

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 95145931

※ 申請日期： 95.12.8

※IPC 分類：

A61K38/21 (2006.01)

C12N5/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於誘發未成熟單核樹突細胞的活化之組成物和方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCING THE
ACTIVATION OF IMMATURE MONOCYTIC DENDRITIC CELLS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

西北生物治療公司

NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC.

代表人：(中文/英文)

歐頓 L. 柏伊騰 / BOYNTON, ALTON L.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國華盛頓州 98011-9501 波黛爾市第 120 大道東北向 18701 號101 公寓

18701-120th Avenue N.E. Apt. 101, Bothell, WA 98011-9501, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 歐頓 L. 柏伊騰 / BOYNTON, ALTON L.

2. 馬尼斯 L. 柏斯屈 / BOSCH, MARNIX L.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.

2. 荷蘭 / NETHERLANDS

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國、 2005.12.8、 60/748,885

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【相關申請】

本發明聲明美國臨時申請案第 60/748,885 號之優先權，其申請於二〇〇五年八月，其全文係以引用方式納入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於誘發未成熟之樹突細胞之成熟及用於活化該等細胞之方法，其不使用樹突細胞成熟劑。本發明亦係關於用於利用經活化的樹突細胞誘發抗原特異性 T 細胞反應及關於有用於活化與誘發抗原特異性 T 細胞之樹突細胞群。本發明更進一步係關於經活化之抗原特異性 T 細胞族群及製造其之方法。

【先前技術】

抗原呈現細胞（APC）於誘發有效免疫反應上是重要的。其不但呈現抗原至具有抗原特異性 T 細胞受體之 T 細胞，且亦提供 T 細胞活化必須之訊號。這些訊號仍未完整鑑定出，但涉及多種細胞表面分子以及細胞介素或生長因子。活化及極化未成熟的 T 細胞（naïve T cell）必須之因子可能和再活化記憶 T 細胞所須的不同。APC 同時呈現抗原及輸送訊號以活化 T 細胞的能力常被稱為附屬細胞功能（accessory cell function）。雖然單核球及 B 細胞已被顯示為勝任 APC，其抗原呈現能力於試管中似乎侷限於再活化先前已致敏 T 細胞。故，單核球及 B 細胞無法直接活化功能上未成熟的或未經引導之 T 細胞族群。它們亦無法輸

送能極化已誘發免疫反應或正被誘發之免疫反應的訊號。

樹突細胞（DC）為免疫系統中專職抗原呈現細胞，其據信能夠活化未成熟的及記憶 T 細胞兩者。樹突細胞越來越常於活體外（*ex vivo*）製備以用於免疫治療，特別是癌症之免疫治療。製備具理想免疫刺激特性的樹突細胞須要了解及利用此等細胞之生物學以於活體外培養。各種用於培養此等細胞的程序以及各程序所屬之各種優點已被描述過。最近之程序包括使用無血清培養基 1、以及使用將所須免疫刺激特徵加至被培養細胞之成熟條件。

樹突細胞之活化會起始一種過程，其轉變未成熟的 DC（其外觀上相似於皮膚之蘭氏細胞）成為成熟、呈現抗原的細胞，其能遷移至淋巴結。此過程造成逐步及漸次地失去強大的抗原攝取能力，其為未成熟的免疫細胞之特徵，及輔助刺激細胞性表面分子及各種細胞介素之表現的向上調控。各種刺激能起始 DC 的成熟化。此過程是複雜的且至少在試管內要花高達 48 小時完成。另一成熟化的結果是活體內細胞遷移特性改變。例如，成熟化誘發數種趨化激素受體，包括 CCR7，其引領細胞至消耗中之淋巴節的 T 細胞區域，而在該處成熟 DC 活化 T 細胞針對由第 I 類、及第 II 類 MHC 分子呈現於 DC 表面的抗原。術語「活化」與「成熟化」、及「被活化」及「成熟」描述誘發及完成自未成熟的 DC（部份特徵為其攝取抗原的能力）至成熟 DC（部份特徵為其有效刺激重升 T 細胞反應的能力）的過程。該術語一般於技術領域中被可互換使用。

已知熟化程序基於活體內環境，其為 DC 據信於暴露至抗原當時或之後接觸。此方法最佳之實例為使用單核球適應培養基（monocyte conditioned media, MCM）作為細胞培養基。MCM 係在試管內藉由培養單核球而產生並被用為成熟化因子之來源。（參見，例如，US 2002/0160430，其係以引用方式納入本文中。）MCM 主要組成物中負責成熟化者據報導為（前）發炎細胞介素，介白素 1 beta（IL-1 β ）、介白素 6（IL-6）、及腫瘤壞死因子 alpha（TNF α ）。

DC 成熟化因此可被多種由許多訊息傳遞路徑作用之不同因子啟動。因此，沒有單一成熟路徑或結果，但事實上存在著許多的成熟 DC 舞台，各有其顯著之功能上的特性。觀念上地說這是合理的，因為免疫系統必須反應的各種針對身體的威脅是多樣性的，必須要不同攻擊策略。例如，雖然細菌感染最佳由經活化的巨噬細胞輔以特異性抗體清除，病毒感染最佳由有效地殺死病毒感染之細胞的細胞毒性 T 細胞攻擊。殺死癌細胞一般包含細胞毒性 T 細胞、自然殺手細胞及抗體之組合。

DC 之試管內成熟化因此可被設計以誘發免疫系統傾向於一種免疫反應勝於另一種，即，極化免疫反應。DC 的方向性成熟化描述的概念為，成熟化過程的結果支配著接著發生的免疫反應，其為使 DC 成熟之方法的結果。在其最簡型式下，方向性成熟化的結果為 DC 群，其係製造細胞介素，其引導 T 細胞反應極化為 Th1 式或 Th2 式反應。DC 能表現高達九種不同的類鐸受體（Toll like receptor）

(TLR1 至 TLR9)，各自其能被用以啟動成熟化。不令人意外地，細菌產物與 TLR2 及 TLR4 互動結果為方向性之 DC 成熟化，其結果為最適合對付細菌感染之極化反應。相反地說，TLR7 或 TLR9 啟動之成熟化顯然會有抗病毒式反應的結果。又一實例為，將伽瑪干擾素加入大多成熟化程序結果為成熟 DC 產生介白素 12，其支配 Th1 式反應。相反地說，包含前列腺素 E2 具有相反效果。

可被用於已活化 DC 之方向性成熟化的因子因此能包括，比如說介白素 1 beta (IL-1 β)、介白素 6 (IL-6)、及腫瘤壞死因子 alpha (TNF α)。其他成熟化因子包括前列腺素 E2 (PGE2)、poly-dIdC、腸血管肽 (vasointestinal peptide, VIP)、細菌脂多醣 (LPS)、及分支菌或分支菌之組成物，比如特定細胞壁結構成份。其他成熟化因子包括，例如咪唑喹啉化合物 (imidazoquinoline compound)、如咪唑喹啉-4-胺基化合物，比如 4-胺基-2-乙氧甲基- α,α -二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇 (命名為 R848) 或 1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺及其等之衍生物 (WO 00/47719, 其完整內容係以引用方式納入本文中)、合成雙股多核醣核酸，例如，聚[I]:聚[C(12)U]、以及類似者，類鐸受體 (TLR, 如 TLR3、TLR4、TLR7 及／或 TLR9) 之促效劑，序列具未甲基化 CpG 模體 (已知會誘發 DC 之成熟化) 之核酸序列、以及類似者。進一步說，上述任意劑之組合能用於誘發樹突前驅細胞之成熟化。

完全成熟樹突細胞於質及量上異於未成熟的 DC。一

一旦完全成熟，DC 表現出較高量之第 I 類及第 II 類 MHC 抗原，及較高量 T 細胞輔助刺激分子，即 CD80 及 CD86。這些改變透過 T 細胞上輔助刺激分子之相容部份（如，CD28、以及類似者）增進樹突細胞活化 T 細胞能力，因其能增加抗原於細胞表面之密度、以及 T 細胞活化訊號之強度。此外，成熟 DC 製造大量細胞介素，其能刺激及極化 T 細胞反應。

一般活體外 DC 產生方法包含，自病患取得富含 DC 前驅細胞之細胞群，並在注回病患前於試管內分化 DC 前驅細胞為成熟 DC。有些人認為 DC 必須被分化至末期，否則其會去分化回單核球／巨噬細胞並失去大量之免疫增效潛能。活體外由單核球成熟化產生之 DC 已被成功藉由上列方法及劑完成。

