(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101155914 B
(45)授权公告日 2013.03.06

(21)申请号 200680011380.2

(22)申请日 2006.04.07

(30)优先权数据
60/669,468 2005.04.08 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.10.08

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2006/013159 2006.04.07

(87)PCT申请的公布数据
WO2006/127150 EN 2006.11.30

(73)专利权人 阿戈斯治疗公司
地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 R·波格-卡利 T·莫内史密斯
I·切尔帕诺瓦 L·丁特曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 刘健 黄可峻

(51)Int.Cl.
C12N 5/06(2006.01)

(56)对比文件
US 2005/084966 A1,2005.04.21, 全文.
CN 1360628 A,2002.07.24, 全文.
CN 1517435 A,2004.08.04, 全文.
WO 97/29182 A1,1997.08.14, 全文.
WO 2004/050855 A2,2004.06.17, 全文.
Mohamadzadeh M, et al,.Interleukin 15skews monocyte differentiation intodendriticcells.Journal of Experimental Medicine194 7.2001,194(7),1013-1019.
Jonuleit H, et al,.Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins inducematuration of potent immunosimulatory dendritic cells underfetal calf serum-free conditions.European Journal of Immunology27 12.1997,27(12),3135-3142.
Sallusto F, et al,.Efficient Presentation of Soluble Antigen by CulturedHumanDendritic Cells Is Maintained byGranulocyte/MacrophageColony-stimulating Factor PlusIuterleukin 4 andDownregulated by Tumor Necrosis Factor a.Journal of Experimental Medicine179 4.1994,179(4),1109-1118.
Liu Y, et al,.Adenovirus-mediated CD40 ligand gene-engineered dendriticcells elicit enhanced CD8+ cytotoxic T-cell activation andantitumor immunity.Cancer Gene Therapy9.2002,9202-208.

(续)

审查员 许欣嘉

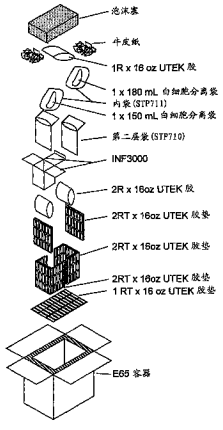
权利要求书 2 页 说明书 44 页
序列表 43 页 附图 7 页

(54)发明名称

树状细胞组合物和方法

(57)摘要

提供用于从分离自个体起已在1℃-34℃下保持约6至96小时周期的单核细胞中生产树状细胞的方法。温育期之后,然后诱导单核细胞分化成树状细胞。与从分离自个体起已在1℃-34℃下没有保持至少6小时的单核细胞中所制备的成熟树状细胞相比,通过本发明方法所制备的成熟树状细胞,提高了一种或多种CD80、CD83、CD86、MHC-I类分子或MHC-II类分子的水平。通过本发明方法所制备的树状细胞,可用于制备疫苗和刺激T细胞。



CN 101155914 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Koya RC, et al,.Potent Maturation of Monocyte-derived Dendritic Cells AfterCD40L Lentiviral Gene Delivery.Journal of Immunotherapy26 5.2003,26(5),451-460.

1. 一种用于从单核细胞制备未成熟树状细胞的方法，所述方法包括：

a. 提供从分离自个体起已在 6℃ -28℃的温度温育 8 至 72 小时周期的单核细胞；和；

b. 通过将所述单核细胞在包含 GM-CSF 和选自 IL-4 和 IL-13 的白细胞介素的培养基中培养来诱导所述单核细胞分化成未成熟树状细胞。

2. 权利要求 1 中所述方法，其中单核细胞是人单核细胞。

3. 权利要求 1 中所述方法，其中温育温度是 14℃ -24℃。

4. 权利要求 1 中所述方法，其中温育温度是 8℃ -26℃。

5. 权利要求 1 中所述方法，其中温育周期是 8 至 48 小时。

6. 权利要求 5 中所述方法，其中温育周期是 10 至 30 小时。

7. 权利要求 1 中所述方法，其中温育周期是 26 至 72 小时。

8. 权利要求 1 中所述方法，其中所述培养基包含 GM-CSF 和 IL-4。

9. 权利要求 1 中所述方法，其中在全部或部分的温育周期中，单核细胞和外周血单核细胞 (PBMC) 一起存在。

10. 权利要求 9 中所述方法，其中通过白细胞分离术，从个体分离 PBMC。

11. 权利要求 9 中所述方法，其中在步骤 a 的温育期之中或之后并且在步骤 b 的分化之前，从 PBMC 富集单核细胞。

12. 权利要求 11 中所述方法，其中通过淘析、稀释 Ficoll 梯度离心、稀释 Percoll 密度梯度离心或磁珠分选，从所述 PBMC 富集单核细胞。

13. 权利要求 11 中所述方法，其中通过使得单核细胞附着于塑料，在温育期之后从 PBMC 富集单核细胞。

14. 权利要求 11 中所述方法，其中还包括将所述富集的单核细胞冷冻的步骤。

15. 权利要求 1 中所述方法，还包括使在步骤 b 中产生的未成熟树状细胞与 PGE2、TNF α 和 IFN γ 接触以产生成熟树状细胞的步骤。

16. 权利要求 15 中所述方法，还包括将一种或多种抗原负载到所述成熟树状细胞中。

17. 权利要求 1 中所述方法，其中还包括将在步骤 b 中产生的未成熟树状细胞接触 PGE2、TNF α 、IL-6 和 IL-1 β 以产生成熟树状细胞的步骤。

18. 权利要求 15 中所述方法，其中还包括用 CD40L 标志所述成熟树状细胞。

19. 权利要求 18 中所述方法，其中树状细胞中的重组 CD40LmRNA 的翻译影响所述用 CD40L 进行的标志。

20. 权利要求 15 中所述方法，还包括用编码 CD40L 的 RNA 和 / 或编码一种或多种抗原或目的表位的 RNA，来转染所述成熟树状细胞。

21. 权利要求 20 中所述方法，其中 RNA 编码一种或多种癌细胞抗原。

22. 权利要求 20 中所述方法，其中 RNA 编码一种或多种病原体抗原。

23. 权利要求 1 中所述方法，还包括将未成熟树状细胞负载一种或多种抗原，以生产抗原负载的树状细胞。

24. 权利要求 23 中所述方法，其中抗原是个体自体的。

25. 权利要求 23 中所述方法，其中通过用一种或多种编码所述抗原的 RNA 转染所述树状细胞，以负载所述抗原。

26. 权利要求 25 中所述方法，其中通过电穿孔，用 RNA 转染树状细胞。

27. 权利要求 25 中所述方法，其中用 1-41μg RNA/106 树状细胞，来转染所述细胞。

28. 权利要求 23 中所述方法，还包括使所述抗原负载的未成熟树状细胞成熟为抗原负载的成熟树状细胞。

29. 权利要求 23-28 中任一项中所述方法，其中抗原来自于或衍生于一种或多种癌细胞或病原体。

30. 权利要求 21 或 29 中所述方法，其中癌选自肾细胞癌、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、黑素瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌和胰腺癌。

31. 权利要求 22 或 29 中所述方法，其中所述病原体是 HTV 或 HCV。

32. 通过权利要求 15-31 任一项中所述方法制备的树状细胞。

33. 权利要求 32 中所述树状细胞，其中树状细胞是抗原负载的。

34. 权利要求 33 中所述树状细胞，其中用编码 CD40L 的 mRNA 转染细胞。

35. 权利要求 32 中所述树状细胞，其中与从新鲜单核细胞制备的成熟树状细胞相比，成熟树状细胞提高了一种或多种 CD80、CD83、CD86、MHC-I 类分子或 MHC-II 类分子的水平。

36. 通过权利要求 20 中所述方法制备的单核细胞衍生的成熟树状细胞，其中细胞中的 ALOX15 RNA 对 β-肌动蛋白 RNA 或 GAPDH RNA 的稳定状态比值小于 1.0。

37. 权利要求 36 中所述树状细胞，其中比值是在 0.2 至 0.7 之间。

38. 权利要求 38 中所述树状细胞，其中比值是在 0.4 至 0.5 之间。

39. 通过权利要求 20 中所述方法制备的单核细胞衍生的成熟树状细胞，其中细胞中的 CD52 RNA 对 β-肌动蛋白 RNA 或 GAPDH 的稳定状态比值大于 1.0。

40. 权利要求 39 中所述树状细胞，其中比值是在 1.2 至 5.0 之间。

41. 权利要求 40 中所述树状细胞，其中比值是在 1.5 至 2.2 之间。

42. 权利要求 41 中所述树状细胞，其中比值是在 1.8 至 1.9 之间。

43. 通过权利要求 20 中所述方法制备的单核细胞衍生的成熟树状细胞，其中细胞中的 TLR1 RNA、TLR2 RNA、IL-13RNA 或 CD69 RNA 对 β-肌动蛋白 RNA 或 GAPDH RNA 的稳定状态比值小于 1.0。

44. 权利要求 43 中所述树状细胞，其中比值是在 0.2 至 0.9 之间。

45. 权利要求 44 中所述树状细胞，其中比值是在 0.5 至 0.8 之间。

46. 包含权利要求 32-45 任何一项所述树状细胞的疫苗。

树状细胞组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及生产用于治疗疾病的树状细胞和相关组合物的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 许多的临床试验已经证明树状细胞疫苗的安全性，超过 1000 名患者接受了树状细胞疫苗而没有出现与该疗法相关的严重不良事件，以及在一半的患者中没有出现临床反应 (Ridgeway(2003)Cancer Invest21 :873-876)。用于制备树状细胞 (DC) 的常规方法是从个体收集外周血单核细胞 (PBMC)，然后将占 PBMC 小比例的单核细胞分化成 DC。一般认为为了作为用于体外制备树状细胞的的合适前体，在从个体分离后不久就应当冰冻或培养单核细胞。因此，在以前的临床试验中，树状细胞疫苗由单核细胞组成，PBMC 或单核细胞可在约 37℃中培养，或在从患者收集后几小时中进行冷冻。然而，由于该方法需要培养或冷冻新分离的 PBMC 或单核细胞，在实际的生产条件中限制了处理的疫苗的广泛应用。PBMC 分化成 DC，耗时约一周，并需要 GMP 设备和熟练技术人员。因此，提供在或接近可从患者获得 PBMC 的每个临床现场以用于生产 DC 疫苗的设备和人员，成本是过高的。

[0004] 商业上生产 DC 疫苗的可行模式是提供一种或较少数量的可从患者 PBMC 或在临床现场收集的单核细胞以制备 DC 疫苗的设备，然后运输到生产现场。然而，所述模式不能应用于目前需要新鲜的 PBMC 或单核细胞的 DC 生产方法。冷冻新鲜的单核细胞需要在收集现场分离白细胞后的额外操作，因此并不是理想的选择。因此，需要研制在运输到生产设备期间使用已经保存的 PBMC 或单核细胞来生产 DC 疫苗的方法。本发明满足了这种需要，同时还提供另外的优点。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明人发现了从分离自个体并在 1-34℃保存 6-96 小时周期的单核细胞中制备树状细胞和树状细胞疫苗的方法。这种从保存的单核细胞制备 DC 的能力，提供了单核细胞更多的加工适应性，并便于单核细胞从收集现场运输到生产设备。另外，本发明人发现了从保存的单核细胞制备的树状细胞疫苗表型优于从新鲜单核细胞制备的树状细胞。例如，与从新鲜单核细胞制备的树状细胞相比，从保存的单核细胞制备的树状细胞疫苗，提高了共刺激分子 (例如 CD80、CD83 和 CD86) 的水平，以及提高了 MHC-I 类和 MHC-III 类分子的水平。

[0007] 因此，在一个方面中，本发明提供用于从单核细胞制备树状细胞的方法，包括 :

[0008] a. 提供从分离自个体起已在 1℃ -34℃温育 6 至 96 小时周期的单核细胞 ;和 .

[0009] b. 诱导所述单核细胞分化成树状细胞。

[0010] 在优选的实施方案中，通过分离白细胞以收集包含单核细胞的外周血单核细胞 (PBMC)，获得单核细胞。

[0011] 优选地，通过用培养基接触单核细胞以诱导分化，其中培养基包含可诱导单核细胞分化成未成熟树状细胞的有效量成分，例如但不限于 GM-CSF ;GM-CSF 和 IL-4 ;GM-CSF 和 IL-13 ;GM-CSF 和 IL-15 ;和 IFNα 。然后使未成熟树状细胞进行发育，以生产成熟树状细胞。

[0012] 通过本发明方法制备的成熟树状细胞，表型不同于现有技术的成熟树状细胞。例

如，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中细胞中 ALOX15 RNA 对肌动蛋白 RNA 或 GAPDH RNA 的比值小于 1.0。与在从新鲜单核细胞制备的成熟树状细胞中的 ALOX15 对肌动蛋白或 GAPDH RNA 的比值相比，该比值是降低的。在另一个实施方案中，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中细胞中的 CD52RNA 对肌动蛋白 RNA 或 GAPDH 的稳定状态比值大于 1.0。在另一个实施方案中，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中细胞中的 TLR1 RNA、TLR2 RNA、IL-1β RNA 或 CD69 RNA 对肌动蛋白 RNA 或 GAPDH 的稳定状态比值大于 1.0。

[0013] 还在另一个实施方案中，本发明提供包含成熟单核细胞衍生的树状细胞的组合物，其中与从新鲜单核细胞制备的成熟树状细胞相比，本发明的成熟树状细胞提高了 CD80、CD83、CD86、MHC-I 类分子或 MHC-II 类分子中的一种或多种的水平。另外，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，所述树状细胞的 ALOX15 RNA、CD52 RNA、TLR1 RNA、TLR2 RNA、IL-1β RNA 或 CD69 RNA 的稳定状态水平发生改变。

[0014] 通过本发明方法制备的树状细胞，特别适合于制备疫苗。因此，同时提供相关的树状细胞组合物和疫苗。在优选的实施方案中，疫苗是个体自体同源的。优选地，树状细胞疫苗负载了来自于个体中的癌细胞或病原体的抗原。

[0015] 令人惊讶地是，发明人已经发现：溶化后在 DMSO 的存在下，用 DMSO 冷冻的树状细胞疫苗是稳定的。因此，本发明提供使用抗原负载的树状细胞以用于制备治疗或预防癌症或病原体传染病的冷冻药物，其中药物包含至少 2％的 DMSO，并且刚一溶化就可进行施用。在另一个实施方案中，本发明提供接种个体的方法，包括：

[0016] a. 解冻包含至少 2％ DMSO 的冷冻树状细胞疫苗，和

[0017] b. 在施用前，不改变细胞对 DMSO 的比例，以将解冻疫苗施用给个体。

[0018] DMSO 的浓度优选是约 10％。

[0019] 在另一个实施方案中，本发明提供抗原负载的树状细胞，其中所述细胞是体外分化于单核细胞，并在≥ 5％ DMSO 的存在下冷冻以及解冻后，能体外存活至少 24 小时。在优选的实施方案中，在≥ 10％ DMSO 的存在下进行冷冻和解冻后，抗原负载的树状细胞能体外存活至少 24 小时。

[0020] 在另一个实施方案中，本发明提供包含约 5-15％ DMSO 的树状细胞疫苗，其中所述疫苗用于施用给个体。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1：用于调节单核细胞（如，分离白细胞的产物）运输温度的优选运输容器和包装材料的简图。

[0023] 图 2：RNA 转染的 DC 提供功能共刺激载体。在混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction，MLR) 分析中，测试 DC 刺激从 PBMC 生产 INF-γ 的能力。将从 3 种不同供体制备的解冻 DC，与预先来自各个供体的冷冻 PBMC 进行匹配。使用作为读数器的 ELISPOT(INF-γ)，测试所有匹配方式的组合。第 1 柱、第 4 柱和第 7 柱代表与自体 PBMC 匹配的 DC。第 2 柱、第 3 柱、第 5 柱、第 6 柱、第 8 柱、和第 9 柱代表与非自体 PBMC 匹配的 DC。第 10-12 柱仅仅代表 DC 对照。第 13-14 柱仅仅代表 PBMC 对照。

[0024] 图 3：对于混合细胞因子的成熟 DC 与来自相同供体的未成熟 DC，比较刺激从自体 T 细胞生产 Th1 细胞因子的能力。用编码流感基质蛋白的 RNA 转染这两种 DC 群体，并用于

刺激来自自体 PBMC 的流感特异记忆性 CTL。显示 ELISPOT 分析的结果 (# 斑点 / 孔与输入 PBMC 有关)。下列顺序显示四个柱形的各组 :通过未成熟 DC,从流感特异 T 记忆性细胞得到的 IFNγ 产物 ;通过成熟 C,从流感特异 T 记忆性细胞得到的 IFNγ 产物 ;通过未成熟 DC,从流感特异 T 记忆性细胞得到的 IL-2 产物 ;以及通过成熟 DC,从流感特异 T 记忆性细胞得到的 IL-2 产物。

[0025] 图 4 :对通过从 2 个不同健康供体获得的日龄 PBMC 所制备的两个 RNA 负载的树状细胞制品中的各两个小管,进行解冻。将每个供体的一个小管迅速在同种异基因混合淋巴细胞反应 (Allo-MLR) 分析中进行测试,同时在通过相同方法进行分析之前,使每个制品的第二个小管置于室温 40 分钟。用于该实验的 PBMC,包括来自每个供体的自体细胞和来自与以上两者无关的供体的 PBMC 的第三种样品。用于该分析的读数器是 ELISPOT(INF-γ)。

[0026] 图 5 :根据 DC 刺激与降低流感 mRNA 转染浓度有关的自体 PBMC 的记忆性流感特异反应,评价 DC 预先冷冻对解冻后的函数。分析的读出器是 ELISPOT(INF-γ)。

[0027] 图 6 :通过使用编码 GFP 的 RNA 电穿孔后,GFP 表达的流式细胞术评价。未转染 (虚线)。

[0028] 图 7 :细胞内细胞因子染色 :使用通过编码 GFP(负调节,左栏) 或 CMV pp65(右栏) 的 RNA 转染的 DC 进行刺激后,CD4 和 CD8T 细胞上的 IL-2/IFN-γ 。

[0029] 图 8 :使用通过编码 GFP(负调节,左栏) 或 CMV pp65(右栏) 的 RNA 转染的 DC 进行刺激后,在 CD4 和 CD8 T 细胞中稀释 CSFE。

[0030] 图 9 :从分离白细胞的日龄产物所制备的 6 日龄未成熟树状细胞 (iDCs) 的表型。

[0031] 图 10 :从分离白细胞的日龄产物所制备的 7 日龄成熟树状细胞 (mDCs) 的表型。

[0032] 发明详述

[0033] 贯穿本说明书的各种出版物、专利和公开专利说明书作为相同引用的参考文献。因此,这些出版物、专利和公开专利说明书的内容作为参考而被引入本说明书中,以更充分地描述适合本发明的现有技术水平。

[0034] 除非另外指出,实施本发明所使用的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规方法 (包括重组技术),均属于本技术领域的范围内。所述方法已在文献中得到充分说明。参见 :例如 Sambrook 等,Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版 (1989) ;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel 等人编著 (1987)) ;the series Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.) ;PCR :A Practical Approach(M.MacPherson 等 人。IRL Press at OxfordUniversity Press(1991)) ;PCR 2 :A Practical Approach(MJ.MacPherson, B.D.Hames 和 G.R.Taylor 编 著, (1995)) ; Antibodies, A Laboratory Manual(Harlow 和 Lane 编 著 (1988)) ;Using Antibodies, A Laboratory Manual(Harlow 和 Lane 编 著 (1999)) ; 以 及 Animal CellCulture(R. I.Freshney 编著 (1987))。

[0035] 定义

[0036] 如本文中所用的,某些术语具有下列规定的含义。

[0037] 如本说明书和权利要求中所用的,除非上下文另外清楚的限定,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数标准。例如,术语“细胞”包括多个细胞及其混合物。

[0038] 术语“抗原”是本领域中充分理解的,包括免疫原性的物质 (即免疫原) 以及抗原

性表位。可以理解的是：可预见本发明使用任何抗原，因此包括但不限于自身抗原（无论是正常或疾病相关的）、传染性抗原（如，微生物抗原、病毒抗原，等等）、或其它外源抗原（如，食品成分、花粉，等等）。术语“抗原”或替换物、或“免疫原”，施加于多于一种免疫原的集合，使得可同时调控对多种免疫原的免疫反应。而且，该术语包括免疫原或抗原的任何各种不同的制剂。在优选的实施方案中，抗原来自于癌细胞或病原体。优选地，癌细胞是肾癌细胞、多发性骨髓瘤细胞或黑素瘤细胞。优选的病原体是 HIV 和 HCV。在优选实施方案中，抗原以分离自或衍生于癌细胞或病原体的 RNA 形式，被呈递于抗原呈递细胞 (APC)。“衍生于”包括但不限于包含融合无关或相关序列的天然存在的序列的重组变体。在共同未决的美国临时专利申请号 60/525,076 和 PCT/US/05053271（其内容在此通过引用以作为参考）中，公开了适于从任何细胞（如，癌细胞或病原体细胞）提取的 RNA 的 RT-PCR 方法以及体外转录方法。

[0039] 术语“癌”指细胞的异常形态，它可展现相对的自发增长，以致癌细胞展现以明显失去细胞增殖控制为特征的畸形生长表型。癌细胞可以是良性的或恶性的。在各种实施方案中，癌侵害膀胱、血液、脑、乳、结肠、消化道、肺、子宫、胰腺、前列腺或皮肤的细胞。如本文中所用的癌细胞定义，不仅包括原发癌细胞，而且包括衍生于癌细胞的任何细胞。这包括衍生于癌细胞的转移性癌细胞和离体培养物以及细胞系。癌包括但不限于，实体肿瘤、液体肿瘤、血癌、肾细胞癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫颈癌、胃癌、食道癌、胰腺癌、肺癌、神经母细胞瘤、恶性胶质瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、骨髓癌、淋巴瘤、肝癌、腺瘤、肉瘤、癌瘤、胚细胞瘤，等等。

[0040] 如本文中所用的，术语“包括”用于限定包含所述要素、但并不排除其它要素的组合物和方法。当用于限定组合物和方法时，“基本上由 ... 组成”表示用于组合的、排除其它要素的任何重要基本物。因此，基本上由本文所规定的要素组成的组合物，不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物以及药学上可接受的载体，例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等等。“由 ... 组成”表示为了施用本发明组合物而排除其它组分的微量元素和基本方法步骤以外。根据这些变化术语的每个具体定义，都落入本发明的范围内。

[0041] 如本文中所用的，术语“细胞因子”指对细胞发挥各种效应（例如，诱导生长或增殖）的许多因子中的任何一个。在实施本发明中，可进行单独或联合使用的细胞因子的非限制性实例包括：白细胞介素 -2(IL-2)、干细胞因子 (SCF)、白细胞介素 -3(IL-3)、白细胞介素 -4(IL-4)、白细胞介素 -6(IL-6)、白细胞介素 -11(IL-11)、白细胞介素 -12(IL-12)、白细胞介素 -13(IL-13)、白细胞介素 -15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞 - 集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞介素 -1β (IL-1β)、干扰素 -γ (IFNγ)、肿瘤坏死因子 -α (TNFα)、前列腺素 E_2(PGE$_2$)、MIP-11、白血病抑制因子 (LIF)、c 试剂盒配体、血小板生成素 (TPO) 以及 flt3 配体。细胞因子是可从一些供应商购买得到的，例如，Genzyme(Framingham,MA)、Genentech(South San Francisco,CA)、Amgen(Thousand Oaks,CA)、R&D Systems(Minneapolis,MN) 以及 Immunex(Seattle,WA)。尽管没有一直明确指出，但可以期望，与野生型或纯化细胞因子具有相似生物活性的分子可用于本发明的精神和范围内。

[0042] 术语“树状细胞 (DC)”指在各种淋巴和非淋巴组织中发现的形态学相似的细胞类型的不同群体 (Steinman(1991)Ann.Rev.Immunol.9:271-296)。树状细胞组成生物体

中最有效的和最优选的 APC。树状细胞可分化于单核细胞，并具有单核细胞的明显表型。例如，在树状细胞中没有发现特殊分化标记 CD14 抗原，但单核细胞具有该标记。显然，成熟 DC 可提供 T 细胞激活和增殖所需的所有信号。此外，成熟树状细胞不是吞噬细胞，然而单核细胞和未成熟树状细胞是明显的吞噬细胞。通过胞吞作用、吞噬作用、巨胞饮作用(macropinocytosis) 或吸附胞饮作用以及受体介导的抗原摄入，未成熟 DC 能够捕获抗原，并是表型 CD80- 或 CD80low、CD83- 或 CD83low、CD86low，以及具有高细胞内浓度的 MHC-II 类分子。成熟 DC 具有菌膜形态、低能力的胞吞作用，与未成熟 DC 相比，其表型是 CD80high、CD83high、CD86high。优选地，成熟 DC 分泌 IL-12p70 多肽或蛋白，和 / 或显著分泌水平下降的 IL-10(每百万 DC0 至 500pg/ml)。在从未成熟 DC 诱导 DC 成熟后直至 36 小时，通过培养上清的 ELISA，测定 IL-10 和 IL-12 水平。参见，Wierda W.G. 等 (2000)Blood 96 :2917 ; Ajdary S 等 (2000)Infection and Immunity 68 :1760 ;Banchereau 和 Steinman(1998) Nature392 :245。

[0043] “有效量”是足以发挥有益或期望结果的量。以一次或多次给药、应用或剂量中，进行施用有效量。

[0044] 如本文中所用的，“表达”指将核酸转录成 mRNA 和 / 或 mRNA 翻译成肽、多肽、或蛋白的过程。如果多核苷酸来源于合适真核生宿主的基因组 DNA，表达则包括 mRNA 剪接。表达所需要的调控元件，包括结合 RNA 聚合酶的启动子序列和用于核糖体结合的转录起始序列。例如，细菌表达载体或表达盒包含启动子 (如，乳糖启动子) 和用于转录起始的 Shine-Dalgarno 序列以及起始密码子 AUG(Sambrook 等 (1989) 上文)。类似的，真核表达载体或表达盒通常包含 RNA 聚合酶 II 的异源或同源启动子、Kozak 序列、起始密码子 AUG、用于核糖体分离的终止密码子以及下游聚腺苷酸化信号。所述载体可通过商业上购买获得，或通过本领域中已知方法所述序列进行合成。

[0045] 术语“遗传修饰”表示含有和 / 或表达可依次修饰细胞或其子代的基因型或表型的外源基因或核酸序列。换句话说，指细胞内源核苷酸的任何添加、缺失或断裂。

[0046] 术语“分离”表示从细胞等组分进行分开，其中多核苷酸、肽、多肽蛋白、或其片段通常与性质是相关的。例如，至于多核苷酸，分离的多核苷酸是从通常结合在染色体中的 5′ 和 3′ 序列所分离的片段。对于本领域技术人员显而易见的是，非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白、抗体或其片段，不需要进行“分离”，以区别其天然存在的配对物。另外，“浓缩的”、“分离的”或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白、抗体或其片段，可不同于其天然存在的配对物，因为每体积分子的浓度或数量大于其“浓缩的”或小于“分离的”天然存在的配对物。不同于天然存在的配对物的一级序列或例如糖基化模式的多核苷酸、肽、多肽、蛋白、抗体或其片段，不必以其分离形式进行存在，因为通过一级序列或者通过另一种特征例如糖基化模式，可从天然存在的配对物区分它们。尽管未明确指明本发明中公开的各个部分，可以理解的是 :本发明提供了用于以下公开的各个组合物和在合适条件下的以上所有实施方案。因此，通过分离的天然存在的多核苷酸的单个实施方案，提供非天然存在的多核苷酸。通过从天然存在的、分离自天然生成的真核细胞的蛋白的单个实施方案，提供细菌细胞中产生的蛋白。从通常在体内被发现的或取自于体内的位置分离单个哺乳动物细胞。例如，通过白细胞分离术收集的白细胞是“分离的”，并且体外从单核细胞分化的树状细胞是“分离的”。

[0047] 术语“主要组织相容性复合体”或“MHC”指编码可将抗原呈递给 T 细胞并用于快速移植排斥所需要的细胞表面分子的基因复合体。在人类中，MHC 亦称“人类白细胞抗原”或“HLA”复合体。MHC 编码的蛋白被称为“MHC 分子”，并被分成 I 类和 II 类 MHC 分子。I 类 MHC 分子包括膜异形二聚蛋白，该蛋白由与 β2- 微球蛋白非共价结合的 MHC 中编码的 α 链组成。几乎所有的有核细胞都能表达 I 类 MHC 分子，并且证实这些分子在抗原呈递于 CD8+T 细胞中发挥作用。I 类分子包括人类中的 HLA-A、HLA-B 以及 HLA-C。II 类 MHC 分子还包括由非共价结合的 α 链和 β 链组成的膜异形二聚化蛋白。已知 II 类 MHC 分子在 $CD4^+$T 细胞和在人类中包括 HLA-DP、DQ 以及 DR 中发挥作用。

