

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310108039.7

C12N 5/08

C12P 19/34

C12P 21/00

G01N 33/53

A61K 39/00

A61K 39/395

A61K 45/00

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1609197A

[22] 申请日 2003. 10. 17

[21] 申请号 200310108039.7

[71] 申请人 上海普泛生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区春晓路 122 弄 34 号 2 号楼

[72] 发明人 范青青 曾 钢

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所

代理人 余明伟

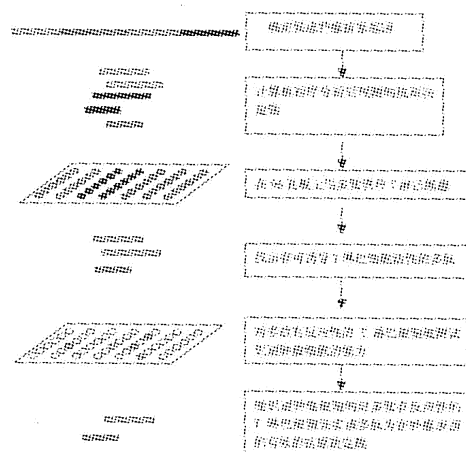
A61P 37/04

权利要求书 4 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种用于发现肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇的高产率逆反免疫法

[57] 摘要

本发明公开了一种使用从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞(或肿瘤穿透淋巴细胞)来寻找有肿瘤特异性的、被某一人种肿瘤细胞上的特定 HLA 类受体呈献而且为 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞识别的、从一个特定的候选肿瘤抗原上获得的抗原决定簇的方法;本发明还公开一种用在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原,以及从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞(或肿瘤穿透淋巴细胞),来筛选细胞免疫疗法对特定种族的病人的潜在疗效的方法;本发明还公开了一种用体外扩增产生对抗原或抗原决定簇有特异反应性的 T 淋巴细胞,来进行细胞寄抚转移疗法,或研制治疗性疫苗以激活细胞免疫系统的方法。



1. 一种使用从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞，寻找有肿瘤特异性的、被某一人种肿瘤细胞上的特定 HLA 类受体呈献、为 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞识别的、从一个特定的候选肿瘤抗原上获得的抗原决定簇的方法，该方法包括：
 - a. 建立一个表达所需的 HLA 受体种类的靶标细胞系，这些靶标细胞还表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过；
 - b. 分析候选肿瘤抗原基因，预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列，根据预测的粘合序列合成一系列的多肽；
 - c. 用这些多肽刺激从病人身上提取的环周血液单核细胞；
 - d. 把激活的环周血液单核细胞和靶标细胞共同培养，找出对多肽有反应性的 T 淋巴细胞；
 - e. 把对多肽有反应性的 T 淋巴细胞和从同一病人上所得的肿瘤细胞共同培养，找出对肿瘤有反应性的 T 淋巴细胞；
 - f. 当一个对多肽有反应性的 T 淋巴细胞克隆被证实可以识别肿瘤细胞，则证实该多肽为此 HLA 受体所呈献的有效的抗原决定簇。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中用于建立靶标细胞的细胞系是 293 细胞系、或 BHK 细胞系、或 Cos 细胞系。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中靶标细胞上表达的 HLA 受体是特异于中国人群的，属于 HLA-A24、或 HLA-A2、或 HLA-DP5、或 HLA-DR4。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中用于扩增 T 淋巴细胞或环周血液单核细胞的培养液包含 interleukine-2、PHA-2 和抗 CD28 的抗体。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中肿瘤反应性 T 淋巴细胞和对多肽有反应性的 T 淋巴细胞是通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来确定的。
6. 一种使用从病人身上收集的肿瘤样品和肿瘤穿透淋巴细胞，寻找有肿瘤特异性的、被某一人种的特定 HLA 类受体呈献、为 CD4 阳性淋巴细

