



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101085349 B

(45) 授权公告日 2011.05.25

(21) 申请号 200610027518.X

页 10-15 行、第 14 页 1-5 行、第 17 页 20-25 行、第 24 页 15-20 行、第 25 页 20-25 行、第 44 页 1-15 行。

(22) 申请日 2006.06.09

(73) 专利权人 项雯华

地址 200040 上海市昌平路 645 弄 2 号 302 室

专利权人 项建华

CN 1639323 A, 2005.07.13, 说明书第 1 页 20-30 行、第 11 页 10-20 行。

审查员 马彦冬

(72) 发明人 项建华

(74) 专利代理机构 上海三和万国知识产权代理
事务所 31230

代理人 章鸣玉

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1265038 A, 2000.08.30, 说明书第 3 页 20-25 行、第 6 页 25-28 行、第 7 页 1-15 行、第 13

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 7 页

(54) 发明名称

囊泡导向的免疫细胞及其在制备抗肿瘤药物上的应用

(57) 摘要

本发明提供一种免疫活性药物组合物, 包含有效量的囊泡导向的免疫细胞以及药用载体。本发明还提供制备这种免疫活性药物组合物的方法, 提供囊泡导向的免疫细胞的制备方法。本发明还提供这种免疫活性药物组合物在制备抗肿瘤、抑制自身免疫疾病和 / 或抑制排异反应的药物上的应用。

1. 一种囊泡导向的 T 细胞,其特征在於:由 T 细胞摄取树状细胞或肿瘤细胞衍生的囊泡而形成的具有免疫刺激作用的细胞,所述囊泡是直径 50-90nm 的细胞膜囊泡。

2. 一种免疫活性药物组合物,包含治疗有效量的权利要求 1 所述囊泡导向的 T 细胞以及药用载体。

3. 如权利要求 2 所述的免疫活性药物组合物,其中所述囊泡来自于树状细胞或工程化的树状细胞或工程化的肿瘤细胞。

4. 如权利要求 2 所述的免疫活性药物组合物,其中所述囊泡导向的 T 细胞是具有 Th₁ 或 Th₂ 特征、由 CD4⁺T 细胞摄取囊泡而形成的具有表达 pMHC I、CD54 和 CD80 的 T 细胞。

5. 如权利要求 2 所述的免疫活性药物组合物,其中还包含免疫佐剂。

6. 如权利要求 5 所述的免疫活性药物组合物,其中所述免疫佐剂包括格兰氏阴性细菌内毒素的类脂质 A 部分、溴化磷酸酯、线形聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段聚合物、矿物盐或脂质体细胞因子。

7. 权利要求 1 所述囊泡导向的 T 细胞的制备方法,其特征在於:

其中由树突细胞衍生的囊泡导向的 T 细胞的制备包括以下步骤:

1) ConA 激活的 CD4⁺T 细胞的制备:在含有 IL-2 和 ConA 的 RPMI1640 培养基中培养脾脏细胞,分离得到 ConA 激活的 CD4⁺T 细胞,

2) 囊泡的制备:在高剂量 GM-CSF 和 IL-4 的作用下,产生骨髓来源树突细胞,将此树突细胞在含有 OVA 蛋白的无血清 AIM-V 培养基中培养,离心所得上清液,得到囊泡沉淀物,

3) ConA 激活的 CD4⁺T 细胞对所述囊泡的摄取:在含有 IL-2 的 AIM-V 培养基中,将步骤 1) 所得的 CD4⁺T 细胞与步骤 2) 所得的囊泡共培养,得到摄取所述囊泡的 ConA 激活的 CD4⁺T 细胞;及

由工程化肿瘤细胞衍生的囊泡导向的 T 细胞的制备包括以下步骤:

1) pcDNA-CD80 表达载体的构建:抽提树突细胞的 RNA,用 RT-PCR 法克隆 CD80 基因,并构造 pcDNA-CD80 基因表达载体,

2) 转染细胞系 EG7/CD80 的产生:将步骤 1) 所得表达载体转化到肿瘤细胞 EG7 中,获得 EG7/CD80 肿瘤细胞,

3) 囊泡的制备:在无 FCS 的 AIM-V 培养基中,培养步骤 2) 所得的肿瘤细胞 EG7/CD80,离心培养所得上清液,得到囊泡沉淀物,

4) CD4⁺T 的激活:从脾脏中分离得天然 CD4⁺T 细胞,将此细胞在含有抗 CD3 抗体、IL-2 的培养基中培养,所述培养基还包含 IL-12 和抗 IL-4 抗体,或 IL-4、IL-10、TGF- β 和抗 IFN- γ 抗体,

5) CD4⁺T 对囊泡的摄取:将步骤 3) 所得囊泡和步骤 4) 所得 CD4⁺T 细胞,在含有 IL-2 的培养基中共培养,得到摄取囊泡的 CD4⁺T 细胞。

8. 权利要求 1 所述囊泡导向的 T 细胞在制备抗肿瘤、抑制自身免疫疾病和 / 或抑制排斥反应的药物上的应用。

囊泡导向的免疫细胞及其在制备抗肿瘤药物上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及免疫调节及疾病防治,更具体涉及提供一种免疫活性药物组合物,包含有效量的囊泡导向的免疫细胞,及其在制备抗肿瘤、抑制自身免疫疾病和 / 或抑制排异反应的药物上的应用。

背景技术

[0002] 树状细胞 (Dendritic cell, DC) 在囊泡室中加工外来抗原,如多泡囊泡 (1) 可以与细胞膜融合,然后释放出抗原提呈小泡称为囊泡 (Exosome, EXO) (2-4)。囊泡是直径为 50-90nm 含有抗原提呈分子 (MHCI, MHCII, CD1, hsp70-90); 四聚体分子 (CD9, CD63, CD81); 黏附分子 (CD11b, CD54) 和协同刺激分子 CD86 等启动潜在免疫应答所必需的元件 (5-7)。Zitvogel 等第一次报道了树突细胞衍生的囊泡可以成功地用做疫苗来去除动物模型中的肿瘤 (4)。来自树突细胞的临床级别囊泡也已获得 (8)。然而,用树突衍生的囊泡进行免疫治疗还有他的局限性,其中最大的局限在于识别肿瘤抗原的有效性。后来发现肿瘤细胞衍生的囊泡可以携带肿瘤抗原启动有效的抗肿瘤免疫应答 (9-11)。而且,肿瘤衍生的囊泡如那些来自于肿瘤腹水的囊泡可以提供一种新来源的非细胞囊泡作为肿瘤疫苗 (12)。最近更多的研究表明囊泡疫苗在不同的动物模型中已确认具有诱导肿瘤免疫的作用 (13-16)。然而,在大多数研究中,囊泡疫苗仅是诱导预防型的抗肿瘤免疫应答,而不是治疗已存在的肿瘤。在最近的 I 期临床实验中使用囊泡疫苗,检测发现在所有 15 个黑色素瘤病人的外周血中没有发现肿瘤特异性的 T 细胞应答。只有一个病人表现出对肿瘤生长的部分应答 (17)。在另外的 I 期临床实验中使用囊泡疫苗,在 9 个后期非小细胞肺癌病人中,只在 3 个病人中发现对 MAGE 肽的迟发性超敏反应 (18)。所以,囊泡疫苗的免疫途径和效率需要进一步提高。

[0003] 囊泡的 pMHCI 和 pMHCII 复合物具有功能,但可能需要转移到树突细胞中才能提高 T 细胞的激活,从而导致肿瘤的消除 (14, 19, 20)。而且囊泡在体内介导的抗肿瘤免疫的潜在途径可能是通过不成熟的 DC 对 EXO 的摄取,反过来再通过携带有囊泡的树突细胞上的 pMHC 复合物和协同刺激分子来激活抗原特异性的 T 淋巴细胞。我们先前发现树突细胞疫苗抗肿瘤免疫的效率依赖于树突细胞的成熟程度,成熟的树突细胞效率高,半成熟的树突细胞效率低 (21)。而且囊泡疫苗的效率低可能与囊泡在体内被不成熟的树突细胞所摄取有关。为了提高抗肿瘤免疫的效率, CpG 佐剂结合在树突细胞表面的 Tol1 样受体 9 上,可使树突细胞成熟和激活 (22),这种方法在体内已被应用到结合囊泡,提高囊泡诱导的细胞毒反应 (15)。所以,本发明者设想在体外携带囊泡的成熟树突细胞的应用可以成为一种新型的更有效的调整肿瘤特异的免疫应答的途径。

[0004] 给动物提供弱化的 T 淋巴细胞显示可刺激免疫抑制,阻止实验中自身免疫疾病的发展 (23, 24)。囊泡可通过抗原特异性的 pMHC/TCR 和非特异性的 CD54/LFA-1 相互作用被 T 细胞摄取 (25, 26)。最近研究显示 CD4⁺T 细胞可以通过 APC 的激活获得 APC 膜分子,这些激活的 CD4⁺T 获得了 pMHCI 和协同刺激分子 CD54 和 CD80,可进一步激活肿瘤特异性的细胞

毒 T 淋巴细胞免疫应答 (27)。CD4⁺T 细胞获得 APC 分子的一个潜在机制可能是 CD4⁺T 细胞摄取了树突细胞释放的囊泡。所以,本发明者设想在体外摄取囊泡的 CD4⁺T 细胞可能也可以成为一种新的针对肿瘤特异性免疫应答的更有效的途径。

[0005] 在上述两项设想的启发下,本发明者利用不同来源的树突细胞及其衍生的囊泡与不同来源的 T 细胞相互作用,制备得到一种免疫活性药物组合物,通过动物实验证实此药物组合物具有免疫活性,从而完成了本发明。

[0006] 因此,本发明的第一个目的是提供一种囊泡导向的 T 细胞。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种免疫活性药物组合物。

[0008] 本发明的第三个目的是提供囊泡导向的 T 细胞的制备方法。

[0009] 本发明的第四个目的是提供囊泡导向的 T 细胞在制备抗肿瘤、抑制自身免疫疾病和 / 或抑制排异反应的药物上的应用。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明第一方面提供的囊泡导向的 T 细胞是由 T 细胞摄取树状细胞或肿瘤细胞衍生的囊泡而形成的具有免疫刺激作用的细胞,所述囊泡是直径 50-90nm 的细胞膜囊泡。

[0012] 本发明第二方面提供的免疫活性药物组合物,包含治疗有效量囊泡导向的 T 细胞以及药用载体。

[0013] 特别是,所述囊泡导向的 T 细胞是具有 Th₁ 或 Th₂ 特征、由 CD4⁺T 细胞摄取囊泡而形成的具有表达 pMHC I、CD54 和 CD80 的 T 细胞。

[0014] 本发明还涉及由树状细胞摄取囊泡而形成的具有表达 pMHC I 及高表达 CD40, CD54 和 CD80 重要免疫分子的细胞,所述囊泡是来自于树状细胞或工程化的树状细胞。

[0015] 本发明第三方面提供囊泡导向的 T 细胞的制备方法,其中包括由树突细胞衍生的囊泡导向的 T 细胞的制备,包括以下步骤:

[0016] 1) ConA 激活的 CD4⁺T 细胞的制备:在含有 IL-2 和 ConA 的 RPMI1640 培养基中培养脾脏细胞,分离得到 ConA 激活的 CD4⁺T 细胞,

[0017] 2) 囊泡的制备:在高剂量 GM-CSF 和 IL-4 的作用下,产生骨髓来源树突细胞,将此树突细胞在含有 OVA 蛋白的无血清 AIM-V 培养基中培养,离心所得上清液,得到囊泡沉淀物,

[0018] 3) ConA 激活的 CD4⁺T 细胞对所述囊泡的摄取:在含有 IL-2 的 AIM-V 培养基中,将步骤 1) 所得的 CD4⁺T 细胞与步骤 2) 所得的囊泡共培养,得到摄取所述囊泡的 ConA 激活的 CD4⁺T 细胞;及

[0019] 其中包括由工程化肿瘤细胞衍生的囊泡导向的 T 细胞的制备,包括以下步骤:

[0020] 1) pcDNA-CD80 表达载体的构建:抽提树突细胞的 RNA,用 RT-PCR 法克隆 CD80 基因,并构造 pcDNA-CD80 基因表达载体,

[0021] 2) 转染细胞系 EG7/CD80 的产生:将步骤 1) 所得表达载体转化到肿瘤细胞 EG7 中,获得 EG7/CD80 肿瘤细胞,

[0022] 3) 囊泡的制备:在无 FCS 的 AIM-V 培养基中,培养步骤 2) 所得的肿瘤细胞 EG7/CD80,离心培养所得上清液,得到囊泡沉淀物,

[0023] 4) CD4⁺T 的激活:从脾脏中分离得天然 CD4⁺T 细胞,将此细胞在含有抗 CD3 抗体、IL-2 的培养基中培养,在培养基中同时加入 IL-12 和抗 IL-4 抗体或加入 IL-4、IL-10、

TGF- β 和抗 IFN- γ 抗体,

[0024] 5) CD4⁺T 对囊泡的摄取 : 将步骤 3) 所得囊泡和步骤 4) 所得 CD4⁺T 细胞, 在含有 IL-2 的培养中共培养, 得到摄取囊泡的 CD4⁺T 细胞。

[0025] 本发明还涉及囊泡导向的树状细胞的制备方法, 包括以下步骤 :

[0026] 1) 骨髓来源的树突细胞的制备 : 骨髓细胞在高剂量 GM-CSF 和 IL-4 的作用下, 产生骨髓来源树突细胞 ;

[0027] 2) 囊泡的制备 : 步骤 1) 所得的树突细胞在含有 OVA 蛋白的无血清 AIM-V 培养基中培养, 离心所得上清液, 得到囊泡沉淀物 ;

[0028] 3) 骨髓来源的树突细胞对囊泡的摄取 : 在 AIM-V 培养基中, 将步骤 1) 所得树突细胞与步骤 2) 所得囊泡共培养, 得到摄取囊泡的树突细胞。

[0029] 本发明第四方面提供囊泡导向的 T 细胞在制备抗肿瘤、抑制自身免疫疾病和 / 或抑制排异反应的药物上的应用。

[0030] 本发明显示树状细胞和 CD4⁺T 细胞能通过获取囊泡而获得囊泡来源的组织相容性复合体 (MHC) 的 I 类分子 (pMHC I), CD54 和共同刺激分子 CD80。本发明还显示以上所获取的分子均具有功能性。这些获取囊泡的 (囊泡导向的) 树状细胞及 T 细胞能更有效地刺激体内和体外的免疫反应。

[0031] 本发明显示由树状细胞衍生的囊泡表达 pMHC I, CD40, CD54 和 CD80。由表达 CD80 的工程化的肿瘤细胞衍生的囊泡亦表达 pMHC I 和 CD80。

[0032] 本发明相应地提供了一种制备囊泡导向的树状细胞的方法。其中包括将由装载了抗原的树状细胞或工程化的肿瘤细胞所衍生的囊泡利其他树状细胞在一定的条件下接触以利于囊泡被树状细胞所获取。

[0033] 本发明相应地提供了一种制备囊泡导向的 CD4⁺T 细胞的方法。其中包括将由装载了抗原的树状细胞或工程化的肿瘤细胞所衍生的囊泡和 CD4⁺T 细胞在一定的条件下接触, 以利于囊泡被 CD4⁺T 细胞所获取。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明显示了树状细胞和 T 细胞能获取从树状细胞及肿瘤细胞所衍生的囊泡。特别是这些细胞能从囊泡获取组织相容复合体和共同刺激分子。本发明显示了这些从囊泡获取的分子是具有功能性的。这样, 囊泡导向的树状细胞及 T 细胞就能直接地刺激免疫反应。

[0036] 本发明相应地提供了一种制备囊泡导向的树状细胞的方法。其中包括将由装载了抗原的树状细胞或工程化的肿瘤细胞所衍生的囊泡和其他树状细胞在一定的条件下接触, 以利于囊泡被树状细胞所获取。

[0037] 本发明也相应地提供了一种制备囊泡导向的 CD4⁺T 细胞的方法。其中包括将由装载了抗体的树状细胞或工程化的肿瘤细胞所衍生的囊泡和 CD4⁺T 细胞在一定的条件下接触, 以利于囊泡被 CD4⁺T 细胞所获取。

[0038] 术语“囊泡”是指直径 50-90nm 的细胞膜囊泡。在本发明中, 囊泡是指来源于抗原递呈细胞如树状细胞, 或是指来源于肿瘤细胞如肿瘤腹水或表达 CD80 的工程化肿瘤细胞。这类囊泡具有抗原递呈能力和粘附分子, 共同刺激分子。这些包括有组织相容性复合体, CD40, CD54, CD80 和 CD86 等。

[0039] 术语“树状细胞衍生的囊泡”是指制备及纯化由树状细胞衍生的囊泡。举例来说,

树状细胞的培养液通过离心去除细胞和细胞碎片,然后再离心获得囊泡。囊泡可来源于骨髓来源的树状细胞或其他来源的树状细胞。比如,由末梢血液来源的树状细胞或是工程化的表达某种肿瘤抗原和细胞因子的树状细胞。

