

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680052028.3

[51] Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101336291A

[22] 申请日 2006.12.8

[21] 申请号 200680052028.3

[30] 优先权

[32] 2005.12.8 [33] US [31] 60/748,885

[86] 国际申请 PCT/US2006/047083 2006.12.8

[87] 国际公布 WO2007/067782 英 2007.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.29

[71] 申请人 西北生物治疗药物公司

地址 美国马里兰

[72] 发明人 A·L·博因顿 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
代理人 罗菊华

权利要求书 3 页 说明书 25 页

[54] 发明名称

用于诱导未成熟单核细胞的树突细胞的激活
的组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供了用于诱导未成熟树突细胞(DC)成熟和用于在不使用树突细胞成熟剂的情况下激活这些细胞的方法。激活的DC可用于诱导抗原特异性T细胞反应。本发明的方法也可包括加入定向成熟剂例如干扰素 γ 以在获得的反应中诱导Th-1和/或Th-2倾向(bias)。本发明还提供了用于激活和诱导抗原特异性T细胞的树突细胞群体。类似地,提供了激活的抗原特异性T细胞群体和产生所述T细胞群体的方法。

1. 用于产生包含富集的激活的树突细胞的群体的细胞群体的方法，该方法包括：在适合未成熟树突细胞附着至组织培养基质和适合于树突细胞的体外培养的条件下，将包含富集的未成熟树突细胞的群体的细胞群体与组织培养基质和具有树突细胞分化剂的培养基接触，进行足以使激活的树突细胞成熟的时间。

2. 权利要求 1 的方法，其中在与组织培养基质接触之前、同时或之后将预先确定的抗原与细胞群体接触。

3. 权利要求 2 的方法，其中预先确定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、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物、膜制剂、重组产生的抗原、肽或分离的抗原。

4. 权利要求 3 的方法，其中从脑肿瘤、前列腺肿瘤、前列腺组织、卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、乳腺组织、白血病细胞群体、肺肿瘤、黑色素瘤、膀胱肿瘤或肿瘤细胞系获得细胞裂解物或膜制剂。

5. 权利要求 4 的方法，其中脑肿瘤是多形性成胶质细胞瘤或少枝星形细胞瘤。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项的方法，其中树突细胞分化剂是 GM-CSF、IL-4、IL-13、IL-15 或其组合。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的方法，其中未成熟树突细胞来源于就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体。

8. 权利要求 7 的方法，其中将就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体与树突细胞分化诱导剂接触。

9. 权利要求 8 的方法，其中树突细胞分化诱导剂是 GM-CSF、IL-4、IL-13 或 IL-15 和其组合。

10. 权利要求 7 至 9 中任一项的方法，其中单核细胞树突细胞前体来自患者或来自 HLA 匹配的个体。

11. 权利要求 3 至 9 中任一项的方法，其中肿瘤细胞和树突细胞

来自患者。

12. 权利要求 1 至 11 中任一项的方法，其中将未成熟树突细胞进一步与定向成熟剂接触。

13. 权利要求 12 的方法，其中定向成熟剂是干扰素 γ 。

14. 用于激活未成熟树突细胞的方法，该方法包括在适合于未成熟树突细胞的体外培养和适合于未成熟树突细胞附着组织培养基质的条件下，将未成熟树突细胞与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触。

15. 权利要求 14 的方法，该方法进一步包括在将未成熟树突细胞与组织培养基质接触之前、同时或之后，将未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触。

16. 权利要求 15 的方法，其中预先确定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、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物、膜制剂、重组产生的抗原、肽或分离的抗原。

17. 权利要求 16 的方法，其中细胞裂解物或膜制剂来源于肿瘤组织或肿瘤细胞系。

18. 权利要求 17 的方法，其中从脑肿瘤、前列腺肿瘤、卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、黑素瘤、膀胱肿瘤或白血病细胞群体获得肿瘤组织或肿瘤细胞系。

19. 权利要求 18 的方法，其中脑肿瘤是多形性成胶质细胞瘤或少枝星形细胞瘤。

20. 权利要求 14 至 19 中任一项的方法，其中树突细胞分化诱导剂是 GM-CSF、IL-4、IL-13、IL-15 或其组合。

21. 权利要求 14 至 20 中任一项的方法，其中将未成熟树突细胞与定向成熟剂进一步接触。

22. 权利要求 21 的方法，其中定向成熟剂是干扰素 γ 。

23. 用于激活 T 细胞的方法，该方法包括：将 T 细胞与树突细胞群体和预先确定的抗原接触，所述树突细胞群体是通过在有助于未成

熟树突细胞附着至组织培养基质的条件下，与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触而成熟的树突细胞群体。

24. 用于产生激活的抗原特异性 T 细胞的方法，该方法包括：将分离的未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触；在有助于未成熟树突细胞附着至组织培养基质的条件下，将分离的未成熟树突细胞与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触以激活未成熟树突细胞；和将激活的树突细胞与幼稚型 T 细胞接触以形成激活的抗原特异性 T 细胞。

25. 权利要求 24 的方法，其中预先确定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、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物、膜制剂、重组产生的抗原、肽抗原或分离的抗原。

26. 权利要求 25 的方法，其中从脑肿瘤、前列腺肿瘤、前列腺组织、卵巢肿瘤、白血病细胞群体、肺肿瘤、乳腺肿瘤或膀胱肿瘤获得细胞裂解物或膜制剂。

27. 权利要求 26 的方法，其中脑肿瘤是多形性成胶质细胞瘤或少枝星形细胞瘤。

28. 权利要求 24 至 27 中任一项的方法，该方法作为第一步骤的包含：在分化诱导剂存在的情况下培养单核细胞树突细胞前体以形成未成熟树突细胞。

29. 权利要求 28 的方法，其中分化诱导剂是 GM-CSF、白细胞介素 4、GM-CSF 和白细胞介素 4 的混合物或白细胞介素 13。

30. 权利要求 28 和 29 的方法，其中从人受试者分离单核细胞树突细胞前体。

31. 权利要求 30 的方法，其中未成熟树突细胞和 T 细胞相互之间是自体同源的。

用于诱导未成熟单核细胞的 树突细胞的激活的组合物和方法

相关应用

本申请要求 2005 年 12 月 8 日提交的美国临时申请 60/748,885 的优先权，通过引用将其包含入本文。

发明背景

抗原递呈细胞 (APC) 在引发有效的免疫反应中是非常重要的。它们不仅将抗原呈递至具有抗原特异性 T 细胞受体的 T 细胞，而且还提供了 T 细胞激活所必需的信号。这些信号仍未完全确定，但牵涉许多细胞表面分子和细胞因子或生长因子。幼稚型 T 细胞的激活和极化所必需的因子可以与记忆性 T 细胞的再激活所需的因子不同。APC 为 T 细胞提供抗原和递送信号的能力通常称为辅助细胞功能 (accessory cell function)。尽管已显示单核细胞和 B 细胞是感受态 (competent) APC，但它们的体外抗原呈递能力似乎限于之前致敏的 T 细胞的再激活。因此，单核细胞和 B 细胞不能直接功能性激活幼稚型或未接触抗原的 T 细胞群体。它们也不能递送可极化诱导的免疫反应或当其被诱导的时的免疫反应的信号。

树突细胞 (DC) 是免疫系统的据认为能够激活幼稚型和记忆性 T 细胞的专职抗原递呈细胞。日益增多地离体制备树突细胞以用于免疫治疗，特别是癌症的免疫治疗。具有最佳免疫刺激性质的树突细胞的制备需要理解和利用这些细胞的生物学知识以用于进行离体培养。已描述了用于这些细胞培养的各种方案，所述方案具有归于各方案的不同有利方面。最近的方案包括无血清培养基的使用，赋予培养的细胞以希望的免疫刺激性质的成熟条件的应用。

