



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03805533.3

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1639323A

[22] 申请日 2003.3.13 [21] 申请号 03805533.3

[30] 优先权

[32] 2002.3.14 [33] US [31] 60/363,849

[86] 国际申请 PCT/IB2003/001391 2003.3.13

[87] 国际公布 WO2003/076603 英 2003.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.8

[71] 申请人 阿诺塞斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 侯亚非 徐迪惠

阿妮塔·梅赫塔-达马尼

亨利·兰帕斯基 佩德罗·帕斯

吉恩-伯纳德·勒佩克

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

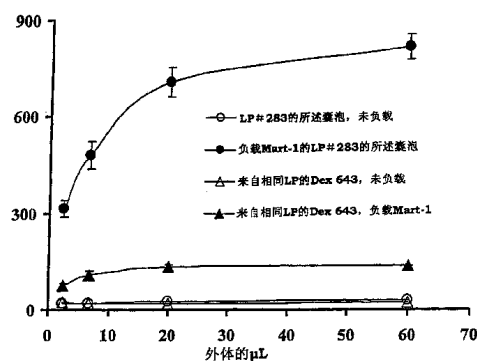
代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 5 页 说明书 27 页 附图 8 页

[54] 发明名称 T 细胞来源囊泡的功能化及其在制备免疫原性药用组合物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及包含激活 T 淋巴细胞所释放囊泡的组合物，及其生产和应用方法。所述囊泡包含一系列对其赋予诸如如下的显著特性的生物活性分子：抗原识别，抗原呈递以及其它调节和效应子功能。本发明也涉及利用上述囊泡向抗原呈递细胞 (APC) 转移或递送抗原分子 (例如肽、肽/MHC 复合物、TCR 及其亚单位等)，以诱导特异性免疫应答，尤其是特异性 CTL 应答的方法。本发明还涉及应用上述囊泡向靶细胞选择性或特异性递送分子的方法。



1. 一种生成脂质囊泡的方法，其中所述方法包括：

5 (a) 将含有 T 淋巴细胞的生物制备物培养在可以从 T 淋巴细胞
释放膜囊泡的条件下，以及

(b) 收集或纯化 a) 产生的囊泡，
并且其中所述淋巴细胞或囊泡经功能化以表达选择的分子。

10 2. 权利要求 1 的方法，其中所述 T 淋巴细胞在培养中进行扩增
和激活。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述 T 淋巴细胞培养在 TCR 激活因
子存在的条件下。

15 4. 权利要求 2 的方法，其中所述 T 淋巴细胞培养在细胞因子、
有丝分裂原或钙离子载体存在的条件下。

20 5. 权利要求 1 到 4 任一项的方法，其中所述生物制备物含有外
周血 T 细胞、T 细胞系、T 细胞克隆、杂交瘤或恶性 T 细胞。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述生物制备物富集 T 细胞亚群。

25 7. 权利要求 1 的方法，其中所述生物制备物富集或者主要含有
NKT 细胞、NK 细胞、 $\gamma \delta$ T 细胞、CD4+细胞或者 CD8+细胞。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述生物制备物是 T 细胞系。

30 9. 权利要求 1 到 8 任一项的方法，其中所述 T 细胞包含或转染
有编码一种生物活性分子的重组多核苷酸。

10. 权利要求 1 到 9 任一项的方法，其中通过用抗原分子直接负载囊泡进行所述囊泡的功能化。

5 11. 权利要求 1 的方法，其中通过用含有融合到 lactadherin 或 E2 糖蛋白或者其片段或者变体的活性部分的嵌合分子嵌合负载泡囊进行所述囊泡的功能化。

12. 权利要求 1 到 11 任一项的方法，其中所述囊泡以单独或者组合形式过滤，离心，离子层析，或浓缩进行收集或纯化。

10

13. 一种生产免疫原性囊泡的方法，所述方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养含有 T 淋巴细胞的生物制备物，

b) 收集或纯化 a) 中产生的囊泡，以及

15 c) 在使分子结合所述囊泡的条件下将所述囊泡与抗原分子接触，以生成免疫原性囊泡。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述抗原分子是肽、蛋白、脂质或糖脂。

20

15. 权利要求 13 的方法，其中所述抗原分子包括 HCV 包膜糖蛋白或其 CD81 结合片段。

16. 权利要求 13 的方法，其中所述分子是含有融合到 lactadherin 或 HCV 糖蛋白或者其变体或者片段的多肽的嵌合蛋白。

25

17. 一种生产功能化囊泡的方法，所述方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养含有 T 淋巴细胞的生物制备物，所述生物制备物包括包含编码所选择的分子的重组核酸的 T 淋巴细胞，以及

30

b) 收集或纯化 a) 中生成的囊泡, 所述囊泡 (或至少其中的一些) 含有所述选择的分子。

18. 一种生产囊泡的方法, 所述方法包括:

5 a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养具有确定 T 细胞受体的 T 淋巴细胞克隆或者独特型群, 以及

b) 收集或纯化 a) 中生成的囊泡, 所述囊泡在其表面表达所述特异性 T 细胞受体。

10 19. 一种生产囊泡的方法, 所述方法包括:

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养 T 细胞系, 以及

b) 收集或纯化 a) 中生成的囊泡。

15 20. 一种生产脂质囊泡的方法, 所述方法包括:

a) 在 T 细胞激活因子存在的条件下培养包含 T 淋巴细胞的生物制备物使膜囊泡从 T 淋巴细胞中释放, 以及 b) 收集或纯化 a) 中生成的囊泡。

20 21. 一种生产药用组合物的方法, 所述方法包括:

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养含有 T 淋巴细胞的生物制备物,

b) 收集或纯化 a) 中生成的囊泡, 以及

c) 将所述囊泡配制在药用载体或赋形剂中。

25

22. 一种包括膜囊泡和药用载体或赋形剂的药用组合物, 其中所述囊泡获自 T 淋巴细胞。

23. 权利要求 22 的药用组合物, 其中所述囊泡包括选择的分子, 诸如药物或者抗原分子, 更优选地是所述囊泡内存在的 MHC 分子和

30

外源抗原肽之间的复合物。

24. 一种刺激受试对象针对抗原产生免疫应答的方法，所述方法包括给受试对象施用有效剂量的权利要求 22 的组合物。

5

25. 一种刺激受试对象针对抗原产生免疫应答的方法，所述方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养含有 T 淋巴细胞的生物制备物，

10

b) 收集或纯化 a) 中生成的囊泡，其中所述囊泡具有免疫原性，

c) 将所述泡囊配制在药用载体或赋形剂中，以及

d) 给受试对象施用有效剂量的囊泡以刺激免疫应答。

15

26. 一种将抗原分子递送到抗原呈递细胞的方法，所述方法包括在体外或离体情况下使抗原呈递细胞与权利要求 22 的组合物或免疫原性囊泡接触，所述囊泡含有所述抗原分子。

27. 一种刺激树突细胞的方法，所述方法包括使树突细胞与权利要求 22 的组合物或免疫原性囊泡接触。

20

28. 一种将分子递送到靶细胞的方法，所述方法包括使所述靶细胞与权利要求 22 的组合物或免疫原性囊泡接触，所述囊泡含有所述分子。

25

29. 一种表征衍生自 T 细胞的囊泡的制备物的方法，所述方法包括：

. 从含有 T 淋巴细胞的生物制备物中分离这种囊泡，以及

. 通过将所述囊泡吸附到支持物并评估特异性标记在这些泡囊表面的存在确定所述囊泡的数量或质量。

30

30. 一种包含免疫原性膜囊泡的组合物，其中所述囊泡获自 T 淋巴细胞并用抗原分子负载。

5 31. 一种包含衍生自 T 淋巴细胞的囊泡和 HCV 包膜糖蛋白或其 CD81-结合片段的组合物。

T 细胞来源囊泡的功能化及其在制备免疫原性药用组合物中的应用

5 简介

本发明涉及包含激活 T 淋巴细胞所释放囊泡的组合物，及其生产和应用方法。所述囊泡包含一系列对其赋予诸如如下显著特性的生物活性分子：抗原识别，抗原呈递以及其它调节和效应子功能。本发明也涉及利用上述囊泡向抗原呈递细胞（APC）转移或递送抗原分子（例如肽、肽/MHC 复合物、TCR 及其亚单位等），以诱导特异性免疫应答，尤其是特异性 CTL 应答的方法。本发明还涉及应用上述囊泡向靶细胞选择性或特异性递送分子的方法。

发明背景

15 免疫系统由两个基本组分构成：即白细胞和可溶性介质。不同的白细胞亚群构成一个免疫调节网络，在这个网络中每一类群的成熟和激活都受到其他类群的影响。免疫细胞间的通讯联系主要通过两种方式进行：一种是膜包被分子与其配体通过细胞-细胞接触而结合。另一种是基于由单个细胞产生的可溶性介质，其扩散与其它细胞上的受体结合。有人注意到这样一种现象：通常被称为外来体（直径 60-80nm）
20 的一些膜外囊泡是由多种不同类型的细胞，尤其是来源于造血细胞系的细胞（hematopoietic）释放到细胞外间隙。B 细胞（Raposo 等 1996 年）、肥大细胞（Raposo 等 1997 年）、树突细胞（Zitvogel 等 1998 年）、激活的血小板（Heijnen 1999 年）、T 细胞（Denzer 等 2000 年）、巨噬
25 细胞（Denzer 等 2000 年）、肿瘤细胞（Wolfers 等 2001 年）以及肠上皮细胞（Van Niel 等 2001 年）来源的外来体已在相关文献中描述。当特异性蛋白和脂类被聚集到出芽小泡内时外体则在体内中形成。它们聚集在特定的细胞区室，多泡体（MVB）中。当 MVB 的限制膜与细胞质膜融合时外体被释放。在几种细胞类型中，外体的释放受特异刺激
30 的调节。不同来源的外体呈递无关联的分子集合（Escola 等 1998，

