

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 48/00

C12N 15/74



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380102586.2

[43] 公开日 2005 年 12 月 14 日

[11] 公开号 CN 1708320A

[22] 申请日 2003.11.7

[21] 申请号 200380102586.2

[30] 优先权

[32] 2002.11.7 [33] US [31] 60/424,602

[86] 国际申请 PCT/US2003/035482 2003.11.7

[87] 国际公布 WO2004/044147 英 2004.5.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.30

[71] 申请人 郎基·常

地址 美国佛罗里达盖恩斯维尔

[72] 发明人 郎基·常 陈晓川

[74] 专利代理机构 深圳创友专利商标代理有限公司

代理人 江耀纯

权利要求书 2 页 说明书 16 页 序列表 1 页
附图 2 页

[54] 发明名称 经修饰的树突状细胞

[57] 摘要

本发明说明树突状细胞受慢病毒感染而损伤其作为抗原呈递细胞的能力，抗原呈递细胞可极化天然 T 细胞，开辟 Th1 途径。所述损伤通过用含有编码 IL-7、IL-12 和针对 IL-10RNA 的 siRNA 的载体的慢病毒感染树突状细胞而得以恢复。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种核酸，其包含慢病毒来源的第一核苷酸序列和编码能够调节树突状细胞活化 T 细胞能力的试剂的第二核苷酸序列。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中所述第二核苷酸序列编码 IL-7。
3. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中所述第二核苷酸序列编码 IL-12。
4. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中所述第二核苷酸序列编码 siRNA。
5. 根据权利要求 4 所述的核酸，其中所述 siRNA 对 IL-10 特异。
6. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中所述核酸包含在一慢病毒载体中。
- 10 7. 根据权利要求 6 所述的核酸，其中所述慢病毒载体包含在一病毒粒子中。
8. 一种已在其中导入纯化核酸的树突状细胞，该纯化核酸包含一种编码能够调节所述树突状细胞活化 T 细胞能力的试剂的核苷酸序列。
9. 根据权利要求 8 所述的树突状细胞，其中所述细胞包含一慢病毒载体。
10. 根据权利要求 8 所述的树突状细胞，其中所述核苷酸序列编码 IL-7。
- 15 11. 根据权利要求 8 所述的树突状细胞，其中所述核苷酸序列编码 IL-12。
12. 根据权利要求 8 所述的树突状细胞，其中所述核苷酸序列编码 siRNA。
13. 根据权利要求 12 所述的树突状细胞，其中所述 siRNA 对 IL-10 特异。
14. 根据权利要求 9 所述的树突状细胞，其中所述慢病毒载体包含编码所述试剂的核苷酸序列，该试剂从由下列各物组成的群组中选出：IL-7、IL-12 和对 IL-10 特
- 20 异的 siRNA。
15. 一种调节树突状细胞的 T 细胞活化活性的方法，该方法包含调节至少一种与
 所述树突状细胞相关的细胞因子的量的步骤。
16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述至少一种细胞因子从由下列各物组
 成的群组中选出：IL-7、IL-10 及 IL-12。
- 25 17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中增加与所述细胞相关的 IL-7 的量。
18. 根据权利要求 16 所述的方法，其中增加与所述细胞相关的 IL-12 的量。
19. 根据权利要求 16 所述的方法，其中降低与所述细胞相关的 IL-10 的量。
20. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述调节至少一种与所述树突状细胞相
 关的细胞因子的量的步骤包含使该细胞与一种可溶性细胞因子相接触。
- 30 21. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述调节至少一种与所述树突状细胞相
 关的细胞因子的量的步骤包含将一纯化核酸导入所述树突状细胞中，该纯化核酸包

含一种编码从由下列各物组成的群组中选出的试剂的核苷酸序列：IL-7、IL-12 和对 IL-10 特异的 siRNA。

22.一种包含慢病毒来源的第一核苷酸序列和编码 siRNA 的第二核苷酸序列的核酸。

- 5 23.一种调节树突状细胞中基因表达的方法，该方法包含将一核酸导入该树突状细胞中的步骤，该核酸包含慢病毒来源的第一核苷酸序列和编码 siRNA 的第二核苷酸序列。

经修饰的树突状细胞

5 相关申请案的交叉引用

本专利申请主张 2002 年 11 月 7 日提交的标题为“Modulation of Dendritic Cell Function”的第 60/424,602 号美国临时专利申请的优先权。

关于联邦资助研究的声明

10 本发明获得美国政府的支持，美国国家卫生总局授予资助号 P50 HL59412。美国政府对于本发明具有某些权利。

技术领域

本发明涉及分子生物学、基因治疗、免疫学及病毒学领域。更具体地说，本发明涉
15 及用慢性病毒载体(lentiviral vector, LV)转导树突状细胞从而调节树突状细胞功能的组合物和方法。

背景技术

尽管诸如人体免疫缺陷病毒(HIV)的 LV 与动物疾病有关，但是其所具有的将
20 外源性核酸转移到宿主细胞中的能力已开发用于治疗疾病的基因治疗实验。对于基因治疗应用，LV 提供若干种优于其它载体的优点。举例而言，HIV 来源的 LV 采用与野生型病毒相似的细胞进入及基因组整合方法，包括感染分裂细胞和未分裂细胞的能力。感染分裂和未分裂细胞的优点使 LV 与常规的致癌逆转录病毒(oncoretroviral)载体相比成为更通用的基因转移媒介物。有效的整合、广泛的宿
25 主细胞嗜性和低的组织特异性使 LV 比诸如与腺相关的病毒载体的其它载体更加有效及适用。

已使用 LV 将基因转移到树突状细胞(DC)中用于免疫疗法和疫苗应用。DC，
专门的抗原呈递细胞，因具有诱导有力的 T 细胞应答的能力而广泛用于该等应用中。
然而，如下文报告，公开说明由 LV 转导的 DC 显示出活化天然 T 细胞的降低的能
30 力。在 LV 转导之后，DC 显示出改变的细胞因子应答和表面标记表达，包括 IL-10
的上调及 T 细胞协同刺激分子的下调。根据这些研究结果，经 LV 转导的 DC 将天

然 T 细胞极化为 Th1 效应细胞的能力受到损害——这种影响可能限制 LV 转导 DC 在免疫治疗及疫苗应用中的用途。

发明内容

5 本发明公开用于克服 LV 诱导的 DC 功能损伤的方法及组合物。在本发明的研发中，调查了一系列用于克服 HIV/慢病毒感染所引起的 DC 诱导 T 细胞机能障碍的免疫调节策略，其中包括应用可溶性细胞因子及免疫调节剂。通过将诸如慢病毒免疫调节病毒的免疫调节剂传递到 DC，可纠正 HIV（慢病毒）感染所引起的 DC 及 T 细胞机能障碍。具体地说，受损的 Th1 应答可通过用含有编码 IL-7、IL-12 或针对 IL-10RNA 的 siRNA 的
10 载体的慢病毒感染 DC 而得以恢复。此项技术提供用于在患者的治疗、疫苗接种或载体应用过程中克服与 DC 的 HIV 感染相关的免疫抑制问题的特定免疫治疗方案。

