



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1427889 B

(45) 授权公告日 2011.06.29

(21) 申请号 01806229.6

A61K 38/20(2006.01)

(22) 申请日 2001.01.09

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日
2002.09.06

WO 9630030 A1, 1996.10.03, 实施例 1.

WO 9846785 A1, 1998.10.22, 说明书 11 页,
实施例 1.

(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2001/000571 2001.01.09

作者 :Schaap G H et al. 标题 :Gene
expression in flow sorted mouse

(87) PCT申请的公布数据
W001/51608 EN 2001.07.19

teratpcarcinoma ×human fibroblast
heterokaryons.differentiation 卷号 : 期号 :
26.1984, (26), 全文.

(73) 专利权人 格林维尔医院系统公司
地址 美国南卡罗来纳州

审查员 吴汀晨

(72) 发明人 T·瓦格纳 Y·韦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 5/12(2006.01)

C12N 5/22(2006.01)

C12N 5/24(2006.01)

A61K 35/14(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 3 页

(54) 发明名称

由抗原提呈细胞可获得的杂交细胞

(57) 摘要

一种制备杂交细胞的快速简便方法,该方法适用于完全分化的不分裂细胞,该方法需要使至少两种不同细胞在促进细胞融合的条件下接触,然后纯化所得的杂交细胞,而不需要进行抗生素或代谢选择。该方法获得的杂交细胞作为免疫系统细胞调节剂可用于各种用途,包括用于临床治疗方案。

1. 一种杂交细胞制备物,该制备物包含一种原发性肿瘤细胞和一种抗原呈递细胞的杂交细胞,其中所述制备物含少于 50% 的反应细胞。
2. 一种杂交细胞制备物,该制备物包含衍生自肿瘤细胞和抗原呈递细胞的用至少两种不同染料标记的杂交细胞,其中所述制备物含少于 50% 的反应细胞。
3. 依照权利要求 2 的制备物,其中所述染料是花菁染料。
4. 依照权利要求 2 的制备物,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。
5. 一种制备杂交细胞的方法,该方法包括:
 - (a) 使肿瘤细胞群与第一种标记接触,
 - (b) 使抗原呈递细胞群与第二种标记接触,其中所述第一种标记与所述第二种标记不同,
 - (c) 使肿瘤细胞群与抗原呈递细胞群在促进细胞融合的条件下接触,及
 - (d) 获得被第一种和第二种标记染色的杂交细胞群,及
 - (e) 用细胞分类术纯化所得杂交细胞群,而不需要进行抗生素或代谢选择。
6. 依照权利要求 5 的方法,其中第一种和第二种标记是荧光染料,及其中杂交细胞群的纯化是使用荧光激活细胞分类术完成的。
7. 依照权利要求 5 的方法,其中所述抗原呈递细胞选自以下的细胞:巨噬细胞、树突细胞、缺乏产生阳性免疫应答所需辅助因子的抗原呈递细胞。
8. 依照权利要求 7 的方法,其中抗原呈递细胞是树突细胞。
9. 依照权利要求 5 的方法,其中在 48 小时内纯化所得的杂交细胞群。
10. 依照权利要求 9 的方法,其中所述染料是两种不同的花菁染料,并且其中所述纯化是使用荧光激活细胞分类术完成的。
11. 依照权利要求 9 的方法,其中所述抗原呈递细胞选自巨噬细胞、树突细胞、缺乏产生阳性免疫应答所需辅助因子的抗原呈递细胞。
12. 依照权利要求 11 的方法,其中抗原呈递细胞是树突细胞。
13. 权利要求 4 的杂交细胞制备物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述杂交细胞得自作为第二种反应细胞的癌细胞。
14. 依照权利要求 13 的用途,其中所述杂交细胞制备物与白介素 2 组合。

由抗原提呈细胞可获得的杂交细胞

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及杂交细胞以及制备和使用杂交细胞的方法。杂交细胞最切实的实际应用可能是产生杂交瘤,再用杂交瘤生产单克隆抗体。此外,在多种情况下它们用于研究目的,但是直到目前它们更广泛应用例如临床治疗应用还不是切实可行的。所述临床应用包括用于治疗或预防癌症和其它疾病以及用于预防移植排斥的细胞疫苗。针对这些缺陷,本发明提供的方法和试剂使杂交细胞的广泛应用变成现实。

[0003] 虽然免疫治疗是半个多世纪以来癌症治疗的目标,但是目前分子免疫学的最新发展才使免疫治疗成为治疗癌症和转移性癌症患者的真正可行的选择。过去十年已经批准和引入了几种免疫治疗策略,广泛用于若干转移性癌症, Parkinson 等, *CANCER MEDICINE*, 第四版, 第 1213-1226 页 (Holland 等主编, 1997)。最著名的策略可能包括 IL-2 治疗 (Philip 等, *Seminars in Oncology*. 24(1 增刊 4) :S32-8, 1997 年 2 月) 和针对黑素瘤的肿瘤疫苗。Smith 等, *Int J Dermatol* 1999 ;38(7) :490-508。虽然这些策略有效对抗部分肿瘤,但因为它们仅仅增强肿瘤细胞已经衰弱的呈递其“外源”表位给 CD8T 细胞并因此产生肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的能力,所以它们的效力是有限的。

[0004] 自体完整肿瘤细胞型疫苗首先用于免疫治疗恶性黑素瘤。所述完整肿瘤细胞型疫苗是有利的,因为它们包含大量抗原,这排除了免疫应答一次针对一种抗原的需要。这是重要的,因为目前几乎不能鉴定出可用于诱导免疫系统介导肿瘤消退的特异性肿瘤相关抗原 (TAA)。Boon 等, *Immunol Today* 1997 ;18 :267-268。然而,目前单独的自体完整肿瘤细胞型疫苗仅显示孤立或非常有限的成功。Smith 等,见上文。如下可知,完整肿瘤细胞型疫苗获得非常有限的成功可能源于损害它们作为抗原呈递细胞 (“APC”) 的能力的肿瘤细胞突变。

[0005] 许多肿瘤免疫实验室的证据证明:肿瘤细胞顽固的部分原因是,它们采取突变部分或完全破坏它们在产生细胞毒性 T 淋巴细胞 CTL 过程中作为 APC 起作用的能力。Stockert 等, *J. Exp. Med* 1998 ;187 :1349-1354 ;Sahin 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995 ;92 :11810-11813 ;Gabilovich 等, *Nature Med.* 1996 ;2 :1096-1103 ;Ishida 等, *J. Immunol.* 1998 ;161 :4842-4851。这些观察结果刺激发展尝试取代肿瘤细胞作为 APC 的策略,而不是试图促进肿瘤已经衰弱的抗原呈递过程。所述取代的最佳候选者是树突细胞 (“DC”)。

[0006] DC 是“专职”抗原呈递细胞,在刺激免疫应答中起关键作用。DC 不仅能够激活原初 CD4+T 辅助细胞,而且能够刺激未致敏的 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞。Steinman, R. M. *Annu. Rev. Immunol.* 1991 ;9, 271-296 ;Macatonia 等, *J. Exp. Med.* 1988 ;169, 1255-1264 ;Mehta-Damaniet 等, *J. Immunol.* 1994 ;153, 996-1003 ;Porgador 等, *J. Exp. Med.* 1995 ;182, 255-260。

[0007] 因为这些特性,人们已经广泛研究 DC 作为用于癌症免疫治疗的抗原呈递细胞。用完整肿瘤抗原或肿瘤抗原肽脉冲处理 DC,可以将肿瘤抗原加载到 DC 上。Young 等, *J. Exp. Med.* 1996 ;183, 7-11 ;Mayordoma 等, *Nat. Med.* 1995 ;1, 1297-1302 ;Bakkar 等, *Cancer*

Res. 1995 ;55,5330-5334 ;Flamand 等, Eur. J. Immunol. 1994 ;24,605-610 ;Gong 等, Gene Ther. 1997 ;4,1023-1028 ;Song 等, J. Exp. Med. 1997 ;186,1247-1256 ;Specht 等, J. Exp. Med. 1997 ;186,1213-1256。

[0008] 例如,已经使用肽或肿瘤裂解物脉冲处理的树突细胞免疫黑色素瘤患者。Rosenberg 等, Nature Med 1998 ;4 :321-327 ;Wallack 等, Cancer 1995 ;75 :34-42 ;Bystry, Rec. Results Cancer Res. 1995 ;139 :337-348 ;Mitchell 等, Semin. Oncol. 1998 ;25 ;623-635 ;Morton 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993 ;690 :120-134 ;Berd 等, Semin Oncol. 1998 ;25 :646-653 ;Berd 等, J. Clin. Oncol. 1997 ;15 ;2359-2370。

[0009] 如此加载肿瘤抗原的肿瘤抗原负荷 DC 能够诱导细胞和体液抗原特异性抗肿瘤免疫应答。Shurin, M. R. Cancer Immunol. Immunother. 1996 ;43,158-164。然而,该方法局限于表达已知肿瘤抗原的肿瘤的应用。见 Haigh 等, Oncology 1999 ;13,1561-1573。该方法对于那些没有鉴定出肿瘤抗原的肿瘤是无用的,例如患者原发性肿瘤,而这为大多数实际情况。显然需要替代策略。

