



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1784488 B

(45) 授权公告日 2010.07.28

(21) 申请号 200480010542.1

(22) 申请日 2004.02.27

(30) 优先权数据

60/451,015 2003.02.27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.10.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/006119 2004.02.27

(87) PCT申请的公布数据

W02004/076651 EN 2004.09.10

(73) 专利权人 西北生物治疗药物公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 B·A·乔阿 M·L·博希

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0216560 A, 2002.02.28, 全文.

W0 2003012081 A, 2003.02.13, 全文.

Sallusto. F. et al.. Efficient presentation of soluble antigen by cultured humandendritic cell is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulation factor. J. Exp. Med 179. 1994, 1791109-1118.

223(1), 摘要.

Manfred B. Lutz a, Nicole Kukutsch.

An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. Journal of Immunological Methods 223 1. 1999, 223(1), 摘要, 第 78 页, 第 89-90 页, 表 1.

赵文理

邢佩霓. 人脐血树突状细胞体外无血清培养. 中国实验血液学杂志 7 4. 1999, 7(4), 摘要, 第 297 页.

审查员 曾繁辉

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 7 页

(54) 发明名称

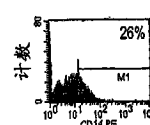
在存在 GM-CSF, 缺少另外的细胞因子下, 由单核细胞性树突细胞前体细胞产生树突细胞

(57) 摘要

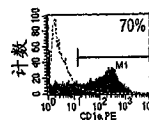
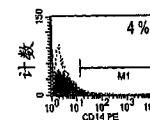
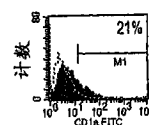
本发明确定了树突细胞可以源自于各种来源, 包括在仅存在 GM-CSF 而无其它细胞因子的情况下, 源自于外周血单核细胞, 如果该单核细胞是未活化的话。通过防止活化, 如通过防止细胞与培养容器表面结合, 单核细胞不需要另外细胞因子的存在, 如 IL-4 或 IL-13, 来防止分化为非树突细胞系。以这种方式产生和维持的不成熟 DCs 是 CD14 并表达高水平 CD1a。通过接触试剂例如 BCG 和 IFN γ 而成熟时, 确定该细胞表达用现有方法纯化和在 GM-CSF 和 IL-4 存在下培养的成熟树突细胞典型的表面分子。由未活化的单核细胞产生和仅在 GM-CSF 中培养的成熟树突细胞适用于基于树突细胞的免疫疗法, 例如用于疾病的治疗, 包括癌症。

预处理
(30分钟)与塑料紧密粘附
(无SAH的培养基)与塑料粘附降低
(培养基+3% HSA)

CD14



CD1a



1. 一种单核细胞性树突细胞前体分化为不成熟树突细胞的方法,包括:
 - a) 提供包含非活化的单核细胞性树突细胞前体的细胞群体;
 - b) 使非活化的树突细胞前体在培养容器中与补充粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、缺少另外细胞因子的树突细胞培养基接触。
2. 根据权利要求1的方法,其中抑制前体细胞与培养容器粘附。
3. 根据权利要求2的方法,其中通过使细胞与包含高浓度的动物或人蛋白的树突细胞培养基接触抑制单核细胞性树突细胞前体细胞的粘附。
4. 根据权利要求3的方法,其中所述的动物或人蛋白是白蛋白、血清、血浆、明胶或聚氨基酸。
5. 根据权利要求4的方法,其中所述的蛋白是人血清白蛋白。
6. 根据权利要求5的方法,其中人血清白蛋白以至少1%的浓度存在。
7. 根据权利要求6的方法,其中人血清白蛋白以2%至10%的浓度存在。
8. 根据权利要求5的方法,进一步包括树突细胞的低温贮藏。
9. 根据权利要求2的方法,其中通过使细胞与低细胞亲和力的培养容器接触抑制单核细胞性树突细胞前体与培养容器的粘附。
10. 根据权利要求9的方法,其中所述的低细胞亲和力的培养容器包括聚丙烯、聚四氟乙烯或PFTE。
11. 根据权利要求3的方法,其中所述的培养容器包括聚苯乙烯、涂布玻璃的聚苯乙烯、苯乙烯或玻璃。
12. 根据权利要求1的方法,其中通过使细胞与包含金属螯合剂的树突细胞培养基接触抑制单核细胞性树突细胞前体细胞的活化。
13. 根据权利要求12的方法,其中金属螯合剂包括EDTA或EGTA。
14. 根据权利要求1的方法,其中所述的树突细胞培养基是无血清培养基。
15. 根据权利要求1的方法,其中所述的细胞群体包括外周血、除去白细胞的产物、脱落产物、脐带血、脾、淋巴结、胸腺或骨髓。
16. 根据权利要求15的方法,其中所述的细胞群体已被低温贮藏。
17. 根据权利要求15的方法,其中通过切向流过滤进一步富集树突细胞前体。
18. 根据权利要求17的方法,其中所述的切向流过滤通过具有5.5微米孔径大小的过滤器,再循环输入速率为1400ml/分钟,过滤速率为17ml/分钟,过滤时间为90分钟。
19. 根据权利要求1的方法,进一步包括使分化的树突细胞前体与目标抗原接触足以摄取抗原的一段时间。
20. 根据权利要求19的方法,进一步包括使分化的树突细胞前体与树突细胞成熟剂接触。
21. 根据权利要求20的方法,其中所述的树突细胞成熟剂包括卡介苗(BCG)、脂多糖(LPS)、TNF α 、干扰素 γ (IFN γ)或其组合。
22. 根据权利要求21的方法,其中所述的成熟剂是BCG和IFN γ 的组合。
23. 根据权利要求19的方法,其中所述的抗原是肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、肿瘤细胞、编码从肿瘤细胞分离的抗原的核酸、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞溶解产物、膜制剂、重组产生的抗原、肽抗原或分离的抗原。

在存在 GM-CSF, 缺少另外的细胞因子下, 由单核细胞性树突细胞前体细胞产生树突细胞

[0001] 相关申请的相互参照

[0002] 本申请要求 2003 年 2 月 27 日递交的美国临时专利申请 60/451,015 的权益, 其公开内容全面并入这里。

背景技术

[0003] 抗原呈递细胞 (APC) 对引起有效免疫反应很重要。APC 不仅向具有抗原特异性受体的 T 细胞呈递抗原, 而且提供 T 细胞活化所需的信号。这种信号仍未完全确定, 但是已知牵涉各种细胞表面分子以及细胞因子或生长因子。原初或未致敏的 T 细胞活化所需的因子可能不同于预先致敏的记忆 T 细胞重新活化所需的因子。尽管已经表明单核细胞和 B 细胞是感受态 APC, 但是它们的抗原呈递能力好象限于预先致敏的 T 细胞的重新活化。因此, 它们不能够直接活化功能上原初或未致敏的 T 细胞群体。另一方面, 树突细胞能够活化原初和预先致敏的 T 细胞。

[0004] 树突细胞是一种异质细胞群体, 具有有特色的形态和广泛的组织分布, 包括血液 (如见 Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9:271-96(1991))。树突细胞的细胞表面不寻常, 具有特征性的面罩样突出物。成熟树突细胞一般鉴定为 CD3⁻、CD11c⁺、CD19⁻、CD83⁺、CD86⁺ 和 HLA-DR⁺。

[0005] 树突细胞加工和呈递抗原, 并刺激来自原初和未致敏的 T 细胞和记忆 T 细胞的反应。尤其是, 树突细胞具有致敏限于 MHC 的 T 细胞的高能力并在向 T 细胞呈递抗原中非常有效, 包括 T 细胞发育和耐受过程中的自身抗原, 和免疫反应过程中的外来抗原。除它们在抗原呈递中的作用之外, 树突细胞也直接与非淋巴组织联系并测量非淋巴组织的损害信号 (如局部缺血、感染或炎症) 或肿瘤生长。一旦发出信号, 树突细胞就通过释放刺激淋巴细胞和单核细胞活性的细胞因子启动免疫反应。

[0006] 由于它们在抗原呈递中的有效性, 使用树突细胞作为体内和离体免疫刺激剂的兴趣不断增长。然而, 由于树突细胞在外周血中的出现率低和用现有方法分离的树突细胞的纯度低, 分离的树突细胞作为免疫刺激剂的用途受到了限制。尤其是, 树突细胞在人外周血中的出现率估计为白细胞的大约 0.1%。类似地, 来自其它组织, 如淋巴样器官的树突细胞的可及性有限。树突细胞的低出现率增加了分离富含树突细胞前体的细胞群体和离体或体外培养这些前体以获得富含不成熟或成熟树突细胞群体的兴趣。因为树突细胞前体的特征仍未完全确定, 所以典型用于分离树突细胞前体的方法不能产生期望前体的纯化部分, 反而通常产生富含树突细胞前体的白细胞混合群体。已经鉴定了具有起树突细胞前体作用潜力的几种细胞类型。源自血液的 CD14⁺ 单核细胞, 特别是在其表面表达生长因子粒细胞-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 受体的 CD14⁺ 单核细胞是已知的树突细胞前体。其它源自血液的树突细胞前体可以通过首先除去单核细胞和其它“非树突细胞前体”而分离 (如见美国专利 5,994,126 和 5,851,756)。其它尚已知的树突细胞前体包括表达 CD34 细胞表面标记的源自骨髓的细胞。

[0007] 已用各种方法获得了富含树突细胞前体的细胞群体,例如密度梯度分离法、荧光活化细胞分选、免疫学细胞分离技术,如淘洗、补体裂解法、玫瑰花结法、磁性细胞分离技术、尼龙羊毛分离法(nylon woolseparation)和这类方法的组合。(见如 O' Doherty et al., J. Exp. Med. 178 :1067-76(1993); Young and Steinman, J. Exp. Med. 171 :1315-32(1990); Freudenthal and Steinman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :7698-702(1990); Macatonia et al., Immunol. 67 :285-89(1989); Markowicz and Engleman, J. Clin. Invest. 85 :955-61(1990) 所有这些文献以其整体并入这里作为参考)。免疫选择树突细胞的方法包括例如使用与树突细胞前体相关的细胞表面标记的抗体,如与基材偶合的抗 CD34 和 / 或抗 CD14 抗体。(见如 Bernhard et al., Cancer Res. 55 :1099-104(1995); Caux et al., Nature 360 :258-61(1992))。

[0008] 在一个典型方法实例中,用白细胞除去方法分离白细胞。另外的方法典型地被用来进一步纯化以富集认为含有树突细胞和 / 或树突细胞前体的细胞部分。类似地,方法如差速离心(如白细胞层的分离),用某些细胞表面蛋白特异性单克隆抗体淘洗(如阳性和阴性筛选)和过滤也产生含有树突细胞前体的白细胞的粗混合物。

[0009] 报道的分离增殖树突细胞前体的另一种方法是使用商品化处理的塑料基材(如珠粒或磁珠)选择性除去粘附的单核细胞和其它“非树突细胞前体”。(见如美国专利 5,994,126 和 5,851,756)。丢弃粘附的单核细胞和非树突细胞前体,而保留非粘附细胞供离体培养和成熟。在另一种方法中,脱落细胞在塑料培养袋中培养,其中添加塑料,即聚苯乙烯或苯乙烯微载体珠以增加袋子的表面积。将细胞培养充分的一段时间使细胞粘附于珠粒并从袋子中洗去非粘附细胞。(Maffei, et al., Transfusion 40 :1419-1420(2000); WO 02/44338, 并入这里作为参考)。