因此，本发明的特点在于一种核酸，其包含慢病毒来源的第一核苷酸序列和编码 IL-7、IL-12、或对 IL-10 特异的 siRNA 的第二核苷酸序列。本发明还包含一种已将纯化核酸导入到其中的树突状细胞（例如，一种经慢病毒感染的树突状细胞），该纯化核酸包
15 含编码从由下列各物组成的群组中选出的试剂的核苷酸序列：IL- 7、IL-12、及对 IL-10 特异的 siRNA。

本发明另一方面的特点在于一种调节树突状细胞的 T 细胞活化能力的方法。该方法包含调节与树突状细胞相关的 IL-7、IL-10、及/或 IL-12 的量的步骤。举例而言，此步骤可涉及增加与该细胞相关的 IL-7 及/或 IL-12 的量，及/或降低与该细胞相关的 IL-10 的量。
20 调节与树突状细胞相关的细胞因子的量可通过使该细胞与可溶性细胞因子相接触，从细胞中清除可溶性细胞因子来达到，或者通过将纯化核酸导入该细胞中来达到，该纯化核酸编码该细胞因子或降低细胞因子表达的试剂（例如，siRNA 或反义核酸）。

文中所用的短语“核酸”表示诸如 RNA（核糖核酸）及 DNA（脱氧核糖核酸）的两种或两种以上核苷酸的链。“纯化”的核酸分子是一种已实质上与核酸天然存在于其中
25 （例如 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100% 无污染）的细胞或有机体中的其它核酸序列分离或离析的核酸分子。该术语包括，例如，结合到载体、质粒、病毒或原核生物或真核生物的基因组中的重组核酸分子、。纯化核酸分子的实例包括 cDNA、基因组核酸片段、核酸产生的聚合酶链反应（PCR）、由基因组核酸的限制酶处理所形成的核酸、重组核酸及化学合成核酸分子。

30 文中所用术语“载体”表示能够转运核酸及/或病毒粒子的实体，例如质粒或病毒载

体。

除非另有规定，否则本文所用的所有技术术语的含义具有与本发明所属领域的技术人员所通晓的含义相同。分子生物学术语的通晓定义可在 Rieger 等人的 Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 第 5 版, Springer-Verlag: New York, 1991 中, 及 Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994 中找到。病毒学术语的通晓定义可在 Granoff 和 Webster, Encyclopedia of Virology, 第 2 版, Academic Press: San Diego, CA, 1990, 及 Tidona 和 Darai, The Springer Index of Viruses, 第 1 版, Springer-Verlag: New York, 2002 中找到。微生物学的通晓定义可在 Singleton 和 Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第 3 版, John Wiley & Sons: New York, 2002 中找到。

虽然与本文所描述类似或等效的方法和材料均可用于本发明的实施或测试，但是适当的方法和材料在下文描述。所有申请案、专利申请案、专利案及其它所提及的参考文献的全文以引用的方式并入本文中。若出现矛盾，则以本发明的说明书（包括定义）为准。

附图说明

图 1 是显示本发明中所用各种载体结构的简略图。

图 2 是展示对 IL-10 RNA 特异的 siRNA 的简略图。

具体实施方式

本发明提供用于克服 LV 所诱导的 DC 的 T 细胞活化能力损伤的方法及组合物。下列优选实施例阐述这些组合物和方法的适用性。虽然如此，但是仍然可以从这些实施例的描述出发，以下文所提供的描述为基础，做出或实施本发明的其他方面。

生物学方法

以下描述涉及常规分子生物技术的方法。该等技术在所属领域中广泛已知，并且在诸如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, 1-3 卷, Sambrook 等人编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; 及 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等人编辑, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (周期更新) 的方法学论文中有详细描述。例如, Beaucage 和 Carruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862, 1981, 及 Matteucci 等人, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185, 1981 中讨论了核酸的化学合成方法。举例而言，可以在商用自动化核苷酸合成器上执行核酸

的化学合成。例如在 *Current Protocols in Immunology*, Coligan 等人编辑, John Wiley & Sons, New York, 1991; 及 *Methods of Immunological Analysis*, Masseyeff 等人编辑, John Wiley & Sons, New York, 1992 中描述了免疫学方法。基因转移和基因治疗的常规方法也可适用于本发明。例如参见 *Gene Therapy: Principles and Applications*, T. Blackenstein 等人编辑, Springer Verlag, 1999; *Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine)*, P. D. Robbins 编辑, Humana Press, 1997; 及 *Retro-vectors for Human Gene Therapy*, C. P. Hodgson 等人, Springer Verlag, 1996。

核酸/LV

本发明提供一种核酸, 该核酸包含慢病毒来源的第一核苷酸序列和编码能够调节 DC 功能(例如, 克服 LV 所诱导的 T 细胞活化损伤)的试剂的第二核苷酸序列。本发明的核酸优选采用 LV 形式。已知许多不同类型的 LV, 包括那些基于天然慢病毒的慢病毒(如 HIV-1、HIV-2)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)及其它病毒。参见美国专利案第 6,207, 455 号。尽管本发明使用基于 HIV-1 的载体来描述,但也可以通过配合本文所描述的信息而使用其它慢病毒来源的其它载体。基于 HIV-1 的载体因提供对于基因治疗应用的许多优点而成为本发明的优选。

本发明的 LV 可以为(例如)假型, 用于克服受限制的宿主细胞嗜性。举例而言, 可使用水疱性口炎病毒 G (VSV-G) 病毒包膜来假型化 LV。为提高安全性, 也可以使用一种自我失活 (self-inactivating, SIN) 的 LV。举例而言, 可通过钝化 3'U3 启动子并删除除 5'整合附着位点(其对于整合至宿主染色体中具有重要性)之外的所有 3'U3 序列来制成 SIN 型 LV。用于设计本发明载体的尤其优选的结构为图 1 中所示的 pTYF。

编码能够调节 DC 功能的试剂的第二核苷酸序列可以是一种编码如 IL-7 或 IL-12(本文中显示两者用于克服 LV 所诱导的 DC 损伤)的细胞因子的核苷酸序列。使用含有编码 IL-12、IL-12 + GM-CSF 及 IL-7 的 LV 的慢病毒调节 DC 功能(例如由慢病毒感染 DC 来纠正受损的 Th1 应答)。优选的 LV 包含 pTYF-IL-12 双顺反子载体、pTYF-IL12-GM-CSF 三顺反子载体及 pTYF-IL-7。本发明的优选慢病毒包括 LV pTYF-IL-12 双顺反子载体、pTYF-IL12-GM-CSF 三顺反子载体及 pTYF-IL-7, 并且以 VSV-G 进行假型化用于拓宽其宿主细胞嗜性范围(参见 Chang 和 Gay, *Current Gene Therapy* 1,237-251, 2001; Chang 和 He, *Curr Opin Mol Ther* 3 (5), 468-75, 2001)。

