



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808615.2

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426461A

[22] 申请日 2001.4.11 [21] 申请号 01808615.2

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 27 [33] US [31] 09/561,205

[32] 2001. 2. 9 [33] US [31] 09/780,748

[86] 国际申请 PCT/EP01/04173 2001. 4. 11

[87] 国际公布 WO01/82958 英 2001. 11. 8

[85] 进入国家阶段日期 2002. 10. 25

[71] 申请人 阿诺塞斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 亨利·兰帕斯基 可蒂斯·路格
珍-柏纳德·莱佩克 迪-威·徐
珍奎-尤恩·耀

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

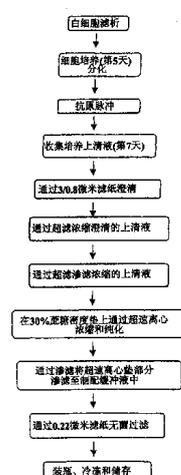
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 10 页 说明书 66 页 附图 33 页

[54] 发明名称 膜囊的生产方法

[57] 摘要

本发明涉及制备用于各种实验、诊断或治疗用途包括免疫治疗处理或肿瘤预防的生物物质的方法。更具体而言，本发明涉及制备由各种类型的哺乳动物细胞释放的膜囊(特别是外来体)的方法，其包括渗滤和/或密度垫离心。本发明亦提供鉴别和分析外来体制品的新型方法，为了药物产品生产的目的，其可用于质量控制的测定中。本发明适用于生产这类膜囊的药物级的制品，并为了用于人类充分鉴别了该制品特征。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 5 1. 一种制备免疫原性膜囊的方法，该方法包括从生物样品中分离或纯化膜囊，并使所述纯化的膜囊与肽或脂质在允许该肽或脂质与在该膜囊表面上的抗原呈递分子结合的条件下接触。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述膜囊分离自包括抗原呈递细胞的生物样品。
- 10 3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述膜囊分离自包括人类树突细胞的生物样品。
- 15 4. 如权利要求 1 所述的方法，其包括在所述膜囊与所述肽或脂质接触之前、期间或之后使该分离或纯化的膜囊暴露在选择的酸性培养基之下。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中在接触之后，使该囊接受密度离心或渗滤以便去除未结合的肽或脂质。
- 20 6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽为第 I 类限制肽。
7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽为第 II 类限制肽。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其中使所述囊与肽的混合物接触。
- 25 9. 如权利要求 8 所述的方法，其中使所述囊与肿瘤细胞的肽洗脱物接触。
- 30 10. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述抗原呈递分子为 CD1 分子，并且所述脂质选自微生物脂质、微生物糖脂和脂质或糖脂肿瘤抗

原。

5 11. 如权利要求 1 所述的方法,为了制备包括外源第 I 类肽与 HLA 第 I 类分子结合的复合体的免疫原性膜囊,该方法包括 (i) 让分离或纯化的膜囊暴露在选择的酸性培养基下, (ii) 使所述分离或纯化的膜囊与第 I 类限制肽在 β 2-微球蛋白的存在下以及在允许该肽与在膜囊表面上的 HLA 第 I 类分子复合的条件下接触,和 (iii) 收集装载的膜囊。

10 12. 如权利要求 11 所述的方法,其中步骤 (i) 包括使分离或纯化的膜囊在 pH 为大约 3 到 5.5 之间的培养基下暴露 15 分钟以内。

15 13. 如权利要求 11 所述的方法,其中步骤 (ii) 包括使分离或纯化的膜囊在 β 2-微球蛋白的存在下与 0.005 至 50 微克/毫升的第 I 类限制肽接触。

20 14. 如权利要求 1 所述的方法,为了制备包括外源第 I 类肽与 HLA 第 I 类分子结合的复合体的免疫原性膜囊,该方法包括 (i) 使分离或纯化的膜囊与第 I 类限制肽在缺乏 β 2-微球蛋白之下接触, (ii) 使 (i) 的混合物在允许该肽与任何与在该囊膜表面上的 HLA 第 I 类分子结合的内源肽交换的条件下,暴露在选择的酸性培养基中, (iii) 中和培养基终止该交换,并使在 (ii) 中形成的复合体稳定,和 (iv) 收集装载的膜囊。

25 15. 如权利要求 14 所述的方法,其中步骤 (ii) 包括使该混合物在 pH 为大约 4 到 5.5 的选择的酸性培养基中暴露 2 小时以内。

30 16. 如权利要求 14 所述的方法,其中步骤 (i) 包括使分离或纯化的膜囊在缺乏 β 2-微球蛋白下与 5 至 500 微克/毫升的第 I 类限制肽接触。

17. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述肽选自肿瘤抗原、病毒抗原、寄生虫抗原和细菌抗原。

5 18. 如权利要求 14 所述的方法，其中该肽选自肿瘤抗原、病毒抗原、寄生虫抗原和细菌抗原。

19. 一种制备装载肽的膜囊的方法，其包括：

- 10 a) 在允许由抗原呈递细胞特别是树突细胞释放膜囊的条件下，培养抗原呈递细胞特别是树突细胞的群，
- b) 膜囊富集或纯化步骤，以及
- c) 使该膜囊与肽在允许该肽与膜囊表面上的 MHC 分子结合的条件下接触，以便产生装载肽的膜囊。

15 20. 一种制备装载肽的膜囊的方法，包括：

- a) 获得不成熟树突细胞的群，
- b) 在允许由不成熟的树突细胞释放膜囊的条件下，培养该不成熟树突细胞的群，
- c) 膜囊富集或纯化步骤，以及
- 20 d) 使该膜囊与肽在允许该肽与膜囊表面上的 MHC 分子结合的条件下接触，以便产生装载肽的膜囊。

21. 如权利要求 19 所述的方法，其中在步骤 c)之前或之后使该膜囊暴露在选择的酸性培养基下。

25

22. 如权利要求 20 所述的方法，其中在步骤 D)之前或之后使该膜囊暴露在选择的酸性培养基下。

23. 一种在受试对象中产生免疫反应的方法，该方法包括 (i) 获得含有树突细胞的生物样品， (ii) 从所述生物样品中分离或纯化膜

30

囊，（iii）使所述纯化的膜囊与肽或脂质在允许该肽或脂质与在膜囊表面上的 MHC 或 CD1 分子结合的条件下接触，和（iv）将（iii）的膜囊施用给受试对象，以便在所述受试对象中产生免疫反应。

5 24. 如权利要求 23 所述的方法，其中在步骤（i）中，该含有树突细胞的生物样品获自待处理的受试对象。

 25. 如权利要求 23 所述的方法，其中在步骤（iii）之前或之后使该膜囊接受弱酸处理。

10

 26. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述肽为第 I 类限制肽。

 27. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述抗原呈递分子为 CD1 分子，而所述脂质选自微生物脂质、微生物糖脂和脂质或糖脂肿瘤抗原。

15

 28. 一种药物组合物，其包括免疫原性膜囊和可药用的稀释剂或载体，其中通过从含有抗原呈递细胞的生物样品中分离膜囊并利用免疫原性肽或脂质装载所述分离的膜囊，而获得该免疫原性膜囊。

20

 29. 如权利要求 28 所述的药物组合物，其中通过从含有抗原呈递细胞的生物样品中分离膜囊，利用免疫原性肽或脂质装载所述分离的膜囊，并且由密度离心或渗滤去除未结合的肽或脂质，而获得该免疫原性膜囊。

25

 30. 如权利要求 28 所述的药物组合物，其中通过从含有树突细胞的生物样品中分离膜囊，而获得该免疫原性膜囊。

 31. 如权利要求 30 所述的药物组合物，其中所述免疫原性肽为第 I 类限制肽。

30

32. 如权利要求 28 所述的药物组合物，其中利用所述肽装载至少 15% 优选至少 40% 在该囊表面上的 HLA 分子。

5 33. 一种制备包括免疫原性膜囊和可药用稀释剂或载体的药物产品的方法，其中该方法包括 (i) 从生物样品中分离膜囊，(ii) 利用免疫原性肽或脂质装载所述分离的膜囊，以产生免疫原性膜囊，(iii) 优选去除未结合的免疫原性肽或脂质，和 (iv) 使该免疫原性膜囊与可药用稀释剂或载体接触。

10

34. 一种人生物样品中制备膜囊的方法，其包括采用密度垫离心处理所述生物样品。

15

35. 如权利要求 34 所述的方法，其进一步包括在该密度垫离心之前和/或之后渗滤该生物样品。

36. 如权利要求 34 或 35 所述的方法，其中所述生物样品是生物流体、培养物上清液、细胞的溶胞产物或纯化前溶液。

20

37. 如权利要求 36 所述的方法，其中处理所述生物样品使其富含膜囊。

38. 一种从生物样品中制备膜囊的方法，其包括：

25

- a. 在允许释放该囊的条件下，培养产生膜囊的细胞群，
- b. 膜囊的富集步骤，和
- c. 通过在密度垫上离心处理所述富集的生物样品。

39. 如权利要求 37 或 38 所述的方法，其中所述富集步骤包括澄清。

30

40. 如权利要求 37 或 38 所述的方法，其中所述富集步骤包括超滤浓缩。

5 41. 如权利要求 37 或 38 所述的方法，其中所述富集步骤包括澄清和超滤浓缩。

42. 如权利要求 37 或 38 所述的方法，其中所述富集步骤包括通过超滤的渗滤。

10 43. 如权利要求 38 所述的方法，其进一步包括无菌过滤来自步骤 c 的制品。

44. 如权利要求 38 所述的方法，其中在具有降低的颗粒体含量的培养基中培养所述细胞。

15

45. 如权利要求 38 所述的方法，其中所述产生膜囊的细胞为抗原呈递细胞或肿瘤细胞。

20

46. 如权利要求 44 所述的方法，其中使所述抗原呈递细胞对一种或数种抗原致敏。

47. 如权利要求 44 或 45 所述的方法，其中所述抗原呈递细胞包括树突细胞，优选不成熟的树突细胞。

25

48. 一种制备膜囊的方法，其包括：

a. 在允许由抗原呈递细胞释放膜囊的条件下，培养抗原呈递细胞的群，

b. 膜囊的富集步骤，以及

c. 使用密度垫离心分离该膜囊。

30

49. 一种制备膜囊的方法，其包括：
- a. 获得不成熟树突细胞的群，
 - b. 在允许由不成熟的树突细胞释放膜囊的条件下，培养该不成熟的树突细胞群，
 - 5 c. 膜囊的富集步骤，以及
 - d. 使用密度垫离心分离该膜囊。
50. 一种制备膜囊的方法，其包括：
- a. 获得抗原呈递细胞的群，
 - 10 b. 视需要，使该抗原呈递细胞对一种或数种抗原致敏，
 - c. 在允许由抗原呈递细胞释放膜囊的条件下，培养该抗原呈递细胞的群，
 - d. 澄清培养物上清液，
 - e. 浓缩澄清的上清液，
 - 15 f. 渗滤浓缩的上清液，
 - g. 使用密度垫离心分离该膜囊，
 - h. 视需要使该膜囊与肽接触，以产生装载肽的膜囊，以及
 - i. 无菌过滤在 g 中获得的膜囊。
- 20 51. 一种产生树突细胞的方法，其包括在包含生长因子和/或细胞因子的培养基中培养树突细胞前体，从而影响或刺激所述前体分化成树突细胞，其中该培养基具有降低的颗粒体含量。
- 25 52. 如权利要求 51 所述的方法，其中所述培养基基本上不含凝集的结合珠蛋白。
53. 一种组合物，其包括在具有降低的颗粒体含量的培养基中的树突细胞。
- 30 54. 一种组合物，其包括在培养基中的树突细胞，其中所述培养

基基本上不含凝集的结合珠蛋白。

55. 一种组合物，其包括 (i) 膜囊，(ii) 缓冲剂和 (iii) 冷冻保护剂或稳定化合物。

5

56. 如权利要求 55 所述的方法，其进一步包括 (iv) 盐类和/或填充剂和/或抗氧化剂和/或维生素。

10 57. 一种鉴别膜囊特征的方法，其包括使所述膜囊平行地与两种或多种对膜囊标记特异的抗体接触，并确定抗原-抗体免疫复合体的形成。

58. 如权利要求 57 所述的方法，其中将所述膜囊装载于固相支持物上，如小珠。

15

59. 如权利要求 57 或 58 所述的方法，其中使用两种或多种下列抗体：抗 CD11c、抗 CD11b、抗 HLAabc、抗 CD81、抗 CD63、抗 CD58、抗 CD1a、抗 CD1b、抗 CD9、抗 CD86、抗 CD82、抗 CD83 和抗乳粘附素。

20

60. 一种鉴别膜囊制品活性特征的方法，其包括使超-抗原-装载的膜囊在辅助细胞的存在下与 T 细胞接触，并确定该 T 细胞的活化。

61. 如权利要求 60 所述的方法，其中利用超抗原装载该膜囊。

25

62. 如权利要求 60 所述的方法，其中从以超抗原装载的生产细胞中产生该膜囊。

30 63. 一种对样品中膜囊确定剂量的方法，其包括 (i) 将样品装载于固相支持物上，使该支持物与抗第 II 类抗体接触，并确定抗体-抗

原免疫复合体的存在。

64. 一种哺乳动物细胞培养基，其中所述培养基基本上不含结合珠蛋白凝集物。

5

65. 一种热灭活的哺乳动物细胞培养基，其中所述培养基含有低于大约 10 纳克/毫升的结合珠蛋白凝集物。

10

66. 一种组合物，其包括生物多肽或其衍生物，其中所述组合物基本上丧失了结合珠蛋白凝集物。

67. 一种组合物，其包括热灭活的生物多肽或其衍生物，其中所述组合物基本上丧失了结合珠蛋白凝集物。

15

68. 如权利要求 66 或 67 所述的组合物，其中所述生物多肽是分离自哺乳动物生物流体的多肽、蛋白质或肽。

69. 如权利要求 68 所述的组合物，其中所述生物多肽选自血清白蛋白、 γ 免疫球蛋白和凝固因子。

20

70. 如权利要求 66 至 69 中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含低于大约 0.01%，特别是低于大约 0.001%的结合珠蛋白凝集物。

25

71. 一种热灭活的人类血清白蛋白的组合物，其中所述组合物基本上不含凝集的结合珠蛋白。

72. 一种热灭活的人类血清白蛋白的组合物，其中所述组合物包括按重量计低于大约 0.001%凝集的结合珠蛋白。

30

73. 一种处理生物产品降低其中所含的结合珠蛋白凝集物的含量

的方法，优选的是热灭活的生物产品，该方法包括使该产物接受过滤，更优选的是超滤。

5 74. 一种制备生物产品的方法，其包括 (i) 生物产品的热灭活，和 (ii) 热灭活的生物产品的过滤。

75. 如权利要求 74 所述的方法，其进一步包括 (iii) 浓缩经过过滤的热灭活的生物产品，和/或 (iv) 其调整。

10 76. 如权利要求 74 或 75 所述的方法，其中所述过滤步骤优选包括超滤，更优选的是在多孔的装置上，该装置的平均孔径在大约 100 kDa 到大约 1000 kDa 之间，通常是在 200 kDa 到 750 kDa 之间。

15 77. 一种处理人类血清白蛋白制品降低其中所含有的颗粒体的方法，其包括使该制品在热灭活之后接受超滤。

78. 一种制备血浆蛋白质制品的方法，其包括使该制品在热灭活之后接受超滤。

20 79. 一种包括膜囊的组合物，其中所述组合物基本上不含结合珠蛋白凝集物。

膜囊的生产方法

5 发明领域

本发明涉及制备用于各种实验、诊断或治疗用途，包括免疫治疗处理或肿瘤预防的生物物质的方法。更具体而言，本发明涉及制备由各种类型的哺乳动物细胞释放的膜囊（特别是外来体）的方法，包括渗滤和/或密度垫离心。本发明亦提供鉴别外来体制品特征和分析它的新型方法，其可为了药物生产的目的，用于质量控制的测定中，以及提供将免疫原性化合物装载于膜囊内的方法。本发明适用于生产这类膜囊的药物级的制品，并为了用于人类上，充分鉴别该制品特征。

发明背景

15 膜囊本质上是球状的囊，通常直径小于 130 纳米，由含有胞质部分的脂双层所组成。特殊的膜囊通过与细胞的原生质膜融合更独特地由细胞从胞内区室产生，导致它们在生物流体或在培养细胞的上清液中释放。这类膜囊通常被称为外来体。外来体较特别的是直径在大约 30 到大约 120 纳米之间，优选在 50 至 90 纳米，更优选的是在大约 60 到 80 纳米之间，并且有利的是其携带膜蛋白（特别是主要组织相容性复合体蛋白质或其他直接或间接参与抗原呈递的蛋白质）。此外，依据其来源，外来体包括诸如 MHC I、MHC II、CD63、CD81 和/或 HSP70 的膜蛋白，且没有内质网或高尔基体。此外，外来体基本上不含核酸（例如 DNA 或 RNA）。

25

在种种不同的生理环境中，已经证实从不同的细胞类型中释放外来体。特别是已经证实 B 淋巴细胞释放带有第 II 类主要组织相容性复合体分子的外来体，其在抗原呈递上扮演某种角色（Raposo 等，J. Exp. MeD. 183(1996) 1161）。同样，亦已经证实树突细胞产生外来体（即帝萨体(Dexosomes), Dex），具有独特的结构和功能特征，并在免疫

30

反应的介导上扮演某种角色，特别是在胞毒性 T 淋巴细胞的刺激上（Zitvogel 等，Nature Medicine 4(1998) 594）。亦已经证实肿瘤细胞以调节方式分泌特定的外来体（即特赛体(texosomes), Tex），其带有肿瘤抗原，并能够呈递这些抗原，或将其转送给呈递抗原细胞（专利申请第 WO99/03499 号）。亦知道肥大细胞在胞内囊状区室中积累分子，其可在信号的影响下进行分泌（Smith 和 Weis, Immunology ToDay 17(1996) 60）。因此，原则上细胞似乎通过其释放的膜囊发出信号并彼此联络，该膜囊可携带抗原性蛋白质（或多肽或肽）、MHC 分子或任何其他信号（细胞因子、生长因子等），具有独特的结构和功能特征，在不同生理状态下产生。因此这些囊，尤其是外来体，代表特别的目的产物用于诊断、接种疫苗或治疗应用，或用来递送目的分子。因此，对于可用来以工业规模制备适宜生物用途特别是药物用途的膜囊的有效方法，亦将特别感兴趣。

传统上制备膜囊（例如外来体）的方法涉及一系列不同的离心步骤，以便从出现在培养基中的细胞或细胞碎屑中分离囊。关于这一点，上文提及的文件基本上描述利用一系列 300g、10,000g 和 70,000g 或 100,000g 的离心作用来制备囊，将在离心管底部所得的沉淀以其原始体积的千分之一再悬浮盐溶液中，从而组成浓缩的外来体溶液。然而，因为许多理由使这些方法基本上不适用于临床应用：1)时间的长度，2)在 GMP 环境中的放大和有效性，3)被细胞碎屑污染的显著风险，4)因为操作者的变化再现性差，5)起因于形成沉淀时的外来体聚集（在沉淀中局部有高外来体浓度），以及 6)在最后加工结束时的低回收。因此，需要制备膜囊的改良方法，其适合工业限制并允许生产具有治疗品质的囊制品。

国际申请第 PCT/FR00/00105 号公开了通过层析技术制备膜囊的方法，如阴离子析法和/或凝胶渗透层析法。

30 发明概述

本发明现在提供以高产量、高纯度和相对较短的时间来制备膜囊的新型方法。本发明亦公开鉴别膜囊制品特征（分析或确定剂量）的方法，其可用于药物生产中以确定囊的活性、表型和/或量。本发明现在允许生产并鉴别很多在临床上可接受的膜囊的特征，具有再现性、
5 不同操作者的有限变化和增加产物质量。本发明进一步涉及从各种培养基或组合物中去除诸如结合珠蛋白的颗粒体（particulate body）的方法、所得组合物和培养基及其用途。本发明亦涉及将免疫原性化合物装入膜囊中的新型方法及其用途。

10 更具体而言，本发明一方面在于使用密度垫离心来制备膜囊的方法。

本发明另一方面在于使用一系列超滤步骤和/或澄清步骤来制备膜囊的方法，更具体而言，是通过超滤的浓缩和渗滤组合，优选先澄清。
15

本发明另一方面在于使用密度垫离心和超滤和/或澄清步骤来制备膜囊的方法，更具体而言，是通过超滤的浓缩和渗滤组合，优选先澄清，接着再是密度垫离心。

20

在特殊方面，本发明方法包括在渗滤之前或之后的密度垫离心。

本发明的方法可应用于各种含有膜囊的生物样品，包括生物流体、培养物上清液、细胞裂解液或纯化前的溶液。在特定的具体实施方案中，使用该方法从富含膜囊的生物样品中制备膜囊（例如纯化、
25 分开或分离）。

本发明的特殊方面在于从生物样品中制备膜囊的方法，包括：

- 30 a. 在允许释放囊的条件下，培养生产膜囊的细胞群，
- b. 膜囊富集步骤，和

c. 通过密度垫离心处理该富集的生物样品。

5 在进一步优选的具体实施方案中，在降低颗粒体含量的培养基中，优选是丧失了结合珠蛋白凝集物的培养基，培养生产膜囊的细胞。在本申请中，将证实使用这类培养基允许增加产量和/或达到较高的纯度和质量水平。

富集步骤可包括一个或多个离心、澄清、超滤、纳米过滤（nanofiltration）、亲和层析和/或渗滤步骤。

10

从步骤 c)中通过任何适当的方法包括吸移或利用针头可收集外来体的制品。

15 在优选的具体实施方案中，该方法尚包括得自步骤 c 的制品的灭菌过滤 d)步骤。

20 可使用本发明来制备来自各种来源的膜囊，包括由抗原呈递细胞（如巨噬细胞、树突细胞、B 淋巴细胞）、肿瘤细胞或产生囊的任何其他细胞或细胞系所生产的膜囊，优选是转导抗原的膜囊。特别适合制备由树突细胞产生的膜囊，优选是不成熟的树突细胞（即帝萨体）。此外，在制备之前、期间或之后，膜囊或相对应的生产细胞可被一种或多种抗原致敏。

本发明更优选的具体实施方案包括：

25

• 制备膜囊的方法，包括：

b. 在允许由抗原呈递细胞特别是树突细胞释放膜囊的条件下，培养该抗原呈递细胞群，特别是树突细胞，

c. 膜囊富集步骤，和

d. 使用密度垫离心分离膜囊。

30

• 制备膜囊的方法，包括：

- a. 获得不成熟的树突细胞群，
- b. 在允许由不成熟的树突细胞释放膜囊的条件下，培养该不成熟的树突细胞群，
- c. 膜囊富集步骤，并
- d. 使用密度垫离心分离膜囊。

5

如上所述，可在该方法中引入以一种或多种特定抗原致敏囊（或产生细胞）的额外步骤，可在步骤 b)之前致敏产生细胞，或在步骤 b)之后直接致敏膜囊。

10

关于这一点，本发明公开直接装载外来体的程序，特别是在从抗原呈递细胞培养物中预制备和纯化的外来体上直接将免疫原性化合物（如肽或脂）掺入到 MHC 复合体内。根据本发明的方法，对于在从不成熟的树突细胞培养物中预先纯化的帝萨体上直接将肽装入到 MHC（第 I 类）复合体内，是特别有利的。

15

如上所述，将与第 I 或第 II 类 HLA 结合的肽装入衍生自树突细胞的外来体（帝萨体）内，到目前为止通过间接装载已经接近，即在产生囊的细胞的培养物中（例如在 GM-CSF 和 IL-4 存在下，从富含单核细胞的粘着细胞中分化出的树突细胞(DC)），加入治疗性(抗原性)肽（例如第 I 类限制的肿瘤肽）（例如在第 6 天，以 10 微克/毫升）（参见例如美国专利第 5,846,827 号及其引用的参考文献）。假定 DC 吸收外源肽，并由此产生在外来体表面上藏匿有这些第 I 类肽的帝萨体。利用鼠科动物 P1A 肥大细胞瘤肿瘤模型的体内实验显示以此方式产生的帝萨体诱发抗-肿瘤的免疫学反应，其导致肿瘤退化。将 Mart-1 肽间接装入帝萨体内，亦可刺激从 Mart-1 特异的 CTL 纯种系 LT11 中 IFN- γ 的少量分泌，这暗示确实发生了某种程度的肽装载。然而，即使使用一种与放射线检测灵敏度相似的生化方法时间分辨荧光分析（fluorometry）（TRF），仍不易检测到这些帝萨体上的第 I 类肽的结合。

30

5 为了改善方法的效率和工业上实施，发明人目前已惊人地发现有可能直接进行装载步骤，其中在从 DC 培养物中纯化出帝萨体之后，再将肽加至其上，以代替将肽加至 DC 培养物中的步骤。特别是发明人目前已经发现，可开发并限定选择的酸性培养基或缓冲液，以便保护膜囊并允许将免疫原性化合物在该膜囊的表面处直接装入抗原呈递分子，特别是 MHC 分子，如第 I 类、第 II 类或 CD1 分子。

10 因此，本发明的特定目的亦在于制备免疫原性膜囊的方法，所述方法包括从生物样品中分离或纯化膜囊，并使所述分离或纯化的膜囊在允许免疫原性化合物与抗原呈递分子（例如，对肽而言为 MHC 第 I 类或第 II 类，对脂质抗原而言为 CD1）结合的条件下，在所述膜囊的表面上与免疫原性化合物（例如肽或脂质）接触。

15 在优选的具体实施方案中，该方法包括在使该膜囊与免疫原性化合物接触之前、期间或之后使分离或纯化的膜囊暴露在选择的酸性培养基下进行处理步骤，以便能够或促进其装载。关于这一点，按照在本申请中的公开，使用选择的酸性培养基或处理允许至少部分地去除结合在该囊表面上的内源肽或脂质，和/或有助于免疫原性化合物的交换。

20 在更优选的具体实施方案中，在该囊与免疫原性化合物接触之后接受离心或渗滤，优选是密度离心，以便去除未结合的免疫原性化合物。

25 免疫原性化合物可以是例如任何肽或脂质，其存在于与抗原呈递分子相连的免疫系统中。肽可以是第 I 类限制肽、第 II 类限制肽，单独或带有其他肽的混合物或组合，或甚至是肿瘤细胞的肽洗脱物。本发明特别适合装载有第 I 类限制肽。脂质可以是微生物脂质、微生物糖脂，或脂质或糖脂的肿瘤抗原，采用分离形式或各种组合或混合物

30

形式。

直接装载方法提供胜过现有技术的显著优点。具体而言，如实施例中所说的，直接肽装载比现有的间接装载更有效，使用较少量的肽便可获得表面 HLA 受体的较高占有率。这明显增加了膜囊的免疫原性潜力。此外，可更精确地控制被装载肽的结构，因为被装载的肽并未由完整细胞加工处理过，因此在装载时仍维持完整且未被修改。本发明现在首次显示使用纯化膜囊如帝萨体可进行直接的肽装载。关于这一点，本发明显示将膜囊放在低 pH 的条件下，不会丧失其活性和功能性。本发明亦描述允许改善直接装载的特殊条件。本发明特别显示用于间接装载（即整个细胞装载）的传统缓冲液培养基可被不同缓冲液培养基有利地取代以便增加直接装载效率并获得较高占有率，这说明囊的行为并不像整个细胞一样。

在优选的具体实施方案中，本发明针对制备包括与 HLA 第 I 类分子结合的外源第 I 类肽的免疫原性膜囊的方法，该方法包括 (i) 使分离或纯化的膜囊暴露在选择的酸性培养基下，(ii) 使所述分离或纯化的膜囊与第 I 类限制肽在允许该肽与在所述膜囊表面上的 HLA 第 I 类分子复合的条件下接触，和 (iii) 收集被装载的膜囊。术语“外源的”一词意指被加至组合物中的肽。

在特定的变体中，该方法包括下列步骤：(i) 使分离或纯化的膜囊暴露在选择的酸性培养基下，(ii) 使所述分离或纯化的膜囊与第 I 类限制肽，在 β 2-微球蛋白的存在下，在允许该肽与在所述膜囊表面上的 HLA 第 I 类分子复合的条件下接触，和 (iii) 收集被装载的膜囊。更优选的是，步骤 (i) 包括使分离或纯化的膜囊暴露在 pH 大约 3 到 5.5 之间的酸性培养基下，更优选的是在大约 3.2 到 4.2 之间，历时少于 5 分钟。因为允许有效率的装载，即使是在仅使用很少量的免疫原性化合物情况下，在 β 2-微球蛋白存在下进行直接装载的步骤是有利的。确实，在使用 β 2-微球蛋白时，发明人已经显示有可能使用限定

的酸性培养基，其基本上从膜囊中去除所有内源肽，并因此有利于功能性 MHC 复合体的复溶，即使是利用低水平的免疫原性化合物（例如从 0.005 至 50 微克/毫升）。因此，这个步骤特别适合肿瘤洗脱物、脂质、天然抗原或其他不能以高产经济（例如通过合成）产生的免疫原性化合物的直接装置。

