(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103957925 A
(43)申请公布日 2014.07.30

(21)申请号 201280051821.7
(22)申请日 2012.10.22
(30)优先权数据
61/549,681 2011.10.20 US
61/594,304 2012.02.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.04.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/061294 2012.10.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/059778 EN 2013.04.25
(71)申请人 加利福尼亚干细胞公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 安德鲁·康福思 罗伯特·迪尔曼
(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司 11258
代理人 肖善强
(51)Int.Cl.
A61K 38/21(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

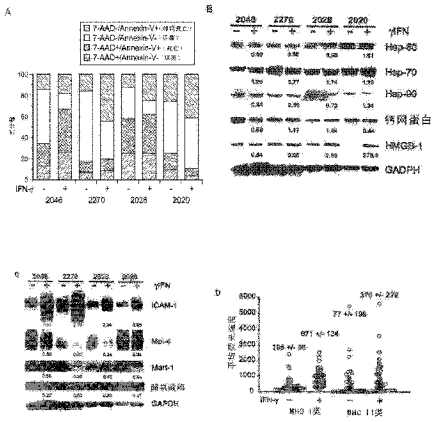
权利要求书3页 说明书23页 附图16页

(54)发明名称

具有 γ 干扰素的抗原呈递癌症疫苗

(57)摘要

本发明提供治疗黑色素瘤的试剂、方法和试剂盒。该试剂包括干扰素-γ(IFN-γ)应答的黑色素瘤细胞,其中所述细胞是自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞,并且其中所述细胞表达 MHC II 类分子。在另一方面,所述试剂包括负载了干扰素-γ 应答的、非凋亡性的、表达 MHC II 类的黑色素瘤细胞的树突细胞。



CN 103957925 A

1. 来自受试者的树突细胞群落，其包含：

黑色素瘤特异性肽，其来自从患有黑色素瘤的受试者采集的黑色素瘤细胞，

其中所述黑色素瘤特异性肽由树突细胞从所述黑色素瘤细胞体外获得，所述黑色素瘤细胞被 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物体外处理，

其中超过60％的被 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物体外处理的所述黑色素瘤细胞是自噬性和非凋亡性的，并且

其中树突细胞和黑色素瘤细胞来自相同受试者。

2. 如权利要求 1 所述的树突细胞群落，其中：

超过80％的被 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物体外处理的所述黑色素瘤细胞是自噬性和非凋亡性的。

3. 用于如权利要求 1 所述受试者的疫苗，其包含如权利要求 1 所述的哺乳动物树突细胞群落。

4. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其中基本上所有的体外获得的黑色素瘤特异性肽均来自不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

5. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其中基本上所有黑色素瘤特异性肽来自由于黑色素瘤细胞受到辐照而不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

6. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其中基本上所有黑色素瘤特异性肽来自由于黑色素瘤细胞的染色体被核酸交联剂交联而不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

7. 如权利要求1所述的树突细胞，其包含来自用 IFN-γ 和辐射处理过的黑色素瘤细胞的黑色素瘤特异性肽。

8. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其包含黑色素瘤特异性肽，其中所有所述肽来自用 IFN-γ 和辐射处理过的黑色素瘤细胞。

9. 如权利要求 1 所述的树突细胞群落，其中所述自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞通过粘附到表面而获得。

10. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其中基本上所有黑色素瘤特异性肽来自经体外处理而不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

11. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其中所述受试者是人受试者。

12. 如权利要求 1 所述的树突细胞，其中所述受试者是非人的哺乳动物。

13. 黑色素瘤疫苗，其包含至少一种成熟树突细胞，所述成熟树突细胞来自患有黑色素瘤的受试者，

其中所述至少一种成熟树突细胞是通过与来自相同受试者的至少一种黑色素瘤肿瘤细胞接触而制得的，

其中与所述至少一种成熟树突细胞接触的所述至少一种黑色素瘤肿瘤细胞是未分裂的、自噬性和非凋亡性的。

14. 刺激对黑色素瘤特异性抗原免疫应答的方法，其包括给如权利要求 1 所述的受试者施用免疫刺激量的如权利要求 1 所述的树突细胞，或者给如权利要求 13 所述的受试者施用免疫刺激量的如权利要求 13 所述的疫苗。

15. 如权利要求14所述的方法，其中被刺激的所述免疫应答包括 $CD4^+$T 细胞应答、$CD8^+$T 细胞应答和 B 细胞应答中的一种或多种。

16. 如权利要求 17 所述的方法，其中可通过 ELISPOT 测定、通过细胞内细胞因子染色测定、通过四聚体测定、或者通过检测抗原特异性抗体的产生来测定所述 $CD4^+$T 细胞应答、$CD8^+$T 细胞应答或 B 细胞应答。

17. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述免疫应答包括含有 2 年总生存率 (OS) 的生存时间，并且其中所述 2 年总生存率至少为 60％。

18. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述施用包括皮下注射所述疫苗。

19. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述施用包括将每周给予的所述疫苗注射三个月，然后每月给予的所述疫苗注射五个月。

20. 制备树突细胞疫苗的方法，其包含来自相同受试者的黑色素瘤细胞和树突细胞，所述方法包括：

用防止细胞分裂的试剂处理一种或多种黑色素瘤细胞；

用干扰素 -γ (IFN-γ) 或 IFN-γ 模拟物在体外处理所述一种或多种黑色素瘤细胞；

选择自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞；

丢弃非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞；

将自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞与一种或多种自体树突细胞接触；

允许由所述一种或多种自体树突细胞摄取至少一种黑色素瘤衍生的肽。

21. 组合物，其包含：

来自第一受试者的经干扰素 -γ (IFN-γ) 处理的黑色素瘤细胞，和来自相同第一受试者的抗原呈递细胞 (APCs)，其中所述黑色素瘤细胞是：

自噬性的；且

非凋亡性的。

22. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述黑色素瘤细胞表达 MHC II 类。

23. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述 APCs 是树突细胞、巨噬细胞或 B 细胞。

24. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述黑色素瘤细胞包含黑色素瘤特异性肽，并且其中所述黑色素瘤特异性肽并不包含于 APCs 中。

25. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述黑色素瘤细胞包含黑色素瘤特异性肽，并且其中至少一种黑色素瘤特异性肽被 APCs 摄取并被 APCs 包含。

26. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述经 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞被负载到 APC 中。

27. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述经 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞未被负载到 APC 中。

28. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述黑色素瘤细胞的自噬是通过如下测试证明的，该测试测定微管相关蛋白轻链 3(LC3)。

29. 如权利要求 21 所述的组合物，其中使用 7- 氨基放线菌素 D(7-AAD) 试剂或 annexin 试剂中至少一种来证明所述黑色素瘤细胞是非凋亡性的。

30. 在受试者中刺激免疫应答的方法，所述受试者患有黑色素瘤且包含黑色素瘤细胞，其中所述受试者是与第一受试者相同的受试者，包括施用免疫有效量的如权利要求 21 所述的组合物。

31. 制造如权利要求 1 的疫苗或权利要求 21 的组合物的方法，其包括将至少一种自

噬性、非凋亡性的黑色素瘤肿瘤细胞与至少一种抗原呈递细胞 (APC) 接触，其中所述至少一种自噬性、非凋亡性的黑色素瘤肿瘤细胞来自第一人受试者，并且其中所述至少一种 APC 来自相同的第一人受试者。

32. 制备树突细胞疫苗的方法，其包括：用防止细胞分裂的试剂处理从第一受试者获得的黑色素瘤细胞；用 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物处理所述黑色素瘤细胞；选择自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞；并且将所选择的黑色素瘤细胞与来自相同第一受试者的自体树突细胞接触。

33. 组合物，其包含通过如权利要求 32 所述的方法制得的树突细胞疫苗。

34. 刺激对黑色素瘤特异性抗原免疫应答的方法，其包括给患有黑色素瘤的受试者施用如权利要求 33 所述的组合物。

具有 γ 干扰素的抗原呈递癌症疫苗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求享有 2011 年 10 月 20 日提交的美国临时申请 No.61/549681 和 2012 年 2 月 2 日提交的美国临时申请 No.61/594304 的全部巴黎公约优先权及其权益，上述两篇临时申请通过引用并入本文，如同其全部内容在本文中阐述一样。

技术领域

[0003] 本发明涉及治疗黑色素瘤、筛选适合治疗的受试者、物质组合物、方法和试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 癌症的特征是缺乏对癌症有效的免疫应答。免疫应答的缺乏可由以下事实引起：例如许多肿瘤抗原是“自身抗原”；肿瘤细胞缺乏 MHC 的表达以及由此产生的肿瘤细胞缺乏肿瘤抗原的呈递；巨噬细胞与肿瘤的关联，该巨噬细胞表达降低免疫应答的细胞因子；以及调节性 T 细胞 (Tregs) 的免疫抑制活性。对肿瘤的免疫应答的缺乏还可以由以下事实引起：肿瘤细胞倾向于不表达那些刺激先天性免疫应答的分子，即刺激 Toll 样受体 (TLRs) 或核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 样受体的分子。癌症包括实体肿瘤以及诸如白血病和骨髓发育不良综合征的血液癌症。

[0006] 免疫系统包括细胞免疫、体液免疫、补体反应 (complement response)。细胞免疫包括多种细胞和多种活动的网络，涉及树突细胞、$CD8^+$T 细胞（细胞毒性 T 细胞；细胞毒性淋巴细胞）和 $CD4^+$T 细胞（辅助 T 细胞）。树突细胞 (Dendritic cells,DCs) 获得多肽抗原，其中这些抗原可以从 DC 的外部获得，也可以在 DC 的内部由感染生物体来生物合成。DC 处理多肽，得到长度约 10 个氨基酸的肽，并将这些肽传输给 MHC I 类或 MHC II 类以形成复合体，并将复合体运 (shuttles) 到 DC 的表面。当携带 MHC I 类 / 肽复合体的 DC 与 $CD8^+$T 细胞接触时，结果是 $CD8^+$T 细胞的活化和增殖。对于 MHC II 类所起的作用，当携带 MHC II 类 / 肽复合体的 DC 与 $CD4^+$T 细胞接触时，其结果是 $CD4^+$T 细胞的活化和增殖 (Munz 等 (2010) Curr.Opin.Immunol.22:89-93；Monaco(1995)J.Leukocyte Biol.57:543-547；Robinson 等 (2002)Immunology105:252-262)。尽管呈递抗原给 T 细胞的树突细胞能够“活化”该 T 细胞，活化的 T 细胞可能不能够具有有效的免疫应答。$CD8^+$T 细胞的有效的免疫应答通常需要 DC 通过一次或多次多个交互来在先刺激 (prior stimulation)。这些交互包括 $CD4^+$T 细胞与 DC 的直接接触（通过 $CD4^+$T 细胞的 CD40 配体与 DCs 的 CD40 受体接触的方式），或者 TLR 激动剂与树突细胞的 toll 样受体 (TLRs) 中的一个受体的直接接触。

[0007] 体液免疫涉及 B 细胞和抗体。B 细胞被转化成浆细胞，浆细胞表达并分泌抗体。初始 B 细胞的区别在于它们不表达标志物 (marker)CD27，而抗原特异性 B 细胞则表达 CD27(Perez-Andres 等 (2010)Cytometry Part B78B(Suppl.1)S47-S60)。分泌的抗体随后可以与驻留在肿瘤细胞表面上的肿瘤抗原结合。结果是受感染的细胞或肿瘤细胞被抗体标记。随着抗体与受感染的细胞或肿瘤细胞的结合，结合的抗体介导 (mediates) 杀灭受感染的细胞或肿瘤细胞，其中杀灭细胞是由 NK 细胞进行的。尽管并没有以配置 T 细胞来识别靶抗原的方式对 NK 细胞进行配置来识别特定的靶抗原，但是 NK 细胞与抗体的恒定区域结合

的能力使得 NK 细胞能够特异性地杀灭抗体所标记的细胞。NK 细胞对抗体的识别是由与抗体的 Fc 部分结合的 (NK 细胞的)Fc 受体介导的。这种类型的杀灭被称为抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。NK 细胞也可以不依赖 ADCC 机理来杀灭细胞，在这种情况下这种杀灭需要在靶细胞中 MHC Ⅰ类的表达损失或缺乏 (参见例如 Caligiuri(2008)Blood112:461-469)。

[0008] 可以使用“迟发型超敏反应”(delayed type hypersensitivity response) 技术来区分主要涉及细胞免疫的免疫应答或主要涉及体液免疫的免疫应答。迟发型超敏反应的阳性信号表明细胞应答 (参见，例如 Roychowdhury 等 (2005)AAPS J.E834-E846)。

[0009] 自噬是一个稳态过程，细胞溶质 (cytosolic) 成分和细胞器通过该过程被输送到溶酶体降解。自噬也与细胞内病原体的先天性免疫应答和适应性免疫应答有关，细胞溶质抗原借助于细胞内病原体而被负载到主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex，MHC)II 类分子上，用于 $CD4^+$T 细胞识别。

[0010] 说明

[0011] 本文中使用时，包括所附权利要求书中使用时，除文本另有明确说明外，诸如“一个”、“一种”(“a”和“an”) 和“所述”的词语的单数形式包括其相应的复数指示物。本文中所引用的所有参考文献通过引用并入本文，并入的程度如同明确且单独地指出各个出版物、专利、公开的专利申请和序列表以及在所述公开和专利文献中的图片和照片通过引用并入本文一样。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供制备树突细胞疫苗的方法，其包括用防止细胞分裂的试剂处理从第一受试者获得的黑色素瘤细胞，用 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物 (mimetic) 处理黑色素瘤细胞，选择自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，并且将所选择的黑色素瘤细胞与来自相同第一受试者的自体树突细胞接触。本发明还提供包含通过上述方法所制得的树突细胞疫苗的组合物。本发明还提供的是刺激对黑色素瘤特异性抗原的免疫应答的方法，其包括向患有黑色素瘤的受试者施用 / 给药 (administering) 上述组合物。

[0014] 疫苗包含来自患有黑色素瘤的给定受试者的哺乳动物树突细胞群落，并且其中受试者含有黑色素瘤细胞，其中当在体外用 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物处理时，受试者所包含的黑色素瘤细胞包括自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，其中树突细胞包含黑色素瘤特异性肽抗原，其中所述黑色素瘤特异性肽抗原被树突细胞从所述黑色素瘤细胞 (或者在所述黑色素瘤细胞) 体外获得，其中树突细胞所包含的超过 60％的黑色素瘤特异性肽来自自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，其中树突细胞所包含的小于 40％的黑色素瘤特异性肽来自非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞，并且其中树突细胞和黑色素瘤细胞来自相同的受试者。本发明还提供上述树突细胞群落，其中通过粘附到表面来获得自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞。

[0015] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，超过 80％的黑色素瘤特异性肽来自自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，并且其中小于 20％的黑色素瘤特异性肽来自非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞。

[0016] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，超过 90％的黑色素瘤特异性肽来自自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，并且其中小于 10％的黑色素瘤特异性肽来自非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞。

[0017] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，基本上所有的黑色素瘤特异性肽均来自不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

[0018] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，基本上所有的黑色素瘤特异性肽来自由于黑色素瘤细胞受到辐照而不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

[0019] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，基本上所有的黑色素瘤特异性肽来自由于黑色素瘤细胞的染色体被核酸交联剂交联而不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。

[0020] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，所有的黑色素瘤特异性肽来自 IFN-γ 处理过或 IFN-γ 模拟物处理过的黑色素瘤细胞。

[0021] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，所有的黑色素瘤特异性肽来自未经 IFN-γ 处理过或未经 IFN-γ 模拟物处理过的黑色素瘤细胞。

[0022] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，存在来自自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞的第一数目的黑色素瘤特异性肽，并且其中存在来自非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞的第二数目的黑色素瘤特异性肽，并且其中所述第一数目和第二数目二者均指的是黑色素瘤特异性抗原类的数目，黑色素瘤特异性抗原类是 S-100、HMB-45、Mel-2、Melan-A、Mel-5、MAGE-1、MART-1 或酪氨酸酶中的一种，并且其中所述超过 60％是从第一数目获得的，并且其中所述小于 40％是从第二数目获得的。

[0023] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，存在来自自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞的第一数目的黑色素瘤特异性肽，并且其中存在来自非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞的第二数目的黑色素瘤特异性肽，并且其中所述第一数目和第二数目二者均指的是黑色素瘤特异性抗原类的数目，黑色素瘤特异性抗原类是 S-100、HMB-45、Mel-2、Melan-A、Mel-5、MAGE-1、MART-1 或酪氨酸酶中的两种，并且其中所述超过 60％是从第一数目获得的，并且其中所述小于 40％是从第二数目获得的。

[0024] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，存在来自自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞的第一数目的黑色素瘤特异性肽，并且其中存在来自非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞的第二数目的黑色素瘤特异性肽，并且其中所述第一数目和第二数目二者均指的是黑色素瘤特异性抗原类的数目，黑色素瘤特异性抗原类是 S-100、HMB-45、Mel-2、Melan-A、Mel-5、MAGE-1、MART-1 或酪氨酸酶中的三种，并且其中所述超过 60％是从第一数目获得的，并且其中所述小于40％是从第二数目获得的。其他实施方式使用上述抗原中的四种、五种、六种、七种或八种。本发明还包含完全不同的黑色素瘤特异性抗原的用途。

[0025] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，基本上所有黑色素瘤特异性肽来自经 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞。

[0026] 本发明公开了一种疫苗，其中在某些情况下，基本上所有黑色素瘤特异性肽来自在体外经处理而不能细胞分裂的黑色素瘤细胞。本发明还包括上述疫苗，其中给定受试者是人类受试者。

[0027] 此外，本发明提供疫苗，其中给定受试者是非人的哺乳动物。

[0028] 本发明公开了刺激对黑色素瘤特异性抗原的免疫应答的方法，其包括向受试者施用免疫刺激量的上述疫苗。

[0029] 本发明公开了一种方法，其中受刺激的免疫应答包括 $CD4^+$T 细胞应答、$CD8^+$T 细胞应答和 B 细胞应答中的一种或多种。

[0030] 本发明公开了一种方法，其中通过 ELISPOT 测定、通过细胞内细胞因子染色测定、通过四聚体测定、或者通过检测抗原特异性抗体的产生来测定 $CD4^+$T 细胞应答、$CD8^+$T 细胞应答或 B 细胞应答。

[0031] 本发明公开了一种方法，其中免疫应答包括含有 2 年总生存率 (OS) 的生存时间，并且其中 2 年总生存率至少为 60％。

[0032] 此外，本发明提供了上述方法，其中所述施用包括皮下注射疫苗。

[0033] 本发明公开了一种方法，其中施用包括将每周给予的疫苗注射三个月，然后每月给予的疫苗注射五个月。

[0034] 本发明公开了制备树突细胞疫苗的方法。

[0035] 本发明公开了制备树突细胞疫苗的方法，该树突细胞疫苗包含来自相同受试者的黑色素瘤细胞和树突细胞，其中用防止细胞分裂的试剂处理一种或多种（一个或多个）黑色素瘤细胞，其中用干扰素 -γ (IFN-γ) 或 IFN-γ 模拟物在体外处理所述一种或多种黑色素瘤细胞，其中选择自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，其中丢弃非自噬性和凋亡性的黑色素瘤细胞，并且其中向一种或多种自体树突细胞提供所述自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞，或者其中向一种或多种自体树突细胞提供衍生自所述自噬性和非凋亡性的黑色素瘤细胞的肽。

