

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025001.0

[51] Int. Cl.

*G01N 33/53 (2006.01)*  
*G01N 33/566 (2006.01)*  
*G01N 33/564 (2006.01)*  
*G01N 33/531 (2006.01)*  
*G01N 33/00 (2006.01)*  
*A61K 39/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1989410A

[51] Int. Cl. (续)

*A61K 38/00 (2006.01)*

[22] 申请日 2005.5.24

[21] 申请号 200580025001.0

[30] 优先权

[32] 2004.5.24 [33] US [31] 60/573,912

[86] 国际申请 PCT/US2005/018418 2005.5.24

[87] 国际公布 WO2005/117996 英 2005.12.15

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.24

[71] 申请人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 J·邦舍罗 J·E·康诺利

A·K·帕卢卡 H·厄诺

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健 刘玥

权利要求书5页 说明书46页 附图59页

[54] 发明名称

免疫应答评价方法

[57] 摘要

本发明包括用于鉴定与个体 HLS 类型无关的 T 细胞抗原决定部位的组合物和方法, 通过同时分析培养物的多个免疫反应性参数来鉴定至少一种抗原决定部位, 其中在子集中引发目标免疫反应性的抗原决定部位被鉴定为关于该子集的靶向剂。

1. 鉴定个体的一种或多种免疫调节肽的方法，所述方法包括下列步骤：

在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的一种或多种肽的存在下培养个体的免疫细胞；和

同时分析培养物的多个免疫反应性参数，如特异性和对肽上抗原决定部位的细胞因子应答，其中通过与个体 HLA 类型无关的肽的免疫反应性的存在来鉴定免疫调节肽。

2. 权利要求 1 的方法，进一步包括鉴定免疫调节肽的反应性抗原决定部位。

3. 权利要求 1 的方法，进一步包括鉴定肽特异性效应细胞。

4. 鉴定一种或多种免疫调节片段的方法，所述方法包括下列步骤：

从个体分离免疫细胞；

在处理过的肽文库的一个或多个片段存在下培养免疫细胞；和

同时分析培养物的多个免疫特异性参数和对片段的细胞因子应答，其中通过片段的免疫反应性的存在来鉴定免疫调节片段。

5. 权利要求 4 的方法，进一步包括鉴定多个肽片段特异性的效应细胞。

6. 鉴定个体对抗原物质表达的免疫反应性类型的方法，包括步骤：

在一个或多个抗原片段的存在下分离并培养一种或多种个体的免疫细胞；

鉴定免疫细胞产生的细胞因子；和

基于响应抗原物质的协同细胞因子表达来测定免疫反应性的类型。

7. 权利要求 6 的方法，其中抗原物质包括抗原、肽、微生物、细胞及其组合的混合物。

8. 权利要求 6 的方法，其中抗原物质包括抗原蛋白，为此蛋白质的氨基酸序列可以是已知或未知的，以及片段取自蛋白重叠肽文库。

9. 权利要求 6 的方法，其中抗原物质包括多种抗原物质。

10. 测定个体免疫状态的诊断方法，所述方法包括下列步骤：

从个体中分离免疫细胞，

在取自目标抗原蛋白重叠肽文库的系列肽存在下培养免疫细胞，

同时分析培养物的多个免疫反应性参数来鉴定至少一种个体的免疫调节分子以基于所产生细胞因子的鉴定来测定免疫调节分子的免疫反应性类型，其中免疫反应性类型显示出个体的免疫状态。

11. 权利要求 10 的方法，其中该方法测定个体免疫抑制的程度。

12. 权利要求 10 的方法，其中该方法测定个体免疫系统超反应的程度。

13. 权利要求 10 的方法，其中对于多种免疫调节分子测定个体的免疫状态来提供个体完整的 T 细胞所有组成部分。

14. 权利要求 10 的方法，其中免疫调节分子和免疫反应性类型表现出个体免疫相关疾病的风险。

15. 权利要求 14 的方法，其中免疫相关疾病选自传染病、自身免疫性疾病、自体炎症疾病、癌症、慢性炎症和过敏症。

16. 预测个体治疗应答的方法，所述方法包括下列步骤：

在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的存在下培养个体的免疫细胞；

分析培养物的多个免疫反应性参数来鉴定至少一种个体的免疫调节分子；和

分析培养物的细胞因子产生以基于所产生细胞因子的鉴定来测定免疫调节分子的免疫反应性类型以测定个体在治疗之前的抗原决定部位特异性的免疫状态，作为治疗结果的指示。

17. 权利要求 16 的方法，其中治疗是免疫治疗如接种疫苗、被动免疫治疗和过继细胞转移。

18. 预测个体疾病过程和临床结果的方法，所述方法包括下列步骤：

在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的一系列肽存在下培养一种或多种个体的免疫细胞；

同时分析培养物的细胞增殖和细胞因子产生特征来测定免疫调节分子的免疫反应性类型；

其中细胞因子产生特征是疾病严重程度和疾病进展或退化状态的

标记。

19. 权利要求 18 的方法，其中疾病选自癌症、肿瘤、自身免疫性疾病、自体炎症疾病、关节炎、糖尿病、过敏症、器官移植和骨髓移植。

20. 制定个体治疗干预的方法，所述方法包括下列步骤：

基于免疫反应多个参数的分析来鉴定一种或多种个体的免疫调节分子，包括鉴定所产生的细胞因子；和

制备含有一种或多种免疫调节分子的抗原决定部位特异性免疫疫苗。

21. 权利要求 20 的方法，其中疫苗包括一种或多种提高个体特定类型免疫应答的抗原。

22. 权利要求 20 的方法，其中疫苗包括给药一种或多种降低个体抗原决定部位特异性细胞因子产生的抗原。

23. 权利要求 20 的方法，其中疫苗包括给药一种或多种提高个体抗原决定部位特异性细胞因子产生的抗原。

24. 权利要求 20 的方法，其中疫苗包括给药一种或多种提高个体抗体产生的抗原。

25. 权利要求 20 的方法，其中疫苗包括给药一种或多种提高个体中细胞介导的免疫性的抗原。

26. 免疫调节个体的方法，所述方法包括下列步骤：

通过从个体分离免疫细胞并将它们暴露于一种或多种从肽文库鉴定的免疫调节肽来测定个体的抗原决定部位特异性免疫状态；

用一种或多种从文库鉴定的免疫调节肽使个体免疫；

通过在暴露于一种或多种免疫调节肽后从个体分离免疫细胞来测定个体的抗原决定部位特异性免疫状态；和

比较免疫之前和之后的免疫应答类型来测定个体抗原决定部位特异性免疫状态的改变。

27. 治疗需要免疫治疗的个体的方法，所述方法包括下列步骤：

将个体的免疫细胞暴露于一种或多种免疫调节肽来测定由这一种或多种免疫调节肽引发的免疫应答类型；

用影响免疫应答类型的免疫调节肽来治疗个体；和

评价用一种或多种免疫调节肽治疗个体后的免疫应答类型，如果

需要，改变一种或多种免疫调节肽来改变免疫应答的类型。

28. 权利要求 27 的方法，其中治疗效力的测定用于监控疫苗治疗、抗癌治疗、抗肿瘤治疗、器官移植、过敏症、自身免疫性疾病的治疗和传染病的治疗。

29. 鉴定和表征用于免疫治疗的新治疗剂的方法，所述方法包括下列步骤：

在免疫调节剂和一种或多种取自目标抗原蛋白重叠肽文库的肽的存在和不存在下培养分离的免疫细胞；

同时分析培养物的多个免疫反应性参数，如特异性和对肽上抗原决定部位的细胞因子应答；和

将免疫调节剂存在时的免疫反应性和免疫调节剂不存在时的免疫反应性进行比较，其中免疫反应性的抑制表示是免疫抑制治疗剂和其中免疫反应性的提高表示是佐剂。

30. 权利要求 29 的方法，其中治疗剂是驱动对 Th1、Th2、Tc1、Tc2 及其组合的免疫应答类型的免疫调节肽的组合。

31. 通过以下方法鉴定的治疗剂，该方法包括下列步骤：

在免疫调节剂和一个或多个目标抗原剂的片段的存在和不存在下培养分离的免疫细胞；

同时分析培养物的多个免疫反应性参数如特异性和对片段的细胞因子应答；和

分离免疫反应性细胞。

32. 权利要求 31 的方法，其中抗原剂选自传染病、癌症、肿瘤、自身免疫性疾病、自体炎症疾病、关节炎、糖尿病、过敏症、器官移植和骨髓移植。

33. 鉴定疫苗抗原决定部位的方法，所述方法包括下列步骤：

在一种或多种取自目标抗原蛋白重叠肽文库的肽存在下培养分离的免疫细胞；

分析培养物的多个免疫反应性参数和细胞因子产生以基于所产生细胞因子的鉴定来测定对肽的免疫反应性类型；和

用一种或多种具有相同识别序列的肽来制备疫苗。

34. 权利要求 33 的方法，其中在分离后测定一种或多种肽的序列。

35. 表征疫苗抗原决定部位的方法，所述方法包括下列步骤：

在一系列取自抗原剂的重叠肽文库的肽存在下培养分离的免疫细胞；

分析培养物的多个免疫反应性参数和培养物中的细胞因子产生来测定对一种或多种肽的免疫反应性类型，

其中通过对抗原剂引发的免疫反应来表征疫苗抗原决定部位。

36. 权利要求 35 的方法，其中抗原剂包括病毒、细菌、真菌、原生动物或蠕虫。

37. 权利要求 35 的方法，其中抗原剂是自体抗原。

38. 权利要求 35 的方法，其中分析细胞培养物并测定一种或多种 T 细胞、B 细胞、树突细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞和红血球的特征。

39. 组合物，其中含有一种或多种从对于特定个体鉴定为免疫反应性的肽文库分离的选择来改变免疫应答类型的肽，在该特定个体中已经鉴定了对于 Th1 和 Th2 T 细胞都是反应性的肽。

40. 组合物，其中含有一种或多种从对于特定个体鉴定为免疫反应性的肽文库分离的选择来改变免疫应答类型的肽，在该特定个体中已经鉴定了对于 Tc1 和 Tc2 T 细胞都是反应性的肽。

## 免疫应答评价方法

### 技术领域

本申请涉及鉴定免疫调节肽的方法，更具体地，涉及通过免疫应答的多重分析来鉴定抗原肽的新方法和系统。

### 发明背景

免疫系统提供了对抗微生物攻击的保护。其真实的本质是一个复杂的系统，因为它必须能够识别并适应不断变化的威胁，同时限制对自我组织的附带损害。这种复杂性的结果是免疫机能障碍，活性过度或不足，是许多人类疾病的根源。获得性免疫系统（包括 B 细胞和 T 细胞）识别分子模型形式的抗原，如肽，糖肽，磷肽和脂质，结合并在分化类别的抗原递呈分子的范围内递呈。由 T 细胞识别的抗原衍生的片段，例如肽，称为抗原决定部位。广泛认可的是通过 T-细胞识别其特异性抗原决定部分是获得性免疫功能中的关键事件。

这些分化的抗原递呈分子包括：i) 典型的人白细胞抗原 (HLA) 蛋白，其是高度多形性的并可以分成两个主要的类别，I 类和 II 类；ii) 由 HLA E, F 和 G 亚基因座编码的非典型群 (Braud VM, *Curr Opin Immunol*. 1999 年 2 月; 11 (1): 100-8), 和 iii) 抗原递呈分子的 CD1 家族 (Bendelac A, *Science* 1995 年 7 月 14 日; 269 (5221): 185-6)。HLA I 类分子由 HLA A, B 和 C 基因座编码并对 CD8+ 细胞毒性 T 细胞递呈 8-10 个氨基酸 (AA) 肽 (Adama EJ, *Immunol Rev*. 2001 年 10 月; 183: 41-64)。HLA II 类分子对 CD4+ 辅助 T 细胞递呈 12-16 个 AA 肽并由 HLA DR, DP 和 DQ 基因座编码 (Korman AJ, *Immunol Rev*. 1985 年 7 月; 85: 45-86)。T 细胞只在抗原递呈分子范围内且仅在合适的抗原加工和递呈后识别抗原。对于 HLA 依赖性抗原递呈，抗原加工通常包括蛋白质的蛋白水解破裂作用，形成适合 HLA 分子凹槽的多肽，这种肽/HLA 复合物随后对 T 细胞在抗原递呈细胞的细胞表面上递呈 (Rock, K, *Adv Immunol*, 2002; 80: 1-70, Cresswell P, *Curr Biol*. 1994 年 6 月 1 日; 4 (6): 541-3)。非典型群由 HLA E, F 和 G 亚基因座编码且特征在于低程度的多形性以及结合免疫效应细

胞并对免疫效应细胞递呈有限系列肽的能力。已经证明通过非典型 HLA 分子递呈的肽的识别在如母体胎儿接触和/或肿瘤免疫性方面的诱导免疫耐受性是重要的。这些分化分子中的其他重要群是 CD1 家族，其涉及脂质如细菌糖脂对免疫系统中的分化效应细胞的递呈。