在可获得较高量的免疫原性化合物的情况下，发明人已经限定第二个共同直接装载的步骤，其中不需要 β 2-微球蛋白。该具体实施方案是有利的，因为需要较少的处理（而得以不改变外来体），且不需要外源 β 2-m，这可降低该方法的成本和加入外源物质的潜在缺陷。在这方面，在另一个特定的变体中，该方法包括下列步骤：（i）使分离或纯化的膜囊在缺乏 β 2-微球蛋白下与第 I 类限制的免疫原性化合物（如肽或脂质）接触，（ii）使（i）的混合物在允许该免疫原性化合物与任何内源化合物交换的条件下，暴露在选择的酸性培养基下或进行处理，所述内源化合物与在该膜囊表面上的 HLA 第 I 类分子结合。（iii）中和该培养基，终止交换和/或使在（ii）中形成的复合体稳定，和（iv）收集被装载的膜囊。更优选的是，步骤（ii）包括使混合物暴露在 pH 大约 4 到 5.5 之间的酸性培养基中一段时间，足以在任何内源分子和免疫原性化合物之间产生交换用于结合 MHC 复合体。确实，发明人现在已经显示，与整个细胞形成对照，膜囊可抵抗延长暴露在酸性培养基或条件下，因此允许通过任何所需的免疫原性化合物来置换内源分子，而不改变或使 MHC 分子失去稳定性，且基本上不会降解或去除内源 β 2-m。发明人亦已经限定特定的酸性培养基和条件，允许进行该交换作用，而不改变膜囊的功能性。这些选择的培养基最特别的特征在于 pH 在大约 4 至 5.5 之间，更优选在 4.2 到 5.2 之间。将膜囊优选与上文选择的酸性培养基接触 15 分钟以上的时间，但通常 2 小时以下，更优选 1 小时以下。根据此变体，该方法不包括使用 β 2-微球蛋白，通过所需肽与内源肽之间的交换而发生装载，不释放内源 β 2-m。在不含 β 2-微球蛋白的具体实施方案中，分离或纯化的膜囊通常是与过量的外源免疫原性化合物，例如 5 至 500 微克/毫升的第 I 类限制肽或

脂质，在缺乏 β 2-微球蛋白下接触。该具体实施方案特别适合可大量获得的免疫原性化合物的装载，如通过合成产生的肽。

5 如上所述，可使用各种免疫原性分子来实施该方法。肽优选是由第 I 类或第 II 类分子提供的肽，即起因于由抗原呈递细胞如树突细胞、巨噬细胞和 B 淋巴细胞加工处理抗原而产生的肽。优选类型的肽的代表是第 I 类限制肽，更优选的是第 I 类限制的肿瘤肽，也就是衍生自肿瘤抗原的肽，其由树突细胞或巨噬细胞提供给免疫系统。特定的肽包括例如 HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A24、HLA-B35 或其他
10 单元型限制的肿瘤肽，得自各种肿瘤细胞或抗原，如 Mage、Bage、Mart、CEA、PSA 等。当然可使用分离的肽或其混合物实施该方法，如肿瘤细胞的肽洗脱物或其他肽组合。亦可根据本发明装载衍生自其他病原体（病毒、细胞、寄生虫等）的抗原肽，而得以产生适合用来治疗各种疾病状况的免疫原性膜囊，例如癌症、感染或免疫疾病。

15

脂质可以是任何在抗原呈递细胞表面上由 CD1 分子提供给免疫系统的脂质、糖脂或脂蛋白。CD1 分子是类似 MHC 的分子，负责将脂质或糖脂抗原呈递给 T 细胞。已经描述了 CD1 的数种同型物，包括 CD1a、CD1b、CD1c、CD1d 和 CD1e，其涉及提供脂质抗原。在
20 特定的具体实施方案中，使用该方法将脂质抗原装载到膜囊表面上的 CD1 分子处，特别是装载到 CD1b 和 CD1d 处。脂质可以是任何微生物脂质、微生物糖脂、脂质或糖脂肿瘤抗原等。脂质的更优选例子包括分枝杆菌脂质，如分枝菌酸、葡萄糖单分枝菌酸酯、己糖-1-磷酸类异戊二烯和脂阿拉伯甘露聚糖（lipoarabinomannan）（LAM）的衍生物，如磷脂酰肌醇甘露糖苷。其他例子包括神经酰胺本身，如神经节
25 苷脂、糖脂肿瘤抗原等。

本发明的特定具体实施方案包括：

-制备免疫原性膜囊的方法，包括：

30 b) 在允许由抗原呈递细胞特别是树突细胞释放膜囊的条件下，

培养该抗原呈递细胞群特别是树突细胞，

c) 膜囊富集或纯化步骤，和

d) 使该膜囊与免疫原性化合物在允许该免疫原性化合物与在膜囊表面上的 MHC 分子结合的条件下接触，以产生免疫原性膜囊。

5

-制备免疫原性膜囊的方法，包括：

a. 获得不成熟的树突细胞群，

b. 在允许由该不成熟的树突细胞释放膜囊的条件下，培养不成熟的树突细胞群，

10

c. 膜囊富集或纯化步骤，和

d. 使该膜囊与免疫原性化合物在允许该免疫原性化合物与在膜囊表面上的 MHC 分子结合的条件下接触，以产生免疫原性膜囊。

-制备免疫原性膜囊的方法，包括：

15

a. 获得不成熟的树突细胞群，

b. 在允许由该不成熟的树突细胞释放膜囊的条件下，培养不成熟的树突细胞群，

c. 膜囊富集或纯化步骤，和

20

d. 使该膜囊与脂质抗原在允许该脂质抗原与在膜囊表面上的 CD1 分子结合的条件下接触，以产生免疫原性膜囊。

如上所述，优选进行富集或纯化以及直接装载。

本发明的特定具体实施方案在于制备膜囊的方法，包括：

25

a. 获得抗原呈递细胞群，更优选的是不成熟的树突细胞，

b. 视需要用一种或多种抗原致敏该抗原呈递细胞，更优选的是不成熟的树突细胞，

c. 在允许由该抗原呈递细胞释放膜囊的条件下，更优选的是不成熟的树突细胞，培养抗原呈递细胞群，更优选不成熟的树突细胞，

30

d. 培养物上清液的澄清，

- e. 经过澄清的上清液的浓缩,
- f. 经过浓缩的上清液的渗滤,
- g. 使用密度垫离心, 分离膜囊,
- h. 视需要使该膜囊与肽接触, 以产生装载肽的膜囊, 和
- 5 i. 减菌过滤在步骤 g 中获得的膜囊。

减菌过滤步骤 i) 之前可以有缓冲液交换步骤, 例如通过渗滤。
图 1 描述典型的方法计划。在上文方法中, 可进行步骤 b) 或步骤 h) 。

10 此外, 本发明亦提供从各种培养基或组合物中去除颗粒体的方法。更具体而言, 本发明证实传统的培养基含有颗粒体, 如结合珠蛋白和相关聚合物(例如结合珠蛋白凝集物), 并公开去除相同物的方法。更广泛而言, 该方法允许生产培养基或任何其他生物产品, 如血液蛋白质或多肽(或其衍生物)、制配溶液、胎牛血清等, 其基本上
15 丧失了结合珠蛋白凝集物。

结合珠蛋白凝集物可显示出免疫抑制活性, 并因此影响膜囊或其他生物产品的生物特性、安全性和纯度, 在下文中进一步证明。然而, 在本领域中并未提出颗粒体的问题, 也未确定它们出现在各种生物产
20 品中, 而且未获得有效去除它们的方法。现在, 本发明提供制备高质量的生物产品的有效方法, 所得产物亦代表本发明的目的。

关于这一点, 本发明通常在于包括基本上不含颗粒体的哺乳动物细胞培养基的组合物, 更优选的是不含结合珠蛋白凝集物。

25

本发明亦在于丧失了结合珠蛋白凝集物的细胞培养基。

本发明更在于在具有降低颗粒体含量的培养基中包括抗原呈递细胞(或任何其他生产膜囊的细胞, 特别是树突细胞)的物质的组合物, 更具体而言, 其基本上不含结合珠蛋白凝集物。更优选的是, 该培养
30

基是经过处理去除颗粒或凝集化合物的培养基，更具体而言，是通过超滤处理的培养基。

5 本发明另一方面在于使用具有降低颗粒体含量的培养物或生产培养基来生产或培养抗原呈递细胞（或任何生产膜囊的细胞）特别是树突细胞的方法。更优选的是，该培养基是基本上不含结合珠蛋白凝集物的培养基，更具体而言，是通过超滤处理的培养基。

10 本发明亦适用于血液产品的组合物的生产，所述血液产品基本上不含凝集的结合珠蛋白，并在将药物用途的产品制配之前，先以各种缓冲液处理。

15 关于这一点，本发明亦涉及包括血液多肽或其衍生物的组合物，其基本上丧失了结合珠蛋白凝集物。更具体而言，本发明在于包括热灭活的血液产品的组合物，其基本上丧失了结合珠蛋白凝集物。更优选的是，本发明涉及（热灭活的）血清-白蛋白的组合物，更优选的是人类的血清-白蛋白，基本上不含凝集的结合珠蛋白。

20 本发明亦在于处理生物产品的方法，更优选的是热灭活的生物产品，以便降低其中所含有的结合珠蛋白凝集物的含量，该方法包括使该产品接受过滤，更优选的是超滤。

25 本发明的特定目的亦在于制备生物产品的方法，包括（i）生物产品的热灭活和（ii）该热灭活的生物产品的过滤。更优选的是，该方法尚包括下列步骤（iii）浓缩该经过过滤、热灭活的生物产品，和/或（iv）其调整。该方法可用于各种生物产品中，包括从诸如人类血液或血浆或血清的哺乳动物生物流体中分离出（或萃取出）的任何蛋白质或多肽（或其衍生物）。如同将在本申请中进一步证明，该方法首次允许生产具有降低结合珠蛋白凝集物含量的热灭活的生物产品，
30 更优选的是基本上不含结合珠蛋白凝集物，并因此将增加安全性。该

方法特别适合制备从血液或血浆中萃取出的药物蛋白质，如血清-白蛋白，更优选的是人类血清-白蛋白， γ 免疫球蛋白、凝固因子等。

5 本发明亦在于处理血清制品的方法，更优选的是胎牛血清制品，以便降低其中所含有的结合珠蛋白凝集物的含量，所述方法包括使该制品接受过滤，更优选的是超滤。

10 如同将在下文中进一步证明，术语“基本上不含”表示组合物或培养基含有低于大约 1ppm 的结合珠蛋白凝集物，更优选的是低于大约 0.5ppm，甚至更优选的是 SDS PAGE 分析和定量 ELISA 无法检测的结合珠蛋白凝集物。

15 本发明另一方面在于分析或鉴别在制品中的膜囊特征（或确定剂量）的方法，以便确定其表型和/或活性和/或含量。

更具体而言，本发明一方面在于鉴别膜囊特征的方法，其包括使膜囊平行地与两种或多种对该膜囊的标记成分特异的抗体接触，并确定抗原-抗体免疫复合体的形成。

20 另一特定的方面包括鉴别膜囊制品的活性特征，包括在辅助细胞存在下使超-抗原-装载的囊与 T 细胞接触，并确定 T 细胞的活化作用。

25 本发明亦提供在样品中确定膜囊剂量的方法，包括（i）将样品装载在固相支撑物上，（ii）使该支撑物与抗-第 II 类抗体（或其他相关抗体）接触，和（iii）确定抗体-抗原免疫复合体的存在。

本发明亦包括组合物，所述组合物包含（i）膜囊，（ii）缓冲剂和（iii）冷冻保护剂（cryoprotectant）或稳定化合物。

30 本发明亦包括药物组合物，所述药物组合物包含免疫原性膜囊和

可药用的稀释剂或载剂，其中通过直接装载，例如通过从含有抗原呈递细胞（例如树突细胞）的生物样品中分离膜囊，并将免疫原性化合物装入该分离的膜囊中，并且优选去除未结合的免疫原性化合物（有利地通过密度离心或渗滤），从而获得该免疫原性膜囊。优选的组合物包括免疫原性膜囊，其中在该囊表面上的 HLA 分子至少有 15%，优选有至少 30%，更优选有至少 40%已经装载了外源肽或脂质。

本发明亦包括制备药物产品的方法，所述药物产品包含免疫原性膜囊和可药用的稀释剂或载体，其中该方法包括（i）从生物样品（例如含有抗原呈递细胞（例如树突细胞））中分离膜囊，（ii）以免疫原性化合物装载分离的膜囊，产生免疫原性膜囊，（iii）优选去除未结合的免疫原性化合物（有利地通过密度离心或渗滤），和（iv）使该免疫原性膜囊与可药用的稀释剂或载体接触。

本发明另一方面包括试剂盒、诊断测定、膜囊的组合物、制备膜囊的装置或装载抗原的抗原呈递细胞（如树突细胞）或膜囊。

这包括在受试对象中产生免疫反应的方法，包括（i）获得含有树突细胞的生物样品，（ii）从该生物样品中分离或纯化膜囊，（iii）使该纯化的膜囊与免疫原性化合物在允许该免疫原性化合物与在膜囊表面上的 MHC 分子结合的条件下接触，和（iv）给受试对象施用（iii）的膜囊，以便在该受试对象中产生免疫反应。该受试对象优选是人类，虽然亦可考虑兽医用途。

本发明特别适合制备帝萨体（即由树突细胞产生的膜囊）或特萨体（即由肿瘤细胞产生的膜囊），更具体而言是人类来源的。这些膜囊用于各种实验、生物、治疗、诊断或预防的应用中。具体而言，膜囊可用于调节受试对象中的免疫反应，尤其是在如癌症、自身免疫疾病、过敏、气喘、炎症反应等的病理症状中。

30

图 1 自身帝萨体分离和纯化的特定方法的综述。

图 2 在第 5 天时，在 CMV pp65 HLA-A2 限制肽的存在下培养 DC。在第 7 天时收集帝萨体并纯化。然后在 HLA-A2 阳性或 HLA-A2 阴性 DC 的存在下，将经过纯化的 CMV 肽-脉冲的帝萨体加至 CMV pp65HLA-A2 限制的 T 细胞系中。以 ELISPOT 形式进行细胞培养，其中以对 IFN- γ 特异的抗体包被培养孔，并以 T 细胞活化的测量值列举特异性地分泌该细胞因子的细胞存在。

样品如下：

1. T+A2⁺DC+外源的/A2⁺DC/无肽
2. T+A2⁺DC+外源的/A2⁺DC/CMV 肽
3. T+A2⁻DC+外源的/A2⁺DC/无肽
4. T+A2⁻DC+外源的/A2⁺DC/CMV 肽

通过比较样品 2 与样品 1，可看出 T 细胞对帝萨体的特定肽反应，并证明刺激是由于肽被掺入到帝萨体中，并且通过比较样品 4 与样品 3，说明并非由于游离肽直接刺激 DC。

图 3 在通过 500 kDa (MWCO) 中空纤维膜超滤处理之前和之后，AIM V 培养基的 SDS-PAGE。以 100,000 xg 超速离心 1 小时，使 AIM V 和 UF-处理的 AIM V 形成沉淀。抛弃上清液，并将沉淀区重悬浮于 PBS 中，第 2 次以 100,000xg 重超速离心 1 小时。将沉淀再悬浮于千分之一原始体积的 PBS 中。在 8-16% 丙烯酰胺凝胶上进行 20 微升沉淀（还原条件）的电泳，随后以胶状的考马斯蓝染色。

图 4 在通过 500 kDa (MWCO) 中空纤维膜的超滤处理之后 3 个月，AIM V 培养基的 SDS-PAGE。以 100,000xg 超速离心 1 小时，使 UF-处理的 AIM V 形成沉淀。抛弃上清液，并将沉淀区重悬浮于 PBS 中，第 2 次以 100,000xg 重超速离心 1 小时。将沉淀再悬浮于千分之一原始体积的 PBS 中。在 8-16% 丙烯酰胺凝胶上进行 20 微升沉淀（还原条件）的电泳，随后以胶状的考马斯蓝染色。

图 5 利用 3/0.8 微米胶囊滤纸的微滤系统的图解。

图 6 图解：使用中空滤芯系统超滤澄清的组织培养上清液。

图 7 在利用 500 kDa 中空纤维膜以 PBS 渗滤之前和之后，含有

帝萨体的浓缩组织培养上清液的 SDS-PAGE。样品以 5 倍体积的 PBS 渗滤。在由 30%蔗糖/Tris D₂O 缓冲液组成的密度垫上，通过超速离心进一步纯化渗滤之前和之后的帝萨体。描述每个被分析样品的倍比浓度。在 8-16%丙烯酰胺凝胶上，进行 20 微升沉淀（还原条件）的电泳，

5 随后以胶状考马斯蓝染色。

图 8a 浓缩帝萨体在 30%蔗糖/Tris D₂O 密度垫（密度=1.190-1.210 克/毫升）内的超速离心-样品制备。

图 8b 从由 30%蔗糖/Tris D₂O 缓冲液组成的密度垫上超速离心帝萨体中收集样品。以制配缓冲液将沉淀重悬浮成其千分之一的原始体

10 积。

图 9a 在由 30%蔗糖/Tris D₂O 缓冲液组成的密度垫上超速离心之后收集到的帝萨体部分的 SDS-PAGE。所有样品均标准化成其二十一分之一的原始体积。部分如下：泳道 1-超滤之后/超速离心之前，泳道 2-UC 密度垫部分，泳道 3-在垫底部的 UC 沉淀/复溶成其千分之一的原始体积，泳道 4-典型沉降法获得的 UC 沉淀/复溶成其千分之一的原始体积，以及泳道 5-在垫上方的 UC。

15

图 9b 在以 100,000xg 超速离心 1 小时之后，蔗糖/D₂O 密度垫的不同部分的 HLA/DR ELISA。在垫以上未观察到 HLA/DR，大约 10% 的信号在复溶的沉淀中（千分之一），而 90%在垫中。

图 10 帝萨体的 SDS-PAGE 和在 PBS 制配缓冲液中的渗滤。通过以 100,000xg 超速离心 1 小时沉降，进一步浓缩帝萨体。以 PBS 复溶沉淀至二千八百分之一的起始上清液体积。将 3.3 微升的帝萨体（还原条件）装载到 8-16%丙烯酰胺凝胶上，接着以胶状考马斯蓝染色。

20

图 11 外来体的 ELISA。通过超速离心形成沉淀或通过密度垫溶液（30%蔗糖/20mM Tris 在 D₂O 中）上超速离心，纯化外来体。至于比较，在相等的细胞培养相等物处使用 DC 溶胞产物。以无脂干奶粉阻断非特异性结合位置，并通过特异的 mAb 检测 CD81（图 11a）和 HLA-DR（图 11b），接着利用与辣根过氧化酶结合的二级抗体检测。采用化学发光检测将样品定量，并以细胞培养相等物的函数作图。

25

图 12 帝萨体制品的 HLA/DR（图 12a,b）和 MHC I（图 12c,D）

30

ELISA。采用前述方法制备帝萨体制品。通过过滤使细胞培养物上清液（3.7 升）澄清，超滤浓缩，在蔗糖/D₂O 密度垫上超速离心浓缩，并通过超滤/渗滤利用缓冲液交换浓缩。将体积标准化，表示 100×原始上清液体积的浓缩（1 微升相等物=1 毫升上清液）。

5 图 12a 以过量外来体滴定抗-HLA/DR。图 12b 以过量抗-HLA/DR 滴定在垫（UC-垫）中超速离心之后以及在配制缓冲液（第 2 次 UF）渗滤之后的帝萨体。图 12c 以过量帝萨体滴定抗-MHC（HC-10 杂交瘤）。图 12D 以过量抗-MHC I 滴定帝萨体 A 和 B。

10 图 13 图 13a：帝萨体对于特异表面受体的流式细胞仪分析。有阴影的柱形图解释以萤光标记的抗体识别提及的受体的结合的特异强度，而空心的柱形图显示无关的背景结合。图 13b：如同图 13a，除了使用未标记的一级抗体并随后以萤光标记的二级抗体进行染色之外，因为未获得作为直接萤光结合物的乳粘附素（lactadherin）抗体。

15 图 14 使用 SEE-脉冲的帝萨体的超抗原测定。按照在实例中的描述以 SEE 纯化和脉冲帝萨体，然后与 Jurkat T 细胞和 Raji 细胞一起温育。用 ELISA 测量 IL-2 的产生，并以由 HLA-DR ELISA 测定确定的每孔 HLA-DR 分子数的函数作图。采用 S 形曲线使数据合格，并根据帝萨体制品的效力的测量，衍生计算的半数最大有效剂量（ED₅₀）。

20 图 15 帝萨体的稀释量（在附图说明中出示）以 SEE 脉冲，并与 Jurkat 和 Raji 细胞一起培养，来测试 Dex 制品的效力。在从 Optiprep 垫中回收之后，使每个样品接受连续滴定，并在细胞测定中测试。数据显示在每个帝萨体制品的稀释度修正之后，记录相同程度的活性，如果看到曲线对于 0.7 微升至 50 微升的外来体范围记录到接近半数最大活性（接近 350 皮克/毫升 IL-2），这代表在接近 100 倍的范围内测定是线性的。测定结果令人意外，使得该测定在测量大范围浓度的未知帝萨体制品时是极为有用的。

25 图 16 通过形成沉淀和区带超速离心纯化的外来体/SEE 复合体的 HLA/DR ELISA 比较。

30 图 17 与 HLA-A2+（上方）和 HLA-A2-（下方）帝萨体结合的肽。以由装载帝萨体的说明所指示的浓度，使用生物素酰化的参考肽。

在 y-轴上, 以 Eu 荧光 (每秒计数) 来表示肽结合的含量, 作为帝萨体溶胞产物测定量的函数 (在 x-轴上, 以微升体积表示。)

5 图 18 利用不同的缓冲液和 pH 值的肽装载。使用 pH3.2-5.2 的醋酸或柠檬酸缓冲液, 装载生物素酰化的参考肽。在 y-轴上, 以 Eu 荧光计数来表示肽装载的量。

图 19 以 pH4.2 醋酸钠缓冲液的弱酸处理的帝萨体比 pH4.2 柠檬酸处理的帝萨体保留了更佳的功能活性。

10 以柠檬酸 (缓冲液 A) 或醋酸钠 (缓冲液 B) 处理 Dex, 以 'SEE' 超抗原脉冲, 并在功能测定中测试, 通过测量其诱发效应细胞分泌 IL-2 的能力, 从而评估对帝萨体生物活性的影响。在 y-轴上, 以帝萨体体积为函数表示 IL-2 分泌。

图 20 β 2-微球蛋白可促进直接的肽装载。利用浓度从 0 至 80 微克/毫升的 β 2-微球蛋白, 装载生物素酰化的参考肽。在 y-轴上, 以 Eu 荧光 (每秒计数) 来表示肽结合的含量作为 β 2-微球蛋白浓度的函数。

15 图 21 参考肽与帝萨体结合的饱和度。以 0-20 微克/毫升的浓度装载生物素酰化的参考肽。在 y-轴上, 以 Eu 荧光 (每秒计数) 来表示肽结合的含量作为参考肽含量的函数。

20 图 22 与帝萨体结合的参考肽的动力学。在室温下, 装载生物素酰化的参考肽 0.5 至 4 小时。在 y-轴上, 以 Eu 荧光 (每秒计数) 来表示肽结合的含量作为参考肽与帝萨体的温育时间的函数。

图 23 未标记的参考肽、MAGE3、4 和 10 与生物素酰化的参考肽对帝萨体的结合竞争。将 1-100 倍未标记的参考肽、MAGE-3、4 和 10 与生物素酰化的参考肽 (5 微克/毫升) 一起温育, 以便竞争对帝萨体的结合。在 y-轴上表示的抑制百分比作为竞争肽的数量的函数。

25 图 24 使用装载 Mart-1 的帝萨体的 T 细胞纯种系测定。

图 25 使用装载 P1A 的帝萨体的 T 细胞纯种系测定。R&D 为 100 单位的 IL-2 标准测定。

30 图 26 在缺乏 β 2 微球蛋白的情况下, 比较在 pH4.8 和 5.2 的醋酸缓冲液中以生物素标记的参考肽与帝萨体的结合。在 y-轴上, 以 Eu 荧光计数来表示肽装载的含量。

图 27 以 pH4.8 和 5.2 的醋酸钠缓冲液弱酸处理的帝萨体象未处理的帝萨体一样保留了相同的功能活性。以 pH4.8 或 5.2 的醋酸钠（缓冲液 A）处理 Dex，以 ‘SEE’ 超抗原脉冲，并在功能测定中测试，通过测量其从效应细胞中诱发 IL-2 分泌的能力，来评估对帝萨体生物活性的影响。在 y-轴上以帝萨体体积为函数来表示 IL-2 的分泌。

图 28 MAGE 4 和 10 与生物素酰化的参考肽对帝萨体的结合的竞争。将 5-20 倍的 MAGE-4 和 10 与 100 微克/毫升的生物素酰化的参考肽一起温育，以便在 pH4.8 时缺乏 $\beta 2$ 微球蛋白的情况下竞争对帝萨体的结合。在每栏的上方，以竞争肽含量为函数来表示抑制百分比。

图 29 MAGE 3 与生物素酰化的参考肽对帝萨体的结合的竞争。将 5-20 倍的 MAGE-3 与 100 微克/毫升的生物素酰化的参考肽一起温育，以便在 pH4.8 时缺乏 $\beta 2$ 微球蛋白的情况下竞争对帝萨体的结合。在每栏的上方，以竞争肽含量为函数来表示抑制百分比。

图 30 在 $\beta 2$ 微球蛋白缺乏之下，通过装载 Mart-1 肽的帝萨体刺激 LT 11 而分泌 IFN- γ 。通过装载 Mart-1 肽的帝萨体，在作为辅助细胞的 DC 的存在下，刺激 LT 11 细胞，并在 y-轴上以帝萨体为函数来表示从 LT 11 中分泌的 IFN- γ 。以在 $\beta 2$ 微球蛋白的存在下 pH4.2 时亦装载的 Exo447 作为对照。

图 31 在 $\beta 2$ 微球蛋白的存在下，HLA-A1 限制肽的结合（上方方格）和抑制（下方方格）。上方方格：HLA-A1 限制、生物素标记的肽 MAGE-3C5 特异性地与 HLA-A1⁺帝萨体结合。下方方格：通过未标记的 MAGE-3A1 肽抑制结合。

图 32 在缺乏 $\beta 2$ 微球蛋白的情况下，在 HLA-A1/B35 限制、生物素标记的 MAGE-3C5 和未标记的 MAGE-3A1/B35 肽之间对 HLA-B35⁺帝萨体（Exo 426）的竞争。

发明详述

如上所述，本发明提供制备和/或鉴别膜囊特征的新型方法和组合物，其适用于药物领域，如各种病理学状况的免疫治疗。本发明亦公开从组合物中去除结合珠蛋白凝集物的方法，如培养基、生物产品

及其类似物，其可用在各种药物或实验的范围中。

5 现在将提供各种步骤的详细说明，所述步骤根据本发明优选的特定具体实施方案可被实施制备膜囊。应了解本发明并不限于包括所有这些步骤的方法，还包括如同上文提及的单个步骤本身。

10 在图 1 中描述制备膜囊的完整方法的图解示意图。该通用方法包含数个主要阶段，包括 (i) 生产含有膜囊的 (生物) 样品，(ii) 富集阶段，(iii) 密度垫分离阶段，(iv) 制配和调整阶段以及 (v) 质量控制或鉴别特征的阶段。此外，本发明亦描述从诸如培养基的生物物质中去除结合珠蛋白的方法。

结合珠蛋白凝集物的去除

15 本发明的特殊且重要的方面在于提供基本上不含诸如结合珠蛋白 (及相关聚合物) 的颗粒体的组合物，更具体而言，为基本上不含结合珠蛋白凝集物的组合物。本发明特别在于提供细胞培养基或生物产品，如分离自生物流体的蛋白质或多肽 (或其衍生物) (例如 hSA 组合物、 γ 免疫球蛋白、凝固因子、血清等) 或缓冲液制配，其基本上不含凝集的结合珠蛋白。

20

结合珠蛋白是复合的 $(\alpha-\beta)_2$ 四聚体蛋白质，以各种组合掺入两种类型的 α 链、 $\alpha-1$ (8.86 kDa) 和 $\alpha-2$ (17.3 kDa)。已经报告了在热灭活血清产物后，结合珠蛋白可形成大的蛋白质凝集物 (“Biological Functions of Haptoglobin-New Pieces to an Old Puzzle”. W. Dobryszczycka, Eur. J. Clin. Chem. Biochem. 1997, 35(9), 第 647-654 页; “Immunosuppressive Effect of Acute-Phase Reactant Proteins in vitro and its Relevance to Cancer”, R. Samak 等, Cancer Immunol Immunother 1982, 13, 第 38-43 页)。此外，已知结合珠蛋白可显示出免疫原性活性 (Dobryszczycka, 同上, Oh 等, J. National Cancer Institute 1990, 82(11), 25 第 934-940 页)。本发明现在认识到存在于许多生物产品中的结合珠 30

蛋白凝集物是非常重要的，并提出允许去除它的新型方法。

5 更具体而言，在本发明的上下文中，结合珠蛋白凝集物是指任何包括结合珠蛋白多肽或链的颗粒体，更优选的是通过 S-S 结合与任何其他多肽或蛋白质交联的颗粒体，例如，特别是结合珠蛋白多肽和白蛋白的任何混合凝集物。这类结合珠蛋白凝集物亦可包括额外的组份，如血红素结合蛋白、转铁蛋白（transferring）、Gc-球蛋白和/或 β 2-糖蛋白，如同 Jensen 等（Vox Sang 67, 1994, 125）所描述。

10 虽然在研究和临床应用中常规使用培养基，但在本领域中未曾提及大的可溶性蛋白质凝集物（或颗粒）的问题，亦未建议去除它们。本发明现在显示，当通过超速离心形成沉淀时，得自 AIM V 的蛋白质凝集物与帝萨体共同-纯化。此外，本申请亦显示在 AIM V 中通过超滤产生的帝萨体的浓缩导致 AIM V 蛋白质的浓缩。再者，经过浓缩的
15 帝萨体的 SDS-PAGE（图 3）在 42 kDa 和 64 kDa 处显示 2 个主要的条带，相当于结合珠蛋白的 β -链和白蛋白。

