



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101298478 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 200810087267.3

WO 99/11775 A1, 1999.03.11,

(22) 申请日 2000.09.05

Salter RD 等. A binding site for the

(30) 优先权数据

99/11133 1999.09.06 FR

T-cell co-receptor CD8 on the alpha3 domain of HLA-A2. 《Nature》. 1990, 第 345 卷 (第 3 期), 41-46.

(62) 分案原申请数据

00801877.4 2000.09.05

审查员 刘树柏

(73) 专利权人 国家健康科学研究所

地址 法国巴黎

(72) 发明人 F·朗 M·伯蒂尼尔 F·达弗迪奥

M·邦尼维勒

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 97/44667 A2, 1997.11.27,

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 7 页

(54) 发明名称

检测和纯化对 HLA 体系中存在的肽特异的 CD8+T 淋巴细胞群的方法

(57) 摘要

本发明涉及从 I 类 MHC 重组蛋白类似物形成的多聚体,其特征在于所述蛋白包含重链与 T 淋巴细胞 CD8 共同受体作用区中的至少一个改变,所述改变导致重链和 CD8 间相互作用亲和力的降低、甚至抑制。所述多聚体与抗原性肽形成复合物,可用于诊断和治疗目的。

1. 由重组 HLA-A2 单体形成的四体复合物,该四体复合物包括:  
HLA-A2 单体,在所述 HLA-A2 单体的  $\alpha 3$  结构域的 245 位氨基酸存在由丙氨酸到缬氨酸的取代,和  
链霉抗生物素分子,  
其中每个 HLA-A2 单体与生物素分子偶联,且所述生物素分子与所述链霉抗生物素分子相结合,从而形成四体复合物。
2. 权利要求 1 的四体复合物,其带有抗原肽。
3. 权利要求 2 的四体复合物,其中所述的抗原肽源自 Epstein-Barr 病毒的蛋白质。
4. 权利要求 2 的四体复合物,其中所述的抗原肽源自 Epstein-Barr 病毒的 BMLFI 蛋白质。
5. 权利要求 2 的四体复合物,其中所述的抗原肽源自巨细胞病毒的蛋白质。
6. 权利要求 2 的四体复合物,其中所述的抗原肽源自巨细胞病毒的 pp65 蛋白质。
7. 权利要求 1 ~ 6 中任一项的四体复合物在检测和 / 或分离肽特异性 CD8+T 淋巴细胞群中的应用。
8. 权利要求 1 ~ 6 中任一项的四体复合物在细胞分选方法中的应用。
9. 权利要求 8 的四体复合物的应用,其中细胞分选方法是免疫磁分选方法。
10. 用于从多克隆 T 淋巴细胞群中检测肽特异性 CD8+T 淋巴细胞的方法,所述方法包括:
  - (a) 将多克隆细胞群与权利要求 2 的四体复合物在允许所述四体复合物和对所述四体复合物有亲和力的 T 淋巴细胞受体相互作用的条件下接触 ;和
  - (b) 检测 T 淋巴细胞对所述四体复合物的结合,其中与所述四体复合物结合的所述 T 淋巴细胞被鉴定为肽特异性 CD8+T 淋巴细胞。
11. 权利要求 10 的方法,其中通过使用流式细胞术进行所述检测。
12. 用于从多克隆 T 淋巴细胞群中分离肽特异性 CD8+T 淋巴细胞的方法,所述方法包括:
  - (a) 将多克隆细胞群与权利要求 2 的四体复合物在允许所述四体复合物和对所述四体复合物有亲和力的 T 淋巴细胞受体相互作用的条件下接触,其中所述四体复合物偶联于磁珠上,
  - (b) 回收包含结合于所述磁珠上的 T 淋巴细胞的磁珠,以此从多克隆群中分离肽特异性 CD8+T 淋巴细胞,和,任选地,
  - (c) 扩增分离出的肽特异性 CD8+T 淋巴细胞。

## 检测和纯化对 HLA 体系中存在的肽特异的 CD8+T 淋巴细胞群的方法

[0001] 本申请是申请日 2000 年 9 月 5 日、发明名称为“检测和纯化对 HLA 体系中存在的肽特异的 CD8+T 淋巴细胞群的方法”的 PCT 申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及检测和纯化对 HLA 体系中存在的肽特异的 TCD8+ 淋巴细胞群的方法。

[0003] T 淋巴细胞带有其所对抗原的特异性受体,称为 TCR。TCR 由多条链组成,其中  $\alpha$  和  $\beta$  链参与对存在于 HLA 分子中的特定抗原性肽的特异性识别。这种识别体现在 T 淋巴细胞  $\alpha/\beta$  TCR 以一定亲和性与存在于靶细胞表面的 HLA-肽复合物结合的能力。反过来,可溶性 HLA-肽复合物能够与存在于对所述 HLA-肽复合物特异的 T 淋巴细胞表面的 TCR 结合。

[0004] 迄今,在分子水平上研究最彻底的系统是 CD8+T 淋巴细胞对存在于 I 型主要组织相容性复合物的分子中、尤其是所谓 HLA-A0201 中的抗原性肽的识别。

[0005] 在该系统中,已确认 TCR 对 HLA-肽的亲和力比抗体对其抗原的亲和力小得多。因此,利用装载有肽并标记的可溶性 HLA-A0201 分子检测携带对 HLA 体系中特定肽反应活性之 TCR 的淋巴细胞是不可能的。为了克服这种低亲和性,Altman 等 (1) 已制备了一种由 HLA 重链生物素化的 HLA-A0201-肽复合物组成的多价反应物,它能与链霉抗生物素结合成四聚体。该 HLA-肽四聚体对带有适当 TCR 的 T 淋巴细胞具有高亲和力,从而可用于通过免疫荧光法显现反应活性细胞群。

[0006] 但 TCR 不是 T 淋巴细胞中能与 HLA-肽复合物相作用的唯一分子。实际上,在生理识别的情形中,TCR 与 MHC-肽复合物的结合因 CD8 共同受体与 I 型 MHC 分子的恒定部分的结合而增强。CD8 在该相互作用中的参与因不同的淋巴细胞克隆而不同,在某些情况下可能导致与给定 HLA-肽复合物结合能力的大幅提高。CD8 这种与 I 类 HLA 结合的能力结果导致 I 类 HLA 四聚体与带有 HLA-肽非特异性 TCR 的 CD8+T 淋巴细胞结合的背景噪音。这种背景噪音随着所用四聚体的浓度而增加,并可能导致免疫荧光的假阳性。为试图减小这种非特异性标记,大部分研究组在抗 CD8 抗体的存在下用 I 类 HLA 四聚体进行标记。但只有某些抗 CD8 抗体有效,而且抗体与四聚体之间的最佳浓度必需在每次试验时重新调节。由于这些缺点,检测存在于一种非特异性细胞群中的低含量的特异性亚细胞群(如约 0.1-1%)变得很困难。