T 细胞免疫性的三个主要类型可以遵循抗原识别：1 型 (Th-1)，2 型 (Th-2) 和调节 (T-调节)。1 型免疫性对于胞内病原体的清除和抗肿瘤免疫性是重要的，其主要特征在于 IFN $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的表达。2 型免疫性对于胞外病原体的清除是关键性的，其主要特征在于细胞因子如 IL-4, IL-5, IL-9 和 IL-13 的表达。通过细胞因子如 IL-10 或 TGF- $\beta$  介导的 T-调节类型的免疫性，对于自我耐受性的产生和维持是必要的。这三种类型的应答不限于典型的 TCR+CD8+T 细胞，还可以通过  $\gamma/\delta$ TCR+CD8+T 细胞以及天然杀伤 (NK) 细胞和 NK T 细胞来介导。因此，特定抗原决定部位通过这些细拔类型任一种识别导致它们的激活和与众不同的专门化应答。因此可以通过观察细胞因子模式 (1 型，2 型和 T-调节) 的协调表达来描述免疫应答的特性。

免疫反应过程中合适 T-细胞应答的激活通常涉及一个分化应答优于其他的优势。这种合适的专门化 T-细胞应答的选择性激活是疾病结果的关键决定因素。这是在麻风个体应答中证明的惊人实例，其中对感染的 1 型-应答的特征在于保护性的免疫性而 2 型应答通常导致致命的疾病。另一个关于肿瘤免疫性的惊人实例中，已经表明导致朝向 T-调节应答的不合适转变的 tolerogenic 抗原决定部分导致随后人体中的肿瘤进展，而通过肿瘤抗原决定部位激活 1 型应答与肿瘤生长的抑制相关。此外，如果自我抗原得到递呈，远离 T-调节应答的不合适转变可以导致自身免疫性疾病的产生。自身免疫性疾病特异性的临床实况将取决于显性应答：1 型，如在 1 型糖尿病情况中，或 2 型，如在过敏的情况中。

因为这些专门化 T-细胞应答的激活取决于特异性抗原决定部位对它们的递呈，因此鉴定这些肽抗原决定部位是有利的。通过在疾病状态早期鉴定这些专门化的 T-细胞抗原决定部位，提高合适的 T-细胞应答或消除不合适的 T-细胞应答的机会增加，并因此转变免疫应答的平衡来改善疾病结果。这些抗原 T-细胞抗原决定部位的定量鉴定和定性表征方法对于疫苗设计以及感染、自体免疫和肿瘤疾病的诊断和治

疗方法是重要的基础。

### 发明概述

本发明包括鉴定一种或多种来自个体的免疫调节肽的组合物和方法，通过在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的一种或多种肽的存在下培养个体的免疫细胞并同时分析培养物的多个免疫反应性参数如特异性和对肽上抗原决定部位的细胞因子应答，其中通过对个体 HLA 类型无关的肽的免疫反应性的存在来鉴定免疫调节肽。例如，反应性抗原决定部位可以选自肽集合中的免疫调节肽。该方法还包括从特定的个体分离肽特异性的效应细胞。

另一个实例是鉴定一个或多个免疫调节片段的方法，通过：从个体分离免疫细胞；在一个或多个来自处理过肽文库的片段存在下培养免疫细胞；并同时分析培养物的多个免疫特异性参数和细胞因子对片段的应答，其中通过对片段的免疫反应性的存在来鉴定免疫调节片段。使用该方法，可以分离多种肽片段特异性的效应细胞，甚至纯化成例如混合物或无性繁殖群。另一个实例中，本发明包括鉴定个体对抗原物质表达的免疫反应性类型的方法，通过分离并在一个或多个抗原片段存在下培养一种或多种个体的免疫细胞；鉴定免疫细胞产生的细胞因子；并基于应答抗原物质的协调细胞因子表达来测定免疫反应性类型。抗原物质可以包括抗原，肽，微生物，细胞及其组合的混合物。抗原蛋白包括具有已知或未知氨基酸序列的肽，来自已知或未知蛋白和/或肽片段，乃至在用于方法和随后的表征之前通过大小分级取自己知蛋白质或肽的重叠肽文库。一些实施方案中，抗原材料包括以不同比例提供的多种抗原物质和/或肽来驱动免疫应答的类型，例如，Th1v.Th2 或 Tc1v.Tc2 或其混合和组合。

本发明还包括用于测定个体免疫状态的诊断方法，通过从个体分离免疫细胞，在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的系列肽的存在下培养免疫细胞并同时分析培养物的多个免疫反应性参数来鉴定至少一种用于个体的免疫调节分子以基于鉴定所产生的细胞因子来测定对免疫调节分子的免疫反应性类型，其中免疫反应性类型表现出个体的免疫状态。例如，该方法可以测定个体免疫抑制的程度，个体免疫系统超活化的程度，个体的 T-细胞所有组成成分，甚至免疫反应性类型，其

可以表现出个体免疫相关疾病的风险。使用本发明可以监控的免疫相关疾病的非限制性实例包括：传染病，自身免疫性疾病，自体炎症疾病，癌症，慢性炎症和过敏。

本发明的另一用途是在预测个体对治疗应答的方法中，其中在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的存在下培养个体的免疫细胞，分析培养物的多个免疫反应性参数来鉴定对于个体 T 细胞和 HLA 清单的至少一种免疫调节分子并分析培养物的细胞因子产生来测定对免疫调节分子的免疫反应性类型，在治疗之前基于所产生的细胞因子的鉴定来测定个体抗原决定部位特异性免疫状态，作为治疗结果的指示剂。治疗可以是免疫治疗，如接种疫苗，被动免疫治疗和过继细胞转移。另一个实例是预测个体疾病进程和临床结果的方法，通过在取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的系列肽存在下培养一种或多种个体的免疫细胞，并分析培养物的细胞增殖和细胞因子产生特征来测定对免疫调节分子的免疫反应性类型，其中细胞因子产生特征是疾病严重程度和疾病进展或退化状态的标志。

另一个实例是定制用于个体的治疗干预的方法，通过基于多个免疫反应性参数的分析包括所产生的细胞因子的分析来鉴定一种或多种个体的免疫调节分子；并制备含有一种或多种免疫调节分子的抗原决定部位特异性免疫疫苗。疫苗包括，例如，一种或多种提高或降低个体特定类型的免疫应答的抗原；一种或多种提高或降低个体抗原决定部位特异性细胞因子产生的抗原；一种或多种提高或降低个体抗原产生或提高细胞介导的免疫性的抗原。

再一个免疫调节个体的方法包括用一种或多种从文库鉴定的免疫调节肽使个体免疫；测定个体的抗原决定部位特异性免疫状态，通过在暴露于一种或多种免疫调节肽后分离个体的免疫细胞；并比较免疫之前和之后的免疫应答类型来测定个体抗原决定部位特异性免疫状态的改变。

实施中，治疗需要免疫治疗的个体的方法包括：将个体的免疫细胞暴露于一种或多种免疫调节肽来测定由一种或多种免疫调节肽引发的免疫应答类型；用影响免疫应答类型的免疫调节肽来治疗个体；在用一种或多种免疫调节肽治疗个体后评价免疫应答的类型，且如果需要，改变一种或多种免疫调节肽来改变免疫应答类型。治疗效力的测

定可以用来监控疫苗治疗，抗癌治疗，抗肿瘤治疗，器官移植，过敏，自身免疫性疾病的治疗和传染病的治疗。本发明的另一种方法包括鉴定和表征用于免疫治疗的新治疗剂，通过在免疫调节剂和一种或多种取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的肽的存在或不存在下培养分离的免疫细胞；同时分析培养物的多个免疫反应性参数如特异性和对肽上的抗原决定部位的细胞因子应答；并将免疫调节剂存在时的免疫反应性和免疫调节剂不存在时的免疫反应性相比较，其中免疫反应性的抑制表示为免疫抑制治疗剂，其中免疫反应性的提高表示为佐剂，甚至可以驱动对 Th1, Th2, Tc1, Tc2 或其组合的免疫应答类型。

通过以下方法来鉴定一种或多种治疗剂：在免疫调节剂和一个或多个来自目标抗原剂的片段存在和不存在下培养分离的免疫细胞；同时分析培养物的多个免疫反应性参数如特异性和对片段的细胞因子应答；并分离免疫反应性细胞。抗原剂可以是传染病，癌症，肿瘤，自身免疫性疾病，自体炎症疾病，关节炎，糖尿病，过敏，器官移植和骨髓移植。还可以通过以下方法来鉴定疫苗抗原决定部位：在一种或多种取自目标抗原蛋白的重叠肽文库的肽的存在下培养分离的免疫细胞；分析培养物的多个免疫反应性参数和细胞因子产生以基于所产生的细胞因子的鉴定来测定对肽的免疫反应性类型；并使用一个或多个具有相同鉴定序列的肽来制备疫苗。该方法足够灵活使得甚至可以在分离后测定一种或多种肽。还可以通过以下方法来鉴定疫苗抗原决定部位：在取自抗原剂的重叠肽文库的系列肽的存在下培养分离的免疫细胞并分析培养物的多个免疫反应性参数和培养物中的细胞因子产生来测定对一种或多种肽的免疫反应性类型，其中疫苗抗原决定部分的特征在于它们引发了对抗原剂的免疫反应性。抗原剂的实例包括病毒，细菌，真菌，原生生物，寄生物或蠕虫。抗原剂可以是自我抗原。还可以分析细胞培养物并测定一种或多种 T 细胞，B 细胞，树突细胞，单核细胞，嗜中性粒细胞，肥大细胞和红血球的特征。

本发明的组合物包括一种或多种从对于特定个体鉴定为免疫反应性的肽文库分离的选择来改变免疫应答类型的肽，已经在该个体中鉴定了对于 Th1 和 Th2 T 细胞的反应性肽。再一个实例组合物包括一种或多种从对于特定个体鉴定为免疫反应性的肽文库分离的选择来改变免疫应答类型的肽，已经在该个体中鉴定了对于 Tc1 和 Tc2 T 细胞的

反应性肽。可以将这些组合物配制成疫苗，以干的或液体形式等。

### 附图简述

为了更完整地理解本发明的特征和优势，现在参照本发明的详述和附图，其中：

图 1 是描绘了根据本发明评价的正常捐献者的免疫应答的图，其中从 HLA-A0201<sup>+</sup>健康志愿者新鲜吸出的血液中分离外周血单核细胞 (PBMC)，以  $2 \times 10^5$  细胞/孔重复三份接种于圆底 96-孔平板中，并用 1 $\mu$ l 的 HLA-A0201 限制性肽 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) 或 MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV) 或肽稀释剂 (H<sub>2</sub>O 中的 5% DMSO) 孵育；48h 后收集培养物上清液并使用 Luminex 技术来定量评价细胞因子和趋化因子的存在；

图 2 是描绘了根据本发明的正常捐献者对 HLA-A0201 限制肽 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) 的免疫应答的另一个实例的图。从另一个 HLA-A0201<sup>+</sup>健康志愿者新鲜吸出的血液中分离 PBMC，以  $5 \times 10^5$  细胞/孔重复三份接种于圆底 96 孔平板中，并用 10 $\mu$ l/ml 的 HLA-A0201 限制肽 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) 或 MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV) 或肽稀释剂 (H<sub>2</sub>O 中的 5% DMSO) 孵育；48h 后收集培养物上清液并使用 Luminex 技术来定量评价细胞因子和趋化因子的存在；

图 3A-3D 是描绘了根据本发明评价的 2 名黑素瘤患者免疫应答的图；

图 4A-4C 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 5 是描绘了根据本发明评价的正常捐献者免疫应答动力学的图；

图 6 描绘了根据本发明的抗原决定部位聚焦的略图，其中将重叠肽文库分成肽簇 (5-10 个肽/簇)，进行簇的分析，接着抗原决定部位聚焦；

图 7 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 8 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 9 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 10 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 11 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 12A 和 12B 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其中用 15-mer MART-1 肽或稀释剂刺激 DC 接种前和 8 次 DC 接种疫苗后从黑素瘤患者（与图 10 的相同）获得的 PBMC；

图 13 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 14 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 15 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 16A-D 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 17 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 18 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 19 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 20 是描绘了用图 19 中所示的鉴定 15-mer 肽刺激时 CD4+ T 细胞的 IL-2 产生的图；

图 21A-B 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，使用从图 19 所示的相同黑素瘤患者获得的 PBMC。

图 22A-C 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 23 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 24 是描绘了用图 23 中所示的鉴定 15-mer 肽刺激时 CD4+ T 细胞的 IL-5 产生的图。

图 25 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 26 是描绘了根据本发明评价的三名黑素瘤患者免疫应答的图；

图 27 描绘了用 EPIMAX 方法鉴定的 4 种黑素瘤抗原，即 gp100, MART-1, NY-ESO1 和 TRP-1 内的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞的新抗原决定部位的概述；

图 28 描绘了根据本发明评价的三名黑素瘤患者免疫应答的图；

图 29A-D 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 30 包括描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 31 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 32 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图；