[0048] 术语单核细胞，是能分化成对 GM-CSF 和 IL-4 应答的未成熟树状细胞的 $CD14^+$ 外周血单核细胞。

[0049] 如本文中所用的“病原体”，指引起任何疾病的生物体或病毒，及其减毒的衍生物。

[0050] “药物组合物”包括活性剂（例如抗原负载的 DC）与惰性或活化载体的组合，以制备适于体外、体内或离体 (ex vivo) 诊断或治疗使用的组合物。

[0051] 如本文中所用的术语“药学上可接受的载体”，包括任何标准药物载体，例如热灭活血清，添加 10％ DMSO、5％葡萄糖、磷酸盐缓冲盐水溶液、水和乳化液（例如油 / 水或水 / 油乳化液）以及各种湿润剂。组合物还包括佐剂、稳定剂以及防腐剂。载体、稳定剂以及佐剂的实例，参见 Remington′ s Pharm.Sci1.8thEd.(Mack Publ.Co.,Easton(1990))。

[0052] 可交换使用术语“多核苷酸”和“核酸分子”，以指代任意长度的核苷酸的聚合形式。核酸包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和 / 或它们的类似物。核苷酸具有任意的三维结构，并可实施任何已知或未知的功能。术语“多核苷酸”，包括，例如，单链 / 双链以及三链螺旋分子、基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组核酸、支链核酸、质粒、载体、任意序列的分离 DNA、任意序列的分离 RNA、核酸探针以及引物。除了天然核酸分子之外，本发明的核酸分子还包括修饰的核酸分子。

[0053] 使用术语“肽”的主要含义，指两种或多种氨基酸亚基、氨基酸类似物或多肽模拟物的化合物。亚基通过肽键连结。在另一个实施方案中，亚基通过其它键，如酯键、醚键等等进行连结。如本文中所用的术语“氨基酸”，指任一的天然和 / 或非天然或合成的氨基酸，包括甘氨酸和 D 型与 L 型旋光异构体、氨基酸类似物以及多肽模拟物。如果肽链很短，三个或多个氨基酸的肽通常被称为寡肽。如果肽链很长，肽通常被称为多肽或蛋白质。

[0054] 如本文中所用的“个体”指哺乳动物，包括但不限于人及其它灵长类动物、啮齿动物、狗以及猫。优选地，个体是人。

[0055] 发明人发现：从患者收集单核细胞后，通过保存于 1℃ -34℃约 6 至 96 小时的单核细胞，可制备未成熟树状细胞、成熟树状细胞以及抗原负载的树状细胞。这些结果是令人惊讶的，因为通常认为关键在于从新分离的单核细胞而不是从已在周围温度下保存相当长时间的单核细胞中制备树状细胞。而且，通过培养收集自患者后 6 小时内的单核细胞、或通过冷冻收集后不久的 PBMC 并保存 PBMC 以用于随后的解冻和培养单核细胞，制备用于本发明之前所实施临床试验的单核细胞衍生的 DC 疫苗。

[0056] 本发明人不仅发现能够从在 1℃ -34℃下保存约 6 至 96 小时的单核细胞制备树状细胞和树状细胞疫苗，而且还令人惊讶地发现该方法所制备的树状细胞，表型优于从新鲜单核细胞所制备的树状细胞。制备方法和通过这些方法所制备的树状细胞疫苗的特征，特

别与疫苗效价、遍及广泛地区的成功的商品化以及便利地施用有关。首先，与通过现有技术方法所制备的 DC 相比，使用本发明方法所制备的成熟树状细胞，表达更高水平的 CD80、CD83 以及 CD86 共刺激分子，以及更高水平的 MHC-I 类和 MHC-II 类分子，其中这些都表现出 DC 成熟性和效价。另外，本发明的成熟 DC 以抗原特异方式，能从记忆性 T 细胞诱导 IL-2 产物。

[0057] 其次，在收集患者 PBMC 的每个现场附近建立树状细胞的生产能力，在商业上是不可行的。因此，自体树状细胞疫苗的有效普遍的商品化，依赖于将 PBMC 或分离自 PBMC 的单核细胞运输到用于分化成未成熟和成熟树状细胞以及疫苗制品的集中生产设备的能力。然而，在本发明之前，一般认为在从患者移出后不久，应当冷冻或培养 PBMC。通过允许加工已被过夜运输或更久运送的 PBMC 或分离自 PBMC 的单核细胞，本发明方法解决了该问题。

[0058] 再者，在施用给患者之前，通常将抗原负载的树状细胞在 DMSO 中冷冻并保存直至解冻、洗涤以及重悬浮在无 DMSO 的药学上可接受的载体中。预先的 DC 疫苗临床试验包括洗涤步骤，因为人们认为 DMSO 对冻融或解冻 DC 会有不利影响。令人惊讶地是，本发明人发现了 DMSO 对树状细胞没有明显的不利影响。因此，在施用之前，不必洗涤和重悬浮解冻的 DC 疫苗。忽略这个步骤，将提高施用简易性，并减少由于额外操作带来的对 DC 的污染风险和副作用。

[0059] 因此，在一个方面中，本发明提供用于从单核细胞制备树状细胞的方法，包括：

[0060] a. 提供从分离自个体起已在 1℃ -34℃温育 6 至 96 小时周期的单核细胞；和

[0061] b. 诱导温育的单核细胞分化成树状细胞。

[0062] 如本文中所用的“单核细胞”，指具有分化成树状细胞的能力的 $CD14^+$ 白细胞。单核细胞可来自任意的哺乳动物，并优选是人单核细胞。在优选的实施方案中，例如作为分离白细胞的产物，提供单核细胞连同其它的外周血单核细胞 (PBMC)。在另一个实施方案中，从 PBMC 富集或直接从周围血液分离单核细胞。本领域技术人员已知了分离单核细胞或含有单核细胞的 PBMC 的方法。在优选的实施方案中，通过分离白细胞，收集单核细胞连同其它的 PBMC。分离白细胞的方法是本领域中已知的。在本发明的优选实施方案中，通过在医院、诊所、医生办公室等进行分离白细胞，从个体中收集包含单核细胞的 PBMC。白细胞分离术是通过除去个体血液的白细胞、并然后将剩余物输回个体的方法。白细胞分离术的产物通常是富集 PBMC 的血份，其具有低水平的红细胞、粒细胞和血小板的杂质。用于实施白细胞分离术的方法和仪器是本领域中熟知的。例如，参见白细胞分离术的详细信息：gambrobct.com/Products_&_Services/。分离白细胞的仪器实例包括由 GAMBRO BCT 制造的 COBESpectra™，和由 Baxter Fenwal 制造的 CS3000 Plus 血细胞分离机。

[0063] 在 1℃ -34℃温育期之中或之后，从血液或血份（如，PBMC）富集单核细胞。如本文中所用的，“富集单核细胞”表示提高单核细胞对存在于该方法起始中的其它细胞类型的比例的方法。用于从 PBMC、血液或其它血份中富集单核细胞的方法，是本领域技术人员已知的，包括但不限于淘析、FACS、淘选、磁力分选、低密度 Ficoll 梯度离心等等。优选地，通过淘析，从 PBMC 富集单核细胞。在一个替代的实施方案中，通过选择在细胞培养中粘附塑料的单核细胞，在 6-96 小时温育期后从 PBMC 富集单核细胞。在另一个实施方案中，通过免疫磁性筛选以富集单核细胞。免疫磁性筛选可正选择结合单核细胞，或负选择结合非单核细胞的细胞（如，T 细胞、B 细胞等等）。

[0064] 一旦从个体分离，将单核细胞从分离自个体起在 1℃ -34℃下温育 6 至 96 小时周期。如本文中所用的，从个体分离单核细胞或含有单核细胞的 PBMC 的时间，指完成从个体中移出该细胞的过程的时间。例如，如果从患者分离 PBMC 超过四小时白细胞分离术的时程，分离时间则是从分离白细胞终点起至收集 PBMC 的时间。

[0065] 优选地，在 3℃ -34℃下、或 4℃ -32℃下或 5℃ -30℃下、更优选地在 6℃ -28℃下、更优选在 6℃ -27℃下、8℃ -26℃下或约 14℃ -24℃下，温育单核细胞 6 至 96 小时。优选的下温度范围是 6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃和 14℃。优选的上温度范围是 20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃和 34℃。优选地，温育期是 8 至 72 小时，更优选 10 至 48 小时，甚至更优选 12 至 24 小时以及最优选 15 至 22 小时。其它优选的温育时间范围包括 8 至 48 小时、10 至 30 小时、26 至 72 小时以及 48 至 80 小时。优选的温育时间下限选自 6、7、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、36 以及 48 小时。优选的温育时间上限选自 24、26、28、30、36、48、60、72、84 以及 96 小时。

[0066] 在 1℃ -34℃温育期，将任意形式的单核细胞（如，血液中的单核细胞、血份、PBMC、纯化单核细胞等等）从临床现场运输到树状细胞生产现场。优选地，将单核细胞在调温容器中进行运输。在温育期间，将单核细胞温度维持在 1℃ -34℃中的方法是本领域技术人员已知的。例如，在恒温箱中或在 1℃ -34℃的室内中温育单核细胞。优选地，在温育期间，将单核细胞进行一些移动（间歇的或连续的）。移动是与运输相关的移动。在另一个实施方案中，在温育期间，可轻柔摇动或转动细胞。不希望受到理论的限制，人们认为移动可防止与沉淀压实相关的细胞损伤。

[0067] 在 1℃ -34℃的 6-96 小时温育期中，温育但不培养单核细胞。术语“不培养”，表示在 6 至 96 小时温育期中，在约 36-38℃下，将单核细胞不在哺乳动物细胞培养基（包括但不限于，生理性合适浓度的培养基，例如 RPMI、DMEM、X-VIVO 15、AIM-V、StemSpan H2000 等等）中进行培养。相反，将通过本发明方法加工的单核细胞在 1℃ -34℃下进行温育，优选在血液或血份（如，血清、血浆、分离白细胞的产物（如，PBMC）、血沉棕黄层等等）盐水或生物学缓冲液例如磷酸盐缓冲液盐水 (PBS) 中进行温育。最优选地，在 1℃ -34℃下，将含有单核细胞的分离白细胞的产物在分离白细胞收集容器（如，血液收集袋）中进行温育。在开始阶段或在温育期间，当将分离白细胞的产物转入另一个容器时，优选避免会增加污染可能性的不必要的转移。

[0068] 在 1℃ -34℃下温育 6-96 小时之中或之后，在分化步骤之前可富集单核细胞。只要在 1℃ -34℃下进行操作，就在温育期间实施对单核细胞或 PBMC 的操作。具体地说，在温育期间，还可纯化 PBMC 或从 PBMC 富集单核细胞。所述操作包括但不限于，离心、淘析、切向流过滤、Ficoll 密度梯度、稀释 Ficoll 密度梯度离心、稀释 Percoll 密度梯度离心、抗体淘选、磁细胞分选、阳性或阴性免疫磁性选择等等。在一个实施方案中，温育期之后，通过在容器（优选塑料容器）中培养和选择粘附的单核细胞，从 PBMC 富集单核细胞。

[0069] 在 1℃ -34℃下温育约 6 至 96 小时周期和进一步富集单核细胞的任选步骤之后，诱导单核细胞分化成树状细胞。典型的，将单核细胞分化成未成熟树状细胞，然后未成熟树状细胞成熟为成熟树状细胞。用于将单核细胞分化成树状细胞和用于树状细胞成熟的各种方法，是本领域技术人员已知的。

[0070] 在一个实施方案中，在包含可诱导单核细胞分化成未成熟或成熟树状细胞的组合

物的培养基中，培养单核细胞。诱导单核细胞分化成未成熟树状细胞的组合物是本领域技术人员已知的。所述组合物包括但不限于，GM-CSF+IL-4；GM-CSF+IL-13；GM-CSF+IL-15；IFNα；以及GM-CSF+TNFα。诱导分化的组合物优选是GM-CSF+IL-4。GM-CSF和IL-4的浓度范围在每细胞因子约400至2000U/ml。优选地，GM-CSF和IL-4的浓度是每细胞因子500至1000单位/ml。在一个实施方案中，在单核细胞分化成未成熟树状细胞期间，将单核细胞接触GM-CSF和IL-4约4-7天，最优选地约5-6天。

[0071] 单核细胞分化成未成熟树状细胞之后，未成熟树状细胞可成熟为成熟树状细胞。用于树状细胞成熟的方法是本领域技术人员已知的。在一个实施方案中，通过接触包含GM-CSF、IL-4、成熟混合物（PGE2、TNFα、IL-6和IL-1β）的培养基，使未成熟树状细胞得以成熟。例如参见，Jonuliet等人（1997)Eur J Immunol 27:3135-3142，其内容通过引用作为参考。

[0072] 在替代的成熟方法中，用包含IFN-γ的第一信号、随后用包含CD40L的第二信号来指示未成熟树状细胞。例如在一个实施方案中，优选地在GM-CSF和IL-4的存在下，将未成熟树状细胞接触PGE2、IFN-γ以及CD40L。在优选的实施方案中，树状细胞中的重组CD40LmRNA的翻译可影响与CD40L的接触。优选地，通过编码CD40L的mRNA或其活性片段，瞬时转染树状细胞。

[0073] 最优选地，优选在GM-CSF和IL-4的存在下，将未成熟树状细胞接触PGE_2、TNFα以及IFNγ，以生产成熟树状细胞。通过使用编码CD40L的RNA进行转染、优选瞬时转染，可进一步增进树状细胞的成熟。优选地，使用编码CD40L的RNA和/或编码一种或多种目的抗原或表位的RNA，转染树状细胞。在美国申请11/246,387中描述了上述成熟方法，其内容在此通过引用以作为参考。

[0074] 在本发明优选的实施方案中，树状细胞负载一种或多种抗原。抗原负载的树状细胞作为疫苗，并用于体外刺激T细胞。可将抗原负载进未成熟或成熟树状细胞。如果将抗原负载进入未成熟树状细胞，那么通过负载本身的方法、或通过本文中所述其它成熟方法或本领域技术人员已知的替代的成熟方法，可使得未成熟树状细胞成熟。抗原可负载成抗原自身（如，蛋白、肽、表位、细胞裂解物、病毒粒子等等），或负载成编码抗原的核酸。优选地，将抗原负载成编码抗原的核酸。更优选地，核酸是RNA，最优选是mRNA。在优选的实施方案中，使用编码CD40L的mRNA，共转染编码一种或多种抗原的mRNA。优选地，抗原是个体自体的，并用于制备施用给个体的抗原负载的自体DC疫苗。使用肽和蛋白抗原、细胞、细胞或组织裂解物、病毒或病毒粒子、核酸等等，用于负载树状细胞的方法是本领域技术人员已知的。

[0075] 在优选的实施方案中，通过使用核酸、优选mRNA进行电穿孔树状细胞（成熟的或未成熟的），来负载抗原。优选地，使用约0.25至4微克RNA/10^6树状细胞、最优选使用约2μg RNA/10^6树状细胞，进行转染树状细胞。在一个实施方案中，每次转染使用1微克肿瘤RNA/百万DC。在另一个实施方案中，每10^6树状细胞，使用0.25至1.0μg的四种RNA中的一种，其中所述四种RNA编码来自病原体（如，HIV）的四种分离的抗原。

[0076] 抗原可以是任意来源。然而，在优选的实施方案中，抗原或抗原是个体自体的。术语“个体自体的”指抗原是从个体中获得的或衍生的。作为非限制性实例，抗原可来自从个体中获得的癌细胞或肿瘤组织。以癌细胞、癌细胞或组织的裂解物、癌细胞或组织的提取

物、癌细胞或组织的纯化或克隆成分、总 RNA 或总 mRNA、或从所述细胞或组织选出的 RNA 或 mRNA 的形式，无论是存在于提取物中、或是纯化的、扩增的、体外翻译等等的形式，可将癌症抗原负载进入树状细胞。或者，可从存在于个体的病原体或病原体感染细胞，获得或衍生抗原。

[0077] 本发明方法可特别用于治疗或预防癌症和病原体传染病。在优选的实施方案中，癌是肾细胞癌、黑素瘤、乳腺癌、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌或前列腺癌。

[0078] 术语病原体指病原学所涉及的任意病毒或生物体及其减毒衍生物。所述病原体包括但不限于，细菌、原虫、真菌和病毒病原体，例如螺旋杆菌 (Helicobacter) 如幽门螺杆菌 (helicobacter pylori)、沙门氏菌 (Salmonella)、痢疾杆菌 (Shigella)、肠杆菌 (Enterobacter)、弯曲菌 (Campylobacter)，各种分枝杆菌 (mycobacteria)，例如麻风分枝杆菌 (Mycobacterium leprae)、炭疽杆菌 (Bacillus anthracis)、鼠疫耶尔森氏菌 (Yersinia pestis)、土拉弗朗西斯菌 (Francisella tularensis)、布鲁杆菌 (Brucella species)、钩端螺旋体菌 (Leptospira mterrogans)、葡萄球菌 (Staphyloccus) (如，金黄色葡萄球菌 S.aureus)、链球菌 (Streptococcus)、梭菌 (Clostridum)、白色念珠菌 (Candida albicans)、疟原虫 (Plasmodium)、利什曼原虫 (Leishmania)、锥虫 (Trypanosoma)、人类免疫缺陷性病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、人乳头状瘤病毒 (HPV)、巨细胞病毒 (CMV)、人嗜淋巴细胞病毒 (HTLV)、疱疹病毒 (如，1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、冠形病毒、水痘带状疱疹病毒以及 Epstein-Barr 病毒 (EBV))、乳头状瘤病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒以及风疹病毒。优选病原体是病毒病原体，更优选是逆转录病原体，以及最优选是 HIV 或 HCV。

[0079] 无论是成熟的或未成熟的、是抗原负载或非抗原负载的树状细胞，都可在包含防冻剂的组合物中进行冷冻。许多防冻剂是本领域技术人员已知的。防冻剂的实例包括但不限于，二甲基亚砜 (DMSO)、甘油、乙醇、甲醇乙酰胺、单乙酸甘油酯、丙烷二元醇、聚乙二醇、乙二醇、异 - 丁四醇、D- 核醣醇、D- 木密醇、D- 山梨糖醇、D- 乳糖、异 - 肌醇、氯化胆碱、氨基酸、白蛋白 (优选人血清白蛋白)、聚烯吡酮、葡聚糖、蔗糖、Ficoll、无机盐以及羟乙基淀粉。在优选的实施方案中，防冻剂是 DMSO。优选地，DMSO 浓度是 2-20％，更优选是 5-15％。以及最优选是约 10％。此外，冷冻培养基含有一种或多种碳水化合物衍生的多羟基化合物，例如葡萄糖、葡萄糖、蔗糖等等，浓度优选为 2-30％，更优选为 5-10％，最优选为 5％葡萄糖。用于冷冻树状细胞的方法是本领域技术人员已知的。例如参见，美国专利申请 20040253574，其内容在此通过引用以作为参考。优选地，防冻剂是二甲亚砜 (DMSO)。在优选的实施方案中，DMSO 浓度是 5％至 20％。最优选地，组合物中的 DMSO 浓度是约 10％。

[0080] 令人惊讶地是，在 5％ -20％ DMSO 的存在下进行冷冻并解冻后，通过本发明方法所制备的树状细胞和树状细胞疫苗，解冻后能体外存活至少 24 小时。由于本发明的抗原负载的树状细胞能抗 DMSO，因此在施用树状细胞疫苗之前不必洗涤细胞。因此，本发明解冻的树状细胞疫苗可在解冻后的任何时间来施用于个体。取消洗涤步骤，可降低污染风险并避免会损伤树状细胞的进一步操作。因此，在一个实施方案中，本发明提供用于施用抗原负载的树状细胞疫苗的方法，包括对包含至少 2％至 20％ DMSO 的冷冻树状细胞疫苗进行解冻，和施用前不改变树状细胞对 DMSO 的比例下将疫苗施用于个体。优选地，疫苗中的 DMSO 浓度

是约 5-20%，更优选是 10%。

[0081] 在另一个实施方案中，本发明提供使用装载抗原的树状细胞以用于制备治疗或预防癌症或病原体传染病的冷冻药物，其中药物包含至少 2%的 DMSO，并且刚一溶化就可进行施用。

[0082] 本发明方法提供生产具有功能增强的和水平提高的成熟标记的新的树状细胞。例如，在一个方面中，本发明提供包含成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中与从新鲜单核细胞制备的成熟树状细胞相比，本发明的成熟树状细胞提高了 CD80、CD83、CD86、MHC-I 类分子或 MHC-II 类分子中的一种或多种的水平。

[0083] 在另一个实施方案中，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中树状细胞可引起从记忆性 T 细胞生产抗原特异 IL-2。用于测量 IL-2 的方法是本领域中已知的。在图 10.35(Immunobiology，第 6 版，Eds. Janeway 等，Garland Science Publishing，New York，NY，2005) 中公开了记忆性 T 细胞特有的并可区别于其它 T 细胞类型的细胞表面标记和其它分子的表达；其内容在此通过引用作为参考。例如，记忆性 T 细胞表达高水平的 CD44、CD45RO、CD45RA、Bcl-2、IFNγ、CD127 和 Ly6C，表达中等水平的 CD122 和 CXCR4，以及表达低水平的 FasL 和阴性的 CD69 和 CD25。

[0084] 如本文所述，稳定状态 RNA 水平的微阵列分析，显示与从新鲜单核细胞制备的树状细胞相比，在从日龄老单核细胞制备的树状细胞之间的不同基因表达。因此在一个实施方案中，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中 ALOX15 RNA 对细胞中的任一的β-肌动蛋白 RNA 或 GAPDH 的稳定状态比值小于 1.0。优选地，比值在 0.2 至 0.7 之间，更优选地在 0.4 至 0.5 之间，以及最优选地约 0.45。

[0085] 在另一个实施方案中，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中细胞中的 CD52 RNA 对 β-肌动蛋白 RNA 或 GAPDH 的稳定状态比值大于 1.0。优选地，比值在 1.2 至 5.0 之间，更优选在 1.5 至 2.2 之间、或在 1.8 至 1.9 之间，以及最优选地比值是 1.86。

[0086] 还在另一个实施方案中，本发明提供成熟单核细胞衍生的树状细胞，其中细胞中的 TLR1 RNA、TLR2 RNA、IL-1β RNA 或 CD69 RNA 对肌动蛋白 RNA 或 GAPDH 的稳定状态比值大于 1.0。优选比值在 0.2 至 0.9 之间，更优选在 0.5 至 0.8 之间。

[0087] 使用 SEQ ID NOs：2-12 所示的 Affymetrix 探针，检测人 ALOX15mRNA(SEQ ID NO：1) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：14-24 所示的 Affymetrix 探针，检测人 IL-1β mRNA(SEQ ID NO：13) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：26-36 所示的 Affymetrix 探针，检测人 TLR1mRNA(SEQ ID NO：25) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：38-48 所示的 Affymetrix 探针，检测人 TLR2 mRNA(SEQ ID NO：37) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：50-60 所示的 Affymetrix 探针，检测人 CD69mRNA(SEQ ID NO：49) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：62-77 所示的 Affymetrix 探针，检测人 CD52 mRNA(SEQ ID NO：61) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：79-98 所示的 Affymetrix 探针，检测人 GAPDHmRNA(SEQ ID NO：78) 及其等位变体。使用 SEQ ID NOs：100-119 所示的 Affymetrix 探针，检测人 β-肌动蛋白 mRNA(SEQ ID NO：99) 及其等位变体。

[0088] 通过微阵列，优选使用 Affymetrix 人基因组 U133 Plus 2.0 阵列，检测 RNA 稳定状态的表达水平。或者，使用上文所列的基因特异探针，进行杂交。优选地，按照产品说明书 (Genechip® Expression AnalysisTechnical Manual，2004)，从树状细胞提取的 RNA 样品

可用于人基因组U133 Plus2.0阵列(AffymetrixSanta Clara,加利福尼亚州)。简单地说,使用Superscript™ II逆转录酶,3微克的总RNA标准品和Genechip® Poly-ARNA Control Kit(Affymetrix,Santa Clara,加利福尼亚州)可转录第一条cDNA链。合成第二条cDNA链后,随即体外转录以用于线性扩增各个转录物和掺入生物素化CTP和UTP。将cRNA产物破碎成约100核苷酸的片段,并将其在微阵列上杂交16小时。然后,将微阵列在低严谨条件(6×SSPE)和高严谨条件(100mM MES,0.1MNaCl)下进行洗涤,并用链霉亲和素-藻红蛋白进行染色。

[0089] 通过添加生物素化的抗链霉亲和素和额外等分量的链霉亲和素-藻红蛋白染料,以扩增荧光。在570nm激发后,将Genechip® Scanner3000(Affymetrix,Santa Clara,加利福尼亚州)用于收集3μm分辨率的荧光信号。对于各个目的微阵列特征,计算两个连续扫描的平均信号。用Genechip® Operating Software v1.1(Affymetrix,Santa Clara,加利福尼亚),分析扫描图像。优选地,将Poly-A RNA对照试剂盒(Affymetrix,Santa Clara,加利福尼亚)中包含的4种对照RNA的高线性相关($R^2 > 0.95$),确认作为有效标记过程的对照。

[0090] 将所有基因或仅仅目的基因(如,ALOX15、IL-1β、TLR1、TLR2、CD69和/或CD52,以及β-肌动蛋白和/或GAPDH)的曲线数据,输入计算机程序GeneSpring™,并进行标准化处理。通过用于Affymetrix阵列的GeneSpring™所建议的标准方法,以正常步骤实施三个步骤。

[0091] 1)数据转换(将所有小于0.01的值设定为0.01);

[0092] 2)将第50百分位数正态化。

[0093] 3)将中值正态化。

[0094] 通过区分目的mRNA的标准化表达(即GAPDH或β-肌动蛋白mRNA的标准化表达),然后可测定目的mRNA(ALOX15、IL-1β、TLR2、CD69或CD52mRNA)对稳定状态GAPDH或β-肌动蛋白mRNA的比值。

[0095] 本发明的抗原负载的树状细胞可作为治疗或预防疾病的疫苗,或激活可用于治疗的T细胞。例如,抗原负载的树状细胞可用于引起对抗原的免疫反应。它们可作为预防将来的传染病或疾病的疫苗,或作为激活免疫系统以治疗正发生的疾病的疫苗,例如但不限于,病原体感染或癌症。可将抗原负载的树状细胞与合适载体(例如生理缓冲液或其它注射液)一起配制成疫苗或药物组合物。以足够引起免疫反应的治疗有效量,进行施用疫苗或药物组合物。

[0096] 优选地,用可衍生树状细胞的个体自体抗原负载树状细胞,并施用于相同个体。例如,参见,美国5,853,719(其内容通过引用作为参考),描述了抗原负载的树状细胞和特别是RNA负载的树状细胞的制品和用途。或者,可使用计划接受DC疗法的受体的非自体抗原,以负载树状细胞。所述抗原的实例包括但不限于已知的治疗靶的抗原,例如端粒酶、前列腺特异抗原,及其它肿瘤标记物,或来自病原体的已知抗原。

[0097] 收集单核细胞或包含单核细胞的PBMC的方法

[0098] 用于收集单核细胞的包含单核细胞的PBMC的各种方法,对于本领域技术人员是已知的。例如,参见,详细说明了用于PBMC收集和淘析单核细胞纯化的白细胞分离术

的 gambrobct.com/Products_&_Services/。在优选的实施方案中，在 GambroBCT COBE Spectra(Gambro BCT,Lakewood,CO) 上使用 AutoPBSC(Automated Peripheral Blood Stem Cell) 程序，在单个无菌的一次性、一次使用的细胞成份袋中，收集分离白细胞产物和血浆。

[0099] 在一个分离白细胞的替换方法中，通过在肝素注射器中收集血液、用 PBS 稀释、在 Histopaque 1077(Sigma) 上分层、离心以及在接触面上复性 PBMC，以获得 PBMC。参见 Woodhead et al.(2000)International Immunol 12:1051-1061。收集、纯化或分级 PBMC 的其它方法，对于本领域技术人员是已知的。

