检测 (n = 3) (图 21f)。总的来说, 我们观察到载体中的顺式 pp65 共表达对 SmyleDC/pp65 的生存力或分化无不良影响。

[0364] 由脐带血单核细胞产生 SmyleDC/pp65

[0365] 用来源于在汉诺威医学院产科诊所 (Obstetrics Clinic) 分娩之足月母亲 (term mother) 在知情同意的情况下捐赠的人脐带血的样品建立脐带血库。通过 Ficol1 分离来分离单核细胞并随后将其冷冻并储存或者进行 CD34⁺造血干细胞富集。将每个供体样品的 CD34 阳性和阴性级分两者都冷冻保存。通过 MACS 从 CD34 阴性级分富集 CD14⁺单核细胞。使用我们之前描述的方案用编码人 GM-CSF-IFN α -pp65 的病毒将这些单核细胞转导并施用于移植有来自同一供体之 CD34⁺细胞的小鼠。将一部分的 SmyleDC/pp65 细胞在培养物中维持 7 天以用于分析 DC 分化免疫表型和 pp65 抗原表达。

[0366] ID-LV-G2 α pp65 在 SmyleDC/pp65 中的整合形式

[0367] 尽管此前 ID-LV 序列的整合形式在输注有载体之小鼠的肝细胞中已经示出 (Matrai 等, 2011) 并且 ID-LV 已被探索用于体外转导小鼠和人 DC (Negri 等, 2012), 但是之前并未针对所转导的单核细胞或 DC 对 ID-LV 的整合形式进行表征。尽管 DC 是有丝分裂后的非复制型细胞, 但是潜在致癌基因座中的偏向整合 (biased integration) 可易于引起基因毒性效应。为了评价骨架 LV-G2 α pp65 载体的整合形式, 将用整合酶活性 (IC-LV) 或整合酶缺陷型 (ID-LV) 载体产生的 SmyleDC/pp65 在培养物中保持 10、20 和 30 天, 并比较所整合的载体拷贝。在第 10 天, 与用 ID-LV 产生的 SmyleDC/pp65 (0.3 拷贝 / 细胞) 相比, 用 IC-LV 产生的 SmyleDC/pp65 显示出四倍高的整合拷贝数 / 细胞 (1.2 拷贝 / 细胞)。对于这两种培养物, 在进一步培养后 (第 20 天) 和当细胞达到衰老时 (约 30 天; IC-LV : 0.3 拷贝 / 细胞; ID-LV : 0.1 拷贝 / 细胞), 整合拷贝数 / 细胞持续降低 (图 22a)。在慢病毒转导后, 在时间点 10、20 和 30 天用高通量整合位点 (IS) 分析 (Schmidt 等, 2007) 监测经遗传修饰的单核细胞的克隆贡献。线性扩增介导 (LAM) PCR 和下一代测序检测到经 IC-LV 转导的单核细胞之映射为 3.000 个独特染色体位置的 > 40.000 个 IS 序列和经 ID-LV 转导的单

核细胞之映射为 > 1.500 个独特染色体位置的 > 14.000 个 IS 序列。每条染色体的整合位点分布没有偏向,即整合位点的数目整体上与这两种载体类型之染色体大小相关,即,在较大的 1 号染色体上检测到多于 10 个整合,而在 21 号染色体上检测到约 1 个整合。就基因或基因 $\pm 10\text{kb}$ 距离中的病毒整合数而言,这两种载体类型具有类似的分布:大多数的整合在基因之外(图 22b),特别是转录起始位点上游的至多 5kb(图 22c)。所有转导时间点的大多数 IS 远低于所得总读数的 5%,而少数偶尔达到至多 5%。显示插入的 10 个频率最高基因座对于每个时间点而言相当不同(图 22d)。值得注意的是,经 ID-LV 转导的单核细胞在编码高尔基体蛋白抗原 7(GOLGA7)之基因的基因座中出现反复插入。含有 GOLGA7 的基因座是 ID-LV 在所有时间点的最频繁 IS,但是随着时间的变化频率下降。两种类型载体发生插入的另外常见基因座是 WDR74(小鼠中胚泡形成所需的一种蛋白质)、锌指蛋白 37A(ZNF37A)和具有张力蛋白同源性的跨膜磷酸酶(TPTE)。所有这些蛋白质的 RNA 表达通常是普遍存在的并且可在人中致癌功能未知的白细胞中检测到。

[0368] SmyleDC/pp65 的 HCMV 感染不允许体外病毒复制

[0369] 已知单核细胞衍生的 DC 易受 HCMV 感染,并且在其分化成活化 DC 后,观察到病毒复制(Riegler 等,2000)。因此,SmyleDC/pp65 的一个重要安全性方面是这种细胞产物是否仍会允许 HCMV 扩散,例如如果从 HCMV 血清阳性供体产生的话。为了解决这一方面,对不同类型的慢病毒载体化 DC 进行了比较:表达 GM-CSF 和 IFN- α 的 SmyleDC 以及共表达 GM-CSF 和 IL-4 的 SmartDC(Daenthanasanmak 等,2012)。用表达 GFP 之经遗传修饰的毒株 HCMV-TB40/E 以 2 的 MOI 感染树突细胞。如先前所述,使用经感染的人成纤维细胞(HF)作为阳性对照(Sinzger 等,2008)。使用荧光显微术观察未染色的细胞。绿色荧光信号表示细胞受到感染。在该实验中,仅在第 10 天于不表达 IFN- α 的 SmartDC 中观察到荧光信号(图 24a)。用 FACS 分析确认这些结果。感染后 7 天,约 50% 的 HF 细胞受到感染,通过流式细胞术分析显示为 GFP $^{+}$ 细胞。SmartDC 培养物中约 0.5% 的细胞表现出 HCMV 感染,而 SmyleDC 和 SmyleDC/pp65 细胞显示出接近基线的 GFP $^{+}$ 细胞($< 0.06\%$)。为了避免由病毒携带而引起的可能人工假象,用 1 的 MOI 重复实验并在病毒感染后将细胞充分洗涤(5x)。对 GFP 表达的动力学分析显示从感染后的第 2 天至第 10 天经 HCMV 感染之 HF 的量逐渐增加(图 24a)。对于 SmartDC, GFP $^{+}$ 细胞的频率最初为 2%,在第 4 天降低至 0.2% 并且随后在第 10 天提高至 0.6%。对于 SmyleDC 和 SmyleDC/pp65,初始感染也为约 2%,但是甚至在培养中的稍后时间点, GFP $^{+}$ 细胞的频率低于 0.06%。通过监测 CD80 来补充这些分析, CD80 为在活化 DC 中上调但在 HCMV 感染后显示受到调节的相关共刺激标志物(Moutaftsi 等,2002)。对于模拟感染的细胞,三种类型的 DC 具有可比较的 CD80 表达(可在 50% 的细胞中检测到)。另一方面,在 HCMV 感染后, SmartDC 中的 CD80 表达下调(第 10 天可在 20% 的细胞中检测到),但是在病毒感染后 SmyleDC 的 CD80 表达提高,特别是在 SmyleDC/pp65 中(第 10 天可在 80% 的细胞中检测到)(图 24b)。为了评价细胞是否可释放新的病毒体,通过噬斑测定分析从每个时间点收集的上清液(图 24c)。经感染的 HF 显示在第 4 天释放大量的病毒(1.4×10^6 pfu/ml) 并且在第 10 天逐渐减少(减少至 1.35×10^6 pfu/ml),因为培养物中的大部分细胞被裂解。在 DC 培养的第 0 天仅可检测到残留量的病毒(120 pfu/ml 至 300 pfu/ml,可能反映出剩余的携带病毒附着在 DC 表面上并且随后被释放)(图 24c)。对于所有的 DC 组,直到培养的第 4 天并未释放出可检测的病毒。在第 6 天, SmartDC 开始释放病毒(5 pfu/

ml), 其在第 10 天逐渐增加 (增加至 35pfu/ml)。相比之下, 在 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 细胞上清液中随后并未观察到病毒释放。因此, 即使 DC 可能初始已被感染, 但是与表达 IL-4 的 SmartDC 相比, SmyleDC 和 SmyleDC/pp65 的 IFN- α 表达似乎能更好地控制 HCMV 感染和释放两者。

[0370] 用自体 SmyleDC/pp65 体外刺激和扩增 CTL

[0371] 需要 CD4⁺T 辅助细胞和 CD8⁺CTL 两者来保护个体以控制原发性 HCMV 感染 (Gamadia 等, 2003) 和 HCT 后 HCMV 再活化 (Einsele 等, 2002) 中的病毒复制。使用基于流式细胞术分析的 16 小时 IFN- γ 捕获测定来评价 SmyleDC/pp65 (收获于转导后的第 7 天) 是否可活化从 HCMV 血清阳性 HD (n = 3) 获得的两种类型的 T 细胞 (图 25a)。作为对照臂, 我们包括了不进行刺激、用 pp65 肽库刺激 (该测定的标准阳性对照) 和用不呈递 pp65 抗原的 SmyleDC 刺激。对于这些健康供体并且在短测定条件下, 在用 pp65 肽刺激后, 我们并未观察到 IFN- γ 产生 CD4⁺或 CD8⁺细胞的频率有所增加。与 pp65 肽刺激形成对比, 经 SmyleDC/pp65 刺激的 CD3⁺T 导致 IFN- γ 产生 CD4⁺T 细胞 (18 倍, $p < 0.05$) 和 CD8⁺T 细胞 (5 倍, $p < 0.05$) 的频率显著增加。未负载 pp65 抗原的 SmyleDC 对 IFN- γ 产生 CD4⁺和 CD8⁺细胞表现出较低但一致的刺激, 这可能归因于释放的 IFN- α 对活化 T 细胞以产生 IFN- γ 的直接刺激作用 (Hervas-Stubbs 等, 2011)。

[0372] 为了进一步定义 pp65 表达对活化抗原特异性 CD8⁺效应细胞的影响, 我们对从 A * 02 ; B * 07 供体 (n = 3, HCMV 血清阳性) 获得的 DC 和 T 细胞进行了两次顺序微量培养以扩增足够数目的 CTL 从而用于进行进一步的功能测定 (图 25b)。与在刺激性重组细胞因子 (IL-2、-7 和 -15) 存在下维持 T 细胞相比, 与经纯化的自体 CD8⁺T 细胞共培养的 SmyleDC/pp65 导致 7 倍高的 T 细胞扩增。值得注意的是, CTL 与 SmyleDC 的共培养也导致较高的 T 细胞扩增 (12 倍), 表明刺激部分地归因于体内稳态作用并且不依赖于抗原。在将 SmyleDC/pp65 与 CD3⁺T 细胞共培养后, 在微量培养系统中也观察到类似的扩增。尽管如此, 只有在 SmyleDC/pp65 存在下扩增的 CTL 显示出高频率的 pp65 特异性 T 细胞, 可通过五聚物染色对其进行分析 (A * 02 限制性表位 pp65aa 495-503 : 平均值 = 7.7% P 值 < 0.05 ; B * 07 限制性表位 pp65aa 417-426 : 平均值 6.4% P 值 < 0.1) (图 25b)。随后, 对已经经 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 刺激之体外扩增 CTL 的细胞毒性功能进行评价。使用被遗传修饰成组成型表达 A * 02 (KA * 02) 或 B * 07 (KB * 07) 并经慢病毒转导以进行高水平 pp65 抗原表达的 K562 细胞作为靶标 (图 25c)。将 CTL 以不同的效应细胞 : 靶标 (E : T) 比共孵育 4 小时, 并评价细胞上清液的乳酸脱氢酶 (LDH) 释放。当与 KA * 02 或 KB * 07 靶标共孵育时, 用 SmyleDC 扩增的 CTL 表现出类似的细胞毒性效应, 不管靶标中是否表达 pp65 抗原。相比之下, 经 SmyleDC/pp65 刺激的 CTL 以剂量依赖性方式更有效地裂解表达 pp65 的 K562 靶细胞 (图 25c)。该数据证实了载体化 DC 中的 pp65 共表达具有产生 pp65 特异性 T 细胞刺激的体外作用。

[0373] 移植有人成年 CD34⁺细胞并经 SmyleDC 相对于 SmyleDC/pp65 免疫之 NRG 小鼠的造血重建

[0374] 此外, 为了证明 SmyleDC/pp65 对 CD8⁺扩增的体外作用并评价对 B 细胞和体液应答的可能适应性作用, 在两轮磁珠选择后, 将从 G-CSF 动员的干细胞供体获得的 CD34⁺细胞移植至经辐照的 4 周龄 NRG 小鼠 (图 26a)。HCT 后 10 周, 对于所有的小鼠, 通过以可比较

的水平分析外周血来确认人造血细胞的植入。在该时间点,人 CD45⁺细胞相对于小鼠细胞的平均频率为约 2.5%。正如我们此前在该 HCT 人源化小鼠模型中已观察到的(参见实施例 3),大多数的人细胞(80%–90%)是 B 细胞(限定为 CD45⁺/CD19⁺细胞)。人 T 细胞的频率要低得多,并且明显地主要是 T 辅助细胞(限定为 CD45⁺/CD4⁺细胞;1–6%),而 CTL 以非常低的频率存在(限定为 CD45⁺/CD4⁺细胞;至多 3%)。因此,使用从同一 HSC 供体材料纯化的 CD14⁺单核细胞来产生“自体”SmyleDC 或 SmyleDC/pp65,以评价对适应性造血重建(即 T 细胞和 B 细胞的扩增)的作用。在 HCT 后的第 10 周和第 11 周,以单个初免/加强进行 DC 疫苗接种。在 HCT 后第 13 周中间物 PBL 分析后,在第 20 周将小鼠处死以进行肉眼病理学检查并收集组织。首先,我们对血液中可检测的人 T 细胞和 B 细胞进行了动力学分析。从第 13 周至第 20 周,经 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 免疫之小鼠示出人 T 辅助细胞(平均为 50%)和 CTL 细胞(30%)两者的频率均明显增加(图 26b)。来自之前使用该模型之组的结果显示未免疫的 HCT 对照在第 20 周与在第 10 周具有类似的人 T 辅助细胞和 CTL 水平(参见“实施例 2”)。顺便提及,与最后一次免疫后两周(第 13 周)形成对比,在 DC 初免/加强后 9 周(第 20 周)观察到明显的效应。在该点,对这两个疫苗组而言,频率最高的人细胞是由约 40% CD4⁺T 细胞组成的 T 细胞,而我们在 SmyleDC 免疫中观察到平均 17% 的 CD8⁺T 细胞并且在 SmyleDC/pp65 中观察到平均 30% ($p > 0.5$)(图 26b)。这些结果表明 SmyleDC/pp65 对降低 CD4/CD8 比具有更明显的作用(SmyleDC 为 2.6,而 SmyleDC/pp65 为 1.5, $p = 0.07$),并且与我们证明 pp65 表达对 CTL 扩增之作用的体外 T 细胞刺激测定相一致。同时,与第 10 周的初始 90%相比,在分析的第 20 周,两个免疫组中的 B 细胞频率均显著下降至约 10%(图 26c)。因此,这些结果表明在免疫后,载体化 DC 能够以某种方式将 HSC 的优先发育从 B 细胞转变成 T 细胞。我们还观察到脾人 T 细胞的明显种群恢复(37% Th、18% CTL 和 33% B 细胞)。脾中约 33%的细胞是人 CD45⁺淋巴细胞,与 PBL 中相比产生 3 倍高的频率。在骨髓中也检测到类似高频率的人 T 淋巴细胞(约 17%人细胞,来自那些 35% Th、26% CTL 和 29% B cell)。脾细胞中表型 T 细胞标志物的分析仅对一个小鼠亚群是可行的($n = 5$ SmyleDC;和 $n = 2$ SmyleDC/pp65)。对经 SmyleDC/pp65 免疫小鼠分析的 Th 细胞表现出更明显的效应记忆表型和仅残余水平的幼稚细胞,这与 SmyleDC 免疫非常不同,其中幼稚、中枢记忆和效应记忆细胞更平衡(图 26d)。同时,在 SmyleDC/pp65 免疫后,效应记忆 CTL 的频率也略高。因此,在免疫后,不仅 B/T 细胞区室被改变,而且 T 细胞活化水平也发生改变。我们针对移植抗宿主病的任何体征对小鼠进行了监测。尽管 T 细胞频率和活化明显提高,但是仅在经 SmyleDC/pp65 免疫的 16 只小鼠中的一只观察到 GVHD。PBL 分析显示 PBL、脾和骨髓中高频率的效应记忆 Th 和 CTL 细胞。

[0375] 在 HCT 后 SmyleDC/pp65 的功能性人体内稳态、T 和 B 细胞作用

[0376] 除对重建不同造血细胞系的作用之外,我们还对经 SmyleDC/pp65 免疫 HIS 小鼠之与功能性免疫应答有关的一些特性进行了表征。移植有 PBL-CD34⁺HSC 并经 SmyleDC/pp65 免疫的小鼠示出在小鼠血浆中可检测的数种人细胞因子的水平明显提高(图 27a)。这些细胞因子反映了无偏 Th1/Th2 模式,因为除 IL-5(与嗜酸性粒细胞活化有关)和 MCP1(调节单核细胞和巨噬细胞之迁移和浸润的趋化因子)之外,还检测到 Th1(至多 10pg/ml:IL-5、IL- β ;高于 10pg/ml:IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、IFN- α)和 Th2(至多 10pg/ml:IL-12、IL-4、IL-10、IL-6、IL-8;高于 10pg/ml:IFN- γ)型细胞因子两者。明显地,在 SmyleDC 免疫后,

除 MCP1, 在小鼠血浆中均检测不到这些细胞因子, 表明 DC 的内源 pp65 抗原呈递具有稳定 T 细胞和 B 细胞免疫突触以及促进人细胞因子和趋化因子广泛产生的关键作用。

[0377] 为了评价抗 pp65 特异性 T 细胞应答, 将经 SmyleDC/pp65 免疫的小鼠的脾细胞合并, 并且将经分选的人 Th 细胞和 CTL 用 CD2/CD3/CD28 珠非特异性活化并进一步用 SmyleDC/pp65 体外扩增以允许进一步的分析。使用 ELISPOT 测定来评估 1 周刺激后的抗 -pp65 应答。用 pp65 脉冲 T 细胞后, 我们观察到以量化的 IFN- γ 阳性斑点测量的 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞反应性, 但是显示, 仅 CD8⁺ 反应性对 pp65 具有特异性, 因为未经 pp65 肽脉冲的 CD4⁺ 也被活化 (图 27b)。

[0378] 另一相关免疫监测参数是 HCT 和免疫后小鼠中的血清转化。值得注意的是, 在 SmyleDC/pp65 免疫后可检测到数种类型的人免疫球蛋白 (IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 和 IgM) (图 27c)。在 SmyleDC 疫苗中不存在抗原的情况下, 我们仅可观察到 IgM 产生。因此, SmyleDC/pp65 的抗原呈递在 B 细胞发育期间促进 Ig 转换。对 pp65 特异性的血浆免疫球蛋白反应性的分析示出可检测水平的 IgM (图 27d)。

[0379] 移植有人脐带血 CD34⁺ 细胞并经不同剂量的 SmyleDC/pp65 免疫之 NRG 小鼠的造血重建

[0380] UCB 是处于非常不成熟分化阶段的 HSC 和祖细胞的丰富来源。因此, 作为解决体外造血重建中慢病毒载体化 DC 之影响的更严格模型, 我们使用从 UCB 分离的 CD34⁺ 细胞作为 HSC 源。使用我们的标准方案来由 UCB 单核细胞产生 SmyleDC/pp65 是可行的。可将 1.5×10^5 剂量的细胞静脉内 (i. v.) 注射到经照射的 4 周龄小鼠中来再现地建立 NRG 小鼠中的 CD34⁺UCBT (图 28a)。如之前对 PBL-CD34⁺ 模型所进行的, 即在 HCT 后 10 和 11 周, 我们将未免疫的小鼠与经 SmyleDC/pp65 免疫的小鼠进行了比较。此外, 考虑到较不成熟的 HSC 状态和可能的较无反应性环境, 在 HCT 后的第 6 周和第 7 周, 我们另外施用了早期 SmyleDC/pp65 免疫 (图 28b)。在 HCT 后 10 周, 未经免疫的小鼠对照示出 60% 至 80% 的循环中淋巴细胞来源于人, 其中它们中的 > 90% 由 B 细胞组成, 并且约 10% 是 T 细胞 (图 28b)。从 HCT 后的第 10 周至第 16 周, 我们观察到血液中的 Th 细胞和 CTL 频率持续逐渐增加, 峰为 Th 20%, CTL 10%。在一次初免 / 加强 SmyleDC/pp65 疫苗接种后, CD4/CD8 比并未改变 (在第 16 周, 对照 3.1 相对于经疫苗接种小鼠的 2.6, $p = 0.45$), 但是在 2 次初免 / 加强 SmyleDC/pp65 疫苗接种后, 在最晚 16 周的时间点观察到较低的 CD4/CD8 比 (1.6, $p = 0.09$)。在 SmyleDC/pp65 免疫后, B 细胞的频率未受影响 (对于所有组, 疫苗接种前约 90% 相对于第 16 周的约 50%)。除这些发现之外, 从 HCT 后 10 周的时间点直至 16 周, 较强的 SmyleDC/pp65 免疫还显示出与较高频率效应记忆 CTL 有关的定量效应 (分别是 9% 相对于 29.5, $p = 0.1$, 图 28c)。在加强的 4x SmyleDC/pp65 免疫后, 脾中的总 CTL (2.7×10^6 相对于对照小鼠的 1.1×10^6 , $p = 0.18$)、幼稚 CTL (0.8×10^6 相对于对照小鼠的 0.3×10^6 , $p = 0.46$) 和 EM CTL (1×10^6 相对于对照小鼠的 0.3×10^6 , $p = 0.18$) 的绝对计数增加 (图 28c)。

[0381] SmyleDC/pp65 免疫增强胸腺 T 细胞发育

[0382] 我们评价了来源于脐带血干细胞重建的成熟 T 细胞的扩增是否是一件外周胸腺外事件或者也可能是 SmyleDC/pp65 免疫增强胸腺中的 T 细胞发育的结果。我们在经 SmyleDC/pp65 免疫 (2x) 之小鼠的胸腺中观察到显著更高频率的双阳性 CD4⁺/CD8⁺ 和 CD3⁺^{lo}; TCR $\alpha \beta$ T 细胞前体 (图 28d)。这表明较高的逆转 (turn-over) 胸腺 T 细胞发育, 其可导