图 33 包括描绘了根据本发明评价的三名正常健康志愿者的免疫应答的图；

图 34 包括描绘了根据本发明评价的三名正常健康志愿者的免疫应答的图；

图 35 包括描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者的免疫应答的图；

图 36 是描绘了根据本发明从冻融的 PBMC 评价三名正常健康志愿者的免疫应答的图；

图 37 是描绘了根据本发明从冻融的 PBMC 评价三名正常的健康志愿者的免疫应答的图；

图 38A 和 38B 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图；

图 39A 和 39B 是描绘了正常健康志愿者对抗 EPIMAX 测试中鉴定的肽的免疫应答的图，并证明了 EPIMAX 可以鉴定功能 Flu-MP 特异性 CD4+T 细胞的抗原决定部位；

图 40 是描绘根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图，并显示了特异性 CD4+T 细胞的新抗原决定部位的鉴定；

图 41A 和 B 是描绘了正常健康志愿者对抗 EPIMAX 测试中鉴定的肽的免疫应答的图；

图 42 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答和个体的抗原决定部位的图，两个肽都含有氨基酸错配并显示出在器官移植的环境中鉴定异源抗原特异性 T 细胞的能力；

图 43 是描绘了根据本发明评价的 1 型糖尿病个体免疫应答的图；

图 44A-44B 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答；

图 45 是描绘了根据本发明评价的五名正常健康志愿者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答；

图 46 包括两张描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T-细胞引起的各种类型的免疫应答；

图 47 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T-细胞引起的各种类型的免疫应答；

图 48 包括四张描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T-细胞引起的各种类型的免疫应答；和

图 49 包括两张描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，并证明了由非 T-细胞引起的各种类型的免疫应答的鉴定。

## 发明详述

尽管以下详细讨论了本发明各种实施方案的形成和使用，应当认识到本发明提供了许多在各种特定内容中具体化的可应用创造性概念。在此讨论的特定实施方案只是以特定方式来说明形成和使用本发明并不是限制本发明的范围。

为了帮助理解本发明，以下定义了多个术语。在此定义的术语具有本发明相关领域的技术人员通常理解的意思。如术语“a”，“an”和“the”不仅仅用来指单数实体，而是包括总的分类，其中的一个特定实例可用于说明。在此的术语用于描述本发明的特定实施方案，但是它们的使用没有限定本发明，除了权利要求中列出的以外。

本发明包括能够测定抗原特异性免疫应答的组合物和方法，不考虑所诱导的应答类型。如在此所用的，术语“诱导的免疫应答类型”或“免疫应答的类型”用于描述通过 Th1, Th2, Tc1, Tc2 及其组合的免疫细胞应答或其他与递呈肽或抗原的主要组织相容性复合体 (MHC) 无关的基于 T 细胞的获得性免疫的激活或调节，借此 T 细胞识别并应答 MHC 范围内的特定肽或抗原，及其对相同的细胞、邻近的细胞或影响特定 T 细胞的细胞的作用或其对递呈肽或抗原的细胞的作用。有经验的免疫学者将识别可能重叠的术语，即，通常所指的蛋白质已经通过抗原递呈细胞加工并装载成肽、抗原或抗原决定部位，其在特定 MHC 糖蛋白范围内递呈，即，I 类或 II 类。

清楚的是在此范围内所用的术语“肽”，“抗原”或“抗原决定部位”可关于抗原递呈细胞递呈后 T 细胞的免疫调节的递呈来使用。如在此所用的，术语“肽”用于描述氨基酸链。

如在此所用的术语“抗原”，“免疫原”，“抗原决定部位”和“抗原决定簇”可交替使用来描述调节免疫应答的那些肽。如在此所用的术语“调节”用于描述免疫应答的激活，调整，无反应性 (anergization) 或甚至抑制，例如通过细胞的增殖，细胞因子或免疫因子分泌，细胞间的相互作用，凋亡等所测量的。例如，T 细胞应答可以是“调节”的，其中通过能够激活特定类型应答的 T 细胞释放特定细胞因子或免疫因子，例如，抗体产生；并同时降低另一种类型的应答，例如，细胞毒性 T 细胞或 NK 细胞的激活。

如在此所用的术语，“免疫调节”用于描述特定抗原，免疫原，

抗原决定部位或抗原决定簇对效应细胞的作用，效应细胞即在原位或甚至在效应级联下游中激活的细胞。

本发明者认识到之前已经产生了用于预测和表征抗原决定部位的许多工具。例如，主要基于 MHC 肽复合体的 X-射线晶体结构数据的肽-主要组织相容性复合体 (MHC) 相互作用的计算机模型化通常用于预测蛋白质内潜在的抗原决定部位。尽管该方法极大地得益于引入了新的预测算法，然而，这取决于结构数据库的大小，因此在预测该数据组未表示的 MHC 复合体时就不太有效。该方法提供了鉴定抗原决定部位的方法，但不可以用于表征由那些抗原决定部位引发的特定应答 (Flower DR, Novartis Found Symp. 2003; 254: 102-20; 讨论 120-5, 216-22, 250-2)。

从 MHC 洗脱肽，接着质谱测序已经成功用于鉴定抗原决定部位 (Hunt DF, Science. 1992 年 3 月 6 日; 255 (5049): 1261-3)。尽管是鉴定的有效方法，但肽洗脱是昂贵的，缓慢的，并需要大的样品尺寸，使得在临床环境中使用是不切实际的。该方法还提供了鉴定抗原决定部位的方法，但不可以用于表征由那些抗原决定部位引发的特定应答。

重叠肽文库已经用于鉴定病原体相关蛋白中的抗原决定部位 (Martin R, Methods. 2003 年 3 月; 29 (3): 236-47)。肽文库筛选使用生物测试作为反应性的读出并因此可以用于测定对抗原决定部位的应答的量级。通过使用重叠文库，可以鉴定所有潜在的 I 类和 II 类抗原决定部位。迄今为止，使用肽文库用于评价潜在抗原决定部位的生物测试包括以下方法：细胞质内细胞因子，ELISA 和细胞增殖 (Martin R, Methods. 2003 年 3 月; 29 (3): 236-47)。这些测试的任一个中对文库内给定肽的反应是抗原决定部位存在的表示；然而，关于对该抗原决定部位的应答性质，这些方法中没有一个给出清楚的表示，例如，抗原性、过敏性、致耐受性或任何其他特定的应答。

还报道了用于预测和表征抗原决定部位的已知技术的组合。以下给出了组合测试的实例。

肽文库和 ELISPOT。ELISPOT 技术使用表面结合的捕获抗体来结合平板上培养的细胞分泌的细胞因子。将第二个标记的抗体用于定量分泌细胞因子细胞的数量。通过用重叠肽文库孵育细胞并通过

ELISPOT 测试细胞因子产生，分离抗原决定部位 (Geginat G, J Immunol. 2001 年 2 月 1 日; 166 (3): 1877-84)。然而，该方法是局限的，因为对于任何给定的样品，只有少数细胞因子的产生可以得到测量。这种测量应答抗原决定部位识别所产生的所有范围的细胞因子和趋化因子的无能使得免疫应答（即，1-型，2-型或 T-调节）的任何表征变得极其困难。

肽文库和 ELISA。ELISA 技术使用表面结合的捕获抗体来结合细胞分泌的可溶性细胞因子。将第二个标记的抗体用来与标准曲线相比较时定量分泌的细胞因子的浓度。通过用重叠肽文库孵育细胞并通过 ELISA 测定细胞因子产生，抗原决定部位得到分离。然而，该方法是局限的，因为对于任何给定的样品，只有少数细胞因子的产生可以得到测量。这种测量应答抗原决定部位识别所产生的所有范围的细胞因子和趋化因子的无能使得免疫应答（即，1-型，2-型或 T-调节）的任何表征变得极其困难。此外，通过 ELISA 测定单个细胞因子需要相当大的至少 100 微升生物流体和/或培养物上清液的体积。

肽文库和细胞增殖测试。细胞增殖测试使用放射性核素结合或荧光染料稀释来监控响应刺激的细胞分裂。通过用重叠的肽文库孵育细胞并通过细胞增殖测试来测定细胞分裂，抗原决定部位得到分离 (Mutch D, J Acquir Immune Defic Syndr. 1994 年 9 月; 7 (9): 879-90)。然而，该方法是局限的，因为尽管细胞分裂可以表示抗原应答规模，但关于应答的性质（即，1-型，2-型或 T-调节），该测试没有给出信息抑制。还应注意一些抗原特异性应答与快速细胞增殖无关如 T-调节应答。

肽文库和细胞毒性淋巴细胞测试 (CTL)。细胞淋巴细胞测试监控放射性核素或荧光染料从装载抗原（包括但不限于 cDNA，病毒和噬菌体表达文库，完整蛋白，蛋白片段，肽，修饰的肽和脂质）的靶细胞的释放，作为抗原决定部位识别和细胞毒性细胞功能的测量。通过用重叠的肽文库孵育细胞并通过细胞毒性淋巴细胞测试来测定细胞的细胞毒性，抗原决定部位得到分离。尽管细胞的细胞毒性可以表示 1-型抗原应答的规模，但测定 1-型以外的应答（即，2-型和 T-调节）时，该方法的使用是局限的。由于受体从靶细胞中释放出来，使用 CTL 测试的抗原特异性细胞毒性的表征通常受到低敏感性的困扰。还应当

注意到该方法需要大规模的细胞培养扩大且因此不能认为是高通量的。

肽文库和细胞质内的细胞因子染色。细胞质内的细胞因子染色技术使用标准的荧光染色程序和抗细胞因子抗体来测量响应抗原刺激所产生的胞内细胞因子的水平。然后通过通过标准的细胞计数、显微镜或分光光度技术来完成细胞因子产生的测量和产生细胞因子细胞的定量。通过用重叠肽文库孵育细胞并通过细胞质内的染色来测定细胞因子产生，抗原决定部位得到分离 (Karlsson AC, *J Immunol Methods*. 2003 年 12 月; 283 (1-2): 141-53)。然而，该方法是局限的，因为对于任何给定的样品，只有少数细胞因子的产生得到测量。。这种测量应答抗原决定部位识别所产生的所有范围的细胞因子和趋化因子的无能使得免疫应答（即，1-型，2-型或 T-调节）的任何表征变得极其困难。该方法进一步受到限制，因为需要大量细胞用于分析且对受分析的细胞是破坏性的。

肽洗脱和质谱测序。从 MHC 洗脱肽接着质谱测序已经成功用于鉴定抗原决定部位 (Hunt DF, *Science*. 1992 年 3 月 6 日; 255 (5049): 1261-3)。尽管对于鉴定是有效的方法，但肽洗脱是昂贵，缓慢且需要大的体积大小，使其在临床环境中使用是不切实际的。该方法提供了鉴定抗原决定部位的方法，但不能用于表征由那些抗原决定部位引发的特定应答（即，1-型，2-型，T-调节）。

肽 MHC 相互作用的计算机模型化。主要基于 MHC 肽复合体的 X-射线晶体结构数据的肽-主要组织相容性复合体 (MHC) 相互作用的计算机模型化通常用于预测蛋白质内潜在的抗原决定部位。尽管该方法极大地得益于引入了新的预测算法，然而，这取决于结构数据库的大小，因此在预测该数据组未表示的 MHC 复合体时就不太有效 (Kuhara S. *Pac Symp Biocompt*. 1999; 182-9)。该方法提供了鉴定抗原决定部位的方法，但不能用于表征由那些抗原决定部位引发的特定应答。

通过重组表达克隆的抗原血清学鉴定 (SEREX)。SEREX 技术涉及通过组合表达文库筛选鉴定由血清抗体识别的抗原决定部位。尽管对于激素免疫应答 SEREX 技术给出了鉴定，但对于细胞免疫应答的规模或性质没有给出这样的鉴定 (Tureci O, *Mol Med Today*. 1997 年

8月; 3(8): 342-9)。该技术费时费力, 并因此在临床环境中是不切实际的。

用于多重细胞因子分析的实时 PCR。实时 PCR 可以用于以定量方式测量编码多重细胞因子的 RNA 的表达 (Giulietti A., *Methods*. 2001 年 12 月; 25(4): 386-401)。然而, 该技术是费时费力的, 需要大量细胞来分离足够量的 RNA 用于分析, 且对于细胞是破坏性的。最后, RNA 的表达不表示生物活性细胞因子的分泌。

如上所述, 已经报道了能够预测并表征抗原决定部位的技术, 且在一些情况中, 为了最大化有用信息的量, 已经将各种技术结合起来, 如基于荧光的增殖测试和胞内细胞因子测试。这些结合的测试通常受到其单个组成测试的限制, 如与上述的细胞质内细胞因子染色相关的局限性。

存在对高通量多参数技术的迫切且迄今为止未完成的需要, 该技术易于自动化, 非破坏性的并需要小的样品大小, 使其可应用于临床诊断环境, 使得可以测定人体内的免疫应答。考虑到其中需要提供免疫应答的图像和/或鉴定病原体性质的快速测试的新兴和再次新兴的病原体以及生物威胁剂, 这种需求特别重要。上述的方法中没有一个提供对抗原决定部位的定性和定量免疫应答的清楚表征。除计算机模型化以外, 这些方法没有提供高通量, 限制了它们在诊断或免疫监控立场的实用性。

本发明提供了免疫调节肽及其衍生物的鉴定, 因此允许评价健康和患病个体中诱导的具有诊断、预后和治疗含义的免疫应答类型。该方法还给出了应答的性质和规模的测量, 而同时鉴定了对其产生应答的抗原决定部位。