[0010] 在基本上所有报道的制备富含树突细胞前体的细胞群体的方法之后,典型地在体外或离体培养细胞群体进行树突细胞前体的分化或维持,和 / 或树突细胞的扩充。简言之,单核细胞性树突细胞前体的离体分化包括在细胞生长因子如细胞因子组合存在下,培养富含树突细胞前体的混合细胞群体。例如,单核细胞性树突细胞前体需要粒细胞 / 单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)与选自例如白介素 4(IL-4)、白介素 15(IL-15)、白介素 13(IL-13)、干扰素 α (IFN- α) 等的至少一个其它细胞因子组合,使细胞分化为抗原摄取、加工和 / 或呈递的最佳状态。也在某些细胞因子存在下扩充来自非单核细胞性树突细胞前体的树突细胞的数量,如除去单核细胞和其它非树突前体细胞(吸附至塑性表面)或选择 CD34+ 细胞获得的那些。GM-CSF 单独或者 GM-CSF 和 IL-4 的组合已经用在从这种增殖树突细胞前体产生树突细胞群体的方法中用于治疗用途。

[0011] 然而,这种离体分化、维持和 / 或扩充的有效性受到富含树突细胞和树突细胞前体的起始群体质量的限制。在一些培养条件下,被嗜中性白细胞、巨噬细胞和淋巴细胞或其组合严重污染的树突细胞和树突细胞前体的群体可以被前述细胞超越,产生低产量树突细胞。含有大量嗜中性白细胞、巨噬细胞和淋巴细胞或其组合的树突细胞的培养不太适合用作免疫刺激制剂。

[0012] 一旦获得不成熟或成熟的树突细胞,典型地已经暴露于目标抗原和成熟剂以提供活化的成熟树突细胞。通常,在合适培养条件下,该抗原已被添加到富含不成熟或成熟的树突细胞的细胞群体。在不成熟树突细胞的情况下,然后允许细胞有足够的时间摄取和加

工该抗原,并在细胞表面表达与 MHC I 类或 II 类标记相关的抗原性肽。抗原可以在细胞表面、以纯化形式、以半纯化形式,如分离的蛋白或融合蛋白(如 GM-CSF- 抗原融合蛋白)、作为膜溶解产物、作为脂质体-蛋白复合物和用其它方法呈递给不成熟树突细胞。此外,由于成熟树突细胞不能够摄取和加工抗原,因此与 MHC I 类或 MHC II 类分子结合的抗原性肽可以添加给成熟树突细胞进行呈递。

[0013] 一旦已经获得活化树突细胞,将它们给予患者刺激免疫反应。活化树突细胞可以通过弹丸注射、连续输注、来自植入物的缓释或本领域已知的其它合适技术给予患者。活化树突细胞也可以与生理学可接受的载体、赋形剂、缓冲液和 / 或稀释剂共同给予。此外,活化树突细胞可用于活化 T 细胞,如细胞毒性 T 细胞,体外使用熟练技术人员熟知的方法。抗原特异性细胞毒性 T 细胞能因此给予患者以治疗例如生长的肿瘤或细菌或病毒感染。这些组合物可以单独或作为其它疗法的辅助剂使用,其它疗法有例如手术切除术、化疗、放疗及其组合,以及适合于待治疗病症的其它治疗形式。

[0014] 本发明发现与现有方法相反,单核细胞性树突细胞前体可以在合适条件下分化为和维持不成熟树突细胞,所述条件完全适宜在单独存在 GM-CSF,无另外的细胞因子的情况下加工和呈递抗原。该方法包括提供包含尚未活化的树突细胞前体的细胞群体,和在补充 GM-CSF,无任何另外细胞因子的树突细胞培养基中体外或离体培养该细胞。典型地用于富集树突细胞前体的细胞群体的方法可以活化前体细胞启动细胞最终分化例如巨噬细胞。其它细胞因子的添加,例如 IL-4、IL-13、IL-15 或 TNF- α 与细胞活化相关的分离效果相反。本发明方法的实践提供了在摄取、加工和呈递所选择抗原的最佳状态下获得和维持不成熟树突细胞的简单和费用更低廉的方法。

发明内容

[0015] 本发明提供了在摄取、加工和呈递所选择抗原的最佳状态下离体或体外分化为和维持不成熟树突细胞的方法。该方法包括提供细胞群体,该细胞群体包含未活化的单核细胞性树突细胞前体,即在它们表面表达 GM-CSF 受体的单核细胞,和其它这种树突细胞前体,和使未活化的树突细胞前体与补充粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,缺少另外的细胞因子的树突细胞培养基接触。与现有方法相反,从分离的未活化的单核细胞性树突细胞前体产生树突细胞不需要另外的细胞因子。

[0016] 通过例如抑制或阻断在典型分离和 / 或富集加工期间或在细胞培养期间前体细胞粘附至细胞将接触的固体表面可以防止单核细胞性树突前体细胞的活化。固体表面可以是用于获得或离体或体外维持细胞的培养容器,如细胞培养烧瓶、瓶子或袋子。固体表面还可以是产生富集树突细胞前体的细胞群体中使用的容器或装置的任何表面,如过滤器表面;用于纯化的珠粒,如磁性、玻璃或塑料珠粒;试管、培养容器等。未活化的单核细胞性树突细胞前体粘附的抑制可以通过向细胞培养物或分离培养基中添加高浓度动物或人蛋白。这里使用的高浓度动物或人蛋白包含约 1 至约 10% w/v 蛋白。动物蛋白可以包括白蛋白、血清、血浆、明胶、聚氨基酸等等,只要它们自己不活化细胞。通过向细胞培养物和 / 或分离培养基中添加金属螯合剂也可以阻断或抑制单核细胞性树突前体细胞的活化。金属螯合剂可以包括 EDTA、EGTA 等等。据信通过降低培养基中二价阳离子金属的浓度,这些树突细胞剂的添加使前体细胞的活化减到最少。

[0017] 通过分离或富集和在低细胞亲合力培养容器中培养树突前体细胞也可以防止或抑制单核细胞性树突前体细胞的活化。低细胞亲合力培养容器典型地包括材料如聚丙烯、Teflon[®]、PFTE 等等。如同添加动物或人蛋白一样,降低或阻断树突前体细胞粘附于固体表面防止细胞活化并允许细胞在补充 GM-CSF,无任何另外的细胞因子的树突细胞培养基中分化为和维持不成熟树突细胞。在大约 37℃ 以下的温度,如室温进行前体细胞的分离进一步降低在细胞群体中活化下的单核细胞性树突前体细胞的比例。本发明的方法可以包括任何或所有这些试剂、材料和 / 或条件的组合。在本发明的一个特定实施方案中,树突细胞培养基不含血清,且添加动物蛋白,如血清白蛋白以降低树突细胞前体对于培养容器表面的亲合力,防止和 / 或降低单核细胞性树突前体细胞的活化。

[0018] 典型地,从外周血、除去白细胞的产物、脱落产物、脐带血、脾、淋巴结、胸腺或骨髓获得包含单核细胞性树突前体细胞的细胞群体。在实施本发明方法之前和之后,可以低温贮藏细胞群体。此外,通过切向流过滤、抗体淘洗、差速离心等等该细胞群体可以进一步富集单核细胞性前体细胞。当通过切向流过滤进一步富集细胞群体时,过滤器典型地包括 5.5 微米孔,再循环速度是约 1400 毫升 / 分钟,过滤速率是约 15 至约 21 毫升 / 分钟,典型地 17 毫升 / 分钟,和过滤时间是约 60 至约 90 分钟。(见如 W02004/000444,2003 年 12 月 31 日公开,并入这里作为参考)

[0019] 用本发明方法获得的不成熟树突细胞可以与所选择的感兴趣抗原接触足以摄取和加工该抗原的一段时间。一旦被加工,该抗原被呈递到树突细胞的表面。此外,不成熟树突细胞可以在接触感兴趣抗原之前、同时或之后接触树突细胞成熟剂。树突细胞成熟剂可以包括卡介苗 (BCG)、脂多糖 (LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ) 或其组合。在本发明的特定实施方案中,树突细胞成熟剂是灭活 BCG 和 IFN- γ 的组合。本发明方法中有用的所选抗原包括但不限于肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、肿瘤细胞、从肿瘤细胞获得的核酸、细菌细胞、病毒颗粒、表达抗原的重组细胞、细胞溶解产物、膜制剂、重组制备的抗原、来源于感兴趣抗原的肽、或感兴趣的分离的抗原。在任何阶段,包括树突细胞接触所选择抗原、摄取、加工和成熟之后,可以低温贮藏细胞供随后使用。

附图说明

[0020] 图 1 描绘了 CD14 和 CD1a 在树突细胞上表面表达的直方图,以评估在单独存在 GM-CSF,无另外的细胞因子的情况下,和在阻止与细胞培养容器表面紧密结合的阻断剂 (3% 人血清白蛋白 ;HSA) 存在下,单核细胞性树突细胞前体体外分化为 CD1a⁺ 树突细胞。

[0021] 图 2 描绘了 CD1a 和 CD14 的表达测定,作为在缺少 IL-4 下,体外培养后单核细胞分化为树突细胞 (DC) 的结果。用“活”CD11c⁺ 细胞上标记 CD1a 和 CD14 的相互表达表示分化。图 2A 表明了在第 5 天 DC 上 CD1a 相对于其在前体单核细胞表面上的表达上调。图 2B 表明了 DC 上 CD14 的表达相对于其在前体单核细胞上的水平下调。显示了各个培养物,在单核细胞系 (CD11c⁺) 细胞上电子启门后 (i) 亚型和 (ii) 由平均荧光强度 (mfi) 测定的相对表达的数据。已经减去了有关同型对照抗体观察到的背景染色。这些数据代表从两个单独供体分离和培养的单核细胞的平均数。

[0022] 图 3 描绘了来自在 GM-CSF 和 IL-4 或单独 GM-CSF 中培养之前允许紧密粘附或松散粘附于基材的单核细胞性树突细胞前体的 IL-12 p70 分泌物的定量。

[0023] 图 4 描绘了在单独 GM-CSF 中培养的单核细胞性树突前体细胞的典型树突细胞标记的表达。

[0024] 图 5 描绘了在单独补充 GM-CSF 的细胞培养基中的未活化的单核细胞体外分化为树突细胞的动力学,如 CD1a 和 CD14 的表达测定。

[0025] 图 6A 直至 6E 描绘了在 Teflon[®] 袋或塑料组织培养瓶,单独补充 GM-CSF 或 GM-CSF 加 IL-4 的细胞培养基中,在存在或缺少树突细胞成熟因子下培养的未活化的单核细胞变为树突细胞的表型比较。图 6A 描绘了 CD1a 阳性的细胞的百分比。图 6B 描绘了 CD83 阳性的细胞的百分比。图 6C 描绘了 CD80 的相对表达 (mfi) 水平。图 6D 描绘了 CD86 的相对表达 (mfi) 水平。图 6E 描绘了 HLA-DR 的相对表达 (mfi) 水平。

[0026] 图 7A 和 7B 描绘了在单独 GM-CSF 或 GM-CSF 和 IL-4 存在下培养,和随后接触对照抗原钥孔血蓝素或流感 A M1-A4 40mer 肽和树突细胞成熟剂,粘附于涂布玻璃的微载体珠而产生的树突细胞的抗原特异性 T 细胞反应。图 7A 描绘了从供体 P016 分离的细胞的抗原特异性细胞毒性 T 细胞分析,和图 7B 是供体 P052 的类似分析。