典型地，欲產生未成熟的樹突細胞（DC），必須首先純化或前驅細胞自其他不純細胞富集單核球前驅細胞。這通常由使單核球前驅細胞黏著至塑膠（聚苯乙烯）表面而完成，因單核球（如淋巴球及自然殺手（NK）細胞），具有比其他細胞（例如，在週邊血液找到者）較大傾向黏在塑膠上。在以劇烈沖洗實質地移去不純細胞後，單核球被培養於能夠轉換單核球前驅細胞為未成熟的 DC、或直接至成熟 DC 的細胞介素中。分化單核球前驅細胞為未成熟的 DC 的方法首先被撒魯斯托（Sallusto）及蘭沙維琪亞（Lanzavecchia）描述（*J. Exp. Med.*, 179:1109-1118, 1994，其係以引用方式納入本文中），其使用細胞介素 GM-CSF

及 IL-4 以誘發單核球分化為未成熟的 DC。雖然此細胞介素組合最常被使用，各種其他組合已被描述來完成同樣目標，譬如以 IL-3 或 IL-15 取代 IL-4。本方法最後結果為「隱藏」細胞，其表現 T 細胞輔助刺激分子，以及高量主要組織相容複合體（MHC）分子，但不會表現樹突細胞成熟標記 CD83。這些細胞相似於皮膚上之蘭氏細胞，且其主要生理功能為捕捉入侵之微生物。

本方法之變化包括不同的單核球純化方法，包括，例如，切向流過濾（tangential flow filtration, TFF）、或藉由將接於珠子上之抗體與單核球表面分子結合。與細胞結合之珠子接著於管柱或具磁性之表面濃縮，如此不純細胞能被沖洗掉，之後單核球被自珠子沖提。在另一獲取樹突細胞前驅細胞的方法中，表現幹細胞標記 CD34 之細胞，不論來自血液（美國專利第 5,994,126，其係以引用方式納入本文中）或自骨髓，被純化。這些細胞能被培養於必須性之細胞介素 GM-CSF 以分為化未成熟的 DC。這些 DC 顯然地具有和產生自單核球之未成熟的 DC 非常類似之特性及功能性特質。

未成熟的 DC 具有高度之攝取及處理抗原能力，但啟動免疫反應能力有限。啟動免疫反應之能力係由未成熟的 DC 成熟化取得。此成熟化又稱為活化 DC、或 DC 之活化。成熟化過程之啟動係藉由與成熟化誘發性細胞介素、細菌產物、或病毒組成物、以及類似者接觸，如上所提。

雖然這些方法能夠製造成熟 DC，利用重組分子及細

胞上清液於 DC 成熟化具有缺點。此等包括來自此等試劑的批次之不一致之品質及產量，以及導入大量可能與所關注、用於輸送至單核之樹突細胞前驅細胞以處理的抗原競爭之外生性蛋白質。外生性蛋白質亦可能具毒性、或造成自體免疫，若投藥在病患身上。如此試劑可能製造起來很貴，使得免疫治療之價格過份地昂貴。

【發明內容】

簡短摘要

本發明所描述之方法及組成物係提供以用於誘發未成熟的樹突細胞（DC）之活化，以及用於引導（prime）該等細胞以用於抗原特異性免疫反應。從一方面來說，本發明提供一種用於製造富含經活化的樹突細胞的細胞群之方法，其係藉由將未成熟的樹突細胞與組織培養基質及具有樹突細胞分化誘發劑之培養基，於適於使樹突細胞黏著至組織培養基質與適於試管內培養未成熟的樹突細胞之培養條件下，接觸一段足以形成富含經活化的樹突細胞之細胞群的時間。在所描述之方法中並不須要加入樹突細胞成熟劑以誘發樹突細胞群之活化。未成熟的樹突細胞可在未成熟的樹突細胞與組織培養表面接觸之前、當時、或之後，與預先決定的抗原接觸。預先決定的抗原可以是（例如）腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物、細胞膜製備物、重組製造的抗原、肽抗原（例如，合成肽抗原）、或經分離之抗原。進一步說，抗原可以是可

溶性抗原或微粒抗原。在特定具體事實中抗原可為細胞溶胞產物或自病患腫瘤或腫瘤細胞系取得之細胞膜製備物。

在特定具體事實中，本發明之方法可視需要地進一步包含獲取富含單核樹突細胞前驅細胞之細胞群；及在能誘發單核樹突細胞分化以形成一群未成熟的樹突細胞之劑的存在下培養該前驅細胞。適合的樹突細胞分化劑包括（例如）GM-CSF、介白素 4、GM-CSF 及介白素 4 之組合、或 GM-CSF 及介白素 13 或介白素 15。單核樹突細胞前驅細胞能以分離自人類個體之細胞的方式獲取。

從另一方面來說，本發明提供一種用於製造富含經活化的樹突細胞之細胞群的方法。本方法一般包含提供富含未成熟的樹突細胞之細胞群；以及將未成熟的樹突細胞與組織培養基質與具樹突細胞分化劑之培養基，於適於使樹突細胞黏著至組織培養基質及適於試管內培養未成熟的樹突細胞之培養條件下接觸。細胞被培養一段足以形成富含經活化的成熟樹突細胞之細胞群的時間。所得的經活化的成熟樹突細胞群可（當投藥於哺乳動物時）於該哺乳動物產生抗原特異性免疫反應。未成熟的樹突細胞群可於在適於黏著條件下與組織培養基質接觸之前、當時、或之後與預先決定的抗原接觸。預先決定的抗原能夠是（例如）腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物、細胞膜製備物、重組製造的抗原、肽抗原（即，合成肽抗原）、或經分離之抗原。抗原可以是可溶性抗原或微粒抗

原。在特定具體事實中抗原能夠為細胞溶胞物或自病患腫瘤或腫瘤細胞系取得之細胞膜製備物。也能加入能引導 DC 之成熟，以偏向對 Th1 及／或 Th2 反應之劑，如，伽瑪干擾素（ $\text{IFN}\gamma$ ）。

在特定具體事實中，本方法能視需要地進一步包含獲取單核球樹突細胞前驅細胞；及於分化劑存在下於試管中培養前驅細胞以形成未成熟的樹突細胞。適當的分化劑包含，例如，GM-CSF、介白素 4、介白素 13、介白素 15、或其組合。單核球前驅細胞能自須要治療之人類受藥者或組織相容符合之個體分離。

又在另一方面來說，活化 T 細胞之組成物被提供。組成物可包括藉由與組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑，於適於使樹突細胞黏著至組織培養基質及適於活化之條件下活化及成熟之樹突細胞群；及預先決定的抗原。樹突細胞群可產生抗原特異性免疫反應，類似於由前述方法產生之成熟樹突細胞所誘發者。樹突細胞群之產生係由自先前培養基及加入之細胞介素分離未成熟的樹突細胞，及將分離之未成熟的樹突細胞與組織培養基質於適於使 DC 黏著至組織培養基質之條件下接觸（不加樹突細胞成熟劑）。樹突細胞在與組織培養基質於適於使樹突細胞黏著至組織培養基條件下接觸時，會被觸發以進行活化及成熟化為經活化的成熟樹突細胞。預先決定的可溶或顆粒抗原（其與未成熟的樹突細胞同時加入組織培養基質，或於成熟過程中加入，即，活化後但於完成成熟之前）可被樹突細胞攝

取及處理並呈現於適當細胞表面受器之中，以在與 T 細胞接觸時誘發抗原特異性免疫反應。

在另一方面來說，經分離、活化之樹突細胞群被提供。該細胞群包括並係富含成熟經活化的單核球樹突細胞，其先前與組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑於促進樹突細胞黏著至組織培養基質之條件下接觸。所產生之經活化的樹突細胞能攝取及處理抗原，且在試管中繼續培養後，能得到成熟樹突細胞表面之表現型。細胞群能視需要地包括預先決定的抗原及/或經分離之 T 細胞，如未成熟的 T 細胞。T 細胞能被視需要地在經分離淋巴球之製劑中。