1999, 2001, Clayton 等 2001)。在所有外体中呈递大量诸如 CD9, CD81 的四跨膜蛋白 (Tetraspanin) 蛋白。来自专门 APC 的树突细胞 (DC) 的外体尤其富含 MHC I/II 类分子。它们具有极强的免疫原性, 能够清除小鼠体内业已存在的肿瘤 (Zitvogel 等 1998)。B 细胞外体将 MHC II 类复合物传递到滤泡树突细胞 (Denzer 等 2000)。在不存在细胞-细胞接触的条件下外体就可以长距离地将膜结合蛋白递送到靶细胞, 并且还能够进行物质交换。已经有人提议了来源于抗原呈递细胞的外体在激发人体特异性免疫应答中的应用 (WO9705900, WO9903499)。

T 淋巴细胞和 B 细胞代表了细胞免疫系统的两种抗原特异组分。T 细胞的激活对绝大多数免疫应答来说都很关键, 并且能够使其他免疫细胞发挥功能。T 细胞可被分为不同的两类: CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞。CD4+T 细胞对其靶细胞如 B 细胞、树突细胞、巨噬细胞以及其他 T 细胞亚群的调节功能, 以及 CD8+T 细胞杀死肿瘤细胞或感染细胞内微生物的细胞的效应器功能既依赖于通过细胞表面分子的细胞-细胞接触, 又依赖于这些细胞被激活时分泌的广泛的细胞因子。如果外体可能是实现免疫细胞间通讯的一条路径, T 细胞外体就可能是能够发挥特异性调节或效应器功能的介质。然而直到现在, 还没有关于这些 T 细胞外体生物学功能的描述, 并且还没有关于制备这些生物活性状态囊泡的有效方法的报道。

发明概述

本发明公开了 T 细胞来源的外体显示了令人意想不到的组成和生物学活性。本发明也提供了有益并且高效产生、分离和/或纯化大量 T 细胞来源外体的方法, 所述外体携带不同集合的生物活性分子。在特别优选的条件下, 这些方法可以引发所述囊泡的释放、产量的增加及其特性的改变。本发明还公开了有利的囊泡能够从多种 T 细胞, 包括多种 T 细胞亚群、T 细胞系、克隆、杂交瘤等产生。本发明还公开了通过直接负载这些囊泡或处理其产生细胞对这些囊泡进行功能化的方

法。本发明还进一步证明这些囊泡可被用于高效和/或选择性地向靶细胞以及抗原呈递细胞递送分子，尤其是，引发或者调节哺乳动物的免疫应答。本发明所描述的方法可以产生并提供多种 T 细胞来源的明确限定的 T 细胞外体用于治疗或者预防领域或者作为研究工具，所述 T 细胞外体具有无关联集合的生物活性分子。

本发明的目的尤其是在于生产脂质囊泡的方法，所述方法包括：

- a) 在能够从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养包括 T 淋巴细胞的生物制备物，以及
- b) 收集或纯化从 a) 所产生的囊泡。

生物制备物可以包括新鲜分离的 T 细胞、体外增殖的 T 细胞、T 细胞克隆、T 细胞株或者 T 细胞杂交瘤。此外，生物制备物可能富含或缺少特定的 T 细胞亚群，诸如 CD4⁺细胞、CD8⁺细胞、 γ dT 细胞、NK-T 细胞或者 NK 细胞等。可以对所述的细胞进行遗传修饰以编码任一需要的产物或者具有任一需要的活性，或者相反，也可以进行处理或改变控制它们的特性。

根据优选的实施方案，生物制备物包括体外或离体增殖的 T 细胞。

根据另一优选的实施方案，生物制备物包括 T 细胞系。

根据另一优选的实施方案，T 细胞经受了激活处理。

在此外另一优选的实施方案中，所述方法包括在 T 细胞释放囊泡之前，过程中或之后对囊泡进行功能化的步骤。囊泡的功能化引起包含一种或者几种所选择分子的修饰囊泡的生成。可以通过在囊泡上直接或嵌合负载分子，或通过修饰 T 细胞的产生（间接负载）实现囊泡的功能化。

基于这一点，本发明的一个特定目的就是产生功能化囊泡的方法，所述方法包括：

- 5 a) 在能够从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养包括 T 淋巴细胞的生物制备物，
- b) 收集或纯化从 a) 所产生的囊泡，和
- c) 在能够使所述分子与囊泡相互作用的条件下将所述囊泡与所选择的分子接触从而产生功能化囊泡。

10 所选择的分子可以是抗原分子，诸如肽、蛋白、脂质、糖脂，等。它也可以是诸如核酸、酶、荷尔蒙、小有机分子、标记物等的任一分子。典型的例子包括病毒蛋白及其片段，诸如 HCV 的糖蛋白 E2，以及包括融合到糖蛋白 E2 或 lactadherin 或者其变体或其片段的嵌合蛋白。

15

在一优选实施方案中，分子是抗原分子，并且所述接触是在可以使所述分子与囊泡表面的抗原呈递分子（如 MHC 分子）连接的条件

20 在另一具体实施方案中，分子是嵌合分子，所述嵌合分子包括融合到 lactadherin 上的多肽或者其它活性部分或其变体或者其片段，并且所述接触是在可以使所述嵌合分子与囊泡表面的磷脂酰丝氨酸连接的条件

25 在一优选的实施方案中，分子是嵌合分子，所述嵌合分子包括融合到糖蛋白 E2 上的多肽或者其它活性部分或其变体或者其片段，并且所述接触是在可以使所述嵌合分子与囊泡表面的 CD81 连接的条件

30 在另一改变方案中（间接负载），产生功能化囊泡的方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养包括 T 淋巴细胞的生物制备物,，所述生物制备物包括含有编码所选择分子重组核酸的 T 淋巴细胞，以及

5 b) 收集或纯化从 a) 所产生的囊泡，所述囊泡（或至少其中的某些）包括上述选择的分子。

在另一改变方案中，所述方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养具有确定 T 细胞受体的 T 淋巴细胞的克隆，在，以及

10 b) 收集或纯化 a) 所产生的囊泡，上述囊泡在其表面表达上述特异性 T 细胞受体。

这种囊泡能够导向在其表面上表达特异性 MHC I 类或 II 类肽复合物的细胞，可以将任何选择的分子定向递送给上述细胞。

15

本发明的另一目的是在于生产药用组合物的方法，所述方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养包括 T 淋巴细胞的生物制备物，

20 b) 收集或纯化 a) 所产生的囊泡，以及

c) 将所述囊泡调节在药物载体或赋形剂中。

25 本发明的另一目的是一种包括膜囊泡和药物载体或赋形剂的药用组合物,，其中上述膜囊泡可以从 T 淋巴细胞获得。更优选地，所述囊泡包含诸如药物或抗原分子的选择的分子。最优选地，囊泡含有在其内存在的 MHC 分子和外源抗原多肽之间的复合物。

30 本发明的另一目的在于刺激受试对象针对抗原产生免疫应答的方法，所述方法包括给受试对象施用有效剂量的上述组合物或者囊泡。更尤其是，本发明的方法包括：

a) 在可以从 T 淋巴细胞释放膜囊泡的条件下培养包括 T 淋巴细胞的生物制备物 (诸如, 例如 T 细胞系、自体 T 细胞或其亚群),

5 b) 在可以使所述分子与所述囊泡结合, 优选地与囊泡表面的抗原呈递分子结合的条件下通过将囊泡与抗原分子接触使上述囊泡功能化, 使它们具有免疫反应性,

c) 收集或纯化 b) 所产生的囊泡,

d) 将所述囊泡调节在药物载体或赋形剂中,

e) 对受试对象施用有效剂量的囊泡从而刺激免疫应答。

10 在一改变的方案中, 在纯化步骤 c) 后进行囊泡的功能化。

在另一改变的方案中, 囊泡被用于体外或离体致敏、刺激或者扩增免疫细胞 (诸如抗原呈递细胞), 接着将免疫细胞施用于那些需要的受试对象。

15

本发明的另一目的是将抗原分子递送到抗原呈递细胞尤其是递送到树突细胞的方法, 所述方法包括将抗原呈递细胞与上述定义的组合物或免疫原性囊泡接触, 所述囊泡包含有所述抗原分子。可以在体外、离体或体内进行接触。对于体内接触而言, 在体内接触所述细胞以后

20 将有效剂量的组合物或免疫原性囊泡施用于受试对象, 从而将抗原分子递送到 APC。

本发明的另一目的是刺激树突细胞的方法, 所述方法包括将树突细胞与上述定义的组合物或免疫原性囊泡接触。接触可以在体外、离体或体内进行。对于体内接触而言, 在体内接触所述细胞后将有效剂量的组合物或免疫原性囊泡施用给受试对象, 从而将抗原分子递送到

25 APC。

本发明的另一目的是将分子递送到靶细胞的方法, 所述包括将靶细胞与上述定义的组合物或免疫原性囊泡接触, 所述囊泡包括所述分

30

子。通过囊泡表面的特异性标记物，诸如配体、受体、抗原等、或者功能片段或者其衍生物最优选地进行定向递送。在一特定的实施方案中，通过存在于囊泡上的特异性 T 细胞受体（TCR）介导靶向。通过这种实施本发明的特定方式，携带选择的（生物活性）分子的囊泡可
5 被特异性靶向到表达抗原肽/MHC 复合物的细胞，所述抗原肽/MHC 复合物可以由 TCR 识别。

