



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103201378 B

(45) 授权公告日 2016.06.15

(21) 申请号 201180046061.6

(22) 申请日 2011.08.11

(30) 优先权数据

1013443.5 2010.08.11 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.03.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/063867 2011.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/020100 EN 2012.02.16

(73) 专利权人 赛特瓦克公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

(72) 发明人 阿列克谢·基尔金

卡林·贾恩朱加齐安

马丁·罗兰·延森

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 丁业平 金小芳

(51) Int. Cl.

C12N 5/0784(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9823728 A1, 1998.06.04,

WO 9806826 A1, 1998.02.19,

US 6498034 B1, 2002.12.24,

Manfred Lehner 等.Functional characterization of monocyte-derived dendritic cells generated under serumfree culture conditions.《Immunology Letters》.2005,209—216.

BERND HILDENBRAND 等.IFN- γ Enhances TH1 Polarisation of Monocyte-derived Dendritic Cells Matured with Clinical-grade Cytokines Using Serum-free Conditions.《ANTICANCER RESEARCH》.2008,1467—1476.

FrancË
oise Vuillier 等.Functional monocyte-derived dendritic cells can be generated in chronic lymphocytic leukaemia.《British Journal of Haematology》.2001,831—844.

Chang-Qing Xia 等.Heparin Induces Differentiation of CD1a Dendritic Cells from Monocytes: Phenotypic and Functional Characterization.《anticancer research》.2008,1131-1139.

Hans Peter Wendel 等.Coating-techniques to improve the hemocompatibility of arti® (续)

审查员 张林

权利要求书1页 说明书12页 附图13页

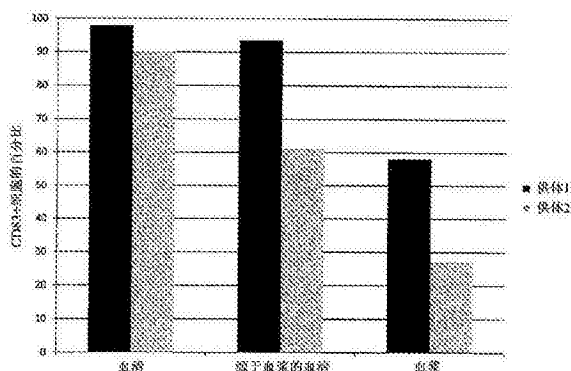
(54) 发明名称

用于制备树突细胞的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于制备树突细胞的组合物和方法,特别涉及用于制备具有免疫活性的未成熟树突细胞的组合物和方法。我们描述了通过培养单核细胞来制备树突细胞的方法,其特征在于以下至少一者:使用基本上不含血浆和基本上不含血清的预处理培养基、包含肝素的预处理培养基和包含蛋白质溶液的预处理培养基中的至少一种进行组织培养表面的预处理;使用基本上不含血浆和基本上不含血清的吸附培养基中的至少一种进行单核细胞的吸附;使用基本上不含血浆和基本

上不含血清的培养基进行单核细胞的培养。我们还描述了包含所述树突细胞的组合物以及所述树突细胞的用途。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Cardio-thoracic Surgery》. 1999, 第 16 卷 342 —
cial devices used for extracorporeal 350.
circulation. 《European Journal of

1. 一种通过培养单核细胞来制备未成熟树突细胞的方法,所述方法包括:
使用预处理培养基进行组织培养表面的预处理的预处理步骤,所述预处理培养基包含肝素和蛋白质溶液;
使用吸附培养基进行单核细胞的吸附的吸附步骤,所述吸附培养基基本上不含血浆或基本上不含血清;以及
使用培养基进行吸附的单核细胞的培养的培养步骤,所述培养基基本上不含血浆或基本上不含血清,
其中所述蛋白质溶液包含人血清,所述人血清的浓度在2%至10%之间,并且所述预处理培养基的肝素的浓度在10U/ml至200U/ml之间。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述预处理培养基的肝素的浓度在25U/ml至100U/ml之间。
3. 一种组合物,其包含根据权利要求1至2中任一项所述的方法制备的未成熟树突细胞。
4. 如权利要求3所述的组合物,其中所述组合物能够被直接注入肿瘤。
5. 根据权利要求1至2中任一项所述的方法制备的未成熟树突细胞在制备通过免疫治疗来治疗癌症的药物组合物中的应用。
6. 包含根据权利要求1至2中任一项所述的方法制备的未成熟树突细胞的疫苗在制备用于治疗或预防癌症的药物中的应用。
7. 如权利要求6所述的应用,其中所述药物用于直接注入肿瘤。
8. 一种通过免疫治疗来治疗癌症的组合物,该组合物包含根据权利要求1至2中任一项所述的方法制备的未成熟树突细胞。
9. 一种抗原呈递组合物,该组合物由根据权利要求1至2中任一项所述的方法制备的未成熟树突细胞制得。
10. 一种制备细胞毒性组合物的方法,包括利用根据权利要求9所述的抗原呈递组合物活化T淋巴细胞,由此获得包含肿瘤特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞的细胞毒性组合物。
11. 根据权利要求9所述的抗原呈递组合物在制备通过刺激针对肿瘤的免疫应答来治疗癌症的药物中的应用,包括将所述药物施用给癌症患者,从而刺激针对肿瘤抗原的免疫应答。
12. 根据权利要求10所述的方法制备的细胞毒性组合物在制备利用过继性T细胞疗法来治疗癌症的药物中的应用,包括对癌症患者施用所述细胞毒性组合物。
13. 根据权利要求3所述的组合物在制备包含用于活化细胞毒性T淋巴细胞的抗原呈递细胞的药物中的应用。
14. 利用权利要求10所述的方法获得的肿瘤特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞在制备用于过继性T细胞免疫治疗的药物组合物中的应用。

用于制备树突细胞的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制备树突细胞的组合物和方法,特别涉及用于制备具有免疫活性的未成熟树突细胞的组合物和方法。

背景技术

[0002] 类似于许多感染物,肿瘤细胞表达正常细胞中不存在的特异性蛋白抗原。有可能的是,免疫系统能够将这些肿瘤细胞识别为外源物质并将其清除。能够介导肿瘤细胞的识别与消灭的主要效应细胞群体为细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。为了诱导CTL应答,抗原应当被抗原呈递细胞(APC)呈递至CTL前体。在过去的15至20年里,免疫治疗研究致力于使用树突细胞作为最有效的抗原呈递细胞(参考文献1和2)。

[0003] 制备树突细胞的最便利的来源为血单核细胞。Peters描述了培养中的单核细胞自发地(3)以及在两种细胞因子(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素-4(IL-4))的存在下(4)变形为树突细胞样细胞(dendritic cell-like cell)的能力。根据Romani等人(1994)(5)和Sallusto和Lanzavecchia(1994)(6)的研究,在GM-CSF和IL-4的存在下培养的单核细胞为用于制备树突细胞的最广泛使用的来源。由单核细胞制备树突细胞通常是在胎牛血清(FCS)的存在下进行的。由于患者面临发展对牛血清白蛋白(BSA)的I型超敏反应的风险,目前,在制备用于免疫治疗的组合物中不推荐使用FCS(10)。

[0004] 存在两种树突细胞:成熟的和未成熟的。成熟树突细胞的特征在于存在CD83,其为成熟树突细胞的公知的标记物(18)。未成熟树突细胞可由CD1a和CD4的表达来鉴定,它们为未成熟树突细胞的特征性标记物。树突细胞的未成熟状态为它们在生物体内的自然状态。在出现感染或病变的细胞之后,树突细胞停留在受影响的器官或组织中,吞噬该感染物或病变的细胞。之后,它们迁移至局部淋巴结,将处理过的抗原呈递至抗原特异性T淋巴细胞。在迁移过程中,也可能在初始的与抗原特异性T细胞相互作用的过程中,树突细胞开始成熟,这导致增强的T细胞刺激活性。普遍认为,为了成为有效的抗原呈递细胞,树突细胞应当是成熟的,因为成熟的树突细胞(DC)表达高水平的协同刺激分子(如CD80和CD86等),并且比未成熟DC更容易迁移。

[0005] 然而,一些研究表明未成熟树突细胞的免疫作用可能具有临床效果。近期有关树突细胞用于黑素瘤患者的治疗的综述(11)列举了未成熟树突细胞有效引起免疫应答的例子,这表明了它们的潜在的免疫活性。事实上,在一项首次对黑素瘤患者进行基于树突细胞的免疫治疗的研究中所证明的临床效果是通过使用未成熟树突细胞获得的(9)。

[0006] 相比于使用成熟DC,使用未成熟DC作为抗原呈递细胞具有潜在的优势。成熟树突细胞以抗原非特异性方式刺激淋巴细胞(参见例如W02008/081035)——这可能是完全成熟的DC高水平地表达协同刺激分子的结果。还表明,成熟树突细胞诱导强的CTL应答,而未成熟树突细胞诱导强的中央型记忆T细胞应答(12),即未成熟DC优选刺激记忆型免疫应答。由于记忆细胞具有再循环的能力(由于存在诸如CD62L等粘附分子(13)),在与肿瘤细胞初步接触之后被活化,并且在破坏肿瘤细胞之后增殖(14,15),因此诱导记忆型免疫应答在诱导

有效的抗肿瘤免疫中是重要的。

发明内容

[0007] 本发明致力于提供生成具有免疫活性的未成熟DC的方法,所述未成熟DC表现出与在体内发现的未成熟DC相似的性质。本发明致力于解决的具体问题在于:在制备未成熟DC的过程中减少或消除异物反应。本发明还旨在提供生成临床上有效且与药物相关的未成熟DC的方法。在这方面,本发明致力于生成与利用FCS制得的DC具有相同性质的树突细胞,但是在制备过程中不使用FCS。

[0008] 在最广的方面,本发明提供了一种制备未成熟树突细胞、特别是具有免疫活性的未成熟树突细胞的方法,所述细胞能够刺激记忆型抗肿瘤T细胞应答。在另一方面,本发明提供了制备表达IL-15的树突细胞的方法。

[0009] 根据本发明,提供了一种通过培养单核细胞来制备树突细胞的方法,其特征在于以下至少一者:使用基本上不含血浆的预处理培养基、包含肝素的预处理培养基和包含蛋白质溶液的预处理培养基中的至少一种进行组织培养表面的预处理;使用基本上不含血浆的吸附培养基和基本上不含血清的吸附培养基中的至少一种进行单核细胞的吸附;和使用基本上不含血浆的培养基进行单核细胞的培养。

[0010] 优选的是,所述蛋白质溶液包含人血清。合适的是,所述人血清的浓度在2%至10%之间。

[0011] 在一个实施方案中,所述预处理培养基的肝素的浓度在10U/ml至200U/ml之间。理想的是,所述预处理培养基的肝素的浓度在25U/ml至100U/ml之间。

[0012] 在一个方面,本发明提供了一种组合物,其包含根据上述方法制备的树突细胞。在一个实施方案中,所述组合物能够被直接注入肿瘤。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了根据上述方法制备的未成熟树突细胞在制备通过免疫治疗来治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0014] 一种通过施用包含根据上述方法制备的未成熟树突细胞的疫苗来治疗或预防癌症的方法构成了本发明的另一个方面。在一个实施方案中,所述方法包括将所述疫苗直接注入肿瘤。

