

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 5/08 (2006.01)

[21] 申请号 200780032430. X

[43] 公开日 2009年8月19日

[11] 公开号 CN 101511384A

[22] 申请日 2007.6.29

[21] 申请号 200780032430. X

[30] 优先权

[32] 2006.6.30 [33] US [31] 60/817,916

[86] 国际申请 PCT/US2007/072525 2007.6.29

[87] 国际公布 WO2008/005859 英 2008.1.10

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.2

[71] 申请人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯

[72] 发明人 A·K·帕吕卡 J·F·班彻罗

N·塔丘特 S·伯克霍尔德

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司  
代理人 曹津燕

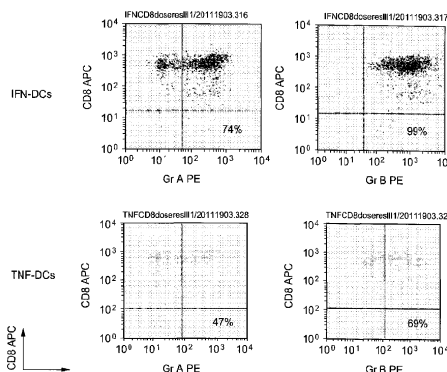
权利要求书 5 页 说明书 33 页 附图 15 页

## [54] 发明名称

采用 GM-CSF 和  $\alpha$  干扰素制成的并装载热处理的且杀死的癌细胞的树突状细胞

## [57] 摘要

本发明包括用于制备药学上有效量的一种或多种树突状细胞的组合物和方法, 所述树突状细胞通过暴露于  $IFN\alpha$  而成熟, 并用来自经热休克并且随后被杀死的细胞的癌抗原装载, 其中一种或多种  $IFN\alpha$  树突状细胞处在提呈一种或多种癌抗原的条件下, 所述癌抗原存在于自体 MHC 中。



1. 一种制备用于治疗癌症的组合物的方法，其包括以下步骤：

通过在一种或多种经热休克并且随后被杀死的癌细胞存在下，孵育一种或多种被 GM-CSF 和  $\alpha$  干扰素活化的抗原提呈细胞，使一种或多种抗原提呈细胞活化以提呈一种或多种癌抗原并诱导 T 细胞活化。

2. 权利要求 1 所述的方法，还包括在诱导 T 细胞活化的条件下用抗原致敏抗原提呈细胞的步骤，所述抗原包含一种或多种经热休克并且随后被杀死的癌细胞的残余物。

3. 权利要求 1 所述的方法，还包括深冷储存一种或多种抗原提呈细胞的步骤，所述抗原提呈细胞已经采用经热休克并且随后被杀死的癌细胞致敏。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中一种或多种抗原提呈细胞包括抗原提呈树突状细胞，所述抗原提呈树突状细胞向一种或多种 CD8<sup>+</sup>T 细胞提呈一种或多种癌细胞经热休克并且被杀死后获得的癌症特异性抗原。

5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述抗原提呈细胞为树突状细胞、单核细胞、自体细胞、异体细胞或它们的组合。

6. 权利要求 1 所述的方法，其中一种或多种抗原提呈树突状细胞包含 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  诱导的树突状细胞。

7. 权利要求 1 所述的方法，其中一种或多种抗原提呈细胞包含与 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  一起培养的单核细胞。

8. 权利要求 1 所述的方法，其中一种或多种癌细胞被进一步定义为来源于患者的热灭活的黑色素瘤细胞。

9. 权利要求 1 所述的方法，其中一种或多种癌细胞被进一步定义为与患者癌细胞类型相同的热灭活的黑色素瘤细胞。

10. 权利要求 1 所述的方法，其中所述癌细胞包含一种或多种 Colo829 黑色素瘤细胞。

11. 权利要求 1 所述的方法，其中所述癌细胞包括确定的癌细胞系。

12. 权利要求 1 所述的方法，其中所述癌细胞为黑色素瘤细胞。

13. 权利要求 1 所述的方法，其中所述一种或多种癌细胞被进一步定义为包含一种或多种 Mel-2 细胞、一种或多种 Mel-3 细胞、一种或多种 Mel-4 细胞、一种或多种 Mel-6 细胞、一种或多种 Mel-9 细胞或它们的组

合的黑色素瘤细胞。

14. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌细胞在约 38°C 和约 46°C 之间被加热处理约 4 小时。

15. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌细胞被剂量为约 160Gy 的  $\gamma$  射线照射约 0.5 小时杀死。

16. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌细胞经加热杀死。

17. 权利要求 1 所述的方法, 还包括加入一种或多种致敏的抗原提呈细胞, 所述抗原提呈细胞包含去核的树突状细胞和一种或多种经热处理的癌细胞, 能够诱导 T 细胞活化并经制剂致敏。

18. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述癌细胞来源于选自纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜癌、间皮癌、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤 (rhabdosarcoma)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝脏肿瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、维尔姆斯癌、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病的癌症。

19. 权利要求 17 所述的方法, 其中所述癌细胞选自纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜癌、间皮癌、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤 (rhabdosarcoma)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝脏肿瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、维尔姆斯癌、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

20. 一种制备提呈癌抗原的树突状细胞的方法，其包括以下步骤：

将一种或多种单核细胞分化成一种或多种树突状细胞；以及

用抗原提呈组合物装载一种或多种树突状细胞，所述组合物包含一种或多种经热休克并随后被杀死的癌细胞，其中在引发一种或多种树突状细胞提呈一种或多种所述组合物中的抗原的条件下，将一种或多种树突状细胞与 GM-CSF 和  $IFN\alpha$  一起孵育。

21. 一种制备提呈黑色素瘤抗原的抗原提呈树突状细胞的方法，其包括以下步骤：

从疑似患有癌症的患者中分离一种或多种单核细胞；

在细胞培养中，将单核细胞暴露于 GM-CSF 和  $IFN\alpha$ ，使得一种或多种单核细胞成熟形成一种或多种成熟的树突状细胞；以及

用抗原提呈组合物装载一种或多种成熟的树突状细胞，所述组合物包含一种或多种经热休克并随后被杀死的癌细胞，其中负载的一种或多种成熟的树突状细胞能够诱导 T 细胞活化，并处在使得一种或多种成熟的树突状细胞提呈一种或多种所述组合物中的抗原的条件下。

22. 一种能够诱导 T 细胞活化的癌症特异性疫苗，其包括：

药学上有效量的一种或多种被 GM-CSF 和  $IFN\alpha$  活化的提呈抗原的树突状细胞，并且树突状细胞提呈的一种或多种抗原包括一种或多种已经被热休克并且在热休克后被杀死的癌细胞。

23. 权利要求 22 所述的疫苗，其中所述癌细胞在杀死的时候没有凋亡。

24. 一种能够诱导 T 细胞活化的黑色素瘤特异性疫苗，其包括：

药学上有效量的一种或多种 GM-CSF 和  $IFN\alpha$  诱导的负载的树突状细胞，所述树突状细胞提呈作为抗原的热休克的并且被杀死的、没有凋亡的黑色素瘤细胞，其中在促进一种或多种黑色素瘤提呈的条件下孵育一种或多种  $IFN\alpha$  树突状细胞。

25. 权利要求 24 所述的疫苗，其中用于 T 细胞活化的致敏制剂被进一步定义为包含一种或多种致敏的去核的抗原提呈细胞。

26. 权利要求 24 所述的疫苗，其中所述疫苗被深冷保藏。

27. 权利要求 24 所述的疫苗，其中一种或多种抗原提呈树突状细胞向一种或多种  $CD8^+$ T 细胞提呈自体癌抗原以引发分化。

28. 权利要求 24 所述的疫苗，其中所述抗原提呈细胞为树突状细胞、

单核细胞、自体细胞、异体细胞或它们的组合。

29. 权利要求 24 所述的疫苗，其中一种或多种单核细胞与 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  一起培养。

30. 权利要求 24 所述的疫苗，其中一种或多种热灭活的黑色素瘤细胞来源于患者。

31. 权利要求 24 所述的疫苗，其中所述癌细胞在约 38 $^{\circ}$ C 和约 46 $^{\circ}$ C 之间被加热处理约 4 小时。

32. 权利要求 24 所述的疫苗，其中所述癌细胞被剂量为约 160Gy 的  $\gamma$  射线照射约 0.5 小时杀死。

33. 权利要求 24 所述的疫苗，其中所述癌细胞来源于选自纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜癌、间皮癌、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤 (rhabdosarcoma)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝脏肿瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、维尔姆斯癌、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病的癌症。

34. 权利要求 25 所述的方法，其中所述癌细胞选自纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜癌、间皮癌、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤 (rhabdosarcoma)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝脏肿瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、维尔姆斯癌、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

35. 一种治疗疑似患有癌细胞生长的患者的方法，其包括以下步骤：

在诱导抗原提呈和 T 细胞活化的条件下，将一种或多种癌抗原装载到经 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  活化的树突状细胞上，其中癌抗原包含已经被热休克并随后被杀死的癌细胞；以及

给予有需要的患者一种或多种提呈一种或多种癌抗原以活化 T 细胞的树突状细胞。

36. 一种治疗疑似患有癌症的患者的方法，其包括以下步骤：

分离一种或多种暴露于 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  的单核细胞并使其成熟；

用组合物装载一种或多种能够诱导 T 细胞活化的树突状细胞以形成一种或多种抗原提呈细胞，所述组合物包含一种或多种经热休克并随后被杀死的热处理的癌细胞；

给予有需要的患者一种或多种抗原提呈细胞。

## 采用 GM-CSF 和 $\alpha$ 干扰素制成的并装载热处理的且杀死的癌细胞的 树突状细胞

### 发明技术领域

概括地说，本发明涉及疫苗领域，具体来说，涉及用于生产树突状细胞的组合物和方法，所述树突状细胞是采用树突状细胞活化因子生成的并装载了热处理的且杀死的癌细胞。

### 发明背景

本发明描述的与癌细胞疫苗有关的背景不限制本发明的范围。

人们已经开发出多种区分、表征和诱导免疫反应的方法。例如，在授予 Engleman 等的美国专利第 6,821,778 号中，教导了一些采用树突状细胞激活  $\gamma/\delta$ -T 细胞受体-阳性 T 细胞的方法。简言之，该专利教导了采用人树突状细胞提呈抗原，从而诱导抗原特异性 T 细胞介导的免疫反应的方法。特别地，其公开内容包括从人血液中分离树突状细胞，将细胞暴露给抗原，将抗原致敏的树突状细胞与  $\gamma/\delta$ -T 细胞受体-阳性 T 细胞 ( $\gamma/\delta$ -TCR+T 细胞) 共培养以刺激抗原特异性 T 细胞的增殖和细胞毒性活性，所述  $\gamma/\delta$ -T 细胞受体-阳性 T 细胞获自未激活的或弱激活的个体。据称其中所述的树突状细胞抗原提呈系统应用范围很广，例如活化和扩增大量抗原特异性主要组织相容性复合物非限制性 T 细胞，用于对感染性疾病和癌症的过继细胞免疫治疗 (adoptive cellular immunotherapy)。

授予 Gong 等的美国专利第 6,652,848 号中还教导了另一个操作树突状细胞的例子，其教导了树突状细胞的杂种。Gong 教导了包含由树突状细胞和非树突状细胞融合而形成的融合细胞的组合物，使用这些组合物的方法，以及制成树突状细胞杂种的方法。

授予 Albert 等的美国专利第 6,602,709 号包括了使用凋亡细胞向树突状细胞递送抗原以诱导或耐受 (tolerization) T 细胞的方法。其公开内容教导了用于向树突状细胞递送抗原的方法和组合物，这些树突状细胞随后被用于诱导抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞和 T 辅助细胞。据称该公开内容提供了用于评价细胞毒性 T 淋巴细胞活性的分析方法。简言之，通过凋

亡细胞使抗原定向到树突状细胞，所述凋亡细胞可以被修饰以表达向树突状细胞提呈的非天然抗原。据称树突状细胞被凋亡细胞激活，能够加工抗原并提呈加工的抗原，以及诱导细胞毒性 T 淋巴细胞活性，也可以用于疫苗治疗。

授予 Steinman 等的美国专利第 6,475,483 号公开了用于体外增殖树突状细胞前体的方法，以及它们在生产用于治疗自身免疫性疾病的免疫原中的用途。据称其公开内容的教导中提供了生成树突状细胞前体的增殖性培养物的方法，以及在培养物中由增殖性树突状细胞前体生成成熟的树突状细胞的方法。成熟的树突状细胞培养物提供了生成新的 T 细胞依赖性抗原的有效途径，所述 T 细胞依赖性抗原由树突状细胞修饰的抗原或抗原致敏的树突状细胞组成，包括微粒，其中抗原经加工并在抗原活化的树突状细胞上表达。该发明的新抗原可以被用作疫苗的免疫原或用于治疗疾病。这些抗原也可以被用于治疗自身免疫性疾病，如青少年糖尿病和多发性硬化。

## **发明概述**

本发明包括用于诱导树突状细胞 (DCs) 协调或调节的免疫反应的组合和方法<sup>1,2</sup>。DCs 存在于外周组织中，随时准备捕捉抗原。当 DCs 成熟并向引流 (draining) 次级淋巴器官移动时，这些抗原随后被加工成小肽<sup>3</sup>。在那里，DCs 向初始 T 细胞提呈肽，这样诱导细胞免疫反应，其涉及了 T 辅助细胞 1 (Th1) 型 CD4<sup>+</sup>T 细胞和溶细胞的 CD8<sup>+</sup>T 细胞。DCs 的重要性在于通过其活化初始<sup>4</sup>和记忆<sup>5</sup>B 细胞的能力引发体液免疫。DCs 还能够活化天然杀伤 (NK) 细胞<sup>6</sup>和 NKT 细胞<sup>7</sup>。由于其具有多种能力，DCs 能够操纵免疫系统的全部要素，并因此成为接种免疫的基本靶向和工具的代表。

间接体内生成的并装载抗原的 DCs 最近已经被用作疫苗来提高免疫性<sup>8</sup>。许多在小鼠中进行的研究已经表明装载肿瘤抗原的 DCs 能够诱导治疗性和保护性抗肿瘤免疫<sup>9</sup>。被递送到 DCs 上的抗原的免疫原性已经在患有癌症<sup>8</sup>和慢性 HIV 感染<sup>10</sup>的患者中表现出来，这样提供了 DC 疫苗有效的原理验证。识别诱导不同类型免疫反应的不同 DC 亚群和 DC 在具有调节/抑制功能的细胞扩增中的作用，为设计用于癌症患者的更好的接种疫苗策略提供了新的待测参数。



本发明包括用于抗原提呈细胞进行活化和提呈抗原的组合物和方法。更特别地，本发明包括制备用于治疗癌症的组合物的方法，该方法通过将一种或多种树突状细胞与一种或多种经过热休克并且随后被杀死的癌细胞一起孵育，活化一种或多种提呈一种或多种癌抗原的树突状细胞，并诱导 T 细胞活化。该方法还可以包括在诱导 T 细胞活化的条件下，用抗原致敏抗原提呈细胞的步骤，所述抗原包括一种或多种经热休克并且随后被杀死的癌细胞的残余物。该方法还可以包括低温储存一种或多种抗原提呈细胞的步骤，所述抗原提呈细胞已经用经热休克并且随后被杀死的癌细胞致敏。一种或多种抗原提呈细胞可以是将一种或多种癌症特异性抗原提呈至一种或多种 CD8<sup>+</sup>或 CD4<sup>+</sup>T 细胞的树突状细胞，所述抗原是癌细胞热休克并且被杀死后获得的。抗原提呈细胞可以是树突状细胞、单核细胞、自体细胞、异体细胞、它们的细胞片断和/或组合。

在某些例子中，一种或多种抗原提呈树突状细胞包括一种或多种树突状细胞，例如已经被 IFN $\alpha$  活化的单核细胞。抗原提呈细胞可以由与 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  一起培养的单核细胞获得。抗原提呈细胞的例子可以为表达一种或多种源自黑色素瘤细胞的热休克蛋白的抗原提呈树突状细胞，例如，来自患者的热灭活黑色素瘤细胞。可选择地，一种或多种热灭活的黑色素瘤细胞可以是与患者相同的基本细胞类型或者甚至是相同的癌细胞类型。在某些实施方案中，癌细胞为 Colo829 黑色素瘤细胞。在一个例子中，癌细胞是已确定的癌细胞系，例如培养的黑素瘤细胞，例如 Mel-2, Mel-3, Mel-4, Mel-6 和/或 Mel-9 细胞或它们的组合。

在某些实施方案中，在约 38°C 和 46°C 之间的温度下，加热约 0.5 至 4 小时处理癌细胞。可以通过剂量为约 160Gy 的  $\gamma$  射线照射约 0.5 小时杀死癌细胞和/或通过加热、循环冻融、法式细胞破碎 (French press)、剪切、直接或间接压缩、冷冻、破裂、干燥、化学暴露以及引起细胞死亡 (而不是凋亡) 的生物试剂等杀死癌细胞。本发明还包括加入一种或多种致敏的抗原提呈细胞，所述抗原提呈细胞可以包括去核的树突状细胞和一种或多种能够诱导 T 细胞活化的热处理过的癌细胞，其被随后被杀死的热休克细胞致敏并经处理用于提呈。在某些实施方案中，在至少一个选自前股部或上臂的位置皮下注射组合物。