因此，本发明证实在传统的哺乳动物细胞培养基中发现结合珠蛋白凝集物（包括亚基、交联链、凝集形式等）。本发明进一步显示不能借助传统的外来体纯化方法来去除结合珠蛋白凝集物。本发明现在
20 提供去除颗粒体的方法，更优选的是从诸如培养基、生物组合物、缓冲液配等的生物物质中去除结合珠蛋白凝集物。本发明亦公开基本上丧失了结合珠蛋白的物质的新型组合物及其用途。诸如结合珠蛋白凝集物的大蛋白质凝集物的去除（或降低浓度）提供数个显著的优势，
25 如增加纯度、增加安全性、降低非特异的免疫抑制活性等。此外，本发明亦公开不含凝集的结合珠蛋白的培养基仍允许有效的细胞培养和外来体的生产，同时大大地促进了外来体的纯化。从培养基中去除蛋白质凝集物，提供免于对血清组份如结合珠蛋白诱导不想要的免疫反应的额外保护（Dobryszyccka，同上）。关于这一点，人们认为结合珠
30 蛋白凝集物比已知是免疫抑制性的非凝集结合珠蛋白可引起更多的不

想要的免疫反应 (Se-Kyung Oh 等, J. Natl Cancer Inst. 1990, 82, 934-940, Interference with immune response at the level of generating effector cells by tumor-associated haptoglobin)。已知蛋白质凝集物具有比可溶形式高出 10,000 (一万) 倍的免疫原性, 因为它们优先被抗原呈递细胞捕捉 (M. Kovacsovics-Bankowski 等 Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90, 4942-4946, Efficient major histocompatibility complex class I Presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophage)。所以, 即使以极低剂量存在, 结合珠蛋白凝集物仍可能是有害的。

此外, 本发明的方法亦允许去除其他颗粒体, 如外来体, 其可存在于含有血清的培养基中。去除先存的外来体进一步增加了产物的纯化, 并避免被其他的免疫-刺激剂污染。

去除方法

根据本发明, 可使用各种方法去除颗粒体 (例如蛋白质凝集物, 更具体而言为结合珠蛋白凝集物), 如 (超) 过滤、微滤、尺寸排阻层析法 (SEC)、亲和层析法、离子交换层析法和超速离心。亦可能通过这些方法, 在利用培养基制配之前, 先去除在人类血清组份中的蛋白质凝集物 (也就是部分 V)。

在优选的具体实施方案中, 通过超滤处理培养基或组合物, 以便去除蛋白质凝集物或其他颗粒体, 更具体而言, 为凝集的结合珠蛋白。

在特定的具体实施方案中, 使用 500 kDa 中空纤维膜进行超滤。对该应用而言, 这是优选的截留分子量 (MWCO), 因为需要使诸如转铁蛋白 (大约 75-80 kDa) 的蛋白质通过该膜。由 ELISA 测量转铁蛋白的浓度显示它定量地通过了该大小的孔。该膜的尺寸将蛋白质凝集物保留在存留物 (retentate) 中, 而允许未凝集的蛋白质与滤液 (permeate) 一起通过。收集滤液, 通过 0.22 微米的滤纸灭菌过滤至瓶中, 并储存在 4°C 下至使用为止。

虽然 500 kDa MWCO 的中空纤维膜对培养基的超滤是优选的，但亦可使用其他尺寸的膜，如 750 kDa、300 kDa、100 kDa 等。优选直径在 100 kDa 至 1000 kDa 之间的膜来超过滤培养基，更优选的是在 200 kDa 到 750 kDa 之间。关于这一点，申请人通过动态光散射测定，现在已确定存在于培养基或其他生物产品如加热过的血清白蛋白中的结合珠蛋白凝集物，90%直径在大约 40 纳米到大约 200 纳米之间。因此，任何孔径低于大约 40 纳米的膜（或其他分离装置，如滤纸、中空纤维等）都将是适合和优选地进行本发明。举例来说，500 kDa 的 MWCO 代表孔径在大约 20-25 纳米之间。

同样，虽然中空纤维膜形式是超滤的优选具体实施方案，但亦可以卡匣形式使用其他类型的超滤装置（也就是平板或框架的卡匣），如 Millipore Pelicon 和相关产品，以及得自 Sartorius Inc 或 Filtronics Inc 的卡匣。膜的材料通常是由聚醚砜（PES）所组成，然而亦可使用其他的材料，如聚丙烯。

此外，在培养基超滤中可使用大范围的操作参数。最佳处理的操作参数通常是进口和出口压力维持在 5-15psi 之间。在处理过程中可使用较低或较高的压力。

在另一特定的具体实施方案中，通过微滤（0.05 微米、0.1 微米、0.2 微米等）处理培养基以去除颗粒体（例如蛋白质凝集物）。优选纤维的孔直径为 0.5 毫米，然而，亦可使用其他直径，如 0.25 毫米、0.75 毫米和 1 毫米。

这些各式各样的处理允许生产具有降低颗粒体含量的培养基或生物产品，现在已经显示其可显著促进外来体的纯化以及所得制品的质量。

不含凝集的结合珠蛋白的培养基

因此，在特定方面，本发明在于使用预处理的具有降低的颗粒体含量的培养基，以及包括这类预处理的培养基的物质的组合物。确实，目前已显示经预处理降低颗粒蛋白质（或蛋白质凝集物）含量的培养基，显著降低了在该方法中出现的污染，增加该方法的效率，允许以较高的纯度和安全性来生产外来体制品，而且不影响培养效力或细胞的存活力。

因此，在本发明特定的具体实施方案中，通过培养在具有降低颗粒体（或蛋白质凝集物）含量的培养基中的细胞所生产的生物样品来制备膜囊。

此外，本发明的另一目的在于生产树突细胞的方法，包括在含有生长因子和/或细胞因子的培养基中培养树突细胞前体，从而影响或刺激该前体分化成树突细胞，特别是分化成不成熟的树突细胞，其中该培养基具有降低的颗粒体含量，更优选是基本上不含结合珠蛋白凝集物。

本发明亦在于包括在具有降低颗粒体含量，如结合珠蛋白凝集物含量的培养基中树突细胞的组合物（或任何其他产生膜囊的细胞），更具体而言，是在基本上不含凝集的结合珠蛋白的培养基中。

培养或生产培养基可以是任何适合培养哺乳动物细胞的培养基，特别是人类细胞的培养基。这类培养基的例子包括 AIM V、RPMI、DMEM 及其类似物，更广泛而言，为任何包括蛋白质（或其血清或取代物）的哺乳动物细胞培养基。优选的培养基包括不含血清的培养基，其适合临床用途。

术语“基本上不含”、“丧失了”或“降低结合珠蛋白凝集物的含量”表示该培养基或产物按凝集的结合珠蛋白的重量计优选含有低

于 1ppm 的结合珠蛋白凝集物，更优选的是低于 0.5ppm。更具体而言，通过 SDS PAGE 和 ELISA，目前申请人已确定可从生物产物如 AIM V 培养基中去除 99%以上的结合珠蛋白凝集物。更具体而言，培养基基本上缺乏具有直径超过 100 纳米的颗粒体（包括蛋白质凝集物、沉淀物及其类似物）。在进一步优选的具体实施方案中，培养基基本上缺乏不能通过 500 kDa 膜的颗粒体（包括蛋白质凝集物、沉淀物及其类似物）。本发明更优选的培养基是由 ELISA 确定（使用例如 Sigma 的单克隆抗体 H6395）的含有低于大约 20 纳克/毫升，更优选的是低于大约 10 纳克/毫升的凝集的结合珠蛋白的培养基。此外，应注意的是结合珠蛋白凝集物的存在通常不显著，直到培养基被浓缩时（通过超速离心或超滤）才会显著。因此，本发明的优选培养基不含有如被 SDS PAGE 分析和 ELISA 测量到的结合珠蛋白凝集物。

不含凝集的结合珠蛋白的生物产品

15 本发明亦适用于生产基本上不含凝集的结合珠蛋白的生物产品（例如血液产品）的组合物，以及在将产品制配用于药物用途之前，先用来处理各种缓冲液。

20 关于这一点，本发明涉及包括生物多肽或其衍生物的组合物，其基本上丧失了结合珠蛋白凝集物。更具体而言，本发明在于包括热灭活的生物多肽的组合物，其基本上丧失了结合珠蛋白凝集物。该生物多肽可以是任何从哺乳动物生物流体中，特别是从血液、血清或血浆中分离（或萃取）出的多肽、蛋白质或肽。生物多肽的优选例子包括血清-白蛋白、 γ 免疫球蛋白、凝固因子（例如因子 VIII、因子 IX），
25 更优选是它们来源于人类。本发明的组合物更优选其特征在于含有低于大约 0.01%的结合珠蛋白凝集物，特别是低于大约 0.001%。

在特定的例子中，本发明涉及热灭活的血清-白蛋白的组合物，更优选的是人类血清-白蛋白，所述组合物基本上不含凝集的结合珠蛋白。纯化的 hSA 被广泛用于药物工业上（血浆补体、蛋白质稳定剂等）。
30

经证实存在于 hSA 溶液中的结合珠蛋白是造成热处理期间形成凝集物的原因。而且，凝集的蛋白质似乎比其未凝集的形式具有高出至少一万倍的免疫原性，使得它们的存在可能对于该制品的活性和安全性是有害的。现在，本发明允许从 hSA 制品中去除任何这类的结合珠蛋白凝集物，更具体而言，经过如上所述的超滤，由此为药物用途提供具有高纯度和质量的新型 hSA 组合物。更具体而言，本发明现在提供按重量 (wt) 计含有低于大约 0.01%凝集的结合珠蛋白的 hSA 制品，更优选的是低于大约 0.001%wt。本申请中所述的特定例子证实利用本发明可获得含有大约 0.00025%wt 或更少的凝集的结合珠蛋白的白蛋白制品。更优选的是，本发明的白蛋白制品（或组合物）为经过加热的 hSA 制品（或组合物），特别适合药物用途。

本发明亦在于处理生物产品，更优选的是热灭活的生物产品，以降低其中所含有的结合珠蛋白凝集物的方法，该方法包括使该产品接受过滤，更优选的是超滤。

本发明的特定目的亦在于制备生物产品的方法，包括(i)生物产品的热灭活，以及(ii)热灭活的生物产品的过滤。更优选的是，该方法尚包括(iii)浓缩该经过过滤、热灭活的生物产品，和/或(iv)及调整的步骤。该方法可用于各种生物产品，所述生物产品包括任何分离（或萃取）自哺乳动物生物流体如人类血液或血浆或血清的蛋白质或多肽（或其衍生物）。如同在本申请中将进一步证明，该方法首次允许生产具有降低结合珠蛋白凝集物含量的热灭活的生物产品，更优选生物产品基本上不含结合珠蛋白凝集物，并因此增加安全性。该方法特别适用于制备从血液或血浆中萃取的药物蛋白质，如血清-白蛋白，更优选的是人类血清-白蛋白、 γ 免疫球蛋白、凝固因子等。过滤步骤优选包括超滤，更优选的 MWCO 是在大约 100 kDa 到大约 1000 kDa 之间，通常是在 200 kDa 到 750 kDa 之间。可以上文公开的任何装置和条件进行该过滤。此外，亦可使用上述的其他方法。

30

关于这一点，本发明亦涉及处理白蛋白制品的方法，包括使白蛋白制品接受过滤，优选的是超滤。更优选的方法在于在平均孔径为 200 kDa 到 750 kDa 之间的多孔装置上通过超滤处理加热的 hSA 组合物(或制品)。因为在药物领域中使用大量的 hSA，申请人的方法和高质量的组合物代表在安全性上的显著优势。

样品的生产

如同上文指出，本发明涉及膜囊的生产，并适合从各种来源来制备膜囊，包括由抗原呈递细胞（如巨噬细胞、树突细胞、B 淋巴细胞）、肿瘤细胞或任何产生膜囊的其他细胞或细胞系生产的膜囊。其特别适合制备由树突细胞生产的膜囊，优选由不成熟的树突细胞（即帝萨体）生产。此外，可在制备之前、期间或之后使膜囊或对应的生产细胞对一种或数种抗原致敏。

15 单核细胞的细胞培养

WO99/03499 已公开生产含有帝萨体或其他膜囊的生物样品的各种方法，在此引作参考。

在本发明范围内的优选方法学是基于从单核细胞前体或骨髓中生产树突细胞（“DC”），更优选的是不成熟的 DC。确实，发明人已经显示不成熟的 DC 具有产生外来体的能力，而成熟的 DC 基本上无法这样做。更具体而言，在本发明的范围内，优选使用在细胞因子组合的存在下，更优选的是在缺乏 DC 成熟因子或条件之下，处理单核细胞前体（包含在血液或骨髓中）和/或一段不允许 DC 成熟的期间而获得的不成熟树突细胞的组合物。

不成熟树突细胞的组合物优选基本上包括（即至少 60%，优选 70%）不成熟的树突细胞。

30 因此，树突细胞的制备步骤有利地包括制备不成熟树突细胞的组

合物，特别是人类来源的不成熟树突细胞，尤其是得自单核细胞前体，更具体而言，是以诸如 GM-CSF+IL-4 或 GM-CSF+IL-13 的细胞因子的组合在成熟因子缺乏之下和/或在不含血清的培养基中进行处理，以避免其成熟。

5

此外，在本发明的范围内，亦可能使用无限增殖化的树突细胞群。这些群可由无限增殖化的树突细胞系（例如 D1 系或任何其他通过在树突细胞中导入例如 myc 致癌基因而产生的系）所组成。它们亦可由体外制备并无限增殖化的树突细胞所组成。无限增殖化的树突细胞的目的
10 在于组成对给定抗原组致敏细胞库，其可在工业上用来制备适宜给整个患者家族施用的帝萨体。

15

为了生产膜囊（帝萨体），在本领域技术人员已知的传统条件下可简单培养不成熟的树突细胞群。然而，优选是在刺激帝萨体产生的条件下培养这些细胞，特别是在能够刺激帝萨体产生的因子存在下，尤其是诸如 γ 干扰素、介白素 10 或介白素 12 的细胞因子（例如参见申请 WO99/03499）。在根据本发明方法的优选具体实施方案中，在刺激膜囊产生的条件下培养不成熟的树突细胞群。预备实验显示在临床前的小鼠肿瘤模型中加入干扰素 γ 促进了体内帝萨体的效力。在第 7
20 天，收集培养基，进行后续的帝萨体分离。

25

在本发明特定的具体实施方案中，在一种不含血清的细胞培养基的临床级 AIM V (Life Technologies, Inc.) 中培养患者的外周血液样品。在使用之前，使培养基接受超滤，去除凝集的蛋白质（例如结合珠蛋白），申请人显示该凝集蛋白质的去除不影响细胞的生长，还很有助于后续分离纯的帝萨体。

30

当然，可通过任何其他的方法制备膜囊并用于本发明中。具体而言，膜囊可以人工产生，或利用无限增殖化的细胞系产生或从先前建立的集合或库中获得。

细胞或囊的致敏：抗原装载

在膜囊产生之前（或期间），可使产生膜囊的细胞对抗原致敏。或者，可致敏膜囊本身。本具体实施方案允许产生具有给定免疫原性的囊。可使用不同已熟知的技术进行致敏，包括例如使细胞与抗原性肽、抗原、蛋白质复合体、表达抗原的细胞或细胞膜、细胞凋零体、膜囊、脂质体、肿瘤 RNA 或编码一种或多种抗原、抗原决定簇或表位的任何核酸（可能由病毒或非-病毒载体携带）等接触（例如参见申请 WO99/03499）。或者，可通过囊的直接肽装载，也就是通过使囊与抗原性肽接触，来进行致敏。确实，本申请显示囊的直接肽装载是可能的，并给该囊提供改良的免疫原性。在优选的方法中，通过将产生细胞与肽、抗原、RNA 或核酸一起温育，或通过囊的直接肽装载，来进行致敏。当然本申请不限于致敏或生产技术。

通过使细胞（或囊）暴露在该抗原、对应的蛋白质、肽、核酸及其类似物之下，可使用许多抗原致敏树突细胞（或膜囊）。优选的抗原为肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原及其类似物。代表性的肿瘤抗原包括黑色素瘤抗原（MAGE、MART、BAGE 等）、前列腺特异的抗原（例如 PSMA）、CEA、ras、p53、Rb、肝脏肿瘤抗原等。

蛋白质抗原在树突细胞（“DC”）内部加工成特定的肽，然后由 MHC 分子捕捉并呈递至细胞表面。对于给定的蛋白质，人类 DC 的不同 HLA 单元型呈递不同的肽（表位）。通过在适当的条件下将 DC 与肽一起温育，可将相关肽装载至 MHC 第 I 类的 DC 上。亦可能体外直接将抗原装载在分离的帝萨体上。在特定的实施例中，为了用于装载患者的帝萨体，合成包括 HLA-A2 的已知表位的 MAGE-A3 和-A4 肽。在该实验中，患者的内含物标准包括 HLA-A2 单元型的表达。HLA A2⁺单元型相对较频繁，大约有 50%的人群存在。

此外，亦可加入对照抗原，如 TT（破伤风毒素）和 CMV 肽，特

别是 TT P2 肽。对照抗原的目的是作为内在对照，以便利用已知抗原测试帝萨体在抗原呈递上的功能。因此，作为阳性对照，亦利用例如 CMV 肽（第 I 类）和 TT P2 肽（第 II 类）装载帝萨体。这些对照的阳性反应显示帝萨体具有活性。CMV 具有提供测试最初和回忆的抗原反应两者的优点，因为大约 50% 的一般群体是对 CMV 具有免疫力的（回忆的），而剩下的则是幼稚的（最初的）。

其他的抗原是脂质抗原，如由 CD1 分子呈递给免疫系统的任何脂质、糖脂或脂蛋白。脂质可以是任何微生物脂质、微生物糖脂、脂质或糖脂的肿瘤抗原等。脂质的特定例子包括分枝杆菌脂质，如分枝菌酸、葡萄糖单分枝菌酸酯、己糖-1-磷酸类异戊二烯和脂阿拉伯甘露聚糖（LAM）的衍生物，如磷脂酰肌醇甘露糖苷。其他的例子包括神经酰胺本身，如神经节苷脂、糖脂肿瘤抗原等。

下文的实施例 3 描述在树突细胞和帝萨体上装载和测定 CMV 肽（抗原）的模型系统中获得的初步结果。结果证实经过装载的囊具有刺激抗原特异的 CTL 的能力（图 2）。

应了解在本发明中，可使用任何其他的致敏方法和抗原，以便鉴别膜囊所需的免疫原性特性。

关于这一点，本发明也描述直接装载膜囊例如帝萨体的方法。可使用第 I 类或第 II 类肽或脂质进行该方法，并提供胜过现有技术的显著优点。特别如实施例中所说明，直接装载比现有的间接装载更有效在于使用较低量的肽便可获得表面 HLA 受体的较高占有率。这明显增加了膜囊的免疫原性潜力。此外，可更精确地控制已装载肽的结构，因为被装载的肽并未由整个细胞加工处理，因此在装载后仍保持完整和未经修饰。本发明现在首次提出并显示使用经过纯化的膜囊如帝萨体可进行直接装载。关于这一点，本发明显示将膜囊置于低 pH 条件下不会丧失其活性和功能性。本发明亦描述允许改善直接装载的特定

条件。本发明尤其显示利用不同缓冲液培养基可有利地代替间接装载（即整个细胞的装载）所使用的传统缓冲液培养基，从而增加直接装载的效率并获得较高占有率，这显示囊的行为并不像整个细胞一样。本发明亦首次显示，与整个细胞对照，膜囊可抵抗延长的酸处理或培养基，由此允许通过替换直接装载，即使是在缺乏加入 $\beta 2\text{-m}$ 的情况下。

在第一个变体中，直接肽装载的方法包括下列步骤：(i)使分离或纯化的膜囊置于选择的酸性培养基下，和(ii)使(i)的膜囊优选在中和期间或之后与选择的肽在 $\beta 2\text{-}$ 微球蛋白的存在下接触，以便将该肽装载到该膜囊上。在进一步优选的具体实施方案中，选择的肽是由第 I 类分子呈递的肿瘤抗原肽，也就是第 I 类限制的肿瘤肽。

在该第一个变体中，首先使膜囊（例如帝萨体）置于选择的酸性培养基中。该酸性洗脱去除至少一部分内源以及在囊表面处与 HLA 第 I 类或第 II 类分子结合的 $\beta 2\text{-}$ 微球蛋白（ $\beta 2\text{-m}$ ），但不改变外来体的生物和免疫特性。这步处理是有利的，因为它避免或降低了针对内源肽的二级免疫反应。如同申请人确定，选择的酸性培养基或处理优选包括使囊置于 pH 值在 2 至 6 之间的培养基下，更优选的是在 3 到 5.5 之间。本申请确实显示可在如此酸性的 pH 值下处理外来体而仍保留其生物特性。具体而言，本申请惊人地显示可使外来体接受弱酸的处理、中和并装载所需的肽，而仍显示出刺激对所需肽的有效免疫反应的能力。该培养基尚可包括任何适当的缓冲液，如柠檬酸盐、醋酸盐等。关于这一点，本发明人已经显示更优选的培养基，包括醋酸钠，与传统的柠檬酸盐缓冲液比较，其提供增加的装载性能。从任何传统的培养基或生长培养基中可衍生选择的培养基，并通过在其中加入缓冲条件来制备，以便达到所描述的 pH 值。培养基亦可以是人造的或合成的，根据本领域已知的方法，使用各种缓冲液的营养物。基本上，根据本发明选择的酸性培养基意指任何允许维持膜囊的培养基、生长、调整或其他液态溶液或缓冲液，具有如上所述 pH 的溶液，并且优选包括醋酸盐例如醋酸钠的溶液。

5 在低温下进行弱酸处理，通常低于 8°C，优选大约 4°C，基本上持续 15 分钟或更短，优选 10 分钟或更短，更优选 5 分钟或更短。应了解使用本申请和实施例的教导，专业技术人员可调整处理的条件（培养基、pH 值、温度、持续时间等），而不背离本发明。

10 根据传统方法，通过增加该溶液的 pH 值可进行中和作用。中和作用优选导致 pH 值在 5.5 以上的培养基，通常在大约 6 到大约 9 之间。通常通过在培养基中加入 pH 值为大约 10 或 11 的中和培养基，例如 Tris 缓冲的溶液，来进行中和作用。

15 肽与外来体接触应该在足以允许该肽与在外来体表面上的 MHC 分子结合的条件下进行。通常在中和作用过程中或之后加入外源（第 I 类）肽和 β 2-m，优选是过量的，以便在与该肽和 β 2-m 形成复合体之后促进 HLA 第 I 类的复溶，而得以装载该肽。不一定要在中和作用之前消除分离的内源肽，或在接触之后去除未结合的肽。通常可使用从 0.005 到 50 微克/毫升的 β 2-m。可通过各种技术生产肽和 β 2-m，如重组生产、合成等。应了解 β 2-m 优选是人类来源的（人类 β 2-m 有市售（Sigma），并可通过传统技术生产）。例如在室温下可进行接触多
20 达大约 2 小时。实施例显示早在接触后 30 分钟便达到饱和。使用 TRF 和生物素酰化的参考肽，我们可确定直接装载于帝萨体上肽的含量，并证实在标记的参考肽和未标记的靶肽之间有结合竞争，这说明靶肽直接装载于帝萨体上是成功的。以此方式，利用 Mart-1 肽在低至 0.1 微克/毫升的浓度下装载帝萨体一致且再现地刺激 Mart-1 特异的 CTL
25 纯种系 LT11 以产生 IL-2（实施例 12）。

30 在另一个变体中，该方法不需要使用 β 2-微球蛋白。确实，发明人已经显示，有可能限定去除内源肽的适当条件，而不会彻底去除或使内源 β 2-m 丧失稳定性，以致于即使不使用外源 β 2-m 也有可能直接装载。在此优选的变体中，该方法包括下列步骤：(i) 在缺乏 β 2-微球

蛋白的情况下，使分离或纯化的膜囊与第 I 类限制肽或脂质接触，(ii) 使(i)的混合物在允许肽或脂质与在该膜囊表面上的 HLA 第 I 类分子形成复合体的条件下置于选择的酸处理，以及(iii)收集已经装载的膜囊。更优选的是，步骤(ii)包括使该混合物在 pH 大约 4 到 5.5 之间接受弱酸处理 2 小时以下，更优选在 pH 大约 4.2 到 5.2 之间处理 1 小时以下。该具体实施方案是有利的，因为需要较少的处理，且不需要外源 β 2-m，其降低了成本、操作和与人类-衍生产物有关的潜在问题。在此不含 β 2-微球蛋白的具体实施方案中，分离或纯化的膜囊通常在缺乏 β 2-微球蛋白的情况下与过量的外源肽接触，例如与 5 至 500 微克/毫升第 I 类限制肽接触。当在如上限定的适当条件下接触后，通过以目的肽或脂质替换与抗原呈递分子结合的内源化合物（例如对肽而言为 MHC 第 I 或 II 类，且对脂质而言为 CD1）（交换过程）而发生装载。由于存在发明人限定的选择的酸性条件，使该交换成为可能或足以发生。亦通过申请人证实诸如外来体的膜囊与整个细胞对照，可抵抗延长的酸性暴露，并因此可接受限定的酸处理，足以使替换步骤更容易，而无需加入外源 β 2-m，从而使该交换成为可能。一旦进行交换或替换，通常在 15 至 30 分钟之后（若需要或更长或更短，依据其条件），便可通过升高溶液的 pH 值使装载的膜囊稳定，由此阻断该交换。可按照如上所述进行中和作用。

20

如上所指出，可使用各种免疫原性化合物实施该方法，如肽或脂质。该肽优选是由第 I 类或第 II 类分子提供的肽，即由抗原呈递细胞如树突细胞和巨噬细胞和 B 淋巴细胞加工处理抗原而产生的肽。优选类型的肽由第 I 类限制肽代表，更优选由第 I 类限制的肿瘤肽代表，也就是衍生自肿瘤抗原的肽，其由树突细胞或巨噬细胞提供给免疫系统。应了解可使用分离的肽或其混合物如肿瘤细胞的肽洗脱物或其他肽的组合，来实施该方法。如上所述，脂质的特定例子包括细菌脂质和糖脂肿瘤抗原。

25

下文的实施例 12 描述帝萨体直接装载的结果。该结果证实已装

30

载的囊刺激抗原特异的 CTLs 的能力。

样品的富集

5 如上所示，可使样品（例如上清液、溶胞产物、生物流体等）经过富集步骤，其可包括一次或多次离心、澄清、超滤、纳米过滤、亲和层析和/或渗滤步骤。在特定的具体实施方案中，富集步骤包括(i)细胞和/或细胞碎屑的排除（澄清），可能接着(ii)浓缩和/或渗滤步骤。根据本发明，优选的富集步骤包括(i)细胞和/或细胞碎屑的排除（澄清），(ii)浓缩和(iii)渗滤。

0

样品的澄清

通过离心样品，例如以低速优选低于 1000g，例如在 100 至 700g 之间，排除细胞和/或细胞碎屑。在该步骤中，优选的离心条件是例如以大约 300g 或 600g 离心 1 到 15 分钟。

5

优选的是，通过过滤样品来去除细胞和/或细胞碎屑，所述过滤可能与上述离心组合进行。特别是可以使用具有递减孔隙度的滤纸进行连续过滤。为了该目的，优选使用具有 0.2 微米以上例如在 0.2 到 10 微米之间孔隙度的滤纸。使用具有 10 微米、1 微米、0.5 微米，接着是 0.22 微米孔隙度的滤纸连续过滤是特别有可能的。

20

通过一次性的由醋酸纤维素组成的 0.8 微米胶囊滤纸进行微过滤细胞培养基，以便去除细胞和碎屑。微过滤胶囊单次使用。图 5 表示该方法的计划。最低限度的 10 个实验显示微滤纸的容量，例如 500 平方厘米的表面积足以过滤 2.5 升至 4 升以上的树突细胞培养物上清液。若需要可使用更大的表面积（例如 1000 平方厘米），这取决于悬浮液中碎屑的含量。

25

亦可使用其他孔径 2 微米、1 微米、0.65 微米、0.45 微米等从帝萨体中澄清细胞和细胞碎屑。微滤纸可含有前滤纸，即 0.8 微米的

30

Sartoclean CA (Sartorius Inc.)含有 3.0 微米的醋酸纤维素前滤纸。此外，滤纸可由醋酸纤维素以外的其他材料所组成，如聚丙烯或聚醚砜（PES）。

- 5 其他可用来从帝萨体中去除细胞和碎屑的方法为低速离心、通过中空纤维的连续流动微过滤以及层析法。

浓缩

10 可进行浓缩步骤，以便降低在密度垫阶段待处理样品的体积。以此方式，通过高速离心样品，例如在 10,000 到 100,000g 之间，引起膜囊的沉降，可获得浓缩。这可包括一系列的差速离心，而以大约 70,000g 进行最后的离心。可将在沉淀中获得的膜囊溶解于较少的体积中，并在适当的缓冲液中进行后续的加工步骤。

15 优先通过超滤进行浓缩步骤。根据优选的具体实施方案，使（澄清的）生物样品（例如上清液）接受超滤，优选的是切向超滤。切向超滤由在两个分隔容器（滤液和留存物）之间用来浓缩和分级分离的溶液所组成，其由具有确定的截留阈值的膜隔开。通过留存物分隔容器中的流动，并在该分隔容器和滤液分隔容器之间应用膜压力，来进行分离作用。可使用不同的系统来进行超滤，如螺旋形膜（Millipore, Amicon）、扁平膜或中空纤维（Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor）。在本发明的范围内，有利的是使用具有低于 1000 kDa 截留阈值的膜，优选在 300 kDa 到 1000 kDa 之间，或更优选在 300 kDa 到 500 kDa 之间。

