



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112243382 A

(43) 申请公布日 2021.01.19

(21) 申请号 201980009289.4

(22) 申请日 2019.01.18

(30) 优先权数据

62/619,018 2018.01.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/014352 2019.01.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/144047 EN 2019.07.25

(71) 申请人 南佛罗里达大学

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 C·曹 X·林 Y·洪

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陈扬扬 陶家蓉

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G12N 5/071 (2010.01)

G12N 5/00 (2006.01)

G12N 5/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书19页 附图18页

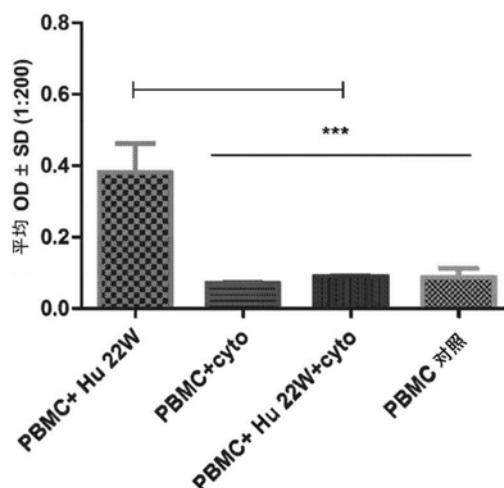
(54) 发明名称

死抗原刺激的未成熟异源性树突细胞作为疾病治疗剂

(57) 摘要

本文公开了外源性抗原致敏的未成熟树突细胞。树突细胞也可以是死的。外源性抗原致敏的未成熟树突细胞可用于引发增加的免疫反应。还提供了包含外源性抗原致敏的未成熟树突细胞的疫苗,在患者中诱导免疫反应的方法,和治疗疾病的方法。

人22W 1-42 DC IP第三次血浆  
成熟对比未成熟



1. 一种用于患者的疫苗,所述疫苗包含抗原致敏的未成熟树突细胞,其中所述树突细胞对于所述患者是外源的。
2. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述树突细胞来自与患者相同物种的对象。
3. 如权利要求2所述的疫苗,其中所述树突细胞来自比患者年轻并且与患者相同物种的对象。
4. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述树突细胞来自与患者不同物种的对象。
5. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞是死的。
6. 如权利要求5所述的疫苗,其中所述树突细胞通过超声处理,热处理,冻干或其组合被杀死。
7. 如权利要求5所述的疫苗,其中所述树突细胞是裂解细胞或其一部分。
8. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞尚未通过用选自TNF $\alpha$ , IL6和IL1 $\alpha$ 的细胞因子刺激而成熟。
9. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中与包含成熟树突细胞的疫苗相比,所述疫苗诱导增加的免疫反应。
10. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗诱导与由包含患者自体的树突细胞的疫苗诱导的反应类似的免疫反应。
11. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞通过与抗原接触而被抗原致敏。
12. 如权利要求11所述的疫苗,其中所述树突细胞在体外与所述抗原接触。
13. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述抗原包括肽,蛋白质,碳水化合物,脂质或其组合。
14. 如权利要求13所述的疫苗,其中所述抗原包括肽。
15. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞来源于血液或骨髓。
16. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。
17. 一种在患者中诱导免疫反应的方法,所述方法包括向所述患者给予如权利要求1-16中任一项所述的疫苗。
18. 如权利要求17所述的方法,其中所述疫苗激活T细胞反应,T细胞免疫,B细胞反应或其组合。
19. 如权利要求17或18所述的方法,其中所述疫苗以多剂量给予所述患者。
20. 如权利要求19所述的方法,其中所述疫苗每两周向所述患者给药一次。
21. 如权利要求17-20中任一项所述的方法,其中所述患者患有选自癌症,自身免疫病,感染性疾病和神经疾病的疾病。
22. 如权利要求21所述的方法,其中所述神经疾病包括阿尔茨海默氏病(AD)。
23. 一种配制疫苗的方法,所述方法包括:  
获得未成熟树突细胞;  
使未成熟树突细胞与抗原接触以形成未成熟抗原致敏的树突细胞;和  
配制包含未成熟抗原致敏的树突细胞和药学上可接受的运载体的疫苗。
24. 如权利要求23所述的方法,还包括杀死未成熟的抗原致敏的树突细胞。

25. 如权利要求24所述的方法,其中杀死包括超声处理,热处理,冻干或其组合。
26. 如权利要求23-25中任一项所述的方法,其中所述树突细胞来源于血液或骨髓。
27. 如权利要求26所述的方法,其中所述树突细胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。

## 死抗原刺激的未成熟异源性树突细胞作为疾病治疗剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年1月18日提交的美国临时申请第62/619,018号的优先权,其通过引用全文纳入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及树突细胞,疫苗和包含其的治疗剂。

[0004] 引言

[0005] 抗原致敏的树突细胞(DC)已被研究并用作治疗各种疾病的疫苗。然而,一些报告表明免疫诱导需要成熟的树突细胞,而据报道,未成熟的树突细胞在癌症或病毒感染的情况下诱导免疫力差或导致临床结果差。常规疫苗还包括活DC。然而,对DC在免疫调节和应答中的功能的理解受到限制,并且很少有疗法成功地发展到临床应用。

### 发明内容

[0006] 一方面,本公开涉及用于患者的疫苗。疫苗可包括抗原致敏的未成熟树突细胞,其中所述树突细胞对于患者是外源的。在一些实施方式中,树突细胞来自与患者相同物种的对象。在一些实施方式中,树突细胞来自比患者年轻并且与患者相同物种的对象。在一些实施方式中,树突细胞来自与患者不同物种的对象。在一些实施方式中,树突细胞是死的。在一些实施方式中,树突细胞通过超声处理,热处理,冻干或其组合被杀死。在一些实施方式中,树突细胞是裂解的细胞或其一部分。在一些实施方式中,树突细胞尚未通过用选自TNF $\alpha$ , IL6和IL1 $\alpha$ 的细胞因子刺激而成熟。在一些实施方式中,与包含成熟树突细胞的疫苗相比,该疫苗诱导增加的免疫反应。在一些实施方式中,疫苗诱导与由包含患者自体的树突细胞的疫苗诱导的应答类似的免疫反应。在一些实施方式中,树突细胞通过与抗原接触而被抗原致敏。在一些实施方式中,使树突细胞与抗原体外接触。在一些实施方式中,抗原包括肽,蛋白质,碳水化合物,脂质或其组合。在一些实施方式中,抗原包含肽。在一些实施方式中,树突细胞衍生自血液或骨髓。在一些实施方式中,树突细胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。

[0007] 在另一方面,本公开涉及在患者中诱导免疫反应的方法。该方法可以包括向患者给予本文详述的疫苗。在一些实施方式中,疫苗激活T细胞应答,T细胞免疫,B细胞应答或其组合。在一些实施方式中,疫苗以多剂量给予患者。在一些实施方式中,疫苗每两周给予患者。在一些实施方式中,患者患有选自癌症,自身免疫病,感染性疾病和神经疾病的疾病。在一些实施方式中,神经疾病包括阿尔茨海默氏病(AD)。

[0008] 本公开的另一方面提供了配制疫苗的方法。该方法可以包括获得未成熟树突细胞;使未成熟树突细胞与抗原接触以形成未成熟抗原致敏的树突细胞;和配制包含未成熟抗原致敏树突细胞和药学上可接受的运载体的疫苗。在一些实施方式中,该方法进一步包括杀死未成熟的抗原致敏的树突细胞。在一些实施方式中,杀死包括超声处理,热处理,冻干或其组合。在一些实施方式中,树突细胞衍生自血液或骨髓。在一些实施方式中,树突细

胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。

[0009] 根据下面的详细描述和附图,本公开提供了其他方面和实施方式,这些方面和实施方式将是显而易见的。

### 附图说明

[0010] 图1A和图1B是示出树突细胞成熟的流式结果和作为疫苗的肽致敏的成熟和未成熟树突细胞的免疫反应的两个图。图1A是树突细胞成熟的流式细胞仪结果。用于此的细胞表面标志物是CD80,CD86,MHCII和CD11b。用于成熟的细胞因子是人IL1 $\alpha$ ,IL6和TNF $\alpha$ 。图1B是用肽(A $\beta$ )致敏的未成熟树突细胞(绿色),肽致敏的成熟树突细胞(蓝色),成熟的树突细胞(红色)和未成熟的树突细胞(黄色)疫苗接种后抗-A $\beta$ 抗体检测的ELISA结果。仅肽致敏的未成熟树突细胞以疫苗方式诱导抗体反应,而成熟的树突细胞则无法诱导抗体反应。

[0011] 图2A,图2B和图2C是显示疫苗接种后的抗体反应和表位作图结果的图。图2A是在用完整肽致敏的树突细胞或通过超声处理裂解10秒的同一批细胞两次接种后,针对在22氨基酸(22W)处具有突变的人A $\beta$ 42的抗体应答。按照Cao等的方法,从2月龄的BALB/c小鼠骨髓中制备树突细胞(Cao C.等,J.Neuroimmunol.2008,200,1-10)。然后将 $1 \times 10^6$ 个完整细胞或裂解细胞注入2月龄的BALB/c小鼠中,然后在两周后用相同的疫苗加强免疫。第二次疫苗接种后10天收集血液。通过腹膜内注射向两只小鼠( $n=2$ )注射完整细胞,并且向三只小鼠注射细胞碎片(致敏抗原: $n=3$ )。完整细胞和裂解的细胞碎片均诱导高抗体反应,如左图所示,两组之间无明显差异( $P>0.05$ )。图2B是针对所有突变肽和片段的表位作图。我们从每组中选择一份血浆,然后测试针对不同肽的抗体。如图所示,两种血清对所有肽无差异,因此表位相同。图2B的右图显示了针对图2B的左图所示的相同的两个抗血清测试的野生型A $\beta$ 肽片段的表位作图的结果。同样,两种抗血清之间没有差异。图2C是完整细胞与超声处理的细胞的流式细胞仪结果。粒径远小于完整细胞,因此大多数细胞被超声破碎。

[0012] 图3A,图3B,图3C,图3D,图3E和图3F是显示疫苗接种后的同种分型和细胞因子表达谱的结果的图。第三次疫苗接种后10天收集血液,随后血浆用于通过Luminex多重分析检查Ig同种分型和细胞因子表达谱。疫苗接种后完整细胞和细胞碎片之间的炎症细胞因子没有增加。第三次疫苗接种后细胞碎片诱导了Th1应答,但第四次疫苗接种后该应答减弱了(数据未显示)。

[0013] 图4A,图4B和图4C是示出来自接种后血液的淋巴细胞的流式结果的图。我们分析了干细胞,CD4,CD8树突细胞和记忆B细胞群体,并且完整细胞和细胞碎片的结果没有差异。结果表明这两种疫苗接种之间的免疫反应没有差异。

[0014] 图5A,图5B,图5C和图5D是显示由DC诱导的免疫反应的结果。图5A是显示在老年和幼年小鼠中DC疫苗接种后的抗体反应的图。每两周向3月龄的C57/BL6小鼠和18月龄的C57/BL6小鼠注射未成熟的A $\beta$ 22W致敏DC细胞碎片。第二次注射后10天采血,并检测到针对野生型淀粉样 $\beta$ 1-42肽的抗体反应。结果表明,幼年小鼠比老年小鼠具有更多的抗体反应( $P<0.05$ , $n=4$ )。图5B,图5C和图5D是流式细胞仪结果的图。从GFP转基因小鼠制备树突细胞,并注射到C57/BL6中。抽血并通过流式细胞术测试以追踪具有荧光GFP的细胞。血液中没有阳性GFP细胞。

## 具体实施方式

[0015] 本文描述的是包含外源抗原致敏的未成熟树突细胞的疫苗,与常规疫苗相比,该树突细胞诱导改善的抗体反应,并且可用作各种疾病的治疗剂。疫苗可包括来自与给予疫苗的患者不同的物种的抗原致敏树突细胞。发现抗原致敏的未成熟树突细胞比成熟的树突细胞引起更早和更好的免疫反应。还发现,经裂解的抗原致敏树突细胞与活抗原致敏树突细胞在诱导免疫反应方面一样有效,并且当用作疗法时,相对于自体树突细胞,外源树突细胞对受体即患者没有不利影响。通用冻干的树突细胞裂解物可以用作疫苗,而不是受限于具有活的自体树突细胞的疫苗。死的外源抗原致敏的未成熟树突细胞或其部分(如本文所详述)可用于疫苗和疗法,并且与传统疫苗相比,它们可显著降低存储,运输,制备和转移的成本,并提高可用性,通用性和有效性。

### [0016] 1. 定义

[0017] 除非另外定义,本文中所使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。若有抵触,以本文件(包括定义)为准。虽然在本发明的实施或测试中可以采用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料,但下文描述了优选的方法和材料。本文中述及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用全文纳入本文。本文公开的材料、方法和实施例都仅是说明性的,不构成限制。

[0018] 本文所用术语“包括”、“包含”、“具有”、“有”、“可以”、“含有”及其变体旨在成为开放式过渡短语、术语或词,其不排除其他作用或结构的可能性。除非文中另有明确说明,否则如本文中所用的单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数指代形式。本公开还预期其他实施方式“包括”,“由……构成”和“基本上由……构成”在此提出的实施方式或元件,无论是否明确提出。

[0019] 为了列举本文的数值范围,明确考虑了它们之间具有相同精确度的每个中间数字。例如,对于6-9的范围,除了6和9外,数字7和8也可以考虑,并且对于6.0-7.0的范围,明确考虑了数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0020] 与数量结合使用的修饰语“约”包括所述值,并且具有上下文所指示的含义(例如,它至少包括与特定数量的测量相关的错误程度)。修饰词“约”也被认为公开了由两端点的绝对值所限定的范围。例如,“约2至约4”的表述也公开了“2至4”的范围。术语“约”可以指所指示数字的正负10%。例如,“约10%”可以表示9%至11%的范围,并且“约1”可以表示0.9-1.1。从上下文中,“约”的其他含义可能很明显,例如四舍五入,因此,例如“约1”也可能表示0.5到1.4。在一些实施方式中,本文所用术语“约”在应用于感兴趣的一个或多个值时,指与所述参照值相似的值。在某些方面中,术语“约”指落入所述参照值任一方向(大于或小于)上20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的比例内的数值范围,除非另有说明或从上下文中可以明显地看出(除非该数字超过可能值的100%)。

[0021] 本文所用术语“氨基酸”指天然产生的和非天然合成的氨基酸,以及作用方式类似于天然产生氨基酸的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然产生的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸。在本文中,氨基酸可用IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的通用三字母符号或单字母符号表示。氨基酸包括侧链和多肽主链部分。

[0022] 本文可互换使用的术语“淀粉样- $\beta$ ”,“淀粉样 $\beta$ ”,“A- $\beta$ ”,“A $\beta$ ”或“A贝塔”是指在大

脑中存在的36至43个氨基酸的肽。淀粉样- $\beta$ 是由 $\beta$ -和 $\gamma$ -分泌酶顺序切割淀粉样蛋白前体蛋白(APP),一种跨膜糖蛋白后形成的。淀粉样 $\beta$ 肽的最常见同种型的长度为40个氨基酸(A $\beta$ 40)和长度为42个氨基酸(A $\beta$ 42)。A $\beta$ 40形式是这两种形式中最常见的形式,但A $\beta$ 42可能具有更多的原纤维生成性。淀粉样- $\beta$ 的聚集可能导致阿尔茨海默氏病。

[0023] “自身免疫性疾病”或“自身免疫性病征”是指由对正常身体部位的异常免疫反应引起的病症。自身免疫性疾病可包括例如类风湿性关节炎(RA),系统性红斑狼疮,炎性肠病,1型糖尿病,格林-巴利综合征,慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病,牛皮癣,格雷夫病,桥本氏甲状腺炎,重症肌无力,血管炎和多发性硬化症(MS)。

