



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102388145 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 21

(21) 申请号 200980155152. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 07. 13

C12Q 1/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/563 (2006. 01)

61/146, 106 2009. 01. 21 US

G01N 33/52 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/050411 2009. 07. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02010/085275 EN 2010. 07. 29

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

申请人 综合医院公司附属马萨诸塞州综合
医院

(72) 发明人 J·C·洛夫 N·范阮达若詹

B·居尔格 B·沃克

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

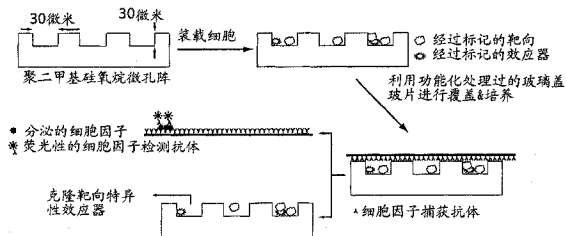
权利要求书 6 页 说明书 26 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用于对单个细胞所具有的细胞毒性进行评价的组合物以及方法

(57) 摘要

本发明提供了用以对存在于靶向细胞以及效应器细胞对之间的相互作用进行分析的方法,所述的方法利用到了高通量的筛选方法,用以对存在于微阵列之中的大量的单个细胞进行描绘。



1. 用以在宿主体内识别 CD8⁺ 细胞的方法,其中所述的 CD8⁺ 细胞能够对 CD4⁺ 人类免疫缺陷病毒感染型细胞进行溶解,所述的方法包括:

提供一种效应器 CD8⁺ 细胞以及来自于宿主的靶向细胞的悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有至少一个存在于微孔阵列之中的微孔,其中在所述的微孔阵列中的至少一个微孔中含有一个效应器细胞;

在允许利用所述的 CD8⁺ 细胞对所述的靶向细胞进行溶解的条件下对所述的悬浮液进行培养;

对利用所述的效应器细胞对所述的靶向细胞所产生的溶解进行检测,并且

识别出那些能够对 CD4⁺ 人类免疫缺陷病毒感染型细胞进行溶解的 CD8⁺ 细胞。

2. 根据权利要求 1 中所述的方法,进一步的包括对溶解了所述的靶向细胞的效应器细胞进行回收。

3. 根据权利要求 2 中所述的方法,进一步的包括对已经溶解了所述的靶向细胞的效应器细胞进行培养。

4. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中在将细胞沉积于所述的微孔内之前,对所述的效应器细胞以及靶向细胞进行混合。

5. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中在将细胞沉积于所述的微孔内之后,对所述的效应器细胞以及靶向细胞进行混合。

6. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中对溶解作用进行检测,所述的检测是通过对一种被标记细胞所具有的荧光性所发生的变化进行监测的方式来实现的。

7. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中对溶解作用进行检测,所述的检测是通过对所述的靶向细胞所具有的细胞内的钙水平所发生的变化进行监测的方式来实现的。

8. 根据权利要求 7 中所述的方法,其中利用一种钙敏感型荧光染料对所述的钙进行检测。

9. 根据权利要求 8 中所述的方法,其中所述的染料是 Fura 2AM(Invitrogen)。

10. 根据权利要求 1 中所述的方法,进一步的包括

将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中利用至少一种试剂对所述的底物进行了预处理,所述的试剂能够特异性的检测出所述的效应器细胞所具有的产物;并且

利用所述的试剂进行检测。

11. 根据权利要求 10 中所述的方法,其中所述的试剂是一种抗体,细胞因子,或者可溶性的细胞溶解调节剂。

12. 根据权利要求 10 中所述的方法,其中所述的试剂是一种细胞因子。

13. 根据权利要求 12 中所述的方法,其中所述的细胞因子是肿瘤坏死因子- α 或者干扰素- γ 。

14. 根据权利要求 8 中所述的方法,其中所述的试剂是一种可溶性的细胞溶解调节剂。

15. 根据权利要求 14 中所述的方法,其中所述的可溶性的细胞溶解调节剂是端粒酶 B(GzB) 或者穿孔蛋白。

16. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中所述的方法进一步的包括利用 CD69 对一种效应器细胞进行标记。

17. 用以对宿主体内的一种抗体应答进行鉴定的方法,所述的方法包括:

提供一种来自于宿主的 B 细胞悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中所述的宿主感染有人类免疫缺陷病毒,或者所述的宿主被怀疑感染了人类免疫缺陷病毒,并且其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内含有一个单个的细胞;

将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中利用至少一种 B 细胞检测试剂对所述的底物进行了预处理;并且

对所述的试剂进行检测,

从而对所述的抗体应答进行鉴定。

18. 根据权利要求 17 中所述的方法,其中所述的 B 细胞检测试剂是一种抗体,所述的抗体对于糖蛋白 120 中的一个表位具有特异性。

19. 根据权利要求 17 中所述的方法,进一步的包括将所述的微孔阵列与第二种底物进行接触,其中利用至少第一种 B 细胞检测试剂对所述的底物进行了预处理。

20. 根据权利要求 19 中所述的方法,其中所述的第一种 B 细胞检测试剂是一种作用于人类免疫缺陷病毒糖蛋白 120 的抗体。

21. 根据权利要求 20 中所述的方法,其中所述的抗体作用于所述的人类免疫缺陷病毒糖蛋白 120 的 C- 末端。

22. 根据权利要求 17 中所述的方法,进一步的包括对由存在于所述的微孔阵列之中的所述 B 细胞生成的所述抗体的同型体进行测定。

23. 根据权利要求 17 中所述的方法,进一步的包括对 B 细胞进行分离,其中所述的 B 细胞能够表达一种抗体,所述的抗体能够与人类免疫缺陷病毒进行反应。

24. 根据权利要求 23 中所述的方法,进一步的包括对所述抗体所具有的轻链以及重链可变区域进行扩增以及分离。

25. 根据权利要求 17 中所述的方法,其中所述的 B 细胞被暴露于一种试剂之下,其中所述的试剂能够刺激存在于所述的细胞之中的抗体的生成。

26. 根据权利要求 25 中所述的方法,其中所述的试剂是 CD40L 或者是一种抗 B 细胞抗原受体抗体。

27. 根据权利要求 25 中所述的方法,其中所述的 B 细胞被暴露于 CD40L 以及一种抗 B 细胞抗原受体抗体之下。

28. 用以鉴定 B 细胞所具有的与多种人类免疫缺陷病毒分离物之间的交叉反应性的方法,所述的方法包括:

提供一种来自于宿主的 B 细胞悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中所述的宿主感染有人类免疫缺陷病毒,或者所述的宿主被怀疑感染了人类免疫缺陷病毒,并且其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内含有一个单个的细胞;

将所述的微孔阵列与第一种底物进行接触,其中利用由存在于所述的至少一个微孔中的所述 B 细胞生成的抗体对所述的底物进行了预处理;

将所述的底物与第一种经过标记的人类免疫缺陷病毒病毒体以及第二种经过标记的人类免疫缺陷病毒病毒体进行接触;并且

确定所述的第一种经过标记的病毒体以及第二种经过标记的病毒体是否与所述的抗

体进行了结合,其中所述的抗体是由在所述的微孔中的相同细胞生成的。

29. 根据权利要求 28 中所述的方法,进一步的包括对生成抗体的所述的 B 细胞进行回收,其中所述的抗体能够与所述的第一种经过标记的病毒体以及第二种经过标记的病毒体发生特异性的结合。

30. 根据权利要求 29 中所述的方法,进一步的包括对上述回收的 B 细胞进行培养。

31. 根据权利要求 17 中所述的方法,其中至少一种所述的病毒体是经过标记的。

32. 根据权利要求 21 中所述的方法,其中所述的第一种病毒体以及第二种病毒体被进行了截然不同的标记。

33. 用以生成效应器细胞的功能曲线的方法,其中所述的效应器细胞能够对宿主体内的一种人类免疫缺陷病毒感染产生应答,所述的方法包括:

提供一种效应器细胞群体,所述的效应器细胞选自由下述细胞所组成的组中:细胞毒性 T 淋巴细胞 ($CD8^+$),天然杀伤细胞 ($CD16^+$),天然杀伤 T 细胞 ($CD1d^+$, $V\alpha 24^+$),或者 $\gamma\delta$ T 细胞 ($V\gamma 9^+$, $V\delta 2^+$),其中所述的效应器细胞是从宿主处获得的,将所述的效应器细胞沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内含有一个单个的效应器细胞,其中将所述的效应器细胞群体与一种同源的靶向细胞群体一同进行装载;

对所述的效应器细胞进行可视化处理;

对所述的效应器细胞所具有的细胞毒性进行评价;

将所述的微孔阵列与第一种底物进行接触,其中利用一种试剂对所述的底物进行了预处理,所述的试剂能够对白细胞介素 -2、白细胞介素 -4、白细胞介素 -10、肿瘤坏死因子 - α 、以及干扰素 - γ 中的一种或者多种进行特异性的检测;并且确定存在于所述的微孔之中的效应器细胞是否与所述的一种或者多种试剂进行了结合。

34. 根据权利要求 33 中所述的方法,其中通过检测钙黄绿素 AM 的释放对细胞毒性进行评价。

35. 根据权利要求 33 中所述的方法,进一步的包括利用一种或者多种特异性的表面标记物蛋白质对所述的细胞进行了标记。

36. 根据权利要求 35 中所述的方法,其中表面标记物蛋白质是 CD62L,趋化因子受体 3,趋化因子受体 4,或者趋化因子受体 7。

37. 根据权利要求 33 中所述的方法,进一步的包括从一个或者多个微孔中对一种效应器细胞进行回收。

38. 根据权利要求 37 中所述的方法,进一步的包括对上述回收的细胞进行培养从而获得所述的回收细胞的克隆性的扩增。

39. 根据权利要求 37 中所述的方法,进一步的包括对存在于所述的回收细胞之中的一种或者多种基因的表达进行鉴定。

40. 根据权利要求 33 中所述的方法,其中所述的细胞是 $CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL),天然杀伤 (NK) 细胞,天然杀伤 (NK) T 细胞,或者 $\gamma\delta$ T 细胞。

41. 根据权利要求 33 中所述的方法,其中所述的宿主是一种处于急性阶段的感染,一种高度活跃的抗逆转录病毒治疗 (HAART) 宿主,或者是一种杰出的控制者 (elite controller)。

42. 用以对宿主体内的一种先天性免疫应答进行评价的方法,其中所述的免疫应答针对的是一种人类免疫缺陷病毒感染,所述的方法包括:

提供一种来自于宿主的天然杀伤细胞悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中所述的宿主感染有人类免疫缺陷病毒,或者所述的宿主被怀疑感染了人类免疫缺陷病毒,并且其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内沉积有一个单个的细胞;并且

将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中利用至少一种天然杀伤细胞检测试剂对所述的底物进行了预处理;并且

对所述的试剂进行检测,

从而对天然杀伤细胞进行检测并且对所述的先天性免疫应答进行评价。

43. 根据权利要求 42 中所述的方法,其中使用 NKp4-Cy3、CD107a-Alexa647、和 / 或 CD69-Alexa488 对所述的天然杀伤细胞进行检测。

44. 根据权利要求 32 中所述的方法,其中在被沉积在所述的可模压成型的平板上之前,对所述的细胞进行共同培养。

45. 根据权利要求 44 中所述的方法,其中利用白细胞介素 -12 以及白细胞介素 -18 对所述的细胞进行共同培养。

46. 根据权利要求 45 中所述的方法,其中所述的天然杀伤细胞检测试剂能够对天然杀伤细胞进行检测。

47. 用以对天然杀伤细胞群体中的克隆多样性进行评价的方法,所述的方法包括:

提供一种天然杀伤细胞以及来自于宿主的靶向细胞的悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有至少一个存在于微孔阵列之中的微孔,其中在所述的微孔阵列中的至少一个微孔中含有一个单个的效应器细胞;

在允许利用所述的天然杀伤细胞对所述的靶向细胞进行溶解的条件下对所述的悬浮液进行培养;

对利用所述的效应器细胞对所述的靶向细胞所产生的溶解进行检测,并且

对所述的效应器细胞进行识别,

从而对存在于所述的天然杀伤细胞群体中的克隆多样性进行评价。

48. 根据权利要求 47 中所述的方法,进一步的包括对能够使所述的靶向细胞发生溶解的效应器细胞进行回收。

49. 根据权利要求 48 中所述的方法,进一步的包括对上述回收的细胞进行培养。

50. 根据权利要求 47 中所述的方法,进一步的包括对已经使所述的靶向细胞发生溶解的天然杀伤细胞进行培养。

51. 根据权利要求 47 中所述的方法,其中在将细胞沉积于所述的微孔内之前对所述的天然杀伤细胞以及靶向细胞进行混合。

52. 根据权利要求 47 中所述的方法,其中在将细胞沉积于所述的微孔内之后对所述的天然杀伤细胞以及靶向细胞进行混合。

53. 根据权利要求 47 中所述的方法,其中通过对一种被标记的细胞所具有的荧光性的变化进行监测的方式对靶向细胞的溶解作用进行检测。

54. 根据权利要求 47 中所述的方法,进一步的包括将所述的微孔阵列与一种底物进行

接触,其中利用至少一种试剂对所述的底物进行了预处理,所述的试剂能够特异性的检测出所述的天然杀伤细胞的一种产物;并且

对所述的试剂进行检测。

55. 根据权利要求 55 中所述的方法,其中所述的试剂是一种抗体,细胞因子,或者可溶性的细胞溶解调节剂。

56. 根据权利要求 55 中所述的方法,其中所述的细胞因子是肿瘤坏死因子- α 或者干扰素- γ 。

57. 用以对天然杀伤细胞以及 B 细胞群体中的多样性进行评价的方法,所述的方法包括:

提供一种细胞悬浮液,所述的悬浮液中包括扩展的人类免疫缺陷病毒感染型 CD4+ 细胞 T 细胞,活化的天然杀伤细胞,以及 B 细胞和靶向细胞,其中所述的悬浮液被沉积在一种可模压成型的平板之上,在所述的平板上含有存在于微孔阵列中的至少一个微孔,其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔中含有一个单个的 T 细胞;

在允许所述的抗体与 T 细胞的表面进行结合的条件下对细胞进行培养,其中所述的抗体是由 B 细胞生成的;

对含有 B 细胞、天然杀伤细胞、以及溶解的 T 细胞的孔进行识别,并且

对 B 细胞或者天然杀伤细胞进行识别。

58. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中利用白细胞介素-2 对所述的天然杀伤细胞进行活化。

59. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中利用 CD40L 或者抗 B 细胞抗原受体对所述的 B 细胞进行活化。

60. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中利用 CD40L 以及抗 B 细胞抗原受体对所述的 B 细胞进行活化。

61. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中利用白细胞介素-2 对所述的天然杀伤细胞进行活化。

62. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中利用一种抗-B 细胞抗原受体 (BCR) 抗体的 CD40L 对所述的 B 细胞进行活化。

63. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中所述的方法进一步的包括

从所述的孔中对所述的 B 细胞或者天然杀伤细胞进行回收;并且

对所述的 B 细胞所具有的一种或者多种性质进行鉴定。

64. 根据权利要求 63 中所述的方法,其中所述的方法包括对存在于所述的 B 细胞之中的抗体基因进行鉴定。

65. 根据权利要求 64 中所述的方法,其中所述的方法包括对存在于所述的 B 细胞之中的编码抗体的基因所具有的 VDJ 区域进行分析。

66. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中所述的方法包括在允许抗体与所述的底物进行连接的条件下任意的将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中所述的抗体是由所述的 B 细胞生成的。

67. 根据权利要求 57 中所述的方法,其中所述的方法包括将所述的底物与来自于一个人类免疫缺陷病毒感染型细胞的溶解产物进行接触并且

对含有由 B 细胞生成的抗体的孔进行识别,其中所述的抗体与所述的人类免疫缺陷病毒溶解产物或者一种抗 - 免疫球蛋白 G3 抗体进行了结合。

68. 根据权利要求 67 中所述的方法,包括对含有由 B 细胞生成的抗体的孔进行识别,其中所述的抗体与所述的人类免疫缺陷病毒溶解产物或者一种抗 - 免疫球蛋白 G3 抗体进行了结合。

用于对单个细胞所具有的细胞毒性进行评价的组合物以及方法

发明领域

[0001] 本发明提供了一种用于对发生在靶点与效应器细胞对之间的相互作用进行分析的方法,所述的方法利用高通量的筛选方法,用以对微阵列中的大量的单个细胞进行描述。

背景技术

[0002] 尽管已经对发生在人类与所述的 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 之间的相互作用进行了超过二十五年的研究,人类免疫缺陷病毒 (HIV)/ 获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 仍然是全球健康的最为盛行的威胁之一。目前的评估表明,它将成为接下来的二十年内世界范围内的死亡率的第三大重要诱因,位列于癌症以及心血管疾病之后。目前仍然没有研发出一种能够预防感染或者引发天然机制用以对所述的疾病进行控制的疫苗。单纯利用现有的分析工具并不足以能够对那些与所述的免疫系统细胞相关的至关重要的特征进行定义,其中所述的免疫系统细胞能够提供有效的针对所述病毒的保护性的免疫力。例如流式细胞术以及免疫吸附检测 (酶联免疫斑点检测 ELISpot, 酶联免疫吸附检测 ELISA) 这样的技术能够对细胞群体进行评价,但是对于稀少的事件而言具有差的敏感度。其他的重要功能,例如细胞毒性以及增殖作用,目前仅仅能够被进行批量的测量。同样的,如果在可能的情况下,这样的局限性使得以足够的清楚度对所述的人类免疫应答进行评价是困难的,其中所述的人类免疫应答是针对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 而产生的,对于应答所进行的评价的目的在于确定保护作用的相关性。这样一来,迫切的需要一种新的方法,用以对针对病毒的保护性免疫力进行分析,其中所述的病毒例如是人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