[0015] 本发明的一个方面提供了一种通过免疫治疗来治疗癌症的组合物,该组合物包含根据上述方法制备的未成熟树突细胞。

[0016] 本发明的又一个方面提供了一种抗原呈递组合物,该组合物由根据上述方法制备的未成熟树突细胞制得。

[0017] 本发明的进一步的方面包括:

[0018] 一种制备细胞毒性组合物的方法,包括利用上述抗原呈递组合物活化T淋巴细胞,由此获得包含肿瘤特异性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞的细胞毒性组合物;

[0019] 一种通过刺激针对肿瘤的免疫应答来治疗癌症的方法,包括对癌症患者施用上述抗原呈递组合物,从而刺激针对肿瘤抗原的免疫应答;

[0020] 一种利用过继性T细胞疗法来治疗癌症的方法,包括根据上述方法制备细胞毒性组合物,并且对癌症患者施用所述细胞毒性组合物;

[0021] 上述树突细胞组合物作为用于活化细胞毒性T淋巴细胞的抗原呈递细胞的用途;

以及

[0022] 利用上述方法获得的肿瘤特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞在制备用于过继性T细胞免疫治疗的药物组合物中的用途。

附图说明

[0023] 下面参照附图和例子,仅以例子的方式来进一步详细描述本发明的上述方面和其它方面,其中:

[0024] 图1示出了塑料预处理培养基中包含血浆对所生成的成熟树突细胞的表型的影响;

[0025] 图2示出了预处理培养基中包含肝素对终产物中淋巴细胞的比例的影响;

[0026] 图3示出了预处理培养基中包含肝素对所生成的成熟树突细胞的表型的影响;

[0027] 图4示出了预处理培养基中包含肝素对所生成的成熟树突细胞产生IL-12p70的影响;

[0028] 图5示出了粘附培养基中包含人血清对所生成的成熟树突细胞的表型的影响;

[0029] 图6示出了粘附培养基中包含人血清对所生成的成熟树突细胞产生IL-12p70的影响;

[0030] 图7示出了未成熟树突细胞的表型;

[0031] 图8示出了未成熟树突细胞中IL-15的表达;

[0032] 图9示出了对未成熟树突细胞和成熟树突细胞的裂解物中的IL-15蛋白的检测结果;

[0033] 图10示出了对标记裂解物的摄取;

[0034] 图11示出了利用摄入有乳腺癌细胞系MDA-MB-231的裂解物的树突细胞刺激两次之后的淋巴细胞的表型;

[0035] 图12示出了所生成的HLA-A2-阳性供体的免疫淋巴细胞对HLA-A2-阳性肿瘤细胞系MCF-7和MDA-MB-231的细胞毒活性;以及

[0036] 图13示出了所生成的HLA-A2-阳性供体的免疫淋巴细胞对HLA-A2-阳性肿瘤细胞系LNCaP和HLA-A2-阴性细胞系T47D的细胞毒活性。

具体实施方式

[0037] 本发明的生成树突细胞的方法显著改进了公知的由单核细胞生成DC的方法。该公知的方法包括从外周血分离单核细胞,然后在GM-CSF和IL-4的存在下培养所分离的单核细胞5至7天。本发明的改进在树突细胞中产生了有益的性质,例如低水平的协同刺激分子和高的内吞活性。根据本发明的制备方法制得的具有免疫活性的未成熟树突细胞的性质与体内的未成熟树突细胞的性质相似。体内的未成熟DC的主要性质为:高的内吞活性、能够产生白介素-15(IL-15)、在添加合适的成熟剂时能够分化为完全成熟的非耗尽树突细胞(non-exhausted dendritic cell)、以及能够在体外诱导记忆型抗原特异性CTL应答。

[0038] 为了从通过离心外周血而获得的单核的细胞群中分离单核细胞,通常使用塑料表面吸附单核细胞。单核的细胞包括单核细胞、淋巴细胞和比例可变的血小板,其非常难以通过离心外周血而被除去。通过吸附而被分离是基于单核细胞的高贴壁性质。所期望的是,仅

单核细胞会粘附到所述表面上,而其它细胞成分则不会。因此,通过除去非贴壁性细胞并且洗涤单层贴壁的单核细胞,单核细胞应容易得到分离。然而,实际上,相当大比例的其它细胞成分也会粘附到所述表面上(参见参考文献(22)的图1)。

[0039] 在单核细胞转变为树突细胞的过程中,存在其它细胞成分会损害树突细胞的性质。一些以前的研究已经报道了体外生成的未成熟树突细胞缺乏免疫活性(7、8)。单核细胞在体外分化为DC的过程受损会导致体外制备的未成熟DC与在体内发现的未成熟DC之间出现差别。在单核细胞和存在于单核的细胞群中的其它细胞接触塑料组织培养表面时所发生的异物反应会导致分化受损(16,17)。异物反应可导致单核的细胞被活化,这将导致产生可抑制单核细胞分化为能力完全的未成熟树突细胞的能力的因子。

[0040] 树突细胞的制备通常包括塑料预处理步骤、吸附步骤和培养步骤。在本发明的方法中,通过减少单核的非单核细胞细胞成分的粘附,同时保持单核细胞的高度粘附,已经改善了单核细胞的吸附过程。

[0041] 在制备树突细胞的吸附步骤中,淋巴细胞的非特异性吸附是普遍的问题(22)。在本发明中,采用利用包含人血清(2-10%)的培养基对组织培养塑料的预处理来包被塑料表面,从而减少淋巴细胞的非特异性吸附。人血清的作用与存在纤连蛋白有关,因为单核细胞具有纤连蛋白受体,因此能够粘附到表面结合的纤连蛋白上(28、29)。在制备对免疫治疗的患者施用的组合物中,使用人血清而不是来自于其它来源的纤连蛋白是有利的。

[0042] 通过在塑料预处理培养基中包含肝素,本发明进一步降低了非特异性吸附和淋巴细胞伸展(expansion)。在各种体外血液处理过程中,肝素通常用于降低人血细胞的吸附与活化(26)。在这些体系中,采取将肝素共价连接至体外设备中所使用的所有表面上,并且直接与血液接触。在树突细胞的生成中,肝素被用作培养基的添加剂,从而制备CD1a表达水平高的细胞(27)。然而,在本发明的方法的一个方面,特别地通过在组织培养塑料预处理培养基中包含肝素来在塑料预处理步骤中使用肝素。

[0043] 发明人还发现,如果在塑料预处理、吸附或培养过程中,从样品培养基中除去血浆,则可以抑制血小板的吸附与活化。在培养基中添加血浆通常用于制备树突细胞(22、23)。血浆包含可介导血小板吸附与活化的纤维蛋白原(24),而血小板通常存在于单核的细胞的制备物中。

[0044] 在本发明的一个方面,在吸附步骤中降低了单核细胞的非特异性活化。单核细胞的非特异性活化通常促进它们分化成巨噬细胞,从而损害它们向树突细胞的分化。在本发明中,通过从吸附步骤中除去成年人血清来实现降低单核细胞的非特异性活化。

[0045] 这里所述的用于生成未成熟树突细胞的方法生成了适合用作树突细胞疫苗的细胞。例如,本发明制备的未成熟树突细胞可被直接注入肿瘤,作为免疫治疗癌症治疗的一部分。本发明的方法还生成了能够诱导强抗原特异性CTL应答的树突细胞。当这些未成熟树突细胞在体外免疫实验中被用作抗原呈递细胞时,所产生的应答具有记忆型应答的特征,例如通过CTL表达CD62L、特异性识别并杀死靶细胞、以及在与靶细胞初步接触后增殖加强。

[0046] 实施例1-树突细胞的制备

[0047] 由血沉棕黄层生成树突细胞。用60ml不含Ca/Mg的磷酸盐缓冲盐水(DPBS)(Cambrex)稀释60ml血沉棕黄层,并施加于人淋巴细胞分离液(Lymphoprep)(4个50-ml试管,每个含有14ml人淋巴细胞分离液)中。为了使具有血小板的外周血单核的细胞(PBMCs)

的污染最小化,根据Romani等人(1996)所述的方法,在20分钟后中断对人淋巴细胞分离液的离心(200g,20℃)(25)。将含有大部分血小板的上层15-20ml转移至50-ml管中,并且重新开始离心(460g,20min,20℃)。

[0048] 通过向塑料组织培养瓶(T25)中加入含有5%人AB血清的RPMI预处理培养基,开始对该瓶的包被。随后,从T25瓶中除去预处理培养基,并用5ml RPMI1640冲洗该瓶。

[0049] 在人淋巴细胞分离液的离心终止后,从界面处收集单核的细胞,用冷的含EDTA的DPBS(Cambrex)稀释两倍,并进行3次离心以进行洗涤,首次转速为250g,第二次转速为200g,并且最后一次转速为150g。离心在4℃下进行12分钟。最后一次离心后,在30ml冷的不含Ca/Mg的DPBS中重悬细胞,并使用库尔特计数器(Coulter Counter)计数。将平均大小为约9 μ m的峰处的细胞数估计为单核细胞的数量。

[0050] 为了生成树突细胞,将每T25聚苯乙烯瓶包含4-8Mio单核细胞的细胞悬浮液转移至离心管中,并在4℃下以250g离心12分钟。然后向每个瓶中加入4ml AIM-V吸附培养基(加有或未加有血浆和/或血清)。进一步离心后,以4-8 $\times 10^6$ 个单核细胞/ml的浓度,在吸附培养基中重悬所得的细胞团,并向各T25瓶中加入1ml细胞悬浮液。在37℃下吸附30分钟后,除去非贴壁细胞,用温的RPMI1640培养基对贴壁细胞进行两次冲洗,并向每个培养瓶中加入5ml培养基(AIM-V培养基)。将培养瓶放入37℃的CO₂恒温箱中。在第二天和第三天,加入细胞因子(GM-CSF,终浓度100ng/ml,和IL-4,终浓度25ng/ml)。

[0051] 第4天,通过加入成熟混合物(maturation cocktail)来确定成熟的能力,成熟混合物包含:10ng/ml的TNF- α ,1000U/ml的IL-6,10ng/ml的IL-1和0.1 μ g/ml的前列腺素E2。第6天,收集细胞,通过FACS分析来确定它们的表型,并通过ELISA分析来确定上清液中IL-12p70的生成。利用与CD83(藻红蛋白(PE))和CD86(PE)直接接合的抗体(它们均购自丹麦邦比市的Pharmingen,Becton Dickinson公司)将细胞染色。使用了合适的同型对照。用FC500流式细胞仪(Beckman Coulter)分析样品。

[0052] 利用DC的CD83水平表明完全成熟。为了表明没有耗尽,测量细胞因子IL-12p70的生成,该细胞因子被认为对于免疫应答的Th1极化是重要的(19)。IL-12p70生成的缺乏被认为是耗尽的成熟树突细胞的标志(20、21)。