[0010] 抗原脉冲处理技术的另一个问题是 APC 的抗原呈递系统在所述蛋白 / 抗原在细胞内合成而不是在细胞外合成时作用最有效和效率最高,这是使用抗原脉冲处理细胞的一个重大缺陷。为避免这一问题,多个实验室已经尝试使用基因治疗将特异性肿瘤抗原引入树突细胞。Gong 等,1997, Gene Ther. 4, 1023-28 ;Song 等,1997, J. Exp. Med. 186 :1247-56 ;和 Specht 等,1997, 同上文。然而,该基因治疗方法也有许多缺点,其中包括 :1) 鉴定所有重要特异性肿瘤抗原的能力有限,2) 对特异性肿瘤抗原基因作图的能力有限,3) 仅能够将一种或少数已知肿瘤抗原基因引入树突细胞 4) 该过程耗时繁琐。

[0011] 另一方面, DC 与肿瘤细胞之间的融合物代表另一种可用方法,该方法产生有效肿瘤抗原呈递细胞,将所有可能肿瘤抗原呈递给免疫细胞。Gong 等, Nat. Med. 1997 ;3 ;558-561 ;Wang 等, J. Immunol. 1998 ;161,5516-5524 ;Lespagnard 等, Int. J. Cancer 1998 ;76,250-258 ;Rowse 等, Cancer Res. 1998 ;58,315-321。已经将 DC 与肿瘤细胞融合,所述融合细胞有效呈递肿瘤抗原到免疫细胞并刺激特异性抗肿瘤免疫应答。Gong 等 ;Wang 等 ;Lespagnard 等,所有这些参考文献同上文。

[0012] 然而,上述融合方案依赖于 DC 和肿瘤细胞各自中的选择标记 (使细胞抗特定细胞毒素的基因产物或使细胞在某些代谢条件下生长的基因产物) 来分离所得的杂交细胞。当仅有包含两种选择标记的融合细胞能够存活时,在两种细胞毒素存在下,通过长期培养选择出很少的细胞融合产物。由于使用选择标记的引入和选择方案需要培养和多次细胞分裂,因此它们不能应用于树突细胞,这是因为 DC 是终末分化的不分裂细胞。因此,毫不奇怪以前的融合工作依赖于携带有所述标记的已经充分定义的肿瘤细胞系以及 DC 特异性和肿瘤特异性缀合抗体,这限制了该策略在治疗癌症中的应用。

[0013] 总的来说,以前基于癌症的融合方法具有如下限制 :1) 它们需要显示特定标记的确定肿瘤细胞系 ;2) 它们需要 DC 和肿瘤细胞特异性抗体来选择融合细胞 ;3) 融合细胞的选择和扩增需要太长时间。

[0014] 使用杂交细胞预防移植排斥的领域甚至比癌症领域发展更慢。事实上,没有发现这样的报告。

[0015] 预防移植排斥的一般方法利用抑制整个免疫系统的非选择性免疫抑制药物。

Abbas 等, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 第 347-350 页。所述方法的明显缺点是, 使患者对在免疫系统完整的情况下能够阻挡的疾病更易感。

[0016] 人们已经认识到: 抗原呈递细胞激活 T 细胞至少必须发生两种相互作用。所述相互作用是加载有抗原的主要组织相容性 (MHC) 抗原和 T 细胞受体之间的相互作用, 以及某些辅助分子和它们在 T 细胞上的关联受体之间的相互作用。辅助分子中研究最充分的一类辅助分子是 B7 (B7.1 和 B7.2), B7 与 T 细胞上的 CD28 和 CTLA4 相互作用。Abbas 等, 同上文。因此, 破坏 MHC 的相互作用或所述辅助分子的相互作用可导致可用于例如预防移植排斥的无反应。

[0017] 事实上, 破坏 B7 相互作用不仅预防免疫应答, 还导致对在该破坏过程中呈递的任何抗原产生永久性的耐受性。Wei 等, 1996, Stem Cells 14 ; 232-38。因此, 在移植排斥情况下, 阻断 B7 可产生耐受, 预防排斥。所述方法的问题以及其不能临床尝试的可能原因是耐受性涉及治疗期间呈递的任何抗原, 而不仅限于移植抗原。换句话说, 假如患者在破坏 B7 期间暴露于一种病原体, 所述患者的免疫系统将永久性地对该病原体具有耐受性。这将阻止患者抵抗所述病原体, 可能产生致命性后果。显然, 需要更特异性的方法。

[0018] 一种有前景的方法利用缺乏辅助分子如 B7 的细胞呈递抗原。这些细胞仍然利用 MHC 呈递抗原, 然而因为它们缺乏激活所需的辅助相互作用, 所以它们诱导呈递抗原特异性耐受性。因此, 可用特异性抗原加载这些细胞 (包括未成熟的 (原初) B 细胞) 并诱导抗原特异性无变应性。与上述癌症实例一样, 该抗原对抗原方法并不具有实际临床应用所需的一般应用性。需要可应用于任何移植器官的方法, 并且该方法不受所述器官的免疫原性抗原的影响。

[0019] 如上所述, 显然本领域需要诱导和抑制对整个细胞的特异性免疫应答的可广泛应用、快速方法以及完成所述方法的特异性试剂。

[0020] 发明简述

[0021] 因此, 本发明目的之一是提供本领域上述缺陷的解决方案。

[0022] 进而为了达到所述目的, 本发明提供用于制备杂交细胞的试剂盒。一方面, 所述试剂盒包含至少两种基本不含内毒素的染料和利用一种方法由反应细胞制备杂交细胞的说明书, 所述方法包括使反应细胞分别与其中一种所述染料接触。另一方面, 所述试剂盒包括至少两种基本不含内毒素的染料和一种促进细胞融合的试剂。所述不含内毒素的染料最好是荧光染料, 如花菁染料。

[0023] 同时按照本发明的所述目的, 公开了杂交细胞制备物。在一个实施方案中, 所述制备物包含具有不多于 $n-1$ 选择标记的杂交细胞, 其中 n 代表用于形成所述杂交细胞的反应细胞数, 并且所述制备物基本不含非杂交细胞。在另一实施方案中, 所述制备物包含原发性肿瘤细胞和抗原呈递细胞的杂交细胞。在又一实施方案中, 所述制备物包含正常细胞和抗原呈递细胞的杂交细胞, 其中所述抗原呈递细胞缺乏产生阳性免疫应答所需的辅助因子。所述正常细胞可以分离自移植器官。再一实施方案是包含病原性细胞和抗原呈递细胞的杂交细胞的制备物, 所述病原性细胞例如来自寄生虫的细胞。一种杂交细胞制备物包括用至少两种不同染料标记的杂交细胞, 所述染料最好是荧光染料, 例如花菁染料。所述杂交细胞可以由例如树突细胞或未成熟 B 细胞获得。

[0024] 按照所述目的, 本发明的另一方面提供制备杂交细胞的方法。本发明方法的一个

实施方案包括：使至少两种不同细胞在促进细胞融合的条件下接触，然后纯化获得的杂交细胞，而不需要进行抗生素或代谢选择。在一个方面，使用荧光染料如花菁染料完成该方法，通过荧光激活细胞分类术分离杂交细胞。所述方法涉及使反应细胞如巨噬细胞、树突细胞和缺乏产生有效免疫应答所需辅助因子的抗原呈递细胞与第二种反应细胞融合，所述第二种反应细胞如肿瘤细胞、病原性细胞和正常细胞。最好在约 48 小时内完成所述方法。

[0025] 又一方面，本发明提供治疗癌症的方法，该方法涉及提供本发明的杂交细胞制备物，所述制备物衍生自癌细胞反应细胞；然后将所述杂交细胞给予癌症患者。该方法包括用细胞因子或淋巴因子如白介素 -2 辅助治疗。

[0026] 再一方面，本发明设想治疗与病原生物存在有关的疾病的方法，该方法涉及提供本发明的杂交细胞制备物，所述杂交细胞制备物衍生自从所述病原生物分离的细胞，然后将所述细胞给予患者。该方法也可以包括用细胞因子或淋巴因子如白介素 -2 的辅助治疗。

[0027] 此外，按照本发明所述，本发明提供诱导抗原的免疫耐受性的方法，所述方法包括提供本发明的杂交细胞制备物，所述杂交细胞制备物衍生自表达需要免疫耐受的抗原的细胞，然后将所述制备物给予患者。免疫耐受性细胞可以是来自移植器官的细胞，其中所述患者需要进行器官移植。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 显示树突细胞和癌细胞形成的本发明杂交细胞能够产生肿瘤特异性细胞毒性 T 细胞反应，所述反应与体内免疫治疗有关。

[0030] 图 2A 显示 FACS 检测在对照树突细胞上的抗原呈递标记。显示一般分布。

[0031] 图 2B 显示在树突 / 肿瘤细胞的杂交细胞上的抗原呈递标记。显示与对照树突细胞相比的一般分布，该分布意味着所述杂交细胞保留抗原呈递所需的所有标记。