所述分子可以暴露在囊泡的表面，或包含在囊泡中。所述分子可以具有不同的性质并且表现广泛的特性或者活性。可以在体外、离
10 体或体内进行接触。对于体内接触而言，将有效剂量的组合物或免疫原性囊泡施用给受试对象以将所述分子体内递送到所述细胞。

本发明的另一方面涉及鉴定 T 细胞来源的囊泡制品的方法，所述方法包括：

15 .从包括 T 淋巴细胞的生物制备物中分离这种囊泡，并且
.通过将其吸附到支持物（例如，珠、板、柱等）上确定所述囊泡的量或者质量，并且评价特异性标记物在这些囊泡表面的出现。典型地，支持物是珠子，诸如乙醛-珠（非特异性结合）或特异性抗体包被的磁珠（特异性结合），或者板，诸如微孔板。可以通过表型分析
20 （例如，通过 FACS）或通过 ELISA（WO01/82958）进行鉴定。在一特定实施方案中，通过将囊泡或生物制备物进行浓缩、超滤、渗滤和/或梯度超速离心分离囊泡。

本发明同时也涉及上述定义的 T 细胞来源囊泡在制造将分子体内，体外或者离体递送到细胞的药用组合物中的应用。
25

附图说明

图 1：由植物凝集素（PHA）激活的 T 细胞产生的膜囊泡的表型。
图 2：由 PHA 激活的 Jurkart T 细胞产生的膜囊泡的表型。
30 图 3：从 3 组不同白细胞群的激活 T 细胞产生的囊泡在 APC 存

在的条件下诱导 Jurkat 细胞释放 IL-2，所述囊泡负载了超抗原 SEE。

图 4：T 细胞来源的囊泡直接负载 HLA-A2 特异性肽。

图 5：T 细胞来源的囊泡直接负载 HLA-A2 特异性 Mart-1 肽。

图 6：在抗原呈递细胞存在的条件下，Mart-1 肽负载的囊泡诱导
5 Mart-1 特异性 T 细胞应答。

发明详述

本发明基于一系列前所未有的观察和发现。起初，我们观察到纯
10 化自培养的人树突细胞培养的上清液，从外周血中富集，包含少量具
有 T 细胞特异性标记的囊泡。这说明污染培养物的 T 细胞也可以释放
外体。进一步研究后，我们发现用不同刺激物培养后纯化的 T 细胞确
实能够产生含有功能性蛋白及其他 T 细胞特异性标记物的囊泡。基于
T 细胞来源膜囊泡在电镜（EM）下的大小、密度和形态，我们得出结
论：所述囊泡具有类似于其他类型免疫细胞来源外体的生理特性。

15

然而，T 细胞产生的囊泡具有特定的形态和赋予其特异性特征的
组成成分。基于这些 T 细胞来源囊泡显示的标记物和组成成分的生物
活性可将所述标记物和组成成分分为 4 类：

- 20 .抗原识别蛋白，诸如 T 细胞受体（TCR）和 CD8；
- .抗原呈递蛋白，诸如 MHC I 类和 II 类分子；
- .调控效应器蛋白，诸如 CTLA-4 和穿孔素；以及
- .其他功能尚未明确的 T 细胞蛋白和标记物。

本申请有证据表明不同来源的 T 细胞分泌特定的囊泡，可以通过
25 多种处理激活、调控释放，囊泡能够大量分离，囊泡显示出具有功能
结构和生物活性的独特分子集合，并且这些囊泡可以进一步功能化。
例如，囊泡上富集的 MHC I 类和 II 类分子可以结合抗原肽并且可以
分别诱导特异性细胞毒性或辅助 T 淋巴细胞的应答。这些囊泡的 MHC
II 类分子能够将超抗原递送到激活的 T 细胞。因此，根据囊泡所拥有
30 的不同生物活性分子，这些囊泡可用于免疫干预方法来治疗不同疾

病。

出人意料地是，本发明证实 T 细胞来源的囊泡表达高量 MHC I 类分子（例如，来自相同量 PBMC 的 T 细胞来源囊泡具有总量与树突细胞来源囊泡相等数量级的 MHC I 类分子），然而 T 细胞并不被看作
5 专职的抗原呈递细胞。

本发明的申请者也已提供证据表明可以用 I 类肽负载这些囊泡并且这些囊泡能够将 I 类/肽的复合物转移到 APC，从而刺激特异性 T
10 细胞的激活。尤其令人惊讶的是 T 细胞本身（囊泡来源的）不是抗原呈递细胞。

本申请还证实通过有效转染生产 T 细胞可以诱导囊泡表达新分子。这一点尤其有利因为其他细胞类型，诸如树突细胞很难转染。
15

本发明的另一出人意料并且有益的方面是 T 细胞产生比其它细胞类型多得多的囊泡。尤其是，本发明表明功能性囊泡可以由已经在培养中诱导了增殖和/或扩增的 T 细胞制备。

20 本发明还显示有益的囊泡可以从已建立的人 T 细胞系获得，从而促进了可重复性的生产。此外，可以用合适的核酸（如 DNA 载体）轻易地转染建立的 T 细胞系，从而可以表达在外体中选择性富集的抗原或其它蛋白（包括多肽）。

25 本发明还显示 T 细胞系可以产生具有明显不同蛋白组合物的囊泡。例如，Jurkat T 细胞系显示出表达极低量的 I 类和 II 类 HLA，高水平表达 CD1c，显著表达 CD1d。因此，这些囊泡可被用于 CD1 特异性抗原刺激。这种 T 细胞系也可以用特异性 I 类或 II 类单倍型 HLA 转染以产生包含避免异体应答的特异匹配 HLA 单倍型的囊泡用于治疗目的。
30

因此，本发明提供了可用于治疗或免疫接种领域，尤其是用于将分子递送到靶细胞的新的生物学产物和组合物。这些产品对于体内、离体或体外产生抗原特异性免疫应答尤为有用。

5

生物制备物

根据本发明，可以利用不同的生物制备物作为 T 淋巴细胞来源生产载体和组合物。尤其是，生物制品可以包括：

10 -新鲜制备不同种类的 T 细胞，包括 PBMCs、血样、血清样本、血浆、大量培养的 T 细胞和富集的 T 细胞亚群，诸如，例如 CD8+细胞毒性/抑制性 T 细胞、CD4+CD25-辅助 T 细胞、CD4+CD25+调节 T 细胞、 γ/δ T 细胞和 NK T 细胞。

-能够在体外培养和增殖的 T 细胞，诸如，例如 T 细胞系、T 细胞克隆、T 细胞杂交瘤以及转化的 T 细胞。

15 -T 细胞来源的恶性肿瘤细胞，例如 T 细胞来源的白血病细胞。

-病毒感染的 T 细胞或由编码特异性蛋白的基因构建物转染的 T 细胞。

20 可以对生物制备物进行处理以去除或者扩增特定的细胞亚群，尤其是特异于特异性抗原或者具有特定活性的 T 淋巴细胞。

根据本发明尤其优选的实施方案，生物制备物或 T 细胞培养在能够引发囊泡的产生或增加囊泡产量的条件下。事实上，本发明已经证实可以采用特定的处理来促进 T 细胞产生囊泡，诸如：

25 -将产生囊泡的细胞与细胞因子或其它试剂一起培养以维持、扩大或者改变 T 淋巴细胞特性，例如在存在 IL1- α , β 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-4 和/或 IL-3 的条件下进行培养；和/或在存在 INF- γ 和/或 T 细胞表面标记物抗体，诸如 CD2、CD3、CD28、TcR，和/或可溶性 I 或 II 类 MHC 四聚体和/或可溶性 CD1 四聚体的条件下进行
30 培养。

5 -将产生囊泡的细胞与药学试剂或特定的处理物一起培养以诱导细胞的突变和/或激活，例如在存在抗原、用特异抗原或超抗原负载的自体或异体 APCs、丝裂素（即，PHA）、集聚蛋白、抗体（诸如抗-CD3和抗-CD28 抗体）或者其片段、触发 PKC 激活（即，佛波酯）、胞质 Ca⁺⁺释放（即，钙离子），抑制磷酸酯酶（即，okadaic 酸）等的试剂。

10 在一优选的实施方案中，生物制备物包括在培养中已经扩增和/或激活的 T 淋巴细胞。

15 在另一特定实施方案中，生物制备物包括在存在 TCR 激活剂的情况下培养的 T 淋巴细胞。

20 在一优选的实施方案中，生物制备物是 T 细胞系，尤其是产生基本上缺失内源性 I / II 类 HLA 分子的囊泡的 T 细胞系。

25 在一优选的实施方案中，生物制备物富集或主要包括一种 T 细胞亚群，诸如 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、 γ δ T 细胞、NKT 细胞、或者 NK 细胞。递送 I / II 类 MHC 肽的特别优选 T 细胞亚群是 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞。根据本发明，NK 细胞也可以生产具有生物活性的囊泡。

30 在另一特定的实施方案中，生物制备物包括对抗原有特异性的 T 淋巴细胞（一个克隆群的 T 淋巴细胞）。

35 生物制备物更优选包括至少 50%或更多的 T 淋巴细胞，更优选地 60%或更多的 T 淋巴细胞，甚至更优选 70%或更多的 T 淋巴细胞。生产囊泡最优选的方法是使用主要含有 T 淋巴细胞的生物制备物，诸如包括至少 90%或更多的 T 淋巴细胞。在一典型的实施方案中，生物制备物至少包括 10E5 个细胞，通常是至少 10E6 个细胞。此外，在一特