[0053] 实施例2-吸附培养基中的血浆的影响。

[0054] 重复实施例1所述的树突细胞的制备,但除AIM-V培养基之外,使用含有血清、源自血浆的血清或血浆的吸附培养基。

[0055] 利用来自两个供体的细胞所进行的实验之一的结果在图1中示出。血浆对成熟的程度有负面影响,而源自血浆的血清具有较小的抑制作用。源自血浆的血清的负面影响可能与以下因素有关:在由加入CaCl₂而诱导的凝血过程中,纤维蛋白原没有被完全从血浆中去除。综上,血浆对树突细胞的达到完全成熟的能力具有负面影响。

[0056] 实施例3-适应性预处理培养基中肝素的影响。

[0057] 如实施例1所述制备树突细胞。在实施例3的实验中,向塑料预处理培养基中添加肝素,从而在预处理步骤中,塑料细胞培养表面包被有肝素。

[0058] 图2示出了肝素包被层对终产物中淋巴细胞的比例的影响。对于大部分供体而言,由于预处理培养基中包含了肝素,淋巴细胞的比例下降了2倍,而树突细胞的最终收率未改变、或者降低不显著。对所生成的树突细胞的流式细胞分析未显示出树突细胞的成熟水平

发生变化(图3)。

[0059] 还测量了这些树突细胞在成熟过程中的IL-12p70的水平。通过夹心ELISA测量IL-12p70的产生,所述包括夹心ELISA捕捉抗体、标准品或样品、生物素化的检测抗体和HRP-链霉亲和素。基本上按照制造商的推荐方法使用针对IL-12p70的“DuoSet ELISA development System”试剂盒(R&D Systems),并进行一些改变。在使捕捉抗体与Nunc maxisorp96孔板过夜结合,并洗涤之后,在室温下(r.t.)进行封闭步骤并延长至至少3小时。通过对标准品进行7次系列稀释来获得标准曲线,起点为500pg/ml。在室温下孵育标准品和样品2小时,然后在4℃下孵育过夜。后续步骤按照制造商的实验方案进行。将过氧化氢-四甲基联苯胺混合物用作HRP的底物溶液,在终止酶反应后,测量光学密度,其中以490nm和620nm的读数之间的差值进行波长校正。

[0060] 如图4所示,在一些培养物中,由树突细胞的成熟而产生的IL-12p70增加,但并非在所有培养物中都这样。

[0061] 综上,在塑料预处理培养基中包含肝素显著降低了最终的树突细胞中的淋巴细胞的污染,而不损坏树突细胞的性质。

[0062] 实施例4-吸附培养基中的人血清的影响。

[0063] 重复实施例1所述的方法并在吸附培养基中使用和不使用人血清,并且研究所得DC的性质。图5和图6示出了利用来自于两种供体的细胞而获得的结果。在吸附步骤中,人血清的存在降低了树突细胞在加入标准成熟混合物后的成熟的能力,这通过CD83+细胞的比例的降低(图5)以及IL-12p70的产生的减少(图6)来表明。该影响可能是血清中存在诱导单核细胞活化的免疫球蛋白的结果(16)。

[0064] 实施例5-树突细胞的最终表征。

[0065] 利用以下方法进行未成熟树突细胞的最终表征:对体内存在的未成熟树突细胞所特有的标记物(CD1a和CD4)的表达进行FACS分析、对IL-15的表达进行FACS分析、以及对标记裂解物的摄取进行FACS分析。

[0066] 图7示出了未成熟树突细胞的FACS分析的结果。细胞为CD1a和CD4阳性。CD4为由淋巴细胞产生的IL-16的受体,以及MHC II类分子的受体。位于树突细胞表面的CD4与配体(MHC II类分子或IL-16)的相互作用可诱导树突细胞的活化,这能够进一步提高它们的协同刺激功能。

[0067] 利用两种方法测定IL-15:利用RT-PCR(常规RT-PCR和实时定量RT-PCR)测定mRNA的表达,以及通过夹心ELISA法测定蛋白质的表达。

[0068] IL-15的mRNA表达

[0069] 从样品中分离RNA,保存在RNAlater(Ambion)中,用DNase处理,进行逆转录,并用于PCR。将没有进行逆转录的制备物用作阴性对照,其中,缺失PCR产物则表明完全不存在污染性基因组DNA。人IL-15的引物在参考文献(30)中给出:TAAAACAGAAGCCAACTG(正向)和CAAGAAGTGTGATGAACAT(反向)。在95℃下最初变性5分钟后,在DNA温度循环器中使样品进行35至38个循环的扩增,每个循环包括:在95℃下变性60秒,在63℃(第1至第3个循环)、59℃(第4至第6个循环)和56℃(第7至第38个循环)下退火60秒,以及在72℃下延伸45秒,之后在72℃下最终延伸10分钟。然后将PCR产物等分试样在2%的琼脂糖凝胶中电泳,并通过溴化乙锭染色进行观察。

[0070] 利用Lightcycler Fastart DNA Master Plus SYBR green I和Lightcycler2.0仪器(Roche Applied Science)进行实时定量RT-PCR,引物和条件如参考文献(31)所述:正向-5'-GCCCTGGATATCTGTTCCAA-3',反向-5'-GCTCGACACATTTCGTCTCA-3',得到大小为177bp的PCR产物。在61℃下进行退火。使用编码 β -肌动蛋白的基因和编码GAPDH的基因作为看家基因对照。

[0071] 通过ELISA法测定IL-15

[0072] 对于IL-15的测定,收集各树突细胞的裂解物0.35ml,并且保持冷冻(-20℃)直到进行分析。使用"Ready-Set-Go"ELISA试剂盒(美国加利福尼亚州圣地亚哥市eBioscience公司)和ELIST放大体系(PerkinElmer LAS公司)测定IL-15的浓度。"Ready-Set-Go"试剂盒包括捕捉抗体、标准品、生物素化的检测抗体和HRP-链霉亲和素。步骤基本上按照制造商的推荐来进行,并做出如下改变:1)在捕捉抗体与Nunc Maxisorp96孔板结合过夜并洗涤该板之后,在室温下进行封闭步骤并延长至至少3小时;2)对标准品进行7次系列稀释,从而获得标准曲线,起点为50pg/ml的IL-15,在室温下孵育标准品和一式三份的样品2小时,然后在4℃下孵育过夜。

[0073] 在结合生物素化的检测抗体和之后的HRP-链霉亲和素后,基本上按照PerkinElmer的实验方案,利用ELIST进行放大。然后使用四甲基联苯胺(TMB)作为底物检测HRP的酶反应。在用硫酸终止反应后,测量光学密度,其中以450nm和550nm的读数之间的差值进行波长校正。

[0074] 图8(RT-PCR分析)和图9(ELISA分析)示出了IL-15的测定结果。结果显示,根据本发明制得的未成熟树突细胞表达了IL-15的mRNA,并在细胞中表达了该蛋白。值得关注的是,在成熟之后,细胞中IL-15的量在一些实验中减少。实时定量PCR的数据证实了IL-15的mRNA的表达(未示出)。与不产生IL-15的细胞相比,IL-15表达DC显示出在诱导CTL应答方面更优(32、33、34)。IL-15还能够促使记忆CD8+细胞的生成和保持(35、36)。因此,IL-15表达能够反映出利用本发明的方法生成的树突细胞在诱导记忆型CTL应答方面具有高活性。

[0075] 为了证明所生成的树突细胞摄取肿瘤细胞裂解物的能力,采用以下方法标记裂解物(按照实施例6所述的方法制备)。在含有Ca/Mg的DPBS中制备肿瘤细胞裂解物(2-4mg蛋白质/ml),加入1M NaOH使pH升高至9.0。将3mg N-羟基琥珀酰亚胺-荧光素(NHS-Fluorescein,Pierce)溶于50 μ l的干DMSO中,并加入到裂解物中。在37℃下将混合物避光孵育1.5小时。对经修饰的裂解物进行透析,以12小时的间隔更换1.5L DPBS(不含Ca/Mg),直到在UV、254nm下,在透析液中不能检测到荧光。将1.5 μ l的最终裂解物和NHS-Fluorescein溶液点在具有荧光指示剂的TCL板上(Kieselgel160F₂₅₄,Merck),并在乙腈:水/4:1的层析系统中显色。在UV254nm下观察TCL板,以确保裂解物中的所有标记物被共价结合到蛋白质上并且裂解物中不含有游离的标记物。

[0076] 图10示出了在37℃下与标记的裂解物孵育60分钟的树突细胞的显微镜检查(a-光学显微镜;b-荧光显微镜)。可以清楚地看到所有树突细胞都表现出对标记的裂解物的强烈摄取。

[0077] 综上,利用上述方法生成的树突细胞是高度均一的,它们表达了存在于体内的树突细胞所需的一系列表面分子特征,它们表达了IL-15,并且它们具有高的摄取外源加入的肿瘤细胞裂解物的能力。

[0078] 实施例6-摄入有肿瘤细胞系裂解物的未成熟树突细胞在体外刺激产生具有记忆型应答特征的肿瘤特异性CTL应答。

[0079] 使用乳腺癌细胞系MDA-MB-231的裂解物作为肿瘤抗原的来源,在体外检测了利用本发明的方法制得并摄入有肿瘤抗原的树突细胞的刺激产生抗肿瘤CTL应答的能力。该细胞系表达广谱的癌/睾丸抗原(参见W02008/081035)。

[0080] 在补充有L-谷氨酰胺和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中培养肿瘤细胞。为了制备裂解物,利用胰蛋白酶处理以收集细胞、洗涤、计数、以 $10^7/\text{ml}$ 的浓度重悬于RPMI1640培养基中,并且进行5次冻(液氮)融(水浴,37℃)循环。通过离心(3000g,60min,4℃)使所得裂解物澄清,并以等分量储存在-80℃下。

[0081] 按照实施例1所述的方法制备树突细胞。在第4或第5天,将10%的肿瘤裂解物添加到树突细胞的培养物中,从而使树突细胞摄入肿瘤裂解物。

[0082] 孵育过夜后,收集细胞、洗涤、重悬于淋巴细胞培养基中(添加有5%自体血清的AIM-V)。为了产生体外肿瘤特异性CTL应答,以1:40的比例将已经完成摄入的树突细胞与自体非贴壁性淋巴细胞混合,并放入24孔板中,每孔2Mio淋巴细胞。在第2、第5和第8天,从每孔中移除一半的培养基,并在每孔中加入1ml含有50U/ml的IL-2的新鲜培养基。在第10或第11天,收集细胞,使用库尔特计数器测定大的活化的淋巴细胞的浓度。然后洗涤细胞,以10:1的比例与解冻的摄入有裂解物的树突细胞混合,并放入24孔板的孔中(每孔 0.5×10^6 淋巴细胞),每孔有2ml的淋巴细胞培养基。

[0083] 在第2和第5天,从每孔中移除一半的培养基,并在每孔中加入1ml含有50U/ml的IL-2的新鲜培养基。在第7天,收集细胞,计数,并且用于FACS分析并且测试对一组肿瘤细胞系的细胞毒性。

[0084] 图11示出了对一系列实验中的一个实验中所生成的淋巴细胞进行的表型分析结果。可以看出,很大部分的细胞为CD8+T淋巴细胞,并且它们中的大部分表达高水平的CD62L。

