

[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 200310108038.2

C12N 5/08

C12P 19/34

C12P 21/00

G01N 33/53

A61K 39/00

A61K 45/00

A61P 37/04

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1609196A

[22] 申请日 2003. 10. 17

[21] 申请号 200310108038.2

[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

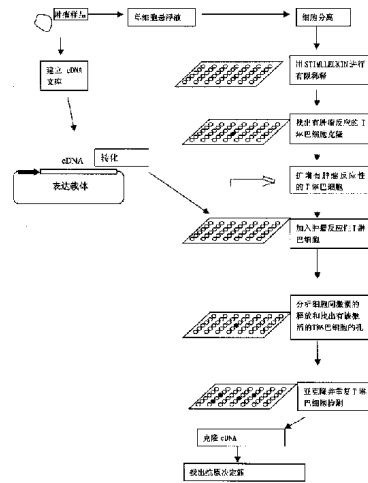
代理人 余明伟

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 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 T 淋巴细胞克隆技术

[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肿瘤穿透淋巴细胞来寻找有肿瘤特异性的、被 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抗原决定簇的方法；本发明还公开了一种用在细胞免疫疗法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；本发明还公开了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，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。



ISSN 1008-4274

1. 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 HLA 类受体呈献的、为 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞识别的抗原决定簇的方法,该方法包括:
 - a. 从病人身上获得肿瘤样品并制成单细胞悬浮液;
 - b. 从单细胞悬浮液提取 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞,用有限稀释制备单个克隆,扩增这些克隆;
 - c. 把扩增的 T 淋巴细胞和肿瘤细胞共同培养,检析上清液中的特殊的细胞间激素,找出有肿瘤反应的 T 淋巴细胞克隆;
 - d. 从病人肿瘤切样的一部分中提取 mRNA,构建 cDNA 文库,用于转化靶标细胞;
 - e. 将肿瘤反应性 T 淋巴细胞与靶标细胞转化子共同培养,检析上清液中的特殊的细胞间激素,找出肿瘤特异性抗原基因;
 - f. 从肿瘤特异性抗原基因上找出肿瘤特异性抗原决定簇。
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 受体是包括但不限于中国人群特异性的,是: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 淋巴细胞的培养液包含 interleukine-2, PHA-L 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 淋巴细胞是通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来确定。
6. 一种用在细胞免疫疗法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,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. 从病人身上获得肿瘤样品,制成单细胞悬浮液;

- b. 从单细胞悬浮液中提取 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞，用有限稀释制备单个克隆，扩增这些克隆；
 - c. 把扩增的 T 淋巴细胞和肿瘤细胞共同培养，检析上清液中的特殊的细胞间激素，找出有肿瘤反应的 T 淋巴细胞克隆；
 - d. 把扩增的 T 淋巴细胞和在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原共同培养，找出对治疗疫苗或免疫原有特异反应性的 T 淋巴细胞；
 - e. 通过对比从步骤 c 和步骤 d 所得数据，定出对治疗疫苗或免疫原有特异反应性的 T 淋巴细胞的相对频率。
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 受体是包括但不限于中国人群特异性的，是 HLA-A24、或 HLA-A、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 淋巴细胞的培养液包含 interleukine-2、PHA-L 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，该方法包括：
 - 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，刺激 T 淋巴细胞的生长；或
 - 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。

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 T 淋巴细胞克隆技术

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 T 淋巴细胞克隆技术。

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 抗原和短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被动（寄抚）转移法，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。

寄抚转移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因而疗效有限。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，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依靠两类正在研发中的肿瘤疫苗，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/HCA 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 II-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（II）DMA、DMB 以及其它 MHC 二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。

现有方法在技术上困难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，然而现有肿瘤穿透技术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），在培养细胞

(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重复 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。

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肿瘤穿透淋巴细胞来寻找有肿瘤特异性的、被 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抗原决定簇的方法, 该方法包括以下步骤:

