

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/50

G01N 33/53 G01N 33/566

G01N 33/569 C12Q 1/04

C12Q 1/70 C12Q 1/24



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02158541.5

[43] 公开日 2003 年 9 月 24 日

[11] 公开号 CN 1444043A

[22] 申请日 2002.12.25 [21] 申请号 02158541.5

[71] 申请人 帕弗瑞生物技术(北京)有限公司

地址 100176 北京市亦庄经济技术开发区宏
达北路 12 号创新大厦 B 座三区三层

[72] 发明人 陈 格 刘向军

权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种个体化特异性免疫细胞功能测定方法

[57] 摘要

根据细胞免疫学中 T 淋巴细特异性识别、激活、效应机制原理,结合器官移植免疫学、肿瘤免疫学的特点,本发明建立了一种具有个体化特异性免疫细胞功能检测方法。该方法以器官移植供者的特异性抗原成分(全细胞 Ag,细胞提取物 Ag,纯化的细胞 Ag,HLA 分子);或 MHC(HLA)分子库;或肿瘤患者自身的肿瘤细胞 Ag 成分或含自身肿瘤抗原的肿瘤抗原库作为个体化特异性刺激物与相应的器官受者或肿瘤患者的免疫细胞温育培养;继而通过对器官受者或肿瘤患者免疫细胞及其亚群进行分离或分类并同时相应免疫细胞的活化指标进行测量,借以评估器官移植供者特异性抗原反应性免疫细胞、肿瘤患者特异性抗原反应性免疫细胞的功能状态。上述测定方法学具有显著的个体化、特异性特征;并同时具有广谱通用性;可广泛应用于器官

移植中特异性免疫排斥反应的预测、动态监测以及肿瘤患者特异性抗肿瘤免疫功能的评价;作为免疫治疗性用药方案的重要参考指标。

1. 一种用于监测器官移植受者、肿瘤患者免疫细胞功能的个体化特异性方法。其主要包括以下内容：1)制备个体化特异性抗原和自身对照抗原；2)制备 MHC(HLA)分子库；制备肿瘤抗原库；3)以上述抗原刺激活化受检样品中的免疫细胞；4)以适当分离和/或分类方法对特异性免疫细胞的各种活化指标进行测量。
2. 权利要求 1 中的个体化特异性抗原解释为器官移植供者的任何组织或细胞及其相应提取物和肿瘤患者自身肿瘤的肿瘤细胞及其相应提取物。
3. 权利要求 2 中的细胞或肿瘤细胞解释为经过各种体外处理或不经任何处理所获得的供者任何生物细胞；或肿瘤患者自身的肿瘤细胞；包括具有或不具有生物活性增殖功能的细胞。
4. 权利要求 1 中的个体化特异性抗原进一步解释为经过物理、化学、生物化学、生物学、酶学等方法对上述组织、细胞处理后所获得的复合组分或单一组分。
5. 权利要求 1 中的个体化特异性抗原可来源于某特定生物个体或一个以上生物个体的组织细胞及其细胞成分。
6. 权利要求 1 中的 MHC (HLA) 分子库解释为包括目前全部或部分已知的 MHC (HLA) 分子的混合分子库；如 MHC (HLA) I 类分子库；MHC (HLA) II 类分子库；MHC (HLA) I 类和 II 类分子的混合分子库。
7. 权利要求 6 中的 MHC (HLA) 分子库进一步解释为通过各种方法、技术，以各种生物细胞、生物材料作为来源所制备获得。如亲和层析技术，层析技术 DNA 重组技术、DNA 转染技术、细胞生物学方法以及其它各种理化方法等。
8. 权利要求 1 中的 MHC (HLA) 肿瘤抗原库解释为包括某一类肿瘤（如腺癌类、黑色素细胞瘤类等）共同抗原的肿瘤抗原，或包括所有肿瘤共同抗原的肿瘤抗原库。上述肿瘤抗原库可由一种或一种以上的同类肿瘤或/和不同类肿瘤，或由来自同一肿瘤组织细胞或不同肿瘤组织细胞的一个或多个生物个体，或细胞系制备而成。包括化学合成、生物合成；但必需包含一种或一种以上可被受检生物个体免疫细胞所能特异性识别并发生相应生物学反应的肿瘤抗原成分。
9. 权利要求 10 中的 MHC (HLA) 肿瘤抗原库进一步解释为全细胞肿瘤抗原库，亚细胞肿瘤抗原库或肿瘤抗原单一或多种纯化组分所组成的肿瘤抗原库。
10. 权利要求 9 中的 MHC (HLA) 进一步解释为通过任何物理、生化、化学合成方法、生物学方法、常层析方法、免疫亲和层析方法、离心、梯度密度离心、沉淀等各种方法制备