用于本文所描述实验的病毒载体(及相应的病毒)是基于 MLV 和基于 SIN 慢病毒(HIV-1)的载体。图 1 显示 LV pTYF-CD80、pTYF-CD86、pTYF-Flt3-L、pTYF-IL-7、

pTYF-CD40L、pTYF-IL-12、和 pTYF-IL-12/GM-CSF 的结构。用于克隆 SIN LV 的启动质粒为 pTYF，它是一种以中心多嘌呤管（central polypurine tract, cPPT）为特点的 SIN 载体。cPPT 序列内含物已显示可将病毒载体活性提高大约 3 倍。SIN LV 还含有插入 3'截断的长末端重复序列（LTR）之后的 3'牛生长激素多聚腺苷化信号（bGHpA）。SIN LV 编码许多种细胞因子，其中包括 IL-12, IL-12+GM-CSF 及 IL-7，以及诸如 CD80 或 CD86 的免疫调节分子（Liang 和 Sha, Curr. Opin. Immunol. 14: 384-390, 2002; 及 Carreno 和 Collins, Annu. Rev. Immunol 20: 29-53, 2002），及 Flt3-L。病毒载体中所含的人细胞因子 cDNA 序列通过 RT-PCR 从人外周血液淋巴细胞（CD80、CD86、GM-CSF、IL-12 及 IL-7），或从人肿瘤细胞（对于 Flt3 配体的 TE671 细胞）扩增。IL-12 基因具有两种成分，IL-12A 和 IL-12B。对于在调节 DC 功能中的使用，IL-12 两种成分的 cDNA 同时克隆到一双顺反子载体中，其中在这两个 cDNA 之间具有内部核糖体进入位点（IRES）。对于 pTYF-IL-12-GM-CSF 载体，两个不同的 IRES 元素位于 IL-12B/IL-12A 与 IL-12A/GM-CSF cDNA 之间，形成三顺反子表达载体。病毒载体中的基因可受任何适宜启动子（例如，诸如人延伸因子 1 α ，EF1 α 的强启动子）的支配。对于 pTYF 载体的结构，参见 Zaiss 等人, J. Virology 76: 7209-7219; 及 Chang 等人, Gene Therapy 6: 715-728。可以如 Zaiss 等人, J. Virol. 76: 7209-7219, 2002 中所述构造 MLV 载体（及相应的病毒）。

Buchschacher 等人, Blood 95: 2499-2504, 2000; Chang 等人, Gene Therapy 6: 715-728, 1999; Emery 等人, PNAS 97: 9150-9155, 2000; Naldini 等人, Science 272: 263-267, 1996; Paillard 等人, 9: 767-768, 1998; Sharma 等人, PNAS 93: 11842-11847, 1996; Reiser 等人, PNAS 93: 15266-15271, 1996; 及 Chinnasamy 等人, Blood 96: 1309-1316, 2000 中讨论了重组 LV 及病毒粒子的结构。Miyoshi 等人, J. Virol. 72: 8150-8157, 1998; Zufferey 等人, J. Virol. 72: 9873-9880, 1998; Iwakuma 等人, Virology 261: 120-132, 1999; Mangeot 等人, J. Virol. 74: 8307-8315, 2000; 及 Schnell 等人, Hum. Gene Ther. 11: 439-447, 2000 中描述了 SIN 载体的设计。

25 树突状细胞

本发明提供一种已在其中导入纯化核酸的 DC，该纯化核酸具有编码免疫调节剂（诸如 IL-7、IL-12 或对 IL-10 特异的 siRNA）的核苷酸序列。可使用的 DC 包括哺乳动物 DC，诸如那些来自小鼠、大鼠、豚鼠、非人灵长类动物（例如，黑猩猩和其它猿类及猴类）、牛、绵羊、猪、山羊、马、狗、猫、及人的 DC。DC 可以是哺乳动物患者内（活体内）的 DC 或离体培养物中的 DC（例如离体培养以用于体外传送给患者的 DC）。根

据本发明的 DC 含有一种核酸，一种具有编码免疫调节剂（诸如 IL-7、IL-12 或对 IL-10 特异的 siRNA）的核苷酸序列的纯化核酸。在优选的 DC 中，表达该核酸，产生多肽或 RNA。

DC 可从任何适宜的来源获得，包括皮肤、脾、骨髓或其它淋巴器官、淋巴结或血液。优选地，从血液或骨髓获得 DC 用于本发明。通常，在经外源性粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和白细胞介素-4 进行刺激后从骨髓及外周血液单核细胞（PBMC）产生 DC。在 Inaba 等人，J. Exp. Med. 176: 1693-1702, 1992；及 Bai 等人，Int. J. Oncol. 20: 247-253, 2002 中描述从骨髓细胞获得 DC 并培养 DC 的方法。从造血干细胞培养 DC 的方法（Mollah 等人，J. Invest. Dermatol. 120: 256-265, 2003）和从单核细胞培养 DC 的方法（Nouri-Shirazi 和 Guinet, Transplantation 74: 1035-1044, 2002）在所属领域中是已知的。在 Pullarkat 等人的 J. Immunol. Methods 267: 173-183, 2002 中描述了一个用于产生 DC 的大规模单核细胞富集程序的实例。可以在荧光活化细胞拣选（fluorescence-activated cell sorting, FACS）分析中使用 DC 特异性标记物从异质细胞样品中分离 DC（Thomas 和 Lipsky J. Immunol. 153: 4016-4028, 1994；Canque 等人，Blood 88: 4215-4228, 1996；Wang 等人，Blood 95: 2337-2345, 2000）。未成熟的 DC 具有下列特征：协同刺激分子、CD80/86、CD40 的低水平表达；诱导 T 细胞活化的低劣能力；不能产生 IL-12p70；及诱导调节性 T 细胞或无反应性 T 细胞的潜力。相比而言，成熟的 DC 可产生 IL-12p70 并表达高水平的 II 类 MHC 抗原、CD80/86 及 CD40、IL-12p70 产物。含有 DC 以及经分离 DC 的细胞群可使用任何适宜的允许 DC 生长和增殖的离体培养方法进行培养。

调节 DC 功能

本发明还提供调节 DC 功能的方法。DC 刺激天然 T 辅助细胞使其分化为产生 IFN- γ 的 Th1 细胞或产生 IL-4 的 Th2 效应细胞，它们调节不同的免疫应答。扭曲的 Th 应答是由 LV 对 DC 的转导和慢病毒的感染所产生的。具体地说，经慢病毒转导和慢病毒感染的 DC 诱导天然 Th 细胞朝着受损 Th1 应答和提高产生 IL-4 的 Th2 的应答的方向分化。本发明的组合物及方法可用于通过向 DC 提供细胞因子（例如免疫基因）而增加 DC 的免疫活化能力（例如恢复 Th1 应答）。适宜的细胞因子的实例包括 IL-12 及 IL-7。其它可以提高 Th1 应答的细胞因子也可用于本发明。

为调节 DC 功能（例如，恢复 Th1 应答），使 DC 细胞与一种含有纯化核酸的 LV 接触，该纯化核酸包含一个慢病毒来源的核苷酸序列和至少一个非慢病毒来源的转基因。

转基因可以是任何提高 Th1 应答的细胞因子, 包括 IL-12 及 IL-7。

在一个调节 DC 功能的实例中, 用含有编码 IL-12、IL-12 加 GM-CSF 和 IL-7 的载体的慢病毒感染 DC。在此实例中, 未成熟的 DC 用 Mock (293T 上清液)、TYF-PLAP、TYF-IL-12、TYF-IL12-GM-CSF、或 TYF-IL-7 感染。在用 LPS (80ng/ml)加 TNF- α (20u/ml)使细胞成熟持续 24 小时后, 收获该 DC 并用 CD4+ T 细胞以 1: 20 的 DC/T 比率进行共培养。共培养 5 天后, 在 IL-2 (25u/ml)存在下使 T 细胞另外扩增 7 天。接着在布雷菲德菌素 A (Brefeldin A) 存在下用离子霉素 (ionomycin) 和 PMA 再刺激 6 小时后通过细胞内 IFN- γ 及 IL-4 染色测量 Th1、Th2 及 Th0 群体。编码诸如 IL-12、IL-12 + GM-CSF、及 IL-7 的免疫调节分子的 LV 可有效地纠正由慢病毒感染 DC 所引起的受损 Th1 应答。