25

在特定的具体实施方案中，通过孔径为 0.5 毫米截留值分子量（MWCO）500 kDa 的中空纤维（A/G Technology Inc.）进行超滤，浓缩澄清的组织培养上清液（例如在通过 0.8 微米滤纸的澄清之后获得的）。该滤芯的孔径将帝萨体保留在留存物中，同时允许比该孔径更小的蛋白质通过该膜。中空纤维的滤芯含有足够的表面积，允许迅速

30

地进行浓缩，但对帝萨体没有过量的剪切力。经受超滤的起始上清液的体积通常为 2-4 升，然后将其降低至大约 100 毫升（20-至 40-倍减少）。图 6 描述了该操作设置。

5 亦可使用其他孔径如 30 kDa、100 kDa、300 kDa 和 750 kDa 来浓缩帝萨体的体积。然而有可能会降低处理的效率和回收百分比。此外，亦可使用得自诸如 Millipore、Sartorius 和 Filtronics 公司的其他超滤形式，如“平板和框架”卡匣。亦可使用如由 Amicon Inc 提供的搅拌格子来降低帝萨体的体积。

10

通过超滤浓缩帝萨体，在低剪切力之下采用中空纤维进行。进料流的剪切力（例如对于 0.7 平方英尺表面积，流速<300 毫升/分钟）为 2000 秒⁻¹ 以下。在操作期间，系统的进口和出口压力在 3-8psi（磅/平方英寸）之间。可使用与目前所用参数相比较更严格的条件来浓缩帝萨体。

15

在本发明的制备方法中，亦可使用其他技术，如离子交换和亲和层析法以及流场-流动分级分离，来浓缩帝萨体。

20

渗滤

可对浓缩的帝萨体制品使用渗滤来降低污染培养基和细胞蛋白质的浓度。根据数种允许以制配缓冲液交换样品缓冲液的技术进行渗滤，包括超滤、层析法、超速离心以及通过透析袋。

25

在优选的具体实施方案中，利用超滤系统进行渗滤。如实验章节证实，该具体实施方案是有效的。此外，如果通过超滤已经浓缩囊制品，使用相同的方法学可轻易地组合渗滤步骤。

30

关于这一点，在特定的具体实施方案中，使用如浓缩步骤中所用的相同的超滤膜（即 500 kDa MWCO 中空纤维膜），通过超滤渗滤外

来体。该具体实施方案是有利的，因为基本上可在相同的装置中进行这两个步骤，对外来体具有有限的干预和处理，也就是仅通过修饰导入中空纤维中的产物。

5 除了 500 kDa 中空纤维之外，可利用其他孔径如 30 kDa、100 kDa、300 kDa 和 750 kDa，优选包括 30 到 1000 kDa 之间，更优选在 200 到 750 kDa 之间。渗滤缓冲液可由除了在 PBS 中找到的那些赋形剂所组成。渗滤中所用缓冲液的体积无论何处均可以为帝萨体浓缩物体积的 1 至 10 倍。

10

 渗滤所用的操作参数与先前对从澄清的组织培养基中浓缩帝萨体所描述的那些参数类似。

外来体的密度垫分离和纯化

15

 正如所示，本发明公开生物样品的处理，包括在密度垫上离心膜囊，并从该垫中回收纯化的囊。密度垫离心提供胜过现有技术使用连续离心或梯度密度离心的数个优点。这些优点包括缺乏囊的凝集，因此使其接受减少的物理损伤；进一步纯化该膜，因为可去除额外的污染物，如在下文将讨论；缺乏在垫中所用组份的毒性；降低蔗糖浓度等。具体而言，密度垫允许在超速离心样品时，防止外来体形成沉淀。在可溶性蛋白质（大约 0.73）、外来体（大约 0.88）和蛋白质凝集物的偏微分比容上的差异使其成为分离和纯化的理想方法。预计蛋白质凝集物（密度约为 1.35）通过密度垫形成沉淀，而外来体仍保留在密度垫中。简而言之，如下描述该方法（图 8a 和 8b 描述了该方法的计划）。

25

 在离心管的底部加入比浓缩的帝萨体溶液更高密度的溶液（即垫），结果形成不连续或台阶梯度（即密度上的急剧变化）。该垫导致排除较低沉降系数的分子。此外，在执行终了时，垫使得重悬浮任何沉降的物质变得更为容易，并防止损害可能无法抵抗形成沉淀的颗

30

粒。

此外，作为其他优点，相信密度垫允许进一步从组合物中排除任何潜在污染的蛋白质凝集物，特别是结合珠蛋白凝集物。

5

已经显示膜囊尤其是帝萨体具有 1.100 至 1.140 克/毫升的密度。因此，密度垫应该具有在大约 1.10 至大约 1.15 的终密度。

10 可由专业技术人员修改垫的组合物，以便达到上文优选的终密度。垫溶液优选是轻微高渗的，渗透性在 700-800mOs 之间。在优选的具体实施方案中，密度垫由在 Tris 缓冲液中的蔗糖/D₂O 所组成。在每个离心管底部加入浓密的蔗糖/ Tris D₂O 缓冲液，置换上方的浓缩帝萨体溶液，形成可见的界面。以 100,000xg 超速离心大约 1 个半小时，使帝萨体沉降更浓密的蔗糖/ Tris D₂O 垫内。浓密的垫含有富集和更纯化的帝萨体群。极少量的帝萨体在垫上方或有时可在离心管底部可见的沉淀内。此外，D₂O 先前已经用于临床环境中，并且未曾在所用浓度下显示出任何的毒性影响。关于这一点，氘在人类中的天然多度为 15 毫克/千克 (0.15%wt)。

20 优选的是，如果使用 D₂O/蔗糖垫，最初垫溶液的密度应该在大约 1.175-1.210 克/毫升的范围内(另外亦可使用这些特定限制的偏差)。确实，申请人现已证实离心期间在垫中发生 D₂O/蔗糖的扩散，导致形成微型-梯度以及在大约 1.1 到大约 1.15 克/毫升之间的终密度(即测量出集中垫的密度在 1.100 到 1.150 克/毫升之间)。这不是预料中的，但对纯化步骤提供了更多的优点，因为借着形成微型梯度，垫允许进
25 一步纯化外来体。

30 在其他例子中，可制备除蔗糖/ D₂O 以外的其他溶液，其中该溶液密度比外来体更高。关于这一点，可使用双重-标记的水(也就是 D₂¹⁷O 或 D₂¹⁸O)，即使这将允许进一步降低在垫中的蔗糖含量。可利用的

$D_2^{18}O$ (纯度 97%) 密度为 1.22。可使用 D_2O 和 $D_2^{17}O$ 或 $D_2^{18}O$ 的混合物来分离囊和各种密度的细胞部分，而无需加入组份。

5 亦可制备在 H_2O (非-氘化) 中较高浓度的蔗糖来产生具有可比密度的溶液，虽然这类溶液将具有显著较高的高渗性并可诱导帝萨体的溶解。可使用由碘克沙醇 (iodixanol) (也就是 OptiPrep)、普克 (Percoll) 和发克 (Ficoll) 组成的商用密度培养基，以类似的方式捕捉帝萨体，以供实验室处理和分析目的使用。

10 通过任何适当的方法，可从垫中收集纯化的外来体，包括以针头刺穿离心管、吸取等。

制配和调整

通过渗滤制配外来体

15 可在适合临床使用或进一步储存的各种缓冲液或悬浮液中制配经过纯化的外来体。

20 为了那个目的，通过渗滤采用 500 kDa 超滤中空纤维滤芯，以与先前在浓缩和/或渗滤中所用的相同形式 (参见上文讨论)，可使纯化的外来体经受缓冲液交换。在渗滤之前，优选含有 hSA (例如 100 微克/毫升) 并缺乏结合珠蛋白污染的缓冲液预调整该滤芯最少 15 分钟。似乎 hSA 的存在防止由于与中空纤维基底膜结合而导致的帝萨体的非特异性损失。使含有纯化 (抗原脉冲) 的外来体的超速离心垫部分 (大约 16 毫升) 进行最少 5 倍体积的缓冲液交换，以便去除垫的组份 (也

25 就是 98% 缓冲液交换)。使用与图 5 所述相同的设置，然而，将中空纤维滤芯的尺寸缩小至容纳较小的体积。如前所述，可能不需要以低剪切力 (即 2000 秒^{-1}) 进行渗滤。

30 图 10 描述帝萨体样品原始体积二千八百分之一的典型 SDS-PAGE。

可使用数种制配缓冲液来配制帝萨体。典型的缓冲液包含 USP/NF 赋形剂。制配溶液可含有下列组份：1) 缓冲剂，如 Tris，2) 冷冻保护剂，如蔗糖、海藻糖、葡萄糖、甘油等，3) 盐类，如 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂ 等，4) 填充剂，如甘露糖醇、甘氨酸、淀粉等，5) 抗氧化剂，6) 维生素，7) 稳定蛋白质和肽，如 hSA，以及 8) 其他广泛接受用于制配的赋形剂。

关于这一点，本发明的目的在于组合物，其包括(i)膜囊，(ii)缓冲剂，和(iii)冷冻保护剂或稳定化合物。该组合物优选进一步包括(iv)盐类和/或填充剂和/或抗氧化剂和/或维生素。

典型的缓冲液包括 PBS、20mM Tris/5%蔗糖/1mM MgCl₂ pH7.4 或 20mM Tris/5%蔗糖/1mM MgCl₂ 100 微克/毫升 hSA pH7.4，并使其接受超滤以去除结合珠蛋白。

优选的是，上述的制配溶液基本上不含结合珠蛋白（或相关聚合物以及颗粒体）。关于这一点，如前所公开，可使该制配溶液（或其特定的个别组份，如白蛋白溶液）接受超滤以排除结合珠蛋白。最终的处理进一步提供产物的较高的保证。

外来体的无菌过滤和冷冻

最后，可使收集（或制配）的物质接受进一步的处理和/或过滤阶段，特别是为了灭菌目的。关于这一点，通过直径小于或等于 0.3 微米的滤纸可无菌过滤外来体。典型的灭菌包括通过 0.22 微米的注射滤器（25 毫米）过滤，具有最低的损失（参见 HLA/DR 测定结果）。在无菌过滤中，可使用由 Millipore 的“Durapore”材料所组成的滤器。亦可使用由醋酸纤维素或聚醚砜所组成的其他滤器材料。在过滤外来体之前，优选含有 100 微克/毫升 hSA（无结合珠蛋白）的制配缓冲液预先使该注射滤器湿润。在受控的参数下用注射泵或由手引起的压

力无菌过滤外来体样品（约 16 毫升）。

亦可冷冻纯化的外来体（任选制成的和/或无菌的），并储存在-80
°C或-20°C或 4°C的其他储存温度下。优选以 1°/分钟的控制速度利用
5 “Mr. Forsty” 低温-1°C冷冻容器（Nalgene Inc）进行冷冻。亦可使用
在液态 N₂ 中慢速或快速冷冻的其他方法。

关于这一点，本发明的目的亦在于包括冷冻外来体的组合物。

10 质量控制

本发明亦公开并提供可用来鉴别已经制备（例如经过纯化和/或
制配）或正在制备期间的膜囊制品特征的新型组合物和方法。本发明的
组合物和方法可用来估测在样品或组合物中的外来体的数量，确定
外来体制品的表型，并评价外来体制品的生物活性。这些方法特别适
15 用于鉴别用于临床应用中产物特征，即用来控制外来体制品的质量和
组合物。这些方法对于治疗目的而言是非常重要的，因为基本上使用
自体的（即患者本身的）膜囊制品，这需要个体的特征参数。使用这
些组合物和方法可鉴别来自各种起源（即抗原呈递细胞、肿瘤细胞
等）、抗原-灵敏度（抗原-装载、抗原-游离等）、新鲜制备或储存的
20 来自初级细胞或无限增殖化细胞系等的外来体制品特征。

外来体的剂量确定

方法被开发出来以评估样品（或纯化的组合物）中存在的膜囊数
量。该方法涉及免疫复合体的形成和检测，使用识别存在于外来体上
25 细胞表面标记的抗体。

更具体而言，根据本发明，确定样品中膜囊剂量的方法包括(i)将
样品吸附在固相支持物上，(ii)使吸附的固相支持物与特异于外来体的
细胞表面标记的（捕捉）抗体接触，和(iii)确定（或确定剂量）抗体-
30 抗原免疫复合体的存在。

更优选的是，特异于外来体的细胞表面标记的抗体是抗-第 II 类抗体，也就是与 MHC 第 II 类分子结合的抗体或抗-第 I 类抗体。此外，在特定的具体实施方案中，至少平行使用二级捕捉抗体，从而进一步增加关于外来体测定的选择性。例如，优选额外的捕捉抗体是针对抗 CD81 细胞表面标记或针对抗 MHC 第 I 类分子。为了鉴别外来体的特征（或确定剂量），使用抗-CD81 抗体是有利的，因为 CD81 从树突细胞中显著降低，并因此提供对帝萨体特定的信号。在该步骤中，可使用对外来体特异的其他抗体，例如抗-CD63 或抗-CD9。

5

因此在优选的具体实施方案中，将外来体吸附在固相支持物上，并分别与抗-第 II 类抗体和抗-CD81 抗体接触。

根据传统的免疫学技术，可检测作为接触步骤的结果而形成的抗体-抗原免疫复合物。优选的是，使用与第一和/或第二个捕捉抗体结合标记显露抗体来显露该复合物。可利用放射性、酶活性、萤光标记、化学发光标记等来标记显露抗体。复合物的测量值与存在于样品中外来体的量相关（即提供其直接的指征）。如果使用两个抗体（例如抗-第 II 类和抗-CD81），可按照定量参数实施以每种抗体检测到的复合物的平均值或比率。

15

在该方法中使用的各种抗体可以是单克隆或多克隆抗体，以天然形成或其修饰（例如人源化）的片段或衍生物。在典型的实验中，捕捉抗体是单克隆抗体。在更典型的实验中，显露抗体是经过标记的单克隆或多克隆抗体。

20

在实施本发明方法时，可使用各种固相支持物，如多孔板，特别是 96-孔板或任何其他滴板。

此外，在进行本发明剂量确定方法时，最好使用纯化的外来体样

25

此外，在进行本发明剂量确定方法时，最好使用纯化的外来体样

30

品，以降低非特异的背景信号。为了这个目的，该样品优选是纯化的外来体样品，更优选的是接受过密度垫（超速）离心的样品。为了分析目的，在 200 微升的 D₂O 蔗糖密度垫上离心数毫升的外来体溶液。可直接在垫溶液上进行 ELISA。这种简单的纯化步骤允许足够的浓缩和纯化。回收率接近 100%。

在特定的具体实施方案中，已经开发出以 ELISA 为基础的分析，从而提供在样品、组合物、流体等中的帝萨体的定量测量。图 11a 说明 HLA-DR（即 MHC II）的测量，和图 11b 说明在帝萨体中 CD81 的测量。HLA/DR 测定是灵敏的，并在功能上与帝萨体的活性相关，因为 HLA/DR 涉及抗原呈递。选择这种测定作为帝萨体制品的定量测定。对 HLA/DR 确定的 ELISA 测定定量了终产物中的帝萨体。因为该测定亦可测量在树突细胞上的 HLA/DR，故该测定提供了每个树突细胞和每份体积的分离的帝萨体涉及 HLA/DR 剂量的方法。

外来体的表型

方法被开发出来以评估存在于样品（或纯化的组合物）中的膜囊的表型。该方法涉及免疫复合体的形成和检测，使用识别存在于外来体上（中）的数个细胞（表面）标记的抗体。该方法尚包括使外来体复合到固相支持物上，如小珠，从而允许合理并可靠地确定每个制品的表型。

关于这一点，本发明的目的在于鉴别制品中膜囊特征的方法，其包括使膜囊制品的样品平行地与二种或多种特异于该囊标记的抗体接触，并确定抗原-抗体免疫复合体的形成。

更具体而言，该方法针对确定外来体制品的表型，即由在制品中外来体表达的特定类型的细胞表面标记。考虑到外来体制品的自体性质，从结构和潜在活性两者的角度来看，表型特征基本上在于制品的组合物。

更优选的是，鉴别制品特征的方法包括使外来体结合到固相支持物上的最初步骤，如小珠。更优选的是，以共价方式或通过抗体-介导的亲合结合，将外来体附着到诸如小珠的固相支持物上。在典型的具体实施方案中，使用直径大约 1 至 10 微米小珠，更优选的是 3 至 5 微米，并可携带共价附着于其上或由免疫亲和力偶联的 1000 个以上的外来体，更优选的是 2000 到 5000 个之间的外来体。然后将包被外来体的小珠分配到板的小孔中，并平行地与选择的抗体接触。

抗体可与细胞表面标记或内部蛋白质结合。确实认为外来体与诸如小珠的固相支持物的结合使得外部药剂，如抗体，得以利用某些内在蛋白质。

优选的是，使用二种或多种在下文表 1 中列举的抗体：

表 1

抗体	来源 Ph armingen
抗 CD11, 更优选	
抗 CD11c	30485x
抗 CD11b	30455x
抗 HLA, 更优选	
抗 HLA abc	32295x
抗 CD81	33475x
抗 CD63	36585x
抗 CD58	36895x
抗 CD1a	34224x
抗 CD1b	
抗 CD9	30374x
抗 CD86	33409x
抗 CD82	35394x
抗 CD83	36934x
抗乳粘附素*	

*: 兔抗-血清抗乳粘附素肽

优选标记这些抗体，从而允许检测和/或确定剂量所形成的免疫复合体。标记可以是放射性、化学、酶、荧光等。优选的标记是荧光，如 FITC 或 PE。

5 更优选的是，使用至少 5 种不同的抗体，更优选的甚至是至少 8 种不同的抗体。抗体优选是单克隆的。

10 在特定的具体实施方案中，使用直接染色法确定免疫表型。将一小等份纯化的外来体与抗-第 II 类（例如抗-HLA/DR）-包被的磁珠一起温育。然后将与抗-HLA-DR 包被的磁珠相偶联的外来体同标记抗体一起温育，更优选的是荧光结合（例如 FITC 或 PE）的单克隆抗体。使用流式细胞仪可测量四个参数。前向散射、侧向散射和两个荧光通道。这两种-颜色的流式细胞仪分析允许在单一的测量中鉴定外来体上的抗原。

15

图 14 呈现数个帝萨体制品所获得的结果。这些结果清楚证实要求保护的用于确定外来体制品免疫表型方法的功效和速度。

外来体的功能

20

方法进一步被开发出来以评估样品（或纯化的组合物）中存在的膜囊的生物活性。该方法涉及使用参考抗原，例如超-抗原（如 SEE），来评估得自 T 细胞群的 CTL 淋巴细胞的活化作用。

25

因此，本发明的特定目的在于鉴别膜囊活性特征的方法，包括在辅助细胞的存在下使装载超-抗原的囊与 T 细胞接触，并确定 T 细胞的活化作用。

30

由许多不同类似细菌和病毒病原体来生产超抗原。超抗原直接与 MHC II 分子结合，不需加工处理。代替在 MHC II 分子沟中的结合，超抗原与 MHC II 分子的外表面及 T 细胞受体（TCR）的 V_{β} 区结合，

而能够刺激极大量的 T 细胞（2-20%）。超抗原可与各种 MHC II 和 TCR 结合并诱导强的 T 细胞反应的事实，使它们成为建立测试帝萨体抗原呈递功能的普遍性和敏感性测定的诱人药剂。从各种来源可制备或分离超抗原。在本发明中使用的优选超抗原是 SEE 抗原和 ET 404
5 （Toxin Technology Inc.）。可使用其他超抗原，如 SEA 和 SEB。

T 细胞可以是任何新鲜制备的包括 T 细胞的细胞群，如外周血液单核细胞（“PBMC”），以及可以是任何无限增殖化的 T 细胞系，如 Jurkat 细胞。Jurkat 细胞是无限增殖化的人类 T 细胞，在激活后分泌 IL-2，其在该生物测定中作为反应者（responder）细胞起作用。Jurkat
10 细胞的 TCR 的 $V_{\beta}8$ 与 SEE 结合。如同永生的肿瘤细胞，Jurkat 细胞是特别有用的，因为它们比初级细胞更不具异种性，并且更容易在实验室中生长。

15 辅助细胞可以是在该生物测定中任何能够调节 T 细胞的激活信号的细胞。辅助细胞可以是树突细胞，如任何活性初级树突细胞培养物或树突细胞系。辅助细胞也可以是其他免疫细胞或细胞系，特别是抗原呈递细胞或细胞系，如 Raji 细胞。Raji 细胞是 EBV-无限增殖化的 B-细胞，并已经显示在该生物测定中起作用。可在任何适当的培养基中培养 Raji 细胞，例如 RPMI。
20

在实施要求保护的方法时，使超抗原装载的囊在辅助细胞的存在下与反应者 T 细胞接触，并评估 T 细胞活化作用。

25 根据各种技术，如细胞因子释放、蛋白质合成、反应者细胞溶解等，可进行 T 细胞活化作用的测量。在优选的具体实施方案中，通过确定培养基中产生的细胞因子来测量 T 细胞的活化作用，更具体而言，是在培养基中产生的介白素-2。通常由 ELISA 来测量 IL-2。

30 在该方法中，膜囊本身可利用超-抗原来装载，或是产生膜囊的

细胞（然后使所得囊暴露在超抗原下）。在优选的具体实施方案中，将该囊与超抗原接触。

5 在特定的具体实施方案中，该功能性的测定首先在制配缓冲液中将超抗原 SEE 与通过超滤、垫密度离心和渗滤从细胞培养上清液中制备的外来体一起温育。可使用新鲜分离的外来体，或亦可冷冻储存在-80℃的 PBS 中。然后通过分析区带离心，使用例如 Optiprep，从未结合的 SEE 中分离外来体与 SEE 的复合体。Optiprep（亦称为碘克沙醇）是碘化的密度梯度培养基（Nycomed），其允许从游离的 SEE 中定量回收外来体/SEE 复合体。因此，对于定量分析每批制品外来体而言，该步骤在生物测定中是重要的。使用分离的复合体，在作为辅助细胞的 Raji 细胞的存在下诱导 T 细胞活化。T 细胞活化的读出是由 Jurkat 细胞分泌的 IL-2。

15 本发明制备方法胜过现有技术使用连续离心步骤的沉降技术的特殊优点如下：

处理时间的长度：沉降处理比超滤和超速离心耗费更多的时间。4 升组织培养上清液通过沉降处理将需要最少 12 个小时，而进行超滤和单一超速离心的组合时，如同其目前进行的，将消耗 6-7 小时。

20

密闭系统-满足 GMP：在该方法中仅仅离心步骤以少量体积进行，并可在目前可获得的密封离心管（转子 6 个离心管的容量各为 33 毫升）中进行。这排除了如果欲进行大体积（数升）的离心步骤时所遭遇到的问题。目前并没有可供如此大体积使用的密封离心管。离心应已在一次性的开口离心管中进行，并将不满足目前规章的束缚。澄清、超滤和无菌过滤均在生物安全的通风橱中进行，所以被认为基本上是密闭系统。目前亦利用密封离心管进行超速离心，其排除了可能由于在开口离心管中的污染引起的问题。

25

30 培养基的超滤：培养基的再处理，如 AIM V，以便去除蛋白质凝

集物，这是整个加工处理纯化计划中的重要步骤。上游去除共-纯化的蛋白质导致在处理之后较纯的外来体产物。特别是推测本发明允许产生基本上不含凝集物的组合物，即其中凝集物相当于总蛋白质的 2-4% 以下。此外，结合珠蛋白的去除降低了不需要的免疫反应。

5

在沉降之后外来体的潜在凝集：外来体的沉降导致局部浓度极高。在沉淀中高浓度的外来体具有导致凝集的产物的潜力。与使用超滤的方法比较，电子显微镜给出一些沉降后外来体正在凝集的特征。其次，通过电子显微镜的观察，外来体的超滤似乎产生较少的碎屑。

10

处理温度：可在冰上进行渗透的处理，即在大约 4 到 10°C 之间的温度下。这是有利的，因为在游离肽和通过 MHC I 与外来体结合的那些肽之间的平衡可受到温度的影响，因此这样的温度可防止诸如蛋白酶的水解污染酶的作用。

15

外来体的纯度：外来体的沉降冒着被细胞碎屑和培养基污染物污染的危险。去除污染的蛋白质凝集物是特别重要的，因为它们具有高免疫原性。

20

外来体的回收：最终回收率为 60-75%，显著大于原始沉降方法（9 个实验平均 15%）。这意味着如果需要，则用来治疗患者的可用剂量将能增加 5 倍，或允许以较少体积的血来进行滤析（apheresis）和培养低 5 倍的细胞，致使该方法的成本相当大的降低。

25

本发明其他方面及优点明示于下列实施例中，这些实施例应看作例证而非用于限制本发明。

实施例

1. 培养基的制备

30

在使用之前，已经先通过超滤处理培养基（在该实施例中，临床

级的 AIM V 为 Life Technologies, Inc.的不含血清的细胞培养基)，以便去除凝集的蛋白质，凝集蛋白质的去除并不影响细胞生长，却相当大地有助于后续纯帝萨体的分离。

5 使用 500 kDa 中空纤维膜（来自 A/G Technology, NeeDham, Mass 或来自备有相关产品的销售商）进行培养基的超滤。该膜的尺寸将蛋白质凝集物保留在留存物中，而允许未-凝集的蛋白质与滤液一起通过。收集滤液，通过 0.22 微米滤纸无菌过滤至小瓶中，并储存在 4℃ 下直到使用为止。

10

在特定的实验中，处理 50 升 AIM V 使用了来自 A/G Technology 的 UFP-500-C-35A（0.5 毫米孔径，14.5 平方英尺表面积）中空纤维滤芯。原料流进口的流速为 13 升/分钟，导致 1 升/分钟的滤液流，且进口和出口压力分别为 12-16 psi 和 10 psi。在 1 小时内完成该过程。

15

通过 0.22 微米的 SartoPore 或 SartoBran 滤纸（Sartorius Inc.）无菌过滤滤液。图 3 和 4 证实降低了培养基的凝集物含量。由 ELISA 定量结合珠蛋白显示通过超过滤去除了 99% 以上的结合珠蛋白相关凝集物。更具体而言，UF 培养基含有低于大约 5 纳克/毫升的结合珠蛋白凝集物。

20

具体而言，BCA 测定显示 AIM V 培养基的超滤去除培养基中 2-4% 的总蛋白质。大部份被去除的蛋白质部分是凝集物。培养基中的蛋白质浓度并不随超滤而有明显的改变，仅仅颗粒体的浓度发生变化。使超滤的 AIM V（UF AIM V）形成沉淀导致任何蛋白质模式与在未经超滤的 AIM V 培养基中所观察到的模式基本上不同（参见图 3）。此外，在处理之后 3 个月使超滤的 AIM V 形成沉淀，如 SDS-PAGE 所显示，并未说明存在蛋白质凝集物（参见图 4），这证实经过处理的培养基可长期储存。

25

30 白蛋白（例如 hSA）组合物的超滤亦允许制备每毫克 hSA 中含

有低于大约 10 纳克结合珠蛋白凝集物的加热 hSA 产物，即低于大约 0.001%的结合珠蛋白凝集物（wt）。

2. 不成熟树突细胞的生产和培养

5 在白细胞滤析（leukopheresis）之后，从患者外周血液中获得树突细胞前体。细胞培养程序是不含血清的，并以临床级的细胞培养基进行，该培养基进一步超滤去除蛋白质凝集物（或颗粒体），如在实施例 1 中所描述，引入的白细胞滤析通常含有大约 1 至 2×10^{10} 个细胞。以补充有 0.1%人类血清白蛋白（临床级）的 PBS 冲洗细胞四次以去
10 除血小板。然后以 200×10^6 个细胞/烧瓶的细胞密度在不含血清经过超滤的培养基中将细胞平铺在大约 100-150 平方厘米的 T 型瓶中。从引入的白细胞滤析中的白血球纯化树突细胞前体依赖于单核细胞对带电荷的聚苯乙烯表面的粘附特性，如同出现在标准市售的组织培养烧瓶中。在 2 小时的温育之后，单核细胞变成具有附着力并被保护下来，
15 而将剩下的非粘着细胞与培养基一起抛弃，并使用补充有 GM-CSF 和 IL-4 或 IL-13 各 50 纳克/毫升以及 γ 干扰素的培养基交换。有粘着力的单核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 或 IL-13 的存在下进行分化，变成不成熟的树突细胞。在培养第 5 天，对这些细胞再添加更多的 GM-CSF 和 IL-13 或 IL-4.可以 500 单位/毫升将干扰素 γ 加至细胞中，以便将树突细胞维
20 持在不成熟的状态。

3. 在模型系统中装载抗原的程序

 进行预备实验，以便评估将抗原装载到树突细胞内的技术参数。为此目的，以 CMV 肽脉冲不成熟的树突细胞，以便产生肽装载的帝
25 萨体。然后通过标准程序分离帝萨体，并通过测量由 CMV 特异的 T 细胞纯种系所释放的 IFN- γ 来测定其活性。以 CMV 肽装载的帝萨体特异性地刺激抗-CMV T 细胞纯种系，且需要树突细胞的存在，这与我们使用基于 SEE 的活性测定的发现一致（图 2）。