用于热处理并杀死以制成用于提呈的抗原的癌细胞的非限制性例子可以包括来自，例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉

瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜癌、间皮癌、尤因瘤 (Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤 (rhabdosarcoma)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝脏肿瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、维尔姆斯癌 (Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病的细胞。

可以用于致敏细胞和/或作为治疗对象的癌可以包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜癌、间皮癌、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤 (rhabdosarcoma)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝脏肿瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、维尔姆斯癌 (Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

另一个实施方案为制备树突状细胞的方法，所述树突状细胞通过将一种或多种单核细胞分化成一种或多种树突状细胞，并用抗原提呈组合物装载一种或多种树突状细胞来提呈癌抗原，所述抗原提呈组合物包括一种或多种经热休克并被随后杀死的癌细胞，其中一种或多种树突状细胞处于使一种或多种树突状细胞提呈组合物中的抗原的条件下。

本发明的另一个方法为制备提呈黑色素瘤抗原的  $IFN\alpha$  树突状细胞的方法，其中从疑似患有癌症的患者分离一种或多种单核细胞；使一种或多种单核细胞成熟成一种或多种  $IFN\alpha$  树突状细胞；以及用包含一种或多种经热休克并且随后被杀死的癌细胞的抗原提呈组合物装载一种或多种

IFN $\alpha$  树突状细胞, 其中负载的一种或多种 IFN $\alpha$  树突状细胞能够诱导 T 细胞活化并处在使得一种或多种 IFN $\alpha$  树突状细胞提呈组合物中的一种或多种抗原的条件下。

本发明还包括能够诱导 T 细胞活化的癌特异性疫苗, 包括药学上有效量的一种或多种被活化的以提呈抗原的树突状细胞, 其中所述树突状细胞提呈一种或多种抗原, 所述抗原为一种或多种已经经热休克并且在热休克后被杀死的癌细胞。在一个实施方案中, 癌细胞在杀死的时候已经经热休克或处理并被杀死 (但不是凋亡)。本发明的另一个例子为能够诱导 T 细胞活化的黑色素瘤特异性疫苗, 该疫苗包括药学上有效量的一种或多种暴露于 IFN $\alpha$  并且已经成熟成树突状细胞 (IFN $\alpha$  树突状细胞) 的单核细胞, 其负载并提呈的抗原为经热休克并随后被杀死的黑色素瘤细胞, 其中一种或多种 IFN $\alpha$  树突状细胞在促进一种或多种黑色素瘤向 T 细胞提呈的条件下孵育。制备疫苗的方法还包括加入用于 T 细胞活化的致敏的制剂, 该制剂包含一种或多种致敏的去核抗原提呈细胞。

本发明的另一个实施方案包括治疗疑似患有癌细胞生长的患者的方法, 其中在包括抗原提呈和诱导 T 细胞活化的条件下, 将一种或多种癌抗原装载到活化的树突状细胞上, 其中所述癌抗原包括已经被热休克并且随后被杀死的癌细胞; 以及给予有需要的患者一种或多种提呈一种或多种癌抗原以活化 T 细胞的树突状细胞。

本发明的另一种方法包括治疗疑似患有癌症的患者的方法, 其中分离一种或多种单核细胞, 并用 IFN $\alpha$  和 GM-CSF 使其成熟成成熟的含有这些细胞因子的树突状细胞, 用包含一种或多种热处理的癌细胞的组合物装载一种或多种能够诱导 T 细胞活化的树突状细胞, 所述热处理的癌细胞经热休克并且随后被杀死以形成一种或多种抗原提呈树突状细胞; 以及给予有需要的患者一种或多种抗原提呈树突状细胞。

## 附图简述

为了更完整地理解本发明的特征和优点, 现在参考附图详细地说明本发明, 其中:

图 1 显示 IFN-DCs 有效地活化了溶细胞的 CD8<sup>+</sup>T 细胞。初始 CD8 T 细胞与 IFN-DCs (上面) 或 TNF-DCs (下面) 一起培养 5 天。T 细胞用抗 CD8 (纵坐标) 和抗颗粒酶 A (左), 或抗 CD8 (纵坐标) 和抗颗粒酶 B

(右)染色。两者都呈阳性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的百分比。

图 2 显示了 IFN-DCs 在体外对成熟刺激物的不同反应。暴露给所示刺激物 6 小时后, 细胞因子向 IFN-DCs 的上清液分泌的归一化表达。标尺 0 (蓝色) -20 (红色)。所示细胞因子的多重细胞因子珠分析。对照=没有加入活化剂。

图 3 显示 IFN-DCs 仅分泌 IL-7。详见图 1。IL-7 在 6 小时时的分泌(纵坐标, pg/ml)。红色柱 (IFN-DCs); 绿色柱 (IL-4 DCs)。

图 4: IFN-DCs 有效地交叉激活肿瘤特异性 CTLs。初始 CD8<sup>+</sup>T 细胞暴露于装载杀死的肿瘤细胞的 IL4-DCs 和 IFN-DCs。两次刺激循环之后测定 CTL 的功能 (纵坐标)。

图 5 显示 IFN-DCs 有效地交叉激活 CTLs 对抗黑色素瘤。HLA-A\*0201<sup>+</sup> 初始细胞 CD8<sup>+</sup>T 与装载杀死的 Me290 黑色素瘤细胞的 IFN-DCs 一起培养。第 7 天刺激培养物生长一次, 并且 5 天后将收获的 T 细胞用于评价它们在所示的 E:T 比 (横坐标) 下, 触发铬从 Me290 细胞以及从对照 K562 细胞释放的能力 (纵坐标, 特异性溶解)。

图 6 显示 IFN-DCs 有效地交叉激活黑色素瘤特异性 CTLs。培养物中四聚体特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的出现频率, 所述培养物中含有装载杀死的黑色素瘤细胞 (Me290) 或黑素细胞的 IFN-DCs。HIV 四聚体用作阴性对照。粗体数值表示 CD8<sup>+</sup>T 细胞结合四聚体的百分比。

图 7 显示对黑色素瘤细胞进行热处理增加了 HSP70。SK Me128 黑色素瘤细胞, 它们被加热并用 BA 杀死。细胞被放在多聚赖氨酸预处理的载玻片上, 固定并增加其渗透性。一抗为抗 HSP70 Ab, 二抗为 Texas-Red 偶联的山羊抗小鼠 IgG。莱卡 (Leica) TCS-NT SP 共聚焦显微技术 (×40)。

图 8 显示热处理的黑色素瘤细胞表现出免疫原性增高: Me275 细胞和对照 K562 的杀死。未装载的 DCs (CTL 1), 装载对照黑色素瘤抗体的 DCs (CTL 2) 以及装载热休克的黑色素瘤抗体的 DCs (CTL 3)。激活的第 14 天释放 <sup>51</sup>Cr (纵坐标)。

图 9 显示热处理的黑色素瘤细胞表现出免疫原性增高: 用四种黑色素瘤肽 (4P; MART-1, gp100, 酪氨酸酶和 MAGE-3) 的混合物或用对照 PSA 肽致敏的 T2 细胞的杀死。装载对照黑色素瘤抗体的 DCs (CTL 1) 以及装载热休克的黑色素瘤抗体的 DCs (CTL 2)。 <sup>51</sup>Cr 释放 (纵坐标)。

图 10 显示了用装载热处理的杀死的黑色素瘤细胞的 DC 激活黑色素瘤

特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞。a) 2 周培养后四聚体染色, 和 b) 用肽致敏的 DCs 刺激生长一次后。参见图 7 和文本。

图 11 显示黑色素瘤细胞的热处理加强了肿瘤抗原的转录。实时 PCR: 冷 (无), 加热的和加热的+放线菌素 D 处理的 Me290 黑色素瘤细胞。归一化的倍数表达 (纵坐标)。

图 12 显示了在杀死的肿瘤细胞中, 对由热上调的 MAGE-10 的交叉激活。装载未加热的 (冷的) 或加热的 (热的) 杀死的黑色素瘤细胞, 或者 HLA-A\*0201<sup>+</sup> Me290 或者 HLA-A\*0201 阴性 Skmel 28 的 DCs。2 次刺激后, 用肽致敏的 DCs 刺激 HLA-A\*0201<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T 细胞生长。流式细胞术采用 MAGE 10 四聚体染色。结合 CD3<sup>+</sup>T 细胞的四聚体%。两次研究。

图 13 显示用热处理的黑色素瘤抗体装载 DCs 导致 CD8<sup>+</sup> (上面) 和 CD4<sup>+</sup>T 细胞 (下面) 的 IL-10 分泌减少, 并且 IFN  $\gamma$  分泌增多。在用 DCs 刺激的第 1 轮或第 2 轮后的所示时间, 对上清液的 Luminex 分析。

图 14 为概述本发明疫苗的全部生产过程的流程图;

图 15 显示了用于本发明的疫苗生产的详细步骤和时间安排;

图 16 显示了冷冻疫苗解冻后的形态;

图 17 显示了冷冻的 IFN-DC 疫苗解冻后的表型;

图 18 为显示冷冻疫苗解冻后的细胞因子分泌情况的图;

图 19 显示了采用 MART-1 肽致敏的冷冻/解冻的 IFN-DCs 刺激两次后, 冷冻疫苗对自体 CD8<sup>+</sup>T 细胞的激活, 结合对照的 CD8<sup>+</sup>T 细胞以及 MART-1 特异性四聚体的百分比。

## 发明详述

尽管下文详细地讨论了本发明的不同实施方案的形成和使用, 但是应理解本发明提供了许多可应用的创造性概念, 这些概念可以包含在大量的特定上下文中。本发明讨论的特定实施方案只是说明形成和使用本发明的特定途径, 并不限制本发明的范围。

为了有助于理解本发明, 下文定义了许多术语。本发明限定的术语具有本发明相关领域中普通技术人员通常理解的含义。术语如 “a”, “an” 和 “the” 不意味是指仅仅单一的实体, 而是包括可以用特定例子来说明的大类。本发明的术语用于描述本发明的特定实施方案, 但是它们的使用并不限制本发明, 除非权利要求中指出。

缩写: GM-CSF: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; IFN  $\alpha$ :  $\alpha$  干扰素; LPS: 脂多糖; TNF: 肿瘤坏死因子; CR: 完全响应; PR: 部分响应; SD: 稳定疾病; PD: 进行性疾病; NPD: 非进行性疾病; NED: 无疾病症状; MDCs: 源自单核细胞的树突状细胞; CTLs: 细胞毒性 T 淋巴细胞; NK 细胞: 天然杀伤细胞; NKT 细胞: 自然杀伤 T 细胞; ND: 未实施; NT: 未检测; TBD: 待测的。

癌症免疫疗法。有许多种改善患者对癌症的抗性的方法。这些方法包括: 1) 采用微生物成分或细胞因子的免疫系统非特异性活化; 2) 采用抗体和/或 T 细胞的抗原特异性过继免疫治疗 (接种疫苗); 以及 3) 抗原特异性活性免疫治疗 (接种疫苗)。抗体的主要局限在于靶蛋白必须在与 T 细胞靶点相对的细胞表面上表达, 靶蛋白可以是细胞间蛋白, 其肽以与 MHC 分子形成复合物的形式存在于细胞表面<sup>11</sup>。特定的人肿瘤抗原的识别推动了过继性 T 细胞治疗的发展<sup>12</sup>。然而由于接种疫苗对治疗性 T 细胞免疫 (肿瘤特异性效应器 T 细胞) 和保护性 T 细胞免疫 (能够控制肿瘤复发的肿瘤特异性记忆 T 细胞) 可预期的诱导, 接种疫苗仍是最具有吸引力的方法<sup>14-16</sup>。

人们已经开发出用于患有癌症的人的治疗性接种疫苗的多种方法, 包括自体的和异体肿瘤细胞 (其经常被修饰成表达不同的细胞因子), 肽, 蛋白和 DNA 疫苗<sup>8,16-19</sup>。所有这些方法都依赖于含有宿主 DCs 的疫苗的随机相遇。如果疫苗抗原未能与 DCs 相遇, 免疫反应不能发生。此外, 与非活化的 DCs 或“错误”的 DCs 亚群的不适合相遇会导致免疫反应沉默<sup>20</sup>。这些情况可以解释现有的癌症疫苗的某些缺点。而且, 还不知道为了得到适当的免疫反应, 如何在体内将需要递送的肿瘤抗原递送到 DCs。因此, 人们需要基于体外生成的自体 DCs 的研究, 在可以确立最佳接种抗癌疫苗的参数可控条件下, 用肿瘤抗原装载所述 DCs。体外生成大量自体 DCs 的方法的发现推动了采用 DCs 作为疫苗的临床研究<sup>21-23</sup>。应该被认为是改善 DC 疫苗接种在癌症中的疗效的参数包括: DC 相关因子; 宿主相关因子; 以及 DC 疫苗与其他治疗的组合。下文简单讨论了两种与 DC 相关的参数, 即新的 DC 亚群和装载肿瘤抗原的新方法。

DC 疫苗的参数。DC 亚群: GM-CSF 和 IL-4 能够使单核细胞分化成不成熟的 DCs<sup>22-24</sup>, 这一发现使我们对 DC 的生物学和功能的了解取得重大进展。依据 Nestle 等<sup>25</sup> (使用肿瘤溶解产物装载的 DCs) 和 Schuler 及

同事<sup>26</sup>（采用黑色素瘤-肽-装载的 DCs）在患有转移性黑色素瘤的患者中进行的开创性临床研究，几个研究机构已经使用 IL4-DCs 作为疫苗<sup>8</sup>。然而，最近的发现指出了替代产生 DCs 的经典方法的新方法。例如，对于体内诱导抗原特异性 CTL 分化而言，黑色素瘤-肽-致敏的 IL15-DCs 比 IL4-DCs 更有效，而它们刺激 CD4<sup>+</sup>T 的能力是可比的<sup>27</sup>。而且，已经发现三天的培养物中生成的 IFN- $\alpha$ -DCs 对诱导特异性免疫有效<sup>28</sup>。因此，这些不同的 DC 疫苗的免疫原性保证了临床研究中的体内测试。

抗原装载。用源自规定的抗原的肽将 I 型 MHC 和 II 型 MHC 分子装载到 DCs 上，这是 DC 疫苗接种中最普遍使用的方法<sup>15,29</sup>。尽管这种技术对于“概念验证”研究是重要的，但是肽的使用还是限制了疫苗的进一步发展：对特定 HLA 型的限制；充分表征的肿瘤相关抗原（TAA）数量有限；外源性肽-MHC 复合物相对快速的转换导致在注射后 DC 进入引流淋巴结的时候，抗原提呈相对低；以及 T 细胞克隆的限制性组成成分的诱导，这样限制了免疫系统控制肿瘤抗原变异的能力。许多种这样的肽可以由天然加工的表位来区分。因此，预期用总抗原制剂装载 DCs，并且进行“天然的”加工和表位选择可以改善疗效，并产生涉及多种 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CTLs 的免疫反应。所有这些方法都用重组蛋白、外来体<sup>30</sup>、病毒载体<sup>31</sup>、质粒 DNA、RNA 转染<sup>32</sup>、免疫复合物<sup>33</sup>和 DC 表面分子的特异性抗体<sup>15,34</sup>装载 DCs。

另一种技术涉及应用 DCs 从吞噬的死亡肿瘤细胞上将肽提呈到 I 型 MHC 分子（以及 II 型 MHC 分子）的能力。这被称之为交叉激活<sup>35,36</sup>。实际上，与杀死的异体黑色素瘤、前列腺癌或乳腺癌细胞系一起培养的 DCs 以肿瘤抗原体外激活初始的 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>36,37</sup>。20 名患有转移性黑色素瘤的患者已经在 BIIR 接种疫苗，以接触（date with）先前暴露于杀死的异体黑色素瘤细胞系的源自自体单核细胞的 DCs（每个月接种疫苗 8 次）。免疫接种已经被证明是安全的（无自体免疫或其它不良事件），并且能够诱导黑色素瘤特异性 T 细胞免疫。在两名患者中，已经观察到长期的肿瘤消退。这些结果为证明疫苗制剂方法效力的更大型临床研究提供了保证。

GM-CSF 和 IFN $\alpha$  诱导的树突状细胞疫苗。几项 IFN 生物学方面的最新发现重新激发了免疫学家对该类分子的兴趣。这些发现包括 1) 证实浆细胞样树突状细胞（pDCs，人和鼠 DCs 的亚群）迅速分泌大量 I 型 IFNs 以响应病毒信号<sup>74</sup>；2) IFN $\alpha$ / $\beta$  活化不成熟的髓系 DCs<sup>75</sup> 和诱导单核细胞