一发明中, 本发明是测定抗原特异性免疫应答的方法, 与诱导的应答类型无关, 因此允许评价健康和患病个体中诱导的免疫应答类型。该方法同时给出了免疫应答的定性和定量测量, 而同时鉴定了对其产生应答的抗原决定部位。

本发明的方法是三种方法的结合, 人或动物的免疫细胞的细胞培养, 非 MHC 限制的抗原物质的递呈, 并分析细胞因子和/或趋化因子的存在, 其提供了观察所有类型免疫应答的能力。一实施方案中, 三种技术包括人或动物的免疫细胞的细胞培养, 非 MHC 限制的重叠肽

文库，和细胞因子和/或趋化因子存在的多重分析。优选，本发明是测定抗原特异性免疫应答的多阶段方法，其中第一个阶段是高通量筛选（阶段 I），和第二个阶段提供特定抗原决定部位的鉴定（阶段 II）。

本发明的方法使用细胞培养物分析，使用呈现能够不同抗原加工，递呈和识别肽和非肽抗原决定部位（例如，糖脂）的多种细胞类型。用于本发明方法的合适细胞包括但不限于 T 细胞，B 细胞，树突细胞，单核细胞，嗜中性粒细胞，肥大细胞和红血球。包括 T 细胞，B 细胞，NK 细胞和 NK-T 细胞的分离外周血单核细胞（PBMC）提供了用于本发明的多种细胞类型的易获得来源。此外，用于培养还支持细胞因子产生的人或动物细胞的任何本领域已知的标准化程序适用于本发明中。

本发明的方法中，任何抗原物质可以用于引发免疫应答。适用于本发明的抗原物质的来源包括抗原，肽，蛋白质，微生物，细胞，组织，肿瘤或其组合物。合适的抗原物质包括但不限于包括肽，糖肽，磷肽，脂质，糖脂和磷脂的组合物。

一实施方案中，在本发明中使用重叠肽文库来鉴定目标蛋白上的抗原决定部位并用来刺激免疫应答。该技术提供了鉴定给定抗原的所有可能的 I 类和 II 类抗原决定部位并适于 CD4 和 CD8 T-细胞应答。且抗原决定部位的鉴定不受 HLA-单套形的限制。

将目标蛋白的氨基酸序列分成小的重叠肽，例如，一系列具有 3 至 4 个氨基酸偏移（offset）的 8-至 15-mer 重叠肽。根据本发明，可以制得或从商业可获得来源购买重叠肽文库。例如，从含有 296 个氨基酸的流感基质蛋白质，可以制得 60 个重叠 15-mer 肽（具有 4 个氨基酸偏移）的重叠肽文库。

从重叠肽文库，用一种或多种粘附培养容器的肽来准备细胞培养容器。在一个多阶段方法中，将多孔的阶段-I 培养平板用于筛选目的，其中每个孔含有几个重叠肽的簇。筛选需要的每簇重叠肽的数量和簇的数量取决于蛋白质自身的大小。优选，每个簇含有约 5-10 个重叠肽；对于较小的蛋白质，约 3-7 个重叠肽。在一个多阶段实施方法中，将目标蛋白的重叠肽文库通过簇分配至编号的预先处理的 96 孔阶段 I 培养平板中，每孔每簇 5-10 个肽。对于阶段 II，以每个孔单个肽来分配反应性簇内的重叠肽。为了最大化通量和最小化测试与测试之间的

变化，预先制备阶段 I 的培养平板。预先制备并存储于-80℃的平板具有最少一年的货架期。且一定程度上发现特异性阶段 I 簇是重复抗原性的，也可以预先制备阶段-II 的培养平板。

为了开始本发明的免疫应答测试，将目标免疫细胞加入上述的培养容器中并在支持响应粘附于培养容器的抗原肽的细胞因子产生的条件下培养一段时间。使用该方法可以测定的免疫细胞包括但不限于 PBMC，淋巴细胞，T 细胞，CD4+ T 细胞，CD8+ T 细胞，NK 细胞，NKT 细胞，TCR T 细胞，B 细胞，单核细胞，树突细胞和粒细胞。在一种方法中，使用外周血单核细胞 (PBMC)。在多阶段方法中，例如，将 PBMC 以  $2 \times 10^5$  每孔接种于一个或多个上述含有目标抗原重叠肽文库的编号的预先处理的 96 孔阶段-I 培养平板中，每孔每簇 5-10 个肽。然后在支持细胞因子产生的条件下孵育免疫细胞，使用对于特定细胞类型选定的培养基、温度和孵育条件。例如，如实施例 1 中所述的，优选将 PBMC 在完全培养基中 37℃ 孵育 18-48 小时。孵育后，将细胞沉淀并从每个孔中分离出上清液并分析多种细胞因子和趋化因子的存在。对于在此所述的本发明，术语“细胞因子”用来表示细胞因子和趋化因子两者。

根据本发明，对于相同样品中几种细胞因子的存在，优选 20 或更多种细胞因子，本领域中已知的能够同时分析上清液的任何方法可用于本发明中。这样的方法包括质谱，基于抗体的矩阵，和多元分析珠子技术。使用细胞因子多元分析，因为：i) 可以同时测量多个免疫参数，ii) 需要小体积的样品，iii) 提供不破坏样品的灵敏测试；iv) 支持专门化免疫应答的特征性特定细胞因子的协调表达，和 v) 提供免疫效应的直接测量。合适的可购得的细胞因子多元分析仪是 Luminex100 细胞因子多元工作台 (Luminex Corp., Austin, Texas)，其能够同时测量高达 100 个分析物，需要小体积的样品，并快速检测每微升 1-32,000 微微克动态范围内的细胞因子的存在。细胞因子多元矩阵技术 (Luminex) 允许同时定量小体积中的多种细胞因子和趋化因子 (Earley MC, Cytometry, 2002 年 10 月 15 日; 50(5): 239-42)。该测试本质上是高通量的，并可以应用于多种生物样品的分析。通过分析响应刺激或病原损害的协调细胞因子表达，可以描述对应于特异性免疫应答的所述特异性生物性质。

在一种方法中，将 50 微升上清液以 96 孔形式转移至 Luminex100 细胞因子多元工作台中（Luminex Corp., Austin, Texas）并根据制造商的说明来分析。快速筛选重复两份的上清液中多种细胞因子的存在，使用预先制备并使之有效的珠子和试剂的总混合物。

在多阶段的方法中，将通过阶段-I 细胞因子分析证明反应阳性的抗原簇分解成它们构成的肽组成部分，用于如上所述的抗原决定部位聚焦阶段-II 培养平板上的抗原肽的鉴定。在一种方法中，阶段-II 培养平板包括编号的预先处理的孔-条带，孔-条带含有每个簇的各个成分肽，重复两份。将目标免疫细胞加入孔-条带中并在支持响应粘附孔-条带的抗原肽的细胞因子产生的条件下培养一段时间。例如，将融化的 PBMC 以  $2 \times 10^5$  细胞每孔加入孔-条带中并在 37°C 培养 18-48 小时。培养后将细胞沉淀，分离上清液并分析细胞因子产生。在一种方法中，将 50 微升上清液转移至 Luminex 工作台中用于分析。对于给定肽条带的阶段-II 中的多元筛选包括响应阶段-I 分析过程中的亲本簇所产生的细胞因子。阶段 II 筛选中鉴定的肽表示由该个体识别的抗原决定部位。响应鉴定的肽而产生的细胞因子和趋化因子的特征模式是该抗原决定部位引发的特定应答类型的表示。

本发明的方法是高通量的方法，用于快速鉴定和表征肽特异性的 T-细胞抗原决定部位。如在此所示的，测试的产生和证实已经引起选定组细胞因子和趋化因子的鉴定，其允许鉴定-1 型，2-型和 T-细胞调节表型。

本发明的这种方法具有优于现有技术的几个优势，包括：a) 高灵敏度：对于所有测试的细胞因子，在每微升微微克检测；b) 高通量：可以在 48 小时内完成测试；c) 小体积生物流体中多种分析物的分析，例如测定 50 微升体积中至少 30 种细胞因子和趋化因子；d) 非破坏性：允许增加基于细胞的测试用于多个参数的分析；和 e) 以 HLA 单套形无关的方式来鉴定抗原决定部位。本发明的方法使用细胞因子多元化来监控多个免疫参数并因此能够表征免疫应答的性质，包括但不限于抗原性、过敏性和致耐受性应答。通过监控多种细胞因子的协调应答，抗原决定部位的鉴定和表征也比本领域技术的现有状态更灵敏。现有本领域技术中没有一个单独或结合能够提供细胞因子的多参数测定，而本发明方法的抗原决定部位的鉴定和表征可以提

供。此外，本发明的方法包括高通量技术的优势。还应当注意到相对于本领域技术的现有状态，本发明的方法对测试的细胞不是破坏性的；因此其可以结合许多标准或定制免疫测试，包括但不限于增殖，胞内细胞因子和表面受体染色，CTL 活性和 ELISPOT。最后，本发明的方法需要比任何其他目前可用技术更小体积的生物流体和/或培养物上清液和更少数量的细胞用于测试。因此，本发明的方法是高通量的，低体积的，非破坏性的技术，易于自动化，并因此对于诊断、预后和治疗用途是实用的。

一方面中，本发明是允许鉴定免疫调节肽及其衍生物的方法，具有诊断、预后和治疗应用。(a) 诊断：该技术可以用于测定个体先前存在的免疫状态。通过鉴定和表征多种抗原的抗原决定部位，可以测定个体完整 T-细胞组成部分的完整图。该技术是高通量的，易于自动化，非破坏性的和需要小的样品大小，使其可应用于临床诊断环境中。因此，可以用作多种自体反应性疾病和超免疫应答诊断中的工具，包括但不限于过敏症、糖尿病、关节炎、狼疮和多发性硬化。(b) 预后：通过该技术测定治疗前个体的抗原决定部位特异性免疫状态可以作为治疗结果的预后指示。因此，可以调整治疗干预的过程来提高或消除这种免疫状态。该技术可以用于抗肿瘤免疫治疗、气管移植、过敏症和自身免疫性疾病治疗的预后测定。(c) 治疗：本发明的方法可以用作治疗过程中的免疫调控工具。治疗过程中的抗原决定部位特异性免疫应答的特异性、规模和性质的完整图可以用来测定正在进行治疗的效用。基于该方法的数据，可以调整治疗来提高、调节或抑制特定的免疫应答。因此，该技术可以用于指导疫苗研发、抗肿瘤免疫治疗、器官移植、过敏症和自身免疫性疾病领域中正在进行治疗。

另一方面中，本发明可用于设计新的药物，包括但不限于疫苗、生物活性肽和靶向试剂。(a) 疫苗：本发明的方法极大地有助于有效疫苗的研发。使用该技术鉴定的抗原决定部位本身可以作为有效的疫苗来提高对抗传染病或癌症的免疫应答，或使对抗用于自身免疫性疾病、过敏症或器官移植治疗的蛋白质的免疫应答变成无反应性 (tolerize)。(b) 生物活性肽：已经描述了通过较大蛋白质的蛋白水解产生的生物活性肽具有意义深远的神经调节和免疫调节功能。使用该技术，可以快速鉴定具有这些特定的蛋白质。(c) 靶向试剂：使用

该技术鉴定的与细胞上特定受体相互作用的生物活性肽可以用作靶向试剂，将药物传送到特定的细胞群。

本发明的方法适用于数种医学应用中，包括但不限于慢性感染、过敏症、肿瘤疾病、自身免疫性疾病、阿尔海默氏病、急性传染病、器官移植和动脉血管粥样硬化。可以理解这些应用意味着是代表性的，且本领域已知的其他应用作为本发明的一部分来考虑。

慢性感染。惊人数量和种类的人类疾病是由慢性致病感染而引起的。尽管这些疾病的进程不同，它们全部可以通过无力引发并有效应答病原体来表征，不管是 1-型或 2-型。一旦应答得到引发，蛋白质相关病原体中的自我抗原决定部位拟态也可以诱导自体免疫应答，其在清除感染后还能持续很长时间，如 Lyme 关节炎和 Herpes 相关的脱髓鞘疾病。病原体免疫识别后的自体免疫反应的出现使得可以选择对安全而有效的治疗关键的特异性抗原决定部位。研究已经涉及一些慢性感染中调节应答的不适当激活。本发明的方法适用于关于慢性感染的诊断、预后和治疗应用。(a) 诊断：用于一些慢性感染剂的非入侵诊断测试，如用于 HBV 的基于 PCR 的测试，证明在临床环境中非常有效。通过对病原体相关肽的特异性应答的快速检测和表征，本发明的方法可应用于慢性感染的诊断。通过使用该技术也有助于病原体相关自体免疫并发症的诊断。(b) 预后：本发明的方法可用于检测和表征对特定病原体相关抗原决定部位的反应，1-型，2-型或 T-调节，随后其可作为疾病结果的预后指示，因此指导抗生素治疗。本发明的方法适用于检测和表征对特定病原体相关抗原决定部位的反应，其对于感染相关的自身免疫性疾病的发作，也可以作为预后指示。(c) 治疗：通过本发明的病原体相关蛋白的抗原决定部位的鉴定和表征可以有助于安全有效的预防和治疗疫苗的研发。这些包括实现避免自我抗原决定部位拟态的疫苗。疫苗还将包括全部变体抗原决定部位的鉴定，靶向病原体蛋白组内的不变抗原决定部位，因此提供对抗相同病原体的多个菌株以及每种病原体的常见突变体的保护，如在 HIV 和疟疾的情况下。通过这种技术的应用鉴定和消除 T-调节抗原决定部位和响应细胞在启动保护性抗病原体应答中起作用。