胞或 CD8 阳性淋巴细胞识别的、从一个特定的候选肿瘤抗原上来的抗原决定簇的方法，该方法包括：

- a. 建立一个表达所需的 HLA 受体种类的靶标细胞系，这些靶标细胞还表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过；
 - b. 分析候选肿瘤抗原基因，预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列，根据预测的粘合序列合成一系列的多肽；
 - c. 用这些多肽刺激从病人提取的肿瘤穿透淋巴细胞；
 - d. 把激活的肿瘤穿透淋巴细胞和靶标细胞共同培养，找出对多肽有反应性的 T 淋巴细胞；
 - e. 把对多肽有反应性的 T 淋巴细胞和从同一病人上所得的肿瘤细胞共同培养，找出对肿瘤有反应性的 T 淋巴细胞；
 - f. 当一个对多肽有反应性的 T 淋巴细胞克隆被证实可以识别肿瘤细胞，则证实该多肽为此 HLA 受体所呈献的有效的抗原决定簇。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中用于建立靶标细胞的细胞系是 293 细胞系、或 BHK 细胞系、或 Cos 细胞系。
8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中靶标细胞上表达的 HLA 受体是特异于中国人群的，是 HLA-A24、或 HLA-A2、或 HLA-DP5、或 HLA-DR4。
9. 根据权利要求 6 所述的方法，其中用于扩增 T 淋巴细胞或环周血液单核细胞的培养液包含 interleukine-2、PHA-2 和抗 CD28 的抗体。
10. 根据权利要求 6 所述的方法，其中肿瘤反应性 T 淋巴细胞和对多肽有反应性的 T 淋巴细胞是通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来确定的。
11. 一种用在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原，以及从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞，来筛选细胞免疫疗法对特定种族病人的潜在疗效的方法，该方法包括：
- a. 建立一个表达所需的 HLA 受体种类的靶标细胞系，这些靶标细胞还表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过；

- b. 分析候选肿瘤抗原基因, 预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列, 根据预测的粘合序列合成一系列的多肽;
 - c. 用这些多肽刺激从病人提取的环周血液单核细胞;
 - d. 把激活的环周血液单核细胞和靶标细胞共同培养, 决定对多肽有反应性的 T 淋巴细胞的相对频率。
12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中用于建立靶标细胞的细胞系是 293 细胞系, 或 BHK 细胞系, 或 Cos 细胞系。
13. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中靶标细胞上表达的 HLA 受体是特异于中国人群的, 是 HLA-A24, 或 HLA-A2, 或 HLA-DP5, 或 HLA-DR4。
14. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中用于扩增 T 淋巴细胞或环周血液单核细胞的培养液中包含 interleukine-2, PHA-2 和抗 CD28 的抗体。
15. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中肿瘤反应性 T 淋巴细胞和对多肽有反应性的 T 淋巴细胞是通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来确定的。
16. 一种用在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫元, 以及从病人身上收集的肿瘤样品和肿瘤穿透淋巴细胞, 来筛选细胞免疫疗法对特定种族的病人的潜在疗效的方法, 该方法包括:
- a. 建立一个表达所需的 HLA 受体种类的靶标细胞系, 这些靶标细胞还表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过;
 - b. 分析候选肿瘤抗原基因, 预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列, 根据预测的粘合序列合成一系列的多肽;
 - c. 用这些多肽刺激从病人提取的肿瘤穿透淋巴细胞;
 - d. 把激活的肿瘤穿透淋巴细胞和靶标细胞共同培养, 决定对多肽有反应性的 T 淋巴细胞的相对频率。
17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中用于建立靶标细胞的细胞系是 293 细胞系, 或 BHK 细胞系, 或 Cos 细胞系。
18. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中靶标细胞上表达的 HLA 受体是特异于中国人群的, 是 HLA-A24, 或 HLA-A2, 或 HLA-DP5, 或 HLA-DR4。