分化成 DCs<sup>28,76</sup> 的能力; 3) IFN $\alpha/\beta$  在生成记忆 CD8<sup>+</sup>T 细胞中的活性<sup>77,78</sup> 以及对抗体反应的刺激<sup>5,79,80</sup>; 4) IFN $\alpha/\beta$  在系统性红斑狼疮发病机理中的核心作用<sup>81,82</sup>; 5) 少量 IFN $\alpha/\beta$  的分泌加速了免疫系统的工作, 正如 IFN $\alpha/\beta$  在 LPS 信号传导和感染性休克发展中的重要作用所表明的<sup>83</sup>。

本发明人最近认识到 IFN $\alpha$  对于引发针对流感病毒的人特异性体液反应很重要的<sup>5</sup>。这就存在这样的可能性, 即 IFN $\alpha$  可能强化 CTLs 的生成, 最特别是被定向针对于肿瘤抗原的那些。

IFN-DCs 有效地活化了溶解细胞的 CD8<sup>+</sup>T 细胞: 通过将单核细胞与 GM-CSF 和 IFN $\alpha$  (IFN-DC) 一起培养, 由单核细胞制备 DC 疫苗, 通过将单核细胞与 GM-CSF 和 TNF (TNF-DCs), 或者 IL-4 (IL4-DCs) 一起培养制备两种已有的产品, 即 DC 疫苗, 比较它们的生物学性质。异体 CD8<sup>+</sup>T 细胞与每种 DC 亚群一起培养 5 天, 然后通过细胞分类再纯化并通过流式细胞术分析。令人惊讶的是, 结果表明 IFN-DCs 能够诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 如颗粒酶 A 和 B (图 1) 和穿孔素 (未显示) 的溶解细胞的 T 细胞分子表达相当高。

IFN-DCs 对成熟刺激物的响应不同: 为了进一步表征 IFN-DCs 在癌症疫苗中的作用, 在体外暴露于不同活化信号的 IFN-DCs 中分析细胞因子生物标记, 活化信号包括 CD40 配体、离子霉素和 TLR 配体, 如 LPS (TLR4), 聚 I:C (TLR3) 和酵母聚糖 (TLR2)。通过将纯化的单核细胞与 GM-CSF 和重组的人 IFN $\alpha$ 2a 一起培养制备 IFN-DCs, 将 IFN-DCs 暴露于不同的刺激物, 细胞因子/趋化因子分泌到培养物上清液中, 在不同的时间点使用多细胞因子珠 (Multiplex cytokine beads, Luminex) 检测。初步分析表明在暴露的 48 小时中, 分泌细胞因子的情况未发生显著变化 (未显示)。如图 2 所示, LPS 引发主要的细胞因子反应, 之后是聚 I:C 和离子霉素引发的。暴露于 CD40 配体或酵母聚糖时, 仅诱导少量细胞因子分泌。这些初步结果表明不同的活化信号引发 IFN-DCs 中不同的细胞因子标记。

IFN-DCs 只分泌 IL-7, 即 T 细胞生长因子: 单一的细胞因子分析观察到 IFN-DCs 自发地分泌可检测到的量的 IL-7 (图 3), 而未活化的 IL4-DCs 却不能如此。然而, 用已知信号活化 IL-4DCs 从而活化 I 型干扰素途径 (脂多糖 (LPS) 和聚 I:C), 而不采用 CD40 配体或酵母聚糖, 导致 IL-7 分泌的诱导 (图 3)。这些结果形成了两个关于 T 细胞活化的重要结论: 1) IFN-DCs 分泌的 IL-7 对于 IFN-DCs 激活初始 CD8<sup>+</sup>T 细胞的较强能力起到



作用, 以及 2) I 型干扰素似乎是通过髓系 DCs 调节 IL-7 的分泌。

IFN-DCs 有效地交叉激活肿瘤特异性 CTLs: 为了确定 IFN-DCs 是否真正在刺激 CTLs 中更有效, 用杀死的黑色素瘤或乳腺癌细胞装载 DCs, 并随后用于在 2 个培养周期中激活纯化的 CD8<sup>+</sup>T 细胞。观察到 IFN-DCs 比 IL4-DCs 更有效地激活 CTLs, 所述 CTLs 具有杀死癌细胞的能力(图 4)。为了评价 IFN-DCs 激活初始 CD8<sup>+</sup>T 细胞的能力, 我们使用我们之前确立的针对肿瘤抗原的体外激活系统。在这种情况下, DCs 装载了杀死的异体肿瘤细胞并且被用于激活经两周培养的自体初始 CD8<sup>+</sup>T 细胞。如图 5 所示, 装载杀死的异体 HLA-A\*0201+Me290 黑色素瘤细胞的 IFN-DCs 具有杀死用于免疫的 Me290 细胞的能力, 对刺激 CTLs 非常有效。四聚体特异性 T 细胞分析进一步证实了黑色素瘤特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的存在。如图 6 所示, 得到的 CD8<sup>+</sup>T 细胞包含 MART-1 特异性 T 细胞的亚群。

因此, IFN-DCs 已经在交叉激活初始 CD8<sup>+</sup>T 细胞分化成肿瘤抗原特异性 CTLs 中显示出高效率。提示该发现可用于高治疗性癌症疫苗。因此, IFN-DCs 在诱导肿瘤特异性免疫中更有效, 这为在临床应用中验证其在患者体内的活性提供了保证。

用于装载 DC 疫苗的高免疫原性杀死的肿瘤细胞的生成。高体温在癌症治疗中的应用, 或者单独使用或者作为放疗的佐剂, 多年来一直是临床感兴趣的目标<sup>84</sup>。高体温与放疗和/或放射免疫治疗(综述<sup>85,86</sup>)的组合看起来特别有效。高体温导致放射敏感分子机理还不清楚, 然而早期响应基因和热休克因子(HSFs)的活化, 以及随后的热休克蛋白(HSPs)可能在这一事件中起到作用<sup>87</sup>。HSPs 是不同蛋白的超家族, 根据它们的分子量适当地命名, 例如 hsp70。大多数 HSPs 是组成性表达的, 并且在应激条件下被进一步诱导, 包括温度升高。HSPs 被认为是从肽在细胞溶质中生成到肽与 ER 中的 I 型 MHC 结合的过程中陪伴肽的分子继电线路(relay line)<sup>88,89</sup>。最近, 已经将 HSP70、HSP60 和 GP96 确认为与抗原性蛋白或肽一起用于交叉激活的免疫佐剂<sup>90,91</sup>。在这个过程中, 重组的 hsp 或 gp96 肽复合物被抗原提呈细胞(APCs), 包括 DCs, 通过受体介导的经由 CD91<sup>92</sup>、CD40<sup>93</sup>、LOX-1<sup>94</sup> 或 TLR2/4<sup>95</sup> 的胞吞作用而内化。因此, 本发明人认识到高体温能够增强交叉激活, 并由此有助于能够增加肿瘤消退的疫苗的生产。

加热的黑色素瘤细胞。目前研究的目标已经成为制备改变的肿瘤细胞

抗体, 该抗体具有高免疫原性, 并且可用于装载用于接种疫苗的 DCs。

因此, 在已经确立了过表达 HSP70 的黑色素瘤细胞系实际上更具有免疫原性 (未显示) 的前提后, 本研究的重点现在转向开发在临床级条件下增加 HSP 表达的方法上来。因此确定了热处理黑色素瘤细胞是否能够提高负载的 DCs 的免疫原性。

对黑色素瘤细胞的热处理增加了 HSP70: 将黑色素瘤细胞在 42°C 下孵育 4 小时 (热休克)。通过 ELISA (未显示) 或细胞外染色 (图 7) 分析 HSPs 的表达, 正如所料, HSP70 显著上调<sup>85</sup>。通过桦木酸 (BA) 诱导, 由未处理的或热休克处理的细胞形成了杀死的黑色素瘤细胞 (黑色素瘤抗体)。

装载热处理黑色素瘤抗体的 DCs 快速产生能够杀死黑色素瘤细胞的 CTLs: 未负载的 DCs (CTL1), 装载对照黑色素瘤抗体的 DCs (CTL2) 以及装载热休克黑色素瘤抗体的 DCs (CTL3) 与纯化的初始 CD8+T 细胞一起培养 2 周。再刺激 T 细胞培养物一次 (总计两次刺激), 并在第二周添加可溶性 CD40 配体和低剂量 IL-7 (10U/ml, 所有培养物) 和 IL-2 (10U/ml)。在再刺激后的第 7 天 (共计培养的第 14 天) 分析 T 细胞。

值得注意的是 T 细胞与装载热处理的 Me275 黑色素瘤抗体的 DCs 一起培养, 但不与对照抗体一起培养, 能够杀死 Me275 细胞 (图 8)。杀死是对 T 细胞特异性的, 未发现 K562 溶解。而且, 两次刺激后, T 细胞能够杀死另一种 HLA-A\*0201 黑色素瘤细胞系 (Me290) (未显示), 表明能够发生针对共有抗原交叉激活。杀死是对黑色素瘤细胞特异性的, HLA-A\*0201 MCF7 乳腺癌细胞未被溶解 (未显示)。最终, 黑色素瘤细胞的杀死至少部分受到 I 型 MHC 表达的限制, 用阻断 mAb W6/32 的 I 型 MHC 预处理靶细胞导致在不同的 E:T 比下, Me275 杀死的抑制率 >60% (未显示)。

装载热休克的黑色素瘤抗体的 DCs 快速产生黑色素瘤特异性 CTLs: 用热处理的黑色素瘤抗体激活的初始 CD8+T 细胞能够特异性地有效杀死装载四种黑色素瘤肽, 但未装载 PSA 肽的 T2 细胞。黑色素瘤细胞系也被破坏了, 但是乳腺癌细胞系 MCF7 和 K562 未受影响 (图 9)。装载热处理杀死的黑色素瘤细胞的 DCs 有效地促使初始 CD8+T 成为黑色素瘤特异性细胞毒性 T 细胞。

四聚体结合分析证实了这种发现, 并表明高达 0.4% 的 CD8+T 细胞具

有对 MART-1 的特异性 (图 10)。然而, 几乎检测不到其它特异性。因此, 在第 2 次刺激后的第 7 天, 采用经四种黑色素瘤肽中的每一种, 或者对照 PSA 肽致敏的自体 DCs 再刺激 T 细胞。在培养 7 天后分析这些培养物。结果显示用黑色素瘤肽致敏的 DCs 促进生长可以扩增黑色素瘤特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞 (图 10), 而采用对照肽促进生长未观察到扩增增加 (未显示)。因此, 黑色素瘤细胞的热处理导致黑色素瘤特异性反应增强。

黑色素瘤细胞的热处理增强了肿瘤抗原的转录。最初假设交叉激活的强化归因于热休克蛋白表达增强, 研究表明纯化的 HSP70、HSP60 和 GP96 作为免疫佐剂与抗原性蛋白或肽一起用于交叉激活<sup>90,91</sup>, 发现上述假设与研究相一致。然而, 在对对照和 HSP70 转导的 Sk-Mel28 细胞进行微阵列分析后, 观察到几种包括 MAGE-A10 (未显示) 的肿瘤抗原的转录增加。因此, 通过实时 PCR 表达来检测编码 MAGE 肿瘤抗原家族的不同成员的 12 个基因。这些抗原包括 MAGE-B3、MAGE-A8 (图 11)、MAGE-B4 和 MAGE-A10 (未显示)。除对放线菌素 D 的敏感性之外, MAGE-B3 的表达增加至 1000 倍, 由此证明了转录的活化 (图 11)。

因此, 鉴定了源自 MAGE-A8 和 MAGE-A10 的 HLA-A\*0201 限制性肽, 并进行分析以确定装载热处理过的抗体的 DCs 能否激活特异性针对这两个表位的 CTLs。如图 12 所示, 与以未加热的黑色素瘤细胞激活的 CTLs 相比, 以热 HLA-A\*0201<sup>+</sup> Me290 或 HLA-A\*0201<sup>neg</sup> Sk-Mel28 细胞激活的 HLA-A\*0201<sup>+</sup> CTLs 表现出更高的 MAGE-A10 四聚体结合 CD8<sup>+</sup>T 细胞的频率。

因此, 高体温引起的肿瘤抗原转录增加可以归因于交叉激活的增强。装载热处理杀死的黑色素瘤抗体的 DCs 诱导自体初始 CD8<sup>+</sup>或 CD4<sup>+</sup>T 细胞产生的 IFN $\gamma$  的水平升高, IL-10 水平降低。调节/抑制 T 细胞被认为是成功给患者接种疫苗以对抗其癌症的主要障碍之一。如图 13 所示, 当与用未加热的肿瘤装载的 DC 制备的培养物相比时, 用热处理杀死的黑色素瘤细胞装载的 DC 疫苗使得 IL-10 分泌减少, 且 IFN $\gamma$  的生成增加。这些结果支持了在临床试验中体内进行 DC 装载的独特方法。因此, 用热处理的并且杀死的黑色素瘤细胞装载的 DC 疫苗导致广泛的黑色素瘤特异性 I 型 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫性的诱导。

本发明包括的自体树突状细胞源自具有 GM-CSF 和 IFN $\gamma$ , 并且装载了杀死的异体 Colo829 黑色素瘤细胞的单核细胞。自体树突状细胞是由单

核细胞生产的，所述单核细胞是由采血获得的外周血单核细胞通过淘析分离出的单核细胞。在封闭的系统中，在粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和干扰素  $\alpha$ （IFN $\alpha$ ）存在下培养单核细胞，所述单核细胞装载了加热的且杀死的异体 COLO829 肿瘤细胞并进行深低温保藏。疫苗储存在液氮（蒸气相）中。

树突状细胞是由采血产品生产的，采用 Elutra 系统（Gambro BCT）处理采血产品以分离出单核细胞。将单核细胞由淘析袋转移至培养袋（每袋体积 100ml），以  $1 \times 10^6/1\text{ml}$  体积培养 72 小时。在这个例子中，培养基包括添加了重组人 GM-CSF（100ng/ml; Berlex）和干扰素  $\alpha 2b$ （500IU/ml; Schering Plough）的无血清培养基。然而，技术人员会知道滴加的量、细胞暴露于 GM-CSF 和/或  $\alpha$  干扰素的时间点和时间长度以使活化最大化。在最初培养 24 小时后，疫苗装载了杀死的 Colo829 细胞。在总计 72 小时的培养之后，收获树突状细胞，用生理盐水洗掉培养基和细胞因子。将细胞再悬浮在包含 10% DMSO 和 10% Plasmalyte 的自体血清中，并且以  $30 \times 10^6$  细胞/管分配到冷冻管中。使用自动速率可控冷冻机冷冻冷冻管并储存在液氮中（蒸气相）。

表 1: 生产步骤

步骤	说明
I	分离—使用 COBE SPECTRA™通过采血获得自体外周血单核细胞。然后在 GAMBRO BCT ELUTRA™上从外周血单核细胞分离单核细胞。
II	培养/装载—通过将单核细胞与 GM-CSF 和 IFN $\alpha$ 一起培养 3 天生产树突状细胞。培养开始后 24 小时，将杀死的异体肿瘤细胞（COLO829）加到培养基中。
III	收获/深冷保藏—以多剂量多份数深冷保藏树突状细胞疫苗。然后使用速率可控的冷冻机冷冻管。

分离。采血—收集 PBMC。使用 COBE SPECTRA™通过采血获得自体外周血单核细胞。

淘析—分离单核细胞。然后在 GAMBRO BCT ELUTRA™上从外周血单核细胞中分离单核细胞。淘析系统是半自动化的封闭离心系统，其使用连续逆流淘析技术，根据尺寸和密度将细胞分成多个组分。Elutra 系统固

有的用途是富集单核细胞。该系统根据尺寸和密度自动收集 5 种细胞组分。组分 5 包含富集的单核细胞群 (~90%纯度, n=7 个的健康志愿者采血), 其被用于树突状细胞的生产。

培养—将包含组份 5 的袋离心, 将缓冲盐排出并弃去。将细胞再悬浮于 CellGenix DC 培养基中, 取样进行细胞计数, 确定活力和表型。一旦单核细胞的数量被确定, 将细胞稀释至浓度为  $1 \times 10^6$  单核细胞/mL, 并且无菌连接到 AFC VueLife 培养袋。加入浓度为 100ng/mL 的细胞因子 GM-CSF (Leukine®)(Berlex Inc.) 以及浓度为 500 IU/mL 的 IFN $\alpha$ -2b (INTRON A) (Schering-Plough Corp.), 并将细胞置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 用于培养的培养箱中。

装载—培养开始后 24 小时, 加入作为抗原来源的杀死的肿瘤细胞 (COLO829) 以及第 2 剂量的 GM-CSF 和 IFN $\alpha$ -2b。采用  $\gamma$  射线按批次制备杀死的 COLO829, 检测其无菌度以及无增殖能力, 正如通过氘代胸腺嘧啶脱氧核苷结合所测定的, 以  $50 \times 10^6$ /mL 的浓度用 10%DMSO 冷冻在冷冻管中, 并储存在蒸气相氮气里。解冻适当数量的冷冻管, 使得每 2 个树突状细胞装载 1 个杀死的肿瘤细胞。杀死的 COLO829 用培养基清洗 3 次, 并以小体积加到培养袋中。