[0032] 发明详述

[0033] 一方面，本发明提供快速有效制备可在多种临床和非临床应用中使用的杂交细胞。所述杂交细胞尤其可以用于激发免疫系统治疗或预防疾病的治疗方案。例如，在优选实施方案中，通过将癌细胞与抗原呈递细胞融合，使用本发明的杂交细胞治疗癌症。在另一实施方案中，本发明的杂交细胞包含浆细胞和癌细胞，所述杂交细胞象常规杂交瘤一样，可用于制备单克隆抗体。在又一实施方案中，本发明的杂交细胞包含缺乏免疫原性反应所需辅助成分的抗原呈递细胞以及预定移植到患者体内的器官的细胞。可以用这些细胞诱导对所述移植细胞的耐受性，由此降低移植排斥的发生率。还提供产生杂交细胞和实施本发明方法的试剂盒。

[0034] 制备杂交细胞的方法

[0035] 本发明设想制备杂交细胞的方法，该方法快速简便并可用于完全分化的不分裂细胞。本发明方法涉及使至少两种不同细胞（“反应细胞”）在促进细胞融合的条件下接触，然后纯化所得的杂交细胞（“产物细胞”），而不需要进行抗生素或代谢选择。一般地说，在暴露于促进细胞融合的条件后，在相当短的时间内完成纯化，例如在少于约 24 到 48 小时内。

[0036] 在优选实施方案中，在至少两种不同染料的辅助下完成所述方法，所述染料可以是荧光染料。因此，所述方法包括使需要融合的两种细胞类型分别与不同染料接触。该融合前标记步骤用不同染料标记每种细胞，使得能够区分每种融合母细胞和杂交细胞融合产物：每种反应细胞被一种染料染色，而产物细胞被两种染料染色。用这种方法，可以将杂交

融合产物与反应细胞分开,例如通过荧光激活细胞分类术 (FACS) 等等。

[0037] 可用于本发明的染料其特征是与细胞结合足够时间,使得能够通过这样的结合检测到细胞。此外,有用的染料并不极大地消除细胞生活力,优选保留大于约 50% 的细胞生活力。通常它们是荧光染料。一组有用的染料包含所谓“花菁”染料。花菁染料有多种类型,在不同波长发射荧光,以便当它们与细胞结合时能够单独或共同检测出来。一些代表性花菁染料可见 Horan 等,美国专利第 4,783,401 号 (1998)、美国专利第 4,762,701 号 (1998) 和美国专利第 4,859,584 号 (1989),其内容特此通过引用专门加入本文中。

[0038] 两种尤其有用的花菁染料是 PKH26-GL 和 PHK2-GL,可以从 Sigma Chemical Co. 获得。由于已经广泛研究和使用的这些染料,因此优选使用它们。例如,已经在体内动物研究中使用它们进行细胞运输研究。Horan 等, Nature 1989 ;340,167-168 ;Horan 等, Methods Cell Biol. 1990 ;33,469-490 ;Michelson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996 ;93, 11877-11882。在实验室动物中,已经显示这些染料不影响细胞生长或功能,并且不从用这些染料染色的细胞迁移到其它细胞 (Horan 等,1989),因此毒性低,这是体内应用的一个所需特性。

[0039] 按照本发明在体内使用的染料应当不含内毒素,例如根据鲎变形细胞 (LAL) 测试不含内毒素。一般地说,当测量到的内毒素水平低于约 1ng/ μ g 染料,优选低于约 0.1ng/ μ g 染料,那么就认为所述染料是“不含内毒素的”。

[0040] 更一般地说,所述染料基本不含热原,不论热原性是由内毒素产生或由其它热原产生。因此,在下面情况下认为染料“基本不含热原”:用所述染料标记的所述杂交细胞的最终制剂 (例如注射到接受者体内的形式) 产生低于约 1 内毒素单位 (EU)/剂,优选低于约 0.1EU/剂,最优选低于约 0.05EU/剂。毒性域值由下面事实决定:当采取本发明的治疗方法时,大多数本文设想的体内方法少于约 10^{-8} g 与细胞结合的所述染料导入患者体内。

[0041] 常规的花菁染料标记方法需要存在细胞稳定剂 (渗透压调节剂) 如糖 (如葡萄糖或甘露醇)、氨基酸和 / 或某些商品缓冲剂。见例如 Horan 等,美国专利第 4,783,401 号 (1998)。发明人发现二甲基亚砷 (DMSO) 能够取代这样的稳定剂。尤其是用标准培养基稀释的 DMSO 可以用作花菁染料的溶剂,并且其促进染料的有效和稳定摄入,而不导致细胞生活力大量丧失。DMSO 浓度的一般使用范围是从约 10% 到约 50%,优选的范围是从约 20% 到约 40%。因此,本发明还设想使用 DMSO 取代常规稳定剂,用花菁染料标记细胞的方法及相应的试剂盒。

[0042] 一旦标记了反应细胞,就使它们在促进细胞融合的条件下相互接触。所述促进融合的条件是技术人员众所周知的,通常涉及加入促进细胞融合的试剂。据认为这些试剂的作用利用分子集群机制使细胞集中到它们足够接近以引起细胞膜融合的程度。本发明设想任何符合这些特征的试剂,而代表性有用试剂是聚合化合物,如聚乙二醇。所述试剂的有效量一般是从约 20% 到约 80% (w/v)。优选范围是从约 40% 到约 60%,更优选约 50%。

[0043] 形成杂交细胞后,将它们与未融合的反应细胞分开是有利的。例如,在细胞疫苗的情况下,所述纯化显著提高效价。例如,可以通过常规 FACS 方法完成纯化。

[0044] 所述方法明确地设想更高级数的杂交细胞,即在两种以上细胞间的融合。在每种情况下,所需要作的仅是增加可以用作标记选择更高级数杂交细胞的染料。例如,用三种不同染料标记的三种不同反应细胞形成“三杂交细胞 (tribred)”,诸如此类。因此,本文所用

术语“杂交细胞”设想两种或更多种反应细胞间的融合物。

[0045] 本发明的试剂盒

[0046] 本发明还涉及用于标记细胞和制备杂交细胞的试剂盒。这些试剂盒用于实施制备杂交细胞的本发明方法。例如，标记试剂盒包含至少一种染料，并且可以包含 DMSO 和标记说明书。本发明的杂交细胞制备试剂盒包含至少两种基本不含内毒素和 / 或不含热原的染料、制备杂交细胞的说明书和 / 或其包含促进细胞融合的试剂。

[0047] 杂交细胞制备物

[0048] 本发明还设想杂交细胞制备物。一般地说，所述制备物将基本不含反应细胞（少于约 50% 反应细胞，更优选少于约 10% 到 25% 反应细胞，最优选少于约 5% 反应细胞）。从可能具有但不一定具有选择标记的反应细胞制备本发明的杂交细胞。无论如何，至少一种反应细胞缺乏所述标记。因此，如果 n 表示反应细胞数，那么在大多数情况下 $n-1$ 表示杂交细胞存在的选择标记最大数目。例如，当两种反应细胞融合形成杂交细胞时，所述杂交细胞将包含不多于一种选择标记。

[0049] 词组“选择标记”在本文中以其常规意义使用，指抗生素抗性 or 代谢标记，如次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 等等。选择标记是内源产生的，并且不包括外源添加物质如染料。

[0050] 在一个实施方案中，本发明的杂交细胞制备物包含一种原发性肿瘤细胞和一种抗原呈递细胞 (APC) 作为反应细胞。所述杂交细胞可用作细胞疫苗以诱导针对肿瘤的免疫应答。所述肿瘤细胞可以是任何类型，包括常见癌症，如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌、肺癌等等。所述 APC 最好是专职 APC，例如巨噬细胞或树突细胞。由于树突细胞优越的抗原呈递能力，更优选使用它们。发明人考虑了同系融合以及同种异体融合，因为发明人已经发现使用对二者适用良好的小鼠模型。

[0051] 另一具体杂交细胞包含一种病原性细胞和一种 APC。这些杂交细胞也可用作细胞疫苗。抗原呈递细胞还是尤其优选树突细胞。另一方面，所述病原性细胞实际上可以是任何类型。例如，它可以是已经去除细胞壁的细菌细胞（螺杆菌属 (*Helicobacter*) 等等）。所述病原性细胞可以是真菌细胞，如假丝酵母属 (*Candida*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和链格孢属 (*Alternaria*)。