[0027] 图 8A 和 8B 描绘了在缺少 IL-4 下体外培养后,分化为树突细胞 (DC) 的单核细胞系的细胞上的表型分布图。“活”CD11c⁺ 细胞上显示所有亚型上的标记和它们的相对表达 (mfi) 水平。图 8A 描绘了在单核细胞和第 5 天 DC 上共表达特异性标记的 CD11c⁺ 细胞的百分比。图 8B 描绘了表型标记的相对表达。显示了来自命名为 63665 和 63666 的两个不同供体的各个培养物,在单核细胞系 (CD11c⁺) 细胞上电子启门后 (i) 亚型和 (ii) 由平均荧光强度 (mfi) 测定的相对表达的数据。已经减去了有关同型对照抗体观察到的背景染色。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明提供了单核细胞性树突细胞前体分化为不成熟树突细胞 (DC) 的方法。尚未活化的单核细胞性树突细胞前体可以接触补充 GM-CSF 作为唯一细胞因子的树突细胞培养基以诱导细胞分化为和维持不成熟树突细胞。仅仅需要添加单个细胞因子的方法使用比较廉价并且比以前使用的方法更有效,以前使用的方法需要添加其它细胞因子以防止单核细胞性树突细胞分化为其它细胞类型,包括例如巨噬细胞等等。

[0030] 用本发明方法产生的不成熟树突细胞在表型和功能上类似于使用更复杂培养条件的现有方法产生的细胞,并且随后可以接触树突细胞成熟因子,如 BCG 和 IFN γ , 并且任选在合适成熟条件下接触预定抗原。抗原可以在本发明的不成熟树突细胞成熟期间或之前接触它们。

[0031] 单核细胞性树突细胞前体和不成熟树突细胞

[0032] 这里使用的单核细胞性树突细胞前体包括在其表面具有 GM-CSF 受体的单核细胞和对 GM-CSF 起反应的其它髓细胞样前体细胞。该细胞可以从它们驻留的任何组织获得,特别是淋巴组织如脾、骨髓、淋巴结和胸腺。单核细胞性树突细胞前体也可以从循环系统分离。外周血是单核细胞性树突细胞前体易得的来源。脐带血是单核细胞性树突细胞前体的另一来源。单核细胞性树突细胞前体可从其中可以引出免疫反应的各种生物分离。这种生物包括,例如人,和非人动物,如灵长类动物、哺乳动物 (包括狗、猫、小鼠和大鼠)、禽类 (包括小鸡),及其转基因物种。

[0033] 在某些实施方案中,单核细胞性树突细胞前体和 / 或不成熟树突细胞可以从健康受试者或从需要免疫刺激的受试者分离,例如癌症患者或可以受益于或需要细胞免疫刺激

的其他受试者（即具有细菌、病毒或寄生虫感染等等的受试者）。单核细胞性树突细胞前体和/或不成熟树突细胞也可以从HLA匹配的健康个体获得，来转变为不成熟树突细胞、成熟、活化和给予需要免疫刺激的HLA匹配的受试者。

[0034] 从上面提供的各种来源，包括血液和骨髓，分离未活化的单核细胞性树突细胞前体和/或不成熟树突细胞的方法可以用很多方法完成。典型地，从个体收集细胞群体并富集未活化的单核细胞性树突细胞前体。例如，用白细胞除去法、脱落、密度离心、差异裂解、过滤、抗体淘洗或制备白细胞层，可以从外周血获得包含未活化的单核细胞性树突细胞前体的细胞混合群体。所选方法应该不活化单核细胞性树突细胞前体。例如，如果选择抗体淘洗富集前体的细胞群体，所选择的抗体不该活化细胞，如，通过诱导钙离子流入，它可以引起分子交联至抗体结合的表面上。典型地，当抗体淘洗时，使用清除巨噬细胞、B细胞、自然杀伤细胞、T细胞等等的抗体。抗体还可以用来肯定地选择表达CD14的单核细胞样细胞。

[0035] 在本发明的一个实施方案中，通过防止包含单核细胞性树突细胞前体的细胞群体紧密粘附于细胞培养容器制备未活化的单核细胞性树突细胞前体。通过例如向用于体外或离体维持树突细胞前体培养基中添加阻断剂可以防止紧密粘附。这种阻断剂可以包括高浓度蛋白，包括例如但不限于动物或人蛋白，如白蛋白、血清、血浆、明胶、聚氨基酸等等。尤其是，典型地使用来自牛或人来源的白蛋白。典型地，使用浓度约1%至约10% w/v的阻断剂。尤其是，可以使用浓度约1%、2%或直至约5%或更高的人血清白蛋白（HSA）。应注意的是必须选择本身不活化细胞的阻断剂。培养基可以是典型地用于单核细胞性树突细胞前体培养的任何培养基，包括不需要血清的那些。

[0036] 在本发明的另一实施方案中，可以向培养基中添加金属螯合剂，通过螯合二价阳离子，包括例如但不限于钙离子，进一步防止或降低单核细胞性树突细胞的活化。低粘附或弱结合培养容器的使用还可以降低树突细胞前体粘附或结合的亲合力以防止细胞被活化。特别优选的弱结合材料包括例如但不限于聚丙烯、Teflon[®]、PFTE等等。金属螯合剂可以与上面描述的阻断剂组合使用。

[0037] 还可以在封闭、无菌系统中制备单核细胞性树突细胞前体和/或不成熟树突细胞。这里使用的术语“封闭、无菌系统”或“封闭系统”是指对非无菌周围或循环空气或其它非无菌条件的暴露减少或消除的系统。分离树突细胞前体和/或不成熟树突细胞的封闭系统通常排除在上端开放的试管中密度梯度离心、露天转移细胞、在组织培养皿或开封瓶中培养细胞等等。在典型的实施方案中，封闭系统允许树突细胞前体和/或不成熟树突细胞从初始收集器无菌转移到可密封的组织培养容器中，不暴露于非无菌空气中。

[0038] 在某些实施方案中，通过部分粘附于单核细胞结合基材分离未活化的单核细胞性树突细胞前体，如W003/010292中公开，其公开内容并入这里作为参考。例如，在防止单核细胞性树突细胞前体细胞的非特异性结合以及降低结合亲合力的阻断剂存在下，白细胞群体（如用白细胞除去法分离的）可以接触单核细胞性树突细胞前体粘附基材，如涂布玻璃的微载体珠。当白细胞群体接触基材时，白细胞群体中的单核细胞性树突细胞前体优先松散粘附于基材。其它白细胞（包括其它潜在树突细胞前体），如增殖树突细胞前体等等显示与基材的结合亲合力降低，因此允许单核细胞性树突细胞前体亚型优先富集在基材表面上。松散粘附不活化单核细胞性树突细胞前体。在细胞结合和非粘附细胞洗脱之后，用可以补充无毒螯合剂的缓冲盐溶液从基材洗脱单核细胞性树突细胞前体亚型。“无毒螯合剂”意

指基本上不降低单核细胞性树突细胞前体活力的螯合剂,例如但不限于 EDTA、EGTA 等等。

[0039] 合适的基材包括例如表面积与体积比大的基材,如玻璃珠或涂布玻璃的微载体。这种基材可以是例如微粒或纤维基材。合适的微粒基材包括例如玻璃颗粒、涂布玻璃的塑料颗粒、涂布玻璃的聚苯乙烯颗粒和其它适于蛋白吸收的珠粒。合适的纤维基材包括玻璃或涂布玻璃的微毛细管和微绒毛膜。微粒或纤维基材通常允许粘附的单核细胞性树突细胞前体被洗脱,基本上不降低粘附细胞活力。微粒或纤维基材可以基本上无孔,以促进从基材洗脱单核细胞性树突细胞前体或树突细胞。“基本上无孔”基材是其中基材中存在的至少大多数孔小于使捕获基材中细胞减到最少的细胞的基材。

[0040] 添加结合介质可以任选地调节单核细胞性树突细胞前体与不活化基材的粘附。合适的结合介质包括单独或以任何组合补充例如细胞因子(如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、血浆、血清(如人血清,如自体或同种异体血清)、纯化蛋白、如血清白蛋白、二价阳离子(如钙和/或镁离子)和辅助单核细胞性树突细胞前体与基材特异性粘附或防止非单核细胞性树突细胞前体与基材粘附的其它分子的单核细胞性树突细胞前体培养基(如 AIM-V[®]、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15[®]等等)。在某些实施方案中,血浆或血清可以是热灭活的。热灭活血浆可以是白细胞自体的或异源的。

[0041] 在从血液组分样品富集单核细胞性树突细胞前体的细胞群体的另一种方法中,提供了从血液样品中的细胞碎屑、红细胞和其它细胞和颗粒切向流过滤白细胞。WO2004/000444 描述了该装置及其用途,全面并入这里作为参考。该方法包含(1)将血液样品引入切向流过滤(TFF)装置,TFF 装置包含交叉流动错流室、滤液室和与交叉流动错流室和滤液室流动联系的过滤器,过滤器具有约 1 至约 10 微米的孔径大小,典型地约 5.5 微米;(2)样品再循环通过 TFF 装置,以预定输入速率,典型地约 1400 毫升/分钟,和预定过滤速率,典型地约 15 至约 21 毫升/分钟,更典型地约 17 毫升/分钟,预定输入速率至少是预定过滤速率的五倍;其中过滤器的预定过滤速率小于不反向的过滤速率;和(3)分离富含白细胞的细胞群体。典型地,过滤时间是约 60 至约 90 分钟。该方法可以产生基本上不含非白细胞血液组分的富集细胞群体,非白细胞血液组分包括血浆、血小板和红细胞。用这种方法产生的富集细胞群体可以包含尚未活化的至少约 50%单核细胞性树突细胞前体和优选至少约 70%单核细胞性树突细胞前体。该方法可以进一步包括从受试者收集血液和在切向流过滤前,用白细胞除去法、密度离心、差异裂解、过滤或制备白细胞层从血液制备样品。在室温或以下(即低于 37°C)进行单核细胞的 DC 前体的 TFF 纯化进一步辅助降低细胞活化。

[0042] 在离体或体外培养富含未活化的单核细胞性树突细胞前体的细胞群体用于分化、成熟和/和扩充。(这里使用的分离的不成熟树突细胞、树突细胞前体、T 细胞和其它细胞是指人工产生的远离它们的原初环境而存在的,并因此不是原初产物的细胞。分离的细胞可以以纯化形式、半纯化形式或在非原初环境中存在。)简言之,离体分化典型地包括在一种或多种分化剂存在下培养未活化的树突细胞前体,或包含未活化的树突细胞前体的细胞群体。尤其是,本发明中的分化剂是单独使用的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),无其它添加的细胞因子,特别是不使用白介素 4(IL-4)。在某些实施方案中,未活化的单核细胞性树突细胞前体分化形成源自单核细胞的不成熟树突细胞,它们能够在外周血单核细胞群体中诱导大量 T 细胞的活化和增殖。

[0043] 树突细胞前体可以在合适的培养条件下分化为和维持不成熟树突细胞前体。合适的组织培养基包括补充 GM-CSF 的 AIM- $\mathbf{V}^{\circledR}$ 、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO $\mathbf{15}^{\circledR}$ 等等。组织培养基可以补充血清、氨基酸、维生素、二价阳离子等等以促进细胞分化为树突细胞。在某些实施方案中,可以在无血清培养基中培养树突细胞前体。这种培养条件可以任选排除任何源自动物的产物。典型地,向培养基中添加浓度约 100 至约 1000 单位 / 毫升,或典型地 500 单位 / 毫升的 GM-CSF。树突细胞前体,当分化形成不成熟树突细胞时显示出在不成熟单核细胞性树突细胞见到的细胞表面蛋白的典型表达模式,如该细胞典型地是 CD14⁻和 CD11c⁺、CD83⁻和表达低水平 CDF86。此外,不成熟树突细胞能够通过专门摄取机制捕获可溶性抗原。