30 因此使用 CMV 模型系统，通过在第 5 天将肽加至 DC 培养物中

可将该肽掺入帝萨体内。此外，我们发现肽装载的帝萨体对 T 细胞的刺激作用需要 DC，这与在 SEE 生物测定中对包含 T 细胞、DC 和帝萨体的需求一致，由此强调在这两个测定中帝萨体行为之间紧密相关。

5

4. 澄清

收集 4 升组织培养上清液，并以 250 毫升/分钟的流速通过 3/0.8 微米的 Sartoclean CA（500 平方厘米表面积）（Sartorius Inc.）过滤。滤纸上的进口压力不超过 10 psi（图 5）。

10

5. 浓缩

利用来自 A/G Technology 的 UFP-500-C-4A 中空纤维滤芯（0.7 平方英尺表面积；0.5 毫米孔径），将 4 升澄清的组织培养基浓缩成 100 毫升。原料流的流速在 225-275 毫升/分钟之间，并且进口和出口压力分别为 4-7 psi 和 3-6 psi。在这些条件下，滤液流速在 40-60 毫升/分钟之间。该过程需要大约 60-80 分钟完成（图 6）。

15

6. 渗滤

在特定的实施例中，使外来体浓缩物对 5 倍体积的 PBS 渗滤（即 100 毫升帝萨体浓缩物对 500 毫升 PBS 渗滤）。图 7 描述了在渗滤之前和之后浓缩帝萨体的 SDS-PAGE。在寒冷的条件下（在大约 4-10°C 之间）进行该步骤以及所有的后续步骤。

20

7. 密度垫分离（不连续梯度）

在如下特定的实施例中，在密度垫上，通过（超速）离心纯化含有帝萨体的浓缩和渗滤的培养基，以及在已经以抗原脉冲外来体的那些实施例中：将外来体浓缩物（大约 100 毫升）等分至离心管中，并置于 4 毫升蔗糖/Tris D₂O 缓冲之下。D₂O 密度垫由 25-30%蔗糖/20mM Tris D₂O（重量/重量%）（pH 7.5-7.7）所组成。密度在 1.18 到 1.21 克/毫升之间。密封离心管以确保为密闭系统。

30

图 9a 描述在超速离心之前和之后样品的 SDS-PAGE，以及在垫上方、垫中或沉淀中的含量。如同所示，大部份蛋白质并未沉降在蔗糖/Tris D₂O 密度垫内。

5

这在图 9b 中进一步得到证实，这表明在垫中回收至少 90% 的外来体。

8. 制配和调整

10

通过渗滤，利用与先前浓缩和/或渗滤（参见实施例 5 和 6）所用形式相同的 500 kDa 超滤中空纤维滤芯，使纯化的外来体接受缓冲液交换。在渗滤之前，先以 hSA（例如 100 微克/毫升）预处理该滤芯最少 15 分钟，并选择滤芯大小处理 10-20 毫升培养基。图 10 描述为其原始体积二千八百分之一的帝萨体样品的典型 SDS-PAGE。

15

使制配的外来体通过 0.22 微米注射器（Millex GV(25 毫米注射器)）无菌过滤。

20

采用 ELISA 测量存在于以 PBS 缓冲液调节的外来体制品（为原始培养基的 200-倍浓缩）中的结合珠蛋白凝集物的含量，并确定为基本上低于大约 0.1 纳克/毫升，更具体而言，两个受试制品为 0.091 纳克/毫升或 0.044 纳克/毫升。比较而言，通过 ELISA 发现，根据现有公布的方法，在同样浓缩 200-倍之后，所获得的外来体制品中凝集结合珠蛋白的含量为 400 微克/毫升。这相当于存在于未经纯化的 AIM V 培养基中的结合珠蛋白凝集物的定量回收（2 微克/毫升）。因此，本发明方法现有技术方法比较，导致在外来体的制品中降低结合珠蛋白凝集物的污染五百万至一千万倍（400 微克/毫升对 40-90 皮克/毫升）。因为培养基的超滤以大约 500 的因数降低结合珠蛋白凝集物的含量，另外的超滤、渗滤和/或密度垫步骤亦对增加纯化效果有显著的贡献。

25

30

这些结果更进一步解释了本发明方法在去除结合珠蛋白凝集物上的功

效。

9. 外来体的剂量确定

5 在特定的具体实施方案中，开发基于 ELISA 的分析，以便提供在样品、组合物、流体等中的外来体的定量测定。图 11 说明在帝萨体中 HLA-DR（即 MHC II）（11b）和 CD81（11a）的测量。HLA/DR 测定对帝萨体的活性是灵敏的而且在功能上相关。选择该测定作为帝萨体制品的定量测定。在下文详述该测定。

10 由 ELISA 测量到的 HLA/DR 信号用于确定从帝萨体制品中获得的 MHC II 分子的数目。MHC II 的数目与先前已报道的细胞类型的数目相关联（Cella 等 1997）。表 2 总结了这些值。

15 表 2 每个细胞数目的 MHC II 分子的近似数目（改编自 Cella 等 1997）

细胞类型	MHC II 分子/细胞 ($\times E6$)
新鲜单核细胞	<0.1
经过培养的单核细胞	<1.0
Raji 细胞	2.0
不成熟的 DC	5.2
成熟的 DC	8.3

20 为了定量 HLA/DR 分子的含量，使用 DC 溶胞产物或 Raji 细胞溶胞产物作为标准。图 11 显示在固定浓度的不成熟 DC 溶胞产物下滴定抗-HLA/DR。从该图计算出 HLA/DR 分子的数目对不成熟树突细胞为 5.8×10^6 个分子/细胞，这与表 1 中呈现的文献值一致。对 Raji 细胞的溶胞产物亦观察到相同的结果（数据未显示）。

25 图 12 (A, B) 描述了获自帝萨体制品的 HLA/DR 测定结果的实施例。以相等的上清液体积为函数对 HLA/DR 信号进行作图。在密度垫（即 UC-垫）上超速离心并渗滤至制配缓冲液中之后，HLA/DR 分

子的数目/微升帝萨体确定为 4.7×10^{10} 。样品的回收率%为 73%HLA/DR。更具体而言，回收率%如下：

<u>处理步骤</u>	<u>总回收率</u>
通过 0.8 微米的澄清	100%
第一次超滤-浓缩	100%
第一次超滤-渗滤	86+/-2%
垫-第二次超滤-渗滤	85+/-2%
0.2 微米的无菌过滤	75+/-3%

5 总而言之，HLA/DR 确定的 ELISA 测定定量了终产物中的帝萨体。因为该测定亦可测量树突细胞上的 HLA/DR，该测定提供涉及每个树突细胞和每份体积分离帝萨体上 HLA/DR 剂量确定的方法。关于这一点，通常我们在纯化之后每个不成熟 DC 能够产生最少 100,000 个 HLA/DR 分子（10-12 个实验）。

10

使用可供捕捉的抗第 I 类抗体，也就是由 HC-10 细胞产生的抗体，来进行类似的测定。结果提供在图 12 (C, D) 中。从该滴定曲线 (12C) 中可确定来自任何未知外来体制品的 MHC-I 分子的含量 (12D)。

15

10. 确定外来体的表型

在微量离心管中使用磁架以 500 微升的 PBS 冲洗 5 至 10 微升抗-HLA-DR 包被的磁珠。抛弃上清液，并在已冲洗过的小珠中加入 25、50 或 100 微升浓缩外来体制品（外来体浓度可能高达 1000 倍）。4°C 在旋转板上温育该混合物大约 2 小时。温育之后，将 500 微升 PBS 加至与外来体偶联的小珠中，并使用磁架冲洗小珠。去除上清液，并将与外来体偶联的小珠悬浮于 200 微升染色缓冲液中。将 20 微升与外来体偶联的小珠溶液等分至测试试管中，然后使其分别与一种标记的分析抗体接触。在 4°C 下温育该抗体大约 30 分钟。然后在试管中加入染色缓冲液，并以 1200 rpm 离心 5 分钟。抛弃上清液，并在各管中加

20

入固定溶液（0.5 毫升）。然后获得每个测定试管，并通过流式细胞仪使用 FACSCalibur™ 装置对其进行分析。

5 图 13 提供数个帝萨体制品所获得的结果。这些结果清楚地证实要求保护的用于确定帝萨体制品的免疫表型方法的功效和速度。

11. 功能测定

10 每种测定需要大约 20 微升分离的帝萨体。在 37℃ 下 100 微升终体积中，将帝萨体与 100 纳克/毫升的 SEE(10 微升 PBS 中的 1 微克/毫升 SEE 的储存液，带有 0.1%BSA)一起温育 1 小时。在 1 小时温育之后，通过区带超速离心（2.2 毫升），在由 Optiprep 溶液组成的两阶段不连续梯度上，从未结合的 SEE 中分离出帝萨体与 SEE 的复合体（帝萨体/SEE）（图 14-16）。

15 该 Optiprep 梯度的制备方法是首先将 1.7 毫升 10%的 Optiprep(1.67 毫升 Optiprep 加 8.33 毫升 RPMI)加至每个测试试管中。接着将 100 微升 20%的 Optiprep（3.33 毫升 Optiprep 加 6.67 毫升 RPMI）加至每个试管的底部，随后在 20% Optiprep 之下加入 100 微升 40%的 Optiprep（6.67 毫升 Optiprep 加 3.33 毫升 RPMI）。然后将 PBS 中含 0.1%BAS
20 的帝萨体/SEE 样品以 200 微升终体积铺在梯度的上方。4℃ 下，在悬吊式转子（TLS-55）中使用缓慢的加速和减速，以 100,000rpm 离心试管 40 分钟。从试管底部收集 200 微升样品，其含有不含未结合 SEE 的帝萨体/SEE 的复合体。游离的 SEE 留在区带层（10% Optiprep）中，而帝萨体/SEE 复合体沉降在试管的 20-40%区内。因为发现 optiprep
25 会干扰 ELISA 的确定，所以如果需要这种确定时，优选使用 D₂O 蔗糖梯度。

30 将 Raji 细胞、帝萨体/SEE（或模拟品/SEE），然后是 Jurkat 细胞加至板孔中（每孔使用 100 微升（30,000 个细胞）各种细胞）。亦加入阳性和阴性对照：仅有 Jurkat 细胞（阴性对照）、Jurkat 加 1 纳

克/孔 SEE（阴性对照）、仅有 Raji（阴性对照）、Raji 和 Jurkat 加未以 SEE 脉冲的帝萨体（背景对照）、Raji 和 Jurkat 加 1 纳克/毫升 SEE（阳性对照）。在 5% CO₂ 37℃ 下，培养该板 18 小时。通过以 1200 rpm 离心（使用板托架）15 分钟，从该板的每孔中收集细胞培养上清液。

5 在 ELISA 测定中使用 200 微升上清液来测定 IL-2 的分泌。可立即或稍后（在该情况下，可以石蜡膜包裹板并冷冻至使用为止）进行 ELISA 测定。

在 Costar ELISA 板（Costar 2581）中，使用 IL-2 ELISA 试剂盒（Duo 组 DY202，R&D Systems），依据制造者的说明进行 IL2 ELISA 测定。结果显示在 IL2 分泌和每孔的外来体含量之间的剂量-依赖性关系，这已经将其转变为与外来体储存液相等的体积。IL2 分泌是 SEE-依赖性的，因为外来体需要 SEE 刺激非-抗原特异细胞（例如 Jurkat）。在该方法中，引入半数最大单位作为帝萨体滴度的定量测量值的一半。将其定义为在所用实验条件下，达到由 Jurkat 分泌的半数最大 IL2 时的外来体的体积。测量到的半数最大单位越小，代表滴度越高。

10

15

12. 直接肽装载

该实施例描述直接装载的方法学、影响装载的参数、在参考肽和靶肽之间与帝萨体的竞争结合以及以抗原装载的帝萨体的生物活性。方案的产生以 HLA-A12 限制肽的直接装载为基础。相同方案可应用在 HLA-A1 限制肽上。亦讨论了帝萨体的直接肽装载在肿瘤治疗临床试验上的重要性和优势。

20

该实施例显示有可能直接装载抗原分子于帝萨体上，并且如此直接装载的帝萨体能够刺激 CTL 纯种系。结果显示直接装载可能比间接 DC 装载更有效，因为需要较少量的肽。

25

12.1.方法

30 在β2-m 存在和缺乏的情况下，直接装载肽于外来体上

通过半胱氨酸将 HLA-A2 限制的参考肽 FLPSDCFPSV 进行生物素酰化，所述参考肽衍生自 B 型肝炎核心抗原的天然表位。该参考肽与未标记的参考肽竞争，暗示生物素酰化的肽仍维持其与 HLA-A2 分子结合的能力。对于在 β 2-m 存在下的直接肽装载，4°C 下用等体积的柠檬酸或醋酸缓冲液 pH3.2-5.2 处理 100 微升纯化的 HLA-A2⁺和 HLA-A2-阴性帝萨体 90 秒，降低 pH 值有利于结合内源肽的洗脱。处理之后，立刻用含有 Tris、外源肽（终浓度从 0.01 至 10 微克/毫升）和 β 2-m（终浓度从 0-80 微克/毫升）的 pH 11 的鸡尾酒中和该制品，并在室温下温育，允许在帝萨体表面上重形成第 I 类、 β 2-m 和肽的三分子复合物。对于在缺乏外源 β 2-m 情况下的直接装载，首先使帝萨体与外源肽（终浓度 10 或 100 微克/毫升）混合，然后用等体积的醋酸缓冲液 pH4.2-5.2 混合，并在室温下温育 30 分钟。在这段期间发生肽的交换，导致过量存在的外源肽的结合。外源肽可以仅为生物素酰化的肽，或标记肽与增量靶肽的混合物。不需要去除未结合的肽和 β 2-m，因为信号源是来自如下所述由抗-HLA-第 I 类抗体捕捉的第 I 类/肽复合物。

利用 TRF 测量与帝萨体结合的参考肽

在冰上用 1% NP 40 溶解装载肽的帝萨体 30 分钟。通过包被在 ELISA 板上的兔抗-小鼠 IgG，由抗-第 I 类抗体捕捉在溶胞产物中含有标记参考肽的第 I 类分子的复合物。温育和冲洗之后，加入铕标记的链霉抗生物素蛋白，通过增强缓冲液，从铕中产生荧光信号，并根据厂商说明（Wallac），利用 Victor 2 荧光读数器读出。将荧光信号的水平与定量的铕标准水平比较，以铕标记的链霉抗生物素蛋白的比活性为基础，可评价生物素酰化的参考肽的绝对含量。

25

参考肽和靶肽与帝萨体竞争结合

在 β 2-m 存在下的竞争

在含有 20 微克/毫升 β 2-m 的装载缓冲液中，将过量达 100 倍的 MAGE 3A1、MAGE-3、4 和 10 肽与 5 微克/毫升生物素酰化的参考肽混合，并装载于酸处理的帝萨体上。通过 TRF 检测参考肽的信号并计

30

算由 MAGE3、4 和 10 导致的信号降低。

在 β 2-m 缺乏下的竞争

5 在 pH 4.8 或 5.2 的醋酸缓冲液中，制备在 5-20 倍过量的生物素-参考肽中的未标记肽（100 微克/毫升）。将该肽加至等体积的帝萨体中，并在室温下温育 1 小时。通过 TRF 检测参考肽的信号，并计算由 MAGE3、4 和 10 或 MAGE 3A1 导致的信号降低。

SEE 测定

10 在 37°C 下，将 100 微升直接装载肽的帝萨体在 β 2-m 的存在或缺乏之下与 100 纳克/毫升 SEE 一起温育 1 小时。通过区带密度梯度离心去除未结合的 SEE 之后，将帝萨体和 SEE 的复合体与 Raji 细胞和 Jurkat 细胞一起温育 18 小时。收集培养物上清液，测量来自 Jurkat 细胞的 IFN- γ 分泌。

15

Mart-1 特异的 CTL 纯种系刺激测定

20 如上所述以 MART-1 肽直接装载帝萨体，并在装载之后冲洗游离的肽，再与 DC 和 T 细胞纯种系 LT 11 细胞一起温育 24 小时。根据下列 T 细胞纯种系测定，利用 ELISA，通过 IL-2 的分泌来测量生物活性。

所使用的肽为 HLA-A2 限制的 MART-1 肽，其具有序列 ELAGIGILTV。

25 通过密度梯度离心去除未结合的 Mart-1 肽。应了解从帝萨体中去除未结合的肽不是必须的，但降低非特异性结合。

T 细胞纯种系测定

30 37°C 下，在 U 型底的 96-孔板中，将 20×10^3 个衍生自树突细胞（BM-DC）的 HLA A2 阳性或阴性单核细胞与 15 微升（ 1×10^{10} 个第 ii

类) 的帝萨体制品一起温育 2 小时, 然后将 20×10^3 个细胞的 T 细胞纯种系 LT11 加至人类 BM-DC 细胞中。每孔的终体积为 200 微升。在 24 小时之后, 收获上清液, 并通过 ELISA 分析 IL-2 的存在。使用直接以 $10 \mu\text{m}$ mart 肽 (ELAGIGILTV) 脉冲的 HLA A2⁺ BM-DC 细胞作为阳性对照。

P1A 肽装载的帝萨体

如下直接以 OVA 肽 257-269 (SIINFEKL) 装载鼠科动物的 H2^b 和 H2^d 帝萨体: 将 1 份体积的醋酸钠缓冲液 (0.2M, pH5) 加至 1 份体积的外来体中, 并在 4°C 下温育 90 秒, 然后加入含有 $10 \mu\text{m}$ 的 OVA 肽和 40 微克/毫升的人类 b2-微球蛋白的 Tris 2M 溶液 (pH 11) 中和。在室温下温育 4 小时之后, 通过 optiprep 梯度从未结合的 OVA 肽中分离出 OVA 帝萨体复合体。

T 细胞纯种系测定

37°C 下, 在 U 型底的 96-孔板中, 将 25×10^3 个 D1 细胞与 25 微升或 50 微升的帝萨体制品一起温育 30 分钟, 然后将 25×10^3 个细胞的 T 细胞杂交瘤 (B3Z) 加至 D1 细胞中。每孔的终体积为 200 微升。在 24 小时之后, 收获上清液, 并通过 ELISA 分析 IL-2 的存在。使用直接以 $10 \mu\text{m}$ OVA 肽脉冲的 D1 细胞作为阳性对照。

12.2. 结果

在 $\beta 2\text{-m}$ 的存在下直接装载 HLA-A2⁺ 帝萨体

按照描述, 首先利用 HLA-A2 限制的参考肽 HFLPSDC (生物素) FPSV-OH 在 HLA-A2⁺ 帝萨体上进行直接的肽装载。使用 HLA-A2 帝萨体作为 HLA 特异性对照。图 17 显示在帝萨体溶解之后, 以生物素-标记的参考肽装载的 HLA-A2 分子在板上被抗-第 I 类抗体捕捉。参考肽与帝萨体的结合是 HLA-A2 特异的, 因为它不与 HLA-A2 帝萨体结合。该结合依赖于肽和帝萨体的含量。

使用所述的 TRF 测定来评估直接肽装载的参数。如 SEE 测定所测量，缓冲液的选择受到对肽装载功效的影响和对帝萨体完整性的影响。测试装载缓冲液的 pH 值范围，以便使装载参考肽的条件最佳。我们发现使用类似的装载条件，采用柠檬酸磷酸缓冲液或醋酸钠缓冲液，获得可比较的肽结合信号（图 18）。为了测试弱酸处理是否可改变帝萨体上表达的分子的构象并削弱其功能，我们进行超抗原测定，其中超抗原 SEE 与帝萨体的 HLA-DR 分子结合，在作为辅助细胞的 Raji 细胞的存在下，从 Jurkat 细胞中诱导分泌 IL-2。图 19 显示在 SEE 测定中，以 pH4.2 的醋酸钠处理的帝萨体制品诱导与未处理的对照相同含量的 IL-2 分泌。以相同 pH4.2 的柠檬酸/磷酸缓冲液处理的帝萨体亦诱导 IL-2，虽然程度低很多。关于这一点，柠檬酸缓冲液可使帝萨体失活，所以使用柠檬酸缓冲液装载完整细胞的条件不能有效地装载帝萨体。因此选择醋酸钠缓冲液进行进一步的研究。我们接下来测试外源 β 2-m 的存在是否可促进肽与帝萨体 HLA-A2 的结合。图 20 显示利用 10 微克/毫升 HLA-A2 限制的生物素参考肽，20 微克/毫升 β 2-m 的加入显著增加了参考肽结合的含量。

为了确定与 HLA A2 分子饱和结合所需的肽的含量，我们进行肽滴定，其中在装载期间加入 0-20 微克/毫升的肽。图 21 显示当使用超过 1.25 微克/毫升的参考肽时，装载便已经饱和了。使用三种不同的帝萨体制品，通过改变在室温下的温育时间，来评估肽装载的动力学。图 22 显示在所有三种测试的帝萨体中，肽结合在 30 分钟到 4 小时之间的温育时间内相对较恒定，这说明大部分结合发生在 30 分钟内。从我们的研究中，我们认为使用 pH4.2 的醋酸钠缓冲液的弱酸洗脱，10 微克/毫升第 I 类肽，20 微克/毫升 β 2-m，以及在室温下装载 30 分钟，对在帝萨体上装载第 I 类肽提供了最适条件。

我们设计了肽竞争性测定，以便提供未标记的靶肽可以相同的方式装载于帝萨体上的证据。以 1-100 的比例，将未标记的靶肽 MAGE-3、4 或 10 与 5 微克/毫升标记的参考肽混合。参考肽荧光信号的降低

表明未标记的靶肽对帝萨体的竞争性结合。如同图 23 证实, 所有三种 MAGE 衍生的肽均与参考肽竞争和帝萨体的结合。MAGE3 和 10 比 MAGE-4 竞争得更多, 或许表示在该装载条件下, 对 HLA-A2 分子具有比 MAGE-4 更高的结合亲和力。

5

建立使用 MART-1 肽特异性 T 细胞纯种系 LT11 的功能测定, 以便测试帝萨体的生物活性, 其测量体外的抗原特异性 T 细胞反应。依据以第 I 类肽直接装载帝萨体的方案, 在 0.01 至 10 微克/毫升的肽浓度下, 将 MART-1、HLA-A2 限制肽装载于 HLA-A2⁺或 HLA-A2⁻帝萨体上。随后通过密度梯度离心冲洗装载的帝萨体以去除未结合的肽。结果呈现于图 24 中, 并显示以 10 μ M Mart 脉冲的 HLA A2⁺BM-DC 细胞能够激活识别带有 Mart 肽的 HLA A2 的 LT11 纯种系。HLA A2⁻BM-DC 细胞不能刺激 LT11 纯种系。以 15 微升 Mart 直接装载的 HLA A2⁺帝萨体脉冲的 BMDC 细胞能够激活 LT11 纯种系, 无论是何种单元型的树突细胞。

10

15

先前, 间接肽装载的帝萨体仅诱导少量水平的 IL-2 分泌, 即使是在将 10 微克/毫升 Mart-1 肽加至 DC 培养物中来制备帝萨体时。以 Mart-1 肽直接装载的帝萨体一致且可再现地刺激 LT11 纯种系, 这暗示直接肽装载是生产具有生物活性帝萨体的较有效途径。

20

相同的方案亦适用于直接装载 HLA-A1 限制肽。在该实验中, 生物素酰化的参考肽 EVDPC (生物素) GHLY 衍生自天然的 HLA-A1 限制的 MAGE3-A1 肽 EVDPIGHLY, 与 A1⁺/A2⁻帝萨体 (Exo 433) 结合, 但不与 A1⁻/A2⁺帝萨体 (Exo 427) 结合。相反, HLA-A2 限制的生物素酰化的参考肽衍生自 B 型肝炎核心抗原, 与 A1⁻/A2⁺结合, 但不与 A1⁺/A2⁻帝萨体结合, 这证实第 I 类抗原肽严格的 HLA-等位基因-依赖性装载。图 10 的下图显示未标记的 MAGE3-A1 肽和生物素酰化的 MAGE-3 A1 肽竞争与 A1⁺帝萨体 (Exo 433) 的结合。

25

30

直接装载方法亦适用于 PIA 肽和鼠科动物的帝萨体。结果呈现于图 25 中。以 25 微升或 50 微升直接装载 H2^b 帝萨体的 OVA 脉冲 D1 细胞，能够激活识别带有 OVA 肽的 K^b 的 B3Z 细胞。当以直接装载 H2^d 帝萨体的 OVA 脉冲 D1 细胞时，我们亦观察到较低程度的活化作用。

5

使用 HLA-A1 限制肽，获得类似的结果。

在β2-m 缺乏之下，HLA-A2+帝萨体的直接装载

如图 20 所示，在 pH4.2 的酸洗脱之后，可在中性 pH 值下将外源肽装载于帝萨体上，而无需添加外源β2-m。因为结合信号是在 20 微克/毫升β2-m 存在下的四分之一至三分之一，故我们使实验条件最适，以便在外源β2-m 缺乏之下增加装载的效率。测试两种肽浓度，10 和 100 微克/毫升的生物素酰化的参考肽以及 pH4.2、4.5、4.8 和 5.2 的醋酸钠缓冲液。图 26 显示参考肽在 100 微克/毫升下采用 pH4.8 的醋酸缓冲液大大促进了参考肽的装载。

15

不象在β2-m 存在下装载帝萨体，其中在酸处理 90 秒之后很快中和帝萨体，在β2-m 缺乏下装载帝萨体，需要它们在 pH4.8 或 5.2 下停留延长的期间，通常室温下最少 30 分钟。图 27 显示在用 pH4.8 或 5.2 未处理或处理后，由 SEE 装载的帝萨体诱导的 Jurkat 细胞分泌 IL-2 并没有差异，这暗示该处理不会损伤外来体。

20

为了证实在β2-m 缺乏下可装载靶肽 MAGE-3、4 和 10，进行一组竞争实验。图 28 中，在 pH4.8 下，5-20 倍的 MAGE-4 和 MAGE-10 肽与参考肽竞争为 35%或 66%，类似 pH4.2 在β2-m 存在下的抑制程度（参见图 23），这表示可通过两种方法来装载两个肽。图 29 显示在 pH5.2 下由 Mage-3 所导致的抑制。装载 MAGE-3 似乎在 pH5.2 下比在 pH4.8 下更有效率，因为 MAGE-3 的竞争在 pH4.8 时弱很多（数据未显示）。

30

根据上文结果,我们在 β 2-m 缺乏之下将 Mart-1 肽装载于 HLA-A2⁺ 上,并在 LT11 测定中对它们进行了测试。图 30 显示在 β 2-m 缺乏之下以 Mart-1 肽装载的帝萨体的生物活性。在该实验中,在 β 2-m 缺乏之下 pH4.8 和 5.2 时,以 10 和 100 微克/毫升将 Mart-1 肽装载于 HLA-A2⁺ (Exo 447) 和 HLA-A2⁻ (Exo 450) 帝萨体上。作为对照,则在 β 2-m 存在下亦以 10 微克/毫升的 Mart-1 装载 Exo 447。以三种不同条件装载的帝萨体 (pH 4.8 无 β 2-m、pH5.2 无 β 2-m、pH4.2 有 β 2-m) 均具有类似的生物活性,这表示对生成具有生物活性的帝萨体而言,并非绝对需要 β 2-m。

在 β 2-m 的存在和缺乏之下,HLA-A1⁺/B35⁺帝萨体的直接装载

相同的方案可适用于直接装载 HLA-A1 或 B35 限制肽。九聚体的 MAGE-3A1 (EVDPIGHLY) 衍生自 MAGE-3 蛋白质,由 HLA-A1 和 HLA-B35 提供。为了测试是否可将该肽装载于 HLA-A1⁺帝萨体上,我们设计了称作 MAGE-3A1C5 的参考肽,其中以半胱氨酸取代 MAGE-3A1 肽的异亮氨酸并以生物素标记。在该实验中,如图 31 的上部所示,在 β 2-m 的存在下,将生物素酰化的 MAGE-3A1C5 装载于 HLA-A1⁺/A2⁻帝萨体 (Exo 433) 上。我们发现同样的肽不能装载于 HLA-A1⁻/A2⁺帝萨体 (Exo 427) 上。相反,衍生自 B 型肝炎核心抗原的 HLA-A2 限制、生物素酰化的参考肽可装载于 A1⁻/A2⁺,但不能装载于 A1⁺/A2⁻帝萨体上,这证实第 I 类抗原肽严格的 HLA-等位基因-依赖性装载。图 31 的下部显示天然的 MAGE3-A1 肽与生物素酰化的 MAGE-3A1C5 肽竞争对 A1⁺帝萨体 (Exo 433) 的结合,这表示未标记的 MAGE3-A1 肽对 A1⁺帝萨体的结合能力。

由于 HLA-A1⁺帝萨体的来源有限,我们使用 HLA-B35⁺帝萨体 (Exo 426) 来测试 MAGE 3-A1 的结合以及在 β 2-m 缺乏之下的抑制。对 HLA-A2⁺帝萨体使用相同的装载条件,我们在图 32 的上部中直接显示 MAGE-3A1C5 可在 pH4.8 或 pH5.2 下与 HLA-B35⁺帝萨体结合,而在 pH5.2 下较少与 HLA-A1⁻B35⁺帝萨体 (Exo 424) 的非特异性结合。图

32 的下部显示,在缺乏 $\beta 2\text{-m}$ 之下 pH4.8 和 5.2 时,由天然的 MAGE-3A1 肽导致的 MAGE-3A1C5 的抑制。在 pH4.8 处,通过天然 MAGE-3A1 的结合抑制强很多,这暗示未标记的 MAGE-3A1 肽在该 pH 值下对 HLA-B35⁺帝萨体具有较佳的结合能力。这些结果显示直接肽装载在其他 HLA 第 I 类等位基因上的广泛应用。