-
19. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中用于扩增 T 淋巴细胞或环周血液单核细胞的培养液中包含 interleukine-2, PHA-2 和抗 CD28 的抗体。
 20. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中肿瘤反应性 T 淋巴细胞和对多肽有反应性的 T 淋巴细胞是通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来确定的。
 21. 一种用体外扩增来产生对抗原或抗原决定簇有特异反应性的 T 淋巴细胞, 进行细胞寄抚转移疗法, 或研制治疗性疫苗以激活细胞免疫系统的方法, 包括:
 - a. 用来培养 T 淋巴细胞的高产率模式, 选用 96 孔、或 192 孔、或 384 孔、或更多孔的培养板, 刺激 T 淋巴细胞生长; 或
 - b. 用来检析 T 淋巴细胞活性的高产率模式, 选用 96 孔、或 192 孔、或 384 孔、或更多孔的培养板, 检析细胞间激素或细胞生死情况。

一种用于发现肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇的 高产率逆反免疫法

技术领域

本发明涉及肿瘤免疫学领域，进一步地，本发明涉及一种用于发现肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇的高产率逆反免疫法。

背景技术

许多研究表明，可利用操作人体免疫系统来达到控制和治疗癌症的目的，比如利用机体的粘液免疫反应，可针对各种生长因子受体和细胞表面标志分子开发单克隆抗体，以达到治疗癌症的效果；另一方面，利用激活人体免疫系统的细胞免疫反应，特异性地杀死肿瘤细胞，达到治疗癌症的方法已越来越得到重视。

人体免疫系统的细胞免疫反应主要是通过 T 淋巴细胞（T lymphocytes）来实现的。T 淋巴细胞可分为 CD8 阳性的杀伤性 T 淋巴细胞（CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte, CTL 或 Tc）和 CD4 阳性的辅助性 T 淋巴细胞（CD4⁺ T-helper lymphocytes）。CD8 阳性的杀伤性 T 淋巴细胞（CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte, CTL 或 Tc）和 CD4 阳性的辅助性 T 淋巴细胞都识别人类白血球抗原（Human Leukocyte Antigen, HLA）、人类主要相容性复合体（Major Histocompatibility Complex, MHC）表面沟的多肽抗原。这些抗原位于细胞表面。CD8 阳性的 T 淋巴细胞可识别 MHC I 类 HLA 抗原的 8-10 个氨基酸长的多肽部分，这些多肽是细胞质蛋白通过降解而产生的，通过内质网膜呈献在细胞表面的 MHC I 类 HLA 抗原。而 CD4 阳性的辅助性 T 淋巴细胞识别的多肽抗原是经过不同的细胞通道：细胞外蛋白经过细胞胞吞进入细胞，在细胞内的内吞体（endosome）被降解成短的多肽抗原，呈献在细胞表面的 MHC II 类 HLA 抗原，CD4 阳性的辅助性 T 淋巴细胞识别 MHC II 类 HLA 抗原和 11-13 个氨基酸长的多肽抗原形成的复合

体。T 淋巴细胞识别抗原是通过同时识别多肽抗原和特异的 HLA 抗原形成的。

用于激起细胞免疫反应的方法包括过继免疫法，利用转移具有肿瘤抗性的免疫细胞，和使用疫苗的主动免疫法，利用刺激病人的免疫系统来大量产生具有肿瘤抗性的免疫细胞。

过继免疫法始于八十年代的临床研究，这些研究表明穿透固体肿瘤的淋巴细胞（简称肿瘤穿透细胞）可以从切除的黑色素肿瘤样品的单细胞悬浮液中获取并进行体外扩增，然后把这些体外扩增的细胞加上高剂量的 IL-2 重新注入黑色素瘤病人体内，可以得到一定的临床治疗效果。但是早期研究仅使用 CD8 阳性的肿瘤穿透细胞，疗效持续时间较短，一般不超过三个月。一项最近完成的研究同时使用了体外扩增的 CD8 阳性肿瘤穿透细胞和 CD4 阳性肿瘤穿透细胞。混合使用两种细胞取得对黑色素瘤病人的显著疗效，持续时间远长于仅用 CD8 阳性肿瘤穿透细胞的疗法。这类研究明显指出肿瘤穿透细胞所识别的肿瘤抗原的潜在用途。

主动免疫法则要求在体内产生大量对肿瘤有高抗性的淋巴细胞。这些细胞必须不为一般肿瘤宽容机制所限制，而且对固体肿瘤有长期持续的免疫抗性。当前主动免疫法主要可分为两大类：基于细胞的疫苗或者基于肿瘤抗原的疫苗。