发明内容

[0003] 本发明提供了用以识别 CD8+ 细胞的方法,所述的 CD8+ 细胞能够对宿主体内的 CD4+ 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞进行溶解,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种效应器 CD8+ 细胞以及来自于宿主的靶向细胞的悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有至少一个存在于微孔阵列之中的微孔,其中在所述的微孔阵列中的至少一个微孔中含有一个效应器细胞;在允许利用所述的 CD8+ 细胞对所述的靶向细胞进行溶解的条件下对所述的悬浮液进行培养;对利用所述的效应器细胞对所述的靶向细胞所产生的溶解进行检测,并且识别出那些能够对 CD4+ 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞进行溶解的 CD8+ 细胞。任选的,对能够使所述的靶向细胞发生溶解的效应器细胞进行回收。优选的,对上述回收的效应器细胞进行培养,其中所述的效应器细胞对所述的靶向细胞进行了溶解。在一个方面,在将细胞沉积于所述的微孔内之前对所述的效应器细胞以及靶向细胞进行混合。或者可供选择的,在将细胞沉积于所述的微孔内之后对所述的效应器细胞以及靶向细胞进行混合。通过对一种被标记的细胞所具有的荧光性的变化进行监测的方式对溶解作用进行检测。或者可供选择的,通过对所述的靶向细胞所具有的细胞内的钙的水平变化进行监测的方式对溶解作用进行检测。利用一种

钙敏感性的荧光素染料对所述的钙进行检测。优选的,所述的钙敏感性荧光素染料是 Fura 2AM(Invitrogen)。

[0004] 在一个方面,将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中利用至少一种试剂对所述的底物进行了预处理,此后利用所述的试剂进行检测,其中所述的试剂能够特异性的检测出所述的效应器细胞的一种产物。所述的试剂是一种抗体,细胞因子,或者是溶解作用的可溶性的调节剂。优选的,所述的细胞因子是肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 或者干扰素- γ (IFN- γ)。任选的,所述的溶解作用的可溶性调节剂是端粒酶 B(GzB) 或者穿孔蛋白。本发明所述的方法中任选的进一步包括利用 CD69 对一种效应器细胞进行标记。

[0005] 本发明同样提供了一种对宿主体内的抗体应答进行鉴定的方法,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种来自于宿主的 B 细胞悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中所述的宿主感染有人类免疫缺陷病毒 (HIV),或者所述的宿主被怀疑感染了人类免疫缺陷病毒 (HIV),并且其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内含有一个单个的细胞;将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中利用至少一种 B 细胞检测试剂对所述的底物进行了预处理;并且对所述的试剂进行检测,从而对所述的抗体应答进行鉴定。优选的,所述的 B 细胞检测试剂是一种对糖蛋白 (gp) 120 中的一个表位具有特异性的抗体。

[0006] 在一个方面,本发明所述的方法中进一步的包括将所述的微孔阵列与第二种底物进行接触,其中利用至少第一种 B 细胞检测试剂对所述的底物进行了预处理。任选的,所述的第一种 B 细胞检测试剂是一种针对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 糖蛋白 (gp) 120 的抗体。优选的,所述的抗体作用的是所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 糖蛋白 (gp) 120 的所述 C-末端。在一个方面,对由存在于所述的微孔阵列之中的所述 B 细胞生成的所述抗体的同型体进行测定。任选的对所述的 B 细胞进行分离,其中所述的 B 细胞能够表达一种与人类免疫缺陷病毒 (HIV) 发生反应的抗体。在另外一个方面,对所述抗体所具有的轻链以及重链可变区域进行了分离以及扩增。所述的 B 细胞被任选的暴露于一种试剂之下,其中所述的试剂能够刺激存在于所述的细胞之中的抗体的生成。优选的,所述的试剂是 CD40L 或者是一种抗-B 细胞抗原受体 (BCR) 抗体。在另外一个方面,所述的 B 细胞被暴露于 CD40L 以及抗-B 细胞抗原受体 (BCR) 抗体之下。

[0007] 本发明同样提供了用以鉴定 B 细胞与多种人类免疫缺陷病毒 (HIV) 分离物之间的交叉反应性的方法,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种来自于宿主的 B 细胞悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中所述的宿主感染有人类免疫缺陷病毒 (HIV),或者所述的宿主被怀疑感染了人类免疫缺陷病毒 (HIV),并且其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内含有一个单个的细胞;将所述的微孔阵列与第一种底物进行接触,其中利用由存在于所述的至少一个微孔中的所述 B 细胞生成的抗体对所述的底物进行了预处理;将所述的底物与第一种经过标记的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 病毒体以及第二种经过标记的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 病毒体进行接触;并且确定所述的第一种经过标记的病毒体以及第二种经过标记的病毒体是否与所述的抗体进行了结合,其中所述的抗体是由在所述的微孔中的相同细胞生成的。任选的,对生成抗体的所述的 B 细胞进行回收,其中所述的抗体能够与所述的第一种经过标记的病毒体以及第二种经过标记的病毒体发生特异性的

结合。在一个方面,对上述回收到的B细胞进行培养。优选的,所述的病毒体中的至少一种是经过标记的。或者可供选择的,所述的第一种病毒体以及第二种病毒体被进行了截然不同的标记,即,利用不同的可检测性的标记物对它们进行了标记。

[0008] 本发明同样提供了用以生成效应器细胞的功能曲线的方法,其中所述的效应器细胞能够对宿主体内的一种人类免疫缺陷病毒(HIV)感染产生应答,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种效应器细胞群体,所述的效应器细胞选自由下述细胞所组成的组中:细胞毒性T淋巴细胞(CTL)(CD8⁺),天然杀伤(NK)细胞(CD16⁺),天然杀伤(NK)T细胞(CD1d⁺, V α 24⁺),或者 γ δ T 细胞(V γ 9⁺, V δ 2⁺),其中所述的效应器细胞是从宿主处获得的,将所述的效应器细胞沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内含有一个单个的效应器细胞,其中将所述的效应器细胞群体与一种同源的靶向细胞群体一同进行装载;对所述的效应器细胞进行可视化处理;对所述的效应器细胞所具有的细胞毒性进行评价;将所述的微孔阵列与第一种底物进行接触,其中利用一种试剂对所述的底物进行了预处理,所述的试剂能够对白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、以及干扰素- γ (IFN- γ)中的一种或者多种进行特异性的检测;并且确定存在于所述的微孔之中的效应器细胞是否与所述的一种或者多种试剂进行了结合。在一个方面,所述的细胞毒性是通过检测钙黄绿素AM(Calcein AM)的释放的方式来进行评价的。任选的,利用一种或者多种特异性的表面标记物蛋白质对所述的细胞进行了标记。优选的,所述的表面标记物蛋白质是CD62L,趋化因子受体3(CXCR3),趋化因子受体4(CCR4),或者趋化因子受体7(CCR7)。在另外一个方面,从一个或者多个微孔中进行效应器细胞的回收。任选的,对上述回收的细胞进行培养从而获得所述的回收细胞的克隆性的扩增。任选的对存在于所述的回收细胞之中的一种或者多种基因的表达进行鉴定。所述的被回收的细胞优选是CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL),天然杀伤(NK)细胞,天然杀伤(NK)T细胞,或者 γ δ T 细胞。在另外一个方面,所述的宿主是一种处于急性阶段的感染,一种高度活跃的抗逆转录病毒治疗(HAART)宿主,或者是一种杰出的控制者(elite controller)。

[0009] 本发明同样提供了用以对宿主体内的一种先天性免疫应答进行评价的方法,其中所述的免疫应答针对的是一种人类免疫缺陷病毒(HIV)感染,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种来自于宿主的天然杀伤(NK)细胞悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有存在于一个微孔阵列之中的至少一个微孔,其中所述的宿主感染有人类免疫缺陷病毒(HIV),或者所述的宿主被怀疑感染了人类免疫缺陷病毒(HIV),并且其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔内沉积有一个单个的细胞;并且将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中利用至少一种天然杀伤(NK)细胞检测试剂对所述的底物进行了预处理;并且对所述的试剂进行检测,从而对天然杀伤(NK)细胞进行检测并且对所述的先天性免疫应答进行评价。在一个方面,使用NKp4-Cy3、CD107a-Alexa647、和/或CD69-Alexa488对所述的天然杀伤(NK)细胞进行检测。所述的天然杀伤(NK)细胞检测试剂能够对天然杀伤(NK)细胞进行检测。在被沉积在所述的可模压成型的平板上之前,任选的对所述的细胞进行共同培养。优选的,利用白细胞介素-12(IL-12)以及白细胞介素-18(IL-18)对所述的细胞进行共同培养。

[0010] 本发明同样提供了用以对天然杀伤 (NK) 细胞群体中的克隆多样性进行评价的方法,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种天然杀伤 (NK) 细胞以及来自于宿主的靶向细胞的悬浮液,其中所述的悬浮液被沉积于一种可模压成型的平板之上,所述的平板上含有至少一个存在于微孔阵列之中的微孔,其中在所述的微孔阵列中的至少一个微孔中含有一个单个的效应器细胞;在允许利用所述的天然杀伤 (NK) 细胞对所述的靶向细胞进行溶解的条件下对所述的悬浮液进行培养;对利用所述的效应器细胞对所述的靶向细胞所产生的溶解进行检测,并且对所述的效应器细胞进行识别,从而对存在于所述的天然杀伤 (NK) 细胞群体中的克隆多样性进行评价。在一个方面,对能够使所述的靶向细胞发生溶解的效应器细胞进行回收并且任选的对其进行培养。在另外一个方面,对已经使所述的靶向细胞发生溶解的天然杀伤 (NK) 细胞进行回收。任选的,在将细胞沉积于所述的微孔内之前对所述的天然杀伤 (NK) 细胞以及靶向细胞进行混合。或者可供选择的,在将细胞沉积于所述的微孔内之后对所述的天然杀伤 (NK) 细胞以及靶向细胞进行混合。在一个方面,通过对一种被标记的细胞所具有的荧光性的变化进行监测的方式对溶解作用进行检测。在另外一个方面,对已经使所述的靶向细胞发生溶解的天然杀伤 (NK) 细胞进行分离并且对存在于所述的天然杀伤 (NK) 细胞之上的杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 基因进行检测。所述的微孔阵列任选的与一种底物进行了接触,其中利用至少一种试剂对所述的底物进行了预处理,所述的试剂能够特异性的检测出所述的天然杀伤 (NK) 细胞的一种产物;并且对所述的试剂进行检测。所述的试剂是一种抗体,细胞因子,或者是溶解作用的可溶性的调节剂。优选的,所述的细胞因子是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、以及干扰素- γ (IFN- γ)。

[0011] 本发明同样提供了用以对天然杀伤 (NK) 细胞以及 B 细胞群体中的多样性进行评价的方法,所述的方法是通过下述方式来实现的:提供一种细胞悬浮液,所述的悬浮液中包括扩展的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型 CD4+ 细胞 T 细胞,活化的天然杀伤 (NK) 细胞,以及 B 细胞和靶向细胞,其中所述的悬浮液被沉积在一种可模压成型的平板之上,在所述的平板上含有存在于微孔阵列中的至少一个微孔,其中存在于所述的微孔阵列之中的至少一个微孔中含有一个单个的 T 细胞;在允许所述的抗体与 T 细胞的表面进行结合的条件下对细胞进行培养,其中所述的抗体是由 B 细胞生成的;对含有 B 细胞、天然杀伤 (NK) 细胞、以及溶解的 T 细胞的孔进行识别,并且对 B 细胞或者天然杀伤 (NK) 细胞进行识别。在一个方面,利用白细胞介素-2 (IL-2) 对所述的天然杀伤 (NK) 细胞进行活化。在另外一个方面,利用 CD40L 或者抗-B 细胞抗原受体 (BCR) 对所述的 B 细胞进行活化。在另外一个方面,利用一种抗-B 细胞抗原受体 (BCR) 抗体的 CD40L 对所述的 B 细胞进行活化。任选的,从所述的孔中对所述的 B 细胞或者天然杀伤 (NK) 细胞进行回收;并且对所述的 B 细胞所具有的一种或者多种性质进行鉴定。在另外一个方面,对存在于所述的 B 细胞之中的抗体基因进行鉴定。任选的对存在于所述的 B 细胞之中的编码抗体的基因所具有的 VDJ 区域进行分析。在允许抗体与所述的底物进行连接的条件下任选的将所述的微孔阵列与一种底物进行接触,其中所述的抗体是有所述的 B 细胞生成的。在另外一个方面,将所述的底物与来自于一个人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞的溶解产物进行接触,并且对含有由 B 细胞生成的抗体的孔进行识别,其中所述的抗体与所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 溶解产物或者一种抗-免疫球蛋白 G3 抗体进行了结合。优选的,对含有 B 细胞生成的抗体的孔进行了识别,其中所述的抗体与所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 溶解产物或者抗-免疫球蛋白 G3 抗体

进行了结合。

[0012] 通过下述对于优选实施方式的描述,并且通过下述的权利要求,本发明所具有的其他特征以及优点将变得显而易见。除非另外定义,在本发明中所使用的所有的技术术语以及科学术语将具有与发明所属技术领域的普通技术人员普遍理解的含义相同的含义。尽管那些与本发明中所描述的相类似或者相等价的方法以及材料可以被用来进行本发明的实践或者测试,但在下文中对适合的方法以及材料进行了描述。在本发明中提及的所有公开出版物、专利申请、专利、以及其他的参考文献中的全部内容被引入作为参考。如果遇到矛盾,本说明书,包括定义,将占主导地位。除此之外,所述的材料、方法、以及实施例仅仅是描述性的并且并不意在构成限制。

[0013] 本发明所具有的其他特征以及优点将通过下面详细描述说明书以及权利要求而变得显而易见。

附图说明

[0014] 附图 1 是一种检测方案的图示。将所述的细胞,经过荧光素标记的靶向(利用钙黄绿素进行了染色,绿色)以及效应器(利用 α -CD8 抗原呈递细胞(APC)进行了染色,粉色)装载在大约 30 微摩的微孔阵列之中并且利用荧光显微镜对其进行了成像。在此之后利用玻璃盖玻片对所述的微孔阵列进行了覆盖并且在 37°C、5% 的二氧化碳条件下进行了 2-6 小时的培养,其中利用捕获抗体对所述的玻璃盖玻片进行了预先的官能团化。经过培养之后,使用特异性的荧光素抗体对存在于所述的玻璃盖玻片之上的分泌出的细胞因子进行检测,并且利用缺乏荧光性的特性对由特异性的效应器所溶解的靶向进行成像(孔 1)。在仅仅含有靶向细胞的微孔中(孔 2)以及在含有不能够溶解所述的靶向的效应器的微孔中(孔 3),所述的靶向所具有的荧光性应当仅仅发生了非常微小的变化。

[0015] 附图 2 是经过标记的靶向以及效应器的一系列代表性的荧光成像,所述的成像发生在培养之前以及培养之后(0 小时以及 4 小时)。(A) 钙黄绿素染色(绿色),肽负载(KK10)的靶向(可以看到 3 个独立的细胞);(B) 利用 α -CD8- 抗原呈递细胞(APC)进行标记(粉色)的效应器;(C) 效应器(粉色)以及未负载(没有进行 KK10 肽的添加)的靶向(绿色)的共同培养物;(D) 效应器(粉色)以及负载有 KK10 肽的靶向(绿色)的共同培养物。仅仅当效应器能够对负载有肽的靶向进行识别时,才会发生靶向的溶解(如 D 中所示)。

[0016] 附图 3 是一组 CD4T 细胞的荧光成像,其中利用一种表达 NL4-3 病毒的绿色荧光蛋白(GFP)对所述的 T 细胞进行了感染。所述的绿色细胞标记着感染。

[0017] 附图 4 是一系列的荧光成像,表示的是人类免疫缺陷病毒(HIV)特异性 CD8+T 细胞克隆与 B 细胞的共同培养物,其中所述的 B 细胞负载有钙黄绿素 AM 标记的人类免疫缺陷病毒(HIV)肽。通过荧光素信号的损失标记着由细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的溶解作用。

[0018] 附图 5 是一组荧光成像,表示的是抗原呈递细胞(APC)标记的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)(红色)与钙黄绿素 AM 标记的 B- 细胞(绿色)的共同培养物。钙黄绿素 AM 荧光性淬灭代表的是由细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的杀伤。

[0019] 附图 6 是一幅示意图,描述的是已经使用一种微孔阵列研发出来的单细胞测量方

法的程序。以串联的方式或者以平行的方式对测量值进行了连结。在每一个图像中表示出来的方块为 50 微米。

[0020] 附图 7 是捕获检测的一种示意性的图示,用来对细胞进行识别,其中所述的细胞能够识别出糖蛋白 (gp) 120 的 CD4 结合区域。在利用可溶性的 CD4 进行阻滞之后,一个阵列的 B 细胞将被用来印染在 (a) 固定化的糖蛋白 (gp) 120 的表面之上,并且在此之后 (b) 被印染在固定化的糖蛋白 (gp) 120 的另外一个表面之上。