[0100] 在收集分离白细胞产物或其它血液产物后，将其中包含的单核细胞在 1-34℃下温育 6-96 小时。在一个实施方案中，在袋中收集分离白细胞的产物，然后将其转移到能维持 1-34℃、优选约 6-28℃、最优选 8-26℃的温度监控运输容器中的疫苗制备设备中。例如在美国专利 4,102807 中公开的有助于防止温度变化的胶袋 (gel pack)，可被归入运输容器范畴中。例如，可在绝热集装箱（如，ThermoSafe™ model E65 聚氨酯泡沫绝热集装箱）中运输单核细胞，并用如图 1 所示的 ThermoSafe™ U-tek 胶袋和胶垫进行包装。例如，在图 1 所示的包装过程中，将可调节 -1℃的 16oz U-tek 胶袋平放在 E65 容器底部。将两个 16oz U-tek 胶垫 (-1℃) 重叠并放在第一层胶垫和 E65 容器的矮容器壁之间。然后将两个 16oz U-tek 胶（调节 +18℃）几乎垂直放置在先前的胶垫上。将 ThermoSafe™ INF 3000 运输容器放置在胶之间。将分离白细胞的袋放在密封的内袋 (STP711) 中。将记录内袋温度的装置用于监测运输温度。一个所述装置是 ThermoSafe™ DataLogger。将内袋置于密封的外袋 (STP710) 中，然后将该袋放入 INF3000 容器中。将 16oz U-tek 胶 (+18℃) 置于用牛皮纸 (Kraft paper) 套上的封闭 INF300 容器的顶部，然后塞上 4”泡沫塞。然后用胶带封口盒子，以备运输。

[0101] 在 1-34℃的温育期之中或之后，可进一步处理或纯化分离白细胞的产物，例如室温下在 50ml 锥形管中进行 Ficoll 密度梯度离心，以分离和浓缩包含树状细胞前体（单核细胞）的单核细胞组分。优选地，在通过磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行多个洗涤步骤后，可测定细胞浓度和细胞存活力。

[0102] 富集单核细胞

[0103] 用于富集单核细胞的方法，对于本领域技术人员是已知的，包括但不限于：密度梯度离心（如，稀释 Ficoll 密度梯度离心、稀释 Percoll 密度梯度离心等等）、淘析、附着塑料、切向流过滤、荧光激活细胞分选 (FACS)、免疫细胞分离法（抗体淘选以选择单核细胞或除去非单核细胞（如，白细胞、巨噬细胞、粒细胞，等等）、差异裂解、磁细胞分选等等）、在包被有塑料微载体珠的塑料培养袋中培养，等等。参见，例如，O′ Doherty 等 (1993) J Exp Med 178:1067-1076;Young 等 (1990)J Exp Med 171:1315-1332;Freudenthal 等 (1990)PNAS 87:7698-7702;Bemhard 等 (1995)Cancer Res 55:1099-1104;Caux 等 (1992) Nature360:258-261;Read 等 (2003)″ Evaluation of a Closed Automated Systemto Isolate Peripheral Blood Monocytes for Dendritic Dell(DC)Immunotherapy ″, Ninth annual meeting of the ISCT;Mu 等 (2003)ScandJ Immunol 58:578-586;Maffei 等 (2000)Transfusion 40:1419-1420;mitenyibiotec.com;Meyer-Wentrup 等 (2003)J Hematother Stem Cell Res12:289-299;以及 WO 2004/000444，其内容在此引用作为参考。例如，通过正选择 (CD14+ 细胞）或通过负选择（即，除去非单核细胞的细胞；如，CD3+、CD

9+ 和 CD2+ 细胞），磁细胞分选可用于富集单核细胞。

[0104] 优选地，通过淘析（分离来自个体白细胞分离物的单核细胞的自动方法），从白细胞分离的产物富集单核细胞。分离白细胞的方法是本领域中已知的。例如，在 Gambro BCT Elutra™ 细胞分离系统 (GambroBCT, Lakewood, CO) 上实施淘析。通过将 1000ml 的 5％人白蛋白血清 (HSA) 加入 4LHank′ 平衡盐溶液 (HBSS) 袋中，以制备淘析缓冲液。根据制造商的方法，通过淘析来分级细胞。在优选的实施方案中，将制造商 (Gambro) 方法的改良法用于淘析，其中最终的旋转出组分是第四馏份而不是第五馏份。对单核细胞馏份实施 CBC 与差异分析，以鉴定纯度和回收率。或者，通过免疫分型法与 CD14，评价单核细胞纯度。然后，将富集的单核细胞分化成树状细胞，或冷冻和保存以便后用。在一个实施方案中，将细胞冷冻在 25ml 或 50ml 的冷冻袋中。冷冻袋的实例包括 Cryocyte™ 冷冻袋、Origen™ 冷冻袋 (Cryostore) 和 Pall™ 冷冻袋。优选地，各个冷冻袋含有 15ml 培养基（如，AIM V、x-VIVO、RPMI，等等），其中具有直至 3×10^9 细胞和约 10-12％的 DMSO 和 10-20％热灭活的过滤血浆、终浓度约 107 至 507mg/L 的 $CaCl_2$，以及终浓度约 44 至 241mg/L 的 $MgSO_4$。使用控制速度的冰箱冷冻细胞，然后冷冻保存。

[0105] 在替代的实施方案中，PBMC 温育和 Ficoll 密度梯度纯化之后，将 PBMC 重悬浮于 AIM-v ® 培养基中，并以每瓶 2.0×10^8 细胞接种 $T150cm^2$ 烧瓶。在获得不足数量的 PBMC 的事件中，可冷冻 PBMC 并与第二次分离白细胞汇集。在 37℃、5％ CO_2、75％湿度的条件下，通过在无菌组织培养塑料烧瓶中附着 1 至 2 小时，从单核细胞群体中选择单核细胞。除去未附着的和半附着的细胞。将 PBS 加入烧瓶，以除去剩余的未附着细胞、半附着细胞以及剩余的培养基。剩余的附着细胞是主要的单核细胞，代表富集的单核细胞群体。

[0106] 单核细胞分化成树状细胞的方法

[0107] 用于单核细胞分化成树状细胞的各种方法，对于本领域技术人员是已知的。参见，U.S.6,607,722，WO 97/29182；Romani 等 (1994) J.Exp.Med.180：83-93；Sallusto 和 Lanzavecchia(1994) J.Exp.Med.179：1109 等，和 Reddy 等 (1997) Blood 90：3640-3646；其内容在此通过引用以作为参考。这些方法的多数包括在细胞因子的存在下培养单核细胞，其中所述细胞因子可诱导单核细胞分化成树状细胞。用于单核细胞分化成树状细胞的替代方法的实例包括但不限于：暴露于物理干扰下（如，剪切），在通过细胞 DNA 成分能制备光加成产物的光敏剂的存在下进行照射，和 / 或用 DNA 粘合剂治疗，随后与疾病效应剂一起温育，例如微生物、真菌、病毒以及恶性细胞。参见美国专利 6,607,722，其内容在此通过引用以作为参考。

[0108] 在一个实施方案中，通过在包含可诱导单核细胞分化成树状细胞的组合物的培养基中进行培养，将单核细胞分化成树状细胞。用于培养单核细胞、未成熟和成熟树状细胞的合适培养基，包括但不限于 AIM-V、X-VIVO-15、RPMI、DMEM 等等。诱导单核细胞分化成树状细胞的组合物是本领域中已知的，包括但不限于添加 IL-4 的 GM-CSF、添加 IL-13 的 GM-CSF、以及 IFNα。

[0109] 在优选的实施方案中，通过在 GM-CSF 和 IL-4 的存在下进行培养，将富集的单核细胞分化成树状细胞。（参见，例如 WO 97/29182；Sallusto 和 Lanzavecchia(1994) J.Exp Med.179：1109；以及 Romani 等 (1994) J.Exp.Med.180：83-93）。简单地说，优选以 1×10^6 细胞 /ml 的浓度，将富集的单核细胞在 AIM V 培养基、×-VIVO 15 培养基或其它合适培养基

中，在800U/ml GM-CSF和500U/ml IL-4的存在下和37℃、5% CO_2、≥75%湿度的条件下进行培养约4-7天、优选6天，以使得单核细胞分化成未成熟树状细胞。可调整细胞因子浓度。例如，GM-CSF浓度优选是500至1500U/ml、更优选是700至1000U/ml、最优选是800U/ml。IL-4浓度优选是400-1500U/ml、更优选是450至1000U/ml、最优选是500U/ml。IL-13或IL-15可用于代替IL-4，或者除其之外还含有IL-4。IFNα可用于代替添加了IL-4、IL-13或IL-15的GM-CSF。当单核细胞分化成树状细胞时，它们逐渐失去CD14的表达，并获得和未成熟状态中的树状细胞表型一致的CD80表达。

[0110] 用于未成熟树状细胞成熟为成熟树状细胞的方法

[0111] 未成熟树状细胞成熟为成熟树状细胞的方法对于本领域技术人员是已知的，包括但不限于，抗原摄入和/或接触可诱导成熟的组合物。诱导未成熟树状细胞成熟的组合物包括但不限于，单核细胞条件培养基；PBMC条件培养基；固定金黄葡萄球菌(Pansorbin™)；脂多糖(LPS)；其它菌细胞产物，例如单磷酸脂A(MPL)、脂胞壁酸等等；磷酸胆碱；钙离子载体；佛波酯例如PMA；热休克蛋白；核苷酸，例如ATP等等；脂肽；Toll样受体4；适于Toll样受体的人造配体；双链RNA，例如poly-I:C等等；免疫激活DNA序列；成熟混合物(TNF-α、IL-6、IL-1β和PGE_2)；GM-CSF、IL-4和成熟混合物(TNFα、IL-6、IL-1β以及PGE_2)、GM-CSF、IL-4、PGE2和IFNγ序列信号，其后是CD40L信号；等等。参见，例如Cisco等(2004)J Immunol 172:7162-7168；Jonluit等(1997)Eur J Immunol 27:3135-3142；美国专利申请20040203143；PCT申请PCT/US2005/036304和美国专利申请11/246,387，其内容在此通过引用以作为参考。

[0112] 在一个实施方案中，将含有TNFα、IL-6、IL-1β和PGE_2的成熟混合物，加入未成熟树状细胞的培养中。然后，将细胞过夜培养(约12小时或更久)，以产生成熟树状细胞。

[0113] 在一个替代的实施方案中，优选通过使用编码CD40L的mRNA、或任选使用编码一种或多种抗原的mRNA进行电穿孔，以转染未成熟树状细胞，然后在IFNγ和任选PGE_2的存在下过夜培养(约12小时或更久)，以生产成熟树状细胞。人CD40L cDNA和蛋白分别如SEQ IDNO:120和SEQ ID NO:121所示。其它CD40L的mRNA是本领域技术人员已知的。

[0114] 在优选的实施方案中，将AIM V培养基中的成熟制剂直接加给未成熟DC，达到TNF-α(10ng/ml)、IFN-γ(1000U/ml)以及PGE_2(1μg/ml)的终浓度。然后，将细胞过夜培养(约12小时或更久)，以产生成熟树状细胞。任选地，通过细胞接触被加入培养基中的或更优选在细胞中表达的CD40配体(CD40L)，可进一步促进成熟。CD40L是组成型表达或瞬时表达。优选地，使用编码CD40L的mRNA，任选地使用编码一种或多种目的抗原的mRNA，转染成熟树状细胞。

[0115] 抗原

[0116] 将任意抗原负载到未成熟或成熟树状细胞中。然后处理抗原，并通过成熟DC进行呈现。抗原实例包括但不限于，病毒粒子、细菌或其它病原体、蛋白及其片段、多肽、病原体裂解物、病原体提取物、病原体核酸、癌细胞、癌细胞蛋白及其片段、癌细胞裂解物、癌细胞提取物以及癌细胞核酸。抗原是天然存在的，或通过化学合成或重组进行制备。使用本领域中已知的方法，以多肽、蛋白或核酸的形式，将抗原呈递给细胞。

[0117] 以“天然”形式进行呈递抗原，其中在制备抗原或诱导其进入所面对树状细胞的环境中没有出现人为干涉。或者或另外，抗原包括粗制品，例如在常规的过敏注射(allergy

shot）或肿瘤裂解物中，通常进行施用的类型。或者抗原是基本上纯化的，如至少约 90％纯度。

[0118] 例如，抗原是通过蛋白裂解分离的蛋白所产生的肽。可利用任何各种裂解试剂，包括但不限于，胃蛋白酶、溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等等。或者，优选在自动合成仪上化学合成可用于本领域的肽，或进行重组表达。另外，使用重组方法以产生编码目的肽的核酸，并在期望条件下表达肽。或者，可纯化编码核酸的抗原，或从细胞、组织或病毒衍生该抗原。

[0119] 抗原具有不同于天然存在的化合物的结构。在本发明的一些实施方案中，抗原是“修饰抗原”，因为抗原具有基本上相同于天然存在的抗原的结构，但包含与天然存在的化合物的精确结构的一个或多个变化。

[0120] 例如，当天然存在的抗原是蛋白或多肽抗原时，与蛋白或多肽抗原相比，修饰抗原具有不同于天然存在的抗原的、以一个或多个氨基酸的插入、取代或缺失形式的氨基酸序列，和 / 或包括不同于天然存在的抗原中所对应氨基酸的、通过插入、取代或缺失一个或多个共价连接于氨基酸的化学部分的氨基酸。在一个方面中，天然存在的和修饰的抗原共有至少 5 个氨基酸（即至少 75％同一性）的至少一个区。本领域技术人员可理解，在比较两条氨基酸序列以测定它们同一性程度中，相同氨基酸延伸段（即，至少两个区）的间距不必总是精确保守的。在至少 5 个氨基酸的至少一个区的氨基酸序列中，天然存在的和修饰的蛋白或多肽抗原显示至少约 80％同一性，或者更多是 85％、90％、95％，或大于 99％同一性。经常，更多的氨基酸序列的长区域（如，10、20、50、或 100 或多个氨基酸）可用于显示称为同一性程度。

[0121] 在优选的实施方案中，以编码抗原的多核苷酸或基因施用抗原，使得基因表达引起在单个处理过的（当体内施用时）或细胞培养系统（当体外施用时）中产生抗原。用于生成包括表达基因或 mRNA 的核酸的方法，和用于将所述核酸导入可产生由表达基因编码的任何蛋白的表达系统，是本领域中已知的，并在下文进行简要描述。优选地，以 mRNA 形式进行施用抗原。将从细胞（例如，癌细胞、病原体细胞或病原体感染的细胞）获得的 RNA 或 mRNA 直接负载到树状细胞中。或者，在负载之前扩增 RNA 或 mRNA。在一个实施方案中，使用含有有义启动子的引物，通过 RT-PCR 扩增总 mRNA 或靶 mRNA，以构建 cDNA 表达构建体。然后，将从表达构建体体外转录的 RNA，用于负载细胞。用于分离、扩增、体外转录 RNA 并将 RNA 或其它核酸负载到树状细胞中的方法，是本领域技术人员已知的。例如，参见，PCT/US04/39539 和美国临时申请 60/522,310，其内容在此通过引用以作为参考。

[0122] 在本发明的一个实施方案中，抗原是一个或多个 HIV 蛋白或其片段。作为非限制性实例，来自 HIV 感染者的血浆可作为 HIV RNA 的分离来源。在一个实施方案中，离心部分血浆、收集上清，并使用 0.22μm 过滤器进行过滤，以及保存在 -20℃，直至用于制备树状细胞疫苗。通过 RT-PCR，扩增血浆中的 HIV RNA 并进行体外转录反应，以提供用于负载到树状细胞中的、足够数量的扩增 HIV RNA。简单地说，使用逆转录酶、合适反应缓冲液以及随机六聚体或靶反向引物，将病毒 RNA 反转录为单链 (ss)DNA。然后，在一级 PCR 反应中，使用多重引物，通过 PCR 将单链 cDNA 扩增成双链 DNA。通过选择互补于那些区域两侧的靶序列的特异引物，测定一级 PCR 反应中的扩增区域的同一性。使用 QIAquick® PCR 纯化试剂盒，纯化一级 PCR 反应的产物，然后作为第二轮或嵌套式 PCR 扩增中的模版。在这轮扩增中，

5′ 引物含有 RNA 聚合酶结合位点（如，T7 启动子）突出端，3′ 引物含有聚 T 片段 (poly T stretche) 的悬突。通过在巢式 PCR 循环中的突出端区域所导入的修饰，使得体外转录 PCR 产物，并一运送到树状细胞中就进行有效翻译。使用 Qiagen RNeasy® 试剂盒，进行纯化体外转录的 RNA，并将 RNA 在无核酸酶的水中进行洗脱。如果需要，进行乙醇沉淀以浓缩 RNA。将 RNA 重悬浮在无核酸酶的水中，并通过 0.8/0.2μm 聚醚砜 (PES) 过滤器，然后分散到 0.5ml 安全锁的聚丙烯管中，并负载到 DC 中或在≤ -150℃下冷冻保护，直至转染之前进行解冻。

[0123] 在另一个优选实施方案中，从一种或多种癌细胞提取 RNA 或 mRNA。使用 PCT/US04/39539 中描述的方法，将 RNA 或 mRNA 直接负载到树状细胞中，或首先通过 RT-PCR 进行扩增和体外转录。

[0124] 树状细胞的抗原负载

[0125] 当作为未成熟树状细胞、成熟树状细胞时，或在未成熟到成熟树状细胞的分化中，使用一种或多种抗原负载树状细胞。树状细胞能摄取抗原，例如蛋白、肽、病毒、细胞、细胞裂解物等等。因此，仅仅通过用抗原或编码抗原的核酸接触树状细胞，可实施抗原负载。用于负载树状细胞的其它方法是本领域技术人员已知的，包括但不限于，核酸转染、外来体、病毒载体、微颗粒输送等等。例如，参见，Mitchell 等 (2000)Curr Opin MoI Ther 2：176-181；Zitovogel 等 (1998)Nature4：594-600；Jenne 等 (2001)Trends Immunol 22：102-106，以及美国专利公开 2005/0158856，其内容在此通过引用以作为参考。将一种或多种抗原直接负载到树状细胞中，或将编码一种或多种抗原的核酸负载（转染）到树状细胞中。在优选的实施方案中，使用编码一种或多种抗原的核酸来负载树状细胞。优选地，核酸是 mRNA。

[0126] 将核酸转染到树状细胞中的方法对于本领域技术人员是已知的，包括但不限于，被动转染、脂质介导的转染、阳离子脂质介导的转染（如，DOTAP）、阳离子肽介导的转染、电穿孔。参见 Nair 等 (1998)NatBiotechnology 16：364-369；Van Tendeloo 等 (2001)Blood 98：49-56；Saeboe-Larssen 等 (2002)J Immunol Methods 259：191-203；Boczkowski 等 (2000)Cancer Res 60：1028-1034；Gilboa 等 Immunol Rev(2004)199：251-263；美国临时申请 60/583,579；和美国专利公开 10/177,390，其内容在此通过引用以作为参考。

[0127] 通过肽脉冲，负载树状细胞

[0128] 使用蛋白、多肽、肽、细胞或组织提取物或其它类型的抗原，以负载树状细胞的方法对于本领域技术人员是已知的。在优选的实施方案中，用一种或多种抗原负载未成熟树状细胞。在本发明的一个实施方案中，仅仅通过在培养基中与未成熟树状细胞一起温育，负载肽、多肽和 / 或细胞或组织提取物。

[0129] 通过电穿孔负载抗原，随后使用细胞因子混合物来成熟未成熟树状细胞

[0130] 在本发明的一个实施方案中，通过轻敲培养瓶以移动细胞，来收集未成熟树状细胞。然后将悬浮细胞转入锥形管。将 PBS 加入培养瓶，以除去加入锥形瓶中的剩余漂浮细胞和剩余培养基。一些未成熟树状细胞可继续附着于烧瓶。通过加入 PBS 并在从 2℃直至室温的任何地方中温育烧瓶，以促进这些细胞的分离。在温育末期，排干烧瓶并将移出的细胞加入锥形管中。然后沉淀所有细胞悬浮液，在 PBS 中洗涤并以 0.5ml 的 4×10^7/ml 重悬浮在

冰冷 ViaSpan® 中，并置于冰上。用编码抗原（组）的、2μg/10^6 细胞的 mRNA 混合 DC，并置于 4mm 缺口电穿孔管中，在 275-350V 脉冲、100-300Ω 和 150μF，优选在 325V、200Ω 下进行电穿孔。在电穿孔后，立刻在 X-VIVO15 培养基中洗涤 DC，并以 1×10^6/ml 浓度重悬浮于补充了 GM-CSF(800U/ml)、IL-4(500U/ml) 和 PGE2(1μg/ml)、TNF-α (10ng/ml)、IL-1β (10ng/ml) 以及 IL-6(100ng/ml) 的 X-VIVO15 中。然后，在 37℃、5% CO_2、≥ 75%湿度下，过夜温育未成熟树状细胞，以生产稳定的成熟树状细胞。然后在 PBS 中洗涤成熟树状细胞。

[0131] 通过电穿孔进行抗原负载，使用 CD40L 进行成熟

[0132] 在本发明的一个实施方案中，使用 CD40L 和 IFN-γ 成熟未成熟树状细胞。优选地，通过如上所述电穿孔，用 4μg CD40L mRNA/10^6 细胞和编码一种或多种抗原的 mRNA(2μg/10^6 细胞）转染未成熟 DC，然后在补充了 GM-CSF(800-1000U/ml)、IL-4(500-1000U/ml)、IFN-γ (500-1000U/ml) 或 TNF-α (10ng/ml) 和 PGE2(1μg/ml) 的 X-VIVO15 中过夜培养，以生成稳定的成熟树状细胞。与通过上述细胞因子混合法成熟的树状细胞相比，通过这种方法成熟的树状细胞，可分泌高水平的 IL-12(T 细胞生长因子）和最小限度的 IL-10。

[0133] 通过电穿孔成熟树状细胞，进行抗原负载

[0134] 通过本领域技术人员已知的方法，用抗原负载成熟树状细胞。在本发明的一个非限制性实施方案中，单核细胞开始分化成未成熟树状细胞后的第 6 天，将 AIM V 培养基中的成熟制剂直接加给未成熟 DC，以获得 TNF-α (10ng/ml)、IFN-γ (1000U/ml) 和 PGE_2(1μg/ml) 的终浓度。然后，过夜培养细胞以产生成熟树状细胞。然后收集 DC，并用 1μg 编码 RNA 的抗原和任选用 4μgCD40L RNA/10^6 细胞，进行共电穿孔。电穿孔后，将细胞在补充了 GM-CSF(800U/mL) 和 IL-4(500U/mL) 的 1×10^6 细胞的 AIM V 培养基中培养 4 小时。然后制备用于施用给个体而无需冷冻的细胞，或者配制用于冷冻的细胞。为了冷冻，优选在热灭活的自体血浆、10% DMSO 和 5%葡萄糖中，以 2×10^7 细胞 /ml 进行制备细胞。使用总数为 1.4×10^7 细胞的 0.7ml 小管，以充满冷冻管。然后，将小管在乙醇盒中于 -85℃下冷冻至少 4 小时，并转入冷冻冰箱中以备保存。然后，将冷冻的树状细胞疫苗进行解冻，并且无需洗涤或重新配制即施用给个体。

[0135] 流式细胞术分析 DC，以评定成熟

[0136] 在优选的方法中，收集 106DC，并重悬浮在冰 PBS/1% FCS 中。在 96 孔平板 (BD Biosciences) 中，使用 1×10^5/ 孔的 DC，混合偶联了 MHC 分子的特异抗体的藻红蛋白 (PE) 或 FITC，(HLA-ABC，HLA-DR)、共刺激分子 (CD80，CD86)、成熟标记 (CD83) 以及单核细胞标记 (CD14)，并在 4℃下温育至少 15 分钟。将同种型匹配抗体作为对照。彻底洗涤之后，使用 FACScalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 和 CellQuest 软件 (BD Biosciences)，实施荧光分析。

[0137] 疫苗制备

[0138] 为了制备树状细胞疫苗的方法是本领域技术人员已知的。在优选的实施方案中，洗涤成熟树状细胞，并以 4×107 细胞 / 的浓度重悬浮在热灭活血浆（优选自体血浆）和 10%葡萄糖中。然后，使用热灭活血浆和 20% DMSO 按 1 ： 1 稀释细胞，以在热灭活血浆中达到 5%葡萄糖、10% DMSO 的终浓度。在适于冷冻保存的容器中，最终的靶填充成分是 1.4×10^7 细胞 /0.7ml。然后，将树状细胞施用给患者或优选在 -85℃下进行冷冻，和优选在

≤-150℃下保存在冷冻冰箱（优选在干液氮冰箱中，以预防污染）中。然后，将冷冻疫苗运输到用于施用患者的临床现场（优选通过皮内注射）。刚一解冻，无需进一步处理就将疫苗直接施用给患者。

[0139] 其它用于施用的合适制剂，包括：含有抗氧剂、缓冲液、抑菌剂和溶质（使得制剂与计划受体血液等渗）的等渗无菌注射水溶液，包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、保存剂、免疫激活剂、细胞因子和佐剂的无菌水性和非水性悬浮液。

[0140] 在优选的实施方案中，将成熟树状细胞以 4×10^7 细胞 / 的终浓度重悬浮在热灭活血浆的自体血浆和 10％葡萄糖中。然后，使用热灭活的自体血浆和 20％ DMSO 的混合液，将这些细胞按 1 ： 1 进行稀释，以在含有 5％葡萄糖和 10％ DMSO 的热灭活的自体血浆中达到终浓度 2×10^7 细胞 /ml。在适于冷冻保存的容器中，最终的饱和制剂是 1.4×10^7 细胞 /0.7ml。然后冷冻疫苗，并保存在≤ -150℃的干液氮冰箱中。解冻之后，无需洗涤和重悬浮，疫苗可用于施用。

[0141] 施用方法

[0142] 通过各种方法，可施用树状细胞疫苗，例如但不限于，注射（如，皮下注射、皮内注射、静脉注射、淋巴管灌注、关节腔内注射、肌肉注射、腹腔内注射）、连续灌输、植入物的持续释放等等。典型地，以每两至四周施用 DC 疫苗。可以与生理可接受的载体、缓冲液、稀释剂、佐剂、免疫调节剂等等一起施用树状细胞疫苗。优选地，所施用的树状细胞疫苗是患者自体的，或是 HLA 配型。

[0143] 施用于个体的细胞（如，激活 T 细胞或树状细胞）剂量，是在个体中随时间有效实现期望的有益治疗反应、抑制癌细胞生长、或抑制传染病的有效量。优选剂量是约 107 细胞。任选地加入生物反应调节物，以通过本发明的 DC 或活化的 T 细胞用于治疗。例如，任选地将细胞与佐剂或例如 GM-CSF、IL-12 或 IL-2 的细胞因子一起施用。

[0144] 评定抗原负载的树状细胞或培养的 T 细胞的免疫原性的方法

[0145] 通过本发明方法可测定抗原负载的树状细胞或培养的 T 细胞的免疫原性，其中这些众所周知的方法包括但不限于下列：

[0146] ^{51}Cr 释放裂解分析。比较抗原特异 T 细胞对肽冲击的 ^{51}Cr 标记靶的裂解。“更活性”组合物显示与时间有关的更多的靶裂解。裂解动力学和固定时点（如，4 小时）的裂解综合指标，可用于评价性能。Ware，CF 等 (1983)J. Immunol. 131 :1312。

[0147] 细胞因子释放分析。T 细胞一接触修饰 APC 就分泌细胞因子的类型和数量的分析，是功能活性的测量。通过测定细胞因子生产的速率和总量的 ELISA 或 ELISPOT 分析，可测量细胞因子。Fujihashi，K. 等 (1993)J. Immunol. Meth. 160 :181 ；Tanquay，S. 和 Killion，JJ. (1994)Lymphokine Cytokine Res. 13 :259。

[0148] 体外 T 细胞培养。分析本发明组合物可引起来自正常供体的 T 细胞群体或患者衍生的 PBMC 的反应的能力。在该系统中，测试所得 T 细胞的溶解活性、细胞因子释放、多克隆性以及对抗原表位的杂交反应。Parkhurst，M. R 等 (1996)J. Immunol. 157 :2539。

[0149] 增殖分析。T 细胞会扩大对反应组合物的响应。例如，通过测量 3H- 胸腺嘧淀的摄入，可定量监测增殖。Caruso，A 等 (1997)Cytometry27 :71。