[0036] 本发明公开包含至少一种经干扰素 (IFN)-γ 处理的来自第一受试者的黑色素瘤细胞和至少一种来自相同第一受试者的抗原呈递细胞 (APCs) 的组合物，其中黑色素瘤细胞是：自噬性的；非凋亡性的；并且表达 MHC II 类分子。在另一方面，本发明包括上述组合物，其中经 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞负载到 APC 中；以及上述组合物，其中经 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞未负载到 APC 中。在另一方面，本发明包含上述组合物，其中黑色素瘤细胞来自患有 I 期 (Stage I)、II 期 (Stage II)、III 期 (Stage III) 或 IV 期 (Stage IV) 黑色素瘤的受试者。此外，本发明涉及上述组合物、相关的试剂盒和相关的方法，其中 APC 包含至少一种树突细胞。

[0037] 在一个方面，本发明的药物组合物、试剂和相关的方法利用癌症细胞的制剂，该制剂在 IFN-γ 处理后为 7-AAD 阴性并且 annexin V 阴性。这种群落 (population) 的非限制性例子可以是，例如约 99％ 7-AAD 阴性和约 99％ annexin V 阴性、或者至少约 95％ 7-AAD 阴性和约 95％ annexin V 阴性、或者至少约 90％ 7-AAD 阴性和约 90％ annexin V 阴性。

[0038] 此外，本发明包含上述组合物，其中自噬是通过如下测试证明的，该测试测定微管相关蛋白轻链 3(LC3)；以及上述组合物，其中使用 7- 氨基放线菌素 D(7-AAD) 试剂或 annexin（膜联蛋白）试剂中至少一种来证明细胞是非凋亡性的。

[0039] 在方法方面，本发明提供制造如上所述组合物的方法，其包括从第一受试者中去除至少一种黑色素瘤细胞，从第一受试者中去除至少一种 APC，并且允许黑色素瘤细胞与 APC 接触；以及刺激对受试者或患者中黑色素瘤的免疫应答的方法，其包含向受试者施用上述组合物。

[0040] 本发明涉及一种方法，其中来自患者的黑色素瘤细胞是非凋亡性的，是自噬性的，并且其中黑色素瘤细胞通过表达 MHC II 类分子来对加入的 IFN-γ 做出应答；以及上述方法，其中在负载到抗原呈递细胞上之前，辐照黑色素瘤细胞。

[0041] 本发明涉及治疗黑色素瘤患者中黑色素瘤的方法，其包括确定黑色素瘤细胞对

IFN-γ 的促凋亡作用不敏感，并给受试者施用一种或多种如上组合物。

[0042] 在另一方面，本发明提供刺激或增强对黑色素瘤患者中黑色素瘤的免疫应答的方法，其包括确定黑色素瘤细胞对 IFN-γ 的促凋亡作用不敏感，并给受试者施用一种或多种如上所述的组合物。还提供上述方法，其中免疫应答是体液免疫应答、细胞免疫应答和先天性免疫应答中的一种或多种。

[0043] 在试剂盒方面，本发明提供用于测试对受试者中肿瘤抗原的免疫应答的试剂盒，其中通过一种或多种上述方法来治疗受试者，并且其中试剂盒包含检测体液免疫应答、细胞免疫应答和先天性免疫应答的试剂。

[0044] 定义

[0045] 免疫刺激量可以是，但不限于，以可测量的量增加 ELISPOT 测定结果的量、以可测量的量增加 ICS 测定结果的量、以可测量的量增加四聚体测定结果的量、以可测量的量增加抗原特异性 $CD4^+$T 细胞的血液总数 (blood population) 的量、以可测量的量增加抗原特异性 $CD8^+$T 细胞的血液总数的量、或者其中当与合适的对照相比时增加了至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、1.5 倍、2.0 倍、3.0 倍等。合适的对照可以是对照疫苗，其中没有用黑色素瘤细胞负载树突细胞，或者没有用衍生自黑色素瘤细胞的肽负载树突细胞。

[0046] 术语“黑色素瘤特异性抗原”包括通常与黑色素瘤相关的抗原，并且其中该抗原对于黑色素瘤来说被认为是唯一的，而不是与其他癌症有关，并且此外，术语“黑色素瘤特异性抗原类”包括通常与黑色素瘤相关的抗原，并且其中该抗原也与诸如乳腺癌、大肠癌等其他类型癌症有关。

[0047] 在辐照本发明的黑色素瘤细胞的上下文中，“辐照”优选地通过 γ- 辐照，但也包括通过 x- 射线、电子、中子、质子、电磁辐照、可见光、紫外光等的辐照。在一个方面，辐照起到防止黑色素瘤细胞的细胞分裂的作用。在另一方面，辐照不仅防止细胞分裂，而且使细胞蛋白质变性。作为辐照的替换，本发明可通过物理破坏的方式诸如超声、空洞形成 (cavitation)、脱水、离子耗竭 (ion depletion) 或者通过暴露于一种或多种盐产生的毒性来防止黑色素瘤细胞的细胞分裂。

[0048] 在本发明中，干扰素 -γ (IFN-γ) 诱导自噬。替换地，或者此外，可以使用自噬诱导剂，例如 mTOR 抑制剂和非 mTOR(mTOR-independent) 依赖型试剂。适合本发明的 mTOR 抑制剂包括，例如雷帕霉素 (rapamycin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、torinl、西罗莫司脂化物 (temsirolimus)、依维莫司 (everolimus)、IKK 刺激、MAPK 激酶抑制剂、MEK1/2 抑制剂、脱水和应激活化分子诸如饥饿所诱导的 JNK1。非 mTOR 依赖型试剂包括由锂、卡马西平和丙戊酸诱导的低肌醇三磷酸 (IP3) 水平，或由暴露于 L- 型钙离子通道拮抗剂诸如米诺地尔 (minoxidil) 所引起的低细胞内钙水平。其他非 mTOR 依赖型试剂包括钙蛋白酶的化学抑制 (钙蛋白酶抑制蛋白)、鞘脂 (S1P)、和诸如过氧化氢的反应性氧 (reactive oxygen)，例如由饥饿或缺氧条件诱导的。提供了这些试剂中的一种或多种来使用，替代 IFN-γ 或 IFN-γ 模拟物。参见例如 Ravikumar 等 (2010)Phys.Revs.90:1383-1435。

[0049] 在“超过 60％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“％”(百分数) 涉及肽分子的数目，而不涉及在抗原性方面不同的肽的数目。在“超过 80％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“％”涉及肽分子的数目，而不涉及在抗原性方面不同的肽的数目。在“小于 40％的黑色素瘤特

异性肽”中，术语“％”涉及肽分子的数目，而不涉及在抗原性方面不同的肽的数目。在“小于 20％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“％”涉及肽分子的数目，而不涉及在抗原性方面不同的肽的数目。

[0050] 在“超过 60％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“肽”涉及肽分子、寡肽分子和多肽分子的数目的总和。在“超过 80％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“肽”涉及肽分子、寡肽分子和多肽分子的数目的总和。在“小于 40％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“肽”涉及肽分子、寡肽分子和多肽分子的数目的总和。在“小于 20％的黑色素瘤特异性肽”中，术语“肽”涉及肽分子、寡肽分子和多肽分子等的数目的总和。

[0051] 术语“偏向自噬性和非凋亡性的”指的是，当用 IFN-γ 体外处理时，癌细胞诸如黑色素瘤细胞是至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％、至少 98％自噬性和非凋亡性的。注意，在用于指代各种黑色素瘤细胞的术语中存在如下差异：自噬性和非凋亡性的细胞与非自噬性和凋亡性的细胞不同。

[0052] 在从一种或多种癌细胞获得的肽的上下文中，“衍生自”或“从……获得”(derived from) 包含以下内容。癌细胞可以被分解，例如通过均化器或通过渗透破裂，从而得到粗提取物。可以使粗提取物的肽、寡肽和多肽接触到树突细胞，然后通过树突细胞处理肽。“衍生自”也包括提供具有完整癌细胞的树突细胞，其中癌细胞是活的，或者其中已经采用辐照处理癌细胞但癌细胞仍然具有代谢活性，或者其中已经采用核酸交联剂处理癌细胞但癌细胞仍然具有代谢活性。“衍生自”包括癌细胞碎片、游离癌细胞蛋白质和经辐照的癌细胞的混合物，它们被树突细胞摄取 (taken up)，因此衍生自癌细胞。

[0053] 应用于人、哺乳动物、哺乳动物受试者、动物、兽医受试者、安慰剂受试者、研究受试者、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，“施用”指的是，但不限于，给受试者、细胞、组织、器官或生物流体等接触外源性配体、试剂、安慰剂、小分子、药剂、治疗剂、诊断剂或组合物。“施用”可涉及例如处理方法、药代动力学方法、诊断方法、研究方法、安慰剂方法和实验方法。细胞的处理包括给细胞接触试剂、以及给流体接触试剂，其中流体与细胞接触。“施用”也包括诸如细胞的体外 (in vitro) 和活体外 (ex vivo) 处理，其通过试剂、诊断、结合组合物或者通过另一细胞进行。

[0054] 涉及配体和受体时，“激动剂”包括刺激受体的分子、分子的组合、复合物、试剂的组合。例如，粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的激动剂可以包括 GM-CSF、GM-CSF 的变异体变白或衍生物、GM-CSF 的肽模拟物、模拟 GM-CSF 的生物功能的小分子、或者刺激 GM-CSF 受体的抗体。涉及配体和受体时，拮抗剂包括抑制、抵消、下调和 / 或脱敏受体的分子、分子的组合物或复合物。“拮抗剂”包括抑制受体的组成性活性 (constitutive activity) 的任何试剂。组成性活性是当不存在配体 / 受体相互作用时显露的活性。“拮抗剂”还包括抑制或防止受刺激 (或受调节) 的受体活性的任何试剂。举例如下，GM-CSF 受体的拮抗剂包括但不限于：与配体 (GM-CSF) 结合并防止其结合受体的抗体，或者与受体结合并防止配体与受体结合的抗体，或者其中抗体将受体封锁在非活性构象。

[0055] 除本文另有指明或上下文指定外，术语“表达”包括如下内容。表达包括 mRNA 的生物合成、多肽生物合成、多肽活化，例如通过翻译后修饰，或者通过改变亚细胞位置或通过募集到染色质使表达活化。换言之，“提高的表达”包括由磷酸酯引起的生物合成提高或活性提高，或者由细胞质到细胞核的迁移所引起的活性提高。

[0056] 抗原呈递细胞 (APCs) 是用于呈递抗原给 T 细胞的免疫系统细胞。APCs 包括树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、边缘区 Kupffer 细胞、小胶质细胞、郎格汉斯细胞、T 细胞和 B 细胞 (参见，例如 Rodriguez-Pinto 和 Moreno(2005)Eur. J. Immunol. 35:1097-1105)。树突细胞产生在至少两个谱系中。第一谱系包括前体 -DC1、骨髓 DC1 和成熟 DC1。第二谱系包括 $CD34^{++}CD45RA-$ 早期祖多能细胞 (early progenitor multipotent cells)、$CD34^{++}CD45RA^{+}$ 细胞、$CD34^{++}CD45RA^{++}CD4^{+}IL\text{-}3Ralpha^{++}$ 促 -DC2 细胞、$CD4^{+}CD11c-$ 浆细胞样 DC2 前体细胞、淋巴样人 DC2 浆细胞样 - 衍生的 DC2、和成熟 DC2(参见，例如 Gilliet 和 Liu(2002)J. Exp. Med. 195:695-704 ;Bauer 等 (2001)J. Immunol. 166:5000-5007 ;Arpinati 等 (2000)Blood95:2484-2490 ;Kadowaki 等 (2001)J. Exp. Med. 194:863-869 ;Liu(2002) Human Immunology63:1067-1071 ;McKenna 等 (2005)J. Virol. 79:17-27 ;O'Neill 等 (2004) Blood104:2235-2246 ;Rossi 和 Young(2005)J. Immunol. 175:1373-1381 ;Banchereau 和 Palucka(2005)Nat. Rev. Immunol. 5:296-306)。

[0057] “有效量”包括但不限于可改善、反转、减轻、预防或诊断医学病情 (condition) 或病症 (disorder) 的症状或迹象的量。除非另有明确指明或通过上下文指明外，“有效量”不限于足以改善病情的最小量。疾病或病症的严重程度以及处理以预防、治疗或减轻疾病或病症的能力，可以通过生物标志物或通过临床参数测定，但不限于此。

[0058] 生物标志物包括多肽，多肽的位置 / 部位 (例如囊泡 (vesicular)、分子内、膜结合的)，核酸，血清、尿、脑脊液中的血球计数、代谢水平，肿瘤细胞计数，癌症干细胞计数，肿瘤水平。肿瘤水平可以通过 RECIST 标准 (Eisenhauer 等 (2009)Eur. J. Cancer. 45:228-247) 来测定。表达标志物包括 mRNA 的基因表达或者基因扩增、抗原表达和多肽的表达。临床参数包括但不限于无进展生存期 (PFS，progression-free survival)、6 月 PFS、无病生存期 (DFS，dsease-free srvival)、疾病进展时间 (TTP，time to progression)、远处转移时间 (TDM，time to distant metastasis) 和总生存期 (overall survival)。

[0059] “标记的”组合物可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、同位素或化学方法直接或间接地检测。例如有用的标记包括 32P、33P、35S、14C、3H、125I、稳定同位素、表位标签、荧光染料、电子 - 致密试剂、底物或酶例如在酶联免疫测定中使用的酶或 fluorettes(例如参见 Rozinov 和 Nolan(1998)Chem. Biol. 5:713-728)。

[0060] 评估免疫应答的方法

[0061] 本发明还提供用于表征免疫应答的 ELISPOT 测定、细胞内细胞因子染色 (ICS) 和四聚体测定 (参见例如，Pardoll 的 US2007/0190029 ;Chattopadhyay(2008)Cytometry A. 200873:1001-1009 ;Vollers(2008)Immunology. 123:305-313 ;Lalvani. 等 (1997) J. Exp. Med. 186:859-865 ;Waldrop(1997)J. Clin. Invest. 99:1739-1750 ;Hudgens(2004) J. Immunol. Methods288:19-34 ;Goulder(2001)J. Virol. 75:1339-1347 ;Goulder(2000) J. Exp. Med. 192:1819-1831 ;Anthony(2003)Methods29:260-269 ;Badovinac 和 Harry(2000)J. Immunol. Methods238:107-117)。通过肿瘤学临床试验中所使用的终点来评估患者体内的免疫应答，包括客观反应 (RECIST 标准)、总生存期、无进展生存期 (PFS)、无病生存时间、远处转移时间、6 月 PFS、12 月 PFS 等等。

[0062] 疫苗

[0063] 本发明的树突细胞疫苗可以通过皮内、结内、粘膜或皮下途径或上述的任意组合

来施用。每剂可以包括约 10×10^3 个树突细胞、20×10^3 个细胞、50×10^3 个细胞、100×10^3 个细胞、200×10^3 个细胞、500×10^3 个细胞、1×10^6 个细胞、2×10^6 个细胞、20×10^6 个细胞、50×10^6 个细胞、100×10^6 个细胞、$200\times10^6$6、500×10^6、1×10^9 个细胞、2×10^9 个细胞、5×10^9 个细胞、10×10^9 个细胞等等。施用频率可以是例如一周一次、一周二次、两周一次、三周一次、四周一次、一个月一次、两个月一次、三个月一次、四个月一次、五个月一次、六个月一次等等。进行施用的天的总数目可以是一天、2 天或 3 天、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 等等。应当理解的是，任何给定的施用可以包含同一天中两次或更多次注射。在一个方面，本发明涉及用整个肿瘤细胞负载树突细胞，其中至少 10％、其中至少 20％、至少 30％、至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％的负载到树突细胞中的衍生自黑色素瘤细胞的蛋白质存在于整个肿瘤细胞中。在非限制性实施方式中，树突细胞疫苗在烧瓶中、小瓶中、瓶子中、注射器、导管中、套管中等等。为了施用，至少 20％、至少 30％、至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％、至少 99％的被施用的树突细胞是树突细胞。

[0064] 疫苗均匀性

[0065] 在一个示例性实施方式中，本发明提供包含树突细胞的疫苗，该树突细胞包含衍生自体外负载的黑色素瘤肽，其中疫苗以至少 5/95、10/90、20/80、30/70、40/60、50/50、60/40、70/30、80/20、90/10、95/5、98/2、99/1 等的树突细胞 / 黑色素瘤细胞的比例包含树突细胞（包含黑色素瘤肽的 DC 和不包含黑色素瘤肽的 DC 的总和）。本发明还提供包含树突细胞的疫苗，该树突细胞包含衍生自体外负载的黑色素瘤肽，其中疫苗以至少 5/95、10/90、20/80、30/70、40/60、50/50、60/40、70/30、80/20、90/10、95/5、98/2、99/1 等的 [树突细胞]/[既非 DC 又非黑色素瘤的细胞] 的比例包含树突细胞（包含黑色素瘤肽的 DC 和不包含黑色素瘤肽的 DC 的总和）。本发明示出了一种带间隔的容器，其中第一间隔包含黑色素瘤细胞，并且第二间隔包含树突细胞。两个间隔可以通过以下物质来分离 ：膜、过滤器、阀门、导管、耦合器来分离，其防止黑色素瘤细胞与树突细胞接触，但其中手动传输或其中去除膜或打开阀门时允许黑色素瘤细胞与树突细胞接触，使得黑色素瘤细胞、黑色素瘤细胞片段和 / 或黑色素瘤肽可以负载到树突细胞上。

[0066] 干扰素 -γ 模拟物

[0067] 本发明包含模拟物，例如干扰素 -γ 模拟物，例如模拟肽 95-132(Ahmed(2007) J.Immunol.178:4576-4583 ;Fulcher(2008)FEBS Lett.582:1569-1574)。本发明提供 IFN-γ 模拟物，其中总的目的是获取富含自噬性和非凋亡性黑色素瘤细胞的黑色素瘤细胞群落。IFN- 模拟物包括例如具有与干扰素 -γ 相同激动剂活性的抗体。

[0068] 使黑色素瘤细胞失活

[0069] 本发明提供其中癌症细胞失活的组合物和方法，例如通过辐射失活或通过核酸交联剂的方式失活。示例性交联剂具有交联 DNA 但不修饰蛋白质的能力。核酸烷基化剂可以是 β- 丙氨酸、N-(吖啶 -9- 基)、2-[双 (2- 氯乙基) 氨基] 乙基酯。在一些实施方式中，核酸靶向化合物是经由 UVA 辐照活化的补骨脂素化合物。例如，核酸靶向化合物可以是 4'-(4- 氨基 -2- 氧杂) 丁基 -4,5',8- 三甲基补骨脂素（本文中也称为 "S-59"）。可以用 150 微摩尔补骨脂素 S-59 和 $3J/cm^2$UVA 光 (FX1019 辐照装置，Baxter Fenwal, Round Lake, IL) 来失活细胞。用 S-59 进行的失活被称为光化学处理，并且导致细胞的完全失活。可以测试