製造經活化的 T 細胞之方法亦被提供。本方法一般包括提供富含經分離未成熟的樹突細胞之細胞群；將未成熟的樹突細胞與預先決定的抗原接觸、及將未成熟的樹突細胞於組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑於促進未成熟的樹突細胞黏著至組織培養基質之條件下接觸。細胞被培養一段足以誘發未成熟的樹突細胞活化形成經活化的樹突細胞之充份時間。經活化之樹突細胞可與未成熟的 T 細胞接觸以形成經活化之抗原特異性 T 細胞。適當抗原包括，例如，腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物（包括腫瘤細胞溶胞產物）、細胞膜製備物、重組製造的抗原、肽抗原（例如，合成肽抗原）、或經分離之抗原。預先決定的抗原可以是可溶性抗原或顆粒性抗原。其可以引導 DC 之成熟以偏向其對 Th1 及／或 Th2 反應的

劑，例如，伽瑪干擾素，亦可被加入。

富含未成熟的樹突細胞之細胞群能同時與預先決定的抗原及組織培養基質和樹突細胞分化誘發劑接觸，或細胞可與預先決定的抗原於與組織培養基及樹突細胞分化誘發劑接觸之前、之時、或之後接觸。在特定具體事實中，本方法可進一步地包括獲得富含單核球樹突細胞前驅細胞之細胞群；及於樹突細胞分化誘發劑存在下在試管內培養前驅細胞以誘發未成熟的樹突細胞之形成。適當分化誘發劑包括，例如，GM-CSF、介白素 4、介白素 13 或介白素 1、或其組合。單核球樹突細胞前驅細胞可視需要地自人類個體獲取。在一特定具體事實中，單核球樹突前趨細胞、未成熟的樹突細胞、及／或 T 細胞互相為自體的。

被活化之抗原特異性 T 細胞能被投藥於動物，特別是哺乳類動物，其須要激發抗原特異性免疫反應。適當的抗原包括，例如，腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物、細胞膜製備物、重組製造的抗原、肽抗原（例如，合成肽抗原）、或經分離之抗原。在特定具體事實中細胞溶胞物及／或膜製備物得自病患腫瘤或腫瘤細胞系。未成熟的樹突細胞能視需要地同時與預先決定的抗原及組織培養基質和樹突細胞分化誘發劑接觸，或未成熟的樹突細胞或可與預先決定的抗原，與新、未使用、乾淨組織培養基接觸之前接觸。

在特定具體事實中，本方法可進一步包含自動物分離

單核球樹突細胞前驅細胞；及於分化劑存在下在試管中培養前驅細胞以形成未成熟的樹突細胞。分化劑可以是，例如，GM-CSF、介白素 4、介白素 13、介白素 15、或前者之組合。

單核球樹突細胞前驅細胞未成熟的樹突細胞群，及／或 T 細胞可以對該動物是自體的，或對該動物是同種異體的。或者，單核球樹突細胞前驅細胞、未成熟的樹突細胞及／或 T 細胞能具有和該動物同樣之 MHC 單純型，或共具 MHC 標記。在特定具體事實中，該動物可以是人類或可以是非人類動物。

【實施方式】

詳細描述

本發明提供用於誘發或觸動未成熟的樹突細胞(DC)群活化及成熟，以及引導該等細胞之抗原特異性免疫反應的方法。未成熟的樹突細胞群可自製備培養基獲得，包括例如，分離培養基、培養培養基、及類似者，及富含未成熟的單核球樹突細胞之細胞群係與組織培養基質和樹突細胞分化誘發劑於適於使 DC 黏著至組織培養基質之條件下接觸（未加樹突細胞成熟劑）。未成熟的樹突細胞可與預先決定的抗原於使其被 DC 攝取處理及呈現之適合的試管內細胞培養條件下接觸。與所關注之抗原接觸可以在活化啟動之當時、之前、或之後。或者，已曝露於抗原（例如，活體內），未成熟之單核球樹突細胞，可被取得並與組織培養基質於類似適當細胞培養條件下接觸。所產生之經活

化的成熟樹突細胞呈現所關注之抗原並被引導以活化 T 細胞向抗原特異性反應。反應方向，即，反應離子偏向較易於 Th-1 或 Th-2 反應可藉由加入定向成熟劑（directional maturation agent）影響，如伽瑪干擾素（ $\text{IFN}\gamma$ ）及類似者。

在另一方面來說，富含單核球樹突細胞前趨細胞之細胞群可自個體或捐獻者獲取。細胞群可與樹突細胞分化誘發劑接觸，如，一或更多種細胞介素（例如，但不限於，GM-CSF，及 GM-CSF 和 IL-4、GM-CSF 和 IL-3、GM-CSF 和 IL-5、及類似者之組合）以獲取未成熟的樹突細胞。未成熟的樹突細胞可接著與預先決定的抗原接觸，其與組織培養基質和樹突細胞分化誘發劑組合，或與細胞介素或其他定向成熟劑組合，以活化及／或部份成熟化樹突細胞。成熟樹突細胞可被直接用以在個體身上誘發抗原特異性免疫反應，或該細胞可用以於 T 細胞誘發抗原特異性免疫反應。在特定具體事實中，第 I 類 MHC 抗原處理被刺激，其係有用於引發針對表現出預先決定的抗原之細胞的 CTL 反應。被誘發的反應之方向可受加入定向成熟劑，如伽瑪干擾素之影響。用於本文，定向成熟劑係能影響成熟 DC 之最終階段，但當單獨使用不會誘發 DC 成熟之劑。例如，定向成熟劑可以極化 DC 群之成熟以利 Th1 反應（相對於 Th-2 反應），或反之亦然。

樹突細胞係一群多變的抗原呈現細胞，其於不同淋巴及非淋巴組織中發現（參閱 Liu, *Cell* 106:259-262(2001); Steinman, *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296(1991)）。樹突細

胞包括脾臟之淋巴樹突細胞、表皮之蘭氏細胞、及血液循環中之隱匿性細胞（veiled cells）。集體地說，樹突細胞基於其形態、高程度之表面第 II 類 MHC 表現、及缺乏於 T 細胞、B 細胞、單核球及殺手細胞表現之某些其他表面標記而被分類為一群。特別是，單核球衍伸之樹突細胞（又稱單核球樹突細胞）通常表現 CD11c、CD80、CD83、CD86，且為 HLA-DR⁺，但一般來說，但並非全為，CD14⁻。

相對來說，單核球樹突細胞前驅細胞（典型為單核球）通常為 CD14⁺且表現無或低程度之 HLA-DR、CD83、及 CD86。單核球樹突細胞前驅細胞能獲取自其存在之任何組織，特別是淋巴組織如脾臟、骨髓、淋巴節及胸腺。單核球樹突細胞前驅細胞亦可獲取自循環系統。週邊血液是隨時可得之單核球樹突細胞前驅細胞來源。臍帶血是另一單核球樹突細胞前驅細胞來源。單核球樹突細胞前驅細胞可獲取自各種其中能誘發免疫反應之生物。這些生物包括動物，例如，包括人類、及非人類動物，譬如，靈長類、其他哺乳類（包括，但不限於，犬、貓、小鼠、及大鼠）、鳥（包括雞）、以及其基因轉殖物種。

在特定具體事實中，富含單核球樹突細胞前驅細胞及／或未成熟的樹突細胞之細胞群可獲取自健康個體或，可選擇地，自須要免疫刺激之個體，如癌症病患，（例如腦、乳、卵巢、肺、前列腺、直腸、及類似者之癌症）或另一種對其而言細胞免疫刺激可以是有益的或須要的之個體（即，具細菌或病毒感染之個體，及類似者）。樹突細胞

前驅細胞及／或未成熟的樹突細胞亦可獲取自 HLA 符合之健康個人以投藥於須免疫刺激之 HLA 符合病患。

樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞

用於自不同來源（包括血液及骨髓）分離富含樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞之細胞群之方法係已知於所屬技術領域中。例如，富含樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞之細胞群可藉由收集經肝素處理血液、藉由血漿離析術或白血球離析術、藉由製備膚色血球層、花結法（rosetting）、離心、密度梯度離心（例如，利用 FICOLL（如 FICOLL-PAQUE®）、PERCOLL®（膠狀矽粒（直徑 15-30mm），以無法透析之聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、蔗糖、及類似者塗覆）、細胞之差異性水解、過濾、及類似者而獲取。在特定具體事實中，白血球群可，例如，藉由自個體收集血液、去血纖維以去除血小板及水解紅血球而製備。樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞可視需要地對單核球樹突細胞前驅細胞進行富集，其係藉由（例如）透過密度梯度材質（例如 PERCOLL® 梯度）離心。