[0021] 附图 8 是实验设计的一种示意性的图示,用来对来自于 B 细胞的人类抗体进行识别,其中所述的抗体能够结合多种人类免疫缺陷病毒 (HIV) 菌株。每一丛被捕获的抗体(带有颜色的)代表着所述的微阵列之中的一种元素,其中所述的元素与一个相对应的微孔阵列中所容纳的细胞相匹配。

[0022] 附图 9 描述的是来自于单细胞数据的功能性曲线的构建。对细胞群体进行分拣并且对它们所具有的细胞毒性能力,它们的细胞因子曲线,以及表面标记物进行测量。这样的地图标志着在所述的感染过程中所述的子集变化的频率。CD4+T 细胞的类似的曲线提供了用于所述的系统的状态的参考点。

[0023] 附图 10 表示的是凝胶,所述的凝胶描述的是单独的 B 淋巴细胞进行的简并的逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 所得到的结果,其中所述的 B 细胞是从微孔中选出的。将 B 细胞从一种血液样本中被纯化出来(通过磁性分选进行的外周血单核细胞 (PBMC) 的被动选择)并且被装载于微孔之中。对来自于十二个微孔中的细胞进行随机的选择,将其沉积于溶解缓冲液中,并且通过逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 对其进行扩增,其中使用到了一种用于所述的重链以及轻链的简并的引物组。寻找到了七个蛋白质序列并且将其在所述的凝胶之下被表示出来。

具体实施方式

[0024] 为了设计出有效的疫苗以及治疗方法,对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 用以躲避免疫系统所使用到的机制进行彻底的了解是至关重要的。对于未经过治疗的个体而言,所述的疾病的恶化是通过所述的病毒复制的持续以及所述的 CD4+T 细胞的损失来标志的(参见 Kahn JO, Walker BD(于 1998 年)在 N. Engl. J. Med. 《新英格兰医学杂志》339, 33 中发表的文章 Acute human immunodeficiency virus type I infection 《急性 I 型人类免疫缺陷病毒感染》;Hecht FM 等人(于 2002 年)在 AIDS 《获得性免疫缺陷综合症》16, 1119 中发表的文章 Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection 《实验室测试以及临床症状在识别原发性人类免疫缺陷病毒感染中的用途》)。病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 在控制持续性的复制作用中起到了显著的作用并且所述的人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 特异性 CD8+T 细胞的最初的出现已经表明能够减少病毒的负载(参见 Altfeld M 等人(于 2006 年)在 PloS. Med. 《药物科学公共图书馆》3(10), 1851 中发表的文章 HLA Alleles Associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial CD8+T cell response against HIV-1 《与获得性免疫缺陷综合症的延迟恶化相关联的人类白细胞抗原 (HLA) 等位基因强烈的促进了初始的 CD8+T 细胞针对人类免疫缺陷病毒-1 的应答》)。然而,这种病毒复制作用的减少在绝大多数的个体中(恶化者)是暂时性的。一群非常小的子集的个体被称为低

水平病毒载量长期不恶化 (LTNP) 的杰出的控制者 (elite controller), 他们在很长的时间段内保持着低的病毒临界值并且在这些个体中识别出的所述的病毒特异性 CD8+T 细胞已经表现出具有更高的增殖能力, 这种更高的增殖能力是相较于从恶化者处分离出的相同细胞而言的 (参见 Migueles SA 等人 (于 2002 年) 在 Nat. Immun. 《自然免疫学》3(11), 1061 中发表的文章 HIV-specific CD8+T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors 《人类免疫缺陷病毒特异性 CD8+T 细胞的增殖作用与穿孔蛋白的表达所发生的连结及其在非恶化者中的保持》)。

[0025] 在这里所描述的本发明之前, 在对存在于一种病原体与所述的人类免疫系统之间的相互作用进行研究时, 存在两个内在固有的挑战: 1) 在大多数的临床样本中可以利用的所述细胞的数量通常是非常有限的; 以及 2) 独特的克隆物, 例如病原体特异性 B 细胞或者 T 细胞, 是稀少的。现有的分析工具同样不足以能够将多种特征 (血统, 功能, 基因型) 同时分配到同一个个体细胞中去。例如, 流式细胞术是一种常见的技术, 被用来对单个细胞的群体进行评价, 评价表面表达的表型标记物, 但是对细胞因子曲线所进行的分析, 则需要对所述的细胞进行固定化以及渗透, 其中所述的细胞因子曲线标志着某些功能性的表型。这种存活能力的丧失意味着不能够直接的对另外的功能性特征例如细胞毒性进行评价, 并且遗传学分析同样通常受到阻碍。因此, 在这里所描述的本发明之前, 不可能明了的搞清楚来自于所述的先天性免疫系统以及适应性免疫系统中的所述的细胞子集中存在的精确的异质性, 其中所述的免疫系统能够对一种特定的传染性试剂产生应答。针对所述的免疫系统的状态建立一种综合性的单帧采集同样是困难的。这样的曲线能够提高对所述的机制所进行的识别, 其中所述的机制能够提供针对某些病原体的保护作用以及用于健康应答的诊断性指示剂。因此, 本发明提供了新的技术, 用以对许多个体细胞的血统、功能、以及表型进行测量并且建立它们之间的关联性, 从而加强对存在于所述的人类免疫系统与目标病原体之间的相互作用所进行的研究, 特别是针对人类免疫缺陷病毒 (HIV) (参见 Fauci, A. S., Johnston, M. I., Dieffenbach, C. W., Burton, D. R., Hammer, S. M., Hoxie, J. A., Martin, M., Overbaugh, J., Watkins, D. I., Mahmoud, A. & Greene, W. C. (于 2008 年) 在 Science 《科学》321, 530-532 中发表的文章 Perspective-HIV vaccine research: The way forward 《前进之路的展望—人类免疫缺陷病毒疫苗的研究》)。

[0026] 本发明提供了这样的方法以及组合物, 用以对针对一种感染所产生的宿主免疫应答进行鉴定, 包括由人类免疫缺陷病毒引起的感染。可以使用本领域已知的方法对微阵列以及平板进行构建, 包括那些在 PCT/US2006/036282 (公开号为 WO/2007/035633) 以及 USSN61/057371 中描述的方法。上述这些申请中的内容作为一个整体在本发明中被引入作为参考。当在本发明中被进行使用时, “可模压成型的平板”指的是这样的一种装置, 当将其放置于与一种底物发生接触时, 所述的装置能够至少在一个方向上弯曲, 移动或者变形。例如, 在某些构型中所述的可模压成型的平板可以包括一种材料, 例如, 一种人造橡胶材料, 这样一来当所述的可模压成型的平板被放置于与一种底物发生接触时, 可以在所述的可模压成型的平板与所述的底物之间形成一种本质上可以流动的牢固的密封, 用以阻滞或者防止任何的流体从所述的可模压成型的平板内流出或者渗漏。

[0027] 抗病毒性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 在人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抑制作用中所发挥的功能

[0028] 细胞毒性 CD8⁺T 细胞 (CTL) 在对所述的急性病毒感染的清除以及持续性病毒汇集的控制中能够起到关键性的作用。在感染有人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的恒河猴中, CD8⁺淋巴细胞的损失能够导致病毒血症发生快速以及显著的增加。然而, 在不存在对病毒进行清除或者控制的情况下, 慢性的人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 的感染与大量的类人猿免疫缺陷病毒 (SIV) 特异性 CD8⁺T 细胞有关。这些数据表明, 不仅仅是数量, 所述的 CD8⁺T 细胞所具有的功能对于有效的控制病毒的复制而言也是至关重要的。到目前为止, 已经可以通过两种方式对所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性 CD8⁺T 细胞的活动所具有的效能进行确定, 所述的两种方式是: 通过对所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性 CD8⁺T 细胞所具有的频率进行评价的方式, 或者通过对这些 T 细胞经由抗原的刺激作用分泌干扰素 - γ (IFN- γ) 的能力进行评价的方式, 其中对所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性 CD8⁺T 细胞所具有的频率所进行的评价是通过利用 I 类肽 - 人类白细胞抗原 (HLA) 复合物的四聚体对细胞进行标记的方式来实现的。然而, 近来的研究表明, 在慢性的人类免疫缺陷病毒 (HIV)-1 感染中, CD8⁺T 细胞的频率以及通过 CD8⁺T 细胞进行的干扰素 - γ (IFN- γ) 的分泌与所述的病毒血症的控制之间不存在关联性。

[0029] 通过使人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型 CD4⁺T 细胞与自体同源的大量的 CD8⁺T 细胞进行共同培养的方式来测量所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的抑制人类免疫缺陷病毒 (HIV) 复制作用的能力进行测量。这些试验对于所述的个体所具有的抑制人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的能力表现出了多种多样的结果。近来的结果表明, 体外的 CD8⁺T 细胞的应答与这些细胞所具有的抑制人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 的体外复制作用的能力之间不存在关联性。尽管所述的 CD8⁺T 细胞能够以足够战胜所述病毒的数量进行增殖从而能够获得对所述的病毒的控制, 但是这些细胞所具有的表型, 功能分布, 以及遗传转录曲线 (成熟 / 消耗) 还没有知晓。

[0030] 尽管病毒特异性 CD8⁺T 细胞在控制疾病的恶化方面所具有的重要性似乎是清楚的, 对于它们的鉴定以及分离仍然是挑战。已经使用过各种不同的方法来分离这些细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 这些方法具有各自的优点以及缺点。限制性稀释检测可以被用来分离抗原特异性克隆物, 但是其依赖于这些克隆物在组织培养中的繁殖能力。酶联免疫斑点检测 (ELISPOT) 检测能够对活化的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的分泌单个的细胞因子的能力进行测量, 但是不能够提供关于所述的细胞溶解酶能力的任何信息。同样的, 之前已经证明了抗原呈递细胞 (APC) 能够在不进行细胞因子的同时分泌的情况下引发细胞毒性的功能, 其中所述的抗原呈递细胞 (APC) 展现出低密度的肽负载的主要组织相容性复合体 (pMHC) (参见 Valitutti S 等人 (于 1996 年) 在 J. Exp. Med. 《试验药理学杂志》183, 1917 中发表的文章 Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy 《通过不同水平的 T 细胞受体的占用在细胞毒性 T 淋巴细胞中引发的不同的应答》)。这种限制作用在试图对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 进行分离时是格外重要的, 因为病毒感染的感染能够对 I 类主要组织相容性复合体 (MHC) 进行去调节 (参见 Mangasarian A 等人 (于 1999 年) 在 J. Virol. 《病毒学杂志》73(3), 1964 中发表的文章 Nef-Induced CD4 and Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) Down-Regulation Are Governed by Distinct Determinants: N-Terminal Alpha Helix and Proline Repeat of Nef

Selectively Regulate MHC-I Trafficking 《Nef 诱导的 CD4 以及 I 类主要组织相容性复合体 (MHC-I) 的去调节作用受到截然不同的决定簇的支配 :Nef 的 N- 末端 α 螺旋结构以及脯氨酸重复选择性的调节 I 类主要组织相容性复合体的运输》)。肽负载、荧光素标记的 I 类人类白细胞抗原 (HLA) 四聚体染色与流式细胞术的耦合被用来对抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 进行分离,但是同样不能够提供关于细胞溶解酶能力的信息。除此之外,已经表明使用四聚体染色进行分离的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 不能够总是识别出病毒感染型细胞 (参见 Appay V 等人 (于 2000 年) 在 J. Exp. Med. 《试验药理学杂志》192(1),63 中发表的文章 HIV-specific CD8⁺T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function《人类免疫缺陷病毒特异性 CD8⁺T 细胞能够生成抗病毒性的细胞因子但是在细胞溶解酶功能方面被进行了削弱》)。已经报道了使用半胱天冬酰胺酶底物的流式细胞术细胞溶解检测,但是所述的检测并不非常适合筛选大量的效应器细胞 (参见 Liu L 等人 (于 2002 年) 在 Nat. Med. 《天然药理学》8,185 中发表的文章 Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates 《使用细胞渗透性荧光性半胱天冬酰胺酶底物对 T 细胞介导的细胞毒性所进行的可视化以及量化》)。因此,在这里所描述的本发明之前,不存在单一的高通量的技术,用来测量所述的单个的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的溶解单个的感染型靶向原发性细胞的能力,以及测量由它们所分泌的所述的细胞因子以及细胞毒性分子,同时仍然能够回收到所述的存活细胞,用以建立克隆系,从而进行进一步的功能鉴定以及遗传学分析。

[0031] 对所述的 CD8⁺T 细胞所具有的高频率的保持与所述的患者所具有的抑制病毒复制的能力存在直接的关联性,其中所述的 CD8⁺T 细胞能够识别并且溶解感染型的 CD4⁺T 细胞。在单个细胞的水平上对细胞溶解性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 以及非细胞溶解性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的独特的表型、功能、以及基因表达曲线所进行的定义将能够允许对所述的抗病毒性 CD8⁺T 细胞的免疫力之间的关联性进行定义,这种定义是建立一种有效的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 疫苗所需要的。本发明提供了一种单个细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤检测,所述的杀伤检测与表型检测以及遗传学检测进行了结合,将能够允许对有效的抗病毒性 CD8⁺T 细胞介导的免疫力所具有的免疫学关联性以及遗传学关联性进行确定。在所述的单个细胞水平上对这些特征所进行的定义将提供一种原型的应答,其中所述的应答是经由一种疫苗接种作用而引发的,所述的应答能够驱动所述的 CD8⁺T 细胞的扩展,其中所述的 CD8⁺T 细胞的扩展作用能够有效的控制病毒的复制作用。

[0032] 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型人类的抗体多样性

[0033] 在所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的表面进行表达的所述的原发性受体是糖蛋白 (gp) 120。它对于感染作用而言是必不可少的,并且能够与 CD4 进行结合,其中所述的 CD4 是一种呈递在某些 T 细胞的表面之上的受体。许多用于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 疫苗的途径已经在寻找通过引发一种作用于糖蛋白 (gp) 120 的中和抗体 (NAbs) 应答的方式对所述的感染进行阻滞,但是到目前为止所有的尝试都失败了,这在很大程度上归因于存在于菌株之间的所述受体所具有的变化性及其在其宿主体内发生变异的倾向性。然而,存在这样的被感染的人群的例子,所述的人群已经天然的产生了中和抗体 (NAbs),所述的中和抗体 (NAbs) 能够广泛的对所述病毒的许多变体产生抑制。利用常规的技术对这样的抗体

所具有的多样性进行评价是困难的,因为存在于血清之中所述的独特的抗体在数量上是有限的,难以进行纯化,并且在不存在相对应的基因的条件下不能够通过重组的方式来制备得到。所存在的挑战是将一种 bNAb 与产生其的 B 细胞所具有的克隆路线进行匹配。到目前为止,用以识别基因的最为成功的方式已经淘选出抗体文库,其中所述的基因能够编码中和抗体 (NAb),其中所述的抗体文库是通过大量的循环的 B 细胞以重组的方式建立的,所述的 B 细胞来自于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 阳性个体 (参见 Koefoed, K., Farnaes, L., Wang, M., Svejgaard, A., Burton, D. R. & Ditzel, H. J. (于 2005 年) 在 *J Immunol Methods* 《免疫学方法杂志》297,187-201 中发表的文章 *Molecular characterization of the circulating anti-HIV-1 gp120-specific B cell repertoire using antibody phage display libraries generated from pre-selected HIV-1 gp120 binding PBLs*。《使用来自于预先选择的人类免疫缺陷病毒 -1 糖蛋白 120 结合的外周血淋巴细胞 (PBL) 的抗体噬菌体展示文库所进行的循环抗人类免疫缺陷病毒 -1 糖蛋白 120 特异性 B 细胞整体的分子鉴定》)。然而,这样的方法掩盖了所述个体的天然的整体性,因为所述的过程打乱了所述的重链与轻链的独特的克隆组合。正如在下文的实施例中所描述的,将致力于解决两个问题:(1) 存在于一个个体中的生成 bNAb 的 B 细胞间所具有的克隆多样性;以及 (2) 对能够结合多种多样的原发性分离物的 bNAb 的鉴定。