致较高数目的 CTL, 这些 CTL 随后可作为幼稚 T 细胞被动动员至血液以在外周 (LN 和脾中) 中进行后续的抗原刺激并发展成为成熟 T 细胞。

[0383] SmyleDC/pp65 免疫增强胸腺 T 细胞发育

[0384] 为了评价 SmyleDC/pp65 在 T 细胞系与耐受性相关方面的影响, 我们检测了 $CD4^+FoxP3^+CD25^+CD127^-$ 调节性 T 细胞 (Treg) 的频率。尽管 SmyleDC/pp65 免疫改善了 UCBT 后成熟和功能性人 CTL 的重建以及体液应答, 但是也观察到调节性 $CD4^+FoxP3^+CD25^+CD127^-$ T 细胞发生适度但值得注意的扩增。值得注意的是, 4x SmyleDC/pp65 免疫使其在血液中的频率增加 (6.7%; 4x SmyleDC/pp65 相对于对照, $p = 0.06$, 图 28e)。效应和致耐原性细胞的平衡再生可潜在地赋予平衡移植物抗宿主病 (GVHD) 发生的致耐原性能力。值得注意的是, 移植有获自 UCB 的 HSC 并保持观察达 16 周的小鼠没有发生 GVHD。

[0385] 重建的有功能性人免疫系统的 NRG 小鼠中无体征或轻微 1 级 GVHD

[0386] 当于异种移植造血干细胞后重建小鼠中的完全功能性人免疫系统时, 小鼠的移植物抗宿主病是一个关注问题。毕竟, 接受者中的 HLA 分子与供体中的 HLA 分子完全不匹配。出于该原因, 对上述实施例中使用的动物的 GVHD 体征和症状进行评估。评估基于调节性免疫细胞的解剖学特征 (例如肠的炎症) 和频率来进行。解剖学评估由经验丰富的病理学家来进行。评估结果总结于表 3 中。

[0387] 结果表明, 重建的人免疫系统不会引起小鼠中的中度或重度 GVHD 体征, 即使其在其他方面有功能性。因此, 使用本发明的 iDC 来在造血干细胞移植后帮助在接受者中重建功能性免疫系统的用途具有诱导接受者的组织对移植的免疫系统具有耐受性的潜力。鉴于以下事实: 小鼠与人之间白细胞抗原的差别不仅在于不同人中的 HLA 分子, 使用本发明的 iDC 具有允许利用不满足匹配标准但目前被应用于在移植后最小化 GVHD 的供体进行同种异体 HSC 移植的潜力。iDC 的这种用途具有显著拓宽给定患者之潜在供体范围并由此发现用于具有罕见 HLA 分子组合之接受者的供体的潜力。

[0388] 讨论

[0389] 移植同种异体 HSC 对患有高风险血液学恶性肿瘤的患者而言是一个经验证的治疗选择, 但是 HCMV 感染会对存活造成显著危险。我们的结果表明, 编码 GM-CSF、IFN- γ 和 HCMV pp65 抗原的三顺反子 ID-LV 在早期 CMV 启动子的控制之下可以以高效率重编程来自 G-CSF 动员供体之外周血和脐带血的人 $CD14^+$ 单核细胞。将单核细胞单独过夜暴露于 ID-LV 载体驱使其自主分化成 DC, 这些 DC 以高生存力, 免疫学特性 (表达 MHC II、共刺激分子和炎性细胞因子) 和 GM-CSF、IFN- γ 和 pp65 的组成型表达自体维持 7 天。尽管, 此前已报道 pp65 的异位表达可抑制 IFN 信号传导 (Browne 和 Sheng, 2003), 但是我们并未观察到在三顺反子载体中顺式表达的 pp65 的不利作用, 支持我们此前使用用于 DC 重编程的两种载体反式共表达 pp65 的研究 (Daenhanasanmak 等, 2012; Salguero 等, 2011)。

[0390] 用 ID-LV 以 5 的 MOI 转导单核细胞产生少于 0.3 拷贝载体 / 细胞, 并且对整合形式的分析示出对前述原癌簇具有高多克隆性并且无偏向。ID-LV 在 GOLGA7 簇区中的整合似乎是频率最高的“热点”, 其可能反映出在活化的单核细胞分化成活化树突细胞过程中活化单核细胞中的活性转录区。GOLGA7 是一种普遍表达的蛋白质并且用作用于将蛋白质从高尔基体穿梭到质膜的棕榈酰化酶 (Ohta 等, 2003)。在活化的 DC 中, GOLGA7 基因表达增加 (Cuiffo 和 Ren, 2010; Li 等, 2000)。在 DC 和 B 细胞活化期间, MHCII 被从内部囊泡主动外

部化至质膜并且 GOLGA7 在蛋白质穿梭通过高尔基体中可具有重要作用。GOLGA7 位于与单核细胞性白血病中的三体镶嵌现象有关区域中的 8 号染色体上 (Ripperger 等, 2011), 但是已知其不是原癌性的。然而, 需从机理上解释为什么 IC-LV 不显示相同优先整合位点, 表明与 IC-LV 相比, ID-LV 在活化单核细胞基因组中的重组和最终整合可更偏向高度转录的“开放”基因组区。尽管如此, 这两种类型的慢病毒载体化 DC 都没有显示在于用于遗传修饰造血干细胞 (KDM2A、PACS1 和 TNRC6C) 之慢病毒载体的临床前研究中表征的最已知热点中的整合 (Aiuti 等, 2013)。这反映出 HIV-1 整合到活跃转录的染色质区域中的行为, 其依赖于细胞类型和活化刺激物。

[0391] 作为潜在的安全考虑, 我们检测了 SmyleDC/pp65 是否可扩散 HCMV, 因为据报道由 CD34⁺和 CD14⁺祖细胞体外衍生的树突细胞对 HCMV 的完整复制循环高度易感并且允许 HCMV 的完整复制循环 (Hertel 等, 2003; Riegler 等, 2000)。我们使用内皮刺激性 (endotheliotropic) 株 TB40/E-GFP 的体外感染研究表明 SmyleDC 的高 IFN- γ 表达可抑制病毒复制, 而表达 IL-4 的 SmartDC 对 HCMV 感染更加易感并且可引起 HCMV 扩散。值得注意的是, SmyleDC 和 SmyleDC/pp65 体外暴露于 HCMV 导致共活化 T 细胞的关键共刺激分子 CD80 的上调, 表明组成型 IFN- γ 还消除对这些 DC 的潜在 HCMV 免疫抑制作用。

[0392] 在临床上, 证明 pp65 特异性 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞在 HCMV 清除中具有关键作用。由我们的结果可知, 我们观察到内源表达的 pp65 对用于体外刺激 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞应答的载体化 DC 具有清除作用, 其可通过上调 IFN- γ 细胞内染色和用针对 pp65 免疫显性表位反应性 TCR 扩增 T 细胞来检测。此外, 扩增的 pp65 特异性 CD8⁺T 细胞对表达 pp65 抗原的靶细胞表现出优异的细胞溶解活性。

[0393] 除了强体外抗原刺激之外, SmyleDC/pp65 加速 HCT 和 UCBT 人源化小鼠模型中的造血重建。与我们的体外结果类似, 用于免疫之 DC 的 pp65 抗原表达在血液和脾中产生数量和/或质量更高频率的人效应 CTL。在 SmyleDC/pp65 免疫后, 在胸腺中从头发育并生物分布至数个组织的 T 细胞变成主要的记忆 T 细胞, 而在不存在抗原的情况下 (HCT 后的 SmyleDC 免疫), 我们观察到幼稚 CTL 亚群在血液中的明显扩增。不清楚什么驱动了在 SmyleDC 疫苗接种之小鼠的脾中和骨髓中观察到的效应记忆 CTL 群的分化。它们可代表对小鼠异种抗原具有反应性的 T 细胞, 如在 PBL-HCT 后在未经免疫的小鼠中同样观察到的 (参见实施例 2)。

[0394] 在 HCT 后人源化模型的免疫重建中的局限之一是成熟 B 细胞的不良重建和缺乏 Ig 类型转换。明显地, 在 HCT 后, 在经 SmyleDC/pp65 免疫的小鼠中检测到高水平的 IgM、IgG 和 IgA (但是经 SmyleDC 免疫则未检测到), 支持以下观点: pp65 抗原可影响用于 Ig 类型转换的 B 细胞的成熟。人源化小鼠中的研究证明 B 细胞成熟与效应 T 细胞的发育有关 (Lang 等, 2013)。因此, 由 SmyleDC/pp65 组驱动的 pp65 特异性 CD4⁺T 细胞扩增可提供 B 细胞成熟、Ig 类型转换和分泌抗原特异性抗体所需关键的成熟因子 (例如 CD40L)。已做出了一些努力来改善 HIS 小鼠中的适应性免疫应答, 例如递送重组细胞因子 (例如 GM-CSF 和 IL-4) (Chen 等, 2012) 或者转基因表达 I 型或 II 型 HLA (Jaiswal 等, 2012; Suzuki 等, 2012)。SmyleDC/pp65 可符合这些要求中的若干条, 因为其与移植的 HSC 是完全 HLA 匹配的、表达多种细胞因子并且提供有效的抗原信号。

[0395] 对于人类年轻患者, 淋巴细胞缺失后的 T 细胞免疫重建可通过活性胸腺生成发

生,但是对于年长的成年患者,其主要通过外周扩增的克隆的体内稳态增殖发生 (Williams 等,2007)。体内稳态增殖结果是外周 T 细胞库的迅速且显著的扩增,并且依赖于淋巴细胞减少后时期内的体内稳态细胞因子和抗原驱使的应答两者 (Williams 等,2007)。尽管目前正在临床试验中针对 HCMV 的一些疫苗候选物进行评估,但是高活力、可潜在地被大规模生产并且提供抗原和体内稳态免疫重建的个性化载体化树突细胞疫苗是一项有前景的临床革新以降低 HCT 和 UCBT 后的死亡率和发病率。

[0396] 增加的病理学和临床证据表明 HCMV 可能是恶性肿瘤 (例如神经胶质瘤和乳腺癌) 中的病原体 (Soderberg-Naucler 等,2013; Taher 等,2013)。尽管尚未报道用 HCMV 感染恶性造血细胞,但是 HCT 接受者或供体的 HCMV 阳性血清状态对急性白血病患者 (特别是急性淋巴细胞白血病) 的存活产生不利影响 (Schmidt-Hieber 等,2013b)。此外,HCT 后早期 HCMV 再激活的急性髓性白血病患者表现出较低的复发风险,表明推定的“病毒抗白血病”效应 (Elmaagacli,2013; Green 等,2013) 或者 HCMV 可能还是增加白血病复发的病原体。因此,还可用基本原理来探索 HCT 后控制 HCMV 的免疫以改善移植物抗白血病和降低白血病的复发率。因此,根据良好生产规范 (good manufacturing practice, GMP) 扩大病毒生产规模并确认 SmyleDC/pp65 产生是当前的发展以用于针对高风险急性白血病的未来免疫治疗临床试验。

[0397] 材料和方法

[0398] 质粒构建和整合酶缺陷型慢病毒载体 (ID-LV) 产生

[0399] 慢病毒骨架载体 RRL 由 Luigi Naldini 教授 (Univ.Milan) 慷慨提供。载体 RRL-cPPT-CMVp-GM-CSF-P2A-IFN- α (LV-G2 α) 和 RRL-cPPT-CMVp-pp65 (65kD) 的构建如 (Daenthanasanmak 等,2012) 所述。对于 LV-GM-CSF-P2A-IFN- α -F2A-pp65 (LV-G2 α -pp65) 的产生,使用人 GM-CSF-IFN- α 和 pp65 的 cDNA 作为模板进行重叠 PCR,并用口蹄疫病毒病的 2A 元件 (F2A) 间隔。用 F2A 元件进行 LV 构建的策略此前已有描述 (Szymczak 和 Vignali, 2005)。用于在 IFN- α 与 pp65 之间产生间隔 F2A 元件的引物是:F2A/pp65 正向 5'-CCGGTG AACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCAGGGCCCATGGAGTCGCGCGGT CGCCGTTG-3' (SEQ ID NO:7) 和 F2A/IFN- α 反向:5'-TGGGTTGGACTCCACGTCTCCCGCCAACTTGA GAAGGTCAAAATTCAAAGTCTGTTTCACCGGTTCTTACTTCTTAACTTTCTTGCA-3' (SEQ ID NO:8)。将 PCR 产物用限制性酶 XbaI 和 ClaI 消化并插入到 RRL-cPPT-CMVp-MCS 载体的多克隆位点中。通过限制性消化和测序分析来确认所有构建体的结构完整性。大规模慢病毒的生产如前所述通过瞬时共转染人胚肾 293T 细胞来进行 (Stripecke,2009)。通过在共转染中使用具有下列包装质粒之骨架载体的组合来进行 ID-LV 的产生:表达含有 D64V 点突变之 gag/pol 的质粒 (由汉诺威医学院的 Axel Schambach 教授慷慨提供)、表达 rev 的质粒和编码 VSV-G 包膜的质粒。

[0400] 用 ID-LV 产生慢病毒载体化 DC

[0401] 根据由汉诺威医学院伦理评价委员会批准的研究方案来获得从 HLA-A * 02.01/HLA-B * 07.02 阳性 HCMV 反应性成年健康志愿者获得的外周血单核细胞 (PBMC)、从 G-CSF 动员供体和脐带血获得的白细胞单采。由 CD14⁺单核细胞来产生慢病毒诱导 DC 此前已有描述 (Daenthanasanmak 等,2012)。简言之,使用 CD14 分离珠 (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) 来从 PBMC 分离 CD14⁺。在转导之前,将单核细胞用重组人

GM-CSF 和 IL-4 (各 50ng/ml, Cellgenix, Freiburg, Germany) 预先处理 8 小时。使用 2.5 μ g/mL p24 当量的 ID-LV-G2 α /pp65 在 5 μ g/ml 硫酸鱼精蛋白 (Valeant, Dusseldorf, Germany) 存在下以 5 的感染复数 (MOI) 转导 5×10^6 单核细胞 16 小时。转导后, 将细胞用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次并进一步维持在含有无血清 X-vivo 培养基 (Lonza) 的培养物中或者直接用于进行小鼠免疫。

[0402] 对细胞因子和转基因表达的分析

[0403] 通过 Western 印记分析 (Bio-Rad, Munich, Germany) 来确定 293T 细胞裂解物和上清液中 HCMV pp65 蛋白的检测。对于 SmyleDC/pp65 中的细胞内 pp65 表达, 通过前述细胞内染色和流式细胞术来进行 (Daenthanasanmak 等, 2012)。首先, 用单克隆抗体抗 - 人 CD14、HLA-DR、HLA-ABC、CD80、CD86、CD83、CD11c 和 CD123 的组合针对 DC 表面抗原染色 SmyleDC, 之后用 BD cytofix/cytoperm 溶液 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) 固定和透化并与针对 HCMV-pp65 的 FITC 缀合小鼠单克隆抗体 (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 一起孵育。用 FACS Calibur 仪器 (Becton Dickinson) 利用 CellQuest 软件来进行分析。通过根据生产商的说明书使用的多重 luminex 珠试剂盒 (Milliplex Milipore, Billerica, USA) 来进行 SmyleDC 培养物之细胞上清液中细胞因子的检测。

[0404] 整合分析

[0405] 使用前述 LAM-PCR 方法根据病毒拷贝数和整合位点分析来评价由 IC-LV 和 ID-LV 产生并在培养物中保持 10、20 和 30 天的 SmyleDC/pp65 (Schmidt 等, 2007)。通过 qPCR 来量化所整合的 LV 拷贝数。

[0406] HCMV-TB40/E GFP 感染和噬斑测定

[0407] 如前所述繁殖 HCMV TB40/E GFP 毒株 (Sinzger 等, 2008), 并且病毒滴度是 1.75×10^7 pfu/ml。对于每个时间点 (感染后 0、2、4、6、8 和 10 天, d. p. i.), 将每种类型的靶 DC 以 5×10^5 细胞 / 孔接种在 6 孔中。使用人成纤维细胞 (HF) 作为阳性对照。用 HCMV (以 2 和 1 的 MOI) 感染 DC 和 HF 细胞 24 小时。感染后, 用 PBS 洗涤细胞并将其保持在含有补充有 10% FBS 以及 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 的培养物中。在每个时间点, 收获经感染的细胞以用于 GFP 分析并使用 PE 缀合的抗 - 人 CD80 来表面染色 DC。在洗涤后, 将细胞固定在 1% 多聚甲醛中并通过流式细胞术分析。对于噬斑形成测定, 在每个时间点收集细胞上清液并将 100 μ l 未经稀释和经稀释 (10 倍连续稀释液中的 20 μ l) 的 DC 上清液添加至 48 孔板中接种的单层 HF 细胞。对于每份上清液和每个时间点, 设置两个重复孔。在孵育 2 小时后, 添加 500 μ l 的羧甲基纤维素以确保感染仅在细胞间是可能的。在感染后 4 至 10 天后分析噬斑的数目。在第 10 天, 使用吉姆萨染色来染色噬斑以确认噬菌斑数目。由噬斑数目的平均值来计算滴度 (pfu/ml), 而噬斑数目由重复孔 $\times$ 稀释因子 / 稀释体积 (0.1ml) 来计数。

[0408] 对体外刺激的 pp65 反应性 T 细胞的分析

[0409] 使用 MACS 系统根据生产商的方案 (Miltenyi Biotec) 从 PBMC 分离自体 CD3⁺ 和 CD8⁺ T 细胞。对于经 10 μ g/ml PepTivator CMV-pp65 重叠肽库 (Miltenyi Biotec) 或 DC 刺激 16 小时的 T 细胞的 IFN γ 细胞内染色分析, 收获 T 细胞并将其用 APC 缀合的抗 - 人 CD3、PB 缀合的抗 - 人 CD4 和 PCy7 缀合的抗 - 人 CD8 抗体染色。在用 Cyofix/perme (BD) 于 4°C 下固定 / 透化 20 分钟并洗涤后, 使用抗 - 人 IFN γ (ebioscience) 染色 30 分钟。获取细胞并

使用 LSRII (Beckman Coulter) 通过流式细胞术分析。对于微量培养扩增系统,将 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 (第 7 天) 与 96 孔板中分离的自体 CD8⁺T 细胞以 1 : 10 的比 (APC : T 细胞) 在补充有 5% 人 AB 血清的 X-vivo 培养基中共培养。每个微量培养添加经 γ 辐照的自体 CD8 饲养细胞 (2×10^5)。3 天后,隔日用 IL-2 (20IU/ml) (Novartis Pharma GmbH, Germany) IL-7 和 IL-15 (各 5ng/ml, Cellgenix, Gladbach, Germany) 补充细胞。对于 7 天后的再刺激,将经冷冻保存的 DC 解冻并以 1 : 10 的比添加至 T 细胞。收获经再刺激的 T 细胞、计数并通过四聚物染色分析 pp65 反应性。使用 PE 缀合的四聚物 (HLA-A * 0201-NLVPMTATV, pp65 氨基酸 (aa) 495-503 ; HLA-B * 0702-TPRVTGGGAM, pp65aa 417-426 ; Beckman Coulter)、APC 缀合的抗 - 人 CD3、PB 缀合的抗 - 人 CD4 和 PCy7 缀合的抗 - 人 CD8。

[0410] 将造血干细胞移植到免疫缺陷 NRG 小鼠中

[0411] 繁殖 NOD. Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl} (NOD. Rag1^{-/-}. IL-2r γ ^{-/-}, NRG) 小鼠的繁殖对并将其在无病原体条件下维持在 IVC 系统 (BioZone, United Kingdom) 中。涉及小鼠的所有操作都经过 Lower Saxony 的审核和批准并且遵循汉诺威医学院动物研究室提供的指导方针。将 5×10^5 从 G-CSF 动员供体之 MACS 系统分离的人 CD34⁺干细胞或 1.5×10^5 来自脐带血的 CD34⁺细胞经尾静脉移植到经辐照的 4 周龄 NRG 小鼠中。在移植后的第 6/7 和 10/11 周,通过皮下注射在后胁上用 5×10^5 自体 SmyleDC 或 SmyleDC/pp65 以初免 / 加强方式疫苗接种小鼠。免疫前,在第 10 周从每只小鼠收集外周血以进行基线流式细胞术分析。在第 20 周,将小鼠处死以收集血液、血浆、脾和骨髓。将 PBL 样品用红细胞裂解缓冲液 (0.83% 氯化铵 / 20mM Hepes, pH 7.2) 处理两次,持续 5 分钟,用 PBS 洗涤并用下列人抗体染色: PB 缀合的抗 - CD45、APC 缀合的抗 - CD3、Alexa700 缀合的抗 - CD19、APHCy7 缀合的抗 - CD4、PCy7 缀合的抗 - CD8、FITC 缀合的抗 - CD45RA、PCy5 缀合的抗 - CD62L。通过对 CD45RA⁺CD62L⁺呈阳性的细胞来定义 T 细胞亚群,其是幼稚细胞 (N)、T 中枢记忆 (TCM, CD45RA⁺CD62L⁺) 和 T 效应记忆 (TEM, CD45RA⁺CD62L⁺)。在 FACSLSR II 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 中使用 Flowjo 软件来进行分析。对于 T 细胞效应功能测定,用 Moflo 仪器 (Becton Dickinson) 从脾细胞分选 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞;从小鼠 (n = 3) 获得的分选 CD4⁺或 CD8⁺脾细胞合并,并在进行 7 天的体外 SmyleDC/pp65 刺激之前用 CD2/CD3/CD28 珠 (T 细胞活化试剂盒, Miltenyi Biotec) 刺激 48 小时。收获 50,000 个 T 细胞,每孔接种在 IFN- γ 抗体包被的 ELISPOT 板上并用 pp65 肽库过夜脉冲。将板按照生产商 (Mabtech, Germany) 所述显影。使用未经肽脉冲的细胞作为对照。用珠阵列根据生产商的方案 (Milliplex Milipore, Billerica, USA) 来量化小鼠血浆中细胞因子和免疫球蛋白 (IgA、IgM、IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4) 的水平。对于 Treg 频率的分析,根据表面标志物将单核细胞用 PB 缀合的抗 - CD45、FITC 缀合的抗 - CD3、Alexa700 缀合的抗 - CD4、APC 缀合的抗 - CD127、PCy7 缀合的抗 - CD25 初始染色。在用 Foxp3fix/perm 缓冲液 (ebioscience) 于 4°C 下固定 / 透化 30 分钟并随后洗涤后,使用 PE 缀合的抗 - Foxp3 进行 30 分钟染色,随后洗涤并进一步进行细胞获取。

[0412] 胸腺分析

[0413] 收获胸腺并将单细胞混悬液随后用 PB 缀合的抗 - CD45、FITC 缀合的抗 - CD3、A700 缀合的抗 - CD4、APC 缀合的抗 - CD3、FITC 缀合的抗 - TCR α β 和 FITC 缀合的抗 - TCR γ δ 染色,随后洗涤并通过 LSRII 流式细胞计量术分析。对胸腺中不同发育阶段的 T 细胞的分析。使用 FloJo (Tree Star Inc., Ashland, OR) 软件来进行 DP: CD45⁺/CD4⁺/CD8⁺、CD4SP: CD45⁺/

CD4⁺/CD8⁻、CD8SP:CD45⁺/CD4⁻/CD8⁺、CD3^{lo};CD45⁺/TCR α β⁻/TCR γ δ⁻、CD3 α β^{hi};CD45⁺/TCR α β⁺、CD3 γ δ^{hi};CD45⁺/TCR γ δ⁺分析。

[0414] 统计学分析

[0415] 使用非参数 Man Whitney T 检验统计学分析来确定统计学显著性。所有的测试都是一侧的并且认为 P < 0.05 是显著的。使用 Graphpad prism 5 软件 (San Diego, CA, USA) 来分析数据。

[0416] 参考文献

[0417] Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M. C., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341,1233151.