因此,该实施例描述了通过已知为直接装载的过程,生产以免疫原性化合物(例如第 I 类限制的肿瘤衍生的肽)装载的具有生物活性的帝萨体的极有效方法。帝萨体第 I 类分子通过弱酸处理丧失了内源肽和 $\beta 2\text{-m}$,可有效地装载靶肽,如生化和功能数据所示。将与帝萨体结合的参考肽的荧光信号与铕标准相比较,可定量测量与帝萨体结合的肽的含量。表 3 显示在 $\beta 2\text{-m}$ 缺乏之下与帝萨体结合的参考肽的绝对含量。依据供体和所用的装载条件,每 10^{14} 个第 II 类分子有 0.1-1.2 纳克之间的参考肽。该数目显著地接近大量制造的帝萨体制品的数目(每 10^{14} 个第 II 类分子 1 纳克),其中以大得多的规模在 pH4.8 下用 10 微克/毫升肽进行肽装载。即使在 $\beta 2\text{-m}$ 缺乏之下结合较少(图 23),我们的 LT11 测定数据(图 30)显示在利用不同条件装载的帝萨体之间具有类似的生物活性,这表示在 $\beta 2\text{-m}$ 缺乏之下直接装载对生物功能是足够的。

通过 TRF 和 ELISA 对在帝萨体上的第 I 类分子水平进行定量,允许确定肽在第 I 类分子上的占有率。我们已经估计参考肽在帝萨体的 HLA-A2 分子上的占有率高达 15%,更优选的是高达 40%。肽的高占有率大大地改善了 T 细胞刺激活性,所述活性由体外 T 细胞测定来测量。此外,肽装载的定量和帝萨体的第 I 类分子上肽占有率的确定将有助于评估基于帝萨体的治疗候选物的剂量,这对于设计动物研究和未来临床试验都是重要方面。

亦可在 $\beta 2\text{-m}$ 缺乏之下进行直接装载。使用高肽浓度和弱酸缓冲液在 HLA 分子上观察到肽的交换。我们通过竞争实验已经证实以该

方式可将我们的靶肽 MAGE-3、4 和 10 特异性地装载于 HLA-A2⁺帝萨体上。在 β 2-m 缺乏之下, Mart-1 肽装载的帝萨体通过 LT 11 刺激了 IFN- γ 的分泌, 这证实了帝萨体的生物活性。因此, 没有 β 2-m 来制造具有生物活性的帝萨体是可行的, 并由此排除了使用从人类供体中纯化的 β 2-m 或非-GMP 级的重组 β 2-m 的困难。在 β 2-m 下整体装载是较低的, 但似乎不影响 LT 11 的活化作用, 这暗示生物测定比生化测定更灵敏。

我们已经证实直接肽装载对各种 HLA 第 I 类等位基因具有广泛的应用, 如 HLA-A2、A1 和 B35。先前, 帝萨体的肽装载依赖间接的方法, 需要增加细胞培养的操作, 并因此增加污染的机会。直接肽装载在制造帝萨体时是较安全的, 其排除了对 β 2-m 的需要以及将肽加至每个培养烧瓶中的艰难任务。

表 3

帝萨体制品	HLA-第 II 类 (10^{10} /微升)	皮摩尔肽/ 16.6 微升 Dex 样品	微克肽(10^{-9})/ 10^{14} 第 II 类
pH5.2 无 β 2-m 100 微克/毫升肽			
Dex 375	2.89	1.4+/-0.1	0.42
Dex 430	3.99	6+/-0.05	1.3
Dex 431	1.44	1.99+/-0.1	1.2
Dex 447	12.7	1.52+/-0.1	.01
PQ01	6.57	1.3+/-0.2	0.2
VP0023-02	1.21	0.93+/-0.1	0.7
pH5.2 无 β 2-m 10 微克/毫升肽			
430	3.99	0.9+/-0.2	0.2
447	12.7	1.6+/-0.06	0.11
pH4.8 无 β 2-m 100 微克/毫升肽			
375	2.89	4.6+/-0.4	1.4
447	12.7	8.8+/-0.2	0.6
PQ01	6.57	5.9+/-10	0.8
VP0023-02	1.21	3.6+/-0.3	2.6
pH4.8 无 β 2-m 10 微克/毫升肽			
375	2.89	1.2+/-0.3	0.36
447	12.7	2.4	0.16
PQ01	6.57	1.1+/-0.1	0.14
VP0023-02	1.21	1.7+/-0.5	1.2

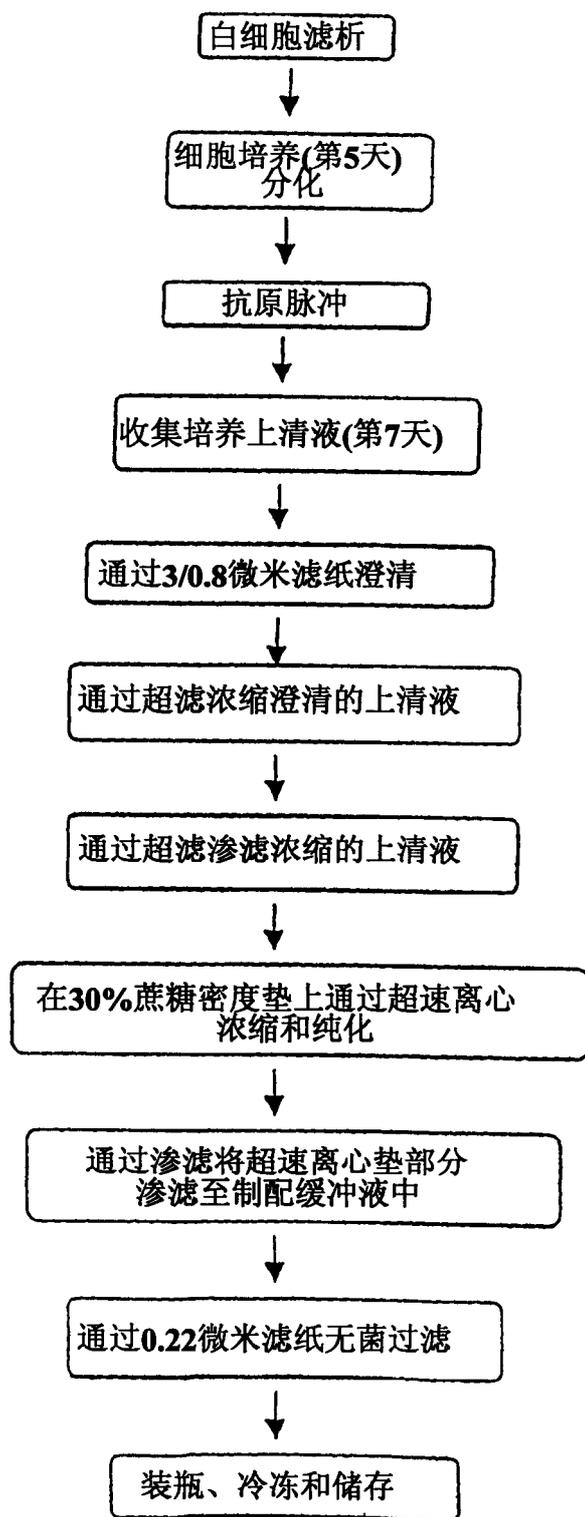


图1

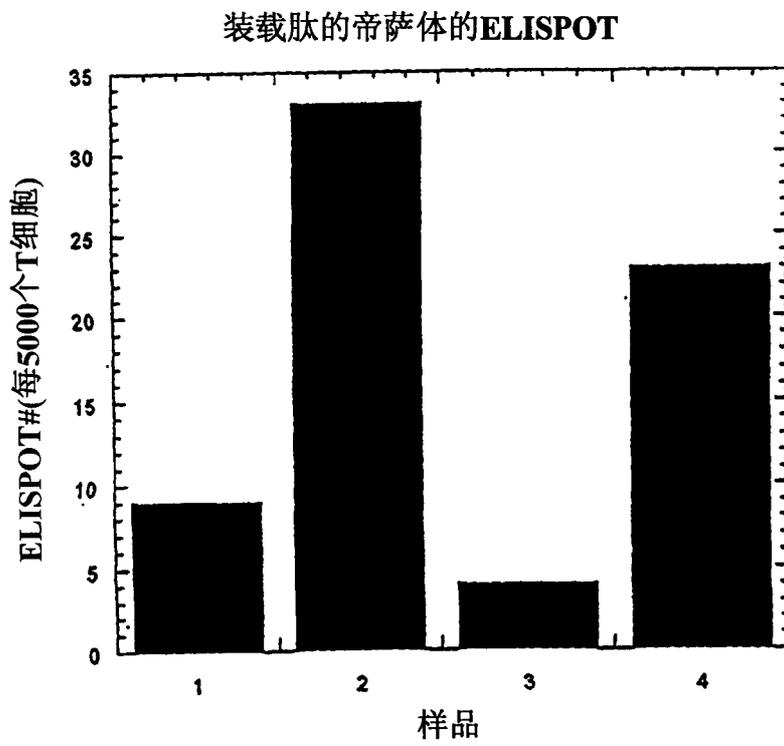


图2

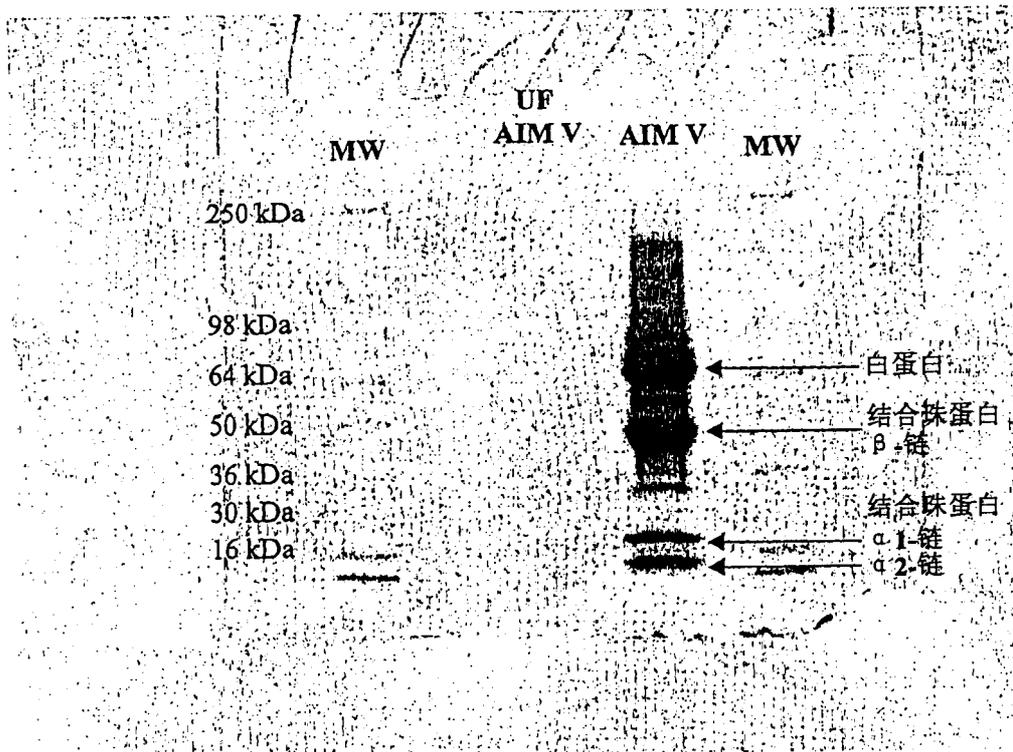


图3

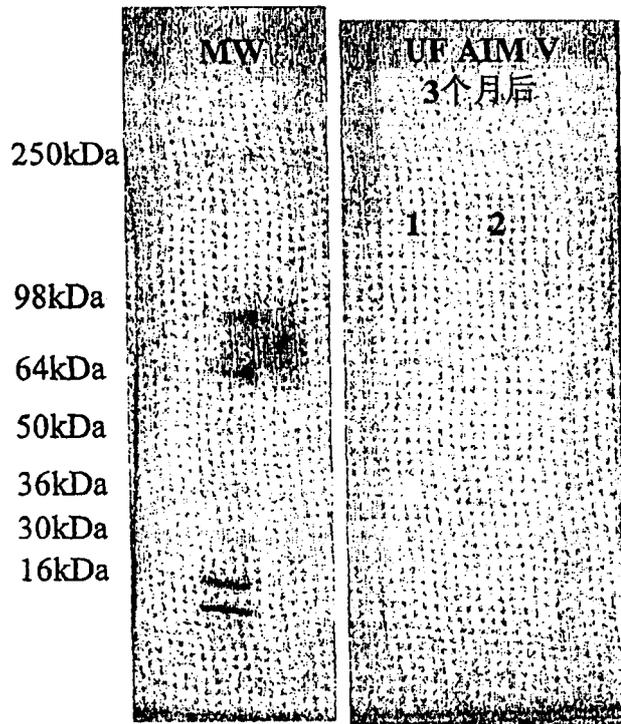


图4

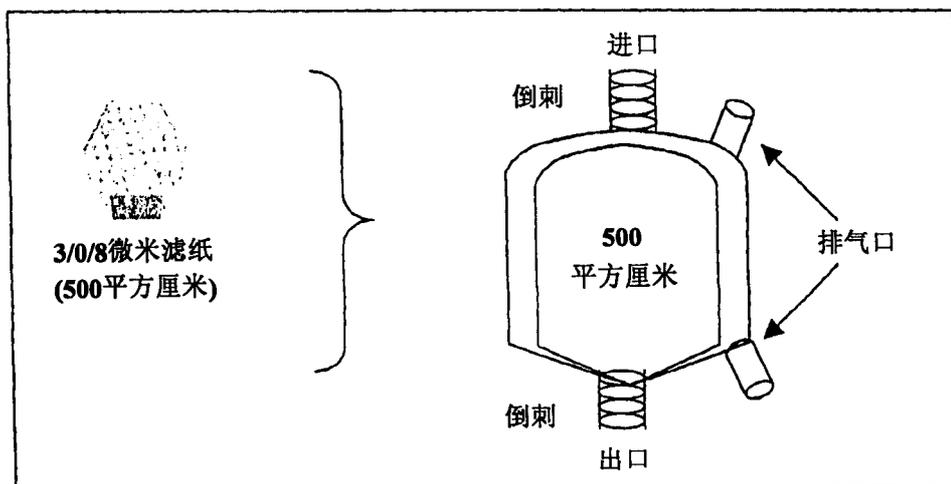
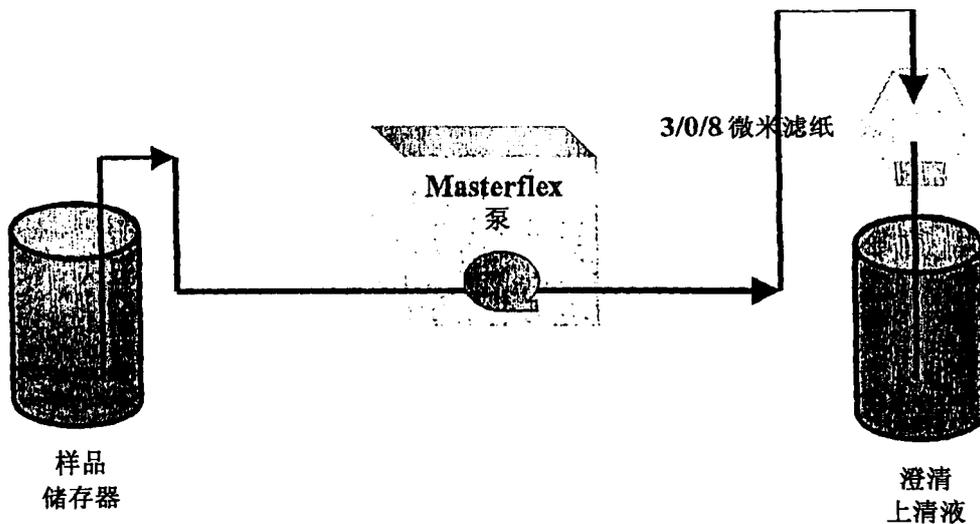