[0034] 针对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的细胞免疫应答

[0035] 一种人类免疫缺陷病毒 (HIV) 疫苗的希望来自于这样的人,所述的人能够以自然的方式对所述疾病的恶化产生显著的控制——所谓的“杰出的控制者 (elite controller)”——以及通过疫苗的接种被保护免于感染类人猿免疫缺陷病毒 (SIV) 的非人类的灵长类动物,但是在这些情形中与保护作用相关联的关键性因素仍然不清楚 (参见 Saez-Cirion, A., Pancino, G., Sinet, M., Venet, A., Lambotte, O. & Gr, A. E. H. C. S. (于 2007 年) 在 *Trends Immunol* 《免疫学趋势》28,532-540 中发表的文章 *HIV controllers: how do they tame the virus?* 《人类免疫缺陷病毒控制者:它们怎样驯服病毒?》;Deeks, S. G. & Walker, B. D. (于 2007 年) 在 *Immunity* 《免疫力》27,406-416 中发表的文章 *Human immunodeficiency virus controllers: Mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy* 《人类免疫缺陷病毒控制者:在不进行抗逆转录病毒治疗的条件下持续的病毒控制所具有的机制》;Koff, W. C., Johnson, P. R., Watkins, D. I., Burton, D. R., Lifson, J. D., Hasenkrug, K. J., McDermott, A. B., Schultz, A., Zamb, T. J., Boyle, R. & Desrosiers, R. C. (于 2006 年) 在 *Nat Immunol* 《自然免疫学》7,19-23 中发表的文章 *HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines* 《人类免疫缺陷病毒疫苗的设计:来自于存活的被削弱的类人猿免疫缺陷病毒疫苗的见解》)。所述的适应性的免疫应答已经接受了太多的关注,但是近来对于所述的先天性免疫系统所进行的研究已经强调了其在修正所述的适应性的应答方面所具有的重要性 (参见 Pulendran, B. & Ahmed, R. (于 2006 年) 在 *Cell* 《细胞》124,849-863 中发表的文章 *Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development* 《先天性免疫力向免疫学记忆中的转换对疫苗的研发所产生的影响》)。用于对免疫细胞进行监测的现有的检测方法不足以能够对存在于它们的功能性行为中的异质性进行鉴定,其中对所述的免疫细胞所进行的监测指的是监测所述的免疫细胞能够怎样有效的消除所述的被感染

细胞（参见 Fauci, A. S., Johnston, M. I., Dieffenbach, C. W., Burton, D. R., Hammer, S. M., Hoxie, J. A., Martin, M., Overbaugh, J., Watkins, D. I., Mahmoud, A. & Greene, W. C. (于 2008 年) 在 Science 《科学》321, 530-532 中发表的文章 Perspective-HIV vaccine research: The way forward《人类免疫缺陷病毒疫苗研究的前进之路的展望》; Walker, B. D. & Burton, D. R. (于 2008 年) 在 Science《科学》320, 760-764 中发表的文章 Toward an AIDS vaccine《获得性免疫缺陷综合症疫苗的方向》)。本发明提供了用于鉴定不同血统的个体细胞的多种免疫功能的方法, 以及用于确定不同血统的个体细胞的多种免疫功能间的相关性的方法, 其目的在于对来自于不同的患者组的效应器细胞的子集进行分析, 其中所述的患者组例如是, 急性感染组, 慢性恶化组, 高活性抗逆转录病毒治疗 (HAART) 患者组, 以及杰出的控制者 (elite controller)。正如在本发明中所描述的, 定量的细胞分析突出了这样的细胞, 所述的细胞具有特异性的功能组合, 其中所述的功能是控制病毒的复制作用所必需的功能。

[0036] 所述的先天性的免疫应答提供了抵抗病毒感染的保护作用的另外一个部分。天然杀伤 (NK) 细胞是这种应答中的一种主要的组成成分 (参见 Alter, G., Teigen, N., Ahern, R., Streeck, H., Meier, A., Rosenberg, E. S. & Altfeld, M. (于 2007 年) 在 J Infect Dis 《传染性杂志》195, 1452-1460 中发表的文章 Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection《在急性人类免疫缺陷病毒 -1 感染的过程中先天性以及适应性的效应器细胞的功能所发生的演变》)。这些细胞属于细胞毒性效应器细胞, 所述的细胞同样能够经由细胞因子的释放来诱导适应性的免疫应答, 其中所述的细胞因子例如是干扰素 (IFN), 巨噬细胞炎性蛋白 -1 β (MIP-1 β), 肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 以及粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。在人类免疫缺陷病毒 -1 感染的情形中, 强有力的流行病学数据已经证明了: 同时拥有特定的天然杀伤 (NK) 细胞受体 (杀伤免疫球蛋白受体 -3DS1 (KIR3DS1) 以及杀伤免疫球蛋白受体 -3DL1 的某些等位基因) 以及它们的假定配体 (人类白细胞抗原 -B 等位基因, 其在位置 80 处具有一个异亮氨酸) 的个体以更为缓慢的速度发生恶化, 所述的恶化是朝向获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 发展的, 所述的更为缓慢是相较于那些仅仅含有这样的等位基因中的一个或者不含有这样的等位基因的个体而言的 (参见 Martin, M. P., Qi, Y., Gao, X. J., Yamada, E., Martin, J. N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E. E., Shupert, W. L., Phair, J., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Kirk, G. D., Telenti, A., Connors, M., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Parham, P., Deeks, S. G., McVicar, D. W. & Carrington, M. (于 2007 年) 在 Nat Genet 《自然遗传学》39, 733-740 中发表的文章 Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1 《作用于人类免疫缺陷病毒 -1 的人类白细胞抗原 -B 与杀伤免疫球蛋白受体 D3L1 亚类型所具有的先天性的伙伴关系》)。与之相类似的, 尽管进行反复的暴露, 在大量的天然杀伤 (NK) 细胞中升高的天然杀伤 (NK) 细胞的活性以及增加的杀伤免疫球蛋白受体 -3DS1 的表达与针对感染的保护作用之间存在关联性 (参见 Alter, G., Martin, M. P., Teigen, N., Carr, W. H., Suscovich, T. J., Schneidewind, A., Streeck, H., Waring, M., Meier, A., Brander, C., Lifson, J. D., Allen, T. M., Carrington, M. & Altfeld, M. (于 2007 年) 在 The Journal of experimental medicine《试验药理学杂志》204, 3027-3036 中发表的文章 Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication

based on distinct KIR/HLA subtypes 《基于截然不同的杀伤免疫球蛋白受体 / 人类白细胞抗原亚类型的由差异化的天然杀伤细胞介导的人类免疫缺陷病毒 -1 复制作用的抑制作用》; Long, B. R., Ndhlovu, L. C., Oksenberg, J. R., Lanier, L. L., Hecht, F. M., Nixon, D. F. & Barbour, J. D. (于 2008 年) 在 *J Virol* 《病毒学杂志》82, 4785-4792 中发表的文章 *Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection* 《在早期的 1 类人类免疫缺陷病毒感染中由杀伤免疫球蛋白受体 3DS1 产生的天然杀伤细胞功能的增强》)。这些数据表明, 特定的天然杀伤 (NK) 细胞群体在预防感染以及控制感染方面同时起到了保护性的作用, 但是仍然没有对这些细胞所具有的精确的表型进行定义。

[0037] 天然杀伤 (NK) 细胞用来消除人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞所采用的一种机制是直接的细胞溶解作用, 所述的细胞溶解作用是经由细胞与细胞的接触而产生的。在所述的天然杀伤 (NK) 细胞的表面上进行表达的某些形式的所述的杀伤免疫球蛋白受体 (KIR) 能够向所述的细胞提供抑制性的信号, 使得当其与 I 类人类白细胞抗原 (HLA) 进行接连时, 对细胞溶解的功能产生抑制, 其中所述的 I 类人类白细胞抗原 (HLA) 是在一种靶向细胞的表面上进行表达的 (参见 Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. & Moretta, L. (于 2002 年) 在 *Nat Immunol* 《自然免疫学》3, 6-8 中发表的文章 *What is a natural killer cell?* 《什么是天然杀伤细胞?》)。在不存在这样的相互作用的情况下, 所述的天然杀伤 (NK) 细胞能够对所述的靶向细胞进行活化以及溶解。人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞通常情况下能够对所述的人类白细胞抗原 -A (HLA-A) 以及人类白细胞抗原 -B (HLA-B) 等位基因的表达进行去调节, 这使得它们更加容易受到活化的天然杀伤 (NK) 细胞的细胞溶解作用 (参见 Fogli, M., Mavilio, D., Brunetta, E., Varchetta, S., Ata, K., Roby, G., Kovacs, C., Follmann, D., Pende, D., Ward, J., Barker, E., Marcenaro, E., Moretta, A. & Fauci, A. S. (于 2008 年) 在 *Plos Pathogens* 《病原体公共图书馆》4, 1-13 中发表的文章 *Lysis of endogenously infected CD4⁺T cell blasts by rIL-2 activated autologous natural killer cells from HIV-infected viremic individuals* 《来自于人类免疫缺陷病毒感染型病毒性个体的重组白细胞介素 2 活化型自体同源性天然杀伤细胞对内感性感染型 CD4⁺T 细胞群所进行的溶解》)。一种天然杀伤 (NK) 细胞子集用以破坏人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞所采用的第二种机制是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC), 其中所述的天然杀伤 (NK) 细胞子集能够表达 CD 16 (Fc 受体 III) (参见 Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (于 2001 年) 在 *Trends Immunol* 《免疫学趋势》22, 633-640 中发表的文章 *The biology of human natural killer-cell subsets* 《人类天然杀伤细胞子集的生物学》)。这些受体能够与所述抗体的 Fc 区域进行结合, 其中所述的抗体与存在于所述的被感染细胞表面上的靶向进行了结合, 并且通过所述的天然杀伤 (NK) 细胞对溶解作用进行了活化。这种保护机制需要所述的体液免疫应答以及所述的天然杀伤 (NK) 细胞的先天性应答之间的合作, 其中所述的体液免疫应答是由 B 细胞介导的。这种应答对于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的感染作用的延迟恶化而言可能是重要的, 并且在某些情形中, 这种应答对于保护作用而言可能是重要的, 其中所述的保护作用是保护静脉药物使用者免于接触人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 以及恒河猴免于接触类人猿免疫缺陷病毒 (SIV) (参见 Stratov, I., Chung, A. & Kent, S. J. (于 2008 年) 在 *J Virol* 《病毒

学杂志》82, 5450-5459 中发表的文章 Robust NK cell-mediated human immunodeficiency virus (HIV)-specific antibody-dependent responses in HIV-infected subjects 《在人类免疫缺陷病毒感染型宿主中由强劲的天然杀伤细胞介导的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性抗体依赖性应答》)。然而, 在这里所描述的本发明之前, 对于这种机制所进行的研究是有局限性的, 这种局限性是由于用于测量抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 的定量检测方法的缺失而引发的。

[0038] 本发明将在下述的非限制性实施例中被进行进一步的描述。

[0039] 实施例 1. 一种用以评价单个细胞所具有的细胞溶解活性的高通量的检测方法的研发

[0040] 之前的研究已经描述了一种高通量的检测方法, 用以从功能上对大量的原发性细胞进行鉴定, 所述的方法是通过将单个细胞装载于皮升微孔 (每个微阵列中大约 2×10^5 , 每个孔具有大约 30 微米的直径) 中的方式来实现的 (参见 Bradshaw EM 等人 (于 2008 年) 在 Clin. Immunol. 《临床免疫学》129(1), 10 中发表的文章 Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: cytokines and antigen-reactive antibodies 《通过微雕刻对来自于人类淋巴细胞的分泌产物所进行的同时检测: 细胞因子以及抗原反应性抗体》; Love JC 等人 (于 2006 年) 在 Nat. Biotech. 《自然生物技术》24(6), 703 中发表的文章 A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies 《用于快速筛选生成抗原特异性抗体的单个细胞的微雕刻方法》)。将上述装载好的微孔保持与玻璃盖玻片之间的物理接触, 其中利用适合的试剂 (例如在聚赖氨酸盖玻片上涂覆抗白细胞介素-2 (IL-2) 捕获抗体) 对所述的玻璃盖玻片进行预先的功能化处理, 并且对其进行 2 小时的培养从而对所分泌的细胞因子进行捕获。在此之后对所述的盖玻片进行处理并且利用适合的检测抗体对其进行标签, 用以揭示出存在于所述的盖玻片之上的荧光性斑点, 其中所述的荧光性斑点可以被映射到分泌它们的所述细胞之上。随后可以使用自动显微操作器对所述的细胞进行回收, 用于进行克隆扩展。

[0041] 本发明提供了所述的微孔阵列的应用, 用于对细胞间的相互作用进行研究。具体的, 本发明提供了用以对被感染的靶向细胞的杀伤作用进行监测的能力, 其中所述的杀伤作用是通过单个的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 来实现的, 而同时能够对活化标记物 / 分泌的可溶性调节剂进行描述 (profiling)。这种检测系统所具有的另外一个优点是获得结果 (或者完成所述检测) 的速度。例如, 所述的结果是在小于 24 小时的时间内获得的 (或者所述的检测是在小于 24 小时的时间内完成的), 所述的结果是在小于 12 小时的时间内获得的, 或者所述的结果是在小于 10 小时的时间内获得的。例如, 所述的结果是在小于 4 小时的时间内获得的 (或者所述的检测是在小于 4 小时的时间内完成的)。

[0042] 微阵列晶片的构建

[0043] 使用影印石版术以及复制模塑法利用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 来构建所述的微孔阵列。所述的孔所具有的深度以及大小优选的小于 100 微米, 例如, 小于 50 微米。正如所述的熟练技术人员所规定的, 所述的孔所具有的深度以及大小被设定为大约 30 微米。氧气等离子体处理被用来同时对所述的微阵列进行灭菌并且赋予其亲水性。将所述的经过等离子体处理的阵列浸没在磷酸盐缓冲液 - 牛血清白蛋白 (PBS-BSA) 中, 从而保持所述的亲水

性质以用于后续的使用。

[0044] 细胞的储备

[0045] 在下面描述的所述方法中同时使用到了所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞以及自体同源性的 CD8 细胞。同样在下面描述的所述方法中被利用到的包括外周血单核细胞 (PBMC), 其中所述的外周血单核细胞 (PBMC) 来自于恶化者个体, 低水平病毒载量长期不恶化 (LTNP) 个体以及人类免疫缺陷病毒 (HIV) 阴性个体。除此之外, 经过分离的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 克隆物被用来作为阳性对照, 用以确立所述检测所具有的有效性并且对实验条件进行精炼, 其中所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 克隆物能够特异性的识别人类白细胞抗原 (HLA)-B27 限制性人类免疫缺陷病毒 (HIV) 开口肽 (KK10)。

[0046] 检测的发展

[0047] 为了设计出一种强有力的方案用于对所述的靶向特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 进行分离, 先前所提及的所述的 KK10 特异性克隆物 (效应器) 被用来作为效应器并且表达人类白细胞抗原 B27 (HLA B27) 的、EB 病毒 (EBV) 转化型 B 细胞被用来作为靶向。在附图 1 中表示出了一幅用以描述所述检测所具有的大致总体内容的示意图。使用钙黄绿素 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 对所述的装载有肽的 B 细胞 (靶向) 进行染色, 并且将其作为一种细胞完整性的标记物, 其中所述的钙黄绿素 AM 是一种用于细胞内酯酶以及脂肪酶的非特异性荧光性底物。正如在附图 2A 中所表示出的, 在所述的杀伤检测的持续过程中 (4 小时), 在不存在所述的效应器细胞的条件下完整的、非胁迫性细胞仍然具有荧光性。

[0048] 由于靶向的荧光性所发生的减少同样可能归因于经由延长的培养作用所产生的光漂白作用 / 荧光团降解作用, 使用 Sytox 红 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 对靶向进行标记。当被插入到核酸中时, 所述的 Sytox 家族的膜不可渗透性染料在荧光强度方面表现出一种高度的增加 (大于 500 倍), 并且因此可以被用来作为溶解细胞的特异性的标记物, 其中所述的溶解的细胞具有受胁迫的膜。由于所述的 Sytox 以及钙黄绿素染料以直交的方式对所述的细胞进行标记, 它们可以同时被用来对所述的靶向的溶解所具有的动力学进行监测, 这是通过在荧光显微镜的独立波段下对荧光性的增加 / 减少进行追踪的方式来实现的。

[0049] 利用荧光性的抗 CD8 抗体 (抗原呈递细胞 / Alexa647 / 太平洋蓝) 对所述的效应器进行标记。将会被使用到的是在检测条件下 (4 小时, 37°C) 能够表现出最多的可再生性信号以及最少的光漂白作用 / 降解作用的染料。利用 α -CD8- 抗原呈递细胞 (APC) 进行标记的效应器在附图 2B 中被表示出来。

[0050] 先前的报道 (参见 Bradshaw EM 等人 (于 2008 年) 在 Clin. Immunol. 《临床免疫学》129(1), 10 中发表的文章 Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: cytokines and antigen-reactive antibodies 《通过微雕刻对来自于人类淋巴细胞的分泌产物所进行的同时检测: 细胞因子以及抗原反应性抗体》; Love JC 等人 (于 2006 年) 在 Nat. Biotech. 《自然生物技术》24(6), 703 中发表的文章 A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies 《用于快速筛选生成抗原特异性抗体的单个细胞的微雕刻方法》) 以及初步的试验 (附图 2A&2B) 均证实了当被包埋在所述的微孔内时, 所述的细胞不能够经受住细胞凋亡作用。接下来对用以装载所述的微孔阵列的最佳方式进行了确定,