过敏症。过敏症是对通常无害物质的超免疫应答。已经报到不恰当的转变成 2-型应答在引发过敏性免疫应答中起关键作用。已经鉴定

出许多过敏原，包括吸入过敏原，如屋尘螨虫，花粉和霉菌；食品过敏原如蛋，小麦，大豆和坚果；或一些药物如青霉素。可以导致严重的通常为致命的反应，称为过敏性反应。因此过敏症范围内的 T-调节应答的激活是有利的。(a) 诊断：皮肤测试和血液测试，如过敏原特异性 IgE 水平，通常用于鉴定过敏原。然而，皮肤测试对于一些经受过敏性反应的个体是危险的。本发明的方法可以应用作为鉴定个体特异性抗原决定部位的安全诊断工具。(b) 预后：本发明的方法允许鉴定个体过敏症个体的过敏原抗原决定部位。这对于监控治疗过程中的免疫应答或对于后续是有用的。还可以在治疗后鉴定致耐受性 T-调节刺激抗原决定部位并可以作为成功治疗的预后指示。(c) 治疗：抗原决定部位的鉴定可以形成基于肽的新疫苗，其可以用于将免疫应答转换成 T-调节或选择性地消除或抑制不恰当的 2-型细胞。

肿瘤疾病。将肿瘤疾病定义为从正常组织突变的异常细胞不受控制的生长。这些包括癌症，实体肿瘤和淋巴/造血系统的恶化，将所有这些总称为肿瘤。已经报道肿瘤环境通过几种不同的机理诱导对抗肿瘤抗原的免疫耐受性。尽管对抗肿瘤细胞的 1-型 T 细胞的产生涉及肿瘤生长的压抑或抑制，对耐受性转变的免疫应答抑制癌症特异性 1-型 T 细胞的产生。然而，在一些癌症中，肿瘤抗原特异性 1-型 T 应答通过过敏性拟态诱导自身免疫性疾病。例如，已经报道 CDR2（乳房和卵巢肿瘤抗原）特异性的细胞毒性 T 细胞，诱导一些个体中的肿瘤性侧小脑恶化（PCD）。

抗肿瘤免疫性过程中自体反应的出现使得可以选择对安全有效治疗关键的特异性抗原决定部位。(a) 诊断：通过使用本发明的方法有助于肿瘤相关自体免疫并发症的诊断。(b) 预后：使用该技术对特异性肿瘤相关抗原决定部位反应（1-型，2-型或 T-调节）的检测和表征，可以作为疾病结果的预后指示。通过比较接种疫苗前和接种疫苗后之间的肿瘤特异性免疫应答的性质和规模，本发明的方法允许评价任何种类的疫苗治疗。对于肿瘤相关自身免疫性疾病的发作，使用该技术对特定肿瘤相关抗原决定部位反应的检测和表征可以作为预后指示。

(c) 治疗：通过本发明的方法对肿瘤相关蛋白的抗原决定部位的鉴定和表征有助于安全有效治疗疫苗的研发。这将包括实现避免自我抗原决定部位拟态的疫苗。

自体疾病。将自体疾病定义为由对抗身体自身组织的免疫应答引起的失调。认为自我抗原递呈范围中远离 T-调节功能的不恰当转变是自身免疫性疾病的发作和进展中的关键因素。所得到疾病的特定性质取决于显性应答。例如，在 1-型糖尿病的情况中，已经分离了个体体内识别胰岛的 1-型细胞 (Arif S, J Clin Invest. 2004 113: 451)。此外，在多发性硬化个体中，存在表明髓磷脂碱性蛋白 (MBP)-反应性 1-型极化 T-细胞经受体内激活和无性繁殖扩大的证据，已经报道其在发病机制中起主要作用。(a) 诊断：本发明的方法允许鉴定引起给定类型的自体反应性免疫细胞扩大的显性自我抗原决定部位。(b) 预后：本发明的方法允许鉴定个体自体免疫个体的自我抗原决定部位。这对于监控治疗过程中的免疫应答或用于继续是有用的。还可以在治疗后鉴定致耐受性 T-调节刺激抗原决定部位并作为成功治疗的预后指示。(c) 治疗：抗原决定部位的鉴定可以形成基于肽的新疫苗，其可以将免疫应答转变成 T-调节或选择性地消除或抑制不当 1-型或 2-型细胞。

阿尔海默氏病。阿尔海默氏病 (AD) 是缓慢进展形式的痴呆，其是智力功能功能渐进性或获得性的削弱。AD 的特征在于大脑区域中 42-残基淀粉状蛋白 (A $\beta$ ) 的渐进性沉积。报道表明与年龄相当的成人相比较时，相当高比例的健康老年对象和 AD 个体具有强烈的 1-型和 2-型特征的 A $\beta$ -反应性 T-细胞应答。(a) 诊断：许多情况中，阿尔海默氏病和老年痴呆之间的不同诊断只有在 mortem 后才能得到确凿的确定。本发明的方法可用于鉴定 A $\beta$  反应性 T 细胞应答，因此其可以作为 AD 的诊断指示。(b) 预后：通过本发明方法的特定免疫应答的鉴定可以允许预测疾病的临床过程。

急性感染。对抗病原体的 1-型应答的诱导对于从胞内微生物如细菌和病毒的恢复是关键。相反，胞外病原体如蠕虫诱导 2-型细胞的产生，其细胞因子指引 IgE 和嗜曙红细胞介导的病原体破坏。一些病毒，如埃博拉病毒或登革热病毒，导致具有高死亡率的严重疾病，对于这两种病毒还没有建立得到许可的疫苗。在小鼠模型中，已经证明使用源自埃博拉病毒糖蛋白 (GP) 和基质蛋白 (VP40) 的病毒样颗粒 (VLP) 的疫苗激活 T 细胞和 B 细胞，并保护不受病毒激发的影响。

(a) 诊断：本发明的方法适用于鉴定诊断新兴和再次新兴病原体和

生物威胁剂存在的新抗原决定部位。(b) 治疗: 本发明的方法通过筛选从这些疾病恢复的个体可以鉴定病毒抗原的 T 细胞抗原决定部位。因此, 可以制得对抗急性致命感染的基于肽的新疫苗。

器官移植。器官移植的排异通常是由对抗移植器官或在移植对宿主疾病的情况中 (GVHD) 对抗接收者的显性 1-型应答引起的超免疫应答。调节功能在产生耐受性和长期移植接受中起关键作用。因此器官移植范围内的 T-调节激活或显性 1-型应答的选择性消除是有利的。

(a) 诊断: 本发明的方法适用于测定免疫反应的模式, 其可以是急性 GVHD 和最特别是慢性 GVHD 产生的预示。(b) 预后: 在移植之前或出现之后, 捐献者或接收者样品中存在的显性 1-型抗原决定部位可以是移植排斥的预后指示, 本发明适用于测定显性 1-型抗原决定部位的存在。还可以在治疗后通过本发明鉴定致耐受性 T-调节刺激抗原决定部位并可以作为移植耐受性的预后指示。(c) 治疗: 通过本发明鉴定的抗原决定部位可以形成基于肽的新疫苗, 其可以将免疫应答转换成 T-调节, 或选择性地消除或抑制不当 1-型细胞。

动脉粥样硬化。动脉粥样硬化是常见的动脉疾病。脂肪、胆固醇和其他物质累积在动脉壁中并形成“粉瘤”或斑点。通常认识到慢性炎症细胞介导的免疫应答涉及动脉粥样硬化的发病机制。报道了动脉粥样硬化斑中的 T-细胞激活是由斑产生的抗原如氧化的 LDL (oxLDL) 启动的。其他报道了人颈动脉粥样硬化斑中的衣原体肺炎-反应性 T 细胞的检测。(a) 诊断: 本发明的方法适用于免疫反应性早期模式的鉴定。(b) 预后: 本发明的方法允许定量测量涉及动脉粥样硬化发病机制的抗原如 oxLDL 或交叉反应性衣原体抗原的抗原决定部位, 其由 T 细胞识别。(c) 治疗: 本发明的方法适用于测定特异性的抗原决定部位, 其可以用于产生基于肽的新疫苗来防止动脉粥样硬化的进展。

可以理解以下给出的实施例是本发明的表示并且是本发明的说明, 但并不解释为以任何方式来限制本发明的范围。在本发明的方法特征中可以形成改变而没有脱离本发明的范围。本领域技术人员显而易见的是也可以使用可替换的方法而没有脱离本发明的范围。特别地, 实施例中呈现的测量细胞因子产生的方法只是代表性的且本领域中用于测量细胞因子浓度的任何已知方法可用于本发明中。

实施例 1: 早在 48 小时通过用病毒肽简单孵育正常捐献者的 PBMC 细胞来检测抗原特异性免疫应答。为了检测通过本发明的方法使用 PBMC 和单种肽是否可以检测抗原特异性免疫应答, 用 HLA-A0201 限制肽孵育 HLA-A0201+正常志愿者的新鲜制备 PBMC。通过其他方法已知捐献者具有 Flu-MP-特异性 CD8+T 细胞但没有 Mage 3-特异性 CD8+细胞 (数据未显示)。

通过 Ficoll-Paque 密度梯度离心从 HLA-A0201+健康志愿者新鲜吸出的血液中分离外周血单核细胞 (PBMC)。将 PBMC 以  $1 \times 10^6$  细胞/ml 的浓度重悬于补充 10% 热灭活的人 AB 血清 (Gemini Bio-Products)、L-谷氨酰胺 (2mM)、青霉素 (200UI/ml)、链霉素 (200 $\mu$ g/ml)、丙酮酸钠 (1mM)、1% 非必需氨基酸、2- $\beta$ -巯基乙醇 (50 $\mu$ M, Sigma) 和 HEPES pH7.4 (25mM, Gibco) 的 RPMI 培养基 (完全培养基: CM) 中。将  $2 \times 10^5$  细胞/孔重复三份接种于圆底 96 孔平板中, 并用 1 $\mu$ l HLA-A0201 限制肽 (储备浓度 1mg/ml, 培养浓度 10 $\mu$ g/ml); Flu-MP58-66 (GILGFVFTL) 或 MAGE-3271-279 (FLWGPRALV, MultiPeptide System, San Diego, CA), 或肽稀释剂 (H<sub>2</sub>O 中的 5%DMSO) 孵育。在 48 小时后收集培养物上清液, 并用 Luminex 来测量细胞因子和趋化因子。

用 Flu-MP 刺激的 PBMC 在 48 小时内诱导了大量的细胞因子, 包括 IFN- $\gamma$  (数据未显示)。结果证明正常捐献者的新鲜 PBMC 响应 Flu-MP 肽并产生大量的细胞因子且早在 48 小时时可以通过用肽简单孵育 PBMC 来检测抗原特异性免疫应答。

实施例 2: 为了 PBMC 中肽反应性细胞宽泛的所有组成部分, 早在 48 小时时检测抗原特异性免疫应答, 包括肿瘤抗原。病毒性抗原通常能够诱导比肿瘤抗原更强烈的恢复应答。为了测定通过本发明的方法是否可以检测肿瘤抗原特异性免疫应答, 用冷的 PBS 融化液氮中低温保存的来自 2 名接受至少 8 次 DC 疫苗 (自体 CD34+造血前体细胞产生的 DC, 装载 4 个黑素瘤相关抗原的 HLA-A2 肽) 注射的黑素瘤患者的 PBMC。用 PBS 第二次洗涤后, 将 PBMC 在 CM 中 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟, 并用尼龙细胞滤器除去细胞碎片。用 CM 将细胞再次洗

涂，并以  $1 \times 10^6$ /ml 重悬浮于 CM 中。然后，以  $2 \times 10^5$  细胞/孔重复三份接种于圆底 96-孔平板中，并用各自 1 $\mu$ l 的 HLA-A0201 限制肽（储备浓度 1mg/ml，培养浓度 10 $\mu$ g/ml）；Flu-MP 58-66；CMV PP65（NLVPMVATV，Biosynthesis，Lewisville，TX），MAGE-3 271-279，MART-1 27-35（AAGIGILTV），gp100g209-2M（IMDQVPFSV），酪氨酸酶 368-376（YMDGTMSQV，NCI），或肽稀释剂（H<sub>2</sub>O 中的 5%DMSO）来孵育。48 小时后收集培养物上清液，并用 Luminex 技术测量所产生的细胞因子。此外，根据制造商（Mabtech）的实验方案进行 ELISPOT 测试来检测产生抗原特异性 IFN- $\gamma$  的 T 细胞。简而言之，在 10 $\mu$ g/ml 肽的存在或不存在下，将 PBMC（ $2 \times 10^5$  细胞/孔）加入预先覆盖 10 $\mu$ g/ml 主要抗-IFN- $\gamma$  单克隆抗体（Mabtech，Stockholm，Sweden）的平板中。