树突状细胞的收获。培养开始后的 72 小时, 收获细胞并将疫苗深冷保藏。将培养袋离心, 上清液挤出, 用生理盐水清洗细胞 3 次。清洗包括将生理盐水袋与培养袋相连, 在生理盐水中再悬浮细胞, 离心培养袋, 并将生理盐水挤到废物收集袋中。第三次清洗后, 将细胞再悬浮在作为冷冻溶液稀释剂的 Plasmalyte 中。取样用于细胞计数和确定活力。

速率可控的冷冻—使用速率可控的冷冻机冷冻冷冻管。将管置于冷冻室中, 液氮通过电磁阀进入冷冻室。由于蒸发几乎是瞬时的, 控制液氮进入冷冻室的速率就直接控制了热吸收速率和从冷冻室中移出的速率以及冷冻室的内容物。

深冷保藏。以  $30 \times 10^6$  细胞/mL 的浓度深冷保藏细胞。一旦细胞数量确定, 用自体血清将细胞稀释至最终浓度的 2 倍。制备包含体积与细胞体积相等的冷冻溶液的袋子。冷冻溶液为含有 20%DMSO 和 20%Plasmalyte 的自体血清。快速地操作, 将冷冻溶液加到细胞袋中并将细胞转移至标记的冷冻管中。DMSO 的最终浓度为 10%。使用自动化速率可控的冷冻机以 1°C/分钟的速率冷冻冷冻管, 并储存在蒸气相氮气中。

储存—将冷冻管从速率可控的冷冻机转移至液氮罐用于长期储存。库存控制由经过 GMP 培训的人员采用数据库来维护。

**表 2: 生产的检验批次**

批号	生产地点	生产日期	生产规模	细胞的总产量	该批用途
ND66	BIIR	05/25/04	1/3 的新鲜组份 5 $2 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	过程检验
ND68	BIIR	05/27/04	1/6 的新鲜组份 5 $3 \times 10^8$	$1.31 \times 10^8$	过程检验
ND70	BIIR	06/01/04	1/3 的新鲜组份 5 $4 \times 10^8$	$2.14 \times 10^8$	过程检验
ND71	BIIR	06/02/04	1/9 的新鲜组份 5 $4 \times 10^8$	$3.39 \times 10^8$	过程检验
ND72	BIIR	06/03/04	1/4 的新鲜组份 5 $4 \times 10^8$	$1.43 \times 10^8$	过程检验
ND73	BIIR	06/08/04	1/6 的新鲜组份 5 $4 \times 10^8$	$1.95 \times 10^8$	过程检验
ND80	BIIR	10/21/04	解冻的组份 5 $51 \times 10^6$	$23 \times 10^6$	过程检验
ND80	BIIR	10/28/04	解冻的组份 5 $46 \times 10^6$	$34 \times 10^6$	过程检验
ND84	BIIR	11/22/04	10%的新鲜组份 5 $2.5 \times 10^8$	$153 \times 10^6$	过程检验
ND84	BIIR	12/06/04	解冻的组份 5 $44 \times 10^6$	$13 \times 10^6$	过程检验
ND85	BIIR	12/09/04	5%的新鲜组份 5 $1.0 \times 10^8$	$61 \times 10^6$	过程检验
ND86-1	BIIR	12/19/04	5%的新鲜组份 5 $1.0 \times 10^8$	$100 \times 10^6$	过程检验
ND86-2	BIIR	12/20/04	1/3 的新鲜组份 5 $0.5 \times 10^8$	$39 \times 10^6$	过程检验

ND86-1	BIIR	01/10/05	解冻的组份 5 $25 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	过程检验
ND89	BIIR	01/15/05	1/3 的新鲜组份 5 $7 \times 10^8$	$6.8 \times 10^8$	过程检验
ND90	BIIR	02/04/05	1/3 的新鲜组份 5 $3 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$	过程检验

活性药物成分的最终剂型的稳定性。说明：包含 1mL 深冷储藏细胞的管在 37° 下迅速解冻，并立即吸入包含 9mL 无菌生理盐水的注射器中（注射前细胞在临床现场立即被解冻的条件）。生理盐水为室温或者 4℃（冷藏的）。然后将细胞平均地分配到 6 个管中，并保持在室温下或冷藏。然后在不同的时间点分析稀释的细胞。

表 3: 作为解冻后时间的函数的产物活力

%活力

	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟	75 分钟
实施例 1	85	87	85	88	87	78
实施例 2	88	87	78	90	88	86
实施例 3	89	92	88	88	93	80
实施例 4	91	89	89	86	86	ND
实施例 5	87	87	82	86	86	ND
实施例 6	ND	ND	ND	ND	86	ND
实施例 7	ND	ND	ND	ND	86	ND
实施例 8	ND	ND	ND	ND	88	ND
实施例 9	ND	ND	ND	ND	94	ND
实施例 10	ND	ND	ND	ND	82	ND
实施例 11	ND	ND	ND	ND	72	ND
平均值	88.0	88.4	84.4	87.6	86.2	81.3
标准偏差	2.24	2.19	4.51	1.67	5.78	4.16

**表 4: 产物的回收: 作为解冻后时间的函数的有活力的细胞  
(相对于冷冻前每管的细胞数量)  
有活力的细胞的回收%**

	0 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟	75 分钟
实施例 1	100	60	68.5	32	36	55
实施例 2	95	55	25	49.6	34	35
实施例 3	60	82	86.6	38	34	16.3
实施例 4	85	62.5	59	70	55	ND
实施例 5	55	46	43	55	45	ND
实施例 6	ND	ND	ND	ND	42	ND
实施例 7	ND	ND	ND	ND	36	ND
实施例 8	ND	ND	ND	ND	31	ND
实施例 9	ND	ND	ND	ND	86	ND
实施例 10	ND	ND	ND	ND	89	ND
实施例 11	ND	ND	ND	ND	98	ND
平均值	79.0	61.1	56.4	48.9	53.3	35.4
标准偏差	20.43	13.28	23.62	14.89	25.26	19.35

**表 5: 混合的淋巴细胞与 CD4+T 细胞的反应中的产物效价  
MLR (cpm)**

	5000DC	2000DC	500DC
实施例 1	262,340	245,887	189,296
实施例 4	194,437	91,980	22,127
实施例 5	69,407	47,926	36,717
平均值	175,395	128,598	82,713
标准偏差	97,886	103,936	92,591



表 6: 在室温和 4℃ 下解冻时产物的回收和活力

A	%回收					
	室温			4℃		
	平均值	标准偏差	范围	平均值	标准偏差	范围
0 分钟	79.0	20.43	55.0-100.0	49.5	14.84	35.0-65.0
15 分钟	61.1	13.28	46.0-82.0	38.0	22.03	7.3-63.5
30 分钟	56.4	23.62	25.0-86.6	40.5	25.76	15.0-80.0
45 分钟	48.9	14.89	32.0-70.0	52.9	39.57	9.6-115
60 分钟	40.8	9.15	34.0-55.0	49.5	47.40	7.3-126
B	%活力					
	室温			4℃		
	平均值	标准偏差	范围	平均值	标准偏差	范围
0 分钟	88.0	2.24	85-91	88.6	3.36	85-94
15 分钟	88.4	2.19	87-92	81.2	14.24	56-90
30 分钟	84.4	4.51	78-89	85.8	3.27	81-90
45 分钟	87.6	1.67	86-90	87.8	3.83	83-93
60 分钟	88.0	2.92	86-93	85.8	4.15	80-91

可以接受的批次释放结果为室温下解冻后的 15 分钟，回收至少 50% 的活细胞和至少 50% 的活力。对在冷冻过程的开始（第 1）、中间（第 2）和最终（第 3）获得的三个管进行释放实验。

冷冻疫苗的表征。为了进一步表征冷冻的疫苗，除了上述用 CD4+T 细胞刺激 MLR 的活力和能力外，还可以分析一种或多种以下指标：（1）形态学和表型；（2）细胞因子分泌；和/或（3）诱导自体 CD8+T 细胞分化的能力。

图 14 为概述本发明全部疫苗生产过程的流程图。在步骤 10 中，选择患者参与疫苗生产过程。在步骤 12，对患者进行采血以分离用于装载的细胞，用于装载的细胞在步骤 14 中获得并筛选。步骤 10、12 和 14 可以在第 1 天内进行。在接着的几天内，培养细胞（步骤 16）并用步骤 16 中获得的抗原和培养物装载（步骤 18），所述抗原是通过装载抗原的树突状细胞提呈的。接着，在步骤 20 中，细胞可以被冷冻并储存以备将来使用，

和/或最后在步骤 22 中解冻并释放。最终，细胞疫苗可以在步骤 24 中用于注射。在一个实施方案中，全部过程可以在大约 10 天内发生。

图 15 显示了用于生产本发明的疫苗的详细步骤和时间安排，其中用淘析袋提供细胞（步骤 26），并将细胞转移至一个或多个培养袋中（步骤 28）。在步骤 30 中，例如，在 3 天培养过程中，零小时加入细胞因子。细胞暴露于细胞因子后，细胞暴露于杀死的靶细胞，例如，Colo629 以及任选的其它细胞因子。最后，约 72 小时后可以收获细胞和/或对其进行冷冻、检验、灭菌等。

培养袋中生成了未装载或装载杀死的 Colo829 细胞的 IFN $\alpha$ -DCs，冷冻并于 -80 $^{\circ}$ C 下储存 1、2 和 3 周。冷冻的细胞在 1 周、2 周和 3 周解冻，并通过 Giemsa 染色评价它们的形态。如图 16 所示，装载和未装载的 IFN-DCs 在冷冻/解冻后保持 DC 形态。

图 17 显示了用所示抗体表面染色和流式细胞术分析的冷冻/解冻的疫苗表型的例子。在 IFN- $\alpha$  存在下，DCs 显示出与它们的世代一致的预期表型，包括：CD1 分子的表达（CD1a 和 CD1b/c），CD14 的表达与作为间质性 DCs 的 IFN-DCs 一致；高水平的 HLA-DR 和共刺激 CD80 和 CD86 分子。因此，冷冻/解冻疫苗保持 IFN-DCs 的形态和表型。

一旦与 T 细胞相互作用，DCs 分泌调节 T 细胞分化的细胞因子。因此，当冷冻的/解冻的 IFN-DCs（装载或未装载杀死的 Colo829 细胞）暴露于可溶性 CD40 配体，而不是 T 细胞信号时，我们评价其分泌的细胞因子。培养 6 和 24 小时后，使用 Multiplex Cytokine Analysis（Luminex）评价上清液。选择三种分泌水平 >1ng/ml 的主要细胞因子，包括 IL-8（~10ng/ml）、IL-6 和 MIP1 $\alpha$ 。正如我们的临床前研究所预期的，IFN-DCs 分泌 IL-7（图 19）。另外，可以检测到低水平的 IL-10（<100pg/ml）。然而，IL-10 的分泌并不归因于装载了杀死的 Colo829 细胞，因为未负载或负载的 DCs 的培养物中的水平相似（图 18）。最终，IL-10 分泌看起来与供体相关（数据未显示）。

DC 疫苗的最根本参数为其向自体 CD8 $^{+}$ T 细胞提呈肿瘤抗原并诱导它们分化的能力。因此，冷冻的/解冻的 HLA-A\*0201+IFN-DCs 用 LPS（5 或 10ng/ml）刺激 24 小时，在最后 10 小时内用 MART-1 肽致敏并用作纯化的自体 CD8 $^{+}$ T 细胞的刺激物。在第 7 天促进 T 细胞培养物生长一次，添加 IL-7 和 IL-2，在促进生长后的第 5 天通过四聚体染色评价 T 细胞的

分化。如图 19 所示，在 DC:T 细胞比为 1:10（即每  $10^6$  个 T 细胞有  $10^5$  个 DCs）时，在培养的第 12 天，~2%的 CD8+T 细胞特异性结合 MART-1 四聚体。而且，甚至可以在 DC:T 细胞比低至 1:33 时，即每  $10^6$  个 T 细胞有 3000 个 DCs 时可以观察到 MART-1 特异性 CD8+T 细胞的分化。这些结果表明冷冻的 IFN-DCs 保持它们的形态、表型和扩增抗原特异性 CD8+T 细胞的能力。

关于产物生产的可行性和在患有转移性黑色素瘤的患者中释放的初步数据。至今，我们已经收集了有关患有 IV 期黑色素瘤的 7 名患者的产物生成的数据。这些是正在进行的临床试验过程中获得的初步结果（IRB#005-065, IND#12339）。获得这些初步的批次生产数据使用了来自患有转移性黑色素瘤并进行化疗的患者的细胞，表明了使用来自上文描述的健康供体的细胞开发的方法的可行性。之后的表格总结了至今使用患者的原料生产的批次。

**表 7: 患有 IV 期黑色素瘤的患者: 从淘析组份 5 回收的单核细胞**

Pt	细胞浓度 $\times 10^6$	%CD14+
005-065-02-001*	58	87
005-065-02-002	2150	88
005-065-02-004	4150	53
005-065-02-005	2850	73
005-065-02-006	2000	77
005-065-02-007	1600	88
005-065-02-008	3650	80
<b>平均值</b>	<b>2351</b>	<b>78%</b>
<b>SD</b>	<b>1364</b>	<b>13%</b>

\*由于采血产品的质量差，在淘析后该患者的所有组份中都出现单核细胞。为了确保足够数量的疫苗，收集所有的组份用于培养。

表 8: 患有 IV 期黑色素瘤的患者: 至今生产的批次中 DC 回收率

Pt	袋数量	培养的细胞数量 × 10(6)	回收的细胞数量 × 10(6)	%回收	冷冻前 %活力	DC 数量 × 10(6)/冷冻管	管数量
005-065-02-001*	2	199	75	38	81	20	7
	3	F4&5 256	F4&5 67	26	69	10	1
005-065-02-002	10	1000	537	54	90	30	18
005-065-02-004	17	1700	788	46	91	32	21
005-065-02-005	12	1200	624	52	94	31	20
005-065-02-006	10	100	564	56	94	27	19
005-065-02-007	16	1600	917	57	98	31	30
005-065-02-008	16	1600	928	58	85	35	28
平均值		1350	726	54	92		
SD		321	175	4	5		

表 9: 患有 IV 期黑色素瘤的患者: 无 DMSO 清洗解冻后的 DC 活力

患者编号	管数量	生产日期	解冻后 %活力
005-065-02-001	8	09/30/05	66
005-065-02-003	18	10/02/05	65
005-065-02-003	1	10/02/05	63
005-065-02-004	1	10/09/05	79
005-065-02-004	10	10/09/05	76
005-065-02-004	21	10/09/05	77
005-065-02-005	1	10/20/05	63
005-065-02-005	10	10/20/05	65
005-065-02-005	20	10/20/05	70
005-065-02-006	1	10/27/05	50
005-065-02-006	9	10/27/05	56
005-065-02-006	19	10/27/05	47

005-065-02-007	1	11/20/05	90
005-065-02-007	18	11/20/05	91
005-065-02-007	30	11/20/05	88
005-065-02-008	1	12/21/05	67
005-065-02-008	14	12/21/05	72
<b>平均值</b>			<b>70</b>
<b>SD</b>			<b>13</b>

表 10: 患有 IV 期黑色素瘤的患者: 无 DMSO 清洗解冻后的 DC 回收率

患者编号	管	%回收
005-065-02-001	1	100
005-065-02-003	18	77
005-065-02-003	1	97
005-065-02-004	1	100
005-065-02-004	10	100
005-065-02-004	21	100
005-065-02-005	1	68
005-065-02-005	10	93
005-065-02-005	20	90
005-065-02-006	1	47
005-065-02-006	9	63
005-065-02-006	19	69
005-065-02-007	1	100
005-065-02-007	18	100
005-065-02-007	30	100
005-065-02-008	1	57
005-065-02-008	14	56
005-065-02-008	26	72
<b>平均值</b>		<b>83</b>
<b>SD</b>		<b>19</b>

## 发明人的参考文献

- Banchereau, J., Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Alexandre, R., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R., and Fay, J. (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Research*. 61:6451-6458.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Interferon alpha and dendritic cells in SLE. *Science*. 294: 1540-1543.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C, Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2001). Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J.Exp.Med*. 194: 1013-20.
- Chomarat, P., Dantin, C, Bennett, L., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2003) TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol*. 171: 2262-9
- Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Wittkowski, K., Steinman, R., Fay, J., and Banchereau, J. (2003). CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine permits rapid induction of T cell immunity in patients with metastatic melanoma *J. Immunotherapy*. 26(5):432-9.
- Neihardt-Berard, E-M., Berard, F., Banchereau, J. and Palucka, A.K. (2004) Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R322-R328.
- Paczesny, S., Banchereau, J., Fay, J., and Palucka, A.K. (2004) Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med* 199(11):1503-11
- Paczesny, S., Shi, H., Saito, H., Mannoni, P., Fay, J., Banchereau, J and Palucka, AK. (2005) Measuring Melanoma-specific CTLs Elicited by Dendritic Cell Vaccines with a Tumor Inhibition Assay in vitro. *J. Immunotherapy* 28(2):148-157
- Palucka, AK., Dhodapkar, M., Paczesny, S., Ueno, H., Fay, J., and Banchereau,

J. (2005) Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34+ progenitor derived dendritic cells can expand long-lived melanoma-specific CD8+ T cell immunity in patients with metastatic melanoma. *J. Immunotherapy* 28(2):158-168

Shi, H., Palucka, AK, Chapel, S., Bagnis, C, Mannoni, P., Davoust, J., and Banchereau, J. (2005) Enhanced cross-priming of melanoma-specific CTLs by dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells that were treated with hyperthermia. *J Immunol* (修订中)

Fay, J., Palucka, A.K., Paczesny, S., Ueno, H., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Steinman, R., and Banchereau, J. (2005) Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with peptide-pulsed CD34-DCs. *Cancer Immunol Immunother*

Banchereau, J., Ueno, H., Dhodapkar, M., Connolly, J.E., Finholt-Perry, J., Klechevsky, E., Blanck, J-P., Johnston, DA., Steinman, R., Palucka, AK., Fay, J. (2005) Immune and clinical outcomes in patients with stage FV melanoma vaccinated with peptide-pulsed dendritic cells derived from CD34+ progenitors and activated with type I interferon. *J Immunother*.