其中所述的装载是具有指定比例的靶向以及效应器。对两种不同的方式进行了评价,所述的方式是:在进行效应器以及靶向的装载之前对存在于介质之中的所述靶向以及效应器进行预先混合,或者依次进行效应器以及靶向的装载。由于首先进行效应器的装载随后进行靶向的装载的这种依次装载的方式为针对于微孔内的效应器与靶向的比例的操作提供了更好的控制,因此其被采纳为所述的标准方式。为了对所述的检测所具有的可行性进行探究,利用效应器对未进行装载的靶向(没有结合肽的靶向,阴性对照)以及装载有 KK10 的靶向(阳性对照)进行了培养。由于存在于所述的效应器之上的所述的 T 细胞受体 (TCR) 仅仅能够对存在于所述的靶向之上的肽-主要组织相容性复合体 (pMHC) 进行识别,在不存在肽的情况下不能够观察到所述的细胞溶解作用(附图 2C)。当利用 KK10 肽对所述的靶向进行预先的负载并且利用效应器对其进行培养时,可以观察到所述的靶向所发生的细胞溶解作用,这是通过所述的绿色荧光的损失来进行证明的(附图 2D)。在附图 2 中所表示出的数据是来自于一个单个的微孔中的代表性的数据。为了对具有单个靶向的所述微孔所具有的频率进行评价并且为了对那些特异性的溶解了所述靶向的效应器子集所具有的频率进行确定,对所生成的荧光图像(两个不同的波段)以及所述的相对照图像(传播的光,第三波段)进行自动化的分析是必要的,其中所述的单个靶向被利用单个的效应器进行了培养。对于如上所述的使用靶向以及效应器克隆物作为对照的试验而言,对少量的细胞(大约 10^3) 所进行的手工检查足以能够确定所述的检测所具有的有效性,但是对于常规的筛选而言,用以对所述的结果数据组进行提取以及分析的运算法则将是必不可少的。

[0051] 对低频率细胞所进行的识别

[0052] 对于细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的常规筛选而言,对于成功的完成所述的检测而言所需要的一个重要的条件是检测以及分离低频率阳性物质的能力。为了达到这一目标,使效应器与人类白细胞抗原 (HLA)-B27 KK10(利用钙黄绿素蓝对其进行了标记)进行预先的混合,其中所述的效应器以不同的比例(1/5,000-1/25,000)与一种不相关的表位(未被标记的)进行了接触,利用 α -CD8-抗原呈递细胞 (APC) 对所述的细胞混合物进行标记并且在微孔阵列中利用负载有 KK10 的靶向(利用钙黄绿素绿对其进行了标记)对它们进行培养。通过 KK-10 特异性效应器能够对存在于微孔中的低频率的效应器阳性物质进行识别,这种识别是通过所述靶向所具有的绿色荧光的损失来实现的,并且可以对所述的定位它们的能力进行独立的验证,这种验证是通过对所述的 KK-10 特异性效应器所具有的位置进行识别的方式来实现的,这种位置的识别是经由荧光图像来实现的,所述的荧光图像是在所述的显微镜的蓝色波段中获得的。

[0053] 抗病毒的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性所具有的表型进行的定义

[0054] 采用所述的微孔阵列平台对有效的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 介导的杀伤所具有的生物学进行剖析。利用两种不同的荧光素报告染料对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型靶向细胞 (T) 以及效应器细胞 (E) 进行标记并且以各种不同的效应器细胞 (E): 靶向细胞 (T) 的比例对其进行混合,并且在此之后将它们以一种方式装载于一个微孔阵列之上,其中所述的方式能够使单个的效应器平均的沉积于每一个孔内。对所述的细胞进行 4 小时的共同培养,并且在此之后对细胞的溶解作用进行测量,这是通过对随着时间而发生的靶向细胞荧光性的消失进行检测的方式来实现的。最终,对介导杀伤的细胞进行识别,并且使用一种自动的显微操作器对这些细胞进行回收并且将其直接转移至 RNA 分离缓冲液中。与此同

时,中间杀伤细胞以及非杀伤细胞同样被进行回收,以用于进行比较。在一个子试验中,对杀伤细胞以及非杀伤细胞进行拾取并且用于进行单细胞克隆从而在所述的克隆水平上获得对这些细胞的深入的了解。这项检测允许以一种更为详细的方式对所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 进行鉴定,但是同样允许在未经操作的 T 细胞上完成这些检测,从而获得关于保护性的 CD8⁺T 细胞的应答所具有的体外关联性的清晰的意见。这样的检测经得起各种不同的试验性修改的检验,从而允许对存在于控制者与恶化者之间的效应器细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的表型之间的差异进行定义,或者对存在于具有“保护性的”人类白细胞抗原 (HLA) 等位基因的患者与具有“非保护性的”人类白细胞抗原 (HLA) 等位基因的患者之间的效应器细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的表型之间的差异进行定义。

[0055] 建立一种基于微孔的检测,用以对单个细胞所具有的细胞溶解能力进行评价

[0056] 本发明同样提供了在具有高度可再现性的不同的设置中对细胞介导的杀伤所进行的识别。与上述提及的微孔培养板有关的许多细节仍然需要被进行定义,包括所述的生物学设计,试剂,动力学,细胞的制备,靶向细胞的选择,以及数据的分析。使用细胞溶解性 T 细胞克隆物作为效应器以及肽脉冲的 B 细胞作为靶向来对所述的检测进行定义。在一项初步的试验中,利用一种人类免疫缺陷病毒 (HIV) 开口肽 (gag peptide) (KK10) 对表达人类白细胞抗原 (HLA) B27 的 B 细胞进行脉冲处理并且在此之后利用钙黄绿素 AM 对其进行标记。利用一种细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 克隆物对靶向细胞进行共同培养,其中所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 能够识别所述的 B27-KK10 表位 (效应器细胞:靶向细胞为 1:1), 并且在进行了 4 小时的培养之后,通过来自于所述的靶向细胞的荧光性的损失从而对溶解作用进行检测 (附图 4)。通过使用一系列的染料来同时突出效应器以及靶向细胞的方式对不同的标记方式进行评价,并且对每一个孔中的效应器细胞:靶向细胞 (E:T) 的比例进行调整,从而提高细胞溶解活性所具有的可视化程度。在另外一项初步的试验中,利用抗 -CD8- 抗原呈递细胞 (APC) 对效应器细胞进行标记并且利用钙黄绿素 AM 对 B 细胞进行标记。附图 5 描述的是经过了 4 小时的共同培养之后所述的靶向细胞所发生的积累性的损失。效应器细胞 (红色) 能够从靶向细胞 (绿色) 中被明显的区分开来。

[0057] 研发用以识别目标细胞的软件运算法则

[0058] 对所研发出的方案所进行的精炼允许在每次试验中进行 10⁵-10⁶ 个细胞的常规筛选。所述的来自于一个阵列中的数据将包括 24*72*3 个图像 (大约 5Gb 的数据)。通过对少量的细胞 (10²-10³) 所进行的手工检查的方式可以对所述的检测进行最优化处理,但是对于通过这种方法所进行的常规筛选而言,用以对所得到的数据组进行提取以及分析的运算法则是优选的。为了解决所述的生物信息学问题,研发出一种软件方法。已经研发出一种定制的软件包,用以进行图像的分析,从而对将伴随着每一个阵列而累积的大量的数据进行处理以及存储。所述的软件能够识别出发生了杀伤作用的孔并且为所述的显微操作器定位这样的孔。

[0059] 实施例 2. 对特异于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型 CD4⁺T 细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所进行的识别以及分离,以及对这些细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 分泌的调节剂所进行的检测,其中所述的识别以及分离是经由它们所具有的溶解所述的靶向细胞的能力来实现的。

[0060] 一旦用于对低频率细胞进行识别的最佳条件被得以确立,微孔阵列被用来对细胞

毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 进行识别,其中所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 能够溶解人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型自体同源性 CD4⁺T 细胞。所述的最初的策略使用 CD4⁺T 细胞来特异性的显现所述的优先的杀伤作用,其中利用表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的重组病毒对所述的 T 细胞进行了感染。对绿色荧光蛋白 (GFP) 荧光性所进行的流式细胞术分选同样能够确保同源性的病毒感染型的 CD4⁺ 靶向群体。近来的研究已经对绿色荧光蛋白 (GFP)+NL4-3- 来源的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 变体进行了评价,其中所述的评价针对的是传染性,复制能力,以及具有有希望的结果的绿色荧光蛋白 (GFP) 的信号强度。当利用这些表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的菌株对 CD4⁺ T 细胞进行感染时,所述的 T 细胞表现出一种明显的绿色荧光信号 (附图 3)。通过细胞的分选对感染型 CD4⁺ 细胞进行纯化,这确保了一种同源性的靶向群体。

[0061] 对靶向特异性溶解性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所分泌的调节剂所进行的检测

[0062] 已经研发出微雕刻技术用于对分泌出的细胞因子进行多元化的检测 (参见 Bradshaw EM 等人 (于 2008 年) 在 Clin. Immunol. 《临床免疫学》129(1),10 中发表的文章 Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving:cytokines and antigen-reactive antibodies 《通过微雕刻对来自于人类淋巴细胞的分泌产物所进行的同时检测:细胞因子以及抗原反应性抗体》)。正如在附图 1 中所描述的,将玻璃盖玻片放置于与所述的微孔阵列进行接触,其中利用作用于细胞因子的捕获抗体对所述的玻璃盖玻片进行了预先的功能处理。经过培养之后,对所述的盖玻片进行洗涤并且利用荧光团共轭型检测抗体对其进行检测。将所述的斑点映射到所述的微孔阵列中的各个孔内,从而能够对被容纳在所述的微孔之中的所述细胞进行识别以及拾取。在由细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 介导的杀伤作用的情形中,将对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 或者干扰素- γ (IFN- γ) 以及溶解作用的可溶性调节剂的分泌进行检测,其中所述的溶解作用的可溶性调节剂是端粒酶 B(GzB) 以及穿孔蛋白。对所述的端粒酶 B(GzB) 以及穿孔蛋白所进行的检测可能是一种挑战,因为它们的分泌作用已经朝向所述的免疫学突触 (IS) 发生极化 (参见 Faroudi 等人 (于 2003 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》100,14145 中发表的文章 Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction:manifestation of a dual activation threshold 《细胞溶解酶与刺激性的突触在细胞毒性 T 淋巴细胞 / 靶向细胞中的相互作用:双重活化界限的显现》) 并且因为所分泌的剂量通常情况下是少的。当所分泌的因子的剂量对于使用所述的检测方法来进行检测而言太低的话,在这样的情形下,通过追踪细胞内的钙的水平的方式对细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的活化作用进行监测。通过肽-主要组织相容性复合体 (pMHC) 复合体所进行的 T 细胞受体 (TCR) 的触发能够导致 T 细胞中的细胞溶质性钙离子的浓度发生剂量依赖性的增加 (参见 Kim H 等人 (于 2006 年) 在 Adv. Funct. Mater. 《先进功能材料》16,1313 中发表的文章 Live lymphocyte arrays for biosensing 《用于进行生物传感的存活的淋巴细胞阵列》)。膜渗透性钙敏感性荧光素染料例如 Fura 2AM (Invitrogen) 可以被用来作为细胞内的钙水平以及因此的 T 细胞的活化作用的便利的报告者而发挥功效。由于这些选项均应当看上去是无法存活的,利用所述的活化作用标记物 CD69 对所述的效应器细胞进行标记。

[0063] 经由细胞溶解酶的能力、所分泌的因子以及活化作用的状态对所述的细胞毒性 T

淋巴细胞 (CTL) 进行了鉴定之后,在此之后使用一种显微操作器对所述的细胞进行回收,用以建立克隆体系并且提供遗传学信息。在细胞因子的印制过程中如果细胞的损失成为一个问题,将会探究另外一种可供选择的方式,所述的方式与仅有的重力相反的是,能够通过使用纤维粘连蛋白 / 抗-CD44 (效应器 / 靶向细胞表面标记物) 对存在于微孔阵列中的细胞进行捕获以及保留。

[0064] 实施例 3. 存在于疾病恶化者与长期非恶化者 (LTNP) 之间的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 中的差异,所述的差异是通过它们所具有的分泌可溶性调节剂的能力以及实现细胞溶解的能力来进行测量的

[0065] 这项研究的目的在于对所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 针对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型 CD4+T 细胞所产生的应答进行量化以及比较,这种量化以及比较是同时通过它们所具有的溶解它们的靶向的能力以及通过它们所具有的分泌细胞因子的能力来实现的。所述的方法是以近来研发的高通量筛选方法为基础的,并且可以被用来对存在于靶向细胞与效应器细胞对之间的相互作用进行分析,其中所述的高通量的筛选方法能够对微阵列中大量的单个细胞进行描绘。

[0066] 对存在于细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 之间的差异进行比较以及量化

[0067] 本发明提供了用于对存在于个体的靶向特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 之间的差异进行量化的能力,其中所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 存在于大群体的恶化者、低水平病毒载量长期不恶化 (LTNP)、接受高度活跃的抗逆转录病毒治疗 (HAART) 的感染型个体、以及慢性感染型个体之中。例如,尽管在低水平病毒载量长期不恶化 (LTNP) 以及恶化者中存在的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 在穿孔蛋白的表达以及增殖作用方面已经表现出显著性的差异,所述的分析是在细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 群体中完成的并且在这些细胞所具有的细胞溶解酶性质方面没有可以获得的直接信息 (参见 Migueles SA 等人 (于 2002 年) 在 Nat. Immun.《自然免疫学》3(11),1061 中发表的文章 HIV-specific CD8+T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in non-progressors《人类免疫缺陷病毒特异性 CD8+T 细胞的增殖作用与穿孔蛋白的表达所发生的连结及其在非恶化者中的保持》)。所引发的一个重要的问题是是否存在这样的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 子集,所述的子集能够经受住通过 T 细胞受体 (TCR) 的连结所产生的活化作用,但是它们所产生的分泌性的应答被得以削弱,所述的分泌性应答可能是细胞因子或者是细胞毒性试剂。高通量检测能够识别这样的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 子集以及其他的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 子集并且能够帮助对所述的细胞进行回收,用以进行随后的克隆体系的建立以及遗传学的操作。

[0068] 这产生了一种强有力的、定量的检测,用以在单个细胞的水平上对细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 进行识别以及回收,其中所述的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 能够溶解人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞。这种方法不仅仅能够对杀伤作用进行量化,经由通过显微操作器所进行的随后的回收,同样能够允许对有效的抗病毒性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的功能所具有的免疫学以及遗传学关联性进行更为详细的洞察。这项技术全面的定义了所述细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所具有的许多的生物学特征并且允许对大量的患者群体进行快速的评价,其中所述的患者群体是发生了急性感染的患者,接受了高度活跃的抗逆转录病毒治疗 (HAART) 的患者,杰出的控制者 (elite controller),以及发生了慢性感染

的患者,用以对存在于这些组中的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 之间所存在的差异进行评价。此外,这项检测可以容易的被扩展到对各种不同的细胞子集所产生的杀伤作用的研究中,其中所述的细胞子集包括细胞溶解性细胞(即,天然杀伤细胞,巨噬细胞,等等)。

[0069] 实施例 4. 对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型人群中的抗体多样性所进行的评价

[0070] 在本发明中所呈现出的是一套新的方法,所述的方法使用微构建的系统以平行的方式对许多原发性的个体淋巴细胞所具有的多种特征进行评价。这些技术能够对抗原反应性抗体分泌细胞进行识别(参见 Love, J. C., Ronan, J. L., Grotenbreg, G. M., van der Veen, A. G. & Ploegh, H. L. (于 2006 年)在 Nat Biotechnol《自然生物技术》24,703-707 中发表的文章 A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies《用于快速筛选生成抗原特异性抗体的单个细胞的微雕刻方法》;Ronan, J. L., Story, C. M., Papa, E. & Love, J. C. 在 J. Immunol. Methods《免疫学方法杂志》(在版)中发表的文章 Optimization of the surfaces used to capture antibodies from single hybridomas reduces the time required for microengraving《对用来从单个的杂交瘤中捕获抗体的表面所进行的最优化处理降低了微雕刻所需要的时间》;Story, C. M., Papa, E., Hu, C.-C. A., Ronan, J. L., Herlihy, K., Ploegh, H. L. & Love, J. C. (于 2008 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci.《美国科学院院刊》105,17902-17907 中发表的文章 Profiling antibody responses by multiparametric analysis of single B cells《通过对单个的 B 细胞所进行的多重参数分析对抗体的应答所进行的描述》) profiling secreted cytokines,对所分泌的细胞因子进行描述(参见 Bradshaw, E. M., Kent, S. C., Tripuraneni, V., Orban, T., Ploegh, H. L., Hafner, D. A. & Love, J. C. (于 2008 年)在 Clin. Immunol.《临床免疫学》129,10-18 中发表的文章 Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: cytokines and antigen-reactive antibodies《通过微雕刻对来自于人类淋巴细胞的分泌产物所进行的同时检测:细胞因子以及抗原反应性抗体》)对 RNA 转录体进行扩增,并且对细胞毒性功能进行评价——利用单个细胞的解决方案(附图 6)。在这些技术中使用到的共同的元件是一种密集的纳升以下的微孔阵列,其中所述的微孔阵列被模压在一种聚合物芯片的表面之内(每个芯片上大约 10^5 - 10^6 个孔)。将细胞以大约每孔 1 个细胞的密度沉积在悬浮液之中(例如,1 个细胞/孔,2 个细胞/孔,3 个细胞/孔,4 个细胞/孔,或者 5 个细胞/孔,优选的每个孔内 1 个细胞)。所述的细胞阵列可以被用来作为一种晶片用以印制被分泌的分子(抗体或者细胞因子)所具有的蛋白质微阵列,并且可以作为一组容器,用以容纳所定义的单个细胞的阵列(基因表达,细胞毒性,或者增殖作用)。除了对基因表达进行评价之外,经过下述的检测之后所述的细胞仍然保持存活:可以对表面表达的标记物进行成像处理,用以确定免疫表型,并且可以通过显微操作器对目标细胞进行回收,用以进行克隆扩展或者遗传学分析。这些检测的依次应用能够对相同组的单个细胞所具有的功能、免疫表型、以及基因型之间进行相互关联。同样的,这些测量方法生成的数据与通过基于群体的检测所获得的数据相类似,但是是利用了单个细胞的解决方案,其中所获得的数据是关于功能(酶联免疫吸附检测,酶联免疫斑点检测,增殖作用)、表型(流式细胞术,免疫荧光检测)、以及基因型(逆转录-聚合酶链式反应)的数据。