各种浓度的核酸交联剂在失活细胞方面的效力，例如在防止细胞分裂方面的效力。S-59 的特征在于其交联核酸但保持蛋白质完整未被修饰的能力。细胞可以悬浮于含 0、1、10、100 和 1000nM 补骨脂素 S-59 的 5mL 生理盐水中。可以如下地辐照每个样品。可以以 100nM 的浓度加入 S-59。以大约 2J/cm^2(FX1019 辐照装置，Baxter Fenwal, Round Lake, III.) 的剂量 UVA 辐照样品。并然后将每个样品转移到 15mL 管、离心并去除上清液，然后用 5mL 生理盐水洗涤、离心并去除上清液，并且最终的沉淀悬浮于 0.5mL 的生理盐水中 (Dubensky 的美国专利 Nos. 7833775 和 7691393)。

[0070] 富集非凋亡性的黑色素瘤细胞

[0071] 可以使黑色素瘤细胞群落富含非凋亡性的黑色素瘤细胞，例如通过使用如下技术：将非凋亡性且自噬性细胞与非自噬性且凋亡性的细胞分离，其中分离是通过将自噬性且非凋亡性的细胞粘附到表面来进行的，其中其他细胞处于浮动状态。还可以通过去除凋亡的细胞来获得富含非凋亡性黑色素瘤细胞的群落，例如通过对磷脂酰丝氨酸特异的抗体的方式去除。通过经固定化的抗体的方式去除细胞的技术是已知的 (Onodera(1998)Ther. Apher. 2:37-42)。对磷脂酰丝氨酸特异的抗体是已知的 (例如 EMD Millipore, Billerca, MA)。也可以用荧光抗磷脂酰丝氨酸抗体标记黑色素瘤细胞的主体群落 (bulk population)，其中通过流式细胞法、亲和层析法、免疫磁性分离 (参见例如 Hoeppener(2012)Recent Results Cancer Res. 195:43-58 ;Dainiak(2007)Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 106:1-18) 除去标记的凋亡黑色素瘤细胞。

[0072] 细胞凋亡的抑制剂

[0073] Z-VAD(Z-VAD-fmk) 是一种细胞凋亡的抑制剂，其可以从例如 Enzo Life Sciences(Exeter, UK)、R&D Systems(Minneapolis, MN)、Tocris Biosciences(Bristol, UK)、BioMol(Plymouth Meeting, PA) 和 EMD Chemicals(Gibbstown, NJ) 获得。Z-VAD-fmk 是一种合成肽 Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH2F。半胱天冬酶 (caspases，胱天蛋白酶) 是半胱氨酸 - 天冬氨酸特异性蛋白酶家族。半胱天冬酶被死亡受体连接 (ligation) 而活化，例如 TRAIL、FAS、通过 DNA 损伤、应激、血清饥饿以及在某些细胞类型中干扰素。半胱天冬酶在包括核断裂、染色质浓缩和细胞质完整性损失的细胞凋亡的高度调节过程中起关键的作用。泛蛋白酶抑制剂 (pan-capase)z-VAD-fmk(苄氧羰基 - 缬氨酰 - 丙氨酰 - 天冬氨酰 -[O- 甲基]- 氟甲基酮) 不可逆地结合半胱天冬蛋白酶的催化位点，并抑制它们在诱导细胞凋亡方面的功能。在对 IFN-γ 应答时抑制细胞进行细胞凋亡的能力可以是如下方式：通过此方式产生非凋亡性但自噬性细胞，而无洗涤选择步骤来去除浮动的凋亡细胞。

[0074] 在本发明的一个实施方式中，在将肿瘤细胞负载到树突细胞上或其他类型的抗原呈递细胞 (APC) 上之前，用 IFN-γ 处理肿瘤细胞。在另一个实施方式中，在将肿瘤细胞负载到树突细胞上或其他类型 APC 上之前，未用 IFN-γ 处理肿瘤细胞。

[0075] 本发明提供药物、试剂、试剂盒 (包括诊断试剂盒)，其中药物、试剂、试剂盒包含树突细胞、抗体或抗原。本发明还提供施用含至少一种树突细胞和至少一种抗原的组合物的方法、刺激抗体形成的方法、刺激 ADCC 的方法、刺激补体依赖性细胞毒性的方法、以及确定患者适用性的方法和试剂盒、在临床试验中确定患者入选 / 排除标准的方法和试剂盒、预测对药物或试剂的应答的方法。现有技术中已描述补体依赖性细胞毒

性（参见例如 Goodman 等 (1990) J. Clin. Oncol. 8:1083-1092 ;Cheson(2010) J. Clin. Oncol. 28:3525-3530）。本发明的药物组合物、试剂和相关方法包含 CD83 阳性树突细胞，其中 CD83 是通过用 IFN-γ 处理的癌细胞负载而诱导的。在本发明的 CD83 方面，CD83 被诱导了至少 2%、至少 3%、至少 4%、6%、7%、8%、9%、10%等。在另一方面，排除如下 DC 试剂或 DC 相关方法，其中树突细胞的 CD83 不能通过用 IFN-γ 处理的癌细胞负载而可检测地诱导。

[0076] 图

[0077] 图 1 展现了在用 IFN-γ 处理之前（左）和 IFN-γ 处理 72 小时之后（右）培养的肿瘤细胞的图形。处理后，培养的肿瘤细胞要么是浮动的、非自噬性且凋亡的，要么是粘附的、自噬性且非凋亡的。浮动的细胞示出表达凋亡标志物磷脂酰丝氨酸。浮动的细胞示出具有相对较少的表达的 MHC II 类，而粘附细胞示出具有过度表达的 MHC II 类。

[0078] 图 2A-D 示出了用于负载树突细胞的经 IFN-γ 处理的自体肿瘤细胞的特征。在 15% FBS/ECS 中在 RPMI 中使用或者不使用 1000IU/mL IFN-γ 处理自体黑色素瘤肿瘤细胞 72 小时，收获并用 100Gy 辐照并冻存。然后在 AIMV 中将细胞解冻，并采样用于流式细胞，以及用于在抗原负载 DC 之前制备用于免疫印迹的细胞裂解物。四个独立的自体黑色素瘤细胞系的例子示于图 2A、图 2B 和图 2C 中。通过 IFN-γ 处理自体肿瘤细胞诱导主要组织相容性复合体（图 2D）。在使用或者不使用 1000IU/mL IFN-γ 处理 72 小时后收获肿瘤细胞，然后测定 MHC I 类和 II 类。使用对照同类型抗体来认定阳性群落。深色数据点表示中值平均 +/-95%置信区间。N = 65。

[0079] 在一个方面，本发明排除用于负载树突细胞的非自体肿瘤细胞，并且排除使用用于负载树突细胞的非自体肿瘤细胞的方法。

[0080] 图 3A 和 3B 描述用自体黑色素瘤细胞系负载的树突细胞的表型，其中使用干扰素 -γ 处理自体黑色素瘤细胞系或未使用干扰素 -γ 处理自体黑色素瘤细胞系。使用或者不使用 1000IU/mL IFN-γ 处理一组四个自体黑色素瘤细胞系 72 小时，辐照并冻存。然后在 AIMV 中将细胞解冻，并在收获和通过流式细胞法测定 CD80、CD83、CD86 和 MHC II 类的表达之前，与自体树突细胞组合大约 24 小时（图 3A）。数据总结于图 3B 中。示出了平均值 ± 标准偏差 (SD)，n = 4。

[0081] 图 4A 和 4B 示出了剂型 (dose) 制备所使用的树突细胞的表型。在用经 IFN-γ 处理的、辐射的自体肿瘤细胞负载之前 (Pre-ATC Load DC, N = 53) 和负载之后 (Post-ATC Load DC, N = 65)，通过流式细胞法评估 DC 的样品对于 CD80、CD83、CD86 和 MHC II 类的表达。使用 FACS Caliber®球来设置初始流式细胞仪仪器设定，然后在整个数据的采集中保持该设定不变（图 4A）。在图 4B 中，比较 ATC 负载之前和 ATC 负载之后的百分数表示的值和平均荧光强度 (MFI) ±SD。*p = 0.019 且 **p = 0.0009。

[0082] 图 5A 至 5C 示出了经干扰素 -γ 处理的黑色素瘤细胞进行自噬。选择商业可购得的黑色素瘤细胞系，并在 5% FBS/RMPI 中用 1000IU/mL IFN-γ 培育 72 小时。在培育期结束时拍摄 SK-5-Mel 细胞培养基的相位差显微镜照片（图 5A），示出了具有自噬体的囊泡的放大的细胞。在用 IFN-γ 处理之前，通过使用 GFP-LC3B 构建转染来证明自噬体的确定和形成（图 5B）。通过使用用于 LC3B 的抗体蛋白质印迹（图 5C），来确定 IFN-γ 处理后的自噬诱导，确认 LC3 的更快的迁移形式，已经表明 LC3 与自噬性血管形成相关。

[0083] 图 6A 和 6B 展现了对干扰素 -γ 应答时诱导的细胞凋亡和自噬。用 1000IU/mL 的 IFN-γ 培育 SK-5-Mel 细胞 72 小时，之后收集非粘附群落和粘附的群落并通过使用 7-AAD 和 Annexin-V 流式细胞法测定细胞凋亡和自噬（图 6A）。使用 Enzo Cyto-ID 自噬检测染料，通过测定制造商所提供的染料的平均强度峰位移，通过流式细胞法来测定自噬（图 6B）。图 6C 中示出了，与 5% FBS/RPMI 相比，峰位移的倍数变化 (fold change)，其中无血清作为自噬诱导的阳性对照。

[0084] 图 7 公开了阻断半胱天冬酶活性后的自噬诱导并不影响在黑色素瘤细胞中对 IFN-γ 应答时的自噬诱导。在 20uM 的泛半胱天冬酶抑制剂 z-VAD 或其对照化合物 z-FA 存在下，用 1000IU/mL 的 IFN-γ 处理 SK-5-Mel 细胞 72 小时。收获细胞，并通过流式细胞法测定自噬，如图 6C 中所示。

[0085] 图 8 示出了 SK-5-Mel 细胞，其用 1000IU/mL 的 IFN-γ 在 10uM 的自噬抑制剂 3- 甲基腺嘌呤 (3-MA) 存在下培育 72 小时。然后收获细胞，并通过流式细胞法测定细胞凋亡和 MHC II 类 (HLA-DR) 表达。

[0086] 图 9 示出了来自由患者肿瘤样本 (N = 36) 所产生的肿瘤细胞系的 IFN-γ 处理过的细胞，测定其在 MHC II 类或细胞凋亡方面的变化。所示数据为平均荧光强度 ±SE 的平均值。

[0087] 图 10 示出了经 IFN-γ 处理的细胞，通过流式细胞法从用于负载患者特异性疫苗免疫治疗的树突细胞的样品测定其 MHC II 类或细胞凋亡。示出了 MHC II 类的倍数变化、平均荧光强度和凋亡细胞百分数 (Annexin-V 阳性）。

[0088] 图 11 和图 12 示出了 MHC II 类的诱导和细胞凋亡的缺乏之间的相关性，在接受用自噬性、非凋亡性、经干扰素 -γ 处理的肿瘤细胞负载的树突细胞的患者中表现出更好的无进展生存期（图 11）和总生存期（图 12）。

[0089] 图 13 示出了来自三次试验的生存曲线。点图 (Kaplan-Meier) 是步进式曲线，表明在临床试验的过程中研究受试者生存的百分数。设计各个组 DC-54（实心圆）、TC-74（实心方块）、TC-24（实心三角形）以及 DC-18（线）。最差的生存发生在 TC-24 组。第二差的生存组是 TC-74。TC-24 指的是在涉及 24 个受试者的研究中肿瘤细胞的疫苗。DC-54 指的是树突细胞疫苗，其中对 54 个受试者进行处理，并且其中疫苗包含与经辐照的自体肿瘤细胞一起共同培养的自体树突细胞 (DCs)。

[0090] 进一步说明

[0091] 自体树突细胞生成

[0092] 通过 ficoled apheresis products 的塑料粘附法 (plastic adherence method) (Choi 等 (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716 ; Luft 等 (1998) Exp. Hematol. 26:489-500 ; Cornforth 等 (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131)，在补充有各 1000IU/mL 的 IL-4 (CellGenix, Freisberg, Germany) 和 GM-CSF (Bertex, Seattle, WA) (DC 培养基）的不含抗生素的 AIM-V 培养基 (Invitrogen, Grand Island, NY) 中，生成树突细胞。然后在用经 IFN-γ 处理的、辐照的自体肿瘤细胞负载之前，将烧瓶培养 6 天。

[0093] IFN-γ 自体肿瘤细胞系生成和药物的制备

[0094] 根据 Cornforth 等 (Cornforth 等 (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131 ; Dillman 等 (1993) J. Immunother. Emphasis Tumor

Immunol.14:65-69;Dillman 等 (2000)Cancer Biother.Radiopharm.15:161-168),生成纯的肿瘤细胞。然后用 1000U/mL 的干扰素 -γ (InterMune,Brisbane,CA) 培育肿瘤细胞 72 小时,用来自铯源的 100Gy 辐照并冻存 (Selvan 等 (2007)Int.J.Cancer122:1374-1383;Selvan 等 (2010)Melanoma Res.20:280-292)。从冻存中恢复经 IFN-γ 处理且辐照的肿瘤细胞,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤,然后加入培养的树突细胞 (DCs),然后培育约 24 小时。通过用橡皮淀帚轻轻刮取来收获负载了抗原的 DCs,并冻存。获得经 IFN-γ 处理或未处理的肿瘤细胞和负载的 DCs 的多个等分部分,用于流式细胞评价和台盼蓝拒染 (trypan-blue exclusion) 测定。

[0095] 皮肤黑色素瘤的分期 (Staging)

[0096] 本发明的药物或试剂可以施用于黑色素瘤患者,其中黑色素瘤诊断为 I 期、II 期、III 期或 IV 期 (Mohr 等 (2009)Ann.Oncology(Suppl.6)vi14-vi21)。例如 I 期指的是具有原发 (初始) 黑色素瘤而无区域或远处转移证据的患者。II 期包括无淋巴结疾病或远处转移证据的患者,其中患者的进一步特征在于 :例如损伤大于 1mm 且小于或等于 2mm 厚的覆上皮 (overlying epithelium) 溃疡,或者损伤大于 2mm 且小于或等于 4mm 厚的上皮溃疡。III 期黑色素瘤包括病理记录波及区域淋巴结或在途 (in-transit) 转移或卫星 (satellite) 转移的损伤,其中患者可具有例如一个、两个、三个或四个或更多个受感染的淋巴结。IV 期黑色素瘤定义为存在远处转移,其中转移仅位于远处皮肤、皮下组织或淋巴结,其中转移涉及肺转移,或者其中转移涉及所有其他内脏部位。

[0097] 本发明包含预防性施用的方法,也就是用于尚未或从未诊断为患有黑色素瘤的受试者。本发明包含施用的方法,其中受试者此前已被诊断为黑色素瘤并且此前已得到成功治疗以消除黑色素瘤 (或者经历过自动完全痊愈),并且其中在根除后预防性施用。

[0098] 肿瘤抗原

[0099] 本发明的黑色素瘤细胞表达 Mage、Mart-1、Mel-5、HMB45、S100 或酪氨酸酶中的一种或多种 (Dillman 等 (2011)Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals26:407-415),但并不限于此。在一个方面,肿瘤抗原的检测使用未暴露于 IFN-γ 的细胞,而在另一方面,肿瘤抗原的检测在经 IFN-γ 处理的细胞上进行 (参见例如 Cornforth 等 (2011)Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals26:345-351)。本发明包含表达一种或多种黑色素瘤抗原或者包含一种或多种分离的黑色素瘤抗原的组合物的黑色素瘤细胞,如 Dubensky 的 US2007/0207171 所公开的,其通过引用以其全文并入本文。

[0100] 测定细胞凋亡

[0101] 可以使用多种试剂来检测或测定细胞凋亡,例如荧光染料标记的膜联蛋白,通过用染料诸如碘化丙烷和 7- 氨基放线菌素 D(7-AAD) 染色,通过测定线粒体内膜势的损失,通过测定半胱天冬酶的活化或裂解。参见例如 George 等 (2004)Cytometry Part A.59A:237-245。细胞凋亡的早期活动是磷脂酰丝氨酸暴露于质膜的外表面,其可以通过荧光染料标记的膜联蛋白检测。可用的方法能够区分活细胞、坏死细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞。本发明使用通过 7-ADD 测定为非凋亡性的黑色素瘤细胞、通过膜联蛋白 V 测定为非凋亡性的黑色素瘤细胞、在 IFN-γ 处理后经凋亡性测定为非凋亡性的黑色素瘤细胞 (Dillman 等 (2011)Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals26:407-415)、或者通过一种或多种生物标志物 Bcl-2、半胱天冬酶 -3、P53 或存活素测定为非凋亡性的黑色素瘤细胞

(Karam 等 (2007)Lancet Oncol.8:128-136)。本发明的药物组合物、试剂和相关方法排除经 IFN-γ 处理的凋亡性的黑色素瘤细胞，其中根据例如 Herlyn 等的美国专利 No.7544465、Thorpe 等的美国专利 7714109 来测定细胞凋亡，其通过引用并入本文。

[0102] 测定自噬

[0103] 自噬是用于降解许多蛋白质和某些细胞器的自然存在的过程。自噬介导蛋白质和细胞器周转、饥饿应答、细胞分化、细胞死亡等。与微管相关的蛋白轻链 3(LC3) 监测自噬。在一种方法中，可以通过测量 LC3 的转化来检测自噬，其涉及 LC3-I 或 LC3-II 的转化。LC3-II 的量与自噬体的数目相关。具体来说，LC3 是细胞溶质的且可溶的，而 LC3-II 存在于膜上。LC3-II 具有更大的分子量，因为其与脂质结合 (conjugated)。可以测量 LC3 加工，例如通过 western 印迹，而自噬、自噬小泡和自噬体可以通过显微镜测定。自噬可以是定量的，例如通过检测加工的 LC3-II、通过早期与晚期自噬性区室 (compartment) 之间的比例、或者通过自噬体积。参见 (Mizushima 和 Yoshimori(2007)Autophagy3:542-546:634-641 ; Tanida 等 (2008)Methods Mol Biol.445:77-88 ;Eng. 等 (2010)Autophagy6:634-641)。在一个方面，本发明使用自噬作为筛选工具，用于选择合适的自噬性癌细胞，其中可以根据在一个或多个具体阶段中自噬的出现来选择细胞。这些自噬阶段包括 :(1) 通过自噬体隔离胞质区室，(2) 使用溶酶体融合自噬体，以形成自溶酶体，并且 (3) 通过溶酶体内的蛋白酶来降解自溶酶体内容物。在另一个方面，本发明包括主要显示第一阶段、主要显示第二阶段、主要显示第三阶段、主要显示所有三个阶段的细胞。在另外一个方面，本发明包含显示第一阶段、第二阶段、第三阶段、第一和第二、第二和第三阶段或者显示所有三个阶段的细胞。