[0007] 另外,已提出了 HLA 四聚体的另一潜在应用。即通过分选(流式细胞仪或通过免疫磁分选)分离在体外扩增结束时与给定 HLA-肽反应的淋巴细胞群,然后在抗病毒或抗肿瘤的被动免疫程序中发挥治疗应用。但出于 CD8 参与的四聚体结合的背景噪音可能对此一应用构成严重的障碍,因为它另致分离出常常相当大一部分对选择的 HLA-肽复合物不反应的 T 淋巴细胞。

[0008] Salter 等 (2) 显示,当 HLA 在  $\alpha 3$  结构域中带有一突变时,具有 CD8  $\alpha\alpha$  共同受体的转染细胞所表达膜 HLA 的结合将改变。

[0009] 本发明人的研究证实,可溶性突变四聚体结合 CD8 的效力降低,无论该 CD8 是  $\alpha\alpha$  或  $\alpha\beta$  及是否与 T 淋巴细胞表面的 TCR 结合,这表现为背景噪音降低。

[0010] 由此人们会预计,突变引起的亲和力损失将导致对某些 CD8 依赖性 T 淋巴细胞克隆特异性信号的全部或部分损失。关于这一点,Salter 等的文章表明,一些 CD8 依赖性同种异体反应性克隆对突变 HLA-A2 携带细胞丧失其细胞毒性而对其它的少有影响。

[0011] 因此这些突变四聚体可能只检测到一个多克隆细胞群中的一部分反应性细胞(CD8 依赖性小的)。

[0012] 但在本发明人用抗 CD8 抗体进行双标记试验中,用突变和天然四聚体对多克隆细胞群的比较标记数出人意料地表明,突变的四聚体与天然四聚体识别相同百分比的特异性细胞。

[0013] 另外,突变四聚体对 CD8 依赖性高的克隆和 CD8 依赖性低的克隆的标记比较表明,用 TCR 表达强度报告的四聚体的结合效力相当。

[0014] 因此看来突变很大程度上降低了四聚体与 CD8 本身的结合,但对其与 TCR-CD8 复合物的结合的影响很小。

[0015] 本发明基于利用在突变(更一般地讲为改变)的 HLA 多聚体中证明的特性,涉及作为新产品的如多聚体和其与抗原性肽的复合物。

[0016] 本发明还涉及这些分子检测和/或分离肽特异性 CD8+T 淋巴细胞群的应用。

[0017] 本发明还提供利用这种载有肽的分子检测和/或分离这种细胞群的方法,特别是用于诊断和治疗领域。

[0018] 本发明的多聚体从 I 类 MHC 的重组蛋白类似物形成,其特征不在于这些蛋白含有 I 类 MHC 重链与 T 淋巴细胞 CD8 共同受体相互作用区中的至少一个改变,其导致该重链和 CD8 间相互作用亲和力的减小、甚至抑制。

[0019] 该相互作用区的改变更具体地涉及重链的  $\alpha 3$  结构域。

[0020] 这尤其涉及,与能结合所述 CD8 共同受体的天然重链相应结构域相比, $\alpha 3$  结构域中的至少一个氨基酸的突变。

[0021] 例如可以举出 HLA-A2 分子的  $\alpha 3$  结构域 245 位丙氨酸残基到缬氨酸残基的突变。

[0022] 这种改变还可以是至少一个氨基酸的化学修饰和/或至少一个氨基酸的缺失,这种改变视情况与一个或多个突变一起使用。

[0023] 本发明还涉及作为新产品的从上述多聚体和抗原性肽形成的复合物。

[0024] 在这些复合物中,多聚体尤其以四聚体的形式存在。

[0025] 根据本发明,这些复合物用于检测和/或分离特异性识别复合物中抗原性肽的 CD8+T 淋巴细胞群。

[0026] 上文所定义复合物的应用可以很大程度上降低非特异性结合的背景噪音,而不改变特异性标记,另外还可以免除免疫荧光分析时同时使用抗 CD8 抗体的必要。

[0027] 在一个优选的应用中,所述复合物被用于细胞分选方法中,如免疫磁分选方法。

[0028] Luxembourg 等(5)报道了一种在小鼠体内分离特异性 T 淋巴细胞的免疫磁分选技术。

[0029] 该技术系基于利用包被有 MHC-肽复合物的小珠系统(果蝇系统中的产品;载有肽并经化学生物素化)。

[0030] 本发明还涉及一种从多克隆细胞群中检测和/或分离肽特异性 CD8+T 淋巴细胞群的方法。该检测方法的特征在于,它包括:

[0031] 一将多克隆细胞群与如上定义的复合了抗原性肽的多聚体在允许改性 I 类 MHC/肽复合物和对所述复合物有亲和力的 T 淋巴细胞受体间相作用的条件下接触,

[0032] 一显示与所述复合物结合的淋巴细胞群。

[0033] 所述显示是通过例如荧光实现的,即利用带荧光成分的多聚体。

[0034] 从多克隆细胞群分离肽特异性淋巴细胞群的方法也属于本发明的范围,并可以视情况在上述检测步骤之后进行。

[0035] 本方法利用免疫磁分选技术,其特征就在于它包括:

[0036] 一将多克隆细胞群与其上固定有上述定义的肽 / I 类 MHC 类似物复合物的小磁珠在允许所述复合物和对这些复合物有亲和力的 T 淋巴细胞的受体间相互作用的条件下接触,

[0037] 一回收结合的细胞群,如需要重复该分选操作,和 / 或视情况随后

[0038] 一体外扩增所选择的细胞群。

[0039] 上述改性多聚体的背景噪音和特异标记间的差异增加使得能更好地在多克隆细胞群中辨别特异性淋巴细胞群,从而使得利用这些多聚体进行的免疫磁分选很有效。

[0040] MHC 分子在重链上包含例如酶生物素化基元。固定有所述复合物的小珠与链霉抗生物素结合。

[0041] 所述多克隆细胞群来自从病人中取出的样品,例如滑液或外周血单核细胞。

[0042] 所选细胞群的扩增步骤最好通过在不影响所扩增群体代表性的条件下的多克隆刺激来实现。例如使用 PHA、IL2 或照射的 PBL。

[0043] 本发明还涉及经选择及视情况经扩增的 T 淋巴细胞群,其特征就在于其仅由对给定复合物的肽反应的 T 淋巴细胞构成。

[0044] 这种肽特异性细胞群在治疗中有巨大意义,尤其是基于按过继免疫治疗对其回输的应用。

[0045] 因而本发明涉及一种药物组合物,其特征就在于它从如上定义的肽特异性 T 淋巴细胞群结合药用载体制备。

[0046] 这种组合物最好可以通过注射给药。

[0047] 因此通过注射分别识别如上定义的 I 类 MHC/ 病毒或肿瘤肽复合物的 T 淋巴细胞可能恢复抗病毒或抗肿瘤免疫,或通过给予对抗给定抗原并具有活化或抑制免疫应答特性的 T 细胞可能校正免疫失衡(例如自体免疫)。