[0071] 存在于个体之中的 bNAb 生成 B 细胞之间所具有的克隆多样性

[0072] 微雕刻是一项已经发展起来的技术,用以对来自于单个细胞的抗体所具有的微阵列进行印制,从而对所述的糖蛋白(gp)120 反应性循环 B 细胞所具有的频率、它们的抗体所具有的同型体的分布、以及它们所具有的中和能力进行量化。对所述的筛选检测进行设定,使其突出糖蛋白(gp)120 反应性抗体,所述的方法是通过下述的方式来实现的:首先将一种抗体进行固定化于一种玻璃盖玻片的表面之上,并且在此之后沉积重组糖蛋白(gp)120(Progenics),其中所述的抗体对所述的糖蛋白(gp)120 的 C-末端(D73-324)具有特异性。利用 CD40L/ 抗-B 细胞抗原受体(BCR)对来自于人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性的个体的 B 细胞进行刺激,从而诱导抗体的生成,其中所述的人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性个体在其血清中含有高滴定量的 bNAb。将所述的细胞沉积在一个微孔阵列之中并且用来在所述的涂覆有糖蛋白 120 的盖玻片上对抗体的两个复制的微阵列进行印制。在印制所述的第二个阵列之前,向所述的底物中添加可溶性的 CD4 或者 b12(一种具有已知的中和能力的单克隆抗体),其中所述的底物被用来对来自于所述的细胞中的抗体进行捕获。那些在所述的第一个微阵列中结合了糖蛋白 120 但是没有能够在所述的第二个阵列中与所述的 CD4 阻滞的糖蛋白 120 发生结合的抗体,将可能对人类免疫缺陷病毒(HIV)进行抑制(附图 7)。为了对存在的同型体所具有的多样性进行打分,利用荧光素、同型体特异性次级抗体(免疫球蛋白 G1,免疫球蛋白 G3,免疫球蛋白 G4,免疫球蛋白 A,免疫球蛋白 M)的混合物对所述的微阵列进行了标记。将存在于所述的微阵列之上的目标抗体映射在相对应的微孔内,并且通过自动化的显微操作器(Aviso CellCelector)对所述的细胞进行回收。对负责编码所述的重链以及轻链的所述基因的可变区域进行扩增以及测序,其中所述的扩增以及测序是通过单个细胞的逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)来实现的(参见 Wang, X. W. & Stollar, B. D. (于 2000 年)在 J Immunol Methods 《免疫学方法杂志》244,217-225 中发表的文章 Human immuno globulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR 《通过单个细胞的逆转录-聚合酶链式反应进行的人类免疫球蛋白可变区域的基因分析》)。对所述的序列所进行的比较通过所述的主要的种系基因以及体细胞的变异将相关的克隆物紧密的联系起来。所述的抗体被进行了重组性的表达并且利用标准的检测(Monogram Biosciences)对它们所具有的中和能力进行了验证。

[0073] 对结合多种原发性分离物的 bNAb 所进行的鉴定

[0074] 对于设计一种能够生成中和抗体(NAb)的疫苗而言所存在的一项挑战是所述的免疫原必须能够激发出这样的抗体,所述的抗体能够广泛的与所述病毒的其他变体发生交叉反应。对所述的抗体所具有的特异性所进行的理解能够对新的免疫原的设计进行引导,并且是在针对人类免疫缺陷病毒(HIV)所进行的研究中的目前的优先考虑事项之一,其中所述的抗体能够对多种不同的原发性的分离物进行抑制(参见 Fauci, A. S., Johnston, M. I., Dieffenbach, C. W., Burton, D. R., Hammer, S. M., Hoxie, J. A., Martin, M., Overbaugh, J., Watkins, D. I., Mahmoud, A. & Greene, W. C. (于 2008 年)在 Science《科学》321, 530-532 中发表的文章 Perspective-HIV vaccine research: The way forward 《前进之路的展望——人类免疫缺陷病毒疫苗的研究》)。对筛选检测进行重新设定,用以对来自于个体 B 细胞中的被分泌的抗体进行捕获,这是通过微雕刻作用来实现的,并且在此之后将人类免疫缺陷病毒(HIV)的不同的分离物放置在所述的阵列之中——每一种分离物都被利用一种截然不同的亲脂性荧光染料进行了染色(附图 8)。对目标细胞进行回收并且对它们的抗体进行重

组性的表达,并且对其所具有的表位特异性以及抑制能力进行鉴定。

[0075] 在循环中,所期望的 B 细胞所具有的频率可能是低的。尽管所述的检测所具有的电限制(0.01 至 0.001%)超过了流式细胞术(FACS)通常所具有的电限制(参见 Bradshaw, E. M., Kent, S. C., Tripuraneni, V., Orban, T., Ploegh, H. L., Hafler, D. A. & Love, J. C. (于 2008 年)在 Clin. Immunol. 《临床免疫学》129,10-18 中发表的文章 Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: cytokines and antigen-reactive antibodies 《通过微雕刻对来自于人类淋巴细胞的分泌产物所进行的同时检测:细胞因子以及抗原反应性抗体》),使用涂覆有糖蛋白 120 的磁性珠对糖蛋白 120 反应性 B 细胞进行富集可能是必要的。用以进行所述的筛选检测的两种可供选择的方式包括 i) 使用能够表达三聚糖蛋白(gp)120 的细胞系或者病毒样粒子对三聚物特异性抗体进行识别,以及 ii) 利用其他的 bNAbs 所进行的竞争性检测,其中所述的其他的 bNAbs 例如是 2G12。在这里所提出的方式提供了一组简单的检测方法,用以对所设计的免疫原所具有的能力进行监测,其中所述的能力指的是生成抗体的能力,所述的抗体能够与直接来自于循环的 B 细胞的多种多样的原发性分离物进行结合。

[0076] 用以评价所述的效应器细胞所产生的应答的最为常见的检测是对干扰素- γ (IFN- γ) 的检测,其中所述的检测是通过酶联免疫斑点检测(ELISpot)来实现的,但是这种单个参数的测量不会与对病毒血症的控制产生关联性(参见 Walker, B. D. & Burton, D. R. (于 2008 年)在 Science 《科学》320,760-764 中发表的文章 Toward an AIDS vaccine 《获得性免疫缺陷综合症疫苗的方向》)。对其他的功能性应答所进行的测量同样是需要,其中所述的功能性应答例如是,增殖作用,广泛的细胞因子曲线,补充到黏膜上的标记物,以及细胞溶解酶活性(参见 Fauci, A. S., Johnston, M. I., Dieffenbach, C. W., Burton, D. R., Hammer, S. M., Hoxie, J. A., Martin, M., Overbaugh, J., Watkins, D. I., Mahmoud, A. & Greene, W. C. (于 2008 年)在 Science 《科学》321,530-532 中发表的文章 Perspective-HIV vaccine research: The way forward 《前进之路的展望—人类免疫缺陷病毒疫苗的研究》)。使用微工具为不同的效应器细胞的子集(CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞(CTL),天然杀伤(NK)细胞,天然杀伤 T 细胞, γ δ T 细胞)定义一种多参数的功能曲线,其中所述的子集能够对人类免疫缺陷病毒(HIV)感染型细胞进行应答。PBMCs are sorted by FACS into CTLs(CD8⁺), NK cells(CD16⁺), NK T cells(CD1d⁺, V α 24⁺), and γ δ T cells(V γ 9⁺, V δ 2⁺)。通过流式细胞术(FACS)将外周血单核细胞(PBMC)分选为细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)(CD8⁺),天然杀伤(NK)细胞(CD16⁺),天然杀伤 T 细胞(CD1d⁺, V α 24⁺),以及 γ δ T 细胞(V γ 9⁺, V δ 2⁺)。将每一种效应器子集与靶向细胞一同被装载于微孔之中——利用来自于人类免疫缺陷病毒(HIV)的肽的重叠整体与人类白细胞抗原 B27(HLA B27)匹配的、EB 病毒(EBV)转化型 B 细胞进行装载并且利用钙黄绿素 AM 对其进行染色。在一个存活细胞显微镜上对上述经过共同装载的阵列进行成像处理用以确定双重负载的孔。经过培养之后,对所述的阵列进行再次成像处理,用以对细胞毒性进行评价(通过钙黄绿素 AM 的释放而变得显著)(附图 6c,右下)。使用微雕刻技术对释放出的细胞因子进行描绘,其中所述的细胞因子是从仍然存在于所述的孔内的所述细胞中释放出来的(白细胞介素-2,白细胞介素-4,白细胞介素-10,肿瘤坏死因子- α ,以及干扰素- γ)。这种初始的小组测量了 Th1 以及 Th2 细胞因子以及调整性的细胞因子,这是以每项检测大约 10-15 个细胞因子的水平

来实现的。同样对多达 3 种的特异性表面标记物进行所述细胞的标记,用以表明它们的制导 (homing) 类型 (例如,CD62L,趋化因子受体 3,趋化因子受体 4,趋化因子受体 7) 并且通过显微镜方法对它们进行成像。通过显微操作器对来自于所述的试验中的目标细胞进行提取,用以进行克隆扩展或者基因表达的描述。在 5 个个体中,在所述的急性感染阶段的过程中的 3-5 个时间点处重复所述的试验。为了进行比较,将所述的测量扩展到高度活跃的抗逆转录病毒治疗 (HAART) 的患者以及杰出的控制者 (elite controller)。这些数据表示出了存在于这些细胞群体之中的多功能性应答之中的变化性,并且建立了表型特征,其中所述的表型特征与有效的细胞毒性之间存在关联性,所述的细胞群体的多功能性的应答是发生在所述感染的过程之中的。

[0077] 与具有急性感染的患者以及那些接受高度活跃的抗逆转录病毒治疗 (HAART) 的患者所具有的免疫应答相比,在杰出的控制者 (elite controller) 中针对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 所产生的免疫应答所具有的系统水平的曲线

[0078] 所述的免疫系统所具有的复杂性以及用以监测在功能上以及表型上所存在的小差异的工具的缺失,已经限制了大多数在人类疾病中的研究,从而对一种细胞群体进行鉴定,其中所述的细胞群体是从所述的网络中与其余群体分离开来的,所述的功能上以及表型上所存在的小差异是存在于宽泛的类别之中的细胞子集 (例如,CD4⁺T 细胞) 之间的。系统水平的量化分析以及对复杂的生物学网络所进行的预测性的模型制作是可能的,但是需要足够的多元化的数据用以解决所述的系统所具有的细节。通过单个细胞的数据来构建基于状态的地图,用以对所述细胞的效应器子集所具有的功能曲线进行描述,其中所述的细胞来自于杰出的控制者 (elite controller),发生急性感染的患者,以及那些接受着高度活跃的抗逆转录病毒治疗 (HAART) 的患者 (附图 4)。利用统计学分析来检查存在于每一种类别中的所述群体之间的变化性,其中所述的统计学分析例如是分级聚类以及主要成分分析。所收集到的数据被用在这项方案中的第一个部分中,用以对这些曲线进行构建。所述的方式与在综合性的基因组分析中所使用到的方式相类似,但是使用到了详细的单个细胞的数据,用以对上述得到的曲线进行定义 (参见 Bradshaw, E. M., Kent, S. C., Tripuraneni, V., Orban, T., Ploegh, H. L., Hafler, D. A. & Love, J. C. (于 2008 年) 在 Clin. Immunol. 《临床免疫学》129, 10-18 中发表的文章 Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: cytokines and antigen-reactive antibodies 《通过微雕刻对来自于人类淋巴细胞的分泌产物所进行的同时检测: 细胞因子以及抗原反应性抗体》)。

[0079] 在本发明中所描述的方法所具有的一个优点是在所述的检测中利用少量的细胞 (103-105)。使用所述的集中 (pooled) 的肽对所述的靶向细胞进行负载能够偏离所测量到的功能曲线。作为另外一种可供选择的方式,在这些检测中对所述的自体同源性人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型 CD4⁺T 细胞的使用进行探索;首先对这些细胞所具有的细胞因子曲线进行评价是必要的,从而避免利用所述的细胞溶解性细胞对它们的曲线进行回旋。用于对非细胞溶解性人类 T 细胞进行克隆的目前的效率是大约 75-90%。由于某些细胞溶解性细胞可能经受到程序化的细胞死亡,所述的效率可能会减小,但是所述的细胞被得以延伸,因此可以在每一种克隆物上进行进一步的分析。对于所述的先天性系统细胞以及效应器存储单元细胞而言,对与有效的抗病毒应答相关联的精确的功能性差异进行的定义将

能够建立一种基准性的标准,用以对疫苗或者其他的干预手段进行评价。

[0080] 实施例 5. 在所述的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的急性阶段过程中,存在于表型标记物与所述的天然杀伤 (NK) 细胞所具有的功能性行为之间的关联性

[0081] 在上文所描述的所述检测方法被用于对细胞因子进行多元化的检测,用以针对天然杀伤 (NK) 细胞建立详细的表型、功能、以及基因型曲线,其中所述的细胞因子是由单个细胞所分泌出的,所述的天然杀伤 (NK) 细胞来自于发生了急性人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的患者以及长期的非恶化者。正如上文中所概括的,所述的方法在解决细胞对于宿主的免疫应答所起到的作用而言是非传统性的,但是却是一种能够对稀有细胞所具有的特征进行识别的方法,其中对稀有细胞所具有的特征进行识别对于已有的工具而言是困难的,所述的已有的工具例如是流式细胞术以及酶联免疫斑点检测 (ELISpot)。在感染的不同阶段中存在不同子集的天然杀伤 (NK) 细胞,并且在经过所述的感染的急性阶段之后,它们的功能性的行为 (或者功能的缺失) 提供了对这些细胞所具有的减少的作用进行了洞察。

[0082] 在这项研究中所需要的细胞是循环的天然杀伤 (NK) 细胞,所述的细胞来自于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 阳性患者。利用到了来自于急性感染的患者以及长期非恶化者 / 杰出的控制者 (elite controller) 的纵向样本。

[0083] 已经报道过在人类中存在天然杀伤 (NK) 细胞的两种重要的子集 (参见 Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (于 2001 年) 在 Trends Immunol 《免疫学趋势》 22,633-640 中发表的文章 The biology of human natural killer-cell subsets 《人类天然杀伤细胞子集的生物学》)。细胞溶解性的天然杀伤 (NK) 细胞 (NKp46^{阳性} CD3^{阴性} CD56^{阳性} CD16^{阳性/阴性}) 能够分泌出大量的干扰素- γ (IFN- γ), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 巨噬细胞炎性蛋白-1 β (MIP-1 β), 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。与之形成对照的是,免疫调节性的天然杀伤 (NK) 细胞 (NKp46^{阳性} CD3^{阴性} CD56^{阳性/阴性} CD16^{阳性}) 能够制造出大量的白细胞介素-10 (IL-10) 以及白细胞介素-17 (IL-17)。健康的个体通常情况下拥有大量的细胞溶解性天然杀伤 (NK) 细胞以及低水平的免疫调节性天然杀伤 (NK) 细胞。然而,在怀孕的过程中以及在牵扯到黏膜感染的过程中,所述的免疫调节性天然杀伤 (NK) 细胞所具有的群体扩大了。不能够确定在人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 感染的过程中存在于这两种天然杀伤 (NK) 细胞群体之间的平衡是否发生变化,以及天然杀伤 (NK) 细胞的特定克隆物是否能够生成与多种 T 辅助细胞应答相关的细胞因子类型。

[0084] 利用上文中所描述的微雕刻方法在一个单一的检测中对五种细胞因子 (干扰素- γ , 肿瘤坏死因子- α , 巨噬细胞炎性蛋白-1 β , 白细胞介素-10 以及白细胞介素-17) 进行检测。为了对所述的检测进行最优化处理,通过阴性选择 (干细胞技术) 将天然杀伤 (NK) 细胞从健康对照的外周血中被提取出来。将这样的天然杀伤 (NK) 细胞分成两个部分,并且利用白细胞介素-12 (IL-12) 以及白细胞介素-18 (IL-18) (对于所有的天然杀伤细胞功能而言是一种有效的刺激) 对它们进行共同培养或者将它们保持在未进行刺激的状态下。经过了 4 小时的刺激作用之后,将天然杀伤 (NK) 细胞沉积于一种微孔阵列之上 (大约 10^5 个具有 30 微米直径的孔)。进行动力学研究,用以对所述的最佳的培养时间进行评价,用以测量天然杀伤 (NK) 细胞功能的峰值。在所述的玻璃上对所述的细胞因子进行捕获之后,为了获得天然杀伤 (NK) 细胞的活化作用所具有的典型标记物而对存在于所述孔内的所述细胞进行染色 (Hoescht 33324 (核), NKp46-Cy3, CD107a-Alexa647, 以及