Dubsky, P., Saito, H., Dantin, C, Connolly, J., Banchereau, J. and Palucka, AK. (2005) IL-15-induced human dendritic cells efficiently prime low frequency melanoma-specific naïve CD8+T cells to differentiate into cytotoxic T cells. 已提交

Saito, H., Dubsky, P., Dantin, C, Finn, OJ., Banchereau, J. and Palucka, AK. Cross-priming of Cyclin B1, MUC-1 and survivin peptide-specific CD8+T cells by dendritic cells loaded with killed allogeneic breast cancer cells. 已提交.

Ueno, H., Connolly, JE., Vence, L., Palucka, AK., and Banchereau, J. (2005) Global assessment of tumor-antigen specific human T cell repertoire. 准备中

Palucka, AK., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J-P., Johnston, DA., Fay, J., and Banchereau, J. (2005) Immune and clinical responses in patients with stage IV melanoma vaccinated with dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. 修订中

其它参考文献:

1. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-96 (1991).
2. Banchereau, J. 等 Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
3. Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255-8 (2001).
4. Caux, C. 等 CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: H Functional analysis. *Blood* **90**, 1458-70 (1997).
5. Jegou, G. 等 Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-34 (2003).
6. Fernandez, N. C. 等 Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* **5**, 405-11 (1999).
7. Kadowaki, N. 等 Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* **193**, 1221-6 (2001).
8. Davis, I. D., Jefford, M., Parente, P. & Cebon, J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* **73**, 3-29 (2003).
9. Gilboa, E., Nair, S. K. & Lyerly, H. K. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* **46**, 82-7 (1998).
10. Lu, W., Arraes, L. C, Ferreira, W. T. & Andrieu, J. M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**, 1359-1365 (2004).
11. Townsend, A. R., Gotch, F. M. & Davey, J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* **42**, 457-67 (1985).
12. Boon, T., Cerottini, J. C, Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **12**, 337-65 (1994).
13. Rosenberg, S. A. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* **18**, 175-82 (1997).
14. Pardoll, D. M. Cancer vaccines. *Nat Med* **4**, 525-31 (1998).



15. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* **11**, 263-70 (1999).
16. Finn, O. J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* **3**, 630-41 (2003).
17. Antonia, S., Mule, J. J. & Weber, J. S. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr Opin Immunol* **16**, 130-6 (2004).
18. Hsueh, E. C. & Morton, D. L. Antigen-based immunotherapy of melanoma: Canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine. *Semin Cancer Biol* **13**, 401-7 (2003).
19. Sondak, V. K. & Sosman, J. A. Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine. *Semin Cancer Biol* **13**, 409-15 (2003).
20. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711 (2003).
21. Caux, C, Dezutter-Dambuyant, C, Schmitt, D. & Banchereau, J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-61 (1992).
22. Romani, N. 等 Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**, 83-93 (1994).
23. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-18 (1994).
24. Peters, J. H. 等 Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol* **329**, 275-80 (1993).
25. Nestle, F. O. 等 Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate- pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**, 328-32 (1998).
26. Thurner, B. 等 Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**, 1669-78 (1999).
27. Mohamadzadeh, M. 等 Interleukin 15 skews monocyte differentiation into

- dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* **194**, 1013-20 (2001).
28. Santini, S. M. 等 Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCED mice. *J Exp Med* **191**, 1777-88. (2000).
29. Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C, Topalian, S. L. & Rosenberg, S. A. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* **284**, 1351-4 (1999).
30. Zitvogel, L. 等 Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**, 594-600 (1998).
31. Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A. & Economou, J. S. Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene Ther* **2**, 57-78 (2002).
32. Bockowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. & Gilboa, E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* **184**, 465-72 (1996).
33. Regnault, A. 等 Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**, 371-80 (1999).
34. Fong, L. & Engleman, E. G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* **18**, 245-73 (2000).
35. Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-9 (1998).
36. Berard, F. 等 Cross-Priming of Naive CD8 T Cells against Melanoma Antigens Using Dendritic Cells Loaded with Killed Allogeneic Melanoma Cells. *J Exp Med* **192**, 1535-1544(2000).
37. Neidhardt-Berard, E. M., Berard, F., Banchereau, J. & Palucka, A. K. Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res* **6**, R322-8 (2004).
38. Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. & von Boehmer, H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* **3**, 756-63 (2002).

39. Jordan, M. S. 等 Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2**, 301-6 (2001).
40. Bensinger, S. J., Bandeira, A., Jordan, M. S., Caton, A. J. & Laufer, T. M. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)/25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* **194**, 427-38 (2001).
41. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-6 (2003).
42. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-61 (2003).
43. Steitz, J., Brack, J., Lenz, J., Knop, J. & Tuting, T. Depletion of CD25(+)/CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res* **61**, 8643-6 (2001).
44. Suttmoller, R. P. 等 Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* **194**, 823-32 (2001).
45. Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T. & Gallimore, A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* **32**, 3267-75 (2002).
46. Ghiringhelli, F. 等 CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* **34**, 336-44 (2004).
47. Somasundaram, R. 等 Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* **62**, 5267-72 (2002).
48. Camara, N. O., Sebille, F. & Lechler, R. I. Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation. *Eur J Immunol* **33**, 3473-83 (2003).
49. Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. & Hirai, H. Human

- CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* **63**, 4516-20 (2003).
50. Wolf, A. M. 等 Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* **9**, 606-12 (2003).
51. Viguier, M. 等 Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>(high)</sup> regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* **173**, 1444-53 (2004).
52. Woo, E. Y. 等 Regulatory CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* **61**, 4766-72 (2001).
53. Curiel, T. J. 等 Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**, 942-9 (2004).
54. Wang, H. Y. 等 Tumor-specific human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* **20**, 107-18 (2004).
55. Woo, E. Y. 等 Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* **168**, 4272-6 (2002).
56. Dieckmann, D., Bruett, C. H., Ploettner, H., Lutz, M. B. & Schuler, G. Human CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [修正的]. *J Exp Med* **196**, 247-53 (2002).
57. Jonuleit, H. 等 Infectious tolerance: human CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4<sup>(+)</sup> T helper cells. *J Exp Med* **196**, 255-60 (2002).
58. Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C, Narula, S. & Levings, M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* **182**, 68-79 (2001).
59. Groux, H. 等 A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-42 (1997).
60. Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. & Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-40 (1994).
61. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of

- interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 1213-22 (2000).
62. Wakkach, A. 等 Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* **18**, 605-17 (2003).
63. Monti, P. 等 Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup> regulatory dendritic cell. *J Immunol* **172**, 7341-9 (2004).
64. Dhodapkar, M. V. & Steinman, R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* **100**, 174-7 (2002).
65. North, R. J. The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. *Adv Immunol* **35**, 89-155 (1984).
66. Berd, D., Maguire, H. C, Jr. & Mastrangelo, M. J. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide. *Cancer Res* **46**, 2572-7 (1986).
67. Berd, D., Maguire, H. C, Jr., McCue, P. & Mastrangelo, M. J. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol* **8**, 1858-67 (1990).
68. Morton, D. L. 等 Polyvalent melanoma vaccine improves survival of patients with metastatic melanoma. *Ann N Y Acad Sci* **690**, 120-34 (1993).
69. Mitchell, M. S. Perspective on allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy. *Semin Oncol* **25**, 623-35 (1998).
70. Bystry, J. C. 等 Immunogenicity of a polyvalent melanoma antigen vaccine in humans. *Cancer* **61**, 1065-70 (1988).
71. Livingston, P. O. 等 Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in-melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2911-5 (1987).
72. Hoon, D. S., Foshag, L. J., Nizze, A. S., Bohman, R. & Morton, D. L. Suppressor cell activity in a randomized trial of patients receiving active specific immunotherapy with melanoma cell vaccine and low dosages of

- cyclophosphamide. *Cancer Res* **50**, 5358-64 (1990).
73. Holtl, L. 等 Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 663-70 (2005).
74. Siegal, F. P. 等 The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood [在进行引证]. *Science* **284**, 1835-7 (1999).
75. Cella, M. 等 Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* **189**, 821-9 (1999).
76. Montoya, M. 等 Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263-71 (2002).
77. Sprent, J., Tough, D. F. & Sun, S. Factors controlling the turnover of T memory cells. *Immunol Rev* **156**, 79-85 (1997).
78. Marrack, P., Kappler, J. & Mitchell, T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* **189**, 521-30 (1999).
79. Le Bon, A. 等 Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**, 461-70 (2001).
80. Proietti, E. 等 Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. *J Immunol* **169**, 375-83 (2002).
81. Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Science* **294**, 1540-3 (2001).
82. Bennett, L. 等 Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**, 711-23 (2003).
83. Karaghiosoff, M. 等 Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* **4**, 471-7 (2003).
84. Woodhall, B., Pickrell, K. L., Georgiade, N. G., Mahaley, M. S. & Dukes, H. T. Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy; application to external cancers of head and face structures. *Ann Surg* **151**, 750-9 (1960).
85. Mattson, D. 等 Heat shock and the activation of AP-1 and inhibition of NF- $\kappa$ B DNA-binding activity: possible role of intracellular redox status. *Int*

- J Hyperthermia* **20**, 224-33(2004).
86. Gius, D., Mattson, D., Bradbury, C. M., Smart, D. K. & Spitz, D. R. Thermal stress and the disruption of redox-sensitive signalling and transcription factor activation: possible role in radiosensitization. *Int J Hyperthermia* **20**, 213-23 (2004).
87. Berwin, B. & Nicchitta, C. V. To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen-presenting cells. *Traffic* **2**, 690-7 (2001).
88. Basu, S. & Srivastava, P. K. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress Chaperones* **5**, 443-51 (2000).
89. Frydman, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**, 603-47 (2001).
90. Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E. & Li, Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* **39**, 93-8 (1994).
91. Srivastava, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses. *Annu Rev Immunol* **20**, 395- 425 (2002).
92. Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. & Srivastava, P. K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**, 303-13 (2001).
93. Becker, T., Haiti, F. U. & Wieland, F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* **158**, 1277-85 (2002).
94. Delneste, Y. 等 Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**, 353-62 (2002).
95. Asea, A. 等 Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**, 15028-34 (2002).