[0044] 不成熟树突细胞可以成熟而形成成熟树突细胞。成熟 DC 释放吸收抗原的能力,和细胞显示上调表达共刺激细胞表面分子并分泌各种细胞因子。具体地说,成熟 DC 表达较高水平 MHC I 和 II 类抗原并通常鉴定为 CD80⁺、CD83⁺和 CD86⁺。更大的 MHC 表达导致 DC 表面上抗原密度增加,而共刺激分子 CD80 和 CD86 的上调通过共刺激分子的对应物来增强 T 细胞活化信号,如 T 细胞上的 CD28。

[0045] 通过使在 GM-CSF 单独存在下培养的不成熟树突细胞与有效量或浓度的树突细胞成熟剂接触可以制备成熟树突细胞(即,成熟)。树突细胞成熟剂可以包括例如 BCG、IFN γ 、LPS、TNF α 等等。典型地,有效量 BCG 在每毫升组织培养基约 10^5 至 10^7 cfu 的范围。典型地,有效量 IFN γ 在每毫升组织培养基约 100-1000U 的范围。卡介苗 (BCG) 是无毒牛分枝杆菌菌株。这里使用的 BCG 是指全部 BCG 以及与诱导 2 型免疫反应相关的细胞壁组分、源自 BCG 的脂阿拉伯甘露聚糖 (lipoarabidomannans) 和其它 BCG 组分。任选灭活的 BCG,如热灭活 BCG、福尔马林处理的 BCG 等等。

[0046] 典型地,不成熟 DC 与有效量 BCG 和 IFN γ 接触约 1 小时至约 48 小时。不成熟树突细胞可以在合适成熟培养条件下培养和成熟。合适的组织培养基包括 AIM- $\mathbf{V}^{\circledR}$ 、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO $\mathbf{15}^{\circledR}$ 等等。组织培养基可以补充氨基酸、维生素、细胞因子如 GM-CSF、二价阳离子等等以促进细胞的成熟。典型地,使用约 500 单位 / 毫升 GM-CSF。

[0047] 可以通过本领域对于树突细胞的已知方法来监测树突细胞的成熟。在本领域熟知试验中可以检测到细胞表面标记,如流式细胞术、免疫组织化学法等。还可以监测细胞的细胞因子产生(如通过 ELISA,另一种免疫测定法或通过使用寡核苷酸阵列)。本发明的成熟 DC 也释放摄取抗原的能力,这可以通过本领域普通技术人员熟知的摄取试验来分析。

[0048] 抗原

[0049] 用本发明方法制备的成熟、致敏的树突细胞可以向 T 细胞呈递抗原。不成熟树突细胞在成熟之前或成熟期间与预定抗原接触可以形成成熟、致敏的树突细胞。

[0050] 用于本发明的合适预定抗原可以包括 T 细胞活化所需的任何抗原。这种抗原可以包括例如细菌细胞、或包含细菌抗原的其它制剂、肿瘤特异性或肿瘤相关抗原(如整个肿瘤或癌细胞、肿瘤细胞溶解产物、肿瘤细胞膜制剂、从肿瘤分离或部分分离的抗原、融合蛋白、脂质体等等)、病毒颗粒或包含病毒抗原的其它制剂,和任何其它抗原或抗原片段,如肽或多肽抗原。在某些实施方案中,抗原可以与前列腺癌有关,例如该抗原可以是但不限于前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、前列腺酸性磷酸酶 (PAP) 或前列腺特异性抗原 (PSA)。(见如 Pepsidero et al., Cancer Res. 40 :2428-32(1980) ;McCormack et al., Urology45 : 729-44(1995)。)该抗原也可以是细菌细胞、细菌溶解产物、来自细胞溶解产物的膜片段,或

本领域已知的任何其它来源。抗原可以被表达或重组产生或甚至化学合成。重组抗原还可以在宿主细胞（如细菌、酵母、昆虫、脊椎动物或哺乳动物细胞）表面表达，可以存在于溶解产物中，或可以从溶解产物中纯化。或者，抗原可以由从肿瘤细胞纯化或扩增的核酸编码，该核酸可以是核糖核酸（RNA）或脱氧核糖核酸（DNA）。

[0051] 抗原还可以存在于来自受试者的样品中。例如，来自受试者中过度增生或其它病症的组织样品可以用作抗原来源。这种样品可以通过例如活体解剖或手术切除获得。这种抗原可以用作溶解产物或作为分离制剂。或者，来自受试者（如癌症患者）的细胞的膜制剂，或确立的细胞系也可以用作抗原或用作抗原或编码该抗原的核酸的来源。

[0052] 在示范的实施方案中，从手术标本回收的肿瘤细胞溶解产物可以用作抗原的来源。例如，活体解剖或手术切除获得的癌症患者自身肿瘤样品可以直接用于给树突细胞呈递抗原或提供用于抗原呈递的细胞溶解产物或核酸。或者，可以使用癌症患者肿瘤细胞的膜制剂。肿瘤细胞可以是例如前列腺、肺、卵巢、结肠、脑、黑素瘤或任何其它类型的肿瘤细胞。用本领域已知方法可以由分离的肿瘤细胞制备溶解产物和膜制剂。

[0053] 在另一示范的实施方案中，与单克隆抗体 7E11-C.5 特异性反应的纯化或半纯化前列腺特异性膜抗原（PSMA，亦称 PSM 抗原）可以用作抗原。（通常见 Horoszewicz et al., Prog. Clin. Biol. Res. 37 :115-32(1983), 美国专利 5,162,504 ;美国专利 5,788,963 ;Feng et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 32 : (Abs. 1418) 238(1991) ;它们的公开内容并入这里作为参考）。在又一个示范的实施方案中，与 PSMA 的氨基酸残基 4-12 对应的具有氨基酸残基序列 Leu Leu His GluThr Asp Ser Ala Val (SEQ ID NO :1)（命名为 PSM-P1）的抗原性肽可以用作抗原。或者，与 PSMA 的氨基酸残基 711-719 对应的具有氨基酸残基序列 Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val (SEQ ID NO :2)（命名为 PSM-P2）的抗原性肽可以用作抗原。

[0054] 在特定的实施方案中，具有氨基酸残基序列 Xaa Leu(或 Met)XaaXaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val(或 Leu)（命名为 PSM-PX），其中 Xaa 代表任何氨基酸残基的抗原性肽可以用作抗原。这个肽类似 HLA-A0201 结合基序，即具有 HLA-A2 患者中发现的“固定残基”亮氨酸和缬氨酸的 9-10 个氨基酸残基的结合基序。（见如 Grey et al., Cancer Surveys22 :37-49(1995)。）这个肽可以用作 HLA-A2⁺ 患者的抗原（见 Central Data Analysis Committee" Allele Frequencies", Section6.3, Tsuji, K. et al. (eds.), Tokyo University Press, pp. 1066-1077）。类似地，可以使用类似其它 HLA 结合基序的肽。

[0055] 典型地，在树突细胞成熟剂，如 BCG、IFN γ 、LPS、TNF α 或其组合，和如上所述合适成熟条件下的预定抗原存在下，培养用本发明方法获得的不成熟树突细胞。任选，在有或者没有 GM-CSF 和 / 或成熟剂的典型树突细胞培养基中，不成熟树突细胞可以与预定抗原混合。与抗原培养至少约 10 分钟至约 2 天后，可以除去抗原并可以添加补充 BCG 和 IFN γ 的培养基。GM-CSF 也可以添加到无另外细胞因子如 IL-4 的成熟培养基中。树突细胞与抗原接触的方法是本领域通常已知的。（通常见 Steel and Nutman, J. Immunol. 160 :351-60(1998) ; Tao et al., J. Immunol. 158 :4237-44(1997) ; Dozmorov and Miller, Cell Immunol. 178 : 187-96(1997) ; Inaba et al., J Exp Med. 166 :182-94(1987) ; Macatonia et al., J Exp Med. 169 :1255-64(1989) ; De Bruijn et al., Eur. J. Immunol. 22 :3013-20(1992) ;其公开内容并入这里作为参考）。

[0056] 然后所产生的成熟、致敏的树突细胞与 T 细胞,如原初 T 细胞共同培养。可以从各种淋巴组织获得 T 细胞或 T 细胞亚型用作应答细胞。这种组织包括但不限于脾、淋巴结和/或外周血。细胞可以与成熟、致敏的树突细胞作为混合 T 细胞群体或作为纯化 T 细胞亚群共培养。通过阳性或阴性筛选可以完成 T 细胞纯化,包括但不限于使用针对 CD2、CD3、CD4、CD8 等等的抗体。

[0057] 通过 T 细胞与成熟、致敏的树突细胞接触,提供了抗原反应性的、或活化的、极化 T 细胞或 T 淋巴细胞。这里使用的术语“极化”是指产生高水平 IFN γ 或否则致敏的 1 型 (Th-1) 反应的 T 细胞。这种方法典型地包括树突细胞与 BCG 和 IFN γ 接触以制备成熟、致敏的树突细胞。不成熟树突细胞可以在成熟期间或之前接触预定抗原。不成熟树突细胞可以在成熟期间与 T 细胞 (如原初 T 细胞) 共培养,或在成熟和树突细胞致敏诱导 1 型反应后与 T 细胞 (如原初 T 细胞) 共培养。此外,成熟前,可以部分纯化或富集不成熟树突细胞或成熟树突细胞。此外,在接触树突细胞前,可以从淋巴细胞群体富集 T 细胞。在具体的实施方案中,富集或纯化的 CD4⁺T 细胞群体接触成熟、致敏的树突细胞。成熟、致敏的树突细胞与 T 细胞的共培养导致特异性 T 细胞刺激,其成熟变为抗原反应性 CD4⁺T 细胞或抗原反应性 CD8⁺T 细胞。

[0058] 在另一方面,该方法提供了 T 细胞的体外再刺激,通过在不成熟树突细胞或致敏诱导 1 型 (Th-1) T 细胞反应的成熟树突细胞存在下培养细胞。任选可以在饲养细胞上培养这种 T 细胞。任选可以在接触 T 细胞前,照射不成熟树突细胞或成熟、致敏的树突细胞。合适的培养条件可以包括一种或多种细胞因子 (如纯化 IL-2、伴刀豆球蛋白 A 刺激的脾细胞上清液、白介素 15 (IL-15) 等等,以及其组合)。这种 T 细胞的体外再刺激可用于促进 T 细胞群体的扩充。

[0059] 通过周期性再刺激,稳定的抗原特异性、极化 T 细胞培养物或 T 细胞系可以在体外维持长的一段时间。可以保存由此产生的 T 细胞培养物或 T 细胞系,和如果保存 (如用低温贮藏和冷冻制剂) 用于以期望间隔再供应活化、极化 T 细胞用于长期使用。

[0060] 在某些实施方案中,按照本发明的方法可以产生活化的 CD8⁺ 或 CD4⁺T 细胞。典型地,用于产生抗原反应性的、极化 T 细胞的成熟、致敏的树突细胞与待给予它们的受试者是同基因的 (如从受试者获得)。或者,可以使用来自 HLA 匹配的供体的非癌细胞 (如正常细胞) 体外制备与预定受体受试者具有相同 HLA 单倍型的树突细胞。在具体实施方案中,体外扩充抗原反应性的 T 细胞,包括 CTL 和 Th-1 细胞作为对于治疗的细胞来源。