[0418] Boeckh, M., and Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of clinical investigation* 121,1673-1680.

[0419] Boeckh, M., and Nichols, W. G. (2004). The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 103,2003-2008.

[0420] Browne, E. P., and Shenk, T. (2003). Human cytomegalovirus UL 83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11439-11444.

[0421] Chen, Q., He, F., Kwang, J., Chan, J. K., and Chen, J. (2012). GM-CSF and IL-4 stimulate antibody responses in humanized mice by promoting T, B, and dendritic cell maturation. *J Immunol* 189,5223-5229.

[0422] Cuiffo, B., and Ren, R. (2010). Palmitoylation of oncogenic NRAS is essential for leukemogenesis. *Blood* 115,3598-3605.

[0423] Daenthanasamak, A., Salguero, G., Borchers, S., Figueiredo, C., Jacobs, R., Sundarasetty, B. S., Schneider, A., Schambach, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., et al. (2012). Integrase-defective lentiviral vectors encoding cytokines induce differentiation of human dendritic cells and stimulate multivalent immune responses in vitro and in vivo. *Vaccine* 30,5118-5131.

[0424] Einsele, H., Roosnek E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., et al. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99,3916-3922.

[0425] Elmaagacli, A. H. (2013). CMV and relapse-What has conditioning to do with it? *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*.

[0426] Feuchtinger, T., Opherck, K., Bicanic, O., Schumm, M., Grigoleit, G. U.,

Hamprecht, K. , Jahn, G. , Handgretinger, R. , and Lang, P. (2010). Dendritic cell vaccination in an allogeneic stem cell recipient receiving a transplant from a human cytomegalovirus (HCMV)-seronegative donor: induction of a HCMV-specific T(helper) cell response. *Cytotherapy* 12, 945-950.

[0427] Gamadia, L. E. , Remmerswaal, E. B. , Weel, J. F. , Bemelman, F. , van Lier, R. A. , and Ten Berge, I. J. (2003). Primary immune responses to human CMV : a critical role for IFN-gamma-producing CD4+T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101, 2686-2692.

[0428] Gluckman, E. , Broxmeyer, H. A. , Auerbach, A. D. , Friedman, H. S. , Douglas G. W. , Devergie, A. , Esperou, H. , Thierry, D. , Socie, G. , Lehn, P. , et al. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi' s anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* 321, 1174-1178.

[0429] Green, M. L. , Leisenring, W. M. , Xie, H. , Walter R. B. , Mielcarek, M. , Sandmaier, B. M. , Riddell, S. R. , and Boeckh, M. (2013). CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk : evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood* 122, 1316-1324.

[0430] Griffiths, P. D. , Stanton, A. , McCarrell, E. , Smith, C. , Osman, M. , Harber, M. , Davenport, A. , Jones, G. , Wheeler, D. C. , O' Beirne, J. . et al. (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients : a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 377, 1256-1263.

[0431] Grigoleit, G. U. , Kapp, M. , Hebart, H. , Fick, K. , Beck, R. , Jahn, G. , and Einsele, H. (2007). Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients : induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor. *The Journal of infectious diseases* 196, 699-704.

[0432] Hertel, L. , Lacaille, V. G. , Strobl, H. , Mellins, E. D. , and Mocarski, E. S. (2003). Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus, *Journal of virology* 77, 7563-7574.

[0433] Hervas-Stubbs, S. , Perez-Gracia, J. L. , Rouzaut, A. , Sanmamed, M. F. , Le Bon, A. , and Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2619-2627.

[0434] Jaiswal, S. , Pazoles, P. , Woda, M. , Shultz, L. D. , Greiner, D. L. , Brehm, M. A. , and Mathew, A. (2012). Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell responses in humanized BLT NSG mice. *Immunology* 136, 334-343.

[0435] Kharfan-Dabaja, M. A. , Boeckh, M. , Wilck, M. B. , Langston, A. A. , Chu, A. H. , Wloch, M. K. , Guterwill, D. F. , Smith, L. R. , Rolland, A. P. , and Kenney R. T. (2012).

A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation:a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial.The Lancet infectious diseases 12,290-299.

[0436] Lang, J., Kelly, M., Freed, B. M., McCarter, M. D., Kedl, R. M., Torres, R. M., and Pelanda, R. (2013). Studies of lymphocyte reconstitution in a humanized mouse model reveal a requirement of T cells for human B cell maturation. J Immunol 190,2090-2101.

[0437] Li, N., Huang, X., Zhao, Z., Chen, G., Zhang, W., and Cao, X. (2000). Identification and characterization of a novel gene KE04 differentially expressed by activated human dendritic cells. Biochemical and biophysical research communications 279,487-493.

[0438] Lilja, A. E., and Mason, P. W. (2012). The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB. Vaccine 30,6980-6990.

[0439] Matrai, J., Cantore, A., Bartholomae C. C., Annoni, A., Wang, W., Acosta-Sanchez, A., Samara-Kuko, E., De Waele, L., Ma, L., Genovese, P., et al. (2011). Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. Hepatology 53,1696-1707.

[0440] McGoldrick, S. M., Bleakley, M. E., Guerrero, A., Turtle, C. J., Yamamoto, T. N., Pereira, S. E., Delaney, C. S., and Riddell, S. R. (2013). Cytomegalovirus-specific T cells are primed early after cord blood transplant but fail to control virus in vivo. Blood 121,2796-2803.

[0441] Milano, F., Pergam, S. A., Xie, H., Leisenring, W. M., Gutman, J. A., Riffkin, I., Chow, V., Boeckh, M. J., and Delaney, C. (2011). Intensive strategy to prevent CMV disease in seropositive umbilical cord blood transplant recipients. Blood 118, 5689-5696.

[0442] Moutaftsi, M., Mehl, A. M., Borysiewicz, L. K., and Tabi, Z. (2002). Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. Blood 99,2913-2921.

[0443] Negri, D. R., Rossi, A., Blasi, M., Michelini, Z., Leone, P., Chiantore M. V., Baroncelli, S., Perretta, G., Cimorelli, A., Klotman, M. E., et al. (2012). Simian immunodeficiency virus-Vpx for improving integrase defective lentiviral vector-based vaccines. Retrovirology 9,69.

[0444] Ohta, E., Misumi, Y., Sohda, M., Fujiwara, T., Yano, A., and Ikehara, Y. (2003). Identification and characterization of GCP16, a novel acylated Golgi protein that interacts with GCP170. The Journal of biological chemistry 278, 51957-51967.

[0445] Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G., and Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete

replicative cycle of human cytomegalovirus. The Journal of general virology 81, 393-399.

[0446] Ripperger, T., Tauscher, M., Praulich, I., Pabst, B., Teigler-Schlegel, A., Yeoh, A., Gohring, G., Schlegelberger, B., Flotho, C., Niemeyer, C.M., et al. (2011). Constitutional trisomy 8p11.21-q11.21 mosaicism: a germline alteration predisposing to myeloid leukaemia. British journal of haematology 155, 209-217.

[0447] Salguero, G., Sundarasetty, B. S., Borchers, S., Wedekind, D., Eiz-Vesper, B., Velaga, S., Jirmo, A. C., Behrens, G., Warnecke, G., Knofel A. K., et al. (2011). Preconditioning therapy with lentiviral vector-programmed dendritic cells accelerates the homeostatic expansion of antigen-reactive human T cells in NOD. Rag1-/- . IL-2rgammac-/- mice. Human gene therapy 22, 1209-1224.

[0448] Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E., and Britt, W. J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. Journal of virology 74, 975-986.

[0449] Schmidt-Hieber, M., Labopin, M., Beelen, D., Volin, L., Ehninger, G., Finke, J., Socie, G., Schwerdtfeger, R., Kroger, N., Ganser, A., et al. (2013a). CMV serostatus has still an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the acute leukemia working party of EBMT. Blood.

[0450] Schmidt-Hieber, M., Labopin, M., Beelen, D., Volin, L., Ehninger, G., Finke, J., Socie, G., Schwerdtfeger, R., Kroger, N., Ganser, A., et al. (2013b). CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. Blood 122, 3359-3364.

[0451] Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Zaoui, K., Ball, C., Pilz, I., Braun, S., Glimm, H., and von Kalle, C. (2007). High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). Nature methods 4, 1051-1057.

[0452] Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W., and Adler, B. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. The Journal of general virology 89, 359-368.

[0453] Soderberg-Naucler, C., Rahbar, A., and Stragliotto, G. (2013). Survival in patients with glioblastoma receiving valganciclovir. The New England journal of medicine 369, 985-986.

[0454] Steinman, R. M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annual review of immunology 30, 1-22.

[0455] Stripecke, R. (2009). Lentiviral vector-mediated genetic programming of

mouse and human dendritic cells. *Methods Mol Biol* 506,139-158.

[0456] Sung, H., and Schleiss, M. R. (2010). Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert review of vaccines* 9,1303-1314.

[0457] Suzuki, M., Takahashi, T., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Harigae, H., Ishii, N., and Sugamura, K. (2012). Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/gamma null mouse. *International immunology* 24,243-252.

[0458] Szymczak, A. L., and Vignali, D. A. (2005). Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert opinion on biological therapy* 5,627-638.

[0459] Taher, C., de Boniface, J., Mohammad, A. A., Religa, P., Hartman, J., Yaiw, K. C., Frisell, J., Rahbar, A., and Soderberg-Naucler, C. (2013). High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes. *PloS one* 8.e56795.

[0460] Verdijk, P., Aarntzen, E. H., Lesterhuis, W. J., Boullart, A. C., Kok, E., van Rossum, M. M., Strijk, S., Eijckeler, F., Bonenkamp, J. J., Jacobs, J. F., et al. (2009). Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research* 15,2531-2540.

[0461] Wendland, M., Willenzon, S., Kocks, J., Davalos-Misslitz, A. C., Hammerschmidt, S. L., Schumann, K., Kremmer, E., Sixt, M., Hoffmeyer, A., Pabst, O., et al. (2011). Lymph node T cell homeostasis relies on steady state homing of dendritic cells. *Immunity* 35,945-957.

[0462] Williams, K. M., Hakim, F. T., and Gress, R. E. (2007). T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Seminars in immunology* 19,318-330.

[0463] 表 1 :与经 ConvDC 免疫或未免疫的对照相比,经 SmyleDC 免疫之小鼠的血液和脾中的人 T 细胞频率显著增加

[0464] i. 外周血

[0465]

对照				ConvDC			SmyleDC			p 值	p 值
标志物 (周)	平均值 (%)	SE	n	平均值 (%)	SE	n	平均值 (%)	SE	n	SmyleDC 相对于对照	SmyleDC相对于 ConvDC
CD3											
10w	3.32	1.28	10	1.53	0.54	7	1.81	0.31	22	0.65	0.67
13w	5.79	0.82	10	7.40	3.57	7	12.04	1.88	22	0.004	0.27
20w	11.22	4.58	10	21.06	7.85	7	53.95	5.39	22	<0.0001	0.0063
CD4											
10w	0.47	0.32	10	0.29	0.13	7	0.32	0.12	22	0.60	0.92
13w	1.15	0.43	10	5.56	3.34	7	3.94	0.96	22	0.012	0.66
20w	2.72	1.24	10	10.02	3.82	7	28.10	4.42	22	0.004	0.042
CD8											
10w	0.71	0.27	10	0.62	0.43	7	0.80	0.15	22	0.80	0.61
13w	1.73	0.58	10	2.13	1.20	7	4.37	0.94	22	0.179	0.023
20w	4.25	1.94	10	8.86	3.22	7	19.48	2.13	22	0.0013	0.018

[0466]

ii. 脾

CD45	2.8	0.9	6.0	1.7	15.4 (2.5x)	3.4	0.001	0.010
CD3	7.8	2.8	3.9	1.2	38.2 (10x)	5.4	<0.0001	<0.0001
CD8	3.6	1.1	1.7	0.5	12.9 (8x)	2.4	0.001	<0.0001
CD8 幼稚	37.5	11.1	14.6	5.3	12.3	4.2	0.030	0.370
CD8 EM	19.3	8.2	24.8	10.2	38.6	7.0	0.040	0.140
CD4	3.8	2.0	1.7	0.8	22.9 (13x)	3.5	<0.0001	<0.0001
CD4 幼稚	19.2	4.9	7.8	2.8	10.5	3.5	0.037	0.276
CD4 EM	28.6	12.1	38.1	11.3	51.3	7.4	0.100	0.340

[0467]

表 2: 慢病毒序列的 PCR 检测, 拷贝/细胞			
	脾	右淋巴结, 引流注射 部位	左淋巴结, 对侧
小鼠 1	0	0.036	0.003
小鼠 2	0.226	1.58	0.178
小鼠 3	0.035	1.48	0.009

[0468]

小鼠 4	2.06	0.03	0.02
平均值± SEM	0.58025 + 0.49	0.7815 + 0.432	0.0525 + 0.041

[0469] 表 3 :对实施例 2 和 3 的 GVHD 分析的总结

[0470]

实验	小鼠	人免疫重建	GVHD	致耐原性 T 细胞的组织学或频率
成年 CD34+ HCT SmyleDC/pp65 2 种载体共转导 在第 10、11 周进行免疫 HCT 后 20 周进行分析 (实施例 2)	22	- 效应 CD4、 CD8 T 细胞 和 pp65 特异性应答 - 成熟 B 细胞 和 app65 特异性应答 - 血浆中的 数种细胞因子	无 GVHD 的临床体征;重量无变化	组织学: 2/4 皮肤 中为 1 级 GVHD; 组织学: 3/4 结肠 中为 1 级 GVHD ;
成年 CD34+ HCT SmyleDC/pp65 2 种载体共转导 在第 10、11 周进行免疫 HCT 后 45 周进行分析 (实施例 2)	10	-所减少的 T 细胞和 B 细胞 的数目	无临床体征	n.d.
成年 CD34+ HCT SmyleDC/pp65 1 种载体转导	5	-效应 CD4、 CD8 T 细胞 和 pp65 特异性应答	4 小鼠无 GVHD 体征, 1 只小鼠患有 GVHD	n.d.

[0471]

在第 10、11 周进行免疫 HCT 后 20 周进行分析 (实施例 3)		- pp65 特异性抗体应答 - 血浆中的数种细胞因子 (pp65 依赖性的)		
脐带血 CD34+ HCT SmyleDC/pp65 1 种载体共转导 在第 10、11 周进行免疫 HCT 后 16 周进行分析 (实施例 3)	12	- 效应 CD4、CD8 T 细胞和 pp65 特异性应答 - pp65 特异性抗体应答	无临床体征	Treg 的频率在正常范围内= 3.45% $\gamma\delta$ T 细胞的频率在正常范围内= 2.08%
脐带血 CD34+ HCT SmyleDC/pp65 1 种载体转导 在第 6、7、10、11 周进行免疫 HCT 后 16 周进行分析 (实施例 3)	9	- 效应 CD4、CD8 T 细胞和 pp65 特异性应答 - 体液 pp65 特异性应答	无临床体征	Treg 的频率在正常范围内= 4.64% $\gamma\delta$ T 细胞的频率在正常范围内= 2.0%

[0472] 总之,上述数据证明了:

[0473] 1. 常规人 DC 疫苗(其在体外或体内不具有高活力或免疫稳定性)与我们 iDC(在数周内可在体外和体内存活并有效)之间的基本差异。

[0474] 2. iDC 一经皮下注射就具有向 LN-“原基”运输的能力,从而导致募集 CD4+ 和 CD8+ 细胞(特别是由效应记忆和中枢记忆细胞所代表的)、滤泡 T 辅助细胞和成熟 B 细胞。

[0475] 3. iDC 施用产生作为针对 CMV 中所表达之蛋白质 (pp65) 的抗原特异性应答可测量的适应性 CTL 应答。

[0476] 4. iDC 免疫刺激小鼠中高水平 IgG 产生的作用和对 pp65 的反应性, 证明在 NRG 中的人 B 细胞发育期间, 发生免疫球蛋白类型转换。

[0477] 5. 安全性增强的整合酶缺陷型慢病毒在 iDC 重编程中的适用性, 其通过降低插入诱变的风险来增强遗传编程的安全性。

[0478] 6. 对临床发展和 iDC 使用的实际看法, 因为: 1. 慢病毒载体已被用于在临床基因治疗方案中进行离体基因转移, 2. 我们所采用的 HSC 源常规用于临床 HSCT, 3. 所采用的 pp65CMV 抗原在于 HSCT 后刺激淋巴细胞减少宿主中的有效抗 -CMV 应答方面具有临床相关性。

[0479] 7. 只表达 GM-CSF 和 IFN- α 之 SmyleDC 与另外表达 HCMV 的 pp65 抗原之 SmyleDC/pp65iDC 之间的比较表明后一类型的 iDC 与接受者中较高人细胞因子水平和不同人免疫球蛋白类型显著相关并且引起 B 细胞和 T 细胞更快速扩增。

[0480] 8. 除血液和脾中观察到的成熟 T 细胞扩增之外, UCBT 后的 SmyleDC/pp65 免疫证明胸腺中具有更高频率的 T 细胞前体。这反映出 SmyleDC/pp65 提供体内稳态和 / 抗原信号以增强胸腺生成的能力。还可能的是, SmyleDC/pp65 免疫增强幼稚 T 细胞被动动员至外周, 从而允许胸腺中更加持久地产生 T 细胞前体。

[0481] 9. 不管小鼠中功能性适应性人免疫系统的有效重建, 仅在 58 只小鼠中的一只小鼠中观察到重度移植物抗宿主病, 这 58 只小鼠类似地移植有异种人干细胞并且被负载 pp65 免疫原的供体衍生 SmyleDC 免疫。在剩余的小鼠中未观察到临床 GVHD 体征。经验丰富的病理学家对 4 只小鼠的群进行组织病理学分析, 显示小鼠亚群中发生仅轻微的 1 级 GVHD。施用 SmyleDC/pp65 4 次的免疫适度地增加 Treg 的频率。因此, 使用 iDC 可潜在地改善使用与目前临床方案所要求的接受者不完全匹配之供体的造血干细胞移植的结果。

[0001]

序列表

<110> Medizinische Hochschule Hannover

<120> 经诱导树突细胞及其用途

<130> 840-1 PCT2

<150> PCT/EP2013/052485

<151> 2013-02-07

<160> 12

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 4307

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<222> 1..4307

<223> /mol_type="DNA"
/note="来自HIV-1的非整合载体"
/organism="人工序列"

<400> 1

atgggtgcga gacgcgcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaaticgg	60
ttaaggccag ggggaagaa aaaatataaa ttaaacata tagtatgggc aagcaggag	120
ctagaacgat tgcagttaa tcciggcctg ttagaacat cagaaggctg tagacaaata	180
ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggaacagaag aacittagatc attatataat	240
acagtagcaa cccctctatg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct	300
ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct	360
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg	420
caaatggtag atcaggecat atcaactaga acittaaatg catgggtana agtagtagaa	480
gagaaggcct tcagcccaga agtgataccc atgttticag cattatcaga aggagccacc	540
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catgcaaatg	600
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcattc agtgcattga	660
gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact	720
agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acacataatc caccatccc agtaggagaa	780
atctataaaa gatggataat cctgggatta aataaaaatg taagaatgta tagccclacc	840
agcattcttg acataagaca aggaccaaaag gaaccttfa gagactatgt agaccgattc	900
tataaaactc taagagccga gcaagcttca caagaggtaa aaaattggat gacagaaaacc	960
ttgttggtcc aaaatgcga cccagattgt aagactattt taaaagcatt gggaccagga	1020
gcgacactag aagaaatgat gacagcatgt caggggagtgg ggggacccgg ccataaagca	1080
agagtttllg clguagcaat gagccaagta acaaatccag ctaccataat gatacagaaa	1140
ggcaatttta ggaaccaaaag aaagactgtt aagtgtttca attgtggcaa agaagggcac	1200
atagccaaaa attgcagggc ccttaggaaa aagggetgtt ggaatgttg aaaggaagga	1260
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc	1320
cacaagggaa gggcagggaa ttttcttcag agcagaaccag agccaacagc cccaccagaa	1380
gagagcttca ggttggggg agagacaaca actccctctc agaagcagga gcegalagac	1440