[0052] 所述病原性细胞也可以是寄生虫细胞，例如来自锥虫寄生虫、阿米巴寄生虫、各种原生动物、线虫、吸虫和绦虫的细胞。代表性属包括：疟原虫属 (*Plasmodium*)、利什曼原虫属 (*Leishmania*)、锥虫属 (*Trypanosoma*)、内阿米巴属 (*Entamoeba*)、纳归虫属 (*Naegleria*)、棘阿米巴属 (*Acanthamoeba*)、双核阿米巴属 (*Dientamoeba*)、弓形虫属 (*Toxoplasma*)、肺囊虫 (*Pneumocystis*)、巴贝虫属 (*Babesia*)、等孢子球虫属 (*Isospora*)、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*)、*Cyclospora*、贾第虫属 (*Giardia*)、小袋虫属 (*Balantidium*)、酵母菌属 (*Blastocystis*)、小孢子虫目 (*Microsporidia*)、肉孢子虫属 (*Sarcocystis*)、吴策线虫属 (*Wuchereria*)、布鲁丝虫属 (*Brugia*)、盘尾属 (*Onchocerca*)、罗阿丝虫属 (*Loa*)、*Tetrapetalonema*、曼森线虫属 (*Mansonella*)、恶丝虫属 (*Dirofilaria*)、蛔虫属 (*Ascaris*) (蛔虫)、板口线虫属 (*Necator*) (钩虫)、钩虫属 (*Ancylostoma*) (钩虫)、类圆线虫属 (*Strongyloides*) (线虫)、蛲虫属 (*Enterobius*) (绕虫)、鞭虫属 (*Trichuris*) (毛首鞭虫)、毛圆线虫属 (*Trichostrongylus*)、毛细线虫属 (*Capillaria*)、

毛线虫属 (*Trichinella*)、*Anasakis*、*Pseudoterranova*、龙线属 (*Dracunculus*)、裂体吸虫属 (*Schistosoma*)、支睾吸虫属 (*Clonorchis*)、并殖吸虫属 (*Paragonimus*)、后睾吸虫属 (*Opisthorchis*)、片吸虫属 (*Fasciola*)、后殖吸虫属 (*Metagonimus*)、异形吸虫属 (*Heterophyes*)、姜片虫属 (*Fasciolopsis*)、绦虫属 (*Taenia*)、膜壳绦虫属 (*Hymenolepis*)、裂头属 (*Diphyllobothrium*)、迭宫绦虫属 (*Spirometra*) 和棘球属 (*Echinococcus*)。

[0053] 在另一实施方案中,本发明的杂交细胞制备物包含一种需要免疫耐受性的靶细胞和一种缺乏免疫原性反应所需辅助分子的抗原呈递细胞。一般这些 APC 缺乏 B7 (如 B7.1 或 B7.2);代表性细胞是原初未成熟的 B 细胞和成纤维细胞,但任何能够呈递抗原 (具有 MHC 分子)、缺乏辅助分子的细胞就能满足要求。在 B7 的情况下,特异性抗体是已知的,而技术人员非常了解确定任何特定细胞类型是否缺乏 B7 的方法。优选原初 B 细胞,因为它们表达高水平的 MHC 分子和所有本领域内已知的有效细胞-细胞接触所需的粘附分子。

[0054] 无论如何,因为所得的杂交细胞携带有 I 类 MHC 分子和 II 类 MHC 分子,因此它们具有呈递抗原到免疫系统的能力,但由于它们不具有必要的辅助标记如 B7 (CD28 或 FLTA4 配体),因此它们不能激活免疫系统。因此,这些杂交细胞不诱导免疫应答,而是细胞编程性死亡清除,由此使免疫系统对这些杂交细胞呈递的靶细胞抗原具有耐受性。所述免疫细胞杂交细胞可用于治疗自身免疫病如移植排斥。

[0055] 可以使用一组如上文所述的染料制备本发明的杂交细胞制备物。因此,用至少两种不同染料标记本发明的杂交细胞。这些染料最好是荧光染料,其中优选花菁染料。或者,例如可以用在反应细胞上差异表达的细胞表面标记以及它们的对应抗体制备杂交细胞。可以使用所述抗体顺序淘选每种标记。见 Gong 等,1997, *Nat. Med.* 3 :558-61。

[0056] 治疗方法

[0057] 本发明的方法和产品可用于治疗和预防方法,本文中的“治疗”包括“预防”。所述方法基本上涉及给予患者一种“靶”细胞和另一种细胞 (一般是抗原呈递细胞) 的杂交细胞。所述“靶”细胞是寻求免疫应答的细胞。根据需治疗的疾病,所述免疫应答可以是阳性或阴性的。例如,在治疗癌症或寄生虫病时需要阳性免疫应答,在预防移植排斥时需要阴性免疫应答。

[0058] 一种具体治疗或预防方法涉及癌症。该方法包括给予患者本发明的杂交细胞或用本发明的方法或试剂盒制备的杂交细胞。一方面,如上所述,所给予的杂交细胞具有 n-1 种选择标记。可以用至少两种染料标记所述杂交细胞。

[0059] 代表性癌症治疗方法涉及用不同染料标记分离的肿瘤细胞和免疫细胞,所标记的细胞形成杂交细胞。分离所述杂交细胞,以可接受的赋形剂给予患者。为避免给予有活力的癌细胞,建议在融合前用致死剂量照射所述肿瘤反应细胞。该步骤杀死细胞,但不妨碍获得的杂交细胞有效呈递肿瘤抗原。发明人考虑了同系融合以及同种异体融合,因为发明人已经发现使用对二者适用良好的小鼠模型。

[0060] 此外,通过联合使用其它抗肿瘤药物和所述杂交细胞,可以促进癌症治疗。一类这样的药物是免疫调节剂。包括细胞因子和淋巴因子,尤其是白介素 2 (IL-2) 和 IL-2 衍生物如 aldesleukin (*Proleukin*, Chiron Corp.)。优选使用 IL-2,因为它会进一步增强所述杂交细胞产生的免疫应答。本文所用的“白介素 2”一般用于指天然分子和保留基本白介素 2 活性 (如促进 T 细胞生长) 的任何衍生物或类似物。也可以使用其它淋巴因子和细胞因子

作为辅助治疗。实例包括 γ 干扰素 (IFN- γ)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等等。

[0061] 对所述癌症治疗方案的改进方案可用于治疗任何与病原生物有关的疾病。在改进方案中,所述反应细胞是 APC 和从病原生物分离的细胞。在其它方面,将按照与癌症治疗相同的方式完成治疗。

[0062] 本发明的另一不同方面包括治疗自身免疫病的方法。用与上文所述癌症治疗基本相同的方式完成所述方法。主要的区别是反应细胞不同。在自身免疫病的情况下,目标是减少或消除免疫应答,而癌症治疗的目标是产生或增强免疫应答。

[0063] 可使用本发明的杂交细胞治疗自身免疫病的部分原因基于以下观察结果:某些细胞能够呈递抗原,但它们缺乏提供阳性免疫应答的辅助分子。通常这些细胞缺乏 B7,例如它们可以是未成熟 B 细胞或成纤维细胞。事实上,这些细胞的抗原呈递产生阴性免疫应答。它使免疫系统产生耐受性,诱导特定抗原反应性免疫细胞的编程性细胞死亡。

[0064] 因此,治疗自身免疫病的方法利用一种在辅助相互作用上存在缺陷的 APC 和一种“正常细胞”作为反应细胞。所述“正常细胞”是希望获得免疫耐受性的任何靶细胞。例如,在预防移植排斥的方法中,它可以来自移植器官。另一方面,在通过移植或其它方法治疗或预防糖尿病的情况下,所述正常细胞可以是胰岛细胞。所述方法可以使免疫系统对任何类型细胞产生耐受性。

[0065] 本文所用术语“治疗”及其各种表达形式也包括预防方法。

[0066] 为说明本发明提供上文详细描述和下面的实施例,它们不是限制性的。技术人员知道,还有其它实施方案在本发明范围内而没有详细描述。

[0067] 实施例

[0068] 实施例 1:动物研究

[0069] 本实施例显示制备癌细胞和树突细胞之间的某些杂交细胞,即树突细胞瘤 (dendritomas)。在一个小鼠转移癌模型系统中,使用这些杂交细胞作为细胞疫苗以预防癌症。

[0070] 为从骨髓制备树突细胞,处死合适数量的雌性 C57BL/6J 小鼠,以支持随后的树突细胞瘤注射(每种注射小鼠需要两只小鼠)。从每只小鼠的后腿取出股骨和胫骨。用装有含 25mM HEPES(Gibco BRL)的 RPMI 1640 的注射器从骨中冲洗出骨髓。所述包含骨髓的培养基过滤通过 40 μ m 细胞过滤器,用 50ml 圆锥形离心管收集。在 1500rpm 离心五分钟,沉淀骨髓细胞。去上清后,轻轻敲打离心管,使细胞沉淀松动。加入 5ml/小鼠 ACK 裂解液(0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.3)并在室温下温育 5 分钟,裂解红细胞。在 1500rpm 离心五分钟,沉淀细胞。去上清后,将所述细胞温和地重悬浮于 10ml/小鼠完全 DC 培养基(RPMI 1640, 10%胎牛血清(FBS), 100 μ g/ml 庆大霉素, 10ng/ml GM-CSF, 10ng/ml IL-4)。所述细胞以两个孔/小鼠接种到六孔组织培养板中。所述培养物在 37°C、5% CO₂ 温育过夜,然后从每个培养物除去未贴壁(floating)的细胞。贴壁细胞用 1X 磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗两次。每孔细胞加入 5ml 完全 DC 培养基。所述培养物在 37°C、5% CO₂ 温育 48 小时。通过将包含细胞的上清转移到 15ml 圆锥形离心管,从 6 孔板收获树突细胞。每孔用 3ml 1X PBS 洗两次。每孔加入 1ml 0.25%胰酶/EDTA(Gibco BRL),用胰酶温和处理所述细胞。振荡所述板使胰酶溶液覆盖整个表面后,快速除去所述胰酶溶液。轻敲所述板,取出