基于细胞的疫苗最初使用同源或异源的完整肿瘤细胞或肿瘤细胞提取物来免疫，但是一般在完整细胞上肿瘤抗原非常少量，严重限制了这种方法的效果。不同的方法正在被尝试于增强整个肿瘤细胞的免疫性，基于细胞的疫苗现在包括完整肿瘤细胞（同源或异源），基因修改过的肿瘤细胞（让其表达细胞间激素或共激活分子基因），肿瘤细胞提取物（裂解物，细胞膜和热休克蛋白）以及肿瘤细胞和抗原表现细胞的融合体。

人类肿瘤抗原的发现使发展基于肿瘤抗原的疫苗成为可能。这类抗原可以大量使用或突变以增强免疫性，从而导致更强和更可以调控的肿瘤抗性，基于肿瘤抗原的疫苗包括提纯的肿瘤抗原（天然或人工重组的）合成多肽，“裸露”DNA，人工重组的病毒和细菌。

用于克隆呈献在 MHC/HLA I 类受体上的肿瘤抗原（该类抗原的抗原决定簇为 CD8 阳性的 T 淋巴细胞所识别）的技术已有相当发展。许多这类抗

原是通过用肿瘤细胞 cDNA 表达文库, 转化表达适当 HLA 分子的目标细胞, 然后用有肿瘤抗性的 T 淋巴细胞来找出合适的转化子。另外, 从肿瘤细胞表面洗脱的多肽(或从肿瘤细胞纯化出的 HLA 分子上洗脱的多肽)可被脉冲冲到抗原表现细胞上并测试对有特异抗肿瘤的淋巴细胞的反应性, 把这些多肽纯化并测序可以最后发现其肿瘤抗原基因。第三种技术常被称为“逆反免疫法”, 该技术已被成功用于证实在肿瘤细胞中超量或独特表达的蛋白是否肿瘤抗原。另外, 体外敏感化技术也被用于生产对特定候选抗原有抗性的 T 淋巴细胞, 如果这些 T 淋巴细胞能有专门特异性地识别完整的肿瘤细胞, 该候选蛋白则可以认为是一个肿瘤抗原。第四种技术一般称为 SEREX (重组 cDNA 表达文库的血样分析技术)。该技术是基于对一个特定蛋白产生抗体必需辅助 T 淋巴细胞的前提之上。肿瘤病人身上的血清被稀释后用于检测在原核生物(如细菌等)中表达的肿瘤 cDNA 文库, 这种 SEREX 方法一般用于发现可以抗体识别的基因。

相对比之下, 克隆为 MHC/HLA II 类受体所呈献的肿瘤抗原(一般为 CD4 阳性 T 淋巴细胞识别)的技术则因技术上的困难而发展有限。技术困难源于这类肿瘤抗原不是来自细胞外环境就是细胞内源蛋白被运输到特别的 MHC 二类受体的装卸部门, 然后被加工后与 MHC 二类受体粘接上再运到细胞表面。最近一项基于生化蛋白提纯和质谱测序的技术被研发出来。该技术被成功用于发现被同源 CD4 阳性肿瘤穿透淋巴细胞识别的表达在 1558 黑色素瘤细胞系上的独特肿瘤抗原。这个方法可能会对克隆别的高度表达的, 可以被抗原呈献细胞有效地从外环境摄取而且呈献给 CD4 阳性 T 淋巴细胞的蛋白抗原也有用。另一项最近发展的方法则是使用一个 1I-cDNA 翻译融合的文库。这个方法是基于遗传决定, 使用 293 细胞系。该细胞系被基因修饰后表达不变链(1I) DMA、DMB 以及其它 MHC II 类受体加工及表现的重要组成部分基因。该方法也有可能为广泛应用于克隆 MHC II 类抗原。

现有方法在技术上严重限制了其在中国人群肿瘤治疗中的应用。现有的肿瘤穿透细胞的技术以及基于肿瘤穿透细胞的技术适用于黑色素瘤, 而黑色素瘤在中国人群中并不普遍。其它癌症如肺癌、鼻咽癌及肝癌对中国