[0002]

aaggaactgt atccitttagc ttccttcaga teactctttg gcagcgaccc ctcgtcacaa	1500
taaagatagg ggggcaatta aaggaagctc tattagatac aggagcagat gatacaglat	1560
tagaagaaat gaatttgcca ggaagatgga aaccaaaaat gataggggga attggaggtt	1620
ttatcaaagt aggacagfat gatcagatac tcatagaat ctgcggacat aaagctatag	1680
gtacagtatt agtaggaect acacctgta acataattgg aagaaatctg ttgactcaga	1740
ttggctgcac tttaaatttt cccattagtc ctattgagac tgiaccagta aaattaaagc	1800
caggaatgga tggcccaaaa gttaaacaat ggccattgac agaagaaaaa ataaaagcat	1860
tagtagaaat ttgiacagaa atggaaaagg aaggaaaaat ttcaaaaatt gggcctgaaa	1920
atccatacaa tactcagta ttgcccataa agaaaaaga cagtactaaa tggagaaaaat	1980
tagtagattt cagagaactt aataagagaa ctcaagattt ctgggaagtt caattaggaa	2040
taccacatcc tgcagggtta aaacagaaaa aatcagtaac agtactggat gtgggcgatg	2100
catatttttc agttccetta gataaagact tcaggaagta tactgcattt accataceta	2160
gtataaacia tgagacacca gggattagat atcagtacaa tgtgcttcca cagggatgga	2220
aaggatcacc agcaatatc cagtgtagca tgacaaaaat cttagagcct tttagaaaaac	2280
aaaatccaga catagtcatc tatcaataca tggatgatit gtatgtagga tctgacttag	2340
aaatagggca gcatagaaca aaaatagagg aactgagaca acatcigtig aggtggggat	2400
ttaccacacc agacaaaaaa catcagaaag aacctccatt cctttggatg ggttatgaac	2460
tccatcciga taaatggaca gtacagccta tagtgcctgc agaaaaggac agctggactg	2520
tcaatgacat acagaaatta gtgggaaaat tgaattgggc aagtcagatt tatgcaggga	2580
ttaaagtaag gcaattatgt aaacttctta ggggaaccaa agcactaaca gaagtagtac	2640
cactaacaga agaagcagag ctagaacigg cagaaaacag ggagattcta aaagaaccgg	2700
tacatggagt gtattatgac ccatcaaaag acttaatagc agaaatacag aagcaggggc	2760
aaggccaatg gacatatcaa atttatcaag agccatttaa aaatctgaaa acaggaaaaat	2820
atgcaagaat gaagggtgcc cacactaatg atgtgaaca attaacagag gcagtacaaa	2880
aaatagccac agaaagcata gtaafatggg gaaagactec taaattttaa ttaccatac	2940
aaaaggaac atgggaagca tgggtgacag agtattggca agccacctgg attcctgagt	3000
gggagtittgt caataccctt ccttagtga agttatggta ccagttagag aaagaaccca	3060
taataggagc agaaacttite tatgtatagtg gggcagccaa tagggaaaact aaattaggaa	3120
aagcaggata tgtaactgac agaggaagac aaaaagtigt cccctaacc gacacaacaa	3180
atcagaagac tgagttacaa gcaattcatc tagctttgca ggattcggga tiagaagtaa	3240
acatagtac agactcaca tatgcatfgg gaatcattca agcacaacca gataagagtg	3300
aafcagagtt agtcagtcaa ataatagagc agttaataaa aaaggaaaaa gtctacctgg	3360
catgggtacc agcacacaaa ggaattggag gaaatgaaca agtagatggg ttggtcagtg	3420
ctggaatcag gaaagtacta tttttagatg gaatagataa ggcccaagaa gaacatgaga	3480
aatatcacag taattggaga gcaatggcta gtgatittaa cctaccacti gtagtagcaa	3540
aagaaatagt agccagctgt gataaatgta agctaaaagg ggaagccatg catggacaag	3600
tagactgtag cccaggaata tggcagctag ttgtacaca tttagaagga aaagttatct	3660

[0003]

```

tggttagcagt tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag 3720
ggcaagaaac agcatacttc ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac 3780
atacagacaa tggcagcaat ttaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tggtaggcgg 3840
ggatcaagca ggaatttggc attccctaca atccccaaag tcaaggagta atagaatcta 3900
tgaataaaga aitaagaaa attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catettaaga 3960
cagcagtaca aatggcagta ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg atgggggggt 4020
acagtgcagg ggaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac 4080
aaaaacaaat tacaaaaatt caaaattttc gggtttatta caggacacgc agagatccag 4140
tttggaaagg accagcaaag ctctctgga aaggtagaagg ggcagtagta atacaagata 4200
atagtacat aaaagtagtg ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaac 4260
agatggcagg tgatgattgt gtggcaagta gacaggatga ggattaa 4307

```

```

<210> 2
<211> 1686
<212> DNA
<213> 巨细胞病毒

<220>
<221> source
<222> 1..1686
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="巨细胞病毒"

```

```

<400> 2
atggagtgcg gcggtcgcg tigtccgaa atgatatccg tactgggtcc catttcgggg 60
cacgtgtgta aagccgtgtt tagtcgcgc gatacgcgcg tgetgcgcga cgagacgcga 120
ctcttgcaga cgggtatcca cgtacgcgtg agccagccct cgtgatctt ggtatcgcag 180
tacaegcccg actcagcgc atgccaccgc ggcgacatc agctgcaggt gcagcacacg 240
tactttacgg gcagcgaggt ggagacgtg tcggtcaag igcacacccc caccggccga 300
agcatctgcc ccagccagga gcccatgtcg atctatgtgt acgcgtgcc gctcaagatg 360
ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac taccgtcgg cgcccgagcg caaacaccga 420
cacctgcccg tagctgacgc tgtgtatcac gcgtcgggca agcagatgtg gcaggcgcgt 480
ctcacggtct cgggactggc ctggacgcgt cagcagaacc agtggaaaga gccgcacgtc 540
tactacacgt cagcgttctg gtttccacc aaggacgtgg cactgcggca cgtggtgtgc 600
gcgcacgagc tggtttgtc catggagaac acgcgcgcaa ccaagatgca ggtgataggt 660
gaccagtacg tcaaggtgta cctggagtcc ttctgcgagg acgtgccctc cgccaagctc 720
tttatgcacg tcacgctggg ctctgacgtg gaagaggacc tgacgatgac ccgcaaccgc 780
caaccttica tgcgcccca cgagcgcaac ggctttacgg tgttgttcc caaaaatatg 840
ataatcaaac cgggcaagat ctgcacatc atgtggatg tggcttttac ctacacagag 900
cattttgggc tgetgtgtcc caagagcatc ccgggcctga gcattctagg taacctgttg 960
atgaacgggc agcagatctt cctggaggtg caagccatac gcagacccgt ggaactgcgt 1020
cagtaecatc cctgtggtgc gctctcttt ttcatatcg acttgcgtgt gcagcgcggg 1080
cctcagtaca gcagcaacc caecttcaac agccagtatc gcattccagg caagcttgag 1140
taccgacaca cctgggaccg gcacgacgag ggtgccgccc agggcgacga cgacgtctgg 1200

```

[0004]

```

accagcggat cggactccga cgaagaactc gtaaccaccg agcgcaagac gccccgcgtc 1260
accggcgggc gcgccatggc gggcgccctc acttccgcgg gccgcaaacg caaatcagca 1320
tcttcggcga eggcgtgcac gtcggggcgtt atgacaecgc gccgccttaa ggccgagttc 1380
accgtcgcgc ccgaagagga caccgacgag gattccgaca acgaaatcca caatccggcc 1440
gtgttcacct ggccgccttg geaggccggc atcctggccc gcaacctggg gcccatggtg 1500
gctacggttc agggtcagaa tctgaagtac caggaattct tctgggaecg caacgacatc 1560
taccgcattc tcgccgaatt ggaaggcgta tggcagcccg ctgcgcaccc caaacgtcgc 1620
cgccaccggc aagacgcctt gcccgggcca tgcctgcctt cgacgcacca aaagcaccca 1680
ggllga 1686

```

```

<210> 3
<211> 432
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..432
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="智人"

```

```

<400> 3
atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 60
cgctcgcaca gccccagcac gcagccctgg gacgatgtga atgccatcca ggaggccggg 120
cgtctctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac 180
tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcttggg gctgtacaag 240
cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccctt tgacctgat agccagccac 300
tacaagcage actgccctcc aaccgccgaa acttcccttg caaccagat taicaccitt 360
gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtca tcccccttga ctgctgggag 420
ccagtcagg ag 432

```

```

<210> 4
<211> 550
<212> DNA
<213> 智人

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..550
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="智人"

```

```

<400> 4
atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctctgtgtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
tctgtgggct gtgactgtcc tcaaacccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgtc 120
ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tctgtcttga aggacagaca tgactttgga 180
tttcccagg aggagtittg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgctctccat 240
gagatgacc agcagatctt caatctcttc agcacaagg actcaatcgc tgcctgggat 300
gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa cttaccagc agctgaatga cctggaagcc 360
tgtgtgatac aggggggtgg ggtgacagag actccccga tgaaggagga ctccattctg 420
gctgtgagga aafacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480

```

[0005]

tgtgacctggg aggttgtag agcagaaatc atgagatett tttctttgtc aacaaaettg 540
caagaaagtt 550

<210> 5
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..66
<223> /mol_type="DNA"
/note="编码人工病毒衍生之接头多肽的核酸"
/organism="人工序列"

<400> 5
ggatccggag ccacgaactt ctctctgita aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc 60
ggtcct 66

<210> 6
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..69
<223> /mol_type="DNA"
/note="编码人工病毒衍生之接头的核酸"
/organism="人工序列"

<400> 6
ccggtgaaac agactitgaa tttagacctt ctcaagttgg cgggagacgt ggagtccaac 60
ccagggeccc 69

<210> 7
<211> 92
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..92
<223> /mol_type="DNA"
/note="PCR 引物"
/organism="人工序列"

<400> 7
ccggtgaaac agactitgaa tttagacctt ctcaagttgg cgggagacgt ggagtccaac 60
ccagggecca tggagtcgag cggtcgcgt tg 92

<210> 8
<211> 88
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..88
<223> /mol_type="DNA"
/note="PCR 引物"
/organism="人工序列"

<400> 8
tgggttgac tccacgtctc ccgccaactt gagaaggcca aaattcaaag tctgtttcac 60

[0006]

cggttcctta ctctttaaac ttctttgc	88
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> source <222> 1..20 <223> /mol_type="DNA" /note="PCR 引物" /organism="人工序列"	
<400> 9 gaggagtgtg gcccggtgt	20
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> source <222> 1..20 <223> /mol_type="DNA" /note="PCR 引物" /organism="人工序列"	
<400> 10 tgacaggtgg tggcaatgcc	20
<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> source <222> 1..22 <223> /mol_type="DNA" /note="PCR 引物" /organism="人工序列"	
<400> 11 tctccattcc ctatgttcat gc	22
<210> 12 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> source <222> 1..22 <223> /mol_type="DNA" /note="PCR 引物" /organism="人工序列"	
<400> 12 gttcccgag aatggtgagg tg	22