[0024] 如本文所用,“癌症”可包括源自肿瘤,赘生物,癌症,癌前癌,细胞系,恶性症的任何细胞或组织,或具有可能无限扩增和生长的任何其他细胞来源。癌细胞可能来自自然来源,也可能是人工产生的。癌细胞也可能能够侵入其他组织并转移。癌细胞还包括侵入其他组织和/或转移的任何恶性细胞。在生物背景下,一个或多个癌细胞也可以称为癌症,肿瘤,赘生物,生长,恶性症,或本领域中用于描述癌态细胞的任何其他术语。实体瘤的示例可包括纤维肉瘤,粘液肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,成骨肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,淋巴管内皮细胞肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤文氏瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,结直肠癌,肾癌,胰腺癌,骨癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,食道癌,胃癌,口腔癌,鼻咽癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎癌,肾母细胞瘤,宫颈癌,子宫癌,睾丸癌,小细胞肺癌,膀胱癌,肺癌,上皮癌,神经胶质瘤,多形性胶质母细胞瘤,星形细胞瘤,成神经管细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突神经胶质瘤,脑膜瘤,皮肤癌,黑色素瘤,神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。其他癌症可包括血源性癌症,例如急性淋巴细胞白血病(ALL),急性淋巴细胞性B细胞白血病,急性淋巴细胞性T细胞白血病,急性髓细胞白血病(AML),急性早幼粒细胞白血病(APL),急性单核细胞白血病,急性红白血病,急性巨核细胞白血病,急性髓细胞白血病,急性非淋巴细胞白血病,急性未分化白血病,慢性粒细胞白血病(CML),慢性淋巴细胞白血病(CLL),毛细胞白血病,多发性骨髓瘤,成淋巴细胞白血病,髓性白血病,淋巴细胞白血病,髓细胞白血病,霍奇金疾病,非霍奇金淋巴瘤,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,重链疾病和真性红细胞增多症。

[0025] 术语“对照”、“参照水平”和“参照”在本文中可互换使用。参照水平可以是预定值或范围,其用作评估测量结果所依据的基准。如本文所用,“对照组”是指一组对照对象。预定水平可以是来自对照组的截止值。预定水平可以是来自对照组的平均值。截止值(或预定的截止值)可以通过自适应索引模型(AIM)方法来确定。截止值(或预定的截止值)可以通过来自患者组的生物样品的接收器操作曲线(ROC)分析来确定。如生物学领域一般所知,ROC分析是确定测试将一种状况与另一种状况区分开的能力,例如确定每种标志物在鉴定患有CRC的患者中的表现。P.J.Heagerty等提供了ROC分析的说明(Biometrics 2000,56,337-44),其公开内容通过引用全文纳入本文。或者,可以通过对患者组的生物学样品的四分位数分析来确定截止值。例如,可以通过选择与第25百分位至第75百分位范围内的任何值相对应的值来确定截止值,优选地,该值对应于第25百分位,第50百分位或第75百分位,并且更优选地为第75百分位。可以使用本领域中已知的任何方法来执行这样的统计分析,并且

可以通过任何数量的商业上可获得的软件包来实现这种统计分析(例如,来自英国利兹的Analyse-it软件公司(Analyse-it Software Ltd);德克萨斯州学院站的StataCorp公司(StataCorp LP);北卡罗来纳州凯瑞的SAS研究所公司(SAS Institute Inc.))。靶标或活性的健康或正常水平或范围可以根据标准实践来定义。对照可以是成熟的树突细胞或已经给予了成熟的树突细胞的对象。对照可以是活树突细胞或已经给予了活树突细胞的对象。对照可以是非抗原刺激的树突细胞或已经给予了非抗原刺激的树突细胞的对象。对照可以是没有如本文详述的树突细胞的对象。对照可以是已知疾病状态的对象或其样品。对象或来自其的样品可以是健康的,患病的,在治疗前患病的,在治疗期间患病的,或在治疗后患病的,或其组合。

[0026] “免疫反应”反应是指响应抗原的引入的对象免疫系统的活化,例如哺乳动物的免疫系统。免疫反应可以是细胞应答或体液应答或两者的形式。

[0027] “感染性疾病”是指由感染引起的疾病。感染是指致病物对于对象组织的入侵,它们的繁殖以及对象组织对感染物及其产生的毒素的反应。感染物可包括病毒,类病毒,病毒,朊病毒,细菌,原生动物,线虫(如寄生性蛔虫和蛲虫),节肢动物(如蜱虫,螨,跳蚤和虱子),真菌(如癣菌)和其他大寄生虫(如绦虫和其他蠕虫)。感染性疾病可能包括但不限于由任何类型的微生物(例如细菌,真菌(例如,念珠菌,曲霉病)和病毒(例如,与疱疹病毒有关的疾病,与HIV有关的疾病,流感),寄生虫(例如疟疾,阿米巴病)或病毒(例如Creutzfeldt-Jacob病)引起的感染性疾病。

[0028] “神经疾病”是指中枢神经系统(CNS)疾病,其特征是神经细胞受损,有缺陷,有功能障碍或缺陷或由其引起。如本文所用,CNS的疾病或病症是指影响对象的脊髓(例如,脊髓病)或大脑(例如,脑病)的病症,其可以表现出神经和/或精神病症状。中枢神经系统疾病包括许多神经退行性疾病和精神疾病。在一些实施方式中,该疾病或病症是发育障碍,认知障碍,退行性疾病,神经精神疾病或脑损伤。在一些实施方式中,发育障碍是小脑症。在一些实施方式中,认知障碍选自安格曼综合症和精神分裂症。在一些实施方式中,退行性疾病是阿尔茨海默氏病。在一些实施方式中,神经精神疾病选自精神分裂症和双相情感障碍。在一些实施方式中,脑损伤是创伤性脑损伤(TBI)。在一些实施方式中,所述疾病或病症选自:小脑症,脆性X综合征,威廉氏综合症,雷特氏综合症,唐氏综合症,安格曼综合症,自闭症,局部缺血,癫痫症,低氧症,帕金森氏病,亨廷顿舞蹈病,阿尔茨海默氏病,颤蛋白(Reelin)缺乏症,精神分裂症,双相情感障碍,神经退行性疾病,头部和脊髓损伤,颅脑外伤,智力低下,痴呆,双相情感障碍,中风,多发性硬化症,肌萎缩性侧索硬化症,神经源性疾病,药物诱发的神经毒性,毒素诱发的神经毒性,眼损伤,视网膜病变以及与年龄有关的认知能力下降。

[0029] 本文可互换使用的“药学上可接受的赋形剂”,“药学上可接受的稀释剂”,“药学上可接受的运载体”或“药学上可接受的佐剂”是指可用于制备药物组合物的赋形剂,稀释剂,运载体和/或佐剂,其通常是安全的,无毒的,并且在生物学和其他方面都无害,并且包括兽药和/或人类药物使用可接受的赋形剂,稀释剂,运载体和佐剂,例如美国食品和药物管理局发布的那些。

[0030] 本文所用的“多核苷酸”可以是单链或双链的,或者可以含有双链和单链序列的部分。该多核苷酸可以是核酸,天然或合成的,DNA,基因组DNA,cDNA,RNA或杂合体,其中该多核苷酸可以包含脱氧核糖和核糖核苷酸的组合,以及包括尿嘧啶,腺嘌呤,胸腺嘧啶,胞嘧



啶,鸟嘌呤,肌苷,黄嘌呤次黄嘌呤,异胞嘧啶和异鸟嘌呤的碱基的组合。多核苷酸可以通过化学合成方法或重组方法获得。

[0031] “肽”或“多肽”是通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的连接序列。多肽可以是天然的,合成的,或天然和合成的修饰或组合。肽和多肽包括蛋白质,例如结合蛋白,受体和抗体。术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”在本文中可互换使用。“一级结构”是指特定肽的氨基酸序列。“二级结构”是指多肽内的局部有序的三维结构。这些结构通常称为结构域,例如酶结构域,细胞外结构域,跨膜结构域,孔结构域和细胞质尾结构域。“结构域”是形成多肽的紧密单位的多肽部分,通常长15至350个氨基酸。示例性结构域包括具有酶活性或配体结合活性的结构域。典型的结构域由组织较少的部分组成,例如, $\beta$ -折叠和 $\alpha$ -螺旋片段。“三级结构”是指多肽单体的完整三维结构。“四级结构”是指由独立的三级单元的非共价结合形成的三维结构。“基序”是多肽序列的一部分,并且包括至少两个氨基酸。基序的长度可以是2至20、2至15或2至10个氨基酸。在一些实施方式中,基序包含3、4、5、6或7个连续氨基酸。结构域可以由一系列相同类型的基序组成。

[0032] 如本文所用,“样品”或“测试样品”可以意指其中将要检测或确定靶标的存在和/或水平的任何样品,或如本文详述的包含DC的任何样品。样品可以包括液体,溶液,乳液或悬浮液。样品可以包括医学样品。样本可能包括任何生物流体或组织,例如血液,全血,血液组分(例如血浆和血清),肌肉,间质液,汗液,唾液,尿液,眼泪,滑液,骨髓,脑脊液,鼻分泌物,痰,羊水,支气管肺泡灌洗液,胃灌洗,呕吐,粪便,肺组织,外周血单核细胞,总白细胞,淋巴结细胞,脾细胞,扁桃体细胞,癌细胞,肿瘤细胞,胆汁,消化液,皮肤或其组合。在一些实施方式中,样品包含等分试样。在其他实施方式中,样品包含生物流体。样品可以通过本领域已知的任何手段获得。样品可以直接从患者那里获得,也可以进行预处理,例如通过过滤,蒸馏,提取,浓缩,离心,干扰组分失活,添加试剂等方法,以本文讨论的某种方式或本领域已知的方式改变样品的特性。

[0033] 如本文所用,“对象”可以意指需要或正需要本文描述的DC或方法的哺乳动物。对象可以是患者。对象可以是人类或非人类动物。对象可以是哺乳动物。哺乳动物可以是灵长类动物或非灵长类动物。哺乳动物可以是灵长类动物,例如人;非灵长类动物,例如狗,猫,马,牛,猪,小鼠,大鼠,骆驼,美洲驼,山羊,兔子,绵羊,仓鼠和豚鼠;或非人类的灵长类动物,例如猴子,黑猩猩,大猩猩,猩猩和长臂猿。对象可以是雄性。对象可以是雌性。在一些实施方式中,对象是人。该对象可以处于任何年龄或发育阶段,例如成年,青少年或婴儿。在一些实施方式中,对象具有特异性遗传标志物。对象可以被诊断患有疾病或有患疾病的风险。对象或患者可能正在接受其他形式的治疗。

[0034] “基本上相同”可以表示第一和第二氨基酸序列在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100个氨基酸的区域上达到至少60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,或99%相同。

[0035] 当涉及保护对象免受疾病侵害时,“治疗”或“处理”是指抑制、阻遏、改善或完全消除疾病。预防疾病包括在疾病发作之前向对象给予本发明的组合物。抑制疾病包括在诱导疾病之后但在其临床出现之前向对象给予本发明的组合物。抑制或改善疾病包括在疾病的临床出现后向对象给予本发明的组合物。

[0036] 本文所用的“变体”，当用于描述多核苷酸时，指(i) 参照核苷酸序列的部分或片段；(ii) 参照核苷酸序列或其部分的互补物；(iii) 与参照多核苷酸或其互补物基本相同的多核苷酸；或(iv) 在严谨条件下与参照多核苷酸、其互补物或与其基本相同的序列杂交的多核苷酸。

[0037] “变体”可以进一步定义为通过氨基酸的插入，缺失或保守取代而在氨基酸序列上不同但仍保留至少一种生物活性的肽或多肽。“生物活性”的代表性实例包括与特异性抗体或多肽结合或促进免疫反应的能力。变体可以表示基本相同的序列。变体可以表示其功能片段。变体也可以表示多肽的多个拷贝。多个拷贝可以串联或由接头分隔。变体也可表示这样的多肽，其氨基酸序列与保留至少一种生物活性的多肽的参照氨基酸序列基本相同。氨基酸的保守取代，即，其中氨基酸用具有相似性质(例如，亲水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸替代，在本领域中认为通常引起较小变化。这些较小变化可部分通过考虑氨基酸的亲水(hydrophobic)指数而鉴定。参见Kyte等，*J. Mol. Biol.* 1982, 157, 105-132。氨基酸的亲水指数基于对其疏水性和带电性的考虑。在本领域中已知具有相似亲水指数的氨基酸可以被取代并且仍然保留蛋白质功能。在一个方面中，取代具有 $\pm 2$ 亲水指数的氨基酸。氨基酸的亲水性也可用于揭示能够获得保留生物功能的多肽的取代。就多肽而言，对于氨基酸的亲水性的考虑允许计算该多肽的最大局部平均亲水性，其已被报道为与抗原性和免疫原性良好相关的有用度量，如美国专利4,554,101中所述，通过引用全文纳入本文。具有相似亲水性值的氨基酸的取代可导致保留生物活性(例如免疫原性)的多肽，如本领域所理解。取代可采用彼此的亲水性值在 $\pm 2$ 以内的氨基酸进行。氨基酸的疏水性指数和亲水性值均受该氨基酸的具体侧链的影响。与该观察结论相一致，与生物功能相容的氨基酸取代理解为取决于那些氨基酸的相对相似性，尤其是那些氨基酸的侧链，如由疏水性、亲水性、带电性、大小和其它性质所揭示的那样。

[0038] 变体可以是在完整基因序列或其片段的全长上基本相同的多核苷酸序列。多核苷酸序列在基因序列或其片段的全长上可以是80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或100%相同的。变体可以是在氨基酸序列或其片段的全长上基本相同的氨基酸序列。氨基酸序列可以在氨基酸序列或其片段的全长上是80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或100%相同的。

## [0039] 2. 树突细胞

[0040] 树突细胞(DC)是抗原呈递细胞(APC)。DC的主要功能是处理抗原物质并将其在细胞表面呈递给免疫系统的T细胞。DC充当先天性和适应性免疫系统之间的信使，并且对于引发T细胞介导的免疫反应非常重要。DC也可以称为职业APC。DC可能存在于与外部环境接触的组织中，例如皮肤，鼻子的内壁，肺，胃和肠。DC可能以未成熟的形式存在于非淋巴组织中，在那里它们能够内化抗原。血液中的DC也可以处于未成熟状态。

[0041] 在一些实施方式中，如本文详述的DC可以用作免疫调节剂。在一些实施方式中，DC可以配制成疫苗。DC可以用作各种疾病的疗法。与成熟DC相比，所述DC可诱导增加的免疫反应，并诱导与自体DC相似的免疫反应。

[0042] 如本文详述的DC可以是未成熟的，抗原致敏的，死亡的或外源的或其组合。

### [0043] a. 未成熟的树突细胞

[0044] 在一些实施方式中,本文详述的DC是未成熟的。未成熟的DC具有较低的T细胞活化潜能。未用炎性细胞因子例如TNF $\alpha$ , IL6或IL1 $\alpha$ 或其组合刺激未成熟的DC。用炎性细胞因子刺激可将DC转换为免疫刺激模式。该过程被称为“成熟”,并与树突细胞表型和功能的变化有关,包括上调共刺激分子和粘附分子以及不同趋化因子受体的表达。

[0045] 相反,成熟的DC是已经被炎性细胞因子例如TNF $\alpha$ , IL6或IL1 $\alpha$ 或其组合刺激的DC。使用的细胞因子的数量和类型,暴露的持续时间以及未成熟树突细胞与细胞因子接触的日期可能会有所不同。本领域技术人员可以采用常规的临床和实验室手段来优化未成熟树突细胞系统的有效性。例如,未成熟的DC可以在与炎性细胞因子接触之前培养约2、3、4、5、6、7、8、9或10天。在一些实施方式中,在与炎性细胞因子接触之前,将DC培养约4、5、6或7天。然后可将DC与炎性细胞因子接触约1、2、3、4或5天。在一些实施方式中,使DC与炎性细胞因子接触约3天。例如,可以将抗原添加到含有GM-CSF和/或IL4的组织培养基中。然后可以将DC再培养几天而不暴露于炎性细胞因子。相对于成熟DC,未成熟DC可能很少表达或根本不表达CD80, CD83, CD86或其组合等的标志物,或表达水平降低。未成熟的DC可能会以高于成熟DC的水平表达诸如CD11c的标志物。与未成熟的DC相比,成熟的DC可以增加或更高的水平表达诸如CD80, CD83, CD86或其组合的标志物。成熟的DC可能几乎不或根本不表达标志物(例如CD11c),或者相对于未成熟的DC降低水平表达。与成熟的树突细胞相比,本文详述的未成熟的DC可诱导增加的免疫反应。未成熟的DC可以诱导比成熟的DC所诱导的免疫反应大至少约2倍,至少约2.5倍,至少约3倍,至少约3.5倍,至少约4倍,至少约4.5倍,至少约5倍,至少约6倍,至少约7倍,至少约8倍,至少约9倍,至少约10倍,至少约15倍,至少约20倍,至少约25倍,至少约30倍,至少约35倍,至少约40倍,至少约45倍或至少约50倍的免疫反应。在一些实施方式中,未成熟的DC诱导的免疫反应比成熟的DC诱导的免疫反应大至少约4倍。在一些实施方式中,未成熟的DC诱导的免疫反应比成熟的DC诱导的免疫反应大至少约5倍。在一些实施方式中,未成熟的DC诱导的免疫反应比成熟的DC诱导的免疫反应大至少约5.5倍。在一些实施方式中,未成熟的DC诱导的免疫反应比成熟的DC诱导的免疫反应大至少约6倍。在一些实施方式中,未成熟的DC诱导的免疫反应比成熟的DC诱导的免疫反应大至少约6.5倍。