松散贴壁的细胞。这些细胞重悬浮于 2ml 完全 DC 培养基并加入 15ml 管。在 1500rpm 离心五分钟,沉淀细胞。所述细胞重悬浮于 10ml 完全 DC 培养基后,进行细胞计数。

[0071] 从 ATCC (CRL-6322) 获得 B16F0 小鼠黑素瘤细胞并使用标准组织培养技术培养。当细胞可用时,用 0.25% 胰酶 /EDTA 处理所述细胞。进行细胞计数后,在 1500rpm 离心五分钟,沉淀实验所需数量的细胞。其余细胞继续培养,以后使用。

[0072] 为一般性细胞膜标记小鼠树突细胞和 B16F0 黑素瘤细胞,使用商业化的荧光细胞连接物试剂盒。用 Sigma 贮液号 PKH2-GL 标记树突细胞为荧光绿;用 Sigma 贮液号 PKH26-GL 标记 B16F0 黑素瘤细胞为荧光红。在 25°C 下进行染色程序。需要染色的细胞用无血清培养基洗涤。所述细胞悬浮液在 400g 离心五分钟,获得松散的沉淀。除去上清,在沉淀中剩下少于 25 μ l 培养基。轻敲所述管,重悬浮所述沉淀,然后在重悬浮细胞中加入 1ml 分别用于绿染色或红染色的 Diluent A 或 C。在染色前,用 Diluent A 或 C 在聚丙烯管中制备 4×10^{-6} 摩尔染料 (2X)。为最小化乙醇作用,加入的染料量少于各样品体积的 1%,将细胞稀释液快速加入 1ml 2X 染料。立即用移液管温和吹打,混合所述细胞和染料。然后所述混合物在 25°C 下温育五分钟。加入等体积 FBS 并温育 1 分钟,终止所述染色程序。用等体积完全培养基稀释已经染色的细胞。在 400g 离心 10 分钟,从所述染色溶液取出染色的细胞。总共洗三次后,所述细胞以合适浓度重悬浮于完全培养基中。通过荧光显微术监测染色效率。

[0073] 在融合过程前,用 5,000 拉德照射红荧光染色的 B16F0 小鼠黑素瘤细胞。在 50ml 圆锥离心管中以 1 : 1 的比例混合小鼠树突细胞和 B16F0 黑素瘤细胞,使两种细胞类型融合。所述管倒满含 25mM HEPES 的无血清 RPMI 1640。所述细胞混合物室温下在 1500rpm 离心五分钟。注意在融合过程中,所有溶液以及进行融合的管都在双烧杯水浴保持在 37°C。从所述混合细胞沉淀吸出上清液并弃去。用 1ml 血清学移液管,在一分钟内将在 PBS (不含 Ca^{++} 和 Mg^{++}) 内含 50% PEG 和 10% DMSO 的 1ml 预热 50% PEG/DMSO (Sigma) 逐滴加入混合细胞沉淀,每加入一滴后用移液管尖搅拌细胞。用移液管再搅拌所述混合物一分钟。

[0074] 使用清洁的 2ml 血清学移液管,在两分钟内将 2ml 预热的含 25mM HEPES 的无血清 RPMI 1640 逐滴加入所述细胞混合物,并在加入每滴后搅拌。用 10ml 血清学移液管,在二到三分钟内逐滴加入 7ml 预热的含 25mM HEPES 的无血清 RPMI 1640。室温下在 1500rpm 离心五分钟,沉淀细胞。弃去上清,将所述管放回烧杯水浴中。用清洁的 10ml 血清学移液管吸取 10ml 完全 DC 培养基,通过强力加入约 3ml 培养基到所述沉淀上并温和加入其余培养基,重悬浮所述细胞沉淀于所述完全 DC 培养基中。所述重悬浮的细胞加入 T75 组织培养瓶中。将 Instant Dendritomas (树突细胞与黑素瘤细胞融合) 在 37°C、5% CO_2 温育过夜。滴一滴细胞在载玻片上,通过荧光显微术评估,确保发生融合。

[0075] 通过取出包含细胞的上清并如上文所述用胰酶温和处理贴壁细胞,从所述组织培养瓶获得 Instant Dendritomas。在 1500rpm 离心五分钟,沉淀细胞。所述细胞沉淀重悬浮于 2ml 1X PBS 中并转移到无菌聚苯乙烯圆底 12 \times 75mm Falcon 管。所述细胞在 1500rpm 离心五分钟后,重悬浮于 1ml 1X PBS。使用 FACS Caliber (Becton Dickinson),用标准方法根据绿和红双荧光分选出 InstantDendritomas。

[0076] 在 2000rpm 离心 30 分钟,沉淀分选出的细胞。去上清后,所述细胞以 50,000 细胞 /0.5ml 1X PBS 的浓度重悬浮。滴一滴细胞在载玻片上,通过荧光显微术评估,确保所述分选物的整体纯度。

[0077] 在融合程序前三天,通过静脉内注射 0.4ml1X PBS 中的 0.75×10^6 B16F0 黑素瘤细胞攻击雌性 C57BL/6J 小鼠。一旦沉淀并重悬浮 Instant Dendritomas 后,每只小鼠静脉内注射 50,000 细胞。随后用 IL-2 处理,以 10,000IU/天/小鼠腹膜内给予。监测所述小鼠的肺转移长达四周。

[0078] 四周后,处死小鼠,计数转移瘤。没有用 Instant Dendritomas 处理的四只对照动物的每一只都有 50 个以上肿瘤。另一方面,只有一只处理过的动物有可测量的转移瘤。这些数据指出,本发明的杂交细胞在公认的动物模型系统中有效治疗癌症。这些数据汇集在下面的表中。

[0079]

组别	转移瘤数 (包括非肺部肿瘤)
<u>对照组</u>	
A	> 50
B	> 50
C	> 50
D	> 50
<u>实验组</u>	
A	0
B	3
C	0
D	0

[0080] 实施例 2:人类研究

[0081] 本实施例证明:本发明的树突细胞瘤杂交细胞诱导癌细胞特异性细胞毒性 T 细胞反应。本实施例提供原理证据证明这些杂交细胞能够诱导针对肿瘤的有治疗意义的免疫应答。

[0082] 为增加从外周血分离的树突细胞数量,利用使用抗 CD14 包被板的淘选技术。将五百微克抗 CD14 抗体重悬浮于 5ml 含 BSA(每 100 μ l 抗体 700 μ g BSA) 的 1X PBS。用 5ml 所述抗体包被一块 100mm 组织培养板。所述板在室温下旋转并温育一小时,或在 4 $^{\circ}$ C 旋转并温育过夜。除去所述抗体溶液,然后用 5ml 1X PBS 洗板五次。

[0083] 从全血中分离外周血单核细胞(PBMC):用无防腐剂或肝素钠试管获取来自患者的 50ml 外周血。所述血用 1X PBS 以 1:1 稀释。在 15ml 圆锥形离心管中,将 8ml 所述稀释血铺展在 4ml 室温 Ficoll-Paque Plus 上。所述 Ficoll 梯度液在室温下以 400g 离心 40 分钟。使用巴氏吸管,小心地从 Ficoll 梯度液吸出 PBMC 层并转移到清洁的 15ml 离心管。在管中加入四倍体积的 1X PBS,倒置几次以完全混合。所述 PBMC 在室温下以 100g 离心 10 分钟。去上清后,在细胞沉淀中加入 10ml1X PBS,并倒置混合。在室温下以 100g 离心 10 分钟,沉淀所述 PBMC。除去上清,将所述 PBMC 重悬浮于 5ml 完全 DC 培养基(RPMI 1640,10% 人血清,800U/ml GMCSF,1000U/ml IL-4,100 μ g/ml 庆大霉素)。

[0084] 将所述重悬浮的 PBMC(多达 2×10^8) 用移液管加入抗 CD14 包被的板,并旋转以覆

盖整个板。所述板在室温下温育 30 分钟。再次温和旋转所述板后,取出包含未贴壁细胞的上清。加入 10ml 1X PBS 并旋转,洗涤贴壁细胞。重复该洗涤共四次,每次在同一位点进行吸量操作。在所述洗涤后,立即在板上加入 10ml 完全 DC 培养基。所述培养物在 37°C、5% CO₂ 温育 5 到 10 天,产生树突细胞。