[0150] 转基因动物模型。通过与本发明组合物一起接种 HLA 转基因小鼠并且测定诱导免疫反应的性质和量度，可体内评价免疫原性。或者，通过人 PBL 的过继转移，hu-PBL-SCID

鼠模型允许在小鼠中重建人免疫系统。如上文所述，可用组合物接种这些动物，并分析免疫反应，参见，Shirai，M 等 (1995)J. Immunol. 154 :2733 ;Mosier，D.E. 等 (1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :2443。

[0151] 灵长类模型。可利用非人灵长类（黑猩猩）模型系统来监测 HLA 限制配体的体内免疫原性。已经证明 :黑猩猩与人 MHC 分子一起共有重叠的 MHC- 配体特异性，因此允许人们检验 HLA- 限制配套的体内的相对免疫原性。Bertoni，R. 等 (1998)J. Immunol. 161 :4447。

[0152] 监测 TCR 信号转导事件。由 MHC- 配体复合物引起的一些细胞内信号转导事件（如，磷酸化），是与有效的 TCR 啮合有关的。这些事件的定性和定量分析已经与组合物通过 TCR 啮合来激活效应细胞的相对能力有关。Salazar，E 等 (2000)Int. J. Cancer 85 :829 ; Isakov，N. 等 (1995)J. Exp. Med. 181 :375)。

[0153] 用于分离和鉴定免疫细胞的方法

[0154] 可在一些任何结构中，实施细胞分离或用于在细胞纯化中检测细胞的免疫测定，如，参见，Maggio（编著）(1980)Enzyme ImmunoassayCRC Press，Boca Raton，Fia ;Tijan(1985) ″ Practice and Theory of EnzymeImmunoassays， ″ Laboratory Techniques in Biochemistry and MolecularBiology，Elsevier Science Publishers B.V，Amsterdam ;Harlow 和 Lane，supra ;Chan（编著）(1987)Immunoassay :A Practical Guide AcademicPress，Orlando，FIa. ;Price 和 Newman（编 著）(1991)Principles andPractice of Immunoassays Stockton Press，NY ;以及 Ngo(编著)(1988)Non-isotopic Immunoassays Plenum Press，NY。

[0155] 通过所述 FACS 分析的流式细胞术，分离和鉴定细胞。各种流式细胞术是已知的。对于荧光激活的流式细胞术的全面概述，例如参见，Abbas 等 (1991)Cellular and Molecular immunology W.B.SaundersCompany，具体是第 3 章 ;和 Kuby(1992)Immunology W.H.Freeman 和 Company，具体是第 6 章。如，可从 Becton Dickinson 获得 FACS 仪器。

[0156] 可用于标记细胞抗原的标记试剂，包括但不限于，单克隆抗体、多克隆抗体、蛋白或其它聚合物，例如亲和基质、碳水化合物或脂质。通过任何已知的方法，例如免疫印迹、蛋白质印迹分析、放射性示踪或生物发光标记、毛细管电泳或其它追踪尺寸、电荷或亲合力基础的方法，进行检测。

[0157] 下列实例是用于举例说明而不是限制本发明。

[0158] 实施例

[0159] 实施例 1 :从日龄分离白细胞制备树状细胞

[0160] 通过分离白细胞，从 4 个人供体收集外周血单核细胞 (PBMC)，并通过过夜输送转移到可保持 8℃ -26℃温度的温度监控运输容器中的树状细胞生产设备 . 输送当天，在 50ml 锥形管中，将分离白细胞的产物在室温（约 19-22℃）下进行 Ficoll 密度梯度离心 (800×g)20 分钟，以分离和浓缩包含树状细胞前体（单核细胞）的单核细胞组分。在用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次之后，测定细胞浓度和细胞存活力。在第三次离心 / 用 PBS 洗涤步骤之后，将单核细胞重悬浮于 StemSpan™ H2000 培养基中，并以 2.0×10^8 细胞 / 烧瓶接种在 T150cm^2 烧瓶中。然后，在 37℃、5％ CO_2、≥ 75％湿度下，通过附着在无菌组织培养塑料烧瓶，从单核细胞群体选出单核细胞。弃去非附着和半附着细胞（初级淋巴细胞）。将主要是单核细胞的剩余附着细胞，培养在含有 GM-CSF(800U/ml) 和 IL-4(500U/ml)StemSpan™

H2000 培养基中。将这些细胞在 37℃、5% CO_2、≥ 75%湿度下温育 6 天，以使得单核细胞分化成未成熟树状细胞。

[0161] 通过轻柔轻敲以移动细胞，收集大量的未成熟树状细胞群体。然后将悬浮细胞转入锥形管。将额外的PBS加入烧瓶以除去剩余的悬浮细胞和剩余的培养基，并将PBS加入锥形管中的细胞悬浮液中。通过加入PBS，并在2-8℃下将烧瓶温育约10分钟，完全分离剩余的附着细胞。当温育这些细胞时，离心锥形管中的细胞悬浮液，并将细胞沉淀重悬浮在PBS中。温育末期，轻拍烧瓶，将内含物加入锥形管中的细胞悬浮液。沉淀所有细胞悬浮液，并重悬浮在PBS中，根据细胞浓度细胞存活力和免疫分型而除去样品。通过流式细胞术，检查下列四种细胞标记组：单核细胞系标记 (CD3、CD14、CD19 以及 CD56)、树状细胞存在的指示物 (CD11c)、抗原呈递细胞标记 (HLA-DR) 以及成熟树状细胞标记 (CD83)。富集的未成熟树状细胞制品，表达不显著水平的 CD83 系标记，和表达高水平的 CD11c 和 HLA-DR。

[0162] 使用 OPTI-MEM ® 还原性血清培养基 (GIBCO™) 和 HEPES 缓冲液、L- 谷氨酰胺而非酚红，将未成熟树状细胞洗涤一次。然后，使用扩增肿瘤 RNA，通过以每 106 树状细胞约 2μg RNA 的比例进行电穿孔，转染树状细胞。在含有 600μl 的细胞悬浮液（含 5×10^7 细胞 /ml）的 4mm 缺口管中，以 500V、500μs 的脉冲实施电穿孔。电穿孔后，将转染的细胞转移到 T150 烧瓶中，该烧瓶含有补充了 IL-4(500U/ml) 和 GM-CSF(800U/ml) 的 StemSpan H2000™ 培养基。在 37℃、5% CO_2、≥ 75%湿度下，将转染的细胞温育 2-3 小时，以使得细胞从电穿孔复苏。

[0163] 在 37℃、5% CO_2、≥%湿度下，将未成熟的电穿孔树状细胞在补充了 IL-4(500U/ml) 和 GM-CSF(800U/ml) 以及成熟混合物 (5ng/ml 的 IL-1β、150ng/ml 的 IL-6、5ng/ml 的 TNF-α 以及 1μg/ml 的 PGE_2) 的 StemSpan H2000™ 培养基中，进行成熟 20-24 小时。使用 1% HSA，将所有细胞因子以及 PGE_2 在 PBS 中重建或稀释（就 PGE_2 而论）。在稀释步骤之前，在乙醇中重建 PGE_2。然后，在加入细胞消化液（无胰蛋白酶）之前，用 PBS 洗涤成熟树状细胞，然后用 PBS 洗涤三次以除去细胞消化液。根据细胞浓度、存活力和免疫分型，收集样品。表 1 所示比较未成熟和成熟树状细胞的免疫分型。

[0164] 表 1

[0165]

	供体 39	供体 40	供体 41	供体 42	平均值	S.D.
未成熟 DC						
%存活力(台盼，Trypan)	96.0	95.0	96.0	97.0	96.0	0.8
%产率(PBMC)	6.1	2.3	1.9	6.0	4.1	2.3
免疫表型						
针对小细胞+大细胞						
%CD3+	1.2	1.4	0.8	0.9	1.1	0.3
%CD19+	1.9	11.7	3.5	4.8	5.5	4.3
%CD14+	1.4	0.3	0.3	0.0	0.5	0.6
%CD56+	1.0	1.1	0.8	1.0	1.0	0.1
CD3+CD19+CD14+CD56+	5.5	14.5	5.4	6.7	8.0	4.4
针对小细胞+大细胞						
%CD11c+	99.6	97.8	99.7	99.7	99.2	0.9
%CD80+	26.6	77.3	37.0	46.6	46.9	21.9
%CD83+	2.2	2.5	2.3	8.2	3.8	2.9
%CD86+	92.1	42.4	66.2	82.0	70.7	21.7
%HLA-DR+	90.8	74.9	72.4	42.7	70.2	20.1
成熟 DC						
肿瘤来源	黑素瘤	肾 CC	肾 CC	黑素瘤		
%存活力(台盼，Trypan)	93.0	83.0	88.0	91.0	88.8	4.3
%产率(PBMC)	73.0	72.0	61.0	57.3	65.8	7.9
免疫表型						
针对小细胞+大细胞						
%CD3+	1.2	1.2	0.9	1.0	1.1	0.2
%CD19+	2.3	11.3	2.2	5.3	5.3	4.3
%CD14+	1.4	0.4	0.9	0.1	0.7	0.6
%CD56+	1.0	1.4	2.0	0.9	1.3	0.5
CD3+CD19+CD14+CD56+	5.9	14.3	6.0	7.3	8.4	4.0
针对小细胞+大细胞						
%CD11c+	99.6	98.9	99.4	99.6	99.4	0.3
%CD80+	90.8	92.8	92.9	91.8	92.1	1.0
%CD83+	75.0	50.8	79.2	72.9	69.5	12.7
%CD86+	99.4	94.2	98.8	99.1	97.9	2.5
%HLA-DR+(MHC II 类)	97.5	97.2	98.1	93.9	96.7	1.9

[0166] 以 2×10^7 细胞 /ml 的终浓度，将转染的成熟树状细胞悬浮在自体血浆中。然后，用 80％血浆和 20％ DMSO 的混合液，按 1 ： 1 稀释细胞，以在 90％血浆和 10％ DMSO 中达到终

浓度 3×10^6 或 1×10^7 细胞，然后使用控速冷冻法将其冷冻在低温管中，并保存在≤ -150℃下。

[0167] 实施例 2：从日龄分离白细胞的产物所制备的树状细胞疫苗，在 10％ DMSO 中解冻后至少 2 小时保持有活力。

[0168] 将如实施例 1 所述制备的冷冻树状细胞疫苗在 37℃下解冻，并在 20-25℃或 2-8℃下保持 2 小时。解冻后，在 30 分钟间隔瞬时测定存活力，直至两小时。解冻后，在 37℃时的瞬时存活力是 92％。结果如表 2 所示，证实疫苗可在 10％ DMSO 中解冻并保存至少两小时。

[0169] 表 2

[0170]

解冻后时间（分钟）	存活力(%)	
	20-25℃ 解冻后	2-8℃ 解冻后
30	91	88
60	89	86
90	89	80
120	87	83

[0171] 实施例 3：从患者分离单核细胞并将单核细胞分化成未成熟树状细胞

[0172] 室温下，通过在临床现场进行分离白细胞从患者或志愿者收集外周血单核细胞和血浆。将分离白细胞的产物 (PBMC) 和血清，在可维持 6-28℃温度范围的温度调节容器中进行过夜运输。分离白细胞的第二天，室温下通过 Ficoll 密度梯度离心，在 50ml 锥形管中纯化 PBMC，以分离和浓缩包含单核细胞（树状细胞前体）和白细胞的单核细胞组分。在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中，几次洗涤单核细胞，并测定细胞浓度。在最终离心 / 用 PBS 洗涤的步骤后，将单核细胞重悬浮在 AIM-V 培养基中，并以 2.0×10^8 细胞每瓶播种在 $T150cm^2$ 中。然后，在 37℃、5％ CO_2、》75％湿度的条件下，通过在无菌组织培养塑料烧瓶中附着 1 至 2 小时，从单核细胞群体中选择单核细胞。通过用 PBS 轻柔洗涤，除去非附着和半附着细胞。将主要是单核细胞的剩余附着细胞，培养在含有 1000U/ml GM-CSF 和 1000U/ml IL-4 的 X-VIVO 15 培养基中。将细胞在 37℃、5％ CO_2、≥ 75％湿度的条件下温育 6 天，使得单核细胞分化成未成熟树状细胞。

[0173] 体外培养之后，通过轻敲烧瓶以移动细胞，收集丰富的未成熟树状细胞群体。将悬浮细胞转入锥形管。将 PBS 加入烧瓶以除去剩余的悬浮细胞和剩余的培养基，然后将 PBS 加入相同锥形管中的细胞悬浮液中。在 2-8℃下，通过在 PBS 中温育，促进剩余的附着未成熟树状细胞的分离。温育末期，轻拍烧瓶，将内含物加入相同锥形管中的细胞悬浮液。然后沉淀所有细胞悬浮液，并重悬浮在 PBS 中，除去样品以测定细胞浓度。

[0174] 洗涤未成熟树状细胞，重悬浮在 ViaSpan 中，并用 2μg 抗原编码 mRNA/10^6 树状细胞进行转染。在含有 0.4ml 细胞悬浮液（含 4×10^7 细胞 /ml）的 4mm 缺口管中，以 300V、100Ω 和 150μF 的脉冲实施电穿孔。在电穿孔后，用 X-VIVO15 培养基洗涤转染的细胞、离心，并重悬浮在补充了 GM-CSF(800U/ml)、IL-4(500U/ml)、IL-1β (10ng/ml)、IL-6(150ng/ml)、TNF-α (10ng/ml)、和 PGE_2(1μg/ml) 的 X-VIVO15(无血清) 中。在 37℃、5％ CO_2、≥ 75％

湿度的条件下，过夜温育细胞以促进成熟。

[0175] 将转染的成熟树状细胞以 4×107 细胞 / 的终浓度重悬浮在热灭活血浆的自体血浆和 10％葡萄糖中。使用 20％ DMSO 的混合液，按 1 ： 1 稀释细胞，以在含有 10％ DMSO 和 5％葡萄糖的热灭活的自体血浆中达到终浓度 2×10^7 细胞 /ml，然后在 150℃下冷冻在无菌低温管中。

[0176] 实施例 4 ：在 6-28℃下，从过夜温育的单核细胞所制备的树状细胞的物理和功能特征

[0177] 该实施例的数据证实了从日龄清血 (apheresis) 产物制备 RNA 转染的树状细胞的功能和可行性。通过实施例 3 中描述的方法，制备树状细胞。下列数据显示，以合适产率从单日龄的清血产物可重复地制备树状细胞，并且所得的细胞是 ：(1) 展现标准的成熟表型，(2) 可有效地被 RNA 转染，以及 (3) 用进行冷冻保存，并具有解冻后高存活力。DC 的免疫表型 . 成熟 DC 的大量特征在于 ：最终的细胞制品中应当存在或没有分子标记的 FACS 染色。HLA-DR、CD83、CD86、CD80、CD1a 和 CD209 显示高表达，CD14、CD56、CD19 以及 CD3 显示低表达。表 3（下文）显示 ：从获得自不同健康供体的 PBMC 中制备树状细胞疫苗的 11 个连续过程中所编辑的结果（阳性细胞百分比的平均值和标准偏差）。

[0178] 表 3 ：从日龄单核细胞所制备的 DC 中，表达细胞表面标记

[0179]

标记	阳性细胞％（平均值）	阳性细胞％（标准偏差）
HAL-DR	99.08	1.21
CD83	91.46	4.97
CD14	0.87	0.89
CD56	6.45	6.85
CD19	1.57	0.71
CD3	2.33	0.66
CD86	98.87	1.66
CD80	83.73	25.50
CD1a	56.15	19.45
CD209	95.73	4.81

[0180] 这些数据与显微照片（未显示）一起说明 ：通过本发明方法条件所制备的 DC，展现标准的 DC 表型和形态。进一步地，比较低的标准偏差表示该方法的可复现性。

[0181] 产量、表型和存活力。树状细胞方法经过了完全测试，并显示可重复产生高质量 RNA 转染的成熟树状细胞。表 4 显示 ：使用作为抗原有效负载的所有扩增肿瘤细胞系 RNA 和作为载体的正常供体树状细胞，11 次疫苗试验的结果。

[0182] 表 4 ：在 11 次一致试验中产生的 DC 疫苗产物的试验结果概要

[0183]

一致试验	MatDC 表型			解冻后存活力	剂量
	CD14	CD83	HLA-DR		
1	1.5%	86.6%	99.7%	81%	5
2	0.7%	95.0%	100.0%	N/A	2
3	2.9%	94.8%	99.9%	93%	22
4	0.3%	89.6%	96.1%	88%	15
5	2.0%	81.2%	97.7%	64%	17
6	0.5%	92.7%	100.0%	88%	34
7	0.1%	85.5%	98.7%	84%	20
8	0.6%	95.2%	99.5%	85%	12
9	0.5%	93.0%	99.8%	83%	18
10	0.3%	96.4%	99.8%	90%	38
11	0.2%	95.6%	98.6%	88%	12
平均值 ±SD 11 次试验	*0.9% ±0.9%*	*91.4% ±5.0%*	*99.0% ±1.2%*	*84% ±8%*	*17.7% ±10.8%*

[0184] 表达 CCR7 的成熟 RNA 转染 DC 迁移。评价除了上述成熟 DC 标记之外的负责体内 DC 的淋巴节迁移的 CCR7 表达。在该研究中，将 FACS 分析和 CCR7 特异抗体用于检查解冻的 RNA 转染的 DC，其中所述 DC 使用工业规模的 GMP 方法进行制备（一致试验 3、4、6、7、8 和 10）。结果如表 5 所示：

[0185] 表 5 :CCR7+ 树状细胞的百分比

[0186]

	IgG 同型对照	CCR7 抗体
试验#3	0.37*	41.9
试验#4	0.12	44.6
试验#6	0.14	42.42
试验#7	0.65	42.96
试验#8	0.17	26.94
试验#10	0.13	32.76

[0187] *%阴性细胞 s

[0188] 除了证实迁移后 CCR7 对 DC 的物理存在之外，通过使用胶原凝胶基质自发的迁移分析，还证实 DC 具有迁移能力，这表明表达的 CCR7 也是有功能的（数据未公开）。

[0189] 转染 RNA 的 DC 提供功能共刺激载体。上述实验显示，所制备的 DC 表达所有的关键共刺激标记，而以下实验说明这些分子具有功能的。对于这个目的，使用从 3 种不同供体和来自各个供体的预先冷冻的 PBMC 中所制备的解冻 DC，测定 DC 刺激由异常混合淋巴细胞

(MLR) 分析中产生的干扰素 γ (IFN-γ) 的能力。期望结果是 :DC 不会刺激由各自的 HLA- 匹配的自体 PBMC 所产生的 INF-γ,但当与非自体 PBMC 混合时,DC 会进行刺激。使用作为读数器的 ELISPOT(INF-γ),测试所有匹配方式的组合。数据如图 2 所示。该实验结果表明,正如预期的,只有错配的 DC/PBMC 组合引起产生 INF-γ,这是需要功能性 MHC 和共刺激分子的表达的性质。

[0190] 成熟 DC 具有额外的功能。在该实验中,用于使转染后 DC 成熟和预冷冻的细胞因子混合物,含有 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 PGE_2。为了说明成熟 DC 优于未成熟 DC,测定两种群体的细胞 (来自相同供体) 刺激自体 T 细胞产生 TH1 细胞因子的能力。用编码流感基质蛋白的 RNA 转染这两种 DC 群体,并用于刺激来自自体 PBMC 的流感特异记忆性 CTL。以下图 3 显示 ELISPOT 分析的结果 (# 斑点 / 孔与输入 PBMC 有关)。观测在未成熟和成熟 DC 之间的引起从流感特异记忆性 T 细胞产生 INF-γ 的非统计学差异。然而,仅仅成熟 DC 会引起从这些细胞产生 IL-2。IL-2 诱导被认为是非常重要的,因为 :(1) 诱导的 IL-2 分泌物可维持自分泌抗原特异性 CTL 的增殖,和 ;(2) 最近显示,少量生产的 INF-γ 和 IL-2 与在 HIV 患者中和最新研究中增长的死亡风险有关,缺乏 INF-γ 或 IL-2 的分泌物会导致削弱了 T 细胞功能,并无法维持中枢记忆性反应 (central memory response)。为简单起见,不图解表示负调节。从 PBMC(即,无 DC) 单独观测的斑点的平均数是 9.7(INF-γ) 和 1.3(IL-2)。使用由 3 个独立供体的 PBMC 所制备的疫苗,重复该实验,结果在性质上是相同的。因此,与未成熟 DC 相比成熟 DC 具有额外的和更优越的功能。

[0191] RNA 转染的解冻后的 DC 是稳定的。当临床方案规定为刚一解冻就立即注射树状细胞疫苗时,意外事故可引发推迟施用。为了说明 DC 会保持活力和功能的,如果解冻但不进行立即注射,则实施下列实验。将相当于 2 种不同健康供体的 2 种树状细胞制品中每种的两管,进行解冻。将每个供体的一个小管迅速在同种异基因混合淋巴细胞反应 (Allo-MLR) 分析中进行测试,同时在通过相同方法进行分析之前,使每个制品的第二个小管置于室温 40 分钟。用于该实验的 PBMC,包括来自每个供体的自体细胞和来自与以上两者无关的供体的 PBMC 的第三种样品。用于该分析的读出器是 ELISPOT(INF-γ)。该实验结果如图 4 所示,并表明 :在一解冻就进行分析的 DC 与在室温下保持 40 分钟的 DC 之间,功能上没有明显的差异。除了这项功能分析之外,通过台盼染色排除法 (trypan dye exclusion),测定解冻后和解冻后 40 分钟的细胞存活力,并获得相同结果 (数据未显示)。

[0192] 冷冻 - 解冻不影响 DC 功能。为了评价 DC 功能是否受到冷冻 - 解冻过程的反向影响,比较预先冷冻和解冻后的 DC 功能。根据 DC 刺激自体 PBMC 的记忆性流感特殊响应的能力,以评价功能,其中所述流感特殊响应与降低用于转染的流感 mRNA 浓度有关。分析的读出器是 ELISPOT(INF-γ)。在这次分析中,结果如以下图 5 所示,表明冷冻 - 解冻过程对 DC 功能没有影响。混合 GFP mRNA 的恒定量 (0.5μg),以监测转染率。冷冻 24 小时后,将解冻后的样品进行解冻。

[0193] 使用 mRNA 电穿孔 DC 后的蛋白表达。作为第一步骤,我们评价使用 mRNA 转染 DC,是否导致编码蛋白的 mRNA 的适量表达。为了制备 DC,通过从健康志愿者中分离白细胞而获得的 PBMC(新鲜或冷冻的),富集体外温育 2 小时后附着在塑料烧瓶上的单核细胞。洗涤之后,将附着细胞在补充了重组粒细胞 / 巨噬细胞 - 集落刺激因子 (rGM-CS) 和白细胞介素 -4(rIL-4) 的 X-VIVO 15 培养基中,培养六天以生成未成熟 DC(iDC)。然后,使用编码病

毒或对照蛋白的RNA进行电穿孔iDC(300、150μF、100Ω)，并在补充了IL-1β、IL-4、IL-6、GM-CSF、TNF-α和前列腺素E_2(PGE_2)的X-VIVO 15培养基中诱导成熟24小时。为了测试转染后的蛋白表达，使用编码绿色荧光蛋白(GFP)的RNA进行电穿孔DC，并通过流式细胞术测量表达。如图6所示，转染后直至四天，从日龄单核细胞所制备成熟DC的大量组分，都表达高水平的GFP，这证实这种方法可有效地长期促进DC中的蛋白表达。

[0194] 其次，测定自体DC在来自CMV感染个体的PBMC中可诱导CD4和CD8T细胞反应的能力，其中所述自体DC通过编码CMV pp65蛋白的mRNA进行电穿孔而被转染。通过使用充分限定的、衍生于pp 65蛋白的免疫优势肽(immunodominant peptide)以刺激来自一些供血者的PBMC，并测量IL-2/IFN-γ分泌物以及测量CD8和CD8 T细胞中的细胞增殖，鉴定CMV感染的个体。检测是阳性CMV特异性T细胞反应的个体，并选出知情同意后赞同进行白细胞分离术的人员以进一步研究。

[0195] 如上所述，从这些个体制备DC。然后，将通过编码CMV pp65蛋白的RNA所转染的成熟DC，与自体PBMC按1/40比例温育16小时(ICS)或6天(增殖)。刺激后，通过流式细胞术，评价IL-2和IFN-γ分泌物(图7)和CMV特异性CD4和CD8T细胞的增殖(图8)。通过CMV pp65 RNA进行电穿孔的DC，可诱导IFN-γ和IL-2的高度表达，以及诱导来自CMV感染个体的CD8T细胞的增殖。然而，在CD4T细胞中所检测的低水平细胞因子分泌物和增殖所示(图7和图8，下组)，这种方法可诱导CD4 T细胞的最小限度的激活。

[0196] 实施例5：使用500U/ml或1000U/ml的IL-4，比较单核细胞分化成树状细胞

[0197] 洗涤来自在6-28℃下保持的日龄分离白细胞的PBMC，并以@～2×10^{8}/烧瓶在AIM-V培养基中种植2小时的附着步骤。2小时后，除去非附着细胞，洗涤附着细胞并重悬浮在补充了1000U/ml GM-CSF和500U/ml或1000U/ml IL-4的X-VIVO 15中，在37℃下温育6天。另外，对于在补充了1000U/ml GM-CSF和500U/ml IL-4的X-VFVO 15中的培养，与培养6天而不改变培养基相比，比较在第3天改变培养基的效果。具体地说，在第3天，除去培养基和悬浮细胞；用X-VIVO培养基轻柔洗涤烧瓶，以收集松软的附着细胞；以及将培养基和洗涤物以1300rpm离心8分钟，以沉淀细胞。将细胞重悬浮在补充了1000U/ml GM-CSF和500U/ml IL-4的新鲜X-VIVO 15培养基中；将培养基和细胞回加到还含有附着细胞的烧瓶中；以及将烧瓶在37℃下进一步温育三天。

[0198] 分别收集用于电穿孔的所有烧瓶。在第6天，用2μg GFP mRNA/106细胞(20μgGFP mRNA/5×10^{6}细胞)转染DC，重悬浮在补充了800U/mlGM-CSF和500U/ml IL-4的X-VIVO 15中并以1×10^{6}/ml进行接种；以及用细胞因子混合物(TNFα-10ng/ml；IL-1β-10ng/ml；IL-6-100ng/ml；PGE2-1μg/ml)进行成熟。在37℃、5% CO_2下过夜温育DC。在第6天(未成熟DC；图9)和转染后24小时(成熟DC；图10)，进行表型鉴定。表6A-C显示，各个培养条件转染后立即和转染后24小时的产率(% Rec)和存活力(% V)。

[0199] 表6A 1000U/ml IL-4

[0200]

	第 6 天的 DC 产量	% Rec	% V	DC/Tn	Tn 后 0 小时的 DC	% Rec	% V	Tn 后 24 小时的 DC	% Rec	% V
F1	3.76×10^7	21	97	5×10^6	2.08×10^6	42	81	1.03×10^6	21	84
F2	3.88×10^7	22	94	5×10^6	2.41×10^6	48	84	8.80×10^5	18	91
F3	4.44×10^7	25	96	5×10^6	2.06×10^6	41	83	8.10×10^5	16	84
总合				2×10^7	1.04×10^7	52	80	7.40×10^6	37	94
总合				2×10^7	1.11×10^7	56	93	7.50×10^6	38	93

[0201] 表 6B :500U/ml IL-4

[0202]

	第 6 天的 DC 产量	% Rec	% V	DC/Tn	Tn 后 0 小时的 DC	% Rec	% V	Tn 后 24 小时的 DC	% Rec	% V
F1	4.16×10^7	23	97	5×10^6	2.81×10^6	56	77	1.19×10^6	24	87
F2	4.23×10^7	24	97	5×10^6	2.43×10^6	49	84	1.32×10^6	26	85
F3	3.87×10^7	22	96	5×10^6	3.26×10^6	65	84	1.52×10^6	30	89

[0203] 表 6C :500U/ml IL-4,在第 3 天改变培养基

[0204]

	第 6 天的 DC 产量	% Rec	% V	DC/Tn	Tn 后 0 小时的 DC	% Rec	% V	Tn 后 24 小时的 DC	% Rec	% V
F1	2.81×10^7	16	94	5×10^6	1.79×10^6	36	62	9.6×10^5	19	82
F2	2.82×10^7	16	93	5×10^6	2.37×10^6	47	69	9.0×10^5	18	83
F3	2.06×10^7	11	85	5×10^6	2.15×10^6	43	71	1.07×10^6	21	84