[0085] 利用以下一组肿瘤细胞系,从形态上确定HLA-A2-阳性供体的活化淋巴细胞的细胞毒活性,所述肿瘤细胞系为:乳腺癌细胞系MCF-7(HLA-A2+)、MDA-MB-231(HLA-A2+)和T47D(HLA-A2-);前列腺癌细胞系LNCaP(HLA-A2+)。将 5×10^4 的肿瘤细胞接种到24孔板中的1ml添加有10%的FCS的RPMI-1640培养基中,孵育2天,之后进行检测。将1ml含有 1×10^6 个细胞的所分离的淋巴细胞的悬浮液添加到肿瘤细胞中。

[0086] 在孵育24-48小时后,从形态上确定淋巴细胞的分解活性。该实验的结果在图12和13中示出。可以看出,所有HLA-A2-阳性肿瘤细胞系均显示出显著的分解,而HLA-A2-阴性T47D肿瘤细胞能抵抗分解。在具有HLA-A2-阳性肿瘤细胞的培养物中见到淋巴细胞的增殖加强,而在具有有抵抗能力的HLA-A2-阴性T47D细胞系的培养物中未见到增殖。

[0087] 这些发现(即,高水平表达CD62L、只分解HLA-A2+肿瘤细胞系、以及在与合适的肿瘤抗原接触和识别后淋巴细胞的增殖加强)表明,在本发明的体系中产生了特异性记忆型CTL应答。

[0088] 综上,本发明的改进的生成DC的方法获得了能够刺激特异性记忆型抗肿瘤T细胞应答的具有完全免疫活性的未成熟树突细胞。

[0089] 参考文献

- [0090] 1.Banchereau,J.,F.Briere,C.Caux,J.Davoust,S.Lebecque,Y.J.Liu,B.Pulendran,and K.Palucka.2000.Immunobiology of dendritic cells.*Annu.Rev.Immunol.*18:767.
- [0091] 2.Banchereau,J.,and A.K.Palucka.2005.Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer.*Nat.Rev.Immunol.*5:296.
- [0092] 3.Peters,J.H.,S.Ruhl,and D.Friedrichs.1987.Veiled accessory cells deduced from monocytes.*Immunobiology*176:154.
- [0093] 4.Peters,J.H.,H.Xu,J.Ruppert,D.Ostermeier,D.Friedrichs,and R.K.Gieseler.1993.Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro.*Adv.Exp.Med.Biol.*329:275.
- [0094] 5.Romani,N.,S.Gruner,D.Brang,E.Kampgen,A.Lenz,B.Trockenbacher,G.Konwalinka,P.O.Fritsch,R.M.Steinman,and G.Schuler.1994.Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.*J.Exp.Med.*180:83.
- [0095] 6.Sallusto,F.,and A.Lanzavecchia.1994.Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin4and downregulated by tumour necrosis factor.*J.Exp.Med.*179:1109.
- [0096] 7.Mahnke,K.,E.Schmitt,L.Bonifaz,A.H.Enk,and H.Jonuleit.2002.Immature, but not inactive:the tolerogenic function of immature dendritic cells.*Immunol.Cell Biol.*80:477.
- [0097] 8.Steinman,R.M.,and M.C.Nussenzweig.2002.Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*99:351.
- [0098] 9.Nestle,F.O.,S.Alijagic,M.Gilliet,Y.Sun,S.Grabbe,R.Dummer,G.Burg,and D.Schadendorf.1998.Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumour lysate-pulsed dendritic cells.*Nature (Med.)*4:328.
- [0099] 10.Mackensen,A.,R.Drager,M.Schlesier,R.Mertelsmann,and A.Lindemann.2000.Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells.*Cancer Immunol.Immunother.*49:152.
- [0100] 11.Engell-Noerregaard,L.,T.H.Hansen,M.H.Andersen,S.P.Thor,and I.M.Svane.2009.Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma:assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters.*Cancer Immunol.Immunother.*58:1.
- [0101] 12.Dumortier,H.,G.J.van Mierlo,D.Egan,W.van Ewijk,R.E.Toes,R.Offringa,and C.J.Melief.2005.Antigen presentation by an immature myeloid dendritic cell line does not cause CTL deletion in vivo,but generates CD8+ central memory-like T cells that can be rescued for full effector function.*J.Immunol.*175:855.

- [0102] 13.Sallusto,F.,J.Geginat,and A.Lanzavecchia.2004.Central memory and effector memory T cell subsets:function,generation,and maintenance.*Annu.Rev.Immunol.*22:745.
- [0103] 14.Klebanoff,C.A.,L.Gattinoni,and N.P.Restifo.2006.CD8T-cell memory in tumour immunology and immunotherapy.*Immunol.Rev.*211:214.
- [0104] 15.Klebanoff,C.A.,L.Gattinoni,P.Torabi-Parizi,K.Kerstann,A.R.Cardones,S.E.Finkelstein,D.C.Palmer,P.A.Antony,S.T.Hwang,S.A.Rosenberg,T.A.Waldmann,and N.P.Restifo.2005.Central memory self/tumour-reactive CD8+T cells confer superior antitumour immunity compared with effector memory T cells.*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*102:9571.
- [0105] 16.Shen,M.,I.Garcia,R.V.Maier,and T.A.Horbett.2004.Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumour necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes.*J.Biomed.Mater.Res.*70A:533.
- [0106] 17.Shen,M.,and T.A.Horbett.2001.The effects of surface chemistry and adsorbed proteins on monocyte/macrophage adhesion to chemically modified polystyrene surfaces.*J.Biomed.Mater.Res.*57:336.
- [0107] 18.Zhou,L.J.,and T.F.Tedder.1995.Human blood dendritic cells selectively express CD83,a member of the immunoglobulin superfamily.*J.Immunol.*154:3821.
- [0108] 19.Heufler,C,F.Koch,U.Stanzl,G.Topar,M.Wysocka,G.Trinchieri,A.Enk,R.M.Steinman,N.Romani,and G.Schuler.1996.Interleukin-12is produced by dendritic cells and mediates T helper1development as well as interferon-gamma production by T helper1cells.*Eur.J.Immunol.*26:659.
- [0109] 20.Kalinski,P.,C.M.Hilken,A.Snijders,F.G.Snijdwint,and M.L.Kapsenberg.1997.IL-12-deficient dendritic cells,generated in the presence of prostaglandin E2,promote type2cytokine production in maturing human naive T helper cells.*J.Immunol.*159:28.
- [0110] 21.Mailliard,R.B.,A.Wankowicz-Kalinska,Q.Cai,A.Wesa,C.M.Hilken,M.L.Kapsenberg,J.M.Kirkwood,W.J.Storkus,and P.Kalinski.2004.-type-1polarized dendritic cells:A novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity.*Cancer Res.*64:5934.
- [0111] 22.Thurner,B.,C.Roder,D.Dieckmann,M.Heuer,M.Kruse,A.Glaser,P.Keikavoussi,E.Kampgen,A.Bender,and G.Schuler.1999.Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application.*J.Immunol.Methods*223:1.
- [0112] 23.Jonuleit,H.,U.Kuhn,G.Muller,K.Steinbrink,L.Paragnik,E.Schmitt,J.Knop,and A.H.Enk.1997.Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf

serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27:3135.

[0113] 24. Tsai, W. B., J. M. Grunkemeier, C. D. McFarland, and T. A. Horbett. 2002. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *J. Biomed. Mater. Res.* 60:348.

[0114] 25. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137.

[0115] 26. Wendel, H. P., and G. Ziemer. 1999. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 16:342.

[0116] 27. Xia, C. Q., and K. J. Kao. 2002. Heparin induces differentiation of CD1a⁺ dendritic cells from monocytes: phenotypic and functional characterization. *J. Immunol.* 168:1131.

[0117] 28. Bevilacqua, M. P., D. Amrani, M. W. Mosesson, and C. Bianco. 1981. Receptors for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. *J. Exp. Med.* 153:42.

[0118] 29. Owen, C. A., E. J. Campbell, and R. A. Stockley. 1992. Monocyte adherence to fibronectin: role of CD11/CD18 integrins and relationship to other monocyte functions. *J. Leukoc. Biol.* 51:400.

[0119] 30. Tinhofer, I., I. Marschitz, T. Henn, A. Egle, and R. Greil. 2000. Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumour propagation in multiple myeloma. *Blood* 95:610.

[0120] 31. Franchi, A., J. Zaret, X. Zhang, S. Bocca, and S. Oehninger. 2008. Expression of immunomodulatory genes, their protein products and specific ligands/receptors during the window of implantation in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 14:413.

[0121] 32. Ratzinger, G., J. Baggers, M. A. De Cos, J. Yuan, T. Dao, J. L. Reagan, C. Munz, G. Heller, and J. W. Young. 2004. Mature human Langerhans cells derived from CD34⁺ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 173:2780.

[0122] 33. Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, A. K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno. 2008. Functional specializations of human epidermal langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity.* 29:497.

[0123] 34. Palucka, K., H. Ueno, G. Zurawski, J. Fay, and J. Banchereau. 2010. Building

on dendritic cell subsets to improve cancer vaccines. Curr. Opin. Immunol.

[0124] 35. Schluns, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng, and L. Lefrancois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8T cells. J. Immunol. 168:4827.

[0125] 36. Becker, T. C, E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma, and R. Ahmed. 2002. Interleukin15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8T cells. J. Exp. Med. 195:1541.