而成。

11. 权利要求 10 中的抗原刺激解释为以权利要求 1-10 中的个体化特异性抗原或 MHC(HLA) 分子库, 或肿瘤抗原库中的抗原与相应受试样品中的免疫细胞在体外共同温育或培养 30 分钟以上, 完成对免疫细胞的刺激活化过程。
12. 权利要求 1 中的受检样品解释为接受相应器官移植供者的受者或任一移植受者和肿瘤特异性抗原制备来源肿瘤患者或任一肿瘤患者的外周全血、骨髓、各种生物体液: 如关节液、胸腔液、腹腔液、髓脊液等; 但其至少包含一种与免疫功能有关的活性细胞成分。
13. 权利要求 1 中的免疫细胞解释为直接或间接参与免疫学反应的任何细胞个体或群体; 如各类淋巴细胞及其亚群(T、B 淋巴细胞; 辅助性 T 淋巴细胞(T_{H0} ; T_{H1} ; T_{H2})、记忆性 T、B 淋巴细胞、抑制性 T 淋巴细胞等); NK 细胞; 各种抗原提呈细胞(如树突状细胞、巨噬细胞、B 淋巴细胞; 间质细胞、纤维母细胞、纤维细胞)、血小板、红细胞、各种骨髓细胞、各种干细胞; 各种免疫细胞前体细胞等。
14. 权利要求 1 中的细胞分离分类方法解释为可将混合细胞群体中某特定细胞群体(如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、CD4 阳性细胞, CD8 阳性细胞、中性粒细胞、NK 细胞、血小板等)加以纯化、分类的任何物理、生化、免疫学、生物学等方法。
15. 权利要求 1 中的细胞分离分类方法进一步解释为离心、密度梯度离心、自然沉降、非特异性吸附、固相吸附、免疫磁珠吸附、聚苯乙烯微珠免疫吸附、聚苯乙烯微孔板吸附, 以及使用单或多标记技术(如单或多色荧光标记)在相应仪器(如流式细胞仪、荧光显微镜等)上可对各种免疫细胞进行分类鉴别的任何方法。
16. 权利要求 1 中的活化指标解释为免疫细胞经过刺激激活、活化后产生的任何直接、间接的生物学改变和生物学产物, 并可被体外直接或间接测量手段所检测的各种信号。
17. 权利要求 1 中的活化指标进一步解释为细胞形态变化、细胞数目变化、细胞酶学变化、细胞内离子浓度变化、细胞内外受体变化、细胞膜通透性变化、细胞吞噬功能变化、细胞活化标志蛋白表达(如 CD 分子: CD69, CD25, CD71, CD95, MHC-I 分子, MHC-II 分子等); 细胞内能量变化(如 ATP、AMP 浓度变化等)、细胞分泌各种生物因子变化(IL-2, IL-12, TNF; INF γ ; IL-4 等)、细胞核变化(细胞核数目、DNA 含量变化等); 细胞功能变化(杀伤功能、吞噬功能、粘附功能等)、细胞蛋白质浓度变化等。
18. 权利要求 1 中的检测方法解释为能够对权利要求 17 中活化指标进行相应测量的任何检测方法, 其主要包括但不限于下列方法: ELISA, 细胞 ELISA(Cellular ELISA); ELISPOT; 发光检测方法(生物发光、化学发光、时间延迟发光等); 荧光检测方法(荧光测定仪、荧光显微镜计数、流式细胞仪检测方法等); 同位素检测(如 ^{51}Cr 释放、 ^3H -TdR 掺入等)、细

胞涂片染色检测、细胞免疫组织化学检测、细胞色素(MTT)检测等。

19. 权利要求 1 中的特异性抗原可来源权利要求 2、3 中所述的细胞及细胞提取物；也可来源于其他一个或一个以上生物个体的细胞；但至少必需含有一种能够活化受检样品中特异性免疫细胞的成分，并可用于评价受检个体的特异性免疫反应细胞的功能状态(如受者对供者组织器官、细胞的特异性免疫反应细胞功能；肿瘤患者抗肿瘤特异性免疫反应细胞功能)。
20. 权利要求 1 中的特异性抗原必须至少包括一种或一种以上与相应移植物共有的抗原成分或至少一种与肿瘤患者自身肿瘤细胞的共有抗原成分；并能特异性地刺激、活化移植物受者或肿瘤患者的抗移植物特异性免疫或肿瘤特异性免疫细胞。
21. 本发明特别强调在特异性细胞免疫功能测定分析中设置自身抗原的对照刺激物，其具体方法为：以与制备相应个体化、特异性抗原相同的方法制备受检个体的细胞或细胞提取作为自身阴性对照，在完全相同的实验条件下，分别对同一样品中免疫细胞进行温育、刺激、活化直至获得最终结果。并结合特异性抗原刺激管(孔)和自身抗原对照管(孔)；无抗原刺激管(孔)的结果进行综合分析和评价。
22. 权利要求 1 中的个性化、特异性抗原和 MHC(HLA)分子库；肿瘤抗原库和自身对照抗原可一次性制备、储存用于不同时间采集的同一生物个体样品的多次检测；也可在不同时间多次适时制备而成。

一种个体化特异性免疫细胞功能测定方法

一、技术领域

本发明主要涉及生物机体特异性细胞免疫功能测定方法。尤其涉及个体化特异性细胞免疫功能的监测方法学。特别涉及器官移植受者的特异性针对相应供者移植物的细胞免疫功能监测，排斥反应的预测，免疫用药方案的调整；以及肿瘤患者机体特异性抗肿瘤免疫功能的评估和抗肿瘤治疗方案的制定等。此外，应用该方法原理选用不同特异性抗原、疫苗、药物等可引起抗体免疫功能发生变化物质作为刺激原可建立相应的各种方法。

二、技术背景

正常生物机体免疫系统由体液免疫和细胞免疫所组成，二者之间的精确配合和相互调节在维持正常机体生命机能和抗疾病免疫中发挥着极其重要的作用。各种淋巴细胞，尤其是 T 淋巴细胞在免疫系统中的中心作用近年来受到广泛地关注。T 淋巴细胞作为生物机体抗疾病免疫和排斥免疫的“轴心”概念得到了普遍的认同。

随着人类对生物机体免疫机制理解的不断深化，近年来尤其是在特异性免疫识别应答机制方面的研究，取得了重要进展。特异性免疫应答的前提条件是特异性免疫识别，而特异性免疫识别又取决“双信号”机制的完整性。组成“双信号”识别的物质基础是：由 MHC 基因的表达产物 MHC 分子和特异性多肽复合物组成特异性识别的第一信号；而协同刺激因子(B7 家族；B7-1；B7-2 等)、细胞粘附因子(CD40 等)则组成免疫识别的第二信号。生物体抗疾病免疫或抗移植排斥免疫的激发、活化、调节以及免疫耐受的产生与上述“双信号”系统的完整性有着极其密切的关联。外来抗原(非己抗原)或移植抗原成分进入生物体后，首先通过抗原提呈细胞(Antigen Presenting Cells; APC)的作用，将非己抗原降解为特异性多肽与相应的 MHC 分子组装形成 MHC-特异性多肽复合物并提呈于细胞表面，然后与膜上的协同刺激因子，细胞粘附因子等共同被特定 T 淋巴细胞克隆特异性受体(T Cell Receptor; TCR)以及协同刺激因子受体(CD28 等)所识别、结合；从而特异性地激活 T 淋巴细胞及其亚群，诱发生物机体全面的特异性免疫应答。通过 MHC-I-多肽复合物诱导激活的 CD8 阳性 T 淋巴细胞形成细胞毒性细胞 (Cytotoxic T Lymphocytes; CTL)或称杀伤性 T 细胞对感染外来抗原(如病毒等)的