所有富含樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞之群體視需要地可於（例如）封閉、無菌系統中製備。用於本文，術語「封閉、無菌系統」或「封閉系統」係指一系統，其曝露至未滅菌、週遭的、或循環空氣或其他未滅菌情況被最小化或去除。用於獲取樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞之封閉系統一般不包括於開頂管中的密度梯度離心、細胞之開放空氣中轉移、細胞於組培養盤或未封之

燒瓶中的培養，及類似者。在典型的具體事實中，封閉系統允許自初始收集容器將樹突細胞前驅細胞及未成熟的樹突細胞無菌轉移至可封閉組織培養容器而不曝露於未滅菌空氣中。

在特定具體事實中，單核球樹突細胞前驅細胞係藉由將單核球黏著至單核球結合性基質而獲取，如於 WO 03/010292 所揭示，其揭示內容係以引用方式納入本文中。例如，一群白血球（如，藉由白血球離析術分離）可與單核球樹突細胞前驅細胞黏著性基質接觸。當白血球群與基質接觸時，白血球群中的單核球樹突細胞前驅細胞優先地黏著至基質。其他白血球（包括其他潛在的樹突細胞前驅細胞）展現對基質較弱結合力，因此允許單核球樹突細胞前驅細胞優先地被富集於基質表面上。

適合的基質包括（例如）該等具有高表面對積體積比者。如此基質可以是（例如）顆粒或纖維基質。適合的顆粒基質包括（例如）玻璃顆粒、塑膠顆粒、玻璃包覆塑膠顆粒、玻璃包覆聚苯乙烯顆粒、及其他適合用於蛋白質吸收之珠子。適合的纖維基質包括微毛細管管及微絨毛膜。顆粒或纖維基質通常允許被黏著之單核球樹突細胞前驅細胞被沖提，而不明顯減少黏著細胞之生存。顆粒或纖維基質可實質上係非孔性以促進單核球樹突細胞前驅細胞或樹突細胞自基質之沖提。「實質上非孔性」的基質係一種基質，其至少大部分存在基質中的孔洞小於細胞以將細胞困住於基質中的情形降到最低。

單核球樹突細胞前驅細胞對基質之黏著，可視需要地藉由加入結合培養基而增強。適當的結合培養基包括單核球樹突細胞前驅細胞培養基（例如，AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15®、及類似者），其係以（個別地或任何組合地）例如細胞介素（如，顆粒球／巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）、介白素 4（IL-4）、或介白素 13（IL-13））、血漿、血清（如，人類血清，例如自體或同種異體血清）、經純化蛋白，例如血清白蛋白、雙價陽離子（如，鈣及／或鎂離子）、及其他有助於單核球樹突細胞前驅細胞對基質的特異性黏著之分子、或防止非單核球樹突細胞前驅細胞與基質黏著者補充。在特定具體事實中，血漿或血清可被加熱去活性。經加熱去活性血漿可以是自體或異體於白血球。

在單核球樹突細胞前驅細胞與基質黏著後，非黏著之白血球被自單核球樹突細胞前驅細胞／基質複合物分離。任何適當方法可用於將非黏著細胞自複合物分離。例如，非黏著白血球及複合物之混合物可靜置，而非黏著白血球及培養基可被倒出或排掉。或者，混合物可被離心，且包含非黏著白血球之上清液可自丸狀複合物倒出或排掉。

在另一方法中，所有富含單核球樹突細胞前驅細胞之群體可自藉由使用切向流過濾設備製備的富含白血球之細胞群獲取。有用於獲取富含單核球樹突細胞前驅細胞之細胞群的切向流過濾設備，可以包括去除單位，其具有交叉

流室（cross-flow chamber）、過濾室（filtrate chamber）及於其之間置入之濾膜（見 WO 2004-000444，其係以引用方式納入本文中）。濾膜於一邊（滯流物表面（retentate surface））與交叉流室呈液體接觸，而及另一邊（濾膜表面）與過濾室呈液體接觸。交叉室有適用於將包含白血球之血液組成物引入至交叉流室及與濾膜之滯流物表面平行的入口。亦於交叉流室提供出口，其中心地置於與濾膜之滯流物表面相反的部分。適用於切向流過濾設備之濾膜一般有平均孔徑大小範圍約 1 至約 10 微米。濾膜可以具有平均孔徑大小約 3 至約 7 微米。提供樣本至交叉流室入口之預先決定輸入率的工具（means），和控制過濾物通過濾膜之過濾率及進入過濾室的工具亦能被包括。過濾率控制工具限制過濾率至低於濾膜未受阻礙之過濾率。包含血液成份樣本可藉由來源設備提供，如白血球離析設備或包含收集自白血球離析設備之樣本的容器。

樹突細胞前驅細胞可試管內或活體外被培養以分化、成熟及／或擴張。用於本文，經分離的未成熟的樹突細胞、樹突細胞前驅細胞、T 細胞、及其他細胞指的是（藉人工操作）離開其等的天然環境而存在，並因此不屬自然產物的細胞。經分離的細胞可以經純化形式，半純化形式（例如，經富集細胞群）、或於非天然環境存在。簡短地說，活體外分化典型會牽涉到培養樹突細胞前驅細胞、或具樹突細胞前驅細胞之細胞群，其係於一或多種樹突細胞分化劑之存在下。適當的分化誘發劑可以是（例如，但不限於）

細胞成長因子（如，細胞介素（如 GM-CSF）、介白素 4（IL-4）、介白素 13（IL-13）、介白素 15（IL-15）、及／或其組合）。在特定具體事實中，單核突細胞前驅細胞被誘發以自單核球衍伸性未成熟的樹突細胞分化。

樹突細胞前驅細胞可被培養及誘發以於適當的培養條件下分化。適當的組織培養基包括，例如，AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15®及類似者。組織培養基可以以血清、胺基酸、維生素、細胞介素，如 GM-CSF 及／或 IL-4、IL-13、或 IL-15、二價陽離子、及類似者補充，以促進細胞分化為未成熟的樹突細胞。在特定具體事實中，樹突細胞前驅細胞可在試管中於無血清培養基中培養。這些培養條件可視需要地排除任何動物衍伸性產物。於一般性樹突細胞培養基之常見的細胞介素組合包含大約各 500 單位/ml 之 GM-CSF 及 IL-4。樹突細胞前驅細胞，當被分化以形成未成熟的樹突細胞時，表現形係上相似於皮膚蘭氏細胞。未成熟的樹突細胞典型為 CD14⁻及 CD11c⁺，表現低水平之 CD86 及 CD83，並能夠藉特化的胞飲作用捕捉可溶性抗原。

典型地，在先前方法中未成熟的樹突細胞在投藥至病患前或接觸於 T 細胞前係於試管中或活體外成熟以形成成熟樹突細胞。在這些方法中，樹突細胞成熟劑被加入至含未成熟的樹突細胞的試管內培養中，其在預先決定的抗原之前加入或同時加入。在成熟後，DC 逐步及漸進地失去攝入抗原之能力且其等典型地展示被向上調節的輔助刺激性細胞表面分子及各種細胞介素之表現。特別地說，成熟

DC 相較於未成熟的樹突細胞表現較高水平的第 I 類及第 II 類 MHC 抗原，且成熟樹突細胞一般被辨識出為 CD80⁺、CD83⁺、CD86⁺、及 CD14⁻。較高的 MHC 表現導致 DC 表面之抗原密度增加，而輔助刺激性分子 CD80 及 CD86 之向上調節藉由在 T 細胞上的輔助刺激分子之配對物，如 CD28，於 T 細胞上強化 T 細胞活化訊號。

不若先前方法，於本發明的方法中未成熟的樹突細胞之活化係藉由將經分離的未成熟的樹突細胞與組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑，於適合使樹突細胞黏著在組織培養表面上之條件下接觸，而開始或啟動。在本發明典型方法中，活化係於未加成熟劑下達成。未成熟的樹突細胞自先前培養基質或純化培養基中去除並自先前之培養基分離。分離之未成熟的樹突細胞接著被計數及與未加樹突細胞成熟因子之新鮮培養基一同冷凍，以供之後於後面過程中使用。在一可選擇之方法中，定向成熟劑可於活化過程中加入以使樹突細胞偏向使其能極化 T 細胞反應為 Th-1 或 Th-2 反應。例如，但不限於能用之製劑，伽瑪干擾素可被加入以使 T 細胞反應偏向 Th-1 反應。將伽瑪干擾素本身加入單核球樹突細胞前驅細胞或未成熟的 DC 無法誘發 DC 分化及／或成熟。