调节患者的免疫应答

用于增强及降低患者免疫应答的组合物和方法可用在多种治疗许多不同疾病的基于 DC 的免疫治疗策略中。成熟的 DC 是主要的抗原呈递细胞群, 它有效地调节用于启动 T 细胞应答 (例如, 细胞毒素性 T 淋巴细胞的诱导) 的到达有组织的淋巴组织的抗原转运。DC 的正常功能是将抗原呈递给 T 细胞, 接着 T 细胞特异性地识别并最终消除抗原来源。DC 作为对于癌症和传染性疾病的治疗性及预防性疫苗使用。设计该等疫苗用于引发强有力的细胞免疫应答。Lundqvist 和 Pisa, *Med. Oncol.* 19: 197-211, 2002; Herrera 和 Perez-Oteyza, *Rev. Clin. Esp.* 202: 552-554, 2002; 及 Onaitis 等人, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11: 645-660, 2002 中综述了 DC 生物学、向 DC 的基因转移及 DC 免疫治疗。

对细胞毒素及 1 型辅助 (Th1) 细胞应答的诱导对于针对慢性传染病或癌症的疫苗是非常需要的 (P. Moingeon, *J. Biotechnol.* 98: 189-198, 2002)。表达上调 Th1 细胞及其作用的白细胞介素的经修饰 DC 可用于增强机体对病原体的抵抗力 (J. W. Hadden, *Int. J. Immunopharmacol.* 16: 703-710, 1994)。对于 HIV 感染的治疗, 例如, 可将 DC 定位在活体外和活体内, 启动并增强 HIV 特异性免疫 (Piguet 和 Blauvelt, *J. Invest. Dermatol.* 119: 365-369, 2002)。

除 HIV 治疗外, 本发明的经修饰 DC 可用于癌症免疫治疗中。经操控将肿瘤抗原呈递给二级淋巴器官及静息的、天然 T 细胞的 DC 可用于产生肿瘤特异性 T 细胞 (A. F. Ochsenbein *Cancer Gene Ther.* 9: 1043-1055, 2002)。举例而言, 经修饰表达骨髓瘤相关抗原的 DC 可适合用作多发性骨髓瘤的抗癌疗法 (Buchler 和 Hajek, *Med. Oncol.* 19: 213-218, 2002)。已显示, 表达某些细胞因子或趋化因子的 DC 展示出实质上改良的成熟状况、活体内迁移到二级淋巴器官的能力, 及活体内刺激肿瘤特异性 T 细胞应答并诱

导肿瘤免疫的能力。因此，经修饰表达细胞因子的 DC 可用于诱导肿瘤免疫，并且可与经修饰表达肿瘤抗原的 DC 联合使用。Lemoli 等人，*Haematologica* 87: 62-66, 2002; A. F. Ochsenbein, *Cancer Gene Ther.* 9: 1043-1055, 2002; Zhang 等人，*Biother. Radiopharm.* 17: 601-619, 2002; Di Nicola 等人，*Cytokines Cell Mol. Ther.* 4: 265-273, 1998; D. Avigan, *Blood Rev.* 13: 51-64, 1999, 及 Syme 等人，*J. Hematother. Stem Cell Res.* 10: 601-608, 2001 中综述了 DC 在癌症免疫疗法中的治疗作用。

在一个基于 DC 的疫苗策略的实例中，使用编码免疫原的 LV 修饰 DC，导致免疫原的表达并呈递给静息的、天然 T 细胞。可以单独使用该抗原呈递策略或联合用作混合免疫方案的一部分，以便引发广泛的免疫应答。Onaitis 等人，*Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11: 645-660, 2002 中描述了涉及将 DC 传送给病人的不同免疫策略。

经修饰的 DC 也可用于调节用于治疗自身免疫性疾病（例如，关节炎、哮喘、过敏性皮炎）的 T 细胞（Th1 和/或 Th2）应答。Th1 与 Th2 之间的平衡在许多自身免疫性疾病中具有重要性。Th1 细胞活性在患有类风湿性关节炎和胰岛素依赖型糖尿病病人的关节中起主要作用，而 Th2 细胞支配的应答在过敏性疾病（例如变态反应性疾病）、器官特异性自身免疫性疾病（1 型糖尿病和甲状腺疾病）、克罗恩氏病、同种异体移植物排斥反应（例如，肾移植急性排斥反应）及一些原因不明的习惯性流产的发病机理中（*Allergy Asthma Immunol.* 85: 9-18, 2000）有所涉及。当宿主免疫系统探测到同种“非己”抗原时即发生同种异体移植物排斥反应。为预防或治疗同种异体移植物排斥反应，可使用经修饰的 DC 诱导对组织特异性抗原的耐受性（*B. Arnold Transpl. Immunol.* 10: 109-114, 2002）。表达免疫抑制分子的 DC 也可用于同种异体移植物排斥反应的疗法（Lu 和 Thomson, *Transplantation* 73: S 19-22, 2002）。

经修饰的 DC 可进一步用于诱导针对微生物病原体（例如，病毒、细菌、真菌、原生动物和蠕虫）的免疫应答。举例而言，可以对 DC 进行修饰，用于表达微生物病原体来源的肽抗原。由该 DC 所进行的抗原递呈可能刺激针对病原体的强有力的免疫应答。

实例

本发明通过下列实例进一步进行说明。提供该等实例仅用于说明而不能以任何方式理解为对本发明范畴和内容的限制。

实例 1-材料和方法

单核细胞来源的树突状细胞的产生。如先前所述（Chang 和 Zhang, *Virology* 211: 157-169, 1995），通过在 Ficoll- Hypaque（Sigma-Aldrich, USA）中的梯度密度离心分

离法,从健康供体(Civitan Blood Center, Gainesville, FL, USA)的血沉棕黄层(buffy coat)中分离外周血液单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。根据 Thurner 等人(J. Immunol. Methods 223: 1-15, 1999)依照下列修改,从 PBMC 制备 DC。在实验开始的前一天,以每孔 5 百万个 PBMC 接种到在无血清 AIM-V 培养基中的十二孔培养板中。于 37°C 下培育 1 小时后,将未粘附的细胞轻轻洗脱并将保持粘附的单核细胞进一步在 AIM-V 培养基中培养直到试验开始的第 1 天。小心地移除培养基,不要干扰松散粘附细胞,并添加含有重组人 GM-CSF (560 u/ml, Research Diagnostic Inc. Flanders NJ)和 IL-4 (25 ng/ml, R&D Systems)的新 AIM-V 培养基(每孔 1 ml),并且将细胞在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。第 3 天,将 1 ml 含有 GM-CSF (560 u/ml) 及 IL-4 (25 ng/ml)的新鲜 AIM-V 培养基添加到培养物中。第 5 天,通过轻轻的移液操作收获未粘附的细胞。洗涤之后,将 DC 冷冻以备后用或立即使用。