定的实施方案中，尽管可以使用异源或外源细胞，但对于被治疗的病人来说 T 细胞是自体的。

5 在一更特定的实施方案中，T 细胞包括编码生物活性分子的重组多核苷酸。这个方案将在下面详细公开。

纯化

10 由 T 细胞产生或释放的囊泡可以利用几种技术分离和/或纯化。这些技术包括过滤、离心、离子层析或浓缩，这些技术可以单独使用也可以联合使用。

最优选的纯化方法包括密度梯度离心的步骤。另一优选方法包括超滤的步骤，可以单独使用也可以与离心步骤联合使用。

15 合适的纯化方法已被描述在 WO99/03499、WO00/44389、WO01/82958 中，在此处引作参考。

功能化

20 本申请进一步表明 T 细胞来源的囊泡可被功能化从而展示不同的生物活性。尤其是可以修饰囊泡从而包括任一需要的分子，诸如蛋白、多肽、肽、脂质、糖脂、核酸、小药剂、糖等。尤其有利的是本申请也提供了这些囊泡可以在体内、离体或体外将分子高效递送给不同靶细胞，尤其是递送给抗原呈递细胞（APC）的证据。

25 如下所讨论，可以在由 T 细胞释放或产生之前、过程中或者之后，对囊泡进行功能化。更确切地说，可以通过分子的直接负载、分子的嵌合负载，间接负载（通过修饰囊泡的 T 细胞）进行功能化。直接或嵌合负载可以在释放囊泡后进行。

30 功能化分子可能出现在囊泡内、其膜内或其表面。胞质中出现的

分子可能是不同的可溶性因子，诸如生物活性蛋白或多肽，包括细胞因子、生长因子、荷尔蒙、反义 RNA、抗体、肿瘤抑制蛋白等。分子也可以部分或全部插入囊泡膜，诸如受体、传感器等。分子可以插在囊泡膜的内表面或外表面，或内外表面（即跨膜分子）。分子也可以通过不同的结合方式，包括共价、静电、疏水键或氢键结合等与囊泡膜结合。分子也可以结合在囊泡膜的内表面或外表面。可以与膜上存在的诸如受体、脂质等的特异性标记物或基元来完成结合。

直接负载是本发明一个尤其优选的实施方案。其尤其适合于产生负载特异抗原肽的免疫原性囊泡。

在一个特别的实施方案中，例如抗原分子可以通过直接负载诸如 I 类或 II 类 MHC 或 CD1 分子的抗原呈递分子结合在囊泡表面。据此看来，本发明的另一目的是基于 MHC 分子在 T 细胞来源的囊泡表面意想不到的富集。本发明的发明者已经表明这种 MHC 分子可以用外源抗原肽（例如，I 类或 II 类肽）直接负载。本发明的特别的目的在于产生免疫原性产物的方法，所述方法包括：

- 提供 T 细胞来源的囊泡，以及
- 将所述囊泡与抗原分子在使所述分子与 MHC 复合物相互作用，从而产生免疫原性产物的条件下接触。

本发明也涉及转化抗原肽（例如，MHC 结合肽）或者肽/MHC 复合物到 APCs 以诱导特异性 T 细胞应答的方法，所述方法包括：

- a) 用抗原肽在结合到 MHC 复合物的条件下负载 T 细胞来源的囊泡，以及
- b) 在体外、离体或体内即，通过给受试对象直接给药将所述负载的囊泡与抗原呈递细胞接触。

直接负载可以在 WO01/82958 所描述的各种条件下进行，此处引入作为参考。在一优先实施方案中，所述方法包括将分离或纯化的膜

囊泡置于所选择的酸性介质，或在将所述囊泡与上述免疫原性化合物接触之前、接触中或接触后进行处理步骤，以使或促进其负载。由此看来，应用所选择的酸性介质或处理至少可以部分地去除结合在囊泡表面的内源性肽或脂质和或促进免疫原性化合物的交换。在一更优选的实施方案中，与免疫原性化合物接触后离心泡囊，优选密度离心或渗滤以去处未结合的免疫原性化合物。

例如，免疫原性化合物可以是任一肽或脂质，它们与抗原呈递分子结合呈递到免疫系统。肽类可以是 I 类限制性肽、II 类限制性肽，或单独，或与其它肽类混合或组合在一起，或者甚至可以是肿瘤细胞洗脱液中的肽。本发明尤其适用于直接负载 I 类限制性肽。脂质可以是微生物脂类、微生物糖脂或者脂类或糖脂肿瘤抗原，它们或单独存在，或以不同组合物或者混合物的形式存在。

在一优选实施方案中，直接负载包括：(i) 将分离或纯化的膜囊泡置于所选择的酸性介质，(ii) 将上述分离或纯化的膜囊泡与 I 类限制性肽在使肽与所述膜囊泡表面的 I 类 HLA 分子复合的条件下进行接触，以及 (iii) 收集负载的膜囊泡。术语“外源性”是指肽被增加到组合物中。

在另一更特别的改变中，所述方法包括如下步骤：(i) 将分离或纯化的膜囊泡置于所选择的酸性介质上，(ii) 在存在 β 2-微球蛋白的条件下，将所述分离或纯化的膜囊泡与 I 类限制性肽在使肽与上述膜囊泡表面的 I 类 HLA 分子复合的条件下进行接触，以及 (iii) 收集负载的膜囊泡。更优选地，所述步骤 (i) 包括将分离或纯化的膜囊泡置于一种酸性介质至少 5 分钟，这种酸性介质的 PH 值为 3.0~5.5，更优选地在 3.2~4.2。 β 2-微球蛋白存在情况下的直接负载是有益的，因为即使当可利用的免疫原混合物数量非常少的情况下，负载也可有效地进行。

当有大量免疫原性化合物可以利用时，就不需要 β 2-微球蛋白并且所述方法包括如下步骤：(i) 在缺少 β 2-微球蛋白的条件下将分离或纯化的膜囊泡与 I 类限制性免疫原性化合物（例如，肽类或者脂质）接触，(ii) 在使免疫原性化合物与内源性复合物交换的条件下将步骤

5 (i) 的混合物置于所选择的酸性介质或进行处理，从而与上述膜囊泡表面的 I 类 HLA 分子结合，(iii) 中和介质以停止交换和/或稳定步骤 (ii) 形成的复合物以及 (iv) 收集负载的膜囊泡。更优选地，步骤 (ii) 包括将混合物置于 PH 值为 4.0~5.5 的酸性介质一段足以使任一内源性复合物分子与免疫原性化合物进行的交换时间，从而结合到 MHC 复合物上。

10

也可以用诸如病毒蛋白的较大抗原直接负载完成囊泡的功能化。尤其是，病毒蛋白能够直接与 T 细胞来源的外体表面标记物，诸如 CD81 相互作用。一个具体的例子是丙型肝炎病毒（HCV）包膜糖蛋白能够与囊泡表面的 CD81 相互作用，因为 CD81 是 HCV 的受体，也是 T 细胞来源囊泡一种主要组成成分。因此一种产生功能化囊泡方法包括将如上所述的 T 细胞来源囊泡与 HCV 包膜蛋白或者其片段在使

15 所述包膜蛋白或者其片段结合 CD81 的条件下进行接触。

依此看来，本发明的另一个目的是提供治疗丙型肝炎病毒（HCV）感染受试对象的方法，或者在受试对象体内产生抗 HCV 的免疫应答的方法，所述方法包括给需要的受试对象施用（例如，注射）有效剂量的负载了 HCV 包膜蛋白或其 CD81 结合片段的 T 细胞来源囊泡。包膜蛋白更优选地为 HCV 包膜糖蛋白 E2 或其 CD81 结合片段。一种

20 更具体的方法包括：

- a) 从 T 细胞制备囊泡，
 - b) 用 HCV 包膜糖蛋白或者其片段、典型的 HCV 糖蛋白 E2 或者其片段，或者包括 E2 糖蛋白和其它 HCV 免疫原性蛋白片段的嵌合构建物负载囊泡，
 - c) 将负载的囊泡注射到需要的受试对象，从而引发或刺激上述
- 25
- 30

受试对象康 HCV 感染的特异性免疫应答。

或者，负载的囊泡可以离体或体外用来刺激免疫细胞，所述免疫细胞被施用于受试对象。

5

本发明还涉及包含有用 HCV 糖蛋白或其片段负载的 T 细胞来源囊泡的组合物，以及上述泡囊在体内对 HCV 感染进行治疗或预防接种的应用。本发明还包括通过将病毒与 CD81 结合并且将病毒转移致 APCs，T 细胞源来源囊泡在中和循环 HCV，从而诱导抗 HCV 的免疫应答中的应用。

10

嵌合负载是本发明的又一特定优选的实施方案。其适用于产生负载有任一类型所选择分子，尤其是蛋白的囊泡，所述蛋白可以作用于 APCs 或 T 细胞从而增强囊泡的抗原呈递功能。通过使用嵌合蛋白可以实现嵌合负载，所述嵌合蛋白包括两个结构域：第一结构域具有与囊泡膜结合的活性，第二结构域具有所选择的活性。第一结构域优选地由 lactaderin 或 E2 糖蛋白或者其片段组成，典型的 lactaderin 或者其片段包括其 C1 和/或 C2 结构域或者其 HCV E2 糖蛋白或者 CD81 结合片段。生产这种嵌合蛋白的方法公开在 US60/313,159 中，此处引入作为参考。