[0040] 术语“肿瘤细胞来源的囊泡”是指制备及纯化由肿瘤细胞衍生的囊泡。举例来说,肿瘤病人的腹水通过离心去除细胞和细胞碎片,然后再离心获得囊泡。再举例,肿瘤细胞可通过工程化而表达一些重要的免疫分子如共同刺激分子 CD80。工程化肿瘤细胞的培养液通过离心去除细胞和细胞碎片,然后再离心获得囊泡。

[0041] 术语“囊泡导向的树状细胞”是指获取囊泡的树状细胞。它们能直接从囊泡获得组织相容性复合体。和共同刺激分子从而能刺激免疫反应。

[0042] 术语“囊泡导向的 T 细胞”是指获取囊泡的 T 细胞。它们能直接从囊泡获取组织相容性复合体和共同刺激分子,从而能刺激免疫反应。

[0043] 术语“在一定的条件下以利于树状细胞获取囊泡”是指树状细胞或肿瘤细胞衍生的囊泡和另一个树状细胞接触以便另一个树状细胞获取囊泡。同时抗原递呈的功能和共同刺激分子也从囊泡被转移到另一个树状细胞。具体来说,树状细胞 (1×10^6) 在含有 5-10 μ g EXO 的 0.5-1.0ml 培养液中,37°C 下培养 4-6 小时。期间每 20-30 分钟将细胞摇匀一次。应当指出,许多因素包括温度、细胞浓度、囊泡浓度、培养液的成分等均能影响到树状细胞对囊泡的最佳获取。

[0044] 再具体来说,本发明中所述的树状细胞可以是骨髓或其他来源的,如末梢血液来源。树状细胞可以是成熟的或不成熟的;可以是抗原装载的或是工程化的以表达某种肿瘤抗原或细胞因子的树状细胞。另一个树状细胞可以在体外不同条件下比如说在有 LPS/TNF- α /IFN- γ 或 IL-10/TGF- β 的情况下分化成为成熟的具有免疫原性的或具有免疫抑制性的树状细胞,也可以是一个表达重要免疫分子的工程化的树状细胞。

[0045] 本发明还包括在本发明的方法中所表达的囊泡导向的树状细胞的分离和纯化的方法。

[0046] 术语“在一定的条件下以利于 T 细胞获取囊泡”是指,树状细胞或工程化的肿瘤细胞衍生的囊泡和 T 细胞接触以便 T 细胞获取囊泡。同时抗原递呈的功能和共同刺激分子也从囊泡被转移到 T 细胞。具体来讲,T 细胞 (1×10^6) 和囊泡 (5-10 μ g) 在含有 IL-2 的培养液,37°C 下培养 4-6 小时。其间每 20-30 分钟将细胞摇匀一次。应当指出,许多因素包括温度、细胞浓度、囊泡浓度、培养液的成分等均能影响 T 细胞对囊泡的最佳获取。

[0047] 再具体来说,在本发明中所述的树状细胞可以是骨髓或其他来源的,比如从末梢血液来源。树状细胞可以是成熟的或不成熟的;可以是抗原装载的或是工程化的以表达某种肿瘤抗原或细胞因子的树状细胞。在本发明中所述的 T 细胞是末梢血液来源的。T 细胞可以是 CD4⁺ 或 CD8⁺T 细胞,是原生型的或是激活的 T 细胞或是表达某些重要免疫分子如 foxp3 和细胞因子的工程化的 T 细胞。激活的 T 细胞来源于体外 T 细胞在不同条件下比如在 IL-2/IL-12/ 抗 IL-4 抗体的条件下或在 IL-4/IL-10/TGF- β / 抗 IFN- γ 抗体的条件下分化成分泌 IL-2/IFN- γ 的 Th₁ 细胞或分泌 IL-4/IL-10 的 Th₂ 细胞。

[0048] 本发明还包括在本发明的方法中所表述的囊泡导向的 T 细胞的分离和纯化的方法。

[0049] 术语“a cell”是指一个单个的细胞或是一种细胞群体。

[0050] 一个有经验的研究人员应当了解到囊泡导向的树状细胞或 T 细胞也能由 DNA 重组方法制备。具体来说,本发明中所述的树状细胞即可通过工程化以表达有兴趣的肿瘤抗原,共同刺激分子如 CD40L 和细胞因子如 GM-CSF 和 TNF- α ;或者,本发明中所述的树状细胞,可以是成熟的或不成熟的树状细胞或可通过工程化以表达有兴趣的肿瘤抗原或共同刺激分子或细胞因子如 IL-10 和 IL-12。在 DNA 重组方法中所必须的技术可参观“分子克隆:一份实验室常用的目录”,第二版,(Sambrook et al.,1989);“动物细胞培养”(R. I. Freshney, ed. 1987);“最近的免疫试验方法”(J. E. Coligan et al., eds., 1991)。

[0051] 术语“应用”是指(但不局限于)免疫组合物应用在肿瘤和免疫疾病,如自身免疫疾病和感染性疾病。

[0052] 术语“治疗有效量”是指有效的剂量和达到所期望治疗结果所需要的治疗时间。囊泡导向的树状细胞和 T 细胞的有效剂量可能随如下一些因素而改变。其中包括疾病的临床期,年龄,性别,动物的重量。剂量也可随最佳治疗的反应而调整。举例来说,可将一个剂量分开在同一天里使用,剂量也可根据治疗情况进行适当调整。

[0053] 术语“动物”是指哺乳动物和人。

[0054] 术语“增强免疫反应”是指增强在一个动物体内的免疫反应,具体的来说就是细胞毒性的 T 淋巴细胞的反应。这种免疫反应通常可用免疫检测方法来测试。比如说可用体内和体外的 CD₈⁺T 细胞增殖试验方法来检测。再举例来说可用体内和体外的 CD₈⁺T 细胞毒性试验方法来检测。

[0055] 具体来说,囊泡导向的树状细胞和 T 细胞可被单独用来增强机体免疫系统进而治疗或预防一种疾病特别是细胞毒性 T 淋巴细胞反应。这些囊泡导向的细胞也可以和其他的免疫细胞联合使用去防治疾病。其他的免疫细胞包括(但不局限于)树状细胞、吞噬细胞、B 细胞和细胞毒性 T 细胞。

[0056] 本发明的方法中还包括使用免疫佐剂。免疫佐剂包括(但不局限于)格兰氏阴性细菌内毒素的类脂质 A 部分,trehalose dimycolate 或分枝杆菌、溴化磷酸酯、线形聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段聚合物、矿物盐如氢氧化铝、脂质体和细胞因子等。

[0057] 为了更适合体内的使用,囊泡导向的树状细胞和 T 细胞还可与其它药物成分组成复合剂。术语“适用体内使用的生物性的剂型”是指其治疗效果远远大于其产生的毒性反应的一种剂型。这种药物可以给予有生命的个体包括人和动物。本发明中所述的有效量是指药物的有效剂量及达到预想结果的时间。举例来说,有效的剂量可能随如下一些因素而改变,其中包括疾病的临床期,年龄,性别和个体的重量。剂量也可随最佳治疗的反应而调整。例如,可将一个剂量分开在同一天使用,剂量也可根据治疗情况进行适当调整。

[0058] 本发明相应地提供了一种免疫活性药物组合物,包括使用有效量的囊泡导向的免疫细胞,如树状细胞和 T 细胞,以及可药用的载体和赋形剂。

[0059] 这些免疫细胞可以用一些简便的方法给予机体。比如用皮下,静脉及肌肉注射的方法,口服,吸入及经皮肤吸收的方法(用霜及油膏等),或用栓剂的方式。根据不同的给药方式,这些活性细胞可用其它物质所包装以避免囊泡导向的树状细胞和 T 细胞被酶,酸和其它自然的物质所破坏。

[0060] 这里所述的添加剂物质和方法都是根据世界上公认的通用方法。这样有效量的药物就能和一些药用的载体混合后使用。这些常用的药用载体可参见 Remington's “药物科

学”(2003,第 20 版)和美国药典:“The National Formulary(USP 24 NF19,1999 版)。据此,这些物质可包括一种或多种药用载体,缓冲液和具有合适酸碱度或等渗的生理液体。

附图说明

[0061] 图 1 显示树突细胞(DC)和树突细胞衍生的囊泡(EXO)的表型。实线代表待测样品,细虚线代表对照。

[0062] 图 2 显示树突细胞(DC)摄取囊泡(EXO)的结果。(A)用流式细胞仪分析 CFSE 和 CD45.1 的表达,其中粗实线代表已摄取囊泡的树突细胞,细虚线代表未摄取囊泡的树突细胞;(B)用流式细胞仪分析一系列细胞表面分子,其中粗实线代表摄取囊泡的树突细胞,粗虚线代表未摄取囊泡的树突细胞,细虚线代表对照;(C)树突细胞摄取囊泡的分子机制。

[0063] 图 3 显示 EXO 导向的 DC 体外刺激天然 CD8⁺T 细胞增殖的结果。(A)CD8⁺T 细胞体外增殖实验;(B)CD8⁺T 细胞体外增殖的分子机制。

[0064] 图 4 显示 EXO 导向的 DC 体内刺激天然 CD8⁺T 细胞增殖的结果。

[0065] 图 5 显示 EXO 导向的 DC 刺激 CD8⁺T 细胞增殖及分化成效应细胞 CTL 的杀伤功能。

[0066] 图 6 显示 EXO 导向的 DC 对已形成肿瘤的治疗效果。

[0067] 图 7 显示 CD4⁺T 细胞以抗原特异性和非特异性两种方式摄取 EXO 的结果。(a)实线代表待测样品,细虚线代表对照;(b)粗实线代表待测样品,细虚线代表对照。

[0068] 图 8 显示 CD4⁺T 细胞通过摄取 EXO 获得 pMHC I 和协同刺激分子的结果。(a)粗实线代表已摄取 EXO_{CFSE},细虚线代表未摄取 EXO_{CFSE};(b)、(c)、(d)、(e)、(f)表示摄取的分子机制。

[0069] 图 9 显示 EXO 导向的 CD4⁺T 细胞激活天然 CD8⁺T 细胞的体外增值结果。(a)CD8⁺细胞体外增殖实验;(b)体外增值的分子机制。

[0070] 图 10 显示 EXO 导向的 CD4⁺T 细胞体内激活非 CD4⁺T 细胞依赖的 CD8⁺T 细胞增殖结果。

[0071] 图 11 显示 EG7/CD80 细胞和 EG7/CD80 细胞衍生的囊泡的表型分析结果。(a)实线代表 EG7 和表达 CD80 的 EG7/CD80 肿瘤细胞,细虚线代表对照;(b)实线代表 EG7/CD80 和 EG7 肿瘤细胞衍生的囊泡,细虚线代表对照。

[0072] 图 12 显示 EG7/CD80 对囊泡的摄取。实线代表激活 CD4⁺T 细胞(aT)和摄取了 EXO_A和 EXO_B的 aT(aT_{EXO A}和 aT_{EXO B}),细虚线代表对照。

[0073] 图 13 显示 EXO 导向的 CD4⁺T 细胞体内激活 CD8⁺T 细胞增殖结果。

[0074] 具体实施方案

[0075] 下面用实施例对本发明作进一步阐述,但这些实施例绝非对本发明有任何限制。本领域技术人员在本说明书的启示下对本发明实施中所作的任何变动都将落在权利要求书的范围内。

[0076] 实施例 1 囊泡导向的树状细胞的制备

[0077] 1. 材料(试剂、细胞及动物):

[0078] 卵清蛋白(OVA)购自 Sigma 公司;OVAI 多肽(28,29),针对非相关 3LL 肺癌特异性的 MutI 多肽由多肽系统合成(30);生物素标记和 FITC 荧光标记的 H-2K^b(AF6-88.5), I a^b(AF6-120.1), CD4(GK1.5), CD8(53-6.7), CD11c(HL3), CD40(IC10), CD54(3E2),

CD80 (16-10A1), CD44 (1M7), MyD88, CCR7 (4B12) 以及 DC 特异的 ICAM- 非整合素 (DC-SIGN) (5H-11) 均购自 Pharmingen 公司; 抗 H-2K^b/OVAI (pMHC I) 复合物抗体由 NIH 的 German 博士提供 (31); PE 批标记 H-2K^b/OVAI tetramer 抗体来自 Backman Coulter; 生物素标记的 TLR4 和 TLR9 抗体购自 eBioscience; 抗 LFA-1, K^b, I a^b 和 DEC205 抗体, 和细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 (CTLA-4/Ig) 融合蛋白; 重组鼠的 IL-4 和 GM-CSF 购自 R&D; 细胞松弛素, D- 甘露糖, D- 葡萄糖, D- 海藻糖, D- 葡萄糖胺购自 Sigma; CFSE 从 Eugene 分子探针获得。高度肺癌转移的 BL/6-10 和 OVA 转基因的 BL6-10 (BL6-10_{OVA}) 黑色素瘤细胞系由本室制备 (27); 鼠 EL4 和 OVA 转基因的 EL4 (EG7) 胸腺瘤细胞系来自 ATCC。雌的 C57BL/6 (B6; CD45. 2⁺), C57BL/6. 1 (B6. 1; CD45. 1⁺), OVA 特异的 T 细胞受体 (TCR) 转基因的 OTI 和 OTII 转基因小鼠, 在 C57BL/6 背景下 H-2K^b, CD4 和 CD8, 基因敲除 (knockout) 小鼠均从 Jackson 实验室获得。所有动物按萨斯卡通大学动物管理委员会条理在萨斯卡通癌症研究中心饲养。

[0079] 2. 步骤:

[0080] 1) 骨髓来源树突细胞的获得

[0081] 骨髓来源的树突细胞, 如背景技术所述 (21), 不成熟 DC (imDC) 在低剂量 GM-CSF (2ng/ml) 下产生, 成熟 DC (mDC) 在高剂量 IL-4 和 GM-CSF (20ng/ml) 的条件下产生。DC 培养 6 天后, 在无血清的 AIM-V 培养基中, 用 0. 3mg/ml OVA 蛋白培养过夜, 获得 DC_{OVA}。来自 H-2K^b 基因敲除的老鼠获得 DC 称 DC (K^{b-/-})。

[0082] 2) 囊泡的纯化与获得

[0083] 囊泡按背景技术所述方法进行分离 (3, 4)。简单的说就是将含有 OVA (0. 3mg/ml) 的无血清 AIM-V 培养基培养 mDC_{OVA} 过夜, 所得上清液分别进行四级离心。分别为 300 × g 离心 5 分钟以去除细胞; 1, 200 × g 离心 20 分钟, 10, 000 × g 离心 30 分钟以去除细胞碎片; 100, 000 × g 离心 1 小时以沉淀 EXO。所得 EXO 沉淀用大量的 PBS 缓冲液洗涤 2 遍后再于 100, 000 × g 离心 1 小时进行回收。回收所得 EXO 蛋白用 Bradford assay 来定量。来自野生的 C57BL/6 和 C57BL/6. 1 小鼠的 EXO 分别命名为 EXO_{OVA} 和 EXO_{6. 1}, 来自于 H-2K^b 基因敲除小鼠 mDC_{OVA} 的 EXO 被命名为 (K^{b-/-})EXO。在 37°C 下用 0. 5 μ M CFSE 染色 mDC 20 分钟后, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次 (32, 33), 随后用含有 OVA 蛋白的无血清 AIM-V 培养基培养过夜, 得到带有 CFSE 标记的 EXO, 称为 EXO_{CFSE}。按囊泡分离方法从培养上清液中收集并纯化 EXO_{CFSE}。

[0084] 3) 树突细胞和囊泡的表型特点

[0085] 为了对树突细胞的表型进行分析, imDC_{OVA} 和 mDC_{OVA} 用一系列生物素标记和 FITC 标记的抗体染色, 流式细胞仪分析。为了分析囊泡的表型, EXO_{OVA} (25-40 μ g) 与一系列的 FITC 标记的抗体在冰上孵育 30 分钟, 如步骤 2) 所述, 进行流式细胞仪检测。在进行流式细胞仪检测时, 为了确定适合分析 EXO 的最佳电压, 以直径为 4. 5 μ m 的 Dynal M450 微珠作为大小对照。为了分析细胞间分子如 TLR9 和 MyD88, DC 和 EXO 在抗体染色前用 Cytoperm 试剂盒按照操作说明进行渗透化处理, 同种匹配的生物素标记或 FITC 标记的抗体作为对照。

[0086] DC 和 EXO 的表型特点见图 1。其中, 骨髓来源的成熟 DCs (mDC), 不成熟 DCs (imDC) 和成熟 DCs 释放的 EXO (EXO_{OVA}) (实线) 用一系列抗体染色后, 用流式细胞仪分析。这些树突细胞和 EXO 也分别被不相关的同型匹配抗体染色, 作为对照细胞群 (细虚线)。图为 2 次重复实验中的一次。结果显示, 不成熟的 DC 表现为 MHCII (Ia^b), 协同刺激分子 CD80, 趋化因子受体 CCR7 的低表达, 而且 CD40 表达也缺陷, 而这些分子在 T 细胞激活中均发挥重要作用。