细胞或肿瘤细胞或器官移植供者细胞等产生直接的特异性杀伤作用；而 MHC-II-多肽复合物诱导、活化的 CD4 阳性 T 淋巴细胞或称辅助性 T 淋巴细胞(T Helper; T_H)可通过分泌各种细胞因子强化或调节 CTL 的特异性杀伤作用和其他免疫细胞(如巨噬细胞活化)功能；同时可刺激 B 淋巴细胞增殖，分化成浆细胞分泌特异性抗体启动体液免疫应答。综上所述，可获得以下重要结论：1、T 细胞尤其是 CD4 阳性的 T 淋巴细胞在完整生物机体免疫系统中具有“轴心”作用；2、生物机体的特异性免疫识别是特异性免疫应答的基础和前提条件；3、“双信号”识别机制的完备与否决定着特异性免疫应答的性质(即特异性免疫“耐受”或“攻击”效应)。

人类对生物免疫系统理解、认识的深化，推动了实验免疫学分析技术的发展；而新的多样化免疫学技术的出现，又给免疫学基础理论研究带来了多角度分析观测工具，从而进一步促进了免疫学理论的完善和科学性，并作为临床免疫学的坚实基础。近年来，各国免疫学工作者建立了多种检测生物机体免疫学功能的方法和技术。其主要包括各种以测定特异性抗体产生为特征的体液免疫功能检测方法和测定各类免疫细胞数目活性、增殖等指标的细胞免疫功能检测方法。后者可分为以下几类：

1. 免疫细胞计数：通过细胞特异性染色和非特异性染色技术，在显微镜下对各类免疫细胞进行分类计数。
2. 免疫组化方法：通过抗体特异性染色(如免疫酶学或免疫荧光染色技术)观察各类免疫细胞的组织分布特征。
3. 流式细胞仪方法：是近年来迅速发展起来的一种高灵敏度、高效率的细胞分析仪器。其将免疫荧光技术与流式细胞技术、计算机技术相结合；可对免疫细胞进行多色荧光标记分类，高速计数；又可通过测定细胞膜表面标志的变化，细胞周期变化、细胞分裂增殖对免疫细胞的功能进行测定。
4. $^3\text{H-TdR}$ 掺入细胞增殖方法：为一种经典的同位素标记胸腺嘧啶核苷测定 DNA 含量的方法，作为测定淋巴细胞分化增殖的指标。
5. ^{51}Cr -释放试验：是另一种传统、经典的同位素测定免疫杀伤细胞活性的高灵敏度方法。
6. 混合淋巴细胞培养(MLC)：属于 $^3\text{H-TdR}$ 掺入细胞增殖方法的一种特殊类型。其特点是将一个生物个体(通常为器官移植供者)淋巴细胞灭活使其丧失繁殖能力后作为一种刺激物与另一生物个体(受者)的淋巴细胞共培养 3-7 天；以 $^3\text{H-TdR}$ 掺入技术测定受检样品中混合淋巴细胞的 DNA 合成情况；以此评估受者免疫细胞对供者淋巴细胞的反应性。该方法灵敏度高，但操作过程复杂，需要较长时间出结果和使用放射性同位素等缺点。
7. 延迟过敏反应皮肤试验(Delayed-Type Hypersensitivity; DTH)：
应用少量特异性抗原皮下注射，诱发机体 T 细胞依赖性巨噬细胞激活免疫反应和炎性反

应。在 24-28 小时后观察注射部位的红疹出现及大小；估测受检者对相对抗原的特异性细胞免疫功能。该方法具有一定特异性，但结果判定困难，没有严格的量化标准。

8. 细胞内 ATP 测定：淋巴细胞受抗原刺激活化后，细胞内 ATP 水平增加，在体外反应系统中，ATP 和虫荧光素酶在 Mg、O₂ 的共同作用下催化虫荧光素，生成氧化虫荧光素并释放波长为 562nm 的光能；通过对这种光能的测定判定免疫细胞的功能状态。该方法灵敏度高，但不稳定。受影响因素多，不易标准化。
9. 穿刺活检技术：属于一种侵入性检测方法，需经穿刺获得病人的生物组织标本。这种方法常用于判定器官移植后，器官移植受者对移植物的免疫排斥反应。是当前移植后免疫排斥监测的“金标准”。
10. CFSE 流式测定细胞分裂增殖：该技术需先将受检免疫细胞进 CFSE 荧光染色标记，然后在加入刺激物的条件下进行 4 天细胞培养，继以免疫荧光抗体标记待测细胞（双荧光标记）。然后对双荧光标记细胞进行流式测定分析，根据 CFSE 染色强度和荧光峰判定相应受检细胞的分裂增殖情况。
11. MHC 分子四联体特异性反应 T 细胞检测方法：是新近发展的一种检测生物体特异性免疫细胞群体的流式细胞分析技术。利用分子重组技术表达带生物素（Biotin）的 MHC 分子与抗生物素-PE（Avidin-PE）联接形成带有 4 个 MHC 分子的“四联体”，并利用特异性多肽加载在 MHC 分子上。通过特异性免疫识别机制，相应的 MHC-多肽特异性 TCR 可对 MHC 分子—多肽进行特异性识别和结合。结合免疫细胞的荧光抗体分类技术，在流式细胞仪上对各类 T 细胞上的 PE 荧光进行分析测定，实现对特异性反应 T 细胞的检测。该方法中的 MHC 分子四联体制备复杂、成本高，难以应用于常规检测。

上述方法在实际应用中具有各自优缺点，但存在的最大不足是在绝大多数情况下，以上方法只是对机体非特异性和特异性免疫的混合测量，不能有效的反映生物机体的特异性细胞免疫功能，特别是个体化特异性免疫活性。在器官移植免疫和抗肿瘤免疫中，受者对相应供者器官的特异性排斥免疫功能监测以及肿瘤患者对其肿瘤细胞的特异性抗肿瘤免疫功能监测具有十分重要的临床应用价值。

相关专利文献：

- 1、Walter, et al.
Mutant MHC Class I Molecules
US Patent: 6248, 564; 2001
- 2、Wier; Majorie L.