[0048] 本发明的其它特征和优点出现在下述实施例中,给出这些实施例完全是为举例说明的目的,其中引用了图 1-7,它们分别代表:

[0049] 一图 1 和 2 代表作为天然四聚体 (1A, 2A) 和相应的突变四聚体 (1B, 2B) 浓度函数的荧光强度(平均值),其中四聚体载有来自 BMLF1(图 1) 或 pp65(图 2) 的肽,

[0050] 一图 3,作为天然和突变四聚体浓度函数的对特异性克隆的荧光强度平均值,

[0051] 一图 4A,在有或无抗 CD8 抗体时,载有 BMLF1 肽的细胞系 BHLA-0201 两特异性克隆的溶解百分率,图 4A 和 4B 中,这些克隆的标记结果,

[0052] 一图 5,天然和突变四聚体用两病人之淋巴细胞进行的单一(用藻红蛋白, PE) 和双重标记(PE 和抗 CD8 标记抗体)的结果,和

[0053] 一图 6 和 7,用天然四聚体和突变四聚体进行的免疫磁分选的结果。

- [0054] 实施例 1:制备在与 CD8 共同受体作用区中突变的 HLA-A0201 四聚体。
- [0055] 使用一种含有编码 HLA0201 重链的 cDNA 和编码酶生物素化基元的延长序列的细菌表达质粒(按 Altman 等 (1) 构建)。用 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 的特异性引物扩增  $\alpha 3$  结构域的编码区。
- [0056] SEQ ID No. 1
- [0057] 5' CCTTCCAGAAGTGGGTGGCTGTGGTGGTGCC 3'
- [0058] SEQ ID No. 2
- [0059] 5' GGCACCACCACAGCCACCCACTTCTGGAAGG 3'
- [0060] 利用 Stratagene 的“定点突变快变试剂盒 R”(QuickchangeSite-directed Mutagenesis R),在扩增片段中引入了一个碱基的突变,从丙氨酸密码子变换为缬氨酸密码子。
- [0061] 再将该突变片段引入表达载体中,该突变的存在通过测序验证。
- [0062] 突变 HLA-A0201 重链以细菌包含体和载有肽的 HLA 单体形式产生,然后按以前由 Garboczi 等 (3) 报道的复性方法得以获得相应的突变四聚体。
- [0063] 实施例 2:载有各种肽的天然 HLA-A0201 四聚体和突变 HLA-A0201 四聚体间的免疫荧光标记效率和特异性的比较研究
- [0064] a) 淋巴细胞克隆的标记
- [0065] 天然 HLA-H0201 四聚体和相应的突变四聚体用来自 EBV 病毒 BMLF1 蛋白的肽负载,或用来自 CMV 的 pp65 蛋白的肽负载。
- [0066] 天然四聚体按实施例 1 的技术(但不包括突变)获得。
- [0067] 标记特异性和非特异性克隆,并以递增的浓度使用。
- [0068] 图 1 给出了用天然 HLA-A2/BMLF1(图 1)和用相应的突变四聚体(图 1B)获得的荧光强度平均值(MFI)。
- [0069] 可以看出,天然 HLA-A2/BM 四聚体显示出与某些非特异性克隆结合的背景噪音,其随着所用四聚体的量而增加。
- [0070] 这种背景噪音似乎不仅与所用克隆的 HLA 限制有关,而且还依赖于负载的肽,因为两个 HLA-A0201 限制的抗 -IE1 克隆给出强背景噪音,而同样是 HLA-A0201 限制的抗 -melan A 克隆给出了中等背景噪音。
- [0071] 用突变四聚体对特异性克隆(BM/A2)获得的荧光平均值小于用天然四聚体获得的值,但对于非特异性克隆的背景噪音几乎为零,而无论所用四聚体的浓度如何。
- [0072] 可以看出,天然四聚体和突变四聚体间的这种背景噪音差异不是 A2/BM 四聚体专有的,因为对 HLA-A2/pp65 也观察到了这种现象(见图 2)。
- [0073] 在该图 2 中,荧光平均值以 log 标度表示以显现用突变四聚体获得的低标记背景噪音。从中注意到,特异性标记和非特异性标记间的差异用突变 A2/pp65 四聚体时为 2 个  $\log(10^2)$  水平,而用天然四聚体时仅为 1 个 log。两个令人注意的例外是两个抗 EBV 的 CD4 克隆,用天然四聚体时背景噪音很小。这一观察结果印证了如下假说:用天然四聚体获得的标记背景噪音是出于四聚体与 CD8 的一定比例的非特异性结合。
- [0074] 图 3 中显示了用负载 pp65 的突变和天然四聚体获得的对特异性克隆的标记差异。用突变和天然四聚体获得的饱和曲线间的差异显示,这些克隆上对天然四聚体比对突变四

聚体存在更多数目的结合位点：因而对于天然四聚体的情况，很可能一些价位与单独 CD8 作用，因为该分子在 T 淋巴细胞表面以远高于 TCR 的密度表达。

[0075] 为了检验利用突变四聚体的特异性标记是否受特异性克隆的 CD8 依赖性程度的显著影响，进行了另一些实验。事实上，众所周知，在 CD8+T 克隆中，某些克隆非常需要 CD8 以增强其 TCR 和 HLA-肽复合物间的相互作用，而其他克隆无此需要。

[0076] CD8 依赖性程度在有或无抗 CD8 抗体存在下按 Couede1 等 (4) 的细胞毒性试验评估，并被认为与 TCR 对 HLA-肽复合物的亲和力成反比。

[0077] 在图 4A 中显示了两个特异性克隆对负载 BMLF1 肽 (10  $\mu$  M) 的 HLA-A0201 细胞系的细胞毒性试验。克隆 A2.10 是高 CD8 依赖性的，因为其细胞毒性被抗 CD8 抗体抵销，而克隆 A4.5 是相对低 CD8 依赖性的。

[0078] 进行了用突变四聚体的标记和用抗 CD3 抗体的标记，以评估表面表达的 TCR 数目。结果示于图 4B (CD3 标记) 和 4C (突变 BMFL1/A2 四聚体标记)。

[0079] 注意到对这两个克隆的四聚体标记 /CD3 标记比例是很接近的，这表明突变四聚体的标记很少受 CD8 依赖性程度的影响 (因而推测很少受 TCR 亲和力的影响)。

[0080] 因此，HLA 分子突变造成的对 CD8 亲和力的降低不显著影响四聚体的特异性标记。

#### [0081] b) 在多克隆细胞群中的特异性细胞检测

[0082] 为了比较天然和突变四聚体检测多克隆细胞群中低百分比特异细胞的能力，标记了两个 HLA-A0201 病人 (以下称为 A 和 B) 的外周淋巴细胞。两位病人的抗 CMV pp65 肽应答已预先证实。这些淋巴细胞已预先在体外多克隆扩增并冷冻。