患者 1，通过直接 IFN- $\gamma$  ELISPOT 已知对于 Flu-MP 和 CMV 具有 CD8+ T 细胞（数据未显示），证明了响应 Flu-MP 或 CMV 肽的 IL-1 $\alpha$ ，IFN- $\gamma$ ，TNF- $\alpha$  和 IP-10 的诱导，但是不具有 4 个黑素瘤肽（数据未显示）。这表明黑素瘤肽没有非特异性地调节免疫应答。患者 2，证明其具有 MART-1 特异性 CD8+T 细胞以及 Flu-MP 或 CMV（数据未显示），呈现了响应 MART-1 肽的 IL-1 $\alpha$  轻微提高和 IP-10 显著提高，但不具有其他黑素瘤肽（数据未显示）。结果表明正常捐献者的新鲜 PBMC 响应 Flu-MP 肽并产生 IL-1 $\alpha$  和 IP-10。两个不同的正常捐献者之间的细胞因子/趋化因子产生特征是不同的，表明使用 EPIMAX 测试可以鉴定识别相同 Flu-MP 肽的不同类型的 CD8+ T 细胞。基于响应 IFN 可以上调 IP-10 的事实，DC-T 相互作用可以诱导 T 细胞产生 IFN- $\gamma$ ，其导致从 DC 产生 IP-10。因此，IP-10 对于 1-型 T 细胞应答是有用的标记物。

实施例 3：响应接种装载肽的 CD34-DC 的黑素瘤患者中的 Mart-1 肽的 IP-10 诱导依赖于 IFN- $\gamma$ 。为了检测 IP-10 产生是否依赖于 IFN- $\gamma$ ，在阻断抗-IFN- $\gamma$ R1 mAb 存在下用 MART-1 肽#6（10 $\mu$ M）或 Flu-MP HLA-A2 肽（10 $\mu$ g/ml）刺激从黑素瘤患者获得的 PBMC，该个体接种自体装载 HLA-A2 黑素瘤肽的 CD34-DC。通过 IFN- $\gamma$ R1 的阻断完全消除了 IP-10 产生（数据未显示）。因此，IP-10 产生依赖于

IFN- $\gamma$  产生，表明 IP-10 是 IFN- $\gamma$  产生的替代标记物。

将融化的液氮中低温保存的来自 2 名接受至少 8 次 DC 疫苗（自体 CD34<sup>+</sup>造血前体细胞产生的 DC，装载四个（4）黑素瘤相关抗原的 HLA-A2 肽）注射的黑素瘤患者的 PBMC 重复三份播种于圆底 96 孔平板中，并用各自 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 HLA-A0201 限制肽：Flu-MP58-66，CMV PP65（NLVPMVATV），MAGE-3<sub>271-279</sub>（FLWGPRALV），MART-1<sub>27-35</sub>（AAGIGILTV），gp100<sub>g209-2M</sub>（IMDQVPFSV），酪氨酸酶<sub>368-376</sub>（YMDGTMSQV），或肽稀释剂（H<sub>2</sub>O 中的 5%DMSO）孵育；并在 48h 后收集培养物上清液并使用 Luminex 技术定量评价细胞因子和趋化因子的存在。为了检测产生抗原特异性 IFN- $\gamma$  的 T 细胞进行 ELISPOT 测试，其中在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  肽的存在或不存在下，将 PBMC（ $2 \times 10^5$  细胞/孔）加入预先覆盖 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  主要抗 IFN- $\gamma$  单克隆抗体的平板中。

结果证明通过本发明的方法鉴定了 PBMC 中肽反应性细胞的广泛清单。

实施例 4：本发明的方法允许鉴定 T 细胞识别的特异性肽序列。为了测定抗原决定部位是否由 T 细胞识别和使用本发明的方法是否可以鉴定该抗原决定部位诱导的免疫应答，用接受 CD34-DC 疫苗的 HLA-A0201+黑素瘤患者获得的 PBMC 孵育 5 簇由 4-7 个来自 15-mer MART-1 肽文库的肽构成的肽。设计具有四个（4）氨基酸偏移的 15-mer 重叠肽来覆盖整个 MART-1（Mimotopes, San Diego, CA）的氨基酸序列。每个肽用 2mM 的 50%乙腈来重建，并保存于-80 $^{\circ}\text{C}$  直至使用。从接受 DC 疫苗的黑素瘤患者获得 PBMC。将 4-6 个成簇的肽（每个肽 1 $\mu\text{l}$ ），或单个肽（1 $\mu\text{l}$ ）重复三份接种于 96 孔平板中，并在室温干燥。然后，将 200 $\mu\text{l}$  CM 中的  $2 \times 10^5$  个 PBMC 加入每个孔中并在潮湿的 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 48 小时。用 Luminex 测量培养物上清液中的细胞因子或趋化因子水平。

发现在簇 #1 培养物中检测到显著较高含量的 IP-10。接着用 MART-1 文库的单个肽制得 PBMC 的第二个培养物来鉴定簇 #1 内负责的肽。肽 #6 诱导显著的 IP-10，表明这种肽是黑素瘤患者 T 细胞的抗原决定部位。令人感兴趣的，这种肽含有 HLA-A0201 显性抗原决定部位序列（MART-127-35；AAGIGILTV）。从接受 DC 疫苗的黑

素瘤患者获得 PBMC。该个体是 HLA-A\*0201<sup>pos</sup>，并使用四聚物结合测试表明具有识别 HLA-A\*0201-限制的显性抗原决定部位 (MART-126-35) 的 MART-1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞 (数据未显示)。用这种 HLA-A\*0201 显性 MART-1 肽来培养 PBMC 时，显著诱导了两种细胞因子，IL-1 $\alpha$  和 IP-10，但注意到没有 IFN- $\gamma$  的上调 (数据未显示)。已知 IP-10 响应 I 型或 II 型干扰素而由许多细胞类型分泌，我们猜测 IP-10 响应 MART-1 特异性 T 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  而产生。因此，通过阻断 IFN- $\gamma$  的功能完全阻止了 IP-10 产生 (图 4C)。结果表明 IP-10 响应接种装载肽的 CD34-DC 的黑素瘤患者的 MART-1 肽的诱导依赖于 IFN- $\gamma$ 。

为了检测该个体的 PBMC 是否含有识别这种显性抗原决定部位的 CD8<sup>+</sup> T 细胞，用装载 MART-127-35 或其他 HLA-0201 肽 (例如，Mage-3，酪氨酸酶和 Flu-MP) 的自体单核细胞衍生的 DC 来培养 PBMC，并用特定的四聚物来检测抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞群的诱导。如图 4B-4E 中所示的，在 7 天内 MART-1 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞容易扩大，表明该个体对于 MART-1 具有记忆或效应 CD8<sup>+</sup> T 细胞，且根据本发明的方法用 MART-1 文库来识别这种 CD8<sup>+</sup> T 细胞群。

实施例 5: 本发明的方法允许鉴定各种类型的免疫应答。本发明的方法允许同时鉴定用于免疫应答的抗原决定部位以及所诱导的应答类型。根据实施例 4 中给出的一般方法，用 5-6 个 MART-1 或 NY-ESO1 肽文库的肽簇孵育来自接种疫苗前或接种疫苗后的黑素瘤患者的 PBMC 48 小时 (MART-1 5 个簇；NY-ESO1 8 个簇)。显示典型的结果来表示对应于不同免疫应答的细胞因子特征的信号 (数据未显示)。展示每种免疫应答模式的肽簇以灰色条显示。在 1-型应答中，抑制了 IL-10 产生，而诱导了 IP-10。相反，在 T-调节应答中，诱导了更多的 IL-10，由于 1-型应答的抑制而阻止了 IP-10 产生。在 2-型应答中检测到 IL-13 和嗜酸性粒细胞活化趋化因子，而没有影响 IP-10 的含量。因此，本发明早在 48 小时内鉴定了由任一种抗原诱导的各种类型的免疫应答。用 HLA-A0201 限制的 Flu-MP58-66，Mage3271-279 或稀释剂重复三份来刺激 HLA-A0201<sup>+</sup> 捐献者的  $2 \times 10^5$  个新鲜 PBMC。用基于珠子的多元细胞因子测试来测量培养物上清液中的细

胞因子。从重复三份的数据显示平均 $\pm$ SD。该结果显示了在肽刺激 48h 时，IL-1 $\alpha$  和 IP-10 的肽特异性产生达到平台期。

实施例 6: 本发明的方法允许鉴定由非 T-细胞诱导的其他类型的免疫应答。已知 15-mer 肽由其他免疫细胞如 B 细胞, NK 细胞或 NK-T 细胞来识别, 且一些肽结合未鉴定的受体, 导致免疫应答的调节。本发明的另一个实施例用于鉴定由非 T-细胞诱导的免疫应答, 使用在 MNC-非限制中呈现调节信号的肽。用 survivin 文库的肽簇孵育黑素瘤患者的 PBMC。如图 6A-6H 中所示的, survivin 簇#3 的肽#15 诱导了细胞因子产生的强烈调节模式。即, 强烈诱导了 IL-10 和 IL-1 $\beta$ , 且作为 1-型应答标记的 IL-1 $\alpha$  和 IP-10 得到严重阻止。

为了测定这种应答是否限于特定类型的 MHC-分子, 用 survivin 肽#15 孵育取自 5 名正常健康志愿者新鲜血液的 PBMC 48 小时, 并根据本发明的方法来测量细胞因子浓度。肽#15 抑制了全部五名正常志愿者的 IP-10 产生 (数据未显示), 表明这种肽不限于特定的 HLA 亚型。表明 survivin 肽#15 具有改变免疫应答的强烈能力, 因为在肽#15 存在下用活的流感病毒刺激黑素瘤患者的 PBMC 呈现了 IP-10 诱导的强烈阻止, 显然是由于 IL-10 产生 (数据未显示)。此外, 肽#15 部分地抑制了 TSST-1 诱导的 T-细胞增殖 (数据未显示)。耗尽研究表明 CD56+ 细胞引起 IL-10 产生和 IP-10 阻断 (数据未显示), 表明 survivin 肽#15 作用于 NK, NK-T 细胞或  $\gamma/\delta$ T 细胞群。还表明肽#15 维持 CD3-CD56+ NK 细胞的存活 (数据未显示)。因此, 本发明的方法可用于鉴定任何种类由特定类型肽诱导的免疫调节。

实施例 7: 本发明的方法可用于接种疫苗过程中黑素瘤患者的免疫调节。将细胞以  $2 \times 10^5$  每孔接种于编号的, 预先处理的 96 孔阶段-I 培养平板中。阶段-I 培养平板含有肿瘤抗原 GP100, MAGE3, NY-ESO 和 MART-1 各自的 5 个肽簇, 重复四份, 使用每个簇 12 个重叠肽, 每个 15 个氨基酸长, 以及 KLH 和杀灭的 Colo 细胞对照。预先制备平板来最大化通量和最小化测试与测试之间的变化。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 天。平行地, 在装载全谱抗原肽簇的自体成熟 DC 存在下, 将指定用于再次刺激的细胞孵育 7 天, PBMC 与 DC 的比例为 30:1。在第

七天，将这些细胞大范围洗涤并转移至阶段-I 培养平板 24 小时。孵育后，将这些再次刺激的细胞沉淀，并将各自 150 微升的上清液以 96-孔形式转移至装有 TECAN Genesis RPS 机械样品处理器的全自动化 Luminex100 细胞因子多元工作台中 (TECAN)。

可以结合条形码识别和随机微平板分析来使用能够运行独立样品处理的工作台。将重复两份的上清液快速筛选 INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-10 和颗粒酶-B 的存在，使用预先制备的且使之生效的多元珠子和试剂的总混合物。将剩余的上清液样品冷冻用于之后的分析。预期共同培养的 DC 可以在阶段-I 平板的 24 小时孵育过程中引起背景细胞因子产生。因此，将成熟 DC 的上清液用作细胞因子多元分析中的对照。将最初刺激测试的细胞沉淀并重悬浮于含有 H3 胸腺嘧啶核苷的培养基中并在 37 $^{\circ}$ C 孵育。5 天后，通过胸腺嘧啶核苷结合测试重复四份测定抗原特异性增殖。将最初刺激测试的上清液冷冻于 -80 $^{\circ}$ C 用于稍后的分析。筛选那些再次刺激后细胞因子产生阳性的肽簇在最初刺激过程中的细胞因子产生。

将通过阶段-I 细胞因子多元测试证明反应阳性的肿瘤抗原簇分解成它们的组成部分，用于阶段-II 培养平板上的抗原肽鉴定。阶段-II 培养平板包括孔-条带，孔-条带含有各自簇的 12 个成份肽，重复两份。预先制备阶段-II 肽孔-条带并置于条形码标记的框中。将融化的 PBMC 在 37 $^{\circ}$ C 用装载阶段-I 鉴定的特定肽簇的自体成熟 DC 孵育 7 天，洗涤并以  $2 \times 10^5$  每孔转移至阶段-II 培养平板 24 小时。孵育后，将细胞沉淀，并将 150 微升上清液转移至 Luminex 工作台用于分析。对于给定肽条带的阶段-II 的多元筛选包括在阶段-I 分析过程中响应其亲本簇产生的细胞因子和趋化因子。成熟 DC 单独作用阶段-II 分析的背景对照。一旦给定簇的抗原肽得到鉴定，将它们用于分离抗原特异性效应物群。