[0085] 在手术后立即获取从患者切割的肿瘤的一部分。将该部分肿瘤切成几块,置于含 1X PBS 的 50ml 圆锥离心管中。用解剖剪刀将所述肿瘤块进一步切割成更小组织块,然后置于 T75 组织培养瓶中。在瓶中加入 10ml 0.25% 胰酶 /EDTA,在 37°C 震荡温育一小时。温育后,在瓶内加入 15ml 完全肿瘤细胞培养基 (DMEM, 10% 人血清, 200 μg/ml 庆大霉素)。取出肿瘤块并置于清洁的 T75 瓶中,在 37°C、5% CO₂ 温育过夜。

[0086] 来自所述最初瓶的培养基 / 胰酶混合物包含一些单个肿瘤细胞。这些细胞过滤通过 40 μm 细胞渗滤器,在 1500rpm 离心五分钟沉淀。所述细胞重悬浮于 10ml 完全肿瘤细胞培养基,转移到 T75 组织培养瓶中,在 37°C、5% CO₂ 温育。对于包含肿瘤块的瓶,温育过夜后加入 20ml 完全肿瘤细胞培养基。仔细监测两种瓶中的贴壁细胞。几天后,从瓶中取出肿瘤块。每三天流加培养贴壁肿瘤细胞,维持以供实验使用。使用针对贴壁细胞的标准组织培养技术,传代培养所述细胞。

[0087] 如上面实施例 1 所述制备细胞膜标记的人树突细胞和肿瘤细胞。

[0088] 通过下面方法制备 CD8+ 细胞毒性 T 细胞 (CTL)。从全血中分离外周血单核细胞 (PBMC): 在无防腐剂或肝素钠管中获取来自患者的 40ml 外周血并在 ACD 管中获取来自患者的 10ml 外周血。所述血用 1X PBS 以 1 : 1 稀释。在 15ml 圆锥形离心管中,将 8ml 所述稀释的血铺展在 4ml 室温 Ficoll-Paque Plus 上。所述 Ficoll 梯度液在室温下以 400g 离心 40 分钟。使用巴氏吸管,小心地从 Ficoll 梯度液吸出 PBMC 层并转移到清洁的 15ml 离心管。在管中加入四倍体积的 1XPBS,倒置几次以完全混合。所述 PBMC 在室温下以 100g 离心 10 分钟。去上清后,在细胞中加入 10ml 1X PBS,并倒置混合。在室温下以 100g 离心 10 分钟,沉淀所述 PBMC,然后重悬浮于完全淋巴细胞培养基 (RPMI 1640, 10% FBS, 100 μg/ml 庆大霉素)。

[0089] 从患者的无防腐剂或肝素钠化的血中分离 PBMC。对所述 PBMC 应用如上文所述的相同淘选技术,只是使用抗 CD4 抗体包被板。淘选前,使 PBMC 通过尼龙毛柱,富集其中的 T 淋巴细胞。如下进行:将 0.5g 精梳尼龙毛塞进一个 10ml 注射器,该注射器顶端装有旋塞阀。该柱用含 10% FBS 的 RPMI 1640 在 37°C 洗涤两次。关闭旋塞阀,在 37°C 温育 1 小时。从柱中排出培养基直到液面到达尼龙毛顶端时,将 PBMC 加到柱上 (高达每 2ml 培养基 2×10^8)。打开旋塞阀,排放培养基直到细胞体积进入尼龙毛。关闭旋塞阀后,加入培养基直到覆盖尼龙毛顶端。该柱在 37°C 温育 1 小时。两次用培养基洗涤,收集未粘附 T 细胞。经过该 T 细胞富集步骤后,用抗 CD4 包被的板淘选 T 淋巴细胞。回收 CD4 抗体未结合的 T 细胞,假定它们是 CD8+ 细胞 (细胞毒性 T 淋巴细胞)。通过 FACS 分析证实为 CD8+ 细胞。

[0090] 为获得肿瘤细胞特异性 CTL 的稳定再刺激物,通过 EB 病毒 (EBV) 转化使从 ACD 血分离的 PBMC 获得无限分裂能力。如下完成:将所述 PBMC 以 1×10^6 细胞 /ml 重悬浮于完全淋巴细胞培养基。在其中加入 1ml EBV 上清和 0.2ml 植物凝集素。该细胞混合物在 T25 组织培养瓶中于 37°C、5% CO₂ 下培养。

[0091] 将从 FACS 分类获得的 Instant Dendritomas 与所述富集的淘选 CD8+T 淋巴细胞

以 1 : 10 比例混合。需要使用的 CD8⁺ 细胞在 1500rpm 离心 5 分钟沉淀,然后重悬浮于 1ml 含 RPMI 1640,10% FBS,1000U/ml IL-6,5ng/ml IL-12 和 10U/ml IL-12 的培养基中。将该溶液加入分类后接种的 Instant Dendritomas 中。该培养物在 37℃、5% CO₂ 培养一周。在这一周内用同样培养基再流加培养培养所述细胞。

[0092] 一周后,用照射过的用肿瘤裂解物脉冲处理的 EBV 转化淋巴细胞再刺激所述已经致敏的 CD8⁺T 细胞 (CTL)。以前培养的肿瘤细胞用四个冻融循环处理,裂解细胞。为获得含有肿瘤抗原的裂解物,已经裂解的细胞在 600g 离心 10 分钟。收集上清并在 13,000g 离心 1 小时。收集包含肿瘤抗原裂解物的上清。为再刺激所述 CTL,用锥虫蓝排除进行活细胞计数。一旦确定了活细胞数量,就用肿瘤裂解物脉冲处理相同数量的 EBV 转化淋巴细胞,将所述裂解物与所述淋巴细胞在 37℃、5% CO₂ 温育 1 小时。所述脉冲处理的淋巴细胞用 5,000 拉德照射,然后与 CTL 在含有 RPMI 1640,10% FBS,10U/ml IL-1 α ,5U/ml IL-2,50U/ml IL-4,125U/ml IL-6 和 30U/ml IL-7 的培养基中混合。所述培养物在 37℃、5% CO₂ 培养,并每两天进行流加培养再流加培养。在初次刺激后第 7 天和第 14 天进行再刺激。

[0093] 每天再流加培养所述 CTL,取出上清并贮存于 -20℃。当可行时,用 OptEIA 人 IFN- γ 试剂盒 (PharMingen) 进行 γ 干扰素 (IFN- γ) 测定。严格根据生产厂家的说明书实施该方法。使用 Benchmark MicroplateReader (BioRad) 读取所述测定值。

[0094] 为确定所述 Instant Dendritomas 是否刺激肿瘤细胞特异性 CTL 反应,使用所培养的肿瘤细胞作为靶细胞进行 CTL 测定。在 15ml 圆锥形离心管中以 200g 离心五分钟,收获并沉淀五万个肿瘤细胞。弃去上清,剩下 0.1ml 培养基在沉淀内。在剩余的培养基内温和地重悬浮细胞。如下用 ⁵¹Cr 标记肿瘤细胞:加入 0.1ml 的 1mCi/ml ⁵¹Cr 溶液和 10 μ l FBS,温和混合。松开管盖,将该混合物置于 37℃、5% CO₂ 温育 1 小时。温育后,用 14ml RPMI 1640 洗涤标记的肿瘤细胞两次,然后以 5 \times 10⁴ 细胞/ml 重悬浮于完全淋巴细胞培养基中。

[0095] 将 CTL 效应细胞接种到圆底 96 孔组织培养板的 4 孔中,其浓度等于 100 : 1、30 : 1、10 : 1 和 3 : 1 效应细胞:靶细胞。在包含效应细胞的孔中以及在其它两个用作天然和最大释放对照的孔中加入五千个标记的靶细胞。混合细胞并在 200g 离心 30 秒钟。所述板在 37℃、5% CO₂ 培养四小时。温育结束前 30 分钟,在最大释放对照孔中加入 0.1ml Triton X-100。温育结束后,细胞在板上以 200g 离心五分钟。每份上清取 0.1ml 加入含 5ml 闪烁混合液的闪烁计数瓶中。使用 LS6500 多用途闪烁计数器 (Beckman) 测量 ⁵¹Cr 释放量。

[0096] 所述 CTL 测定结果显示:随着杂交细胞致敏的 CTL 与肿瘤细胞的比例增加,同位素的释放也增加,说明 CTL 数量和杀死肿瘤呈正相关关系。在 100 : 1 效应细胞:靶细胞比例观察到超过 50% 的杀死细胞。另一方面,没有用本发明杂交细胞致敏的对照 T 细胞没有这样的相关关系。甚至在 100 : 1 的比例,对照 T 细胞裂解的肿瘤细胞并不多于在更低比例裂解的肿瘤细胞。这些结果证明:使用我们的杂交细胞抗原呈递细胞产生的 CTL 完全有功能并且对肿瘤细胞有特异性。结果描述于图 1。

[0097] 事实上,这些数据提供了基本证据,即本发明的杂交细胞能够用于体内免疫治疗。已知 CTL 在细胞介导的免疫应答中起关键作用,即它们主要负责杀死携带“外源”抗原的细胞。例如,使用免疫疗法治疗癌症背后的原理基于刺激肿瘤特异性 CTL,从而导致杀死肿瘤细胞。本发明杂交细胞能够刺激肿瘤特异性 T 细胞反应的事实提供了它们能够通过同样机