Methods for measurement of lymphocyte function US Patent: 5,773,232; 1998

三、发明内容

针对上述现有各种细胞免疫测定方法的主要问题，根据免疫学 T 细胞特异性识别机制的特点，本发明设计了一种新的个体化特异性的细胞免疫功能测定方法。在器官移植应用中，将器官移植供者的组织细胞成分作为个体特异性抗原或利用 MHC(HLA)分子抗原库，与供者免疫细胞共同温育以激活相应供者各类免疫细胞，然后对免疫细胞活化的各种标志进行测定。可反映器官移植受者对移植物的特异性细胞免疫反应功能，从而达到对移植物排斥反应的预测、动态监测，以及为临床免疫抑制治疗提供科学依据。

器官移植中的排斥反应可根据排斥反应出现的时间和免疫学特征分为超急性、急性、慢性排斥反应。超急性排斥反应主要由受者体内已存在的抗供者 HLA 分子抗体和补体引起的体液免疫反应和其他炎性反应性细胞及因子所共同参与导致的急性血管内皮细胞损伤、血管堵塞、凝血。

而急性、慢性排斥反应主要由受者针对供者移植物的细胞免疫所介导。通过供者特异性抗原直接或间接提呈机制，受者体内针对供者的 T 细胞(供者抗原特异性反应 T 细胞克隆)通过 T 淋巴细胞受体(T Cell Receptor; TCR)和其它细胞表面受体特异性地识别 MHC-供者抗原多肽复合物和结合协同刺激因子，继而活化增殖，诱发受者抗移植物的特异性排斥反应。由于这种排斥反应具有明显的个体特异性，且主要以供者细胞表面 MHC 分子作为识别对象和标志；因此，以供者细胞及其细胞提取物或包括供者 MHC 分子的抗原库作为体外细胞免疫测定的特异性刺激原具有理论上的合理性。这种供者特异性刺激原包含了供者抗原或移植物抗原的全部信息，尤其是供者细胞膜上的 MHC 分子是引起供者抗原特异性反应 T 细胞特异性识别机制中的关键抗原成分。本发明特别强调在检测受者特异性抗供者排斥免疫反应的检测方法中使用供者细胞或细胞提取物或 MHC 分子抗原库作为个体化特异性刺激原的重要性。实验表明：对于受者的免疫细胞，供者的亚细胞成分或 MHC 分子具有与全细胞类同的免疫原刺激特性，二者均可特异性地激活受者机体的供者抗原特异性反应 T 细胞发生分化增殖效应。在体外实验中，测定受者免疫细胞(经供者特异性抗原或 MHC 分子刺激后)的活化标志，可反映受者免疫细胞对供者移植物的特异性排斥功能，从而达到对排斥反应的预测和动态监测，并为临床免疫治疗用药提供参考指标。

在特异性细胞免疫功能检测方法学中，另一突出问题是由于多种因素可直接或间接影响受检样品中免疫细胞的反应活性，而导致免疫细胞的非特异性激活从而使结果分析判定困难。本发明特别强调在检测中设置空白对照和自身对照以排除非特异性活化信号的干扰。

空白对照设置：不加入任何刺激原，其反映受检免疫细胞在没有刺激原状态下的功能状况，用以排除上述非特异性、个体特异性抗原以外的未知刺激因素的影响。

自身抗原对照：使用受检生物个体的细胞或亚细胞成分作用自身对照抗原刺激物(通常使用外周有核细胞制成)，其制备方法和用量与供者特异性抗原完全相同。这种自身抗原对照可较好的反映非供者特异性抗原所导致的影响因素。

个体化特异性抗原管：以器官移植供者的细胞或亚细胞成分或包括供者 MHC 分子的 MHC 分子抗原库作为刺激原，可反映器官移植受者机体的供者移植物特异性反应细胞免疫功能。

综合分析上述三者检测结果及其相互差异、关系可对受检个体的特异性细胞免疫功能做出客观合理的评估。

器官移植受者的细胞免疫功能状态的免疫学分析：

一、器官移植前：器官移植受者在接受移植前，其体内的供者特异性反应 T 淋巴细胞处在“静息”状态或称非致敏状态；此时若以 MHC 型别不完全相符的供者特异性抗原在体外刺激受者免疫细胞可诱发缓慢而强度较弱(相对移植后)的免疫细胞活化，这种情况相当免疫系统与非己抗原的第一次接触。根据供者与受者的 MHC(HLA)相符合程度；受者的细胞免疫反应的强度也存在不同差异。即供者 MHC(HLA)与受者 MHC(HLA)的符合率越高则受者免疫细胞的活化程度越低，移植后发生排斥反应的发生几率也越低；反之，则排斥反应的发生几率将增加。因此在器官移植前，本发明所述及的方法可作为器官移植供者选择的科学依据。

二、器官移植后：理论上，当器官移植受者接受 MHC(HLA)不相符合或部分符合的器官移植后或当移植受者免疫细胞接触到供者细胞后，其通过特异性免疫识别机制接受非己抗原刺激并发生相应的活化反应，直致排斥反应发生并持续。因此，在器官移植后的任一时间，对受者免疫细胞功能的测定与移植前的非致敏状态存在实质性差异；即测定对象是已经被供者特异性抗原致敏的免疫细胞，测定结果反映了受者免疫细胞致敏后的细胞免疫功能状态。这种情况类似于非己抗原成分与免疫细胞第二次或多次接触时所产生的反应。其具有反应快速、强烈、持续性等特点。因此，在体外对受者特异性细胞免疫功能测定时可相应缩短温育刺激时间，快速获得结果。