- a. 从病人身上获得肿瘤样品并制成单细胞悬浮液;
- b. 从单细胞悬浮液提取 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞, 并用有限稀释制备单个克隆而且扩增这些克隆;
- c. 把扩增的 T 淋巴细胞和肿瘤细胞共同培养, 并检析上清液中的特殊的细胞间激素, 从而找出有肿瘤反应的 T 淋巴细胞克隆;
- d. 从病人肿瘤切样的一部分中提取 mRNA、构建 cDNA 文库, 并用于转化靶标细胞;

- e. 将肿瘤反应性 T 淋巴细胞与靶标细胞转化子共同培养并检析上清液中的特殊的细胞间激素，最终找出肿瘤特异性抗原基因；
- f. 从肿瘤特异性抗原基因上找出肿瘤特异性抗原决定簇。

进一步地，在本发明的实施方式中，上述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。

在本发明中，上述靶标细胞上表达的 HLA 受体是包括但不限于中国人群特异性的，例如：HLA-A24、或 HLA-A2、或 HLA-DP5、或 HLA-DR4。

在本发明中，用于扩增 T 淋巴细胞的培养液包含 interleukine-2、PHA-L 和抗 CD28 的抗体。

在本发明中，肿瘤反应性 T 淋巴细胞是通过检析在上清液中的 GM-CSF 或 IFN-g 来发现。

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，包括以下步骤：

- a. 从病人身上获得肿瘤样品并制成单细胞悬浮液；
- b. 从单细胞悬浮液提取 CD4 阳性淋巴细胞或 CD8 阳性淋巴细胞，并用有限稀释制备单个克隆而且扩增这些克隆；
- c. 把扩增的 T 淋巴细胞和肿瘤细胞共同培养，并检析上清液中的特殊的细胞间激素，从而找出有肿瘤反应的 T 淋巴细胞克隆；
- d. 把扩增的 T 淋巴细胞和在细胞免疫疗法中使用的治疗疫苗或免疫原共同培养以找出对治疗疫苗或免疫原有特异反应性的 T 淋巴细胞；
- e. 通过对比从步骤 c 和步骤 d 得数据，可以定出对治疗疫苗或免疫原有特异反应性的 T 淋巴细胞的相对频率。

进一步地，在本发明的实施方式中，上述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。

在本发明中，上述靶标细胞上表达的 HLA 受体是包括但不限于中国人群特异性的，如 HLA-A24、或 HLA-A、或 HLA-DP5、或 HLA-DR4。

在本发明中，上述用于扩增 T 淋巴细胞的培养液包含 interleukine-2、PHA-L 和抗 CD28 的抗体。

在本发明中，上述肿瘤反应性 T 淋巴细胞是通过检析上清液中 GM-CSF 或 IFN-g 的含量来发现。

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，包括以下步骤：

- a. 一种用来培养 T 淋巴细胞的高产率模式，特别是用 96 孔、192 孔、384 孔或其他培养板以刺激 T 淋巴细胞的生长；或
- b. 一种用来检析 T 淋巴细胞活性的高产率模式，特别是用 96 孔、192 孔、384 孔或其他培养板检析细胞间激素或细胞生死情况。

本发明是一项高产率的用于发现克隆 MHC I 型和 MHC II 型肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇的 T 淋巴细胞技术系统，这项发明可适用于多种肿瘤，包括黑色素瘤。这项发明用于发现新肿瘤特异性抗原和肿瘤特异性抗原决定簇，以便利用肿瘤穿透细胞的免疫方法来治疗除黑色素瘤和肾癌之外的肿瘤。

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，为了解决这个问题，从非黑色素瘤病人的肿瘤细胞中克隆 T 淋巴细胞，本发明人研制成功一种新的刺激淋巴细胞的生长素，该生长素不依靠 TCR/CD3 信号传导途径，而且可以替代 OKT-3 用于有限稀释法和所得 T 淋巴细胞的快速扩增。该生长素混合液通过非 TCR/CD3 途径传导 T 淋巴细胞生长信号，因此，它不会导致从肿瘤穿透细胞中得到的对肿瘤有特异抗性的 T 淋巴细胞的主动引导性死亡。当该混合液直接与 OKT-3 对比用于克隆肿瘤特异性 CD4 阳性 T 淋巴细胞和 CD8 阳性 T 淋巴细胞时，该混合液显示了更高的克隆效率并获得更多的肿瘤特异性 T 淋巴细胞，此类效果在重复实验中相当一致。