[0046] b. 抗原致敏树突细胞

[0047] 未成熟的DC可以与需要增加针对其的免疫反应的一种或多种抗原接触,以形成抗原致敏的未成熟DC。抗原可包括肽,蛋白质,碳水化合物,脂质或其组合。在一些实施方式中,抗原包含肽。

[0048] 未成熟DC的培养物可在或约在培养的第1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天与目标抗原接触足以允许由未成熟的DC摄取抗原的时间。抗原暴露的持续时间可以变化。例如,使用0.1-10 $\mu$ g/mL的目标抗原时,抗原暴露的持续时间可能少于1-2天。然后可以将未成熟的DC再培养几天而不暴露于抗原。取决于特定目标抗原,使用的抗原的量,暴露的持续时间以及未成熟树突细胞与抗原接触的日期可能会有所不同。本领域技术人员可以采用常规的临床和实验室手段来优化未成熟树突细胞系统的有效性。例如,未成熟的DC可以在GM-CSF和IL4存在于37 $^{\circ}$ C和5%CO $_2$ 下培养。在一些实施方式中,DC在体外与抗原接触。

[0049] 在抗原摄取之后,DC可以是可操的,以从非淋巴组织迁移至区域淋巴结,作为产生T细胞介导的免疫反应的步骤。在淋巴结中,DC可以与T细胞和/或B细胞相互作用,以启动和塑造适应性免疫反应。DC可以激活T细胞,启动T细胞免疫,启动B细胞反应,或其组合。DC可

以激活CD4+辅助T细胞和CD8+细胞毒性T细胞。

[0050] c. 死树突细胞

[0051] 常规的DC疫苗或疗法使用活DC,通常是因为将抗原致敏的树突细胞归巢至淋巴系统被视为启动免疫反应的必要步骤。然而,如实施例中详述的,一旦抗原在体外存在,DC的活力对于引发免疫反应不是必需的。如本文详述的DC可以是活细胞或完整活细胞。在其他实施方式中,本文详述的DC是死的。死DC是无法生长或倍增的DC。DC可以是完整的死细胞,或死细胞的部分。杀死DC可以通过本领域已知的任何合适的手段来执行。DC可以通过化学或物理方法杀死。例如,DC可以通过包括超声处理,裂解,热处理,冻干或其组合的方法被杀死。在一些实施方式中,DC被超声处理。在一些实施方式中,DC被冻干。在一些实施方式中,将DC超声处理,然后冻干。在一些实施方式中,DC是裂解的细胞或其一部分。死DC可以存储在任何合适的温度下,例如0-100℃,低温,高温,体温,环境温度或室温。在一些实施方式中,死DC被存储在环境温度或室温下。抗原致敏的未成熟DC也可以冷冻保存或以其他方式处理。与活DC相比,死DC可以使存储和/或运输更快,更容易或更经济高效,或者是它们的组合。

[0052] d. 外源树突细胞

[0053] 常规DC疫苗使用源自自体细胞的DC。如本文详述,相对于自体树突细胞,当用作治疗时,外源树突细胞对患者没有不利影响。DC可能是外源的。“外源的”也可以称为“异源的”。“外源的”可以意指源自与患者不同的任何对象。“外源的”可以指衍生自或源自与对象相同物种,相同属,相同性别,相似年龄,不同物种,不同属,不同性别,或不同年龄的不同个体的对象,或其组合。DC可以源自对于患者而言外源的对象。DC可以是跨物种的。DC可以源自与患者相同或不同物种的对象。DC可以来自比患者年长或年轻的对象。在一些实施方式中,DC来自与患者相同物种的对象。在一些实施方式中,DC来自比患者年轻并且与患者相同物种的对象。在一些实施方式中,DC来自与患者不同物种的对象。在一些实施方式中,DC来自与患者相同属的对象。在一些实施方式中,DC来自与患者不同属的对象。在一些实施方式中,DC诱导与由患者自体的DC诱导的反应类似的免疫反应。

[0054] e. 树突细胞的分离

[0055] 分离和培养未成熟DC的方法在美国专利号5,994,126和WO 97/29182中公开,其通过引用纳入本文。简而言之,用于分离未成熟树突细胞的合适组织来源可以包括脾脏,传入淋巴,骨髓,血液和脐带血,以及在给予细胞因子如G-CSF或FLT-3配体后引起的血细胞。在一些实施方式中,DC衍生自血液或骨髓。在一些实施方式中,DC是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。在一些实施方式中,可以在培养前用刺激造血的物质例如G-CSF和FLT-3配体处理组织来源,以增加树突细胞前体相对于其他细胞类型的比例。其他实例可包括但不限于GM-CSF, M-CSF, TGF- $\beta$ , 血小板生成素或其组合。

[0056] 预处理也可以用于使组织来源更适合于体外培养。本领域技术人员将认识到,治疗方法将可能取决于特定的组织来源。例如,可首先处理脾脏或骨髓以获得单细胞,然后进行适当的细胞分离技术以将白细胞与其他细胞类型分离,如美国专利号5,851,756和5,994,126中所述,该专利在此通过引用纳入本文。血液的治疗可能涉及细胞分离技术,以将白细胞与其他类型的细胞(包括红细胞(RBC))分离。某些细胞的去除可以通过本领域已知的标准方法来完成。

[0057] 在一些实施方式中,组织来源是血液或骨髓。在一些实施方式中,组织来源是血液。在一些实施方式中,组织来源是人血。

[0058] 在一些实施方式中,未成熟树突细胞衍生自多能血液单核细胞前体(参见例如WO 97/29182,通过引用纳入本文)。这些多能细胞通常表达CD14,CD32,CD68和CD115单核细胞标志物,很少或不表达CD83或p55或辅助分子(例如CD40和CD86)。如下所述,当在细胞因子(例如GM-CSF和IL-4或IL-13的组合)存在下培养时,多能细胞可能会产生未成熟的树突细胞。可以修饰未成熟的树突细胞(例如,使用表达IL-10的载体),以使其在体外或体内保持未成熟状态。

[0059] 本领域技术人员将认识到,考虑到此处公开的本发明的几个实施方式的目的,可以在公开的方法中引入许多修饰,以分离未成熟的树突细胞并使它们在体外和体内保持未成熟状态。

[0060] f. 树突细胞的培养

[0061] 可以将从适当的组织来源获得的细胞进行培养以形成原代培养物,例如,在补充了粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的培养基中的适当基底上,该物质可以促进多能细胞分化成未成熟的DC,如美国专利号5,851,756和5,994,126所述,其通过引用纳入本文。在一些实施方式中,基底包括细胞可以附着于其上的任何组织相容性表面。例如,基底可以是经处理用于组织培养的市售塑料。

[0062] 为了进一步提高未成熟DC的产量,除GM-CSF外,还可以将其他因子添加到培养基中,以阻断或抑制非树突细胞类型的增殖。抑制非树突细胞增殖的因子的例子可以包括白介素-4(IL-4)和/或白介素13(IL-13),它们可以抑制巨噬细胞增殖。这些物质的组合可通过优先刺激DC前体的增殖同时抑制非树突细胞类型的生长而增加培养物中未成熟DC的数量。

[0063] 在一些实施方式中,可以通过例如在塑料组织培养板上铺板单核细胞并使其附着来从血液单核细胞前体产生富集的未成熟DC群。然后可以在GM-CSF或IL-4或其组合的存在下培养塑料附着细胞,以扩大未成熟DC的群。浓度介于约200U/mL至约2000U/mL,约500U/mL至约1000U/mL或约800U/mL至约1000U/mL的GM-CSF可能产生大量不成熟的DC。浓度介于约200U/mL至约2000U/mL,约500U/mL至约1000U/mL或约800U/mL至约1000U/mL的IL-4可产生大量不成熟的DC。可以使用GM-CSF(10ng/mL)和IL-4(10-20ng/mL)的组合。细胞因子的浓度可能会在培养的不同阶段发生变化,以使新鲜培养的细胞在IL-4(1000U/mL)浓度高于建立的培养物(培养物中2天后500U/mL IL-4)的情况下培养。其他细胞因子如IL-13可以代替IL-4。

[0064] 培养的未成熟DC可能未标记成熟树突细胞上的mAb标志物。成熟的DC的标志物的实例包括表面CD83,DC-LAMP,p55,CCR-7的表达,以及高水平的MHCII和共刺激分子例如CD86的表达。可以根据典型的形态,较低水平的MHCII和共刺激分子的表达以及缺乏DC成熟标志物的表达(例如CD83的表面表达和DC-LAMP的表达以及缺乏CD14的表达)来鉴定未成熟的DC。另外,未成熟DC的阳性标志物的实例包括但不限于DC-SIGN,细胞内CD83,胰岛蛋白(Langerin)和CD1A。

[0065] 因此,通过利用本领域已知的标准抗体染色技术,可以评估任何给定培养物中未成熟DC的比例。抗体还可用于通过流式细胞术或本领域公知的其他细胞分选技术从混合细

胞培养物中分离或纯化未成熟的DC。

[0066] g. 增加的免疫反应

[0067] 一旦在淋巴结中,DC可以与T细胞和/或B细胞相互作用,以启动和形成适应性免疫反应。DC可以激活T细胞,启动T细胞免疫,启动B细胞反应,或其组合。DC可以激活CD4+辅助T细胞和CD8+细胞毒性T细胞。DC可以是未成熟的,抗原致敏的,死的,外源的或其组合,并且与成熟的DC相比可以诱导增加的免疫反应和/或诱导与自体DC相似的免疫反应。与常规DC或其他对照相比,本文详述的DC可诱导增加或增强的免疫反应。免疫反应增加或增强可能是指较早的反应,持续时间较长的反应或某些抗体或细胞因子水平升高的反应。例如,相对于对照,本文详述的DC可以增加对该抗原特异性的抗体水平。相对于对照,本文详述的DC可导致对抗原特异性的抗体的存在被更早地检测到。作为另一个例子,相对于对照,本文详述的DC可以增加细胞因子的水平。

[0068] 在一些实施方式中,如本文详述的DC引发的免疫反应比常规DC或其他对照更早开始。如本文详述的,由DC引起的免疫反应可以比常规DC或其他对照提早至少约3天,至少约5天,至少约一周,至少约1.5周,至少约两周或至少约2.5周开始。如本文详述的,由DC引起的免疫反应可以比常规DC或其他对照提早至少约5%,至少约10%,至少约15%,至少约20%,至少约25%,至少约30%,至少约35%,至少约40%,至少约45%,至少约50%,至少约55%,至少约60%,至少约65%,至少约70%,至少约75%,至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约2倍,至少约3倍,至少约4倍,至少约4.5倍,至少约5倍,至少约6倍,至少约7倍,至少约8倍,至少约9倍或至少约10倍开始。

[0069] 如本文详述的DC引起的免疫反应可以比常规DC或其他对照诱导的情况大或强至少约5%,至少约10%,至少约15%,至少约20%,至少约25%,至少约30%,至少约35%,至少约40%,至少约45%,至少约50%,至少约55%,至少约60%,至少约65%,至少约70%,至少约75%,至少约80%,至少约85%,至少约90%,至少约95%,至少约2倍,至少约2.5倍,至少约3倍,至少约3.5倍,至少约4倍,至少约4.5倍,至少约5倍,至少约6倍,至少约7倍,至少约8倍,至少约9倍,至少约10倍,至少约15倍,至少约20倍,至少约25倍,至少约30倍,至少约35倍,至少约40倍,或至少约50倍。在一些实施方式中,如本文详述的DC诱导的免疫反应比常规DC或其他对照诱导的免疫反应大或强至少约4倍。在一些实施方式中,如本文详述的DC诱导的免疫反应比常规DC或其他对照诱导的免疫反应大或强至少约5倍。在一些实施方式中,如本文详述的DC诱导的免疫反应比常规DC或其他对照诱导的免疫反应大或强至少约5.5倍。在一些实施方式中,如本文详述的DC诱导的免疫反应比常规DC或其他对照诱导的免疫反应大或强至少约6倍。在一些实施方式中,如本文详述的DC诱导的免疫反应比常规DC或其他对照诱导的免疫反应大或强至少约6.5倍。

[0070] 3. 药物组合物

[0071] 可以根据药学领域技术人员众所周知的标准技术将本文详述的DC配制成药物组合物。该组合物可以包含DC和药学上可接受的运载体。如本文所用,除非另有说明,否则术语“药学上可接受的运载体”是指无毒、惰性的固体、半固体或液体填料、稀释剂、包封材料或任何类型的制剂助剂。药物组合物可包含对一种或多种不同抗原敏感的DC。在一些实施方式中,药物组合物包含对第一抗原致敏的DC和对第二抗原致敏的其他DC。

[0072] 给予所公开的DC的途径和组合物的形式将决定所用运载体的类型。药物组合物可

以是多种形式,例如适合于全身给药(例如口服,直肠,舌下,口腔,植入物,鼻内,阴道内,透皮,静脉内,动脉内,肿瘤内,腹膜内或肠胃外)或局部给药(例如,皮肤,肺,鼻,耳,眼,脂质体递送系统或离子电渗疗法)。在一些实施方式中,药物组合物用于给予对象的中枢神经系统。技术和配方通常可在“雷明顿药物科学”(Remington's Pharmaceutical Sciences)(宾夕法尼亚州伊斯顿米德出版公司)中找到。在制备和储存条件下,药物组合物通常必须是无菌和稳定的。所有运载体在组合物中是任选的。

[0073] 药学上可接受的运载体包括,例如,稀释剂,润滑剂,粘合剂,崩解剂,着色剂,调味剂,甜味剂,抗氧化剂,防腐剂,助流剂,溶剂,助悬剂,润湿剂,表面活性剂,润肤剂,推进剂,湿润剂,粉末,pH调节剂及其组合。药物组合物可包含一种或多种本领域已知的佐剂。

[0074] 合适的稀释剂包括例如糖,例如葡萄糖,乳糖,右旋糖和蔗糖;二醇,例如丙二醇;碳酸钙;碳酸钠;糖醇,例如甘油;甘露醇;山梨糖醇;纤维素;淀粉;和明胶。全身或局部组合物中稀释剂的量通常可以为约50%至约90%。

[0075] 合适的润滑剂包括,例如,二氧化硅,滑石粉,硬脂酸及其镁盐和钙盐,硫酸钙;和液体润滑剂,例如聚乙二醇和植物油,例如花生油,棉籽油,芝麻油,橄榄油,玉米油和可可油。全身或局部组合物中润滑剂的量通常可以为约5%至约10%。

[0076] 合适的粘合剂包括例如聚乙烯吡咯烷酮;硅酸铝镁;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;明胶;黄耆胶;蔗糖;和纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素,甲基纤维素,微晶纤维素和羟丙基甲基纤维素。全身或局部组合物中粘合剂的量通常可以为约5%至约50%。

[0077] 合适的崩解剂包括例如琼脂,藻酸及其钠盐,泡腾混合物,交联蜜糖,交聚维酮,羧甲基淀粉钠,淀粉羟乙酸钠,粘土和离子交换树脂。全身或局部组合物中崩解剂的量通常可以为约0.1%至约10%。

[0078] 合适的防腐剂包括例如苯扎氯铵,对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠。全身或局部组合物中防腐剂的量通常可以为约0.01%至约5%。

[0079] 合适的助流剂包括例如二氧化硅。全身或局部组合物中助流剂的量通常可以为约1%至约5%。

[0080] 合适的溶剂包括例如水,等渗盐水,油酸乙酯,甘油,蓖麻油,羟基化蓖麻油,醇如乙醇或异丙醇,二氯甲烷,乙二醇单乙醚,二甘醇单丁醚,二甘醇单乙醚,二甲亚砜,二甲基甲酰胺,四氢呋喃和磷酸盐缓冲液及其组合。全身或局部组合物中溶剂的量通常为约0%至约100%,或0%至约95%。

[0081] 合适的悬浮剂包括例如AVICEL RC-591(得自宾夕法尼亚州费城的FMC集团(FMC Corporation))和藻酸钠。全身或局部组合物中悬浮剂的量通常可以为约1%至约8%。

[0082] 合适的表面活性剂包括例如卵磷脂,聚山梨酯80和月桂基硫酸钠,以及得自特拉华州威尔明顿的阿特拉斯粉末公司的吐温(TWEENS)。合适的表面活性剂包括C.T.F.A.化妆品成分手册,1992年,第587-592页;《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第15版,1975,第335-337页;和麦卡彻恩的《乳化剂和洗涤剂》(Emulsifiers & Detergents),第1卷,1994年,北美版,第236-239页中公开的那些。全身或局部组合物中表面活性剂的量通常可以为约0.1%至约5%。