於本發明中有用的組織培養基質可包括組織培養槽孔、燒瓶、瓶、袋、或任何用於生物反應器之基質，如纖維、珠子、盤子、及類似者。典型地，組織培養基質包含塑膠如聚苯乙烯、鐵氟龍®（聚四氟乙烯，PTFE）及類

似者。組織培養基質中最常被用於活體外培養供免疫治療之樹突細胞者包括組織培養燒瓶、組織培養袋、或細胞片段，其由多重堆積之塑膠構成、及類似者。

分離之未成熟的樹突細胞可被培養及成熟於適當的成熟化培養條件中。適當組織培養基包括 AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15®及類似者。組織培養基可以胺基酸、維生素、細胞介素、人類血清，如，大約 1%至大約 10%人類 AB 血清、雙價陽離子、及類似者補充，以促進細胞成熟。

樹突細胞之成熟化或活化可以技術領域中已知的技術監控。細胞表面標記可於技術領域中熟悉的分析法中偵測，如流式細胞計數法、免疫組織化學、及類似者。亦監視細胞之細胞介素生產（如，藉由 ELISA、FACS、或其他免疫分析法）。在依據本發明活化之 DC 群中，亦可對細胞分析典型細胞表面標記 CD83、CD86、及 HLA-DR 之出現。這些中有些如 CD83 只在成熟 DC 表現，而其他之表現於成熟時顯著升高。成熟 DC 亦失去以胞飲攝入抗原之能力，其可以由發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟悉的分析法分析。樹突細胞前驅細胞、未成熟的樹突細胞、及成熟樹突細胞（以經抗原啟動或未啟動）可被冷凍保存以供之後使用。冷凍保存之方法於所屬技術領域中係廣為人知。參閱，例如，美國專利 5,788,963，其係以引用方式納入本文中。

抗原

依據本發明之成熟、經活化的樹突細胞可將抗原呈現給 T 細胞。成熟、經活化之樹突細胞可由將未成熟的樹突細胞與預先決定的抗原於活化時或之後接觸而形成。或者，已接觸抗原（如，分離前於活體內）之未成熟的樹突細胞可與於組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑接觸以製造被活化以誘發細胞毒殺 T 細胞反應之成熟樹突細胞。

4 適當之預先決定的抗原可包括任何對 T 細胞活化係所欲的抗原。這些抗原可包括，例如，細菌抗原、腫瘤特異性或腫瘤相關性抗原（如，全細胞、腫瘤細胞溶胞產物，如，來自神經膠母細胞瘤、前列腺、或卵巢、胸部、直腸、腦部、黑色素瘤、或肺腫瘤細胞、及類似者的）、來自腫瘤之分離的抗原、融合蛋白、微脂粒、及類似者、病毒抗原、及任何其他抗原或抗原片段，如，胜肽或多肽抗原。在特定具體事實中，抗原可以是，例如，但不限於，前列腺特異性膜抗原（PSMA）、前列腺酸性磷酸酶（PAP）、或前列腺特異性抗原（PSA）。（參閱，如，Pepsidero 等人，*Cancer Res.* 40:2428-32(1980); McCormack 等人，*Urology* 45:729-44(1995)）。抗原亦可為細菌細胞、細菌溶胞產物、來自細胞溶胞產物之膜片段、或任何技術領域中已知的來源。抗原可被重組地表現或製造，或甚至化學合成。重組抗原亦可被表現於宿主細胞（如，細菌、酵母菌、昆蟲、脊椎或哺乳動物細胞）表面、可存在於溶胞產物中、或自溶胞產物純化。抗原可以是可溶性抗原或顆粒性抗原。

抗原亦可存在於來自病患之樣本中。例如，來自病患中過度增生或其他疾症之組織樣本可被用為抗原來源。如此之樣本可藉由，例如，切片或手術切除獲取。如此抗原可呈，例如，溶胞產物或為分離之製備物之形式使用。或者，個體（如，癌症病患）細胞之膜製備物，或已建立之細胞系亦可被用為抗原或抗原來源。

在示範性具體事實中，回收自手術檢體之神經膠母細胞瘤腫瘤細胞溶胞產物可被用為抗原來源。例如，癌症病患自己的腫瘤之樣本，其係於切片或手術切除獲取，可被直接用以呈現抗原至樹突細胞或提供細胞溶胞產物供抗原呈現。或者，癌症病患腫瘤細胞之膜製備物可被使用。腫瘤細胞可以是神經膠母細胞腫瘤、前列腺、肺、卵巢、胸部、直腸、腦部、黑色素瘤、或任何他種腫瘤細胞。溶胞產物及膜製備物可以技術領域中所熟知的方法製備自分離的腫瘤細胞。

在一具體事實中，單核球樹突細胞前驅細胞可於基質上分離，自基質沖提，並轉換至生物反應器、或其他封閉系統，如組織培養袋。適當之組織培養袋包括，例如 STERICELL 培養容器（Nexell Therapeutics Inc.）或鐵氟龍培養袋（American Fluoroseal Corp.），及類似者。封閉系統可為任何適當大小或容積，如熟習該項技術者會理解的。適當容積包括，例如，自大約 0.01 升至大約 5 升，或大約 0.01 升至大約 0.05 升，然而較大及較小容積是可行的且落入本發明之範圍內。

單核球樹突細胞前驅細胞亦可被培養於基質上。例如，於基質上的單核球樹突細胞前驅細胞可被培養於生物反應器（包括醱酵槽）或組織培養容器，例如組織培養燒瓶，袋、或盤中。組織培養燒瓶、袋或盤可為任何適當大小或容積，如熟習該項技術者會理解的。生物反應器典型地容積為自大約 0.01 至 5 升，或大約 0.01 至大約 0.05 升，然而較大及較小容積是可行的且落入本發明之範圍內。典型地，用以培養單核球樹突細胞前驅細胞之生物反應器具有大約 0.01 至 0.1 升之容積。生物反應器可以任何適量單核球前驅細胞接種，例如，自每毫升基質大約 10^5 細胞至大約 5×10^6 細胞。基質上之單核球樹突細胞前驅細胞亦可被培養於封閉、無菌系統。

單核球樹突細胞前驅細胞被培養及分化以獲取未成熟的樹突細胞。適當組織培養基包括 AIM-V、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15、及類似者。組織培養基可以胺基酸、維生素、細胞介素，如顆粒球／巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）及／或介白素 4（IL-4）、介白素 7（IL-7）或介白素 13（IL-13）、雙價陽離子、及類似者補充，以促進單核球樹突細胞前驅細胞分化為未成熟的樹突細胞。典型的細胞介素組合係大約各 500 單位/ml 之 GM-CSF 及 IL-4。典型地，若單核球樹突細胞前驅細胞被培養於基質上，被以自基質表面停止黏著之細胞的形式回收之成熟樹突細胞的數目主要為成熟樹突細胞。單核球樹突細胞前驅細胞可培養一段任何適當的時間。

在特定具體事實中，分化前驅細胞至未成熟的樹突細胞之適當培養時間可為大約 4 到大約 7 天。自前驅細胞分化未成熟的樹突細胞可以熟習該項技術者已知的方式監控，例如以經標定之單株抗體監控細胞表面標記（例如，CD14、CD11c、CD83、Cd86、HLA-DR）之存在與否。樹突細胞之表現型亦可由領域中所熟知的方法藉由分析基因模式測定。未成熟的樹突細胞之典型細胞表面表現型會為 CD14⁻、CD11c⁺、CD83⁻、Cd86⁻、HLA-DR⁺。未成熟的樹突細胞亦可被培養於適當組織培養基中以擴展細胞群及／或維持未成熟的樹突細胞於用於進一步分化或抗原攝取、處理、及呈現之狀態。例如，未成熟的樹突細胞可於 GM-CSF 及 IL-4 之存在下維持及／或擴展。