树突细胞的激活起始了将未成熟 DC (其表型与皮肤郎格汉斯细胞

相似) 转变成成熟的、能够迁移至淋巴结的抗原递呈细胞的过程。该过程导致表征未成熟树突细胞的强抗原摄取能力的渐近和累进丢失以及导致共刺激细胞表面分子和各种细胞因子的表达上调。不同的刺激物可起始 DC 的成熟。该过程非常复杂且在体外至少可花费 48 小时才能完成。成熟的一个其他结果是细胞的体内迁移性质的改变。例如, 成熟诱导几个趋化因子受体, 包括 CCR7, 所述受体指导细胞至引流淋巴结的 T 细胞区域, 在该区域成熟 DC 激活 T 细胞, 所述 T 细胞抗 DC 表面呈递的 I 类和 II 类 MHC 分子背景中的抗原。术语“激活”和“成熟”以及“激活的”和“使成熟”描述了诱导和完成从未成熟 DC (部分特征在于摄取抗原的能力) 至成熟 DC (部分特征在于有效地刺激新形成的 T 细胞反应的能力) 的转变。所述术语在本领域内通常可互换使用。

已知的成熟方案基于据认为 DC 在暴露于抗原期间或之后遇到的体内环境。该方法的最佳实例是将单核细胞条件化的培养基 (MCM) 用作细胞培养基。通过培养单核细胞在体外产生 MCM, 并且将其用作成熟因子的来源。(参见例如, 美国 2002/0160430, 通过引用包含入本文)。MCM 中负责成熟的主要成分据报导为 (促) 炎症细胞因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

因此可通过许多不同的因子触发 DC 的成熟, 所述因子通过宿主参与信号转导途径。作为结果, 不存在单一的成熟途径或结果, 但事实上存在许多成熟 DC 策略, 其各自具有它们自身的独特的功能特征。从概念上来说这是这个道理, 因为免疫系统必须对其作出反应的对身体的各种威胁是多方面的, 因此这需要不同的攻击策略。例如, 在通过补充以特定抗体的、激活的巨噬细胞充分清除细菌感染, 通过有效地杀死病毒感染的细胞的细胞毒性 T 细胞充分攻击病毒感染的时候。癌细胞的杀死通常牵涉细胞毒性 T 细胞、天然杀伤细胞和抗体的结合。

因此可设计 DC 的体外成熟, 以诱导免疫系统趋向于一种类型的免疫反应而非另一种免疫反应, 即, 极化免疫反应。DC 的定向成熟描述了概念, 即成熟过程的结果规定了由使用成熟 DC 的处理引起的跟着

发生的免疫反应的类型。以其最简单的形式,定向成熟导致产生 DC 群体,该 DC 群体产生指导对 Th1 型或 Th2 型反应极化的 T 细胞反应的细胞因子。DC 表达多至 9 种不同的 Toll 样受体 (TLR1 至 TLR9), 所述受体中的各受体可用于触发成熟。毫不惊奇的是,细菌产物与 TLR2 和 TLR4 的相互作用导致 DC 的定向成熟,从而导致最适合于处理细菌感染的极化反应。相反地,通过 TLR7 或 TLR9 触发的成熟似乎更倾向于导致抗病毒类型的反应。作为另一个的例子,向最成熟的方案加入干扰素 γ (IFN- γ) 导致成熟 DC 产生白细胞介素 12, 这规定了 Th1 类型反应。相反地,前列腺素 E2 的加入具有相反的效应。

因此可用于激活的 DC 的定向成熟的因子可包括例如白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α)。其他成熟因子包括前列腺素 E2 (PGE2)、poly-dIdC、血管肠肽 (VIP)、细菌脂多糖 (LPS) 以及分枝杆菌或分枝杆菌的组分例如特定的细胞壁成分。其他成熟因子包括例如咪唑喹啉化合物,例如咪唑喹啉-4-胺化合物,例如 4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-乙醇(称为 R848)或 1-(2-甲丙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺,以及它们的衍生物(WO 00/47719, 其全文通过引用包含入本文)、合成的双链多核苷酸例如 poly[I]:poly[C(12)U]等、Toll 样受体 (TLR) 例如 TLR3、TLR4、TLR7 和/或 TLR9 的激动剂、包含已知诱导 DC 的成熟的未甲基化的 CpG 基序的核酸的序列等。此外,上述试剂的任何组合可用于诱导树突前体细胞的成熟。

完全成熟的树突细胞在质量上和数量上与未成熟的 DC 不同。一旦完全成熟,DC 表达更高水平的 MHC I 类和 II 类抗原,以及更高水平的 T 细胞共刺激分子,即 CD80 和 CD86。这些变化增加了树突细胞激活 T 细胞的能力,因为它们通过 T 细胞例如 CD28 等上的共刺激分子的相应物(counterpart)增加了细胞表面的抗原密度和 T 细胞激活信号的强度。此外,成熟 DC 产生大量刺激和极化 T 细胞反应的细胞因子。

通常,用于离体 DC 产生的方法包括从患者获得就 DC 前体细胞而富集的细胞群体,然后在导回患者之前,在体外将 DC 前体细胞分化成

成熟 DC。一些人认为 DC 必须完全分化,或它们将去分化回到单核细胞/巨噬细胞和失去许多它们的免疫增强能力。已使用上面列出的方法和试剂成功地实现了从单核细胞产生的 DC 的离体成熟。

一般地,为产生未成熟树突细胞(DC),人们必须首先从其他污染细胞类型纯化或富集单核细胞前体。通常通过将单核细胞前体附着至塑料(聚苯乙烯)表面来进行所述纯化或富集,因为单核细胞对塑料具有比在例如外周血中发现的其他细胞例如淋巴细胞和天然杀伤(NK)细胞更大的依附倾向。在通过强力清洗基本上除去污染细胞后,将单核细胞与将单核细胞前体转化成未成熟 DC 或直接转化成成熟 DC 的细胞因子一起培养。用于区分单核细胞前体细胞和未成熟 DC 的方法最早由 Sallusto 和 Lanzavecchia (J. Exp. Med., 179:1109-1118, 1994, 通过引用将其包含入本文)描述,他们使用细胞因子 GM-CSF 和 IL-4 诱导单核细胞至未成熟 DC 的分化。尽管最常使用细胞因子的该组合,但已描述了不同的其他组合实现了相同的目的,例如用 IL-13 或 IL-15 取代 IL-4。该过程的最终结果是“面纱”细胞,该细胞表达 T 细胞共刺激分子以及高水平的主要组织相容性复合物(MHC)的分子,但不表达树突细胞成熟标记 CD83。这些细胞类似于皮肤中的朗格汉斯细胞,且它们的主要生理功能是捕获入侵的微生物。

该方法的变型包括纯化单核细胞的不同方法,包括例如,正切流动过滤(TFF),或通过将附着至小珠的抗体与单核细胞上的表面分子结合。然后将具有结合细胞的小珠浓集在柱子中或磁性表面上,这样可在将单核细胞从小珠洗脱后将污染细胞洗掉。在获得树突细胞前体的另一个方法中,纯化来自血液(美国专利 5,994,126,通过引用包含入本文)或来自骨髓的表达干细胞标记 CD34 的细胞。可将这些细胞与必需细胞因子 GM-CSF 一起培养以分化成成熟的 DC。这些 DC 似乎具有与从单核细胞产生的未成熟 DC 非常相似的特征和功能性质。

未成熟 DC 具有摄取和加工抗原的高容量,但具有有限的起始免疫反应的能力。通过未成熟 DC 的成熟获得引起免疫反应的能力。该成熟也称为激活 DC 或 DC 的激活。通过与上面所示的诱导成熟的细胞因