[0083] 合适的润肤剂包括,例如,硬脂醇,单蓖麻油酸甘油酯,单硬脂酸甘油酯,1,2-丙二

醇,1,3-丁二醇,貂油,鲸蜡醇,异硬脂酸异丙酯,硬脂酸,棕榈酸异丁酯,硬脂酸异辛酯,油醇,月桂酸异丙酯,月桂酸己酯,油酸癸酯,十八烷-2-醇,异鲸蜡醇,十六烷基棕榈酸酯,癸二酸二正丁酯,肉豆蔻酸异丙酯,棕榈酸异丙酯,硬脂酸异丙酯,硬脂酸丁酯,聚乙二醇,三乙二醇,羊毛脂,芝麻油,椰子油,花生油,蓖麻油,乙酰化羊毛脂醇,石油,矿物油,肉豆蔻酸丁酯,异硬脂酸,棕榈酸,亚油酸异丙酯,乳酸月桂酯,乳酸肉豆蔻酯,油酸癸酯,肉豆蔻酸肉豆蔻酯及其组合。用于皮肤的特定润肤剂包括硬脂醇和聚二甲基硅氧烷。在基于皮肤的局部用组合物中的润肤剂的量通常可以为约5%至约95%。

[0084] 合适的推进剂包括,例如,丙烷,丁烷,异丁烷,二甲醚,二氧化碳,一氧化二氮及其组合。局部组合物中推进剂的量可以为约0%至约95%。

[0085] 合适的保湿剂包括例如甘油,山梨糖醇,2-吡咯烷酮-5-羧酸钠,可溶性胶原,邻苯二甲酸二丁酯,明胶及其组合。局部组合物中保湿剂的量可以为约0%至约95%。

[0086] 合适的粉末包括例如 $\beta$ -环糊精,羟丙基环糊精,白垩,滑石粉,富勒土,高岭土,淀粉,树胶,胶体二氧化硅,聚丙烯酸钠,四烷基铵蒙脱石,三烷基芳基铵蒙脱石,化学改性的硅酸铝镁,有机改性的蒙脱土,水合硅酸铝,煅制二氧化硅,羧乙烯基聚合物,羧甲基纤维素钠,单硬脂酸乙二醇酯及其组合。局部组合物中粉末的量通常可以为0%至95%。

[0087] 合适的pH调节添加剂包括例如HCl或NaOH,其量足以调节局部药物组合物的pH。

[0088] 尽管组合物中组分的量可以根据所制备的组合物的类型而变化,但是一般而言,全身组合物可以包含0.01%至50%的化合物(例如,式I'或I或II或III的化合物)和50%到99.99%的一种或多种运载体。肠胃外给药的组合物通常可包含0.1%至10%的化合物和90%至99.9%的一种或多种运载体。口服剂型可以包括例如至少约5%或约25%至约50%的化合物。口服剂量组合物可包含约50%至约95%的运载体,或约50%至约75%的运载体。与所公开的化合物结合使用的运载体的量足以提供每单位剂量化合物给药的实际量的组合物。在以下参考文献中描述了用于制备可用于本发明方法的剂型的技术和组合物:《现代药理学》(Modern Pharmaceutics),第9和第10章,Banker和Rhodes编(1979);Lieberman等,《药物剂型:片剂》(Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets)(1981);和Ansel,《药物剂型介绍》(Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms),第二版,(1976)。

[0089] a. 疫苗

[0090] 可以根据本领域已知的方法将未成熟的抗原致敏的树突细胞配制成疫苗。疫苗可包含对一种或多种不同抗原致敏的DC。在一些实施方式中,疫苗包含对第一抗原致敏的DC和对第二抗原致敏的其他DC。

[0091] 4. 给药

[0092] 本文详述的DC或包含DC的药物组合物可以给予对象或患者。考虑到诸如特定对象的年龄,性别,体重和状况以及给药途径之类的因素,可以以剂量和通过医学领域技术人员众所周知的技术来给予包含DC的此类组合物。

[0093] 可以预防性或治疗性地给予DC。在预防性给药中,DC可以足以引起反应的量给药。在治疗应用中,将DC以足以引起治疗效果的量给予有此需要的对象。足以完成此效果的量定义为“治疗有效量”。对于这种用途有效的量将取决于例如所给予的DC方案的特定组成,给药方式,疾病的阶段和严重性,患者的总体健康状况以及处方医生的判断。在治疗有效量中,DC的治疗有益效果胜过任何毒性或有害效果。“预防有效量”是指按照一定剂量和必要



时程能够有效实现所需预防效果的量。一般而言,由于预防剂量在疾病的早期或患病之前用于对象,预防有效量将小于治疗有效量。

[0094] 例如,DC的治疗有效量可以是约1mg/kg至约1000mg/kg,约5mg/kg至约950mg/kg,约10mg/kg至约900mg/kg,15mg/kg至约850mg/kg,约20mg/kg至约800mg/kg,约25mg/kg至约750mg/kg,约30mg/kg至约700mg/kg,约35mg/kg至约650mg/kg,约40mg/kg至约600mg/kg,约45mg/kg至约550mg/kg,约50mg/kg至约500mg/kg,约55mg/kg至约450mg/kg,约60mg/kg至约400mg/kg,约65mg/kg至约350mg/kg,约70mg/kg至约300mg/kg,约75mg/kg至约250mg/kg,约80mg/kg至约200mg/kg,约85mg/kg至约150mg/kg和约90mg/kg至约100mg/kg。DC的治疗有效量可以是每位对象或每剂量约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{10}$ 个细胞。

[0095] DC可以通过本领域众所周知的方法给予,如Donnelly等。(Ann.Rev.Immunol.1997,15,617-648);Felgner等(1996年12月3日授权的美国专利号5,580,859);Felgner(1997年12月30日授权的美国专利号5,703,055);和Carson等(1997年10月21日授权的美国专利号5,679,647)所述,其全部内容通过引用全文纳入本文。DC可以复合为颗粒或珠,其可以例如使用疫苗枪给予个体。本领域技术人员会知道,包括生理上可接受的化合物在内的药学上可接受的运载体的选择取决于例如,给药途径。

[0096] DC可以通过多种途径递送。典型的递送途径包括肠胃外给药,例如皮内,肌内或皮下递送。其他途径包括口服给药,鼻内,阴道内,经皮,静脉内,动脉内,肿瘤内,腹膜内和表皮途径。在一些实施方式中,将DC静脉内,动脉内或腹膜内给予对象。在一些实施方式中,将DC给予对象的中枢神经系统。在一些实施方式中,将DC静脉内给予给对象。

[0097] DC以单剂量或多剂量给予患者。在一些实施方式中,DC每两周给予患者。

## [0098] 5.方法

### [0099] a.诱导免疫反应的方法

[0100] 本文提供了在患者中诱导免疫反应的方法。该方法可以包括向患者给予本文详述的DC或疫苗。疫苗可激活T细胞反应,T细胞免疫,B细胞反应或其组合。在一些实施方式中,如本文详述的DC可以用作佐剂。佐剂可以增加抗原的免疫原性。可以将本文详述的DC或疫苗递送或给予患者,以调节患者免疫系统的活性并增强免疫反应。如本文详述的DC或疫苗可用于诱导免疫反应,包括治疗性免疫反应或预防性免疫反应。可以产生针对抗原的抗体和/或杀伤性T细胞。

[0101] 本文还提供了治疗患者疾病的方法。该方法可以包括向患者给予本文详述的DC或疫苗。疫苗可激活T细胞反应,T细胞免疫,B细胞反应或其组合。

[0102] DC或疫苗可用于治疗各种疾病,例如免疫相关疾病,癌症,感染性疾病,神经疾病,阿尔茨海默氏病(AD),青少年糖尿病,多发性硬化症,牛皮癣,系统性红斑狼疮(SLE)和类风湿关节炎。在一些实施方式中,将DC或疫苗给予患有选自癌症,自身免疫病,感染性疾病和神经疾病的疾病的患者。在一些实施方式中,神经疾病包括阿尔茨海默氏病(AD)。

[0103] 在一些实施方式中,与包含成熟树突细胞的疫苗相比,该疫苗诱导增加的免疫应答。在一些实施方式中,疫苗诱导的免疫应答类似于由包含对患者自体的树突细胞的疫苗诱导的应答。

### [0104] b.配制疫苗的方法

[0105] 本文提供配制疫苗的方法。该方法可以包括获得未成熟树突细胞;使未成熟树突

细胞与抗原接触以形成未成熟抗原致敏的树突细胞;和配制包含未成熟抗原致敏树突细胞和药学上可接受的运载体的疫苗。在一些实施方式中,该方法进一步包括杀死未成熟的抗原致敏的树突细胞。在一些实施方式中,杀死包括超声处理,热处理,冻干或其组合。在一些实施方式中,该方法包括超声处理未成熟的抗原致敏的树突细胞,收集所得的细胞碎片,并将该细胞碎片冻干成粉末。在一些实施方式中,该方法还包括将冻干的细胞碎片或粉末配制成疫苗。

[0106] 例如,配制疫苗的方法可以包括选自以下步骤的任意组合:收集血液或骨髓,从血液或骨髓中分离单核细胞并分化DC,使DC与抗原接触形成未成熟抗原致敏树突细胞,收获或收集未成熟抗原致敏的树突细胞,对未成熟抗原致敏的树突细胞进行超声处理以杀死细胞并产生细胞碎片,收集细胞碎片,冻干细胞碎片,将细胞碎片配制成疫苗。如上所述,可以将疫苗给予给患者。

[0107] 6. 实施例

[0108] 实施例1

[0109] 材料和方法

[0110] 小鼠骨髓衍生的树突细胞制备:从10周龄的BALB/c小鼠或C57/BL6小鼠中收获小鼠骨髓细胞,并用IL4和GM-CSF进行分化。将制备的树突细胞的一半用抗原(未成熟)致敏,将另一半用TNF $\alpha$ , IL6和IL1 $\alpha$ 刺激(首先成熟),然后将抗原加载到成熟的树突细胞中。在分化后第4天,通过添加TNF $\alpha$ , IL6和IL1 $\alpha$ 三天来进行DC的早期成熟,然后加载抗原。在第10天收获DC。用TNF $\alpha$ , IL6和IL1 $\alpha$ 分化后,在第7天进行常规成熟,然后在三天后加载抗原,然后在第12天收获DC。

[0111] 人单核细胞衍生的树突细胞制备:从佛罗里达州血库订购人血沉棕黄层,并使用标准报道的方案分离出单核细胞(Pandha H.S.等, *BJU Int.* 2004, 94, 412-418)。制备未成熟树突细胞和成熟树突细胞作为小鼠树突细胞制剂。

[0112] 肽制备:所有肽均购自Biomer技术公司(Biomer Technology Inc.) (美国加利福尼亚州),然后用HFIP重建,然后等分至100 $\mu$ g/小瓶。然后将肽经speedVac干燥后储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0113] 免疫和反应监测:未成熟和成熟的树突细胞用作疫苗,每两周间隔注射BALB/c小鼠和C57/BL6小鼠。未成熟和成熟树突细胞的细胞裂解液和完整活细胞均每两周间隔接种BALB/c小鼠和C57/BL6小鼠。

[0114] 样品收集和处理:在免疫前和第二次免疫后10天通过下颌下静脉穿刺采集血样。通过离心分离血浆,并使用所选标志物将血细胞用于细胞染色。

[0115] 流式细胞术测定:使用一组树突细胞成熟标志物(CD40, CD80, CD86, MHC-II和CD11c)来监测和跟踪树突细胞的成熟。使用流式细胞仪在指定的时间点对细胞进行计数。

[0116] 完整,活树突细胞和细胞裂解物的制备:制备树突细胞(成熟的和未成熟的样品),并用所述的所选DC标志物(如MHCII, CD11c, CD80, CD83和CD86)染色。将制备的细胞的一半进行超声处理以破坏细胞。将完整活细胞和细胞裂解物都送入流式细胞仪进行大小测定并确认细胞的破坏。

[0117] 抗体检测:使用ELISA测定检测抗体产生,并使用ELISA测定进行表位作图。

[0118] Ig-同种分型测定:使用Luminex测定检测血浆IgA, IgD, IgE和IgG1, IgG2a, IgG2b

和IgG3(目录号,密理博美国)

[0119] 细胞因子表达谱检测:按照公司提供的手册中的说明进行操作,使用Luminex多重测定从疫苗接种前血浆和疫苗接种后血浆中检测一组细胞因子(IL1,IL2,IL4,IL6,IL10,IL12,IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ )。

[0120] 实施例2

[0121] 与成熟的树突细胞相比,人单核细胞分化的未成熟树突细胞在诱导免疫反应方面具有更好的功能。

[0122] 检查了各种树突细胞样品的抗体反应,Ig免疫型,T细胞反应和归巢。图1A和图1B中显示了结果,其是示出树突细胞成熟的流式细胞术结果和作为疫苗的肽致敏的成熟和未成熟树突细胞的免疫应答的图。图1A显示了树突细胞成熟的流式细胞术结果。使用的细胞表面标志物是CD80,CD86,MHCII和CD11b。用于成熟的细胞因子是人IL1 $\alpha$ ,IL6和TNF $\alpha$ 。图1B是用肽(A $\beta$ )致敏的未成熟树突细胞(绿色),肽致敏的成熟树突细胞(蓝色),成熟的树突细胞(红色)和未成熟的树突细胞(黄色)疫苗接种后抗-A $\beta$ 抗体检测的ELISA结果。如图所示,当用作疫苗时,仅肽致敏的未成熟树突细胞诱导抗体反应,而成熟的树突细胞则无法诱导抗体反应。

[0123] 实施例3

[0124] 树突细胞归巢可能只是一个自然过程,但不是树突细胞功能所需的过程。

[0125] 使用表达GFP的细胞检查树突细胞归巢。

[0126] 结果如图2A,图2B和图2C所示,显示疫苗接种后的抗体反应和表位作图结果。图2A是在用完整细胞肽致敏的树突细胞或通过超声处理裂解10秒的同一批细胞两次疫苗接种后,针对在22氨基酸(22W)处具有突变的人A $\beta$ 42的抗体应答。按照Cao等(Cao C.等,J.Neuroimmunol.2008,200,1-10)详述的方法,从2月龄的BALB/c小鼠骨髓中制备树突细胞。然后将 $1 \times 10^6$ 个完整细胞或裂解细胞注入2月龄的BALB/c小鼠中,然后在两周后用相同的疫苗对小鼠加强免疫。第二次疫苗接种后10天收集血液。通过腹膜内注射向两只小鼠(n=2)注射全细胞,并且向三只小鼠注射细胞碎片(致敏抗原,n=3)。完整细胞和裂解的细胞碎片均诱导高抗体反应,如上图所示,两组之间无明显差异(P>0.05)。图2B是针对A $\beta$ 的所有突变肽和片段的表位作图。我们从每组中选择一份血浆,然后测试针对不同肽的抗体结合。如图所示,两种血清对所有检测的肽无差异,因此表位相同。完整细胞和细胞碎片之间没有表位变化。右图是针对野生型A $\beta$ 肽片段的表位作图,该片段针对中图所示的相同的两个抗血清进行了测试。同样,两种抗血清之间没有差异。完整细胞和裂解细胞(碎片)均诱导抗体反应。图2C是完整细胞与超声处理的细胞的流式细胞术结果。粒径远小于完整细胞,这表明大多数细胞被超声破碎。

[0127] 图3A,图3B,图3C,图3D,图3E和图3F是显示疫苗接种后的同种分型和细胞因子表达谱的图。第三次疫苗接种后10天收集血液,并且血浆用于使用Luminex多重分析检查Ig同种分型和细胞因子表达谱。在完整细胞或细胞碎片情况中,疫苗接种后没有炎症细胞因子增加。第三次疫苗接种后细胞碎片确实诱导了Th1应答,但第四次疫苗接种后该应答减弱了(数据未显示)。

[0128] 图4A,图4B和图4C是示出来自接种后血液的淋巴细胞的流式细胞术结果的图。分析了干细胞,CD4,CD8树突细胞和记忆B细胞群。在完整细胞和细胞碎片样品之间没有发现

差异,表明两种不同的疫苗接种引起的免疫反应没有差异。

[0129] 结果表明,完整(活细胞)和细胞裂解物(死细胞)具有相同的功能(抗体反应,免疫类型,归巢是不必要的,以及T细胞反应)。

[0130] 实施例4

[0131] DC诱导免疫反应

[0132] 成熟的树突细胞与未成熟的树突细胞相比,在抗原吞噬和抗原呈递方面的效力较低。成熟的树突细胞已经开始凋亡信号传导级联,因此成熟的DC可能比未成熟的DC有相对较短的寿命和更少的活性(Winzler C.等,J.Exp.Med.1997,185,317-328;Rescigno M.等,J.Exp.Med.2000,192,1661-1668)。