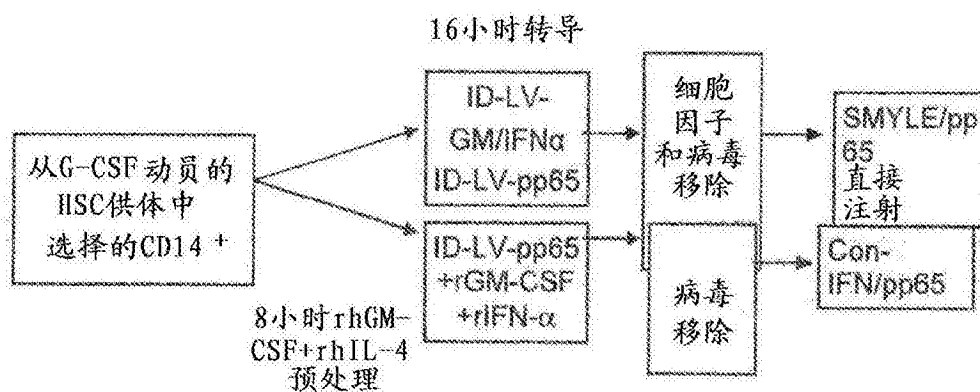


图 1A

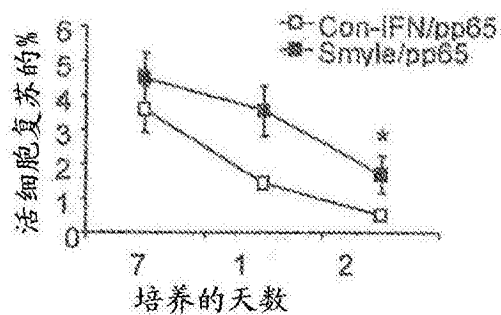


图 1B

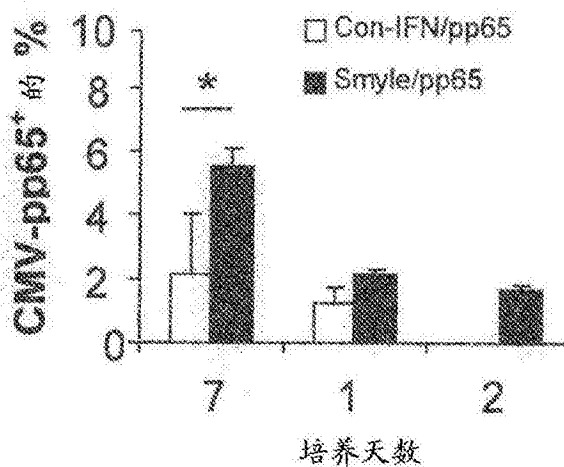


图 1C

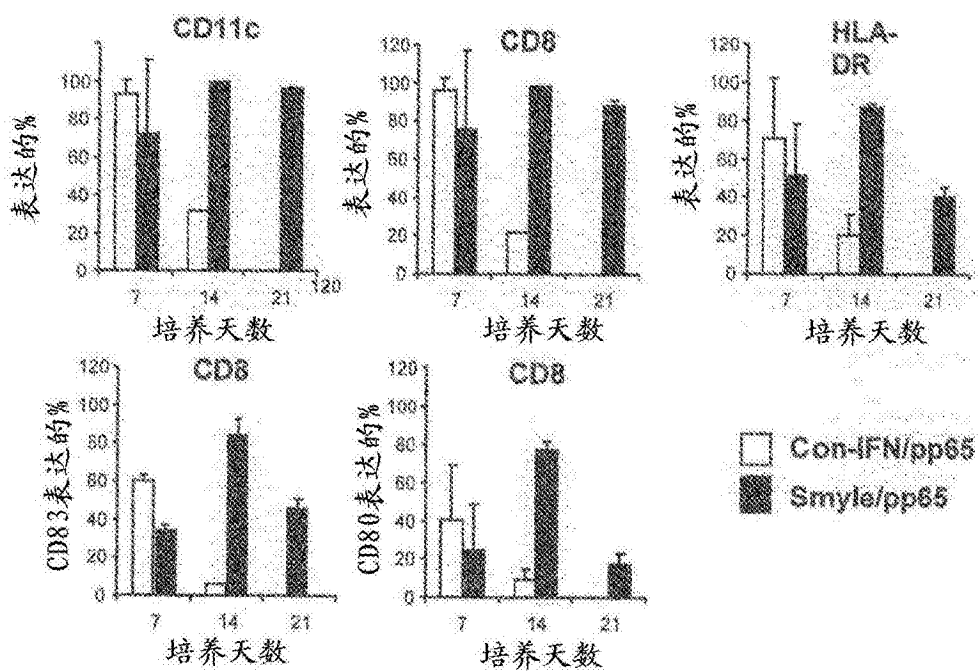


图 1D

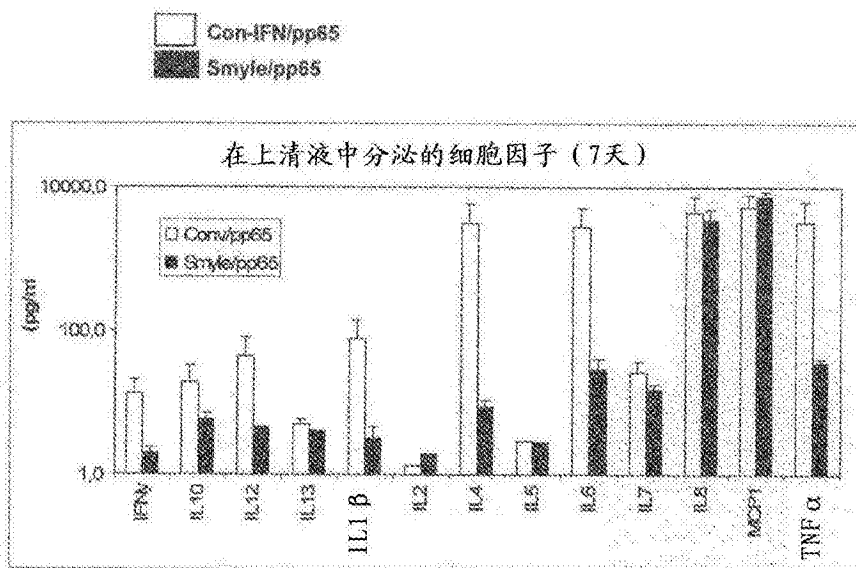


图 2A

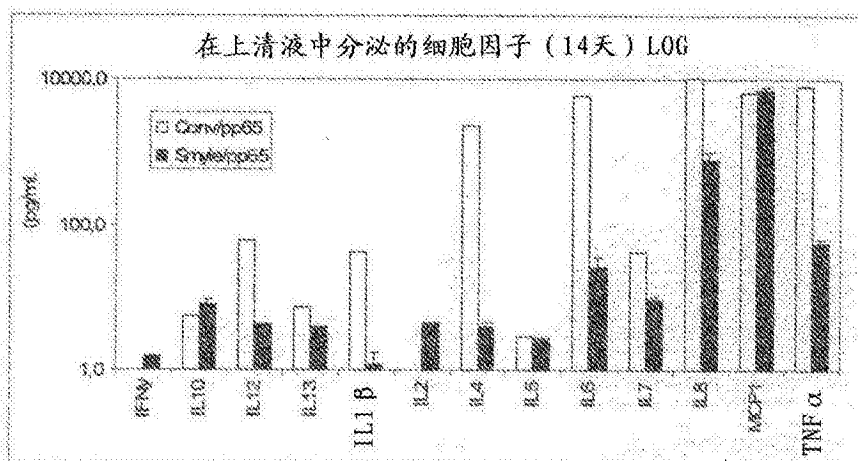


图 2B

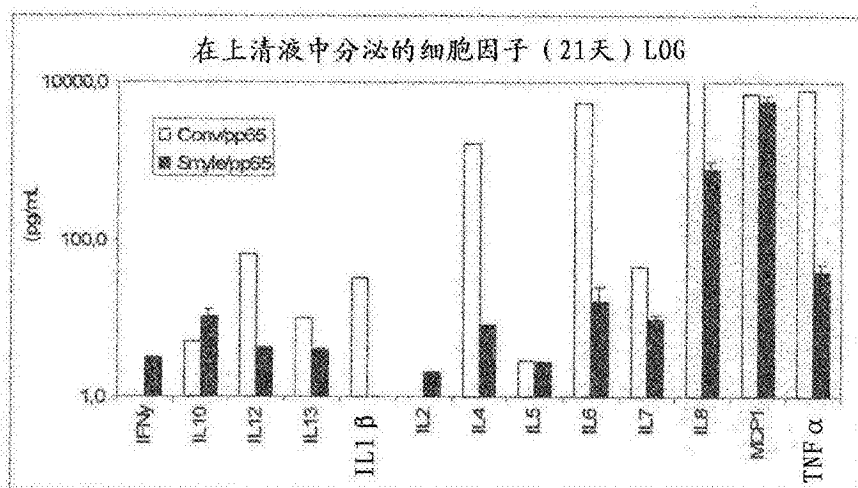


图 2C

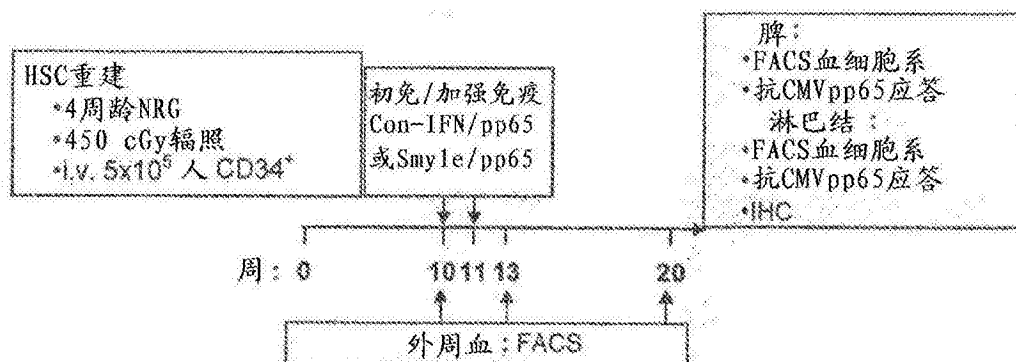


图 3A

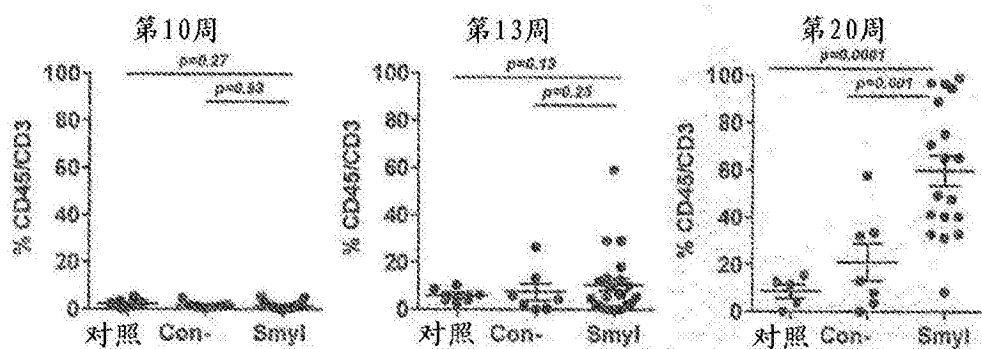


图 3B

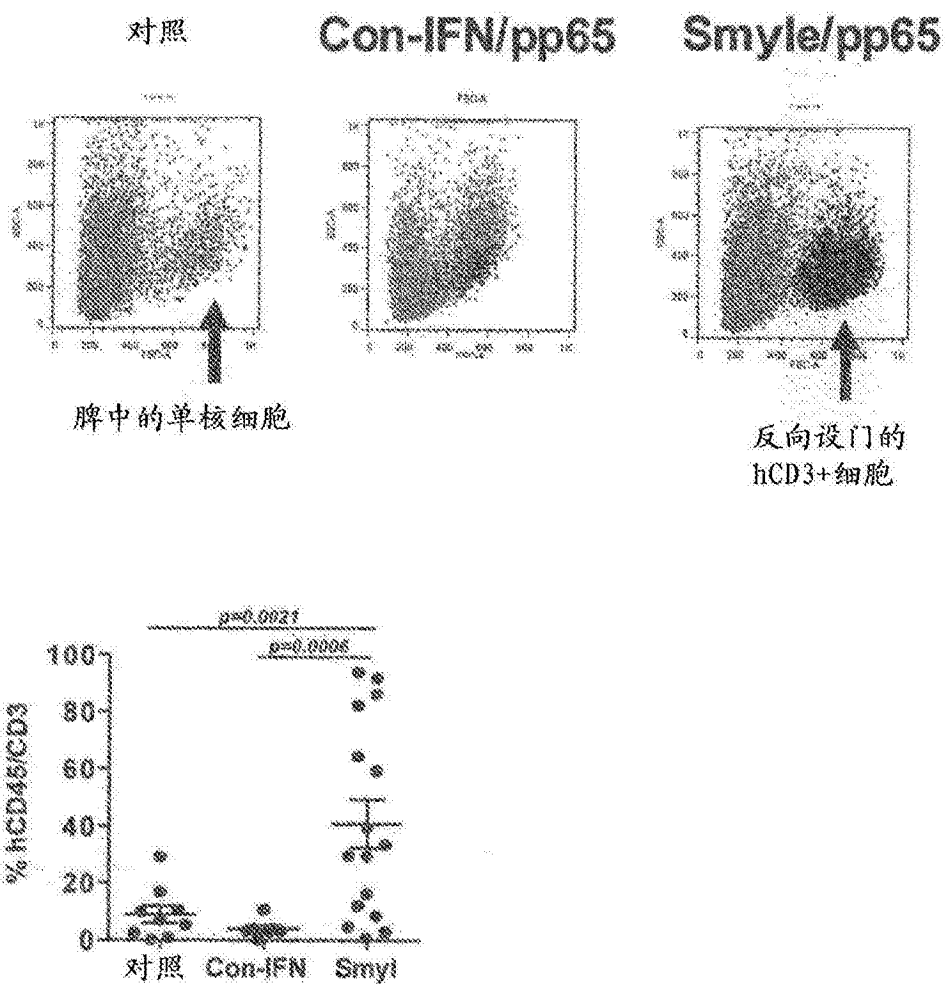


图 4A

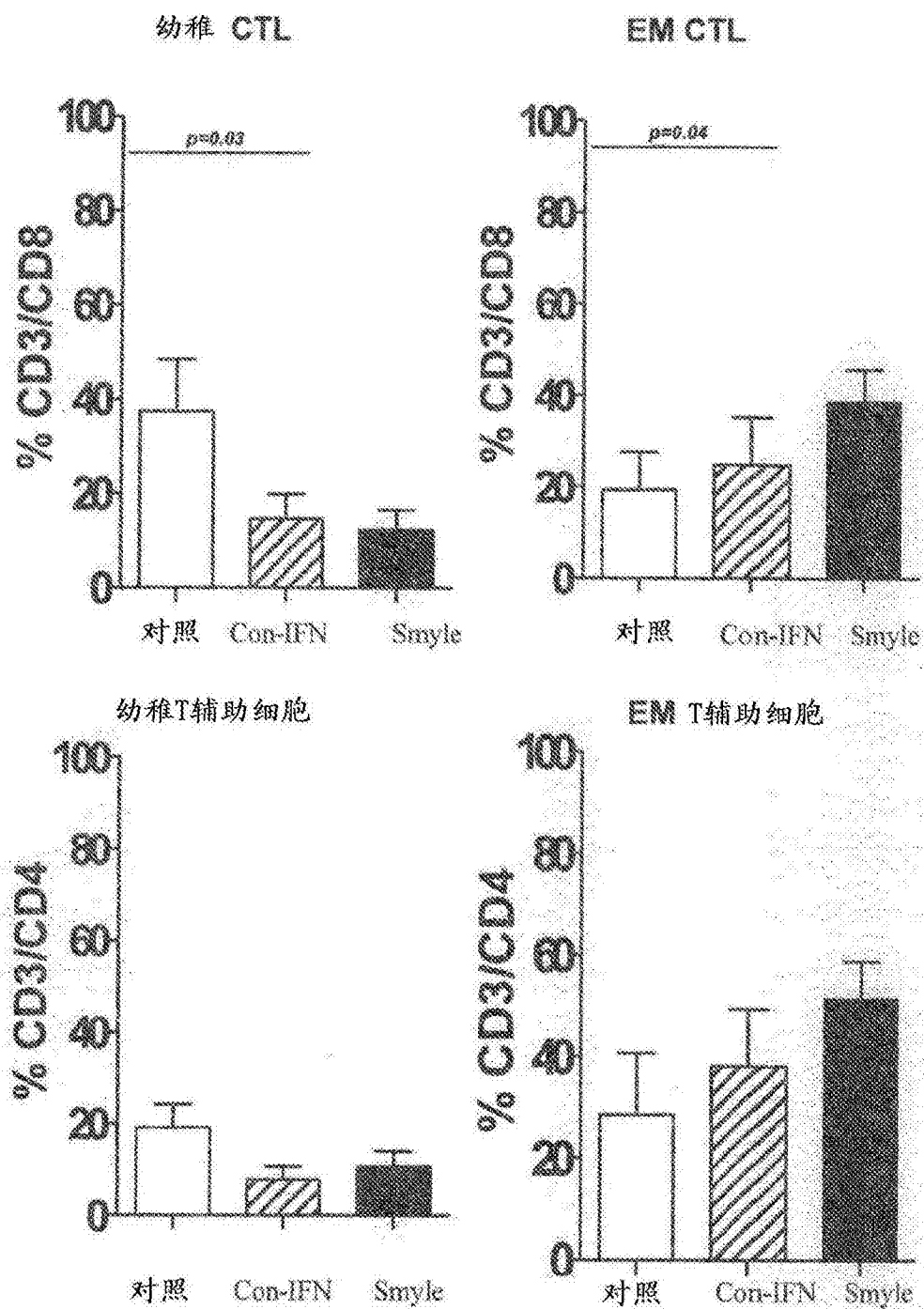


图 4B

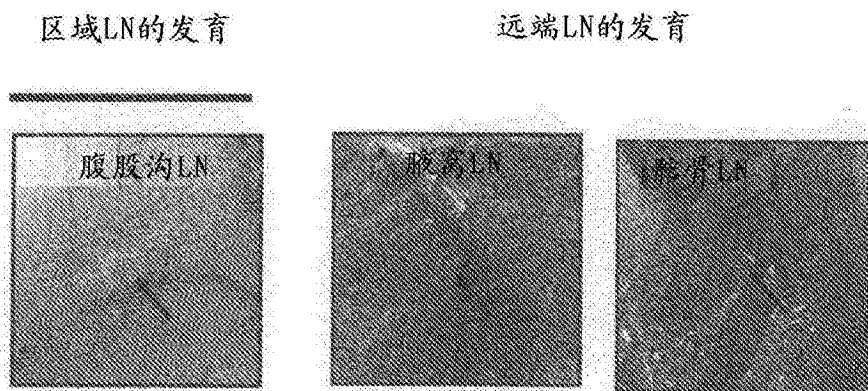


图 5A

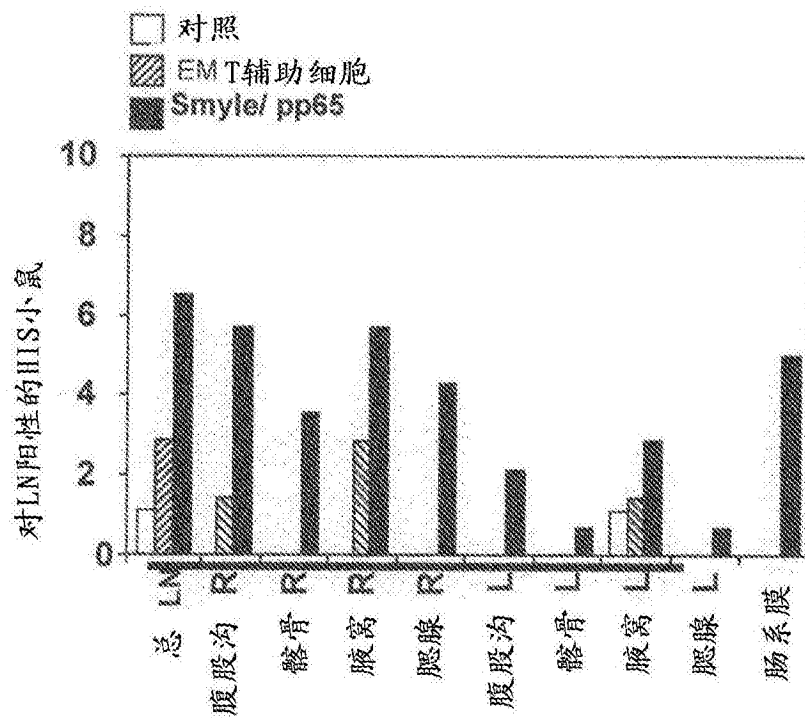


图 5B

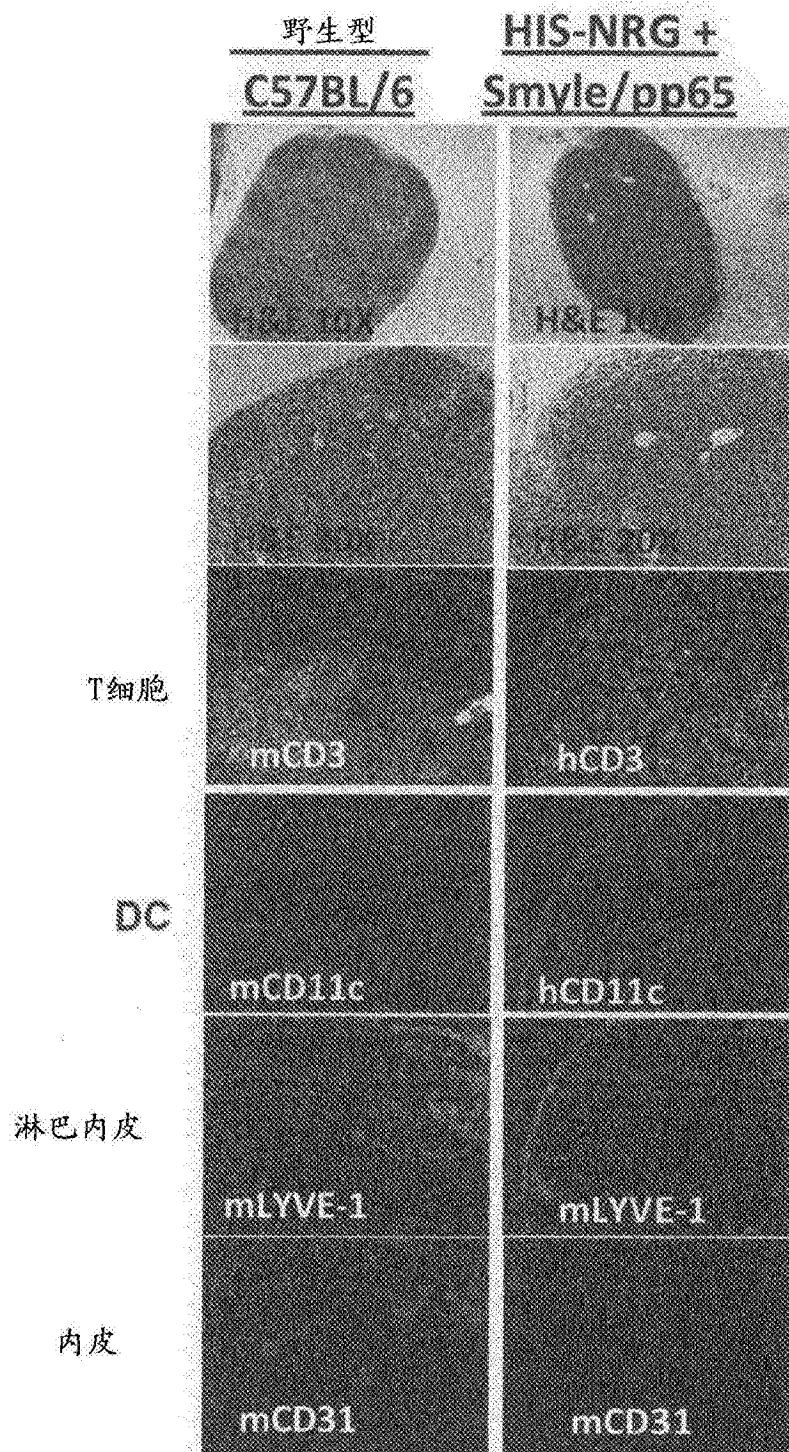


图 6

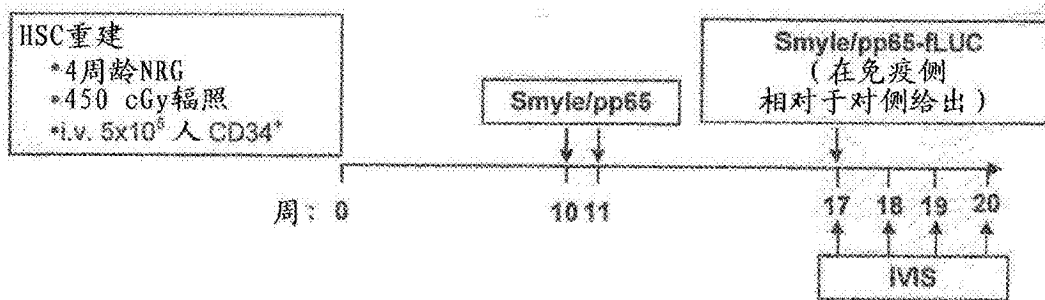


图 7A

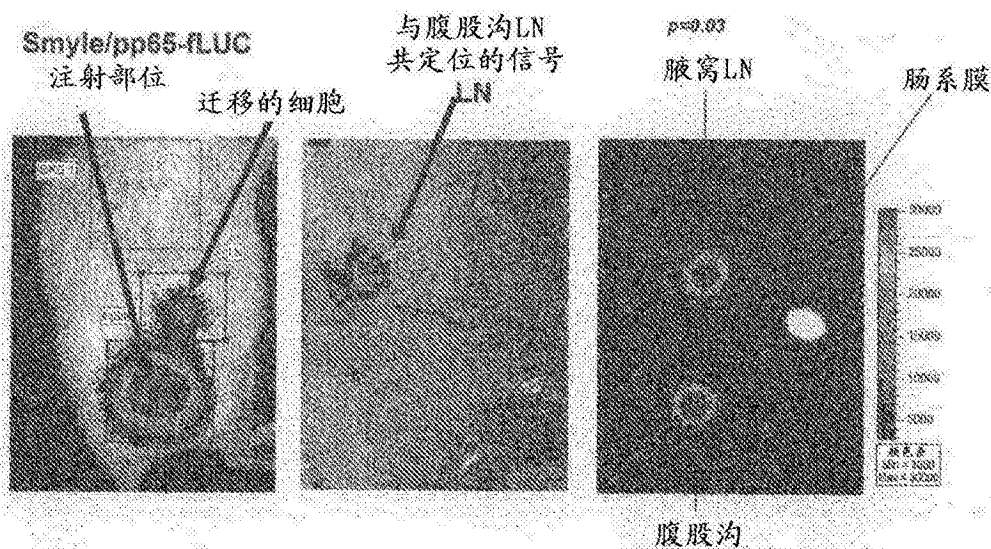


图 7B

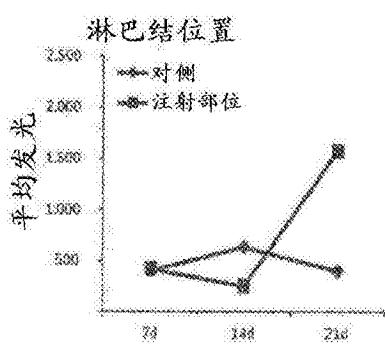


图 7C

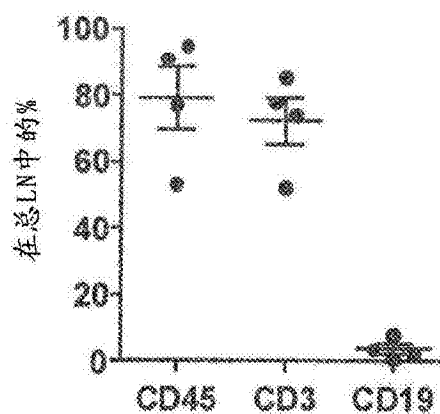


图 8A

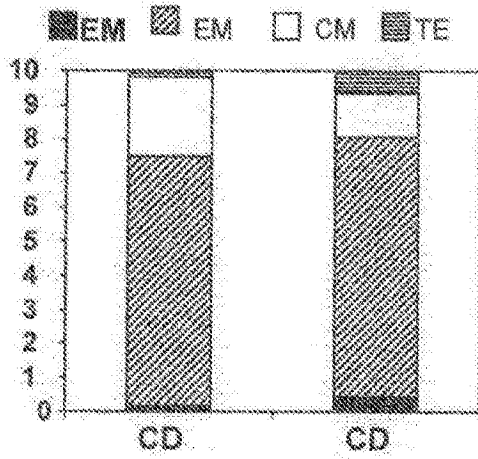


图 8B

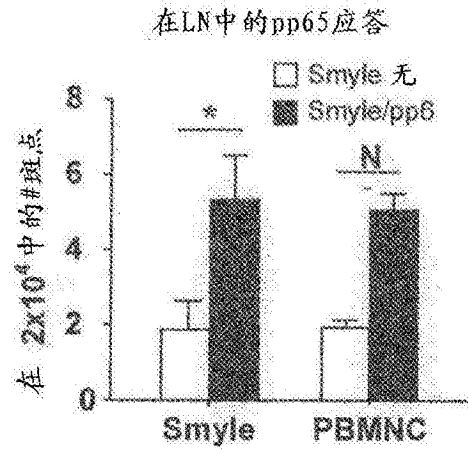


图 8C

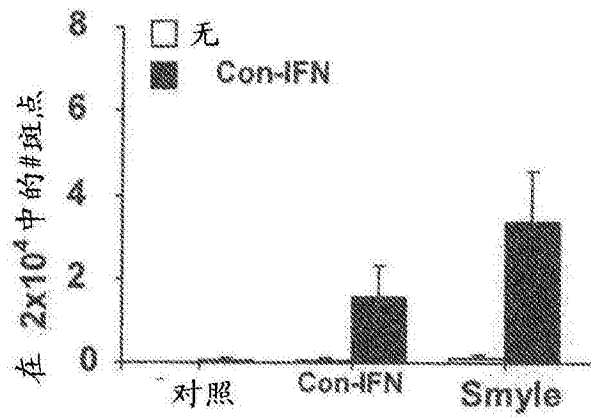


图 8D

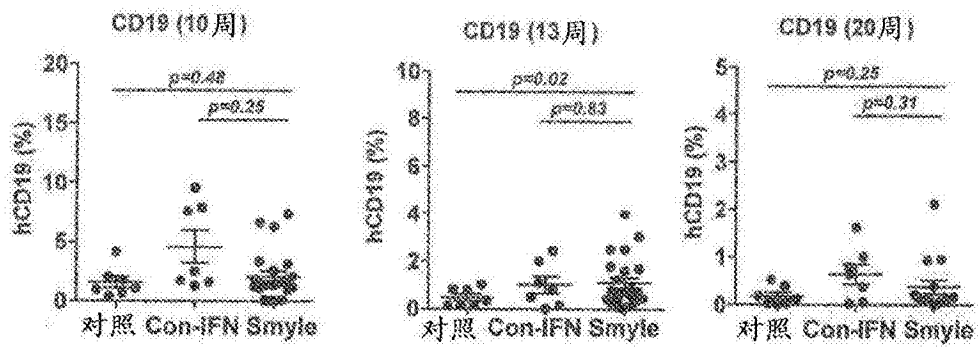


图 9A

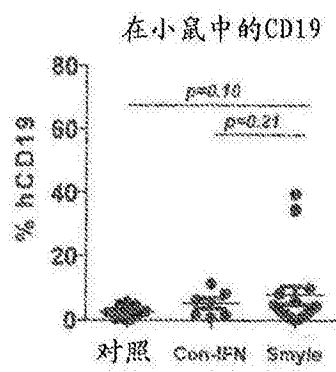


图 9B

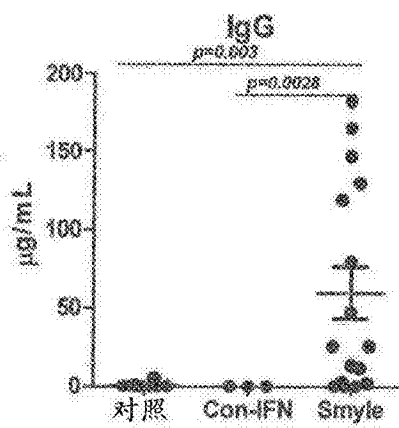
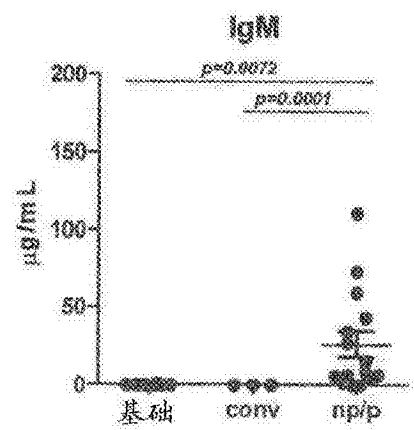
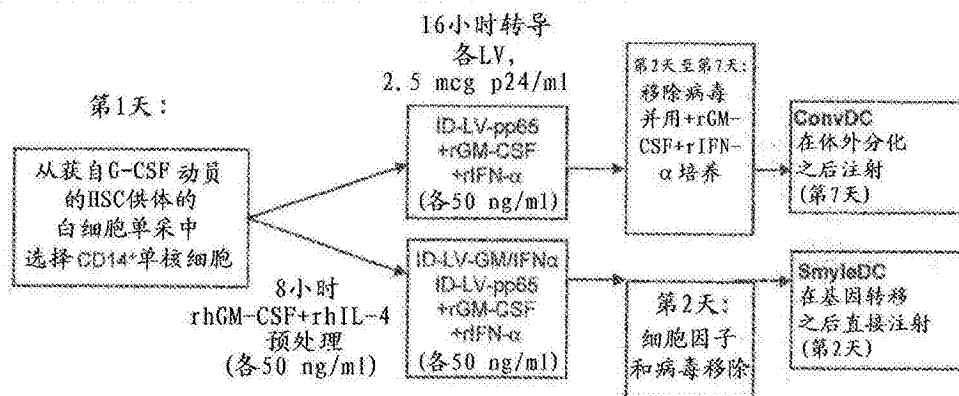