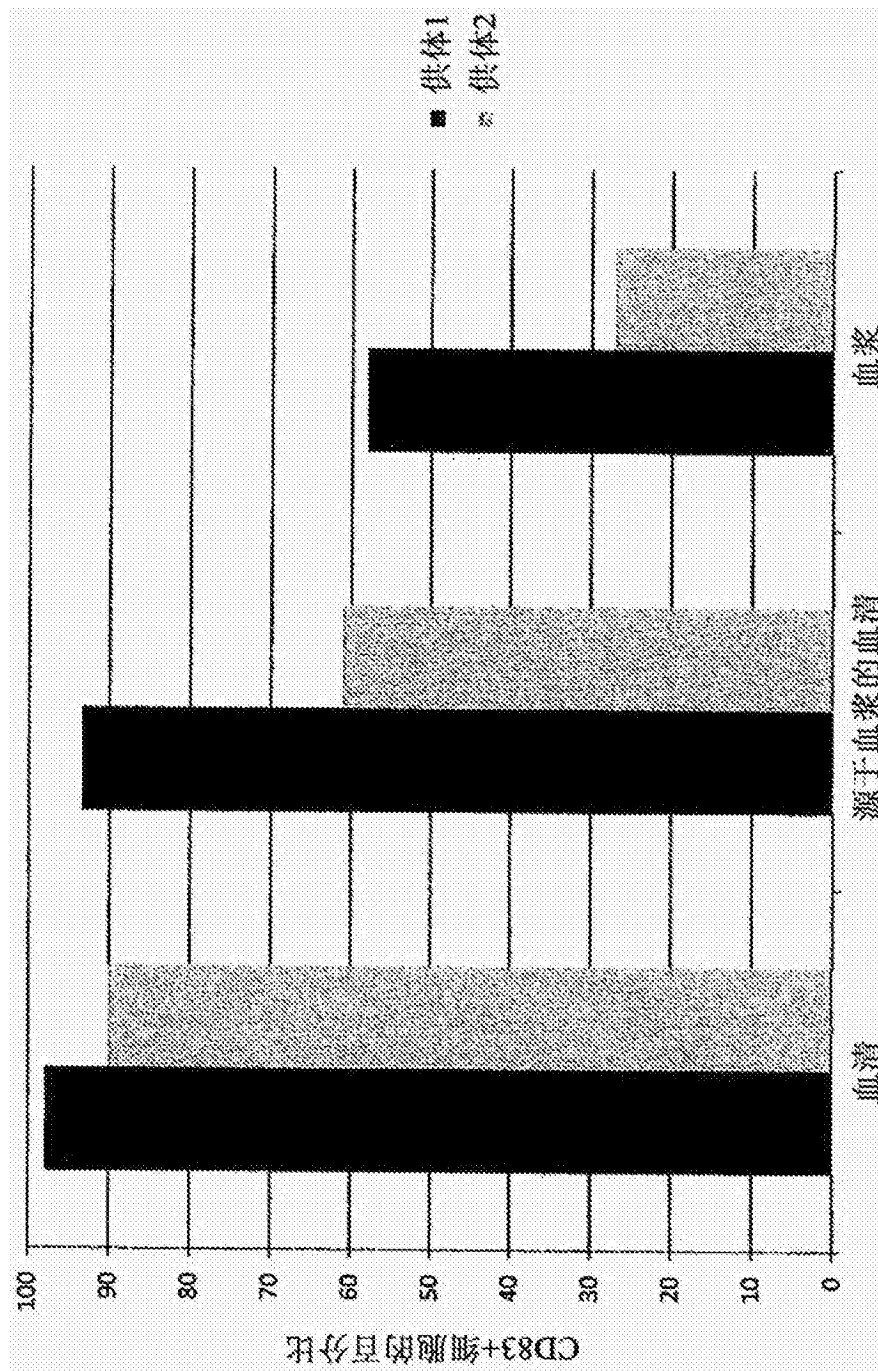


图1

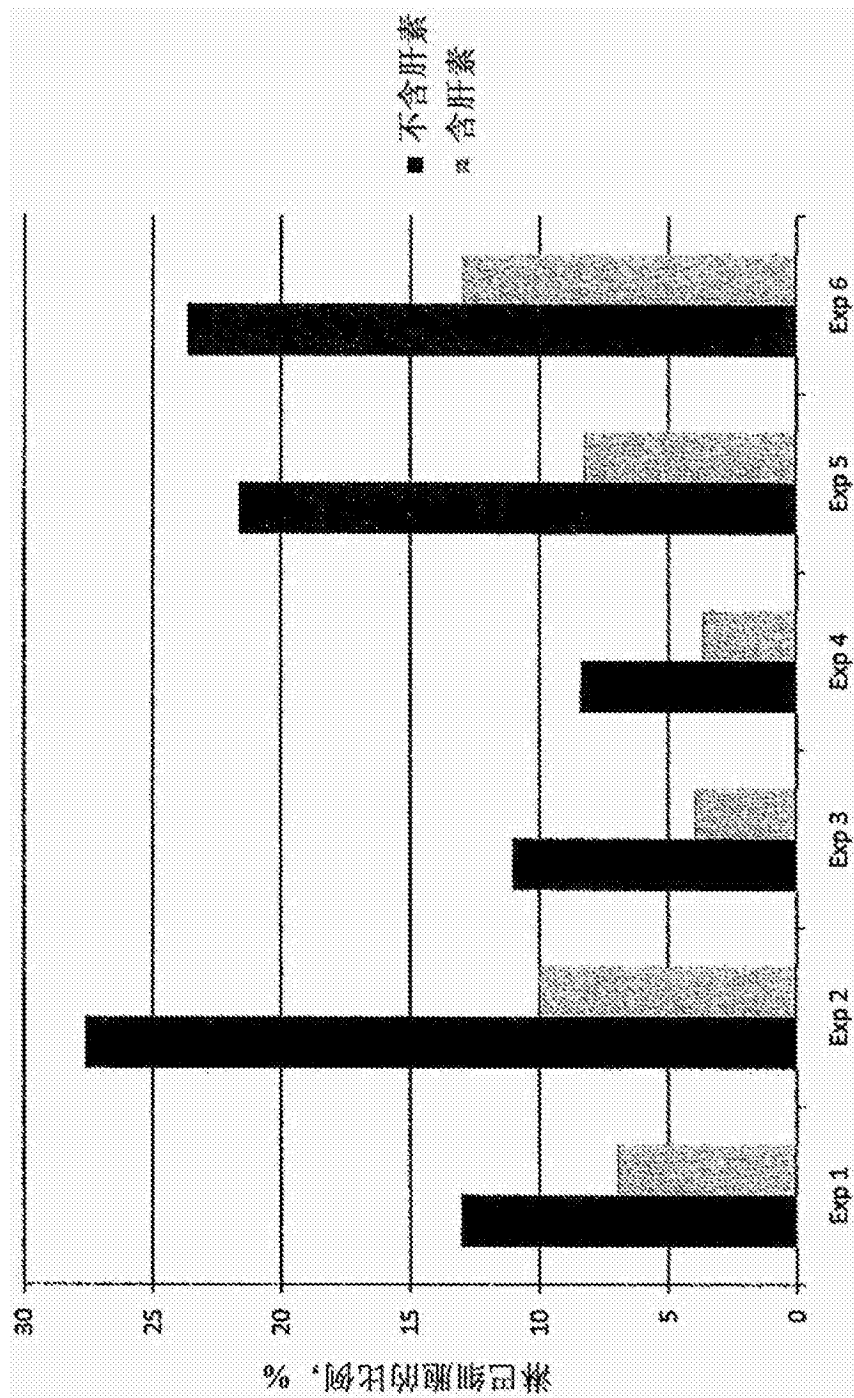


图2

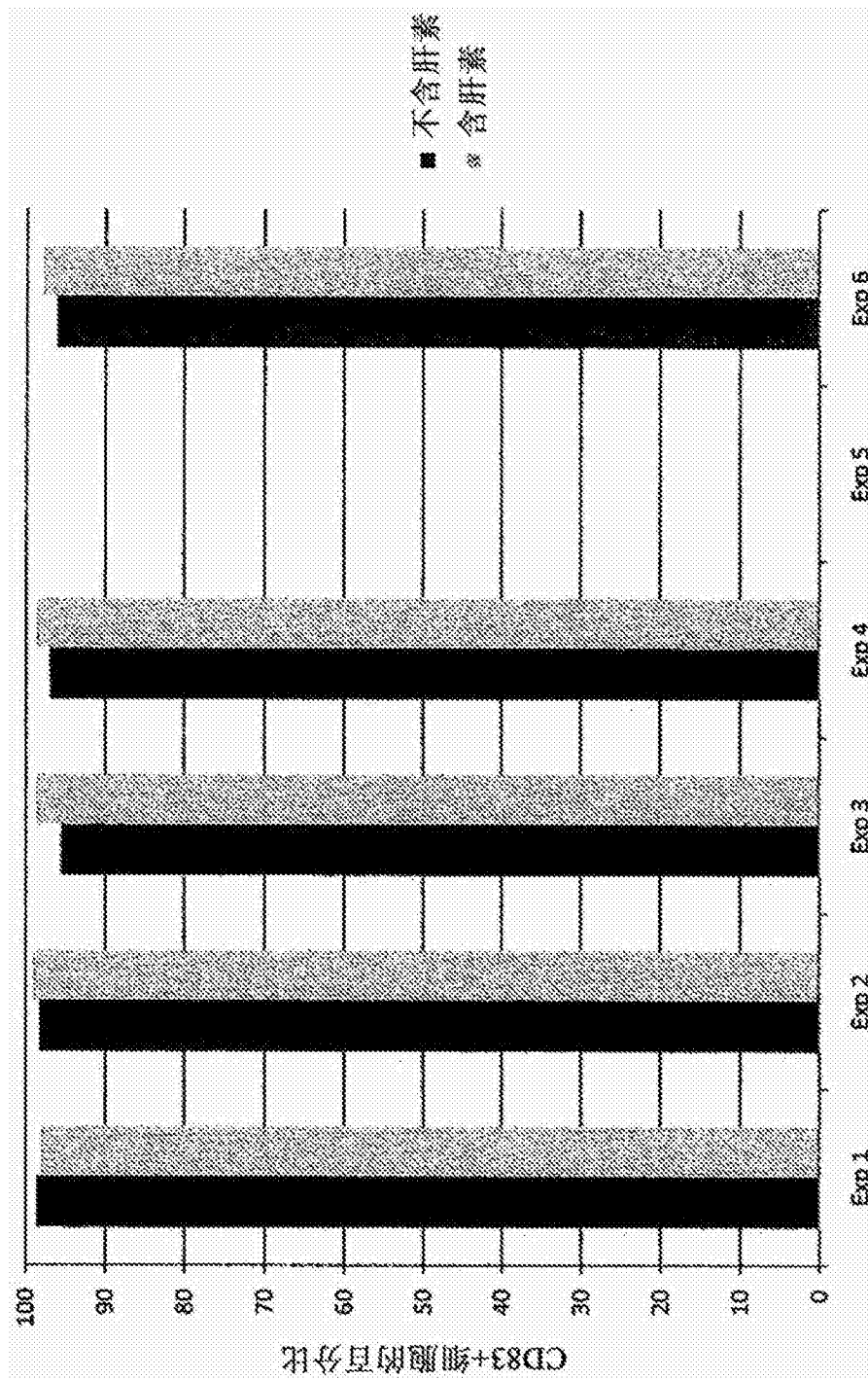


图3

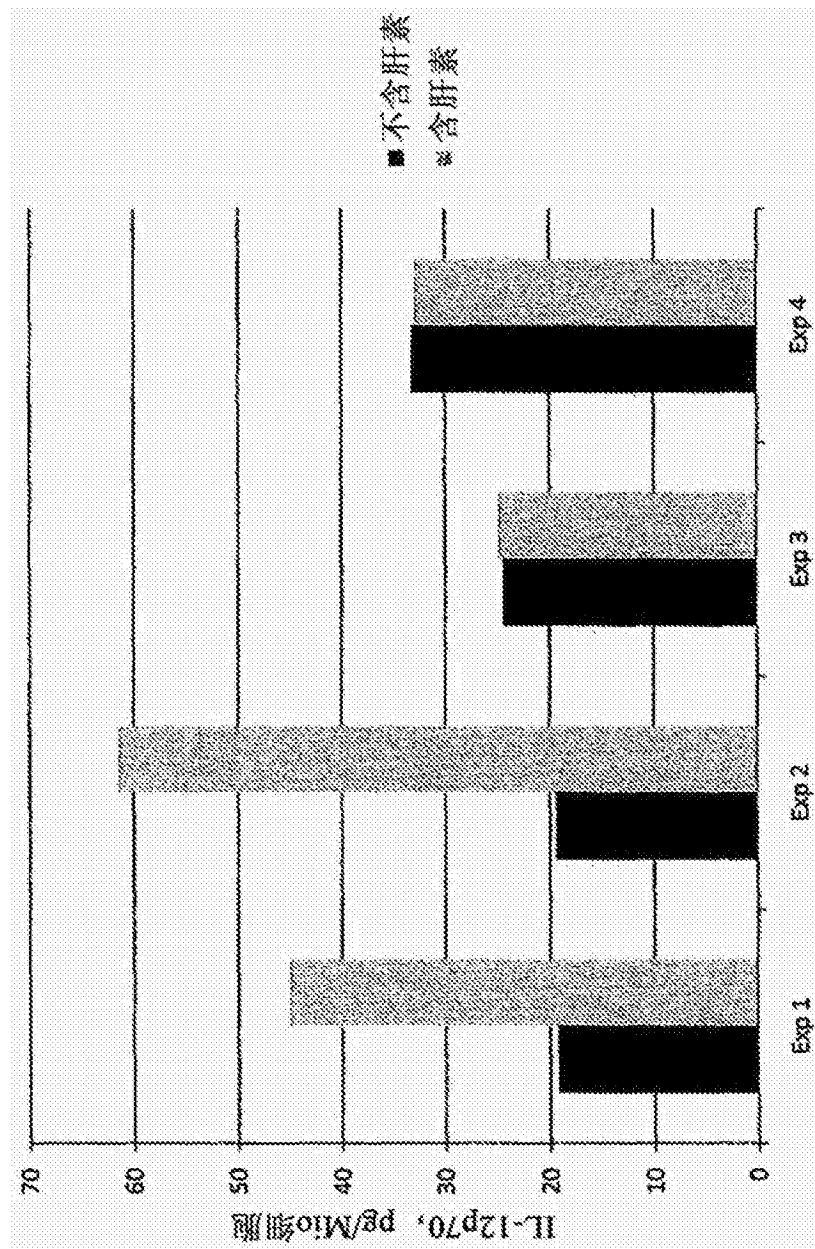