[0061] 根据本发明的又一个方面,可以保存未活化的单核细胞性树突前体细胞、不成熟树突细胞和成熟致敏的树突细胞,如通过低温贮藏。在继续这里描述的加工前可以回收每个群体。例如,可以从患者获得除去白细胞的或脱落产物形式的单核细胞性树突细胞前体,之后在粘附阻断剂和 GM-CSF 存在下在树突细胞培养基中培养形成和维持不成熟树突细胞。在制备不成熟树突细胞之后,在暴露于抗原和成熟前或在给予待治疗患者之前,可以低温贮藏这些细胞。可以使用的低温贮藏剂包括但不限于二甲基亚砜 (DMSO)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、白蛋白、右旋糖酐、蔗糖、乙二醇、i- 赤藓醇、D- 核糖醇、D- 甘露醇、D- 山梨糖醇、i- 肌醇、D- 乳糖、氯化胆碱、氨基酸、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯和无机盐。典型地,不同的低温防护剂和不同的细胞类型具有不同的最佳冷却速度。水变成冰的熔化热相应该最小。通过使用例如程序可控的冷冻装置或甲醇浴方法可以实施冷却过程。程序可控

的冷冻装置允许测定最佳的冷却速度和促进标准可复现冷却。程序可控的控速冷冻器如 Cryomed 或 Planar 允许冷冻方式与期望的冷却速率曲线一致。

[0062] 彻底冷冻后,可以将树突细胞迅速转入长期深冷储藏容器。在典型实施方案中,样品可以低温贮藏在液氮(-196°C)或它的蒸气(-165°C)中。对于造血干细胞,特别是来自骨髓或外周血的造血干细胞的操作、低温贮藏和长期储存的考虑和方法很多适用于本发明的未活化的树突细胞。可以在例如下列参考文献中找到造血干细胞低温贮藏的讨论,并入这里作为参考:Taylor et al., *Cryobiology* 27:269-78(1990); Gorin, *Clinics in Haematology* 15:19-48(1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, Jul. 22-26, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107-186。

[0063] 典型地,使冷冻细胞迅速融化(如在维持在 $37-41^{\circ}\text{C}$ 的水浴中)和融化后立即冷却。可能期望这样处理细胞以免融化时细胞凝块。为防止凝块,可以使用各种方法,包括但不限于冷冻之前和/或之后添加 DNA 酶 (Spitzer et al., *Cancer* 45:3075-85(1980))、低分子量右旋糖酐和柠檬酸盐、羟乙基淀粉 (Stiff et al., *Cryobiology* 20:17-24(1983)) 等等。低温防护剂如果对人体有毒性,应该在融化的低粘附树突细胞治疗使用前除去。其中除去低温防护剂的一个方法是稀释至微不足道的浓度。一旦已融化和回收冷冻的 DC,它们可用于活化 T 细胞,如这里对于非冷冻的 DC 所描述。

[0064] 体内给予细胞群体

[0065] 在本发明的另一方面,提供了给需要免疫刺激的受试者施用成熟、致敏的树突细胞或活化、极化的 T 细胞,或含有这类细胞的细胞群体的方法。这种细胞群体可以包括不成熟树突细胞、部分成熟的树状细胞、成熟、致敏的树突细胞群体和/或活化、极化的 T 细胞群体。在某些实施方案中,通过获得未活化的树突细胞前体或不成熟树突细胞,用 GM-CSF,在缺少另外细胞因子的情况下分化那些细胞,和在成熟剂,例如 BCG 和/或 IFN γ 和预定抗原存在下使那些细胞成熟,形成对 Th-1 反应致敏的成熟树突细胞群体来实施该方法。不成熟树突细胞可以在成熟之前或期间与抗原接触。这种成熟、致敏的树突细胞可以直接给予需要免疫刺激的受试者。

[0066] 在相关实施方案中,成熟、致敏的树突细胞可以接触来自受试者的淋巴细胞,刺激淋巴细胞群体内的 T 细胞。活化、极化的淋巴细胞,任选继之以在抗原反应性 CD4^{+} 和/或 CD8^{+} T 细胞的细胞培养物中克隆扩充,可以给予需要免疫刺激的受试者。在某些实施方案中,活化、极化的 T 细胞是受试者自体的。

[0067] 在另一实施方案中,树突细胞、T 细胞和接受受试者具有相同 MHC (HLA) 单倍型。确定受试者的 HLA 单倍型的方法是本领域已知的。在相关实施方案中,树突细胞和/或 T 细胞对接受受试者是同种异体的。例如,树突细胞对于 T 细胞和接受受试者可以是同种异体的,其具有相同 MHC (HLA) 单倍型。典型地,异源细胞与至少一个 MHC 等位基因(如共享至少一个而不是所有的 MHC 等位基因)相配。在不太典型的实施方案中,树突细胞、T 细胞和接受受试者彼此之间全部是异源的,但是全部共同具有至少一个公共 MHC 等位基因。

[0068] 根据一个实施方案,从与获得不成熟树突细胞的受试者相同的受试者获得 T 细胞。体外成熟和极化后,将自体 T 细胞给予受试者激起和/或增加存在的免疫反应。例如,可以通过静脉内输注给予 T 细胞,例如以约 10^8-10^9 个细胞/ m^2 体表面积剂量(见如 Ride11

et al., Science 257:238-41(1992), 并入这里作为参考)。可以以期望间隔重复输注, 例如每月。可以在 T 细胞输注期间和之后监测接受者的任何副作用迹象。

[0069] 根据另一实施方案, 用本申请所述方法获得的树突细胞在仅仅 GM-CSF 存在下生长, 用 BCG 和 IFN γ 成熟, 和根据本发明可以直接注射入肿瘤, 围绕肿瘤的区域或含有目标抗原的其它组织。这种成熟细胞可以摄取抗原和向体内 T 细胞呈递抗原。

具体实施方式

[0070] 提供下列实施例仅仅用于说明本发明的各个方面并不应该解释为以任何方式限制本发明。

[0071] 实施例 1

[0072] 在这个实施例中, 证明了在 GM-CSF 单独存在下, 单核细胞体外分化为 CD1a⁺ 树突细胞需要不允许细胞与培养容器形成最初粘附。

[0073] 简言之, 将 CD14⁺CD1a⁻ 单核细胞重悬于 Iscove 改良的 Dulbecco 氏培养基 (IMDM, Bio Whittaker) 加 2mM L-谷氨酰胺 (Gibco BRL) 或 X-VIVO-15[®] (Bio Whittaker) 加 3% 人血清白蛋白 (HSA, Bayer)。将细胞悬液转移到 T-25 培养瓶 (Greiner) 并在 6% CO₂、37°C 恒温箱中培养 30 分钟。培养之后, 添加人血清白蛋白 (HSA) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF, Immunex) 达到 3% HSA 和 500 单位/毫升 GM-CSF 的终浓度。两个培养物都在 6% CO₂、37°C 恒温箱中培养 4 天。使用 CD14 和 CD1a 分子特异性的标记单克隆抗体分析 CD14 和 CD1a 的表面表达并使用流式细胞术检测。点直方图代表同型对照 (背景) 染色 (图 1)。

[0074] 相差显微技术确定, 初在无 HSA 的培养基中培养的细胞、单核细胞显示与塑料紧密粘附, 如细胞在表面上逐渐展平而证明, 而在具有 HSA 的培养基中培养的细胞显示粘附程度降低。如相差显微技术确定, 球形细胞证明此。培养 4 天之后, 前一培养保留一些 CD14 表达和极低水平的 CD1a 表达。(图 1)。相比之下, 不允许与培养容器表面紧密粘附的大多数细胞是 CD14⁻ 和 CD1a⁺ 特征性不成熟树突细胞。

[0075] 在另一实施例中, 证明了当不允许细胞与 Teflon[®] 培养袋形成粘附时, 在 GM-CSF 单独存在下, 单核细胞将体外分化为 CD1a⁺ 树突细胞。

[0076] 简言之, 将从两个除去白细胞的供体分离的单核细胞独立重悬于 X-VIVO-15[®] (Bio Whittaker) 加粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF, Immunex) 和人血清白蛋白 (HSA, Plasbumin[™], Bayer) 达到 Teflon[®] 袋中 500 单位/毫升 GM-CSF 和 2% HSA 的终浓度。将袋中细胞悬液转入 6% CO₂、37°C 恒温箱 5 天。在培养期结束时, 向培养物中添加成熟剂 (1 : 400 稀释的灭活 BCG (Organon-Teknika) 和 500U/ml IFN- γ (R and D Systems))。允许成熟事件进行 4 小时。使用向前散射 (FS) 和侧面散射 (SS) 开启, 和 CD14 和 CD1a 分子特异性的标记单克隆抗体, 使用荧光活化细胞流分析术分析“活”细胞上 CD14 和 CD1a 的表面表达 (图 2A 和 2B)。同型对照抗体用作本底荧光对照, 和对于 CD1a 特异性抗体是 IgG₁, 对于 CD14 特异性抗体是 IgG_{2b}。

[0077] 最初分离的前体细胞表达高水平单核细胞典型的 CD14 和表达极低水平或无 CD1a。(图 2A 和 2B)。相比之下, 低粘附培养后的大多数细胞是 CD14⁻ 和 CD1a⁺, 如源自单核细胞的树突细胞所预期。

[0078] 实施例 2

[0079] 在这个实施例中,来源于单核细胞的不允许与培养容器表面粘附的不成熟树突细胞被成熟化和检测 IL-12 的分泌。由树突细胞分泌的 IL-12 的量与用典型方法分离的成熟树突细胞相比并在 GM-CSF 和 IL-4 存在下培养。

[0080] 简言之,将低温贮藏的单核细胞以 1×10^6 个细胞 /ml 的浓度重悬于 Iscove 改良的 Dulbecco 氏培养基 (IMDM, Bio Whittaker) 加 2mM L- 谷氨酰胺 (Gibco BRL), 缺少或存在 3% 人血清白蛋白 (HSA, Bayer)。将细胞悬液转移到每种条件的两个组织培养瓶 (Greiner), 并在 6% CO_2 、37°C 湿润恒温箱中培养 30 分钟。培育期之后,添加 HSA 达到所有瓶中 3% HSA 的终浓度。向每个培养条件添加 500 单位 / 毫升终浓度的粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF, Immunex) 或 GM-CSF 和白介素 -4 (IL-4, R & D Systems)。所有培养物都在 6% CO_2 、37°C 湿润恒温箱中培养 4 天。在培养期结束时,向培养物中添加成熟剂 (1 : 400 稀释的灭活卡介苗 (BCG, Organon-Teknika) 和 500U/ml 干扰素 - γ (IFN- γ , R and D Systems))。允许成熟进行 18-24 小时。收集培养上清并测定 IL-12p70 分泌。比较两个分开的实验产生的结果。在两个实验中,在单独补充 GM-CSF 或 GM-CSF 和 IL-4 的培养物中检测到 IL-12p70 分泌。(图 3)。此外,在两个实验中受到紧密最初粘附,随后在单独 GM-CSF 中培养的单核细胞未能分泌 IL-12p70。在一个实验中,在受到紧密最初粘附,随后在 GM-CSF 和 IL-4 存在下培养 4 天的培养物中检测到 IL-12p70 分泌。

[0081] 实施例 3

[0082] 在这个实施例中,在单独 GM-CSF 存在下培养的未活化的单核细胞中测定树突细胞典型的细胞表面标记的表达。在单独 GM-CSF 中培养的未活化的单核细胞证明了成熟 DC 典型的细胞表面标记的表达。

[0083] 简言之,将低温贮藏的单核细胞以 1×10^6 个细胞 /ml 的浓度重悬于含有 X-VIVO-15[®] (Bio Whittaker)、2% 人血清白蛋白 (Bayer) 和 500U/ml GM-CSF (Immunex) 的 DC 培养基中。将细胞悬液转移到组织培养瓶 (Greiner) 中,并在 6% CO_2 、37°C 湿润恒温箱中培养 4 天。在培养期结束时,向瓶中添加成熟剂 (1 : 400 稀释的灭活 BCG (Organon-Teknika) 和 500U/ml IFN- γ (R and D Systems))。允许成熟事件进行 18-24 小时。收获成熟 DC 并表征。细胞与 CD11c、CD1a、CD40、CD80、CD86、CD54、和 CD83 特异性的标记单克隆抗体反应。此外,用碘化丙锭 (propidium iodide) 对细胞染色。用流式细胞术检测标记。这些数据证明了回收的 80% 细胞是活的 DC (CD11c⁺ 和碘化丙锭⁺)。此外,这些细胞表达典型的 DC 标记,即,缺少 CD14 表达和 CD11c、CD1a、CD40、CD80、CD86、CD54 和 CD83 表达。(图 4)。