图5

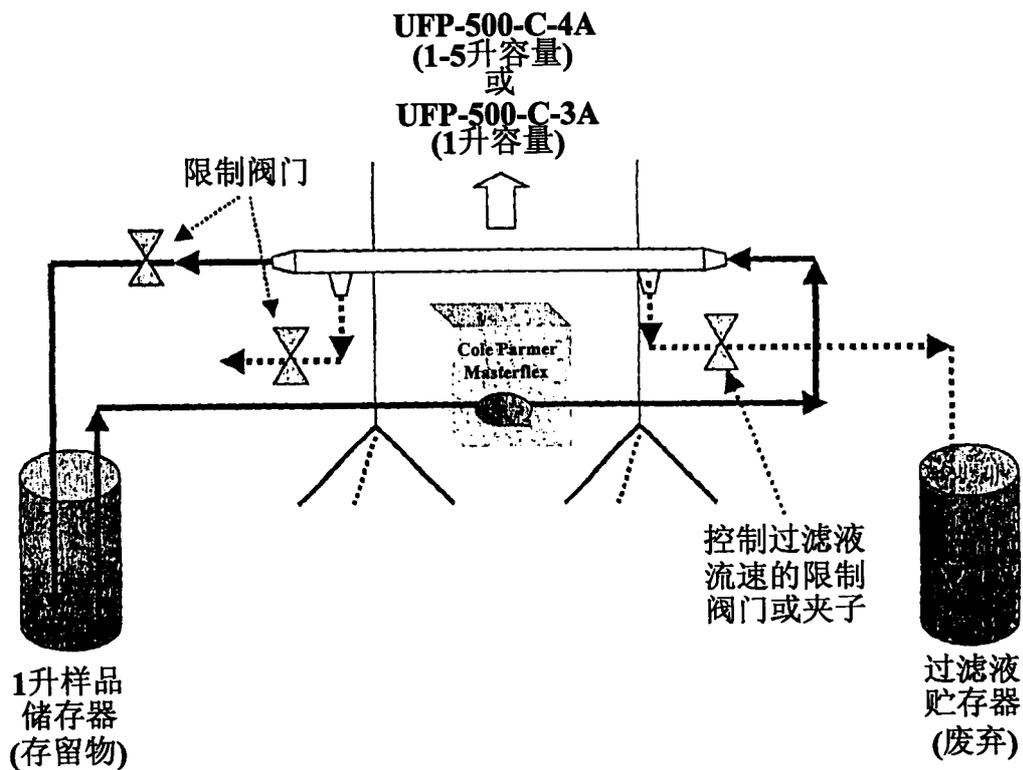


图6

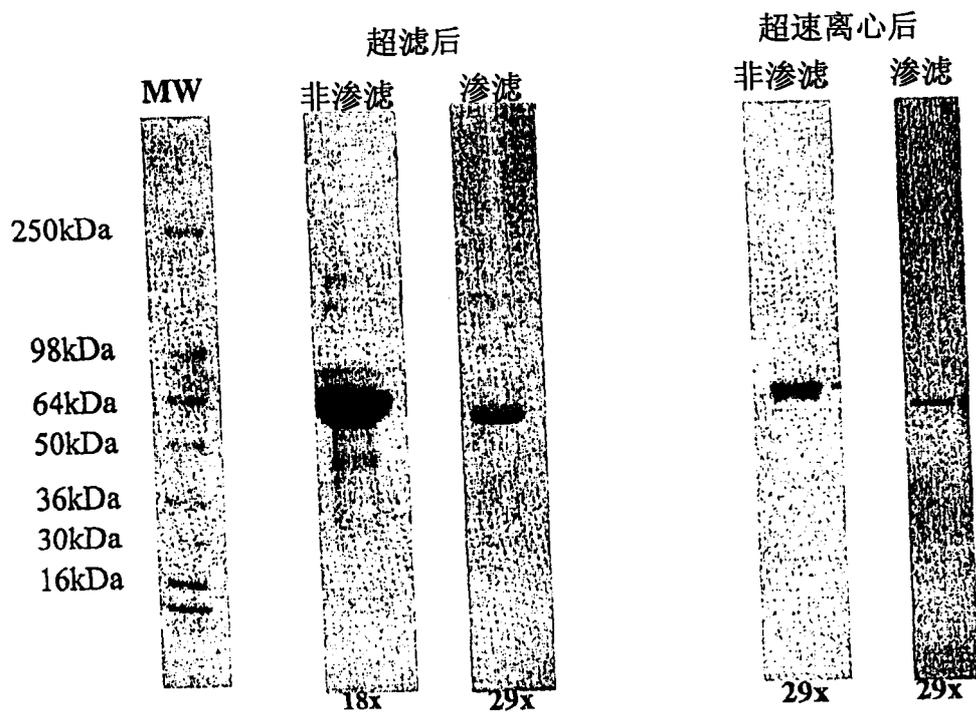


图7

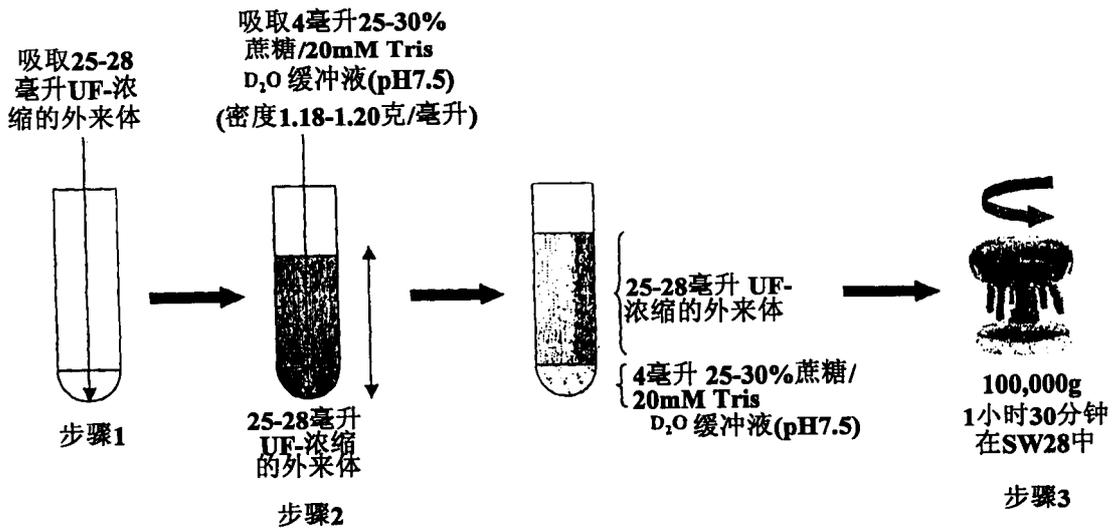


图8a

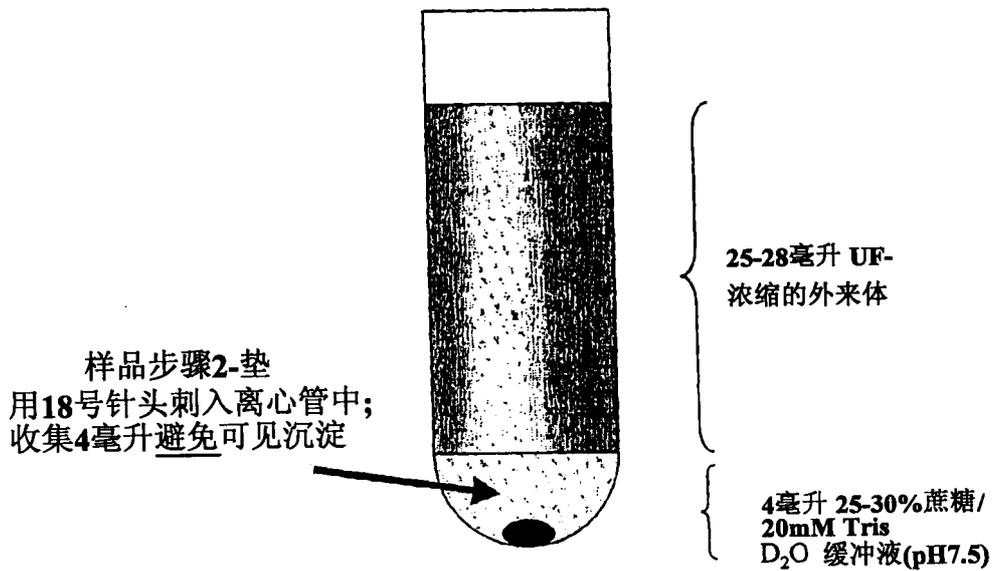


图8b

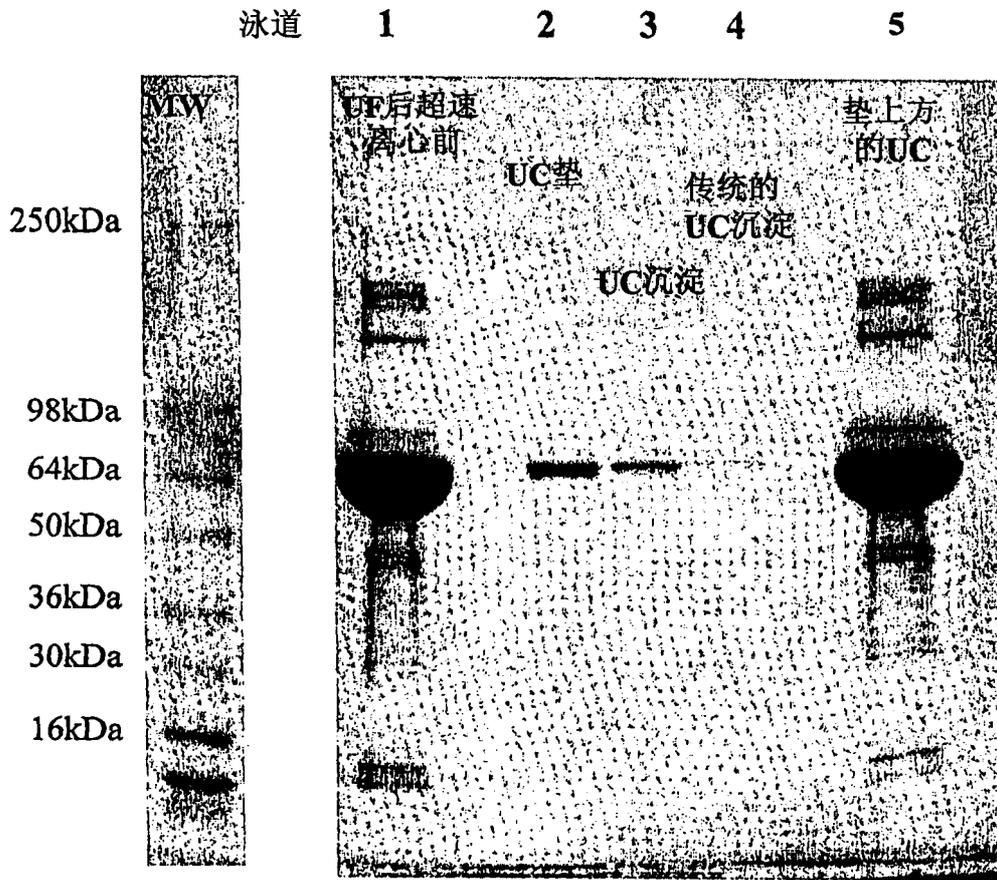


图9a

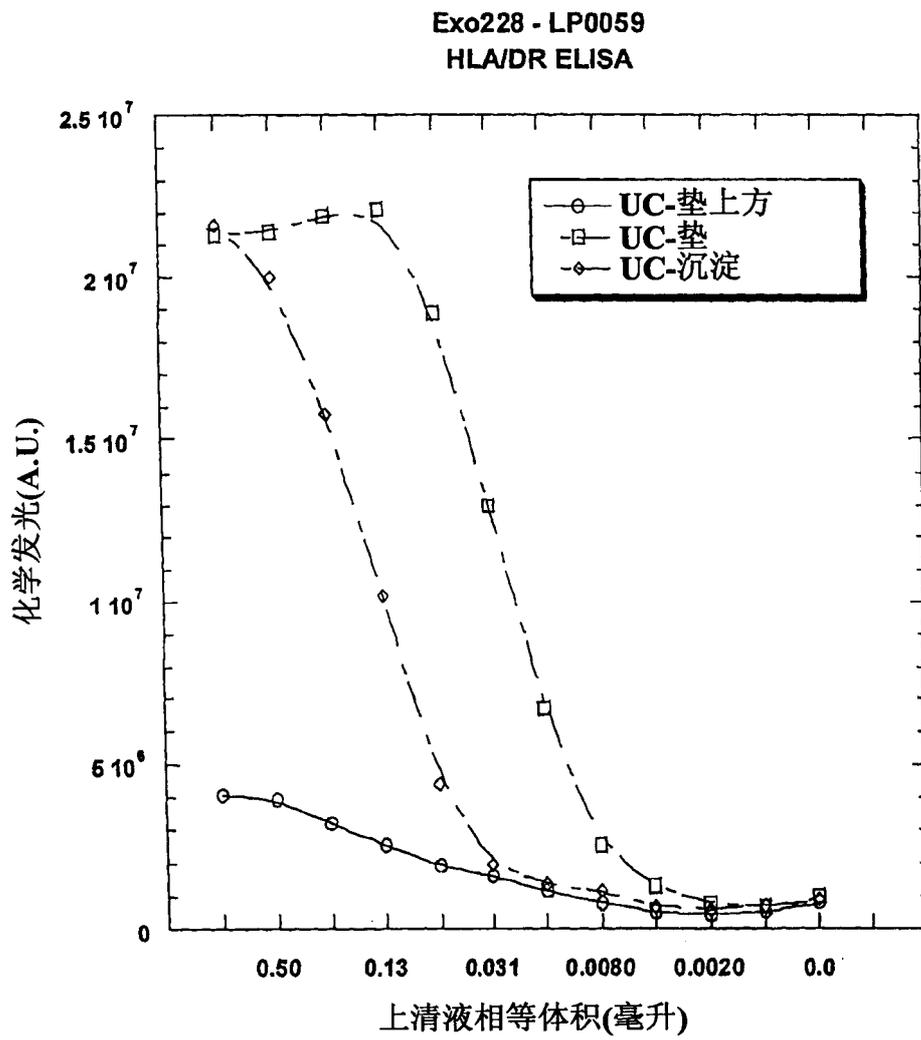


图9b

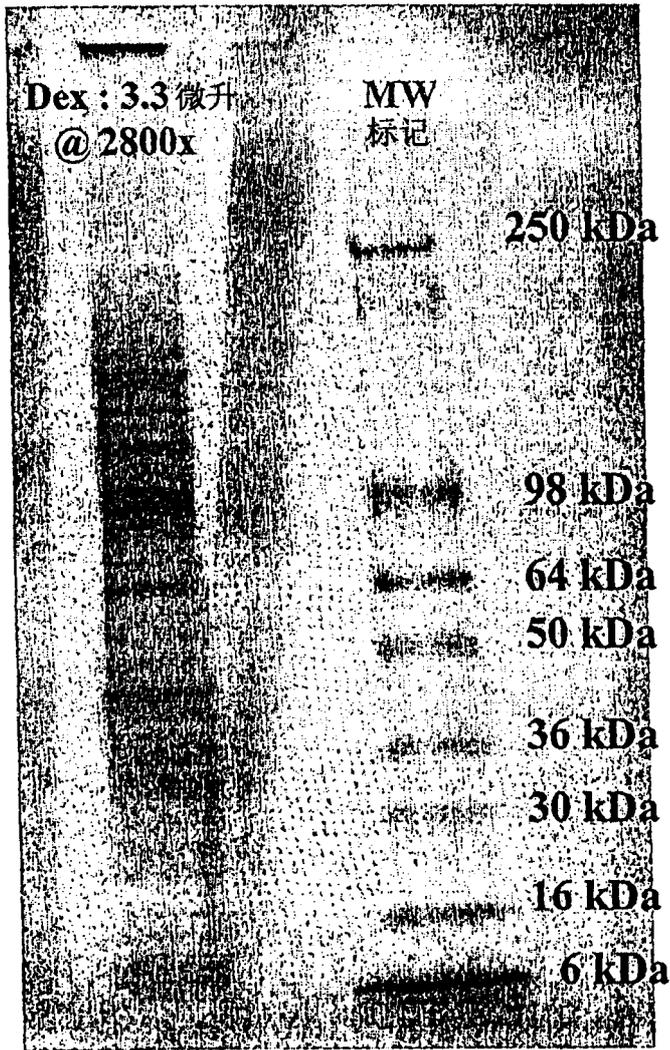


图10

CD81 ELISA比较DC-溶胞产物,通过形成沉淀分离的外来体和
在密度垫上通过超速离心分离的外来体

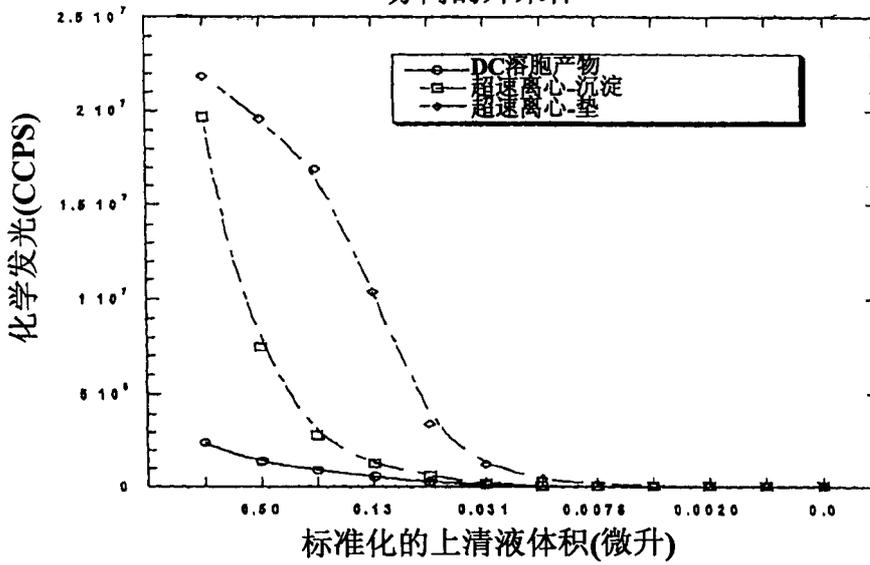


图11a

HLA-DR ELISA比较DC-溶胞产物,通过形成沉淀分离的外来体和
在密度垫上通过超速离心分离的外来体

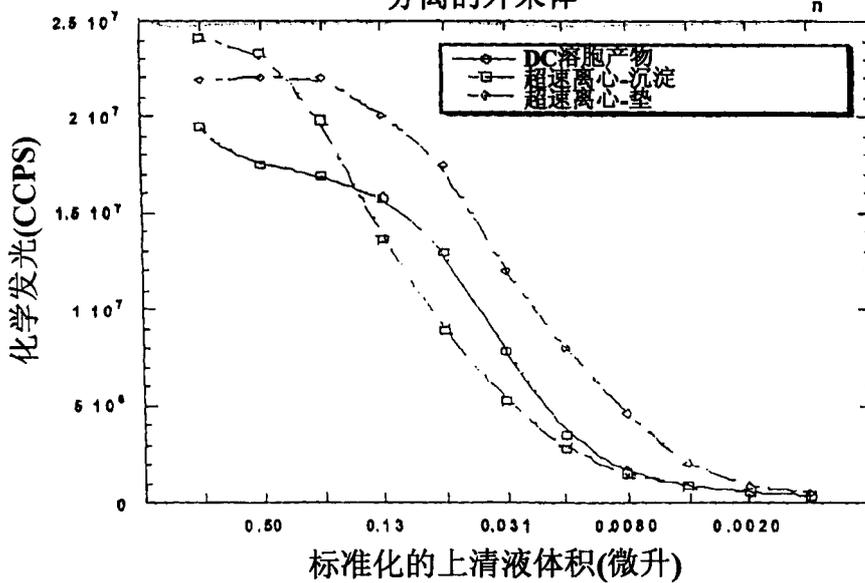


图11b

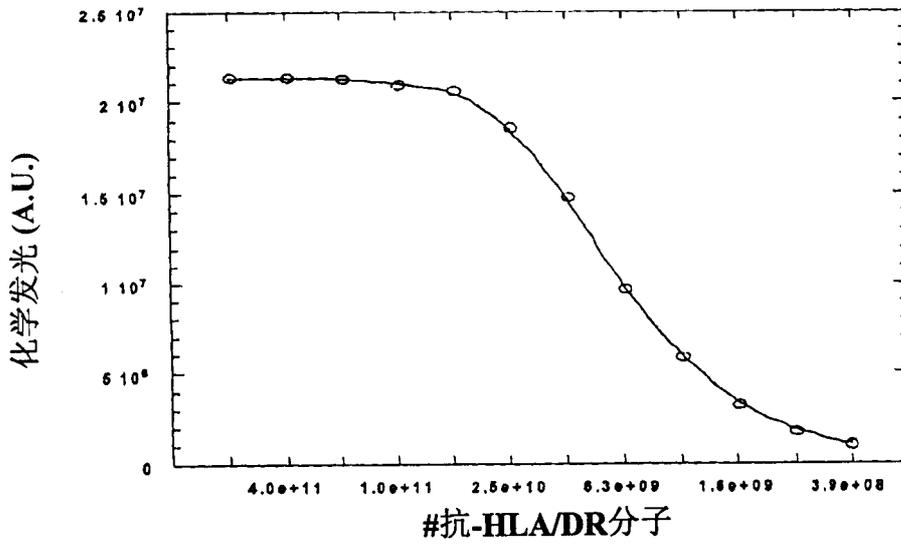


图12a

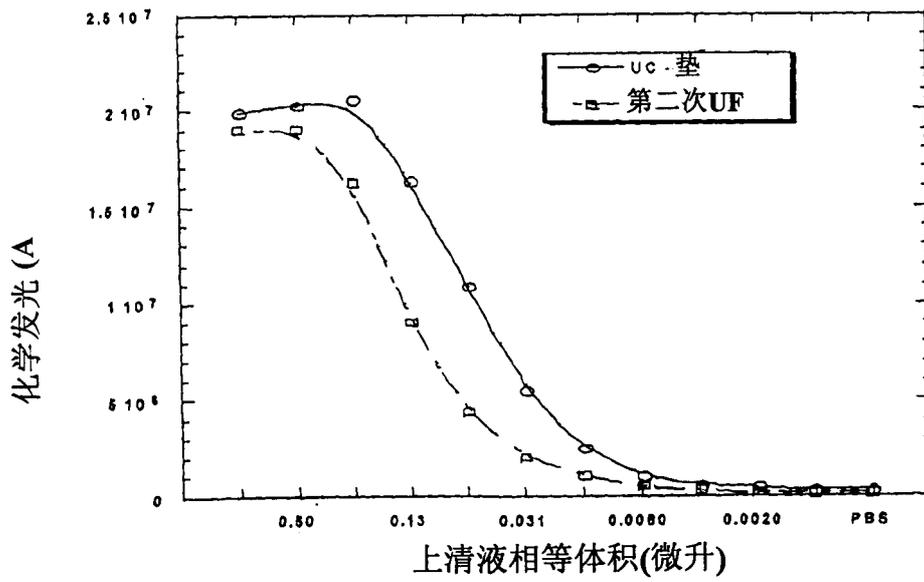


图12b

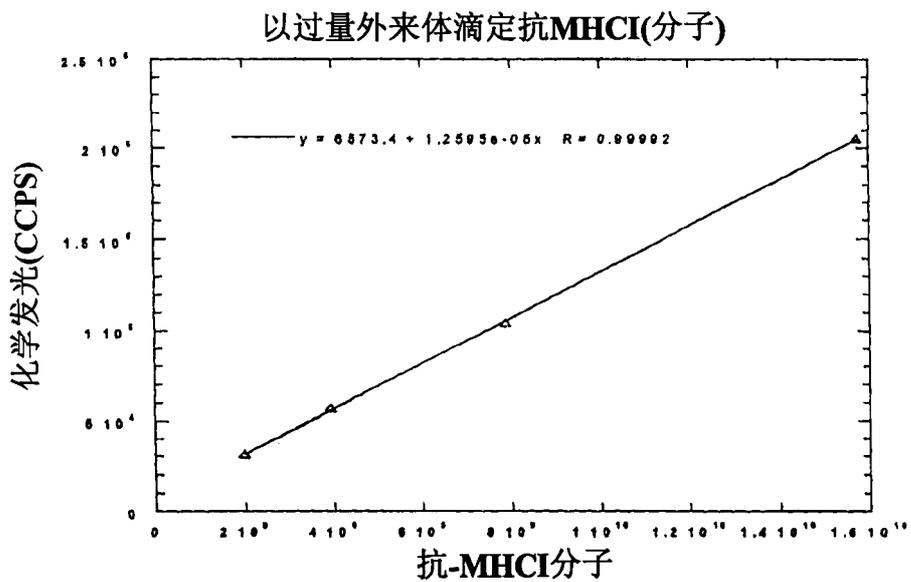


图12c

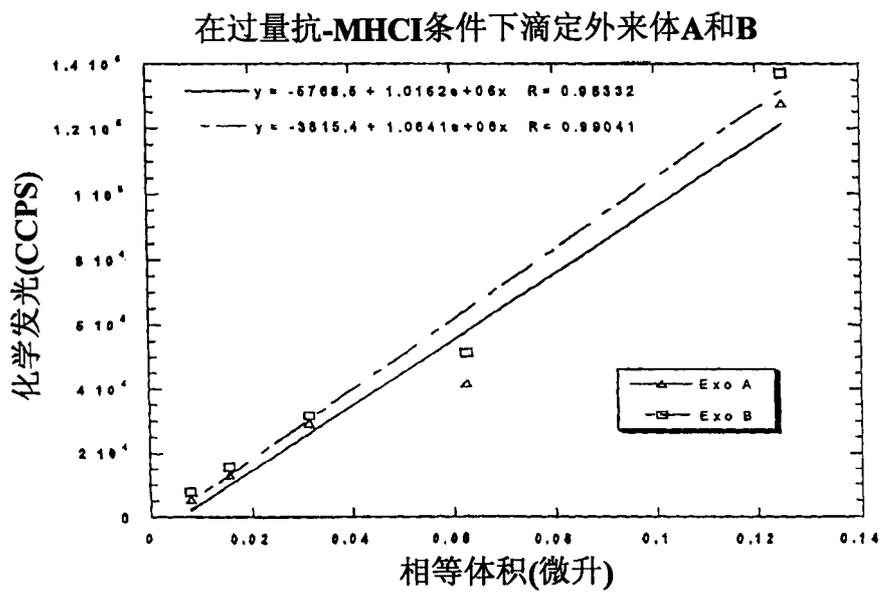


图12d

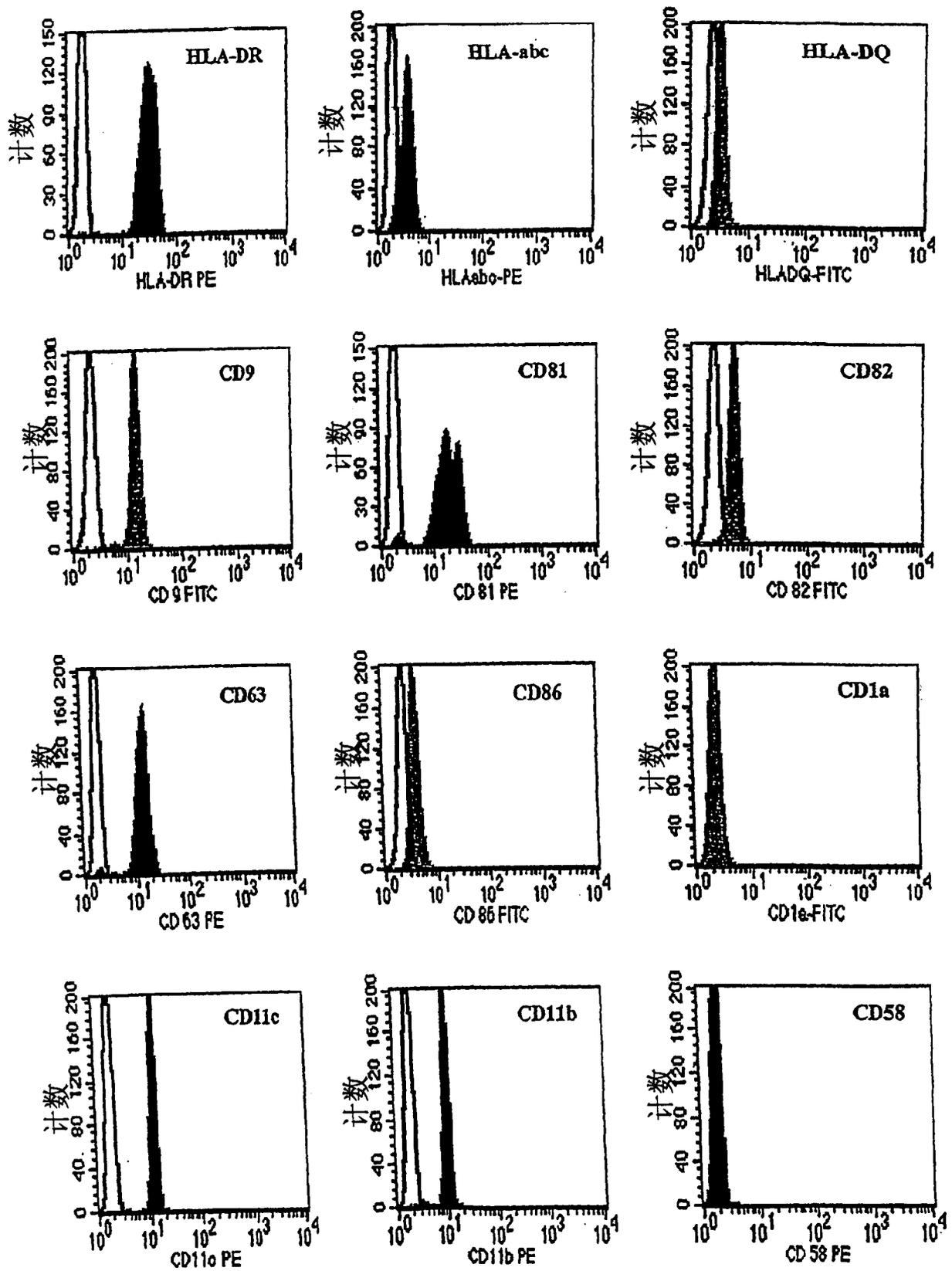


图13a

外来体

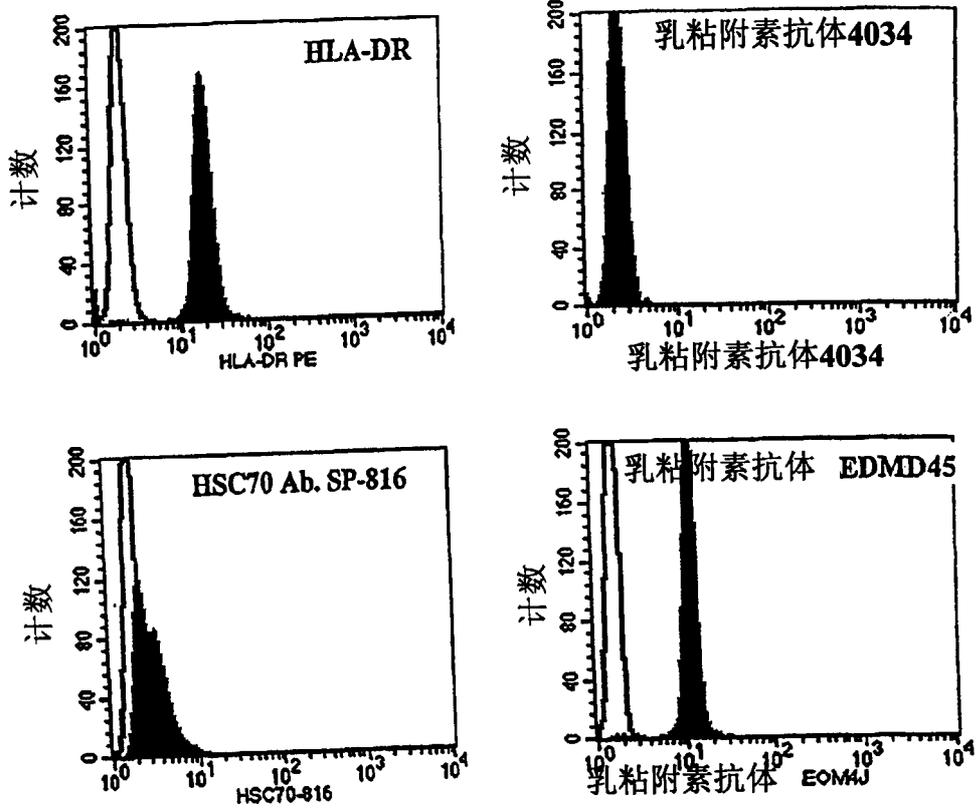


图13b

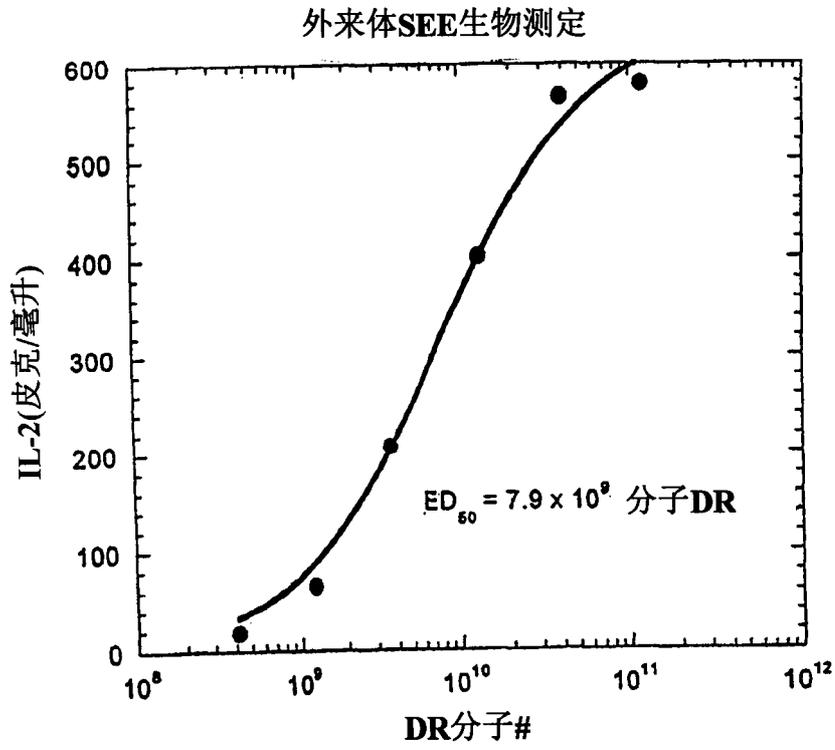


图14

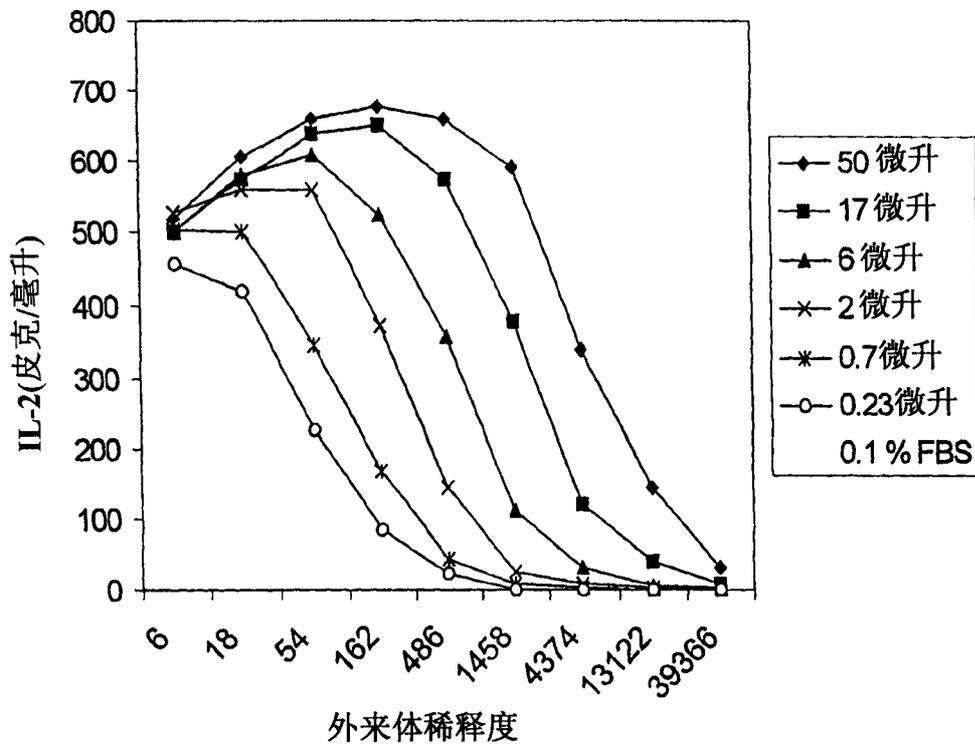


图15

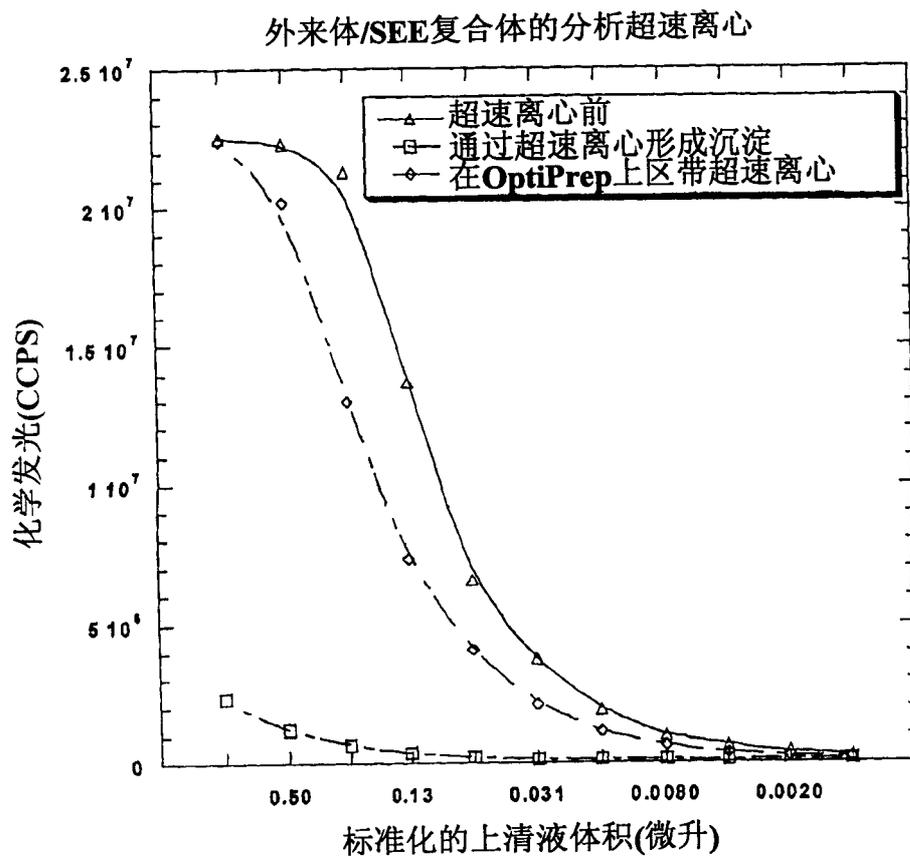


图16

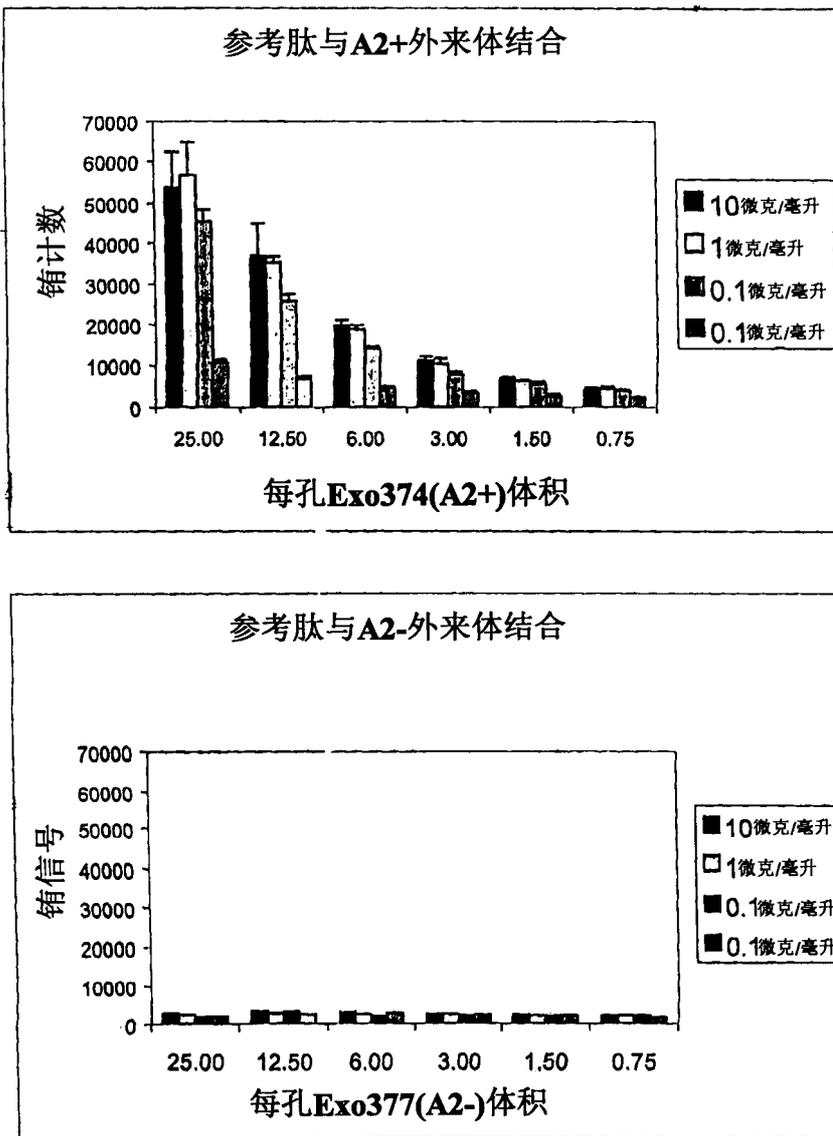


图17

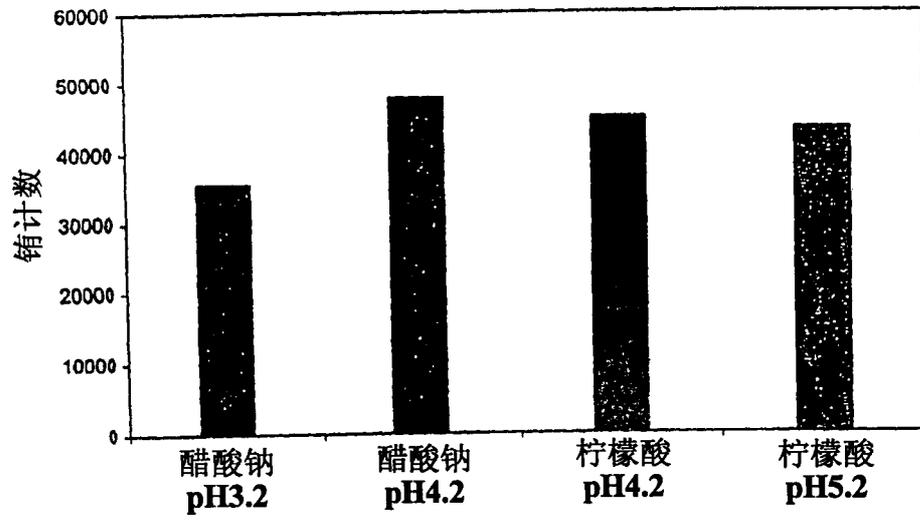


图18

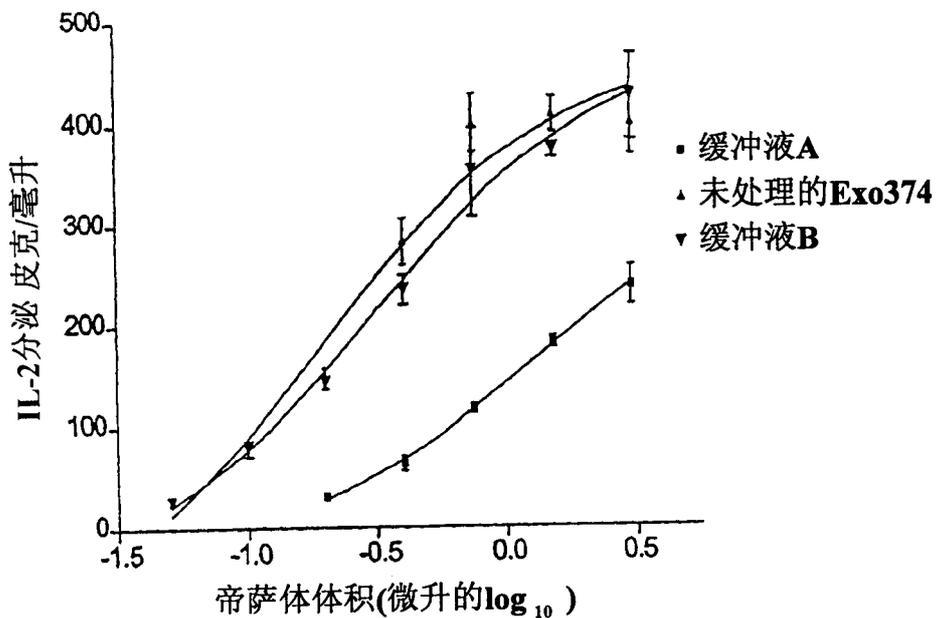


图19

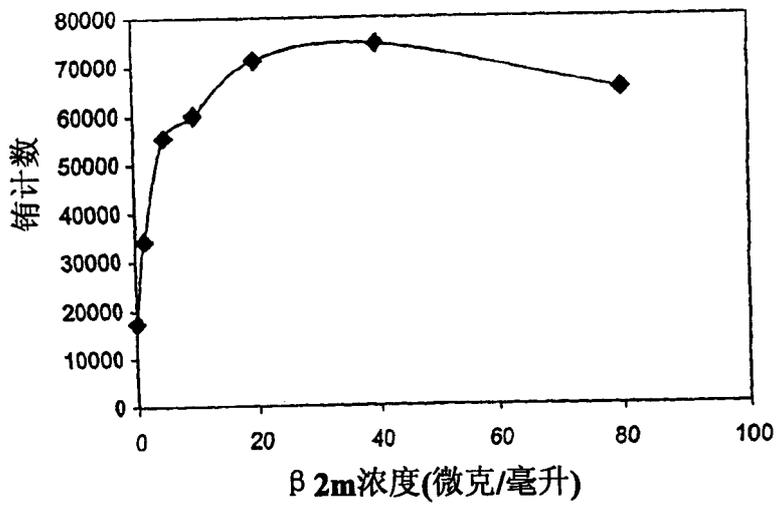


图20

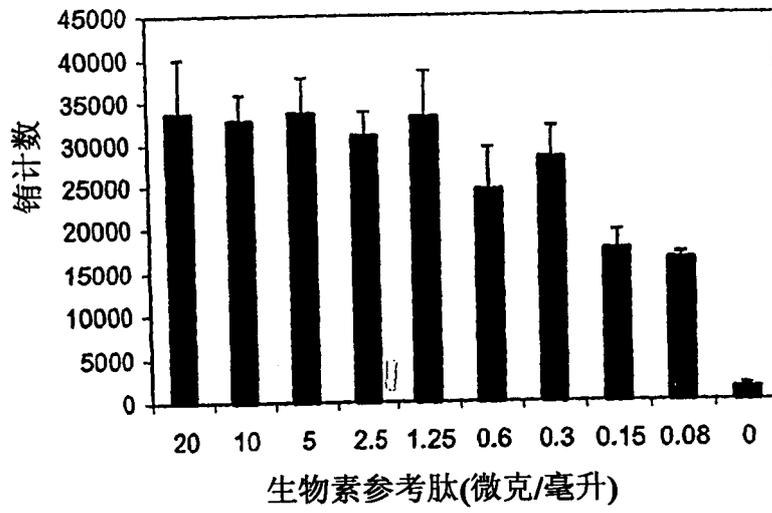


图21

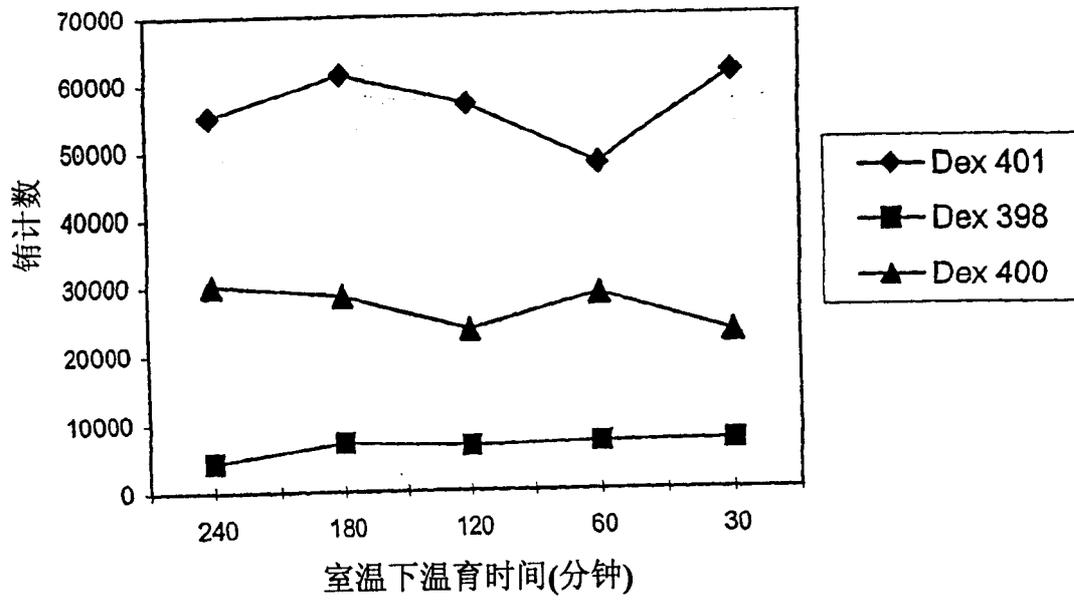


图22

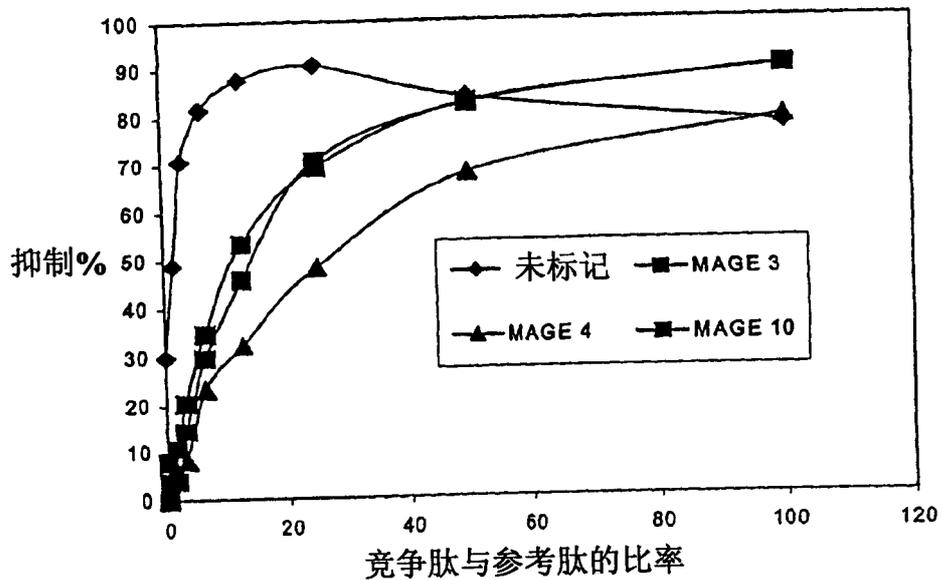


图23

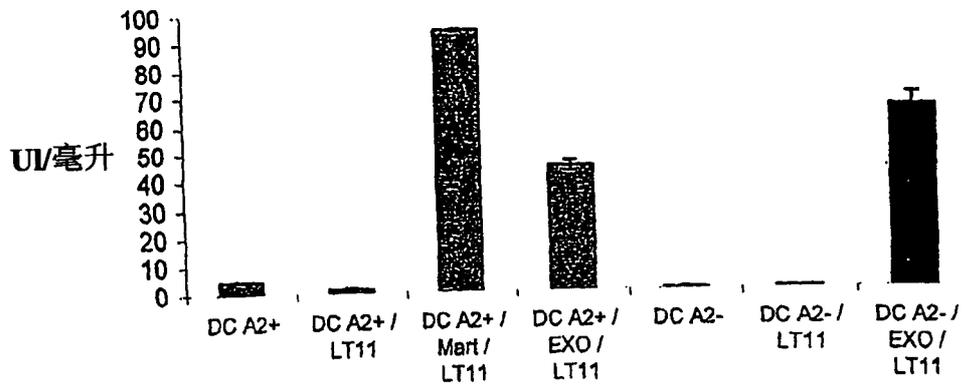


图24

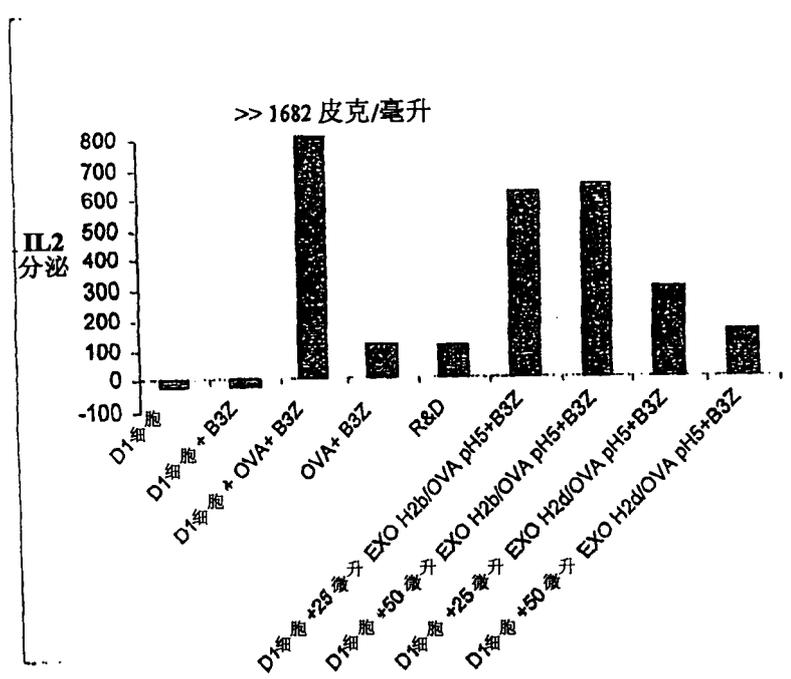