三、免疫抑制治疗的影响：由于生物机体免疫反应性遗传学上的个体差异、供者与受者 MHC(HLA)型别符合程度的不同、以及免疫抑制治疗的药物不一样和用药剂量的差别等诸多因素影响，会导致对受者免疫细胞功能测定结果分析、评估的复杂性。因此，测定结果是上述各因素的综合表现形式。本发明强调对器官移植受者的特异性免疫功能进行动态跟踪测定；特别强调移植前后和免疫用药前后的动态监测。对受者特异性细

胞免疫功能状态做出具有科学依据的正确判断。为免疫抑制治疗的用药选择、剂量调整和个体化治疗方案设计提供客观的参考指标。

特异性抗肿瘤免疫功能测定：

根据上述相同原理和方法学基础，以肿瘤患者自身肿瘤细胞或亚细胞成分；或任何其它与患者肿瘤细胞具有共同抗原成分的其他肿瘤细胞(如同类肿瘤细胞等)；或同类肿瘤抗原库作为特异性肿瘤抗原刺激物，与肿瘤患者自身免疫细胞在体外进行温育刺激，然后对相应各类 T 淋巴细胞或其它免疫细胞的激活标志物或增殖功能进行测定，可反映肿瘤患者的抗肿瘤特异性细胞免疫功能状态，为抗肿瘤免疫治疗和病情预后及转归提供科学依据。

在免疫药物的筛选、评估和临床治疗效果的监测领域；利用本发明所述及的方法，在检测中增设药物加特异性刺激物加受检样品免疫细胞测定管；或/和直接以免疫药物为刺激物(或抑制物或调节物)与免疫细胞共同温育，可获得免疫药物对相应个体细胞免疫功能的效应程度等有关资料。

在免疫疫苗研究领域，直接将疫苗作为特异性刺激物，或/和其它特异性抗原刺激物共同作为刺激原，在疫苗接种前后对相应生物个体进行特异性细胞免疫功能进行动态监测，可用于对疫苗作用及效价的评估。

本发明所述及受检样品的免疫细胞定义为所有直接或间接参与生物机体免疫反应的任何细胞，尤其是指 T 淋巴细胞及其亚群、B 淋巴细胞、NK 细胞以及 APC 细胞等。根据实际需要，在检测前可采用适当方法(如免疫磁珠分选、免疫亲和技术分选、免疫共沉淀分选，梯度密度分离等)对上述各类免疫细胞及其亚群分离免疫，然后分别进行功能测定；或先以特异性抗原刺激混合免疫细胞群体，然后用上述方法分选细胞，对某一特定细胞群体进行功能测定，如 T 淋巴细胞(CD3⁺)；CTL(CD8⁺)，T_H(CD4⁺)，NK 细胞(CD16⁺，或/和 CD56⁺)，B 淋巴细胞(CD19⁺或 CD20⁺)等。

体外生物检测方法的金标准是采取最为接近生物体生理内环境的反应系统，其能最为客观地反映检测结果的真实性。这在体外测定生物体免疫功能状态的方法中尤其重要。生物机体的免疫功能状态是各种免疫细胞相互联系(Communication)、作用(Interaction)、接触(Contactation)、调节(Regulation)的综合体现。因此，在体外检测某细胞群体免疫功能时，应尽可能保证其它直接或间接影响该群体某种特定免疫功能的细胞共存于同一测定体系中，以避免检测结果的片面性和不客观性。例如，在检测某生物体 T 淋巴细胞功能时，应保留相应的抗原提呈细胞存在于同一检测系统之中，从而保证 T 淋巴特异性识别系统的完整性；另外，在测定 NK 细胞或 B 细胞免疫功能的反应体系中应包含 T 淋巴细胞。因此，本发明着重强调

使用原始样品作为测定对象。原始样品定义为直接来自生物体经最少处理或不经任何处理的含免疫细胞的体液样品，其主要包括全外周血、全骨髓、去除红细胞的有核细胞混合群体、腹腔液、胸腔液或经离心后获取的腹腔液、胸腔液、脑脊液所含的混合细胞组分。

四、发明小结

本发明提出了一种以特异性抗原作为刺激物测定生物机体细胞免疫功能的方法。这种新方法学设计具有显著的个体化特异性。其主要特征如下：

1、使用具有个体化特异性抗原作为诱导活化特定生物个体特异性免疫细胞的刺激物：

在器官移植受者细胞免疫功能测定中，以相应的器官供者细胞或亚细胞成分作为特异性刺激原，对受者体内供者移植物抗原特异反应性免疫细胞的功能进行测定。用于对移植前器官移植供者的选择，在移植后可对针对移植物排斥反应的预测；动态监测受者特异性细胞免疫功能，可为免疫抑制治疗提供用药参考。

将肿瘤患者自肿瘤细胞或其亚细胞成分作为特异性抗原刺激物，可对患者体内潜在的抗肿瘤特异性免疫功能进行测定，为肿瘤治疗提供客观的科学依据。

2、使用多价通用性、特异性抗原库作为诱导活化任一生物个体特异性免疫细胞的刺激物：

1) 利用混合 MHC 分子或 HLA 分子作为多价、通用性、特异性抗原：

器官移植供者、受者之间的 MHC 或 HLA 的符合程度是导致移植物排斥反应发生的决定性因素。在移植排斥免疫应答中，受者 T 淋巴细胞主要通过对自身或供者 MHC 分子和供者 MHC(HLA)多肽复合物的特异性识别机制活化产生抗移植物免疫应答(Indirect or Direct Recognition; 间接或直接识别)。因此，制备包括全部或部分 MHC 分子或 HLA 分子的混合体系作为多价、通用性、特异性抗原可对所有或部分生物群体进行特异性细胞免疫功能测定。