未成熟的樹突細胞對一些應用而言可能係較佳的，因其保存處理新抗原之能力。（參閱，如，Koch 等人，*J. Immunol.* 155:93-100(1995)）。相反地，成熟樹突細胞（如，CD14⁻、CD11c⁺、CD83⁺、Cd86⁺、HLA-DR⁺）（其已被曝露至且處理抗原且至適當成熟條件）典型係已失去有效地處理新抗原的能力。成熟樹突細胞可與胜肽接觸，而該胜肽具有結合第 I 類 MHC 及／或第 II 類 MHC 分子以呈現至細胞表面之能力。

在培養時，未成熟的樹突細胞可視需要地被曝露至預先決定的抗原。適當之預先決定的抗原可包括任何 T 細胞活化所需之抗原，如上。在一具體事實中，未成熟的樹突細胞係於腫瘤細胞溶胞產物存在下（如神經膠母腫瘤細

胞、前列腺、肺、卵巢、胸部、直腸、腦部、黑色素瘤、腫瘤細胞溶胞產物、及類似者）被培養，以用於癌症免疫治療及／或腫瘤生長抑制。其他抗原可包括，例如，細菌及病毒抗原、腫瘤細胞、經純化腫瘤細胞膜、腫瘤特異性或腫瘤相關抗原（如，來自腫瘤的經分離抗原、融合蛋白、微脂體、及類似者），細菌細胞、細菌抗原、病毒顆粒、病毒抗原、及任何其他抗原。此外，抗原可表現於表現該抗原之轉型或轉染之宿主細胞表面，或表現所關注的抗原之轉型或轉殖細胞的細胞溶胞產物或經純化膜。

在接觸抗原（如腫瘤細胞溶胞產物）後，細胞可被培養一段任何適當的時間以允許抗原攝取及處理，以擴展抗原特異性樹突細胞之族群，及類似者。未成熟的樹突細胞亦可被成熟化為經活化的樹突細胞，其能結合於第 I 類 MHC 或第 II 類 MHC 分子呈現抗原。這種成熟化可藉由（例如）於培養基質上培養且使用樹突細胞分化誘發劑，於促進樹突細胞黏著至組織培養基質且在缺乏其他已知成熟劑之條件下培養而進行。典型地，樹突細胞分化誘發劑為 GM-CSF 及 IL-4、IL-13 或 IL-15 及類似者。

依據另一方面，樹突細胞可被曝露至預先決定的抗原及定向成熟劑。定向成熟劑（當單獨使用時）不會誘發單核球樹突細胞前驅細胞分化或誘發未成熟的樹突細胞之成熟，但典型地在與活化方法併用時會引導 DC 成熟至能誘發 Th-1 或 Th-2 反應之細胞。伽瑪干擾素係能誘發受誘發之 T 細胞反應之偏向至 Th-1 反應的劑之實例。

在本發明另一具體事實中，曝露於預先決定的抗原之未成熟的樹突細胞能被用以試管內活化 T 細胞對抗抗原。樹突細胞可於曝露於抗原後立即使用以刺激 T 細胞。或者，樹突細胞可在曝露於抗原及 T 細胞之前於細胞介素之組合（如，GM-CSF 及 IL-4）存在下維持，或樹突細胞可藉由技術領域中熟知的方法冷凍保存以供日後使用。在特定具體事實中，人類樹突細胞被用以刺激人類 T 細胞。

T 細胞或 T 細胞子群可獲取自各種淋巴組織已用作為反應細胞（responder cell）。這種組織包括但不限於脾臟、淋巴結、及週邊血液。經分離或經純化的 T 細胞可呈混合的 T 細胞族群或呈經純化的 T 細胞子群之形式與曝露至預先決定的抗原之樹突細胞共培養。

例如，經純化的 $CD8^+$ T 細胞可與曝露至抗原之樹突細胞共培養以引發抗原特異性 CTL 反應。此外，早期去除 $CD4^+$ T 細胞可在 $CD8^+$ 及 $CD4^+$ T 細胞兩者之混合培養中預防 $CD4^+$ 細胞過度生長。T 細胞純化可藉由正或負選擇達成，其包括，但不限於，使用針對 CD2、CD3、CD4、CD6、及／或 CD8 的抗體。

或者， $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 細胞之混合的族群可與樹突細胞共培養以誘導專一於抗原的反應，包括細胞毒殺及 T 輔助細胞免疫反應。在特定具體事實中，經活化的 $CD8^+$ 或 $CD4^+$ T 細胞可依據本發明之方法產生。典型地，用於產生抗原反應性、極性化的 T 細胞之成熟、經引導的（primed）樹突細胞與將被投藥之係受藥者同基因型的（如，係獲取

自該受藥者)。或者，與欲接受之受藥者具相同 HLA 單元型 (haplotype) 之樹突細胞可試管內使用非癌症細胞 (如，正常細胞) 自 HLA 符合捐者製備。在特定具體事實中，抗原反應性 T 細胞，包括 CTL 及 Th-1 輔助細胞，係於試管內擴展以作為免疫刺激之細胞來源。

細胞群之活體內投藥

在本發明另一角度中，係提供用於投藥成熟、已引導的樹突細胞或已活化的 (如，極性化的) T 細胞、或包含此類細胞之細胞群至需要免疫刺激之受藥者的方法。此類細胞群可包括成熟、已活化的樹突細胞群及／或已活化的 (如，極性化的) T 細胞族群。在特定具體事實中，此類方法係藉由獲取樹突細胞前驅細胞或未成熟的樹突細胞、藉由與組織培養基質、樹突細胞分化誘發劑、及預先決定的抗原接觸以形成被引導以誘發抗原特異性 T 細胞反應的成熟經活化的樹突細胞群，以分化及成熟此類細胞而進行。未成熟的樹突細胞可於活化之前、之時、或之後與抗原接觸。成熟或經活化之樹突細胞可直接投藥至需要免疫刺激之受藥者。

在相關具體事實中，經活化或成熟之樹突細胞可與來自受藥者之淋巴球接觸以刺激淋巴球群內之 T 細胞。經活化、極性化的淋巴球 (視需要地於抗原反應性 CD4⁺及／或 CD8⁺T 細胞之培養中接著殖系擴展) 可被投藥至需要免疫刺激之受藥者。在特定具體事實中，經活化、極性化的 T 細胞為病患自體的。

在另一具體事實中，樹突細胞、T 細胞、及接受之受藥者具相同 MHC (HLA) 單元型。測定受藥者 HLA 單元型之方法係技術領域中已知的。在相關具體事實中，樹突細胞及／或 T 細胞與接受之受藥者為同種異體。例如，樹突細胞可對 T 細胞及接受之受藥者（其與具相同的 MHC (HLA) 單元型）為同種異體。同種異體細胞典型上至少有一個 MHC 對偶基因相吻合（如，同具至少一但非全部的 MHC 對偶基因）。在較不典型的具體事實中，樹突細胞、T 細胞及接受之受藥者對彼此而言均互相為同種異體，但均至少共有一共同的 MHC 對偶基因。

依據一具體事實，T 細胞係獲取自獲取未成熟的樹突細胞之同一受藥者。在試管內成熟及極化後，自體 T 細胞被投藥至受藥者以引發及／或增強已存在之免疫反應。例如，T 細胞可（例如）以大約 10^8 至大約 10^9 個細胞/ m^2 之體表面積的劑量（藉由靜脈內灌注）投藥（參閱，如，Ridell 等人，*Science* 257:238-241(1992)，其係以引用方式納入本文中）。灌注可於需要之間隔（例如，每月）重複。接受者可於 T 細胞灌注期間或之後監控任何不良效應。

依據另一具體事實，依據本發明藉由與新的、未使用之乾淨組織培養基接觸而成熟的樹突細胞可被直接注射至腫瘤、或包含標的抗原之其他組織。此類部份成熟的細胞可攝取抗原及將該抗原於活體內呈現至 T 細胞。

實施例以下實施例僅係提供以描述本發明的不同方面，並不應能被推斷為以任何方式限制本發明。

實施例一：單核球樹突細胞前驅細胞藉接觸組織培養基質之成熟。

在本實施例中，富含前驅細胞之細胞群中的單核球樹突細胞前驅細胞係在 GM-CSF 與 IL-4 存在下被分化以形成未成熟的樹突細胞。未成熟的樹突細胞自組織培養系統收集、清洗、計數、及與預先決定的抗原於新、乾淨之組織培養容器中結合。細胞被在預先決定的可溶性或顆粒性抗原之存在，在典型的樹突細胞維持之條件下，於補充 GM-CSF 及 IL-4 之典型的樹突細胞培養基中培養。樹突細胞成熟劑未被加入培養基中。藉由測定為成熟樹突細胞之特徵的細胞表面標記之存在，確立樹突細胞已在不加樹突細胞成熟劑下成熟。