阶段 III 监控包括特异性效应细胞的鉴定和表征肽。该程序中，融化  $2 \times 10^6$  个 PBMC 并用载有阶段-II 中各自分离的抗原肽的自体成熟 DC 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 7 天。然后将细胞洗涤并接受 24 小时的再次刺激。再次刺激后，将细胞进行布雷菲德菌素 A 处理，固定，渗透并用一组抗体染色来表征表面标记和胞内细胞因子表达。使用能够 9 色分析和分选的 FACSaria 流式细胞计数器/分选器 (Becton-Dickinson) 通过

多色流式细胞计数分析来完成抗原特异性效应群的鉴定。通过 Cr51 释放测试来体外测定刺激的 T 细胞的 CTL 功能，使用装载肽的、EBV 转化的自体 B-LCL 作为目标。鉴定后，用装载自体成熟抗原肽的 DC 在 IL-2 和 IL-6 存在下将抗原特异性效应细胞群培养 7 天来亚克隆，接着在 IL-2 和 IL-7 存在下用装载肽的成熟 DC 每周再刺激。一旦建立克隆的效应细胞群，进行基因表达模式和细胞毒性功能的大范围表征。

**实施例 8:** 本发明的方法允许选择癌症中的疫苗抗原决定部位。使用该技术对特异性肿瘤相关抗原决定部位反应（1 型，2-型或 T-调节）的检测和表征可以作为鉴定和表征用于疫苗接种时引发所需类型免疫应答的肿瘤相关蛋白的抗原决定部位的工具。

为了选择疫苗抗原决定部位，将个体的 PBMC 暴露于表示肿瘤相关蛋白的抗原决定部位的系列肽文库。48 小时培养后，收集上清液，并根据本发明的教导来分析所分泌的细胞因子。鉴定诱导 1-型 T 细胞应答的肽簇，例如，产生 IFN- $\gamma$  但不产生 IL-10（T-调节应答）或 2-型细胞因子。接下来的步骤中，可以进一步选择对应于给定个体 HLA 型的肽并用于该特定个体的疫苗接种。因此，使用本发明可以测定用于特定的疫苗接种以在个体中产生所需免疫应答类型的药剂。

**实施例 9:** 本发明的方法允许选择传染病中的疫苗抗原决定部位。已知许多目前可用的对抗微生物剂的疫苗没有给予保护性免疫力，例如登革热病毒疫苗。保护性免疫力的缺乏可能是由于不当免疫应答的诱导而引起的，例如，一些目前的疫苗抗原决定部位可以诱导 2-型，或调节 T 细胞而不是 1-型 T 细胞，因此偏移和/或抑制免疫应答朝向非保护性。该实施例中，本发明的技术可以作为鉴定和表征用于接种疫苗时引发所需类型免疫应答的微生物相关抗原的抗原决定部位的工具。

为了选择疫苗抗原决定部位，将个体的 PBMC 暴露于表示来自微生物例如登革热病毒的抗原决定部位的系列肽文库。48 小时培养后，收集上清液，并根据本发明的教导分析所分泌的细胞因子。鉴定诱导 1-型 T 细胞应答的肽簇，例如，产生 IFN- $\gamma$  但不产生 IL-10（T-

调节应答)或 2-型细胞因子。接下来的步骤中,可以进一步选择并用于疫苗接种的肽。因此,本发明的方法可以选择允许在接种疫苗时诱导保护性抗微生物免疫性的抗原决定部位。

图 1 是描绘了根据本发明评价的正常捐献者免疫应答的图,其中从 HLA-A0201<sup>+</sup>健康志愿者新鲜吸出的血液中分离外周血单核细胞(PBMC),以  $2 \times 10^5$  细胞/孔重复三份接种于圆底 96 孔平板中,并用 1 $\mu$ l HLA-A0201 限制肽 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) 或 MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV), 或肽稀释剂(H<sub>2</sub>O 中的 5%DMSO)来孵育;并在 48h 后收集培养物上清液并使用 Luminex 技术定量评价细胞因子和趋化因子的存在。结果表明正常捐献者的新鲜 PBMC 响应 Flu-MP 肽并产生大量的细胞因子。

图 2 是描绘了根据本发明的对正常捐献者中 HLA-A0201 限制肽 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) 的免疫应答的另一个实施例。从另一名 HLA-A0201<sup>+</sup>健康志愿者新鲜吸出的血液中分离外周血单核细胞(PBMC),以  $5 \times 10^5$  细胞/孔重复三份接种于圆底 96 孔平板中,并用 10 $\mu$ g/ml HLA-A0201 限制肽 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) 或 MART-1<sub>27-35</sub> (AAGIGILTV), 或肽稀释剂(H<sub>2</sub>O 中的 5%DMSO)孵育;并在 48h 后收集培养物上清液并使用 Luminex 技术来定量评价细胞因子和趋化因子的存在。结果表明正常捐献者的新鲜 PBMC 响应 Flu-MP 肽并产生 IL-1 $\alpha$  和 IP-10。两个不同正常捐献者之间的细胞因子/趋化因子特征是不同的,表明用 EPIMAX 测试可以鉴定识别相同 Flu-MP 肽的不同类型的 CD8<sup>+</sup> T 细胞。

图 3A-3D 是描绘了根据本发明评价的 2 名黑素瘤患者免疫应答的图。图 3A 和 3C 中,各自对应于患者 1 和 2,将融化的低温保存于液氮中的来自 2 名接受至少 8 次 DC 疫苗(自体 CD34<sup>+</sup>造血前体细胞衍生的装载四个(4)黑素瘤相关抗原的 HLA-A2 肽的 DC)注射的黑素瘤患者的 PBMC 重复三份接种于圆底 96-孔平板中,并用各自 10 $\mu$ g/ml 的 HLA-A0201 限制肽: Flu-MP<sub>58-66</sub>, CMV PP65 (NLVPMVATV), MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV), MART-1<sub>27-35</sub> (AAGIGILTV), gp100<sub>g209-2</sub>M (IMDQVPFSV), 酪氨酸酶<sub>368-376</sub> (YMDGTMSQV), 或肽稀释剂(H<sub>2</sub>O 中的 5%DMSO)孵育;并在 48h 后收集培养物上清液并使用 Luminex 技术来定量评价细胞因子和趋化因子的存在。在各

自对应于患者 1 和 2 的图 3B 和 3D 中,为了检测产生抗原特异性 IFN- $\gamma$  的 T 细胞,进行 ELISPOT 测试,其中在 10 $\mu$ g/ml 肽的存在或不存在下,将 PBMC (2 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞/孔)加入预先覆盖 10 $\mu$ g/ml 主要抗 IFN- $\gamma$  单克隆抗体的平板中。结果表明通过本发明的方法鉴定了宽的 PBMC 中肽反应性细胞的所有组成部分。

图 4A-4C 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。对于图 4A,从接受 DC 疫苗的 HLA-A\*0201<sup>pos</sup> 黑素瘤患者获得 PBMC,并用装载 HLA-A\*0201-限制的显性 MART-1 肽 (MART-1<sub>26-35</sub>) 的自体 DC 来刺激。使用四聚物测试表明个体具有识别 HLA-A\*0201-限制的显性抗原决定部位 (MART-1<sub>26-35</sub>) 的 MART-1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞 (图 4A)。用该 HLA-A\*0201 显性 MART-1 肽直接培养 PBMC 时,特异性地诱导了两种细胞因子,IL-1 $\alpha$  和 IP-10,但是注意到没有 IFN- $\gamma$  的上调 (图 4B)。已知由许多细胞类型响应 I 型或 II 型干扰素而产生 IP-10,我们推测 IP-10 响应 MART-1 特异性 T 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  而产生。因此,通过使用 IFN- $\gamma$ R 阻断 mAb 来阻断 IFN- $\gamma$  的功能而完全阻止了 IP-10 的产生 (图 4C)。结果表明响应接种装载肽的 CD34-DC 的黑素瘤患者中的 MART-1 肽的 IP-10 诱导依赖于 IFN- $\gamma$ 。

图 5 是描绘了根据本发明评价的正常捐献者免疫应答动力学的图。用 HLA-A0201 限制肽 Flu-MP<sub>58-66</sub>, 或 Mage3<sub>271-279</sub>, 或稀释剂重复三份刺激 HLA-A0201\*捐献者的 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个新鲜 PBMC 所示的时间段。用基于珠子的多元细胞因子测试来测量培养物上清液中的细胞因子。从重复三份的数据中显示平均 SD。这些结果表明在肽刺激 48h 时,EPIMAX 测试中的 IL-1 $\alpha$  和 IP-10 的肽特异性产生到达平台期。

图 6 描绘了根据本发明的抗原决定部位聚焦的略图。首先,将编码抗原蛋白的 15-mer 重叠肽文库重复两份分成肽簇 (5-10 个肽/簇)。首先用每个簇肽刺激 5 $\times$ 10<sup>5</sup> PBMC (簇分析)。用基于珠子的多元细胞因子测试来测量培养物上清液中的多种细胞因子,并测定了“碰撞 (hit)”簇。第二个培养物中,抗原决定部位聚焦,用“碰撞”簇的单个肽培养 PBMC 48h,随后用多重细胞因子分析来测定抗原肽。

图 7 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图,其允许鉴定由特异性 T 细胞识别的抗原决定部位。从接受 DC 疫苗的黑素瘤患者获得 PBMC。该个体是 HLA-A\*0201<sup>pos</sup>, 并使用四聚物结合测

试表明具有识别 HLA-A\*0201-限制性显性抗原决定部位 (MART-1<sub>26-35</sub>) 的 MART-1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞 (图 4A)。将覆盖整个 MART-1 氨基酸序列的具有 4 个氨基酸偏移的 15-mer 重叠肽以 4-6 个成簇的肽 (10 $\mu$ M 每个肽) 或单个肽 (10 $\mu$ M) 重复三份接种于 96-孔平板中; 并将 200 $\mu$ l CM 中的 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞 PBMC 加入每个孔中并在潮湿的 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 48 小时; 并用 Luminex 测量培养物上清液中的化学因子或趋化因子水平。如图 7 中所示的, MART-1#6 肽诱导了从接种疫苗的黑素瘤患者获得的 PBMC 中 IP-10 的强烈产生。MART-1 肽#6 含有 10-mer HLA-A2 显性抗原决定部位, 如图 4A 中所绘的。因此, 本发明的方法可以鉴定肽特异性的 T 细胞应答。

图 8 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。从接受 DC 疫苗的黑素瘤患者获得 PBMC。该个体是 HLA-A\*0201<sup>POS</sup>, 且使用四聚物结合测试表明具有识别 HLA-A\*0201 限制性显性抗原决定部位 (MART-1<sub>26-35</sub>) 的 MART-1 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞 (图 4A)。在阻断 IFN  $\gamma$ R mAb (20 $\mu$ g/ml) 或对照 mAb 存在下, 用 A2-MART-1 肽或 15-mer MART-1 肽#6 刺激 PBMC 48h。将 A2-HIVpol 肽和 15-mer MART-1 肽#15 用作对照肽。显示了培养物上清液中的 IL-1a 和 IP-10 水平。该结果表明了 IL-1a 和 IP-10 的产生都依赖于肽特异性 T 细胞的 IFN- $\gamma$  产生, 证明了 IL-1a 和 IP-10 是 1 型 T 细胞应答的替代标记, 即 Th1 和 Tc1 细胞。

图 9 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。用编码黑素瘤抗原的重叠肽簇或单个肽刺激从黑素瘤患者获得的 PBMC 48h。用 Luminex 测量培养 48 小时的培养物上清液中的细胞因子/趋化因子水平。该结果表明抗原决定部位聚焦的概念可以应用于本发明方法中的任何抗原和任何细胞因子。

图 10 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用编码 MART-1 (黑素瘤分化抗原) 的重叠肽簇或单个肽来刺激从接受 DC 疫苗的黑素瘤患者获得的 PBMC。显示了培养 48h 时培养物上清液中的 IL-1a 和 IP-10 水平。使用簇分析 (上图), 簇#2 和#3 诱导了 IL-1a 和 IP-10 的上调。使用抗原决定部位聚焦 (下图), 簇#2 的肽#6 和簇#3 的肽#13 鉴定为特异性 T 细胞的抗原决定部位。该结果表明本发明的方法可以鉴定能够产生 IFN $\gamma$  的特异性 T 细胞的抗原决定部位。

图 11 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用白细胞清除术从图 10 相同的个体获得 PBMC，在冻存管中制得等份试样，并保存于液氮中直至使用。用 MART-1 15-mer 肽#6，肽#13 或稀释剂刺激融化的 PBMC。将该实验分开重复三次。显示了培养 48h 时培养物上清液中的 IL-1a 和 IP-10 水平。3 个实验中的三个都表明了用肽#6 或#13 刺激时 IL-1a 和 IP-10 的上调，证明了该 EPIMAX 测试的高度再现性。