[0083] 对病人 A 和 B 获得的结果报告在图 5 中，图 5A 相应于病人 A，图 5B 相应于病人 B。其中包括用 20  $\mu$  g/ml 藻红蛋白的 HLA-A0201/pp65 四聚体单标记，以及相应的双重标记 (用 PE 标记的四聚体和 FITC 标记的抗 CD8 抗体) 的结果。该图还给出了荧光强度平均值 (log)。

[0084] 首先注意到，单标记中天然四聚体的辨别能力随起始细胞群中特异细胞的百分比而变化。事实上，对于病人 A，5.60% 的阳性细胞峰易于辨认，而对于病人 B，该峰被非特异性标记所污染，使得难以测定阳性细胞的百分比。根据文献，天然四聚体和抗 CD8 的双重标记降低了背景噪音，从而得以清楚地确认阳性亚细胞群，并准确测定其百分比 (此例中为 0.84%)。这证明用天然四聚体准确测定阳性细胞的百分比需要使用抗 CD8 进行双重标记。

[0085] 而利用突变四聚体的单标记在两个病人中均明确无误地检定了阳性细胞峰。所获阳性细胞百分比与用天然四聚体的双重标记得到的结果几乎相同。这表明所有用天然四聚体可检测的特异性细胞也可以用突变的四聚体检测，并证实了用 CD8 高依赖性和低依赖性克隆获得的结果，即该突变不显著影响特异性识别。

[0086] 另外，这些结果表明，用突变四聚体的双重标记与单标记相比没有带来新的信息。最后，可以看到，在用天然四聚体的双重标记中，用抗 CD8 抗体获得的荧光平均值 (对病人 A 和 B 的 216 和 193) 显著低于用突变四聚体的双重标记中所获得的值 (对病人 A 和 B 的 366 和 370)。用抗 CD8 单标记总群所获得的荧光平均值对病人 A 和 B 分别为 340 和 358。这表明抗 CD8 抗体和天然四聚体间的结合竞争，而与突变四聚体不产生这种竞争。

[0087] 因而突变四聚体的使用使得测定多克隆细胞群中特异性细胞的百分比不再依赖于使用抗 CD8 的双重标记。

[0088] 实施例 3:用负载 p65 肽的天然 HLA-A0201 四聚体和突变 HLA-A0201 四聚体进行的免疫磁分选的效力和特异性比较研究

[0089] 将负载 pp65 肽的生物素化 HLA-A0201 单体固定在与链霉抗生物素偶联的磁珠 (Dynabeads M-280 Streptavidin, DYNAL) 上。本研究中所用淋巴细胞群来自患有类风湿性关节炎病人的滑液或 PBL 或 CMV 血清阳性健康供体的 PBL。

[0090] 在图 6 中显示了用天然四聚体和突变四聚体对这些多克隆细胞群的单标记结果。利用突变四聚体,可以显示两个样品中的阳性细胞低百分比 (0.22% 和 0.14%), 而用天然四聚体几乎测不出。

[0091] 这些细胞群用载有天然四聚体或突变四聚体的小珠分选, 然后通过一种多克隆刺激 (PHA、IL2、照射的 PBL) 体外扩增所选择的细胞群, 所述刺激不影响所扩增群体的代表性。

[0092] 然后对这些分选和扩增的细胞群用两种四聚体标记。

[0093] 如图 6 中所示, 用天然四聚体分选得到的细胞是该相同四聚体标记阳性的, 但這些细胞很小的比例是对突变的四聚体阳性的 (0.7% 和 2.88%)。

[0094] 用突变四聚体分选后结果显著不同, 因为所分选的细胞群对两种四聚体都是强阳性的。

[0095] 用突变四聚体获得的阳性细胞富集倍数对样品 1 为 421 (92.64% 对 0.22%), 对样品 2 为 693 (97.01 对 0.14%)。

[0096] 这些结果表明用突变四聚体进行分选可能从阳性细胞群占 0.1-0.2% 的样品获得纯度大于 90% 的阳性细胞群。

[0097] 下表说明了这一观察结果的普遍性, 该表列出了用天然四聚体和突变四聚体对病人和健康供体的 PBL 和滑液淋巴细胞进行分选的结果。

[0098]

四聚体阳性细胞百分数(富集倍数)

样品	未分选	第一次分选		第二次分选	
		天然 A2/pp65	突变 A2/pp65	天然 A2/pp65	突变 A2/pp65
SFL1	14.0	95.0 (6.8)			
PBL1	5.6	89.5 (16.0)	97.9 (17.5)		
SFL2	1.4	25.3 (18.1)		75.9 (3.0)	
PBL2	0.8	51.1 (63.9)	97.5 (121.9)		
SFL3	0.6	13.7 (22.8)			
PBL3	nd	8.5 (nd)		12.0 (1.4)	
SFL4	0.3	4.1 (13.6)		8.6 (2.1)	
SFL5	0.2	0.7 (3.5)	92.5 (462.5)		
SFL6	0.14	2.9 (20.6)	97.1 (693.6)		
PBL4	0.09		82.9 (921.1)		
PBL5	0.02	0.04 (2.0)	2.2 (110.0)		98.7 (44.90)

[0099] 通过用突变四聚体进行重复分选,可能从亚细胞群含量更低的样品获得纯的特异性群体(参见表中的PBL5)。而用天然四聚体要获得该结果要困难得多;实际上用天然四

聚体第一次分选分离的非特异性细胞看来具有足够的亲和力,使得在以后的分选中再次被选择。这导致第二次分选的富集倍数很一般(参见 PBL3 和 SFL4)。

[0100] 对所分选群体的反应性进行了另一项研究,以验证按其结合突变 A2/pp65 四聚体之能力挑选的细胞在生理环境中与 HLA-肽复合物的反应性良好。

[0101] 为此,研究了所分选淋巴细胞群的活化,具体为在加入负载 pp65 肽的 T2 细胞 (A0201+) 后,诱导表面 IL2 受体的  $\alpha$  链 (CD25)。

[0102] 如图 7 所示,用天然四聚体分选的细胞群在与负载肽的 T2 细胞接触后不表达 CD25。

[0103] 相反,用突变四聚体分选的细胞大部分在负载 pp65 肽的 T2 存在下被活化,CD25 阳性细胞的百分数与突变四聚体标记细胞的百分比一致性很好(对病人 1, 90.63% 的活化细胞对 92.64% 的标记细胞;对病人 2 为 97.20% 对 97.01%)。

[0104] 这些结果表明,用突变四聚体标记和分选的细胞均为反应性细胞,而用天然四聚体分选的细胞是没有反应性的。

[0105] 在用天然四聚体分选后没有发现任何反应活性细胞,但可能最终会在该细胞群中辨别出若干阳性细胞,这一事实看来是由于这些细胞的百分比太低,无法在功能试验中检测到。

[0106] 这些结果一起表明了经免疫磁分选选择起始细胞群中的低含量群体方面,突变四聚体与天然四聚体相比具有显然的优越性。

[0107] 当起始样品中特异性群体数量很大时,应可以用天然四聚体分离反应活性细胞,但所获群体的纯度比用突变四聚体平行获得的纯度低得多(表)。

[0108] 参考文献

[0109] 1) Altman J. D. 等,1996,科学 (Science) 274 :94-6 和专利 US5,635,363,

[0110] 2) Salter, R. D. 等,1990,自然 (Nature) 345 :41-46,

[0111] 3) Garboczi D. N. 等,1992,美国科学院院刊 (Proc Natl. Acad. Sci. USA) 89 : 3429-33,