基于这个新的 T 淋巴细胞生长素，本发明人发明了一种高产率 T 淋巴细胞克隆系统，用于有效地克隆肿瘤特异性的肿瘤穿透淋巴细胞，并且找出 CD4 阳性和 CD8 阳性 T 淋巴细胞特异性抗原。该系统可用于高产率地发现肿瘤特异性抗原和抗原决定簇，而且使用从病人身上获得的肿瘤样品和

血细胞样品，而不是绝大部分现有方法中必需的已在体外建系的细胞。该方法克服了现有技术的有限稀释法中的技术性限制。

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

如图示 1 所示，HITC 技术的一个典型例子可以描述如下：

一. 找出并扩增有肿瘤反应性的 T 淋巴细胞

- 1、切除肿瘤样品：从病人身上取得肿瘤切样。
- 2、单细胞悬浮液：肿瘤切样的一部分经由多种酶处理或由自动机械力量处理，使之成为单细胞悬浮液。
- 3、细胞分离：用抗体覆被的磁性小珠分离 CD4 阳性和 CD8 阳性细胞，而剩余的细胞（主要是肿瘤细胞）则按附着细胞培养。
- 4、用 STIMULEUKIN（新的生长素混合液）进行有限稀释：基于对 T 淋巴细胞克隆的需要，分离出的 CD4 阳性和 CD8 阳性 T 淋巴细胞被稀释，然后点到有已被照射杀死的培养细胞覆盖的 96 孔板上，每个孔只能有最多一个细胞，往每个孔内加注 STIMULEUKIN 以扩增这些单细胞克隆。
- 5、找出有肿瘤反应的 T 淋巴细胞克隆：从第 3 步得来的肿瘤细胞被转入新的 96 孔板内，然后从第 4 步得来的 T 淋巴细胞则被转加入这些有肿瘤细胞的孔内。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（GM-CSF 或 IFN-g），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。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。
- 6、扩增有肿瘤反应性的 T 淋巴细胞：这类细胞被放入大培养器中继续扩增。

二. 找出肿瘤特异性抗原

- 7、建立 cDNA 文库：从病人肿瘤切样的一部分中提取 mRNA 并用于构建 cDNA 文库,表达载体的选择可以决定这个文库具体是用于找寻 MHC I 类或 MHC II 类受体特异性抗原。
- 8、转化：cDNA 文库一般是在细菌中培养生长,该文库接着被扩增而且分为亚群,每一亚群包括一定数量的初源 cDNA。从这些亚群中扩培的 cDNA 被用于转化表达正确的 HLA 种类并已预先生长在 96 孔板上的 293 细胞。这样,在每个孔里的转化子会具有不超过最初亚群中数目的 cDNA 种类。
- 9、加入肿瘤反应性 T 淋巴细胞：从第 6 步得到并扩增的肿瘤反应性细胞被分加入有转化子的 96 孔板中。
- 10、分析细胞间激素的释放和找出有被激活的 T 淋巴细胞的孔：因为有肿瘤反应性的 T 淋巴细胞会被表现正确的抗原决定簇的 293 细胞所激活并释放特异的细胞间激素,经过分析所有孔中的特异细胞间激素可以找出被正确的肿瘤抗原基因所转化的 293 细胞。
- 11、亚克隆并重复 T 淋巴细胞检测：在第 10 步中找出的 293 细胞实际上是一群细胞,由一个亚群的初源 cDNA 转化而得,该亚群再分小群并用于转化同样的 293 细胞,重复第 9 和 10 步。
- 12、克隆 cDNA：重复第 11 步直到获得可以激活肿瘤反应性的 T 淋巴细胞的单个克隆为止,从该细胞中克隆出 cDNA,这就是肿瘤特异性抗原。
- 13、找出抗原决定簇：使用同批肿瘤反应性 T 淋巴细胞,在现有技术中采用的多个方法均可用于找出特异的抗原决定簇。