与不成熟 DC 相比,成熟 DC 的上述分子表达水平较高。另外,成熟和不成熟的树突细胞都表达 CD11c、黏附分子 CD54、Toll 样受体 TLR4、TLR9、MyD88、具有甘露糖特异配体的 C 型凝集素 DEC205 和具有甘露聚糖 Le^x 特异配体的 DC-SIGN。经 OVA 蛋白装载后他们表达 pMHC I 的量相似。除了以前报道的 MHC I, MHC II 和 CD86 外 (34), pMHC I、MHC II (Ia^b)、CD11c、CD40、CD54、CD80、CCR7、TLR4、TLR9、MyD88、DEC205 和 DC-SIGN 分子也均在 EXO_{OVA} 表面表达,但表达水平低于成熟 DC_{OVA}。

[0087] 4) T 细胞的准备

[0088] 原始的对 OVA 抗原特异的 T 细胞分别从具有 OVA 特异性的 TCR 转基因小鼠 OTI 和 OTII 的脾脏中获得,经过尼龙柱后,OTIICD4⁺ 和 OTIICD8⁺ 的 T 细胞用抗小鼠 CD8 或 CD4 的磁珠 (Dyna1 公司) (27) 经阴性选择后得到纯化,所得细胞群的 98% 分别为 CD4⁺/V α 2V β 5⁺ 或 CD8⁺/V α 2V β 5⁺。

[0089] 5) DC 对 EXO 的摄取

[0090] 成熟 DC (mDC) 和不成熟 DC (imDC) 与 EXO_{OVA} (10 μ g/1 \times 10⁶DC) 在 0.5-1ml AIM-V 培养基中,37 $^{\circ}$ C 共培养 6 小时,其间每 20 分钟将细胞摇匀一次,然后用 PBS 缓冲液洗涤 2 遍后所得的 DC 分别被命名为 mDC_{EXO} 和 imDC_{EXO}。为了估计 EXO 被吸收情况,成熟 DC 和不成熟 DC 分别与 EXO_{CFSE} 或 EXO_{6.1} (10 μ g/1 \times 10⁶DC) 共同孵育,然后分别用流式细胞仪检测 CFSE 染色和 CD45.1 分子的表达情况。为了研究 EXO 吸收的分子机制,成熟的不表达自身 H-2K^b 分子的 DC (K^{b-/-}) 在与 EXO_{OVA} 共培养前和培养后,分别与一系列抗体: H-2K^b、Ia^b、LFA-1、DEC205、DC-SIGN (15 μ g/ml)、融合蛋白 CTLA-4/IgG (10 μ g/ml)、肌动蛋白聚合物的抑制剂 CCD (15 μ g/ml)、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-海藻糖、D-葡萄糖胺 (5mM) 和 EDTA (50mM) 在冰上孵育 30 分钟,然后测定 EXO 摄取后 DC 表面 H-2K^b 分子的表达。

[0091] DC 摄取 EXO 分子的结果见图 2A 与图 2B。(A) 已摄取 EXO_{CFSE} 和 EXO_{6.1} 的不成熟 DCs (imDC) 和成熟 Dcs (mDC) (粗实线) 和未摄取 EXO_{CFSE} 和 EXO_{6.1} 的不成熟 DCs 和成熟 Dcs (细虚线) 用流式细胞仪分析 CFSE 和 CD45.1 的表达。(B) 已摄取 EXO_{OVA} 的不成熟 DCs 和成熟 Dcs (粗实线) 和未摄取 EXO_{OVA} 的不成熟 DCs 和成熟 Dcs (粗虚线) 用流式细胞仪分析一系列细胞表面分子。不相关的同型匹配抗体作为对照 (细虚线)。图为 2 次重复实验中的一次。其中图 2A 显示,成熟 DC 和不成熟 DC 都可检测到 CFSE 染色,说明 DC 可以摄取 EXO; 与 EXO_{6.1} 孵育后,成熟 DC 和不成熟 DC 都获得了 CD45.1。其中图 2B 显示,另外其他 EXO 分子如: MHC I、MHC II、CD11c、CD40、CD54、CD80 也转移到成熟 DC 和不成熟 DC 细胞表面。

[0092] DC 通过 LFA-1/CD54 和 C 型凝集素 /C 型凝集素受体的相互作用来摄取 EXO 的结果见图 2C。(C) 为研究 DC 摄取 EXO 的分子机制,mDC (K^{b-/-}) 在与 EXO_{OVA} 共培养前和培养后,分别加入一系列抗 H-2K^b、Ia^b、LFA-1、DC-SIGN 和 DEC205 抗体,融合蛋白 CTLA-4/IgG,肌动蛋白聚合物的抑制剂 CCD, D-甘露糖, D-葡萄糖, D-海藻糖, D-葡萄糖胺和 EDTA 在冰上孵育 30 分钟。流式细胞仪分析和比较在不同情况下 DCs 表面 H-2K^b 分子的表达。并和试剂对照组进行 Student's T 检验 (40)。结果 *p 值小于 0.05,说明实验组与对照组有显著性差异。图为 2 次重复实验中的一次。其中,用抗 LFA-1 抗体和抗 DEC205 抗体阻断后,DC 对 EXO 的摄取显著下降 (p < 0.05),但抗 H-2K^b、抗 Ia^b、抗 DC-SIGN 抗体和 CTLA-4/Ig 融合蛋白并没有阻断作用。说明 LFA-1/CD54 和 C 型凝集素 /甘露糖富集的 C 型凝集素受体的相互作用与 EXO 的摄取有关。当用 CCD (肌动蛋白聚合抑制剂) 处理后,DC 对 EXO 的摄取的

能力也显著下降 ($p < 0.05$), 说明肌动蛋白细胞骨架对 EXO 的摄取非常重要。LFA-1/CD54 在 DC 摄取 EXO 的过程中的相互作用与以前的报道一致 (35)。既然 C 型凝集素与其受体的相互作用是 Ca^{2+} 依赖的 (36), 本发明者使用 Ca^{2+} 螯和剂 EDTA, 结果显示 50mM 的 EDTA 可显著降低 DC 对 EXO 的摄取 ($p < 0.05$), 证实了 DC 对 EXO 的摄取是通过 C 型凝集素 / C 型凝集素受体的相互作用来介导的。为了进一步证实 C 型凝集素 / 甘露糖富集的 C 型凝集素受体在 EXO 摄取中发挥的作用, 本发明者在阻断实验中使用了一系列的单糖, 其中 D-甘露糖和 D-葡萄糖胺可显著抑制 EXO 的摄取, 而 D-葡萄糖和 D-岩藻糖没有显著作用, 说明 DC 对 EXO 的摄取是通过 C 型凝集素和甘露糖 / 葡萄糖胺富集的 C 型凝集素受体相互作用介导的。

[0093] 6) T 细增殖的体外实验

[0094] 为评估树突细胞衍生的囊泡的功能, 进行 $CD8^+$ T 细胞体外增殖实验。EXO_{OVA} (10 μ g/ml) 和其双倍稀释物与数量恒定的原始 OTI $CD8^+$ T 细胞 (1×10^5 细胞 / 孔) 培养。为检测被 DC 摄取的 EXO_{OVA} 的 pMHC I 复合物是否有功能, 成熟 DC (0.3×10^5 个细胞 / 孔) 和不成熟 DC (0.3×10^5 细胞 / 孔) 与 EXO_{OVA} 及其两倍稀释物共培养 4 小时, 然后将恒定数量的原始 OTI $CD8^+$ T 细胞 (1×10^5 细胞 / 孔) 加入每孔中。为检测分子机制, 在 OTI $CD8^+$ T 细胞加入之前, 一系列试剂: 抗 H-2K^b、LFA-1 抗体和 CTLA-4/Ig 融合蛋白 (10 μ g/ml), 上述试剂复合物 (作为复合试剂) 和同型匹配的非相关抗体复合物 (作为对照组) 分别加入成熟 DC 和不成熟 DC 培养液中, 培养 48 小时后, 用 ³H-thymidine 结合法检测 (30)。

[0095] EXO 导向的 DC 体外刺激天然 $CD8^+$ T 细胞增殖的结果见图 3。既然 EXO 包含有免疫分子, 它们就有刺激 $CD8^+$ T 细胞的潜在功能 (35)。(A) $CD8^+$ T 细胞体外增殖实验。EXO_{OVA} (10 μ g/ml)、DC_{OVA}、mDC_{EXO} 和 imDC_{EXO} (0.3×10^5 细胞 / 孔) 和他们两倍稀释物与一定数量的 OTI $CD8^+$ T 细胞 (1×10^5 细胞 / 孔) 共培养。2 天后用 ³H 掺入法测定 $CD8^+$ T 细胞的增殖效应。(B) 通过加入中和试剂 (包括抗 H-2K^b 和 LFA-1 抗体、CTLA-4/IgG 融合蛋白), 中和试剂混合物和对照抗体和融合蛋白的混合物测定 mDC_{EXO} 对 OTI $CD8^+$ T 细胞增殖的影响。进行比较并进行 Student's T 检验 (40)。结果 *p 值小于 0.05, 说明实验组和对照组有显著差异。图为 3 次重复实验中的一次。图 3A 显示, EXO_{OVA} 可刺激 OTI 小鼠 $CD8^+$ T 细胞体外增殖, 但其效率低于 DC_{OVA}、成熟 DC_{EXO} 和不成熟 DC_{EXO}, 说明 EXO 要更有效的激活天然 $CD8^+$ T 细胞需要 DC 的参与。其中, 摄取了 EXO 的成熟 DC 可称为 EXO 导向的成熟 DC 是最有效的刺激物。为了研究 $CD8^+$ T 细胞增殖的分子机制, 在细胞培养中加入了一系列的试剂, 结果如图 3B, 抗 MHC I、抗 LFA-1 抗体和 CTLA-4/Ig 融合蛋白在共培养过程中可以显著抑制 OTI 小鼠 $CD8^+$ T 细胞增殖, 其抑制率分别为 62%、49% 和 56% ($p < 0.05$)。其混合试剂组对 $CD8^+$ T 细胞增殖的抑制率高达 95% ($p < 0.05$), 说明经由 EXO 导向的树突细胞对 $CD8^+$ T 细胞增殖严格的依赖于 pMHC I/TCR 的特异性, 并且受协同刺激分子 (CD80/CD28 和 CD54/LFA-1) 的影响。

[0096] 7) 四聚体 (Tetramer) 染色

[0097] C57BL/6 或 CD4 基因敲除小鼠分别用 EXO_{OVA} (10 μ g / 只老鼠), 4,000rad 辐照处理的 DC_{OVA}、mDC_{EXO} 和 imDC_{EXO} (0.5×10^6 细胞 / 只) 静脉注射免疫。6 天后从免疫鼠尾收取血样本, 血样本与 10 μ l PE- 标记的 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetramer 和 FITC 标记的抗 CD8 (PK135) 在室温下孵育 30min。用裂解缓冲液溶解红细胞后, 细胞用流式细胞仪检测。

[0098] EXO 导向的 DC 体内刺激 $CD8^+$ T 细胞增殖的结果见图 4。野生型 CD57BL/6 (B6) 和 CD4 基因敲除小鼠分别静脉注射 EXO_{OVA}、辐照处理的 DC_{OVA}、mDC_{EXO} 和 imDC_{EXO}, 6 天后, 小鼠断尾

取血,做流式细胞仪检测。每组代表 tetramer 阳性 CD8⁺T 细胞群占总 CD8⁺T 细胞群的百分率。结果为每组 4 个样本中的一个。实验重复 3 次。为了确认 EXO 导向的 DC 在体内也可以刺激 CD8⁺T 细胞增殖,本发明者使用 Tetramer 染色进行研究 (37)。图 4 显示,EXO_{OVA} 在免疫 6 天后只能诱导小鼠 1.42%,Tetramer 阳性的 CD8⁺T 细胞(占有所有 CD8⁺T 细胞群的比例),说明 EXO_{OVA} 可在体内激活天然的抗原特异性 CD8⁺T 细胞应答,但与 DC_{OVA} 所产生的 2.88% Tetramer 阳性的 CD8⁺T 细胞相比,激活能力较低。然而成熟 DC_{EXO} 诱导的 CD8⁺T 细胞应答最强,Tetramer 阳性的 CD8⁺T 细胞比例最高为 3.36%,说明 EXO 定向的 DC 可在体内有效的启动天然 CD8⁺T 细胞增殖。结果也显示 DC_{OVA}、成熟 DC_{EXO} 和不成熟 DC_{EXO},均可在 CD4 基因敲除的小鼠中刺激 OVA 特异性的 CD8⁺T 细胞增殖(Tetramer 阳性的 CD8⁺T 细胞占有所有 CD8⁺T 细胞群的比例分别为 0.42%、0.68%和 0.32%),而 EXO_{OVA} 无此作用。说明 DC_{OVA}、成熟 DC_{EXO} 和不成熟 DC_{EXO} 诱导的主要是 CD4⁺Th 依赖型的 CD8⁺ 细胞反应,同时也诱导一些 CD4⁺Th 非依赖型的 CD8⁺ 细胞反应。

[0099] 8) 细胞毒性实验

[0100] 在免疫 6 天后,上述的免疫小鼠的脾脏细胞和 4,000rad 辐照处理过的 EG7 共培养 3 天,获得 CTL 作为效应细胞,肿瘤细胞 EG7 由 ⁵¹Cr 标记后作为靶细胞,而 ⁵¹Cr 标记的 EL4 细胞作为对照靶细胞,随后进行细胞毒性实验 (27)。

[0101] EXO 导向的 DC 刺激 CD8⁺T 细胞增殖成 CTL 效应细胞的结果见图 5。在体外细胞毒性实验中,天然的 OTI CD8⁺T 细胞 (2×10⁵ 细胞 /mL) 与分别与 EXO_{OVA} (10 μg/mL) 或辐照处理的 (4,000rads) DC_{OVA}、mDC_{EXO} 和 imDC_{EXO} (0.6×10⁵ cells/ml) 孵育激活 3 天。这些激活的 CD8⁺T 细胞被用作效应细胞 (E),而 ⁵¹Cr- 标记的 EG7 或对照 EL4 肿瘤细胞作为靶细胞 (T),特异性的杀伤按以下公式计算:100×[(实验组 cpm- 自发 cpm)/(最大 cpm- 自发 cpm)]。⁵¹Cr 释放量测定中数据表示特异性靶细胞的裂解百分率。每个点代表 3 次的平均值,实验重复 3 次。显示,在细胞毒实验中,被 EXO_{OVA} 体外激活的 CD8⁺T 细胞显示出对 EG7 肿瘤细胞的杀伤活性 (25% 杀伤, E : T 比例为 12 : 1),但远低于被 DC_{OVA}、成熟 DC_{EXO} 和不成熟 DC_{EXO} 所激活的 CD8⁺T 细胞的杀伤率 (50%、58%和 39%, E : T 比例为 12 : 1)。说明 mDC_{EXO} 能最有力地刺激 CTL 的反应。然而,这些 CTL 对其亲本细胞 EL4 肿瘤细胞没有杀伤活性,说明这种 CTL 的杀伤活性是具有 OVA 特异性的。

[0102] 9) 动物实验

[0103] 为检测抗肿瘤免疫的保护效应,野生型的 CD57BL/6, CD4 基因敲除和 CD8 基因敲除小鼠 (n = 8) 分别静脉注射 EXO_{OVA} (10 μg/只), 4,000rad 辐照处理的 DC_{OVA} (0.05-0.5×10⁶ 细胞 / 只), mDC_{EXO} (0.05-0.5×10⁶ 细胞 / 只), imDC_{EXO} (0.5×10⁶ 细胞 / 只)。免疫后的小鼠分别在免疫后 6 天或 3 个月,静脉注射 BL6-10_{OVA}。动物实验结果见表 1。

[0104] 为检测肿瘤的治疗效果,野生型 CD57BL/6 小鼠 (n = 15) 先静脉注射 0.5×10⁶ BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞,5 天后小鼠静脉注射辐照的 DC_{OVA} 和 mDC_{EXO} (1×10⁶ 细胞 / 只)。小鼠在肿瘤细胞注射四周后处死,计数肺部的黑色素瘤的克隆数。转移到健康肺部的肿瘤呈岛状分布,显现出独立分散黑色斑点,很容易与正常的肺组织区分。转移的黑色斑点太多而无法计数的就指定为 > 100。动物实验结果见表 1。

[0105] 为进一步证实对已形成肺转移的肿瘤治疗效果,野生型 C57BL/6 小鼠 (n = 15) 先静脉注射 BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞,5 天后再分别静脉免疫 DC_{OVA} 和 mDC_{EXO} 细胞,接踵后 4 星期,同

样处死小鼠。对肺转移肿瘤克隆数进行计数,并用非参数秩和检验 (Mann-Whitney Utest)。动物实验结果见表 1。

[0106] 表 1EXO 导向的 DC 有抗肺肿瘤转移的免疫保护

[0107]