利用包含所有生物 MHC(HLA)I 类分子的 MHC-I 类分子库 (MHC-I Molecules Bank) 作为刺激原，可对任一生物个体 CTL(CD8⁺)的功能进行测定。

利用包含所有生物 MHC(HLA)II 类分子的 MHC-II 类分子库 (MHC-II molecules Bank)。可对任一生物个体 CD4⁺T 淋巴细胞的功能进行测定。

同理，利用上述 MHC(HLA)I 类和 II 类分子的混合体系 (MHC(HLA)I/II 类分子库)，可对生物体总 T 淋巴细胞功能进行测定。

上述三种 MHC 分子库在与某一特定生物个体免疫细胞群体进行温育或共培养

时, 存在于反应系统中的 APC 细胞可将 MHC 分子提呈给相应的特定 T 淋巴细胞群体(CTL, TH1, TH2 等), 诱导其活化。如果受检免疫细胞是第一次接触这些非己 MHC(HLA)分子; 在设定时间内它们的活化程度、反应强度则相对低而弱; 若检测系统中的受检免疫细胞曾经被 MHC(HLA)分子库中的部分 I 类或 II 类分子(器官移植植物具有的 MHC 分子)所致敏(第二次或多次接触), 则那些被致敏的免疫细胞会在短时间内迅速活化, 其活化的程度和反应较为强烈。这在器官移植排斥反应中尤其显著。在临床器官移植实践中, 移植手术完成后, 移植受者免疫细胞被相应的非己 MHC(HLA)分子所致敏而处在高敏感状态。在体外反应系统中, 免疫细胞再次遭遇 MHC(HLA)分子库中与移植供者相同的 MHC(HLA)分子而迅速发生活化反应并被测量。因此, 根据移植前后, 移植受者免疫细胞对包括在 MHC(HLA)分子库中与移植供者相同的 MHC(HLA)分子的反应性, 可判断受者免疫细胞的特异性抗移植植物排斥反应的有无和强度。

2) 多种同类肿瘤细胞或肿瘤共同抗原库作为多价、通用性抗原:

如前所述, 利用肿瘤患者自身的肿瘤细胞或亚细胞成分可制备个体化特异性刺激原, 可用于对相应个体的特异性抗肿瘤细胞免疫功能进行测定。但在临床实践中, 有许多肿瘤患者由于种种原因而不能获得其自身的肿瘤细胞而不能进行个体化特异性肿瘤抗原制备, 给测定带来一定困难。因此, 针对这种情况, 本发明强调使用多种同类肿瘤细胞制备多价肿瘤抗原(肿瘤抗原库); 或使用肿瘤共同抗原作为免疫细胞的刺激物对相应患者的抗肿瘤细胞免疫功能进行测定。

本发明首次在机体特异性细胞免疫功能测定方法学中引入 MHC(HLA)分子库和肿瘤抗原库作为免疫刺激原的概念。其主要意义在于制备多价广谱具有通用性的抗原刺激物, 用于任一特定生物个体的特异性细胞免疫功能测定。对于整个生物群体而言, 上述 MHC(HLA)分子库或肿瘤抗原库具有广谱通用性特点; 而对于某一特定生物个体又具有其特异性。这是因为, 在对某一特定生物个体的特异性细胞免疫功能测定中, 其已经处在致敏状态的免疫细胞(这些细胞曾接受相应移植植物或肿瘤抗原的刺激), 通过特异性识别机制对 MHC(HLA)分子库或肿瘤抗原库中的某些特异性抗原分子(器官移植供者 MHC 分子或肿瘤共同抗原成分)进行识别, 从而赋予这种检测方法以个体特异性。

3、分类测定各种免疫细胞群体的功能状态:

利用各种分离技术，如特异性抗体磁颗粒分离技术，双色或多色荧光标记流式细胞技术等。可在特异性抗原刺激前或刺激后对各类免疫细胞及其亚群进行纯化或分类测定。如总 T 淋巴细胞、CTL(CD8⁺)，T_H(CD4⁺)NK 细胞(CD16⁺，CD56⁺)、B 淋巴细胞(CD19⁺或 CD20⁺)、APC 细胞(CD80⁺/CD83⁺/CD86⁺/HLA-DR⁺)功能的选择性测定等。

4、免疫细胞活化信号测量的多样性：

各种免疫细胞接受上述特异性抗原刺激后，活化的免疫细胞可发生下列主要细胞生物学变化：酶学改变(如蛋白酪氨酸激酶；PTKs；Ras-MAP 激酶；ZAP-70 激酶等)，离子浓度改变(Ca⁺⁺浓度)、膜受体改变(IL-2 受体等)、特异性配体表达(CD40 配体；CD40L)，细胞内 ATP 浓度增加；NK-KB，NFAT，AP-1，Fas 激活表达、各种 CD 分子表达(CD69，CD25，CD71，CD95，CD40 等)，MHC 分子表达(MHC-I 类分子，MHC-II 类分子)，各种细胞因子表达(IL-2，IL-4，IL-12，INF γ 等)，DNA 合成增加(³H-TdR 掺入增加)、细胞增殖及数目增加 (CFSE 染色流式测定)，CTL 细胞毒性杀伤功能增强(⁵¹Cr-释放试验，MTT 试验等)。通过对上述任何一种细胞生物学变化的测量，可建立多种抗原特异性细胞免疫功能的测定方法。

5、合理的空白对照、自身抗原对照设置和动态监测方案：

在对样品免疫细胞功能进行检测时，本发明除提出设置不加任何刺激物的空白对照样品外，着重强调设置自身抗原对照样品。自身抗原对照主要是利用自身细胞或亚细胞成分(通常为外周血有核细胞或溶解物等)制备而成；但亦可采用无关细胞系(受检免疫细胞不对此发生活化反应或允许范围内的微弱反应)的细胞、亚细胞成分。这种自身抗原对照和空白对照可完好地反映非特异性抗原所产生背景信号(Background Signals)，另一方面也有助于对受检样品中免疫细胞的非特异性功能状态进行分析；而比较空白对照、自身抗原对照、特异性抗原刺激样品三者测量结果，分析三者结果之间的数量关系；对测量结果或受检生物个体的特异性细胞免疫功能状态可作出符合客观实际的解释和科学判断。