[0112] 4) Couedel, C. M. 等,1999,免疫学杂志 (J. Immunol.) 162,6351-8,

[0113] 5) Luxembourg A. T. 等,自然生物技术 (Nature Biotechnology), vol. 16, 1998 年 3 月,281-285。

图 1A HLA-A2/BMLF1 四聚体 图 1

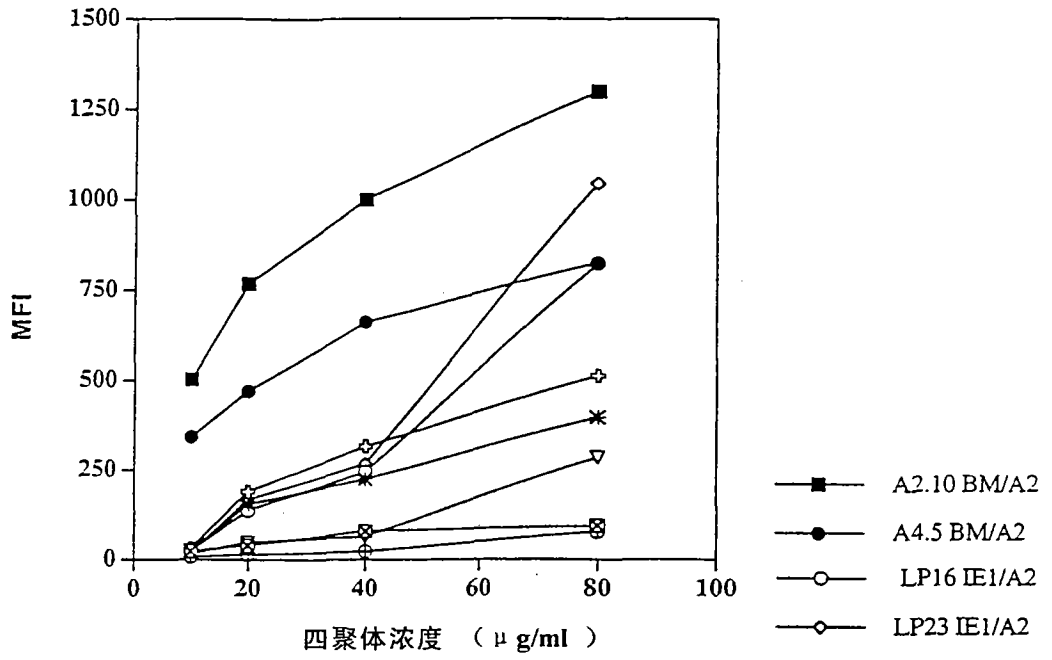


图 1B 突变 HLA-A2/BMLF1 四聚体