CD69-Alexa488), 并且在一种定制的高速成像系统上对其进行成像。将所述的检测到的来自于每一个孔内的细胞因子曲线与这些数据相关联, 并且通过主要成分分析法对其进行聚类, 从而对细胞的共同子集进行识别 (每个细胞 8 项参数)。天然杀伤 (NK) 细胞是从 10 个发生了人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的急性感染的患者以及 10 个长期的非恶化者处分离得到的。对所述的检测进行重复, 用以对存在于这些组中的所述的细胞子集所发生的变化进行评价, 其中所述的这种变化是相较于彼此以及所述的对照组而言的。最终, 在所述的细胞子集中对所述的差异进行纵向的检查, 其中所述的细胞子集是存在于发生了急性感染的患者中的, 用以评价伴随着所述疾病的恶化而发生的所述子集的变化。

[0085] 实施例 6. 对存在于细胞溶解性天然杀伤 (NK) 细胞间的克隆多样性所进行的评价

[0086] 不同于表达一种单一的抗原特异性受体的 T 细胞以及 B 细胞, 天然杀伤 (NK) 细胞能够以随机组合的方式表达许多种不同的受体。存在于个体天然杀伤 (NK) 细胞克隆物之上的所述的受体的组合允许它们能够差异化的识别出病毒感染的细胞或者恶性细胞。伴随着人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的感染, 所述的天然杀伤 (NK) 细胞受体的表达以及所述的天然杀伤 (NK) 细胞所具有的子集的分布均发生了戏剧性的变化。发生了急性人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 感染的个体表现出了天然杀伤 (NK) 细胞的显著的扩大: 在所述的感染作用的前几周的时间内, 高达 50% 的所述的循环的外周血单核细胞 (PBMC) 是天然杀伤 (NK) 细胞。通过进行比较, 恶化性的感染作用是通过无能性的 CD56^{阴性}天然杀伤 (NK) 细胞的积累而显现出来的。没有对下述情形进行理解: 所述的多种多样的受体怎样发生了克隆性的变化, 以及所述的受体与能够发挥抗病毒性控制作用的功能的天然杀伤 (NK) 细胞之间存在怎样的关联性, 特别是对于那些能够表现出显著的细胞溶解性能力的克隆物而言。

[0087] 在人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 感染的不同阶段中对杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的曲线进行确定, 其中所述的杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 是由个体细胞溶解性天然杀伤 (NK) 细胞所表达的, 以急性感染为开始。使用一项利用微孔阵列的检测对细胞溶解性功能进行测量。通过显微操作器对个体的细胞毒性天然杀伤 (NK) 细胞进行回收, 用以对它们所具有的受体的全部功能进行随后的量化, 其中所述的量化是通过逆转录 - 定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 来实现的。为了进行所述的单个细胞的细胞溶解性检测, 将天然杀伤 (NK) 细胞与主要组织相容性复合体 (MHC) 缺乏型靶向细胞 (K562 或者 221) 进行共同装载, 其中利用 CD56-Alexa 647 或者细胞溶质性着色剂 (细胞示踪红) 对所述的天然杀伤 (NK) 细胞进行染色, 并且利用钙黄绿素 AM 对所述的主要组织相容性复合体 (MHC) 缺乏型靶向细胞进行染色。对这些检测进行 5-6 小时的培养, 同时对其进行周期性的成像, 用来对细胞溶解作用进行评价 (这是通过来自于靶向细胞的钙黄绿素的损失来显现的)。为了确保活化作用, 同样获得存在于所述的天然杀伤 (NK) 细胞的表面之上的 CD107a。

[0088] 这种类型的检测所取得的初步结果在附图 5 中被表示出来, 其中在所述的检测中使用到了细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 以及一种靶向 T 细胞系。或者可供选择的, 可以使用自体同源性的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型 CD4⁺T 细胞, 作为这项检测中的靶向。在对存在于所述的阵列之中的含有个体的细胞溶解性细胞的所述孔的位置进行打分之后, 通过自动化的显微操作器 (Aviso CellCelector) 对细胞进行回收, 并且使用重组的白细胞介素 -2 (IL-2) 在 96 孔培养板内对其进行克隆性的扩展。经过扩展之后, 利用一组针对 12 个杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的特异性引物在每一个克隆物上对所述的天然杀伤

(NK) 细胞受体的全部功能进行量化,其中所述的量化是通过逆转录-定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)来实现的。

[0089] 通过下述方式在不进行扩展的情况下来实现对细胞的直接的单个细胞分析:将所述的细胞放置于 SuperScript-3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) mastermix(Invitrogen) 中,其中含有一组 oligo-dt 引物,所述的引物中含有用于嵌套引物的植入型的扩增结合序列,此后进行热循环,使用所述的 12 个杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)引物组在 cDNA 上进行定量聚合酶链式反应(qPCR)。在 10 个健康的对照组,10 个急性人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性感染个体,10 个人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性自发性非恶化者(病毒负载量低于 2000 个拷贝/毫升),以及 10 个人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性未经治疗的恶化者(病毒负载量大于 10000 个拷贝/毫升)中,将对来自于分离的天然杀伤(NK)细胞中的所述的杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的全部功能中存在的多样性进行定义。

[0090] 实施例 7. 对天然杀伤(NK)细胞所具有的影响抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)的变化的能力所进行的确定,这种变化是伴随着感染作用的恶化而发生的

[0091] 到目前为止,作用于人类免疫缺陷病毒(HIV)的大多数的备选疫苗均已经尝试过广泛的引发出作用于所述病毒的中和抗体(参见 Barouch, D. H. (于 2008 年)在 Nature《自然》455,613-619 中发表的文章 Challenges in the development of an HIV-1 vaccine《在研发人类免疫缺陷病毒-1 疫苗中所存在的挑战》)。使用一种抗体应答来介导保护作用的一种可供选择的策略是抗体依赖性的细胞毒性作用(ADCC)。来自于急性感染型患者的血清转移研究表明,天然杀伤(NK)细胞的活化作用可以发生,但是迄今为止不能利用任何检测来识别这样的 B 细胞克隆物,其中所述的 B 细胞克隆物能够生成有效的诱导抗体依赖性的细胞毒性作用(ADCC)的抗体,所述的抗体依赖性的细胞毒性作用(ADCC)是通过天然杀伤(NK)细胞来进行介导的。按照下面的描述通过这样的克隆物来建立重组的抗体能够促进新的研究,其中所述的研究针对的是用于进行疫苗接种的免疫原的基本原理设计(参见 Walker, B. D. & Burton, D. R. (于 2008 年)在 Science《科学》320,760-764 中发表的文章 Toward an AIDS vaccine《获得性免疫缺陷综合症疫苗的方向》)。

[0092] 将这些细胞群体从发生急性感染的患者以及长期非恶化者体内分离出来—— $CD56^{\text{低}}CD16^+$ 天然杀伤(NK)细胞, $CD4^+$ T 细胞,以及 $CD20^+$ B 细胞。通过利用植物血凝素凝集素(PHA)以及白细胞介素-2(IL-2)进行培养的方式对所述的 $CD4^+$ T 细胞进行扩展,并且利用人类免疫缺陷病毒(HIV)对其进行外生性的感染。利用白细胞介素-2(IL-2)对所述的天然杀伤(NK)细胞进行活化,并且利用 CD40L 以及抗-B 细胞抗原受体(BCR)对所述的 B 细胞进行活化。将 B 细胞(利用细胞示踪红对其进行标记)与人类免疫缺陷病毒(HIV)感染型 T 细胞(利用钙黄绿素 AM 对其进行标记)共同装载于一种微孔阵列之中。利用玻璃盖玻片对所述的阵列进行一小时的密封。在这个时间阶段内,在所述的分离的反应器内,所述的 B 细胞能够生成这样的抗体,其中所述的抗体能够结合在所述的感染型 T 细胞的表面之上。在此之后将所述的阵列从所述的玻璃上去除并且对其进行洗涤。

[0093] 将上述经过活化的天然杀伤(NK)细胞(利用细胞示踪蓝对其进行标记)添加到所述的孔内并且进行 4-6 小时的培养。在进行培养之前以及之后,对所述的阵列进行成像处理,用以对经过培养之后含有下述细胞的孔进行打分,其中所述的细胞是:1)B 细胞,2)

天然杀伤 (NK) 细胞, 以及 3) 发生细胞溶解的 T 细胞。从这些孔中对细胞进行回收并且使用一种退化的引物组在编码所述抗体的所述基因所具有的 VDJ 区域上进行逆转录 - 聚合酶链式反应 (RT-PCR)。存在于所述的阵列之上的内在对照是那些随机的不含有 B 细胞或者不含有天然杀伤 (NK) 细胞的孔。同样对那些只含有天然杀伤 (NK) 细胞以及 T 细胞的阵列进行了打分。经过回收的所述抗体所发生的重组性的表达能够对所述的结合于感染型细胞之上的表位进行映射, 以及对在所述的 B 细胞中引发的克隆多样性进行评价, 其中所述的克隆多样性与生成性的抗体依赖的细胞毒性作用 (ADCC) 之间存在相关性。

[0094] 另外一种可供选择的方式是将所述的检测分割成为两个部分。首先, 使用所述的微雕刻技术生产富集的 B 细胞群体, 并且使用所述的 B 细胞群体来生成抗体微阵列。利用细胞的溶解产物对这些阵列进行染色, 其中所述的溶解产物来自于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染型细胞以及抗免疫球蛋白 G3。对那些能够映射出双阳性孔的 B 细胞进行回收, 用以进行遗传学分析。向感染型细胞施用于来自于这些细胞的重组抗体, 并且在一项类似于上文中所描述的细胞溶解性检测中将其与天然杀伤 (NK) 细胞进行混合。

[0095] 在本发明中所描述的方法允许直接在细胞内对宿主 - 病原体之间的相互作用进行鉴定, 并且促进用于传染性疾病的疫苗以及免疫疗法的发展, 其中所述的细胞是从临床人类样本中直接获取的, 在所述的免疫疗法中使用量化的免疫学曲线进行探索、评价、以及监测。除了人类免疫缺陷病毒 (HIV) 之外, 所述的方法可以被扩展到其他传染性疾病中, 包括在免疫胁迫人群中成为感染的主要诱因的病原体, 无论是作为人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的结果或者是预备性的抑制性干预的结果。这包括, 例如, 新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*), 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*), 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 以及结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。