子、细菌产物或病毒组分等接触来启动成熟过程。

尽管这些方法能够产生成熟 DC,但使用重组分子和细胞上清液进行 DC 成熟具有不利方面。这些方面包括这些试剂的批次与批次之间质量和产量不一致以及引入了大量外源蛋白,所述外源蛋白可与目的抗原竞争运输入单核细胞树突细胞前体以进行加工。外源蛋白也可以是有毒性的或如果给患者施用则导致自身免疫。这样的试剂的生产成本也可以很昂贵,从而使得免疫治疗的费用昂贵得让人不敢问津。

发明概述

目前描述的方法和组合物提供了未成熟树突细胞 (DC) 的激活的诱导,和引发这些细胞进行抗原特异性免疫反应。在一个方面,提供了通过在培养条件下将未成熟树突细胞与组织培养基质和培养基接触来产生就激活的树突细胞而富集的细胞群体的方法,所述培养条件适合于树突细胞附着组织培养基质和适合于在足以形成就激活的树突细胞而富集的细胞群体的时间内体外培养未成熟的树突细胞。在所述方法中,不必加入树突细胞成熟剂来诱导树突细胞群体的激活。可在将未成熟树突细胞与组织培养表面接触前、接触过程中或接触后将未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触。预先确定的抗原可以是例如肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、肿瘤细胞、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物、膜制剂、重组产生的抗原、肽抗原(例如,合成的肽抗原)或分离的抗原。此外,抗原可以是可溶性抗原或颗粒抗原。在特定的实施方案中,抗原可以是来源于患者肿瘤或肿瘤细胞系的细胞裂解物或膜制剂。

在某些实施方案中,方法还可任意地包括获得就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体;和在试剂存在的情况下培养前体,所述试剂可诱导单核细胞树突细胞前体细胞分化形成成熟树突细胞群体。合适的树突细胞分化试剂包括,例如,GM-CSF、白细胞介素 4、GM-CSF 和白细胞介素 4 的、或 GM-CSF 和白细胞介素 13 或白细胞介素 15 的混合物。可以以从人受试者分离的细胞的形式获得单核细胞树突细胞前

体。

在另一个方面，提供了用于产生就激活的树突细胞而富集的细胞群体的方法。方法通常包括提供就未成熟树突细胞而富集的细胞群体；和在培养条件下将未成熟树突细胞与具有树突细胞分化诱导剂的组织培养基质和培养基接触，所述培养条件适合于树突细胞与组织培养基质的附着和适合于未成熟树突细胞的体外培养。培养细胞，进行足以形成就激活的成熟树突细胞而富集的细胞群体的时间。当给哺乳动物施用，所得的激活的成熟树突细胞群体在该哺乳动物中产生抗原特异性免疫反应。可在适合于附着的条件下，在与组织培养基质接触之前、接触期间或接触后将未成熟树突细胞群体与预先确定的抗原接触。预先确定的抗原可以是例如肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、肿瘤细胞、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物、膜制剂、重组产生的抗原、肽抗原（即，合成的肽）或分离的抗原。抗原可以是可溶性抗原或颗粒抗原。在特定的实施方案中，抗原是来源于患者肿瘤或肿瘤细胞系的细胞裂解物或膜制剂。也可加入可指导 DC 的成熟倾向对 Th1 和/或 Th2 反应的试剂，例如干扰素 γ (IFN γ)。

在某些实施方案中，方法还可任意地包括获得单核细胞树突细胞前体；和在分化剂存在的情况下体外培养前体，从而形成未成熟树突细胞。合适的分化剂包括例如 GM-CSF、白细胞介素 4、白细胞介素 13、白细胞介素 15 或其混合物。可从需治疗的人受试者或从组织相容性匹配的个体分离单核细胞树突细胞前体。

在另一个实施方面，提供了用于激活 T 细胞的组合物。组合物可包含通过在适合于树突细胞附着组织培养基质和适合于激活的条件下与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触而被激活的和成熟的树突细胞群体；和预先确定的抗原。树突细胞群体可产生与通过前述方法产生的成熟树突细胞群体诱导的免疫反应相似的抗原特异性免疫反应。通过将未成熟树突细胞与之前的培养基和加入的细胞因子分离，然后在不加入树突细胞成熟剂的情况下，在适合于 DC 附着至组织培养

基质的条件下将分离的未成熟树突细胞与组织培养基质接触来产生树突细胞群体。树突细胞，一旦在适合于树突细胞附着至组织培养基质的条件下与组织培养基质接触后，立即被触发进行通过激活和成熟，形成活性成熟树突细胞。与未成熟树突细胞同时加入组织培养基质的或在成熟过程中（即在激活后但在完全成熟之前）加入的预先确定的可溶性抗原或颗粒抗原能够被树突细胞摄取和加工，并且在合适的细胞表面受体（与 T 细胞接触后可获得的）的背景下被呈递，从而诱导抗原特异性免疫反应。

在另一个方面，提供了分离的、激活的树突细胞群体。细胞群体包括和富集之前在有助于树突细胞附着至组织培养基质的条件下与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触的成熟的激活的单核细胞树突细胞。所得的激活的树突细胞可摄取和加工抗原，且在体外持续培养后，可获得成熟树突细胞的细胞表面表型。细胞群体可以任意地包括预先确定的抗原和/或分离的 T 细胞，例如幼稚型 T 细胞。T 细胞可以任意地存在于分离的淋巴细胞的制剂中。

也提供了产生激活的 T 细胞的方法。方法通常包括提供就分离的未成熟树突细胞而富集的细胞群体；在适合未成熟树突细胞附着至组织培养基质的条件下将未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触和将未成熟树突细胞与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触。培养细胞，进行足以诱导未成熟树突细胞的激活的时间以形成激活的树突细胞。可将激活的树突细胞与幼稚型 T 细胞接触，从而形成激活的抗原特异性 T 细胞。合适的抗原可包括例如肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、肿瘤细胞、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物（包括肿瘤细胞裂解物）、膜制剂、重组产生的抗原、肽抗原（例如，合成的肽抗原）或分离的抗原。预先确定的抗原可以是可溶性抗原或颗粒抗原。也可加入可指导 DC 的成熟使反应倾向 Th1 和/或 Th2 反应的试剂，例如干扰素 γ 。

可将就未成熟树突细胞而富集的细胞群体同时与预先确定的抗原和组织培养基质以及树突细胞分化诱导剂接触，或可在与组织培养

基质和树突细胞分化诱导剂接触之前、期间或同时或之后，将细胞与预先确定的抗原接触。在某些实施方案中，方法还可包括获得就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体；和在树突细胞分化诱导剂存在的情况下体外培养前体以诱导未成熟树突细胞的形成。合适的分化诱导剂包括，例如，GM-CSF、白细胞介素 4、白细胞介素 13 或白细胞介素 15 或其混合物。可任意地从人受试者获得单核细胞树突细胞前体。在特定的实施方案中，单核细胞树突细胞前体细胞、未成熟树突细胞和/或 T 细胞相互之间是自体同源的。

可对需要抗原特异性免疫反应刺激的动物，特别是哺乳动物施用激活的抗原特异性 T 细胞。合适的抗原包括例如肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、肿瘤细胞、细菌细胞、表达抗原的重组细胞、细胞裂解物、膜制剂、重组产生的抗原、肽抗原（例如，合成的肽抗原）或分离的抗原。在特定的实施方案中，细胞裂解物和/或膜制剂来源患者肿瘤或肿瘤细胞系。可任意地将未成熟树突细胞同时与预先确定的抗原、和组织培养基质、树突细胞分化诱导剂接触，或可在与新的、未使用的、干净的组织培养基质接触之前将未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触。

在某些实施方案中，方法还可包括从动物分离单核细胞树突细胞前体；和在分化剂存在的情况下在体外培养前体以形成未成熟树突细胞。分化剂可以是例如 GM-CSF、白细胞介素 4、白细胞介素 13、白细胞介素 15 或其混合物。