15

20

尤其是，嵌合多肽或化合物可以通过基因或化学融合方法制备。对于基因融合而言，编码目的肽的嵌合基因区可以融合在结合 Lactadherin 或 E2 糖蛋白的上游、下游、或内部结构域。此外，结构域可以直接相互融合，或被间隔区分隔，所述间隔区并不改变嵌合多肽的特性。这种间隔区包括克隆位点、切割位点、可变区等。此外，嵌合基因构建物可进一步包括前导信号序列以利于编码的嵌合多肽的分泌。对于化学融合而言，可以选择或修饰部分或全长的 lactadherin 序列，以在其最末端存在一个游离活性基团诸如硫醇、氨基、羧基以便交联一可溶性多肽、糖脂、或任一小分子。在一个优选化的实施方

25

30

案中，Lactadherin 构建物至少编码 C1 结构域的氨基酸和半胱氨酸，从而为与其它分子进行的化学较链提供游离的硫醇基。肽，化合物与 SH 基团的交联可以通过已经建立的稳定方法实现（综述 G.T Hermanson(1996)Bioconjugate techniques San Diego Academic Press 785 page）。

融合到 Lactadherin 或 E2 糖蛋白的结构域可以是任一多蛋白、肽、脂质等。它也可以是能够特异结合到修饰的选择的分子的活性结构域。

在一个典型的实施方案中，生产功能化囊泡的方法包括提供 T 细胞来源的囊泡并将所述囊泡与嵌合蛋白接触，所述嵌合蛋白含有融合到目的分子的 Lactadherin（或者其包括 C1 和/或 C2 结构域的片段）。例如，嵌合蛋白可以包括 Lactadherin C1-C2-集聚蛋白分子，所述分子可以通过 Lactadherin 的 C1-C2-结合到囊泡上，还可以通过集聚蛋白部分增加抗原的亲合性来激活 T 细胞应答。

在另一个典型的实施方案中，生产功能化囊泡的方法包括提供 T 细胞来源的囊泡并将所述泡囊与包含融合到目的分子的 HCV 糖蛋白包膜（或其包含 CD81 结合结构域的片段或变体）的嵌合蛋白接触。例如，嵌合蛋白可含有 HCV E2-集聚蛋白分子，所述分子能通过 CD81 标记与囊泡结合，并通过集聚蛋白部分增加抗原的亲合性来激活 T 细胞应答。

间接负载是本发明的另一尤其优选的实施方案。其适用于产生负载不同类型选定分子的囊泡。间接负载是基于对生产 T 细胞的修饰。这种修饰可通过重组 DNA 技术（基因修饰）或通过用抗原分子直接负载 T 细胞实现。在一个特定实施方案中，T 细胞含有编码目的分子的重组核酸。核酸可以是 DNA 或 RNA。它可以整合到不同类型施用于转染或感染 T 细胞的载体上，诸如质粒、病毒载体、裸 DNA 等。

转染后，重组 DNA 在细胞内表达并且表达产物转移至囊泡。为进一步增强所表达的分子对囊泡的靶向，重组核酸可以包括特殊的运输信号，诸如膜锚定序列。编码的分子可以是抗原、肽类、细胞因子、生长因子、配基受体、受体配基、TCR 或者其亚单位等。

5

在一具体的实施方案中，间接负载被用于产生呈递限定的 TCR 或 MHC 分子的囊泡。尤其是，T 细胞系可以用编码特异性 MHC 单元体的核酸转染，从而从异源 T 细胞生产有免疫能力的囊泡。如上所述，可以通过直接负载限定的抗原肽对这种囊泡进一步功能化。

10

这些不同方法可以产生含有目标分泌分子的 T 细胞来源的囊泡。这些囊泡具有改良的生物特性，并且可用于体内递送抗原以体内或体外刺激免疫细胞从而产生免疫反应将分子递送到特定的组织等。

15

免疫应答的产生

本发明尤其适用于产生、刺激或者调节免疫反应，尤其是诸如 CTL 应答的抗原特异性免疫应答。

20

实际上，T 细胞不能被看作是专职的抗原传递细胞，本发明出人意料表明 T 细胞来源的囊泡表达大量的 I 类 MHC 分子，并且这些囊泡能负载 I 类肽，并且它们能将 I 类分子/肽复合物转移至 APCs，刺激特异 T 细胞的激活。

25

本申请的特别之处在于产生或调节受试对象免疫应答的方法，所述方法包括给受试对象施用有效剂量的 T 细胞来源的囊泡。一个更优先的方法是针对产生或调节受试对象的抗原特异性免疫应答，所述方法包括给受试对象施用有效剂量的负载有所述抗原或者其抗原决定簇的 T 细胞来源的囊泡。这些方法可被用作疫苗来提高病人对感染和肿瘤的免疫力。所述抗原可以是病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原、寄生虫、自体抗原等。

30

5 本发明也提供了存在于囊泡上的特异性 TCRs 能够被传递到 APCs，从而诱导产生针对这种 TCR 特异抗原决定簇的免疫应答。尤其是，本发明由 T 淋巴细胞克隆、系、杂交瘤或者 T 淋巴细胞来源的恶性细胞产生的囊泡在其表面表达同源性的 TCR。这种同源性的 TCR 可作为抗原来引发特异性免疫反应。尤其是，这种囊泡可用于向 APCs 递送特殊的 TCR（作为抗原）从而诱导特异针对 TCR 抗原决定簇的免疫应答。

10 本发明的一个特殊目的在于从培养的 T 细胞克隆/系的囊泡在递送携带的 TCRs 到 APCs 的应用，从而诱导对有害 TCR 的免疫应答，所述 T 细胞克隆/系由它们的 TCRs 识别特异性自体抗原。这种类型的囊泡可作为 TCR 疫苗用于治疗自体免疫失调。

15 本发明的另一个特殊目的在于从来源于 T 细胞的恶性细胞产生的囊泡在递送作为特异性肿瘤抗原的 TCRs 到 APCs，从而诱导针对抗原性 TCRs 的免疫反应的应用，所述 T 细胞可以具有克隆的 TCR。这类囊泡可被用作独特型 TCR 疫苗以治疗 T 细胞白血病。

20 基于囊泡所表现的调节和效应器分子的本发明另一目的是通过生物活性的膜结合蛋白或囊泡携带的蛋白诱导靶细胞激活、抑制或其细胞毒性的方法。

25 囊泡可以应用于任一哺乳动物，尤其是应用于人体。它们通常通过注射，例如真皮内、皮下、静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、肿瘤内（或肿瘤周围）进行施用。如果合适，可以反复注射。可以在不同的介质，诸如盐水、等渗液、缓冲液等中调节囊泡。例如，I 类 MHC 分子每次的注射剂量大约在 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ 之间。

30 分子的靶向递送

本发明的另一目的是基于囊泡表面所存在的抗原特异性 TCRs。事实上, TCR 可作为靶向因子向靶细胞特异性递送任一分子。因此本发明还涉及囊泡通过它们的 TCR 成分将泡囊靶定到靶细胞方法, 所述靶细胞表达可以由 TCR 识别的抗原。

5

这种方法可用于特异性地将由泡囊携带的生物活性分子递送到靶细胞, 所述靶细胞表达由囊泡上的 TCR 识别的 MHC 抗原复合物, 此方法还可用于在泡囊上负载的追踪或功能分子特异性递送到靶细胞, 所述靶细胞表达能被上述囊泡上的 TCR 识别的 MHC 抗原。

10

本发明的其它方面和优点将在下列实施例中公开, 这些实施例应该被理解为说明性的而非限制本发明的保护范围。在本申请中引用的所有参考文献都在此处引入作为参考。

15 实施例

材料与方法

1. 从原代 T 细胞和 T 细胞系产生囊泡

1.1 从原代 T 细胞产生囊泡

从未吸附的 PBMC 细胞中通过用尼龙纤维柱除去非 T-细胞将 CD3+ T 细胞富集纯化度为 90%。富集的 CD3+ T 细胞稀释至 $4-5 \times 10^6$ /ml 并利用下列方法之一培养在过虑的 AIMV 培养基中:

- a. 1μ l/ml PHA 培养 3 天
- b. 5μ l/ml PMA 加 250ng/ml 离子霉素培养 3 天
- c. 1μ l/ml PHA 培养 2 天。用新鲜并过虑的 AIMV 培养基更换后, 再继续培养 4 天。

25

1.2 从 T 细胞系 (Jurkat) 产生囊泡

Jukat 细胞稀释至 $4-5 \times 10^6$ /ml, 并培养在过虑的 PHA 浓度为 1μ l/ml 的 AIMV 培养基中 4 天。

1.3 纯化 T 细胞来源的囊泡

30 根据实施例 1.1 和 1.2, 利用 WO01/82958 中公开的方法从 T 细

胞培养上清液中纯化产生的囊泡。然后将囊泡浓缩 150-200 倍。

2. 囊泡的鉴定

2.1 用醛珠分析 () 检测囊泡的表型

5 在用于 FACS 分析之前，将囊泡结合到醛聚苯乙烯乳胶珠上 (Interface Dynamics 公司) 并用荧光标记的抗-CD 抗原的抗体进行染色。

2.2 通过醛珠分析和吸附 ELISA 法定量 FACS 分析测定囊泡上 I /II 类分子的数量。

10 醛珠分析结合定量 FACS 分析首先对囊泡表面的 I 类和 II 类分子的比值进行检测。囊泡与醛珠结合并用未标记的抗 I /II 类分子的小鼠抗体连同荧光标记的二抗进行染色。将二抗的平均荧光强度与醛珠上每珠带有已知数量小鼠 Ig 的抗体的荧光强度比较。结果，得出每个磁珠的囊泡表面的 I 类和 II 类分子数量并可推导出囊泡表面 I 类和 II 类分子的比值。