[0096] 其他的实施方式存在于所述的权利要求的范围之内。

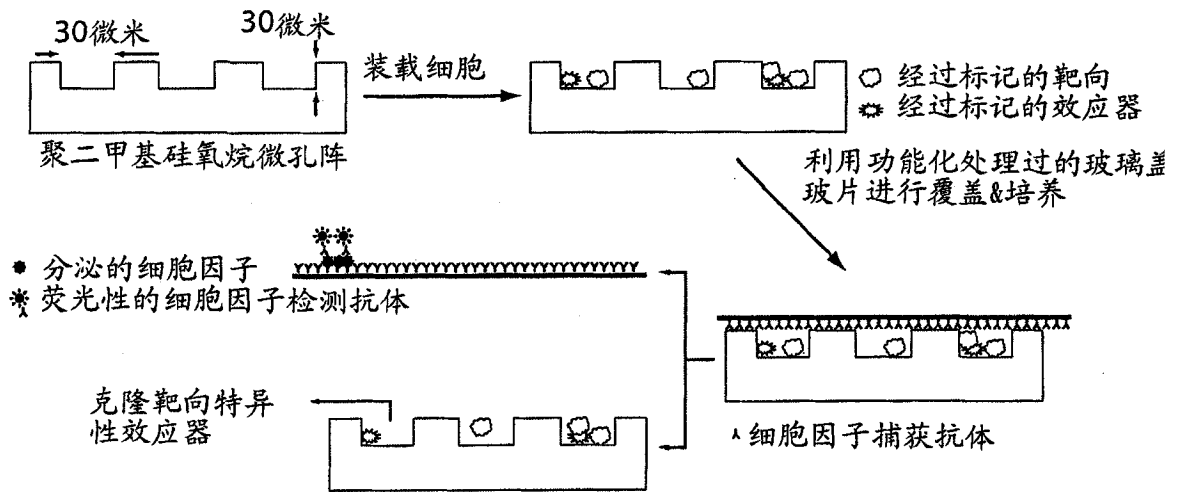


图 1

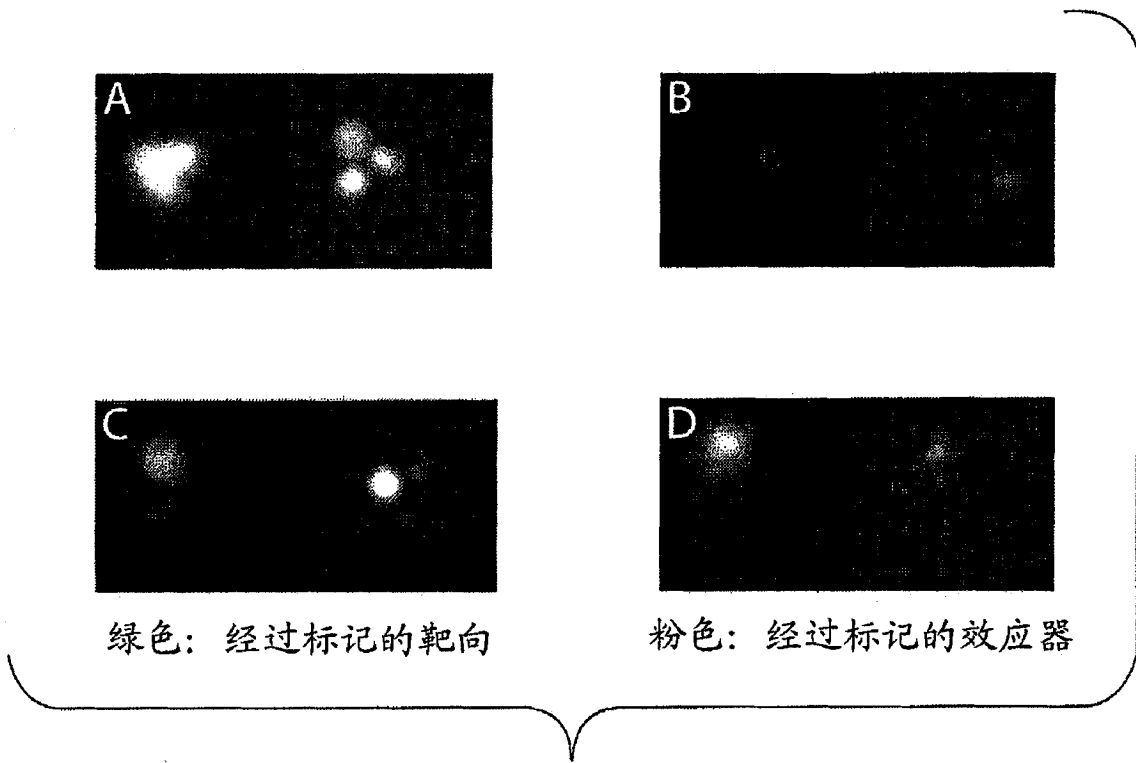


图 2

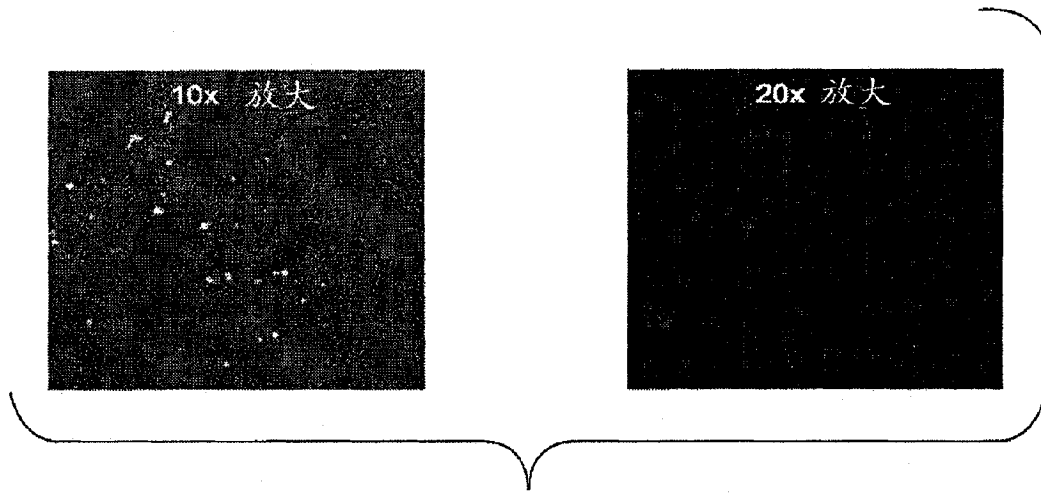


图 3

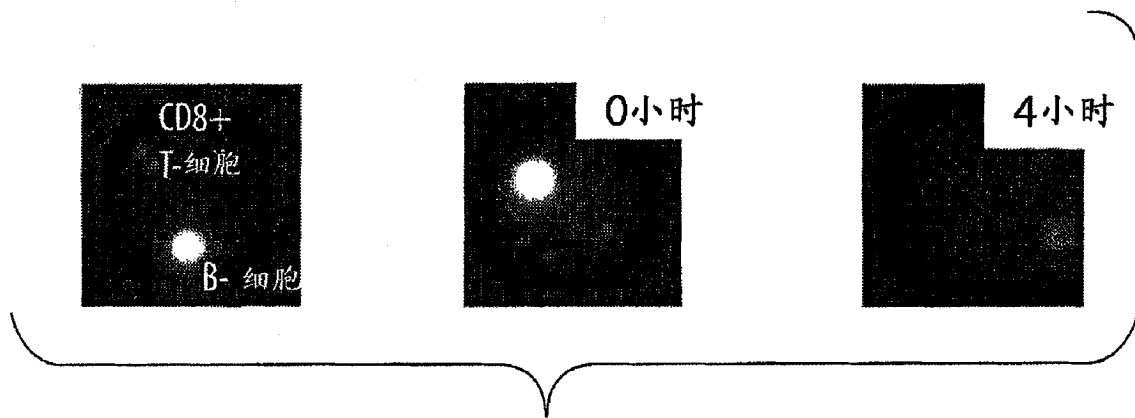


图 4

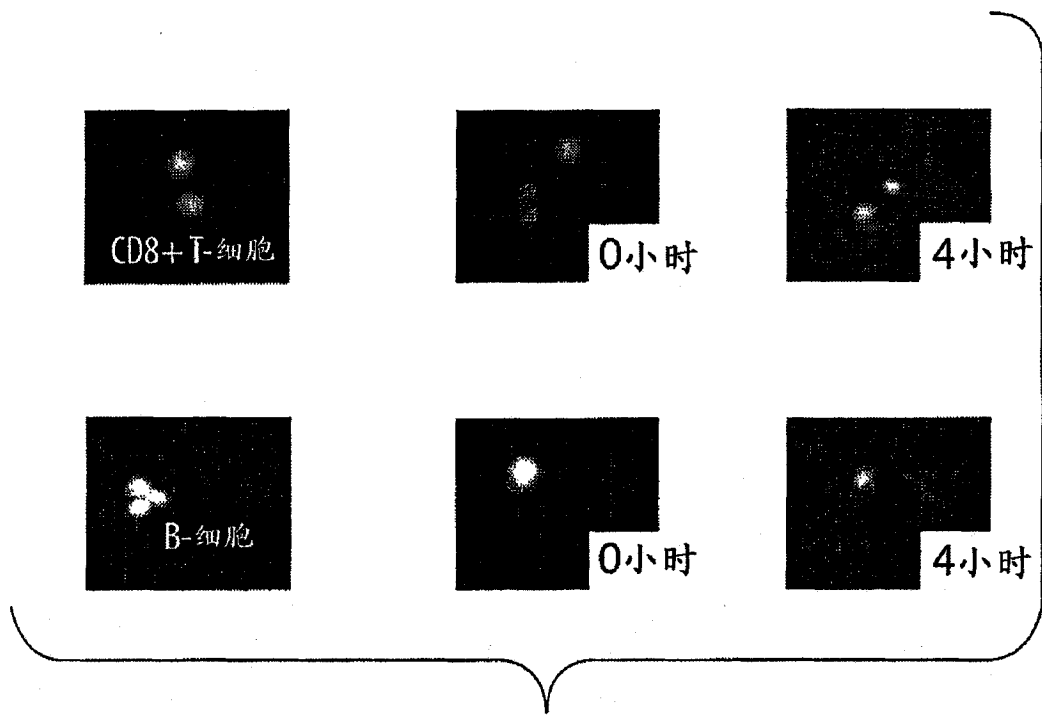


图 5

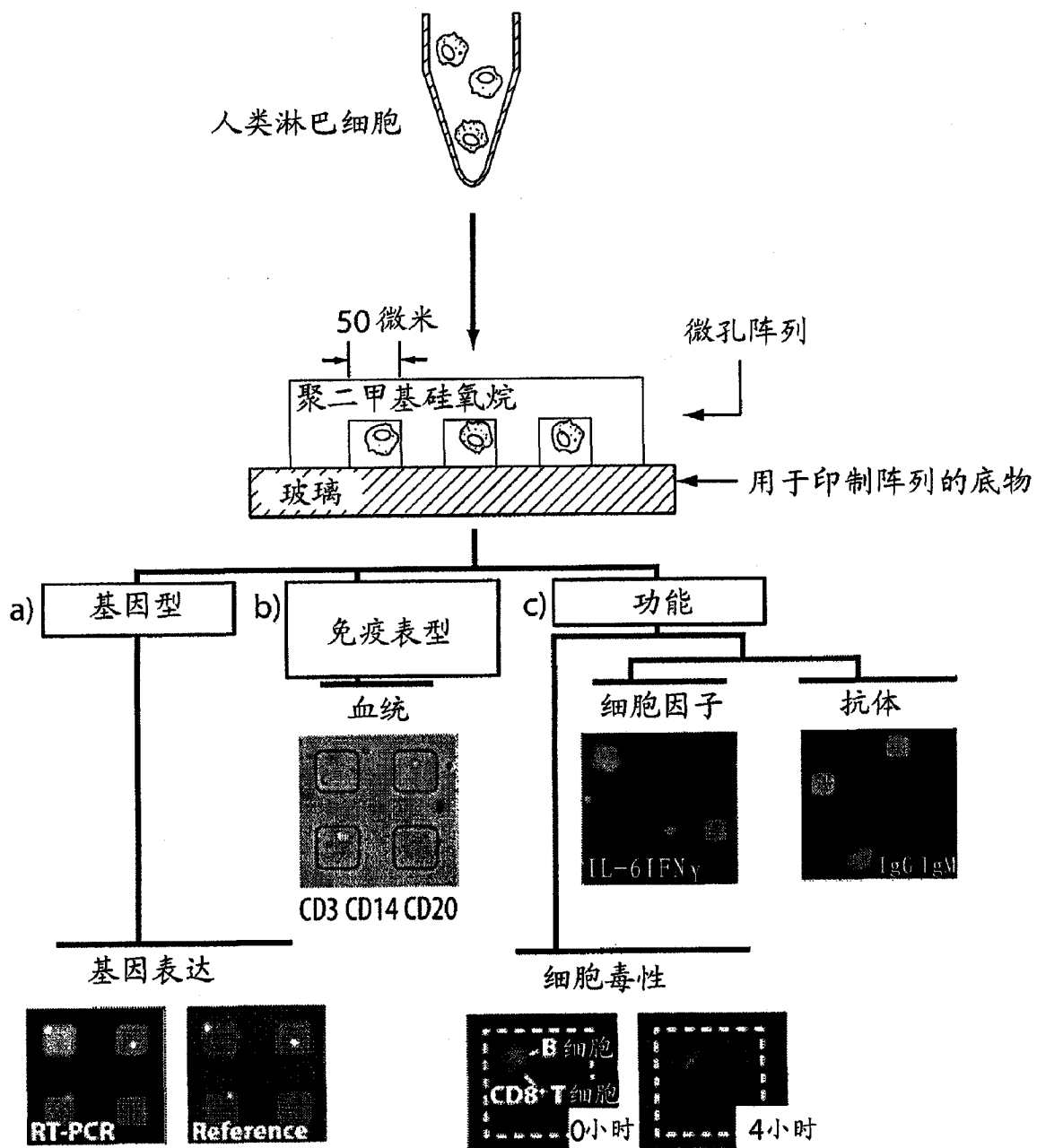


图 6

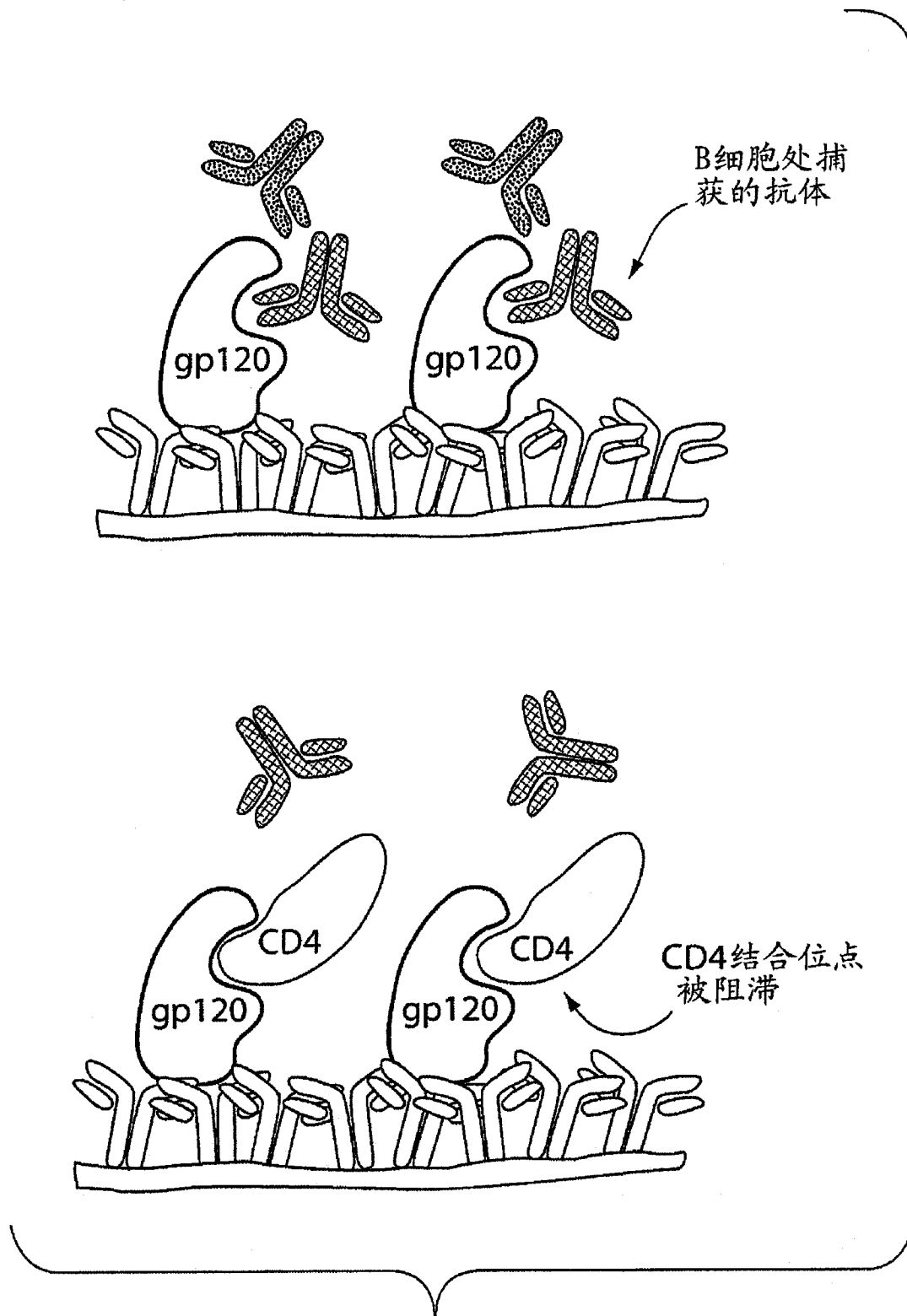


图 7

经过标记的人
类免疫缺陷病
毒病毒体

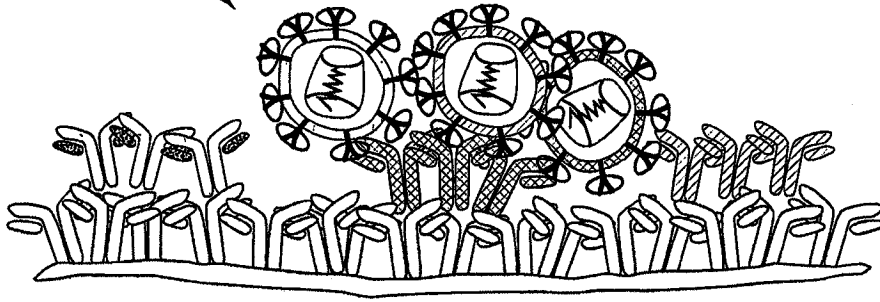


图 8

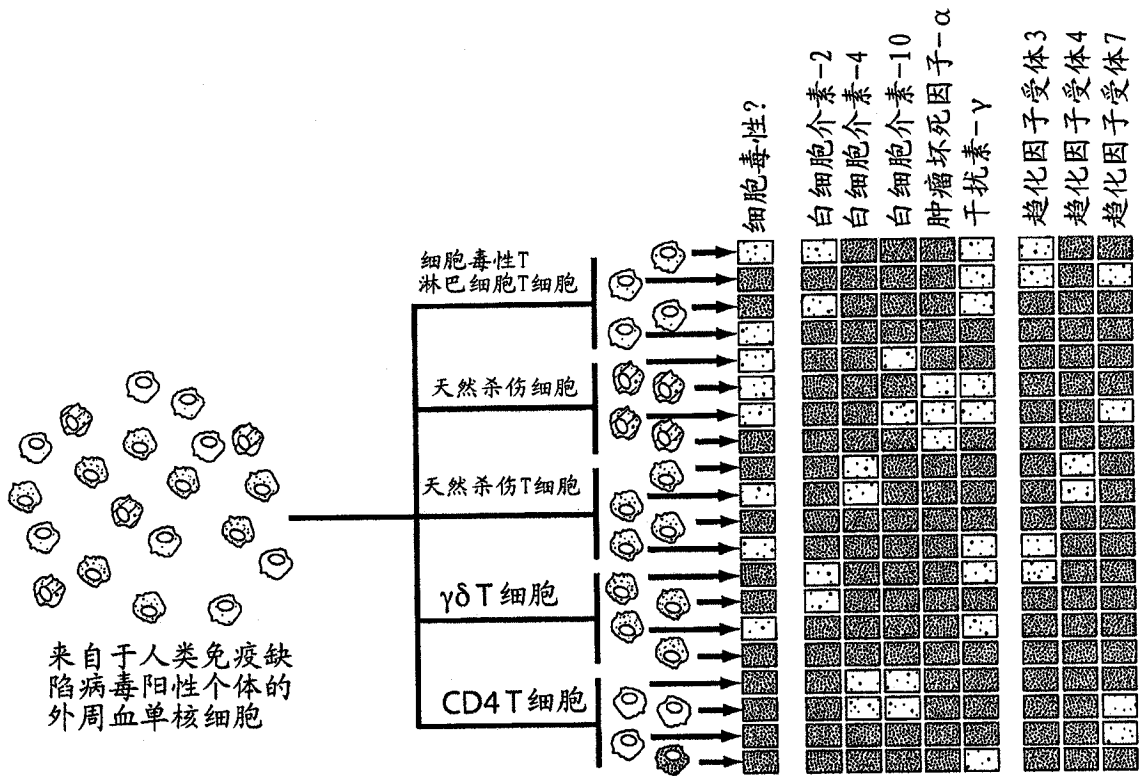
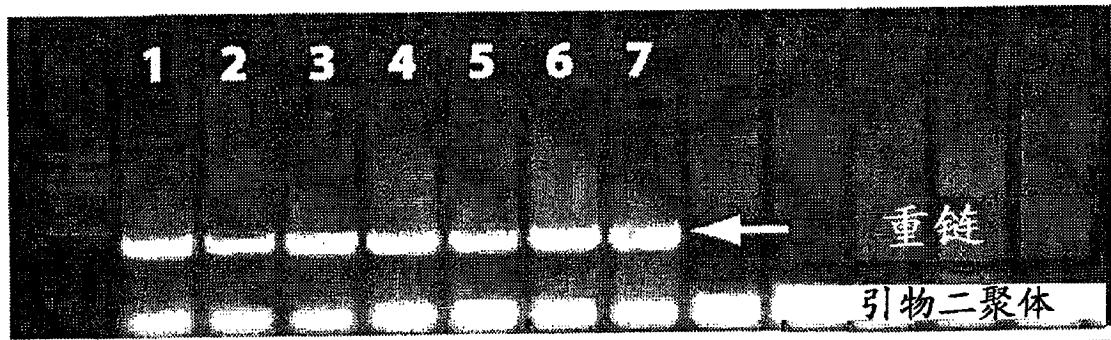


图 9



细胞	重链可变区域		互补决定区域3
B1	IGHV2	26*01	CARIGHRFLEWYLNDYW
B2	IGHV2	26*01	CARIGHRFLEWYLNDYW
B3	IGHV1	2*04	CARDMGCGGDCYHDAFDIW
B4	IGHV4	59*01	CAREATAMAAYFDYW
B5	IGHV4	59*01	CAREATAMAAYFDYW
B6	IGHV3	30*03	CAKTTVTITLNYGMDVW
B7	IGHV2	5*10	CAHRGQDTFXYW

图 10

专利名称(译)	用于对单个细胞所具有的细胞毒性进行评价的组合物以及方法		
公开(公告)号	CN102388145A	公开(公告)日	2012-03-21
申请号	CN200980155152.6	申请日	2009-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
当前申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
[标]发明人	JC洛夫 N范阮达若詹 B居尔格 B沃克		
发明人	J·C·洛夫 N·范阮达若詹 B·居尔格 B·沃克		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/563 G01N33/52 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/16 G01N33/5047 G01N33/56972 C40B30/06		
优先权	61/146106 2009-01-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用以对存在于靶向细胞以及效应器细胞对之间的相互作用进行分析的方法，所述的方法利用到了高通量的筛选方法，用以对存在于微阵列之中的大量的单个细胞进行描绘。