举例：

一、个体化特异性抗原制备：

(一) 全细胞抗原刺激物制备：

1. 抽取器官移植供者和受者外周静脉血各 5-10ml，分别置于两支抗凝管中；
2. 在上述管中加入适量 RBC 裂解液、裂解 RBC，离心去除 RBC 裂解碎片；
3. 收集有核细胞成分并进行细胞计数，使上述两管细胞具有相同的细胞浓度；
4. 使用放射性照射或裂霉素处理有核细胞，使其丧失分裂活性。制备成个体化特异

性全细胞抗原刺激物，用于受者免疫细胞功能测定；

5. 由相应器官移植受者制备的细胞抗原将作为检测方法中的自身抗原对照刺激物；由相应器官移植供者制备的细胞抗原将作为检测方法中的个体化特异性刺激物

(二) 亚细胞抗原刺激物制备：

1. 同方法（一）中步骤 1-3；
2. 使用反复冻融法裂解有核细胞成分；即在 0° C 以下冻结细胞，然后在常温或 37° C 融解，反复 1-5 次；或使用超声破碎法或匀浆方法，裂解上述细胞，制备亚细胞抗原；
3. 由上述制备获得的亚细胞抗原将分别作为自身对照和个体化特异性刺激物用于分析测定；
4. 上述亚细胞抗原成分可置低温(<20° C)保存，供动态监测分析多次使用。

(三) MHC(HLA)分子纯化制备：

1. 同方法（一）中步骤 1-3；
2. 用含有去垢剂的适当缓冲液溶解有核细胞，经离心等方法去除细胞核成分，保留含有 MHC(HLA)分子的细胞膜和细胞浆可溶性组份。
3. 使用抗 MHC(HLA)I 类或/和 II 类分子抗体的亲和层析柱，分离纯化相应的 MHC(HLA)I 类或/和 II 类分子组分。
4. 利用 SDS-PAGE 技术鉴定上述纯化成分的分子量；利用抗 MHC(HLA)分子抗体 Western Blot 技术(免疫印迹技术)对纯化物进行特异性纯度鉴定；
5. 测定上述纯化物的蛋白浓度，置低温保存备用或直接用于检测。

(四) 血小板 MHC(HLA)I 类分子制备：

1. 同方法（一）中步骤 1；
2. 常规离心分离获得相应的血浆组分。
3. 进一步制取血小板。血小板可作为 MHC(HLA)I 类分子抗原刺激物直接用于检测免疫细胞功能或进一步纯化获得血小板提取物或 MHC(HLA)I 类分子。
4. 利用匀浆或超声破碎技术或血小板溶解液裂解血小板，去除不含 MHC(HLA)分子的有形成分。保留含 MHC(HLA)I 类分子组分直接用于检测。
5. 利用 MHC(HLA)I 类分子抗体的亲和层析柱，对步骤 4 获得的血小板溶解物进行 MHC(HLA)I 类分子纯化；

6. 同方法（三）中的步骤 4-5。

（五）MHC 分子库制备：

1. 利用多个(100±个体)已知 MHC(HLA)型别生物体的外周血有核细胞、或/和血小板，或表达 MHC 分子的细胞系、或转基因细胞系(表达特定已知的 MHC(HLA)分子型别)作为 MHC(HLA)分子库制备来源，以满足统计学上对各类 MHC(HLA)型别的要求(理论上覆盖 100%的生物群体)。
2. 根据方法 3、方法 4 所提供的方法对 MHC(HLA)I 类、II 类分子进行纯化、鉴定；可分别获得 MHC(HLA)I 类分子库(覆盖目前已知的全部 I 类分子型别)；MHC(HLA)II 类分子库(覆盖目前已知的全部 MHC(HLA)II 类分子型别)；全 MHC(HLA)分子库(包括全部 MHC(HLA)I 类 II 类分子型别)。
3. 上述三种 MHC(HLA)分子库可根据测定需要分别加以选用。如利用 MHC(HLA)I 类分子库检测 CD8⁺的 CTL 细胞功能；利用 MHC(HLA)II 类分子检测 CD4 的 T_H 的细胞功能等。
4. 除上述 MHC(HLA)分子库外，对于其它 MHC 型别；如少数 MHC(Minor MHC)分子库也可利用上述提供的原理、方法进行制备，用于测定生物体的某些其它免疫功能。

二、 肿瘤特异性抗原制备：

（一） 自身肿瘤特异性抗原制备：

1. 由外科手术中切除的患者自身肿瘤组织剪成碎块或活检肿瘤组织，用酶学消化，梯度密度离心等技术制成单个肿瘤细胞悬液；
2. 经灭活处理的血液肿瘤细胞可直接用作特异性抗原刺激物；
3. 同时制备肿瘤患者外周血灭活的有核细胞作为自身抗原对照；
4. 上述细胞可使用前述的冻融法，去垢剂裂解法、匀浆、超声裂解法将肿瘤细胞制成亚细胞成分作为检测方法中的特异性刺激物；