单核细胞树突细胞前体未成熟树突细胞群体和/或 T 细胞对于动物可以是自体的或对于动物可以是同种异体的。可选择地，单核细胞树突细胞前体、未成熟树突细胞和/或 T 细胞可具有与动物相同的 MHC 单元型，或共有 MHC 标记。在某些实施方案中，动物可以是人或可以是非人动物。

发明详述

本发明提供了用于诱导或触发未成熟树突细胞（DC）群体的激活

和成熟以及引发这些细胞群体进行抗原特异性免疫反应的方法。可从制剂培养基（包括分离培养基、培养培养基等）获得未成熟树突细胞群体，和在树突细胞成熟剂不存在的情况下，将就未成熟单核细胞树突细胞而富集的细胞群体在适合于 DC 附着至组织培养基质的条件下与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触。可在适合于体外细胞培养的条件下将未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触以使其可被 DC 摄取加工和呈递。可在激活起始期间、之前或之后进行与目的抗原的接触。可选择地，可获得已暴露于抗原（例如，体内）的未成熟单核细胞树突细胞并将其在相似的适合细胞培养的条件下与组织培养基质接触。所得的激活的成熟树突细胞呈递目的抗原，从而被引发激活 T 细胞朝向抗原特异性反应。可通过加入定向成熟剂（directional maturation agent）例如干扰素 γ (IFN γ) 等来影响反应的方向，即支持 Th-1 或 Th-2 反应的反应倾向。

在另一个方面，可从受试者或从供体获得就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体。可将细胞群体与树突细胞分化诱导剂例如一种或多种细胞因子（例如但不限于 GM-CSF，和 GM-CSF 与 IL-4、GM-CSF 与 IL-13、GM-CSF 与 IL-15 的混合物等）接触来获得未成熟树突细胞。然后可将未成熟树突细胞与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂一起或，与细胞因子或其他定向成熟剂一起与预先确定的抗原接触，从而激活和/或部分使树突细胞成熟。可将成熟树突细胞直接用于在受试者中诱导抗原特异性免疫反应或可将细胞用于在 T 细胞中诱导抗原特异性免疫反应。在某些实施方案中，刺激 MHC I 类抗原加工，这用于引发抗展示预先确定的抗原的细胞的 CTL 反应。可通过加入定向成熟剂例如干扰素 γ 来影响诱导的反应的方向。如此处所使用的，定向成熟剂是当单独使用时可影响成熟 DC 的最终状态但不诱导 DC 成熟的试剂。例如，定向成熟剂可极化 DC 群体的成熟以有利于 Th1 反应而不利于 Th-2 反应，或反之亦然。

树突细胞是在多种淋巴样和非淋巴样组织中发现的不同抗原递呈细胞群体。(See Liu, *Cell* 106: 259-262 (2001); Steinman, *Ann.*

Rev. Immunol. 9: 271-296 (1991))。树突细胞包括脾的淋巴树突细胞、表皮的朗格汉斯细胞和血液循环中的面纱细胞。总体上, 基于它们的形态学、高水平的表面 MHC-II 类表达和某些 T 细胞、B 细胞、单核细胞以及天然杀伤细胞上表达的其他表面标记的不存在将树突细胞分类为一类细胞。特别地, 单核细胞来源的树突细胞 (也称为单核细胞树突细胞) 通常表达 CD11c、CD80、CD83、CD86 且为 HLA-DR⁺, 但通常是而非总是 CD14⁻。

相反地, 单核细胞树突细胞前体 (通常为单核细胞) 通常是 CD14⁺ 且不表达或表达极低水平的 HLA-DR、CD83 和 CD86。可从它们存在的任何组织, 特别是淋巴样组织例如脾、骨髓、淋巴结和胸腺获得单核细胞树突细胞前体。也可从循环系统获得单核细胞树突细胞前体。外周血是容易获得的单核细胞树突细胞前体的来源。脐带血是单核细胞树突细胞前体的另一个来源。可从多种其中可引发免疫反应的生物获得单核细胞树突细胞前体。这样的生物包括动物, 例如包括人和非人动物, 例如灵长类动物、其他哺乳动物 (包括, 但不限于狗、猫、小鼠和大鼠)、鸟 (包括鸡) 以及其转基因物种。

在某些实施方案中, 可从健康受试者或可选择地从需要免疫刺激的受试者, 例如癌症患者 (例如, 脑癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌等) 或细胞免疫刺激对其来说可以是有益的或希望的另一个受试者 (例如, 具有细菌或病毒感染等的受试者) 获得就单核细胞树突细胞前体和/或未成熟树突细胞而富集的细胞群体。还可从 HLA 匹配的健康个体获得树突细胞前体和/或未成熟树突细胞以对需要免疫刺激的 HLA 匹配的受试者进行施用。

树突细胞前体和未成熟树突细胞

用于从不同来源 (包括血液和骨髓) 分离就树突细胞前体和未成熟树突细胞而富集的细胞群体的方法在本领域内是已知的。例如, 可通过收集肝素化血液, 通过血浆分离置换法 (apheresis) 或白细胞分离法 (leukapheresis)、通过血沉棕黄层的制备、花结法 (rosetting)、离心、密度梯度离心 (例如, 使用 FICOLL (例如 FICOLL-PAQUE®)、

PERCOLL[®] (用非可透析的聚乙烯吡咯酮 (PVP) 包被的胶体硅颗粒 (15-30 mm 的直径)、蔗糖等)、细胞的差别裂解、过滤等获得就树突细胞前体和未成熟树突细胞而富集的细胞群体。在某些实施方案中, 可以例如通过从受试者收集血液, 离心 (defibrinating) 以除去血小板和裂解红细胞来制备白细胞群体。任意地, 可通过例如通过密度梯度材料 (例如 PERCOLL[®] 梯度) 的离心来就单核细胞树突细胞前体富集树突细胞前体和未成熟树突细胞。

可任意地在例如封闭的、无菌的系统中制备就树突细胞前体和未成熟树突细胞富集的所有群体。如此处所用的, 术语“封闭的、无菌的系统”或“封闭系统”是指其中对未灭菌的、环境或循环气体或其他未灭菌条件的暴露被减小至最低限度或消除的系统。用于获得树突细胞前体和未成熟树突细胞的封闭的系统通常不包括开放顶端的管中的密度梯度离心、细胞的开放空气中的转移 (open air transfer of cell)、组织培养皿或未封闭的培养瓶中的细胞培养等。在一般的实施方案中, 封闭系统允许树突细胞前体和未成熟树突细胞从最初的收集容器无菌转移至可密闭的组织培养容器而不暴露于未灭菌的空气。

在某些实施方案中, 如 WO 03/010292 (其公开内容通过引用包含入本文) 中所述, 通过将单核细胞附着至单核细胞结合基质来获得单核细胞树突细胞前体。例如, 可将白细胞群体 (例如通过白细胞分离法分离的) 与附着单核细胞树突细胞前体的基质接触。当将白细胞群体与基质接触时, 白细胞群体中的单核细胞树突细胞前体优先附着至基质。其他白细胞 (包括其他潜在的树突细胞前体) 展示减少的对基质的结合亲和力, 从而允许单核细胞树突细胞前体在基质的表面上优先富集。

合适的基质包括, 例如, 具有大的表面积对体积比的基质。这样的基质可以是例如, 微粒或纤维性基质。合适的微粒基质包括例如玻璃、塑料微粒、玻璃包被的塑料微粒、玻璃包被的聚苯乙烯微粒和适合于蛋白质吸附的其他微珠。合适的纤维性微粒包括微毛细管和微绒毛膜。微粒或纤维性基质通常允许附着的单核细胞树突细胞前体洗脱