制用于体内免疫疗法的切实证据。

[0098] 实施例 3:树突细胞瘤表征

[0099] 本实施例进一步表征实施例 1 和 2 中描述的反应细胞和树突细胞瘤。

[0100] 荧光显微分析显示:100%染色的细胞被成功标记。为测试染料是否在两种不同类型的细胞间交叉染色,混合绿 DC 和红肿瘤细胞并温育过夜。荧光显微检查显示没有交叉染色。对融合细胞的即时检查证明:绿 DC 与红肿瘤细胞融合在一起,过夜回收后,融合细胞显示两种颜色。双色细胞(约 10%总细胞),即 Instant Dendritomas 随后通过 FACS 分类进行纯化。超过 95%分类细胞是双色融合细胞。

[0101] Instant Dendritomas 表达所有抗原呈递所需的分子。FACS 分析显示:Instant Dendritomas 表达抗原呈递所需的分子,如 I 类 MHC 分子、II 类 MHC 分子、辅助刺激分子 CD80(B7.1) 和 CD86(B7.2)。数据描述于图 2。“同种型”是阴性对照;HLA-A、B、C 是 I 类 MHC 分子,而 HLA-DR 是 II 类 MHC 分子。此外,在显微镜下,InstantDendritomas 也具有黑素瘤细胞所具有的黑色颗粒。

[0102] 在图 2 中,用上面的方法融合分别用绿染料染色的人外周血 DC 和用红染料染色的肿瘤细胞。过夜温育后,将细胞等量分为四组。然后所述细胞与 Cy-Chrome 缀合的抗体(一百万细胞/微克抗体,Becton/Dickinson)在冰上温育 30 分钟,用所述抗体染色所述细胞。不同分组如下:抗人 HLA-A、B、C[组 I];抗人 HLA-DR[组 II];抗人 CD80[组 III];抗人 CD86[组 IV]。两次洗涤除去未结合的抗体,将细胞沉淀重悬浮于 0.5ml 染色缓冲液(含 0.1% BSA 和 0.1%叠氮化钠的 PBS)。使用 CellQuest 软件通过 FACS 进行三色分析。用同样抗体以同样方法染色对照人 DC。

[0103] 实施例 4:临床方法

[0104] 本实施例提供用本发明杂交细胞制备物治疗人类癌症患者的代表性临床方法。例如,该治疗方案可使用按照本发明方法制备的树突细胞瘤来治疗黑素瘤患者。

[0105] 从患者外周血单核细胞产生成熟树突细胞。用无防腐剂或肝素钠管从患者获取 50ml 外周血。简要地说,所述血用 1X PBS 以 1:1 稀释。在 15ml 圆锥形离心管中,将 8ml 所述稀释的血铺展在 4ml 室温 Ficoll-Paque Plus 上,然后以 40g 离心 40 分钟。从 Ficoll 梯度液吸出 PBMC 层并转移到清洁的 15ml 离心管。在管中加入四倍体积的 1X PBS,倒置以混合细胞。所述 PBMC 在室温下以 100g 离心 10 分钟。加入 10ml 1X PBS,并倒置混合细胞。所述 PBMC 在室温下以 100g 离心 10 分钟。将所述 PBMC 重悬浮于 5ml 完全 DC 培养基(RPMI 1640+10%人血清+800U/ml GMCSF+1000U/ml IL-4)。然后使用抗 CD14 包被的板淘选树突细胞/前体细胞。将 2×10^8 PBMC 加入抗 CD14 包被的板并旋转。所述板在室温下温育 30 分钟。取出未贴壁细胞。加入 10ml 1X PBS,旋转板,然后除去 PBS。重复该 PBS 洗涤共四次,每次在同一位点进行吸量操作。此后,立即在板上加入 10ml 完全 DC 培养基。所述培养物在 37°C、5% CO₂ 温育 5 到 10 天,产生树突细胞。

[0106] 在活组织检查或切除时获得肿瘤。用下面方法培养肿瘤细胞。从肿瘤组织(1-5 克)除去脂肪组织和坏死组织后,将所述肿瘤切成小大块并放入 T75 瓶。加入 10ml 0.25% 胰酶/EDTA。所述溶液在 37°C 震荡温育一小时,然后加入 15ml 完全培养基(DMEM+10%人血清+庆大霉素)。然后取出肿瘤块并置于清洁的 T75 瓶中。所述瓶在 37°C、5% CO₂ 温育过夜。所述细胞悬浮液/胰酶/完全培养基在 1000g 离心 5 分钟。所述细胞重悬浮于 15ml 完

全培养基中,在 T75 组织培养瓶中 37°C、5% CO₂ 培养 24 小时。装有肿瘤块的瓶在没有培养基的情况下温育过夜后,加入 20ml 完全培养基,然后该溶液在 37°C、5% CO₂ 培养两天。除去肿瘤块,并培养贴壁细胞。用于树突细胞融合的肿瘤细胞来自这两种培养物。

[0107] 下一步涉及融合来自患者的肿瘤细胞和树突细胞。在加入聚乙二醇作为融合剂后,通过细胞融合形成杂交细胞为常规工作。下面概述的程序是 Prado 等,1989FEBS Lett., 259:149-52 报道的用于 PEG 介导的单层体细胞融合的改进形式。

[0108] 首先,将肿瘤细胞暴露于单剂量 5000 拉德,该剂量足以杀死所有细胞。然后用 PKH2-GL 荧光染料 (Sigma) 将树突细胞染成绿色,用 PKH26 荧光染料 (Sigma) 将肿瘤细胞染成红色。使用 Sigma 程序的轻微改进形式,在 25°C 进行所述染色程序。用无血清培养基洗涤要染色的细胞。所述细胞悬浮液在 400g 离心 5 分钟,获得松散的沉淀,然后除去上清组份。轻敲离心管,重悬浮所述沉淀,然后加入 1ml Diluent (在无血清 RPMI 中的 20% DMSO) 重悬浮细胞。染色前,在聚丙烯管中用 Diluent 制备 4×10^{-6} 摩尔染料 (2X)。将细胞稀释液快速加入 1ml 2X 染料,然后立即用移液管温和吹打,混合所述混合物。然后所述混合物在 25°C 下温育五分钟。加入等体积 10% 人血清并温育 1 分钟,终止所述染色程序,所述人血清可以是患者自己的血清。用等体积完全培养基稀释染色细胞。在 400g 离心 10 分钟,从所述染色溶液分离出染色的细胞。

[0109] 绿色树突细胞与红色肿瘤细胞以 1 : 1 的比例在 50ml 圆锥形离心管中混合。该管装满无血清 DMEM。所述细胞混合物在 500g 离心 5 分钟。在离心细胞的同时,在层流净化罩内制备三个 37°C 双烧杯水浴:将盛有 100ml 37°C 水的 400ml 烧杯放入盛有 75 到 100ml 37°C 水的 600ml 烧杯中。将预热 50% PEG 溶液的管和完全无血清 DMEM 的管放入层流净化罩内的两个 37°C 水浴内。然后从所述细胞混合物吸取上清并弃去。将包含混合细胞沉淀的管放入层流净化罩内的双烧杯水浴,在 37°C 下进行细胞融合。在一分钟内将 1ml 预热的 50% PEG 逐滴加入所述混合细胞沉淀,每加入一滴后用移液管尖搅拌细胞。然后再搅拌所述混合物一分钟。

[0110] 使用清洁的移液管,在一分钟内将 1ml 预热的 RPMI+HEPES 逐滴加入所述细胞混合物,并在加入每滴后搅拌。用另外 1ml 预热的 RPMI+HEPES 溶液重复该步骤一次。用 10ml 移液管,在二到三分钟内逐滴加入 7ml 预热的 RPMI+HEPES。该混合物在 500g 离心 5 分钟。在离心细胞的同时,将水浴调回 37°C 并放置于层流净化罩内。将预热的完全 DC 培养基放在烧杯水浴中。弃去混合物的上清;将所述管放回烧杯水浴中。用移液管,强力加入 10ml 预热的完全 DC 培养基到所述细胞沉淀,然后加入 T75 瓶中。该制备物在潮湿的 37°C、5% CO₂ 培养箱中温育过夜。

[0111] 第二天,使用 CELLQuest 软件 (Becton/Dickenson) 在 FACS Caliber 荧光激活细胞分类仪上分析所述细胞。该仪器将携带绿染料和红染料的融合细胞分离出来。然后将这些融合细胞 (树突细胞瘤) 重悬浮于 1ml NS (生理盐水) 中并注射入患者体内。

[0112] 所述疫苗将包括 100,000 个 (或更多) 与树突细胞融合的照射肿瘤细胞 (即树突细胞瘤)。将这些树突细胞瘤重悬浮于 1ml NS,然后静脉内注射入患者体内。

[0113] 也可以采用低剂量方案给予白介素 2 (如 Aldesleukin)。当使用 IL-2 时,从接种开始的那一天开始,以一千八百万单位日剂量皮下注射 5 天。