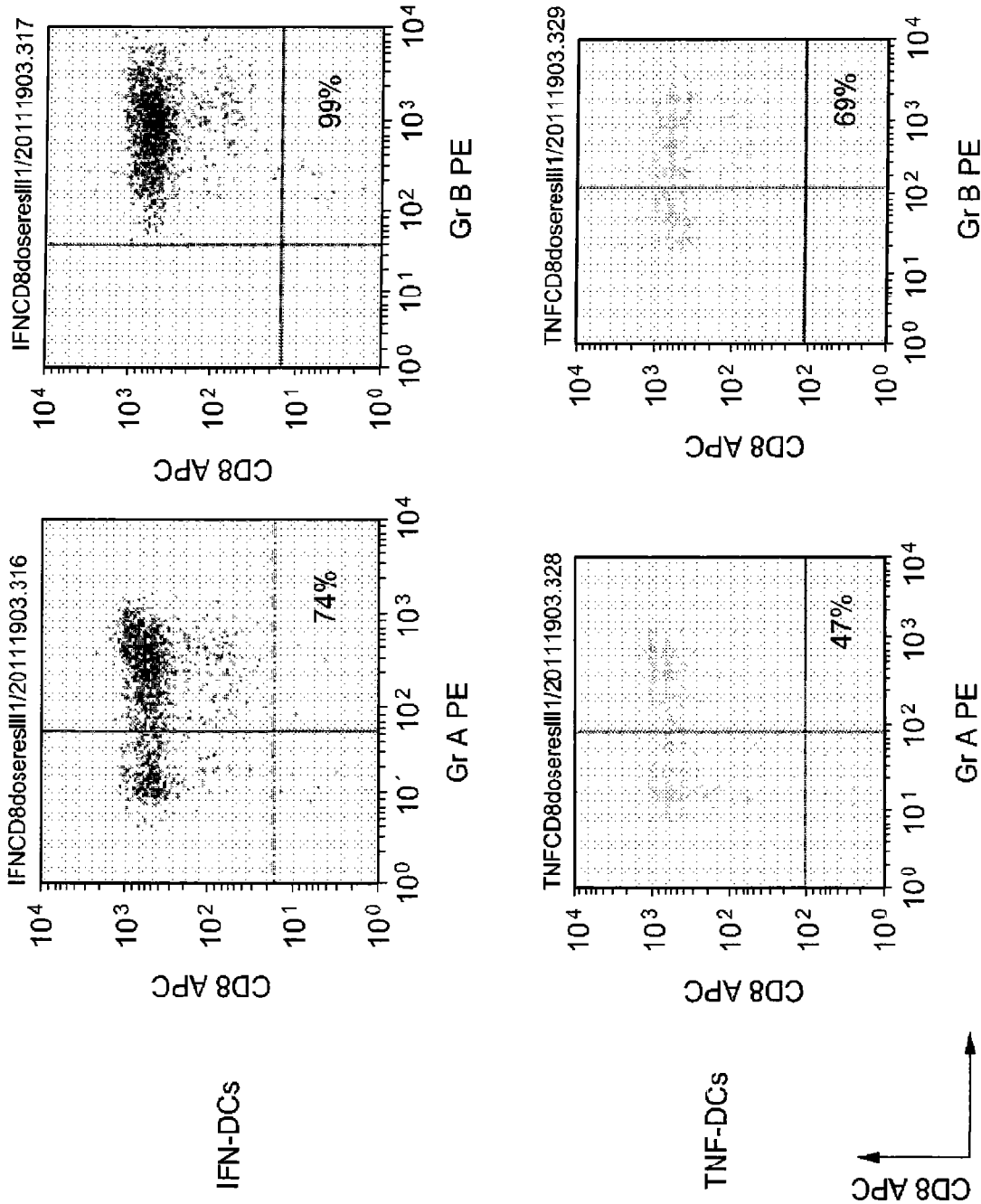


图1



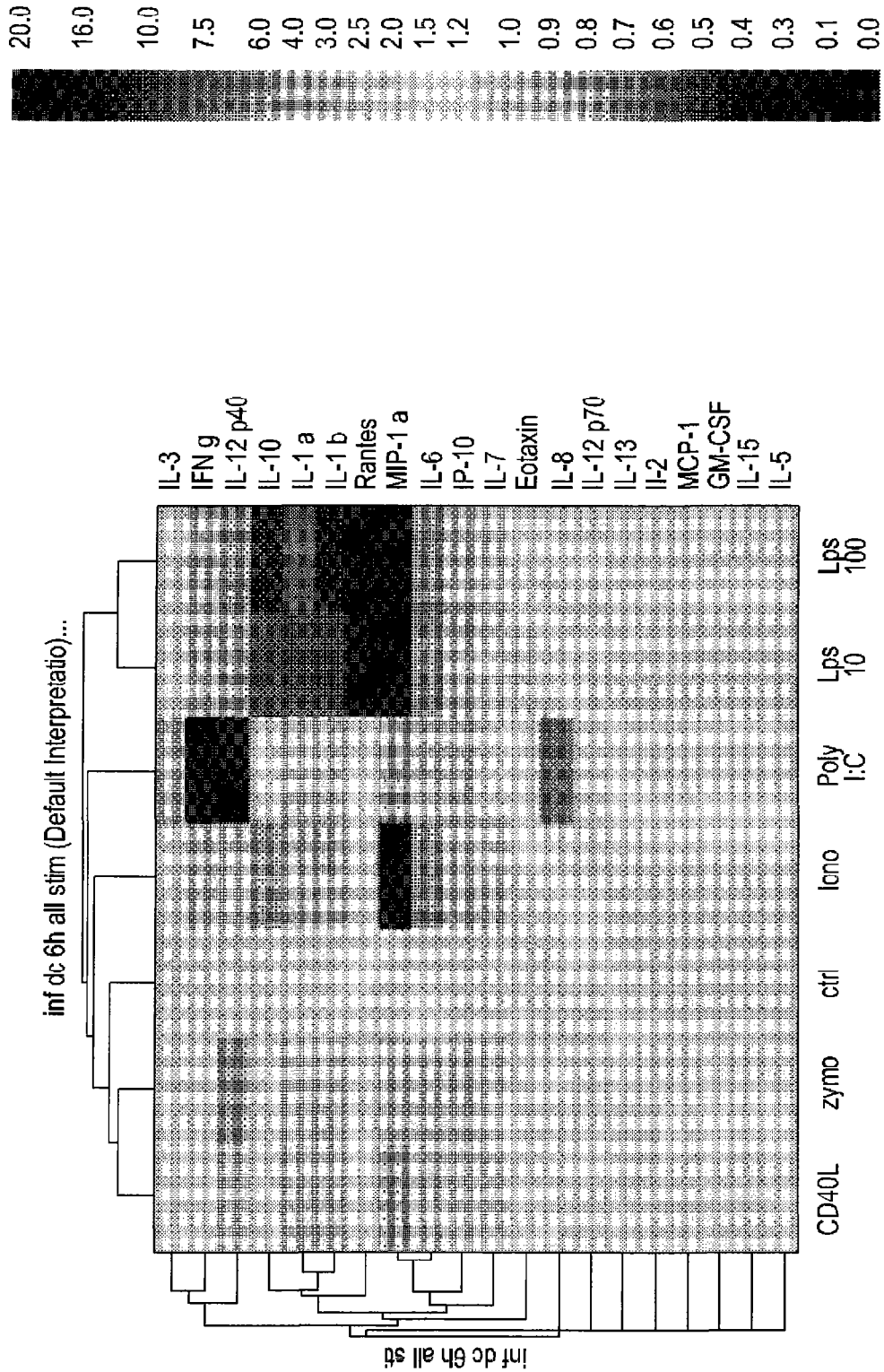


图 2

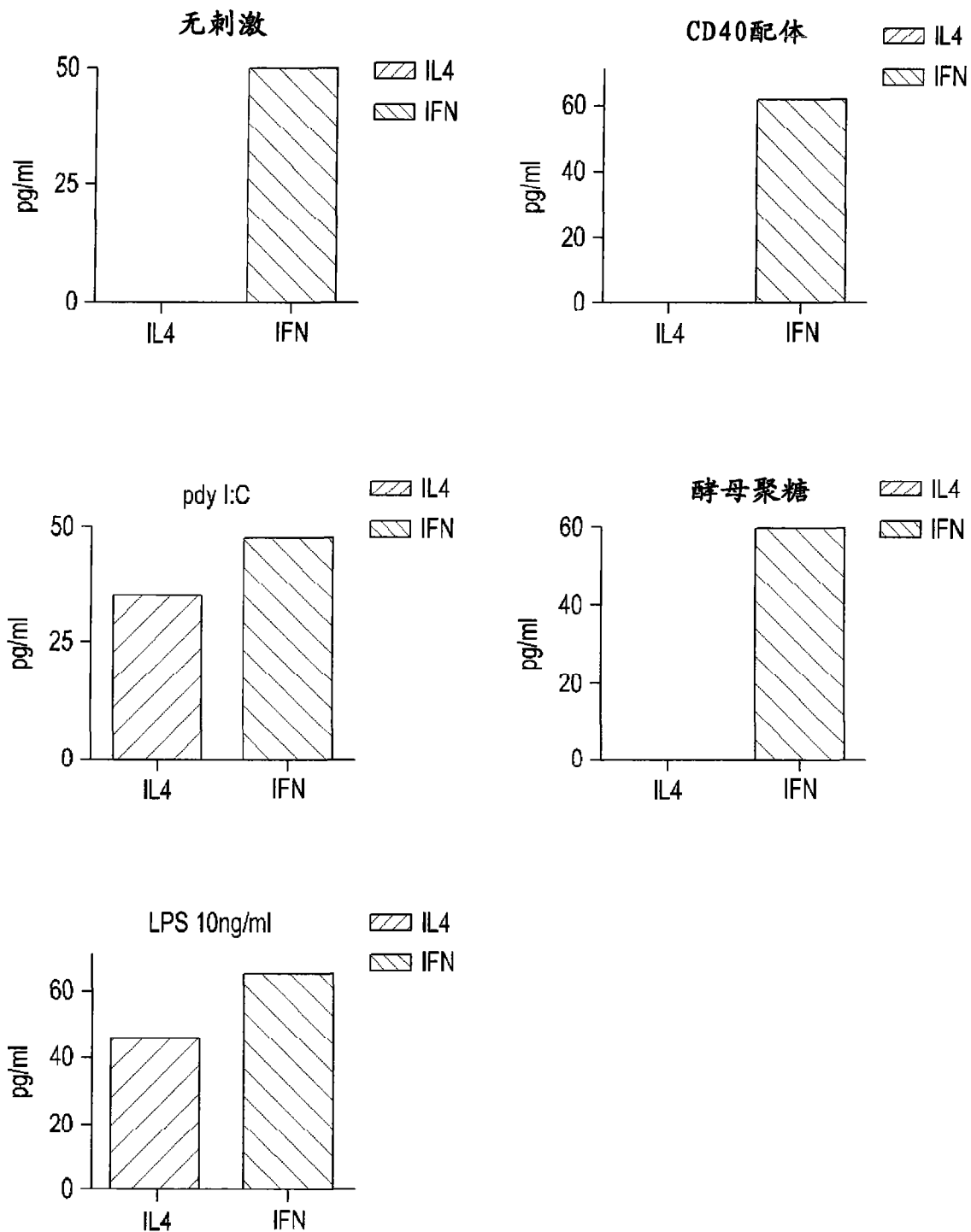


图3

%特异性溶解

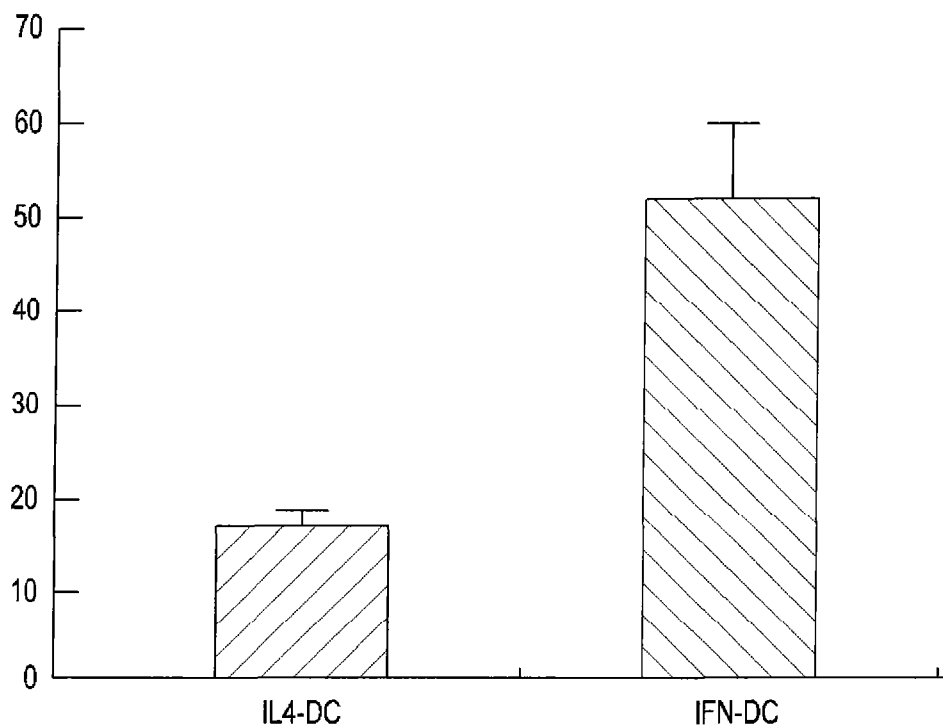


图4

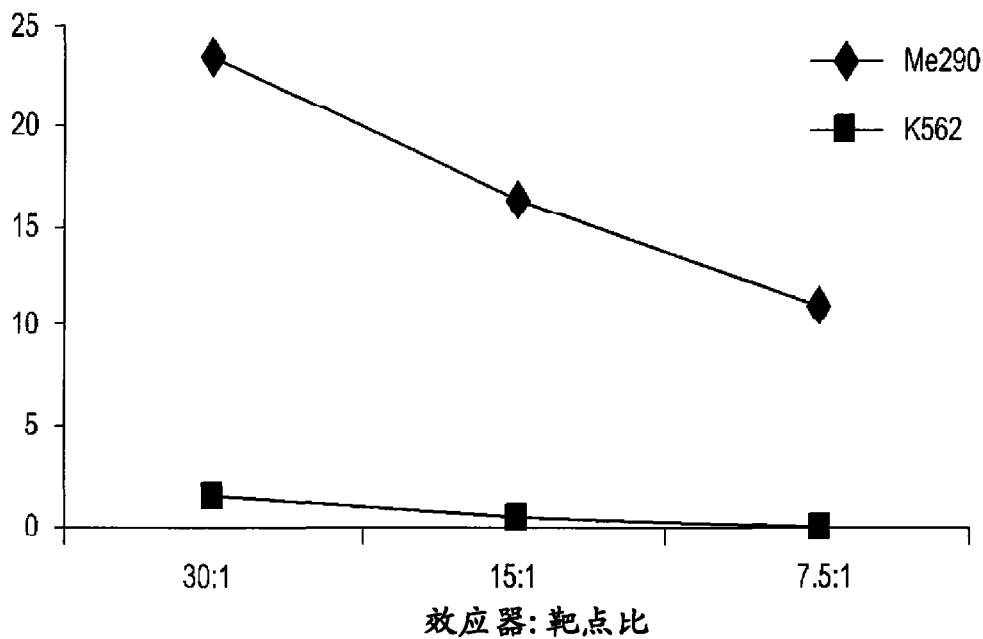


图5

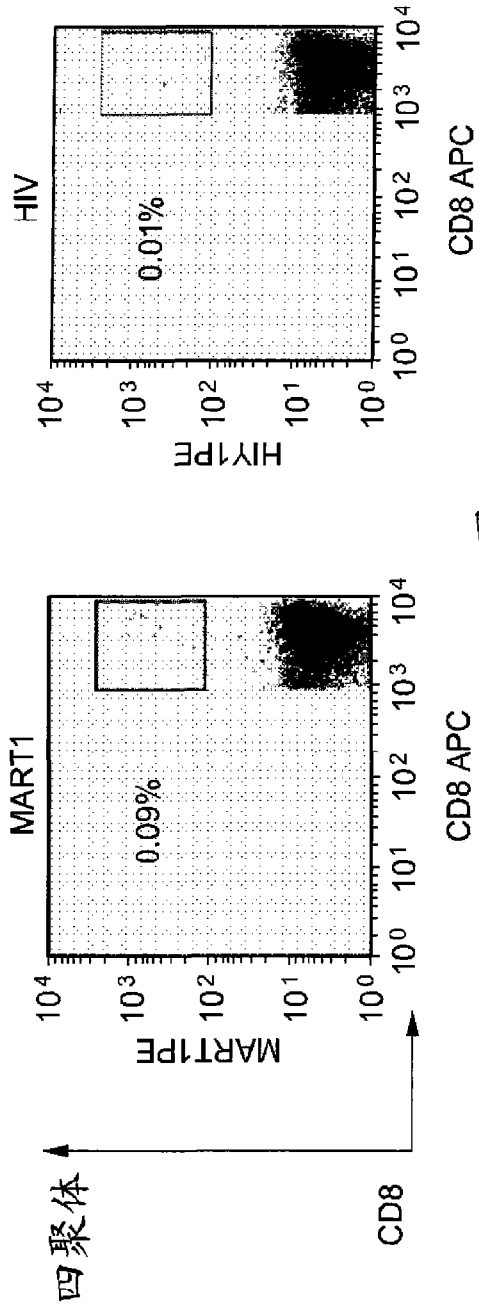


图6

四聚体

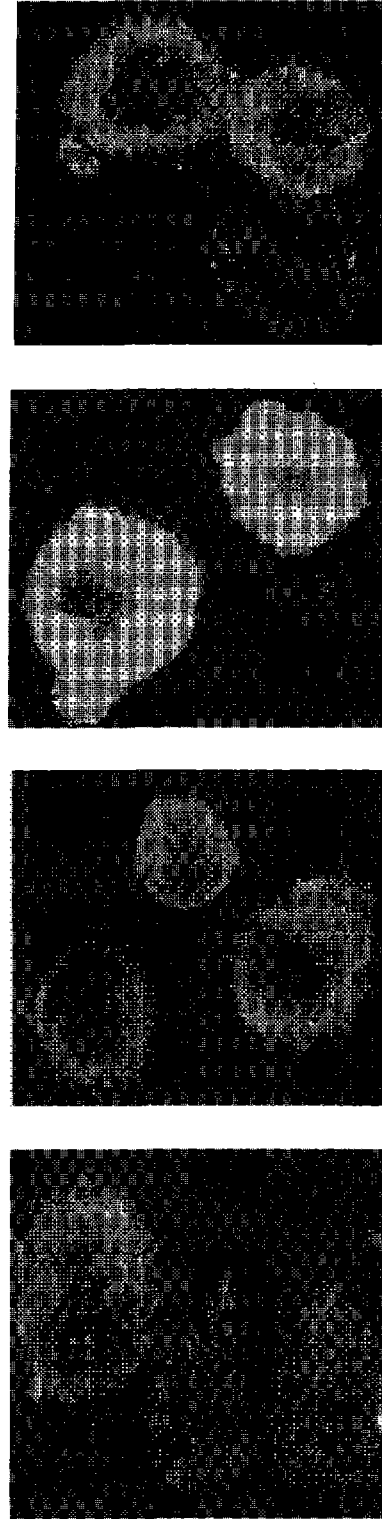


图7

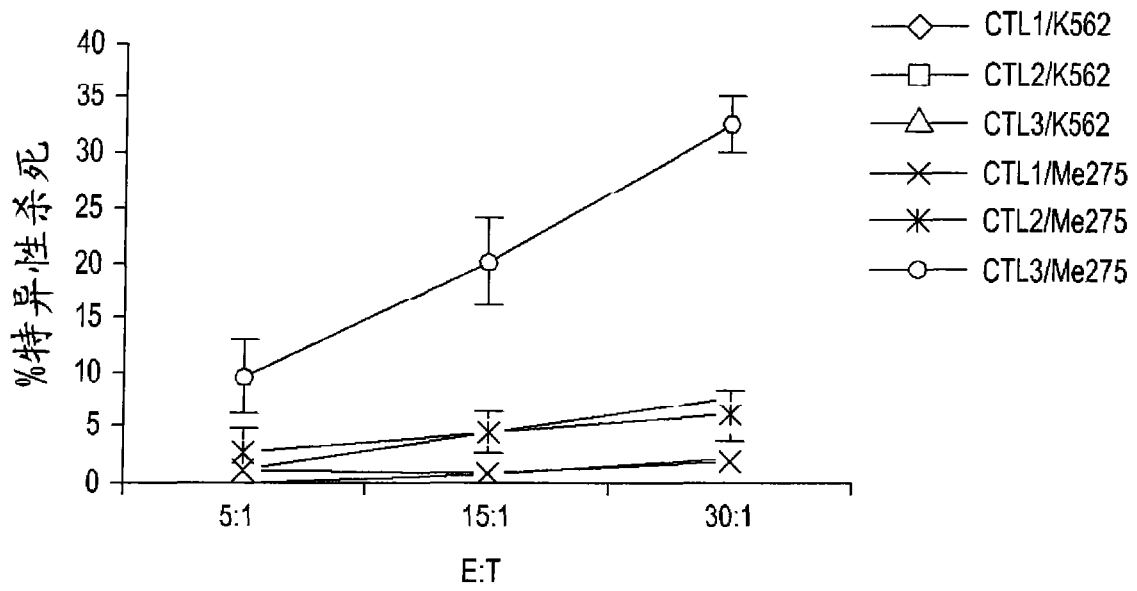