未成熟 DC 的慢病毒转导和 DC 成熟。第 5 天,将未成熟的 DC 以每孔 5×10^5 涂在含有 200 ul 补充了 GM-CSF (560 u/ml) 和 IL-4 (25 ng/ml) 的培养基的 24 孔培养板中。通过以 50-100 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)将浓缩的 LV 添加到细胞中来进行 DC 的转导。将细胞在 37°C 下培育 2 小时,每 30 分钟轻轻摇动,然后添加 1 ml DC 培养基,并将病毒载体与培养物一起另外培育 12 小时。通过将最终浓度为 80 ng/ml 的脂多糖(LPS)和最终浓度为 20 u/ml 的 TNF- α 添加到 DC 培养物中并持续 24 小时来诱导 DC 成熟。在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中用含有 2 mM EDTA 的 AIM-V 培养基培育成熟的 DC 并持续 20 分钟,之后将其收获。将细胞洗涤 3 次,用于后续实验。

抗体染色和流式细胞术。为了由流式细胞术分析细胞表面标记的表达,将 DC 用正常小鼠血清培育 10 分钟,然后用与荧光染料联合的抗人单克隆抗体再培育 30 分钟,该等抗体包括 HLA-ABC (Tu149, 小鼠 IgG2a, 经 FITC 标记, Caltag Laboratories)、HLA-DR (TU36, 小鼠 IgG2b, 经 FITC 标记, Caltag Laboratories)、CD1a (HI49, 小鼠 IgG1k, 经 APC 标记, Becton Dickinson)、CD80 (L307.4, 小鼠 IgG1k, 经 Cyochrome 标记, Becton Dickinson)、CD86 (RMMP-2, 大鼠 IgG2a, 经 FITC 标记, Caltag Laboratories)、ICAM-1 (15.2, 经 FITC 标记, Calbiochem)、DC-SIGN (eB-h209, 大鼠 IgG2a, k, 经 APC 标记, eBioscience)、CD 11c (Bly-6, 小鼠 IgG1, 经 PE 标记, Becton Dickinson)、CD40 (5C3, 小鼠 IgG1, k, 经 Cy-chrome 标记, Becton Dickinson)、CD123 (小鼠 IgG1, k, 经 PE 标记, Becton Dickinson)、CD83 (HB15e, 小鼠 IgG1, k, 经 R-PE 标记, Becton Dickinson)。在每次染色情形中也包含相应的同型对照抗体。两次洗涤之后,将细胞重

新悬浮并固定在 1%多聚甲醛的 PBS 中，然后使用 FACSCalibur 流式细胞仪和 CELLQUEST 程序 (Becton Dickinson) 进行分析。通过前散射和侧散射特征控制选择活细胞，并且记录阳性细胞的百分数和细胞群平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

- 5 **RNA 的分离、标记和阵列杂交。**用逆转录病毒或腺病毒载体感染之后，收获该等细胞并用 Trizole 试剂 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, California) 使其溶解。将全部 RNA 分离、进行标记并准备根据厂商协议 (Clontech) 将其杂交至 Atlas Array 滤膜。用 15 ug 经标记的 cDNA 产物过夜杂交。杂交并洗涤后，使用磷光成像仪 (phosphorimager) (Storm 486, Molecular Dynamics) 扫描阵列滤膜，并使用 Clontech
10 Atlas Array 图像分析软件进行定量分析。

- IL-4、IL-10 和 IL-12 的半定量及定量 RT-PCR 分析。**如上所述用 LV 转导 DC 并使其成熟。使用 Tri-reagent 试剂将总 RNA 纯化。对于半定量 RT-PCR，使用人 IL-4、IL-10 和 IL-12 的引物及人 GAPDH 的对照引物来执行标准的一步 RT-PCR (Promega)。对于定量 RT-PCR 分析，通过使用 Tri-reagent 试剂盒分离 DC 的总 RNA 并且使用 oligo-dT 和
15 AMV 逆转录酶转录第一链 cDNA，然后在 ABI-Prism 7000 PCR 循环仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 上执行实时 RT-PCR。从 ABI 购得 IL-12p40、IL-10、GAPDH 的有效 PCR 引物及 TaqMan MGB 探针 (经 6FAM 标记)。根据厂商说明书 (Stratagene 和 ABI) 制备 PCR 混合物，并且循环加热器条件如下：1 x 95°C，10 分钟，40-50 个循环变性 (95°C，15 秒)；和联合退火/延伸 (60°C，1 分钟)。通过比较样品与连续稀释
20 标准品的循环阈值 (threshold cycle value) 执行相对定量分析。

- 天然 CD4⁺ T 细胞的制备。**根据厂商说明书通过使用 CD4⁺ T 细胞分离玫瑰花结混合物 (Rosette cocktail) (StemCell Technologies) 进行阴性选择而从 PBMC 制备 CD4⁺ T 细胞。简单地说，在 200 ml 无菌 Falcon 离心管中，在 25°C 下用 2.25 ml CD4⁺ T 细胞富集玫瑰花结混合物将 45 ml 血液黄层 (大约 5 x 10⁸ PBMC) 培育 25 分钟。接着，添加
25 45 mL 含有 2 % FBS 的 PBS，稀释该血液黄层。轻轻混合之后，将 30 ml 稀血液黄层转移，并在 50 ml Falcon 试管中的 15 ml Ficoll Hypaqueh 上成层，并且以 1,200 g 离心 25 分钟。在 Ficoll 界面处收获非花结细胞，并用 PBS (2% FBS) 洗涤两次，计数，然后以等分样品低温贮藏在液态 N₂ 中备用。经分离的 CD4⁺ T 细胞的纯度一直保持在 95% 以上。根据厂商说明书使用 MACS (Miltenyi Biotec) 磁性亲和柱基于 CD45RO⁺ 细胞的阴性选
30 择纯化 CD4⁺CD45RA 天然 T 细胞。

Th 功能的离体诱导和细胞内细胞因子染色。离体 DC:T 细胞共培养方法根据 Caron G 等人 (J. Immunol, 167: 3682-3686, 2001) 进行。简单地说, 在无血清 AIM-V 培养基中, 将经纯化的天然 CD4 T 细胞与异源的成熟 DC 在不同比率 (20: 1 至 10: 1) 下共培养。第 5 天, 添加 50 u/ml 的 rhIL-2, 而且使培养物扩增, 并每隔一天补给含 rhIL-2 的 AIM-V 培养基一直到 3 周。第 12 天后, 洗涤静息的 Th 细胞并用 PMA (10 ng/ml 或 0.0162 uM) 和离子霉素 (ionomycin) (1 ug/ml, Sigma-Aldrich) 再刺激 5 小时。在培养的最后 2.5 个小时中添加布雷菲德菌素 A (1.5 ug/ml)。接着将细胞固定、通透、并用 FITC 所标记的抗-IFN- γ 和 PE 所标记的抗-IL-4 mAb (PharMingen) 染色, 然后在 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 中分析。