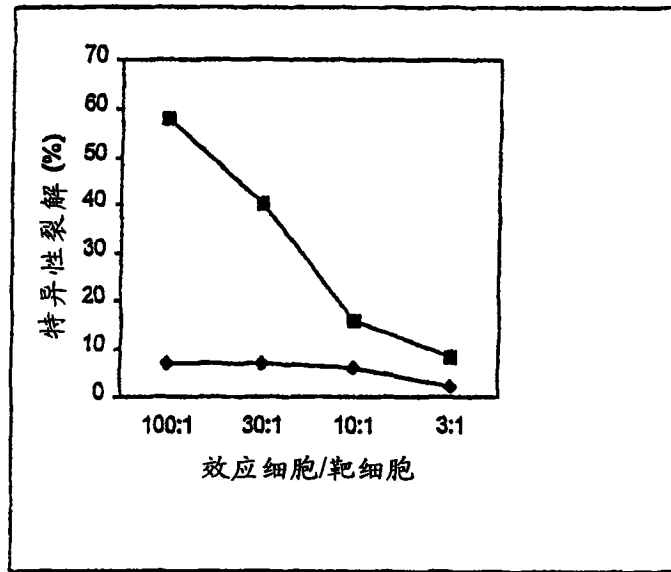


图 1

人树突细胞

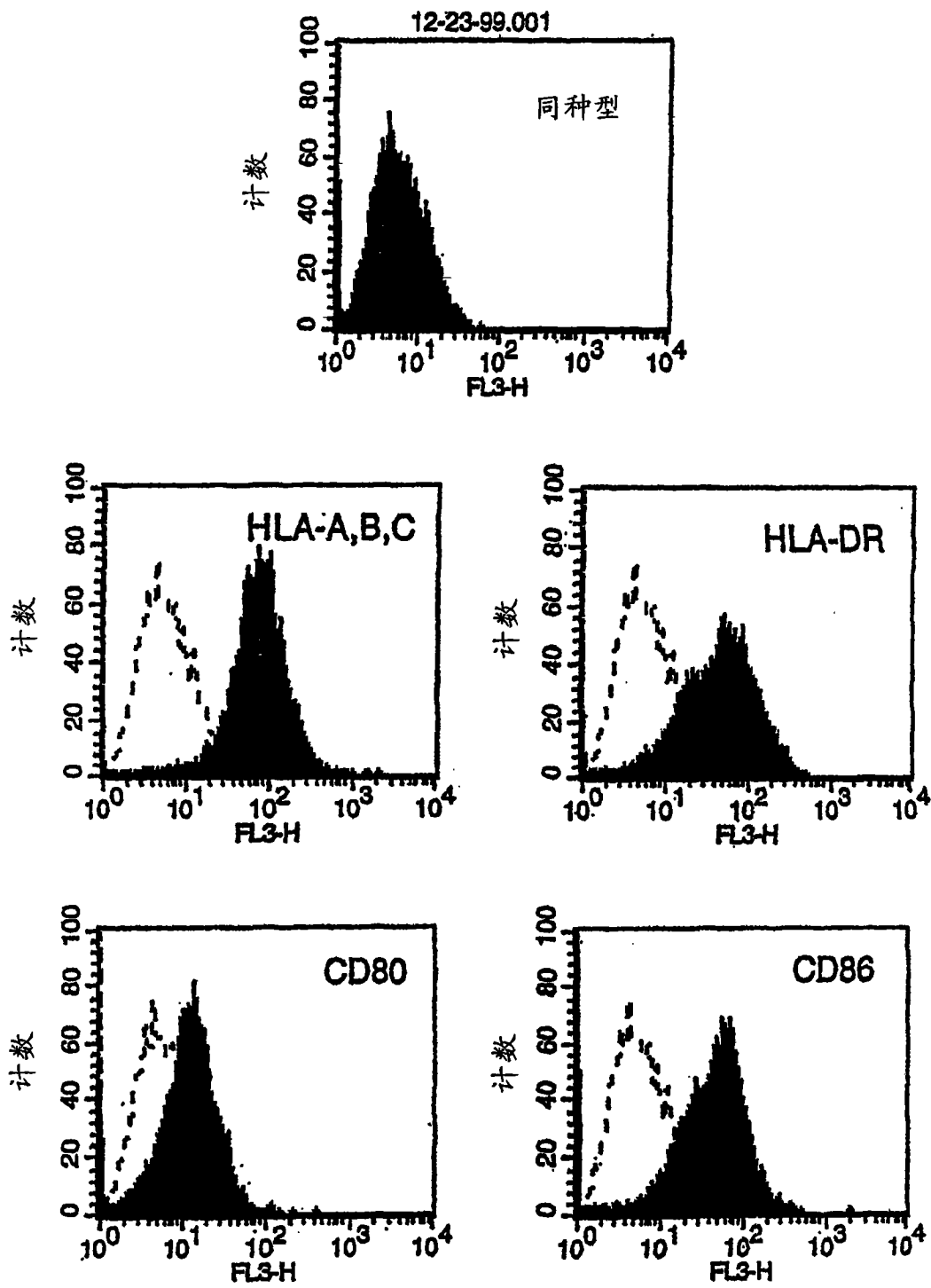


图 2A

人树突细胞瘤

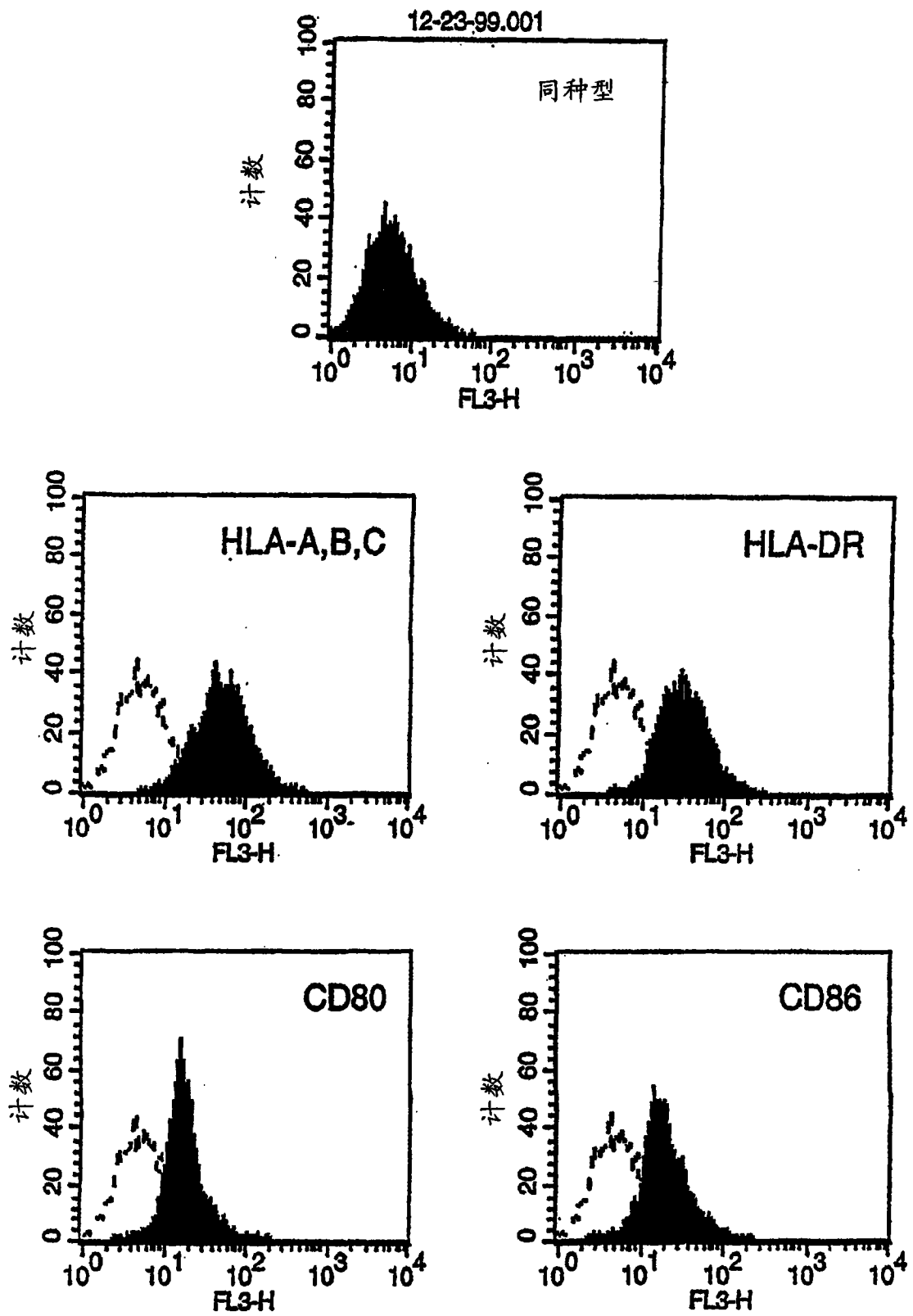


图 2B