15 每微升囊泡的 II 类分子的绝对数值用 WO01/82958 中描述的吸附 Elisa 方法进行检测。

 每微升囊泡的 I 类分子的绝对数值用 I 类和 II 类分子的比值乘以每微升 II 类分子的绝对数值计算得出。

20 2.3 功能分析：SEE 分析

 用超抗原 SEE 负载囊泡并检测囊泡在 Raji 抗原呈递细胞 (WO01/82958) 存在的条件下诱导 Jukat T 细胞分泌 IL-2 的能力。

3. I 类肽负载

25 用生物素标记的参照肽直接负载囊泡的 I 类 MHC 分子。由钬-亲和素产生的荧光信号显示参照肽与 I 类 MHC 分子的结合，在板上捕获囊泡的 I 类分子后，所述钬-亲和素与生物素结合。

 用生物素标记的参照肽以及靶肽的混合物直接负载所述囊泡的 I 类 MHC 分子。通过生物素参照肽结合的减少显示靶肽与 I 类分子的结合，所述减少如 WO01/82958 所述由从生物素标记肽的结合的钬-亲

和素的荧光信号的减少反映。

4. 载有 Mart-1 I 类肽的囊泡的生物活性

5 从 HLA-2+ T 细胞产生的囊泡直接用 Mart-1 肽直接负载并检测它们诱导 Mart-1 特异性 T 细胞 LT11 分泌 IFN- γ 的能力。

结果

5. 从激活的原代 T 细胞富集的囊泡表达 T 细胞特异性标记物和外体特异性 tetraspan 蛋白。

10

由第一部分所述的 PHA 激活的 T 细胞产生的膜囊泡的表型已经由醛珠测定法进行了分析。分析结果如图 1 所示。

15 图 1a 显示激活 T 细胞来源的囊泡表达特异标记物诸如 CD3, CD8, T 细胞受体 (TCR) 和 CD152。这与其它类型细胞, 诸如树突细胞 (Dex) 来源的囊泡形成对比, 这些细胞基本不表达类似 CD3, CD8, TCR 和 CD152 的标记。T 细胞外体与 Dex 上标记物的平均荧光强度的比值对在 CD3、CD8、TCR 和 CD152 而言分别为 9.0、4.7、3.9 和 2.0。

20

图 1b 显示激活 T 细胞来源的囊泡出乎意料地表达的 I 类比 II 类分子多 (I 类分子和 II 类分子的平均荧光强度比值为 12.2)。这与 Dex 相反, 其表达的 II 类分子比 I 类分子多 (I 类分子和 II 类分子的平均荧光强度比值为 0.11)。

25

图 1c 显示激活 T 细胞来源的囊泡表达 tetraspan 蛋白, 例如 CD63、CD81 和 CD9。

6. Jurkat T 细胞系来源的囊泡表达 T 细胞特异性标记

30 由第一部分所述的 PHA 激活的 Jurkat T 细胞产生的膜囊泡的表

型已由醛珠分析法进行了分析。分析结果如图 2 所述。奇怪的是，囊泡低水平表达 I/II 类分子，而高表达 CD1c,d。

5 7. 由激活 T 的细胞产生的囊泡的 I 类分子总量与树突细胞来源的囊泡的 I 类分子总量在同一数量级。

表 1 列出由激活 T 细胞产生的囊泡的 I 类分子总量，以及来自三个白细胞群的 Dex 源囊泡的 I 类分子总量。所述囊泡与没有细胞扩增的每个白细胞群的 Dex 的的 I 类分子总量在一个数量级。

10 已经有报道表明在人工抗原呈递细胞存在的情况下 T 细胞很容易扩增到 10,000 倍 (Maus MV 等, 2000)。它们还可以永生 (Hooijberg E. 等 2000, Kaltof K. 1998)。因此，相同数量的血细胞或白细胞群可用于生成携带比 Dex 多的多的 I 类分子的囊泡。

15 8. T 细胞来源的囊泡上的 II 类分子可负载超抗原 E (SEE) 并刺激 Jurkat T 细胞分泌 IL-2。

图 3 显示从三个白细胞群的激活 T 细胞产生并负载有超抗原 SEE 的囊泡在 APC 存在的情况下刺激 Jurkat 细胞产生 IL-2。这就表明这种囊泡能将抗原 HLA 复合物转移至抗原呈递细胞并使它们充分发挥功能。

20 9. 可以用生物素标记的参照肽负载 T 细胞来源的囊泡上的 I 类分子。

25 图 4 显示了来自 HLA-A2+白细胞群而非 HLA-A2-白细胞群 T 细胞上的 I 类分子可以在 PH 值 4.2 以及 $\beta 2m$ 存在的情况下用 HLA-A2-特异性的生物素标记的参照肽直接负载。这就提供了证据表明肽负载是特异的，因为 HLA 的限制。

30 图 5 显示 HLA-A2+T 细胞来源的囊泡上的 I 类分子在 PH 值 5.2 以及 $\beta 2m$ 缺失的情况下能直接负载 HLA-A2-特异性肽 Mart-1。Mart-1 肽能竞争抗生物素标记的参照肽的结合。这表明 Mart-1 肽可以 HLA 限定的方式被特异地负载到囊泡的 I 类 MHC 分子上。

10. 负载有 Mart-1 肽的 HLA-A2+T 细胞来源的囊泡上的 I 类分子诱导 Mart-1 特异性 T 细胞分泌 IFN- γ 。

5 图 6 清晰地显示 Mart-1 特异性 T 细胞 LT11 应答负载 Mart-1 肽的所述囊泡 (HLA-A2+) 的刺激并分泌 IFN- γ 。这证明囊泡已被功能化并能将 MHC I 类肽复合物转移到靶 APC。

表 1 比较 T 细胞外体和来自白细胞群的 Dex 的 I 类分子总量

	所述囊泡	Dex
LP#279	0.87×10^{14}	1.39×10^{14}
LP#282	0.25×10^{14}	0.28×10^{14}
LP#283	2.2×10^{14}	2.2×10^{14}
平均值	1.1×10^{14}	1.3×10^{14}
标准偏差	0.97×10^{14}	0.98×10^{14}

参考文献

- Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., Newman, G. R.和 Jasani, B.
基于免疫磁性分离和流式细胞术分析抗原呈递细胞衍生的外体。
5 J Immunol Methods 247, 163-74, 2001
- Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W.和 Geuze, H. J.
外体：从多囊泡体的内部囊泡到细胞间信号装置。
10 J Cell Sci 113 Pt 19, 3365-74.,2000
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., de Groot, C.和 Geuze, H. J.
滤泡树突细胞在其表面携带表达 MHC II类分子的微囊泡。
15 J Immunol 165, 1259-65.,2000
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. 和 Geuze, H. J.
在多囊泡内体的内部囊泡上和由人 B 淋巴细胞分泌的外体上选择性富集 tetraspan 蛋白。
20 J Biol Chem 273, 20121-7,1998
- Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J.和 Sixman, J. J.
25 激活的血小板释放两种膜囊泡：表面脱落的微囊泡和从多囊泡体和 α 颗粒的胞吐衍生的外体。
Blood 94, 3791-9., 1999
- Hooijberg E, Ruizendaal JJ, Snijders PJ, Kueter EW, Walboomers JM, Spits H.
30 通过端粒酶逆转录酶的异位表达使人 CD8+T 细胞克隆永生

J Immunol 2000 Oct 15;165(8):4239-45

Kaltoft, K.

5 细胞因子引发体外激活的人 T 淋巴细胞永生。CD28 的表达与
细胞群倍增负相关。

Exp Clin Immunogenet 15, 84-9, 1998

Maus MV, Thomas AK, Leonard DG, Allman D, Addya K,
Schlienger K, Riley JL, June CH.

10 由人工 APCs 表达 T 细胞受体配体、CD28 和 4-1BB, 离体扩增
多克隆和抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞。

Nat Biotechnol. 2002 Feb;20(20):143-8.

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R.,
15 Harding, C. V., Melief, C. J.和 Geuze, H. J.

B 淋巴细胞分泌抗原呈递囊泡

J Exp Med 183,1161-72,1996

Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C.和
20 Desaymard, C.

在肥大细胞分泌颗粒中聚集主要相容性抗原 II 类分子并在脱颗粒
后释放

Mol Biol Cell 8, 2631-45, 1997

25 Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-
Castagnoli, P., Raposo, G.和 Amigorena, S.

树突细胞衍生的外体的分子鉴定。选择性聚集热休克蛋白 hsc73。

J Cell Biol 147, 599-610, 1999

30 Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo,

G., Garin, J.和 Amigorena, S.

树突细胞衍生的外体：一种分泌的明显有别于凋亡囊泡的亚细胞结构的蛋白质组分析：

J Immunol 166, 7309-18, 2001

5

Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N.和 Heyman, M.

肠上皮分泌外体样囊泡。

Gastroenterology 121, 337-49., 2001

10

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., They, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. 和 Zirvogel, L.

肿瘤衍生的外体是 CTL 交叉致敏的共用肿瘤排异抗原的来源

15

Nat Med 7, 297-303.,2001

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G.和 Amigorena, S.