簡短地說，未成熟的 DC 係由將週邊血液單核球於補充 1%人類血漿之 OptiMEM®培養基（Gibco-BRL）存在下與塑膠接觸而製備。未結合之單核球可藉沖洗移除。被結合之單核球可在每毫升 500 單位 GM-CSF 及 500 單位 IL-4 存在下於 X-VIVO 15®培養基培養大約 6 到 7 天。

未成熟的 DC 係藉由沖提收集且細胞係以培養基沖洗。細胞被計數且被沖洗之 DC 係與腫瘤細胞溶胞產物，該腫瘤細胞係來自（例如）自病患以手術移除之神經膠母腫瘤以接受處理。DC 及溶胞產物係與 GM-CSF 及 IL-4 於一起於培養基中如上，並被加入至新的乾淨未使用之組織培養盤並培養大約 12 至 20 小時。在可選擇的具體事實中伽瑪干擾素可被加入以誘發 Th-1 強化反應。

被活化的 DC 被收集、沖洗、及製備以投藥至病患。經活化的 DC 樣本被用以測試細胞表現型，其藉對 CD14、CD83、CD86 及 HLA-DR 每一者有專一性之抗體標定。經標定細胞以流式細胞儀分析以測定其表現型。經活化的 DC 表現出少許 CD14 或不表現 CD14，係 CD83 陽性，並表現高水平的 CD86 及 HLA-DR，如會對成熟樹突細胞所預期的。

餘下部份之經活化的 DC 被投藥至病患，其係以每次注射 1×10^6 細胞至 1×10^{10} 細胞的量。抗原特異性免疫反應的誘發係由藉由 MHC 四聚體分析測量 T 細胞反應及／或藉由 ELISA 測抗體對抗原之反應而評估。

實施例二：測定不使用成熟劑而活化的單核球樹突細胞前驅細胞之細胞表面表現型

在本實施例中單核球係藉黏著至塑膠培養容器純化，收集與沖洗，並再懸浮於新的組織培養容器一段額外的培養時間。測量成熟樹突細胞標記 CD83 之細胞表面表現。

為產生未成熟的 DC，單核球藉黏著至塑膠而純化並於具有 GM-CSF 及 IL-4、和 1% 人類 AB 血清的樹突細胞培養基培養 7 天。在大約 7 天後，細胞（其近乎全部自由漂浮於培養基中）被收取及重新鋪盤於未使用、乾淨聚苯乙烯組織培養燒瓶，其使用含 GM-CSF 及 IL-4 和大約 1% 人類 AB 血清之樹突細胞培養基。於倒立顯微鏡視覺觀察重新鋪盤之細胞顯現大部分的細胞緊緊地黏著至組織培養表面。重新鋪盤二十小時後細胞表現出 DC 標記 CD83 的誘

發。下表表現對各種分離出之單核球樣本的。

樣本	%CD83 ⁺
A	56.7
B	47.6
C	41
D	21
E	15.4
F	24.1
G	40.5
H	19.6
I	20.5
J	19.4
K	17.9
L	11.6
M	12.5
N	23.6
O	17.1
P	13.8

實施例三：未加成熟劑而活化之樹突細胞的臨床用途

本實施例中獲取自多形性神經膠母腫瘤病患之樹突細胞組成物（在未加樹突細胞分化劑下活化且與製備自病患之腫瘤溶胞產物接觸）之安全性及效能被測試。

腫瘤溶胞產物係製備自手術移除的腫瘤組織。分離之腫瘤組織被切碎並製於容器中，其具有包含膠原酶的緩衝

溶液以分解組織。此混合液被置於室溫過夜。在過濾確定之組織分解後，將被釋放讀腫瘤細胞離心為丸狀物。細胞丸狀物被懸浮於小容量之 RPMI 1640，並接受三次冷凍－解凍循環。在冷凍－解凍後，腫瘤溶胞產物以離心澄清，且含蛋白質之上清液以 0.22 微米濾膜過濾消毒。

富含單核球樹突細胞前驅細胞之細胞群係藉由於 FICOLL 梯度純化淋巴球離析產物，接著黏著至塑膠而製備。黏著細胞為單核球樹突細胞前驅細胞，其係在補充 10% AB 人類血清及各 500U/ml 之 hGM-CSF 和 hIL-4 中之 RPMI 1640 於標準樹突細胞培養件下培養七天。

在七天後分化之未成熟的樹突細胞被收取、清洗及冷凍供日後使用，或與病患腫瘤溶胞產物混合並重新於 1% 至 10% 人類 AB 血清、及各 500U/ml 之 hGM-CSF 和 IL-4 存在下鋪盤於新鮮的組織培養燒瓶。DC 最終濃度為 0.5 至 2 百萬細胞/ml（典型係 1×10^6 細胞/ml）且腫瘤溶胞產物最終濃度為 10 至 1000 $\mu\text{m}/\text{ml}$ （典型性 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

在第一次試驗中被描述之病患接受了與衍伸自自體培養腫瘤細胞的腫瘤溶胞產物接觸之樹突細胞。此研究為劑量上升研究，其中三名病患接受了 1×10^6 DC，三名病患接受了 5×10^6 DC，且六名病患接受了 10×10^6 DC。免疫反應係藉由測量延遲性過敏（DTH 反應）、細胞毒性 T 細胞反應（CTL）、藉由測定及於疾病復發之病例中在手術過程中滲入性淋巴球之存在而評估。此等分析之每一者測量了被誘發的免疫反應之同方面。DTH 反應為輔助 T 細胞（Th）

活性的典型證據，而 CTL 反應測量被誘發的反應是否導致具有殺死腫瘤細胞之能力的 T 細胞。在反應後在腫瘤中所偵測到的滲入之 T 細胞測量經活化的 T 細胞是否具有移動至腫瘤處以原位殺死腫瘤細胞之能力。

表二．免疫反應概述－首次第一期試驗

病患 #	DC 劑量 (細胞數 / 注射)	DTH 皮膚測試增加	週邊 CTL 活動增加	腫瘤內 T 細胞 (於再手術) ^a
1	1×10^6	陽性	陽性	++++
2	1×10^6	陰性	陰性	--
3	1×10^6	陽性	陽性	+++
4	5×10^6	陰性	陽性	++
5	5×10^6	陽性	陽性	n.a.
6	5×10^6	陰性	陽性	n.a.
7	10×10^6	陰性	陰性	--
8	10×10^6	陰性	陰性	++
9	10×10^6	陽性	陽性	+++
10	10×10^6	陰性	陰性	n.a.
11	10×10^6	陰性	陰性	n.a.
12	10×10^6	陰性	陰性	n.a.

^a 以半主觀評估滲入淋巴球數目而計分。

n.a.，因為未進行手術而無法適用。

第二次試驗亦為劑量上升研究，四名病患接受每次注射 1×10^6 DC，六名病患接受每次注射 5×10^6 DC，且六名病

患接受每次注射 10×10^6 DC。在本研究中，腫瘤溶胞產物係衍伸自自各病患手術移除之腫瘤且溶胞產物係與衍伸自該病患之 DC 接觸。免疫反應係藉由於接種後以對抗原特異性 CD8⁺T 細胞之四聚體染色以及藉由於再手術時（若可行）測定滲入性腫瘤 T 細胞而評估。典型地，再手術只於疾病復發後進行。十三名病患具有新診斷之多形性神經膠母細胞瘤（GBM），兩名有復發 GBM，且一名有復發三級寡星狀細胞瘤（oligoastrocytoma）。

以對抗原特異性 T 細胞之四聚體染色評估免疫反應可測定表現針對給定抗原的 T 細胞受體之 T 細胞之存在及數量。此類 T 細胞，若亦表現 CD8，被推定為對抗這些抗原之 CTL 群的代表。本研究所選抗原為已知腫瘤抗原，其已由組織學方法被顯示存在於原移除腫瘤中。反應性係使用標準方法對腫瘤相關抗原，包括 Gp100（黑色素瘤相關腫瘤抗，亦於 GBM 中發現）、Trp-2（酪胺酸酶相關蛋白質二）、Her-2（表皮生長因子受器相關受器酪胺酸激酶）、及 CMV（巨大細胞病毒）作測試。