[0205] 实施例 6 :通过淘析,富集单核细胞,并分化成未成熟和成熟 DC

[0206] 作为自动方法,在Elutra™细胞分离系统 (Gambro BCT,Lakewood,CO) 上实施淘析 (又称为计数流动离心),以从日龄白细胞分离术分离单核细胞,所得的单核细胞可在温度调节 (6-28℃) 容器中通过过夜传输从收集现场运输到生产设备。通过将 1000ml 的 5% 人白蛋白血清 (HSA,Baxter Healthcare,Westlake,CA) 加入 4L 的 Hank' 平衡盐溶液 (HBSS, Cambrex Bio Science,Walkersville,MD) 袋中,以制备淘析缓冲液。将该淘析缓冲液加入等于清血 (pheresis) 体积的日龄清血产物中。用淘析缓冲液灌注 Elutra™ 细胞分离系统 (GambroBCT, Lakewood, CO),并装载清血产物。实施淘析过程之后,从转出的组分收集单核细胞。冷冻保存单核细胞。

[0207] 解冻已冷冻陶析的单核细胞，然后在烧瓶中，以 1 百万细胞 /ml 在具有 800U/ml GM-CSF(Berlex Laboratories,Richmond,CA) 和 500U/ml IL-4(RD Systems,Minneapolis, MN) 的 X-VIVO 15 中，进行分化 5 天以产生未成熟树状细胞 (iDC)。收集 iDC，并通过电穿孔法，用扩增的 RCC 肿瘤 RNA 来负载抗原。用 800U/ml GM-CSF、500U/mlIL-4 以及成熟细胞因子 (TNF-α、IL-1β、IL-6 以及 PGE_2) 来培养细胞，并在培养 24 小时后进行收集。使用台盼蓝排除法，通过 ViCell(BeckmanCoulter Inc.,Fullerton,CA) 测定成熟树状细胞 (mDC) 的细胞计数和存活力。将所得的 mDC 进行表型鉴定。烧瓶中培养的细胞是 99％ CD83+ 和 0.2％ CD14+。在烧瓶中，所培养 mDC 的产量是 34％的 CD14+ 细胞。

[0208] 实施例 7 :比较通过新鲜细胞和通过日龄白细胞分离术所制备的 DC 的共刺激分子的表达

[0209] 在白细胞分离术分离的第 3 天，从 3 个健康人供体收集周围血液，并在收集后 30 分钟内转移到蒙特利尔大学 (University of Montreal)。除去 20ml 白细胞分离物，并通过离心制备自体血浆。将白细胞分离物体积分成两个相等部分。立即处理一部份，以生成“新鲜”单核细胞，而将第二部份以 20ml 等分量保存在 5 个 50ml 锥形管中，以产生来自“日龄清血法”的细胞。将试管置于倾斜于震动台 (rocking platform) 的盒中的塑料容器中，于 16-20℃下保存 24 小时。温育期后，使用 Ficoll 密度梯度，分离 PBMC。

[0210] 使用 Ficoll 密度梯度，从新鲜和日龄清血产物，分离包含树状细胞前体 (单核细胞) 的单核细胞组分。在 50 锥形管中，在 Ficoll 上分层白细胞分离物，并在室温下将管离心 (800×g)20 分钟。在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 四次洗涤细胞，并进行计数以测定细胞浓度和细胞存活力。为了获得高纯度单核细胞群体，使用 CD14 微珠 (Miltenyi) 进一步纯化单核细胞组分。将 1×109 细胞重悬浮在 8ml 含有 PBS、0.5％ BSA 以及 2mM EDTA(Miltenyi 缓冲液) 的缓冲液中。将 2ml 的 CD14 微珠加入含有 1×109 细胞的各个 50ml 管，并在 4℃下温育 15 分钟。在 100ml 相同缓冲液中洗涤细胞，以 300×g 离心并重悬浮在 20ml Miltenyi 缓冲液中。将细胞悬浮液施加到位于磁场下的四个 LS 柱 (MiltenyiQuadromax™)。F 利用重力流而施加细胞后，用 3ml Miltenyi 缓冲液将柱洗涤三次。在没有磁场下，用 5ml Miltenyi 缓冲液将单核细胞洗脱两次，并以 300×g 离心 10 分钟。使用特异于 CD3、CD19、CD16、CD56、CD14 以及 CD209 的抗体，通过流式细胞术测定洗脱物和流过组分的纯度。洗脱物组分包含 88-98％单核细胞和小于 2％的小细胞。非附着组分仅仅包含小百分率 (2％) 的单核细胞。在这时候，从一部分纯化的单核细胞 (50 百万) 提取总 RNA。

[0211] 为了制备成熟的分化 DC，在 37℃下，将 50 百万单核细胞在含有 IL-4 和 GM-CSF 的 X-VIVO 培养基的 T150cm^2 烧瓶中接种 5 天。在第 5 天，将含有肿瘤坏死因子、干扰素 γ 和前列腺素 E2 的细胞因子混合物 (TIP) 加入细胞中。收集培养第 6 天的细胞，并将此时的细胞命名为“TIP-DC”。通过轻敲烧瓶以移动细胞，收集富含树状细胞的群体，用另外的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行洗涤，并通过在 PBS 中于 2-8℃下温育约 10 分钟，来分离剩余的附着细胞。沉淀所有细胞悬浮液，并重悬浮在 PBS 中，分析细胞浓度、细胞存活力和免疫分型。通过流式细胞术，检查下列细胞标记组 :单核细胞系标记 (CD3、CD14、CD19、CD16 以及 CD56)、树状细胞存在的指示物 (CD11c、CD1a 和 CD209)、抗原呈递细胞标记 (HLA-II)、迁移标记 (CD38 和 CCR7) 以及成熟树状细胞标记 (CD83 和 CD86)。

[0212] 将 20 百万 TIP-DC 重悬浮在 600μl 的 ViaSpan™ 中，并用 CD40LRNA 以 4μgRNA/

百万树状细胞的比例进行电穿孔。在4mm缺口试管中，以300V、300μs的脉冲实施电穿孔。电穿孔后，将细胞转移到含有补充了IL-4和GM-CSF的X-VIVO培养基（无血清培养基）的T75烧瓶中。在37℃、5% CO_2、≥75%湿度下，将转染的细胞温育4小时，使得细胞从电穿孔复苏。此后，使细胞进一步成熟，并将其命名为“PME-CD40L DC”。从所生成的PME-CD40L DC的部分中，分离RNA。

[0213] 使用调速冷冻法(controlled-rate freezing)，将PME-CD40L DC冷冻在具有10% DMSO和90%自体血浆的冷冻管中，并保存在-85℃下。将如上所述制备的冷冻树状细胞疫苗，在37℃下进行解冻，并在20-25℃下保持30分钟。解冻后，立即以10分钟间隔测定存活力，直至30分钟。使用特异于下列标记的抗体，通过流式细胞术检查解冻后的PME-CD40L DC：单核细胞系标记(CD14)、树状细胞标记(CD11c、CD1a和CD209)、抗原呈递细胞标记(HLA-II)、迁移标记(CD38和CCR7)以及成熟树状细胞标记(CD80、CD83和CD86)。

[0214] 结果

[0215] 单核细胞的产生

[0216] 来自三个供体的数据表明：使用CD14微珠的正选择，得到88-98%纯度的单核细胞群体（表7）。小细胞污染的最大量是2%（表7）。在所有三个供体中，非附着（流动）组分含有直至2%单核细胞（大量细胞）（数据未公开）。因此，在非附着组分中没有显著的单核细胞损失。作为高CD3表达和低CD19、16或56标记表达的证据，洗脱物中存在的小细胞群体污染，主要由T细胞组成。在新鲜和日龄白细胞分离物之间的洗脱物组分中，CD83、CD86、CD11C、HLA-I或HLA-II标记的表达中没有明显的差异。

[0217]

表7：单核细胞汇总

供体	单核细胞	组分	大细胞%	小细胞%	CD14+%
1	新鲜	洗脱物	97-98	<1-1.5	99
1	日龄	洗脱物	88-89	0.8-1.5	99
2	新鲜	洗脱物	98-99	0.9-1.4	99
2	日龄	洗脱物	94-98	1-2	98
3	新鲜	洗脱物	97-98	<1	99
3	日龄	洗脱物	89-90	<1	97

[0218] TIP-DCS

[0219] 单核细胞在最初是很纯的(90%)，并且在分化过程中纯度进一步得到提高，例如在来自所有三个供体的TIP-DC中，大细胞百分率是98-99%，因此，小细胞百分率低于2%（数据未公开）。通过流式细胞术分析TIP-DC表型，显示：在由新鲜白细胞分离物和日龄白细胞分离物所生成的TIP-DC之间，CD83表达存在差异。阳性细胞百分率涉及用于研究中的标记的细胞阳性数目。在来自所有3个供体的、从新鲜白细胞分离物所制备的TIP-DC中，表达表面成熟标记CD83的DC百分率，低于来自日龄白细胞分离物所制备的TIP-DC的表达率（表8）。在来自TIP-DC的任何其它标记中，没有其它差异，其中通过新鲜白细胞分离物和日龄白细胞分离物可产生TIP-DC。

[0220]

表 8: TIP-DC 汇总			
供体	白细胞分离物	%CD83+	%CD86+
1	新鲜	26	90
	日龄	59	81
2	新鲜	40	74
	日龄	51	85
3	新鲜	57	98
	日龄	87	98

[0221] PME-CD40L DCS

[0222] 转染后 4 小时

[0223] 对于转染后的 DC(PME-CD40L DC),分析转染后四小时内 CD154(CD40L) 的表达。与通过新鲜白细胞分离物所生成的 PME-CD40L DC 相比,在转染后 1、2 和 4 小时的供体中,来自日龄白细胞分离物的 PME-CD40L DC 表达更多的 CD40L(表 9)。在通过供体 1 和供体 2 中的新鲜分离物和日龄分离物所生成的 PME-CD40L DC 之间,平均荧光强度 (MFI) 也存在差异(表 9)。

[0224] 解冻后的 PME-CD40L DC

[0225] 解冻后,分析 PME-CD40L DC 对各种 DC 标记的表达。在解冻后的、由新鲜白细胞分离物和日龄白细胞分离物所生成的 PME-CD40LDC 表型中,存在差异。与通过日龄白细胞分离物所制备的 DC 相比,在通过新鲜白细胞分离物所制备的 PME-CD40L DC 中,CD40L 表达的平均荧光强度更低。

[0226] 还有趋势认为,两个供体中的转染率 (CD40L 表达的阳性百分率) 低于通过新鲜白细胞分离物所生成 DC 中的转染率 (表 9)。

[0227]

表 9：PME-CD40L DC 中的 CD154 表达汇总

供体	白细胞分离物	PME-CD40L DC	%CD154+	CD154MFI
1	新鲜	电穿孔后 4 小时	35	26
	日龄	电穿孔后 4 小时	63	51
2	新鲜	电穿孔后 4 小时	40	41
	日龄	电穿孔后 4 小时	50	60
3	新鲜	电穿孔后 4 小时	58	61
	日龄	电穿孔后 4 小时	52	35
1	新鲜	解冻后	21	31
	日龄	解冻后	38	50
2	新鲜	解冻后	16	39
	日龄	解冻后	30	44
3	新鲜	解冻后	60	56
	日龄	解冻后	56	64

[0228] 通过流式细胞术所测量的阳性细胞百分率，显示在三个实例的两个中，在通过白细胞分离物的日龄部分所生成的树状细胞中，更多的细胞被 CD83 抗体染色成阳性（表 10）。

[0229]

表 10：PME-CD40L DC 解冻后的表型

供体	白细胞分离物	%CD83+	%CD86+	%CD80+
1	新鲜	50	97	95
	日龄	86	99	99
2	新鲜	57	97	98
	日龄	71	99	94
3	新鲜	90	98	97
	日龄	89	99	97

[0230] 当 CD80、CD83 和 CD86 的阳性细胞百分率中的差异不一定高于通过日龄白细胞分离物（供体 3，表 10）所生成 DC 中的百分率时，在所有供体中，通过用特异抗体染色的日龄白细胞分离物所生成的细胞平均荧光强度是更高的。除了 CD80、CD86 和 CD83 之外，HLA-I 和 HLA-II 显示相同的结果（表 11）。在成熟 DC 中，上调了与高蛋白水平表达 / 细胞和 CD80、CD83、CD86、HLA-I 以及 HLA-II 分子的表达相关的平均荧光强度信号。因此，这些细胞的表型反映了从所有三个供体中的日龄部分所获得树状细胞的更多成熟状态。这些变化反映 DC 的成熟状态。将测量阳性细胞百分率所获得的数据联合平均荧光强度的数据，使得我们断定：从白细胞分离物的日龄部分所生成的细胞可展现更多的成熟表型。

[0231]

表 11：解冻后 PME-CD40L DC 的 MFI						
供体	白细胞分离物	CD83 MFI	CD86 MFI	CD80 MFI	HLA-I MFI	HLA-II MFI
1	新鲜	55	97	48	330	145
	日龄	73	282	71	904	338
2	新鲜	43	66	47	249	115
	日龄	55	123	55	383	214
3	新鲜	27	104	38	630	175
	日龄	53	219	57	974	182

[0232] 实施例 8：在新鲜与日龄单核细胞中的基因表达的微阵列分析，及从中制备的树状细胞

[0233] 根据制造商的说明书 (Genechip® Expression Analysis TechnicalManual, 2004)，将如实施例 8 所述新鲜的和日龄的单核细胞（在分离白细胞后，已将单核细胞在 16-20℃下温育 24 小时）的 RNA 样品，以及从新鲜的和日龄的单核细胞所制备的 DC 的 RNA，应用于 HumanGenome U133 Plus 2.0 阵列 (Affymetrix, Santa Clara，加利福尼亚）。简单地说，使用 Superscript™ II 逆转录酶，将 3 微克的总 RNA 标准品和 Genechip® Poly-A RNA Control Kit(Affymetrix,Santa Clara，加利福尼亚州）转录成第一条 cDNA 链。合成第二条 cDNA 链后，随即体外转录以用于线性扩增各个转录物和掺入生物素化 CTP 和 UTP。将 cRNA 产物破碎成约 100 核苷酸的片段，并将其在微阵列上杂交 16 小时。然后，将微阵列在低严谨条件 (6×SSPE) 和高严谨条件 (100mMMES,0.1MNaCl) 下进行洗涤，并用链霉亲和素 - 藻红蛋白进行染色。

[0234] 通过添加生物素化的抗链霉亲和素和额外等分量的链霉亲和素 - 藻红蛋白染料，以放大荧光。在 570nm 激发后，将 Genechip® Scanner3000(Affymetrix,Santa Clara，加利福尼亚州）用于收集 3μm 分辨率的荧光信号。对于各个微阵列特征，计算两个连续扫描的平均信号。用 GenechipR Operating Software v1.1(Affymetrix,Santa Clara，加利福尼亚），分析扫描图像。将 Poly-A RNA Control Kit(Affymetrix, SantaClara，加利福尼亚）中包含的 4 种对照 RNA 的高线性相关，确认是保证标记过程的成功。

[0235] 将所有性质的数据输入计算机程序 Genespring 中，并根据样品类型（即单核细胞样品对单核细胞，树状细胞样品对树状细胞）进行标准化处理。根据用于 Affymetrix 阵列的 GeneSpring 所建议的标准方法，以正常步骤实施三个步骤。

[0236] 4) 数据转换（将所有小于 0.01 的值设定为 0.01）；

[0237] 5) 将第 50 百分位数正态化。

[0238] 6) 将中值正态化。

[0239] 首先过滤具有空斑点的标志的数据。然后，不使用随机预测模型，通过置信水平范围在 p.05 或 p.1 的单向方差分析 (one way anova)，进行分析数据。然后，分析过滤基因

(filtered gene)表的任一倍数变化、表达水平或置信度。使用正常水平的样品或单个样品，实施如上操作。在变量分析之前或之后，比较新鲜的和日龄的单核细胞或树状细胞中的表达水平。相互比较基因表，并在一些基因表中根据它们的可信度选择重叠的基因。表12中列出了具有从日龄单核细胞所制备的树状细胞中与从新鲜单核细胞所制备的树状细胞中的变化的RNA稳定状态水平的基因。表12B中列出了这些基因的说明。表13A中列出了具有日龄单核细胞中与新鲜单核细胞中的变化的RNA稳定状态水平的基因。表13B中列出了这些基因的说明。这些结果说明：新鲜单核细胞表型上不同于日龄单核细胞，而且从新鲜单核细胞所制备的树状细胞表型上不同于从日龄单核细胞所制备的树状细胞。

[0240] 表12A：与从新鲜单核细胞所制备的树状细胞相比，具有从日龄单核细胞所制备的树状细胞中的变化的RNA稳定状态水平的基因。

[0241]

基因符号	Aaffymetrix 标识符	NCBI	单一基因 (unigene)	倍数	P 值	日龄变化
ALOX15	207328_at	NM_001140	Hs.73809	5.8	0.0699	减少
	1558517_s_at	AK094804	Hs.24181	5.5	0.0957	减少
KRT17; PC; K17; PC2; PCHC1	212236_at	NM_000422	Hs.2785	5	0.0759	减少
KCNJ2	231513_at, 206765_at	NM_000891	Hs.1547	4.5	0.0507	减少
YWHAZ	214848_at	NM_003406, NM_00145690	Hs.492407	4.3	0.0581	减少
IL1B	205067_at, 39402_at	NM_000576	Hs.126256	3.7	0.0752	减少
PTX3	206157_at	NM_002852	Hs.127657	3.5	0.0408	减少
FYN	216033_s_at, 210105_at	NM_002037, NM_153047, NM_153048	Hs.390567	3.5	0.0724	减少
GALNT3	203397_at	NM_004482	Hs.170986	3.3	0.0295	减少
FLJ20073	219691_at	NM_017654	Hs.65641	3	0.0262	减少

[0242]

CDK6	243808_at	NM_001259	Hs.119882	3	0.00634	减少
CD69	209795_at	NM_001781	Hs.208854	2.6	0.0145	减少
TLR1	210176_at	NM_003263	Hs.111805	2.193	0.456	减少
TLR2	204924_at	NM_003264	Hs.519033	2	0.089	减少
ENO3	204483_at	NM_001976 NM_053013	Hs.224171	6	0.0588	增加
CD52	34210_at	NM_001803	Hs.276770	5	0.0925	增加
TRPS1	234351_at	NM_014112	Hs.253594	4	0.067	增加
FLJ21069 (RSNL2)	226425_at	NM_024692	Hs.122927	3.7	0.0806	增加
TNS	218864_at	NM_022648	Hs.471381	3.5	0.019	增加
CPEB1	219578_s_at	NM_030594	Hs.459132	3.2	0.0779	增加
RAB9P40	203150_at	NM_005833	Hs.19012	3	0.0357	增加
PIR	207469_at	NM 001018109 NM_003662	Hs.495728	3	0.0559	增加
CALM2	235190_at	NM_001743	Hs.468442	3	0.0913	增加
ABCG2	209735_at	NM_004827	Hs.480218	3	0.0985	增加
A2M	217757_at	NM_000014	Hs.212838	3	0.0384	增加
	232750_at		Hs.550958	3	0.0207	增加
APEX2	204408_at	NM_014481	Hs.555936	4.3038	0.027	增加
THBD	203888_at	NM_000361	Hs.2030	6.5432	0.122	减少
DNASE1L3	205554_s_at	NM_004944	Hs.476453	3.9148	0.108	减少
PKIB	223551_at	NM_032471	Hs.486354	3.6986	0.130	减少
PTGER3	210375_at	NM_000957	Hs.445000	28.2	0.0979	减少
CAMTA1	213268_at	NM_015215	Hs.397705	6.4	0.0897	减少
PLS3	201215_at	NM_005032	Hs.496622	6.4	0.0436	减少
TREM1	219434_at	NM_018643	Hs.283022	5.2	0.031	减少
TMEPAI	217875_at	NM_020182	Hs.517155	5.5	0.0784	减少
CHI3L1	209396_at	NM_001276	Hs.382202	6.5	0.0367	增加

[0243] 表 12B :表 12A 中列出的基因说明

[0244]

基因符号	说明	
ALOX15	花生四烯酸 15-脂氧合酶	电子转运，脂质代谢，炎症反应，白细胞三烯生物合成，白细胞三烯代谢
	CDNA FLJ37485 fis 克隆 BRAWH2014379	
KRT17; PC; K17; PC2; PCHC1	角蛋白 17	表皮发育
KCNJ2	钾内部整流通道，亚族 J，成员 2	离子转运
YWHAZ	酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸单加氧酶活化蛋白，ζ多肽	蛋白结构域特异结合
IL1B	淋巴因子 1-β	免疫反应，炎症反应
PTX3	被 IL-1β 快速诱导的穿透素(pentraxin)相关基因	炎症反应
FYN	SRC、FGR、YES 相关的 FYN 致癌基因	蛋白氨基酸磷酸化，蛋白氨基酸磷酸化胞内信号级联蛋白激酶级联蛋白氨基酸磷酸化钙离子转运
GALNT3	UDP-N-乙酰-α-D-半乳糖-多肽 N-乙酰半乳糖转移酶 3(GalNAc-T3)	碳水化合物代谢
FLJ20073	含 9 的不育性 α 基序结构域	结合
CDK6	细胞周期蛋白依赖型激酶 6	通过细胞有丝分裂周期的蛋白氨基酸磷酸化细胞增殖的 G1 期的进展调控
CD69	CD69 抗原(p60，早期 T 细胞的活化抗原)	防御反应，信号转导相关的细胞表面受体
TLR1	Toll 样受体 1	炎症反应，免疫反应

[0245]

TLR2	Toll 样受体 2	诱导细胞凋亡反应、炎症反应、信号转导、免疫反应
ENO3	烯醇酶 3（β，肌）	糖酵解
CD52	CD52 抗原（CAMPATH-1 抗原）	整合质膜
TRPS1	毛发、鼻、指(趾)综合征 1(trichorhinophalangeal syndrome 1)	转录的骨骼发育转录调控，来自 RNA 聚合酶 II 启动子 NLS 的 DNA 依赖型转录，负责将底物运输入细胞核
FLJ21069，(RSNL2)	休眠蛋白(restin)2 系	
TNS	张力蛋白 1(Tensin 1)	胞内信号级联
CPEB1	细胞质聚腺苷酸化元件结合蛋白 1	mRNA 加工
RAB9P40	具有 kelch 基序的 Rab9 效应蛋白	介导内吞作用的受体，胞吐作用中的囊泡锚定
PIR	Pirin（铁结合核蛋白）	转录辅因子活性，铁离子结合，金属离子结合
CALM2	钙调蛋白 2（Δ磷酸化酶激酶）	信号途径中的 G 蛋白偶联受体蛋白
ABCG2	ATP 结合盒，亚族 G(WHITE)，成员 2	对药物运输的运输应答
A2M	α-2 巨球蛋白	胞内蛋白运输蛋白，同型寡聚化
	CDNA FLJ13750 fis，克隆 PLACE 300331	
APEX2	APEX 核酸酶（aspurinic/aspyrimidinic 核酸内切酶）2	对 DNA 损伤刺激的 DNA 修复应答
THBD	凝血调节蛋白	跨膜受体活性，钙离子结合，糖结合，受体活性，钙离子结合受体活性
DNASE1L3	DNASE1L3	DNA 降解代谢，细胞凋亡，DNA 代谢

[0246]

PKIB	蛋白激酶（cAMP 依赖型的催化反应）抑制子 β	蛋白激酶活性的负调节
PTGER3	前列腺素 E 受体 3（亚型 EP3）	转录，DNA 依赖型，信号转导，细胞死亡，G 蛋白偶合受体蛋白信号途径
CAMTA1	钙调蛋白结合转录激活蛋白 1	WNF 受体信号途径
PLS3	丝素蛋白（T 同型）	肌动蛋白结合钙离子结合肌动蛋白结合
TREM1	在骨髓细胞 1 上表达的触发受体	体液免疫反应胞内信号级联
TMEPAI	RNA 诱导的跨膜前列腺和雄激素	整合膜
CHI3L1	几丁质酶-3-样 1（软骨糖蛋白-39）	碳水化合物代谢几丁质分解

[0247] 表 13A：与新鲜单核细胞相比，具有日龄单核细胞中的变化的 RNA 稳定状态水平的基因

[0248]

基因符号	Aaffymetrix 标识符	NCBI	单一基因 (unigene)	倍数	P 值	日龄变化
ADM	202912_at	NM_001124	Hs.440147	6.67	0.020	增加
Est	230127_at	AW044663	Hs.232417	5.29	0.017	增加
PPARD	242218_at	NM_006238	Hs.485196	5.29	0.040	增加
CIASI	216016_at	NM_004895, NM_183395	Hs.159483	4.60	0.030	增加
SLC6A6	211030_s_at	NM_003043	Hs.529488	3.30	0.020	增加
Est	243423_at	AF150368	Hs.205098	3.40	0.015	增加
WTAP	1560274_at	NM_004906, NM_152857, NM_152858	Hs.446091	3.30	0.008	增加
	1556072_at	AK097861	Hs.517397	3.90	0.010	增加
APAF1	204859_s_at	NM_013229	Hs.552567	3.00	0.020	减少
CCR2	206978_at	NM_000647, NM_000648	Hs.511794	4.05	0.004	减少

[0249]

SLC35A5	218519_at	NM_017945	Hs.237480	4.12	0.030	减少
RPE	225039_at	NM_006916 NM_199229	Hs.282260	4.12	0.040	减少
TRPS1	222651_s_at	NM_014112	Hs.253594	4.17	0.020	减少
OXR1	222553_x_at	NM_181354	Hs.148778	4.22	0.006	减少
TRIM14	203148_s_at	NM_014788 NM_033219 NM_033220 NM_033221	Hs.555909	4.22	0.040	减少
MRF2	212614_at	NM_032199	Hs.535297	4.22	0.040	减少
TNFSF10	214329_at	NM_003810	Hs.478275	4.37	0.040	减少
DKFZp434L142	219872_at	NM_001031700NM_016613	Hs.535739	4.42	0.030	减少
LOC115294(PCMTD1)	232382_s_at	NM_052937	Hs.308480	4.15	0.030	减少
LOC201895	227052_at	NM_174921	Hs.205952	4.88	0.040	减少
PAG1	227354_at	NM_018440	Hs.266175	5.03	0.046	减少
DMXL1	203791_at	NM_005509	Hs.181042	5.46	0.002	减少
CX3CR1	205898_at	NM_001337	Hs.78913	10.88	0.030	减少

[0250] 表 13B :表 13A 中所列基因的说明

[0251]

基因符号		说明
ADM	肾上腺髓质素	CAMP 生物合成，孕酮生物合成，信号转导，细胞-细胞信号，妊娠，分泌
Est	转录位点	
PPARD	Δ过氧化物酶增殖激活受体	转录调节子
CIASI	寒冷型自身炎症综合征(Cold autoinflammatory syndrome)	细胞凋亡，诱导细胞凋亡、炎症反应，信号转导
SLC6A6	溶质载体家族 6 成员 6	氨基酸代谢，整合质膜
Est	转录位点	

[0252]

WTAP	Wilms 肿瘤 1 相关蛋白	
	推定蛋白	
APAF1	细胞凋亡肽酶激活因子	调控细胞凋亡
CCR2	趋化因子(C-C 基序)受体 2	趋化性，炎症反应，细胞防御反应，信号转导
SLC35A5	溶质载体家族 35，成员 A5	碳水化合物运输，核苷酸-糖运输
RPE	核酮糖-5-磷酸-3-差向异构酶	碳水化合物代谢
TRPS1	毛发、鼻、指(趾)综合征 1 (trichorhinophalangeal syndrome 1)	转录因子活性
OXR1	氧化抗性 1	对氧化压力的应答
TRIM14	含三联基序的 14	区划说明(compartment specification)
MRF2	富 AT 的相互作用结构域 5B（MRF1 样）	转录，负调控依赖 DNA 的转录，调控依赖 DNA 的转录
TNFSF10	肿瘤坏死因子（配体）超家族，成员 10	细胞凋亡，诱导细胞凋亡、炎症反应，信号，细胞-细胞信号
DKFZp434L142	推定的蛋白 DKFZp434L142	
LOC115294 (PCMTD1)	蛋白-L-同共天冬氨酸(D-天冬氨酸)O-甲基转移酶结构域，含 1	蛋白修饰
LOC201895	推定的蛋白 LOC201895	蛋白结合
PAG1	与鞘糖脂微结构域 1 相关的磷蛋白	细胞活化的负调控，胞内信号级联，T 细胞活化的调控
DMXL1	蛋白结合	
CX3CR1	趋化因子(C-X3-C 基序)受体 1	趋化性，细胞防御反应，细胞附着，信号转导