[0084] 实施例 4

[0085] 在这个实施例中,检测在粘附阻断剂存在下培养的单核细胞性树突前体细胞在单独补充 GM-CSF 的培养基中体外分化为树突细胞的动力学。

[0086] 简言之,将低温贮藏的单核细胞以 1×10^6 个细胞 /ml 的浓度重悬于含有 X-VIVO-15[®] (Bio Whittaker)、2% 人血清白蛋白 (Bayer) 和 500U/ml GM-CSF (Immunex) 的 DC 培养基中。将细胞悬液转移到 Teflon[®] 袋 (Americal Fluoroseal) 中,并在 6% CO_2 、37°C 湿润恒温箱中培养 5 天。在第 5 天,向培养袋中添加成熟剂 (1 : 400 稀释的灭活 BCG (Organon-Teknika) 和 500U/ml IFN γ (R and D Systems))。允许成熟事件进行约 18

小时。每天从袋中收获细胞进行 CD14 和 CD1a 表达的流式细胞术分析。这些分析的数据表明在培养开始之后 1 和 2 天之间单核细胞 (CD14⁺ 和 CD1a⁻) 开始转变为 DC (CD14⁻、CD1a⁺)。(图 5)。到第 3 天,完成表型转变。

[0087] 实施例 5

[0088] 在这个实施例中,比较在 Teflon 袋或培养瓶中各种培养条件下培养的 DC 的表型。细胞在单独 GM-CSF 或补充 IL-4 的 GM-CSF 中生长。也比较暴露或没有暴露于成熟剂的细胞的表型。

[0089] 简言之,将单核细胞以 1×10^6 个细胞 /ml 的浓度重悬于单独补充 500U/ml GM-CSF 或 GM-CSF 与 500U/ml IL-4 结合的含有 X-VIVO-15[®] (Bio Whittaker) 和 2% 人血清白蛋白 (Bayer) 的 DC 培养基中。将细胞悬液 (每个培养条件两份) 在 Teflon 袋 (American Fluoroseal) 或组织培养瓶 (仅仅 GM-CSF/IL-4 组合) 中,在 6% CO₂、37°C 恒温箱中培养。5 天后,向两份 Teflon 袋培养物之一,以及烧瓶培养物中添加成熟剂 (1 : 400 稀释的灭活 BCG (Organon-Teknika) 和 500U/ml IFN- γ (R and D Systems))。在第 6 天,收获所有培养物。用 CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 特异性的标记单克隆抗体染色,用流式细胞术检测分析它们的表型。

[0090] 全部五个培养条件的大部分 DC 表达 CD1a (89-97%)。(图 6A)。在 GM-CSF 和 GM-CSF/IL-4 培养物中,仅仅在暴露于成熟剂的培养物中观察到 DC 成熟标记、CD83 的显著表达 (图 6B)。此外,观察到共刺激分子 (CD80 和 CD86、图 6C 和 6D),以及 HLA-DR (图 6E) 的表面表达显著增加,因为这些 DC 已成熟。全部三个成熟 DC 群体中这些分子的表达水平类似。

[0091] 此外,将受到最初紧密粘附步骤的单核细胞产生的 DC 的 T 细胞刺激作用与缺少紧密粘附在粘附阻断剂存在下产生的 DC 相比。在这个研究中,两个来源的单核细胞被用作起始群体。对于紧密粘附单核细胞群体,外周血单核细胞 (PBMC) 在 OPTIMEM-1 (Gibco BRL) 加 1% 热灭活自体血浆中,在组织培养瓶 (Greiner) 中培养 1 小时。培养之后,除去非粘附细胞,在瓶表面上留下富集粘附的活化单核细胞群体。为了获得未活化的单核细胞群体,从含有人血清白蛋白 (HSA) 涂布的玻璃微载体珠的柱 (珠粒盒) 获得单核细胞。

[0092] 然后将每个单核细胞群体 (活化和未活化的) 在含 2% HSA 的 X-VIVO-15[®] 中,单独 GM-CSF 或与 IL-4 结合存在下培养 5 天。在用 BCG (1 : 400 稀释的) 和 IFN- γ (500U/mL) 洗涤和成熟前,向所产生的不成熟 DC 负载流感 A M1-A4 40mer 肽或钥孔血蓝素 (KLH) 一小时。收获和洗涤成熟 DC 以后,以 1 : 10 DC : PBMC 比率在第 2 天直至第 8 天补充 20ng/ml IL-2 的 AIM- γ [®] 加 5% 人 AB 血清 (HuAB 血清) 中建立 DC 与自体 PBMC 的共培养物。培养八天之后,收获 T 细胞系并用流式细胞术分析 M1-A4 特异性 CD8⁺ T 细胞扩充 (V β 17⁺CD8⁺T 细胞)。

[0093] 与 KLH 对照相比,与塑料粘附产生的 DC 需要 IL-4 产生流感 (M1-A4) 特异性反应。(图 7A)。然而,由珠粒盒分离的单核细胞 (未活化的),当它们产生期间单独使用 GM-CSF 时,所产生的 DC 启动二级 CD8⁺ T 细胞反应最有效。(图 7B)。

[0094] 实施例 6

[0095] 在这个实施例中,在已经通过切向流过滤富集并在单独 GM-CSF 存在下培养的未活化的单核细胞中测定树突细胞典型的细胞表面标记的表达。在单独 GM-CSF 中培养的树

突细胞证明了成熟 DC 典型的细胞表面标记的表达。

[0096] 简言之,通过切向流过滤方法从两个不同的供血者预先分离低温贮藏的单核细胞。这个方法包括具有孔径大小 5.5 微米的过滤器的装置中 TFF 单核细胞样品。再循环(输入)速率约 1400ml/分钟,过滤速率约 17ml/分钟,和时间约 90 分钟。将富集的单核细胞性树突细胞前体以 1×10^6 个细胞/ml 的浓度在含有 X-VIVO-15[®] (Bio Whittaker)、2% 人血清白蛋白 (Bayer) 和 500U/ml GM-CSF (Immunex) 的 DC 培养基中单独培养。细胞悬液在 Teflon[®] 袋中、在 6% CO₂、37°C 湿润恒温箱中培养 5 天。在培养期结束时,向培养物中添加成熟剂 (1 : 400 稀释的灭活 BCG (Organon-Teknika) 和 500U/ml IFN- γ (R and D Systems))。允许成熟事件进行 4 小时。收获成熟 DC 并表征。细胞与 CD11c、CD1a、CD40、CD54、CD80、CD86 和 CD83 特异性的标记单克隆抗体反应。使用向前散射 (FS) 和侧面散射 (SS) 开启和分子特异性的标记单克隆抗体,使用流式细胞术检测来分析“活”细胞上的标记表达。此外,用碘化丙锭对细胞染色。用流式细胞术检测标记。回收的 80% 以上细胞属于单核细胞系,表达 CD11c 并且是“活的”DC (碘化丙锭⁺, 未显示)。缺少 IL4 下分化的细胞显著表达典型的 DC 标记,即, CD14 表达,和 CD1a、CD40、CD80、CD86、CD54 和 CD83 的表达降低 (图 8A 和 8B)。使用同型对照抗体并且是 IgG₁ 测定本底荧光,CD14 例外,同型对照是 IgG_{2b} 抗体。

[0097] 实施例 7

[0098] 在这个实施例中,确定了暴露于塑料表面 (即组织培养瓶) 的单核细胞变为活化的,除非通过添加阻断剂,像人血清白蛋白 (HAS) 阻断紧密相互作用。

[0099] 将单核细胞 (1×10^6 个/ml) 铺在组织培养瓶中 Iscove 改良的 Dulbecco 氏培养基 (IMDM) 中培养 1 小时,有或者没有 3% (w/v) HSA。37°C 培养 1 小时之后,3% HSA 也被添加到在缺少 HSA 下起初铺板的培养物中,两种培养物在 37°C 培养过夜。然后收获上清液,测定典型地与单核细胞活化相关的各种细胞因子的水平。下表 1 显示了细胞因子浓度 (ng/ml)。

[0100] 表 1

[0101]	细胞因子	无 HSA	3% HSA
[0102]	白介素 8	7,192	710
[0103]	白介素 6	752	200
[0104]	TNF- α	44	< 5

[0105] 提供在前实施例来说明而不是限制要求保护的发明的范围。本发明的其它变型对本领域普通技术人员是显而易见的并被附加权利要求所包括。因此这里引用的所有出版物、专利、专利申请和其它参考文献并入作为参考。