	疫苗	肿瘤细胞攻击	肿瘤生长率(%)	肺部黑色素瘤的平均克隆数	
实验 I	DC _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0	
	EXO _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	3/8 (37)	27±6	
	mDC _{EXO}	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0	
	imDC _{EXO}	BL6-10 _{OVA}	2/8 (25)	16±5	
	PBS	BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	>100	
	DC _{OVA}	BL6-10	8/8 (100)	>100	
	mDC _{EXO}	BL6-10	8/8 (100)	>100	
	DC _{OVA} (CD4KO)	BL6-10 _{OVA}	2/8 (25)	15±7	
	mDC _{EXO} (CD4KO)	BL6-10 _{OVA}	1/8 (12)	13	
	DC _{OVA} (CD8KO)	BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	>100	
	mDC _{EXO} (CD8KO)	BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	>100	
	实验 II	0.5×10 ⁶ DC _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0
		0.2×10 ⁶ DC _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	2/8 (25)	15±6
0.1×10 ⁶ DC _{OVA}		BL6-10 _{OVA}	4/8 (50)	28±9	
0.05×10 ⁶ DC _{OVA}		BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	55±14	
0.5×10 ⁶ mDC _{EXO}		BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0	
0.2×10 ⁶ mDC _{EXO}		BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0	
0.1×10 ⁶ mDC _{EXO}		BL6-10 _{OVA}	1/8 (12)	16*	
0.05×10 ⁶ mDC _{EXO}		BL6-10 _{OVA}	3/8 (37)	17±8*	
PBS		BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	>100	

[0108] 表 1 续

[0109]

	疫苗	肿瘤细胞攻击	肿瘤生长率(%)	肺部黑色素瘤的平均克隆数
实验 III	DC _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	8/15 (53)	35±10
	mDC _{EXO}	BL6-10 _{OVA}	2/15 (13)	9±7*
	PBS	BL6-10 _{OVA}	15/15 (100)	>100

[0110] 在表 1 实验 I 中,结果显示,所有注射 PBS 的小鼠都有大量的肺肿瘤转移灶 (> 100)。EXO_{OVA} 免疫组与不成熟 DC_{EXO} 免疫组相似,保护率分别为 63% (5/8) 和 75% (6/8),而 DC_{OVA} 和成熟 DC_{EXO} 疫苗对 BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞完全免疫保护,保护率均为 100% (8/8)。通过观察成熟 DC_{EXO} 对不表达 OVA 的 BL6-10 肿瘤细胞没有任何保护。即肿瘤细胞注射后,所有小鼠都有大量的肺肿瘤转移灶 (> 100),说明了所有的免疫保护都具有 OVA 肿瘤抗原特异性。DC_{OVA} 和成熟 DC_{EXO} 的保护性免疫在 CD4 基因敲除小鼠中仍有保留,但在 CD8 基因敲除小鼠中则完全丢失,说明成熟 DC_{EXO} 抗肿瘤免疫是通过 CD8⁺ 细胞介导的。

[0111] 在表 1 实验 II 中,结果显示,用在 mDC_{EXO} 免疫组小鼠的肺部平均肿瘤克隆数和 DC_{OVA} 免疫组的相比,并用非参数秩和检验 (Mann-Whitney U test),*p 值小于 0.05,说明和同类 DC_{OVA} 免疫组相比,在 mDC_{EXO} 免疫组所见肺部平均肿瘤克隆数的减少是有统计学上显著

性意义的。同时,结果显示,成熟 DC_{EXO} 在较低剂量时 (每只小鼠 $0.05-0.2 \times 10^6$) 比 DC_{OVA} 保护率高,尽管两者在高剂量时 (0.5×10^6) 对 BL6-10_{OVA} 肿瘤都具有 100% 的免疫保护,说明成熟 DC_{EXO} 比 DC_{OVA} 诱导的抗肿瘤免疫更强。

[0112] 在表 1 实验 III 中与免疫组 47% (7/15) 相比, mDC_{EXO} 免疫组 87% (13/15) 的小鼠,肺转移肿瘤完全消失, mDC_{EXO} 免疫组所见肺部平均肿瘤克隆数也远比在 DC_{OVA} 免疫组中的为少 ($p < 0.05$)。以上结果说明, EXO 导向的成熟的 mDC_{EXO} 比 DC_{OVA} 更有效地清除已存在的肺转移肿瘤。

[0113] 为进一步证实对已有皮下肿瘤的治疗效果, C57BL/6 小鼠 ($n = 10$) 皮下注射 0.3×10^6 BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞。4 天后当肿瘤形成可触及的小块 (直径约 3mm), 小鼠皮下免疫辐照处理的 DC_{OVA} 和 mDC_{EXO} (1.0×10^6 细胞 / 只老鼠)。每天观察瘤生长状况,用游标卡尺测量肿瘤大小直到 4 周。出于人道主义考虑,所有带有 1.5cm 直径肿瘤的小鼠均处死。

[0114] EXO 导向的 DC 清除肿瘤结果见图 6。C57BL/6 小鼠 ($n = 10$) 皮下接种 0.3×10^6 BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞,4 天后,当肿瘤可触及 (直径 3mm), 小鼠皮下免疫经辐照处理的 DC_{OVA} 和 mDC_{EXO}, 监测动物死亡率,并进行组间比较和用 Log 秩检验 (40)。结果 * p 值小于 0.05, 说明在对已形成肿瘤的治疗中, mDC_{EXO} 优于 DC_{OVA} 组的差别有显著性意义。实验重复 2 次,结果相似。结果显示, PBS 对照组的所有小鼠肿瘤细胞接种后 16 天全部死亡, DC_{OVA} 免疫组肿瘤生长延缓,但不能免疫抑制已有肿瘤生长,所有小鼠在肿瘤细胞接种后 3 周全部死亡 (10/10)。而成熟 DC_{EXO} 免疫组成功地治愈 30% (3/10) 已带有肿瘤生长的小鼠,说明成熟 DC_{EXO} 不但可以诱导比 DC_{OVA} 更强的抗肿瘤免疫保护,还可以诱导对已有肿瘤的治疗效应。

[0115] 实施例 2 囊泡导向的 T 细胞的制备

[0116] 1. 材料 (材料、细胞和动物)

[0117] 卵清蛋白 (OVA) 购自 Sigma 公司; OVA I (SIINF EKL) 和 OVA II (ISQAVHA AHA EINEA-GR) 分别是针对 H-2K^b 和 I a^b 特异性多肽 (28, 29); Mut I 多肽是针对非相关 3LL 肺癌特异性的多肽,所有的肽均由多肽系统合成;生物素标记和 FITC 荧光标记的 H-2K^b (AF6-88.5), I a^b (AF6-120.1), CD3 (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), CD11c (HL3), CD25 (7D4), CD40 (IC10), CD44 (IM7), CD54 (3E2), CD62L (MEL-14), CD69 (HL.2F3), CD80 (16-10A1), IL-7R (4G3) 和 V α 2V β 5⁺TCR (MR9-4) 以及 FITC 结合的生物素均购自 Pharmingen 公司;抗 H-2K^b/OVA I (pMHC I) 复合物抗体由 NIH 的 German 博士提供 (31);抗 LFA-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α 抗体,和细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 (CTLA-4/Ig) 融合蛋白;重组鼠的 IL-4 和 GM-CSF 购自 R&D; CFSE 从 molecular Probe 公司获得。高度肺癌转移的 BL/6-10 和 OVA 转基因的 BL6-10 (BL6-10_{OVA}) 黑色素瘤细胞系由本室制备 (27); 鼠 EL4 和 OVA 转基因的 EL4 (EG7) 胸腺瘤细胞系来自 ATCC。雌的 C57BL/6 (B6; CD45.2⁺), C57BL/6.1 (B6.1; CD45.1⁺), OVA 特异的 T 细胞受体 (TCR) 转基因的 OTI 和 OTII 小鼠,在 C57BL/6 背景下 H-2K^b, I a^b, IL-2, IFN- γ , TNF- α , CD54 和 CD80 基因敲除小鼠均从 Jackson 实验室获得。纯合子的 OT II/H-2K^b^{-/-}, OT II/CD54^{-/-}, OTII/CD80^{-/-}, OT II/IL-2^{-/-}, OTII/IFN- γ ^{-/-} 和 OTII/TNF- α ^{-/-} 小鼠由相应的基因敲除小鼠与 OTII 小鼠回交三代所得。所有动物按萨斯卡通大学动物管理委员会条理饲养。

[0118] 2. 步骤

[0119] 1) 脾脏 DC 的获得

[0120] 小鼠脾脏来源的 DC, 按前面实验所述 (37), 简之, 脾脏细胞用含有 5mM EDTA 的洗涤, 在含有 7% FCS 的培养液中 37°C 孵育 2 小时, 轻轻摇晃后去除未贴壁细胞, 贴壁细胞继续在 1% 正常鼠血清, GM-CSF (1ng/ml), OVA (0.2mg/ml) 的培养基中培养过夜。这些 DC 被称为脾 DC_{OVA}。来源于 H-2K^b, CD54 和 CD80 基因敲除小鼠的 DC 分别被命名为 (K^{b-/-})DC_{OVA}, (CD54^{-/-})DC_{OVA} 和 (CD80^{-/-})DC_{OVA}。

[0121] 2) EXO 的准备

[0122] 骨髓来源和 OVA 装载的 DC_{OVA} 释放的囊泡 (EXO_{OVA}) 和 CFSE 标记的 EXO_{CFSE} 的准备与纯化按照实施例 1 所述。

[0123] 3) CD4⁺T 细胞的准备

[0124] 从具有对 OVA 有特异性的 T 细胞受体的转基因小鼠 OTI 和 OTII 的脾脏中分离天然的 OVA 特异性自然 T 细胞 (nT)。通过尼龙柱后, 用抗小鼠 CD8 或 CD4 的微珠 (Dyna1 Inc) (27) 进行阴性选择, 分别获得纯度 > 98% 的 CD4⁺/V α 2V β 5⁺ 或 CD8⁺/V α 2V β 5⁺ 细胞群。为了得到激活的 OTII CD4⁺T 细胞, 来自 OTII 小鼠的脾脏细胞在含有 IL-2 (20U/ml) 和 ConA (1 μ g/ml) 的 RPMI1640 培养基中培养 3 天 (27), ConA 激活的 CD4⁺T 细胞 (aT) 按上述程序纯化。

[0125] 4) CD4⁺T 细胞对 EXO 分子的摄取

[0126] 首先, 将 CD4⁺nT 和 aT 细胞与 EXO_{CFSE} (10 μ g/1 \times 10⁶T 细胞) 在 0.5-1ml 含有 IL-2 (10U/ml) 的 AIM-V 细胞培养液中, 37°C 孵育 4 小时, 其间每 20 分钟将细胞摇匀一次。用 PBS 洗涤 2 遍后, 用流式细胞仪分析 CFSE 染色。另外一组实验, 用 CD4⁺ 的 nT 和 aT 细胞与 EXO_{6.1} 共培养, 然后分析 CD45.1 分子的表达。

[0127] 为了进一步测定 EXO 分子向 T 细胞的转移, 来源于 OTII 小鼠或不同基因敲除的 OTII 小鼠的 CD4⁺nT 和 aT 细胞与 EXO_{OVA} 孵育, 流式细胞仪分析 H-2K^b, CD54, CD80 和 pMHC I 的表达。阻断实验是用来自于 H-2K^b 基因敲除小鼠的 CD4⁺T 细胞分别在冰上与抗-H-2K^b 和 I a^b 抗体 (12 μ g/ml) 或 CTLA-4/Ig (12 μ g/ml) 孵育 30 分钟, 然后与 EXO_{OVA} 37°C 共培养 4 小时。收获细胞, 流式细胞仪分析 H-2K^b 的表达。CD4⁺nT 和 aT 细胞与 EXO_{OVA} 共培养后得到的 T 细胞分别命名为 nT_{EXO} 和 aT_{EXO}。来自 H-2K^b, CD54, CD80, IL-2, IFN- γ 和 TNF- α 基因敲除小鼠的 CD4⁺aT 细胞与 EXO_{OVA} 共培养后分别被命名为 CD4⁺aT_{EXO} (K^{b-/-}), aT_{EXO} (CD54^{-/-}), aT_{EXO} (CD80^{-/-}), aT_{EXO} (IL-2^{-/-}), aT_{EXO} (IFN- γ ^{-/-}), aT_{EXO} (TNF- α ^{-/-}); aT_{EXO} (K^{b-/-}), aT_{EXO} (CD54^{-/-}) 和 aT_{EXO} (CD80^{-/-}) 细胞的细胞因子表达谱与 aT_{EXO} 细胞相似, aT_{EXO} (IL-2^{-/-}), aT_{EXO} (IFN- γ ^{-/-}) 和 aT_{EXO} (TNF- α ^{-/-}) 细胞的细胞因子表达谱除了特定的细胞因子 (IL-2 或 IFN- γ 或 TNF- α) 缺陷外, 其他的细胞特征也与 aT_{EXO} 细胞相似。

[0128] CD4⁺T 细胞以抗原特异性和非特异性两种方式摄取 EXO 的结果见图 7。流式细胞仪分析 (a) OVA 装载 (pulsed) 的 DC_{OVA} 和 DC_{OVA} 衍生的 EXO (EXO_{OVA}) 被一系列抗体染色 (实线), 然后用流式细胞仪分析, 说明实验组与对照组 (control reagent) 有显著差异。同时用同型匹配的无关抗原染色作为对照 (细虚线)。(b) 来源于 OT II 小鼠的天然型 CD4⁺T (nT) 和激活型的 T (aT) 细胞被一系列抗体染色 (粗实线) 或用同型匹配的无关抗体染色作为对照 (细虚线) 后流式细胞仪分析。实验重复 2 次, 结果相似。结果显示, 与有 OVA 装载 (pulsing) 的 DC_{OVA} 相似, DC_{OVA} 释放的 EXO_{OVA} 表面也检测到 MHC I (Kb) 和 class II (Ia^b), CD11c, CD40,

CD54, CD80 和 pMHC I 复合物,只是表达量比 DC_{OVA} 低(图 7a)。来自转 OTII 基因小鼠的 nT 和 aT 细胞也表达 CD4 和 TCR 分子(图 7b)。CD4⁺aT 细胞表达激活 T 细胞的标记分子(CD25 和 CD69),但 CD4⁺nT 细胞不表达,而且他们分泌 IL-2(~ 2.4ng/ml 每 10⁶ 细胞/24 小时), IFN- γ (~ 2.0ng/ml 每 10⁶ 个细胞/24 小时)和 TNF- α (~ 1.7ng/ml 每 10⁶ 个细胞/24 小时),但不分泌 IL-4 和 IL-10,说明这些细胞属于 Th1 细胞。

[0129] T 细胞摄取 EXO 的结果及 CD4⁺T 细胞通过摄取 EXO 获得 pMHC I 和协同刺激分子的结果见图 8。为证实 T 细胞对 EXO 的摄取,来自 OTII 和 C57BL/6 小鼠的 CD4⁺nT 和 aT 细胞与 EXO_{CFSE} 共同孵育,然后用流式细胞仪检测。(a) 已摄取 EXO_{CFSE} (粗实线)和不摄取 EXO_{CFSE} (细虚线)的天然和激活 OTII 和 C57BL/6CD4⁺T 细胞,流式细胞分析 CFSE 的表达。(b) 阻断实验,激活的 OTII CD4⁺aT 细胞与分别抗 Iab, LFA-1 抗体和 CTLA-4/Ig 融合蛋白,这些试剂混合物或匹配同型的抗体在冰上孵育 30min,在和 EXO_{CFSE} 37°C 孵育 4 小时后,分析 CFSE 阳性 T 细胞,和在不同情况下 T 细胞的 CFSE 的表达进行比较并用 Student's T 检验。结果 *p 值小于 0.05,说明抗 Iab 和 LFA-1 抗体对阻断 T 细胞摄取 EXO 有显著意义。已摄取(粗实线)和未摄取(细实线)EXO_{OVA} 的天然的(c)和激活的(e)OTII CD4⁺T 细胞,用一系列抗体染色或用不相关的同型匹配的抗体作为对照(细虚线)进行流式细胞仪分析 H-2K^b, CD54, CD80 和 pMHC I 的表达。天然的(d)和激活的(f)OTII CD4⁺T 细胞来源于具有相应基因缺陷的 OTII 小鼠,也进行相同的染色及流式细胞仪分析。实验重复 2 遍。结果相似。如图 8a 所示,和野生型的 B6 小鼠 CD4⁺aT 细胞一样,转基因 OTII 小鼠的 CD4⁺nT 和 aT 细胞均可检测到染色的 CFSE,但 B6 小鼠 CD4⁺nT 细胞则检测不到。为探究摄取 EXO 的分子机制,我们用一系列的试剂来进行阻断实验。结果如图 8b,抗 Iab 和 LFA-1 抗体可以阻断 EXO 的摄取,而 CTLA-4/Ig 融合蛋白和抗 H-2Kb 抗体则无此功能,说明 CD4⁺T 细胞对 EXO 的摄取是通过 OVA 特异的 Iab/TCR 和非特异的 CD54/LFA-1 相互作用共同介导的,这与以前的报道一致(25, 26)。

[0130] 图 8c 和 8e 显示,与上述转移 CFSE 染色相似,其他的 EXO 分子如 MHC I, CD54 和 CD80 也转移到 OTII CD4⁺nT 和 aT 细胞上。另外,OVA 特异性的 CD8⁺CTL 激活的关键因子 pMHC I 复合物也转移到 CD4⁺T 细胞表面。因为原来的 CD4⁺T 细胞,特别是 CD4⁺aT 细胞也表达上述一些囊泡上的分子,那么首先要确定这些分子表达的提高是否是内源性的上调还是外源性的摄取。因此本发明者用带有不同基因敲除的 OTII CD4⁺T 细胞与 EXO 孵育,然后用流式细胞仪分析。结果如图 8d 和 8f 所示,原来的带有不同基因敲除的 OTII CD4⁺nT 和 aT 细胞分别不表达其内源性的 H-2K^b, CD54 和 CD80。而在摄取了 EXO_{OVA} 后,每种细胞都表达外源的 H-2K^b, CD54 和 CD80 分子,说明 CD4⁺T 细胞表达上述分子的升高与摄取 EXO 相关。