利用一种新型无细胞疫苗：树突细胞衍生的外体根除建立的鼠肿瘤。

20

Nat Med 4, 594-600,1998

图1a

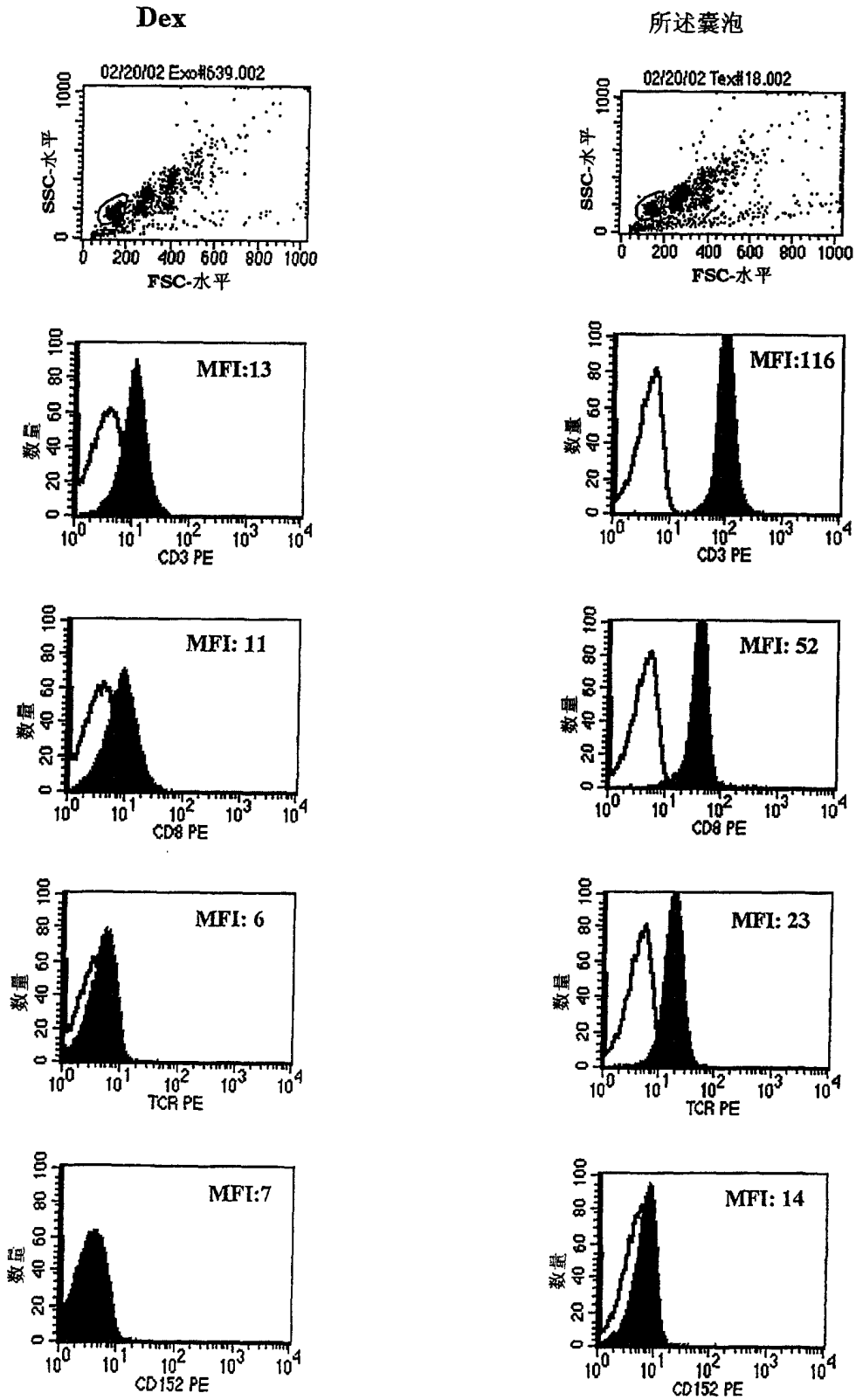


图 1b

HLA II类和I类分子

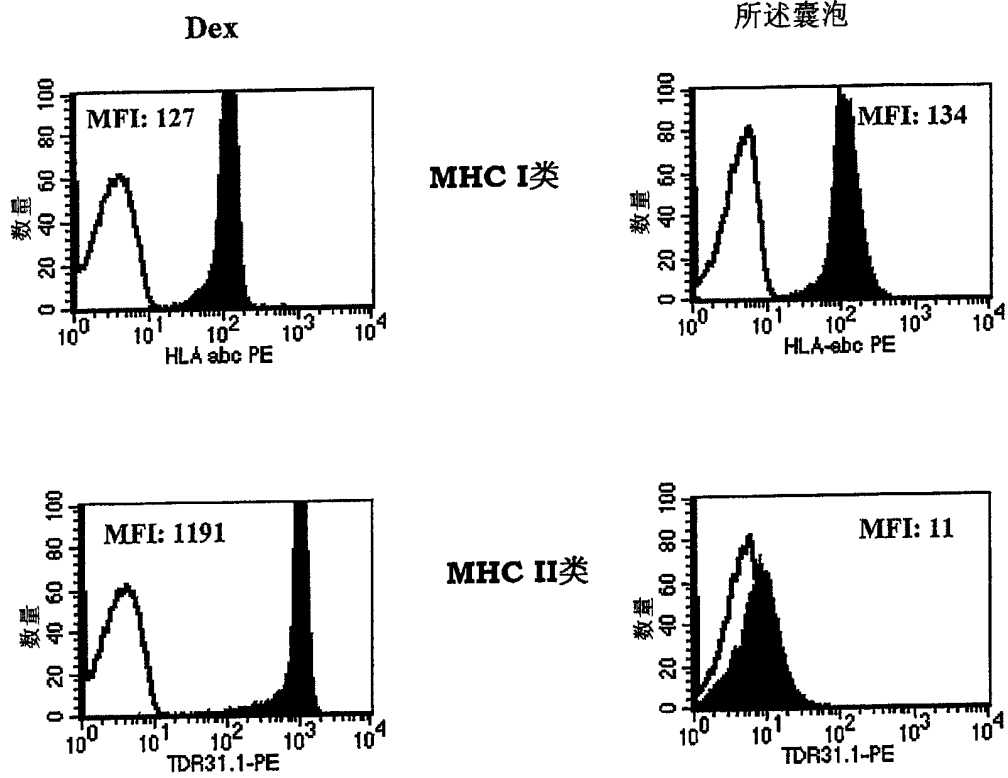


图1c
Tetraspan蛋白

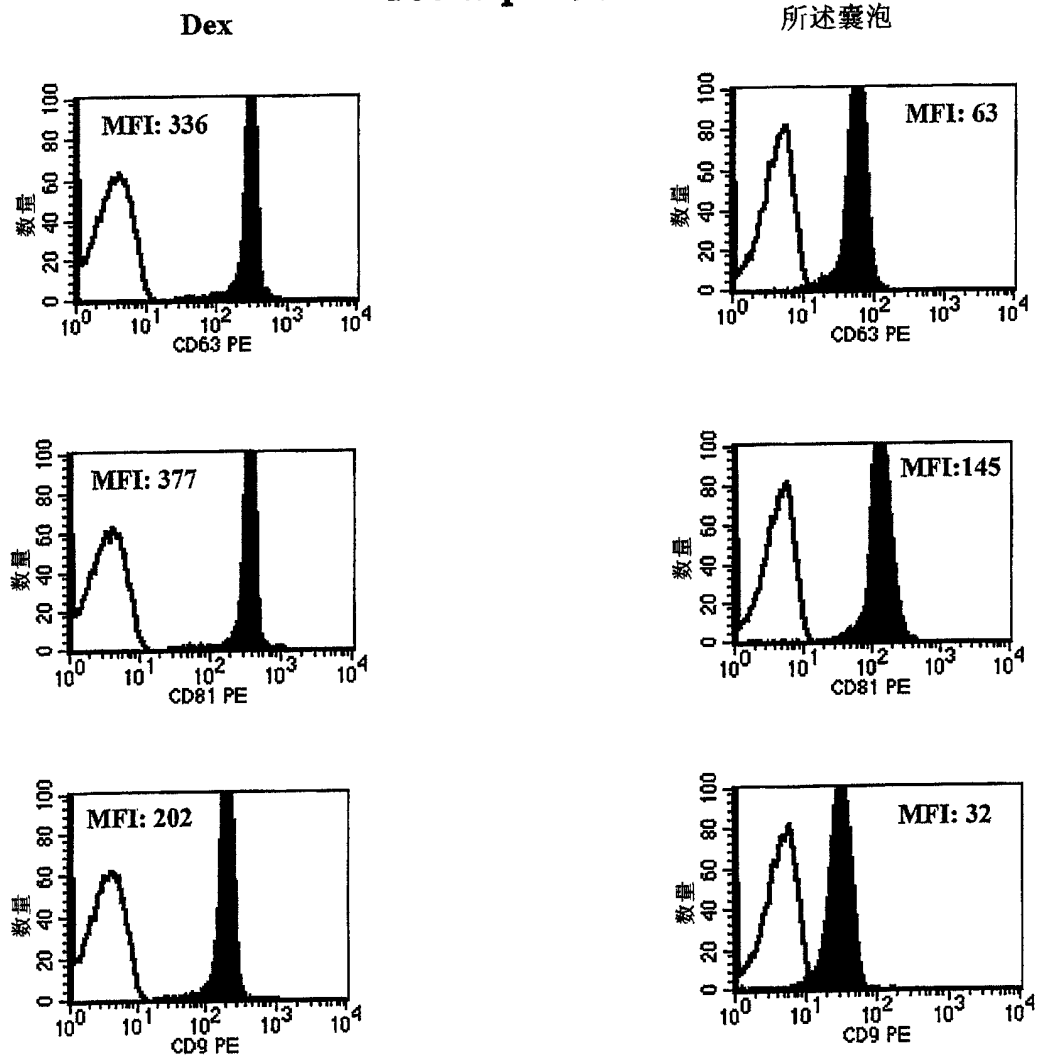