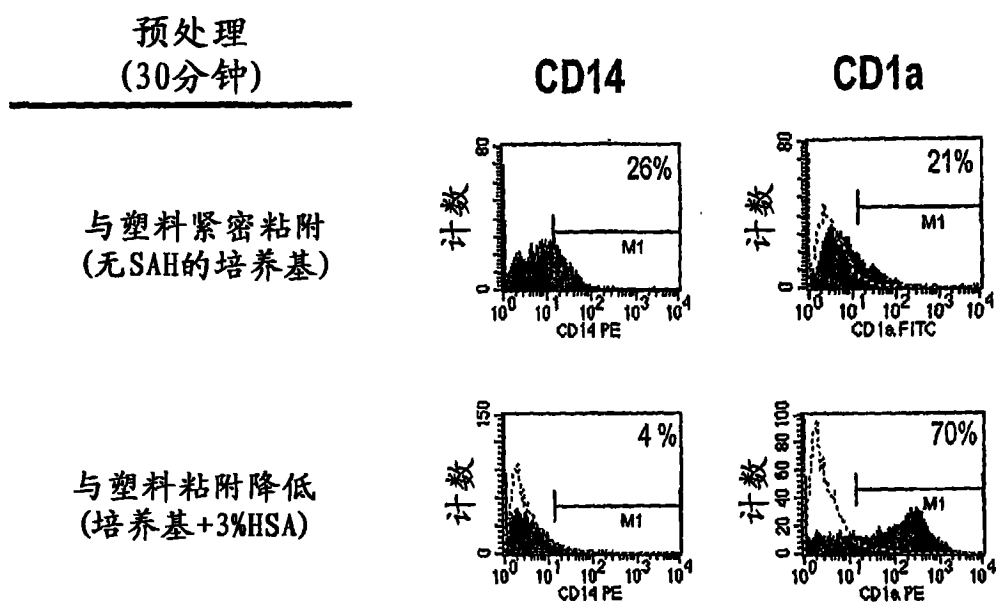


图 1

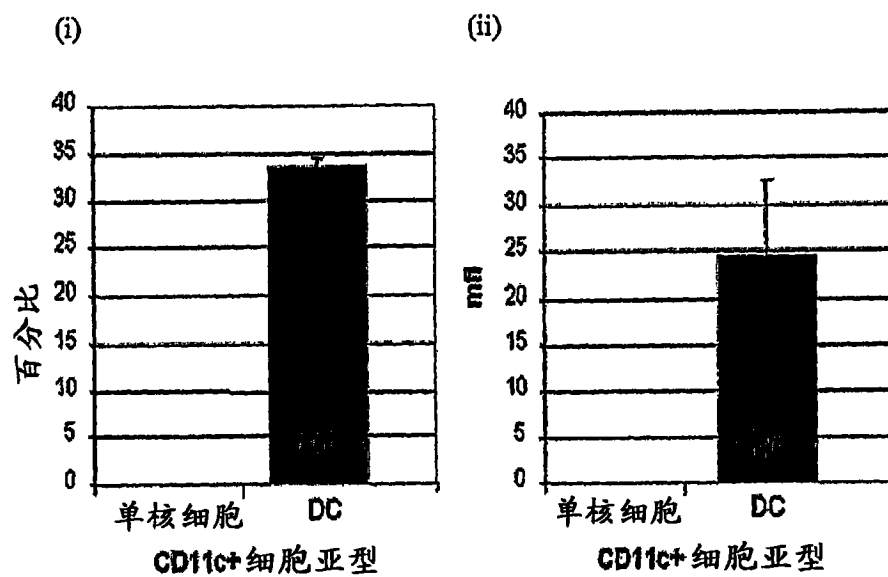


图 2A

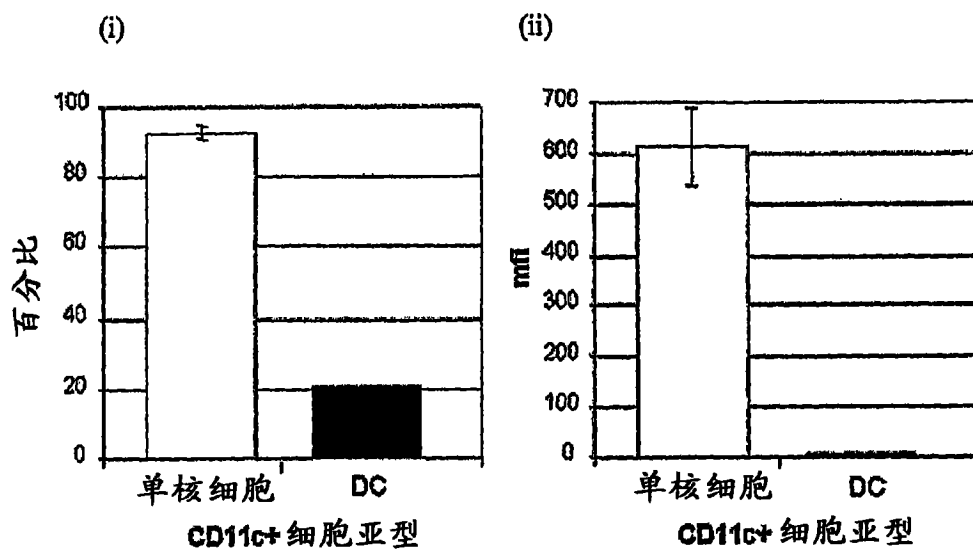


图 2B

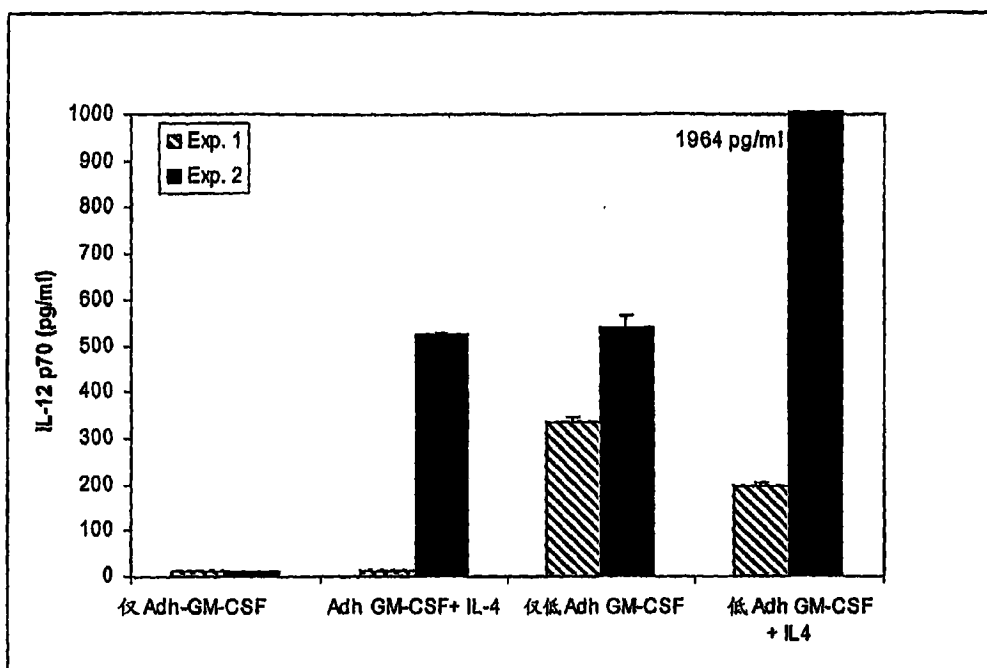


图 3

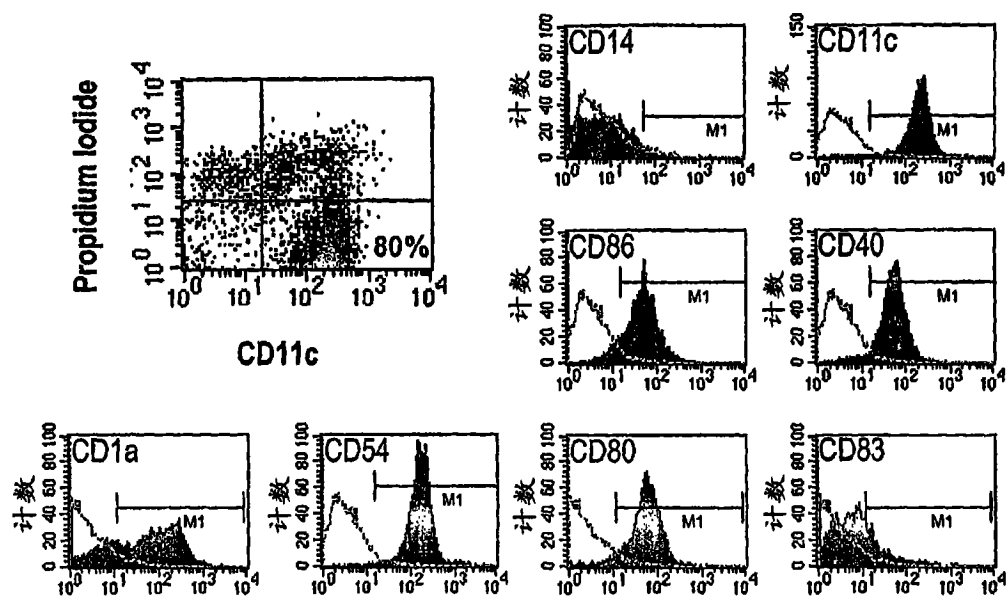


图 4

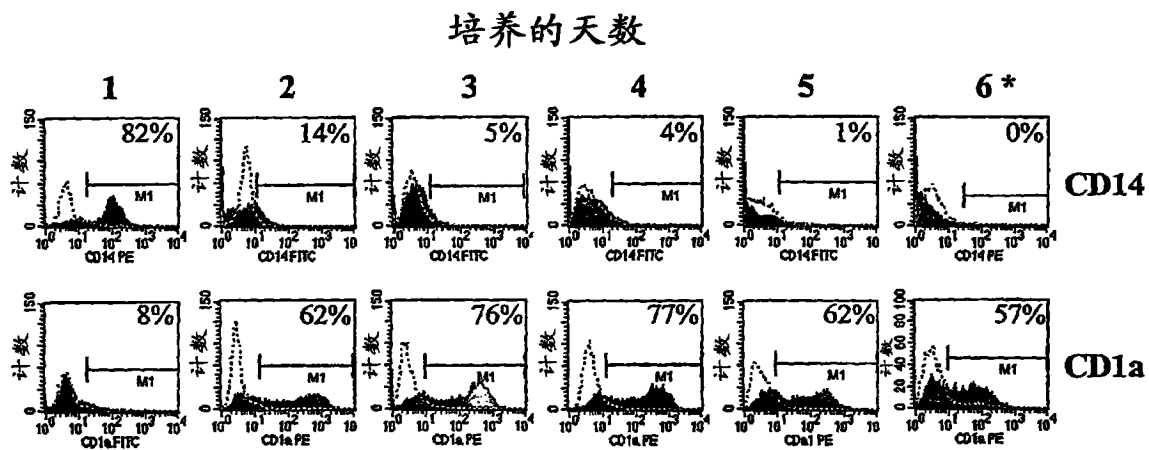


图 5

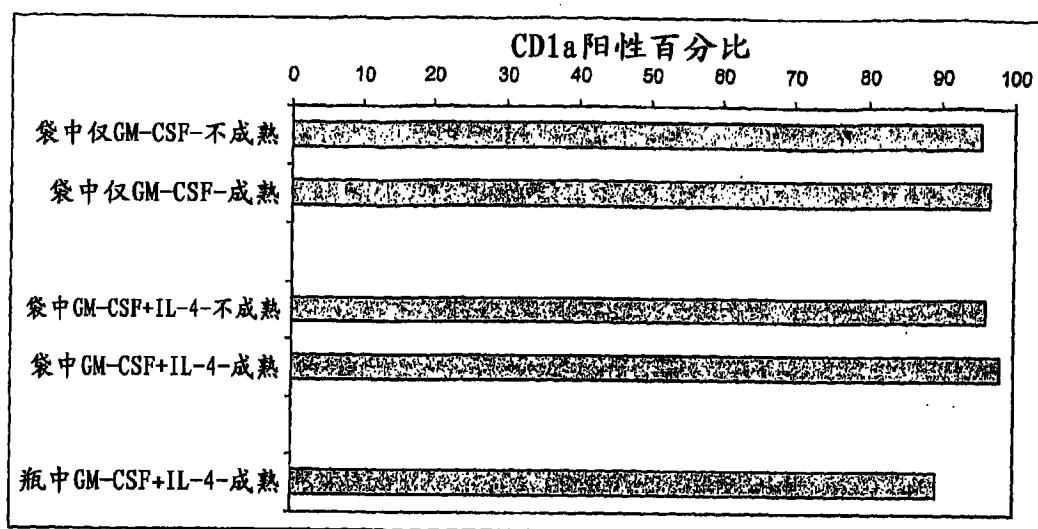


图 6A

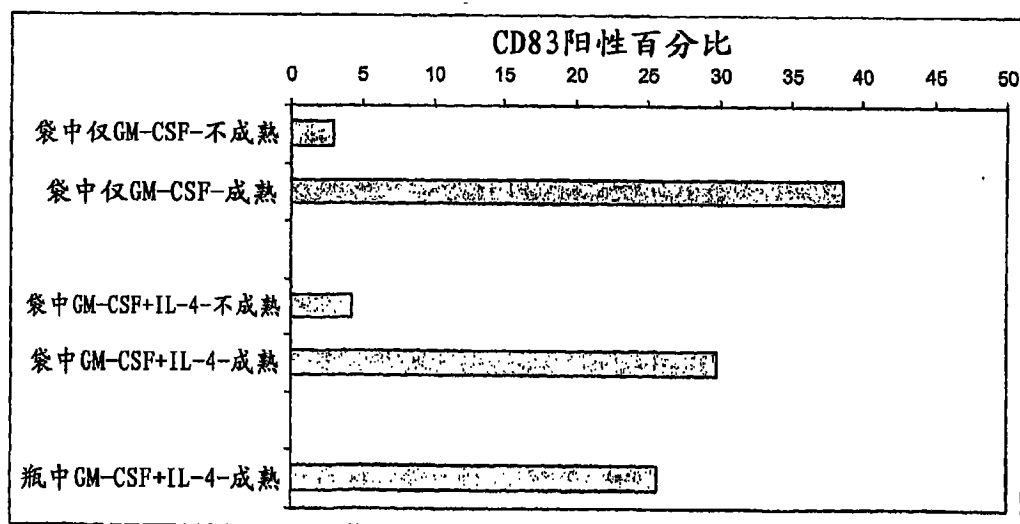