人群的健康是一个更大的威胁，然而利用现有肿瘤穿透技术来筛选肿瘤抗原，却无法用于这些癌症，主要因为以下两个原因：

1、在绝大部分现用方法中，一旦肿瘤切除后，肿瘤穿透细胞一般通过有限稀释克隆法获得。该方法靠抗 CD3 单克隆抗体（OKT-3），在哺育细胞（FEEDER CELL，例如被照射杀死的异源环周血液单核细胞）的存在下刺激 T 淋巴细胞生长，这个方法被成功用于扩增大量的集体 T 淋巴细胞和从黑色素瘤病人身上克隆 T 淋巴细胞。但是靠 OKT-3 介接的 T 淋巴细胞扩增和克隆技术常导致其失去对黑色素瘤以外肿瘤的特异免疫性。同样的问题也存在于“逆反免疫法”得到的 T 淋巴细胞及体外多肽刺激所得的 T 淋巴细胞。现在流行的一种假说认为，在体内对肿瘤有特异抗性的前体 T 淋巴细胞上的 T 淋巴细胞受体和 CD3 的复合构架已被肿瘤细胞重复刺激，而这些肿瘤细胞本身并非职业的抗原表现细胞并且缺少共激活因子，例如 CD80 和 CD86。因此，在体内 TCR/CD3 信号传导途径已被用竭，而现有的有限稀释克隆法则是依靠 OKT-3 来刺激已用竭的 TCR/CD3 信号传导途径。另外，普遍使用的逆反免疫法靠体外和多肽脉冲过的环周血液单核细胞共同培养以获得 T 淋巴细胞，也是靠 TCR/CD3 途径传导信号，结果，现有的依靠 OKT-3 的 T 淋巴细胞扩增和克隆技术很可能导致对肿瘤有特异抗性的 T 淋巴细胞的主动引导性死亡。

2、由于现今有限稀释法中的技术性限制，迄今为止尚无有效的高产率（high-throughput）方法来大规模发现肿瘤特异性抗原。该类方法对于寻找最有效的抗原以作为未来的疫苗尤其有用。

另外，大多数现有方法是为找寻被 HLA-A2 和其他在高加索人种中常见得 HLA 受体所呈献的抗原而设计的。这些受体在中国人种中不常见，严重限制了已有的抗原决定簇在中国人种中用为疫苗的实用性。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于提供一种使用从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞来寻找有肿瘤特异性的、被某一人种（如中国人种）肿瘤细胞上的特定 HLA 类受体呈献而且为 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞识别的、从一个特定的候选肿瘤抗原上获得的抗原决定

簇的方法，该方法包括：

- a. 建立一个靶标细胞系，这些靶标细胞表达所需的 HLA 受体种类，而且表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过；
- b. 分析候选肿瘤抗原基因，预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列，而且根据预测的粘合序列合成一系列的多肽；
- c. 用这些多肽刺激从病人提取的环周血液单核细胞；
- d. 把激活的环周血液单核细胞和靶标细胞共同培养以找出对多肽有反应性的 T 淋巴细胞；
- e. 把对多肽有反应性的 T 淋巴细胞和从同一病人上所得的肿瘤细胞共同培养以找出对肿瘤有反应性的 T 淋巴细胞；
- f. 当一个对多肽有反应性的 T 淋巴细胞克隆被证实可以识别肿瘤细胞，则证实该多肽为此 HLA 受体所呈献的有效的抗原决定簇。

本发明所要解决的技术问题还在于提供一种使用从病人身上收集的肿瘤样品和肿瘤穿透淋巴细胞来寻找有肿瘤特异性的，被某一人种（如中国人种）上的特定 HLA 类受体呈献而且为 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞识别的，从一个特定的候选肿瘤抗原上来的抗原决定簇的方法，该方法包括：