[0104] 干扰素 -γ (IFN-γ) 信号传导

[0105] IFN-γ (II 型干扰素) 信号传导依赖于一些基因的表达，诸如 IFN-γ 受体、STAT1、STAT2、STAT1 同源二聚体、STAT1/STAT2 异源二聚体、IRF-1、GAS 和 IRF-E。研究表示 IFN-γ 信号传导依赖于 IFN-γ 受体 (IFNGR1 链 ;IFNGR2 链)。细胞表面上 IFNGR 的低表达能够阻断 IFN-γ 信号传导的某些方面 (Schroder 等 (2004)J.Leukocyte boil.75:163-189)。在一个方面，本发明排除使用表现出 IFNGR 的低表面表达的癌细胞。在另一个方面，本发明筛选表达 STAT1 同源二聚体的那些癌细胞，使用这些细胞，并且基本上排除那些不表达 STAT1 同源二聚体的细胞。在另外一个方面，本发明考虑筛选那些具有 STAT1 磷酸化 (丝氨酸 -727) 的细胞。本发明还考虑排除来自具有 STAT1 基因中功能突变缺失的患者的癌细胞 (参见例如 Dupuis 等 (2001)Science293:300-303 ;Schroder 等 (2004)J.Leukoc.Biol.75:163-189)。下面关注 IRF 基团家族。RF-1、IRF-2 和 IRF-9 均参与 IFN-γ 信号传导。本发明涵盖了使用表达这些 IRF 基因族基因中的一种或多种基因的癌细胞，或者排除未表达这些基因中一种或多种的癌细胞。

[0106] IFN-γ 应答基因

[0107] 在一些示例性实施方式中，本发明包含生物材料、组合物、试剂和方法，其要求使用对 IFN-γ 应答的黑色素瘤细胞或肿瘤前期的黑色素瘤细胞。可以通过一种或多种 IFN-γ 应答基团的表达测定，来确认、区分和选择黑色素瘤细胞。已经确认了许多 IFN-γ 应答基团 (参见例如 Halonen 等 (2006)J.Neuroimmunol.175:19-30 ; MacMicking(2004)11:601-609 ;Boehm 等 (1997)15:749-795)。所述测定可以涉及从患者中

去除一种或多种黑色素瘤细胞、在添加的 IFN-γ 存在和不存在情况下培养细胞、并确定对 IFN-γ 的应答。在该测定中，IFN-γ 诱导的基因表达可以通过对以下敏感的试验来检测，上述试验对以下敏感：转录因子结合到 IFN-γ 诱导的基因的启动子、IFN-γ 诱导的基因的 mRNA 的表达、表达的多肽等等。IFN-γ 应答基因可以包括例如，用于免疫应答、编码转录因子、转运蛋白质的基因、细胞凋亡基因、用于细胞生长或维持的基因、用于脂质代谢的基因、介导胞吞或胞吐的基因、胞内信号传导基因、糖代谢基因、细胞粘附基因以及无确定功能 (established function) 的基因。

[0108] 在一个方面，本发明排除使用 IFN-γ 处理时具有以下特点的黑色素瘤细胞：表现出 MHC II 类表达降低，在 MHC II 类的表达方面未表现出可检测到的变化，表现出 MHC II 类表达增加 10％或更少，表现出 MHC II 类表达增加 15％或更少，表现出 MHC II 类表达增加 20％或更少、25％或更少、30％或更少、40％或更少、50％或更少等等。在一个方面，百分数的值指的是存在于来自给定受试者或患者的活检或部分活检中的黑色素瘤细胞群落的平均表达值。

[0109] 用于筛选 IFN-γ 应答癌细胞的 IFN-γ 诱导基因的非限制性列表

[0110] ab000677, JAB/SOCS1；m63961, IFN-γ 诱导蛋白 (mag-1)；m35590, 巨噬细胞炎性蛋白 1-β；m19681, MCP-1(JE)；y07711, zyxin；M34815, IFN-γ 诱导的单核因子 (MIG)；m33266, 干扰素诱导蛋白 10(IP-10)；U44731, 嘌呤核苷酸结合蛋白；U88328, 细胞因子信号传导抑制因子 -3(Sup. of cytokine signalling-3, SOCS-3)；M21065, 干扰素调节因子 1；M63630, GTP 结合蛋白 (IRG-47)；U19119, G- 蛋白样 LRG-47；L27990, Ro 蛋白；M31419, 204 干扰素活化蛋白；af022371, 干扰素诱导蛋白 203；U28404, MIP-1α 受体；U43085, 糖皮质激素减弱反应基因 39(Glucocorticoid-attenuated response39)；x56123, Talin；m31419, 204 干扰素活化蛋白；U53219, GTPase IGTP；I38444, T 细胞特异蛋白；M31418, 202 干扰素活化蛋白；d38417, 芳香烃 (Arylhydrocarbon) 受体；m26071, 组织因子 (mtf)；D13759, Cot 原癌基因；M18194, 纤维连接蛋白；u59463, ICH-3；M13945, pim-1 原癌基因；L20450, DNA 结合蛋白 (参见 Gil 等 (2001)Proc. Natl. Acad. Sci98:6680-6685)。本发明包含 IFN-γ 诱导基因 CIITA(参见例如 Chan 等 (2010)J. Leukocyte Biol. 88:303-311；Kwon 等 (2007)Mol. Immunol. 44:2841-2849) 的用途。

[0111] 本发明包含对如下 IFN-γ 诱导基因中一种或多种的表达的测量，作为用于确认施用药物的患者的资格或选择施用药物的患者的筛选过程。这些基因包括：(基因 1) FCGR1A、(基因 2)IL6R、(基因 3)CXCL9、(基因 4)CLCSF14、(基因 5)UBD、(基因 6)C/EBPalpha 和 (基因 7)MHC2TA(CIITA)(参见 Waddell 等 (2010)PLoS ONE5:e9753)。还包括这些基因的特定簇在确认资格过程中的用途，例如基因 1 和 2、2 和 3、3 和 4、4 和 5、5 和 6、6 和 7、1 和 3、1 和 4、1 和 5、1 和 6、1 和 7、2 和 4、2 和 5、2 和 6、2 和 7、3 和 5、3 和 6、3 和 7、4 和 6、4 和 7、5 和 7 以及这些基因的组合，例如 1、2、3；或 3、4、5；或 4、5、6；或 5、6、7；或 1、3、4；或 1、3、5，或 1、3、6，或 1、3、7；或 1、2、4；或 1、2、5；或 1、2、6；或 1、2、7 等等。(这些基因编号是任意的。)

[0112] 干扰素 -γ 处理

[0113] 包含暴露于 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞的试剂和相关方法说明如下。本发明包含如下细胞，其中 IFN-γ 应答基因的诱导为至少 20％ (对照值的 1.2 倍)、至少 30％、至

少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 100％（对照值的 2.0 倍）、至少 2.5 倍、至少 3.0 倍、至少 4.0 倍等。

[0114] 本发明排除的是具有以下特征的黑色素瘤细胞群，其中在 IFN-γ 处理后，小于 90％是自噬性的、小于 80％是自噬性、小于 70％是自噬性、小于 60％是自噬性、小于 50％是自噬性、小于 40％是自噬性等等。

[0115] 本发明排除的是具有以下特征的黑色素瘤细胞群，其中在 IFN-γ 处理后，小于 90％是非凋亡性的、小于 80％是非凋亡性的、小于 70％是非凋亡性的、小于 60％是非凋亡性的、小于 50％是非凋亡性的、小于 40％是非凋亡性的等等。

[0116] 本发明排除的是具有以下特征的黑色素瘤细胞群，其中在 IFN-γ 处理后，小于 90％是非粘附性的、小于 80％是非粘附性的、小于 70％是非粘附性的、小于 60％是非粘附性的、小于 50％是非粘附性的、小于 40％是非粘附性的等等。

[0117] 测量 MHC II 类的表达

[0118] 使用对 MHC II 类基因产物特异的抗体或核酸探针，可以测量 MHC II 类的表达。这些 MHC II 类产物包括 HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、HLA-DRB1 以及 HLA-DM 和 HLA-DO（参见例如 Apostolopoulos. 等 (2008)Human Vaccines4:400-409）。

[0119] 例如，本发明包含试剂、治疗方法和诊断方法，其要求黑色素瘤细胞表达 STAT1 和 STAT2，从而具有活性 STAT1 信号传导通路、具有活性 STAT2 信号传导通路或者具有活性 STAT1 和 STAT2 信号传导通路。

[0120] 本发明提供药物组合物或药物试剂、相关施用方法以及治疗方法，其导致以下生存数据：危害比 (hazard ratio，HR) 小于 1.0、HR 小于 0.9、HR 小于 0.8、HR 小于 0.7、HR 小于 0.6、HR 小于 0.5、HR 小于 0.4、HR 小于 0.3 等。本发明结果可以为总生存数据、无进展生存数据、疾病进展时间数据等。本发明还提供至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％等的 6 月 PFS。此外，本发明提供至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％等的 6 月总生存率 / 期。此外，本发明提供至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％等的 1 年（或 2 年）PFS。此外，本发明提供至少 40％、至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％等的 1 年（或 2 年）总生存率（参见例如 U.S.Dept.of Health and Human Services.Food and Drug Administration.Guidance for Industry.Clinical trial endpoints for the approval of cancer drugs and biologies(April2005)）。

[0121] IFN-γ 的使用和自噬的诱导

[0122] 在 IFN-γ 处理后诱导自噬是一种确定对系统性 (systemic)IFN-γ 处理的应答的方法，如通过增加主要组织相容性 II 类复合体测定。如果在暴露于培养基中 IFN-γ 后，活检的黑色素瘤肿瘤细胞的可测量的群落发生自噬而不是细胞凋亡，则这表明这些患者将有利地对系统性 IFN-γ 处理应答。此外，如果从活检中确定了成功细胞系，患者也会从细胞治疗产品受益，该细胞治疗产品由来自自噬性但非凋亡性粘附 (adherent) 群落的经 IFN-γ 处理的纯化的肿瘤细胞系制得。

[0123] 本发明包含分离和表征从自噬性、非凋亡性细胞所分离的主要组织相容性复合体，上述细胞是从用干扰素 -γ 处理的肿瘤细胞系收集的。主要组织相容性复合体包含对

$CD4^+$T 细胞特异的抗原，并且已经与抗体介导的免疫应答相关。复合体代表不会存在于非自噬性细胞中的大型抗原库 (repertoire)，这是因为在自噬性细胞中诱导的溶酶体介导的抗原加工活动。

[0124] 由经 IFN-γ 处理的细胞系所产生的非凋亡性的、自噬性肿瘤细胞可以与树突细胞整合，以增强抗原呈递，这是因为在自噬性肿瘤细胞的表面上高水平的主要组织相容性复合体。该过程会得到由两种细胞类型融合而产生的新的细胞产物。

[0125] 对 IFN-γ 的应答时诱导自噬的过程可以以不导致细胞凋亡的方式诱导。通过用半胱天冬酶抑制剂和干扰素 -γ 合并处理肿瘤细胞，可以阻断细胞死亡（并最终阻断耐受性凋亡细胞的形成）的过程，而不抑制自噬的诱导或主要组织相容性 II 类复合体的增加。

[0126] 消除凋亡细胞同时保留有活力的自噬性细胞的程序

[0127] 黑色素瘤的研究表明在临床试验中凋亡细胞的存在与差生存率之间具有相关性 (Cornforth 等 (2011)Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131 ;Dillman 等 (2011)Cancer Biother. Radiopharmaceuticals26:407-415)。下面研究调查了在体外 IFN-γ 处理黑色素瘤肿瘤细胞后自噬的诱导、细胞凋亡和 MHC II 类分子。

[0128] 过滤

[0129] 下面提供“过滤”程序。本发明提供方法以及通过这些方法所产生的细胞，其用于增强非凋亡性细胞中黑色素瘤细胞群落。在体外 IFN-γ 处理之前，在任意给定的黑色素瘤细胞群落中，第一百分数细胞可以偏向于是凋亡性的，并且第二百分数细胞可以偏向于是非凋亡性的。在本发明上下文中，偏向指的是体外 IFN-γ 处理刺激第一百分数细胞（或第一子群落细胞）的细胞凋亡，但不刺激第二百分数细胞（或第二子群落细胞）的细胞凋亡。在多个实施方式中，可以使用体外 IFN-γ 处理来富集用于树突细胞疫苗中的黑色素瘤细胞的免疫学刺激群落，通过迫使偏向于凋亡性的黑色素瘤细胞经历细胞凋亡。一旦偏向于凋亡性的黑色素瘤细胞的子群落经历细胞凋亡，就可以将这些细胞去除并丢弃。

[0130] 本项研究的方法如下。在测定自噬、细胞凋亡和 MHC II 类表达之前，用 1000IU/mL 的 IFN-γ 培育自体黑色素瘤肿瘤细胞系和模型黑色素瘤肿瘤细胞系 72 小时。通过采用对 LC3II 的抗体的免疫印迹并通过采用 Enzo's CytoID® 自噬检测试剂盒的流式细胞法，来检测自噬。通过使用 7-AAD 和 Annexin-V 染色和对 MHC II 类的抗体的流式细胞法，分别测定细胞凋亡和 MHC II 类诱导。

[0131] 本研究的结果证明 IFN-γ 既诱导黑色素瘤细胞系中自噬性细胞群落又诱导凋亡性的细胞群落。凋亡性的群落主要发现于非粘附群落中，而自噬性细胞保持粘附到烧瓶上。用抑制剂 3- 甲基腺嘌呤 (3-MA) 阻断自噬会抑制对 IFN-γ 应答时 MHC II 类阳性细胞的诱导 (39.4% IFN-γ vs. 10.0% IFN-γ +3-MA)。用泛半胱天冬酶抑制剂 Z-VAD 抑制半胱天冬酶活性来在经 IFN-γ 处理的细胞中防止细胞凋亡但不干扰自噬 (2.75±0.15IFN-γ vs. 3.04±0.27IFN-γ +Z-VAD，倍数变化）。综上所述，细胞凋亡的诱导与低水平的自噬和 MHC II 类诱导有关。本发明提供消除凋亡性的细胞同时保护有活力的自噬性细胞的方法或程序以及 IFN-γ 处理能够增强这类基于细胞的免疫治疗的有效性。

[0132] 第一研究的材料和方法

[0133] 自体树突细胞生成

[0134] 通过如前所述的塑料粘附法 (Choi 等 (1998)Clin. Cancer Res. 4:2709-2716 ;

Luft 等 (1998)Exp.Hematol.26:489-500)，生成树突细胞。简言之，将自体采血术产物进行 ficoll-hypaque(GE Healthcare,Buckinghamshire,United Kingdom) 密度梯度分离。将所得到的外周血单核细胞置于无抗生素的 AIM-V 培养基中 (Invitrogen,Grand Island,NY)，上述培养基补充有在以 15×10^6cells/mL 的细胞培养瓶 (Corning-Costar,Corning,NY) 中各 1000IU/mL 的 IL-4(CellGenix,Freisberg,Germany) 和 GM-CSF(Beriex,Seattle,WA)(DC 培养基)。培育一小时后，丢弃未粘附群落，并将新鲜 DC 培养基加入到烧瓶中。第二天早晨，丢弃未粘附细胞，用室温 PBS 将烧瓶洗涤一次，并加入新鲜 DC 培养基。然后将烧瓶培养 6 天，在这段时间进行流式细胞评估来测定该方法 (负载 DC 之前) 所产生的 DC 的百分数和表型。

[0135] 自体肿瘤细胞系生成

[0136] 将先前报道的生成和表征的纯肿瘤细胞扩展到 2 亿个细胞，然后在 15％ FBS/ECS 中在 RPMI(完全培养基) 中用 1000IU/mL 的 IFN-γ (InterMune,Brisbane,CA) 培育 72 小时，用来自铯源的 100Gy 辐照并冻存 (Choi(1998)Clin.Cancer Res.4:2709-2716 ; Luft(1998)Exp.Hematol.26:489-500 ;Dillman(1993)J.Immunother.Emphasis Tumor Immunol.14:65-69)，如前所述。从冻存中恢复经 IFN-γ 处理且辐照的肿瘤细胞，用 PBS 洗涤 3 次，然后加入体外培养的 DC，并培育约 24 小时。通过用橡皮淀帚轻轻刮取来收获负载了抗原的 DC，并以相等的量在 9-11 个等份中冻存。获得细胞的等分部分，用于流式细胞评价，其代表负载后的 DC 细胞。

[0137] 流式细胞法

[0138] 使用对从 BD Pharmingen San Diego,CA 获得的表面标志物的单克隆抗体 : 结合 PerCp 的 MHC II 类抗体、结合 APC 的 CD11c 抗体，CD80 抗体、CD83 抗体、结合 PE 的 CD86 抗体，进行树突细胞群落的表型表征。使用同型对照来测定百分阳性细胞。使用来自 BD Pharmingen 的对结合 FITC 的 MHC I 和 II 类的抗体、Annexin-V-PE 和 7- 氨基放线菌素 D(7-AAD)，进行肿瘤细胞的流式细胞法。在每个批次之前，使用 CaliBRITE 流式细胞校准 (BD Pharmingen)，并且在流式细胞数据的整个收集过程中使用相同的仪器设定。

[0139] 免疫印迹测定

[0140] 用 Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo Scientific,Rockford,IL) 加蛋白酶抑制剂混合物 (Roche,Indianapolis,IN) 以 10,000 细胞 /uL 在冰上，制备细胞质的细胞裂解物。将大约 25uLs/ 道的细胞裂解物在 12.5％ Tris- 甘氨酸凝胶上分离，转移到 PVDF 膜，并用针对如下的抗体进行探测 : 钙网蛋白 (MBL,Woburn,MA)、Hsp-60、Hsp-70、Hsp-90(R&D Systems,Minneapolis,MN)、HMBG-1(Cell Signaling,Danvers,MA)、ICAM-1(Santa Cruz Biotech,Santa Cruz,CA)、Mel-4、Mart-1(Signet,Emeryville,CA)、酪氨酸酶 (Upstate,Lake Placid,NY) 和 GADPH(Calbiochem,Darmstadt,Germany)。

[0141] 免疫组织化学

[0142] 使用免疫细胞化学程序，测定黑色素瘤系对一组 (panel) 抗原的表达。在存在或不存在 1000IU/mL IFN-γ 的情况下，在 8 室培养载玻片 (Thermo Fisher,Rochester,NY) 中培养细胞。72 小时后，用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 3 次，并固定在冷丙酮中。阻断内源性过氧化物酶后，用适当的对所列抗原的一抗 (primary antibodies) 培育细胞。使用生物素化抗鼠 (anitmouse) 或兔免疫球蛋白、结合超敏感酶的链霉亲和素标记 (Super Sensitive

enzyme-conjugated streptavidin labeling)和辣根过氧化物酶色原体(chromogen)以及底物试剂盒(Biogenex,San Ramon,CA),进行免疫组织化学。采用同型匹配对照抗体,研究如下抗人多克隆或单克隆抗体的活性:S-100和HMB-45(Biogenex,San Ramon,CA)、Mel-2、Mel-5、art-1(Signet,Dedham,MA)、酪氨酸酶和Mage-1(Thermo Scientific,Fremont,CA)、Melan-A、HLA-I类和HLA-II类(Dako,Denmark)。