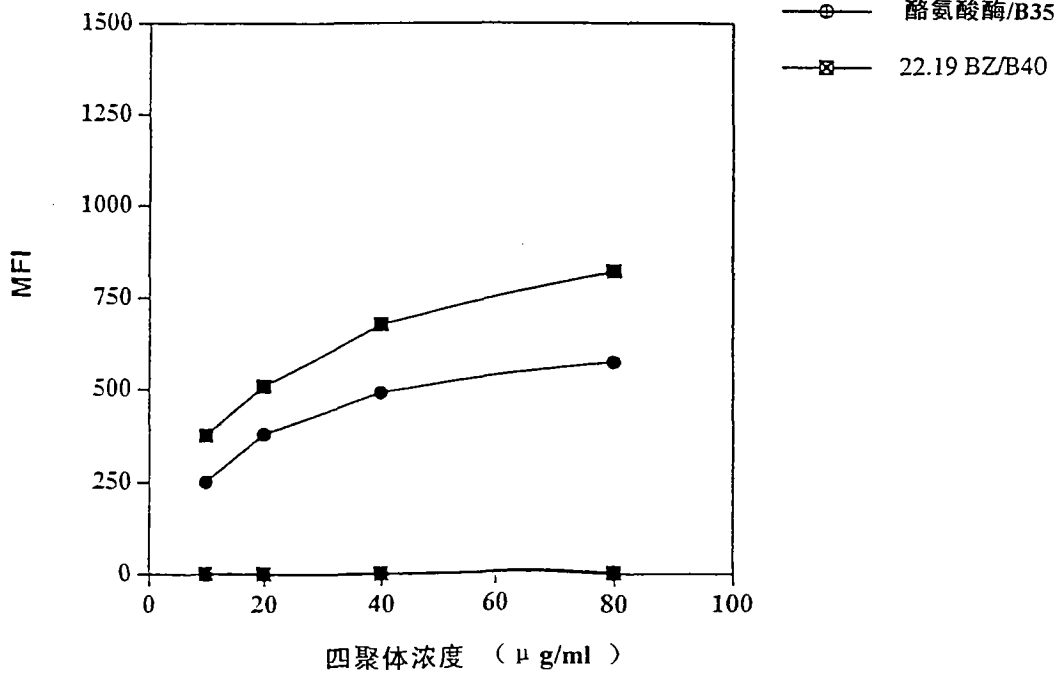


图 2

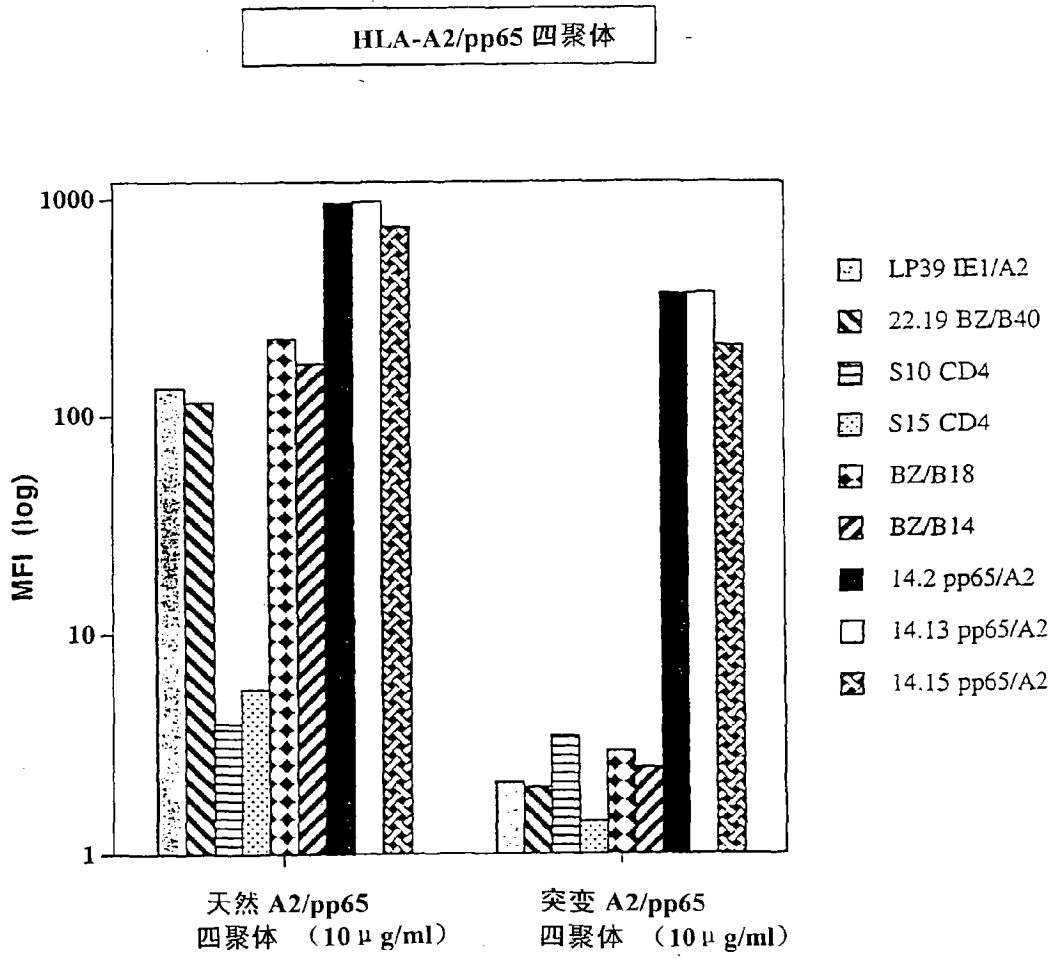


图 2A

图 2B

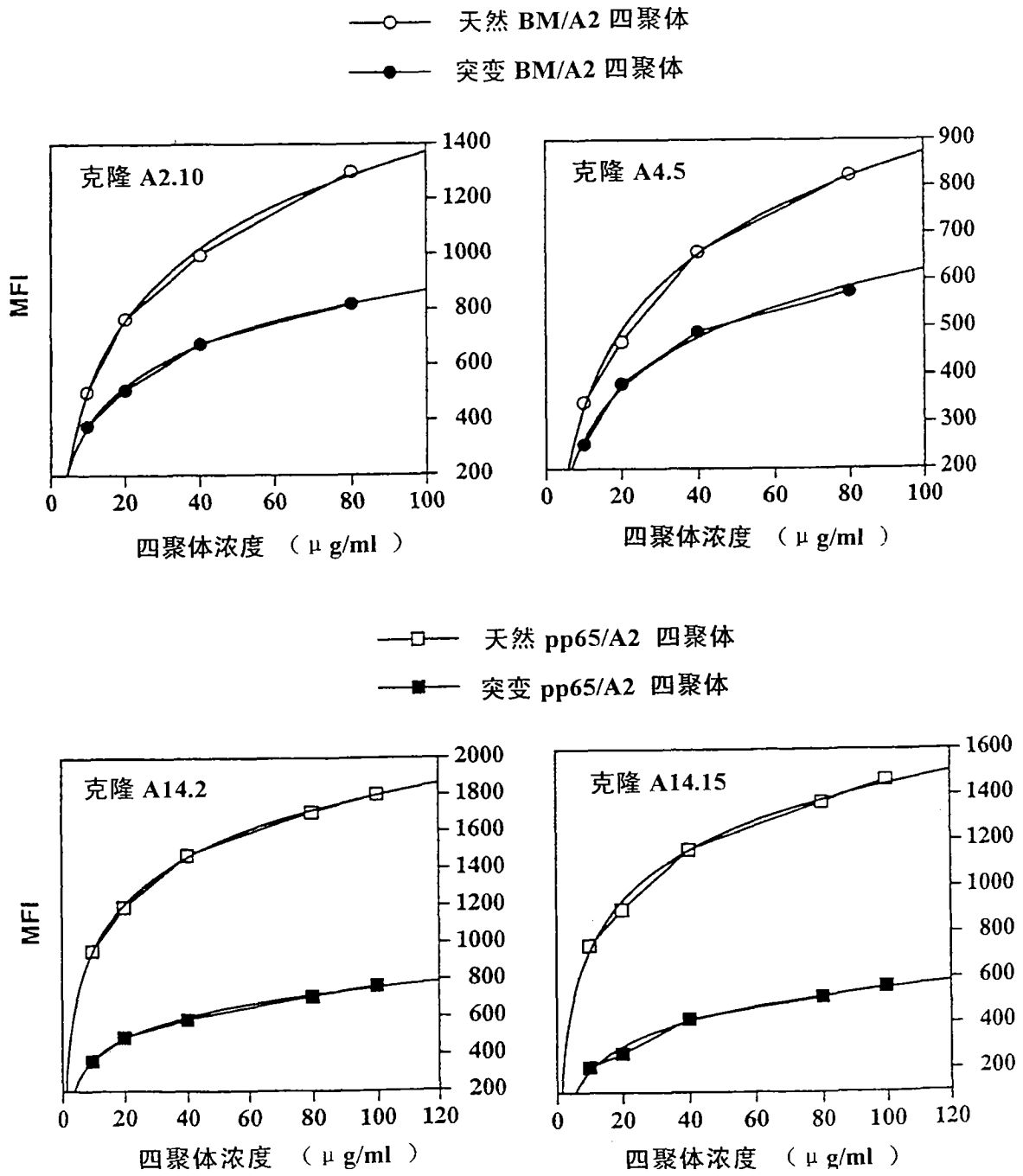


图 3

图 4

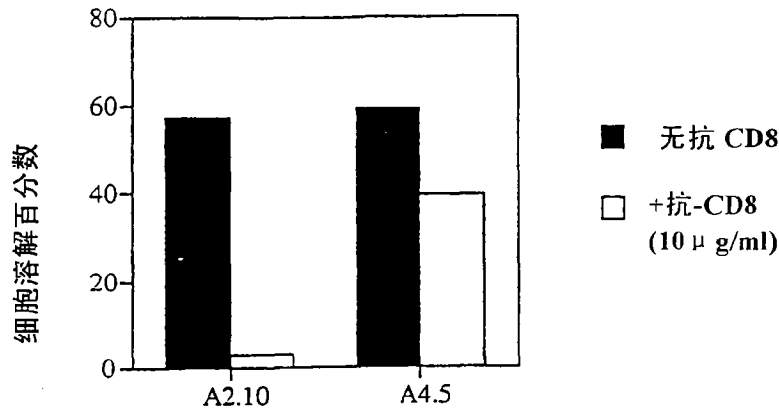
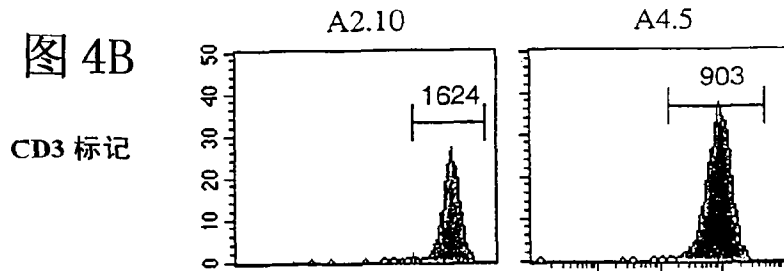