[0253] 将表达两个持家基因的树状细胞基因进行进一步标准化处理，其中所述持家基因

在通过新鲜的和日龄的单核细胞所制备的 DC 之间是保持恒定的。将各个基因的平均表达量（标准）除以 GAPDH（甘油醛 -3 磷酸脱氢酶）或 β - 肌动蛋白的平均表达量（标准），以得到持家基因有关的表达比值。六种基因的结果如表 1 4 所示。“DCdo”指从日龄单核细胞所制备的 DC。“DCf”指从新鲜单核细胞所制备的 DC。

[0254] 表 14 :在通过日龄或新鲜的单核细胞所制备的 DC 中，某些 RNA 对 GAPDH 或 β - 肌动蛋白的 RNA 稳定状态表达比值。

[0255]

基因	基因:GAPDH DC_{do}	基因:GAPDH DC_f	基因: 肌动蛋白 DC_{do}	基因: 肌动蛋白 DC_f
ALOX15	0.45	1.5	0.45	1.52
IL1β	0.58	1.38	0.57	1.37
TLR1	0.68	1.49	0.68	1.48
TLR2	0.67	1.34	0.66	1.33
CD69	0.66	1.61	0.65	1.60
CD52	1.86	0.74	1.85	0.74

[0256] 迄今为止，使用表 15 所示的引物并通过实时定量 PCR(QPCR)，实施额外地检验两个候选基因的单核细胞中的差异表达。根据制造商的说明书 (Invitrogen，Carlsbad，加利福尼亚），使用寡聚 (dT) 引物和用于 RT-PCR 的 Superscript™ III First-strand Synthesis System，从各种总 RNA（与用于 GeneChip 分析的相同）生成第一 cDNA 链。根据制造商的说明书 (ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System UserGuide)，使用 ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System(AppliedBiosystems，Foster City，加利福尼亚）以实施 QPCR。将 TaqMan® GeneExpression Assays 或 Custom TaqMan® Gene Expression(AppliedBiosystems，Foster，加利福尼亚）作为 TaqMan® 探针。使用 ABsolute™QPCR ROX Mix(ABgene，Surrey，英国），实施三次 PCR 反应。使用如 ABI Prism® 7700 Sequence Detection System User Bulletin#2(AppliedBiosystems，Foster City，加利福尼亚）中所述相对标准曲线方法，进行相对 cDNA 浓度的定量。将 Genechip 分析中具有各种基因最大表达量的一种 cDNA，用于生成相对标准曲线。显示所有数据与内部 GAPDH 的表达有关。证明 :在新鲜和日龄的单核细胞中的 APAF-I 和 CDCA2 效应蛋白，相对于 GAPDH 分别减少了至少 2.5 倍和 3 倍。

[0257] 表 15 :引物

[0258]

基因	TaqMan® Gene Expression Assays ID
GAPDH	Hs99999905_ml
CDC42 效应蛋白 2	Hs00198943_ml
APAF1	Hs00185508_ml

[0259] 实施例 10：比较通过从供体分离后在室温下温育 23、48 或 71 小时的 PBMC 所制备的树状细胞

[0260] 方法：

[0261] 过夜运输后，接受来自两个供体的“健康供体”白细胞分离产物。在如下所示的分离收集后的给定时间中，对用于生成 DC 的约三分之一的各种产物进行加工。在进行如下所述 Ficoll-淋巴细胞分离液 (Histopaque) 密度梯度离心和附着步骤之前，将白细胞分离产物 (即 PBMC) 在室温下温育 23、48 或 71 小时。室温温育期之后，测定 PBMC 的存活力和 B 细胞、T 细胞、单核细胞以及 NK 细胞的百分比。结果如表 16 所示。

[0262] 表 16：鉴定第 0 天培养的细胞产物

[0263]

	供体 1			供体 2		
	23 小时	48 小时	71 小时	23 小时	48 小时	71 小时
PBMC 存活力(%)	97	99	97	98	99	97
%B 细胞	4	3.8	4.4	5.15	4.55	5.45
%T 细胞	38.9	35.5	27.4	49.3	42.7	46.4
%单核细胞	41.9	37.7	41.2	29.5	24.4	28.7
%NK 细胞	6.4	11.3	10.9	4.7	2.54	5.7

[0264] DC 产物的生成

[0265] 通过 Ficoll-淋巴细胞分离液密度离心制备 PBMC，并在 PBS 中于室温洗涤四次。将 2×10^8PBMC 重悬浮在 30ml 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中，并在 37℃下使其附着于 $150cm^3$ 的塑料烧瓶。除去非附着细胞，将剩余细胞在补充了 1000U/ml 的 GM-CSF(Leukine) 和 1000U/ml 的 IL-4(R&D 系统) 的 X-VIVO15 培养基中，于 37℃、5% CO_2 下培养 5 天。最初，通过添加 TNF-α (10ng/ml)、IFN-γ (1000U/ml) 和 PGE_2(1μg/ml)，使未成熟 DC 成熟。过夜培养后通过除去培养基并用冰 PBS 洗涤，以收集 TIP-DC 中间产物。鉴定 TIP-DC 表型，证实了细胞成熟种群的生成。为了生成抗原负载、使 DC 完全成熟，电穿孔 TIP-DC：将细胞以 4×10^7/ml 浓度重悬浮在 0.5ml 的冰 Viaspan 中，并置于冰上。使用 1μg/10^6 细胞的扩大总肿瘤肾细胞癌 mRNA(作为编码抗原的有效负载)，加上 4μg/10^6 的 CD40L mRNA，以混合 DC，并置于 4mm 缺口的电穿孔管中，随后使用 Biorad GenePulsar Xcell 系统进行电穿孔。电穿孔后，立即将 DC 在 X-VIVO 15 培养基中洗涤，最后以 1×10^6/ml 浓度重悬浮在补充了 GM-CSF(800U/ml) 和 IL-4(500U/ml) 的 20ml X-VrVO15 中，并在低附着性 T75 烧瓶中于 37℃培养 4 小时。使用如制造商所述碘化丙啶和 CalTag 计数微珠，测定细胞数和存活力。

将Ficoll梯度离心后的PBMC样品、第6天的TIP-DC、电穿孔和培养(PME-CD40L DC)4小时后回收的DC,以及解冻后的最终产物,都进行细胞计数和存活力分析。结果如表17所示。

[0266] 表17:PME-CD40L DC的生成中,DC的回收率和产量.

[0267]

	接种PBMC/烧瓶的数量	第6天回收的PBMC输入量的百分比/存活力	电穿孔4小时后的回收率/存活力	冷冻/解冻回收率%/终产物的存活力
供体1				
23小时	2×10^8	27%/96%有活力	60%/93%有活力	78%/86%有活力
48小时	2×10^8	17%/98%有活力	58%/95%有活力	85%/94%有活力
72小时	2×10^8	9%/97%有活力	50%/96%有活力	71%/93%有活力
供体2				
19小时	2×10^8	6.6%/95%有活力	68%/95%有活力	68.9%/91%有活力
41小时	2×10^8	12%/96%有活力	62%/93%有活力	78.5%/89%有活力
66小时	2×10^8	3.1%/97%有活力	41%/91%有活力	86.3%/90%有活力

[0268] PBMC和DC产物的表型

[0269] 所有抗体都来自BD Biosciences,并根据制造商建议的稀释度进行使用。PBMC:使用CD19-PE、CD14-PE和CD3-PE中的各种,染色3×10^5细胞,或者通过在抗体中于4℃温育30分钟,来匹配同型偶联的对照。温育后,在冰1% FBS/PBS中3次洗涤染色细胞,并重悬浮PBS中,然后使用CellQuest软件(BD Biosciences),通过FACScalibur流式细胞仪(BD Biosciences)进行荧光分析。在探测前3分钟,将碘化丙啶(1μg/ml)加入各个样品,以作为用于指示存活力目的的着色剂。DC:将1×10^6细胞(TIP-DC和PME-CD40L DC)重悬浮在冰PBS/1% FBS中。使用1×10^5/孔的DC,混合偶联了MHC分子(HLA-ABC、HLA-DR)的特异抗体的PE或FITC、或者混合共刺激分子(CD80、CD86)、或混合成熟标记(CD83)以及单核细胞标记/DC系标记(CD14、CD209),并在4℃下温育至少15分钟。将同型匹配抗体作为对照。彻底洗涤后,将细胞进行如上所述流式细胞术。如下所示测定胞内CD40L:将2×10^5的PME-CD40L DC重悬浮在250μl的Cytofix/Cytoperm溶液(BD Biosciences)中,并置于4℃最短10分钟、最长2小时。用2ml染色缓冲液(PBS、BSA、NaN3以及EDTA)两次洗涤细胞,重悬浮在0.5ml染色缓冲液中并于4℃过夜保存。将细胞在2.0ml Perm/洗液(BD Biosciences)中重悬浮15分钟,离心并重悬浮在100μl的Perm/洗液中。将20μl鼠抗人CD40L APC或鼠IgG1 APC加入各个DC制品,并在黑暗中于4℃温育30分钟。用1ml的Perm/洗液两次洗涤细胞,并在进行流式细胞术分析之前重悬浮在染色缓冲液中。结果如表18所示。

[0270] 表18:中间TIP-DC和最终PME-CD40L DC产物的表型

[0271]

第 6 天 TIP-DC(%)	供体 1			供体 2		
	23 小时	48 小时	71 小时	23 小时	48 小时	71 小时
CD14	4.1	1.23	.62	.16	1.38	.89
CD80	96.92	97.9	98.3	99.4	99.5	87.8
CD83	84.19	88	93	92.2	88.5	62.1
CD86	99.31	99.6	98.4	99.8	99.9	99.4
HLA-I	95.65	94.6	96.1	95.6	97.4	82.6
HILA-II	99.55	99.7	98.5	99.8	99.8	96.9
最终 PME-CD40L 产物(%)						
CD14	1.19	1.36	1.3	.43	.66	1.08
CD209	97.98	97.60	98.23	89.9	98.2	96.3

[0272] 应当理解的是，本文中描述的具体实施方案是用于举例说明而非限制本发明。各种实施方案可使用本发明的主要特征而不脱离本发明的范围。本领域技术人员可认可或能确定使用许多不超过常规实验的、本文所述具体方法的等效方法。所述等效方法被认为是落入本发明范围内，并被权利要求所覆盖。

[0273] 说明书中提到的所有出版物和专利申请，可指导本发明所属领域的技术人员的技能水平。以达到与引入被具体和分别说明的各种单个出版物或专利申请作为参考的相同程度，将所有出版物和专利申请以及特别是其相关部分引入本文以作为参考。

[0274] 根据本说明书而不需要过多的实验，可获得和实施本文中所公开的和要求保护的所有组合物和 / 或方法。当根据优选实施方案来描述本发明的组合物和方法时，对本领域技术人员显而易见的是：可改变本文所述组合物和 / 或方法以及方法中的步骤或步骤顺序，而不脱离本发明的原理、精神和范围。更具体地说，当能达到相同或相似的结果时，化学和生理上都相关的一些试剂显然可取代本文中所述试剂。对本领域技术人员显而易见的是，如附属权利要求所限定的，所有这些相似的替代方式和修饰，被认为落在本发明的精神、范围和原理中。

[0275] 表 16 中来自两个独立实验的数据表明，来自患者的分离白细胞产物，静置直至 72 小时后可产生高活力的群体，并且在回收的白细胞亚组没有显著的偏差。尽管使用分离产物的 DC 总回收率在延长的周期中的确下降（表 17），使用 PBMC 在每个时点接种烧瓶、并培养以生成成熟 DC(TIP-DC)，可获得高频率的活细胞。然而，通过用所有扩增的肿瘤 RNA 和 CD40L RNA，可生成用于进一步加工的充足 DC。最重要的，表 17 和表 18 表明：从各种起始产物所生成的 TIP-DC 进行了相同的电穿孔，并且和具有完全成熟为最终产物 PME-CD40LDC 的相同回收率。从该研究所生成的 PME-CD40L DC，可制成“疫苗”，并可进行冷冻和解冻而不出现 DC 制品的任何变质。总之，收集后直至 72 小时，分离白细胞产物是用于统一生产门诊中所用 DC 疫苗的活性原料。

序列表

<110>ARGOS THERAPEUTICS, INC.
KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA
Caley, Rebecca
Monesmith, Tamara
Tcherepanova, Irina
Dinterman, Lois

<120> 树状细胞组合物和方法

<130>ARG035WO

<140> 还未指定
<141>2006-04-07

<150>60/669,468
<151>2005-04-08

<160>121

<170>PatentIn version 3.3

<210>1
<211>2707
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(15)..(2003)
<223>ALOX-15 编码序列

<400>1
catctttgag caagatgggt ctctaccgca tccgcgtgtc cactggggcc tcgctctatg 60
ccggttccaa caaccaggtg cagctgtggc tggtcggcca gcacggggag gcggcgctcg 120
ggaagcgact gtggcccgca cggggcaagg agacagaact caaggtggaa gtaccggagt 180
atctggggcc gctgctgttt gtgaaactgc gcaaacggca cctccttaag gacgacgcct 240
ggttctgcaa ctggatctct gtgcagggcc ccggagccgg ggacgaggtc aggttccctt 300

gttaccgctg ggtggagggc aacggcgtcc tgagcctgcc tgaaggcacc ggccgcactg 360
tgggcgagga ccctcagggc ctgttccaga aacaccggga agaagagctg gaagagagaa 420
ggaagttgta ccggtgggga aactggaagg acgggttaat tctgaatatg gctggggcca 480
aactatatga cctccctgtg gatgagcgat ttctggaaga caagagagtt gactttgagg 540
tttcgctggc caaggggctg gccgacctcg ctatcaaaga ctctctaaat gttctgactt 600
gctggaagga tctagatgac ttcaaccgga ttttctggtg tggtcagagc aagctggctg 660
agcgcgtgcg ggactcctgg aaggaagatg ccttatttgg gtaccagttt cttaatggcg 720
ccaaccccgt ggtgctgagg cgctctgctc accttcctgc tcgcctagtg ttccctccag 780
gcatggagga actgcaggcc cagctggaga aggagctgga gggaggcaca ctgttcgaag 840
ctgacttctc cctgctggat gggatcaagg ccaacgtcat tctctgtagc cagcagcacc 900
tggctgcccc tctagtcatg ctgaaattgc agcctgatgg gaaactcttg cccatggtca 960
tccagctcca gctgccccgc acaggatccc caccacctcc ccttttcttg cctacggatc 1020
ccccaatggc ctggcttctg gccaaatgct gggtgcgcag ctctgacttc agctccatg 1080
agctgcagtc tcatcttctg aggggacact tgatggctga ggtcattgtt gtggccacca 1140
tgaggtgcct gccgtcgata catcctatct tcaagcttat aattccccac ctgcgataca 1200
ccctggaaat taacgtccgg gccaggactg ggctggtctc tgacatggga attttcgacc 1260
agataatgag cactggtggg ggaggccacg tgcagctgct caagcaagct ggagccttcc 1320
taacctacag ctccttctgt ccccctgatg acttggccga ccgggggctc ctgggagtga 1380
agtcttcctt ctatgcccaa gatgcgctgc ggctctggga aatcatctat cggtatgtgg 1440
aaggaatcgt gagtctccac tataagacag acgtggctgt gaaagacgac ccagagctgc 1500
agacctggtg tcgagagatc actgaaatcg ggctgcaagg ggcccaggac cgagggtttc 1560
ctgtctcttt acaggctcgg gaccaggttt gccactttgt caccatgtgt atcttcacct 1620
gcaccggcca acacgcctct gtgcacctgg gccagctgga ctggtactct tgggtgccta 1680
atgcaccctg cacgatgcgg ctgcccccgc caaccaccaa ggatgcaacg ctggagacag 1740
tgatggcgac actgcccaac ttccaccagg cttctctcca gatgtccatc acttggcagc 1800
tgggcagacg ccagcccgtt atggtggctg tgggccagca tgaggaggag tatttttcgg 1860
gccctgagcc taaggctgtg ctgaagaagt tcagggagga gctggctgcc ctggataagg 1920
aaattgagat ccggaatgca aagctggaca tgccctacga gtacctgcgg cccagcgtgg 1980
tggaaaacag tgtggccatc taagcgtcgc cacccttgg ttatttcagc ccccatcacc 2040
caagccacaa gctgacccct tcgtggttat agccctgccc tcccaagtcc caccctcttc 2100
ccatgtccca ccctccctag aggggcacct tttcatggtc tctgcaccca gtgaacacat 2160
tttactctag aggcatcacc tgggacctta ctcctctttc cttccttcct cctttcctat 2220
cttccttcct ctctctcttc ctctttcttc attcagatct atatggcaaa tagccacaat 2280
tatataaatc atttcaagac tagaataggg ggatataata catattactc cacacctttt 2340
atgaatcaaa tatgattttt ttgttgttgt taagacagag tctcactttg acacccaggc 2400
tggagtgcag tggtgccatc accacggctc actgcagcct cagcgtcctg ggctcaaatg 2460
atcctcccac ctcagcctcc tgagtagctg ggactacagg ctcatgccat catgcccagc 2520
taatattttt ttattttcgt ggagacgggg cctcactatg ttgcctaggc tggaaatagg 2580
attttgaacc caaattgagt ttaacaataa taaaaagttg ttttacgcta aagatggaaa 2640

agaactagga ctgaactatt ttaaataaaa tattggcaaa agaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700
aaaaaaa 2707

<210>2
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>2
ccctagaggg gcacctttc atggt 25

<210>3
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>3
tagaggggca ccttttcatg gtctc 25

<210>4
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>4
tttactctag aggcatcacc tggga 25

<210>5
<211>25
<212>DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>5
tagaggcatc acctgggacc ttact 25

<210>6
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>6
tcctctttct tcattcagat ctata 25

<210>7
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>7
cttcattcag atctatatgg caaat 25

<210>8
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>8
tagccacaat tatataaatc atttc 25

<210>9
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>9
atattactcc acacctttta tgaat 25

<210>10
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>10
actccacacc ttttatgaat caaat 25

<210>11
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>11
tattttcgtg gagacggggc ctcac 25
<210>12
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>12
ggctggaaat aggattttga accca 25

<210>13
<211>1498
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(88)..(897)
<223>IL-1B 编码序列

<400>13
accaaacctc ttcgaggcac aaggcacaac aggctgctct gggattctct tcagccaatc 60
ttcattgctc aagtgtctga agcagccatg gcagaagtac ctgagctcgc cagtgaaatg 120
atggcttatt acagtggcaa tgaggatgac ttgttctttg aagctgatgg ccctaaacag 180
atgaagtgct ccttccagga cctggacctc tgccctctgg atggcggcat ccagctacga 240
atctccgacc accactacag caagggcttc aggcaggccg cgtcagttgt tgtggccatg 300
gacaagctga ggaagatgct ggttccctgc ccacagacct tccaggagaa tgacctgagc 360
accttctttc ccttcatctt tgaagaagaa cctatcttct tcgacacatg ggataacgag 420
gcttatgtgc acgatgcacc tgtacgatca ctgaactgca cgctccggga ctcacagcaa 480
aaaagcttgg tgatgtctgg tccatatgaa ctgaaagctc tccacctcca gggacaggat 540
atggagcaac aagtggtgtt ctccatgtcc tttgtacaag gagaagaaag taatgacaaa 600
atacctgtgg ccttgggcct caaggaaaag aatctgtacc tgtcctgcgt gttgaaagat 660
gataagccca ctctacagct ggagagtgta gatcccaaaa attacccaaa gaagaagatg 720
gaaaagcgat ttgtcttcaa caagatagaa atcaataaca agctggaatt tgagtctgcc 780
cagttcccca actggtacat cagcacctct caagcagaaa acatgcccgt cttcctggga 840
gggaccaaag gcggccagga tataactgac ttcaccatgc aatttgtgtc ttcctaaaga 900
gagctgtacc cagagagtcc tgtgctgaat gtggactcaa tccctagggc tggcagaaag 960
ggaacagaaa ggtttttgag tacggctata gcctggactt tcctgttgtc tacaccaatg 1020
cccaactgcc tgccttaggg tagtgctaag aggatctcct gtccatcagc caggacagtc 1080
agctctctcc tttcagggcc aatccccagc ccttttgttg agccaggcct ctctcacctc 1140
tcctactcac ttaaagcccg cctgacagaa accacggcca catttggttc taagaaaccc 1200
tctgtcattc gctcccacat tctgatgagc aaccgcttcc ctatttattt atttatttgt 1260
ttgtttgttt tattcattgg tctaatttat tcaaaggggg caagaagtag cagtgtctgt 1320
aaaagagcct agtttttaat agctatggaa tcaattcaat ttggactggt gtgctctctt 1380
taaatcaagt cctttaatta agactgaaaa tatataagct cagattattt aaatgggaat 1440

atttataaat gagcaaatat catactgttc aatggttctg aaataaactt cactgaag 1498

<210>14
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>14
agctgtaccc agagagtcct gtgct 25

<210>15
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>15
tggactcaat ccctagggct ggcag 25

<210>16
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>16
ggtttttgag tacggctata gcctg 25

<210>17
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>17
tatagcctgg actttcctgt tgtct 25
<210>18
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>18
ccaactgcct gccttagggt agtgc 25

<210>19
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>19
ctaagaggat ctcctgtcca tcagc 25

<210>20
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>20
cacttaaagc ccgcctgaca gaaac 25

<210>21

<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>21
gacagaaacc acggccacat ttggt 25

<210>22
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>22
cattcgctcc cacattctga tgagc 25

<210>23
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>23
cacattctga tgagcaaccg cttcc 25

<210>24
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>24
ggtgtgctct ctttaaatca agtcc 25

<210>25
<211>2867
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(275)..(2635)
<223>TLR 1 编码序列

<400>25
acagactgcc aaatggaaca gacaagcagg ttgtcttgtg ttaaagaaaa tgagatataa 60
gtcagttact cccggaggca atgctgctgt tcagctcttc tgtttttgtg gccagggtct 120
tcatgaacac taataggggt accaggccct cttcctcgtt agaagaaatc aggataacaa 180
aggcatattg ggcaccccta caaaaggaat ctgtatctgt atcaagatga tctgaagaac 240
agcttctacc tttaggaatg tctagtgttc caaaatgact agcatcttcc attttgccat 300
tatcttcatg ttaatacttc agatcagaat acaattatct gaagaaagtg aatttttagt 360
tgataggtca aaaaacggtc tcatccacgt tcctaaagac ctatcccaga aaacaacaat 420
cttaaatata tcgcaaaatt atatatctga gctttggact tctgacatct tatcactgtc 480
aaaactgagg attttgataa tttctcataa tagaatccag tatcttgata tcagtgtttt 540
caaattcaac caggaattgg aatacttgga tttgtcccac aacaagttgg tgaagatttc 600
ttgccaccct actgtgaacc tcaagcactt ggacctgtca tttaatgcat ttgatgccct 660
gcctatatgc aaagagtttg gcaatatgtc tcaactaaaa tttctggggt tgagcaccac 720
acacttagaa aaatctagtg tgctgccaat tgctcatttg aatatcagca aggtcttgct 780
ggtcttagga gagacttatg gggaaaaaga agaccctgag ggccttcaag actttaacac 840
tgagagtctg cacattgtgt tccccacaaa caaagaattc cattttattt tggatgtgtc 900
agtcaagact gtagcaaatc tggaactatc taatatcaaa tgtgtgctag aagataacaa 960
atgttcttac ttcctaagta ttctggcgaa acttcaaaca aatccaaagt tatcaaatct 1020
taccttaaac aacattgaaa caacttggaa ttctttcatt aggatcctcc agctggtttg 1080
gcatacaact gtatggtatt tctcaatttc aaacgtgaag ctacagggtc agctggactt 1140
cagagatttt gattattctg gcacttcctt gaaggccttg tctatacacc aagttgtcag 1200
cgatgtgttc ggttttccgc aaagttatat ctatgaaatc ttttcgaata tgaacatcaa 1260
aaatttcaca gtgtctggta cacgcatggt ccacatgctt tgcccatcca aaattagccc 1320
gttcctgcat ttggattttt ccaataatct cttaacagac acggtttttg aaaattgtgg 1380
gcaccttact gagttggaga cacttatttt acaaatgaat caattaaaag aactttcaaa 1440
aatagctgaa atgactacac agatgaagtc tctgcaacaa ttggatatta gccagaattc 1500

tgtaagctat gatgaaaaga aaggagactg ttcttggact aaaagtttat taagtttaaa 1560
tatgtcttca aatatactta ctgacactat tttcagatgt ttacctccca ggatcaaggt 1620
acttgatctt cacagcaata aaataaagag cattcctaaa caagtcgtaa aactggaagc 1680
tttgcaagaa ctcaatgttg ctttcaattc tttaactgac cttcctggat gtggcagctt 1740
tagcagcctt tctgtattga tcattgatca caattcagtt tcccacccat cggctgattt 1800
cttccagagc tgccagaaga tgaggtcaat aaaagcaggg gacaatccat tccaatgtac 1860
ctgtgagcta ggagaatttg tcaaaaatat agaccaagta tcaagtgaag tgttagaggg 1920
ctggcctgat tcttataagt gtgactaccc ggaaagttat agaggaaccc tactaaagga 1980
ctttcacatg tctgaattat cctgcaacat aactctgctg atcgtcacca tcgttgccac 2040
catgctggtg ttggctgtga ctgtgacctc cctctgcagc tacttggatc tgccctggta 2100
tctcaggatg gtgtgccagt ggacccagac ccggcgcagg gccaggaaca taccccttaga 2160
agaactccaa agaaatctcc agtttcatgc atttatttca tatagtgggc acgattcttt 2220
ctgggtgaag aatgaattat tgccaaacct agagaaagaa ggtatgcaga tttgccttca 2280
tgagagaaac tttgttcctg gcaagagcat tgtggaaaat atcatcacct gcattgagaa 2340
gagttacaag tccatctttg ttttgtctcc caactttgtc cagagtgaat ggtgccatta 2400
tgaactctac tttgcccatc acaatctctt tcatgaagga tctaatagct taatcctgat 2460
cttgctggaa cccattccgc agtactccat tcctagcagt tatcacaagc tcaaaagtct 2520
catggccagg aggacttatt tggaatggcc caaggaaaag agcaaacgtg gccttttttg 2580
ggctaactta agggcagcca ttaatattaa gctgacagag caagcaaaga aatagattac 2640
acatcaagtg aaaaatattc ctcctgttga tattgctgct tttggaagtt ccaacaatga 2700
ctttattttg catcagcata gatgtaaaca caattgtgag tgtatgatgt aggtaaaaat 2760
atataccttc gggtcgcagt tcaccattta tatgtggtat taaaaattaa tgaaatgata 2820
taactttgat ttaaacagtt ctgacacata aaaaaaaaaa aaaaaaa 2867

<210>26
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>26
ggcacgattc tttctgggtg aagaa 25
<210>27
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>27
aaggtatgca gatttgcctt catga 25

<210>28
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>28
aatggtgcca ttatgaactc tactt 25

<210>29
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>29
atagcttaat cctgatcttg ctgga 25

<210>30
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>30
gtactccatt cctagcagtt atcac 25

<210>31
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>31
aagctcaaaa gtctcatggc cagga 25

<210>32
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>32
ggaggactta tttggaatgg cccaa 25

<210>33
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>33
gagcaaacgt ggccttttt gggct 25

<210>34
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>34
ttgggctaac ttaagggcag ccatt 25

<210>35
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>35
tattcctcct gttgatattg ctgct 25

<210>36
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>36
gactttattt tgcatcagca tagat 25

<210>37
<211>3417
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(220)..(2574)
<223>TLR-2 编码序列