而不显著地减少附着的细胞的成活力。微粒或纤维性基质可以基本上是无孔的,从而有助于单核细胞树突细胞前体或树突细胞从基质洗脱。

“基本上无孔的”基质是其中至少大部分存在于基质中的孔比细胞更小从而使基质中捕获的细胞减少至最低限度的基质。

任意地,可通过加入结合介质来增强单核细胞树突细胞前体至基质的附着。合适结合介质包括单核细胞树突细胞前体培养基(例如, AIM-V[®]、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15[®]等),所述培养基单独地或以任何组合补充以细胞因子(例如,粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素 4 (IL-4)或白细胞介素 13 (IL-13))、血浆、血清(例如,人血,例如自体或同种异型的血清)、纯化的蛋白质例如血清白蛋白、二价阳离子(例如,钙和/或镁离子)和帮助单核细胞树突细胞前体特异性附着至基质或阻止非单核细胞树突细胞前体附着至基质的其他分子。在某些实施方案中,可加热失活血浆或血清。加热失活的血浆对白细胞可以是自体或异源的。

在单核细胞树突细胞前体附着至基质后,可将未附着的白细胞与单核细胞树突细胞前体/基质复合物分离。可使用任何合适的方法将未附着的细胞与复合物分开。例如,可让未附着的白细胞和复合物的混合物沉降,然后倒出或引流排出未附着的白细胞和培养基。可选择,可对混合物离心,轻轻倒出或从沉淀的复合物引流排出包含未附着白细胞的上清液。

在另一个方法中,可从通过使用正切流动过滤装置制备的白细胞中富集的细胞群体获得就单核细胞树突细胞前体而富集的所有群体。用于获得就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体的正切流动过滤装置可包括具有错流室的清除器单位(remover unit)、过滤室和置于之间的过滤器(参见 WO 2004-000444, 其全文通过引用包含入本文)。过滤器在一侧(滞留表面(retentate surface))在液体中与错流室相通,在另一侧(滤出液表面)与过滤室相通。错流室具有适合于将包含白细胞的血液成分样品导入错流室的进口并且平行于过滤器的滞留表面。也在错流室中提供了出口,其位于室的中央部分,

与过滤器的滞留表面相对。适合用于正切流动过滤装置的过滤器通常具有范围在大约 1 至 10 微米的平均孔径。过滤器可具有大约 3 至大约 7 微米的平均孔径。还可包括用于提供预先确定的样品进入错流室的进口的输入速率的方法和用于控制滤液通过过滤器从而进入过滤器室的过滤速率的方法。过滤速率控制是指限制过滤的速率以使之低于过滤器的无抗击过滤速率 (unopposed filtration rate)。可通过源装置 (source device) 例如白细胞分离装置或装有从白细胞分离装置收集的样品的容器提供包含血液成分的样品。

可体外培养或离体培养树突细胞前体以进行分化、成熟和/或扩增。如此处所使用的, 分离的未成熟树突细胞、树突细胞前体、T 细胞和其他细胞是指通过人工从其天然环境分离而存在的, 从而为非自然产物的细胞。分离的细胞可以以纯化的形式、半纯化的形式 (例如, 富集的细胞群体) 存在或存在于非天然环境中。简而言之, 离体分化通常包括在一种或多种树突细胞分化剂存在的情况下培养树突细胞前体或具有树突细胞前体的细胞群体。合适的分化诱导剂可以是例如, 但不限于, 细胞生长因子 (例如, 细胞因子例如 (GM-CSF)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 13 (IL-13)、白细胞介素 15 (IL-15) 和/或其混合物)。在某些实施方案中, 诱导单核细胞树突细胞前体以分化成单核细胞来源的未成熟树突细胞。

可在合适的培养条件下培养树突细胞前体和诱导其分化。合适的组织培养基包括例如 AIM-V[®]、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15[®]等。组织培养基可补充以血清、氨基酸、维生素、细胞因子例如 GM-CSF 和/或 IL-4、IL-13 或 IL-15、二价阳离子等, 以促进细胞分化成未成熟树突细胞。在某些实施方案中, 可在体外在无血清培养基中培养树突细胞前体。这样的培养条件可任意地不包括任何动物来源的产物。常用的树突细胞培养基中的常用细胞因子混合物包含各自大约 500 个单位/ml 的 GM-CSF 和 IL-4。树突细胞前体, 当分化形成未成熟树突细胞时, 其表型与皮肤朗格汉斯细胞相似。未成熟树突细胞通常是 CD14⁻和 CD11c⁺, 表达低水平的 CD86 和 CD83, 能够通过专门的吞噬作用捕

获可溶性抗原。

通常，在现有方法中，在对患者施用前或在与 T 细胞接触前，以体外或离体的方式使未成熟树突细胞成熟形成成熟树突细胞。在这些方法中，在预先确定的抗原之前或与其一起向包含未成熟树突细胞的体外培养物中加入树突细胞成熟剂。一旦成熟，DC 逐渐和累进地失去摄取抗原的能力，它们通常展示上调的共刺激细胞表面分子和各种细胞因子的表达。特别地，成熟 DC 表达比未成熟树突细胞更高水平的 MHC I 类和 II 类抗原，成熟的树突细胞通常鉴定为表现 CD80⁺、CD83⁺、CD86⁺和 CD14⁻。更高的 MHC 表达导致 DC 表面上抗原密度的增加，同时共刺激分子 CD80 和 CD86 的上调通过 T 细胞上的共刺激分子的相应物例如 CD28 加强了 T 细胞激活信号。

与现有方法不同，通过在适合于树突细胞附着至组织培养表面的条件下将分离的未成熟树突细胞与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触来起动的或触发本发明的方法中的未成熟树突细胞的激活。在本发明的常用方法中，在不加入成熟剂的情况下完成激活。从前述培养基质或纯化介质中取出和从前述培养基中分离未成熟树突细胞。然后对分离的未成熟树突细胞进行计数，并且冷冻以待以后与新配制的培养基（在方法的剩余部分不加入树突细胞成熟因子）一起使用。在一个可选择的方法中，可在激活期间加入定向成熟剂以使树突细胞产生偏向性，这样它们可极化 T 细胞反应朝向 Th-1 或 Th-2 反应。例如，但不作为对可使用的试剂的限定，可加入干扰素 γ 以使 T 细胞反应偏向 Th-1 反应。加入单核细胞树突细胞前体或未成熟 DC 的干扰素 γ 本身不诱导 DC 分化和/或成熟。

用于本发明的方法的组织培养基质可包括组织培养孔、培养瓶、瓶、袋或用于生物反应器的任何基质例如纤维、小珠、板等。通常，组织培养基质包括塑料例如聚苯乙烯、Teflon[®]（聚四氟乙烯，PTFE）等。最常用于树突细胞（用于免疫疗法）的离体培养的 these 组织培养基质包括组织培养瓶、袋或由多个塑料叠加层组成的小室部分（cell fraction）等。

可在合适的成熟培养条件中培养和成熟分离的未成熟树突细胞。合适的组织培养基包括 AIM-V[®]、RPMI 1640、DMEM, X-VIVO 15[®]等。组织培养基可补充以氨基酸、维生素、细胞因子、人血清例如大约 1% 至大约 10% 的人 AB 血清、二价阳离子等, 以促进细胞的成熟。

通过本领域内已知的方法监测树突细胞的成熟或激活。可在本领域熟悉的测定法例如流式细胞术、免疫组织化学法等中检测细胞表面标记。还可就细胞因子的产生(例如, 通过 ELISA、FACS 或其他免疫测定法)监测细胞。在根据本发明激活的 DC 群体中, 还可就典型的细胞表面标记 CD83、CD86 和 HLA-DR 的出现测定细胞。这些抗原中的一些如 CD83 只在成熟 DC 上表达, 然而其他抗原的表达在成熟后显著上调。成熟 DC 也失去了通过胞饮作用摄取抗原的能力, 这可通过本领域技术人员熟知的摄入测定法来进行分析。可冷藏保存已接触抗原的或未接触抗原的树突细胞前体、未成熟树突细胞和成熟树突细胞以用于以后使用。用于冷藏保存的方法在本领域内是熟知的。参见, 例如, 美国专利 5,788,963, 其全文通过引用包含入本文。