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。

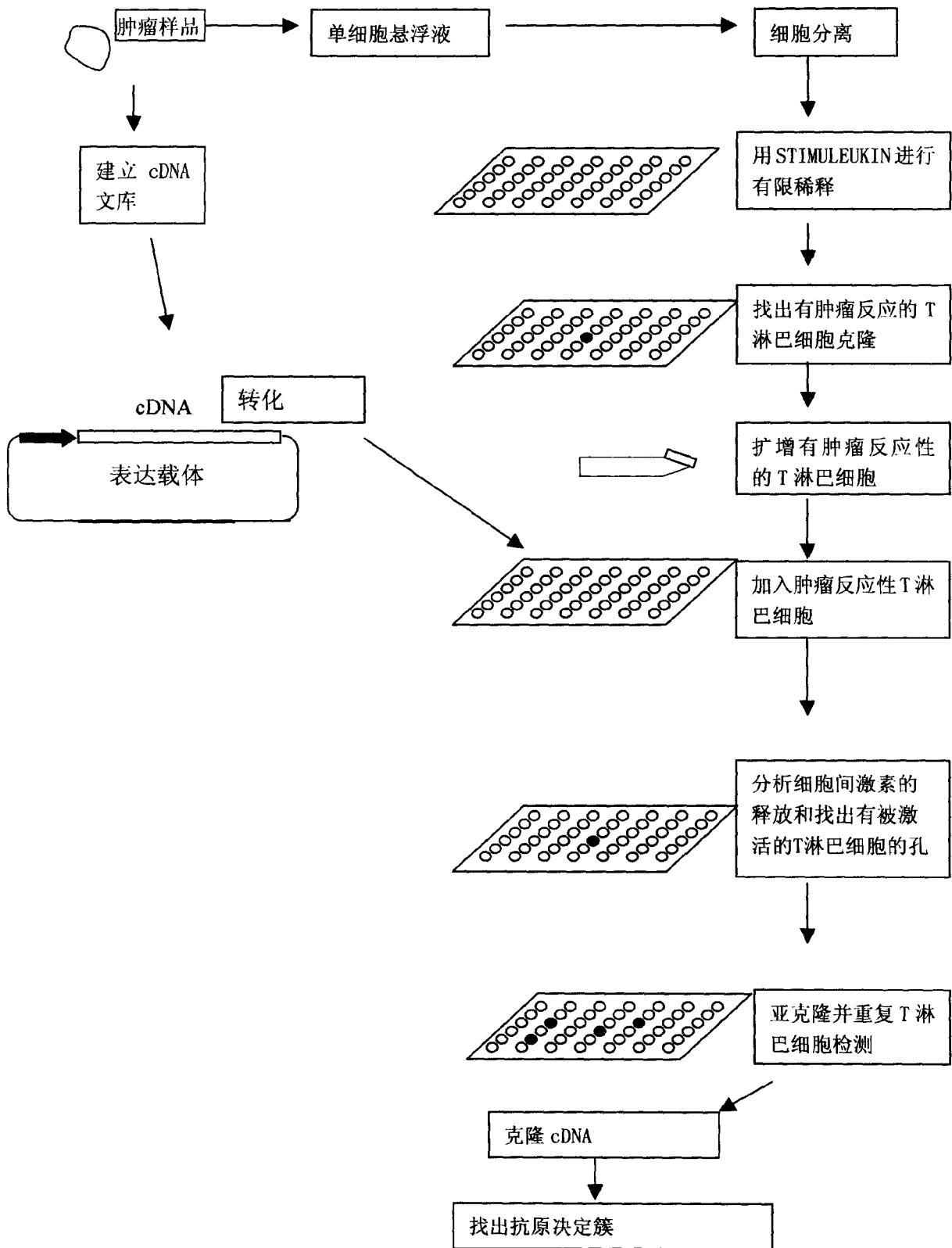


图 1

专利名称(译)	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T淋巴细胞克隆技术		
公开(公告)号	CN1609196A	公开(公告)日	2005-04-27
申请号	CN200310108038.2	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 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肿瘤穿透淋巴细胞来寻找有肿瘤特异性的、被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抗原决定簇的方法；本发明还公开了一种用在细胞免疫疗法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；本发明还公开了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，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。