DC 介导的混合淋巴细胞反应 (MLR)。将 DC 从每孔 10,000 个细胞连续稀释到每孔 313 个细胞, 并在 96 孔 U 底培养板中用 1×10^5 异源 CD4 T 细胞培养 5 天, 培养物总体积 200 ul。根据厂商说明书 (Promega), 通过将 20 ul 的 CellTiter96 溶液添加到每个孔中来监控 T 细胞的增殖, 并且获得在 490 nm 下的 OD 读数。

LV 结构和产生。质粒结构。如先前所述 (Zais 等人, J. Virol. 76: 7209-7219, 2002) 构建用于此项研究的致癌逆转录病毒 (MLV) 和 LV (HIV-1 及 HIV-1 SIN)。所有的 HIV-1 SIN 载体 (pTY) 都具有插入 3' 截断的长末端重复序列 (LTR) 之后的 3' 牛生长激素多聚腺苷化信号 (bGHpA)。通过将 *NotI* 消化的 pHEF 与人化 eGFP 构造来源的 *NotI* 消化的 eGFP 片段连接而构建增强的绿色荧光蛋白质 (eGFP) 表达质粒, pHEFeGFP, 其中人化 eGFP 构造可从 UF Powell 基因治疗中心的载体中心获得。通过将 eGFP 片段 (*XhoI*-*EcoRI*) 从 pTVdl.EFeGFP 插入到 pTYEFnlacZ 中, 替换核心 lacZ (nlacZ) 基因来制造 pTYEFFeGFP。通过用从 pHEFeGFP 分离得到的 eGFP 片段 (*XhoI*-*EcoRI*) 替换 pTVdl.EFnlacZ 的 nlacZ 片段 (*XhoI*-*EcoRI*) 而产生 pTVdl.EFeGFP。MLV gag-pol 构造是基于 pcDNA3.1/Zeo (+) (Invitrogen), 其中巨细胞病毒即刻早期启动子被人延伸因子 1 α (EF1 α) 启动子所替换。表达细胞因子基因或 T 细胞协同刺激基因的慢病毒载体是通过如上所述将编码这些基因的 cDNA 插入到 EF1 α 启动子之后的 pTYF-EF 转导载体中而构建的。

实例 2-结果

病毒转导后细胞应答的 cDNA 微阵列分析。通过在原始的人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中比较不同的病毒载体来分析对病毒转导的细胞应答, 该等病毒载体包括 HIV-1 (LV)、莫洛尼氏 (Moloney) 鼠白血病病毒 (MLV) 和腺病毒 (Ad) 载体。通过

DNA 共转染制备 HIV-1 和 MLV 载体，并且如前所述载体基因组中不包含病毒基因 (Chang 和 Gay, *Current Gene Therapy*, 1: 237-251, 2001; Zaiss 等人, 同上)。Ad 载体是基于含有大部分腺病毒基因的 E1A 缺失载体系统 (Graham 和 Prevec, *Manipulation of adenovirus vectors*, 第 7 卷, 第 11 章, 第 109-128 页, 1991)。将 HUVEC 维持在低传代 (<5) 并以 2-3 的感染复数 (moi) 进行转导。为了将由包装细胞和转基因引起的变化降到最低, 使此项研究中所用的 3 个病毒载体全部携带 lacZ 报告基因并且在 293 细胞中产生。使用一组 4 种 Clontech Human Atlas Array 1.2 印迹试剂盒研究 HUVEC 的细胞应

答, 每种印迹试剂盒含有 1,176 个人类 cDNA、9 个管家对照 cDNA 和阴性对照品。用模拟品 (对照品 293 上清液)、LV、MLV 和 Ad 载体转导 HUVEC。在感染 24 小时

10 时后, 收获全部的 polyA⁺ RNA, 通过逆转录用 ³²P-dATP 进行标记, 并用于杂交到 4 种相同的 Clontech Atlas Human Array 1.2 cDNA 印迹试剂盒。使用 Clontech AtlasImage 1.5 软件和两两对比法分析所得结果。可由任何应用软件所记录的超过 2 倍的变化或 10,000 以上的信号强度任意地测定上调或下调基因, 并通过视觉比较加以确认。结果总结为 6 组由 Clontech 任意设立的基因库: 细胞周期及致癌基因、信号转导、细胞凋亡及 GTP

15 酶、转录及表面信号发放、粘附-受体-趋化因子, 和应激反应-白介素-干扰素。见下表 1。LV 似乎比 MLV 和 Ad 载体更经常增强转录和表面信号发放基因, 而且有趣的是, IL-10 (一种免疫抑制细胞因子) 在 MLV 及 LV 转导后出现上调。

表 1. HUVEC 中病毒转导对基因表达的影响。由上调 (↑)、下调 (↓) 或不变 (—) 表示 6 个任意定义的功能基因的基因表达的变化倍数。

20		Ad	MLV	LV
	A: 细胞周期/致癌基因	↑	↑ ↑	↑ ↑
	B: 信号转导	↓	↓	↓
	C: 细胞凋亡, GTP 酶	—	—	—
	D: 转录, 表面信号发放	↑ ↑	↑	↑ ↑ ↑
25	E: 粘附, 受体, 趋化因子	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑
	F: 应激反应, IL, IFN	↑	↑	↑

LV 转导后 DC 表面标记表达的分析。使用不同的抗体和流式细胞术分析 LV 转导后 DC 上的表面标记表达。用包含模拟品 (对照品 293 上清液)、空 LV 粒子 (含有 HIV-1

壳体和 VSV-G 包膜而无病毒基因组的粒子)、LV 及 MLV 的载体转导外周血液单核细胞 (PBM) 来源的未成熟 DC。也检验空 LV 以便观察载体粒子中存在的病毒蛋白质是否会诱导 DC 表型的变化。在用 LPS 加 TNF- α 处理 24 小时后, 收获 DC 以用于抗体染色和流式细胞术。结果总结在表 2 中。在经检验的表面分子中, CD1a、CD80、CD86、ICAM-1 和 DC-SIGN 在 LV 转导后出现下调, 但是使用空 LV 或 MLV 时不发生此种情况。当检验携带有 PLAP 或 Cre 报告基因的 LV 的不同制备物时, 获得相同的结果。

表 2. 经 LV 或 MLV 转导的 DC 的表面标记概况

几何平均荧光强度 $\pm$ SD				
表面标记	模拟品	空 LV	LV-PLAP	MLV
CD11c	48.8 $\pm$ 3.2	47.2 $\pm$ 1.3	52.3 $\pm$ 2.3	55.3 $\pm$ 1.1
CD123	13.0 $\pm$ 0.4	13.4 $\pm$ 0.8	14.9 $\pm$ 0.6	15.7 $\pm$ 0.1
CD1a	27.3 $\pm$ 1.1	27.6 $\pm$ 2.9	21.5 $\pm$ 0.2*	31.0 $\pm$ 0.3
CD40	8.6 $\pm$ 0.1	8.9 $\pm$ 0.6	8.6 $\pm$ 0.1	9.0 $\pm$ 0.3
ICAM-1	462.6 $\pm$ 57.5	376.5 $\pm$ 30.1	179.5 $\pm$ 3.4***	498.5 $\pm$ 6.9
CD62L	3.3 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.03	3.7 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.4
CD80 (B7-1)	9.9 $\pm$ 0.9	10.6 $\pm$ 0.7	9.3 $\pm$ 0.2*	11.3 $\pm$ 0.4
CD83	5.8 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.01	6.0 $\pm$ 0.3
CD86 (B7-2)	39.6 $\pm$ 3.5	39.6 $\pm$ 2.5	31.4 $\pm$ 0.4*	47.3 $\pm$ 1.5
DC-SIGN	62.7 $\pm$ 4.5	55.7 $\pm$ 0.4	50.6 $\pm$ 1.5*	68.6 $\pm$ 4.1
HLA-ABC	13.9 $\pm$ 1.3	15.8 $\pm$ 1.0	14.6 $\pm$ 0.3	17.2 $\pm$ 0.9
HLA-DR	31.5 $\pm$ 0.8	28.6 $\pm$ 2.2	26.9 $\pm$ 0.4	33.2 $\pm$ 1.7