（二） 多价肿瘤抗原库制备：

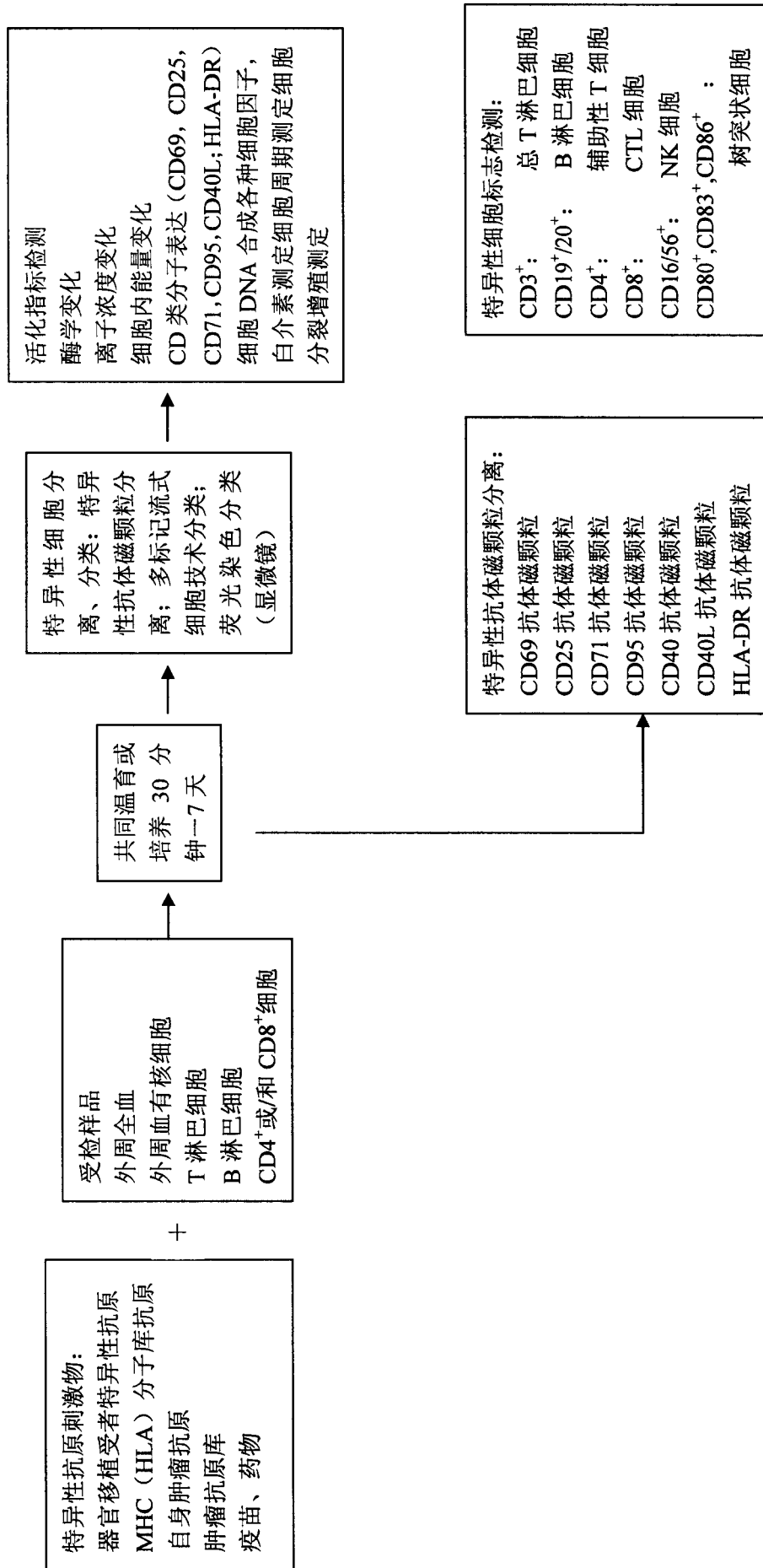
1. 根据现有各种肿瘤组织学来源、分类方法；可利用来自多个个体的同类肿瘤或多个同类肿瘤细胞系作为多价肿瘤抗原制备的来源。如腺癌类、鳞癌类、各类白血病细胞、黑色素细胞瘤细胞等；
2. 利用上述方法（一）中所提供的方法，可制备成不同种类肿瘤的抗原库，通过肿瘤共同抗原识别机制，利用相应各类肿瘤抗原库对某一特定肿瘤患者的特异

性抗肿瘤免疫功能进行测定。

三、 个体化特异性细胞免疫功能检测方法学：

由于本发明属于一种个体化特异性细胞免疫功能检测的方法学技术平台；根据发明中提出的方法学原理、技术路线可衍生出多种相应的检测方法，所必需强调的是这些方法不可能在本发明中一一列举。因此，仅列一种方法学技术平台描述“个体化特异性细胞免疫学功能检测方法学”，详见附件一。

个体化特异性细胞免疫学功能检测方法学技术平台



附图一

专利名称(译)	一种个体化特异性免疫细胞功能测定方法		
公开(公告)号	CN1444043A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	CN02158541.5	申请日	2002-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	帕弗瑞生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	帕弗瑞生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	帕弗瑞生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	陈格 刘向军		
发明人	陈格 刘向军		
IPC分类号	C12Q1/04 C12Q1/24 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56977		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

根据细胞免疫学中T淋巴细特异性识别、激活、效应机制原理，结合器官移植免疫学、肿瘤免疫学的特点，本发明建立了一种具有个体化特异性免疫细胞功能检测方法。该方法以器官移植供者的特异性抗原成分(全细胞Ag，细胞提取物Ag，纯化的细胞Ag，HLA分子)；或MHC(HLA)分子库；或肿瘤患者自身的肿瘤细胞Ag成分或含自身肿瘤抗原的肿瘤抗原库作为个体化特异性刺激物与相应的器官受者或肿瘤患者的免疫细胞温育培养；继而通过对器官受者或肿瘤患者免疫细胞及其亚群进行分离或分类并同时相应免疫细胞的活化指标进行测量，借以评估器官移植供者特异性抗原反应性免疫细胞、肿瘤患者特异性抗原反应性免疫细胞的功能状态。上述测定方法学具有显著的个体化、特异性特征；并同时具有广谱通用性；可广泛应用于器官移植中特异性免疫排斥反应的预测、动态监测以及肿瘤患者特异性抗肿瘤免疫功能的评价；作为免疫治疗性用药方案的重要参考指标。