[0131] 通过使用带有不同基因敲除的 aT_{EXO} 去观察其对 OVA 特异的 CD8⁺T 细胞的刺激作用。本发明者发现 aT_{EXO}(IL-2^{-/-})(0.24%)和 aT_{EXO}(CD80^{-/-})(0.31%)细胞的 CD8⁺T 细胞应答基本丢失,但 aT_{EXO}(IFN- γ ^{-/-})(2.15%), aT_{EXO}(TNF- α ^{-/-})(2.13%)和 aT_{EXO}(CD54^{-/-})(2.31%)的变化不大。说明 aT_{EXO} 对 CD8⁺T 细胞应答刺激效应是通过 IL-2 介导的并通过囊泡来源的 CD80 协同刺激而获得。同时结果显示, aT_{EXO}(K^b^{-/-})细胞与其具有相同的细胞因子谱的 aT_{EXO} 细胞相比,由于它并没有如 aT_{EXO} 具有所获得的 pMHC I 复合物,它也完全失去了协同刺激功能(0.11%)。这说明 aT_{EXO} 的协同刺激功能是通过获得囊泡来源的 pMHC I 复合物在体内能特异性的将 aT_{EXO} 的刺激功能传递给 CD8⁺T 细胞。以上这些结果可以说明, EXO 导

向的 CD4⁺T 细胞的刺激效应是通过 IL-2 介导并由囊泡来源 CD80 协同刺激而获得,并且这种刺激效应是通过获得囊泡来源的 pMHC I 复合体使其在体内能特异性传递给 CD8⁺T 细胞。

[0132] 5) T 细胞增殖实验

[0133] 为了确定 CD4⁺nT_{EXO} 和 aT_{EXO} 细胞的功能,我们进行了 CD8⁺T 细胞增殖实验。将 CD4⁺nT_{EXO} 和 aT_{EXO} 细胞 (0.3×10^5 个细胞 / 孔) 及其两倍的稀释物与 OTI CD8⁺T 细胞 (1×10^5 个细胞 / 孔) 共培养。为了检测分子机制,用抗 H-2K^b, I-A^b 和 LFA-1 抗体和 CTLA-4/Ig 融合蛋白 (10 μg/ml) 和这些试剂的混合物,以及同型匹配的不相关的抗体混合物作为对照试剂分别加入细胞培养液中。培养 3 天后,用 ³H-thymidine 结合法检测 (27)。

[0134] EXO 导向的 CD4⁺T 细胞激活天然 CD8⁺T 细胞的体外增殖见图 9。(a) CD8⁺ 细胞体外增殖实验 EXO_{OVA} (10 μg/ml)、DC_{OVA}、nT_{EXO}、aT_{EXO} 和 Con A-activated OTII T(aT) 细胞以及他们的 2 倍稀释物与定量的 OTI CD8⁺T 细胞共培养 3 天,³H 掺入法分析 CD8⁺T 细胞的增殖。(b) 通过加入单种中和试剂 (包括抗 K^b、I-A^b、LFA-1、IL-2、IFN、TNF-α 抗体及 CTLA-4/Ig 融合蛋白,中和试剂混合物,对照抗体和融合蛋白混合物测定其对 aT_{EXO} 刺激 OTI CD8⁺T 细胞增殖的影响,比较并用 Student's T 检验 (40),结果 *, p < 0.05,说明实验组与对照组有显著差异。图 9a 所示,EXO_{OVA} 可以激活 CD8⁺T 细胞在体外增殖,但与 DC_{OVA} 相比激活程度低,这与 Hwang 等的先前报道一致 (25, 26)。然而,EXO 导向的 aT_{EXO} 与 DC_{OVA} 相比,可更强的激活 CD8⁺T 细胞增殖,而天然的 nT_{EXO} 刺激效果相对较弱。为研究 CD8⁺T 细胞增殖的分子机制,将一系列的试剂加入细胞培养基中,结果如图 9b 所示,与抗 Ia^b, IFN-γ 和 TNF-α 抗体没有显著影响相比,抗 H-2K^b, LFA-1, IL-2 抗体和 CTLA-4/Ig, 均可显著抑制 CD8⁺T 细胞增殖,抑制率分别为 49%, 52%, 62% 和 49% (p < 0.05)。结果说明 CD8⁺T 细胞增殖严格依赖 OVA 特异的 pMHC I/TCR 相互作用,并受非特异性协同刺激分子 (CD80/CD28 和 CD54/LFA-1) 的影响。

[0135] 6) Tetramer 染色

[0136] C57BL/6 小鼠分别静脉注射 4000rad 辐照处理的 DC_{OVA}, nT_{EXO}, aT_{EXO} (3×10^6 细胞 / 只老鼠)。在免疫后 6 天,对上述小鼠断尾取血 100 μl。血样本与 PE-H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetramer 和 FITC- 标记的抗 CD8 抗体在室温结合 30 分钟,用裂解 / 固定缓冲液裂解红细胞,细胞用 PBS 缓冲液洗涤两次,流式细胞仪分析。免疫三个月后,再断尾取血,用 PE-Tetramer, 和 FITC- 标记的抗 CD8 抗体进行染色,然后用流式细胞仪检测 OVA 特异型的 CD8⁺Tm 免疫记忆细胞。

[0137] EXO 导向的 CD4⁺T 细胞在 C57BL/6 小鼠体内激活非 CD4⁺T 细胞依赖的 CD8⁺T 细胞增殖见图 10。野生型或 Ia^{b-/-} 基因敲除小鼠分别静脉注射辐照处理的 (a) DC_{OVA}、nT_{EXO}、aT_{EXO} 和 (b) 各种基因敲除的 aT_{EXO}。免疫 6 天后,断尾取血与 PE-H-2K^b/OVAI tetramer 和 FITC-anti-CD8 抗体孵育,用流式细胞仪检测。实验值表示 tetramer 阳性 CD8⁺T 细胞占总 CD8⁺T 细胞的百分率。括号内的值表示标准差。实验重复 2 遍。结果相似。野生型或 MHCII (Ia^b) 基因敲除小鼠在免疫 6 天后,用 Tetramer 染色来检测小鼠体内 OVA 特异的 CD8⁺T 细胞应答反应。图 10a 所示,DC_{OVA}, aT_{EXO} 和 nT_{EXO} 细胞刺激 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetramer 阳性 CD8⁺T 细胞数分别占野生型 C57BL/6 小鼠脾脏总 CD8⁺T 细胞的 1.03%, 2.24% 和 0.86%。说明 aT_{EXO} 在三种刺激物中效果最强。图 10b 所示,在缺少 CD4⁺T 细胞的 Ia^b 基因敲除小鼠中,只有 aT_{EXO} 仍然可以刺激 OVA 特异的 CD8⁺T 细胞应答 (2.01%), 说明 aT_{EXO} 诱导的 CD8⁺T

细胞应答是非 CD4⁺T 细胞依赖的,反之那些 DC_{OVA} 和 nT_{EXO} 是 CD4⁺T 细胞依赖的。

[0138] 7) 动物实验

[0139] 为检测 EXO 导向的 CD4⁺T 细胞的抗肿瘤免疫保护作用,对野生型 C57BL/6, 缺少 CD4⁺ 或 CD8⁺T 细胞的 Ia^b 或 K^b 基因敲除小鼠 (n = 8), 分别静脉注射 EXO_{OVA} (10ug/ 只老鼠), 4000rad 辐照处理的 DC_{OVA}, nT_{EXO}, 和 aT_{EXO} 或 aT_{EXO} (1×10⁶/ 只老鼠), 对照组注射 PBS。野生型 C57BL/6 小鼠也分别静脉注射 4000rad 辐照处理的来自不同基因敲除小鼠的 aT_{EXO} 细胞 (1×10⁶/ 只老鼠) 免疫, 免疫后 6 天, 小鼠静脉注射 0.5×10⁶BL6-10_{OVA} 或 BL6-10 肿瘤细胞来检测抗肿瘤免疫反应。小鼠在注射肿瘤细胞后 4 周处死, 计数肺部的黑色素瘤的克隆数。转移到健康肺部的肿瘤呈岛状分布, 显现出独立分散黑色斑点, 很容易与正常的肺组织区分。转移的黑色斑点太多而无法计数的就指定为 > 100 (27)。实验结果见表 2。

[0140] 为阐明基因缺陷的 aT_{EXO} 细胞用于免疫的分子机制。我们用带有不同基因敲除的 aT_{EXO} 去免疫小鼠, 野生型 C57BL/6 小鼠 (n = 8) 用具有不同基因缺陷的 aT_{EXO} 免疫。6 天后, 每只小鼠静脉接种 BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞。肿瘤细胞接种后 4 周, 处死小鼠, 对肺转移肿瘤克隆数进行计数。实验数据为重复三次中有代表性的一次。实验结果见表 2。

[0141] 表 2. EXO 导向的 CD4⁺T 细胞有抗肺肿瘤转移的免疫保护

[0142]

	疫苗	肿瘤细胞攻击	肿瘤生长发生率(%)	肺部黑色素瘤的平均克隆数
实验 I	DC _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	2/8 (25)	17±6
	nT _{EXO}	BL6-10 _{OVA}	3/8 (37)	19±10
	aT _{EXO}	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0
	EXO _{OVA}	BL6-10 _{OVA}	3/8 (37)	27±6
	PBS	BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	>100
	nT _{EXO}	BL6-10	8/8 (100)	>100
	aT _{EXO}	BL6-10	8/8 (100)	>100
	PBS	BL6-10	8/8 (100)	>100
实验 II	aT _{EXO} (B6)	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0
	aT _{EXO} (Ia ^b KO)	BL6-10 _{OVA}	1/8 (12)	8
	aT _{EXO} (K ^b KO)	BL6-10 _{OVA}	8/8 (100)	>100
实验 III	aT _{EXO} (IL-2 ^{-/-})	BL6-10 _{OVA}	7/8 (88)	38±20
	aT _{EXO} (IFN-γ ^{-/-})	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0
	aT _{EXO} (TNF-α ^{-/-})	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0
	aT _{EXO} (CD80 ^{-/-})	BL6-10 _{OVA}	5/8 (63)	27±13
	aT _{EXO} (CD54 ^{-/-})	BL6-10 _{OVA}	0/8 (0)	0
	aT _{EXO} (K ^b ^{-/-})	BL6-10 _{OVA}	7/8 (88)	34±19

[0143] 在表 2 实验 I 中, 结果显示 EXO 导向的 CD4⁺T 细胞在 C57BL/6 小鼠体内诱导强的抗肿瘤免疫显示所有接种 PBS 的小鼠都有大量的肺肿瘤转移灶 (> 100)。aT_{EXO} 免疫组对 BL6-10_{OVA} 肿瘤细胞 (0.5×10⁶ 个细胞 / 只老鼠) 完全免疫保护, 保护率为 100% (8/8), 而 DC_{OVA} 和 nT_{EXO} 免疫组或 EXO_{OVA} 的保护率分别为 75% (6/8) 和 63% (5/8), 说明 CD4⁺aT_{EXO} 可以诱导比脾 DC_{OVA} 或骨髓来源的 DC 释放的囊泡 EXO_{OVA} 更强的抗肿瘤免疫应答。保护的特异性通过观察 aT_{EXO} 对不表达 OVA 的肿瘤细胞 BL6-10 没有免疫保护作用而确认。所有的小鼠都有大量的肺肿瘤转移灶 (> 100)。

[0144] 在表 2 实验 II 中,结果显示大部分缺失 CD4⁺T 细胞的 Ia^b 基因敲除小鼠仍被免疫保护 (7/8),而所有缺失 CD8⁺T 细胞的 H-2K^b 基因敲除小鼠都有大量的肺肿瘤转移灶 (8/8),这样就肯定了 aT_{EXO} 诱导的抗肿瘤免疫是不依赖 CD4⁺Th 细胞的结论。

[0145] 在表 2 实验 III 中,我们发现用 aT_{EXO}(IFN- γ ^{-/-})-, aT_{EXO}(TNF- α ^{-/-})- 和或 aT_{EXO}(CD54^{-/-}) 免疫的小鼠 (8/8) 均没有肺转移肿瘤,而用 aT_{EXO}(IL-2^{-/-})-(7/8) 和 aT_{EXO}(CD80^{-/-}) (5/8) 免疫小鼠,有时会有免疫遗漏(如表 2 实验 II 所示)。说明在体内刺激 CD8⁺T 细胞应答时 aT_{EXO} 分泌 IL-2 并获得 CD80 协同刺激发挥重要作用,而 IFN- γ , TNF- α 和 CD54 则不是必须的,这与本发明者在图 10 中所示的数据是一致的。同时结果显示大多数缺陷 pMHC I 的 aT_{EXO}(pMHC I^{-/-}) 细胞免疫的小鼠 (7/8) 都有大量的肺肿瘤转移灶 (> 100),这进一步说明 aT_{EXO} 细胞的刺激效应是通过获得囊泡来源的 pMHC I 复合体使其在体内能特异性的将 aT_{EXO} 的刺激功能传递给 CD8⁺T 细胞。

[0146] 实施例 3 工程化的囊泡导向的 T 细胞的制备

[0147] 1. 材料(试剂、细胞和动物)

[0148] 卵清蛋白(OVA)购自 Sigma 公司;OVAI(SIINFEKL)和 OVAII(ISQAVHAAHAEINEA-GR)分别是针对 H-2K^b 和 Ia^b 特异性多肽(28,29);MutI 多肽是针对非相关 3LL 肺癌特异性的多肽(30),所有的肽均由多肽系统合成;生物素标记和 FITC 荧光标记的 H-2K^b(AF6-88.5), CD4(GK1.5), CD25(7D4), CD80(16-10A1) 和抗 OVA 抗体均购自 Pharmingen 公司;抗 H-2K^b/OVAI(pMHC I) 复合物抗体由 NIH 的 German 博士提供(31);抗 IL-4 和 IFN- γ 抗体以及重组鼠的 IL-4, IL-12 和 GM-CSF 购自 R&D;OVA 转基因的 EG7 细胞系和表达 Ia^b 的 BL27 肿瘤细胞系均购自 ATCC,在 10% FCS 和 G418(0.5mg/ml) 的 DMEM 培养基中培养;高度肺癌转移的 BL/6-10 和 OVA 转基因的 BL6-10(BL6-10_{OVA}) 黑色素瘤细胞系由本室制备(27);雌的 C57BL/6 小鼠从 Jackson 实验室获得;所有动物按萨斯卡通大学动物管理委员会条理饲养。

[0149] 2. 步骤

[0150] 1)DC 的获得

[0151] 按实施例 1 实施例 2 所述,骨髓来源的成熟 DC 准备获得后,用 0.2mg/ml OVA 蛋白激活过夜。这些 DC 被称为 DC_{OVA}。

[0152] 2)pcDNA-CD80 表达载体的构建

[0153] 用 RNA 试剂盒从 DC 中抽提总 RNA,利用 RT-PCR 法从 DC 细胞的 cDNA 文库中用 PFU 酶克隆一段 1000bp 的鼠 CD80 分子开放可译框架的 cDNA 片段。PCR 的上下游引物分别为:上游引物:5-ctcca ttggc tctag attcc-3;下游引物:5-cctca tgagc cacat aatac-3。克隆的 CD80cDNA 片段连接到 pCR2.1 载体上,形成 pCR2.1/CD80, cDNA 片段用双脱氧核苷酸法测序后将 CD80 基因酶切后(HindIII/XbaI)克隆到 pcDNA3.1 质粒上,形成表达载体 pcDNA-CD80(38)。

[0154] 3) 转染细胞系 EG7/CD80 的产生

[0155] 20×10⁶ 个 EG7 细胞重悬在 0.7ml 的 PBS 中和 0.3ml 含有 10ug pcDNA-CD80 DNA 的 PBS 中。用 300V 125uF 将 pcDNA-CD80 或 pcDNA 对照电转化到肿瘤细胞中(38)。转化的细胞在含有 4mg/ml 潮霉素和 0.5mg/ml G418 的培养基中进行筛选,筛选的 EG7/CD80 细胞在含有 10% FCS, 0.5mg/ml 潮霉素和 0.5mg/ml G418 的 DMEM 培养基培养,用流式细胞仪分析

CD80 的表达。

[0156] 4) 囊泡的准备

[0157] 肿瘤细胞来源的囊泡的准备和纯化按照实验 I 所述准备。简之,在含有 0.5mg/ml 潮霉素和 0.5mg/ml G418 的无 FCS 的 AIM-V 培养基在培养 EG7 细胞或 EG7/CD80 细胞过夜后的上清,经过 1,200g 离心 20 分钟,10,000g 离心 30 分钟去除细胞碎片,再 100,000g 离心 1 小时沉淀囊泡。EXO 沉淀用大量的 PBS 洗涤两次,并用 100,000g 离心 1 小时沉淀囊泡蛋白。用 Bradford 分析来自 EG7 细胞和 EG7/CD80 细胞的囊泡(分别命名为 EXO_A 和 EXO_B) 的蛋白浓度。