- a. 建立一个靶标细胞系，这些靶标细胞表达所需的 HLA 受体种类，而且表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过；
- b. 分析候选肿瘤抗原基因，预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列，而且根据预测的粘合序列合成一系列的多肽；
- c. 用这些多肽刺激从病人提取的肿瘤穿透淋巴细胞；
- d. 把激活的肿瘤穿透淋巴细胞和靶标细胞共同培养以找出对多肽有反应性的 T 淋巴细胞；
- e. 把对多肽有反应性的 T 淋巴细胞和从同一病人上所得的肿瘤细胞共同培养以找出对肿瘤有反应性的 T 淋巴细胞；
- f. 当一个对多肽有反应性的 T 淋巴细胞克隆被证实可以识别肿瘤细胞，则证实该多肽为此 HLA 受体所呈献的有效的抗原决定簇。

本发明所要解决的技术问题还在于提供一种用在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原，以及从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞，来筛选细胞免疫疗法对特定种族的病人的潜在疗效的方法，该方法包括：

- a. 建立一个靶标细胞系，这些靶标细胞表达所需的 HLA 受体种类，而且不是表达候选肿瘤抗原基因就是被候选多肽脉冲过；
- b. 分析候选肿瘤抗原基因，预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列，而且根据预测的粘合序列合成一系列的多肽；
- c. 用这些多肽刺激从病人提取的环周血液单核细胞；
- d. 把激活的环周血液单核细胞和靶标细胞共同培养以决定对多肽有反应性的 T 淋巴细胞的相对频率。

本发明所要解决的技术问题还在于提供一种用在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原，以及从病人身上收集的肿瘤样品和肿瘤穿透淋巴细胞，来筛选细胞免疫疗法对特定种族的病人的潜在疗效的方法，该方法包括：

- a. 建立一个靶标细胞系，这些靶标细胞表达所需的 HLA 受体种类，而且表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过；
- b. 分析候选肿瘤抗原基因，预测现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列，而且根据预测的粘合序列合成一系列的多肽；
- c. 用这些多肽刺激从病人提取的肿瘤穿透淋巴细胞；
- d. 把激活的肿瘤穿透淋巴细胞和靶标细胞共同培养以决定对多肽有反应性的 T 淋巴细胞的相对频率。

进一步地，在本发明所述的方法中，用于建立靶标细胞的细胞系是 293 细胞系，或 BHK 细胞系，或 Cos 细胞系。

在本发明所述的方法中，靶标细胞上表达的 HLA 受体是特异于中国人群，并且是 HLA-A24，或 HLA-A2，或 HLA-DP5，或 HLA-DR4。

在本发明所述的方法中，用于扩增 T 淋巴细胞或环周血液单核细胞的培养液包含 interleukine-2, PHA-2 和抗 CD28 的抗体。

在本发明所述的方法中，肿瘤反应性 T 淋巴细胞和对多肽有反应性的 T 淋巴细胞通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来确定。

本发明所要解决的技术问题还在于提供一种用体外扩增来产生对抗原或抗原决定簇有特异反应性的 T 淋巴细胞，包括 CD4 阳性淋巴细胞和 CD8 阳性淋巴细胞，来进行细胞寄抚转移疗法，或研制治疗性疫苗以激活细胞免疫系统的方法，包括：

- a. 一种用来培养 T 淋巴细胞的高产率模式， 选用 96 孔， 192 孔， 384 孔或更多孔的培养板， 以刺激 T 淋巴细胞的生长；
- b. 一种用来检析 T 淋巴细胞活性的高产率模式， 选用 96 孔， 192 孔， 384 孔或更多孔的培养板， 检析细胞间激素或细胞生死情况。

本发明用于更有效地从候选抗原中找出适用于中国病人的特异的抗原决定簇。本发明是从靶点基因开始，筛选能特异地识别靶点基因上的抗原识别簇的 CD4 阳性 T 淋巴细胞或 CD8 阳性 T 淋巴细胞。现有的候选肿瘤抗原基因（有已知的为 A2 或同类的受体所呈献的抗原决定簇）可以用计算机程序分析后预测出特异于在中国人种的 HLA 受体的抗原决定簇，然后合成代表这些抗原决定簇的多肽并用于在 96 孔板上产出对这些多肽有反应性的 T 淋巴细胞。这些多肽有反应性的 T 淋巴细胞被用于检测其裂解肿瘤细胞的能力。当一个对多肽有反应性的 T 淋巴细胞克隆被证实可以识别肿瘤细胞，该多肽则被证实为此 HLA 受体所呈献的有效的抗原决定簇。