[0143] 统计分析

[0144] 在双尾检验的学生t检验中,两样本的方差相等。通过p值≤0.05确定显著差异。

[0145] 第一研究的结果

[0146] 在完全培养基中,对用IFN-γ培育72小时应答时,在自体黑色素瘤肿瘤细胞系中差异地引起细胞死亡。在经IFN-γ处理的细胞上或者未经IFN-γ处理的细胞上,进行台盼蓝拒染料测定,其表明在经IFN-γ处理的细胞中向更低活力的显著趋势(89.1±6.8% vs.84.9±9.3%,p=0.014,N=47)。通过流式细胞法分析四个自体黑色素瘤细胞系的样本的细胞凋亡诱导(图1A),其表明黑色素瘤细胞对IFN-γ诱导的细胞凋亡差异地敏感,其中一些细胞显示更迟的细胞凋亡或"死亡"群落(7-AAD+/Annexin-V+),而其他细胞显示出更早的细胞凋亡或"即将死亡"群落(7-AAD-/Annexin-V+)的信号。IFN-γ处理后所得到的凋亡性细胞的存在与无进展生存期和总生存期中显著降低有关(Comforth(2010)Cancer Immunol.Immunother.Resistance to the proapoptotic effects of interferon-gamma on melanoma cells used in patient-specific dendritic cell immunotherapy is associated with improved overall survival)。对数秩检验(log-rank test)表明IFN-γ处理黑色素瘤肿瘤细胞后较低的活力与所研究患者中总生存期明显相关。

[0147] 将在存在或不存在IFN-γ的情况下发育的细胞裂解物进行各种分子的免疫印迹,这些分子可能是免疫的重要介导物(图1B)。在用IFN-γ处理的黑色素瘤细胞的设定中,热休克蛋白似乎被差异性地调控,但基本上仍存在于细胞制剂中,尤其是在hsp-70的情况下。内质网蛋白、钙网蛋白和高迁移率族蛋白1(HMGB-1)似乎在某些情况下IFN-γ处理后被正调节(图1B)。相反,普通黑色素瘤抗原(mel-4、Mart-1和酪氨酸酶)通常似乎被IFN-γ负调节,而ICAM-1被显著正调节(图1C),ICAM-1是一种与对淋巴细胞介导的细胞毒性的敏感度有关的淋巴细胞黏附分子(Hamai(2008)Cancer Res.68:9854-9864)。事实上发现,经IFN-γ处理的黑色素瘤肿瘤细胞对细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性更敏感。此外,一组黑色素瘤相关抗原的免疫组织化学表明,IFN-γ导致在许多考查的抗原中抗原表达的负调节(表1)。

[0148] IFN-γ的使用导致主要组织相容性复合体I类和II类的正调节(Bohn(1998)J.Immunol.161:897-908)。如图1D中所示,用IFN-γ处理自体黑色素瘤细胞导致几乎普遍的且显著的MHC I类正调节($p=2.8\times10^{-8}$),中值倍数诱导(median fold induction)为2.91±1.13(95% C.I.)。此外,MHC II类的平均荧光强度也显著较高,但稍逊色($p=0.039$),中值诱导为4.23±2.66(95% C.I.)。在自体黑色素瘤细胞表面上MHC II类分子的水平通常低于MHC I类分子,但在70%的情况下,对IFN-γ处理应答时对于MHC II类分子来说诱导高2倍,这是因为MHC II类表达的低初始水平。在抗原负载到树突细胞上时,肿瘤细胞上这些分子的存在可以提供将MHC复合体"易装"("cross dressing")到抗原呈递细胞上的机会(Dolan(2006)J.Immunol.277:6018-6024,Dolan(2006)

J. Immunol. 176:1447-1455)。

[0149] 用 IFN-γ 培育一组四个代表性自体黑色素瘤细胞系，并等量负载到树突细胞上，然后通过流式细胞法测定 CD80、CD83、CD86 和 MHC II 类的表达。结果表明，在负载经 IFN-γ 处理的黑色素瘤细胞后，观察到表达 CD83 的树突细胞的阳性群落百分数的小幅但明显增加（图 2)。此外，在 CD86 散点图（左上象限）中标出更多的未经处理的肿瘤细胞，结果是 CD86 阳性群落百分数明显减少，表明未经 IFN-γ 处理的肿瘤细胞仍然存在。此效果最可能地是由于 IFN-γ 诱导细胞凋亡，因为凋亡性细胞更可能被之前报告的树突细胞吞噬。

[0150] 如图 3 中所示，负载前 DC 的样本表明其表达 CD80(39.0±16.2％)、CD83(7.1±6.9％)、CD86(73.6±19.5％）并且是 MHC II 类阳性的，并且具有 96.2±5.0％活力。负载的 DC 具有显著更高百分数的 CD83(9.4±7.1％，p ＝ 0.019) 和显著更高的平均荧光强度 (172.9±79.0, p ＝ 0.0009)，表明用经辐照的、IFN-γ 处理的肿瘤细胞负载 DC 在一些树突细胞中诱导成熟（图 3B)。

[0151] 第一研究讨论

[0152] 在抗肿瘤免疫的上下文中，抗原负载、成熟和施用的方案以及在基于树突细胞 (DC) 的免疫治疗的指导是本领域技术人员已知的。这种类型的治疗包含经纯化的自体肿瘤细胞作用抗原的来源的用途，并且包含与肿瘤相关抗原的患者特异库 (repertoire)(Selvan(2010)Melanoma Res. 20:280-292 ;Dillman(2007)Cancer Biother. Radiopharm. 22:309-321)。一些临床试验使用未纯化的自体实体 (bulk) 肿瘤。这种抗原来源可能具有已污染的成纤维细胞和坏死组织 (O'Rourke(2007) Melanoma Res. 17:316-322)。与肿瘤干细胞有关的抗原可以存在于经纯化的细胞系中 (Dillman(2006)New Engl. J. Med. 355:1179-1181)。IFN-γ 处理提高 MHC II 类分子的表达。MHC II 类分子对于对基于树突细胞的治疗的应答非常重要。存在于吞噬物质中的分子（诸如钙网蛋白、HMGB-1 和热休克蛋白）可对成熟信号有贡献，该贡献可以是除细胞因子混合物贡献之外的贡献。本发明中 DCs 的制备表现出成熟的趋势，其可与晚期凋亡性细胞的吞噬有关 (Ip(2004) J. Immunol. 173:189-196)。已经知晓凋亡性细胞的使用与树突细胞的生成有关，与负载肿瘤细胞裂解物或负载坏死细胞的树突细胞相比，该树突细胞在刺激淋巴细胞 IFN-γ 分泌方面更有效，表明负载了凋亡性细胞的树突细胞在体内更有效。对 IFN-γ 的促凋亡 (proapoptotic) 作用的耐性与更好的临床结果有关 (Cornforth(2010) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131)。成熟 DC 分泌的白细胞介素 -12(IL-12) 可以导致细胞毒性淋巴细胞 (CTL ;$CD8^+$T 细胞）稳健的活性。活体外成熟是否导致持久的肿瘤免疫的问题已经得到解决。也已经表明，通过未成熟 DC 诱导调节性 T 细胞的风险（抑制抗原特异性 CTLs) 发生在使用细胞因子成熟的 DC 时。本文调查导致成熟的信号传导活动的顺序的重新评估，以改善 DC 成熟方案。因此，在本研究中在不需要体外细胞因子成熟的情况下经辐照的肿瘤细胞作为抗原来源的用途可能是 DC 免疫治疗的更优选的方法，因为本文中的证据表明 DC 已经开始成熟过程。注射后，这些“正在成熟”("maturing") 的 DCs 可以通过分泌趋化因子，来完成成熟过程，该趋化因子会吸引表达许可 (licensing)、抗原特异性 CD40L 的 $CD4^+$T 细胞。已经证明，诸如树突细胞在对佐剂 GM-CSF 应答时所产生的 CCL17/TARC 的血清趋化因子与更好的无进展生存率有关。在某些情况下，树突细胞活化淋巴细胞可能需要诸如 CD80 和 CD86 的辅助刺激分子的表达。作为成熟的标志物，CD83 表达在成熟

树突细胞上，并且可对应于能够诱导更有效免疫应答的树突细胞 (Prazma(2008)Immunol. Lett.115:1-8)。这表示在药物组合物中所有细胞中的一部分。在任何药物团中，成熟 DCs 单独的数目可以与更好的患者应答有关或者可以与更好的患者应答无关。

[0153] 第一研究的表

[0154] 表 1：使用患者特异性细胞基于树突细胞的治疗中黑色素瘤细胞系中对干扰素 -γ 应答时与普通肿瘤相关的抗原表达水平的变化。

[0155]

表 1				
抗原	无基础表达	基础表达	IFN-γ 处理后的变化	
			无	下调节（负调节）
S-100	74.1%	25.9%	42.9%	57.1%
HMB-45	18.5	81.5	54.5	45/5
Mel-2	3.7	96.3	46.2	53.8
Melan-A	11.1	88.9	29.2	70.8
Mel-5	18.5	81.5	72.7	27.3
MAGE-1	51.9	48.1	38.5	61.5
MART-1	11.1	88.9	14.8	85.2
酪胺酸酶	25.9	74.1	40.0	60.0

[0156] N = 27 个样本。

[0157] 第二研究的材料和方法

[0158] 黑色素瘤细胞系

[0159] 商业可购买的黑色素瘤细胞系 A375、SK-Mel-5 和 SK-Mel-28 从 American Type Culture Collection（产品目录编号：CRL-169,HTB-70,and HTB-72）购得。将 A375、SK-Mel-5 和 SK-Mel-285％保持在 RPMI-1640 中的 5％胎牛血清中 (Invitrogen,catalogue number11875-085)。泛蛋白酶抑制剂 z-VAD-fmk 及其对照化合物 z-FA-fmk 从 BD Pharmingen（目录号：550377 和 550411）见得。按照每个制造商的说明书 (InvivoGen, 目录号 psetz-gfplc3 和 lyec-12) 进行 GFP-LC3 的转染，并且在 Olympus BX-51 显微镜上使用 DP72 数码相机拍摄显微图像。在测定之前，用 1000U/mL 的 IFN-γ (InterMune,Cat#) 培育肿瘤细胞系 72 小时。如 (Hamai(2008)Cancer Res.68:9854-9864；Tyring(1984)J.Natl. Cancer Inst.73:1067-1073) 所述，通过外科肿瘤样本的酶消化，在补充了胎牛血清且富含小牛血清 (Omega Scientific,San Diego,CA) 加 1mM 丙酮酸钠、1mM 的谷氨酰胺和 HEPES 缓冲液的 RPMI-1640 组织培养介质中培养，来生成患者特异性细胞系。在 Olympus CK-2 显微镜上用 Nikon DS-L1 数码显微相机拍摄相衬 (phase contrast) 显微图像。

[0160] 自体树突细胞生成

[0161] 通过 ficoled apheresis products 的塑料粘附法 (Selvan(2007)Int. J.Cancer.122:1374-1383；Cornforth(2010)Cancer Immunol.60:123-131)，在补充有各 1000IU/mL 的 IL-4(CellGenix,Cat#) 和 GM-CSF(Bertex,Seattle,WA) 的不含抗生素的 AIM-V 培养基 (Invitrogen,Grand Island,NY) 中，生成树突细胞。然后在用经 IFN-γ 处理的、辐照的自体肿瘤细胞负载之前，将烧瓶培养 6 天。

[0162] 流式细胞法

[0163] 通过使用对 MHC II 类的抗体、Annexin-V-PE 和 7- 氨基放线菌素 D(7-AAD)，来对 IFN-γ 应答时肿瘤细胞死亡和主要组织相容性 II 类的表达变化进行分析，并在 Beckton-Dickenson FACS Calibur® 流式细胞仪上采集。

[0164] Western 印迹测定

[0165] 将黑色素瘤肿瘤细胞裂解物分解在 10-12.5％ SDS-PAGE 上，转移到硝酸纤维素，用一抗探测过夜，用二抗结合且用 Novex AP 显色底物 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 显色以产生带 (bands)。分别以制造商推荐的稀释比例 1:100 和 1:10000，使用 LC3-B 抗体 (Cell Signaling Technologies, Boston, MA) 和 GADPH(EMD biosciences, Germany) 的抗体。

[0166] 第二研究的说明

[0167] 调查的是在体外 IFN-γ 处理黑色素瘤肿瘤细胞后自噬的诱导、细胞凋亡和 MHC II 类分子。在测定自噬、细胞凋亡和 MHC II 类表达之前，使用 1000IU/mL 的 IFN-γ 培育自体和模型黑色素瘤肿瘤细胞系 72 小时。通过采用对 LC3II 的抗体的免疫印迹并通过采用 Enzo 的 CytolD 自噬检测试剂盒的流式细胞法，来检测自噬。通过使用 7-AAD 和 Annexin-V 染色和对 MHC II 类的抗体的流式细胞法，分别测定细胞凋亡和 MHC II 类诱导。

[0168] 第二研究的结果

[0169] 结果表明，IFN-γ 既诱导黑色素瘤细胞系中自噬性细胞群落又诱导凋亡性的细胞群落。凋亡性的群落主要发现于非粘附群落中，而自噬性细胞保持粘附到烧瓶上。用抑制剂 3- 甲基腺嘌呤 (3-MA) 阻断自噬会抑制对 IFN-γ 应答时 MHC II 类阳性细胞的诱导 (39.4％ IFN-γ vs. 10.0％ IFN-γ +3-MA)。用泛半胱天冬酶抑制剂 Z-VAD 抑制半胱天冬酶活性来在经 IFN-γ 处理的细胞中防止细胞凋亡但不干扰自噬 (2.75±0.15IFN-γ vs. 3.04±0.27IFN-γ +Z-VAD，倍数变化)。细胞凋亡的诱导与低水平的自噬和 MHC II 类表达有关。接受负载了自体肿瘤细胞的树突细胞的患者具有改善的无进展生存期和总生存期 (分别 p0.003 和 p0.002)，该树突细胞是从经干扰素 -γ 处理纯化的肿瘤细胞系获得的非凋亡性的自噬性的细胞。在干扰素 -γ 处理后消除凋亡性的细胞同时保护有活力的自噬性细胞的程序，可以增强这类基于细胞的免疫治疗的有效性。

[0170] 研究的汇总分析

[0171] 自体、增殖、自我更新肿瘤细胞 (假定肿瘤干细胞和 / 或早期祖细胞) 对于转移性癌症的新库 (depots) 的建立是非常重要的，并且可以是用于疫苗的抗原的优良来源。这些研究涉及采用来自这些细胞的抗原免疫对生存的影响。

[0172] 方法

[0173] 从三个连续第二阶段试验汇集数据，所有试验包括患有记录的转移性黑色素瘤的患者，以使用用来自自体肿瘤细胞的细胞培养基的抗原的方案治疗患者。每周给予皮下 (S.C.) 注射三周时间，然后每月注射 5 个月的时间 ：用经辐照的肿瘤细胞 (TC) 注射 74 个患者 ；用已经使用经辐照的自体肿瘤细胞 (NCI-V01-1646) 共同培养过的自体树突细胞 (DC) 注射 54 个患者 ；在随机的 II 期试验中，用 TC 注射 24 个患者，并用 DC 注射 18 个患者 (NCT00436930)。

[0174] 结果

[0175] 表 2 总结了每个试验中的总生存期 / 率 (OS)。在汇总分析中，有 98 个 TC 和 72 个 DC 患者。在年龄 (51,52)、男性性别比例 (62％ ,62％)、治疗时无患病证据的比例

(46%,47%)和治疗时存在M1c内脏疾病比例(13%,14%)的方面,特征类似。在用DC治疗的患者中,OS更长(中值63.1vs20.2个月,5-年OS51% vs26%,p = 0.0002Mantle-Cox对数秩检验)。随机试验中OS的差异也很显著(p = 0.007)。

[0176] 用来自自体增殖、自我更新肿瘤细胞的抗原初免的患者特异DC疫苗与鼓励长期生存率相关,并且优于已诊断为转移性黑色素瘤的患者中的患者特异TC疫苗。

[0177]

表2					
疫苗	#患者	#死亡	中值OS	2年OS	5年OS
TC	74	60	20.3mos	45%	28%
DC	54	31	58.4mos	72%	50%
TC	24	16	15.9mos	31%	---
DC	18	5	未达到	72%	---

[0178] 来自三个患者特异性疫苗的试验的生存曲线示于图13中。使用自体肿瘤细胞,与自体树突细胞(DC)结合或不与其结合,进行连续I期和II期临床试验。皮下注射每周一次、注射三(3)周,每月一次、注射五(5)个月:用经辐照但未经IFN-γ预处理的肿瘤细胞注射74位患者,用已与经辐照的、经干扰素-γ预处理的自体肿瘤细胞(TC)共同培养的自体树突细胞注射54位患者。在随机的II期试验中,用未经IFN-γ预处理的肿瘤细胞(TC)注射24位患者,并用树突细胞(DC)加未经IFN-γ预处理的肿瘤细胞(TC)注射18名患者。

[0179] IFN-γ处理的表征

[0180] IFN-γ处理迫使偏向细胞凋亡的黑色素瘤细胞实际地进入细胞凋亡,并因此可以通过吸附/浮动技术去除。甚至在选择采用吸附/浮动技术之前,IFN-γ处理就已经导致更大量的自噬性、非凋亡性的细胞。如选择采用吸附/浮动技术后测得的,IFN-γ处理就已经导致更大量的自噬性、非凋亡性的细胞。IFN-γ处理就已经导致更大量的自噬性、非凋亡性的细胞,其中提高自噬导致更大的抗原呈递细胞的交叉启动(cross-priming)。

[0181] 因此,尽管前面已经示出并描述和指出了应用于示例性实施方式和/或其各个方面的本发明的基本特征,但应当理解的是,在不偏离本发明和/或权利要求书的精神的情况下,本领域技术人员可以在细节和形式方面对示例性实施方式、本发明及其各个方面做出各种省略、重置和替换和改变。例如,本发明明确指出,以基本相同的方式进行、实现基本相同的功能、得到基本相同的结果的那些元素和/或方法步骤的所有组合都在本发明的范围内。此外,应当认识到,结合本发明的任何公开的形式或实施方式而示出和/或描述的各种结构和/或元素和/或方法步骤可以作为设计选择的一般主题而包括在任何其他公开或描述或暗示形式或实施方式中。因此,其并不意图限制本发明的保护范围。所有这种修改应当在本申请所附权利要求的保护范围内。

[0182] 本说明书中所引用的所有出版物、专利、专利申请、文献和序列表通过此引用并入本文,如同在本文中完整陈述一样。

[0183] 提供摘要是为了符合 37CFR § 1.72(b) 的规定，使读者能够快速地了解本文公开技术的本质和要点。应该理解所提交的摘要并不能用于限制权利要求的范围。