结果表示为流式细胞术后的几何平均荧光强度。

星号 (*) 表示司图登特 t-检验 (Student t-test) 的差异显著性 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)。

受 LV 转导损伤的 DC 介导的 Th1 免疫。使用人 DC 和天然 T 细胞执行离体 DC 功能检定。在含有 GM-CSF 和 IL-4 的培养物中从 PBM 产生 DC, 并用携带 PLAP 报告基因的 LV 感染 PBM 来源的第 5 天 (d5) 的 DC。第 7 天分析受感染 DC 的 PLAP 活性。

在此情况下, 使用 LV 以约 30-80 的感染复数转导 90%以上的 DC。为了观察 LV 感染之后 DC 中 IL-10 的表达是否受到影响, 用 LV 感染第 5 天的 DC, 并在第 6 天用 LPS 处理 DC, 在接下的时间里使用抗-IL-10 单核克隆抗体和流式细胞术, 通过细胞内细胞因子染色 (ICCS) 分析 IL-10 表达。与 HUVEC 的 LV 转导类似, LV 感染之后观察到 DC 中 IL-10 出现上调。

为了进一步表征 LV 感染后 DC 的功能, 从外周血液单核细胞 (PBMC) 纯化天然 CD4⁺ T 细胞, 并且在用 TNF- α 和 LPS 诱导成熟之后与 PBM 来源的异源 DC 共培养。第 5 天用 LV 或 MLV 感染这些 DC, 诱导其成熟, 并且与天然 CD4⁺ T 细胞共培养。允许这些 T 细胞扩增并在 DC 启动超过 7 天之后进行休眠。为分析 Th 应答, 在用离子霉素和 PMA 共培养后的第 7 天和第 9 天激活休眠的 T 细胞, 并如上所述使用针对 IFN- γ 和 IL-4 的抗体进行细胞内染色 (ICCS)。结果证明产生 IFN- γ 的 Th1 细胞群急剧减少, 从第 7 天的 72%和第 9 天的 75% (对照品), 降到第 7 天的 27%和第 9 天的 22% (经 LV 转导的 DC), 而 Th2 群保持不变。对于 MLV 转导的 DC 观察到了类似但不太显著的效果。

由编码免疫调节基因的 LV 修饰 DC 的免疫性。如图 1 所示将人 CD80 和 CD86 的 cDNA 克隆到 LV 中。用携带有报告基因的 LV (LV-PLAP)、携带有 CD80 cDNA 的 LV (LV-CD80) 或携带有 CD86 cDNA 的 LV (LV-CD86) 转导 DC, 12 个小时后用 LPS 和 TNF- α 加以处理。LV 转导后 36 小时, 使用抗 CD80 和抗 CD86 抗体通过流式细胞术分析经转导 DC 的 CD80 和 CD86 表达。受到 LV-PLAP 感染后 CD80 和 CD86 的表达均降低, 对于 CD80 而言从 41%降到 35%, 对于 CD86 而言从 61%降到 49%。然而, 在用编码 CD80 和 CD86 的 LV 转导之后, CD80 和 CD86 的表达分别出现上调, CD80 从 35%上调到 44%, CD86 从 49%上调到 76%。

在其它实验中, 将用模拟品、LV-PLAP、LV-PLAP 加 LV-CD80、或 LV-PLAP 加 LV-CD86 转导的 DC 与天然 CD4 T 细胞进行共培养。8 天后, 再次激活 T 细胞并如上所述使用抗 IL-4 和抗 IFN- γ 抗体通过 ICCS 和流式细胞术进行分析。结果表明, LV 转导之后, Th1 群从 24%下调到 13%, 而且这种损伤不能由 DC 中 CD80 和 CD86 的上调 (分别为从 13%到 12%及 13%) 加以纠正。

在其它实验中,研究是否可以通过向 DC 培养物补充可溶性的 IL-12 和/或 FL 来增强 DC 的 Th1 活化功能,其中将这些细胞因子单独或一起添加到病毒转导期间的 DC 培养物中和 DC: T 细胞共培养物中。第 6 天和第 7 天再次激活经共同培养的 T 细胞用于 Th 分析。由 IL-4 和 INF- γ ICCS 对 T 细胞进行的第 6 天和第 7 天的分析结果均证实 LV 转导后 Th1 应答受到损伤(分别从 37.5%和 20%降到 15.6%和 10%)。然而,仅补充外源性 IL-12 可部分地纠正受损的 Th1 应答(分别为,单独补充 IL-12 时从 15.6%和 10%恢复到 19.1%和 11.7%, IL-12+FL 时恢复到 18.7%和 13.2%),而单独补充 FL 时无作用(分别从 15.6%和 10.0%到 14.6%和 8.8%)。在其它使用更高浓度可溶性 IL-12 的实验中,受损的 Th1 应答完全得到纠正。

10 为了设计具有增强的关键细胞因子内源性表达的 DC,构建并检验编码不同细胞因子的 LV,该等细胞因子包括 FL、IL-7、CD40L、双顺反子 L-12 及三顺反子 IL-12/GM-CSF (图 1)。用仅携带有报告基因的 LV 转导 DC,或用表达不同细胞因子的 LV 共转导 DC。通过 DC: T 细胞共培养物检定研究 LV 所转导 DC 的 Th 功能,并且 12 天后,如上所述再激活 T 细胞,并由 ICCS 和流式细胞术进行分析。结果显示,单独的 LV 报告载体转导导致降低的 Th1 进展(从 54.6%降到 37.7%)。然而,用编码双顺反子 IL-12、三顺反子 IL-12/GM-CSF 和 IL-7 的 LV 共同转导 DC,可有效地增强 Th1 应答,分别从 37.7%增到 56.2%、56.2%和 50.7%。编码其它免疫调节基因(如 FL、GM-CSF 或 CD40L)的 LV 未显示出任何纠正作用。

由表达针对 IL-10 的小干扰 RNA 调节 DC 功能。构建编码针对 IL-10 的小干扰 RNA (small interfering RNA) 的 LV。选择 IL-10 mRNA 中的两个区域作为 RNA 干扰靶位(图 2)。由人 H1 pol III 启动子驱动 siRNA 表达盒,并将其逆向克隆到 LV 中。LV-siRNA 载体还在邻近 pol III siRNA 处携带有 nlacZ 报告基因,以用于滴定度的测定。用报告 LV 和针对 IL-10 的 LV-siRNA 共同转导 DC,接着在经 LPS 处理和 ICCS 后如上所述分析 IL-10 表达。结果再次显示,单独的 LV 转导上调 IL-10 表达,而与针对 IL-10 的 LV-siRNA 进行共同转导下调 IL-10 的表达。接着将两种 IL-10 LV-siRNA 构造与 LV 共同转导和 DC: T 共培养物 Th1 功能检定中的 LV-IL-7 相比较。激活共培养的天然 T 细胞,并且在再次活化和 Th 细胞因子分析之前使其休眠 20 天。IL-4 和 IFN- γ ICCS 的结果表明,两种 IL-10