图4

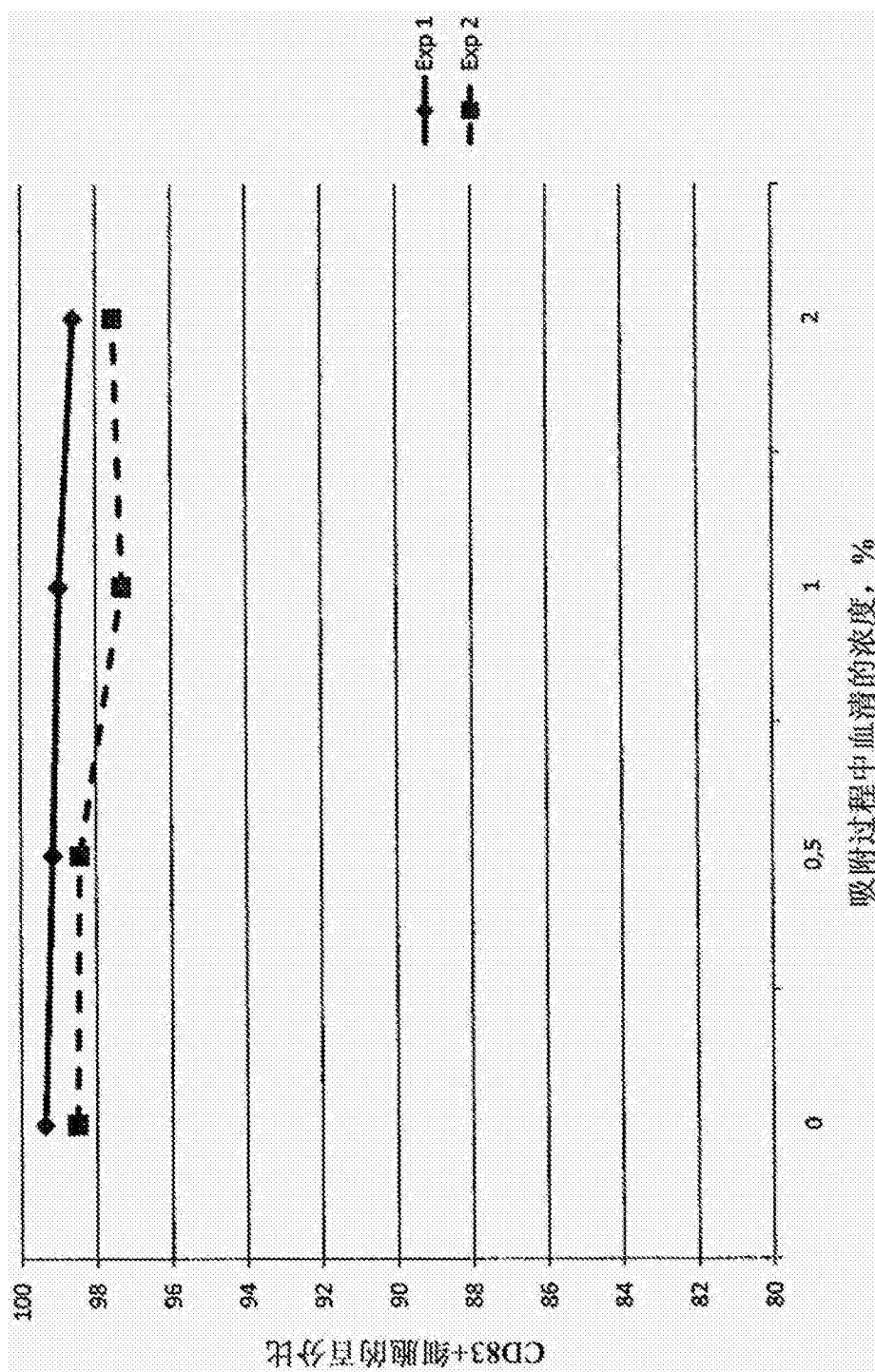


图5

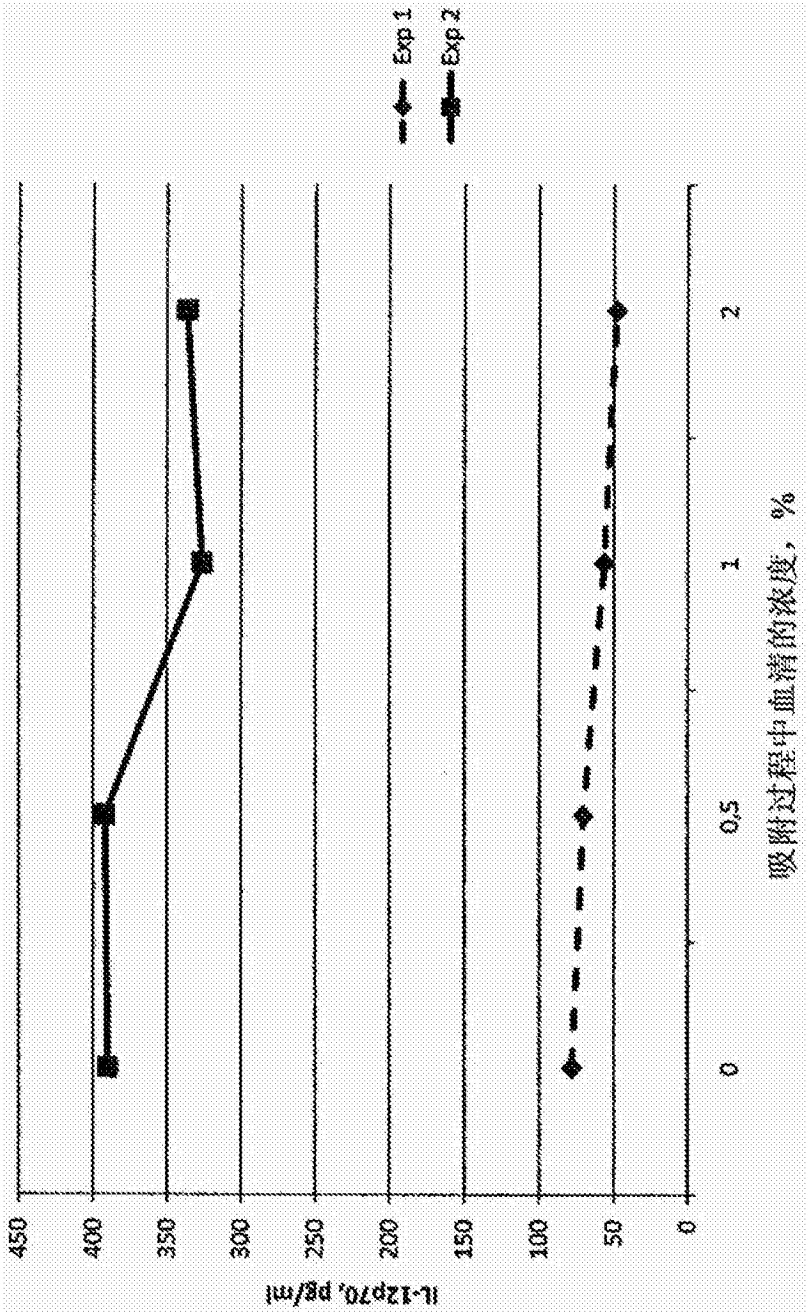


图6

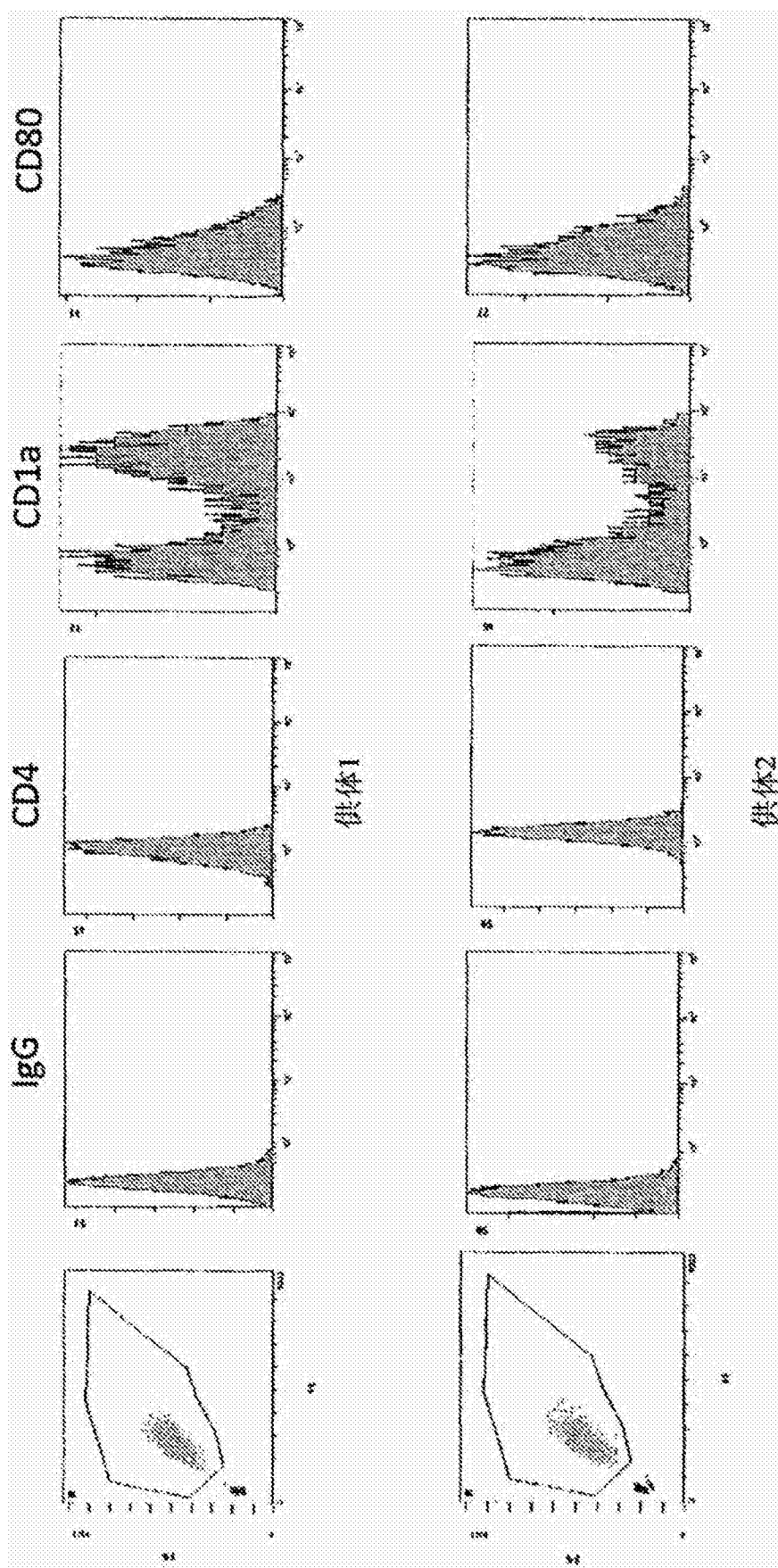
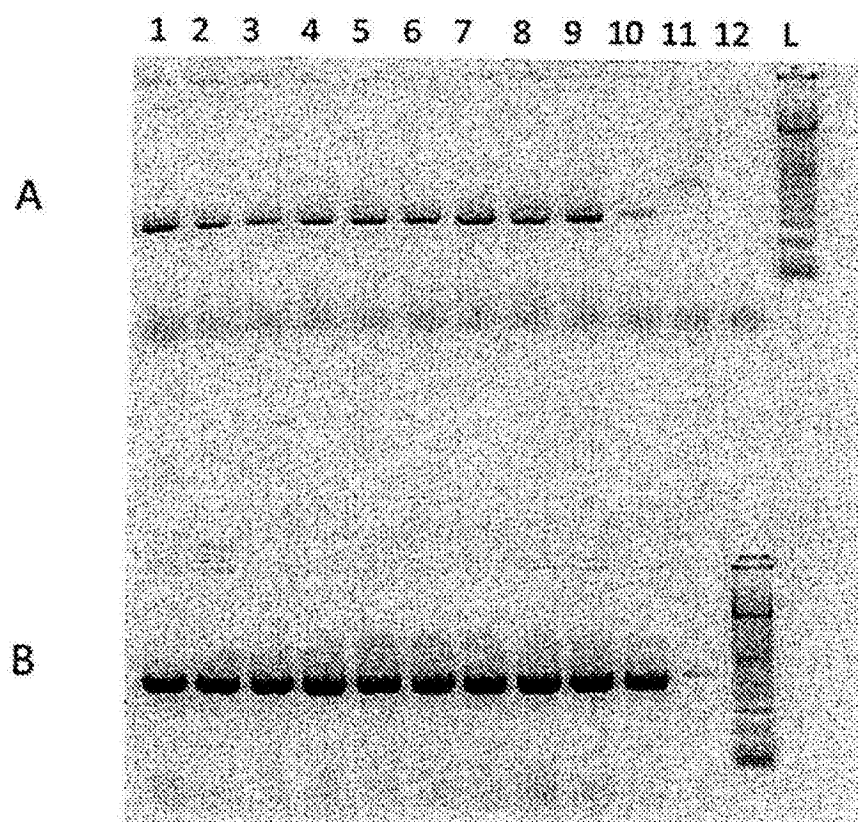