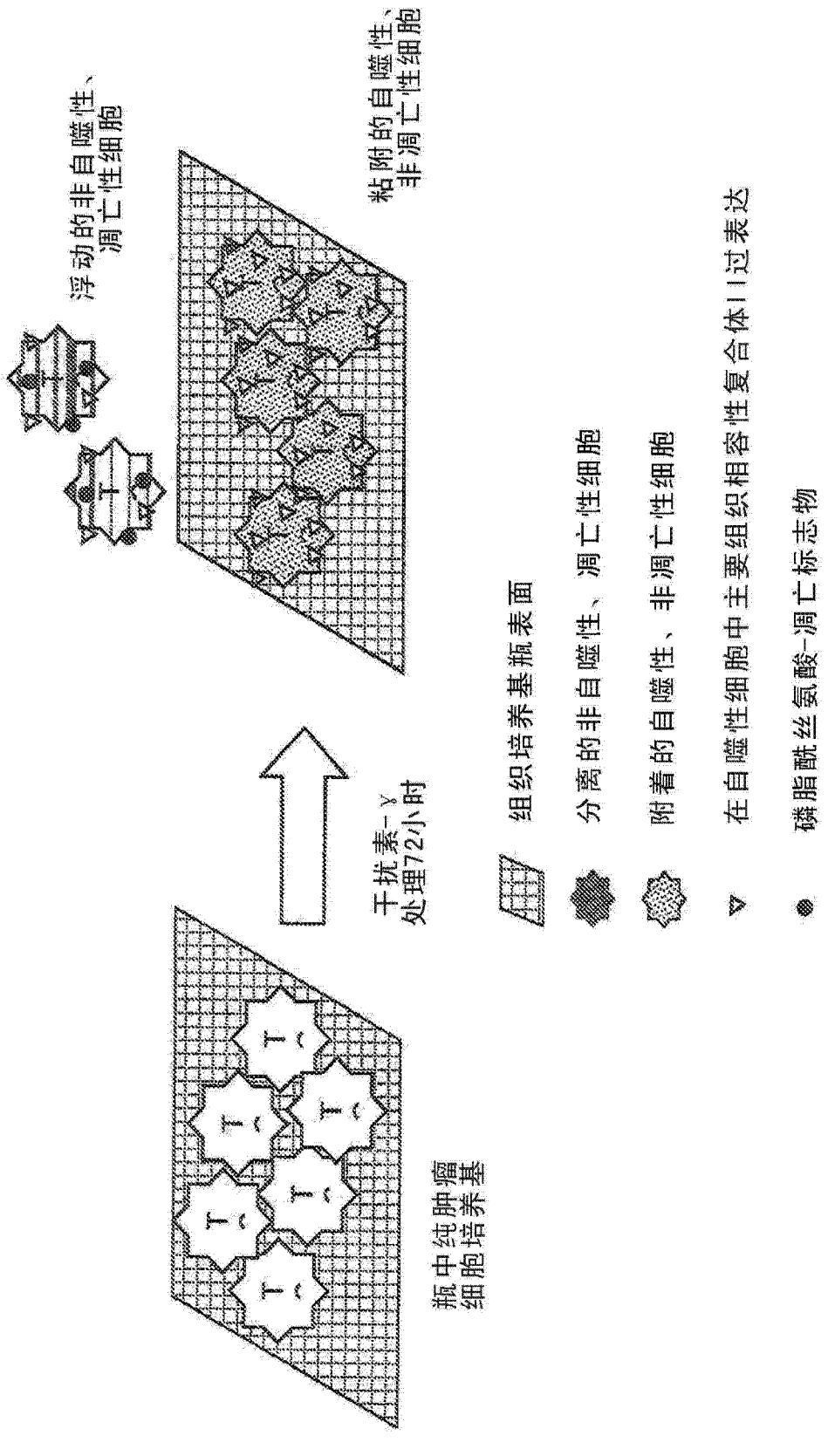

瓶中纯肿瘤
细胞培养基
干扰素-γ
处理72小时
浮动的非自噬性、
凋亡性细胞
粘附的自噬性、
非凋亡性细胞
组织培养基瓶表面
分离的非自噬性、凋亡性细胞
附着的自噬性、非凋亡性细胞
在自噬性细胞中主要组织相容性复合体II过表达
磷脂酰丝氨酸-凋亡标志物

图 1

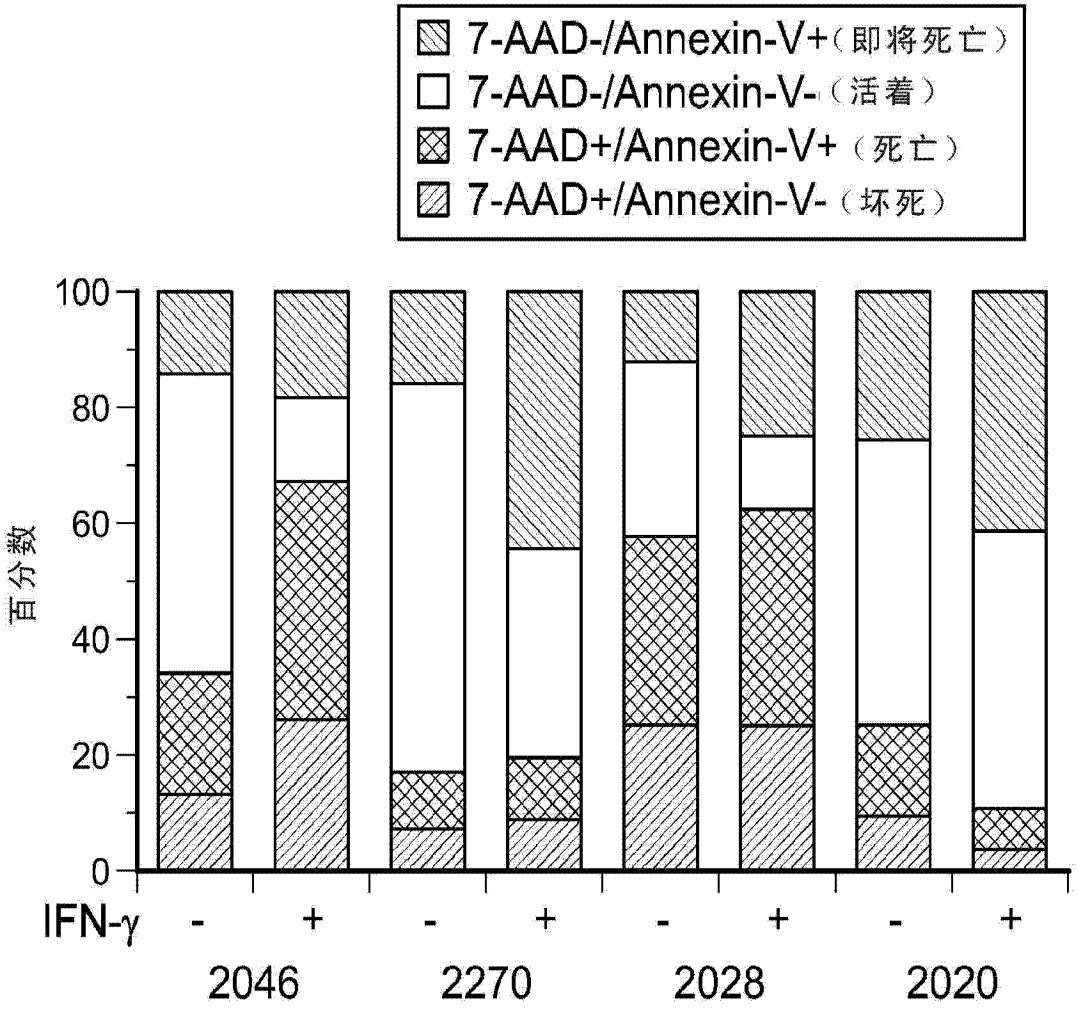

7-AAD-/Annexin-V+（即将死亡）
7-AAD-/Annexin-V-（活着）
7-AAD+/Annexin-V+（死亡）
7-AAD+/Annexin-V-（坏死）
百分数
100
80
60
40
20
0
IFN-γ - + - + - + - +
2046
2270
2028
2020

图 2A

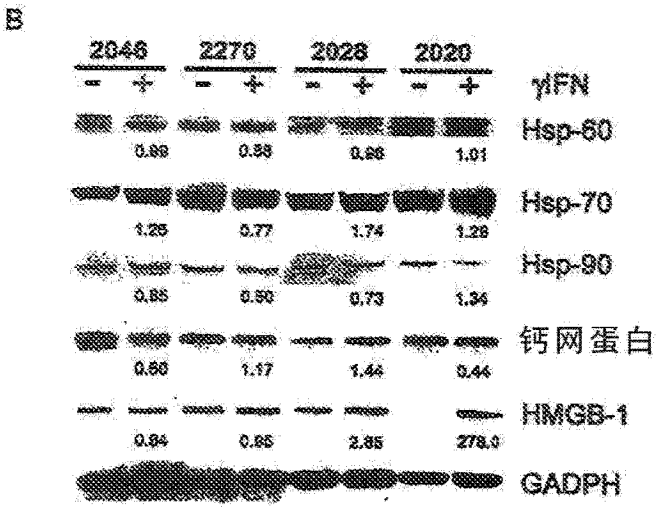

B
2046
2270
2028
2020
γIFN
Hsp-60
0.89 0.58 0.86 1.01
Hsp-70
1.25 0.77 1.74 1.28
Hsp-90
0.85 0.50 0.73 1.34
钙网蛋白
0.58 1.17 1.44 0.44
HMGB-1
0.94 0.85 2.85 278.0
GADPH

图 2B

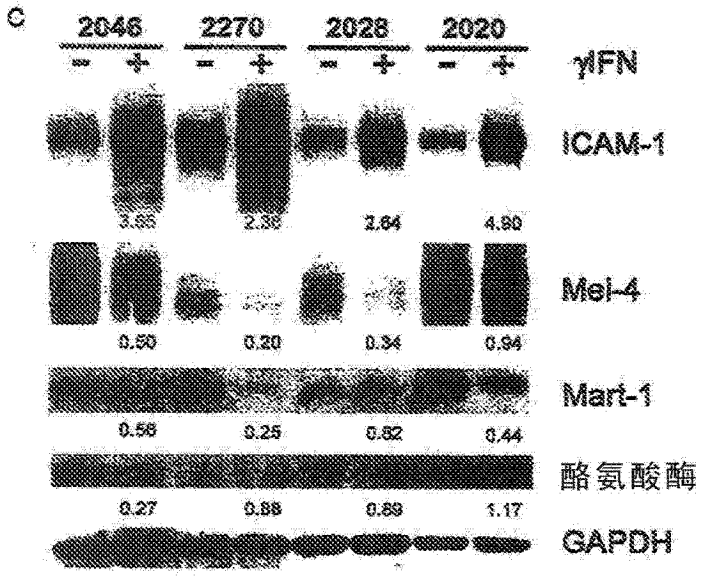

C
2046
2270
2028
2020
- + - + - + - +
γIFN
ICAM-1
3.65
2.32
2.64
4.80
Mel-4
0.50
0.20
0.34
0.94
Mart-1
0.56
0.25
0.82
0.44
酪氨酸酶
0.27
0.88
0.69
1.17
GAPDH

图 2C

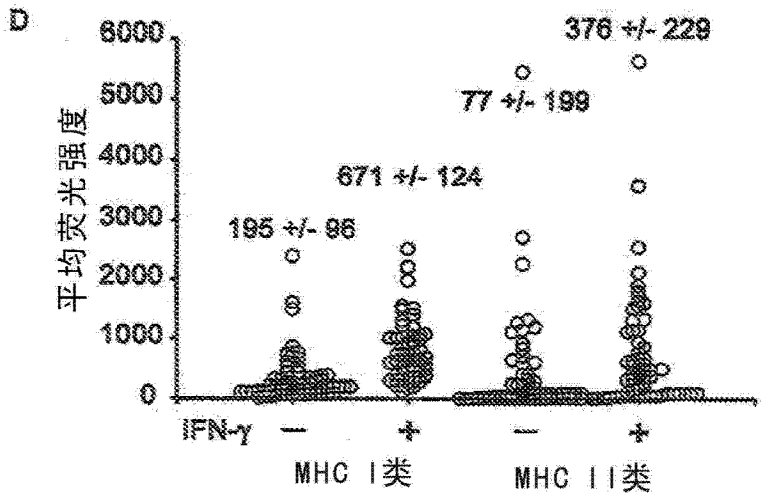

D
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
平均荧光强度
376 +/- 229
77 +/- 199
671 +/- 124
195 +/- 96
IFN-γ - + - +
MHC I类
MHC II类

图 2D

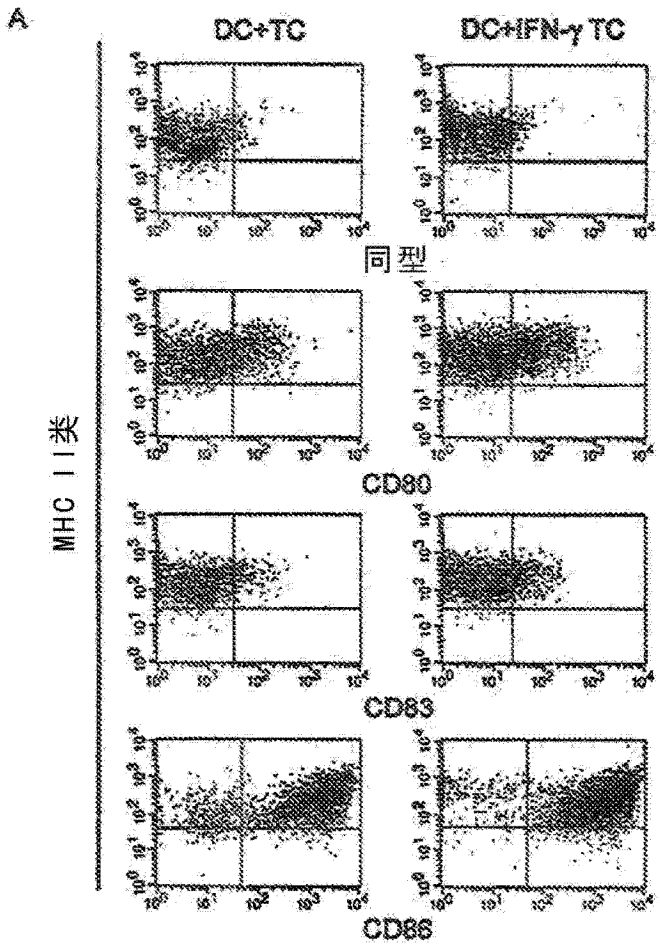


图 3A

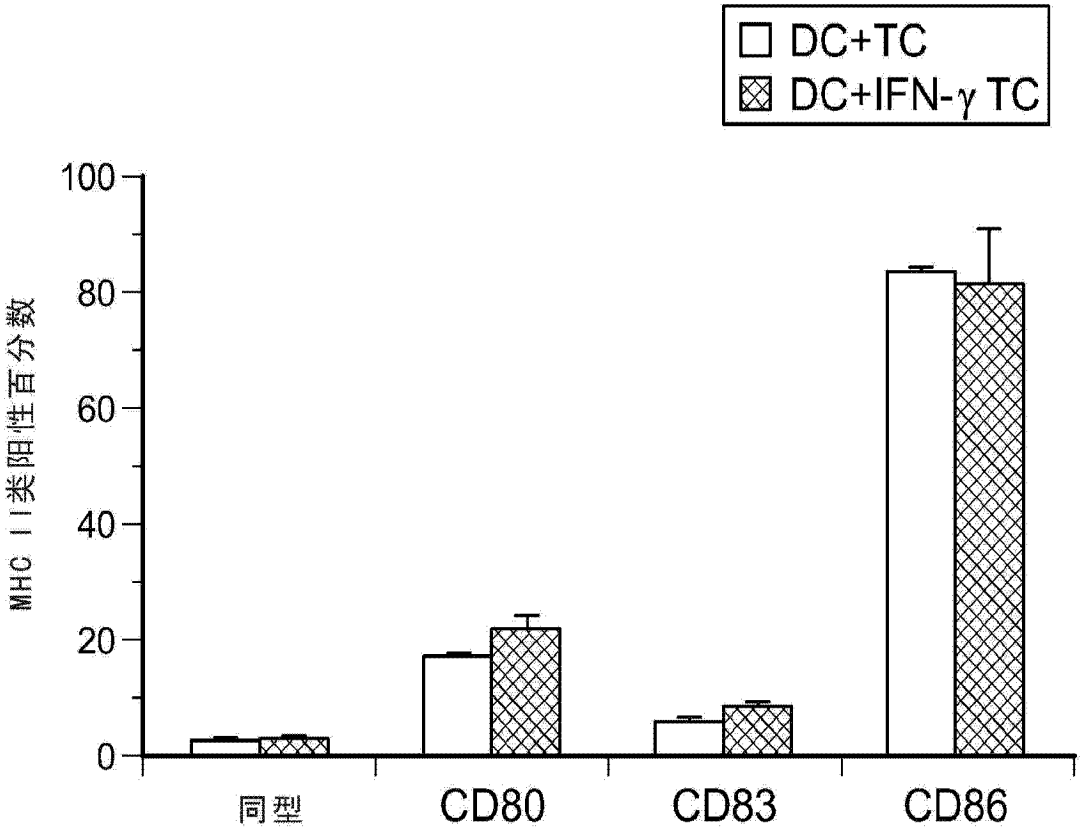

DC+TC
DC+IFN-γ TC
MHC II类阳性百分数
100
80
60
40
20
0
同型
CD80
CD83
CD86

图 3B

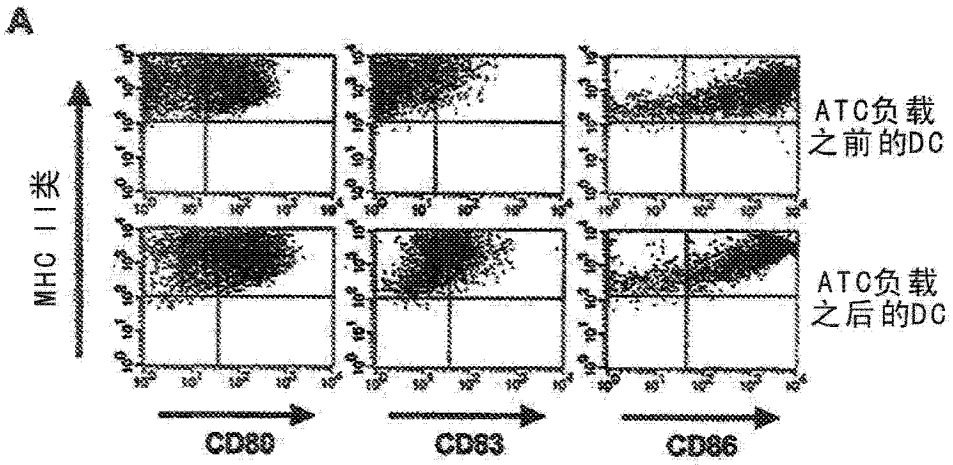

A
MHC II类
ATC负载之前的DC
ATC负载之后的DC
CD80
CD83
CD86

图 4A

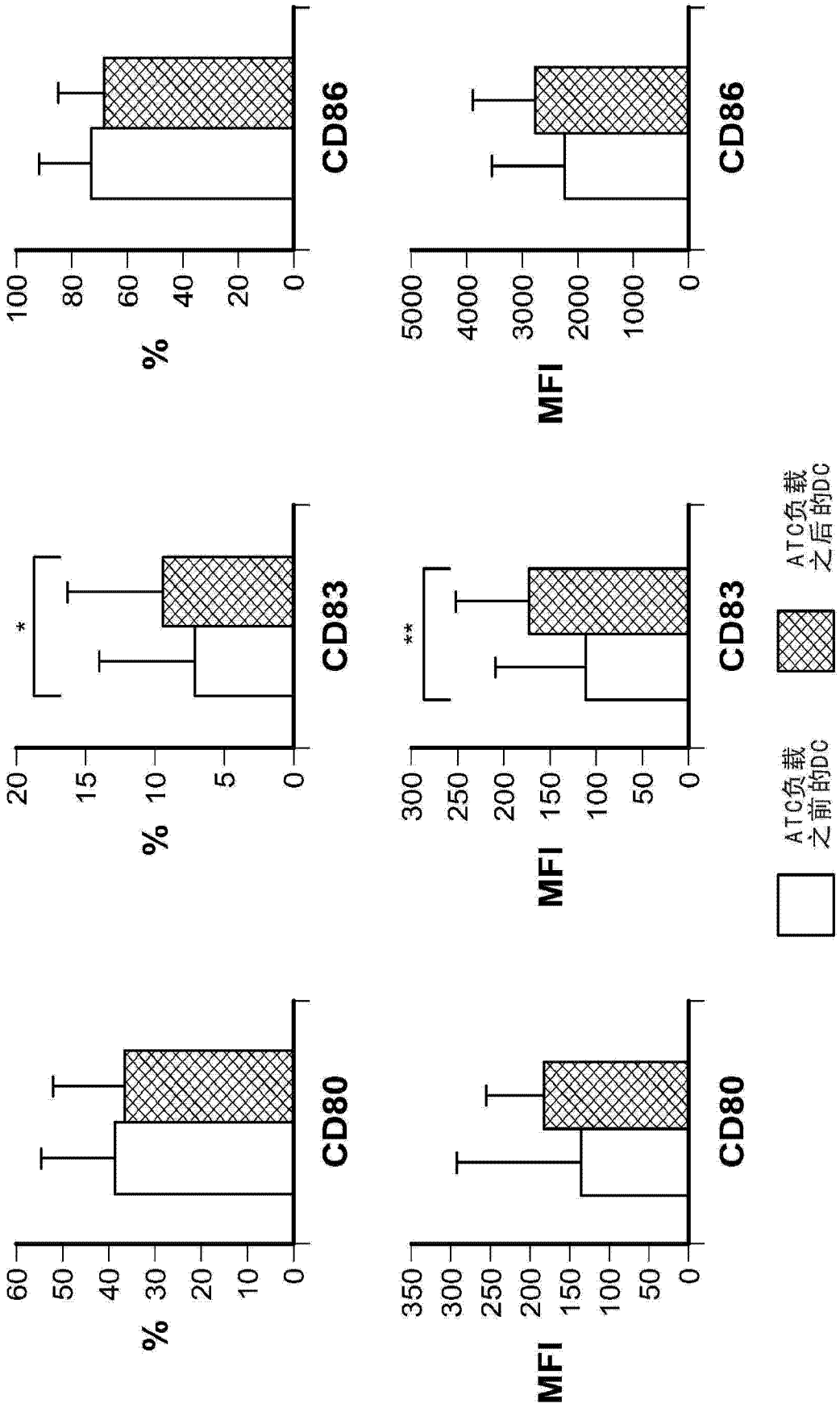

CD86
%
100
80
60
40
20
0
CD86
MFI
5000
4000
3000
2000
1000
0
CD83
%
*
20
15
10
5
0
CD83
MFI
**
300
250
200
150
100
50
0
ATC负载之后的DC
ATC负载之前的DC
CD80
%
60
50
40
30
20
10
0
CD80
MFI
350
300
250
200
150
100
50
0