<400>37
cggaggcagc gagaaagcgc agccaggcgg ctgctcggcg ttctctcagg tgactgctcg 60
gagttctccc agtgtttggt gttgcaagca ggatccaaag gagacctata gtgactccca 120
ggagctctta gtgaccaagt gaaggtacct gtggggctca ttgtgcccat tgctctttca 180

ctgctttcaa ctggtagttg tgggttgaag cactggacaa tgccacatac tttgtggatg 240
gtgtgggtct tgggggtcat catcagcctc tccaaggaag aatcctccaa tcaggcttct 300
ctgtcttgtg accgcaatgg tatctgcaag ggcagctcag gatctttaaa ctccattccc 360
tcagggctca cagaagctgt aaaaagcctt gacctgtcca acaacaggat cacctacatt 420
agcaacagtg acctacagag gtgtgtgaac ctccaggctc tggtgctgac atccaatgga 480
attaacacaa tagaggaaga ttctttttct tccctgggca gtcttgaaca tttagactta 540
tcctataatt acttatctaa tttatcgtct tcctggttca agccccttc ttctttaaca 600
ttcttaaact tactgggaaa tccttacaaa accctagggg aaacatctct tttttctcat 660
ctcacaaaat tgcaaatcct gagagtggga aatatggaca ccttcactaa gattcaaaga 720
aaagattttg ctggacttac cttccttgag gaacttgaga ttgatgcttc agatctacag 780
agctatgagc caaaaagttt gaagtcaatt cagaatgtaa gtcatctgat ccttcatatg 840
aagcagcata ttttactgct ggagattttt gtagatgtta caagttccgt ggaatgtttg 900
gaactgcgag atactgattt ggacactttc catttttcag aactatccac tggtgaaaca 960
aattcattga ttaaaaagtt tacatttaga aatgtgaaaa tcaccgatga aagtttgttt 1020
caggttatga aacttttgaa tcagatttct ggattgttag aattagagtt tgatgactgt 1080
acccttaatg gagttggtaa ttttagagca tctgataatg acagagttat agatccaggt 1140
aaagtggaaa cgttaacaat ccggaggctg catattccaa ggttttactt attttatgat 1200
ctgagcactt tatattcact tacagaaaga gttaaaagaa tcacagtaga aaacagtaaa 1260
gtttttctgg ttccttgttt actttcacaa catttaaaat cattagaata cttggatctc 1320
agtgaaaatt tgatggttga agaatacttg aaaaattcag cctgtgagga tgcctggccc 1380
tctctacaaa ctttaatttt aaggcaaaat catttggcat cattggaaaa aaccggagag 1440
actttgctca ctctgaaaaa cttgactaac attgatatca gtaagaatag ttttcattct 1500
atgcctgaaa cttgtcagtg gccagaaaag atgaaatatt tgaacttatc cagcacacga 1560
atacacagtg taacaggctg cattcccaag acactggaaa ttttagatgt tagcaacaac 1620
aatctcaatt tattttcttt gaatttgccg caactcaaag aactttatat ttccagaaat 1680
aagttgatga ctctaccaga tgcctccctc ttacccatgt tactagtatt gaaaatcagt 1740
aggaatgcaa taactacgtt ttctaaggag caacttgact catttcacac actgaagact 1800
ttggaagctg gtggcaataa cttcatttgc tcctgtgaat tcctctcctt cactcaggag 1860
cagcaagcac tggccaaagt cttgattgat tggccagcaa attacctgtg tgactctcca 1920
tcccatgtgc gtggccagca ggttcaggat gtccgcctct cggtgtcgga atgtcacagg 1980
acagcactgg tgtctggcat gtgctgtgct ctgttcctgc tgatcctgct cacgggggtc 2040
ctgtgccacc gtttccatgg cctgtggtat atgaaaatga tgtgggcctg gctccaggcc 2100
aaaaggaagc ccaggaaagc tcccagcagg aacatctgct atgatgcatt tgtttcttac 2160
agtgagcggg atgcctactg ggtggagaac cttatggtcc aggagctgga gaacttcaat 2220
ccccccttca agttgtgtct tcataagcgg gacttcattc ctggcaagtg gatcattgac 2280
aatatcattg actccattga aaagagccac aaaactgtct ttgtgctttc tgaaaacttt 2340
gtgaagagtg agtggtgcaa gtatgaactg gacttctccc atttccgtct ttttgatgag 2400
aacaatgatg ctgccattct cattcttctg gagcccattg agaaaaaagc cattccccag 2460
cgcttctgca agctgcggaa gataatgaac accaagacct acctggagtg gcccatggac 2520

gaggctcagc gggaaggatt ttgggtaaat ctgagagctg cgataaagtc ctaggttccc 2580
atatttaaga ccagtctttg tctagttggg atctttatgt cactagttat agttaagttc 2640
attcagacat aattatataa aaactacgtg gatgtaccgt catttgagga cttgcttact 2700
aaaactacaa aacttcaaat tttgtctggg gtgctgtttt ataaacatat gccagattta 2760
aaaattggtt tttggttttt ctttttttcta tgagataacc atgatcataa gtctattact 2820
gatatctgaa tatagtccct tggtatccaa gggaattggt tgcaggatcc tcgtggatat 2880
caaaattcat agatgatcaa gtcccttata agagtggcat agtatttgca tataacctgt 2940
gtacattctc ctgtatactt taaatcatct ctagattact tatgataccc aatacaatgt 3000
aaatactatg taaatagttg tactgtcttt ttatttatat tattattgtt atttttttatt 3060
ttcaaaattt ttaaaacata cttttgatcc acagttggtt gacttcatgg atgcagaacc 3120
catggatata gagggccaac tgtaatctgt agcaactggc ttagttcatt aggaaacagc 3180
acaaatgaac ttaagattct caatgactgt gtcattcttt cttcctgcta agagactcct 3240
ctgtggccac aaaaggcatt ctctgtccta cctagctgtc acttctctgt gcagctgatc 3300
tcaagagcaa caaggcaaag tatttggggc actccccaaa acttgttgct attcctagaa 3360
aaaagtgctg tgtatttcct attaaacttt acaggatgag aaaaaaaaaa aaaaaaa 3417

<210>38
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>38
gtttcttaca gtgagcggga tgcct 25

<210>39
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>39
gagaacctta tggtccagga gctgg 25

<210>40
<211>25

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>40
ataagcggga cttcattcct ggcaa 25

<210>41
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>41
gtatgaactg gacttctccc atttc 25

<210>42
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>42
ctcccatttc cgtctttttg aagag 25

<210>43
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>43
aatgatgctg ccattctcat tcttc 25

<210>44
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>44
agcgcttctg caagctgcgg aagat 25

<210>45
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>45
acaccaagac ctacctggag tggcc 25

<210>46
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>46
tggagtggcc catggacgag gctca 25

<210>47
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>47
agctgcgata aagtcctagg ttccc 25

<210>48
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>48
gaccagtctt tgtctagttg ggatc 25

<210>49
<211>1702
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(82)..(681)
<223>CD69 编码序列

<400>49
agactcaaca agagctccag caaagacttt cactgtagct tgacttgacc tgagattaac 60
tagggaatct tgagaataaa gatgagctct gaaaattgtt tcgtagcaga gaacagctct 120
ttgcatccgg agagtggaca agaaaatgat gccaccagtc cccatttctc aacacgtcat 180
gaagggtcct tccaagttcc tgtcctgtgt gctgtaatga atgtggtctt catcaccatt 240
ttaatcatag ctctcattgc cttatcagtg ggccaataca attgtccagg ccaatacaca 300
ttctcaatgc catcagacag ccatgtttct tcatgctctg aggactgggt tggctaccag 360
aggaaatgct actttatttc tactgtgaag aggagctgga cttcagccca aaatgcttgt 420
tctgaacatg gtgctactct tgctgtcatt gattctgaaa aggacatgaa ctttctaaaa 480
cgatacgcag gtagagagga acactgggtt ggactgaaaa aggaacctgg tcacccatgg 540
aagtggtcaa atggcaaaga atttaacaac tggttcaacg ttacagggtc tgacaagtgt 600
gtttttctga aaaacacaga ggtcagcagc atggaatgtg agaagaattt atactggata 660

tgtaacaaac cttacaaata ataaggaaac atgttcactt attgactatt atagaatgga 720
actcaaggaa atctgtgtca gtggatgctg ctctgtggtc cgaagtcttc catagagact 780
ttgtgaaaaa aaattttata gtgtcttggg aattttcttc caaacagaac tatggaaaaa 840
aaggaagaaa ttccaggaaa atctgcactg tgggctttta ttgccatgag ctagaagcat 900
cacaggttga ccaataacca tgcccaagaa tgagaagaat gactatgcaa cctttggatg 960
cactttatat tattttgaat ccagaaataa tgaaataact aggcgtggac ttactattta 1020
ttgctgaatg actaccaaca gtgagagccc ttcatgcatt tgcactactg gaaggagtta 1080
gatgttggta ctagatactg aatgtaaaca aaggaattat ggctggtaac ataggttttt 1140
agtctaattg aatcccttaa actcagggag catttataaa tggacaaatg cttatgaaac 1200
taagatttgt aatatttctc tctttttaga gaaatttgcc aatttacttt gttatttttc 1260
cccaaaaaga atgggatgat cgtgtattta tttttttact tcctcagctg tagacaggtc 1320
cttttcgatg gtacatattt ctttgccttt ataatctttt atacagtgtc ttacagagaa 1380
aagacataag caaagactat gaggaatatt tgcaagacat agaatagtgt tggaaaatgt 1440
gcaatatgtg atgtggcaaa tctctattag gaaatattct gtaatcttca gacctagaat 1500
aatactagtc ttataatagg tttgtgactt tcctaaatca attctattac gtgcaatact 1560
tcaatacttc atttaaaata tttttatgtg caataaaatg tatttgtttg tattttgtgt 1620
tcagtacaat tataagctgt ttttatatat gtgaaataaa agtagaataa acacaaaaaa 1680
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1702

<210>50
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>50
tagtctaatt gaatccctta aactc 25

<210>51
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>51

atgggatgat cgtgtattta ttttt 25

<210>52
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>52
ttttttactt cctcagctgt agaca 25
<210>53
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>53
acttcctcag ctgtagacag gtcct 25

<210>54
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>54
gacaggtcct tttcgatggt acata 25

<210>55
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>55
tggtacatat ttctttgcct ttata 25

<210>56
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>56
tataatcttt tatacagtgt cttac 25

<210>57
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>57
gtgatgtggc aaatctctat tagga 25
<210>58
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>58
atattctgta atcttcagac ctaga 25

<210>59
<211>25

<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>59
aggtttgtga ctttcctaaa tcaat 25

<210>60
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>60
tacgtgcaat acttcaatac ttcat 25

<210>61
<211>523
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(99)..(284)
<223>CDW52 编码序列

<400>61
ctcctggttc aaaagcagct aaaccaaaag aagcctccag acagccctga gatcacctaa 60
aaagctgcta ccaagacagc cacgaagatc ctaccaaaat gaagcgcttc ctcttcctcc 120
tactcaccat cagcctcctg gttatggtac agatacaaac tggactctca ggacaaaacg 180
acaccagcca aaccagcagc ccctcagcat ccagcaacat aagcggaggc attttccttt 240
tcttcgtggc caatgccata atccacctct tctgcttcag ttgaggtgac acgtctcagc 300
cttagccctg tgccccctga aacagctgcc accatcactc gcaagagaat cccctccatc 360
tttgggaggg gttgatgcca gacatcacca ggttgtagaa gttgacaggc agtgccatgg 420
gggcaacagc caaaataggg gggtaatgat gtaggggcca agcagtgccc agctgggggt 480
caataaagtt acccttgtac ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 523

<210>62
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>62
taatcggctc actataggaa tttgc 25

<210>63
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>63
aagcagctaa accaaaagaa gcctc 25

<210>64
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>64
cagatacaaa ctggactctc aggac 25

<210>65
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>65
caaactggac tctcaggaca aaacg 25

<210>66
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>66
tcaggacaaa acgacaccag ccaaa 25

<210>67
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>67
ttccttttct tcgtggccaa tgcca 25

<210>68
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>68
ttcttcgtgg ccaatgccat aatcc 25

<210>69
<211>25
<212>DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>69
ttctgcttca gttgaggtga cacgt 25

<210>70
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>70
ttcagttgag gtgacacgtc tcagc 25
<210>71
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>71
gtgacacgtc tcagccttag ccctg 25

<210>72
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>72
ggttgatgcc agacatcacc aggtt 25

<210>73
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>73
atcaccaggt tgtagaagtt gacag 25

<210>74
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>74
caccaggttg tagaagttga caggc 25

<210>75
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>75
atgtaggggc caagcagtgc ccagc 25

<210>76
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>76
tgtaggggcc aagcagtgcc cagct 25

<210>77
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>77
gtcaataaag ttacccttgt acttg 25

<210>78
<211>1310
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(103)..(1110)
<223>Gapdh 编码序列

<400>78
aaattgagcc cgcagcctcc cgcttcgctc tctgctcctc ctgttcgaca gtcagccgca 60
tcttcttttg cgtcgccagc cgagccacat cgctcagaca ccatggggaa ggtgaaggtc 120
ggagtcaacg gatttggtcg tattgggcgc ctggtcacca gggctgcttt taactctggt 180
aaagtggata ttgttgccat caatgacccc ttcattgacc tcaactacat ggtttacatg 240
ttccaatatg attccaccca tggcaaattc catggcaccg tcaaggctga gaacgggaag 300
cttgtcatca atggaaatcc catcaccatc ttccaggagc gagatccctc caaaatcaag 360
tggggcgatg ctggcgctga gtacgtcgtg gagtccactg gcgtcttcac caccatggag 420
aaggctgggg ctcatttgca gggggggagcc aaaagggtca tcatctctgc cccctctgct 480
gatgccccca tgttcgtcat gggtgtgaac catgagaagt atgacaacag cctcaagatc 540
atcagcaatg cctcctgcac caccaactgc ttagcacccc tggccaaggt catccatgac 600
aactttggta tcgtggaagg actcatgacc acagtccatg ccatcactgc cacccagaag 660
actgtggatg gcccctccgg gaaactgtgg cgtgatggcc gcggggctct ccagaacatc 720

atccctgcct ctactggcgc tgccaaggct gtgggcaagg tcatccctga gctgaacggg 780
aagctcactg gcatggcctt ccgtgtcccc actgccaacg tgtcagtggt ggacctgacc 840
tgccgtctag aaaaacctgc caaatatgat gacatcaaga aggtggtgaa gcaggcgtcg 900
gagggccccc tcaagggcat cctgggctac actgagcacc aggtggtctc ctctgacttc 960
aacagcgaca cccactcctc caccttttgac gctggggctg gcattgccct caacgaccac 1020
tttgtcaagc tcatttcctg gtatgacaac gaatttggct acagcaacag ggtggtggac 1080
ctcatggccc acatggcctc caaggagtaa gacccctgga ccaccagccc cagcaagagc 1140
acaagaggaa gagagagacc ctcactgctg gggagtccct gccacactca gtcccccacc 1200
acactgaatc tcccctcctc acagttgcca tgtagacccc ttgaagaggg gaggggccta 1260
gggagccgca ccttgtcatg taccatcaat aaagtaccct gtgctcaacc 1310

<210>79
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>79
cctctgactt caacagcgac accca 25

<210>80
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>80
gggctggcat tgccctcaac gacca 25

<210>81
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>81
ccctcaacga ccactttgtc aagct 25

<210>82
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>82
accactttgt caagctcatt tcctg 25

<210>83
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>83
ttgtcaagct catttcctgg tatga 25

<210>84
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>84
tcatttcctg gtatgacaac gaatt 25

<210>85
<211>25

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>85
acaacgaatt tggctacagc aacag 25
<210>86
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>86
gggtggtgga cctcatggcc cacat 25
<210>87
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>87
tcatggccca catggcctcc aagga 25

<210>88
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>88
acatggcctc caaggagtaa gaccc 25

<210>89
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>89
aggagtaaga cccctggacc accag 25

<210>90
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>90
gccccagcaa gagcacaaga ggaag 25

<210>91
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>91
gagagagacc ctcactgctg gggag 25

<210>92
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>92
cctcactgct ggggagtccc tgcca 25

<210>93
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>93
cctcctcaca gttgccatgt agacc 25

<210>94
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>94
agttgccatg tagacccctt gaaga 25

<210>95
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>95
catgtagacc ccttgaagag gggag 25

<210>96
<211>25

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>96
tagggagccg caccttgtca tgtac 25

<210>97
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>97
gccgcacctt gtcatgtacc atcaa 25

<210>98
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>98
tgtcatgtac catcaataaa gtacc 25

<210>99
<211>1793
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(74)..(1201)
<223>B- 肌动蛋白编码序列

<400>99

cgcgtccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgccgcccg tccacacccg 60
ccgccagctc accatggatg atgatatcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gctccggcat 120
gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc ccccccgggcc gtcttccccct ccatcgtggg 180
gcgccccagg caccagggcg tgatggtggg catgggtcag aaggattcct atgtgggcga 240
cgaggcccag agcaagagag gcatcctcac cctgaagtac cccatcgagc acggcatcgt 300
caccaactgg gacgacatgg agaaaatctg gcaccacacc ttctacaatg agctgcgtgt 360
ggctcccgag gagcaccccg tgctgctgac cgaggccccc ctgaacccca aggccaaccg 420
cgagaagatg acccagatca tgtttgagac cttcaacacc ccagccatgt acgttgctat 480
ccaggctgtg ctatccctgt acgcctctgg ccgtaccact ggcatcgtga tggactccgg 540
tgacggggtc acccacactg tgcccatcta cgaggggtat gccctccccc atgccatcct 600
gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg 660
cggctacagc ttcaccacca cggccgagcg ggaaatcgtg cgtgacatta aggagaagct 720
gtgctacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctcctccct 780
ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggtcatcacc attggcaatg agcggttccg 840
ctgccctgag gcactcttcc agccttcctt cctgggcatg gagtcctgtg gcatccacga 900
aactaccttc aactccatca tgaagtgtga cgtggacatc cgcaaagacc tgtacgccaa 960
cacagtgctg tctggcggca ccaccatgta ccctggcatt gccgacagga tgcagaagga 1020
gatcactgcc ctggcaccca gcacaatgaa gatcaagatc attgctcctc ctgagcgcaa 1080
gtactccgtg tggatcggcg gctccatcct ggcctcgctg tccaccttcc agcagatgtg 1140
gatcagcaag caggagtatg acgagtccgg cccctccatc gtccaccgca aatgcttcta 1200
ggcggactat gacttagttg cgttacaccc tttcttgaca aaacctaact tgcgcagaaa 1260
acaagatgag attggcatgg ctttatttgt ttttttgtt ttgttttggt tttttttttt 1320
tttttggctt gactcaggat ttaaaaactg gaacggtgaa ggtgacagca gtcggttgga 1380
gcgagcatcc cccaaagttc acaatgtggc cgaggacttt gattgcacat tgttgttttt 1440
ttaatagtca ttccaaatat gagatgcatt gttacaggaa gtcccttgcc atcctaaaag 1500
ccacccccact tctctctaag gagaatggcc cagtcctctc ccaagtccac acaggggagg 1560
tgatagcatt gctttcgtgt aaattatgta atgcaaaatt tttttaatct tcgccttaat 1620
actttttat tttgttttat tttgaatgat gagccttcgt gccccccctt ccccctttt 1680
gtcccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggtctccct gggagtgggt ggaggcagcc 1740
agggcttacc tgtacactga cttgagacca gttgaataaa agtgcacacc tta 1793

<210>100
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>100
tcttgacaaa acctaacttg cgcag 25

<210>101
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>101
atgagattgg catggcttta tttgt 25
<210>102
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>102
gcagtcggtt ggagcgagca tcccc 25

<210>103
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>103
ccaaagttca caatgtggcc gagga 25

<210>104
<211>25
<212>DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>104
aagttcacaa tgtggccgag gactt 25

<210>105
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>105
atgtggccga ggactttgat tgcac 25

<210>106
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>106
ccgaggactt tgattgcaca ttgtt 25

<210>107
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>107

tttaatagtc attccaaata tgaga 25

<210>108
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>108
agtcattcca aatatgagat gcatt 25

<210>109
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>109
tgttacagga agtcccttgc catcc 25

<210>110
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>110
tacaggaagt cccttgccat cctaa 25

<210>111
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400>111
tcccttgcca tcctaaaagc caccc 25

<210>112
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>112
cttctctcta aggagaatgg cccag 25

<210>113
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>113
gaggtgatag cattgctttc gtgta 25

<210>114
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>114
tattttgaat gatgagcctt cgtgc 25
<210>115
<211>25

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>115
tttgaatgat gagccttcgt gcccc 25

<210>116
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>116
gtatgaaggc ttttggtctc cctgg 25

<210>117
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>117
ggtggaggca gccagggctt acctg 25

<210>118
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>118
cagggcttac ctgtacactg acttg 25

<210>119
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400>119
ttacctgtac actgacttga gacca 25

<210>120
<211>1816
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221> 其它特征
<222>(40)..(825)
<223>CD40L 编码序列

<400>120
cttctctgcc agaagatacc atttcaactt taacacagca tgatcgaaac atacaaccaa 60
acttctcccc gatctgcggc cactggactg cccatcagca tgaaaatttt tatgtattta 120
cttactgttt ttcttatcac ccagatgatt gggtcagcac tttttgctgt gtatcttcat 180
agaaggttgg acaagataga agatgaaagg aatcttcatg aagattttgt attcatgaaa 240
acgatacaga gatgcaacac aggagaaaga tccttatcct tactgaactg tgaggagatt 300
aaaagccagt ttgaaggctt tgtgaaggat ataatgttaa acaaagagga gacgaagaaa 360
gaaaacagct ttgaaatgca aaaaggtgat cagaatcctc aaattgcggc acatgtcata 420
agtgaggcca gcagtaaaac aacatctgtg ttacagtggg ctgaaaaagg atactacacc 480
atgagcaaca acttggtaac cctggaaaat gggaaacagc tgaccgttaa aagacaagga 540
ctctattata tctatgccca agtcaccttc tgttccaatc gggaagcttc gagtcaagct 600
ccatttatag ccagcctctg cctaaagtcc cccggtagat tcgagagaat cttactcaga 660
gctgcaaata cccacagttc cgccaaacct tgcgggcaac aatccattca cttgggagga 720
gtatttgaat tgcaaccagg tgcttcggtg tttgtcaatg tgactgatcc aagccaagtg 780
agccatggca ctggcttcac gtcctttggc ttactcaaac tctgaacagt gtcaccttgc 840

aggctgtggt ggagctgacg ctgggagtct tcataataca gcacagcggt taagcccacc 900
ccctgttaac tgcctattta taaccctagg atcctcctta tggagaacta tttattatac 960
actccaaggc atgtagaact gtaataagtg aattacaggt cacatgaaac caaaacgggc 1020
cctgctccat aagagcttat atatctgaag cagcaacccc actgatgcag acatccagag 1080
agtcctatga aaagacaagg ccattatgca caggttgaat tctgagtaaa cagcagataa 1140
cttgccaagt tcagttttgt ttctttgcgt gcagtgtctt tccatggata atgcatttga 1200
tttatcagtg aagatgcaga agggaaatgg ggagcctcag ctcacattca gttatggttg 1260
actctgggtt cctatggcct tgttggaggg ggccaggctc tagaacgtct aacacagtgg 1320
agaaccgaaa ccccccccccc ccccccccgcc accctctcgg acagttattc attctctttc 1380
aatctctctc tctccatctc tctctttcag tctctctctc tcaacctctt tcttccaatc 1440
tctctttctc aatctctctg tttccctttg tcagtctctt ccctccccca gtctctcttc 1500
tcaatccccc tttctaacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 1560
acacacacac acacacacac agagtcaggc cgttgctagt cagttctctt ctttccaccc 1620
tgtccctatc tctaccacta tagatgaggg tgaggagtag ggagtgcagc cctgagcctg 1680
cccactcctc attacgaaat gactgtattt aaaggaaatc tattgtatct acctgcagtc 1740
tccattgttt ccagagtgaa cttgtaatta tcttgttatt tatttttga ataataaaga 1800
cctcttaaca ttaaaa 1816

<210>121
<211>261
<212>PRT
<213> 智人

<400>121

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30
Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45
Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60
Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255
Gly Leu Leu Lys Leu
260

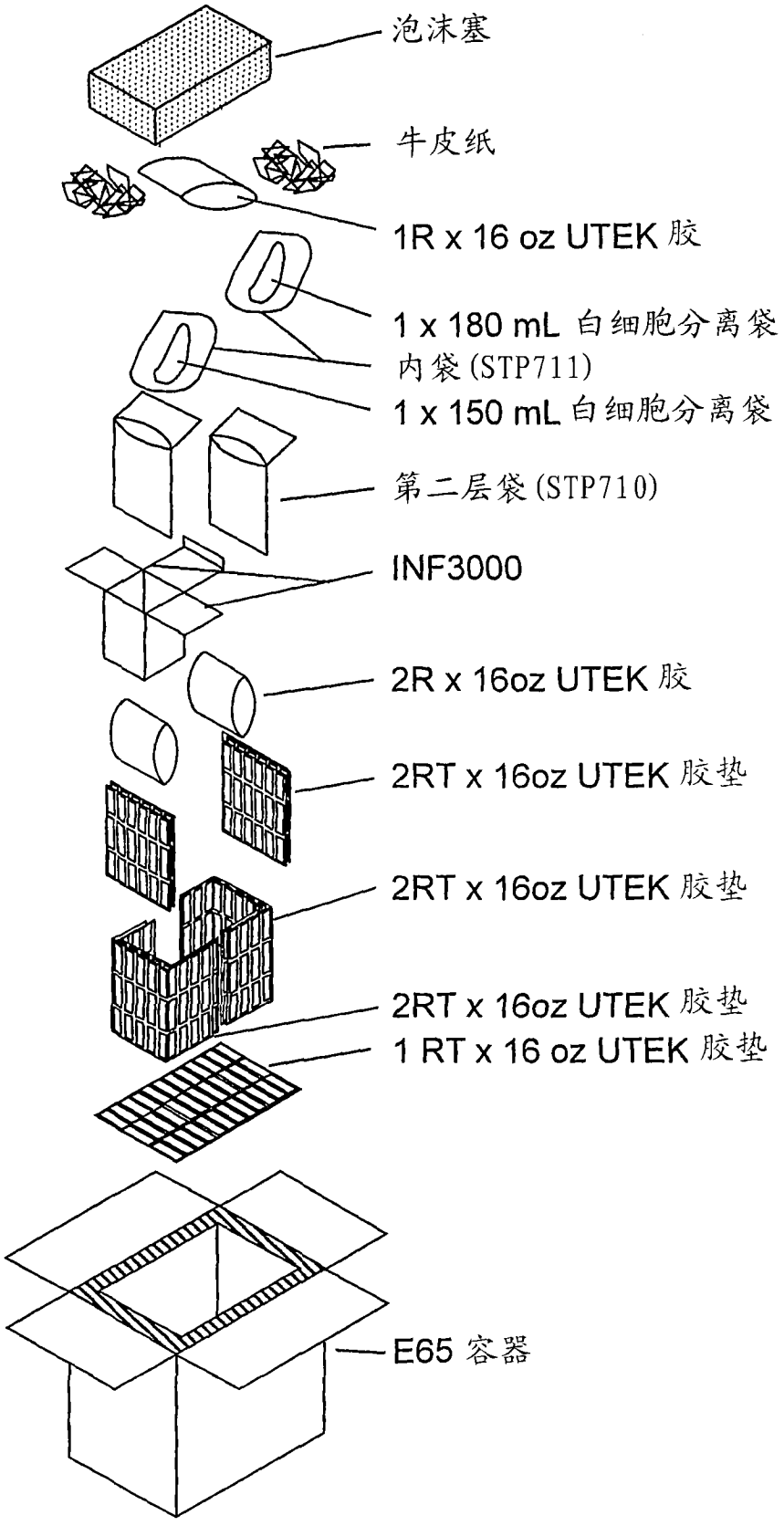

泡沫塞
牛皮纸
1R x 16 oz UTEK 胶
1 x 180 mL 白细胞分离袋
内袋(STP711)
1 x 150 mL 白细胞分离袋
第二层袋(STP710)
INF3000
2R x 16oz UTEK 胶
2RT x 16oz UTEK 胶垫
2RT x 16oz UTEK 胶垫
2RT x 16oz UTEK 胶垫
1 RT x 16 oz UTEK 胶垫
E65 容器