图7



DC中IL-15(A)和GAPDH(B)的表达的RT-PCR分析。

DC裂解物样品(泳道1-10)，未进行RT的对照(泳道11)，无cDNA的对照(泳道12A)，最后一个泳道-100 bp分子量标准。

图8

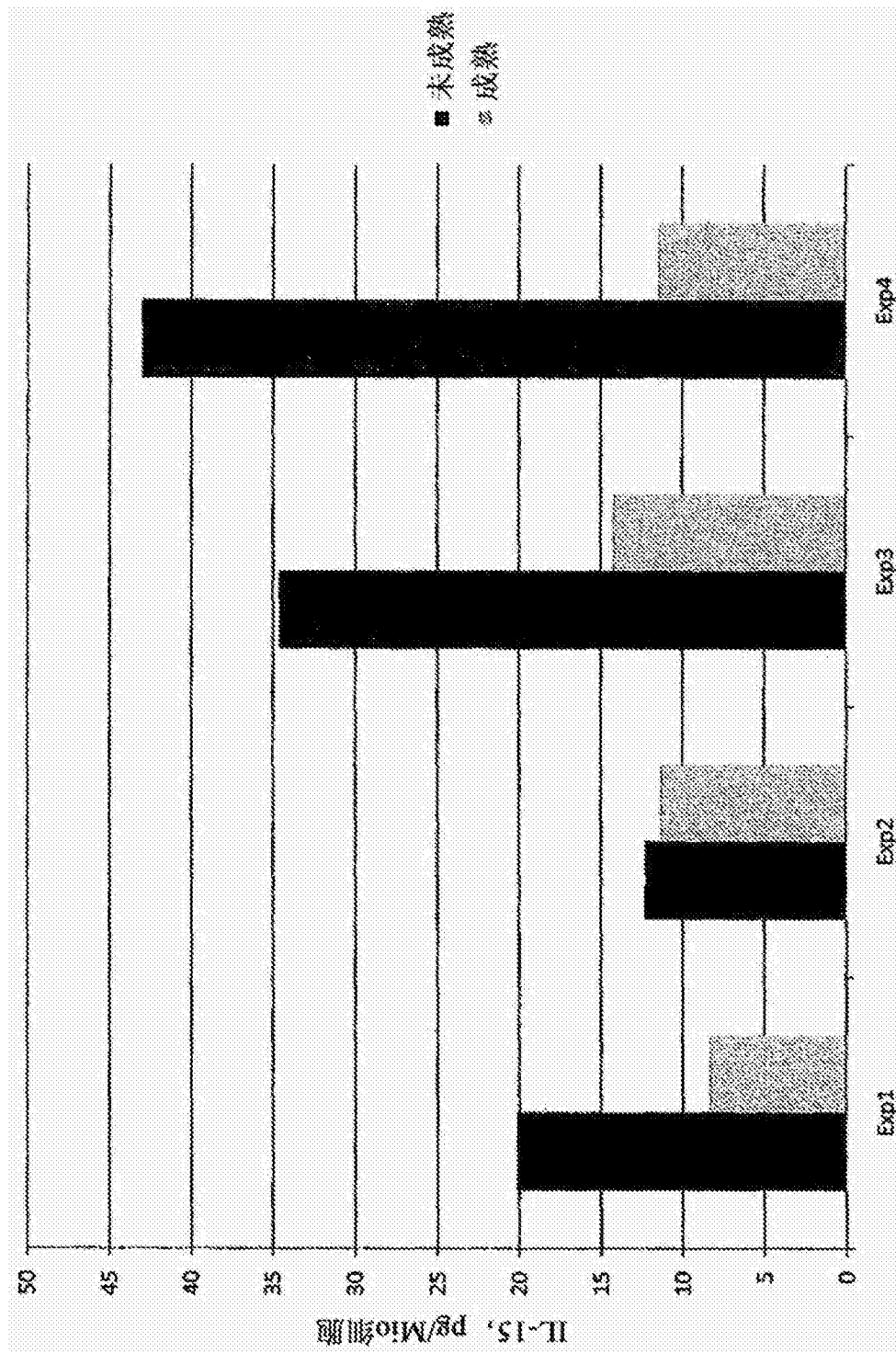


图9