图 4B

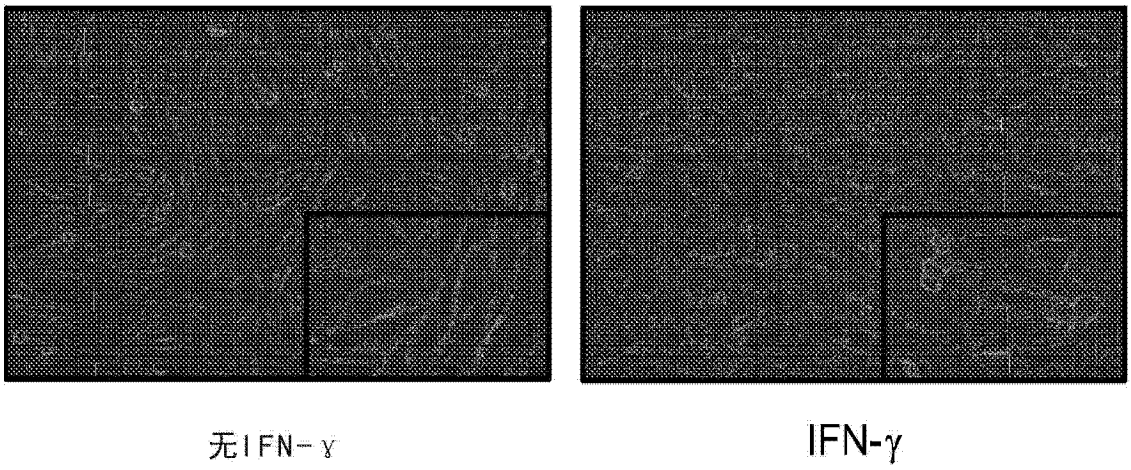


图 5A

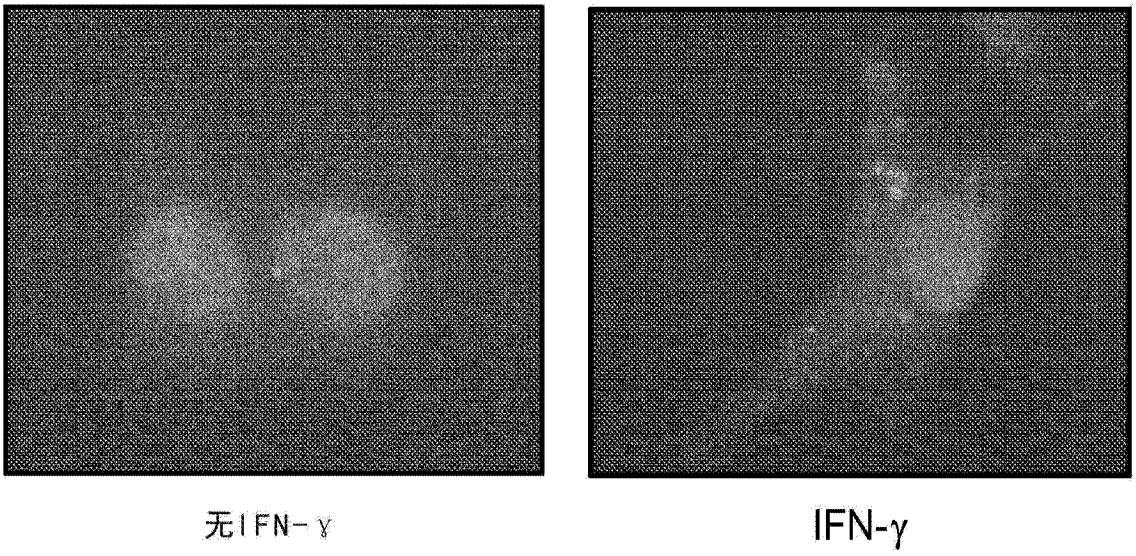


图 5B

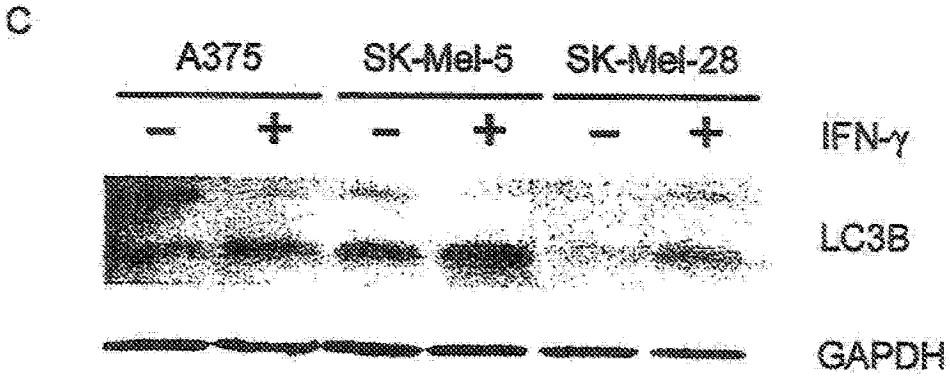


图 5C

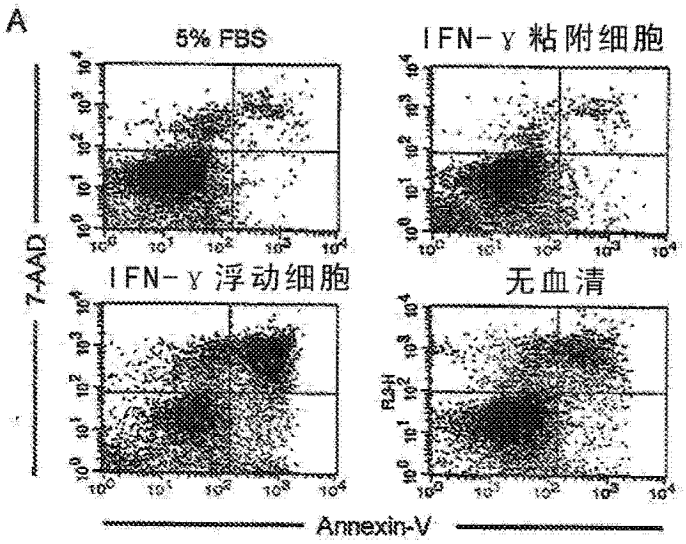

A
5% FBS
IFN-γ 粘附细胞
IFN-γ 浮动细胞
无血清
7-AAD
Annexin-V

图 6A

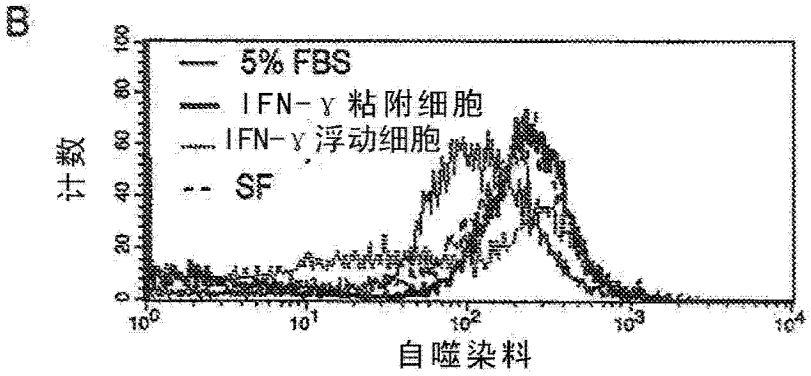

B
5% FBS
IFN-γ 粘附细胞
IFN-γ 浮动细胞
SF
计数
自噬染料

图 6B

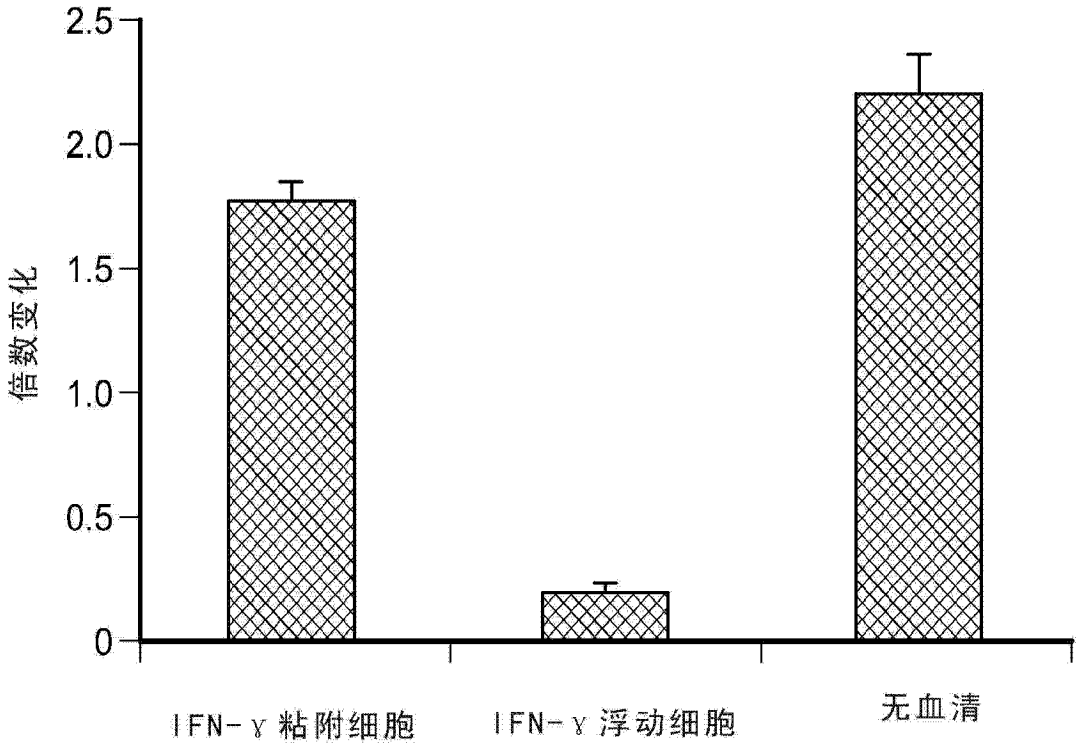

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
倍数变化
IFN-γ 粘附细胞
IFN-γ 浮动细胞
无血清