附图说明

图 1 显示了找出肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇的方法流程图。

具体实施方式

实施例 1

1. 候选肿瘤抗原基因的确定：选择候选肿瘤抗原基因，比如慢性粒细胞白血病，BCR-ABL 基因。
2. 计算机程序分析后预测出抗原决定簇，针对一个种族（如中国人种）具有自己特定的 HLA 受体种类。候选肿瘤抗原基因用已有的计算机程序

分析以发现对应于这些特定的 HLA 受体种类的抗原决定簇的粘合序列 (binding motif)。现有的计算机程序包括 Ken Parker 程序。根据预测的粘合序列合成一系列最具有潜在的抗原性的多肽。

3. 在 96 孔板上用多肽诱导 T 淋巴细胞：通过白血球泳析法或抽血从病人身上提取环周血液单核细胞。把这些细胞置于 96 孔板培养，然后加入在第 2 步中合成的多肽。在不同的时间点再加入新的、被这些多肽脉冲过的环周血液单核细胞和 interleukine-2。过一定时间后，细胞从板上收集起来并与靶标细胞（这些靶标细胞表达所需的 HLA 受体种类，而且表达候选肿瘤抗原基因或被候选多肽脉冲过）共同培养过夜；
4. 找出有可诱导 T 淋巴细胞活性的多肽：用已有的试剂系统，如 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ELISA kit, 分析各孔内上清液内的细胞间激素（GM-CSF 或 IFN-g 的含量）。因为对候选肿瘤抗原有特异反应性的 T 淋巴细胞会被靶标细胞所激活并分泌特殊的细胞间激素，分析各孔内的细胞间激素可以最后发现对候选肿瘤抗原有特异反应性的 T 淋巴细胞克隆，其 ELISA 显示蓝色阳性反应。这些有多肽特异反应性的 T 淋巴细胞克隆被混合培养。CD4 阳性 T 淋巴细胞和 CD8 阳性 T 淋巴细胞可用抗体覆被的磁性小珠分离。
5. 对多肽有反应性的 T 淋巴细胞被测试识别肿瘤细胞的能力。把这些有多肽特异反应性的 T 淋巴细胞克隆和肿瘤细胞在 96 孔板上共同培养。因为有肿瘤特异反应性的 T 淋巴细胞会被肿瘤细胞所激活并分泌特殊的细胞间激素，分析各孔内的细胞间激素可以最后发现有肿瘤反应性的 T 淋巴细胞克隆；使用从同一病人体内得到的正常细胞（例如 B 细胞，纤维细胞等）作为对照，具有特异识别肿瘤细胞的能力的 T 淋巴细胞对正常细胞不产生免疫反应。
6. 能识别肿瘤细胞的对多肽有反应性的 T 淋巴细胞证实该多肽为在肿瘤表面的有效的抗原决定簇：一旦一个对多肽有反应性的 T 淋巴细胞克隆被证实可以识别肿瘤细胞，该多肽则被证实为此 HLA 受体所呈献的有效的抗原决定簇