[0133] T细胞表位具有突变的淀粉样 $\beta$ (A $\beta$ )肽对于成功地使DC致敏非常重要并可以在小鼠中引起抗体反应。尾静脉注射和腹膜内注射在诱导免疫反应方面没有差异。我们向C57/B6小鼠提供多达5次注射的来自BALB/c小鼠的肽敏化DC,并发现在外周或中枢免疫系统中均无异常反应。我们还比较了用突变肽致敏的成熟与未成熟DC的免疫结果,结果清楚地表明,未成熟DC的免疫反应比成熟DC好得多(参见图1B)。尽管其他研究小组使用或曾经使用活DC作为治疗手段,并且不受理论的限制,我们认为所有信号在体外都可以完全配备,并且DC是死是活并不重要。在小鼠模式下诱导免疫反应时,活DC和死DC之间没有差异(请参见图2A,图2B和图2C)。检查了将人DC递送给小鼠的效果,并且抗原致敏的DC的跨物种接受者注射也显示出成功的免疫反应,而没有任何不良影响(见图3A-图3F)。肽致敏的DC可以在老年小鼠中诱导免疫反应。从幼年小鼠中收获的DC被注射到老年和幼年小鼠中,并且发现幼年小鼠具有比老年小鼠明显更好的免疫反应(见图5A)。为了检查注射后向免疫器官(脾脏和淋巴结)的DC归巢,我们从GFP小鼠中产生了DC,将其注射到C57/B6中,并在不同时间点采集了血液和脾脏。发现的GFP细胞不太多(参见图5B,图5C和图5D)。这些结果暗示DC归巢到脾和淋巴结可能是自然的过程,但是它可能不是DC免疫调节功能的必要步骤。

[0134] 已经开发了一种制备抗原致敏的未成熟树突细胞疫苗的新方法,该方法优于用成熟DC的常规方法和疫苗。外源性DC疫苗可以用于治疗应用,例如可以使用来自外源性年轻供体的DC进行更有效的治疗。例如,能够使用死DC,裂解DC或DC碎片而不是活DC可以使疫苗的开发变得更便宜,更具成本效益和更具治疗效果,并且便于运输和提高可用性。

[0135] \*\*\*

[0136] 以上具体方面的描述完全揭示了本发明的一般性质,通过应用本领域技术范围内的知识,他人无需过多实验即能很容易地在不背离本发明总体理念的前提下就各种应用改良和/或修改这些具体方面。因此,基于本文所列出的教导和指导,这些修改和改良旨在落入所公开方面的等同形式的含义和范围内。应当理解本文中的措词和术语仅仅是描述性的而非限制性的,从而本说明书中的术语或措词可由本领域技术人员根据所述教导和指导解读。

[0137] 本公开的广度和范围不应受限于上述任何示例性方面,而应仅根据所附权利要求书及其等同内容来定义。

[0138] 全部出版物、专利、专利申请和/或其他本申请所引用的文献在此完整引入以供参考,其程度相当于每一出版物、专利、专利申请和/或其他本申请所引用的文献都单独说明对于所有目的引入以供参考。

[0139] 出于完整性的原因,本发明的各个方面在以下编号的条款中列出:

[0140] 条款1.一种用于患者的疫苗,所述疫苗包含抗原致敏的未成熟树突细胞,其中所述树突细胞对于所述患者是外源的。

[0141] 条款2.如条款1所述的疫苗,其中树突细胞来自与患者相同物种的对象。

[0142] 条款3.如条款2所述的疫苗,其中树突细胞来自比患者年轻并且与患者相同物种的对象。

[0143] 条款4.如条款1所述的疫苗,其中树突细胞来自与患者不同物种的对象。

[0144] 条款5.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中树突细胞是死的。

[0145] 条款6.如条款5所述的疫苗,其中树突细胞通过超声处理,热处理,冻干或其组合被杀死。

[0146] 条款7.如条款5所述的疫苗,其中树突细胞是裂解细胞或其一部分。

[0147] 条款8.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞尚未通过用选自TNF $\alpha$ , IL6和IL1 $\alpha$ 的细胞因子刺激而成熟。

[0148] 条款9.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中与包含成熟树突细胞的疫苗相比,所述疫苗诱导增加的免疫反应。

[0149] 条款10.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗诱导与由包含患者自体的树突细胞的疫苗诱导的反应类似的免疫反应。

[0150] 条款11.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞通过与抗原接触而被抗原致敏。

[0151] 条款12.如条款11所述的疫苗,其中所述树突细胞在体外与所述抗原接触。

[0152] 条款13.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中所述抗原包括肽,蛋白质,碳水化合物,脂质或其组合。

[0153] 条款14.如条款13所述的疫苗,其中所述抗原包括肽。

[0154] 条款15.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞来源于血液或骨髓。

[0155] 条款16.如前述条款中任一项所述的疫苗,其中所述树突细胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。

[0156] 条款17.一种在患者中诱导免疫反应的方法,所述方法包括向所述患者给予如条款1-16中任一项所述的疫苗。

[0157] 条款18.如条款17所述的方法,其中所述疫苗激活T细胞反应,T细胞免疫,B细胞反应或其组合。

[0158] 条款19.如条款17或18所述的方法,其中所述疫苗以多剂量给予所述患者。

[0159] 条款20.如条款19所述的方法,其中所述疫苗每两周向所述患者给药一次。

[0160] 条款21.如条款17-20中任一项所述的方法,其中所述患者患有选自癌症,自身免疫病,感染性疾病和神经疾病的疾病。

[0161] 条款22.如条款21所述的方法,其中所述神经疾病包括阿尔茨海默氏病(AD)。

[0162] 条款23.一种配制疫苗的方法,所述方法包括获得未成熟树突细胞;使未成熟树突细胞与抗原接触以形成未成熟抗原致敏的树突细胞;和配制包含未成熟抗原致敏的树突细胞和药学上可接受的运载体的疫苗。

[0163] 条款24.如条款23所述的方法,还包括杀死未成熟的抗原致敏的树突细胞。

- [0164] 条款25.如条款24所述的方法,其中杀死包括超声处理,热处理,冻干或其组合。
- [0165] 条款26.如条款23-25中任一项所述的方法,其中所述树突细胞来源于血液或骨髓。
- [0166] 条款27.如条款26所述的方法,其中所述树突细胞是单核细胞衍生的未成熟树突细胞。

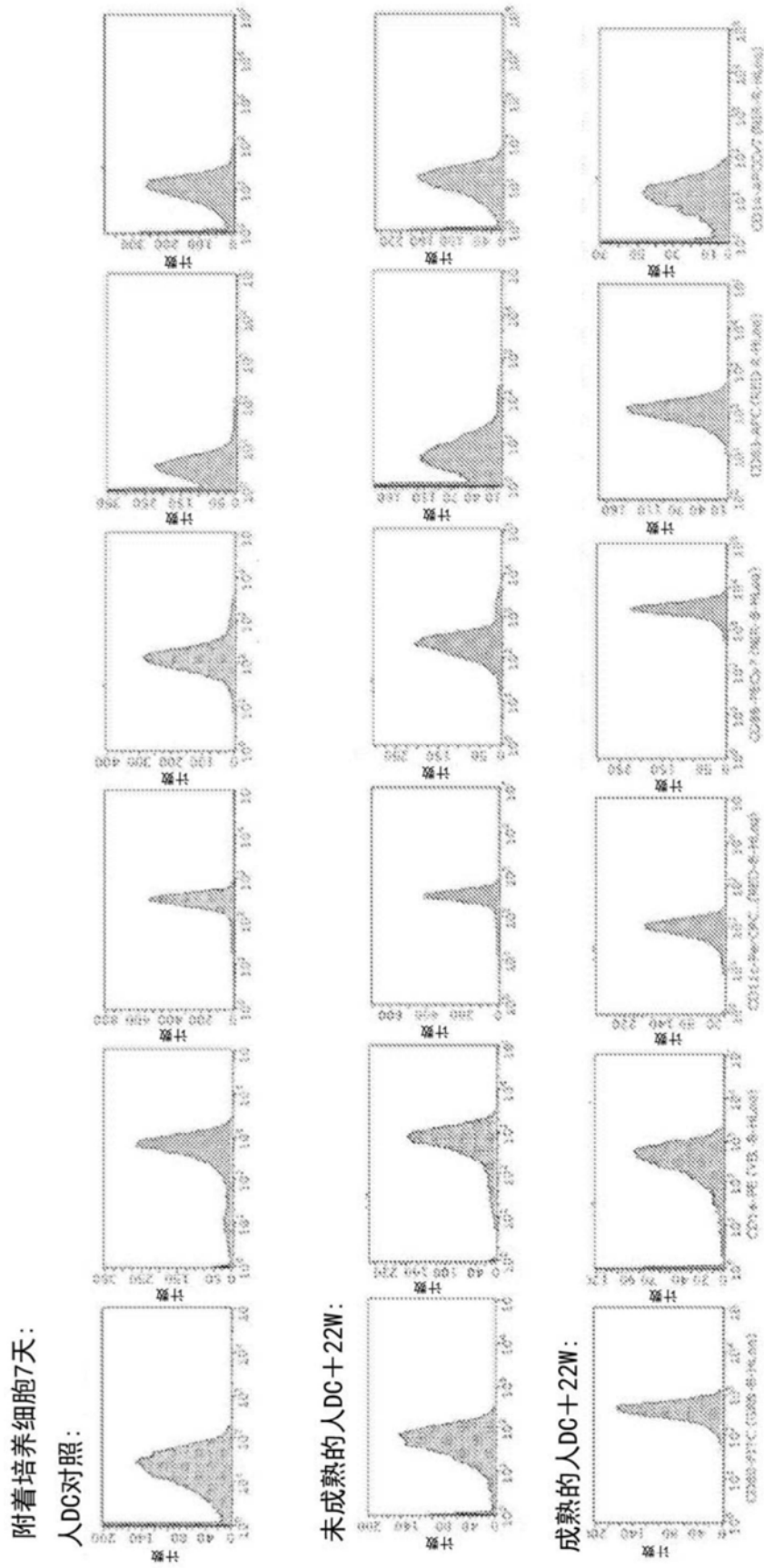


图1A

人22W 1-42 DC IP第三次血浆  
成熟对比未成熟

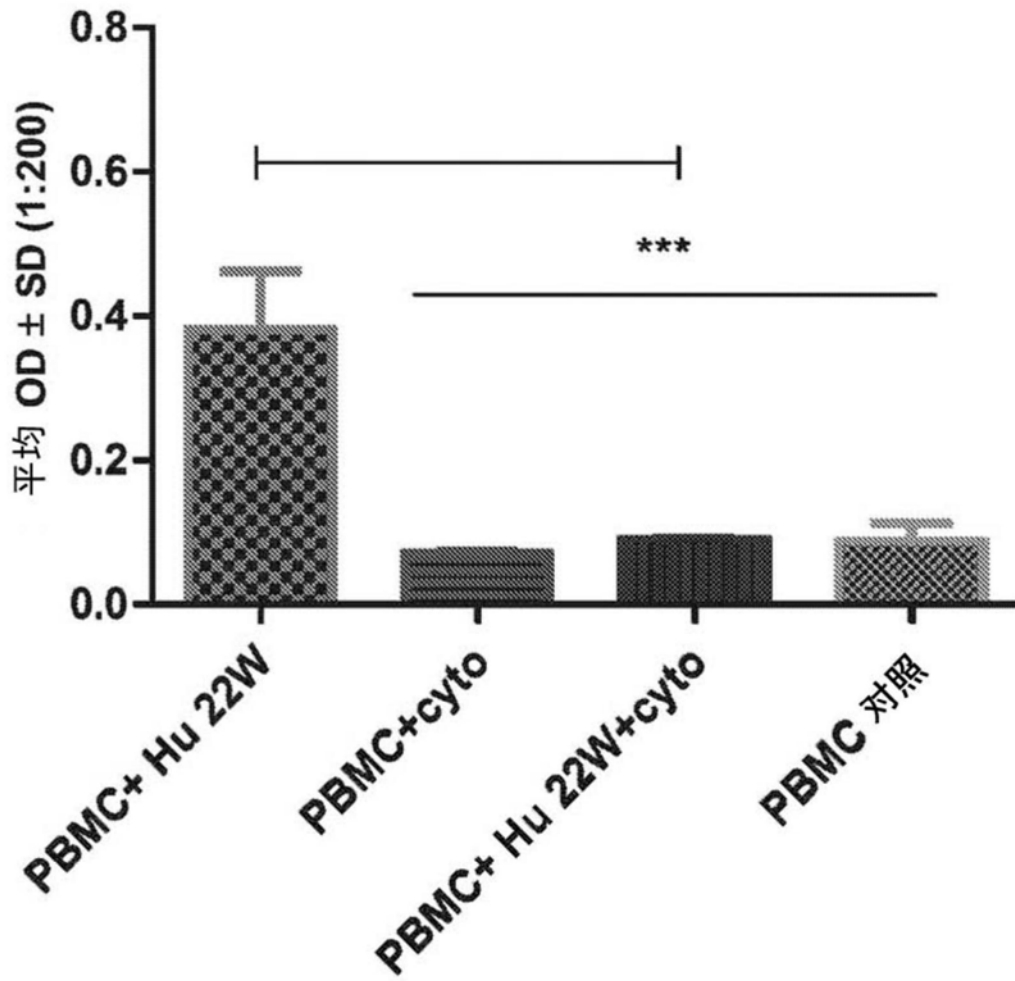


图1B



人22W 1-42 DC第三次IP  
(包被人22w肽)

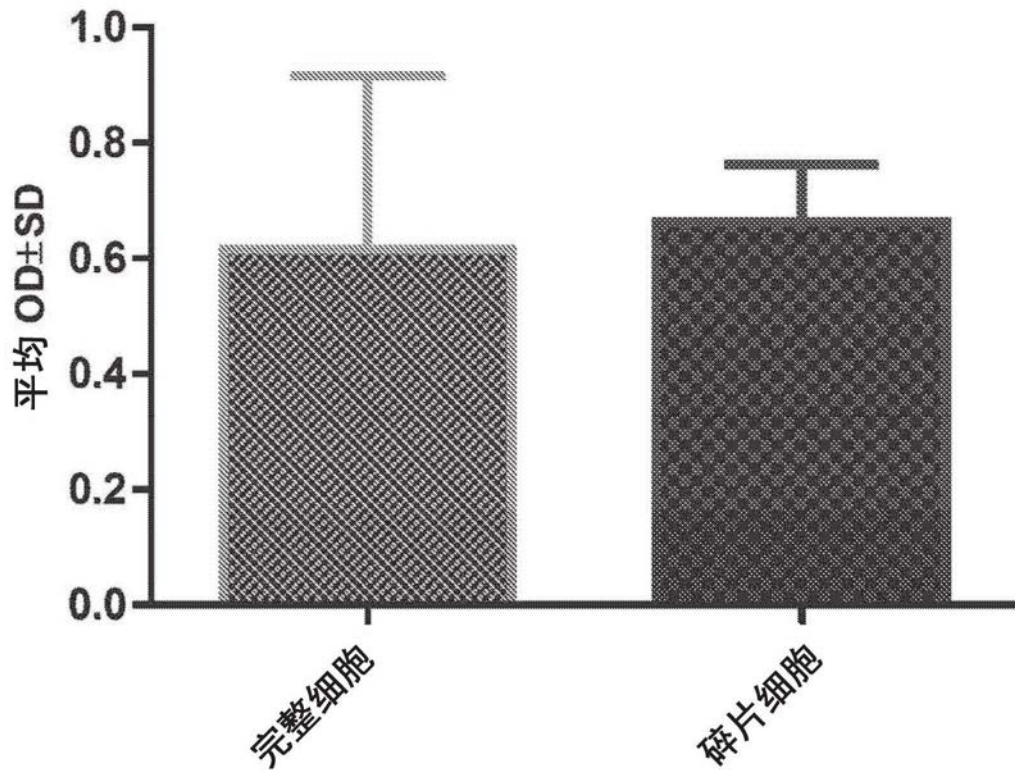
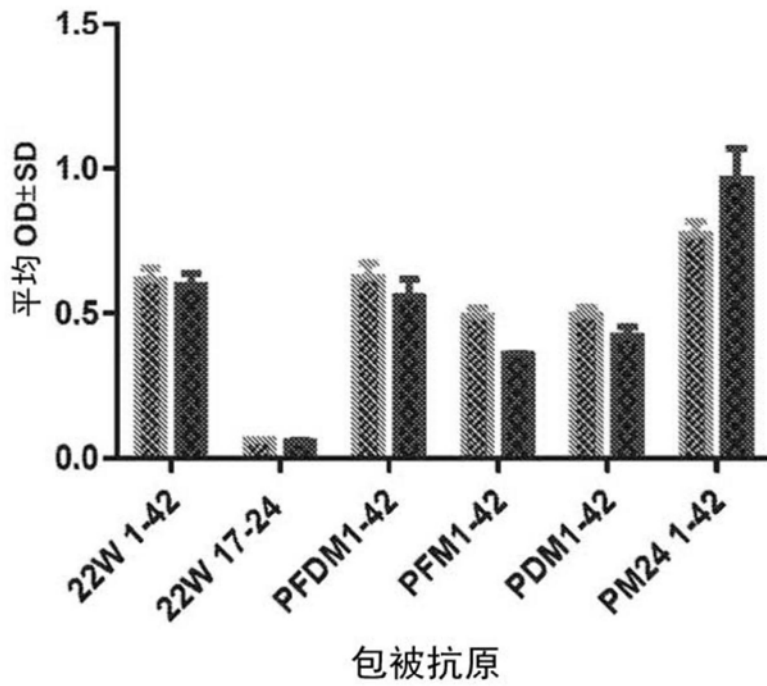