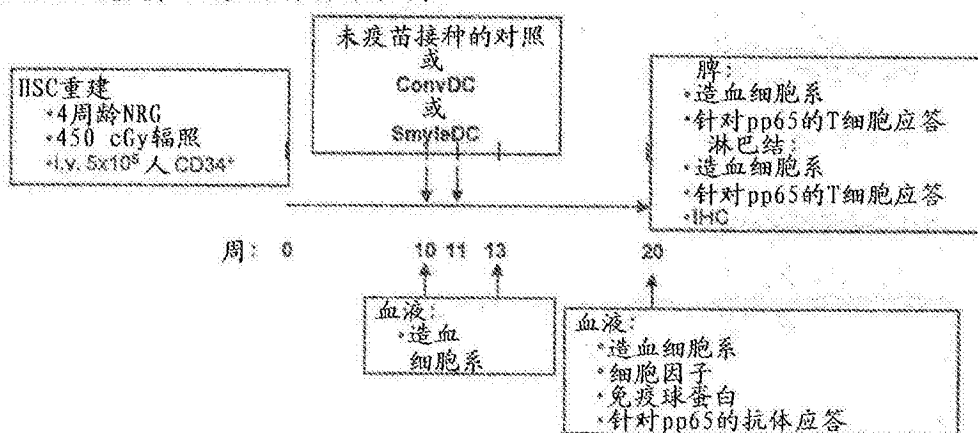
图 9C



a) 从用于疫苗接种的G-CSF动员的PBL中产生ConvDC和SmyleDC



b) 人HCT、免疫和小鼠组织分析的时间表



c) 在体外再刺激之后针对pp65的T细胞应答的分析

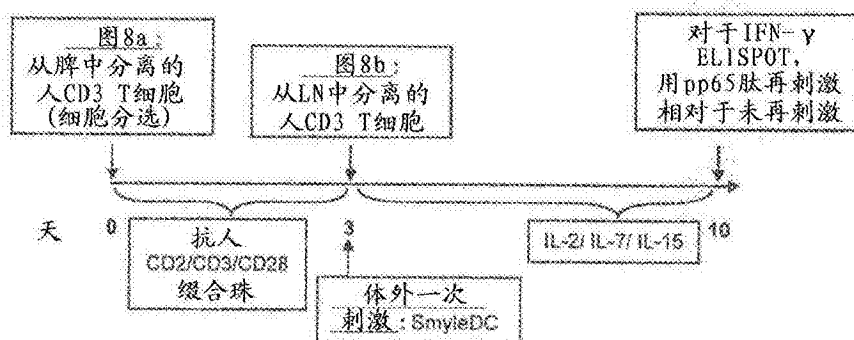


图 10

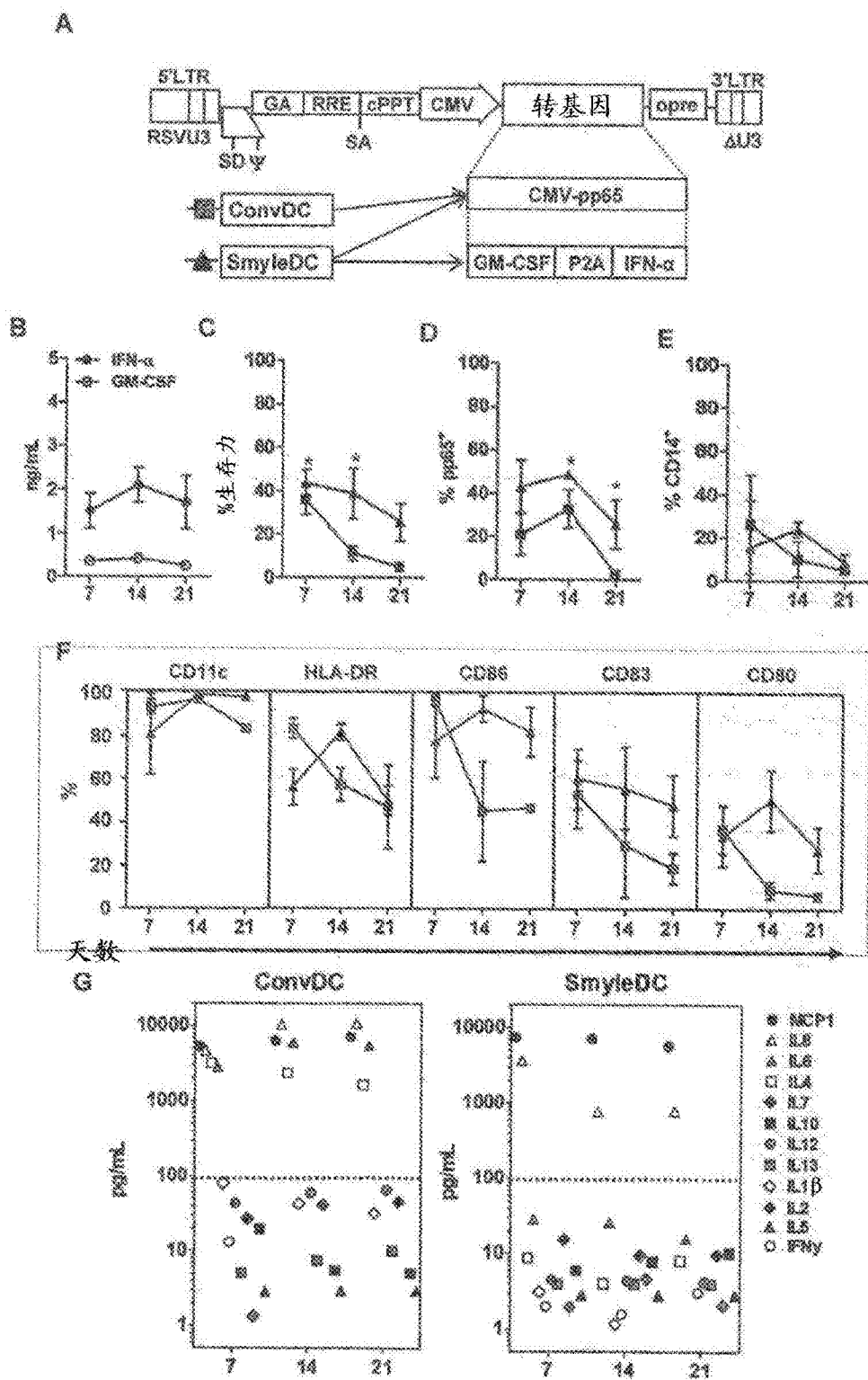


图 11

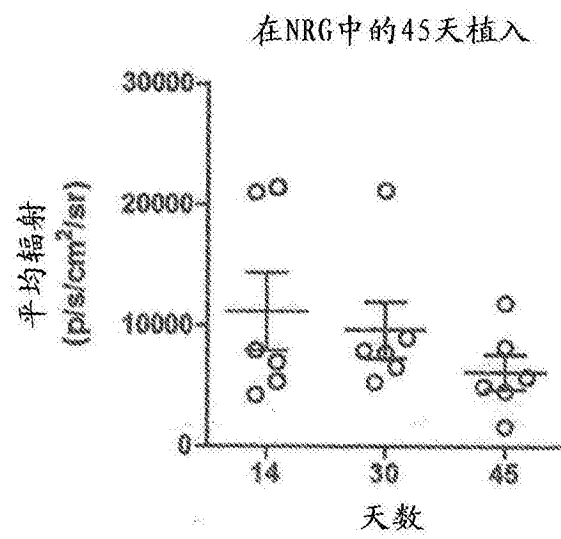


图 12

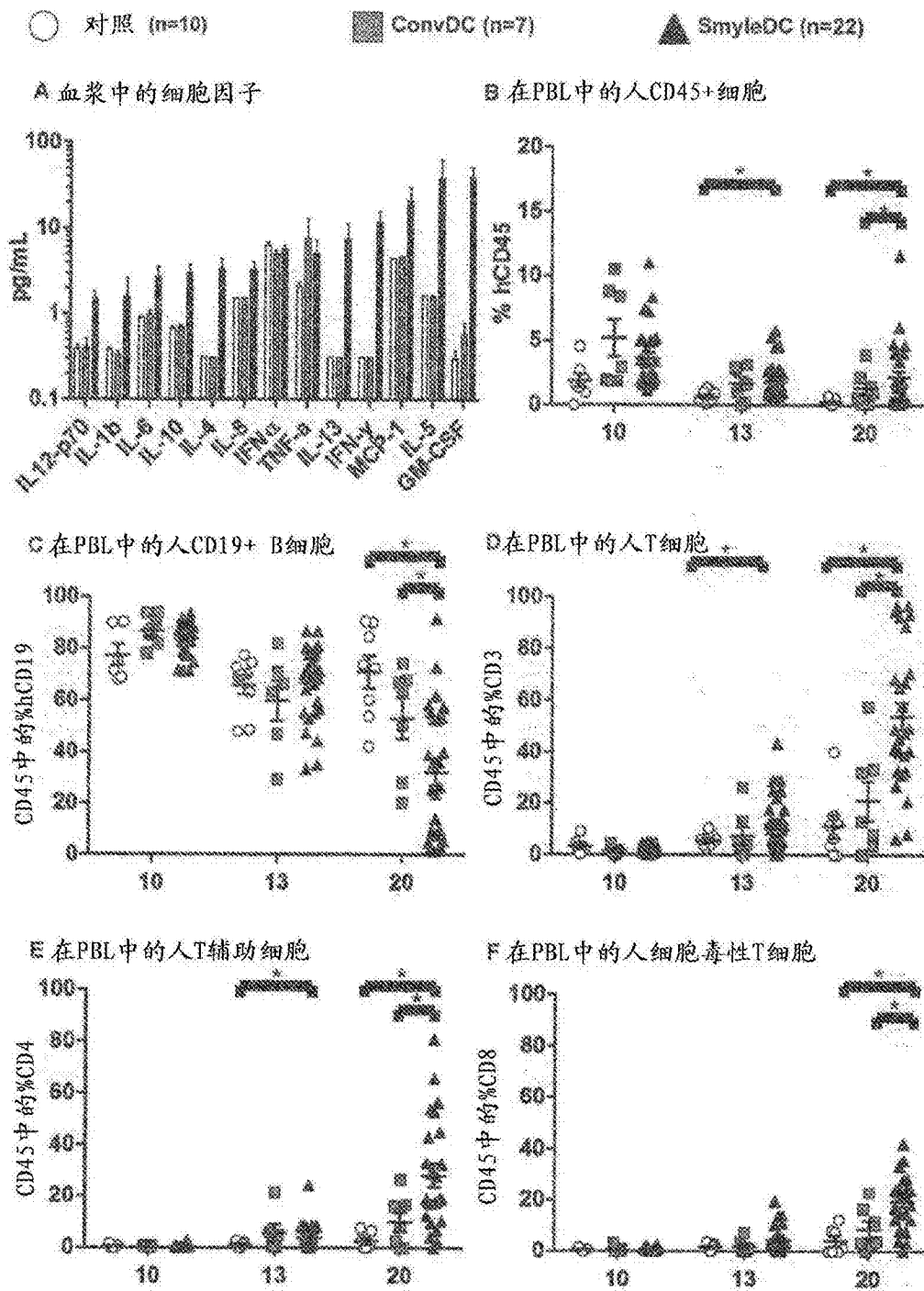


图 13

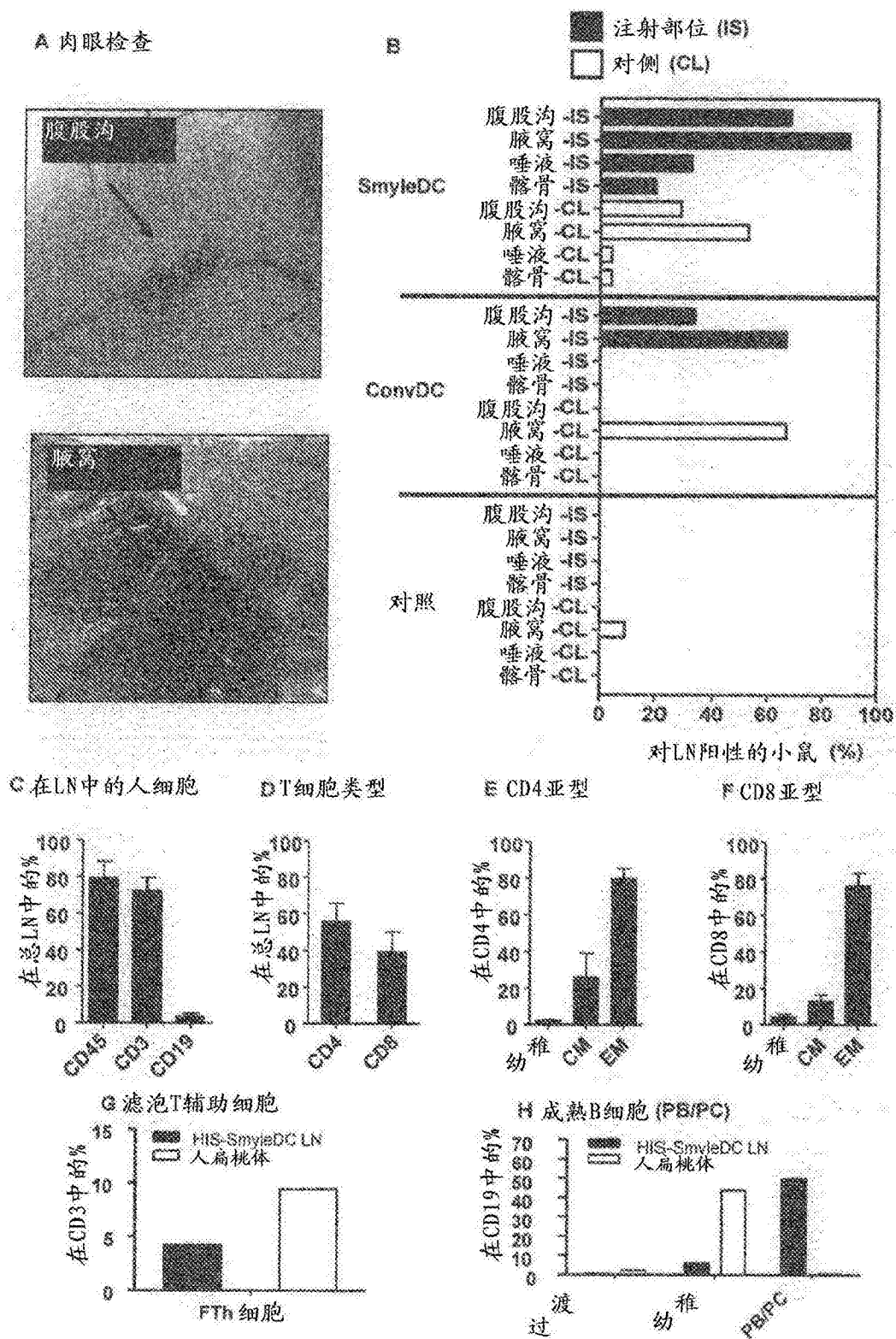


图 14

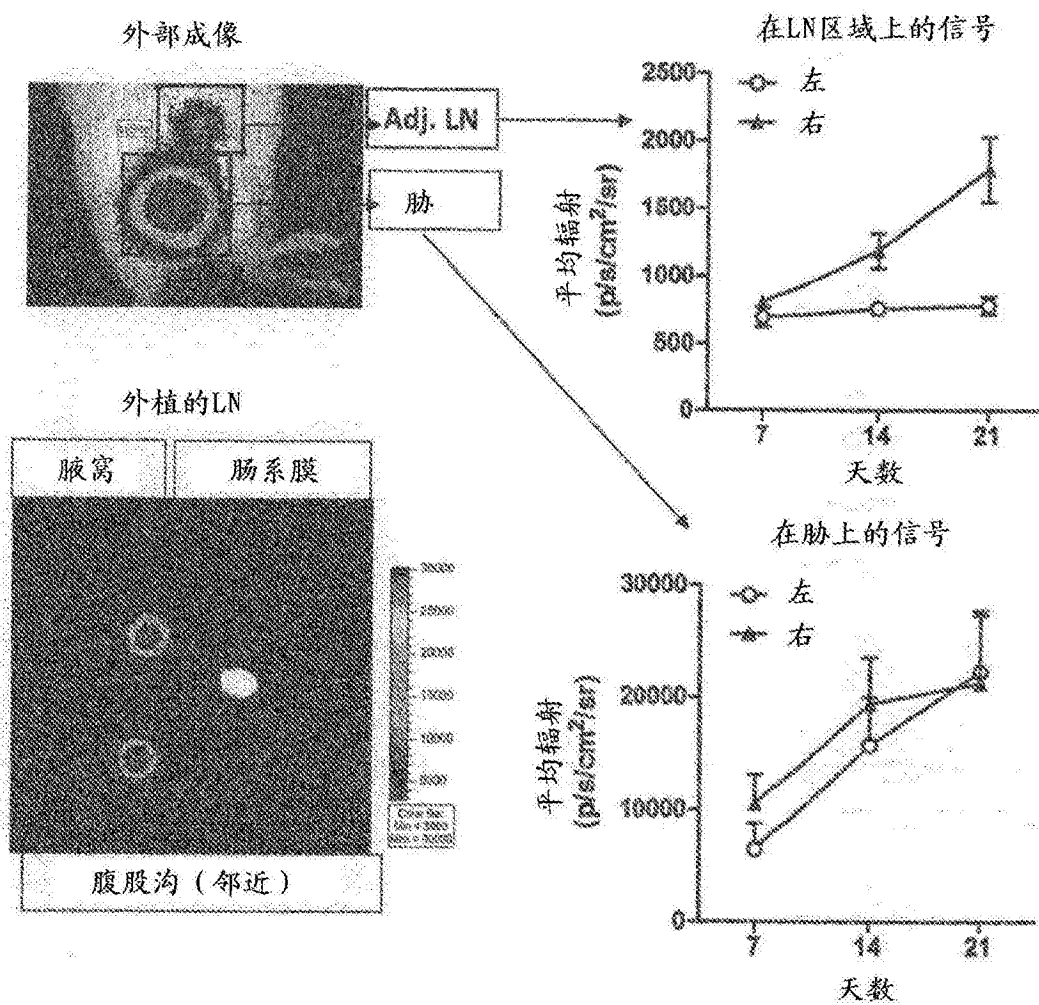


图 15

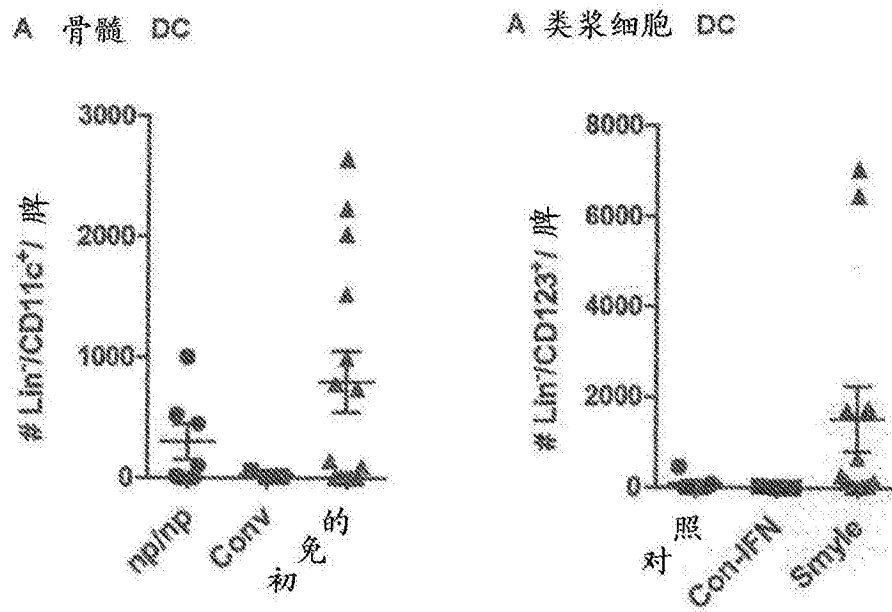


图 16

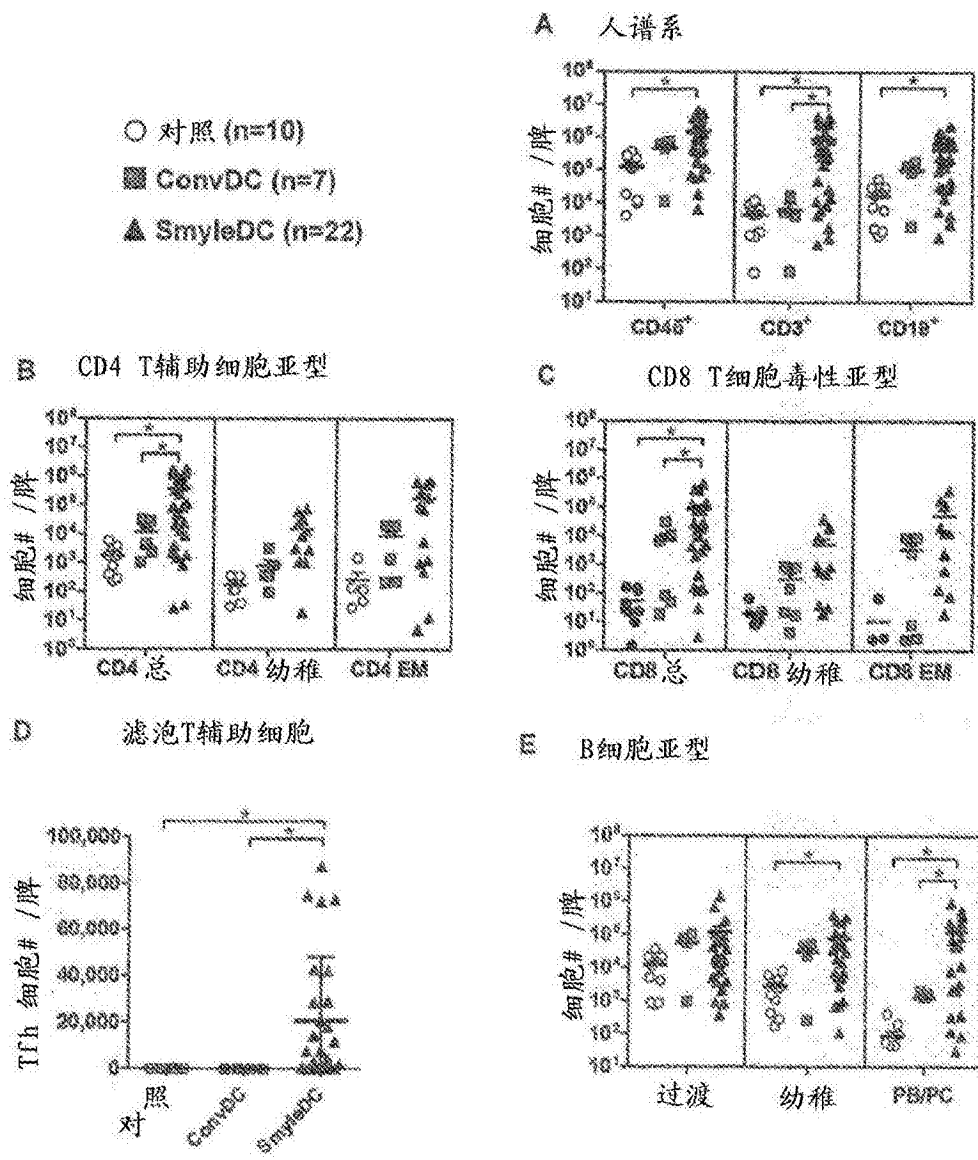


图 17

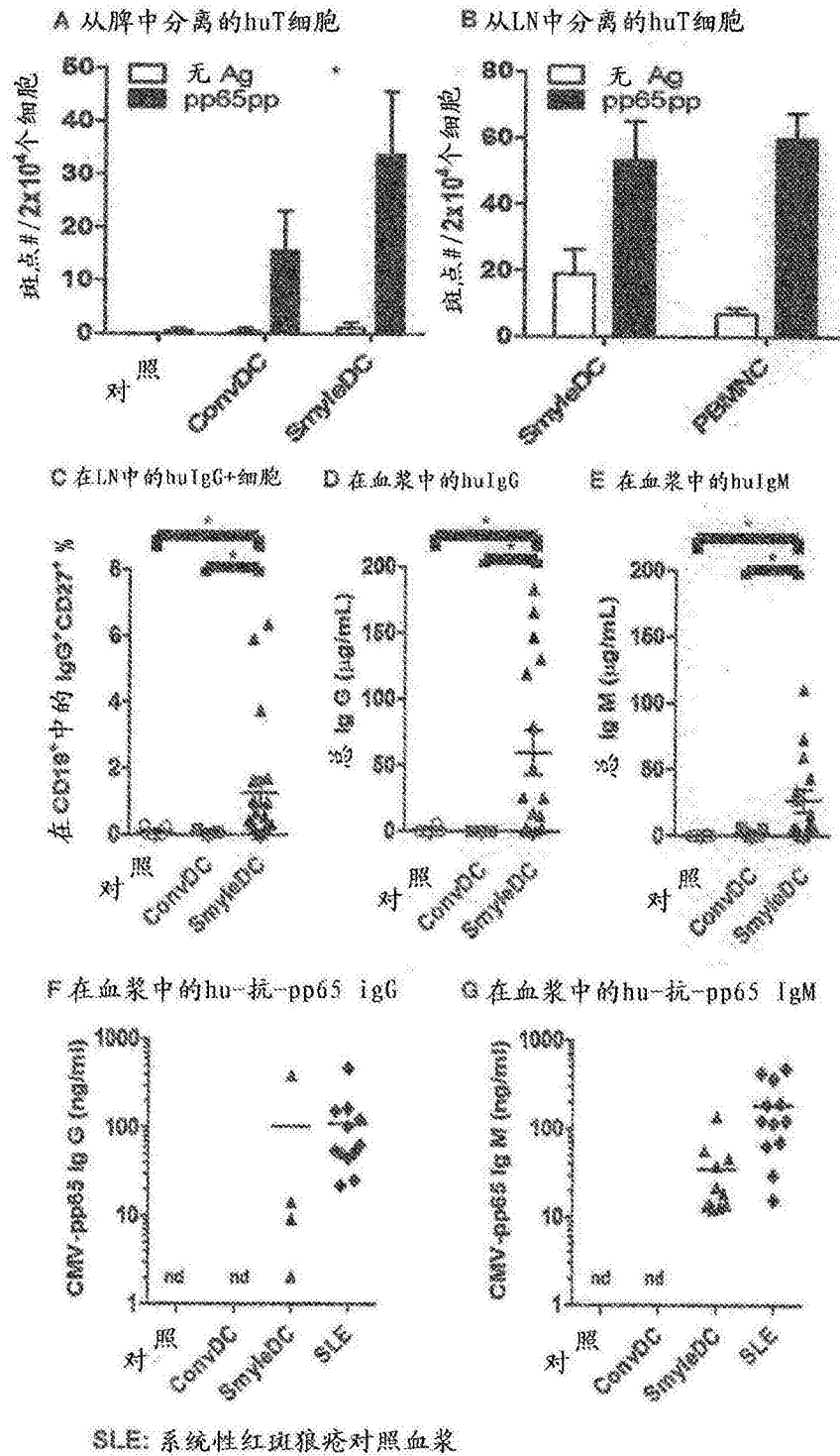
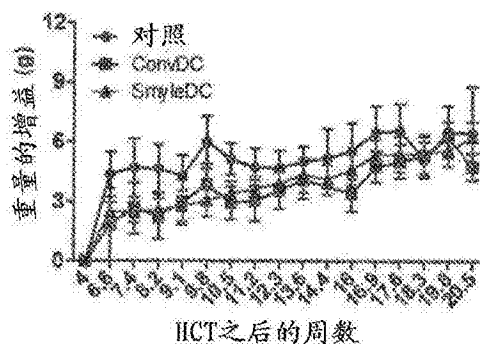
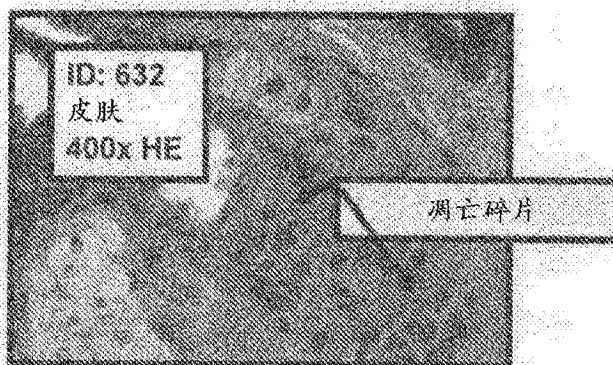


图 18

a) 在对照 (n=3) 和用 ConvDC (n=3) 免疫的 NRG 小鼠或 SmyleDC (n=8) NRG 小鼠的组中的体重监测。



b) 皮肤的组织学分析示出用 SmyleDC 免疫的 4 只小鼠中的 2 只为轻度 1 级 GVHD。可以看到一些凋亡碎片，但是淋巴细胞的局灶和少量浸润表明没有炎症。



c) 肠的组织学分析示出用 SmyleDC 免疫的 4 只小鼠中的 3 只为轻度 1 级 GVHD。可以看到一些凋亡碎片，但是淋巴细胞的局灶和少量浸润表明没有炎症。

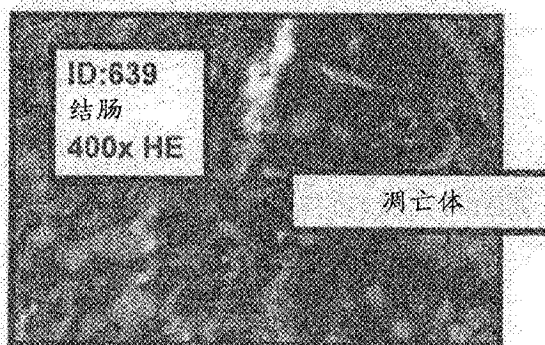
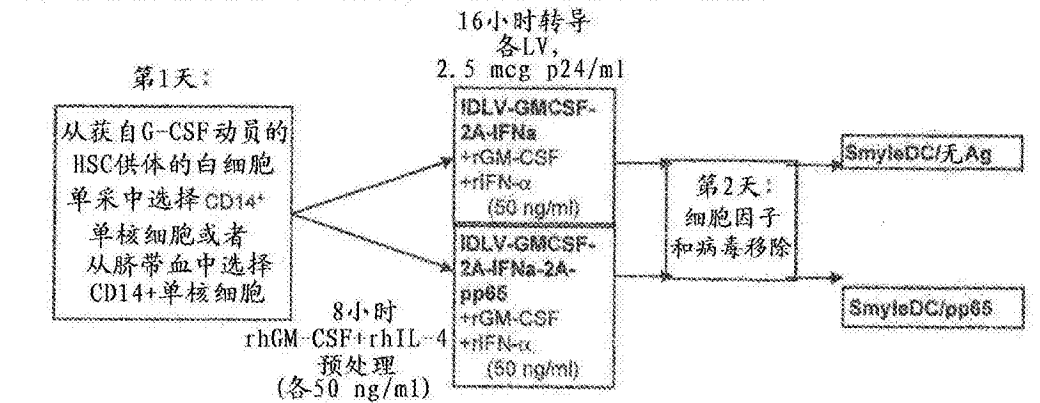
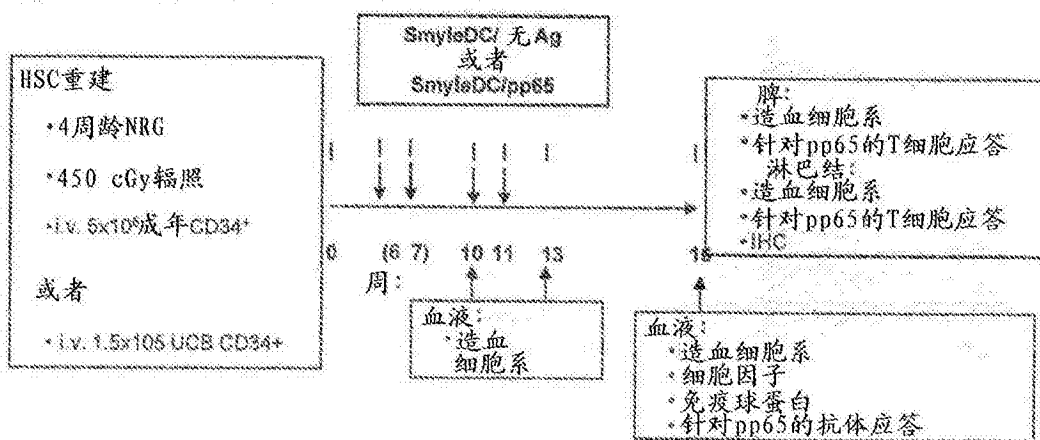


图 19