針對抗原特異性 CD8⁺T 細胞之四聚體染色係於七名病患中進行，且陽性反應係於五名中被偵測到。在五名反應性病患中，兩名以 1×10^6 DC 致免疫且三名以 10×10^6 DC 致免疫。這些結果指出藉由本發明的方法成熟化之 DC 能夠於大多數病患中誘發免疫反應。在大多病例中該反應包括抗原特異性細胞毒性 T 細胞反應。

以上實施例被供以敘述，但非限制，所請求的發明之

範圍。本發明之其他變化對熟習該項技術者而言係立即顯見的且為附屬之申請專利範圍所涵蓋。所有出版品、專利案、專利申請案、及其他於本文中引述者亦以其等之完整內容以引用方式納入本文中。

【圖式簡單說明】

無

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明提供用於誘發未成熟的樹突細胞（DC）之成熟及活化該等細胞之方法，其等不使用樹突細胞成熟劑。已活化的樹突細胞能被用於誘發抗原特異性 T 細胞反應。本發明之方法亦可包含加入定向成熟劑，如伽瑪干擾素，以於所獲得之反應中誘發 Th-1 及／或 Th-2 趨勢。本發明亦提供有用於活化以及誘發抗原特異性 T 細胞之樹突細胞群。相似地說，係提供經活化之抗原特異性 T 細胞族群，及製造其等的方法。

六、英文發明摘要：

The present invention provides methods for inducing the maturation of immature dendritic cells (DC) and for activating those cells without the use of a dendritic cell maturation agent. The activated DC can be used for inducing an antigen specific T cell response. Methods of the invention can also comprise the addition of a directional maturation agent, such as interferon gamma, to induce a Th-1 and/or Th-2 bias in the response obtained. The present invention also provides dendritic cell populations useful for activating and for inducing antigen specific T cells. Similarly, activated antigen specific T cell populations, and methods of making the same are provided.

十、申請專利範圍：

1.一種用於製造包含富含經活化的樹突細胞的族群之細胞群的方法，其包括：將含富含未成熟的樹突細胞的族群之細胞群與組織培養基質及具樹突細胞分化劑之培養基，於適於使未成熟的樹突細胞與組織培養基質黏著及適於試管內培養樹突細胞的條件下，接觸一段足以令經活化的樹突細胞成熟之時間。

2.根據申請範圍第 1 項之方法，其中預先決定的的抗原與細胞群在與組織培養基質接觸之前、之時、或之後接觸。

3.根據申請範圍第 2 項之方法，其中該預先決定的抗原為腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物溶胞產物、膜製備物、重組製造的抗原、胜肽、或經分離之抗原。

4.根據申請範圍第 3 項之方法，其中該細胞溶胞產物或膜製備物係獲取自腦部腫瘤、前列腺腫瘤、前列腺組織、卵巢腫瘤、胸部腫瘤、胸部組織、白血球細胞群、肺部腫瘤、黑色素瘤、膀胱腫瘤、或腫瘤細胞系。

5.根據申請範圍第 4 項之方法，其中腦部腫瘤為多形性神經膠母細胞瘤或寡星狀細胞瘤（oligoastrocytoma）。

6.根據申請範圍第 1 到 5 項中任一項之方法，其中該樹突細胞分化劑為 GM-CSF、IL-4、IL-13、IL-15、或其組合。

7.根據申請範圍第 1 到 5 項中任一項之方法，其中該未成熟的樹突細胞係衍伸自富含單核球樹突細胞前驅細胞之細胞群。

8.根據申請範圍第 7 項之方法，其中該富含單核球樹突細胞前驅細胞之細胞群係與樹突細胞分化誘發劑接觸。

9.根據申請專利範圍第 8 項之方法，其中該樹突細胞分化誘發劑為 GM-CSF、IL-4、IL-13、IL-15、及其組合。

10.根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中該單核球樹突細胞前驅細胞係來自病患或來自 HLA 符合個體。

11.根據申請專利範圍第 3 至 5 項中任一項之方法，其中該腫瘤細胞及樹突細胞係來自病患。

12.根據申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中該未成熟的樹突細胞係進一步與定向成熟劑 (directional maturation agent) 接觸。

13.根據申請專利範圍第 12 項之方法，其中該定向成熟劑為伽瑪干擾素。

14.一種活化未成熟的樹突細胞之方法，其包括將該未成熟的樹突細胞與組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑於適於試管內培養未成熟的樹突細胞及適於使未成熟的細胞黏著至組織培養基質之條件下接觸。

15.根據申請專利範圍第 14 項之方法，其進一步包括將該未成熟的樹突細胞與預先決定的抗原於未成熟的細胞與組織培養基質接觸之前、之時、或之後接觸。

16.根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中該預先決

定的抗原為腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物、膜製備物、重組製造抗原、胜肽、或經分離之抗原。

17.根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該細胞溶胞產物或膜製備物係衍伸自腫瘤組織或腫瘤細胞系。

18.根據申請專利範圍第 17 項之方法，其中該腫瘤組織或腫瘤細胞系係獲取自腦部腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、胸部腫瘤、肺部腫瘤、黑色素瘤、膀胱腫瘤、或白血球細胞群。

19.根據申請專利範圍第 18 項之方法，其中該腦部腫瘤為多形性神經膠母細胞瘤或寡星狀細胞瘤。

20.根據申請專利範圍第 14 至 19 項中任一項之方法，其中該樹突細胞分化誘發劑為 GM-CSF、IL-4、IL-13、IL-15、及其組合。

21.根據申請專利範圍第 14 至 19 項中任一項之方法，其中該未成熟的樹突細胞係進一步與定向成熟劑接觸。

22.根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該定向成熟劑為伽瑪干擾素。

23.一種活化 T 細胞之方法，其包括：

將 T 細胞與樹突細胞群及預先決定的抗原接觸，該樹突細胞群係藉由和組織培養基質與樹突細胞分化誘發劑於促進未成熟的樹突細胞黏著至組織培養基質之條件下接觸而成熟。

24.一種製造經活化的抗原特異性 T 細胞的方法，其包括：

將經分離的未成熟的樹突細胞與預先決定的抗原接觸；

將經分離的未成熟的樹突細胞與組織培養基質及樹突細胞分化誘發劑有助於未成熟的樹突細胞黏著至組織培養基質之條件下接觸以活化未成熟的樹突細胞；及

將經活化的樹突細胞與未成熟的 T 細胞 (naïve T cell) 接觸以形成經活化的抗原特異性 T 細胞。

25.根據申請專利範圍第 24 項之方法，其中該預先決定的抗原為腫瘤特異性抗原、腫瘤相關抗原、病毒抗原、細菌抗原、腫瘤細胞、細菌細胞、表現抗原之重組細胞、細胞溶胞產物、膜製備物、重組製造的抗原、胜肽、或分離之抗原。

26.根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中該細胞溶胞產物或膜製備物係獲取自腦部腫瘤、前列腺腫瘤、前列腺組織、卵巢腫瘤、白血球細胞群、肺部腫瘤、胸部腫瘤、或膀胱腫瘤。

27.根據申請專利範圍第 26 項之方法，其中該腦部腫瘤為多形性神經膠母細胞瘤或寡星狀細胞瘤。

28.根據申請專利範圍第 24 至 27 項中之任一項方法，其進一步包括作為第一步之：

在分化誘發劑存在下培養單核球樹突細胞前驅細胞以形成未成熟的樹突細胞。

29.根據申請專利範圍第 28 項之方法，其中該分化誘發劑為 GM-CSF、介白素 4、GM-CSF 及介白素 4 之組合、或介白素 13。

30.根據申請專利範圍第 28 項之方法，其中該單核球樹突細胞前驅細胞係分離自人類個體。

31.根據申請專利範圍第 30 項之方法，其中該未成熟的樹突細胞與 T 細胞互為自體的。

十一、圖式：

無

29.根據申請專利範圍第 28 項之方法，其中該分化誘發劑為 GM-CSF、介白素 4、GM-CSF 及介白素 4 之組合、或介白素 13。

30.根據申請專利範圍第 28 項之方法，其中該單核球樹突細胞前驅細胞係分離自人類個體。

31.根據申請專利範圍第 30 項之方法，其中該未成熟的樹突細胞與 T 細胞互為自體的。

十一、圖式：

無

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無