图2A

用不同肽的人22w作图



用PWT不同片段肽的人22w作图

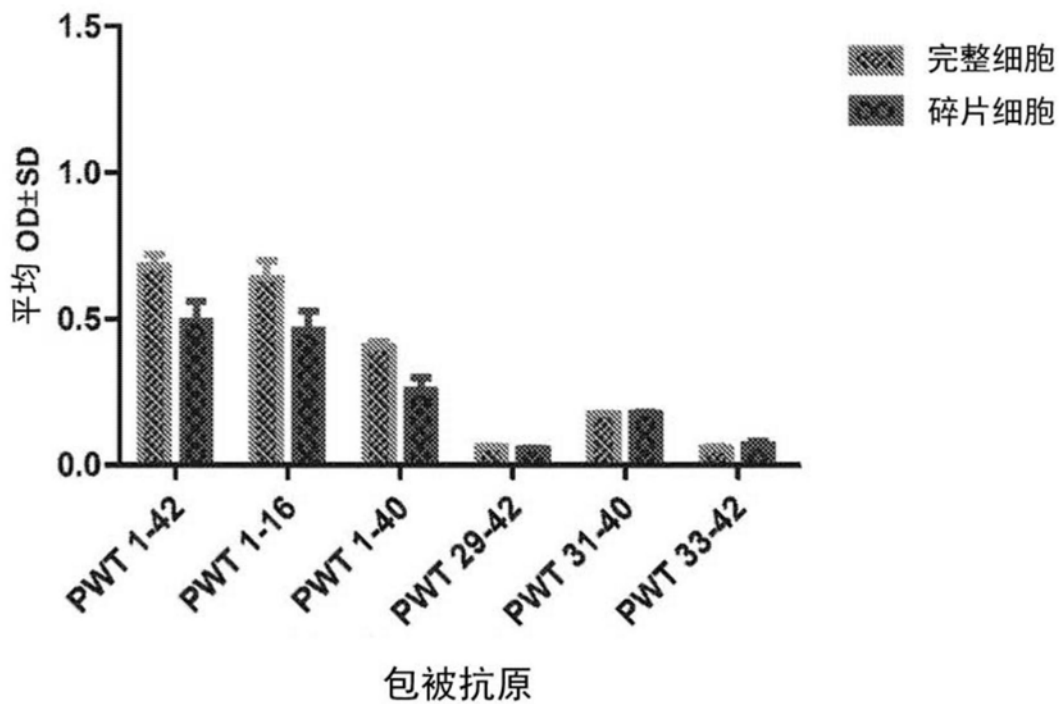


图2B

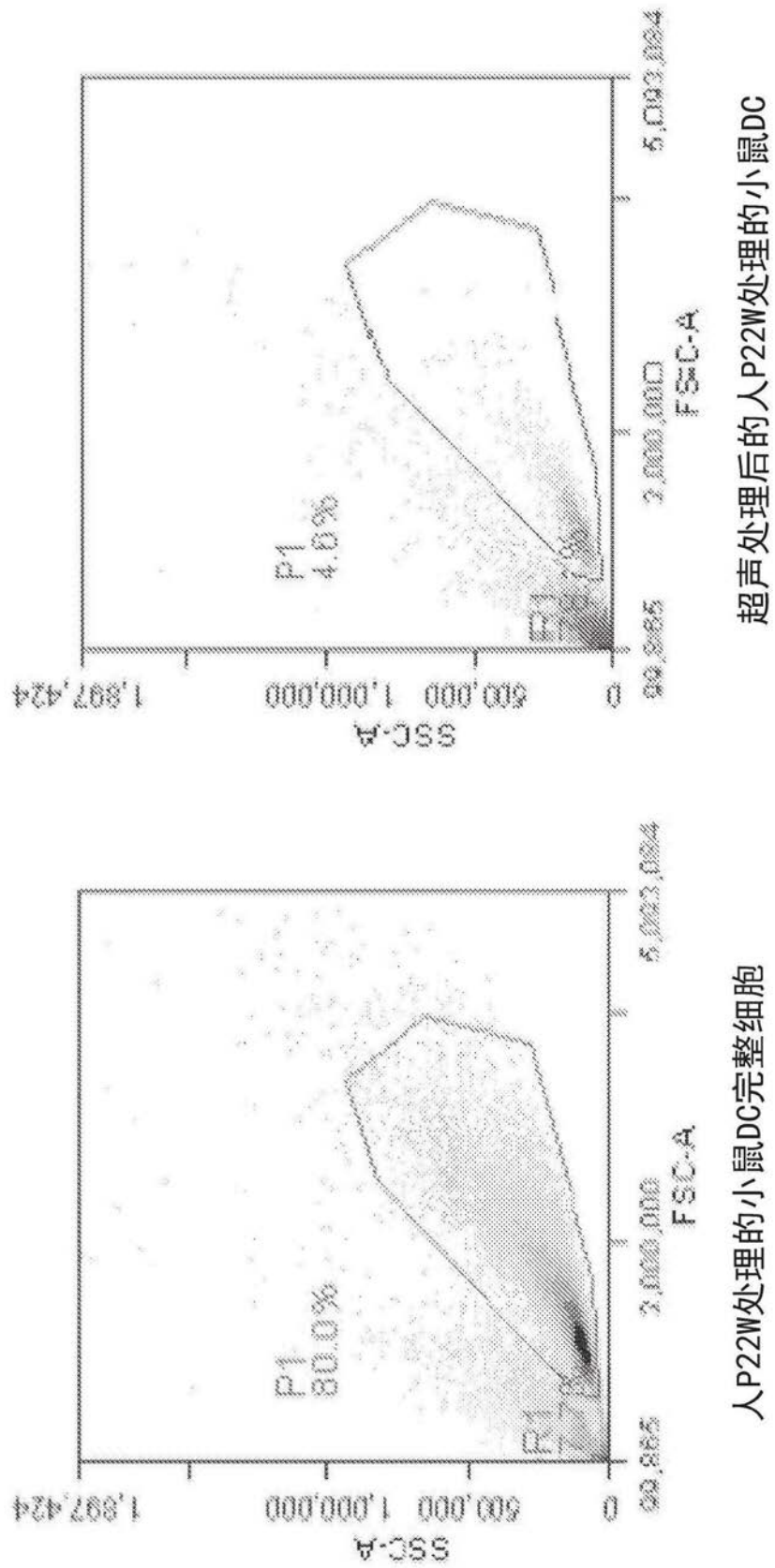


图2C

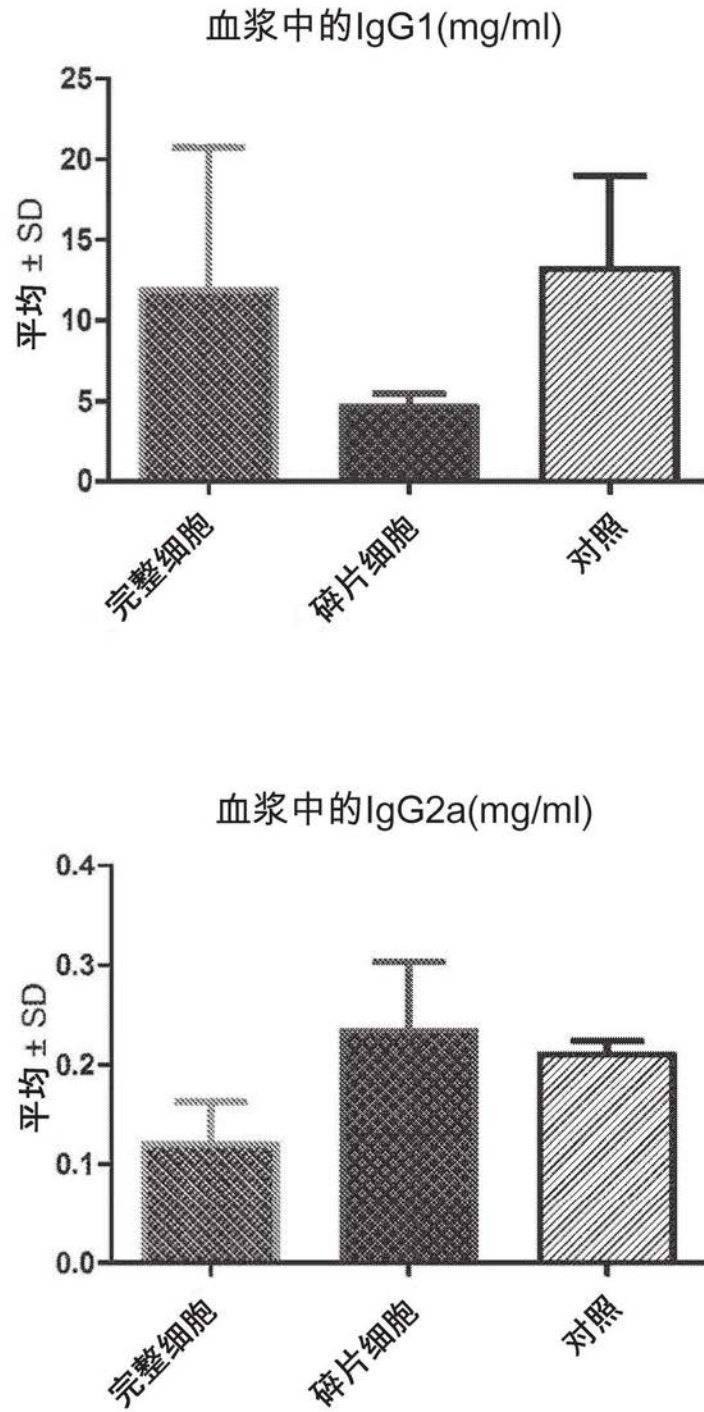


图3A

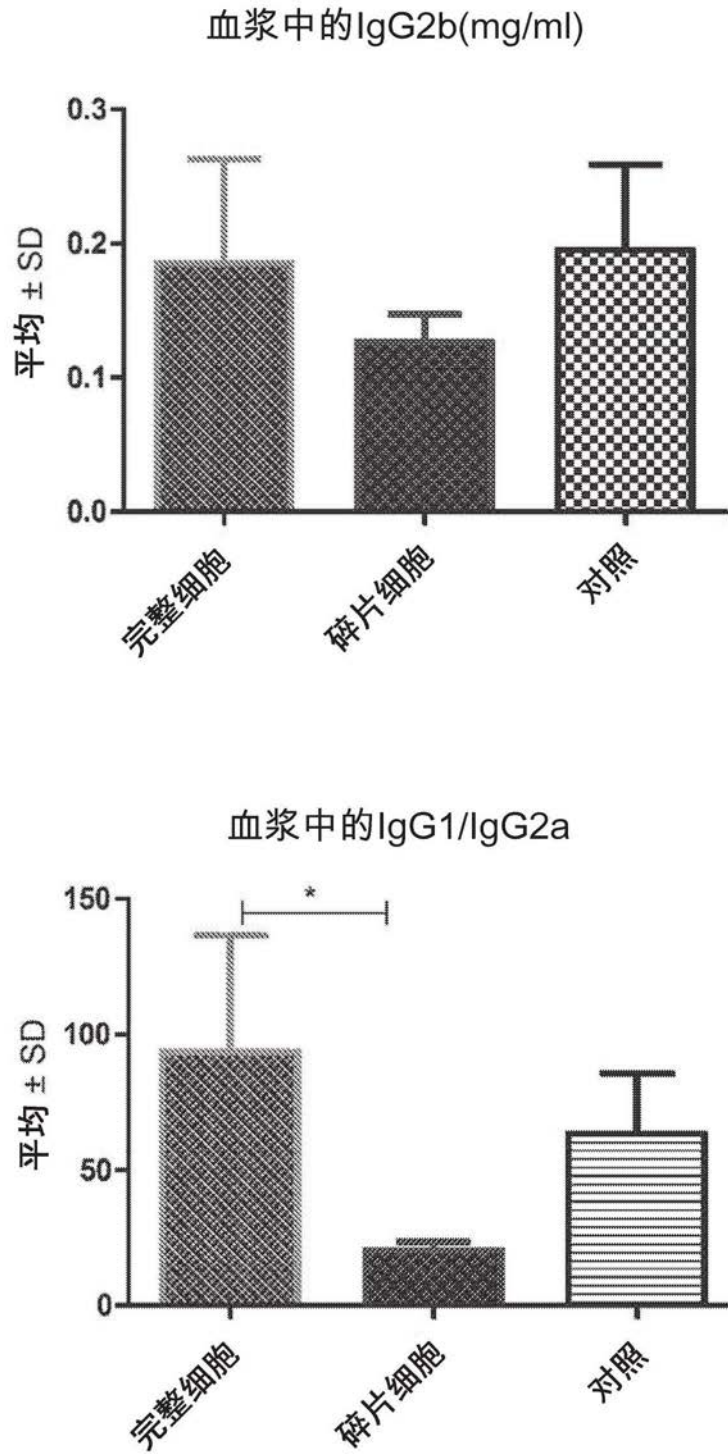


图3B

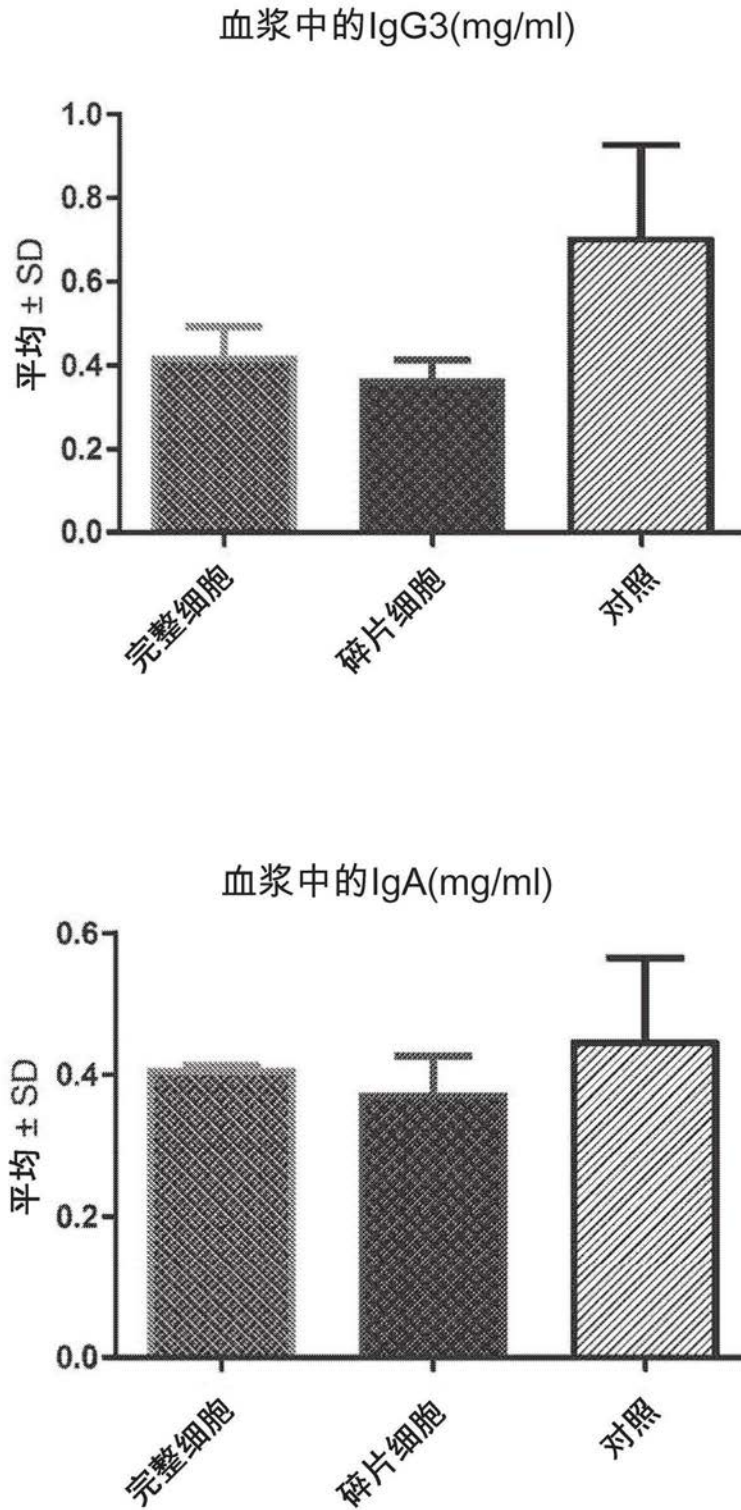


图3C



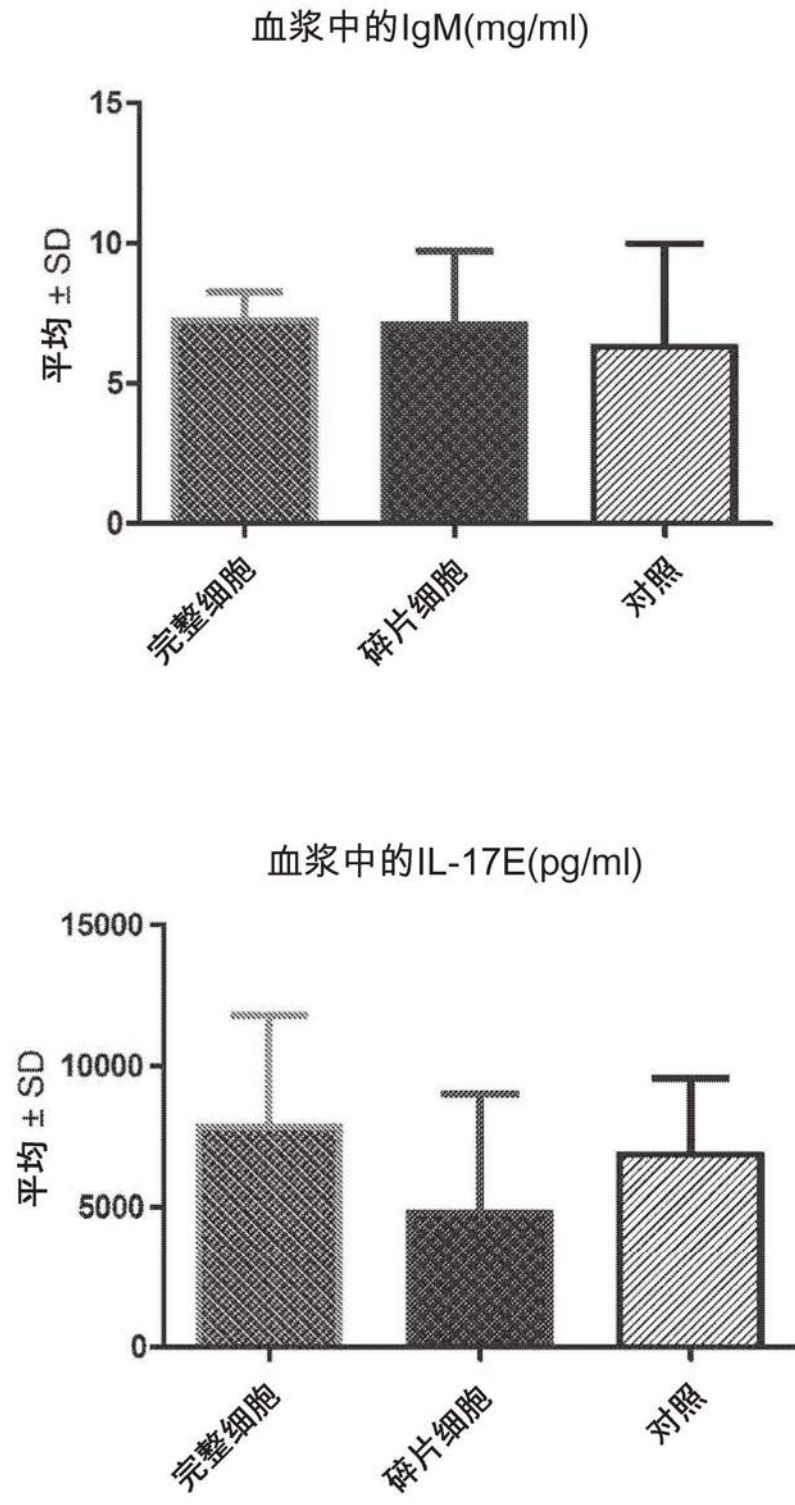


图3D

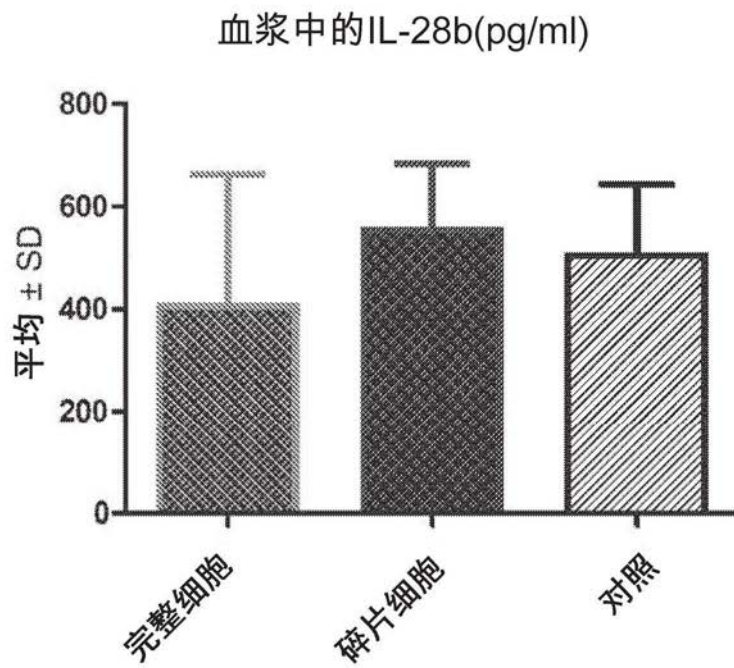
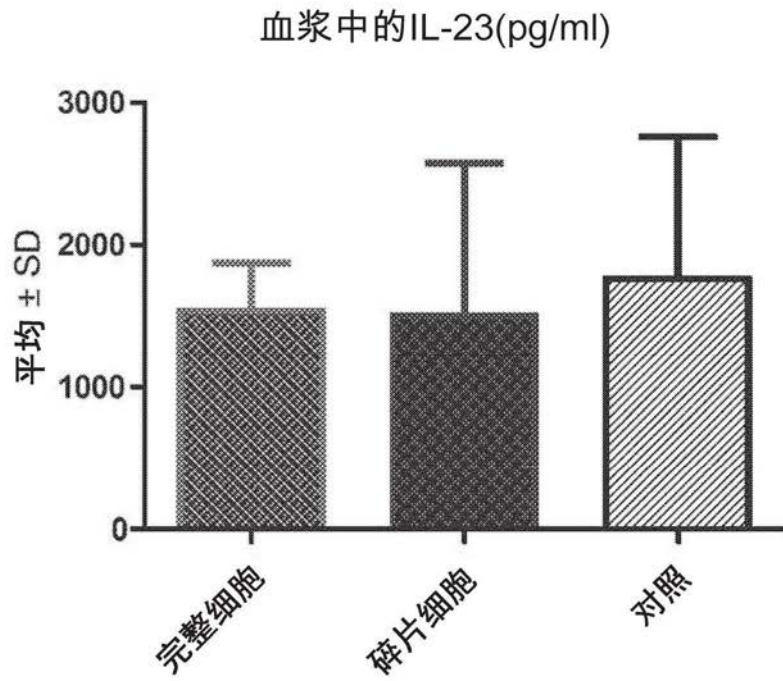