抗原

本发明的成熟的、激活的树突细胞可向 T 细胞呈递抗原。可通过在激活过程中或之后将未成熟树突细胞与预先确定的抗原接触来形成成熟的、激活的树突细胞。可选择地, 可将已与抗原接触(例如, 在体内在分离之前)的未成熟树突细胞与组织培养基质和树突细胞分化诱导剂接触, 从而产生被激活的成熟树突细胞以诱导细胞毒性 T 细胞反应。

合适的预先确定的抗原可包括希望激活 T 细胞的任何抗原。这样的抗原可包括, 例如, 细菌抗原、肿瘤特异性或肿瘤相关抗原(例如, 完整的细胞、肿瘤细胞裂解物, 例如来自成胶质细胞瘤、前列腺、或卵巢、乳腺、结肠、脑、黑素瘤或肺肿瘤细胞等的裂解物)、来自肿瘤的分离的抗原、融合蛋白、脂质体等、病毒抗原和任何其他抗原或抗原例如肽或多肽抗原的片段。在某些实施方案中, 抗原可以是例如

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)。(参见, 例如, Pepsidero 等人, *Cancer Res.* 40: 2428-32 (1980); McCormack 等人, *Urology* 45: 729-44 (1995).)。抗原还可以是细菌细胞、细菌裂解物、来自细胞裂解物的膜片段或本领域内已知的任何其他来源。可表达或重组产生或甚至化学合成抗原。重组抗原还可在宿主细胞(例如, 细菌、酵母、昆虫、脊椎动物或哺乳动物细胞)的表面表达, 可存在于裂解物中, 或可从裂解物纯化。抗原可以是可溶性抗原或颗粒抗原。

抗原也可存在于来自受试者的样品中。例如, 来自受试者中过度增殖(hyperproliferative)或其他状况的组织样品可用作抗原的来源。可以例如通过生物活组织检查或通过手术切除术获得这样的样品。这样的样品可以例如用作裂解物或用作分离的制剂。可选择地, 受试者(例如, 癌症患者)的细胞的膜制剂或已建立的细胞系也可用作抗原或抗原的来源。

在示例性实施方案中, 从手术样品回收的成胶质细胞瘤细胞裂解物可用作抗原的来源。例如, 可在活组织检查或手术切除时获得的癌症患者自己的肿瘤样品可直接用于将抗原呈递至树突细胞或提供细胞裂解物以用于抗原呈递。可选择地, 可使用癌症患者的肿瘤细胞的膜制剂。肿瘤细胞可以是成胶质细胞瘤、前列腺、肺、卵巢、乳腺、结肠、脑、黑素瘤或任何其他类型的肿瘤细胞。可通过本领域内熟知的方法从分离的肿瘤细胞制备裂解物和膜的制剂。

在一个实施方案中, 可在基质上分离单核细胞树突细胞前体, 从基质洗脱所述细胞, 转移至生物反应器或其他封闭系统例如组织培养袋。合适的组织培养袋包括例如 STERICELL 培养容器(Nexell Therapeutics Inc.)或 TEFLON 培养袋(American Fluoroseal Corp.)等。封闭系统可具有任何合适的大小或体积, 本领域技术人员理解这一点。合适的体积包括例如大约 0.01 升至大约 5 升, 或大约 0.01 升至大约 0.05 升, 甚至更大或更小的体积也是可能的且在本发明的范围内。

也可在基质上培养单核细胞树突细胞前体。例如,可将基质上的单核细胞树突细胞前体培养在生物反应器(包括发酵罐)或组织培养瓶(culture vessel)例如,组织培养烧瓶、袋或板中培养。组织培养瓶、袋或板可具有任何合适的大小,本领域技术人员将理解到这一点。生物反应器通常具有大约 0.01 至大约 5 升或大约 0.01 至大约 0.05 升的体积,尽管更大或更小的体积是可能的且在本发明的领域内。通常,用于培养单核细胞树突细胞前体的生物反应器具有大约 0.01 至大约 0.1 升的体积。可用任何合适量例如大约 10^5 个细胞至大约 5×10^6 个细胞/ml 基质的单核细胞树突细胞前体接种生物反应器。也可在封闭、无菌的系统中培养基质上的单核细胞树突细胞前体。

培养和分化单核细胞树突细胞前体,以获得未成熟树突细胞。合适的组织培养基包括 AIM-V、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO15 等。组织培养基可补充以氨基酸、维生素、细胞因子例如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和/或白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 7 (IL-7)或白细胞介素 13 (IL-13)、二价阳离子等,以促进单核细胞树突细胞前体分化成未成熟树突细胞。常用的细胞因子组合是各自大约 500 个单位/ml 的 GM-CSF 和 IL-4。通常,如果在基质上培养单核细胞树突细胞前体,以从基质表面脱落的细胞的形式回收的成熟树突细胞的数目是原代成熟树突细胞。可培养单核细胞树突细胞前体,进行任何合适的时间。

在某些实施方案中,用于将前体分化成未成熟树突细胞的合适的培养时间可以是大约 4 至大约 7 天。可通过本领域技术人员已知的方法,例如通过使用标记的单克隆抗体监测细胞表面标记例如 CD14、CD11c、CD83、CD86、HLA-DR 的存在或不存在来监测未成熟树突细胞从前体的分化。也可通过使用本领域内熟知的方法分析基因表达的模式来确定树突细胞的表型。未成熟树突细胞的一般细胞表面表型是 CD 14⁻、CD11c⁺、CD83⁻、CD86⁻和 HLA-DR⁺。也可以在合适的组织培养基中培养未成熟树突细胞,从而扩增细胞群体和/或使未成熟树突细胞保持原态以用于进一步分化或抗原摄取、加工和呈递。例如,可在 GM-CSF

和 IL-4 存在的情况下保持和/或扩增未成熟树突细胞。

未成熟树突细胞对于一些应用可以是优选的，因为它们保持了处理新抗原的能力。（参见，例如 Koch 等人，J. Immunol. 155: 93-100 (1995)）。相反地，成熟树突细胞（例如，CD 14⁻、CD11c⁺、CD83⁺、CD86⁺ 和 HLA-DR⁺），已暴露于抗原和加工抗原以及暴露于合适的成熟条件的成熟树突细胞，通常已失去有效加工新抗原的能力。可将成熟树突细胞与能够与 MHC I 类和/或 MHC II 类分子结合的肽接触以使其呈现在细胞表面。

在培养期间，任意地，可将未成熟树突细胞暴露于预先确定的抗原。合适的预先确定的抗原可如上包括希望激活 T 细胞的任何抗原。在一个实施方案中，在肿瘤裂解物（例如，胶质细胞瘤、前列腺、卵巢、乳腺、结肠、脑、黑素瘤或肿瘤细胞等的裂解物）存在的情况下培养未成熟树突细胞以用于癌症免疫疗法和/或肿瘤生长抑制。其他抗原可包括例如细菌和病毒抗原、肿瘤细胞、纯化的肿瘤细胞膜、肿瘤特异性或肿瘤相关抗原（例如，来自肿瘤的分离的抗原、融合蛋白、脂质体等）、细菌细胞、细菌抗原、病毒颗粒、病毒抗原和任何其他抗原。此外，可在转化的或转染的表达抗原的宿主细胞的表面上、或转染的或转化的表达目的抗原的细胞的纯化的膜或细胞裂解物中表达抗原。