图 6B

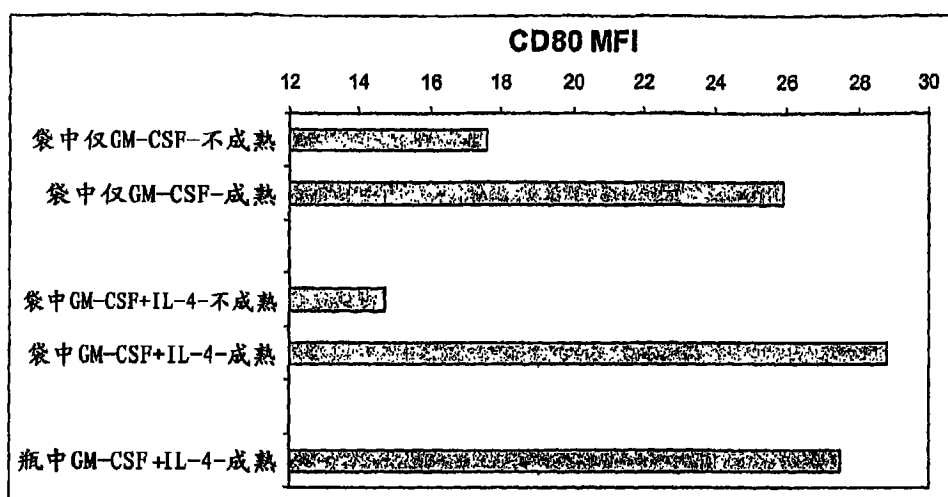


图 6C

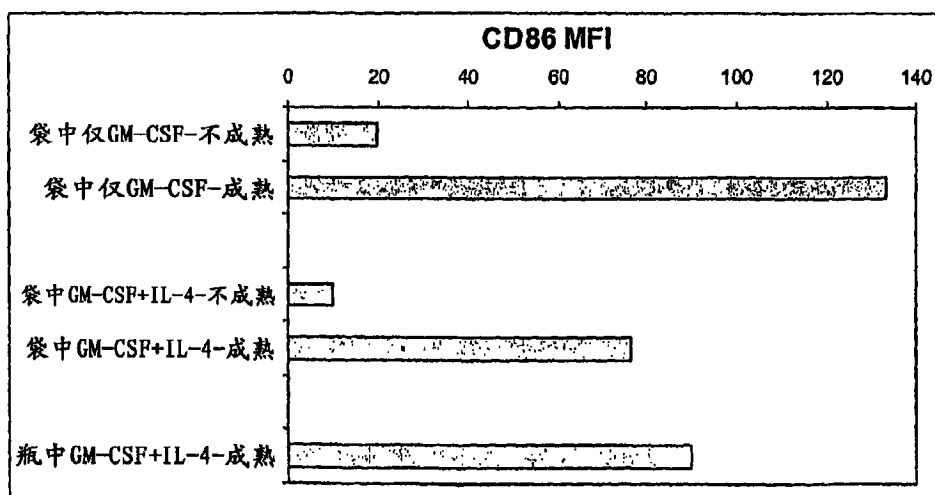


图 6D

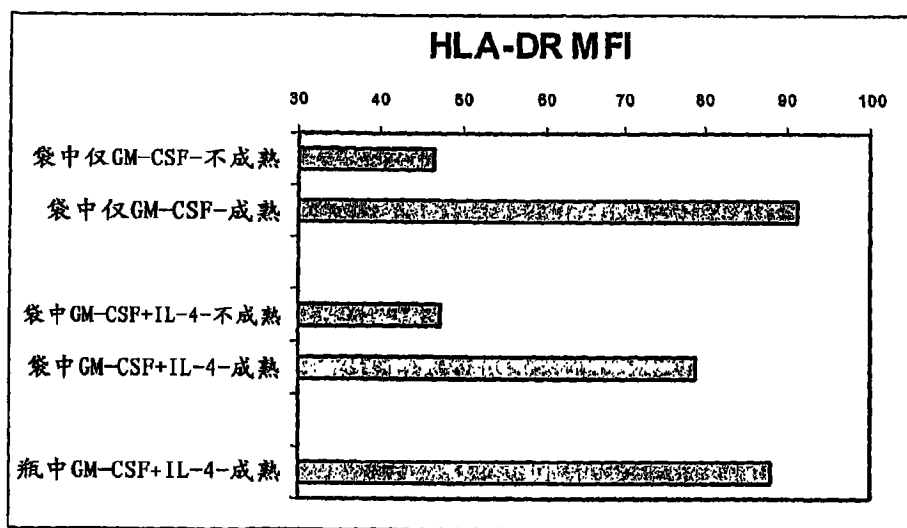


图 6E

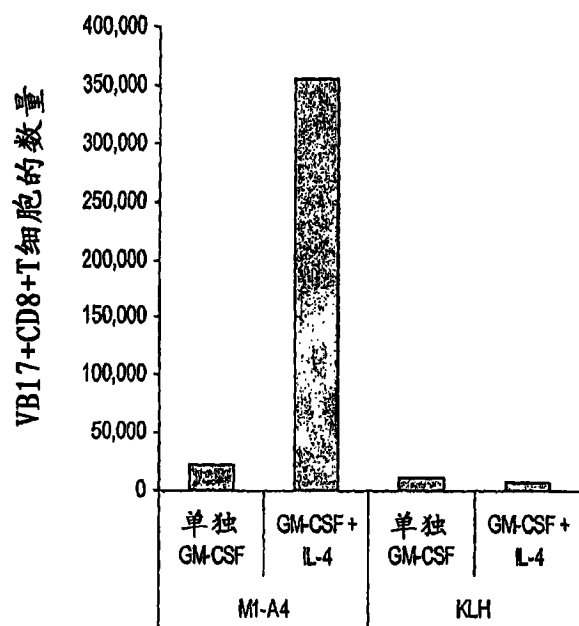


图 7A

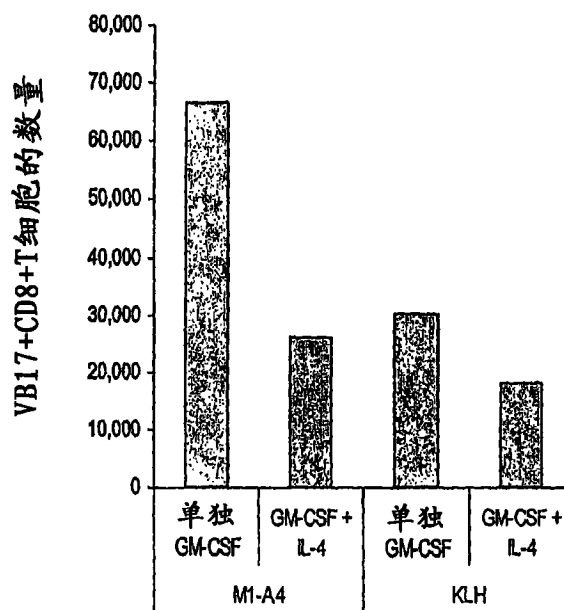


图 7B

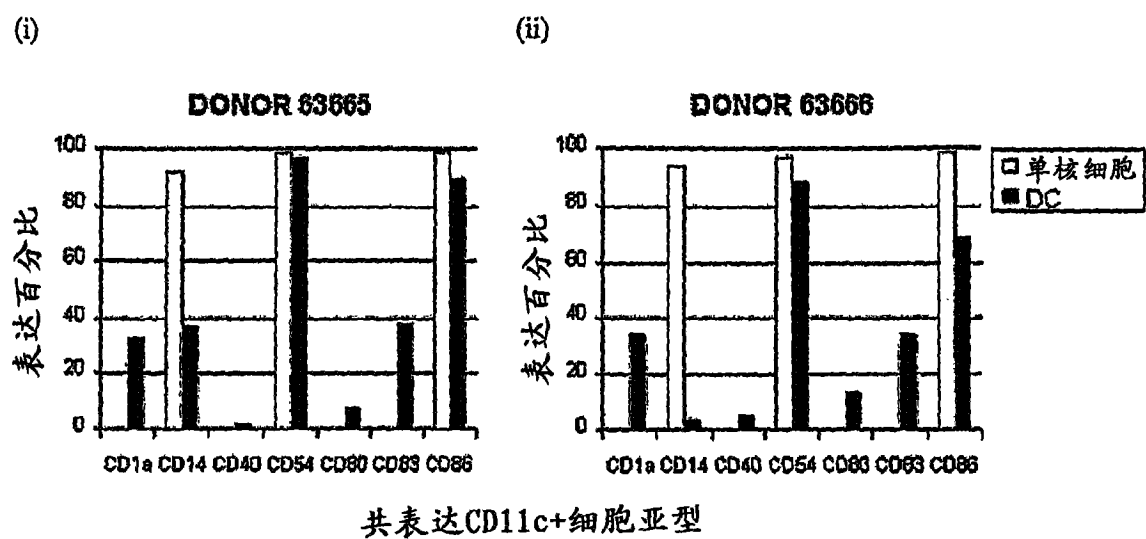


图 8A

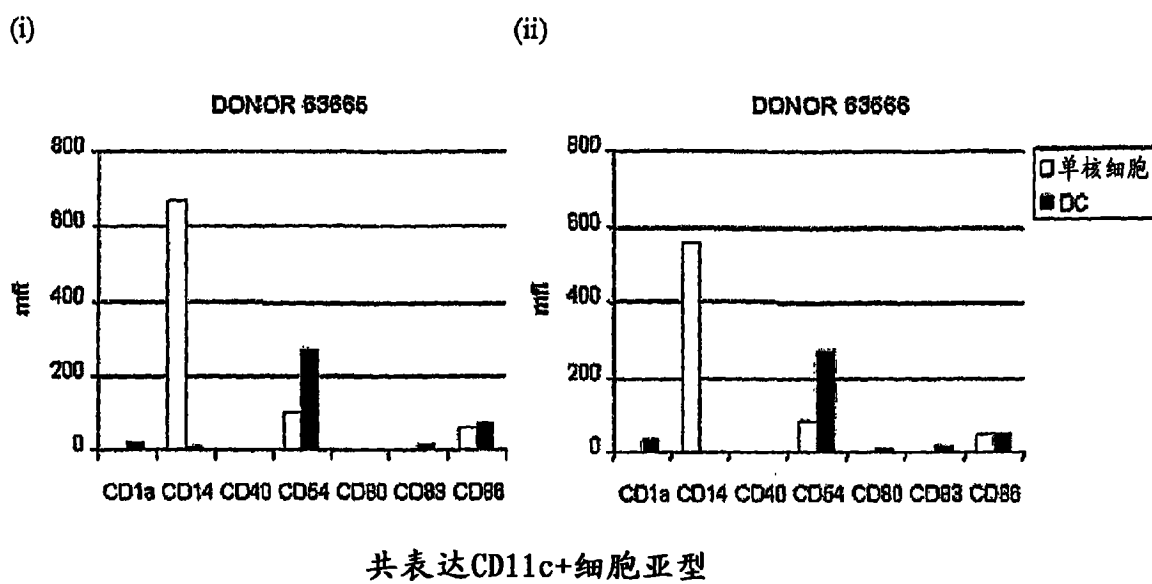


图 8B