在本申请中，一些本领域技术人员熟知的技术未作详细描述。此外应

理解，在阅读了本发明的上述描述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

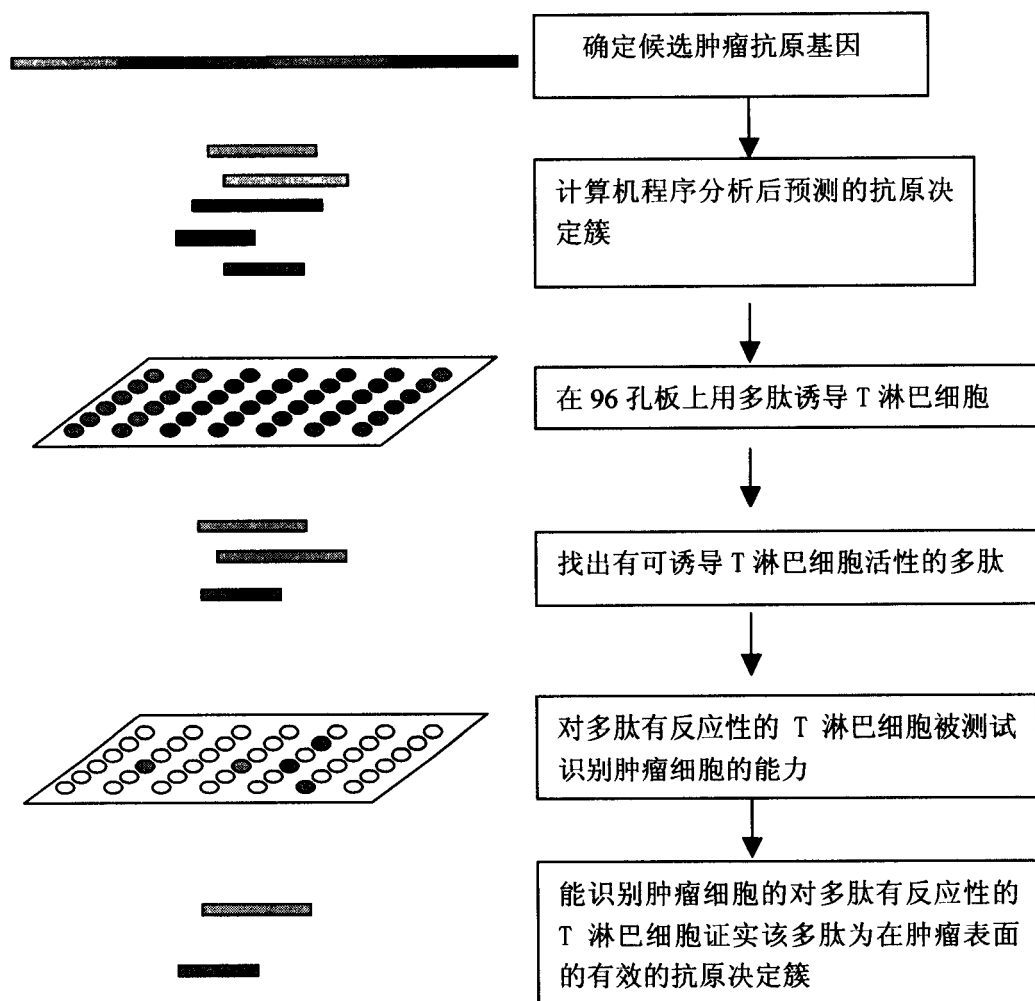


图 1

专利名称(译)	一种用于发现肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇的高产率逆反免疫法		
公开(公告)号	CN1609197A	公开(公告)日	2005-04-27
申请号	CN200310108039.7	申请日	2003-10-17
[标]发明人	范青青 曾钢		
发明人	范青青 曾钢		
IPC分类号	A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P37/04 C12N5/0783 C12P19/34 C12P21/00 G01N33/53 C12N5/08		
代理人(译)	余明伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种使用从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞(或肿瘤穿透淋巴细胞)来寻找有肿瘤特异性的、被某一人种肿瘤细胞上的特定HLA类受体呈献而且为CD4阳性淋巴细胞或CD8阳性淋巴细胞识别的、从一个特定的候选肿瘤抗原上获得的抗原决定簇的方法；本发明还公开一种用在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原，以及从病人身上收集的肿瘤样品和环周血液单核细胞(或肿瘤穿透淋巴细胞)，来筛选细胞免疫疗法对特定种族的病人的潜在疗效的方法；本发明还公开了一种用体外扩增产生对抗原或抗原决定簇有特异反应性的T淋巴细胞，来进行细胞寄抚转移疗法，或研制治疗性疫苗以激活细胞免疫系统的方法。