图 1

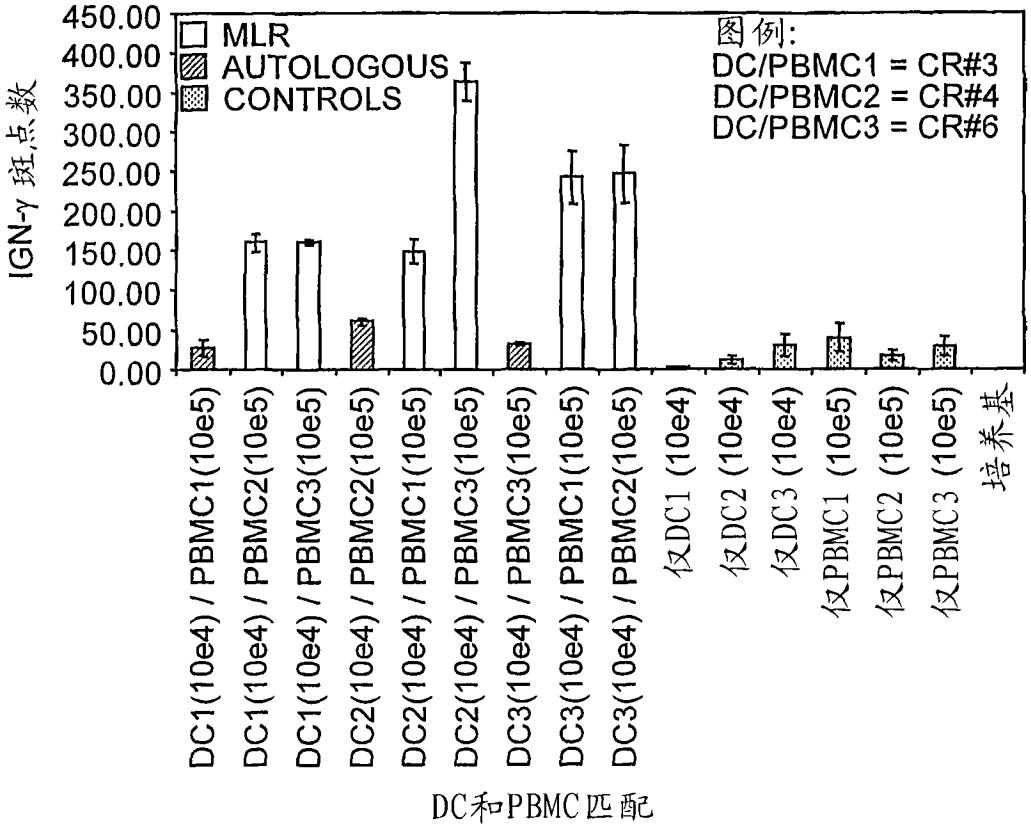

450.00
400.00
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
IGN-γ 斑点数
MLR
AUTOLOGOUS
CONTROLS
图例:
DC/PBMC1 = CR#3
DC/PBMC2 = CR#4
DC/PBMC3 = CR#6
DC1(10e4) / PBMC1(10e5)
DC1(10e4) / PBMC2(10e5)
DC1(10e4) / PBMC3(10e5)
DC2(10e4) / PBMC2(10e5)
DC2(10e4) / PBMC1(10e5)
DC2(10e4) / PBMC3(10e5)
DC3(10e4) / PBMC3(10e5)
DC3(10e4) / PBMC1(10e5)
DC3(10e4) / PBMC2(10e5)
仅DC1 (10e4)
仅DC2 (10e4)
仅DC3 (10e4)
仅PBMC1 (10e5)
仅PBMC2 (10e5)
仅PBMC3 (10e5)
培养基
DC和PBMC匹配

图 2

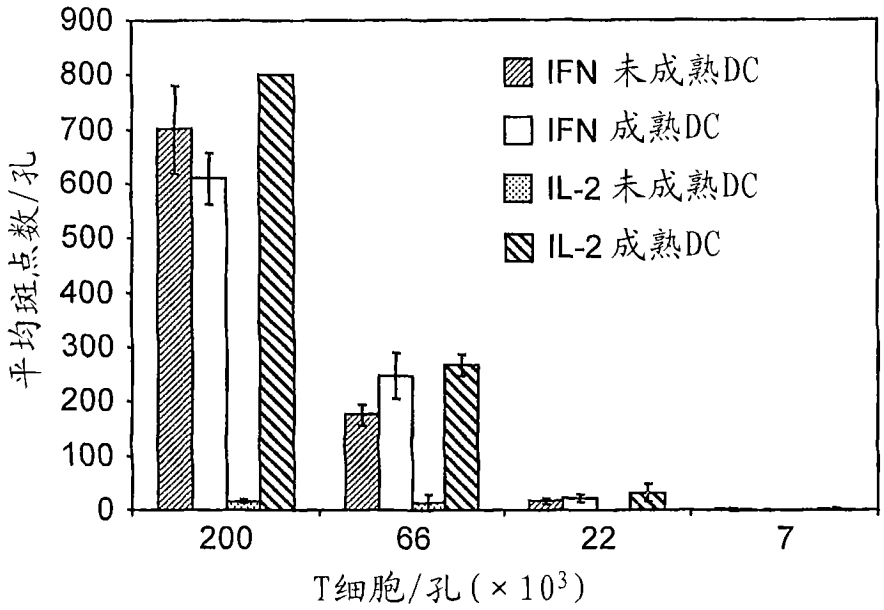

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
平均斑点数/孔
IFN 未成熟DC
IFN 成熟DC
IL-2 未成熟DC
IL-2 成熟DC
200
66
22
7
T细胞/孔(×10³)

图 3

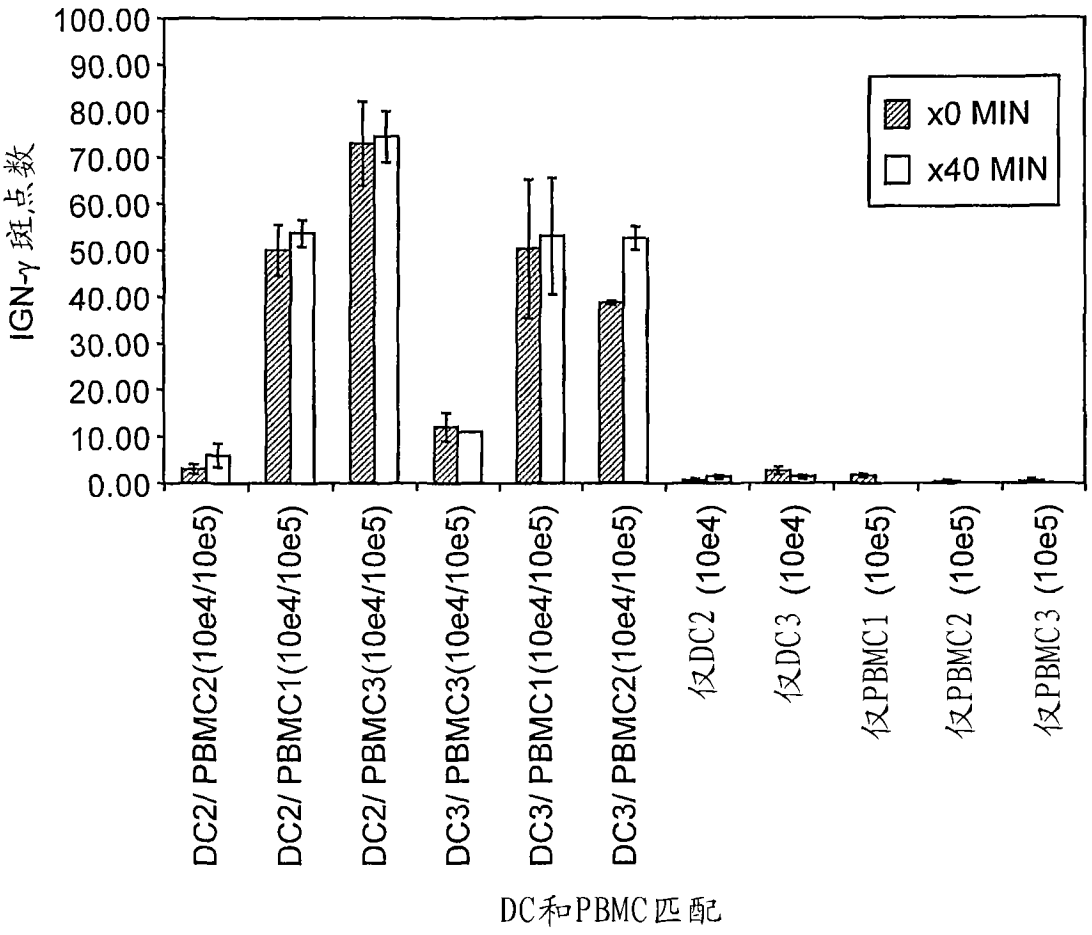

100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
IGN-γ 斑点数
x0 MIN
x40 MIN
DC2/ PBMC2(10e4/10e5)
DC2/ PBMC1(10e4/10e5)
DC2/ PBMC3(10e4/10e5)
DC3/ PBMC3(10e4/10e5)
DC3/ PBMC1(10e4/10e5)
DC3/ PBMC2(10e4/10e5)
仅DC2 (10e4)
仅DC3 (10e4)
仅PBMC1 (10e5)
仅PBMC2 (10e5)
仅PBMC3 (10e5)
DC和PBMC匹配

图 4

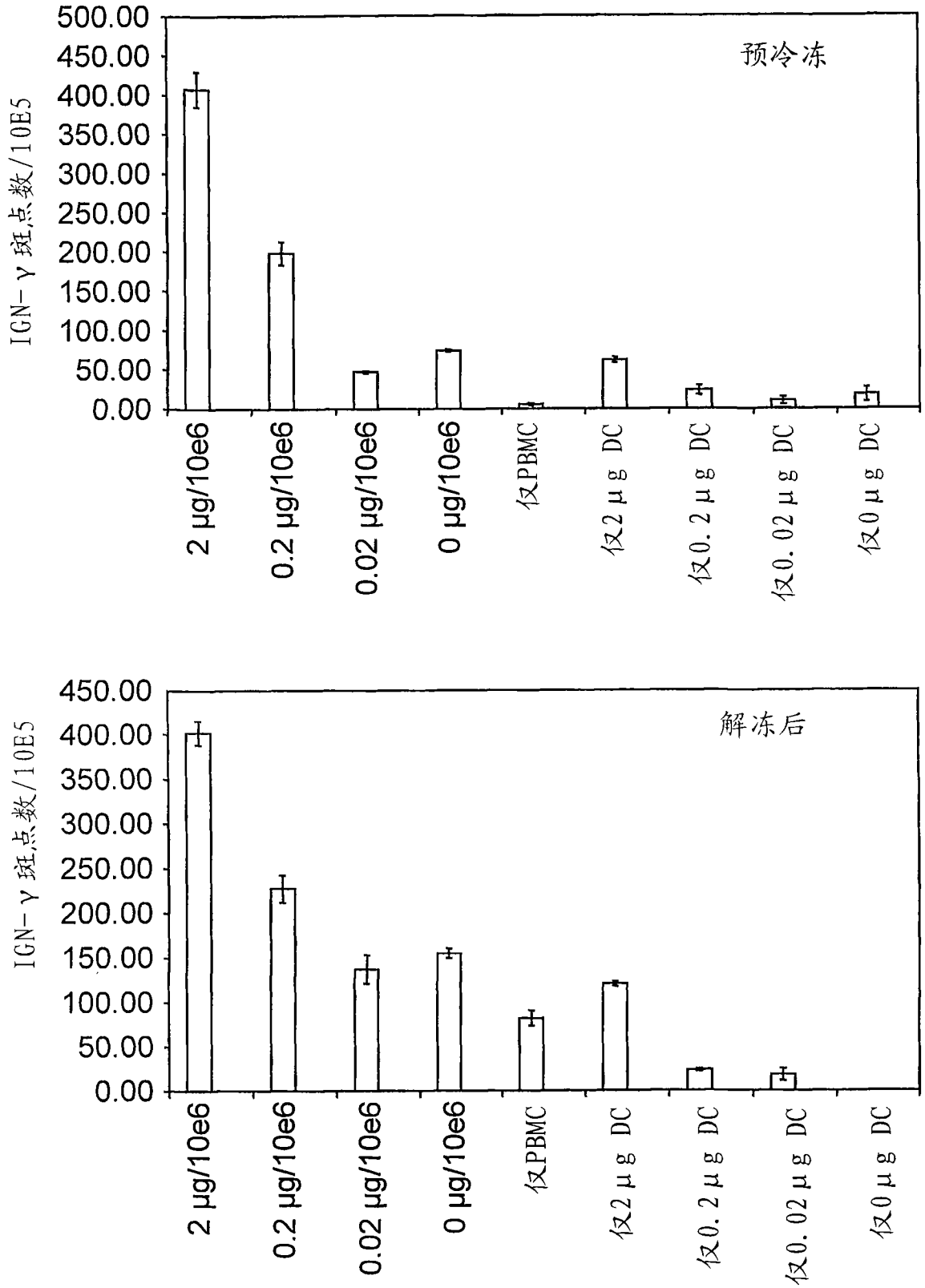

预冷冻
IGN-γ斑点数/10E5
500.00
450.00
400.00
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
2 μg/10e6
0.2 μg/10e6
0.02 μg/10e6
0 μg/10e6
仅PBMC
仅2 μg DC
仅0.2 μg DC
仅0.02 μg DC
仅0 μg DC
解冻后
IGN-γ斑点数/10E5
450.00
400.00
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
2 μg/10e6
0.2 μg/10e6
0.02 μg/10e6
0 μg/10e6
仅PBMC
仅2 μg DC
仅0.2 μg DC
仅0.02 μg DC
仅0 μg DC

图 5

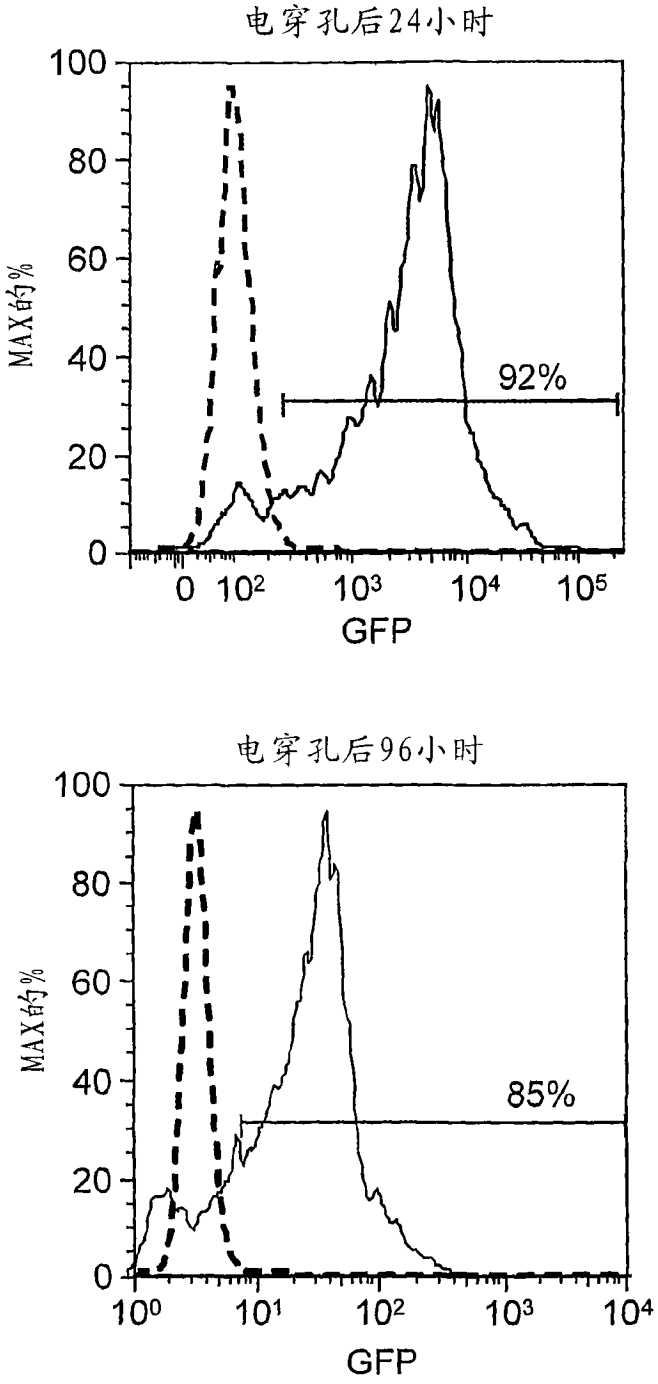

电穿孔后24小时
100
80
60
40
20
0
MAX的%
92%
0
10²
10³
10⁴
10⁵
GFP
电穿孔后96小时
100
80
60
40
20
0
MAX的%
85%
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
GFP

图 6

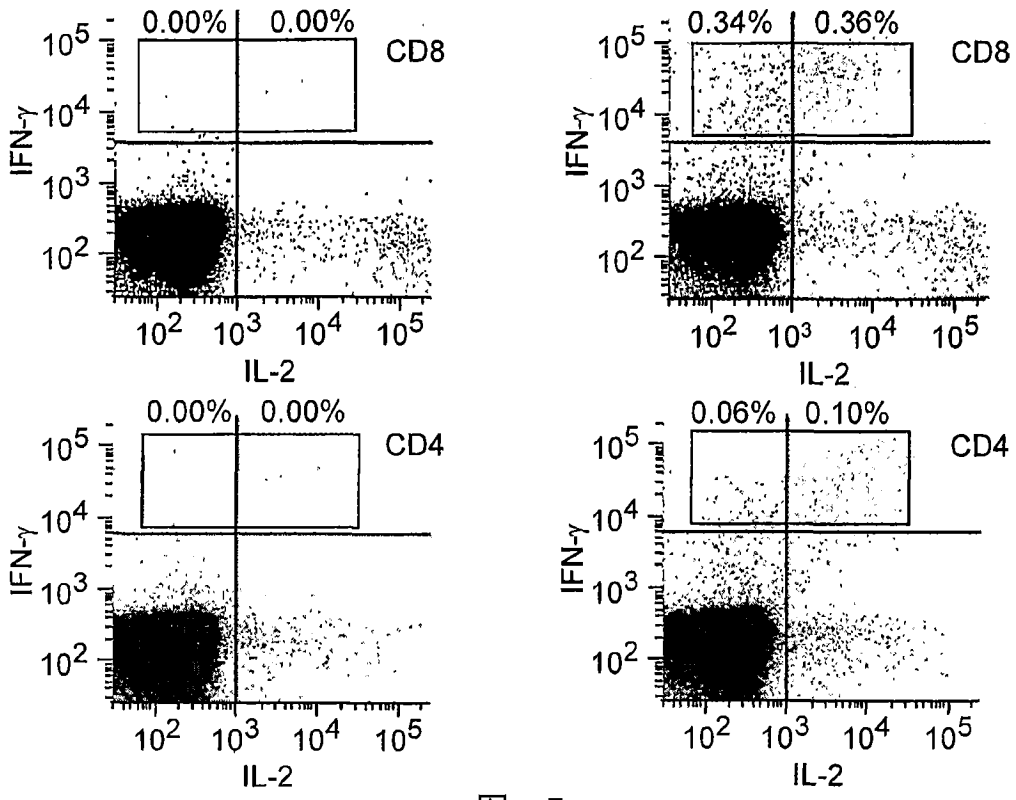

0.00%
0.00%
CD8
IFN-γ
IL-2
0.34%
0.36%
CD8
IFN-γ
IL-2
0.00%
0.00%
CD4
IFN-γ
IL-2
0.06%
0.10%
CD4
IFN-γ
IL-2

图 7

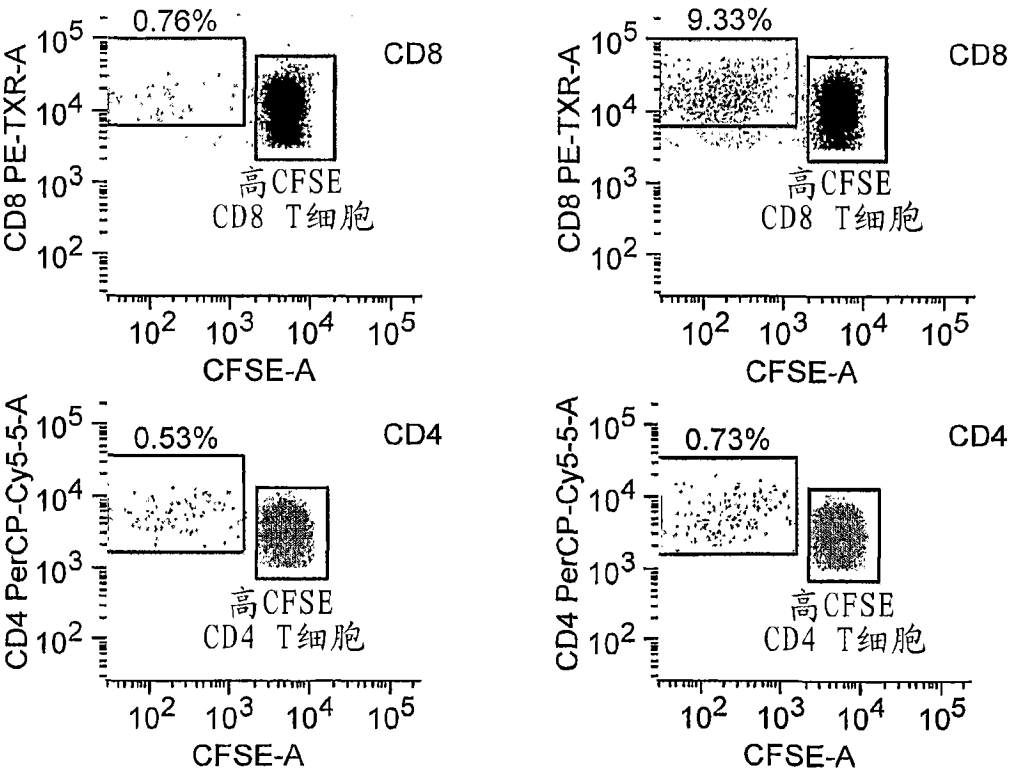

0.76%
CD8
CD8 PE-TXR-A
高CFSE
CD8 T细胞
CFSE-A
9.33%
CD8
CD8 PE-TXR-A
高CFSE
CD8 T细胞
CFSE-A
0.53%
CD4
CD4 PerCP-Cy5-5-A
高CFSE
CD4 T细胞
CFSE-A
0.73%
CD4
CD4 PerCP-Cy5-5-A
高CFSE
CD4 T细胞
CFSE-A

图 8

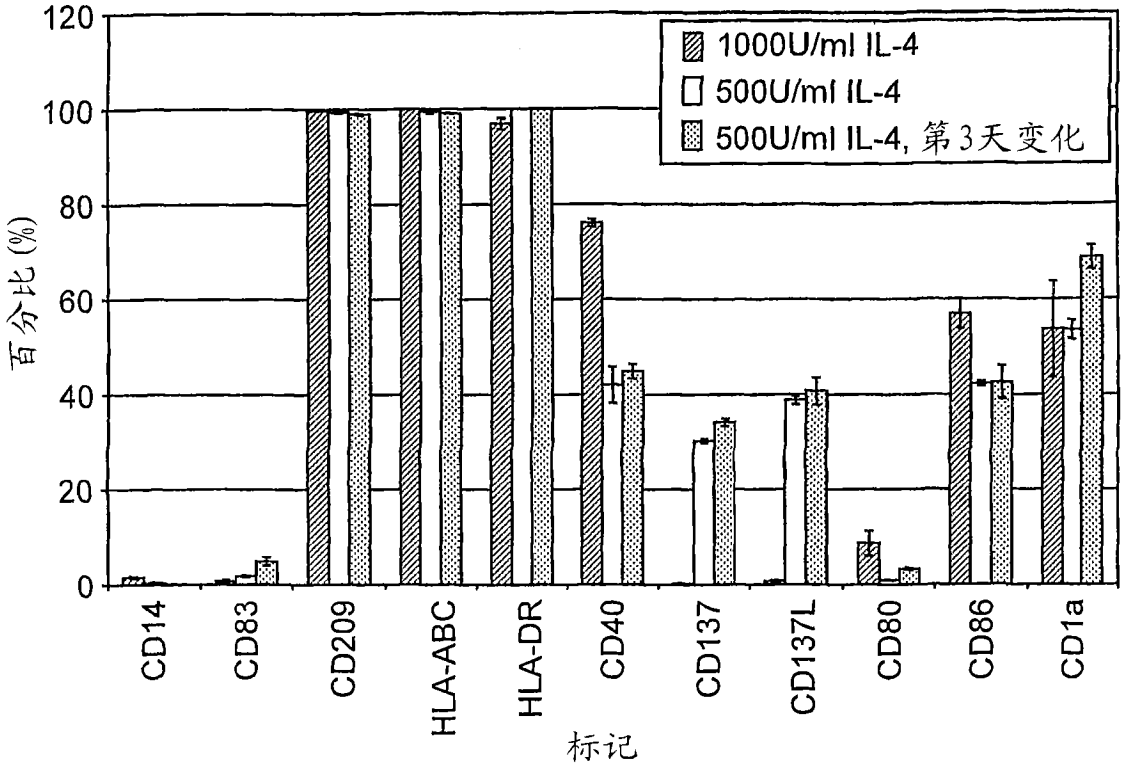

1000U/ml IL-4
500U/ml IL-4
500U/ml IL-4, 第3天变化
百分比 (%)
120
100
80
60
40
20
0
CD14
CD83
CD209
HLA-ABC
HLA-DR
CD40
CD137
CD137L
CD80
CD86
CD1a
标记

图 9

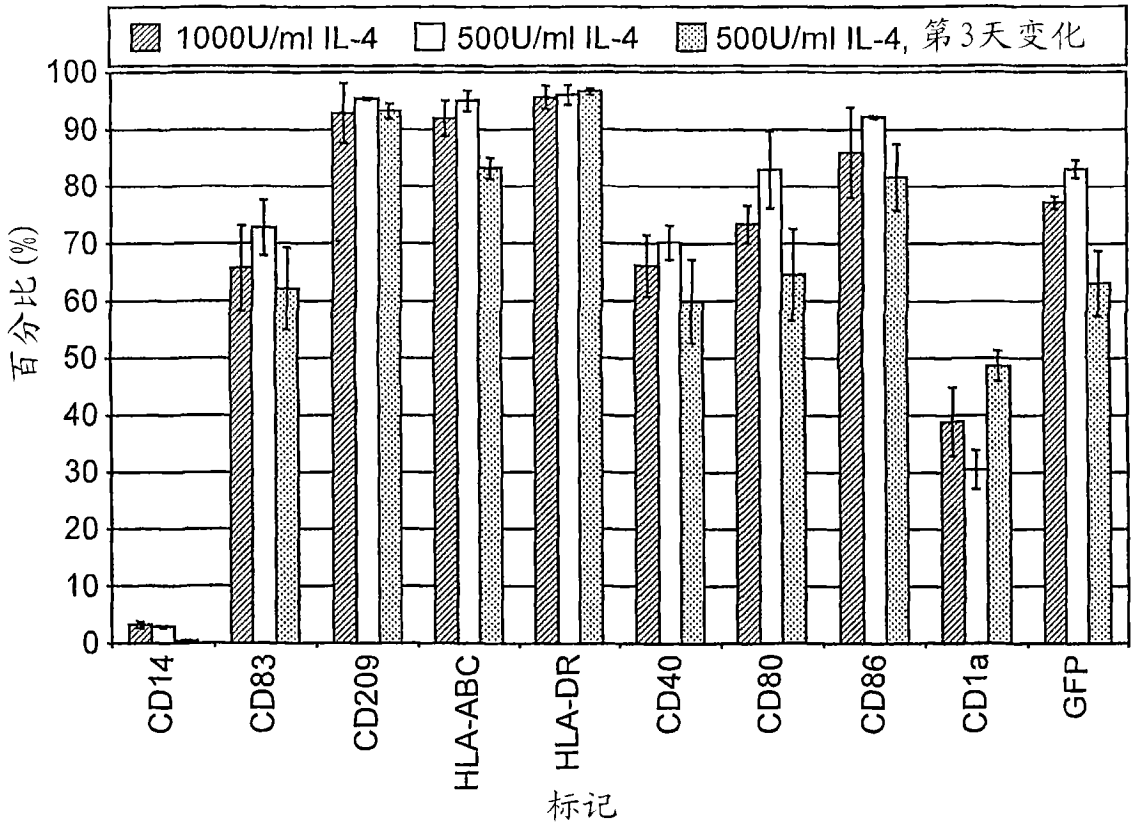

1000U/ml IL-4
500U/ml IL-4
500U/ml IL-4, 第3天变化
百分比 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD14
CD83
CD209
HLA-ABC
HLA-DR
CD40
CD80
CD86
CD1a
GFP
标记

图 10