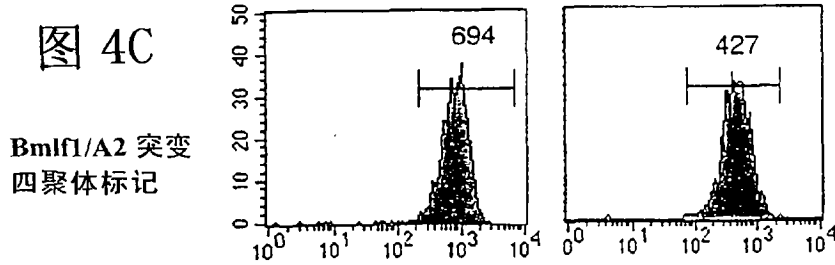
图 4A

图 4B



CD3 标记

图 4C



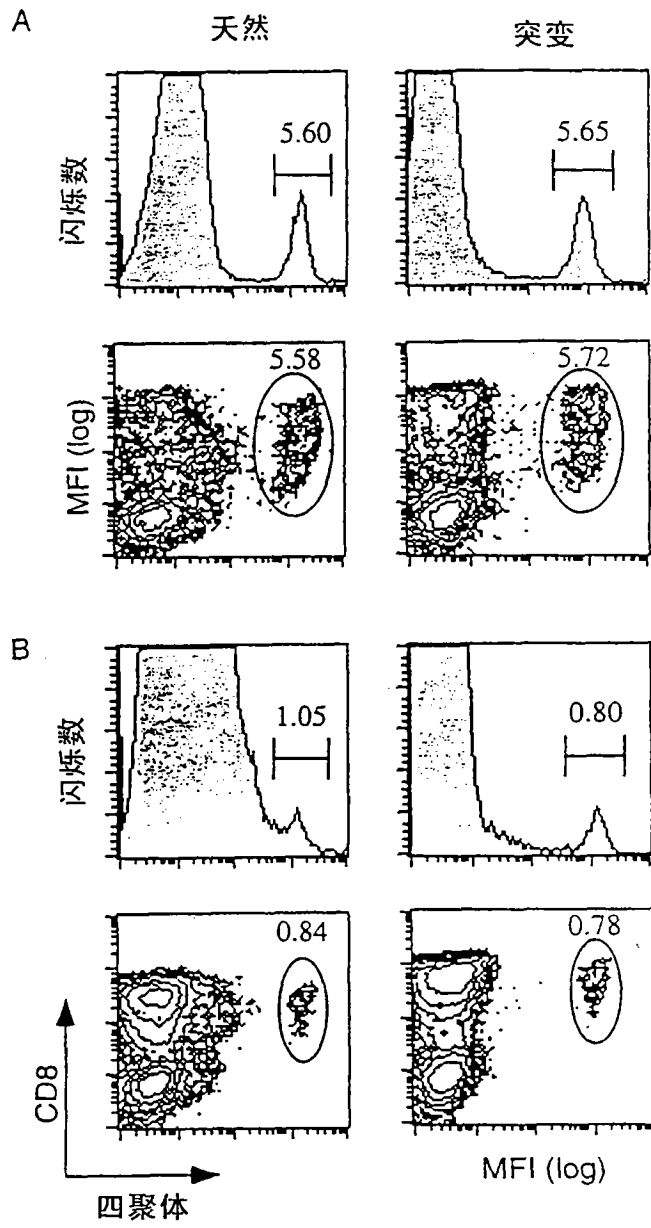
Bmlf1/A2 突变  
四聚体标记

四聚体 MFI/CD3MFI 之比

A2.10: 0,43

A4.5: 0,47

图 5



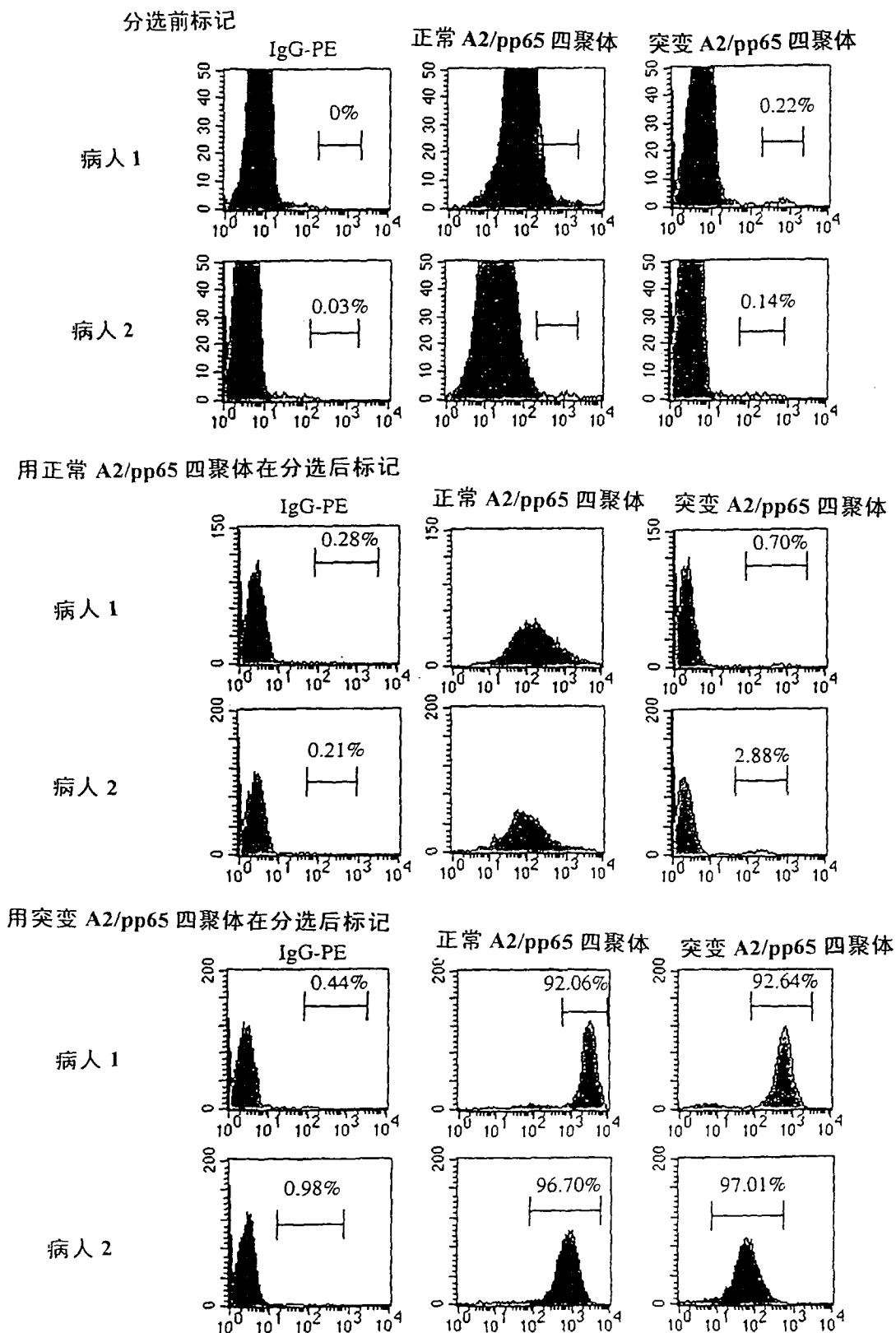


图 6

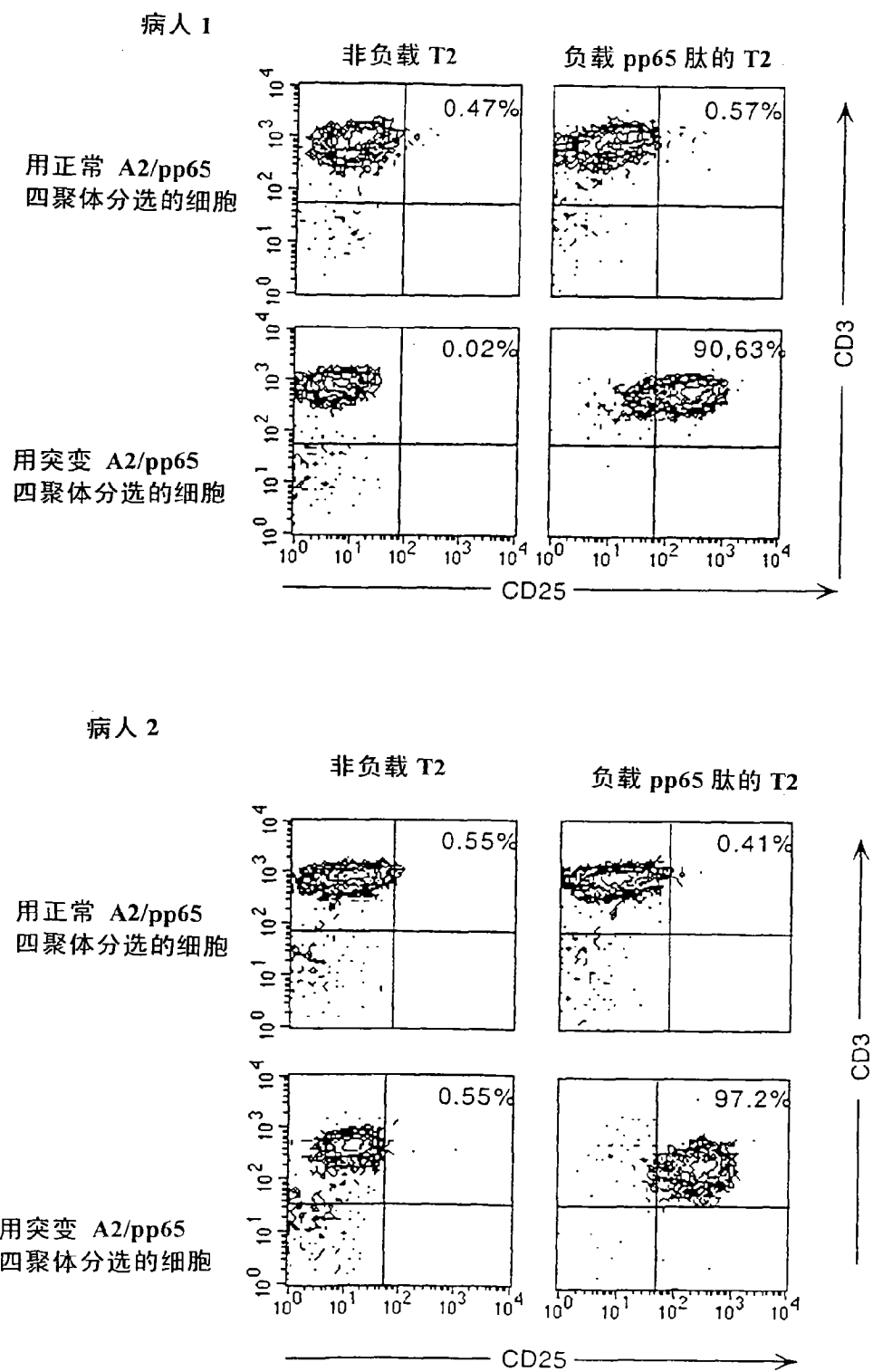


图 7

专利名称(译)	检测和纯化对HLA体系中存在的肽特异的CD8+T淋巴细胞群的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101298478B</a>	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN200810087267.3	申请日	2000-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	国家健康科学研究所		
申请(专利权)人(译)	国家健康科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	国家健康科学研究所		
[标]发明人	F朗 M伯蒂尼尔 F达弗迪奥 M邦尼维勒		
发明人	F·朗 M·伯蒂尼尔 F·达弗迪奥 M·邦尼维勒		
IPC分类号	C07K14/705 G01N33/68 C12Q1/02 C12N5/08 G01N33/53 A61K35/12 A61K35/14 A61K35/24 A61K38/00 A61P37/02 A61P37/04 