图 6C

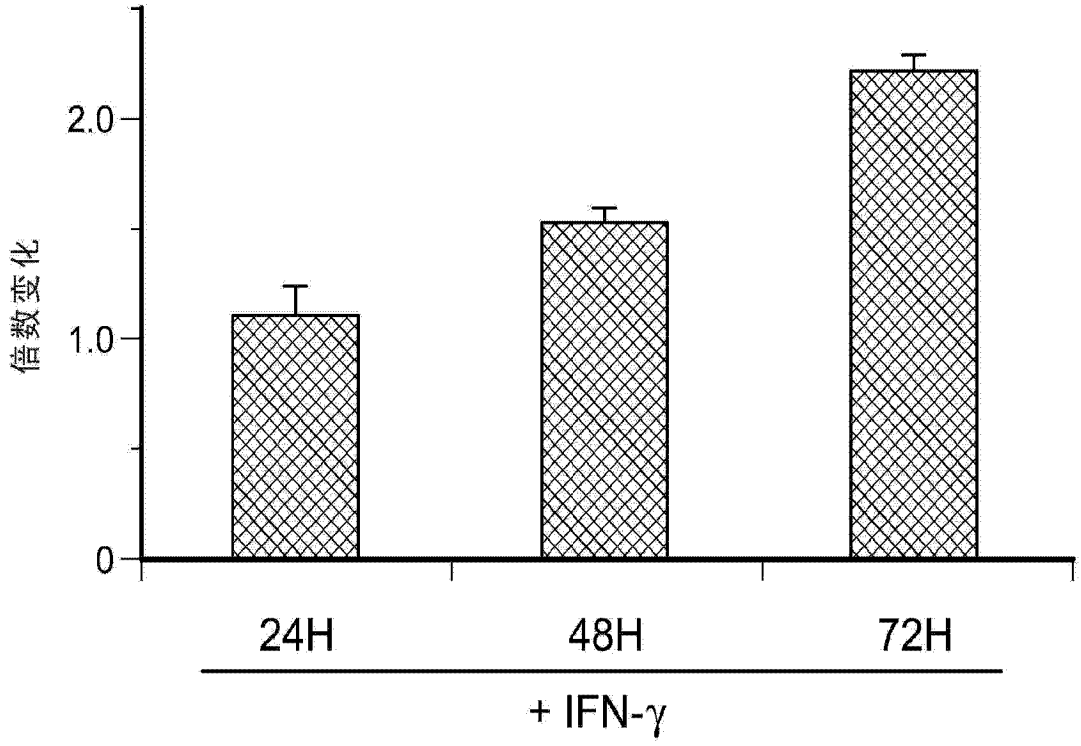

2.0
1.0
0
倍数变化
24H
48H
72H
+ IFN-γ

图 7A

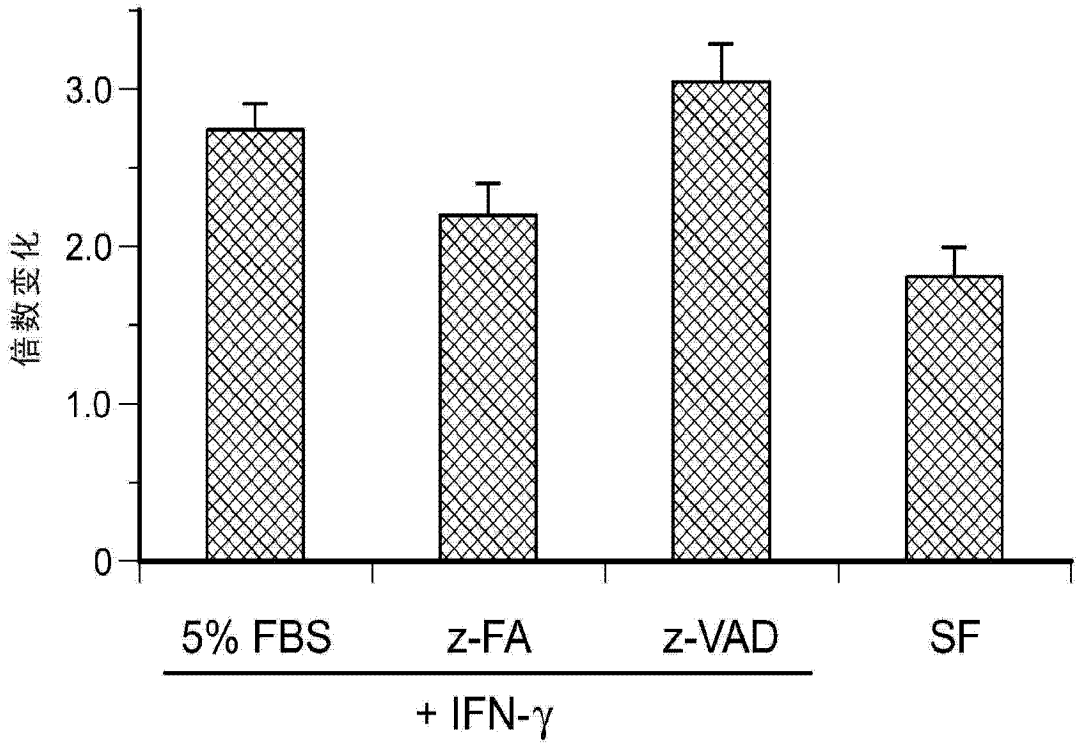


图 7B

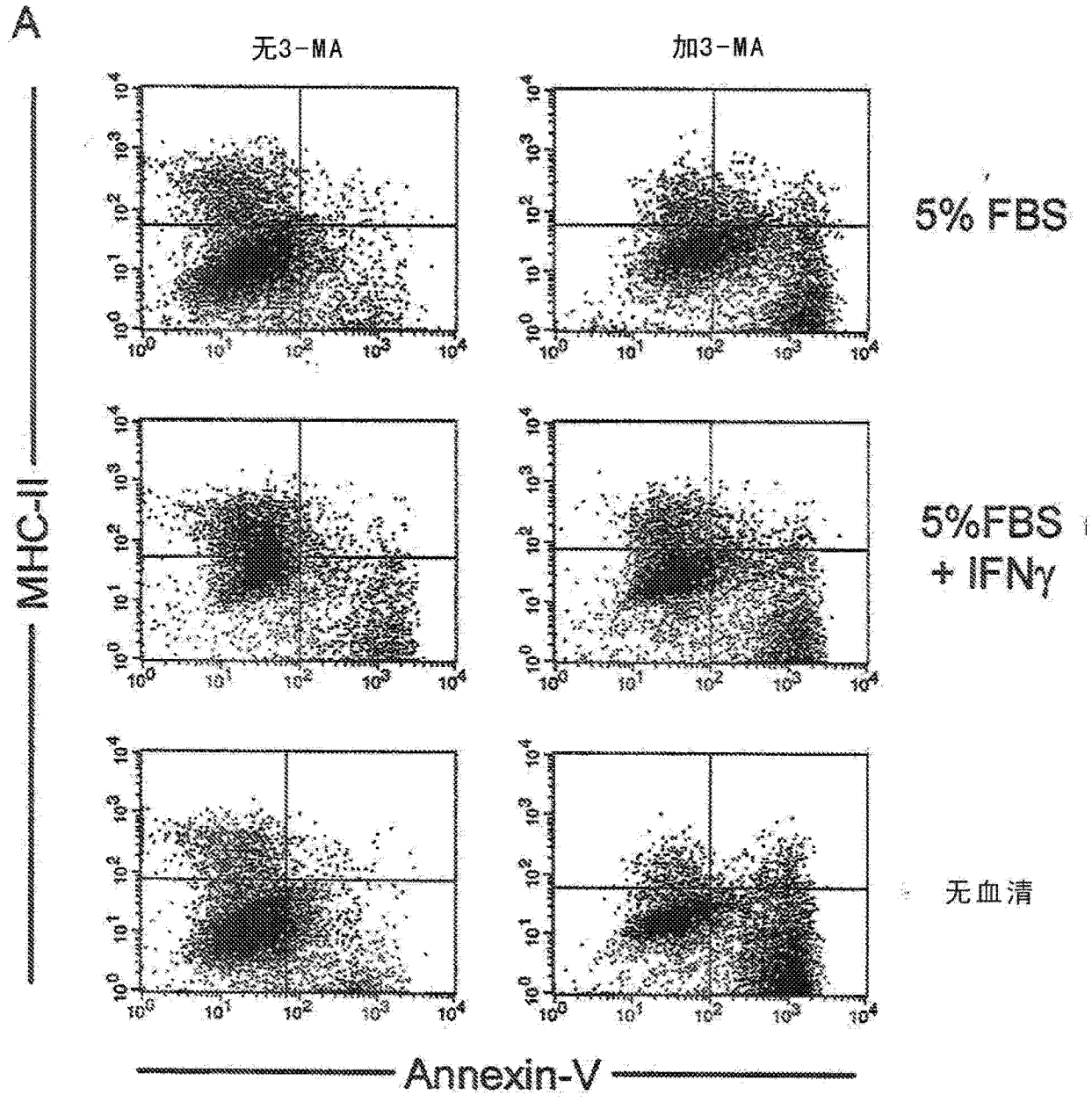


图 8

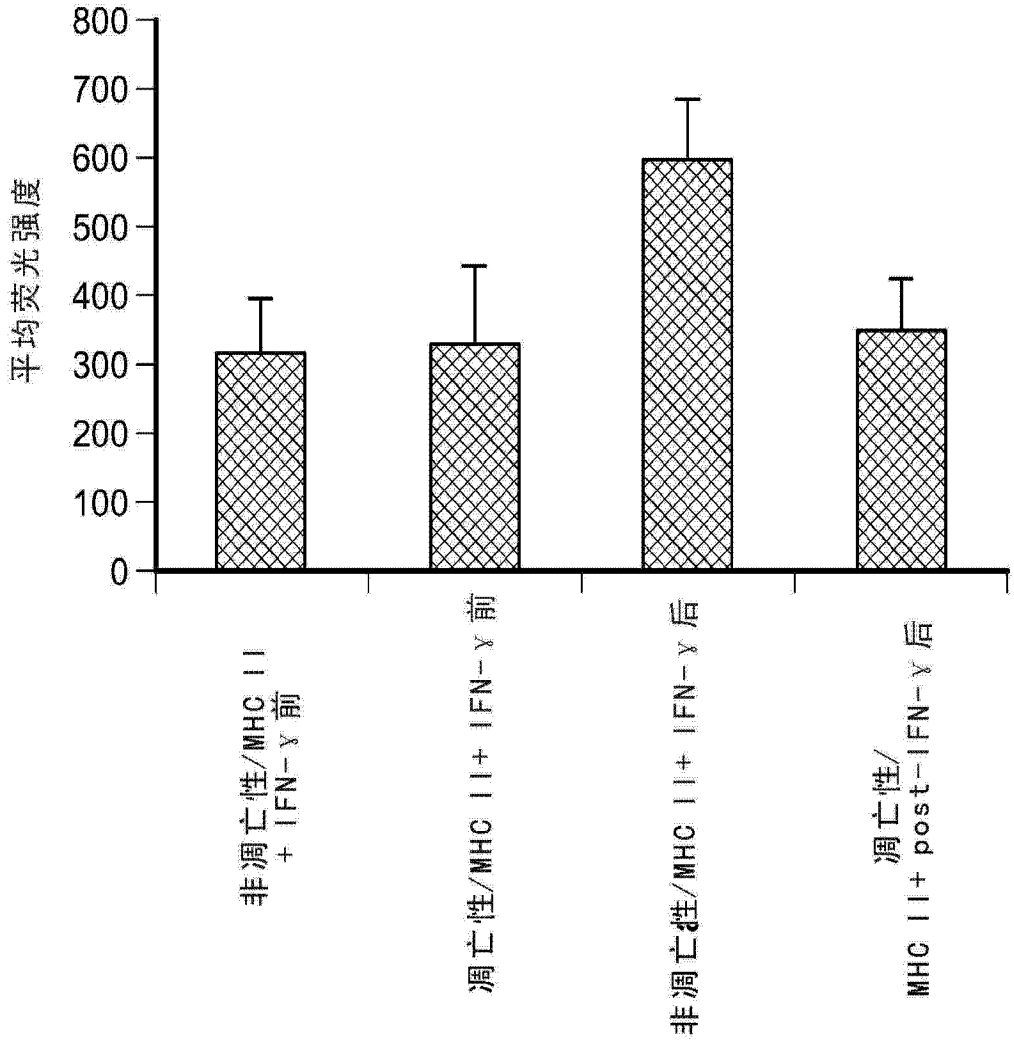

平均荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
非凋亡性/MHC II + IFN-γ前
凋亡性/MHC II + IFN-γ前
非凋亡性/MHC II + IFN-γ后
凋亡性/MHC II + post-IFN-γ后

图 9

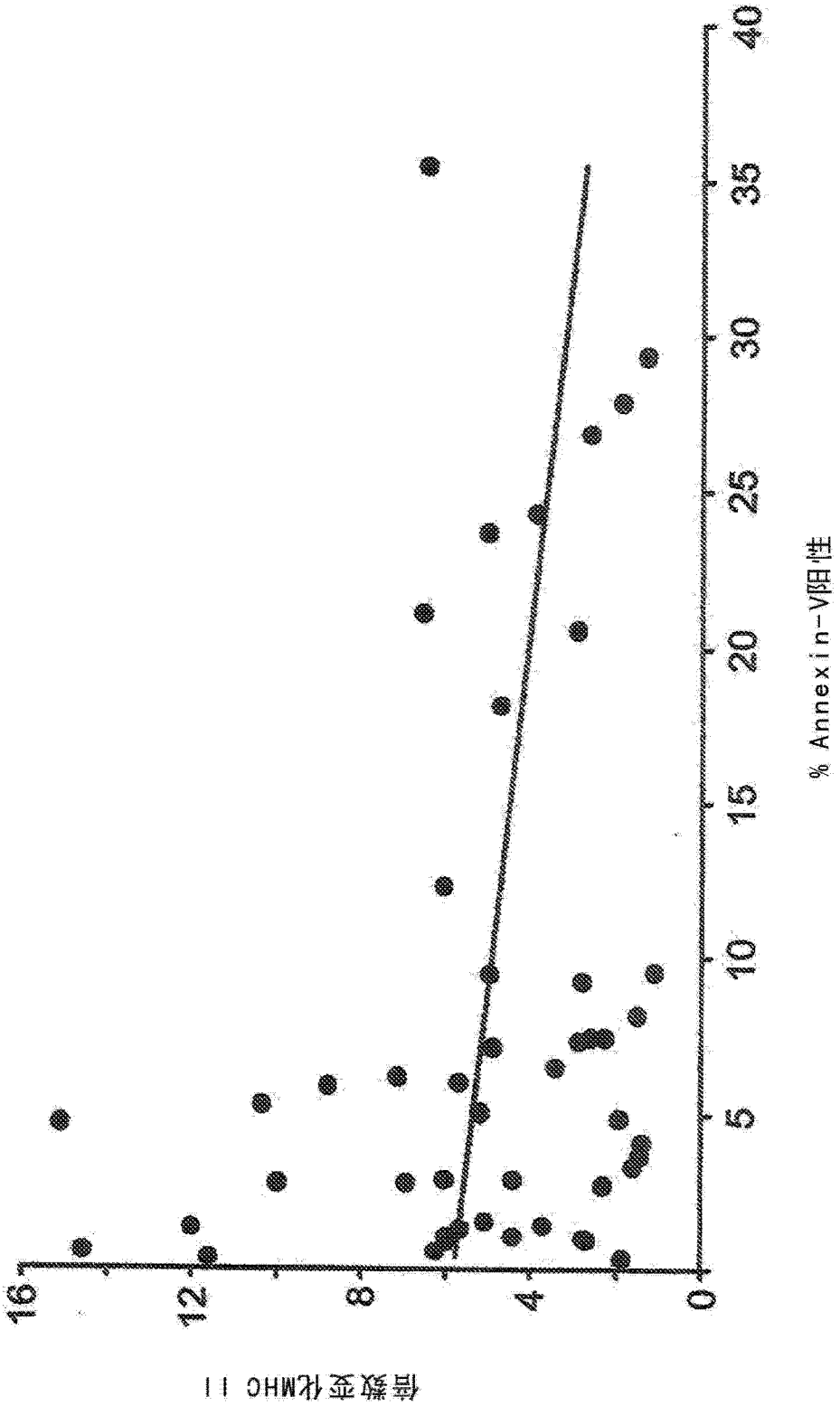


图 10

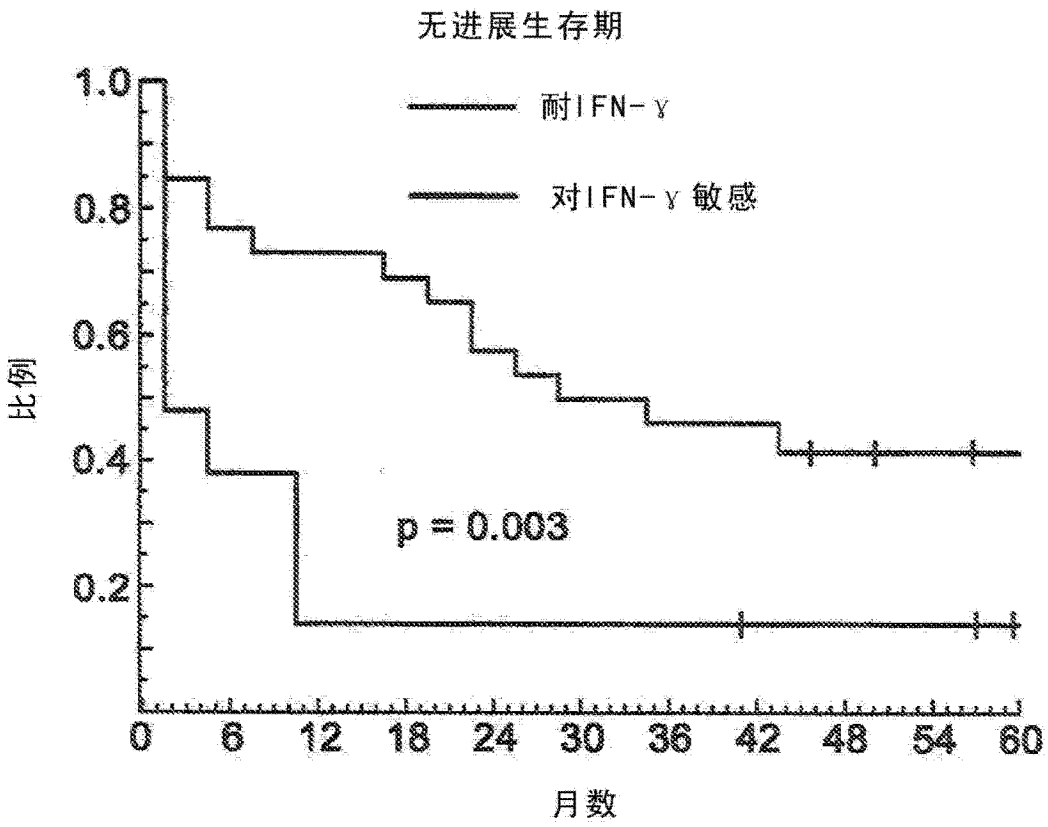

无进展生存期
耐IFN-γ
对IFN-γ敏感
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
比例
p = 0.003
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60
月数

图 11

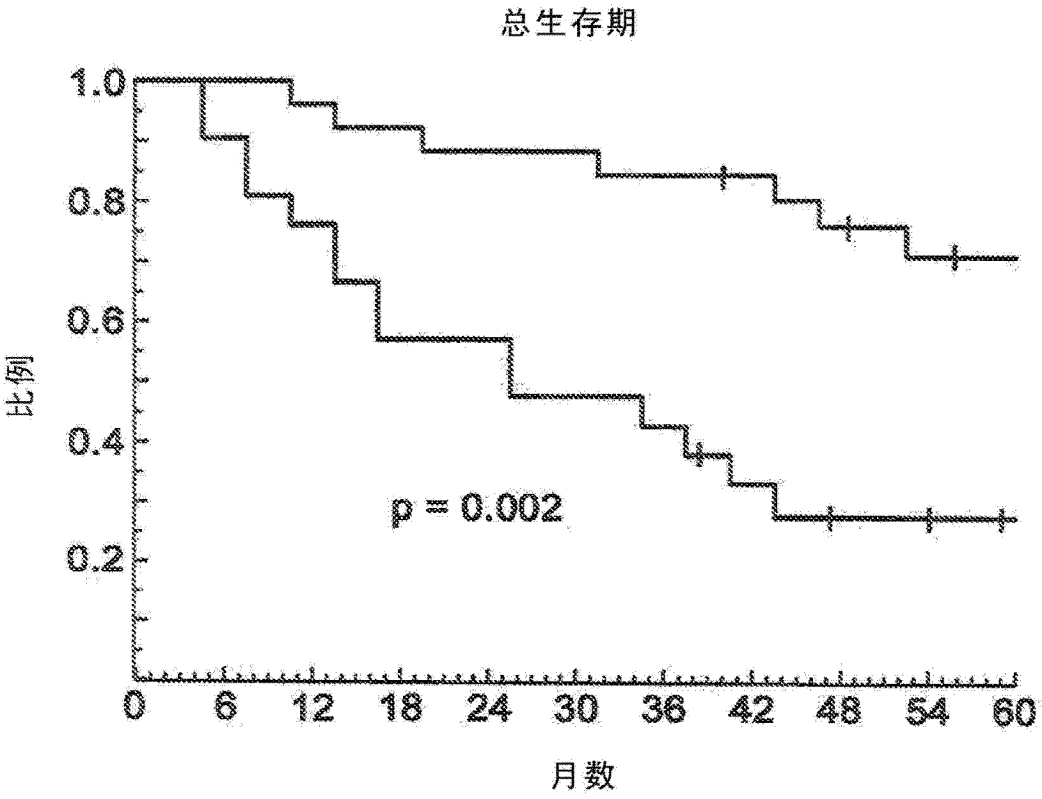


图 12

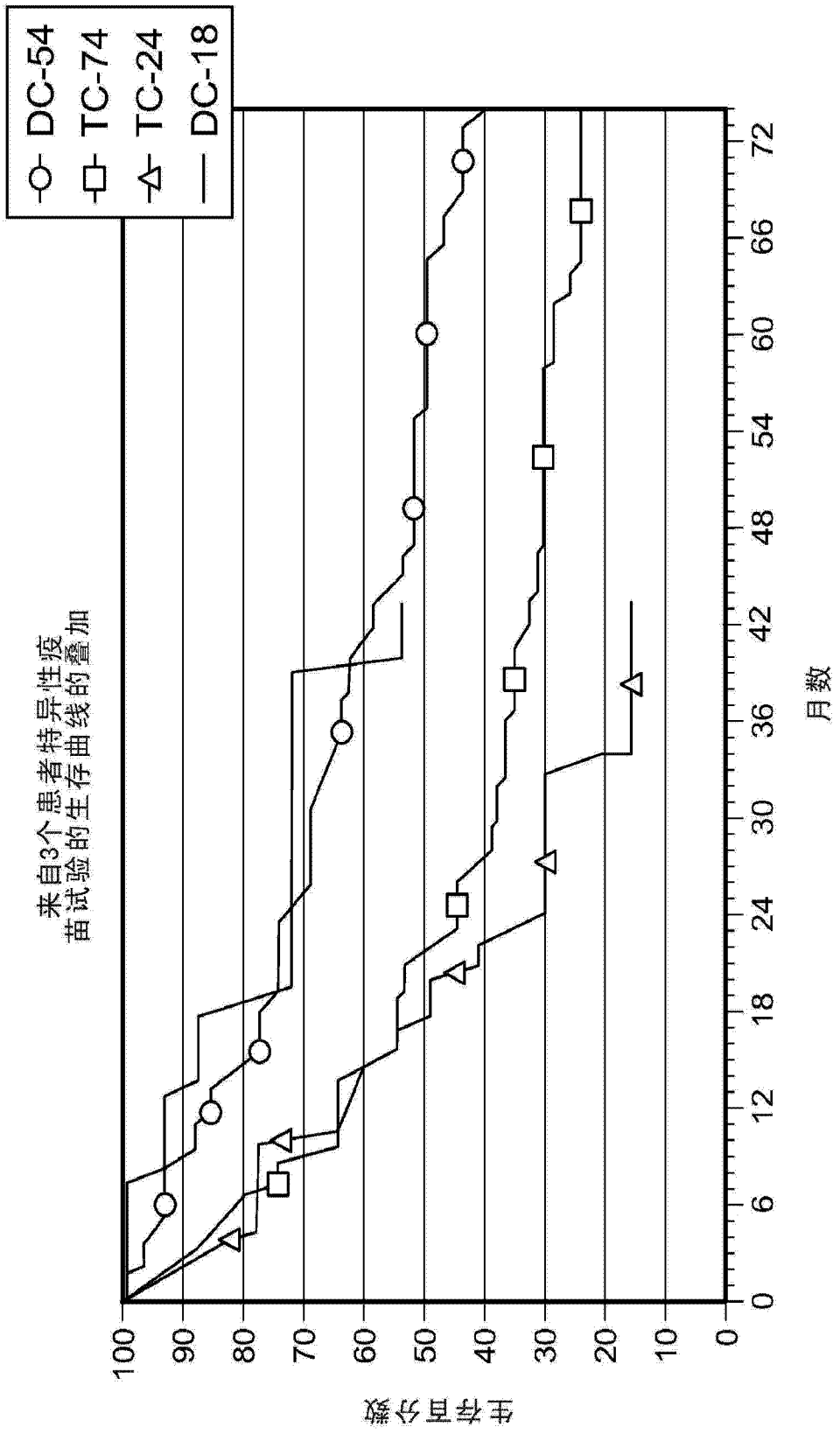

DC-54
TC-74
TC-24
DC-18
来自3个患者特异性疫
苗试验的生存曲线的叠加
生存百分数
月数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60
66
72

图 13