图25

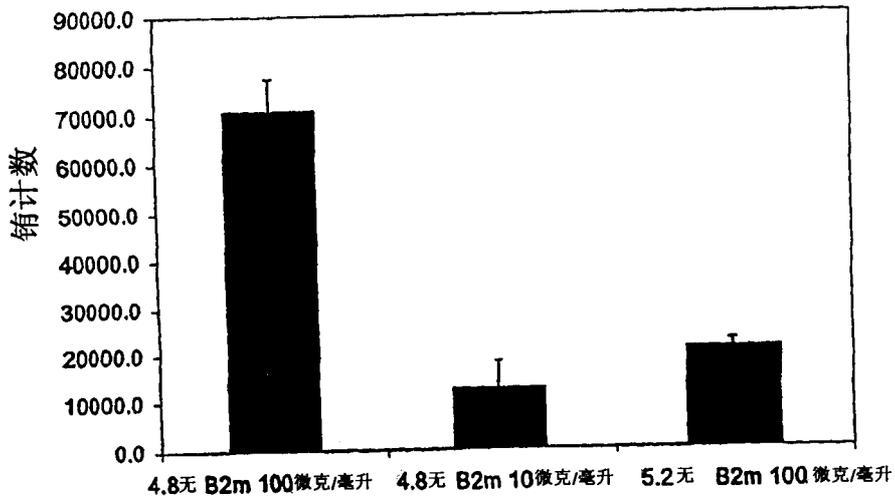


图26

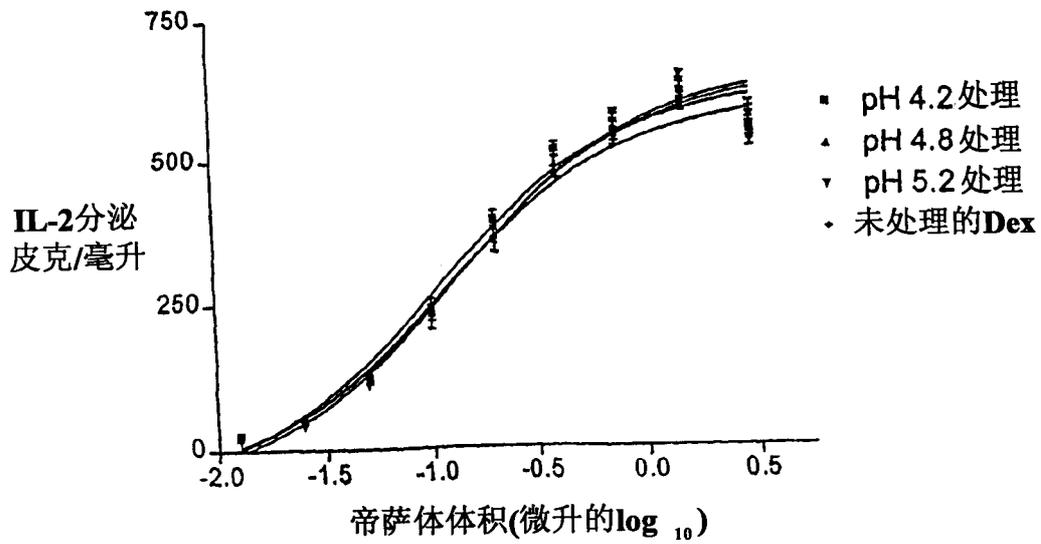


图27

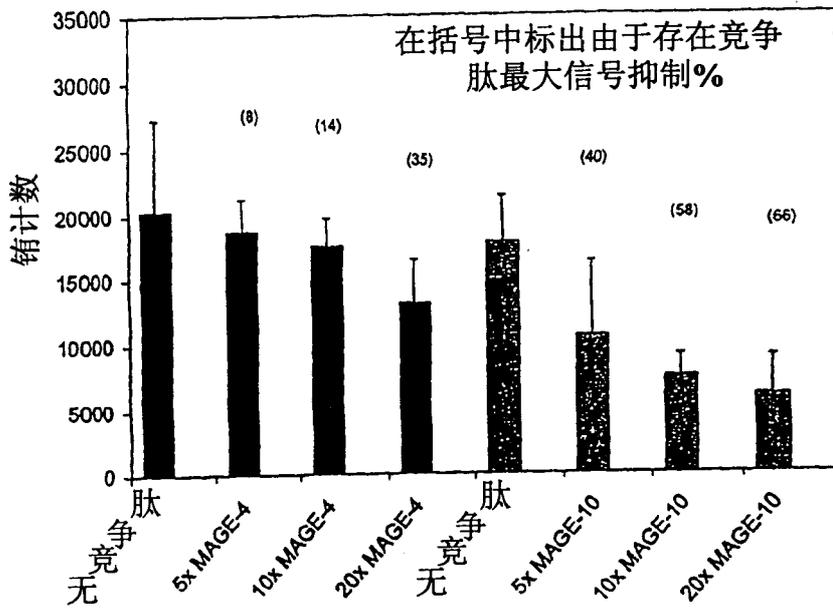


图28

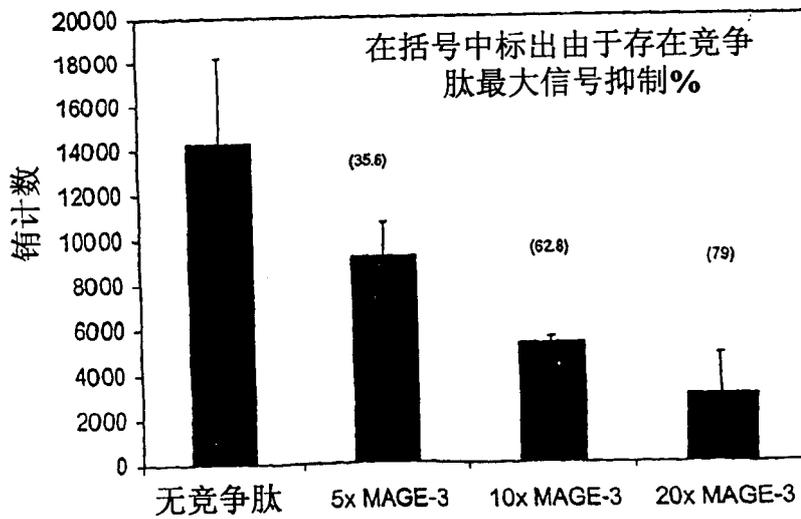


图29

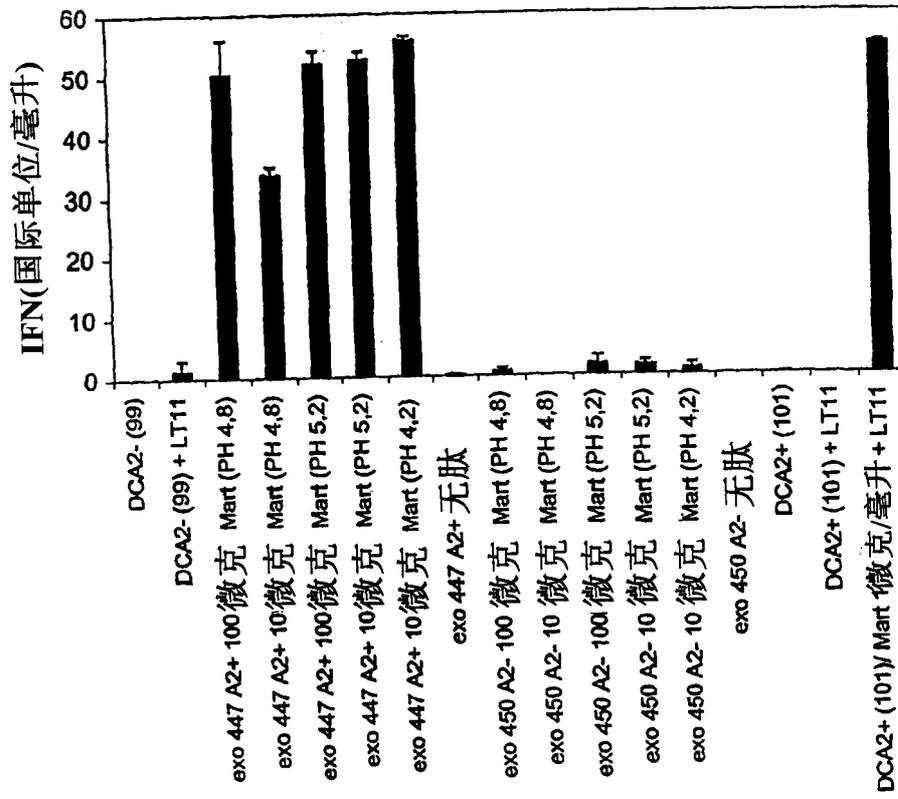


图30

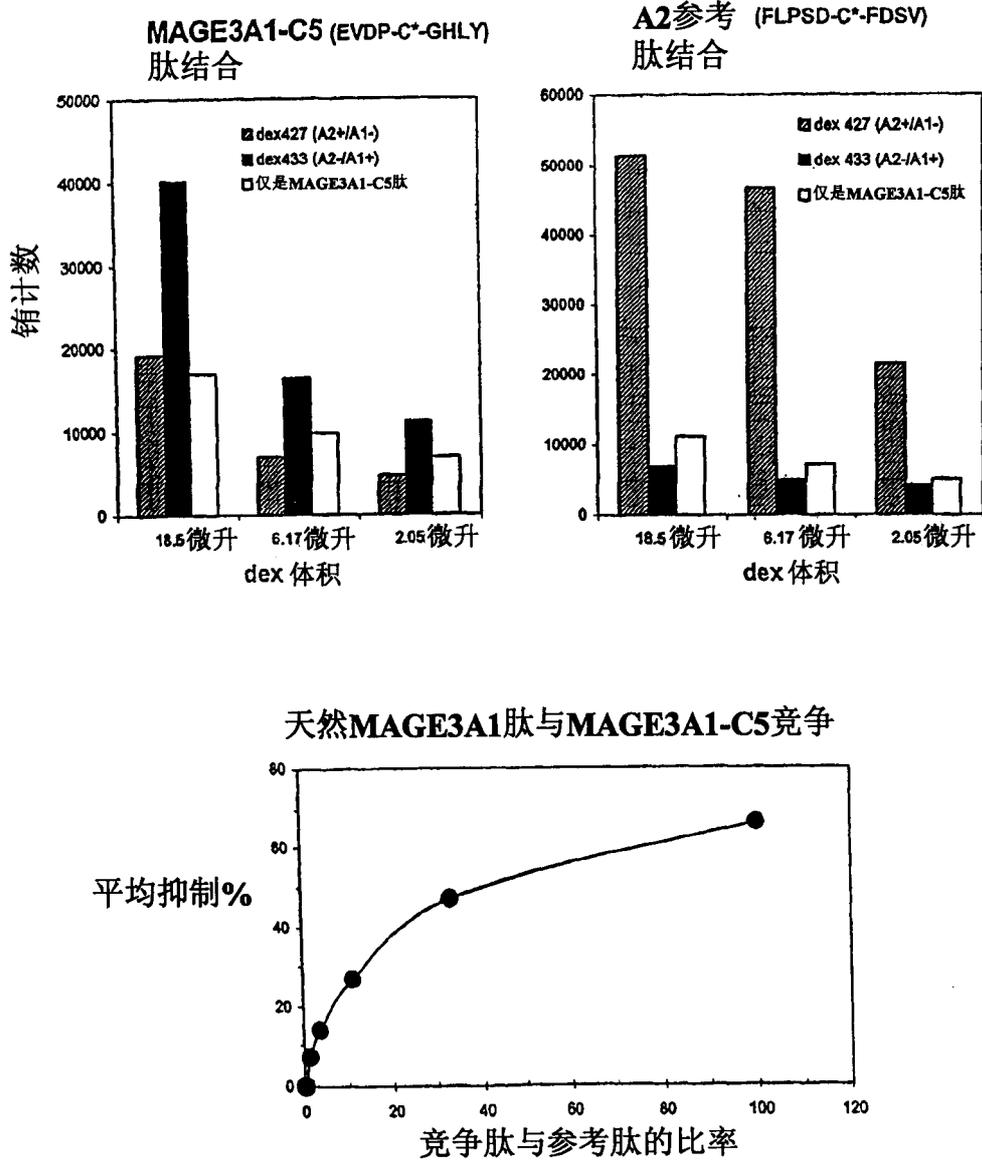


图31

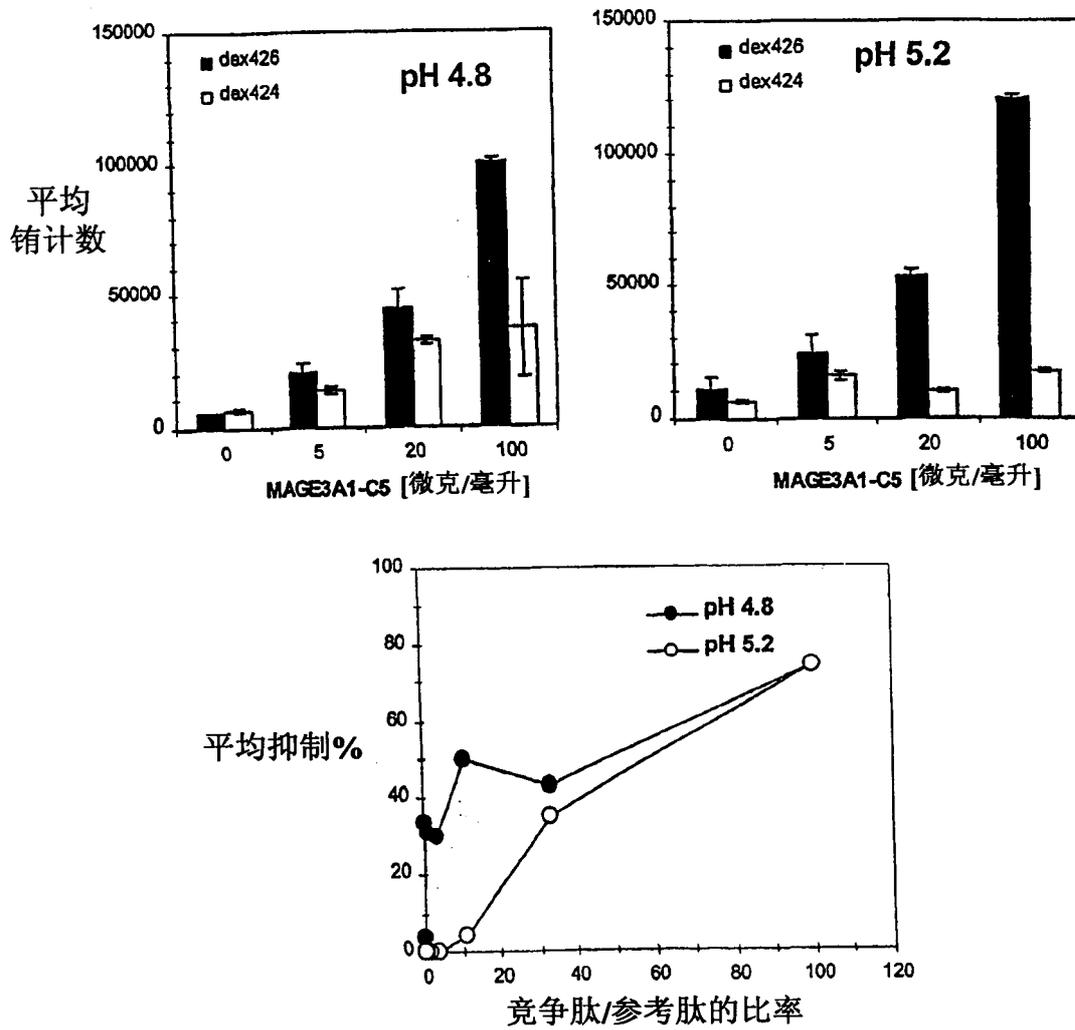


图32

专利名称(译)	膜囊的生产方法		
公开(公告)号	CN1426461A	公开(公告)日	2003-06-25
申请号	CN01808615.2	申请日	2001-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	阿诺塞斯公司		
申请(专利权)人(译)	阿诺塞斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿诺塞斯公司		
[标]发明人	亨利兰帕斯基		
发明人	亨利·兰帕斯基 可蒂斯·路格 珍·柏纳德·莱佩克 迪·威·徐 珍奎·尤恩·耀		
IPC分类号	C12N5/02 A61K39/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/08 C12N5/0784 C23C16/44 C23C16/509 G01N33/543 H01J37/32 C12N5/06 C12N5/08 G01N33/53 C07K14/765 C07K14/745 C07K16/00		
CPC分类号	C12N2500/99 A61K2039/55555 A61K39/0011 H01J37/32431 C12N2501/23 C23C16/4401 C12N2501/22 A61K2039/5154 C12N5/0639 G01N33/5432 C23C16/509 C12N2501/24 A61P11/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/08 C12N2500/90		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	09/561205 2000-04-27 US 09/780748 2001-02-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及制备用于各种实验、诊断或治疗用途包括免疫治疗处理或肿瘤预防的生物物质的方法。更具体而言，本发明涉及制备由各种类型的哺乳动物细胞释放的膜囊(特别是外来体)的方法，其包括渗滤和/或密度垫离心。本发明亦提供鉴别和分析外来体制品的新型方法，为了药物产品生产的目的是，其可用于质量控制的测定中。本发明适用于生产这类膜囊的药物级的制品，并为了用于人类充分鉴别了该制品特征。