C07K14/74 C12N5/0783 C12N15/09 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2035/124 C12N5/0636 C07K14/70539 G01N33/56972 A61K38/00		
审查员(译)	刘树柏		
优先权	1999011133 1999-09-06 FR		
其他公开文献	CN101298478A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及从I类MHC重组蛋白类似物形成的多聚体，其特征在于所述蛋白包含重链与T淋巴细胞CD8共同受体作用区中的至少一个改变，所述改变导致重链和CD8间相互作用亲和力的降低、甚至抑制。所述多聚体与抗原性肽形成复合物，可用于诊断和治疗目的。

样品	未分选	第一次分选		第二次分选	
		天然 I2/pp65	突变 I2/pp65	天然 I2/pp65	突变 I2/pp65
SPE1	14.0	95.0 (6.8)			
PBI1	5.6	88.5 (16.0)	97.9 (17.5)		
SPE2	1.4	25.3 (8.1)		75.9 (3.0)	
PBI2	0.8	51.1 (63.9)	97.5 (121.9)		
SPE3	0.6	13.7 (22.8)			
PBI3	nd	8.5 (nd)		12.0 (1.4)	
SPE4	0.3	4.1 (13.6)		8.6 (2.1)	
SPE5	0.2	0.7 (3.5)	92.5 (462.5)		
SPE6	0.14	2.9 (20.6)	97.1 (683.6)		
PBI4	0.09		88.9 (921.1)		
PBI5	0.02	0.04 (2.0)	2.2 (110.0)		88.7 (44.90)