a) 从用于接种疫苗的G-CSF动员的PBL或脐带血产生SmyleDC/pp65



b) 人HCT、免疫和小鼠组织分析的时间表



c) 在体外再刺激之后针对pp65的T细胞应答的分析

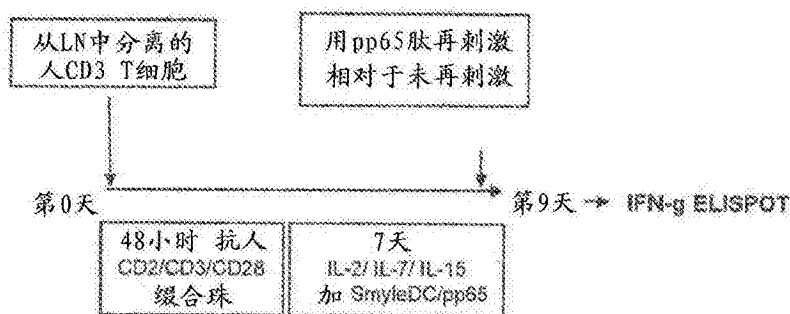


图 20

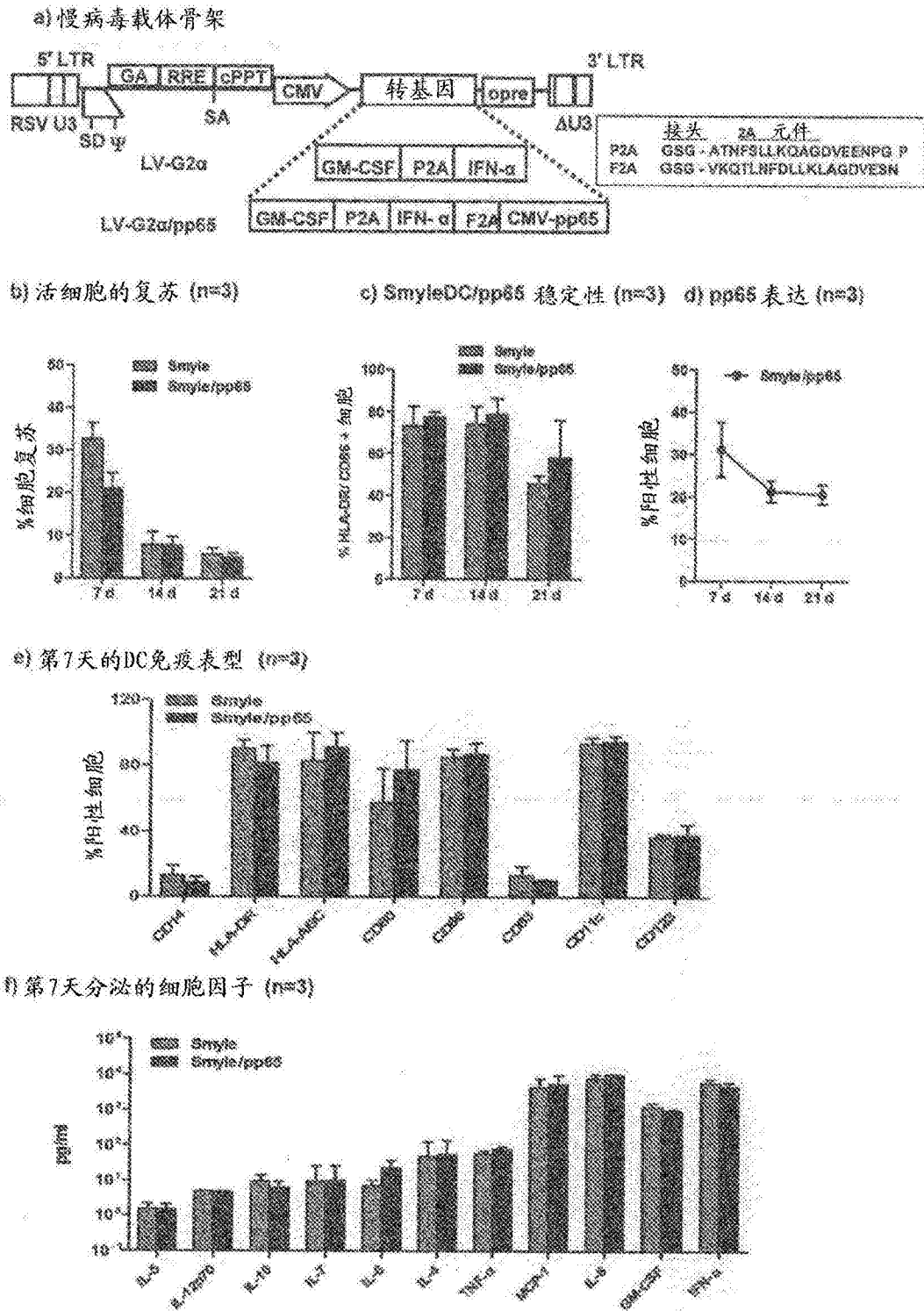
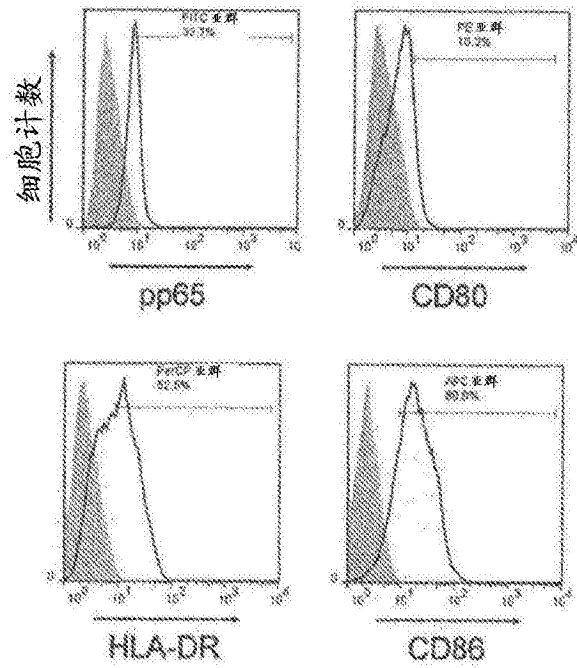


图 21

a) 使用第7天的Smy1eDC/pp65进行的流式细胞术分析的代表性实例



b) 标志物阳性Smy1eDC/pp65的频率 (n=4)

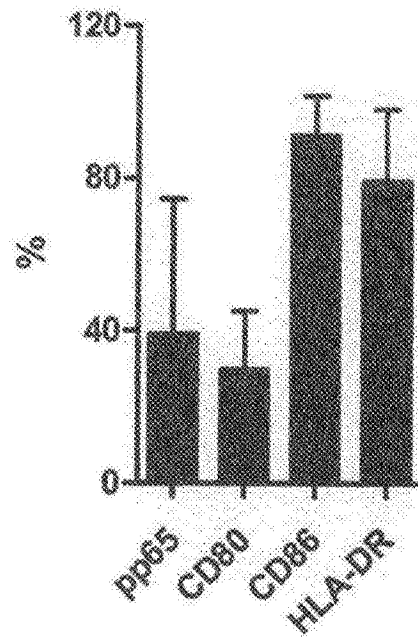
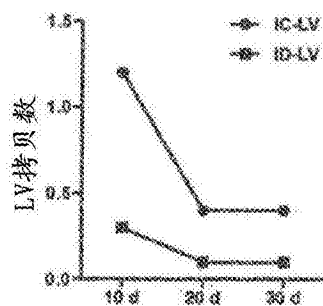
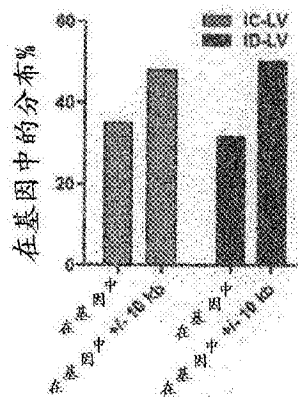


图 22

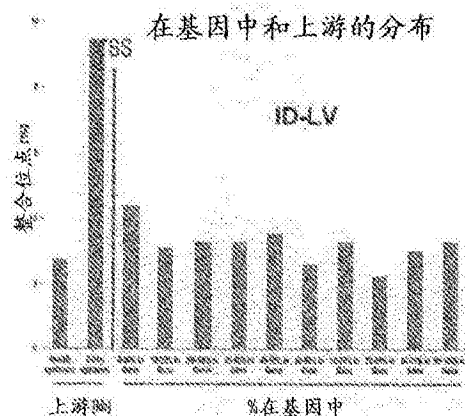
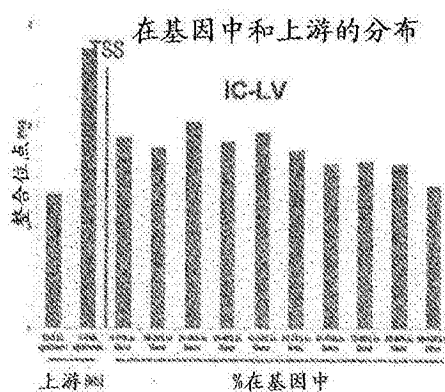
a) 整合的LV拷贝的数目/细胞



b) 整合位点的%

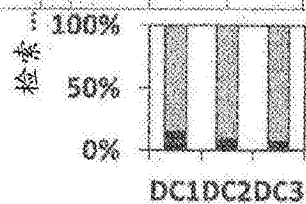


c) 相对于转录起始位点 (TSS) 的整合位点



d) 在10个主要克隆中的整合位点分析

次序	DC1	DC2	DC3
1		BRINP3L4	
2	SLF2		
3	SLF2	LSBP1	FEJ151
4	SLF2	COH6	INCLP
5	DPH1A	THSSE12P	
6		R77N	SP1A1
7	RP15		
8	SLF2	ACR55	SLF2
9		ACR55	FEJ151
10	SLF2	FEJ151	SLF2
所有其他15	1115	252	1427



次序	DC4	DC5	DC6
1			ALJ505
2	2NF3CA	ITGAS	
3	1P12	RF2	SYNCRP
4		POU3F3	PTGFR15
5	SLF2		2NF3CA
6		STAG2L4	650H3
7	10NF	PTNC	LYRA2
8	DC3	CDKL5	BOOSAP1
9	ND84	LPXK2	UCR2P1
10	01NF32	65A5	PRK3
所有其他15	426	562	402