图8

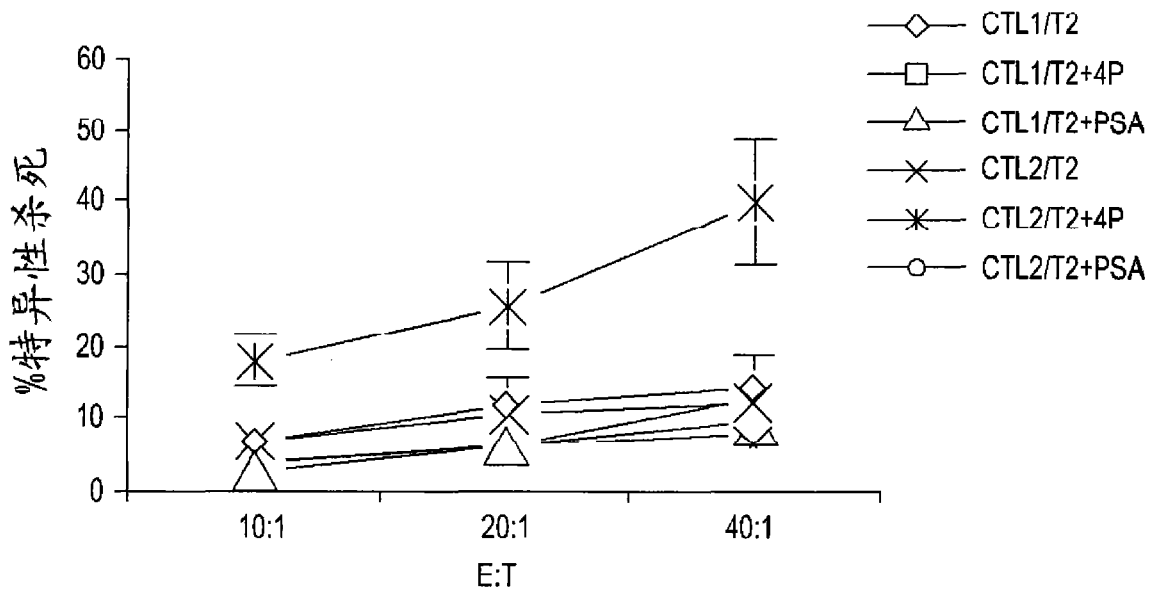


图9

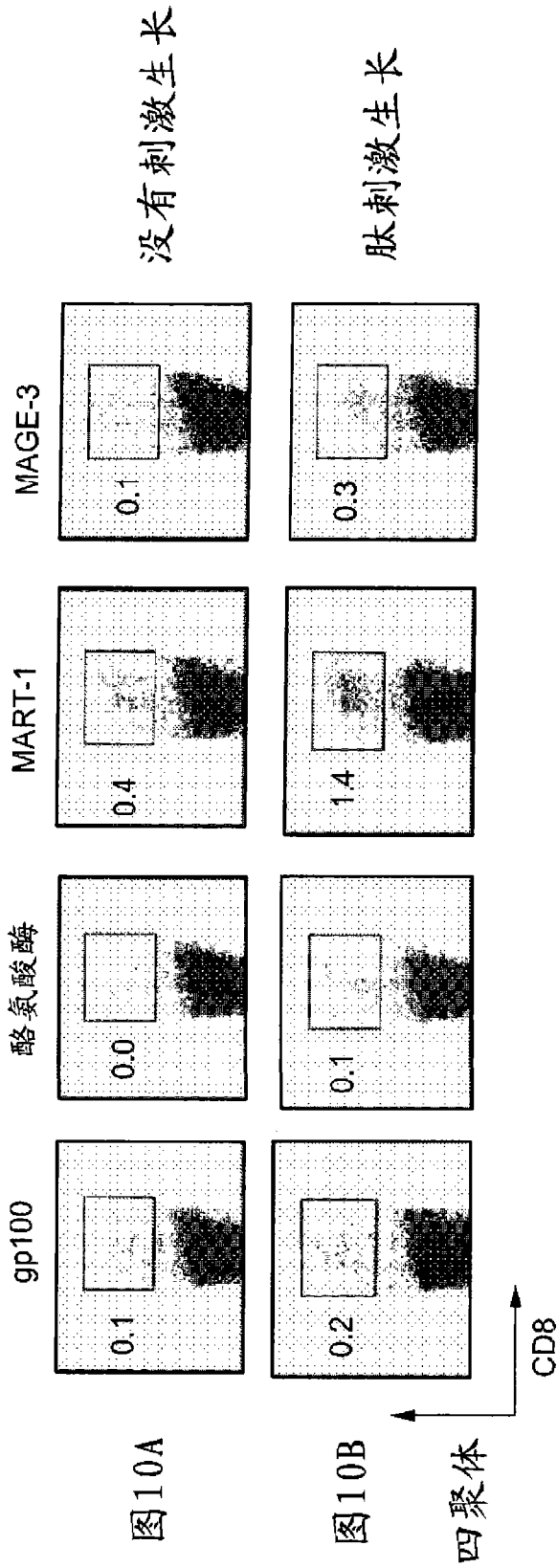


图10A

图10B

四聚体

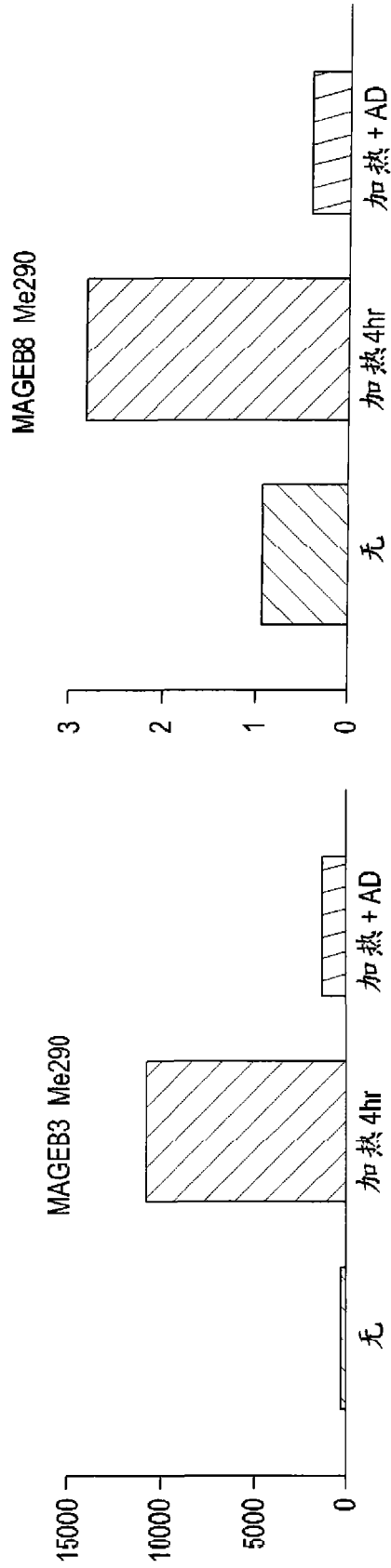


图11

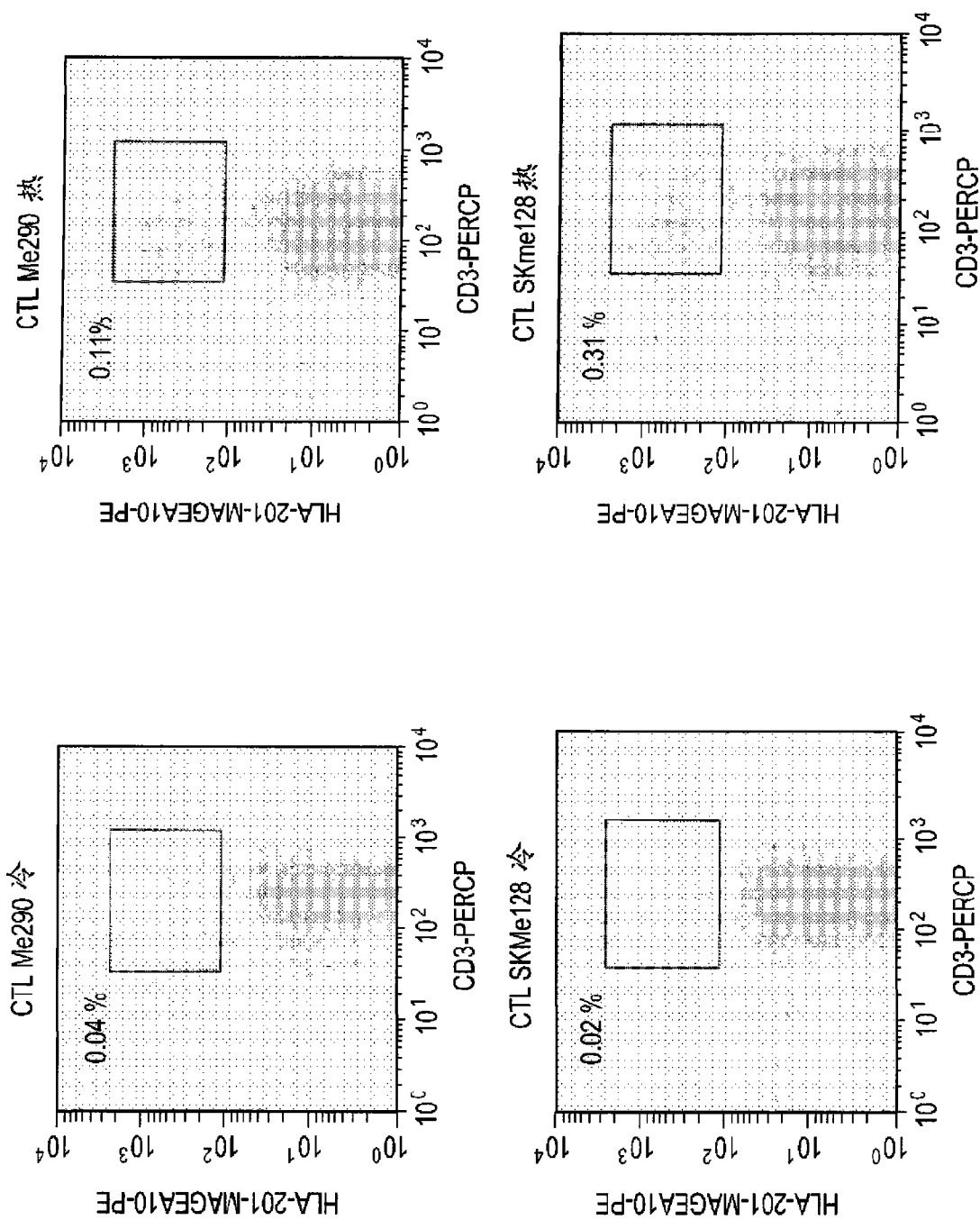


图 12

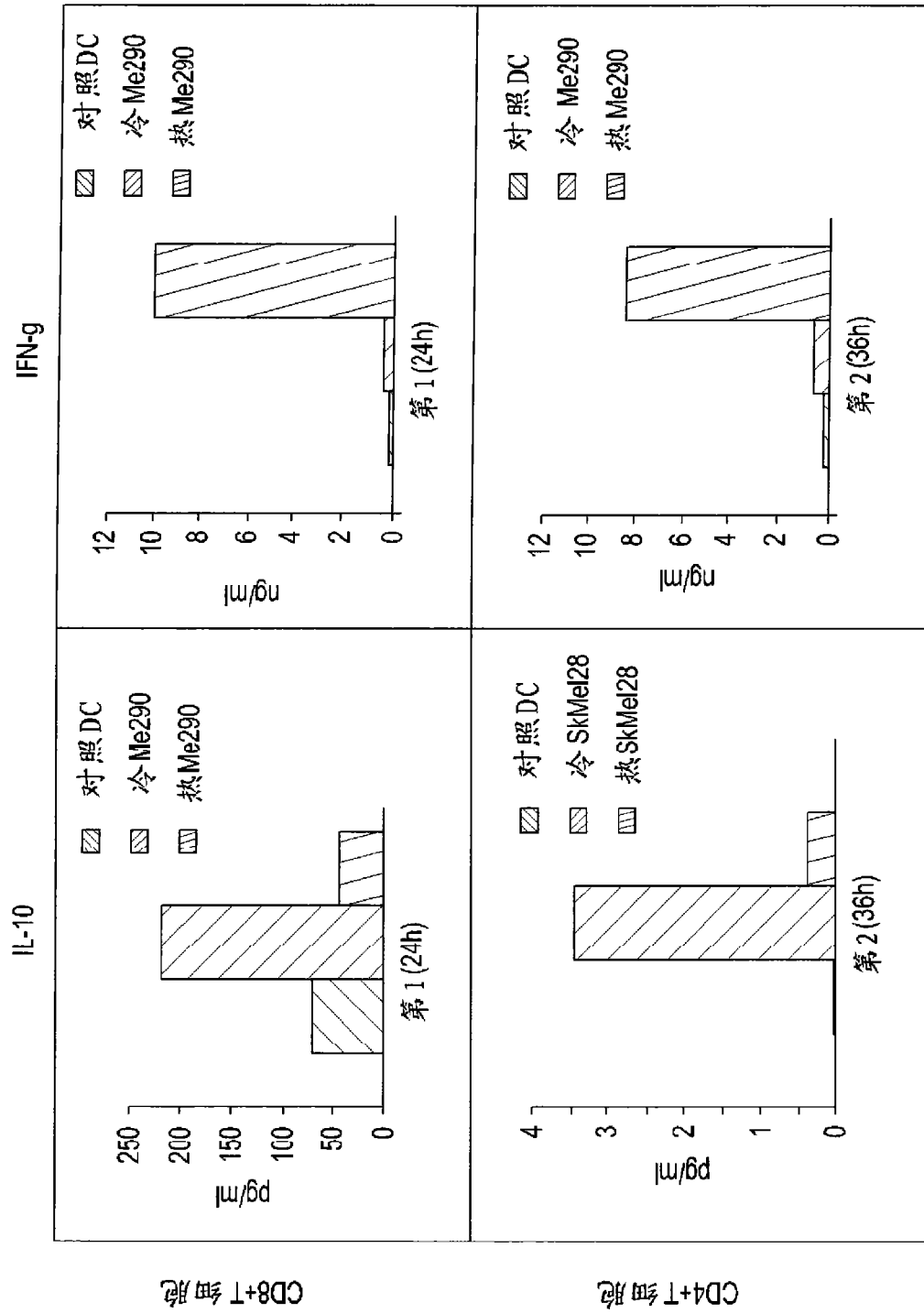


图13



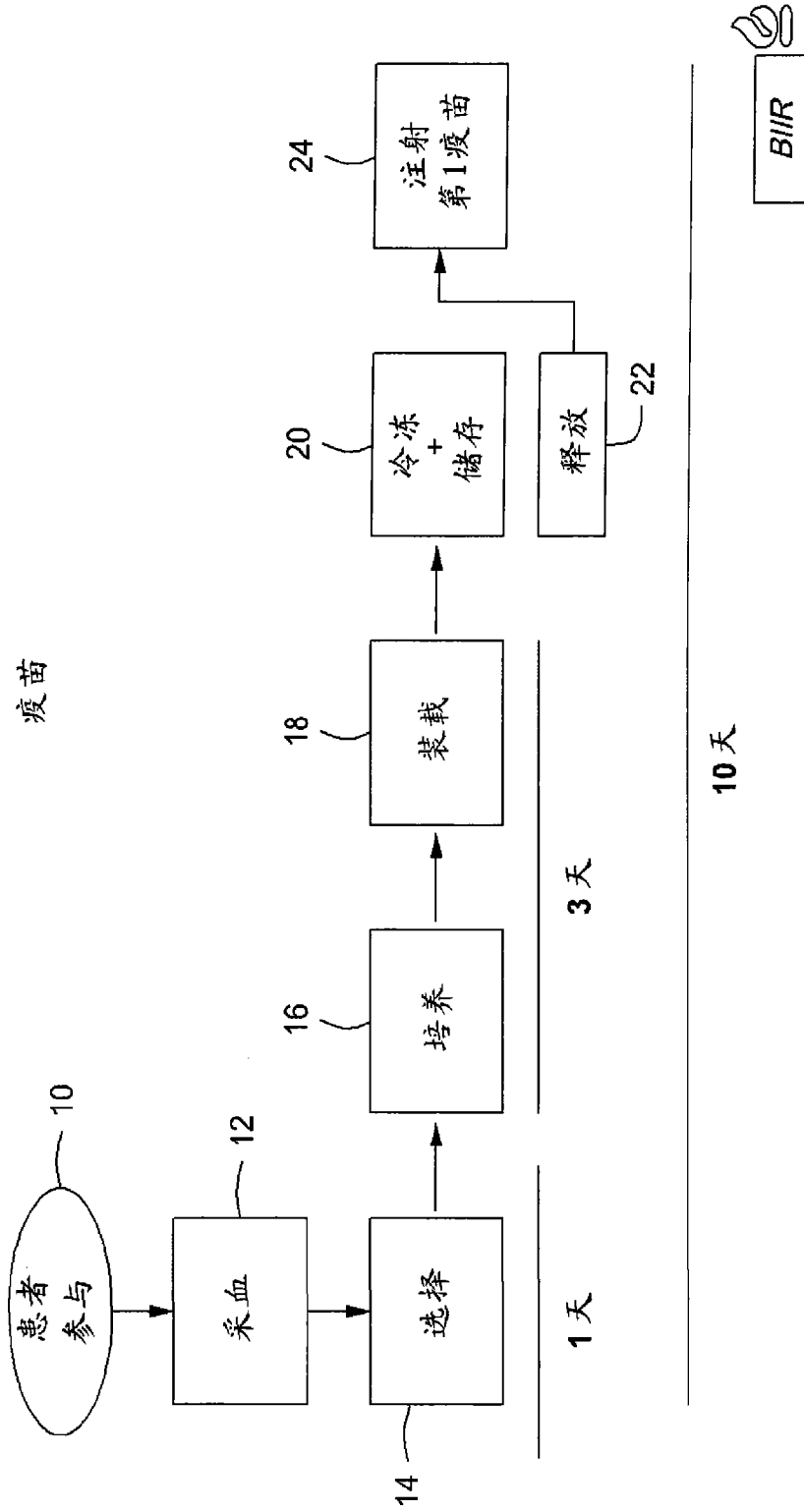


图14

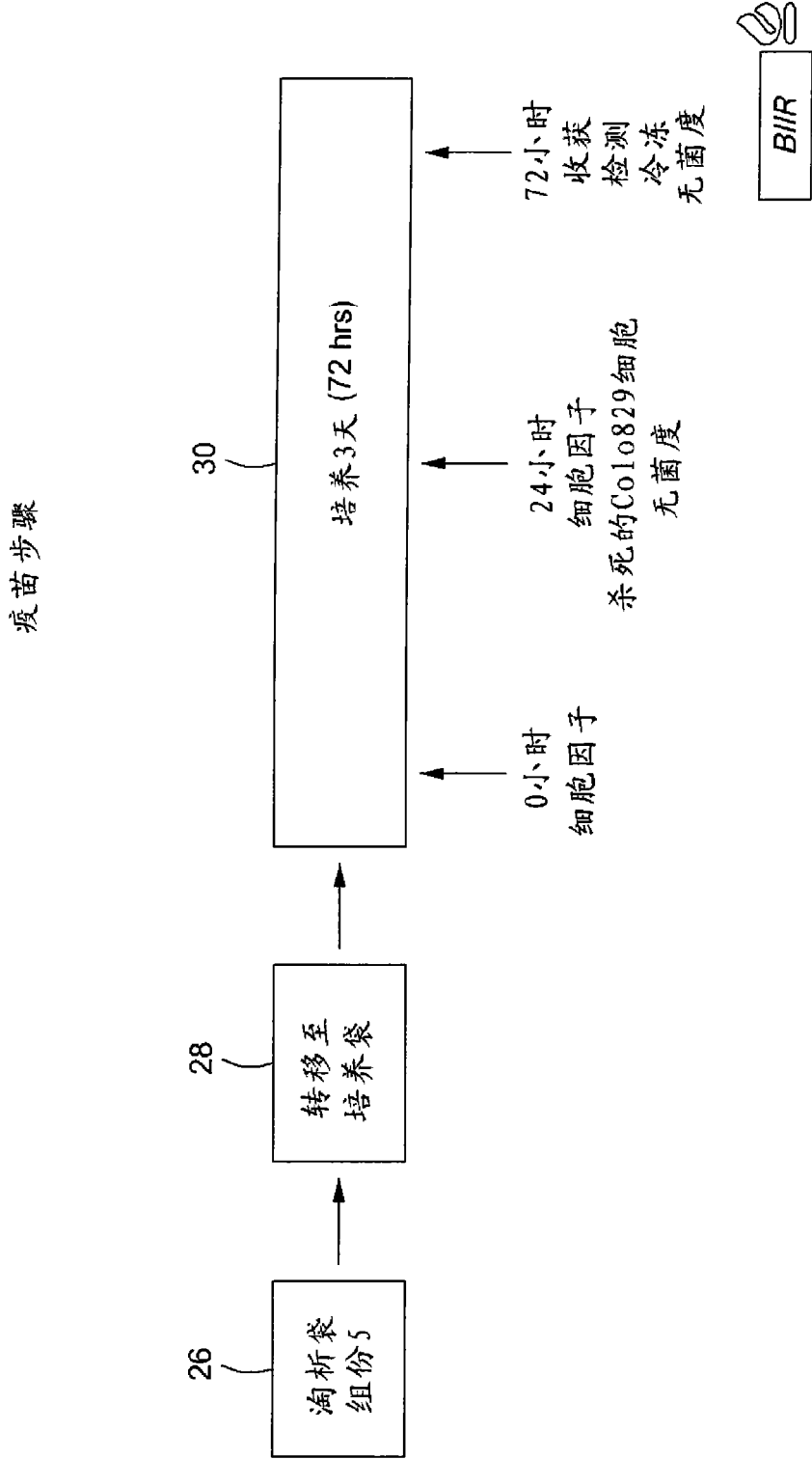


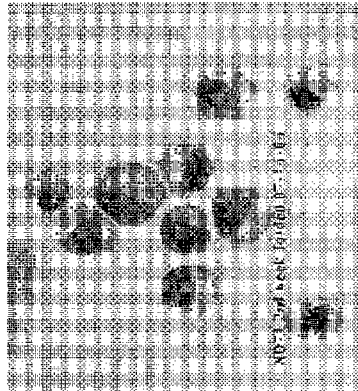