图3E



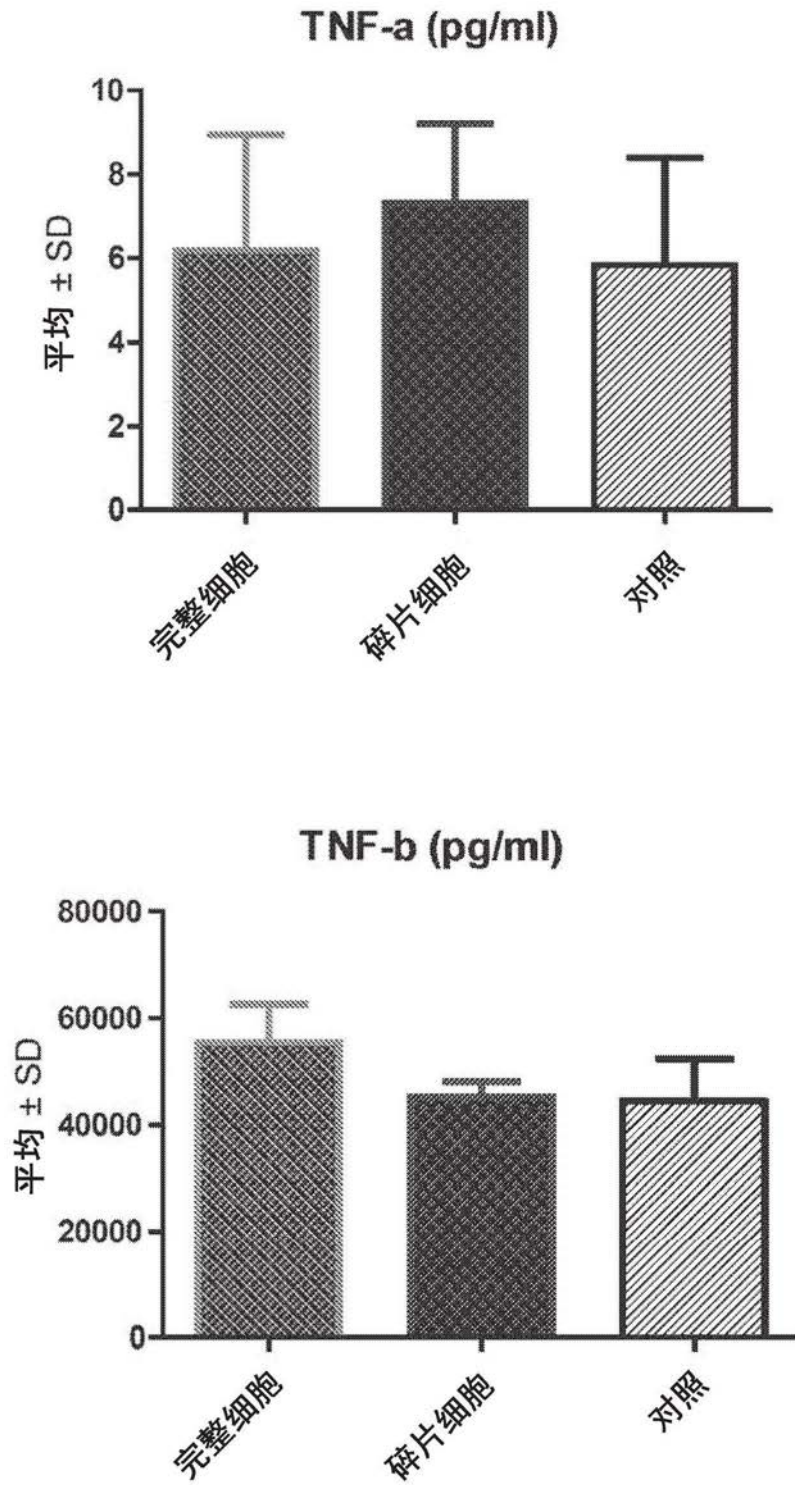


图3F

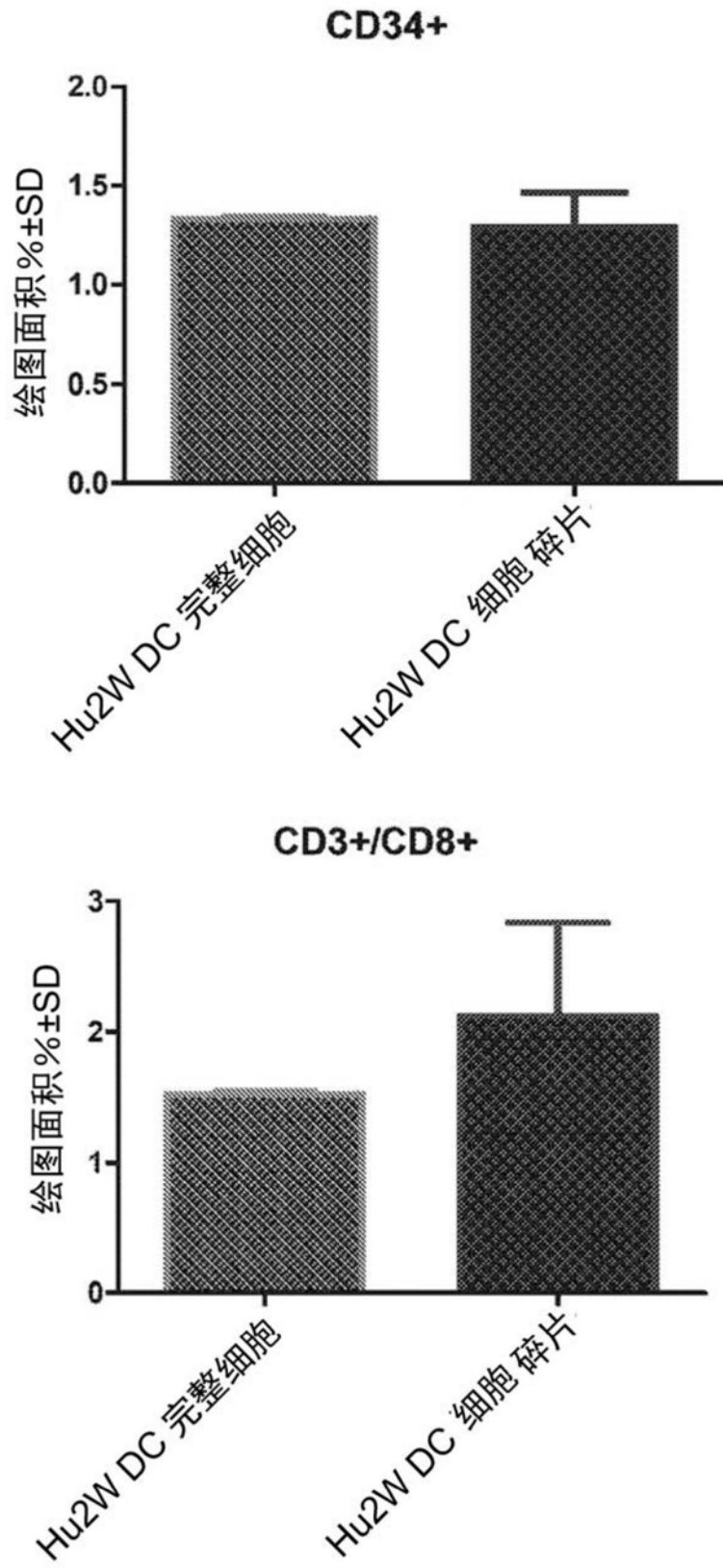


图4A

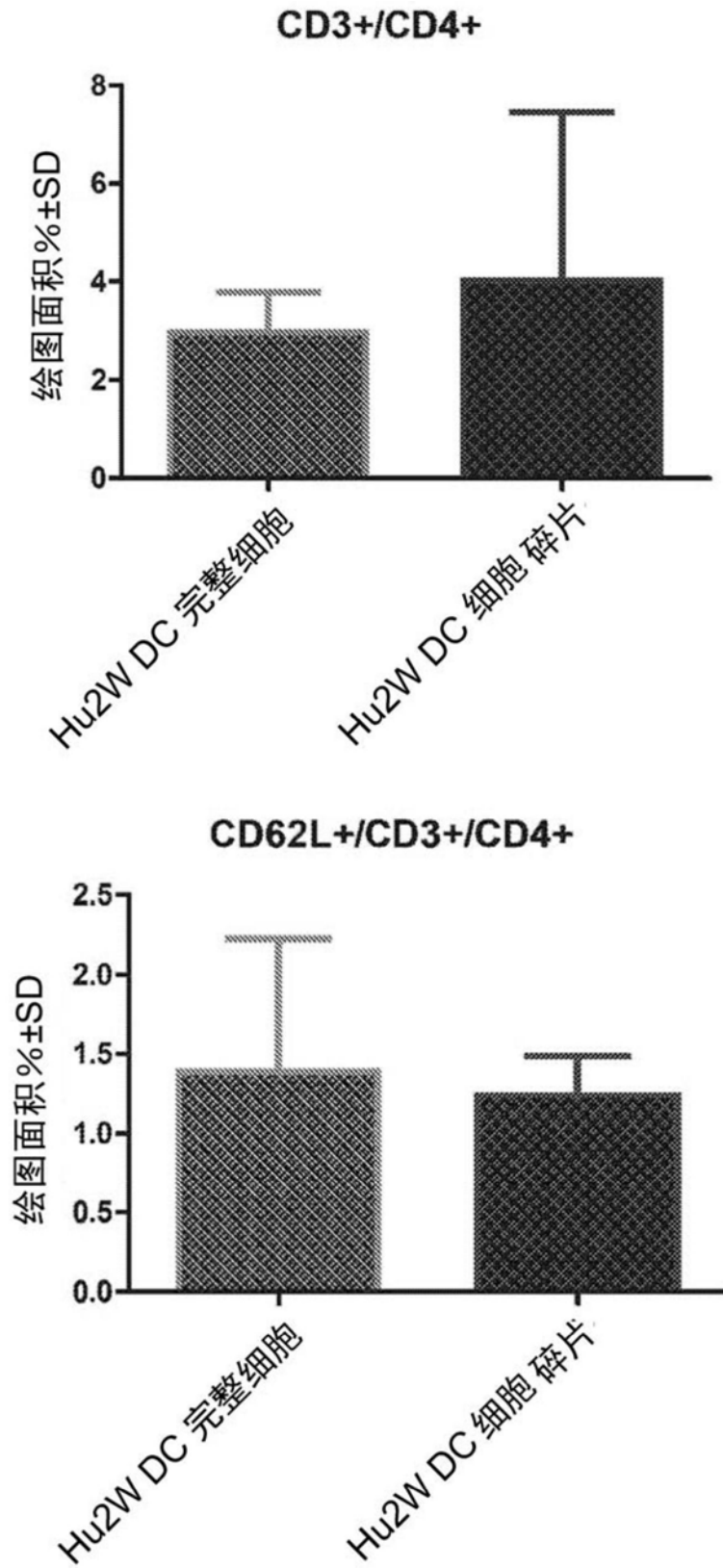


图4B

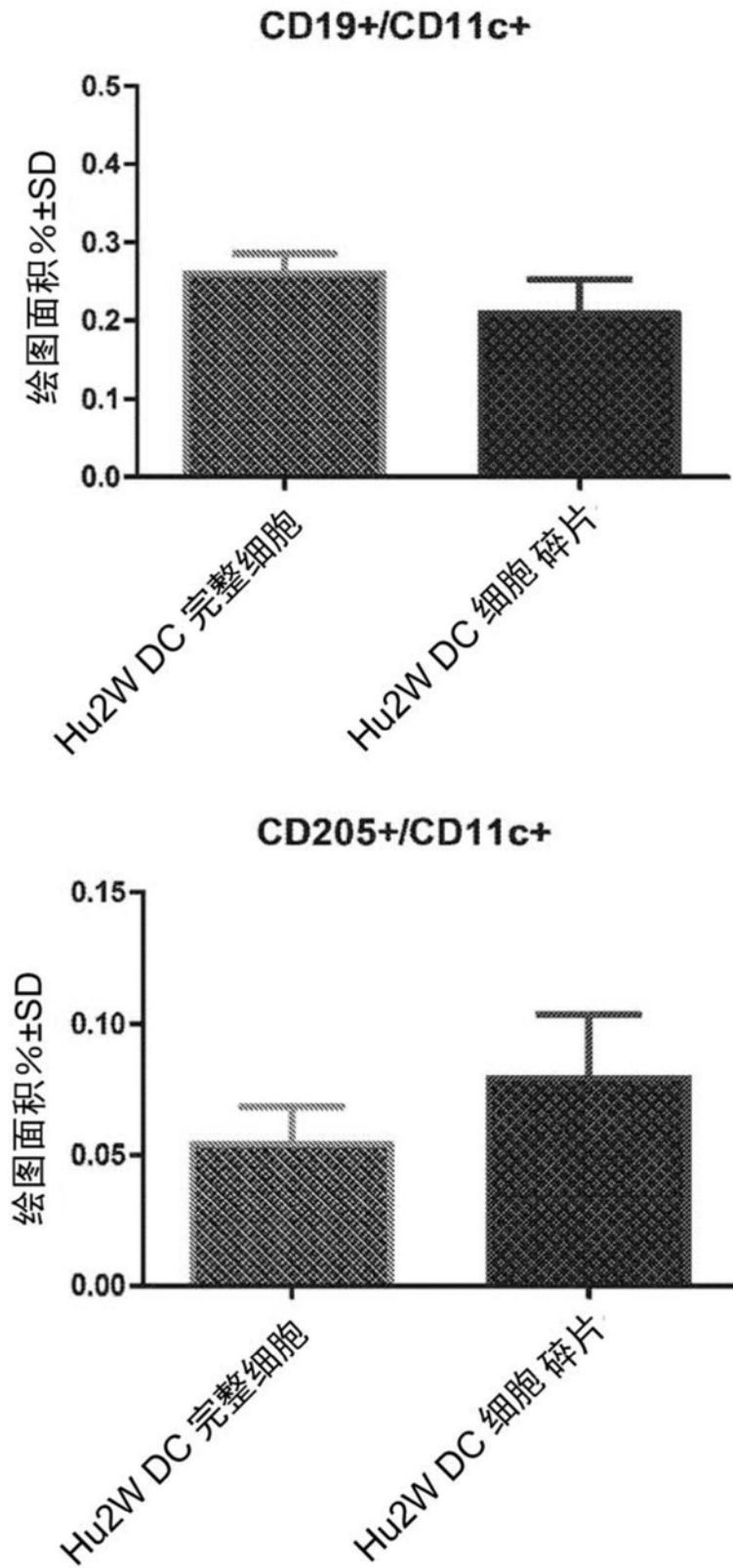


图4C

第二次IP小鼠血浆

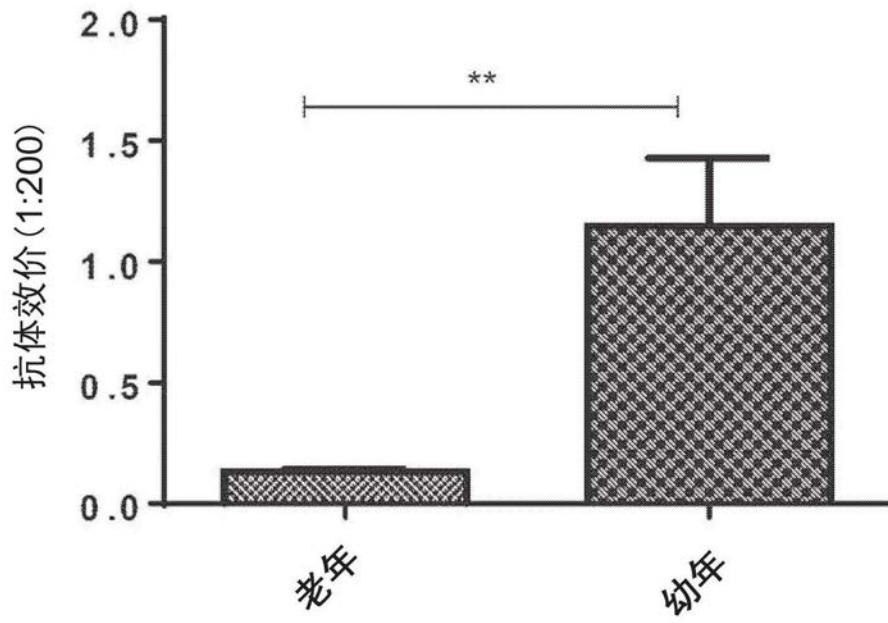
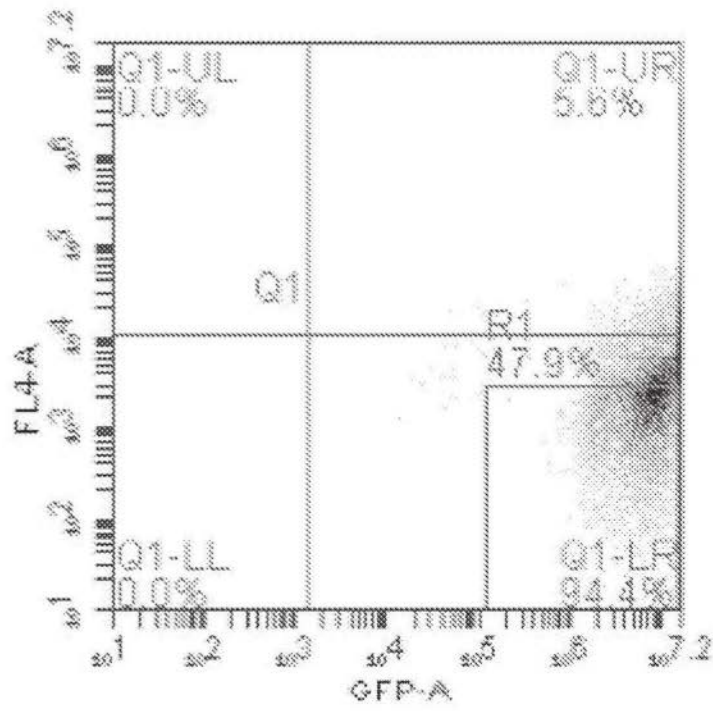