在与抗原例如肿瘤细胞裂解物接触后，可培养细胞，进行任何合适的时间，以允许抗原摄取和加工，允许扩增抗原特异性树突细胞的群体等。也可使未成熟树突细胞成熟为在 MHC I 类或 MHC II 类分子的背景下呈递抗原的被激活的树突细胞。可以例如通过在其他已知的成熟剂不存在的情况下，在有助于树突细胞附着至组织培养基质的条件下，在组织培养基质上使用树突细胞分化诱导剂进行培养来进行该成熟。通常，树突细胞分化诱导剂是 GM-CSF 和 IL-4、IL-13 或 IL-15 等。

根据另一个方面，可将树突细胞暴露于预先确定的抗原和定向成熟剂。当单独使用时，定向成熟剂不诱导单核细胞树突细胞前体细胞

的分化或不诱导未成熟树突细胞的成熟，但通常，当与激活方法组合时，指导 DC 朝向可诱导 Th-1 或 Th-2 反应的细胞的细胞的成熟。干扰素 γ 是可诱导朝向 Th-1 反应的诱导的 T 细胞反应的偏向性的试剂的实例。

在本发明的另一个实施方案中，可使用暴露于预先确定的抗原的非成熟树突细胞体外激活抗抗原的 T 细胞。可在暴露于抗原之后立即使用树突细胞刺激 T 细胞。可选择地，可在暴露于抗原和 T 细胞之前，在细胞因子混合物（例如，GM-CSF 和 IL-4）存在的情况下保持树突细胞，或可通过本领域内熟知的方法冷藏保存树突细胞以在以后使用。在特定的实施方案中，使用人树突细胞刺激人 T 细胞。

可从不同的淋巴样组织获得 T 细胞或 T 细胞亚型以用作应答细胞。这样的组织包括但不限于脾、淋巴结和外周血。可将分离的或纯化的 T 细胞以混合的 T 细胞群体的形式或以纯化的 T 细胞亚群的形式与暴露于预先确定的抗原的树突细胞共培养。

例如，可将纯化的 $CD8^+$ T 细胞与抗原暴露的树突细胞共培养以引发抗原特异性 CTL 反应。此外， $CD4^+$ T 细胞的早期清除可防止 $CD4^+$ 细胞在 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞的混合培养物中过度生长。可通过阳性或阴性选择包括但不限于使用针对 CD2、CD3、CD4、CD6 和/或 CD8 的抗体来实现 T 细胞的纯化。

可选择地，可将 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的混合群体与树突细胞共培养以引发对获得细胞毒性和 T 辅助免疫反应的抗原是特异性的反应。在某些实施方案中，可按照本发明的方法产生激活的 $CD8^+$ 或 $CD4^+$ T 细胞。一般地，用于产生抗原反应性、激活的 T 细胞的成熟的、已接触抗原的树突细胞与对其施用所述树突细胞的受试者是同基因的（例如，从该受试者获得的）。可选择地，可使用来自 HLA 匹配的供体的非癌细胞（例如正常细胞）在体外制备具有与希望的受者受试者相同的 HLA 单元型的树突细胞。在特定的实施方案中，体外扩增抗原反应性 T 细胞，包括 CTL 和 Th-1 辅助细胞以作为用于免疫刺激的细胞来源。

细胞群体的体内施用

在本发明的另一个方面，提供了用于给需要免疫刺激的受试者施用成熟的、已接触抗原的树突细胞或激活的，例如极化的 T 细胞或包含此类细胞的细胞群体的方法。此类细胞群体可包括成熟的、激活的树突细胞群体和/或激活的例如极化的 T 细胞群体。在某些实施方案中，这样进行所述方法，即获得树突细胞前体或未成熟树突细胞，通过与组织培养基质、树突细胞分化诱导剂和预先确定的抗原接触来分化和成熟这些细胞，从而形成经引发诱导抗原特异性 T 细胞反应的成熟的激活的树突细胞群体。可在激活之前、期间或之后将未成熟树突细胞与抗原接触。可直接对需要免疫刺激的受试者施用成熟的或激活的树突细胞。

在相关实施方案中，可将激活的或成熟的成熟树突细胞与来自受试者的淋巴细胞接触以刺激淋巴细胞群体内的 T 细胞。可将激活的、极化的淋巴细胞（任意地之后在抗原反应 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ T 细胞的细胞培养物中进行克隆扩增）给需要免疫刺激的受试者施用。在某些实施方案中，激活的、极化的 T 细胞对于受试者是自体同源的。

在另一个实施方案中，树突细胞、T 细胞和受者受试者具有相同的单元型 MHC (HLA) 单元型。确定受试者的 HLA 单元型的方法在本领域内是已知的。在相关实施方案中，树突细胞和/或 T 细胞对于受者受试者是同种异型的。例如树突细胞对于具有相同 MHC (HLA) 单元型的 T 细胞和受者可以是同种异型的。同种异型细胞通常对于至少一个 MHC 等位基因是匹配的（例如，共有至少一个但非所有 MHC 等位基因）。在不太常见的实施方案中，树突细胞、T 细胞和受体接受者在相互之间全都同种异型，但全都共同具有至少一个共同的 MHC 等位基因。

根据一个实施方案，于从其获得未成熟树突细胞的相同受试者获得 T 细胞。在体外成熟和极化后，将自体 T 细胞施用给受试者，从而激发和/或增强已存在的免疫反应。例如，可通过例如以大约 10^8 至大约 10^9 个细胞/ m^2 身体表面积的剂量静脉内输注来施用 T 细胞（参见，例如，Ridell 等人，Science 257:238-241 (1992)，通过引用将其合

并入本文)。可以以希望的间隔例如每月一次重复输注。可在 T 细胞输注期间和之后就不利效应的任何迹象监控受者。

根据另一个实施方案,通过与新的、未使用的干净的本发明的组织培养基质接触而成熟的树突细胞可直接注射入肿瘤或包含靶抗原的其他组织。这样的部分成熟的细胞可在体内摄取抗原并将该抗原呈递至 T 细胞。

实施例

下列实施例的提供仅仅用作本发明的不同方面的举例说明,不当解释为以任何方式限定本发明。

实施例 1 : 通过与组织培养基质接触进行的单核细胞树突细胞前体的成熟

在本实施例中,在 GM-CSF 和 IL-4 存在此的情况下将就前体而富集的细胞群体中的单核细胞树突细胞前体分化形成未成熟树突细胞。从组织培养系统收集未成熟树突细胞,对其进行洗涤、计数和在新的干净的组织培养瓶中与预先确定的抗原混合。在通常适用于树突细胞保持的条件下在预先确定的可溶性抗原或颗粒抗原存在的情况下培养细胞,常用的树突细胞培养基补充以 GM-CSF 和 IL-4。不向培养基中加入树突细胞成熟剂。通过确定成熟树突细胞的细胞表面标记特征的存在来确定树突细胞在不加入树突细胞成熟剂的情况下已成熟。

简而言之,通过在补充以 1% 的人血浆的 OptiMEM® 培养基 (Gibco-BRL) 存在的情况下将外周血单核细胞与塑料接触来制备未成熟 DC。可通过清洗除去未结合的单核细胞。在每毫升 500 个单位的 GM-CSF 和 500 个单位的 IL-4 存在的情况下在 X-VIVO 15® 培养基中培养结合的单核细胞,进行大约 6 至 7 天。

通过漂洗收集未成熟的 DC,用培养基清洗细胞。对细胞进行计数,将清洗的 DC 与来自例如从接受治疗的患者手术切除的成胶质细胞瘤的肿瘤细胞裂解物混合。将上述具有 GM-CSF 和 IL-4 的培养基中的 DC

和裂解物加入新的干净的未使用的组织培养皿中，并且培养大约 12 至大约 20 小时。在可选择的实施方案中，可加入干扰素 γ 以诱导 Th-1 增强的反应。

收集、洗涤和制备激活的 DC 以对患者进行施用。激活的 DC 的样品用于通过用各自对于 CD14、CD83、CD86 和 HLA-DR 是特异性的抗体进行标记来检测细胞的表型。通过流式细胞术分析标记的细胞以确定它们的表型。激活的 DC 显示极少或没有 CD14，对于 CD83 是阳性的，且表达高水平的 CD86 和 HLA-DR，这正是成熟树突细胞所预期的表型。