图 2

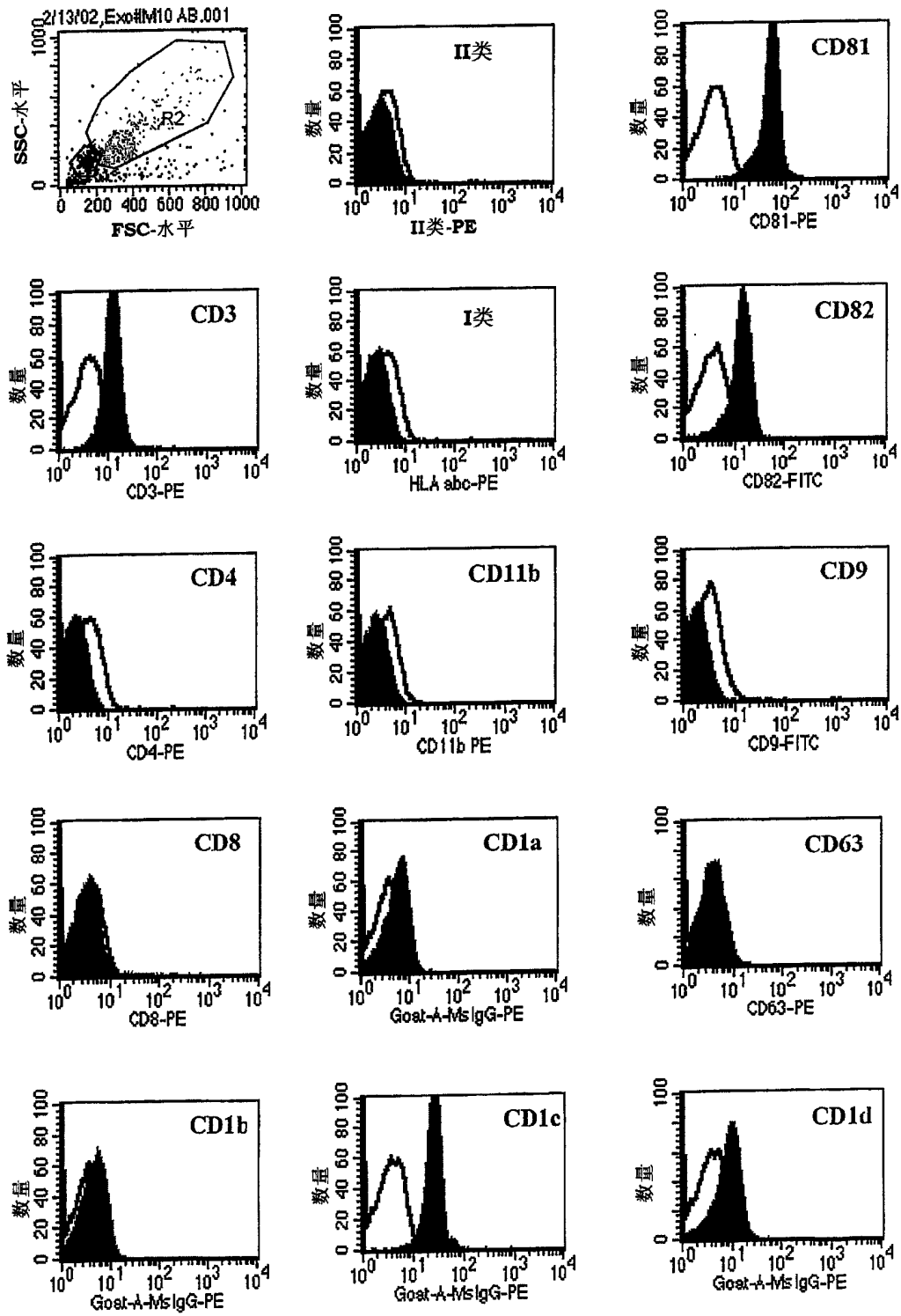


图3

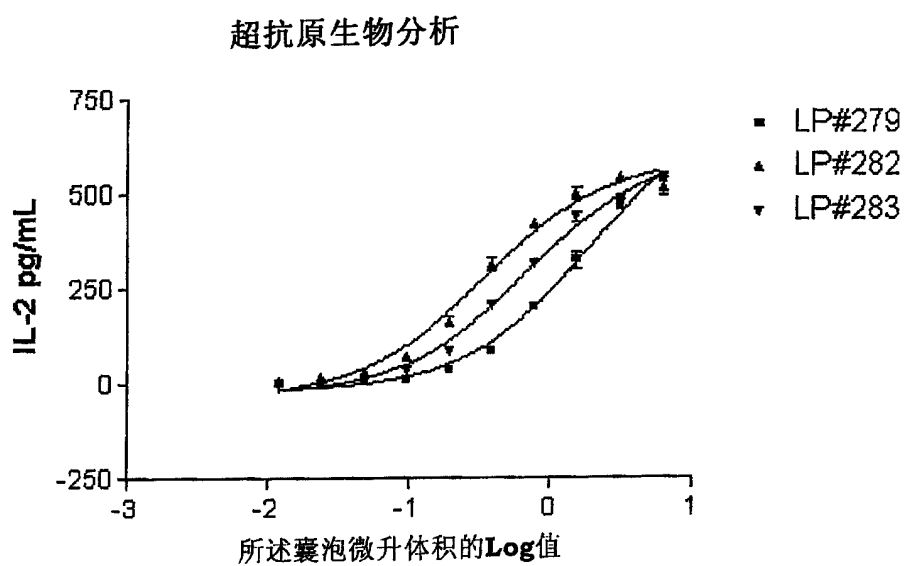


图4

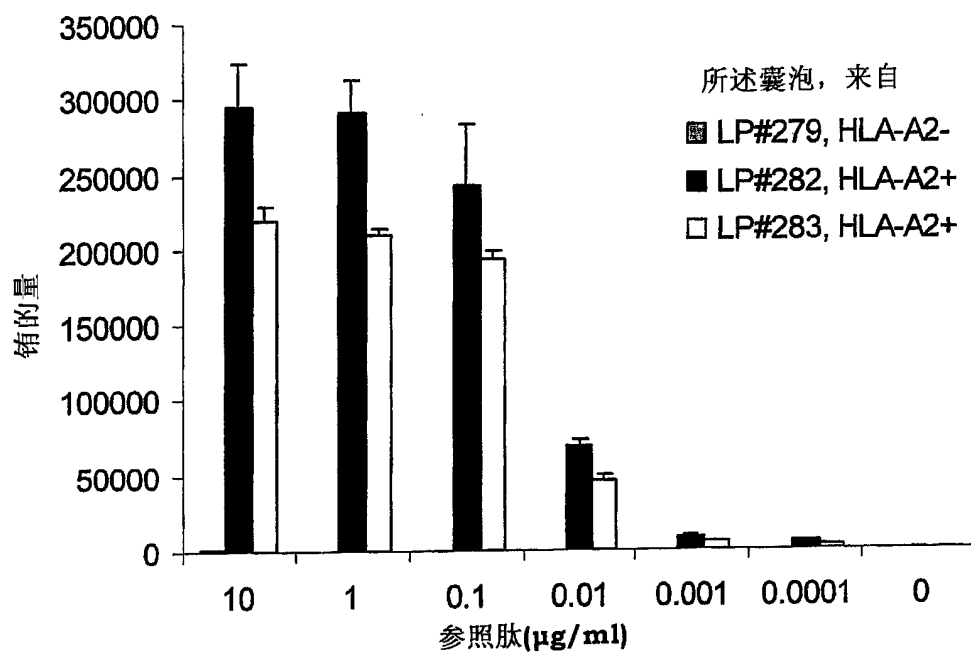


图5

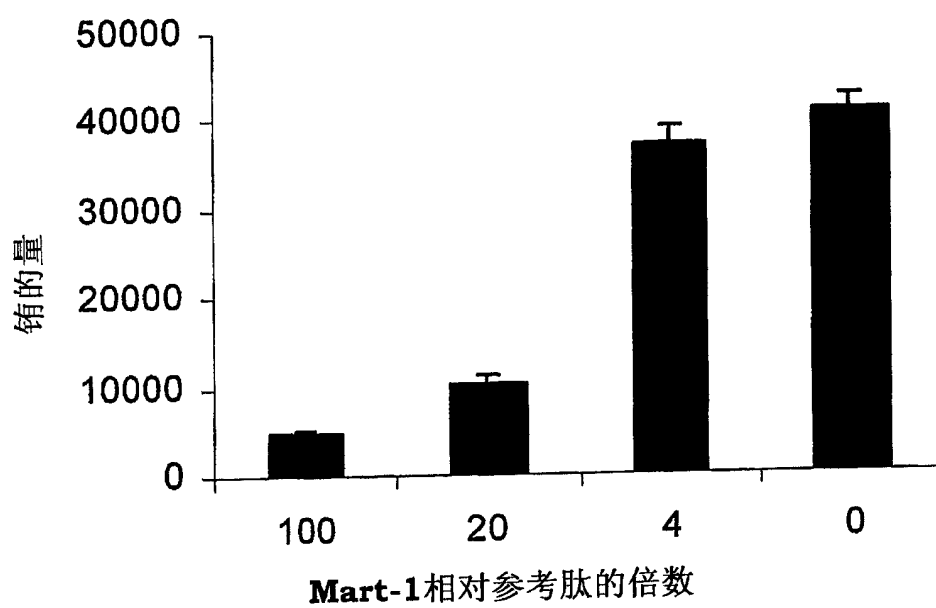


图6