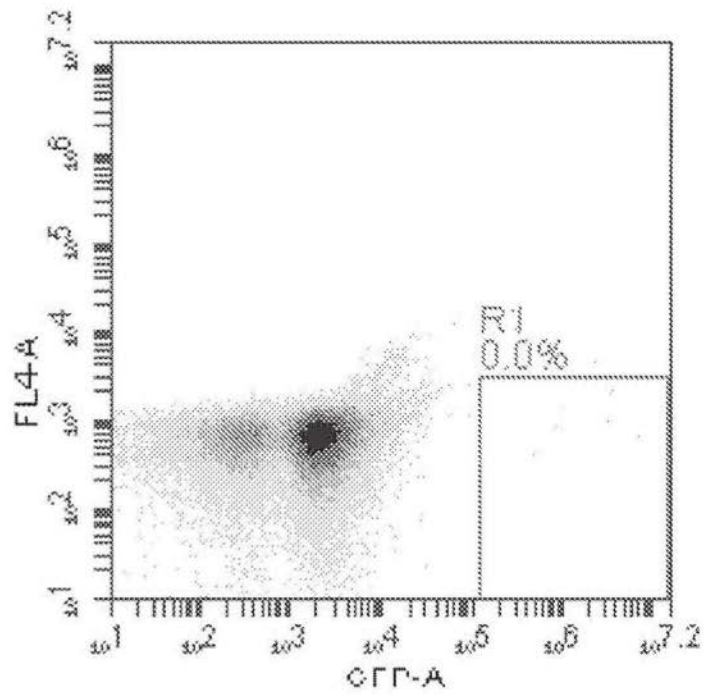


图5A

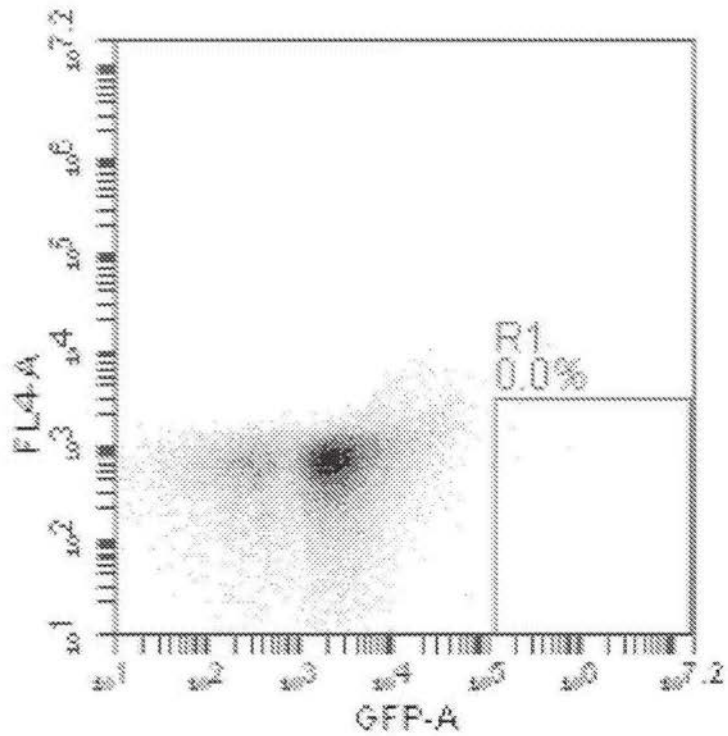


GFP小鼠BM DC对照

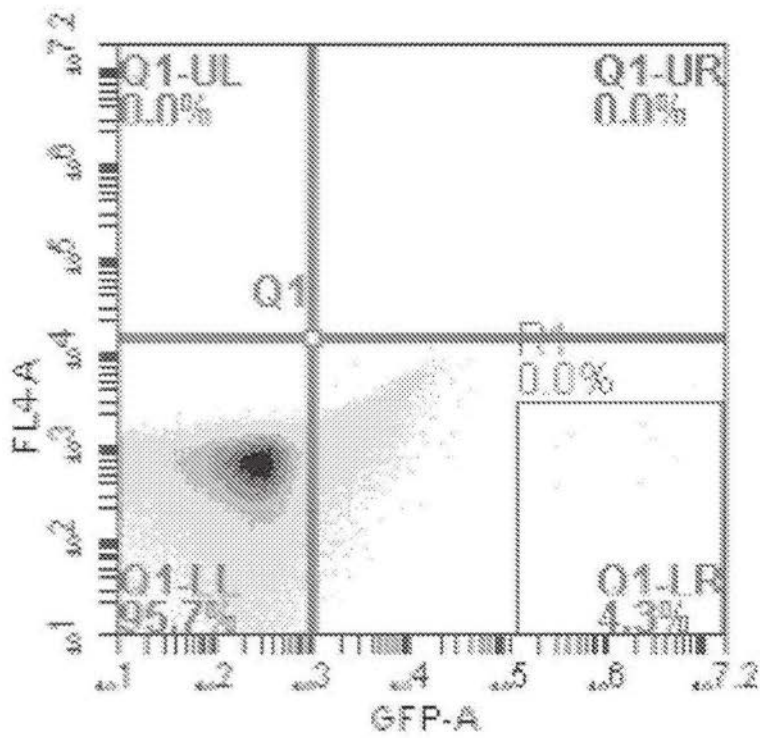


GFP DC IP 40分钟肝

图5B



GFP DC IV 40分钟肝



GFP DC IP 40分钟脾细胞

图5C

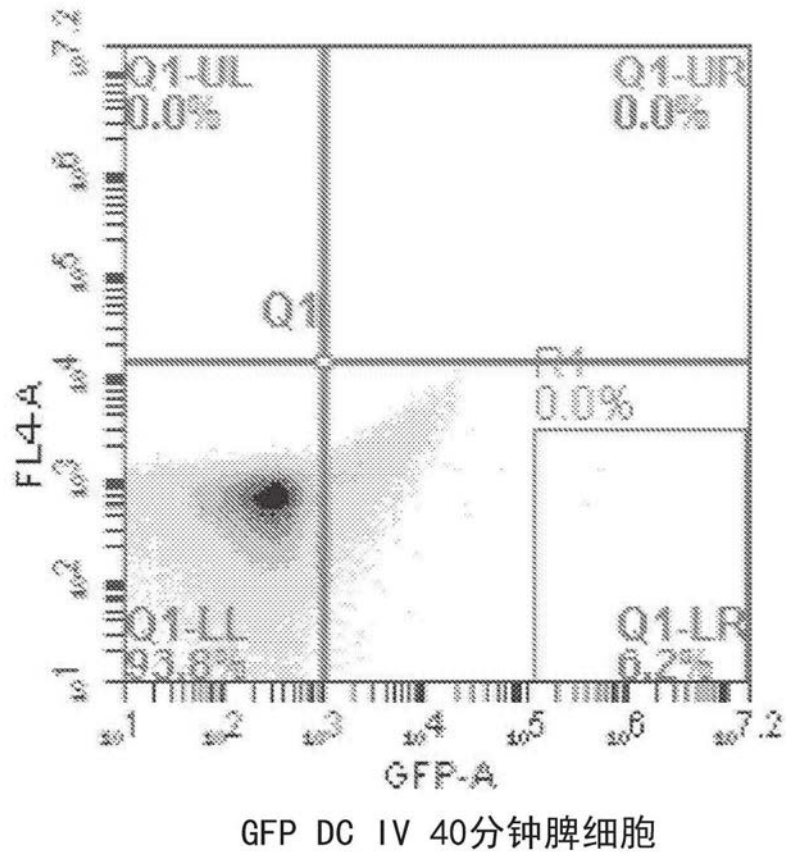


图5D