[0158] 5) 激活 CD4⁺T 细胞的准备

[0159] 从 C57BL/6 小鼠脾脏中分离天然 CD4⁺T 细胞,经过尼龙柱和抗鼠 CD8 磁珠的阴性选择纯化。为了得到激活 CD4⁺T 细胞,将纯化的天然 CD4⁺T 细胞在含有抗 CD3 抗体 (1ug/ml), IL-2 (20U/ml) 的培养基中培养 3 天。为得到不同类型的 T 细胞,上述的天然 CD4⁺T 细胞在培养基中另外加 IL-12 (5ng/ml)/anti-IL-4 抗体 (5ug/ml) 或 IL-4/IL-10/TGF- β (10ng/ml)/抗 IFN- γ 抗体 (5ug/ml) 培养 3 天 (39),然后用流式细胞仪分析。激活的 CD4⁺T 细胞用 4,000rad 辐照处理过的装载有 OVAII 多肽的 BL27 肿瘤细胞重新激活,经 24 小时重新激活的 CD4⁺T 细胞的上清用 ELISA 试剂盒分析细胞因子的表达 (27)。在含有 IL-12 (5ng/ml)/anti-IL-4 抗体 (5ug/ml) 或 IL-4/IL-10/TGF- β (10ng/ml)/抗 IFN- γ 抗体 (5ug/ml) 培养基中的 CD4⁺T 细胞被命名为 Th₁ 或 Th₂ 因为他们分别分泌 IL-2 (1.5ng/ml/每 10⁶ 细胞/24 小时)/IFN-rI (1.2ng/ml/每 10⁶ 细胞/24 小时)/无 IL-4/IL-10 和 IL-4 (1.6ng/ml/每 10⁶ 细胞/24 小时)/IL-10 (1.3ng/ml/每 10⁶ 个细胞/24 小时)/无 IFN- γ 。

[0160] 6) CD4⁺T 细胞对囊泡的摄取

[0161] 激活的 CD4⁺T 细胞与 EXO (10 μ g/1 \times 10⁶T 细胞/0.5ml AIM-V 培养基) 在含有 IL-2 (10U/ml) 的培养基中培养 4 小时,每 20 分钟请轻轻摇动一次,用 PBS 洗涤 2 次,按实施例 2 所述用流式细胞仪分析。

[0162] EG7/CD80 细胞和 EG7/CD80 细胞衍生的囊泡的表型分析结果见图 11。EG7 和改造过的 EG7/CD80 肿瘤细胞用一系列抗体染色,流式细胞仪分析。(A) EG7 和表达 CD80 的 EG7/CD80 肿瘤细胞(实线),(B) EG7/CD80 和 EG7 肿瘤细胞衍生的囊泡 (EXO_A and EXO_B) (实线) 被一系列抗体染色,流式细胞仪分析。这些细胞和囊泡也被同源匹配的无关抗体染色,以作为对照(细虚线)。实验重复 2 遍。结果相似。结果显示,EG7 和 EG7/CD80 肿瘤细胞表达相似数量的 MHC I、OVA 和 pMHC I 复合物。但 EG7/CD80 细胞表达 CD80,而 EG7 细胞不表达 CD80。图 11B 显示,MHC I (K^b), OVA, pMHC I 复合物和 CD80 在 EG7/CD80 肿瘤细胞衍生的 EXO 表面表达,而与 EG7/CD80 衍生的 EXO 相比,EG7 细胞衍生的 EXO 表达的浓度较低,而且与 EG7 细胞相同,都不表达 CD80。

[0163] CD4⁺T 细胞通过摄取 EXO_A 来获得 pMHC I 复合物和 CD80 协同刺激分子的结果见图 12。激活 CD4⁺T 细胞 (aT) 和摄取了 EXO_A 和 EXO_B 的 aT (aTEXO_A and aTEXO_B) (实线) 分别用一系列抗体染色。这些细胞和囊泡也被同源匹配的无关抗体染色,以作为对照(细虚线)。实验重复 2 遍。结果相似。为研究 CD4⁺aT 细胞是否可摄取 EXO,本发明者用 aT 细胞与 EXO 孵育 4 小时,然后用流式细胞仪分析这些 T 细胞。结果显示,原来的 aT 细胞表达 CD4 和 CD25,但不表达 pMHC I 复合物和 CD80,说明这些是活化的 CD4⁺aT 细胞。与 EG7/CD80

细胞衍生的 EXO 孵育后,这些 aT 细胞特命名为 aT_{EXO_A} 的细胞表达 pMHC I 复合物和 CD80 协同刺激分子。与 EG7 细胞衍生的 EXO 孵育后,这些 aT 细胞特命名为 aT_{EXO_B} 表达 pMHC I 复合物但不表达 CD80 协同刺激分子。既然 pMHC I 复合物和 CD80 协同刺激分子在激活 OVA 特异性的 $CD8^+T$ 细胞应答中发挥重要作用,那些摄取了 EXO_A 并表达这两个分子的 aT_{EXO_A} 就可以激活 CTL 应答。激活的 $CD4^+Th_1$ (分泌 IL-2/IFN- γ) 和 Th_2 (分泌 IL-4/IL-10) 细胞摄取了 EG7/CD80 细胞衍生的 EXO_A 或 EG7 细胞衍生的 EXO_B 分别被命名为 EXO 导向的 $aT_{EXO_{A1}}$ 和 $aT_{EXO_{A2}}$ 或 $aT_{EXO_{B1}}$ 和 $aT_{EXO_{B2}}$ 。

[0164] 7) Tetramer 染色分析

[0165] 分别对 C57BL/6 小鼠静脉注射 4000rad 辐照处理过 DC_{OVA} (1×10^6 细胞), $aT_{EXO_{A1}}$, $aT_{EXO_{B1}}$, $aT_{EXO_{A2}}$ 细胞 (3×10^6 细胞 / 只)。另外,小鼠也静脉注射 4,000rad 辐照处理过 DC_{OVA} (1×10^6 细胞 / 只) 和 $aT_{EXO_{A2}}$ 细胞 (3×10^6 细胞 / 只)。免疫 6 天后,小鼠尾部取血 100 μ l,血液样本用 PE-H-2Kb/OVA257-264Tetramer 和 FITC-抗 CD8 抗体染色,在室温下孵育 30 分钟,用裂解 / 固定缓冲液裂解红细胞,细胞洗涤后用流式细胞仪分析。

[0166] EXO 导向的 $CD4^+T$ 细胞在野生型小鼠体内激活 $CD4^+T$ 细胞依赖的 $CD8^+T$ 细胞增殖的结果见图 13。小鼠分别静脉注射免疫辐照处理的 DC_{OVA} , $aT_{EXO_{A1}}$ (摄取 EXOA 的 aTh_1 细胞), $aT_{EXO_{B1}}$ (摄取 EXOB 的 Th_1 细胞) 和 $aT_{EXO_{A2}}$ (摄取 EXO_A 的 aTh_2 细胞) 或 DC_{OVA} 和 $aT_{EXO_{A2}}$, 免疫后 7 天,尾部取血,流式细胞仪分析,每组数据代表 tetramer 阳性 $CD8^+T$ 细胞占总 $CD8^+T$ 细胞数的百分比。结果是每组 8 只小鼠中代表性的数据。比较并用 Student' s T 检验 (40), 结果 *, $p < 0.05$, 说明实验组与对照组有显著差异。实验重复 3 次,结果相似。 DC_{OVA} 、 $aT_{EXO_{A1}}$ 和 $aT_{EXO_{A2}}$ 细胞分别免疫小鼠后 6 天,本发明者用 Tetramer 染色检测 OVA 特异性的 $CD8^+T$ 细胞。结果显示, DC_{OVA} 刺激 H-2Kb/OVA257-26 阳性 $CD8^+T$ 细胞的增殖占野生型小鼠脾 $CD8^+T$ 细胞总数的 1.12%。只表达 pMHC I 而不表达 CD80 的 $aT_{EXO_{B1}}$, 刺激 H-2K^b/OVA257-26 阳性 $CD8^+T$ 细胞失败 (0.03%)。而既表达 pMHC I 又表达 CD80 的 $aT_{EXO_{A1}}$ 刺激 H-2K^b/OVA257-26 阳性 $CD8^+T$ 细胞的增殖占野生型小鼠脾 $CD8^+T$ 细胞总数的 1.92%, 说明由于提供包括 OVA 特异性的 pMHC I/TCR 和非特异性的协同刺激分子 CD80/CD28 两个信号, EXOA 导向的 aT_{EXO_A} 是强刺激物。其次,同样表达 pMHC I 又表达 CD80 的 $aT_{EXO_{A2}}$, 因为同时分泌免疫抑制因子 IL-10 而不能刺激任何 H-2Kb/OVA257-26 阳性 $CD8^+T$ 细胞 (0.02%)。而且当小鼠用 DC_{OVA} 和 $aT_{EXO_{A2}}$ 同时免疫后, DC_{OVA} 刺激的 $CD8^+T$ 细胞应答 (1.12%) 明显被抑制 (0.34%) ($p < 0.05$), 说明 $aT_{EXO_{A2}}$ 能诱导 OVA 特异性的免疫抑制。

[0167] 8) 动物实验

[0168] 为检测 EXO 导向的 $CD4^+T$ 细胞的抗肿瘤免疫保护,野生型的 C57BL/6 小鼠 ($n = 8$) 分别静脉注射 EXO_A 或 EXO_B (10ug/ 只) 或 4,000rad 辐照处理过 DC_{OVA} (1×10^6 细胞), $aT_{EXO_{A1}}$, $aT_{EXO_{B1}}$, $aT_{EXO_{A2}}$ 或 aT 细胞 (3×10^6 细胞 / 只)。另外,小鼠也同时静脉注射 4,000rad 辐照处理过 DC_{OVA} (1×10^6 细胞 / 只) 和 $aT_{EXO_{A2}}$ 细胞 (3×10^6 细胞 / 只), 注射 PBS 的小鼠作为对照。免疫 6 天后小鼠再静脉注射 0.5×10^6 BL6-10_{OVA} 或 BL6-10 细胞来验证抗肿瘤免疫。小鼠在注射肿瘤细胞后 4 周处死,计数肺部的黑色素瘤的克隆数。转移到健康肺部的肿瘤呈岛状分布,显现出独立分散黑色斑点,很容易与正常的肺组织区分。转移的黑色斑点太多而无法计数的就指定为 > 100 (27)。结果见表 3。

[0169] 表 3. 工程化的肿瘤细胞所衍生的 EXO 所导向的 $CD4^+Th_1$ 和 Th_2 细胞分别诱导免疫

应答和免疫抑制

[0170]

疫苗	肿瘤细胞攻击	肿瘤生长发生率(%)	肺部黑色素瘤的平均克隆数
DC _{OVA}	BL6-10OVA	0 (0)	0
aT _{EXO_{A1}}	BL6-10OVA	0 (0)	0
aT _{EXO_{B1}}	BL6-10OVA	10/10 (100)	>100
aT _{EXO_{A2}}	BL6-10OVA	10/10 (100)	>100
EXO _A	BL6-10OVA	6/10 (60)	57±16*
EXO _B	BL6-10OVA	10/10 (100)	>100
PBS	BL6-10OVA	10/10 (100)	>100
DC _{OVA} /aT _{EXO_{A2}}	BL6-10OVA	3/10 (30)	36±13*
DC _{OVA}	BL6-10	10/10 (100)	>100
aT _{EXO_{A1}}	BL6-10	10/10 (100)	>100
PBS	BL6-10	10/10 (100)	>100

[0171] 表3结果显示所有注射PBS的或表达pMHC I而不表达CD80的EXO_B小鼠都有大量的肺转移肿瘤灶(>100)。既表达pMHC I又表达CD80的EXO_A的免疫组中,只有4/10(40%)的小鼠获得了抗肿瘤免疫。然而骨髓来源的DC_{OVA}和aT_{EXO_{A1}}疫苗可诱导完全抗BL6-10OVA的免疫保护8/8(100%),说明aT_{EXO_{A1}}疫苗可诱导比EXO_A更强的免疫。但是,aT_{EXO_{A1}}疫苗并不能诱导不表达OVA的BL6-10肿瘤的免疫保护,说明了免疫保护的特异性。该小组所有小鼠均有大量的肺转移肿瘤灶(>100)。然而,不表达CD80的aT_{EXO_{B1}}也不能诱导保护性抗肿瘤免疫。所有小鼠均有大量的肺转移肿瘤灶(>100),说明CD80在抗肿瘤免疫保护中的重要作用。aT_{EXO_{A2}}免疫的小鼠也没有得到任何的保护性免疫。而且,DC_{OVA}诱导的保护性免疫在用DC_{OVA}和aT_{EXO_{A2}}同时免疫的小鼠中被明显抑制($p < 0.05$),说明aT_{EXO_{A2}}分泌的免疫抑制因子IL-10可以诱导OVA特异性免疫抑制,这与先前报道一致(40)。本发明者所得数据清楚说明体外培养的CD4⁺的Th₁和Th₂细胞当摄取改造过的肿瘤细胞产生的表达pMHC I和CD80协同刺激分子的EXO分子后,可以诱导免疫应答和免疫抑制。而且这种途径将可以被应用到肿瘤治疗,自身免疫病和器官移植中。

[0172] 参考文献

[0173] 1. Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena. 2003. ER-phagosome 溶合定位在树状细胞内与交叉递呈组织相容性抗原 I 有关的细胞器. 自然 (Nature) 425 :397.

[0174] 2. Kleijmeer, M. J., J. M. Escola, F. G. UytdeHaag, E. Jakobson, J. M. Griffith, A. D. Osterhaus, W. Stoorvogel, C. J. Melief, C. Rabouille, and H. J. Geuze. 2001. 在细胞内装载组织相容性抗原 I 的路径. 交通 (Traffic) 2 :124.

[0175] 3. Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. 1996. B 淋巴细胞分泌抗原递呈的囊泡. 实验医学杂志 (J Exp. Med) 183 :1161.

[0176] 4. Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1998. 一种新颖的无细胞的疫苗能清除鼠肿瘤:树突细胞来源的囊泡. 自然医学 (Nature medicine). 4 :594.

- [0177] 5. Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze. 2000. 囊泡:从多泡体的内部小泡到细胞内的信号装置.(细胞科学杂志) *J Cell Sci* 113 Pt 19 :3365.
- [0178] 6. Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze. 1998. 在多泡囊泡的内部小泡和人 B 淋巴细胞分泌囊泡上的选择性强化的四聚体蛋白.(生物化学杂志) *J Biol Chem* 273 :20121.
- [0179] 7. Clayton, A., J. Court, H. Navabi, M. Adams, M. D. Mason, J. A. Hobot, G. R. Newman, and B. Jasani. 2001. 基于免疫磁珠分离和流式细胞仪分析抗原提呈细胞衍生的囊泡(免疫方法杂志) *J Immunol Methods* 247 :163.
- [0180] 8. Lamparski, H. G., A. Metha-Damani, J. Y. Yao, S. Patel, D. H. Hsu, C. Rugg, and J. B. Le Pecq. 2002. 来源于树突细胞的临床级别囊泡的生产与鉴定.(免疫方法杂志) *J Immunol Methods* 270 :211.
- [0181] 9. Andreola, G., L. Rivoltini, C. Castelli, V. Huber, P. Perego, P. Deho, P. Squarcina, P. Accornero, F. Lozupone, L. Lugini, A. Stringaro, A. Molinari, G. Arancia, M. Gentile, G. Parmiani, and S. Fais. 2002. 通过肿瘤细胞分泌的带有 FasL 的微泡诱导淋巴细胞凋亡.(实验医学杂志) *J Exp Med* 195 :1303.
- [0182] 10. Altieri, S. L., A. N. Khan, and T. B. Tomasi. 2004. 的来源于浆细胞瘤的囊泡可作为肿瘤疫苗(免疫治疗杂志) *J Immunother* 27 :282.
- [0183] 11. Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, and L. Zitvogel. 2001. 肿瘤衍生的囊泡是反启动 CTL 共享肿瘤排斥抗原的来源.(自然医学) *Nat Med* 7 :297.
- [0184] 12. Andre, F., N. E. Scharz, M. Movassagh, C. Flament, P. Pautier, P. Morice, C. Pomel, C. Lhomme, B. Escudier, T. Le Chevalier, T. Tursz, S. Amigorena, G. Raposo, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2002. 恶性渗出和肿瘤免疫原衍生的囊泡. *Lancet* 360 :295.
- [0185] 13. Hsu, D. H., P. Paz, G. Villafior, A. Rivas, A. Mehta-Damani, E. Angevin, L. Zitvogel, and J. B. LePecq. 2003. 作为肿瘤疫苗的囊泡:通过直接装载抗原多肽增强其效应.(免疫治疗杂志) *J Immunother* 26 :440.
- [0186] 14. Andre, F., N. Chaput, N. E. Scharz, C. Flament, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier, G. Raposo, B. Escudier, D. H. Hsu, T. Tursz, S. Amigorena, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2004. 作为潜在的非细胞多肽疫苗 1. 树突细胞衍生的囊泡将功能性的主要组织相容性复合物 1/ 多肽复合物传递给树突细胞.(免疫学杂志) *J Immunol* 172 :2126.
- [0187] 15. Chaput, N., N. E. Scharz, F. Andre, J. Taieb, S. Novault, P. Bonnaventure, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier, M. Merad, G. Adema, M. Adams, M. Ferrantini, A. F. Carpentier, B. Escudier, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2004. 作为潜在的非细胞多肽疫苗 2. CpG 佐剂中的囊泡启动天然. Tc1 淋巴细胞导致肿瘤排斥(免疫学杂志). *J Immunol* 172 :2137.
- [0188] 16. Cho, J. A., D. J. Yeo, H. Y. Son, H. W. Kim, D. S. Jung, J. K. Ko, J. S. Koh, Y. N. Kim, and C. W. Kim. 2005. 囊泡:肿瘤免疫治疗中对肿瘤抗原的一种新传递系统.(国际癌症杂志)

志). *Int J Cancer* 114 :613.