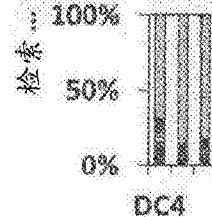
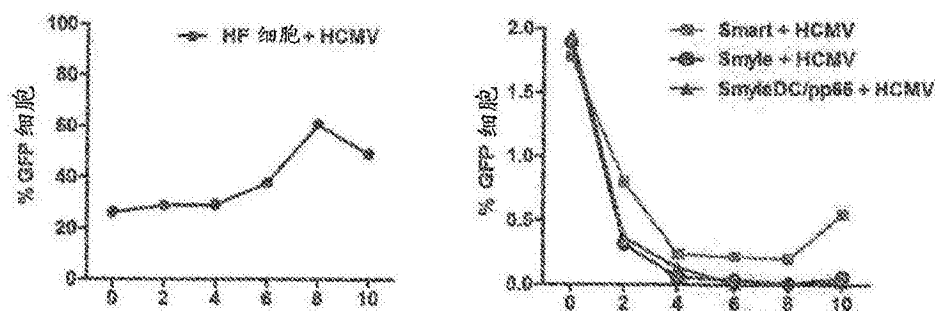
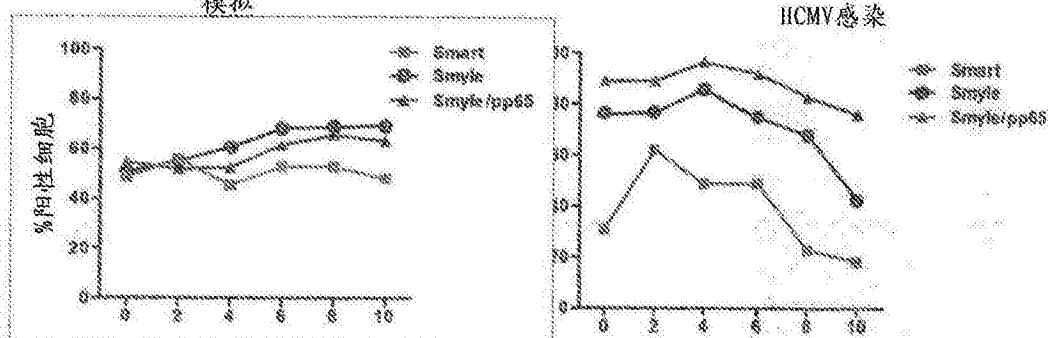


图 23

a) HCMV/GFP感染的细胞的流式细胞术分析 (第0天至第10天)

b) CD80表达—模拟相对于HCMV感染
模拟

c) 在细胞上清液中的HCMV检测

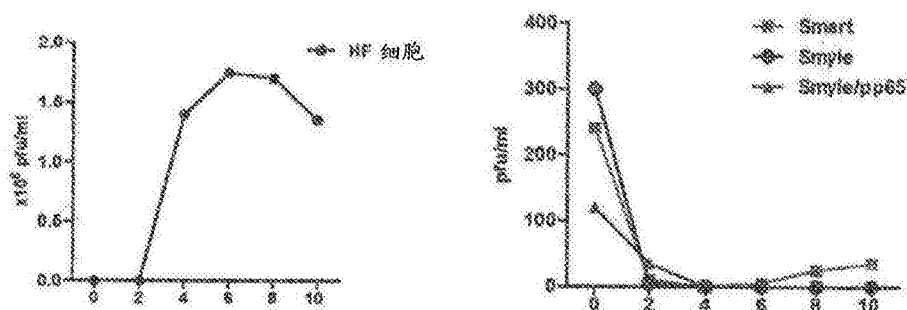
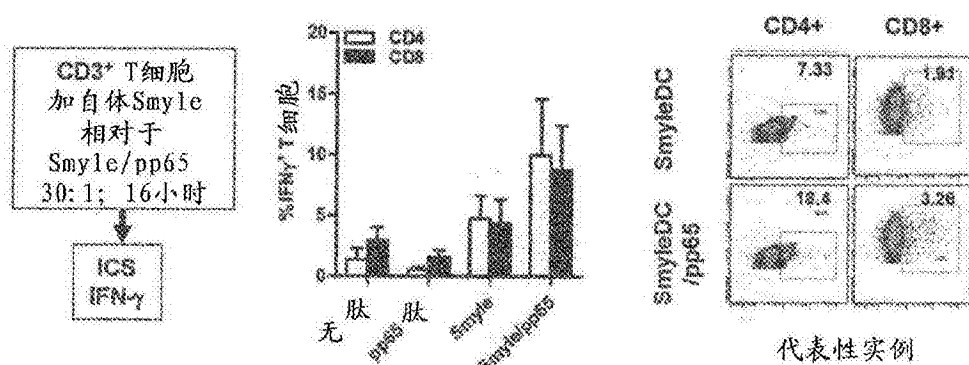
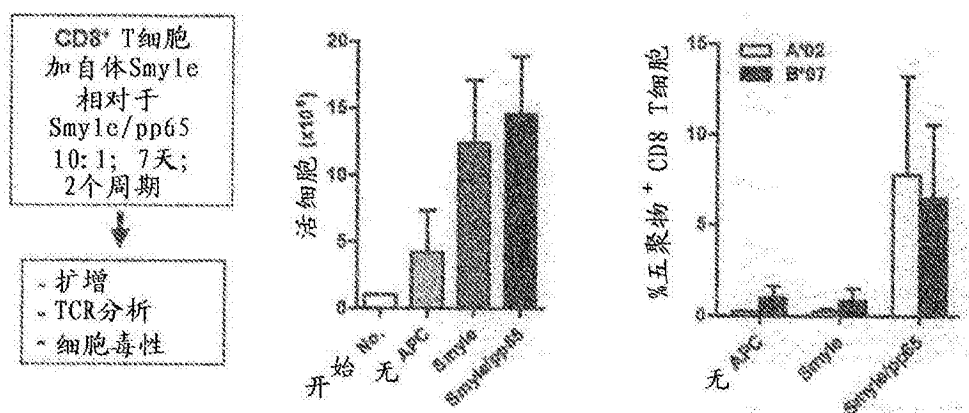


图 24

a) 短刺激和IFN γ -ICS (n=3)

b) 对CD8 T细胞扩增的长刺激



c) CD8 T细胞细胞毒性活性

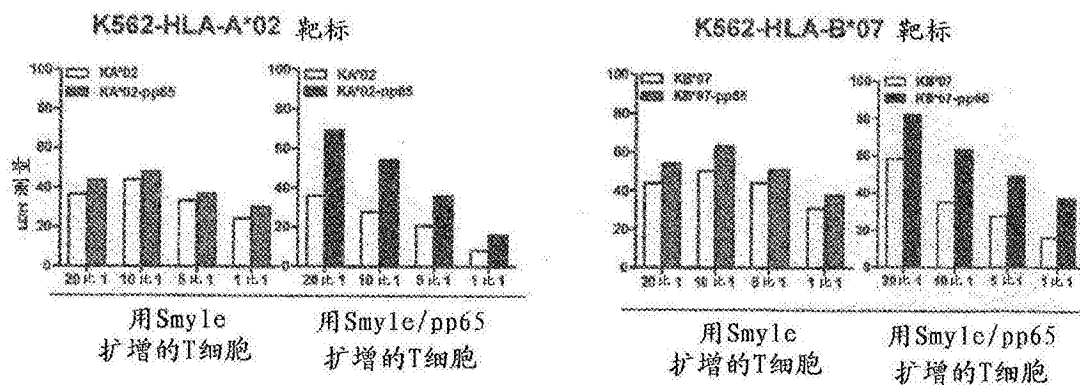
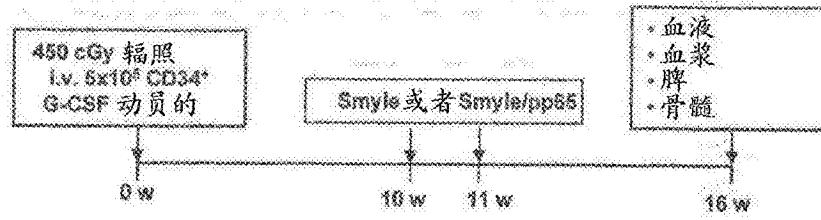
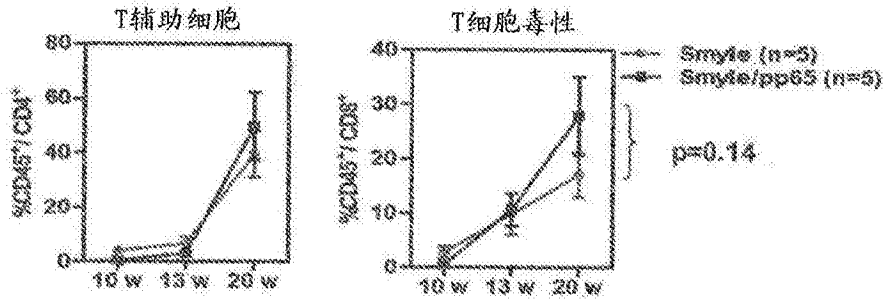


图 25

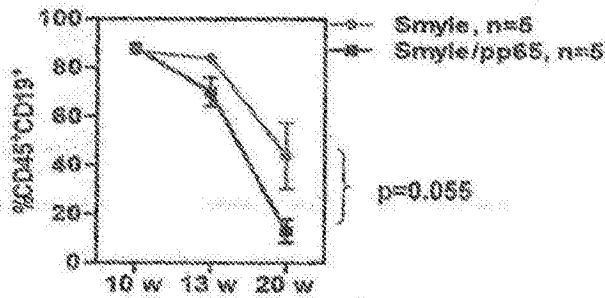
a) 用G-CSF动员的干细胞移植NRG小鼠的实验流程图



b) 在PBL中的人T淋巴细胞扩增的动力学



c) 在PBL中的人B细胞扩增的动力学



d) 在脾中的人淋巴细胞的T细胞亚群

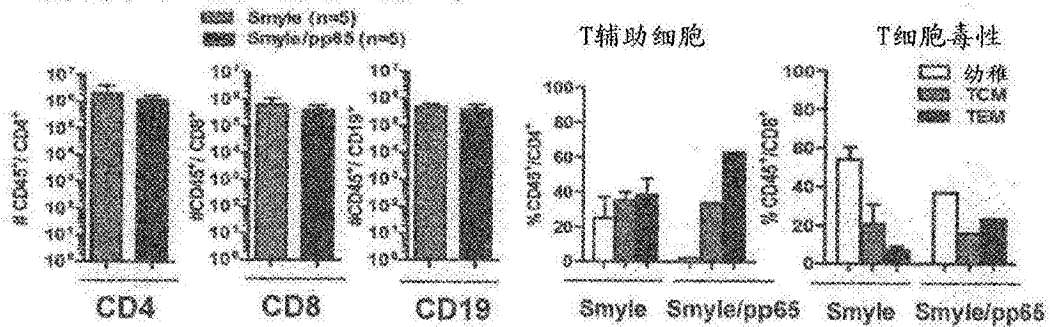


图 26

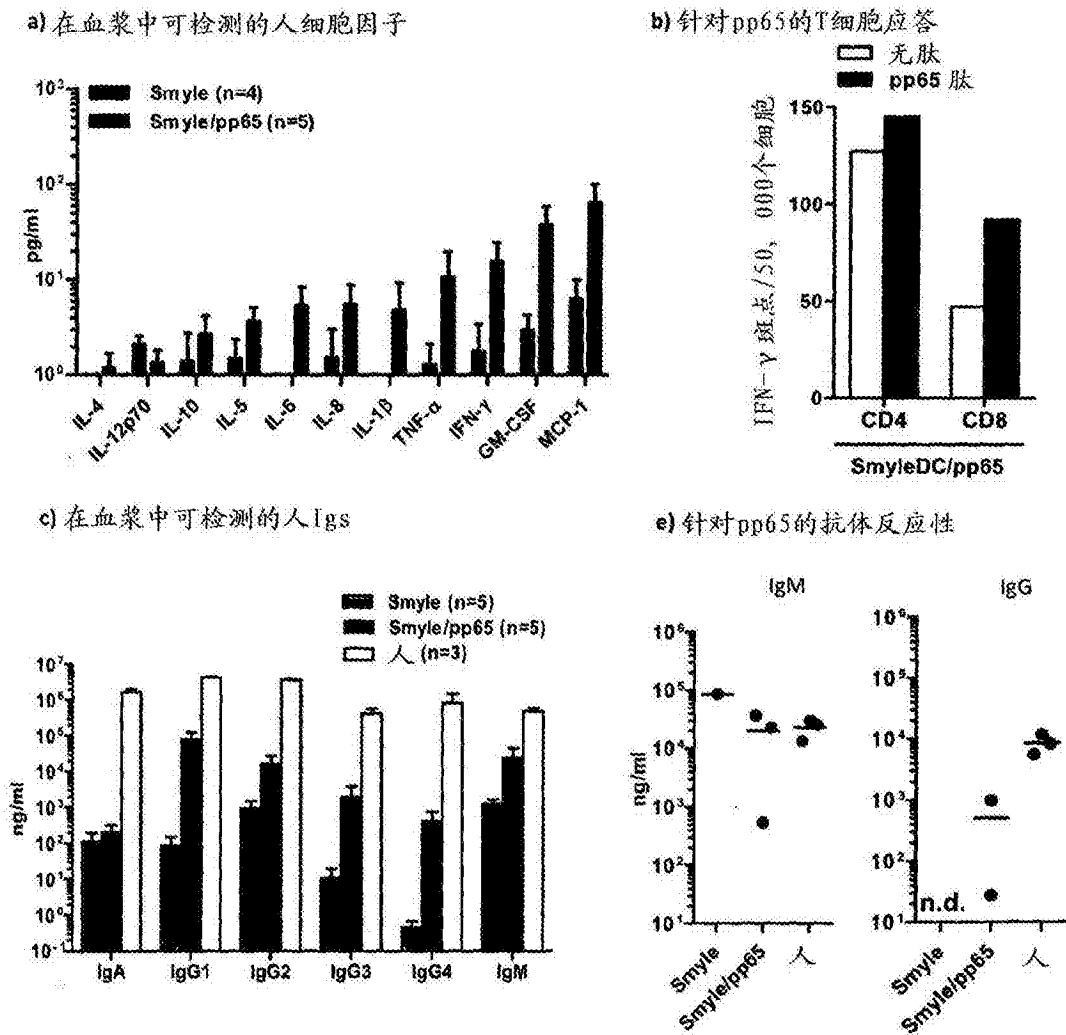
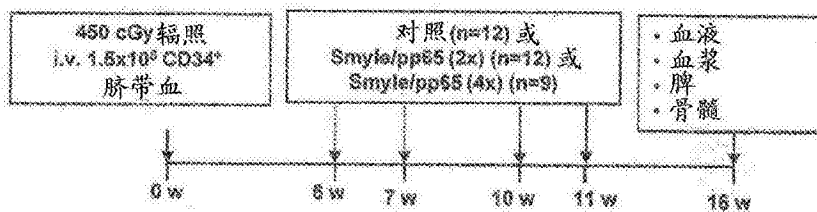
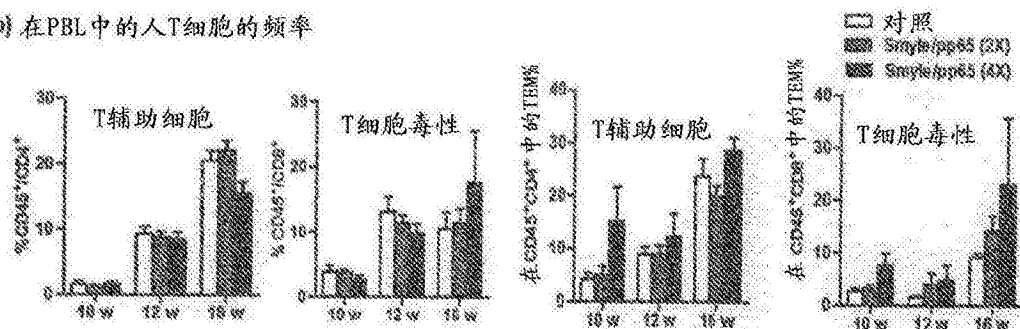


图 27

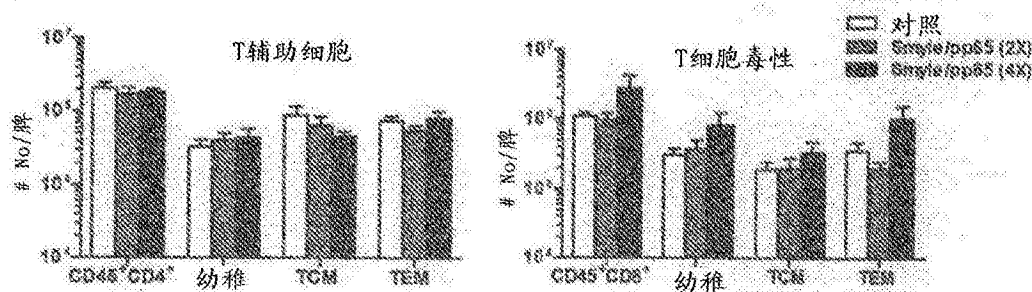
a) 实验流程图



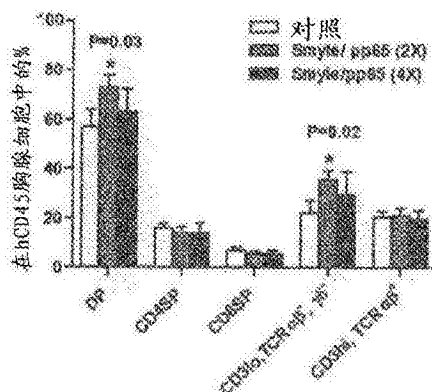
b) 在PBL中的人T细胞的频率



c) 在脾中的人T细胞总数



d) 胸腺分析



e) 在血液中的Tregs的频率

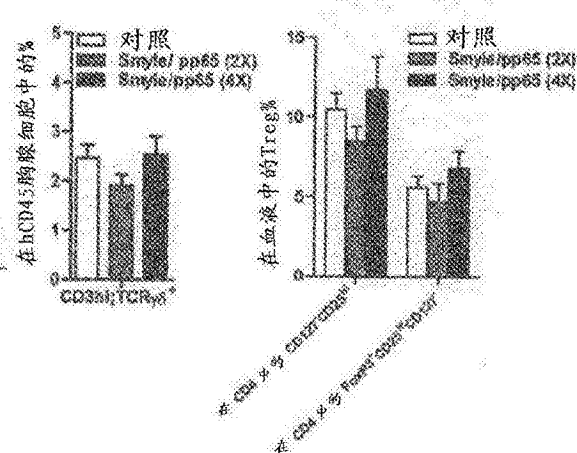
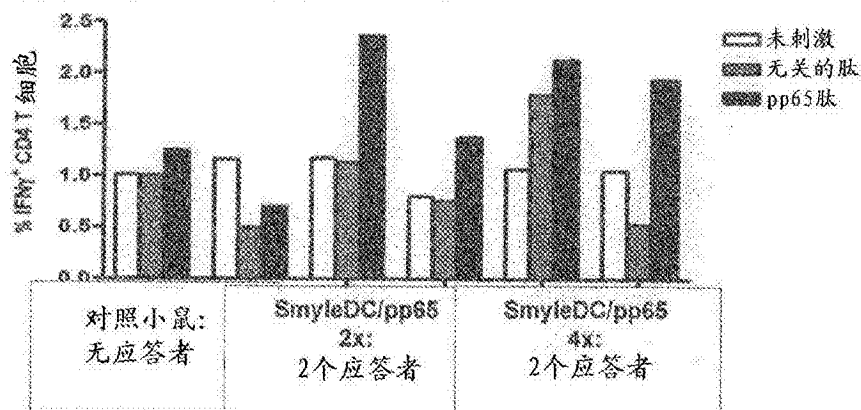
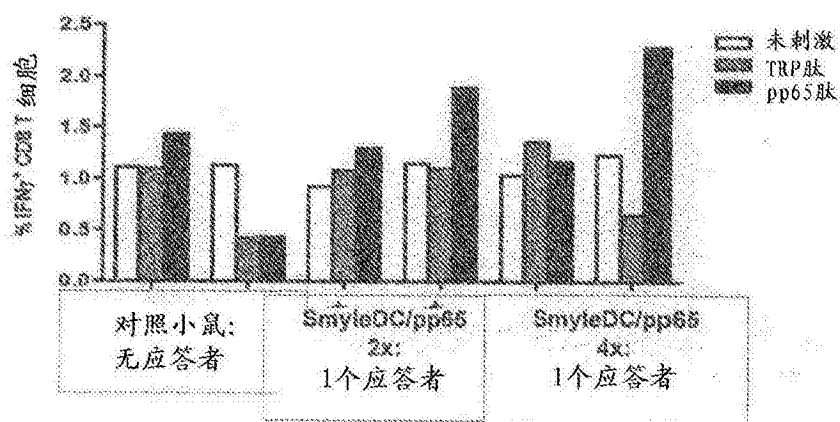


图 28

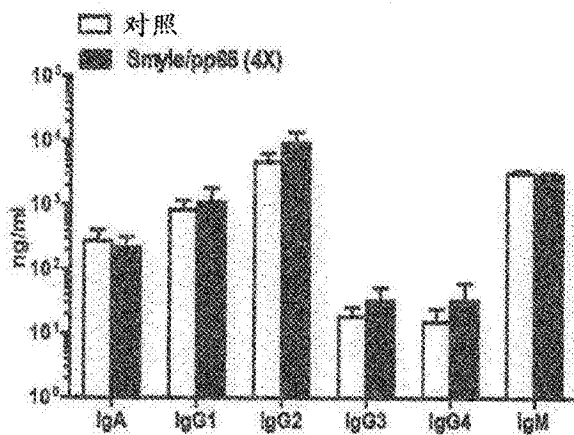
a) 针对pp65的T辅助细胞应答 (2只小鼠/组)



b) 针对pp65的T细胞毒性细胞应答 (2只小鼠/组)



c) 在血浆中可检测到的人Igs



d) pp65特异性huIgG

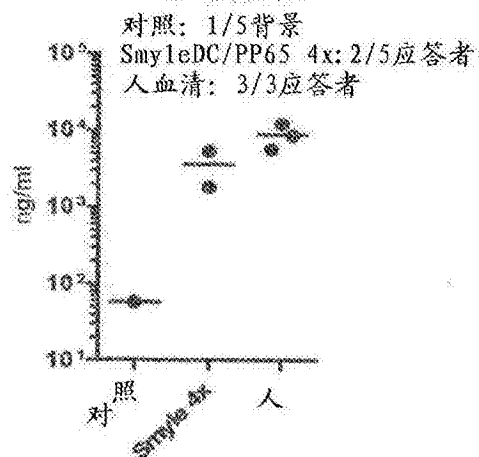


图 29