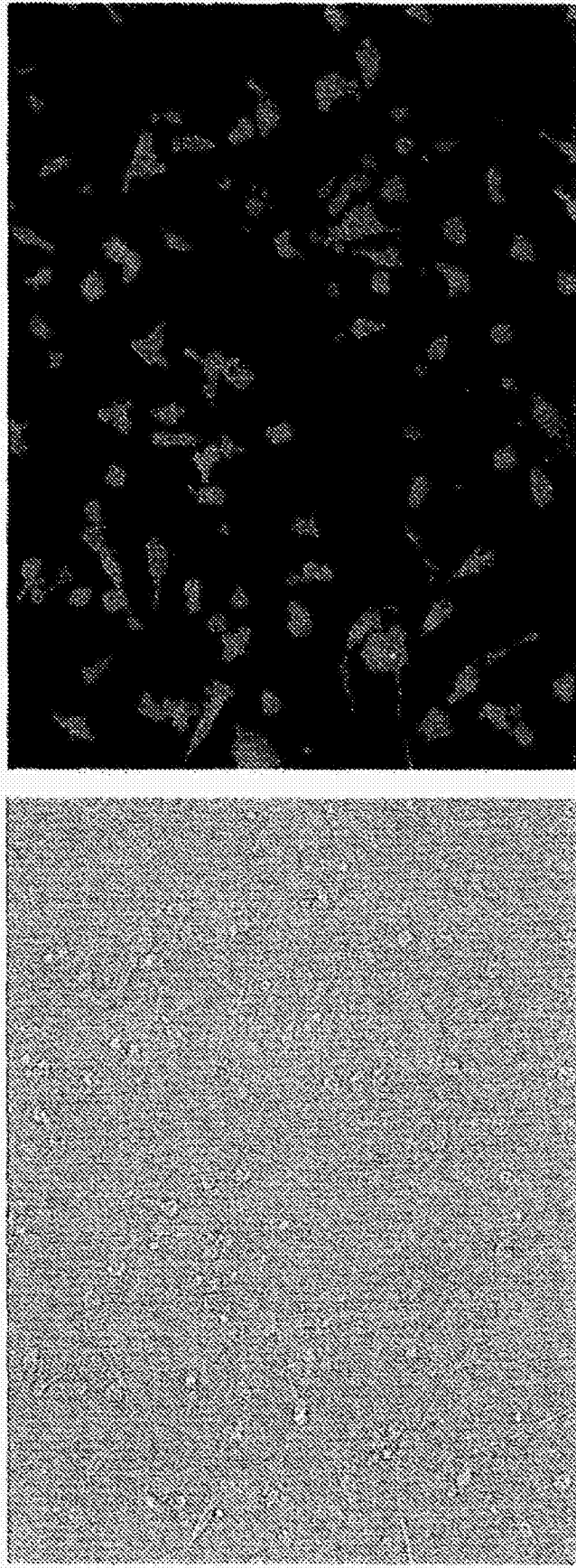


图10

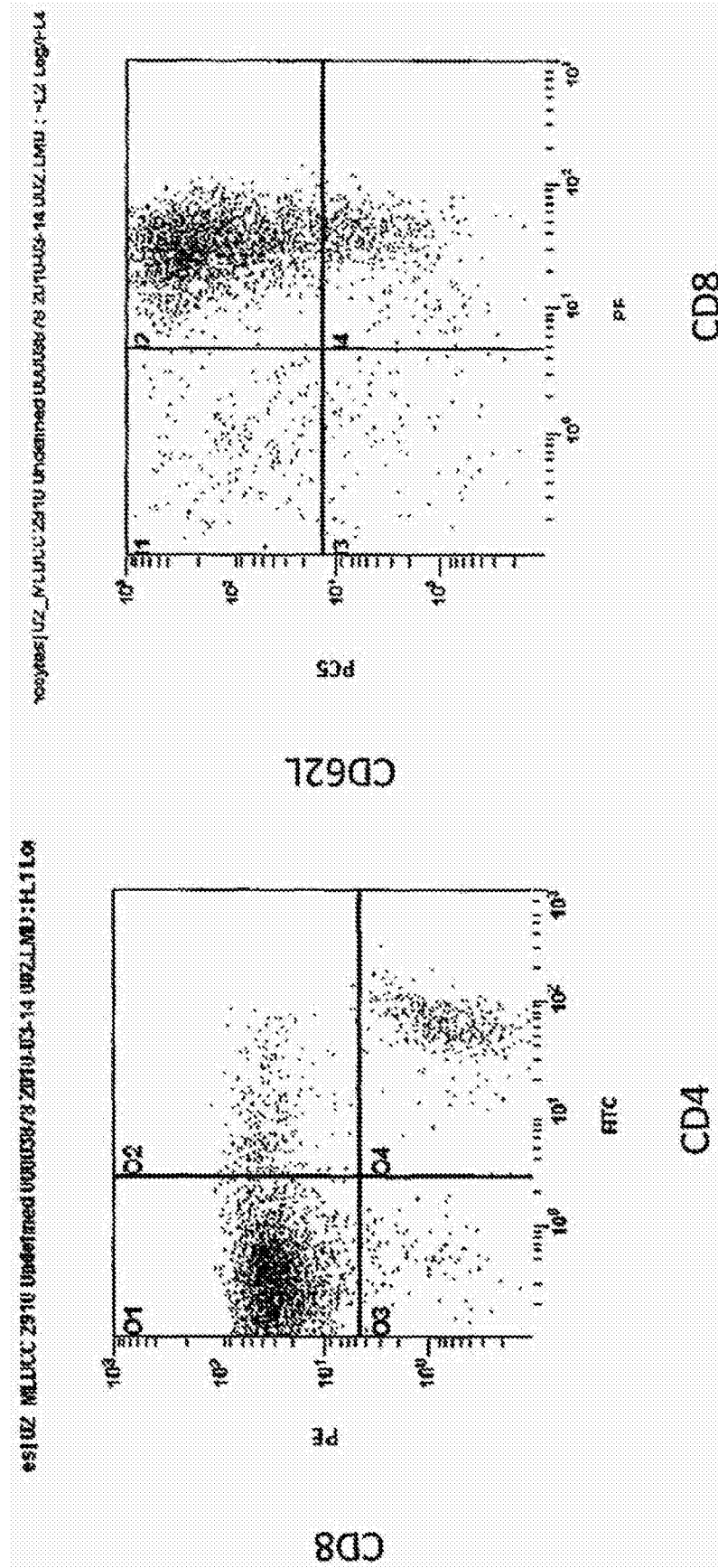


图11

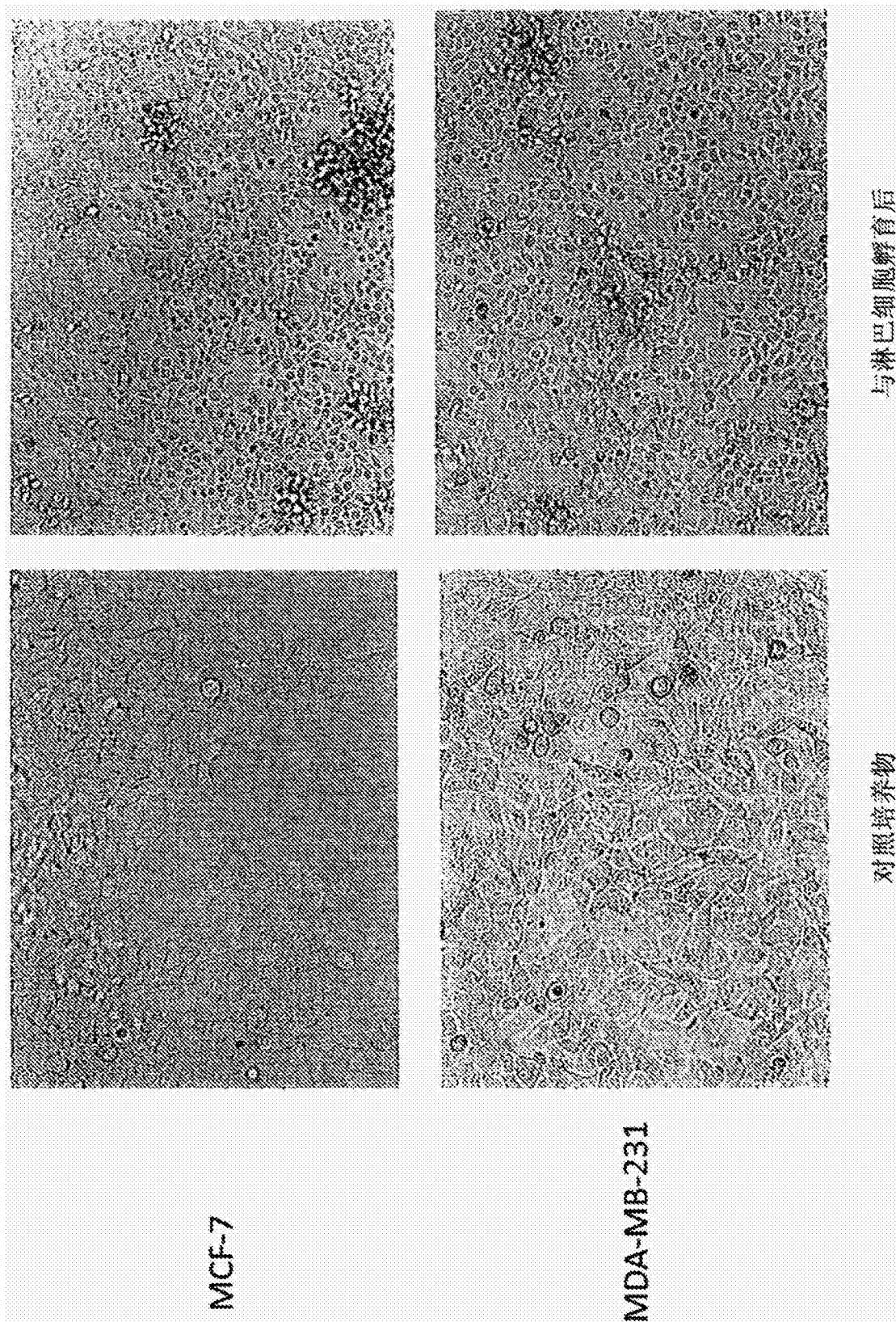


图12

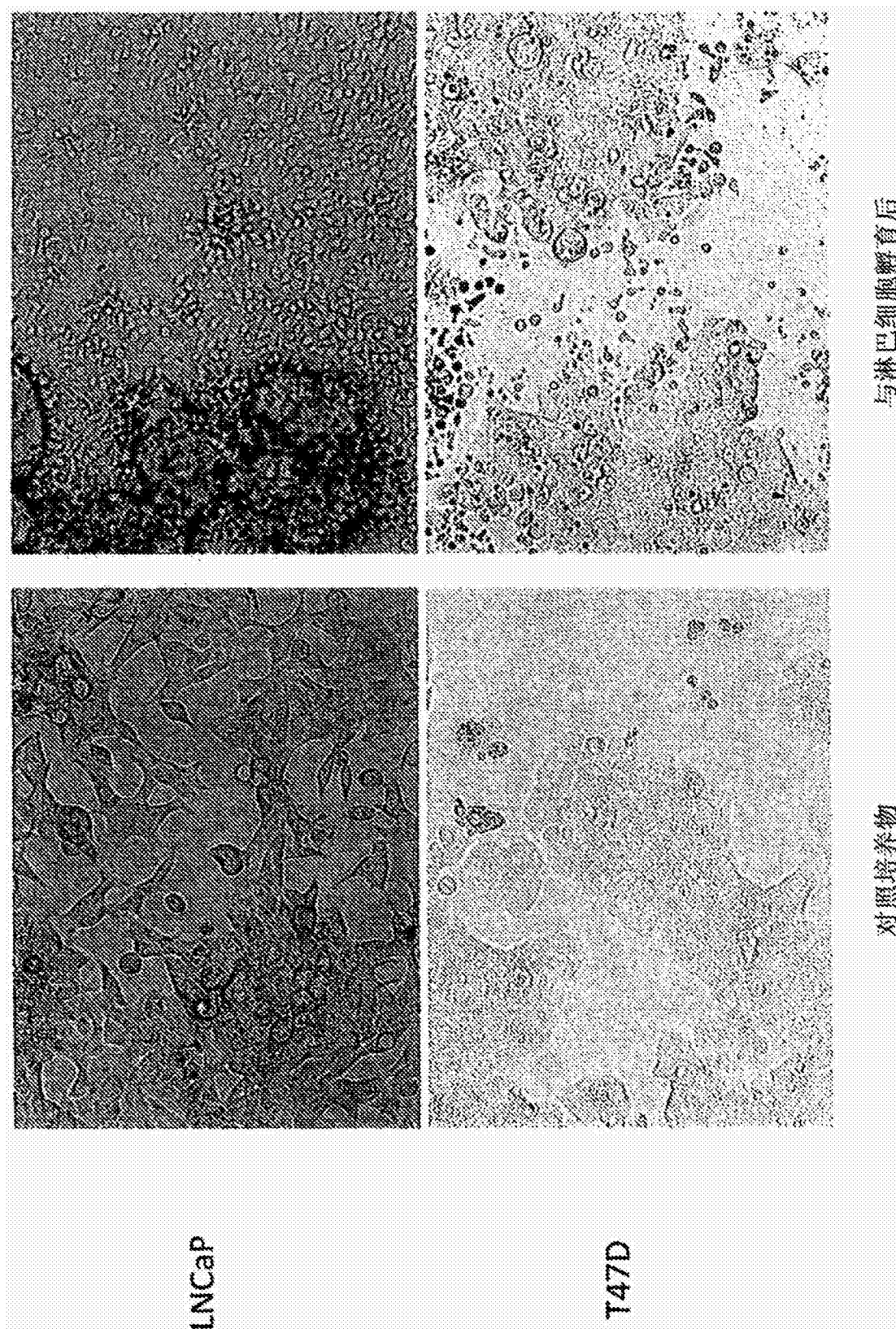


图13