LV-siRNA 载体均增强 Th1 应答, 并且#2 IL-10 LV-siRNA 显示出与 LV-IL-7 相当或高于 LV-IL-7 的水平的 Th1 应答增强。另一种 Th1 细胞因子 TNF α ICCS 的分析进一步证实了所述结果。

其它实施例

- 5 应了解, 当已结合本发明的详细说明对其做出描述时, 前述描述的目的在于说明而不是限制本发明的范畴, 本发明的范畴由附加的权利要求界定。举例而言, 可以使用非慢病毒方法将克服 LV 诱导的 DC 损伤的试剂导入到靶 DC 中, 例如使用其它病毒载体或非基于载体的方法来进行。本发明的其它方面、优点和修改均从属于以上权利要求的范畴。

10

	<110>	郎基•常	
5	<120>	经修饰的树突状细胞	
	<130>	7655-1WO	
	<160>	2	
10	<170>	PatentIn version 3.2	
	<210>	1	
	<211>	53	
15	<212>	RNA	
	<213>	human	
	<400>	1	
20		agccaugagu gaguugacu ucaagagagu caaacucacu cacucauggc uuu	53
	<210>	2	
	<211>	49	
	<212>	RNA	
25	<213>	human	
	<400>	2	
30		ggguuaccug gguugccaau ucaagagauu ggcaaccag guaaccuu	49

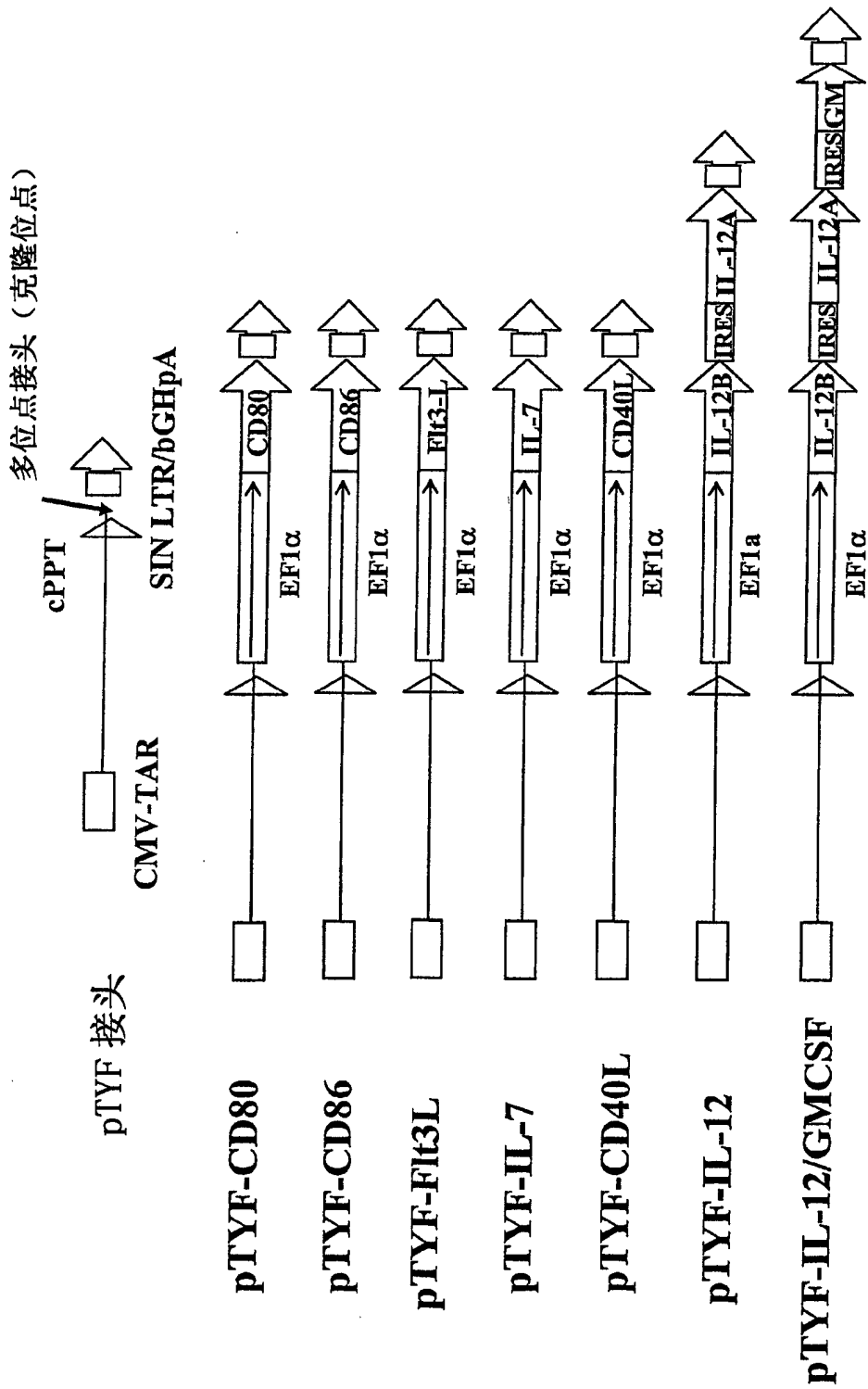


图 1

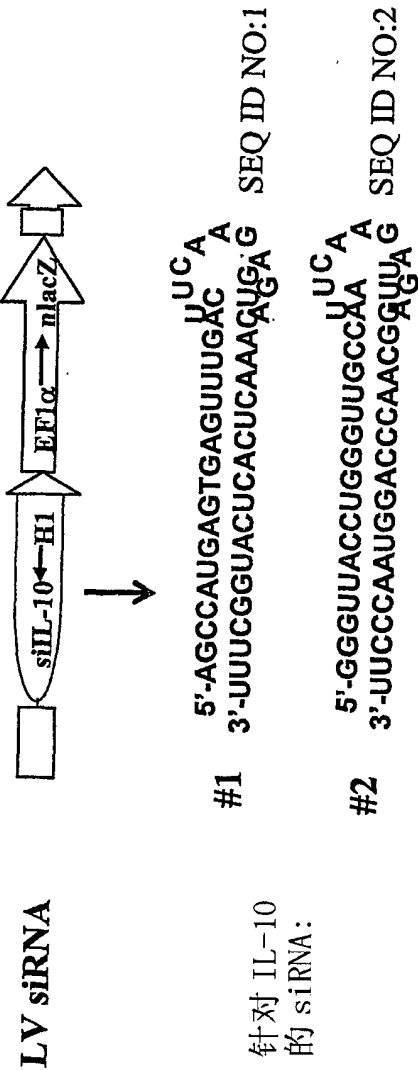


图 2