[0189] 17. Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. Andre, M. P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J. B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2005. 利用自身树突细胞衍生的囊泡免疫转移性黑色素瘤病人 :I 期临床实验结果 . (移植医学杂志) *J Transl Med* 3 :10.

[0190] 18. Morse, M. A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T. M. Clay, N. Valente, R. Shreeniwas, M. A. Sutton, A. Delcayre, D. H. Hsu, J. B. Le Pecq, and H. K. Lyerly. 2005. 囊泡免疫治疗早期非小细胞肺癌病人的 I 期临床研究 . (移植医学杂志) *J Transl Med* 3 :9.

[0191] 19. Thery, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz, and S. Amigorena. 2002. 树突细胞衍生的囊泡对天然 CD4⁺T 细胞的间接激活 (自然免疫) *Nat Immunol* 3 :1156.

[0192] 20. Vincent-Schneider, H., P. Stumptner-Cuvelette, D. Lankar, S. Pain, G. Raposo, P. Benaroch, and C. Bonnerot. 2002. 带有 HLA-DR1 分子的囊泡需要树突细胞才可有效的刺激特定的 T 细胞 . (国际免疫学) *Int Immunol* 14 :713.

[0193] 21. Chen, Z., S. Dehm, K. Bonham, H. Kamencic, B. Juurlink, X. Zhang, J. R. Gordon, and J. Xiang. 2001. DNA 芯片分析和生物学鉴定小鼠树突细胞成熟状态对其表型和抗肿瘤疫苗效率的影响 . (细胞免疫) *Cell Immunol* 214 :60.

[0194] 22. Pulendran, B. 2004. 利用树突细胞和 Toll 样受体调整疫苗效果 . (免疫综述) *Immunol Rev* 199 :227.

[0195] 23. Kishimoto, C., Takada, H., Hiraoka, Y., Shinohara, H. & Kitazawa, M. T 细胞疫苗对柯萨奇病毒 B3 心肌炎的免疫保护 . (分子细胞学杂志) *J Mol Cell Cardiol* 32, 2269-77 (2000).

[0196] 24. Medaer, R., Stinissen, P., Truyen, L., Raus, J. & Zhang, J. 通过 T 细胞免疫来排除髓磷脂碱蛋白 T 细胞自发反应 :多发型硬化症的前期实验 . *Lancet* 346, 807-8 (1995).

[0197] 25. Hwang, I. et al. T 细胞可利用 T 细胞受体或 CD28 受体来吸收和整合抗原提呈细胞的细胞表面分子 . (实验医学杂志) *J Exp Med* 191, 1137-48 (2000).

[0198] 26. Hwang, I. & Sprent, J. 肌动蛋白细胞骨架在 T 细胞吸收和整合抗原提呈细胞配体中发挥的作用 . (免疫学杂志) *J Immunol* 166, 5099-107 (2001).

[0199] 27. Xiang, J., H. Huang, and Y. Liu. 2005. 通过 CD4⁺Th 抗原提呈细胞途径发挥 CD8⁺T 细胞应答效应的一种新型动力学模式 . (免疫学杂志) *J Immunol* 174 :7497.

[0200] 28. Slingluff, C. L., Jr. 1996. 肿瘤抗原和肿瘤疫苗 :免疫原多肽 . (高级外科肿瘤) *Semin Surg Oncol* 12 :446.

[0201] 29. Li, M., G. M. Davey, R. M. Sutherland, C. Kurts, A. M. Lew, C. Hirst, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2001. 细胞关联的 OVA 在体外的交叉提呈效率比可溶性的 OVA 高 . (免疫学杂志) *J Immunol* 166 :6099.

[0202] 30. Zhang, W., Z. Chen, F. Li, H. Kamencic, B. Juurlink, J. R. Gordon, and J. Xiang. 2003. 肿瘤坏死因子 α 转基因的树突细胞比树突细胞产生的重组肿瘤坏死因子 α 可扩大细胞成熟并诱导更强的 T 细胞活化和抗肿瘤免疫 . (免疫学) *Immunology* 108 : 177.

- [0203] 31. Porgador, A., J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain. 1997. 用单克隆抗体对特异多肽-MHCI 复合物进行定位和定量. (免疫) *Immunity* 6:715.
- [0204] 32. Lyons, A. B., and C. R. Parish. 1994. 用流式细胞分离淋巴细胞的测定. (免疫学方法杂志) *J Immunol Methods* 171:131.
- [0205] 33. Hao, S., X. Bi, S. Xu, Y. Wei, X. Wu, X. Guo, S. Carlsen, and J. Xiang. 2004. 来源骨髓瘤细胞和树突细胞的融合杂交瘤的新颖疫苗可提高抗肿瘤免疫. (实验肿瘤). *Exp Oncol* 26:300.
- [0206] 34. Thery C, M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi, G. Raposo, J. Garin and S. Amigorena. 2001. 树突细胞衍生的囊泡的蛋白质组分析. (免疫学杂志.) *J Immunol*, 166:7309.
- [0207] 35. Hwang, I., X. Shen, and J. Sprent. 2003. 来自抗原提呈细胞的膜囊泡直接刺激天然 T 细胞:CD54 和 B7 分子的特定角色. (美国科学院学报) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6670.
- [0208] 36. Drickamer, K. 1999. C-型凝集样结构域. *Curr Opin Struct Biol* 9:585.
- [0209] 37. Wang J and A. Livingstone. 2003. CD4⁺Th 细胞 cel 对体外启动 CD8⁺T 细胞至关重要. (免疫学杂志) *J. Immunol.* 171:6339.
- [0210] 38. Chen Z, Huang H, Chan T, Carlsen S, Saxena A, Marr R, Xing Z and Xiang J. 2002. 通过共转染 HER-2/neu 和 TNF- α 双基因进入鼠树突细胞来提高 HER-2/neu 的抗肿瘤免疫. (肿瘤基因治疗) *Cancer Gene Ther.*, 9:778.
- [0211] 39. Huang H, Bi X, Yuan J, Xu S, Guo X and Xiang J. 2005. Combined CD4⁺Th1 效应和淋巴细胞趋化因子转基因表达联合作用提高 CD8⁺T1 细胞的肿瘤定位和治疗. (基因治疗) *Gene Ther.* 12:999.
- [0212] 40. Zhang X, Huang H, Yuang J, Sun D, Hou W, Gordon J and Xiang J. 2005. CD4-8- 树突细胞启动 CD4⁺T1 调节细胞抑制抗肿瘤免疫. (免疫学杂志) *J. Immunol.* 175:2931.

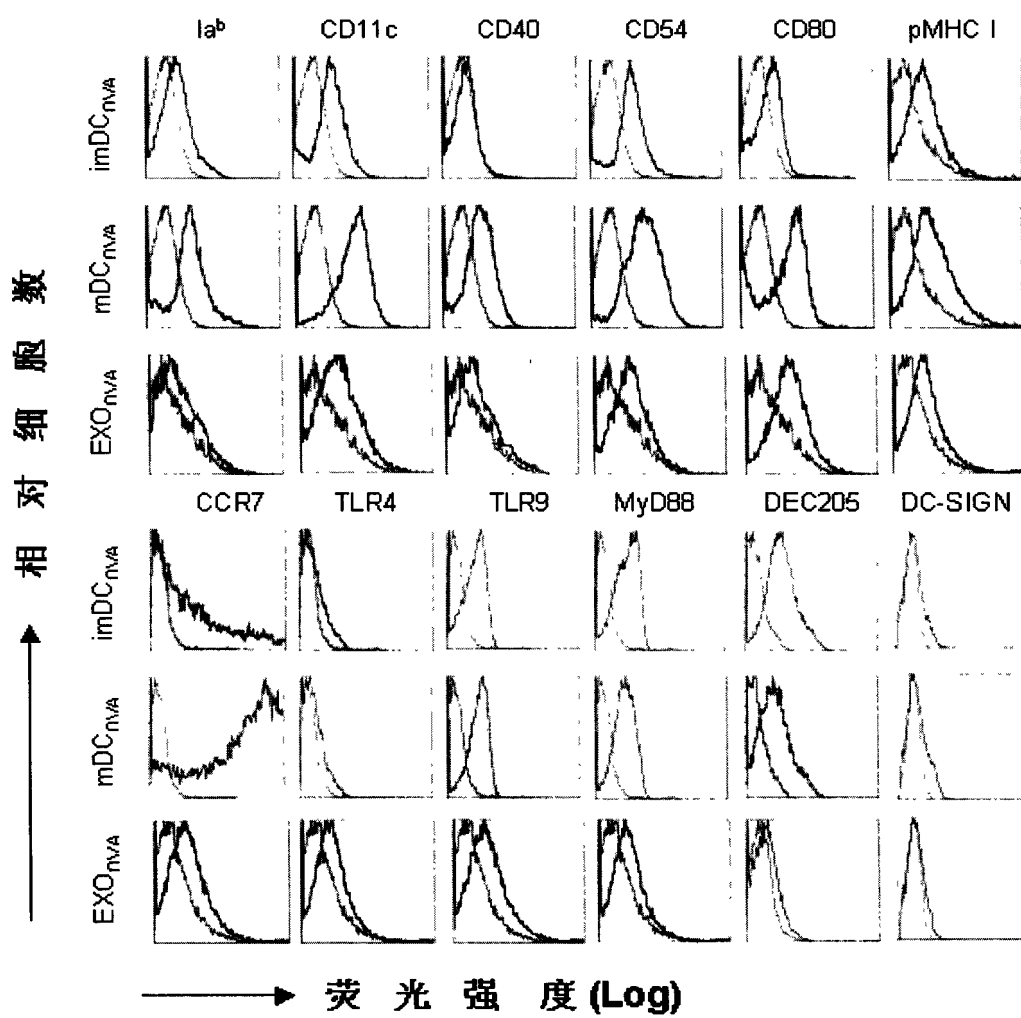


图 1

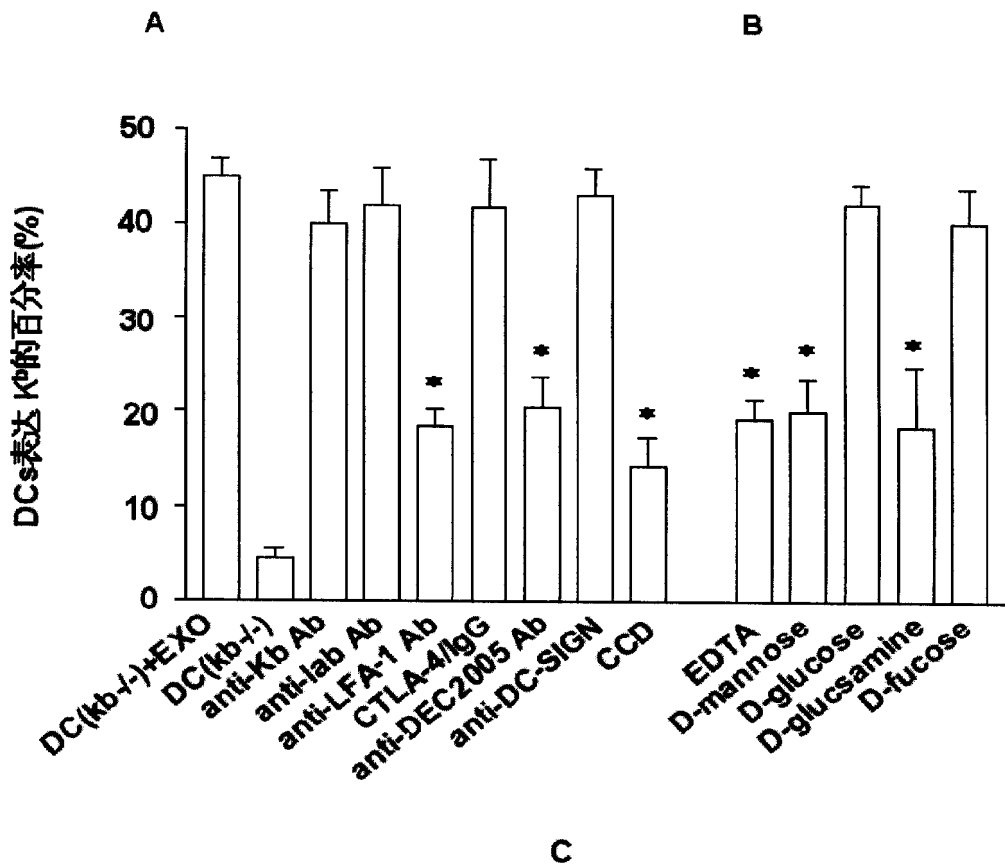
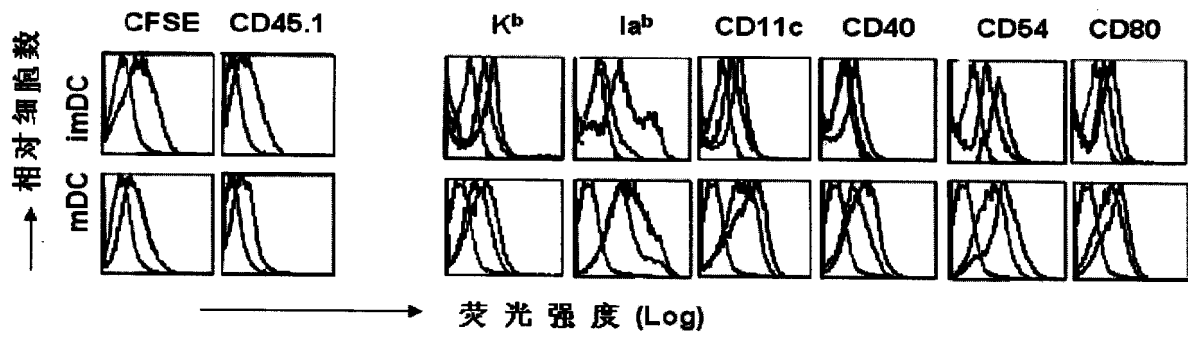