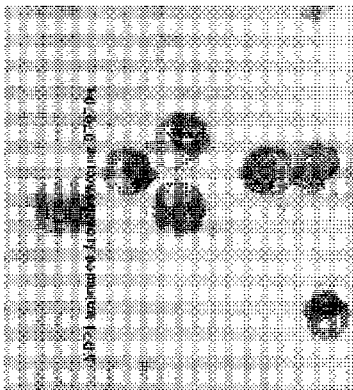
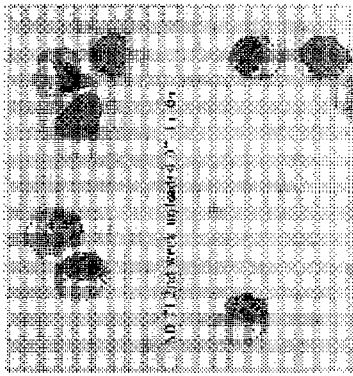
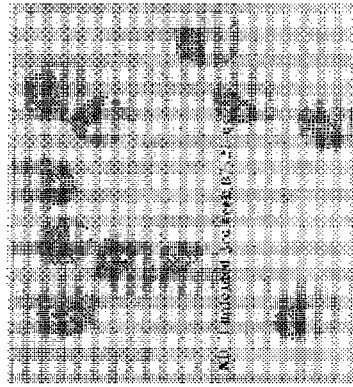
图15

冷冻的疫苗解冻后的形态

第3周

第2周

第1周



未装载的

装载的：  
热cO10

图16

冷冻的IFN-DC疫苗解冻后的表型

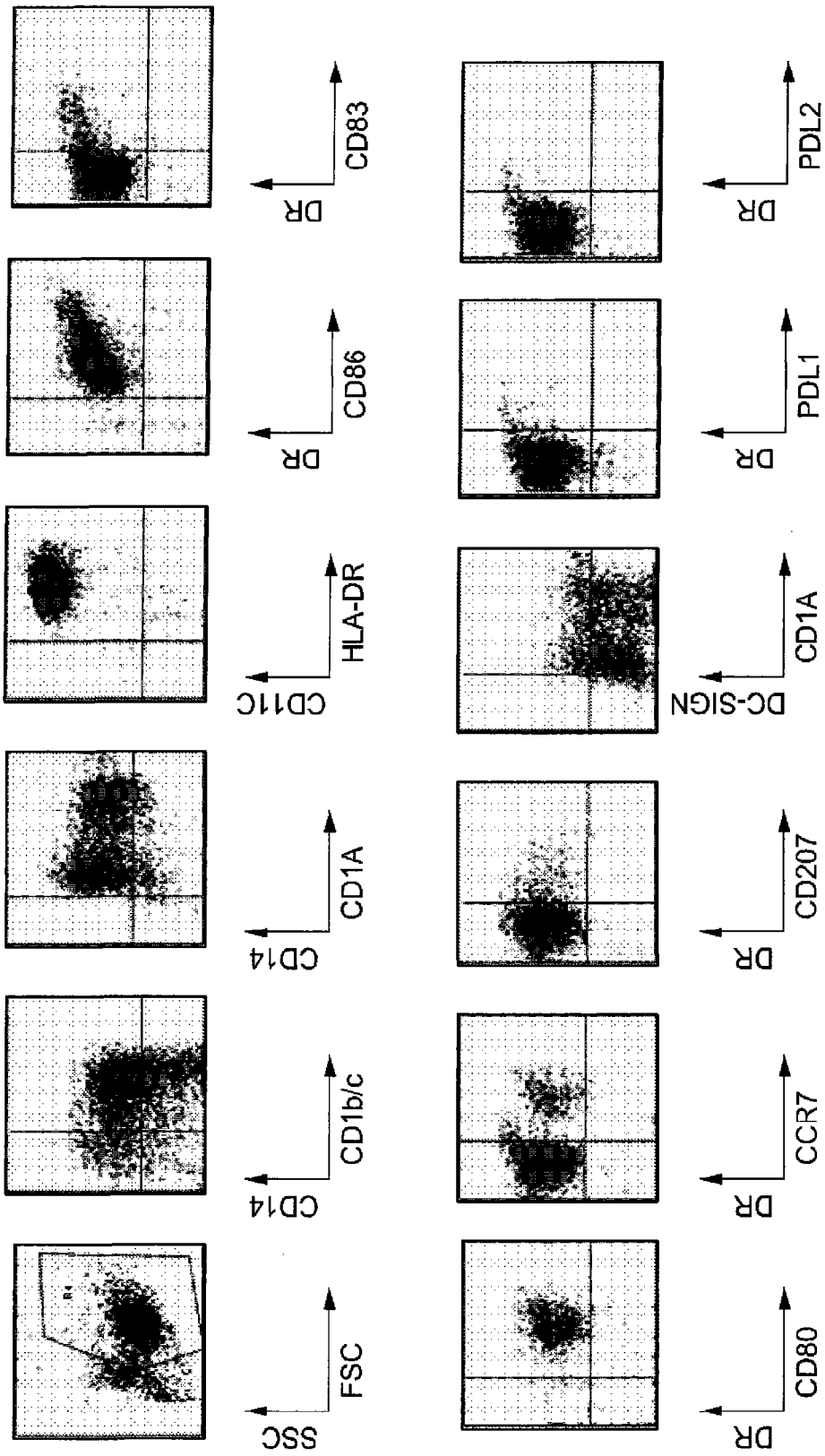


图17

冷冻的疫苗解冻后的细胞因子分泌

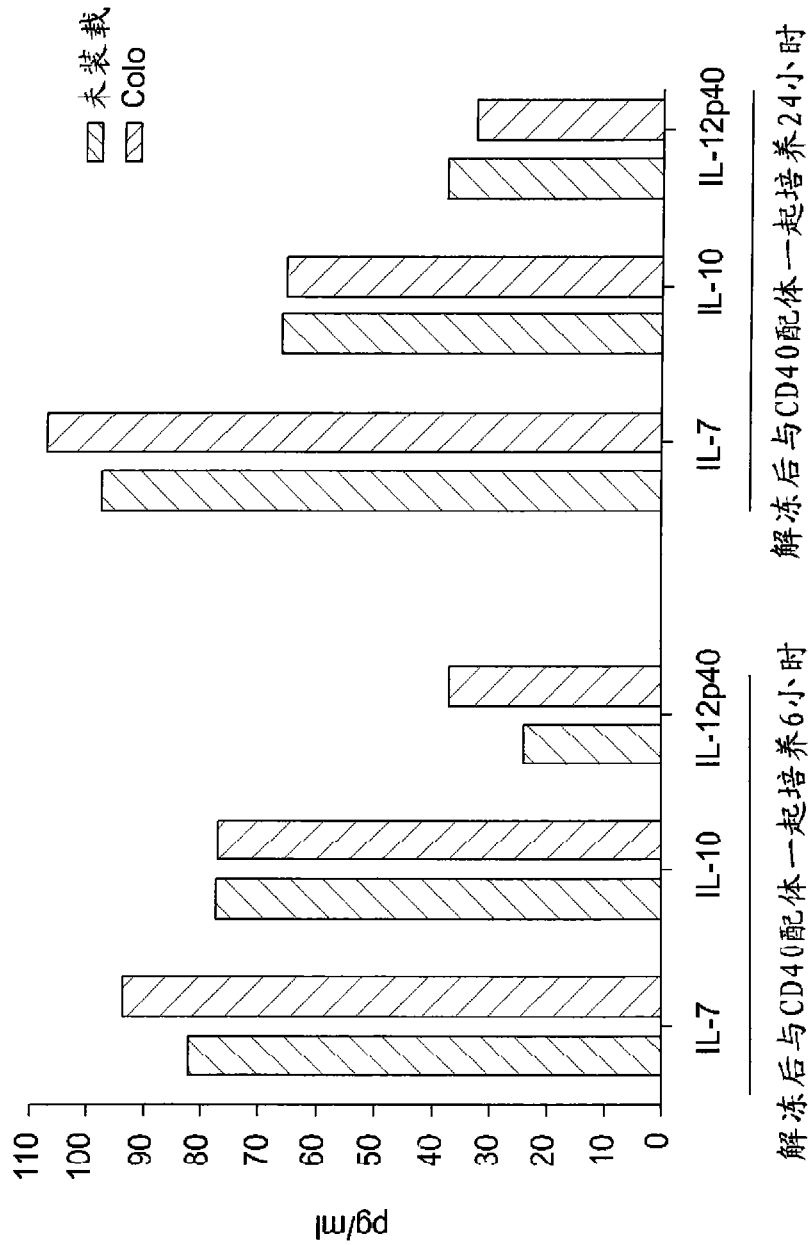


图18

冷冻疫苗激活自体CD8+T细胞

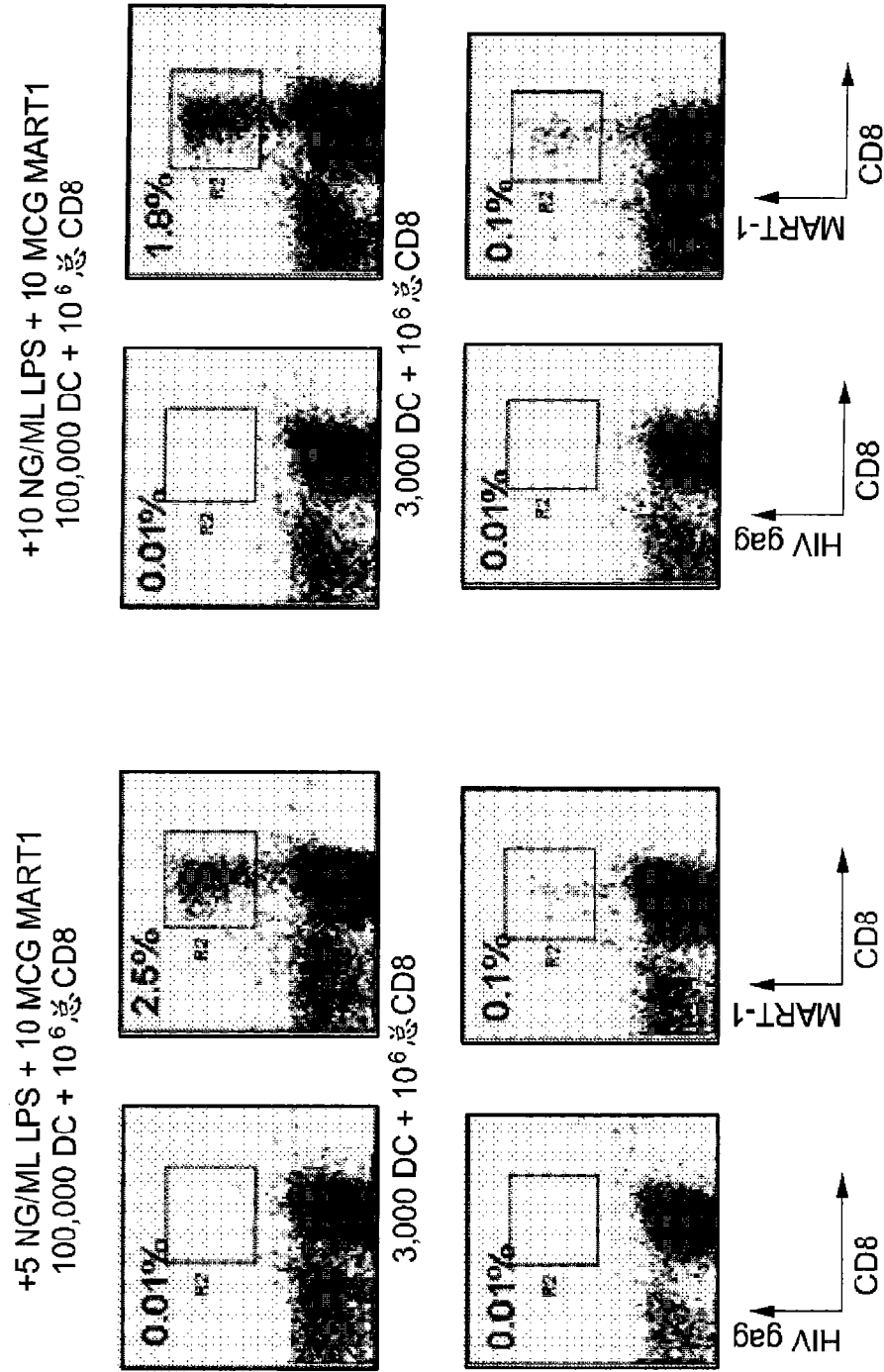


图 19