将剩余部分的激活的 DC 以 1×10^6 个细胞至 1×10^{10} 个细胞/注射的量给患者施用。通过使用 MHC 四聚体分析测量 T 细胞反应和/或通过 ELISA 测量对抗原的抗体反应来评估抗原特异性免疫反应的诱导。

实施例 2：在成熟剂不存在的情况下激活的单核细胞树突细胞前体细胞的细胞表面表型的确定

在该实施例中，通过附着至塑料组织培养瓶中纯化单核细胞，收获细胞，洗涤细胞，将其重悬浮于新的组织培养瓶中进行另外的培养时间。确定成熟树突细胞标记 CD83 的细胞表面表达。

为了产生成熟 DC，通过附着至塑料纯化单核细胞，然后在具有 GM-CSF 和 IL-4 以及 1% 人 AB 血清的树突细胞培养基中培养大约 7 天。大约 7 天后，收获几乎完全自由漂浮在培养基中的细胞，然后重新涂布在装有树突细胞培养基的未使用的干净的聚苯乙烯组织培养瓶中，所述培养基具有 GM-CSF 和 IL-4 和大约 1% 的人 AB 血清。重新涂布的细胞在倒置显微镜下的目视观察显示大部分细胞紧紧附着至组织培养物表面。在重新涂布后 20 小时，细胞展示 DC 标记物 CD83 的诱导。下列表提供了对分离的单核细胞的不同样品的 CD83 染色。

表 1

样品	%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

实施例 3: 在不使用成熟剂的情况下激活的树突细胞的临床用途

在该实施例中, 检测树突细胞组合物的安全性和功效, 所述树突细胞组合物是在不使用树突细胞分化剂和与从患者制备的肿瘤裂解物接触的情况下, 从多形性成胶质细胞瘤患者获得的树突细胞组合物。

从手术切除的肿瘤组织制备肿瘤裂解物。将分离的肿瘤组织切碎放入装有包含胶原蛋白酶的缓冲溶液的容器中以分离组织。让该混合物在室温下放置过夜。在确保组织消化的过滤后, 将释放的肿瘤细胞离心成沉淀。将细胞沉淀重悬浮于小体积的 RPMI 1640 中, 使之经历 3 次冻融循环。在冻融后, 通过离心使肿瘤裂解物澄清, 将包含蛋白质的上清液通过 0.22 微米的过滤品过滤以进行灭菌。

通过在 FICOLL 梯度上纯化白细胞分离法的产物, 然后将其附着至塑料来制备就单核细胞树突细胞前体而富集的细胞群体。附着细胞是在标准树突细胞培养条件下在 RPMI 1640 (补充以 10% 的 AB 人血清和各自 500 U/ml 的 hGM-CSF 和 hIL-4) 中培养 7 天的单核细胞树突细胞前体。

在 7 天后, 收获、洗涤分化的未成熟树突细胞, 冷冻所述细胞以

待日后使用或在 1%至 10%人 AB 血清和各自 500 U/ml 的 hGM-CSF 和 IL-4 存在的情况下, 将其与患者肿瘤裂解物混合并重新涂布新鲜组织培养瓶中。DC 的终浓度是 0.5 至 2 百万个细胞/ml (通常 1×10^6 个细胞/ml), 肿瘤裂解物的终浓度是 10 至 1000 $\mu\text{g/ml}$ (通常 100 $\mu\text{g/ml}$)。

在第一试验中, 所述患者接受与来源于自体培养的肿瘤细胞的肿瘤裂解物接触的树突细胞。研究是剂量增大研究, 其中 3 人受试者接受 1×10^6 个 DC, 3 位受试者接受 5×10^6 个 DC, 6 个受试得接受 10×10^6 个 DC。通过测量迟发型超敏感性 (DTH 反应)、细胞毒性 T 细胞反应 (CTL) 和通过确定在疾病复发的情况下在再手术过程中浸润淋巴细胞的存在来估量免疫反应。各个测定测量了诱导的免疫反应的不同方面。DTH 反应通常是辅助 T 细胞 (Th) 活性的证据, 然而 CTL 反应测量诱导的反应是否具有导致产生具有杀死肿瘤细胞的能力的 T 细胞。反应后的肿瘤中检测到的浸润 T 细胞测量了激活的 T 细胞是否具有迁移至肿瘤位置, 从而原位杀死肿瘤细胞的能力。

表 2. 免疫反应的概述-第 I 期试验

患者编号	DC 剂量 (# 细胞/注射)	DTH 皮试增加	外周 CTL 活性增加	瘤内 T 细胞 (在再手术时) ^a
1	1×10^6	阳性	阳性	++++
2	1×10^6	阴性	阴性	--
3	1×10^6	阳性	阳性	+++
4	5×10^6	阴性	阳性	++
5	5×10^6	阳性	阳性	n. a.
6	5×10^6	阴性	阳性	n. a.
7	10×10^6	阴性	阴性	--
8	10×10^6	阴性	阴性	++
9	10×10^6	阳性	阳性	+++
10	10×10^6	阴性	阴性	n. a.
11	10×10^6	阴性	阴性	n. a.
12	10×10^6	阴性	阴性	n. a.

^a 通过浸润淋巴细胞的数目的半主观估量评分。

n. a., 因为没有手术而不适用的。

第二个试验也是剂量增大研究, 4 位受试者接受 1×10^6 个 DC/注射, 6 位受试者接受 5×10^6 个 DC/注射, 6 位受试者接受 10×10^6

个 DC/注射。在该研究中，肿瘤裂解物来源于从各特定的患者切除的肿瘤，将裂解物与来源于该患者的 DC 接触。通过在接种后对抗原特异性 CD8⁺T 细胞进行四聚体染色和，如果适用的话，通过在再手术时确定浸润的瘤内 T 细胞的存在来估量免疫反应。通常，可在疾病复发后进行再手术。患者中的 13 位具有最近诊断的多形性成胶质细胞瘤 (GBM)，2 位具有复发的 GBM，1 位具有复发的 III 级少枝星形细胞瘤。

通过抗原特异性 T 细胞的四聚体染色进行的免疫反应的评估允许确定循环 T 细胞的存在和定量循环 T 细胞的水平，所述循环 T 细胞表达对于给定的抗原是特异性的 T 细胞受体。这样的 T 细胞，如果也表达 CD8，被认为是抗这些抗原的 CTL 群体的代表。选择用于该研究的抗原已知为已通过组织学方法显示存在于最初切除的肿瘤中的肿瘤抗原。使用标准方法检测肿瘤相关抗原（包括 Gp100（黑素瘤相关肿瘤抗原，也在 GBM 中发现的）、Trp-2（酪氨酸酶 (tyrosinase) 相关蛋白 2)、Her-2（表皮生长因子受体相关受体酪氨酸激酶）和 CMV（细胞巨化病毒）的反应性。

在 7 位患者中尝试用于抗原特异性 CD8⁺T 细胞的四聚体染色，在 5 位患者中检测到阳性反应。在 5 位反应患者中，2 位已用 1×10^6 个 DC 进行了免疫，3 个已用 10×10^6 个 DC 进行了免疫。这些结果表明通过本发明的方法成熟的 DC 能够在大部分患者中诱导免疫反应。在大多数情况下，该反应包括抗原特异性细胞毒性 T 细胞反应。

前述实施例的提供是用于举例说明而非限定本发明的范围的。本发明的其他变型对于本领域技术人员来说是很显然的，且由所附权利要求所包括。所有此处引用的出版物、专利、专利申请和其他参考资料也以其全文通过引用包含入本文。