图 2

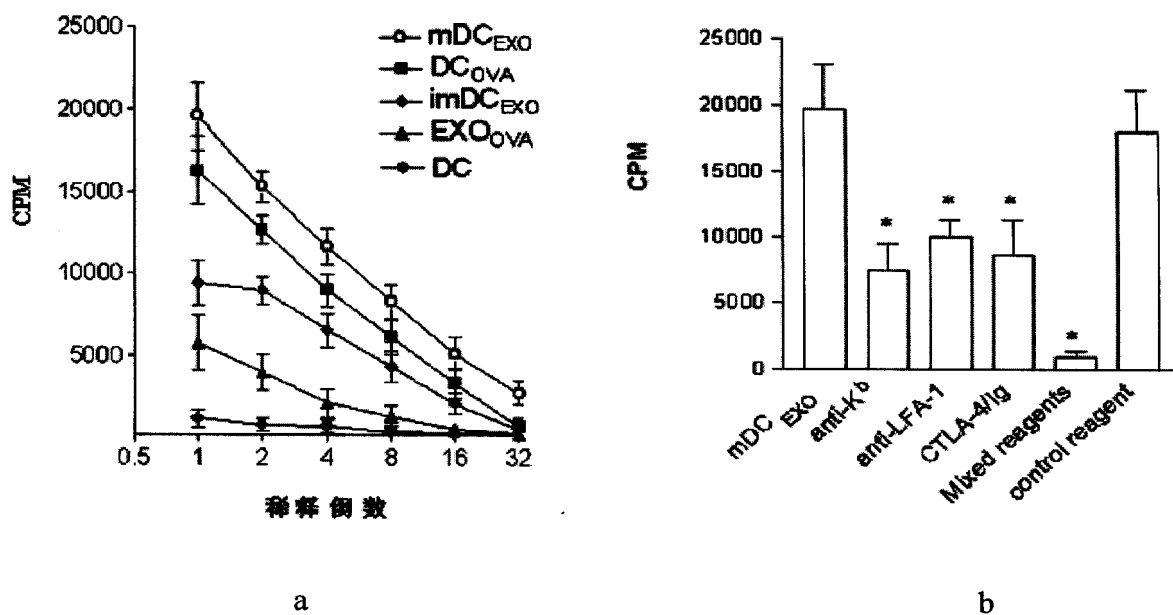


图 3

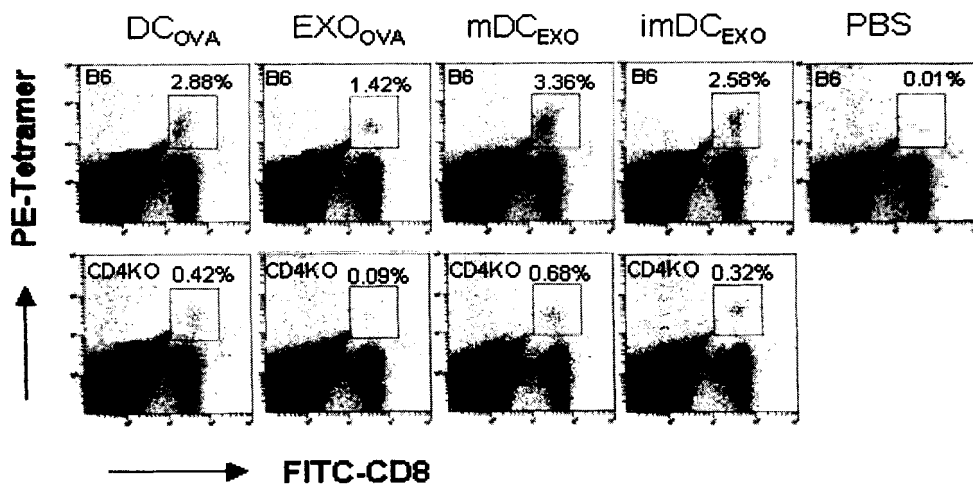


图 4

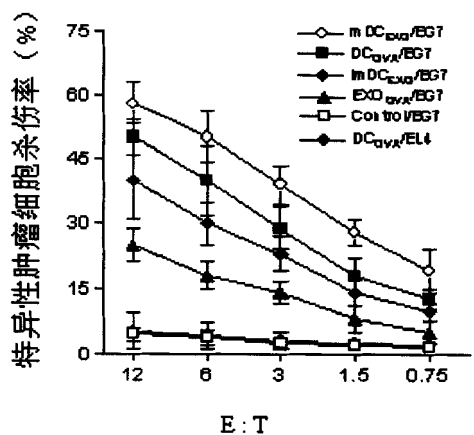


图 5

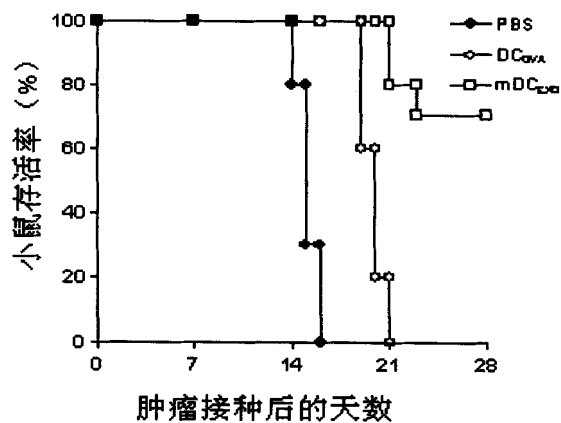


图 6

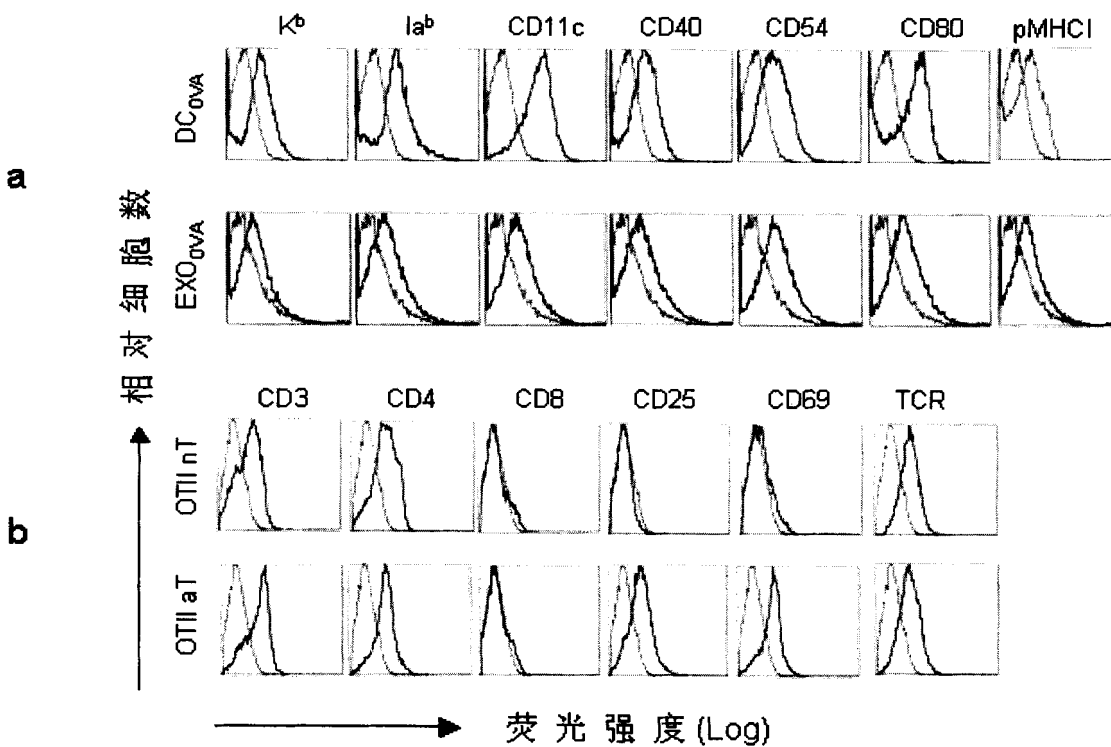


图 7

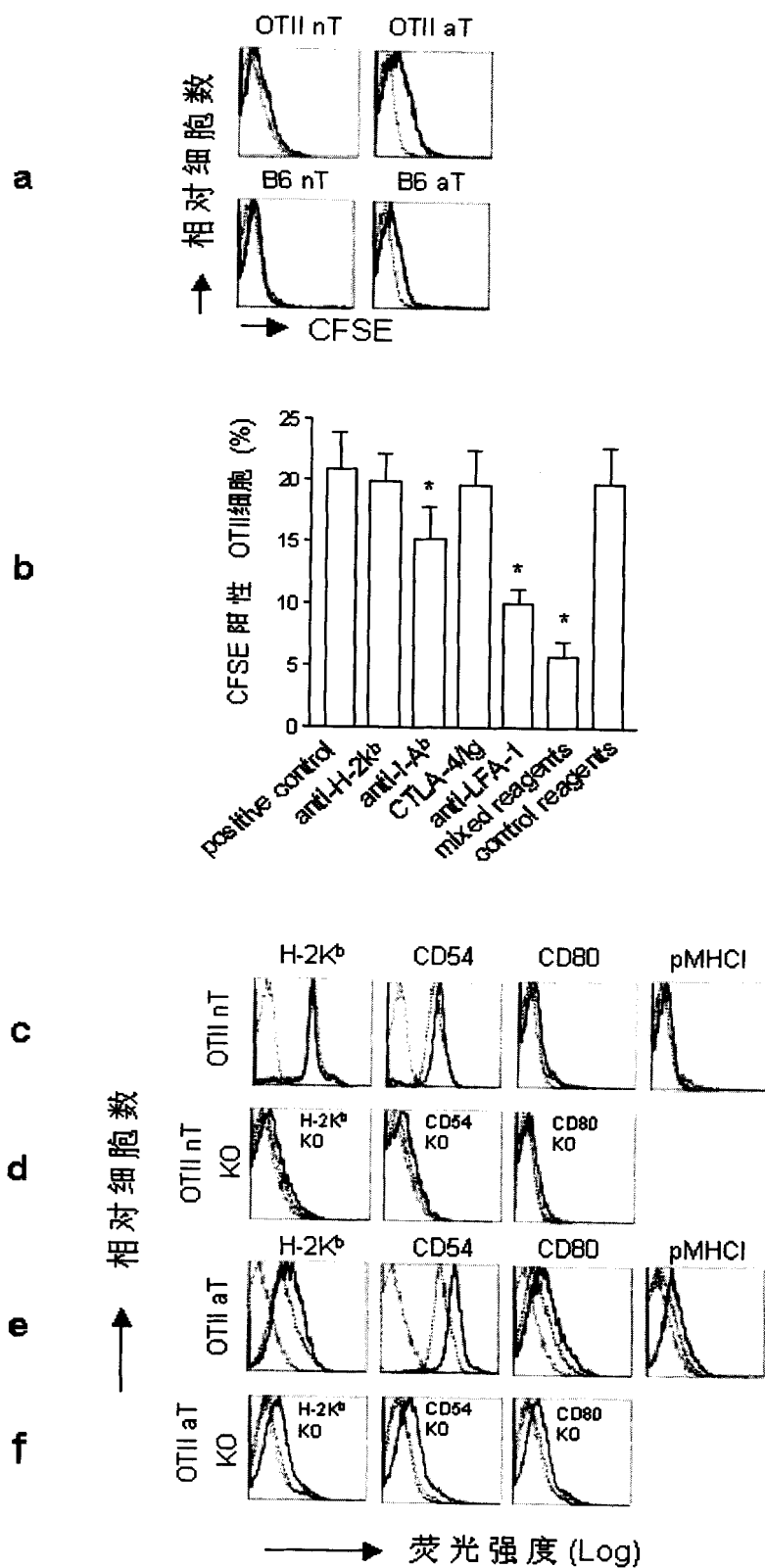


图 8

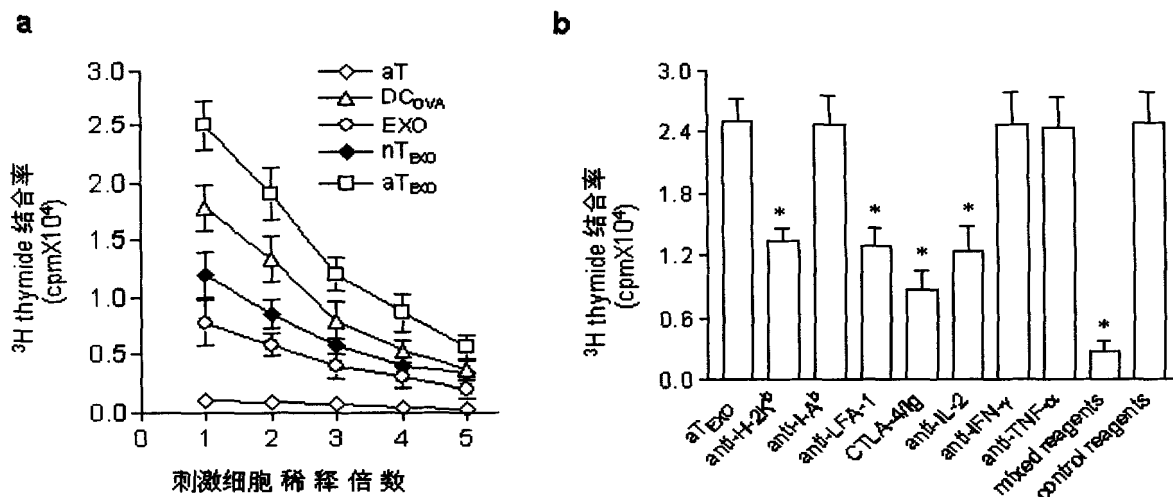


图 9

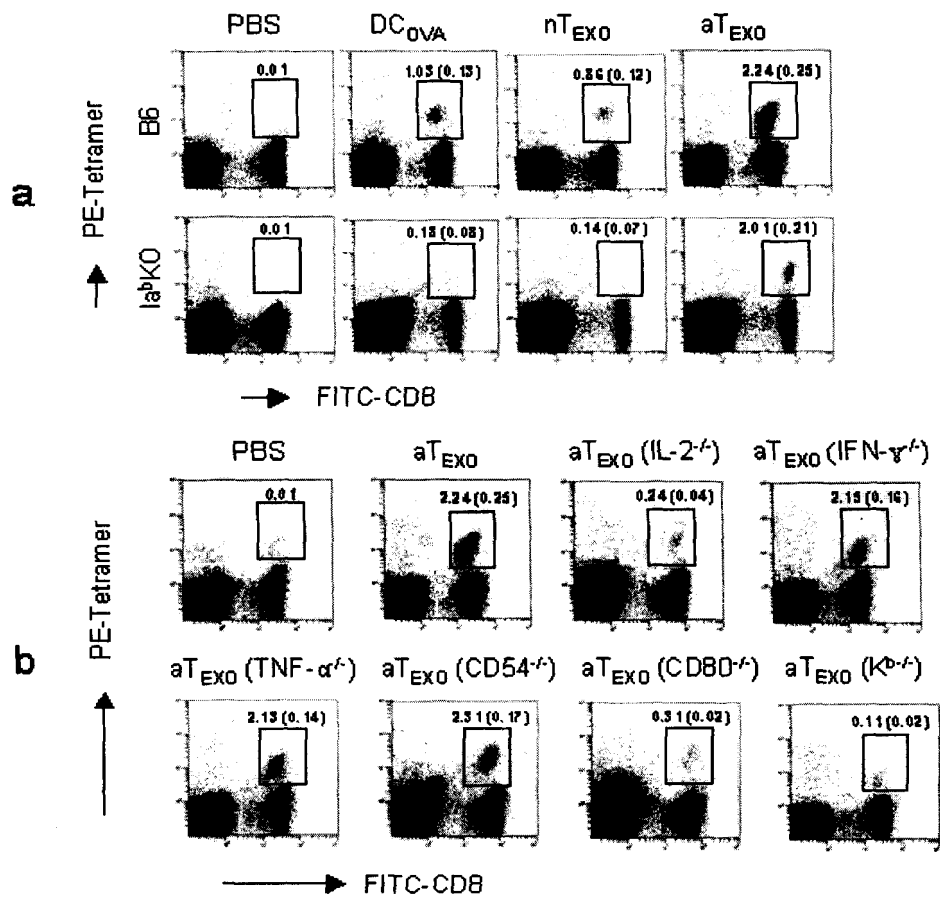


图 10

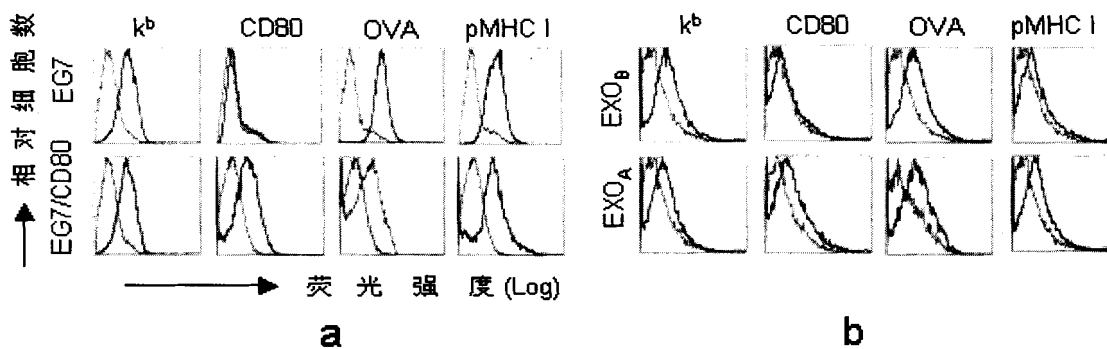


图 11

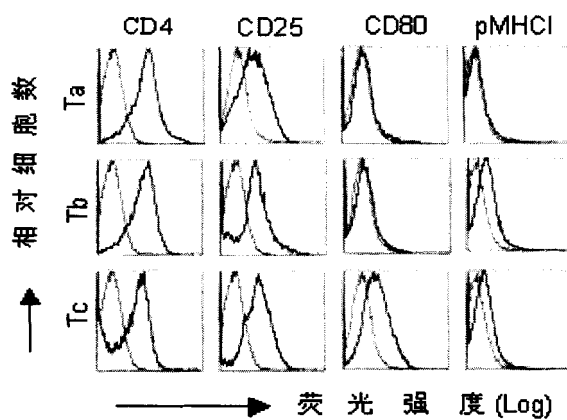


图 12

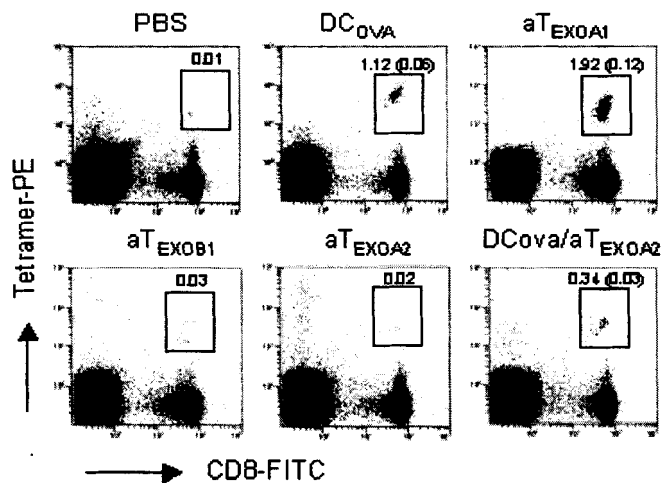


图 13