图 12A 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。用单个 15-mer MART-1 肽或稀释剂刺激从 DC 接种前和 8 次 DC 接种后的黑素瘤患者（与图 10 的相同）获得的 PBMC。显示了培养 48h 时培养物上清液中的 IL-1a 和 IP-10 水平。尽管后-PBMC 显示了响应鉴定的两种（2）15-mer 肽（肽#6 和#13）的 IL-1a 和 IP-10 上调，前-PBMC 对于响应肽#13 的 IL-1a 和 IP-10 上调失败。前-PBMC 响应肽#6 的 IL-1a 和 IP-10 产生比后-PBMC 的低。这些结果表明 DC 接种诱导了肽#13 特异性 T 细胞应答并提高了肽#6-特异性 T 细胞应答。为了检测这种假设，我们使用了一种不同的充分确定的方法，胞内细胞因子检测测试。在抗 CD28/CD49d mAb 和莫能菌素的存在下，用 MART-1 15-mer 单个肽刺激相同的 PBMC 8h。细胞膜渗透后，用抗 IFN- $\gamma$  mAb 将细胞染色并用流式细胞计数器来分析 IFN- $\gamma$ +群（图 12B）。尽管在后-PBMC 中约 0.15% 的 CD8+ T 细胞响应肽#6 或#13 而产生 IFN-g，在前-PBMC 中没有检测到 IFN-g 产生。这些结果证明 EPIMAX 可以用于监控癌症个体中的抗原特异性 T 细胞，并表明通过检测 EPIMAX 中的细胞因子/趋化因子的调节规模来预测每个特异性 T 细胞应答的规模。

图 13 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。CFSE(56-羧基荧光素二醋酸丁二酰亚胺酯)是允许用流式细胞计数器鉴定细胞分裂数量的痕量染料。因为 EPIMAX 是非破坏性测试，我们将 EPIMAX 结合 CFSE 技术来测定抗原特异性 T 细胞的增殖能力。证实 CFSE 染色没有改变 EPIMAX 中的细胞因子产生。首先用 1 $\mu$ M CFSE 将从相同黑素瘤患者（与图 10 的相同）获得的 PBMC 染色，并用编码 MART-1 的重叠肽簇或单个肽刺激。在培养的第 8 天，用 CD8-PE，CD3-PerCP 和 CD4-APC 将细胞染色，并分析响应肽刺激

的 T 细胞增殖。图显示了 CD8+ T 细胞增殖的分析。MART-1 簇#2 和 #3, 以及肽#6 和#13 诱导了一些 CD8+ T 细胞群中 CFSE 强度的稀释, 证明肽刺激诱导了抗原特异性 CD8+ T 细胞的增殖。该结果表明结合其他方法可以获得抗原特异性 T 细胞的更多表型和/或功能表证。

图 14 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。首先用 1 $\mu$ M CFSE 将从相同黑素瘤患者 (与图 10 中的相同) 获得的 PBMC 染色, 用编码 MART-1 的单个肽重复三份来刺激。在培养的第 8 天, 用 CD8-PE, CD3-PerCP 和 CD4-APC 将细胞染色, 并分析响应肽刺激的 T 细胞增殖。图显示了 CD8+ T 细胞群内 CFSE 稀释的 CD8+ T 细胞群的%。MART-1 肽#6 和#13 诱导了一些 CD8+ T 细胞群中 CFSE 强度的稀释, 证明肽刺激诱导了抗原特异性 CD8+ T 细胞的增殖。

图 15 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。CD8+ T 细胞识别抗原递呈细胞上表达的 MHC-I 类分子范围内的 8-10mer 肽。为了检测鉴定的 CD8+T 细胞的准确抗原决定部位, 用 15mer MART-1 肽#13 内的 1 个氨基酸延迟来产生 10mer 重叠肽, 并用于刺激相同个体的 PBMC。显示了 48h 时培养物上清液中的 IL-1 $\alpha$  和 IP-10 水平, 和培养 8 天时的 CFSE 稀释试验。这些结果证明 MART-1<sub>54-62</sub> 是 CD8+ T 细胞的抗原决定部位, 其允许 IFN- $\gamma$  的产生和特异性 CD8+ T 细胞的增殖。因此, EPIMAX 允许鉴定 CD8+ T 细胞的准确抗原决定部位。

图 16A-D 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用编码 NY-ESO1 (在大部分黑素瘤细胞中广泛表达的睾丸癌抗原) 的重叠肽簇或单个肽刺激从 HLA-A2<sup>neg</sup> 黑素瘤患者获得的 PBMC。簇#5 内的 NY-ESO1 肽#24 在 48h 时诱导了 IP-10 的上调 (图 16A)。这些结果表明 NY-ESO1<sub>93-107</sub> 是作为抗原决定部位由特异性 T 细胞识别的。为了检测是哪个 T 细胞子集识别该抗原决定部位, 在抗 MHC I 类阻断 mAb (W6/32) 或同型对照 mAb 存在下, 用 NY-ESO1 肽#24 刺激个体的 PBMC。如图 16B 中所示的, 通过 W6/32 完全阻止了响应肽#24 的 IP-10 产生, 表明 IP-10 的产生依赖于 MHC I 类分子, 因此 CD8+ T 细胞识别肽#24。

为了鉴定 CD8+ T 细胞的准确抗原决定部位, 产生肽#24 内的 9mer 重叠肽, 并用于刺激个体的 PBMC。如图 16C 所示的, NY-ESO1<sub>94-102</sub> 诱导了强烈的 IP-10 上调, 表明这是 CD8+ T 细胞的抗原决定部位。

为了鉴定 HLA-限制性组成部分, 用 NY-ESO1 肽#24 脉冲的自体单核细胞衍生的 DC 在 IL-2 (10IU/ml) 存在下刺激 PBMC。在培养的第 9 天, 用编码各种 HLA 的表达质粒转化的缺乏 MHC I 类分子的 LCL 再次刺激细胞, 用 NY-ESO1<sub>94-102</sub> 肽脉冲或未脉冲。用 ELISA 测量 8h 刺激过程中的 IFN- $\gamma$  分泌。如图 16D 所示的, 用 NY-ESO1<sub>94-102</sub> 肽脉冲的 HLA-B\*3501 转化子诱导了 T 细胞的 IFN- $\gamma$  产生, 表明这种新的肽是通过 HLA-B\*3501 分子递呈的, 这些结果表明 EPIMAX 允许鉴定 HLA-A2<sup>neg</sup> 个体中 CD8+ T 细胞的新抗原决定部位, 结合其他方法允许我们鉴定它们的 HLA 限制性组成部分。

图 17 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用 MART-1 15-mer 肽#6 和#13 内的 10mer 重叠肽刺激从黑素瘤患者(与图 10 的相同)获得的 PBMC 48h。图 17 显示了 48 小时时培养物上清液中的 IP-10 水平。MART-1<sub>26-35</sub>(已知抗原决定部位)和 MART-1<sub>53-62</sub>(新抗原决定部位)是抗原决定部位。

图 18 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用 MART-1 15-mer 肽#6 内的 10mer 重叠肽刺激从两名 HLA-A2<sup>neg</sup> 黑素瘤患者获得的 PBMC 48 小时。显示了 48 小时时培养物上清液中的 IP-10 水平。MART-1<sub>26-35</sub>(已知抗原决定部位)是两名个体的抗原决定部位。已知该抗原决定部位限于 HLA-A2。因为这些个体是 HLA-A2<sup>neg</sup>, 且这两名个体之间的 HLA-I 类亚型完全不同, 通过至少三种不同的 MHC I 类分子来递呈该抗原决定部位。这是用 EPIMAX 鉴定 CD8+ T 细胞的抗原决定部位的另一个实例。

图 19 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用#6 至#15 的单独 MART-1 15-mer 肽重复三份刺激从黑素瘤患者(与图 10 的相同)获得的 PBMC 48h。显示了 48 小时时培养物上清液中的 IL-2 水平。MART-1 肽#10 和#11 诱导了 IL-2 的上调。该结果证明了用 EPIMAX 鉴定抗原决定部位的另一个实例。

图 20 描绘了用图 19 中所示的鉴定的 15-mer 肽刺激时 CD4+ T 细胞的 IL-2 产生。在抗 CD28/CD49d mAb 和莫能菌素存在下用 MART-1 15-mer 肽#10 刺激相同个体的 PBMC 8 小时。通过特定 mAb 的染色来分析 IL-2 的产生。该图证明了 CD4+ T 细胞群响应 MART-1 肽#10 而产生 IL-2。这些结果表明 EPIMAX 还可以鉴定 CD4<sup>+</sup> T 细胞

的抗原决定部位。

图 21A-B 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。首先用 1 $\mu$ M CFSE 将从相同黑素瘤患者（与图 10 的相同）获得的 PBMC 染色，并用编码 MART-1 的单个肽重复三份来刺激。在培养的第 8 天，用 CD8-PE，CD3-PerCP 和 CD4-APC 将细胞染色，并分析响应肽刺激的 T 细胞增殖。图 21A 显示了 CD4<sup>+</sup> T 细胞群内 CFSE 稀释的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群的%。MART-1 肽#10 和#11 比没有肽诱导了更多 CFSE 稀释的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群，证明了这些肽诱导了抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖。图 21B 描绘了 CD4<sup>+</sup> T 细胞群内响应各个 MART-1 15-mer 肽的 CFSE 稀释的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群。MART-1 肽#10 和#11 诱导了比其他 15-mer 肽显著多的 CD4<sup>+</sup> T 细胞增殖。这些结果强烈地表明了 EPIMAX 允许鉴定 CD4<sup>+</sup> T 细胞的抗原决定部位，并通过结合 CFSE 技术允许测定特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖能力。

图 22 A-C 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。首先用 1 $\mu$ M CFSE 将从接受 DC 接种的 HLA-A2<sup>neg</sup> 黑素瘤患者获得的 PBMC 染色，并用编码 NY-ESO1 的肽簇刺激。在培养的第 8 天，用 CD8-PE，CD3-PerCP 和 CD4-APC 将细胞染色，并分析响应肽刺激的 T 细胞增殖，用流式细胞计数器基于 CFSE 稀释来分析。图 22A 显示了 CD4<sup>+</sup> T 细胞群内 CFSE 稀释的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群的百分比(%)。NY-ESO1 簇#8 比其他簇诱导了更多的 CFSE 稀释的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群，证明了这些肽诱导了抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖。图 22B 描绘了培养 48 小时时培养物上清液中的 IL-2 水平。在含有 NY-ESO1 簇#8 的培养物中产生了 IL-2。为了鉴定 CD4<sup>+</sup> T 细胞的抗原决定部位，用 NY-ESO1 簇#8 内的单个肽刺激 CFSE 染色的 PBMC。在第 8 天使用流式细胞计数器基于 CFSE 稀释来分析 CD4<sup>+</sup> T 细胞增殖。如图 22C 所示的，NY-ESO1<sub>149-167</sub> 和 NY-ESO1<sub>165-180</sub> 诱导了更多的 CD4<sup>+</sup> T 细胞增殖，证明了这些是抗原决定部位。该结果表明鉴定黑素瘤抗原中 CD4<sup>+</sup> T 细胞抗原决定部位的另一个实例。

图 23 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用#6 至#15 的单个 MART-1 15-mer 肽重复三份刺激从相同个体（与图 10 的相同）获得的 PBMC。显示了 48 小时时培养物上清液中的 IL-5 水平。MART-1 肽#10 和#11 诱导了 IL-5 的上调。该结果证明了用 EPIMAX 鉴定抗原

决定部位的另一个实例。

图 24 描绘了用图 23 所示的鉴定的 15-mer 肽刺激时 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 IL-5 产生。在抗 CD28/CD49d mAb 和莫能菌素的存在下,用 MART-1 15-mer 肽#11 刺激相同个体的 PBMC 8 小时。通过特定的 mAb 染色来分析 IL-5 的产生。该图证明了 CD4<sup>+</sup> T 细胞群响应 MART-1 肽#11 而产生 IL-5。这些结果表明 EPIMAX 可以鉴定抗原决定部位以及特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生的细胞因子类型。

图 25 描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者的免疫应答。用 TRP-1 簇#25 或 gp100 簇#15 的单个 15-mer 肽刺激从两名黑素瘤患者获得的 CFSE 染色的 PBMC。在 48h 时测量培养物上清液中的细胞因子,并在培养的第 8 天基于 CFSE 稀释测试来分析 T 细胞的增殖。结果表明 TRP-1 肽#124 和 gp100 肽#152 是 CD4<sup>+</sup> T 细胞的抗原决定部位,两个都是 CD4<sup>+</sup> T 细胞的新抗原决定部位。肽刺激诱导了各种效应物细胞因子产生,如 IL-2, IL-5, IL-13 和 IP-10 (IFN- $\gamma$ ), 和特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖。这些结果表明鉴定黑素瘤抗原中 CD4<sup>+</sup> T 细胞抗原决定部位的另一个实例,并表明 EPIMAX 可以用于鉴定不同类型的 T 细胞应答。

图 26 描绘了根据本发明评价的三名黑素瘤患者的免疫应答。EPIMAX 允许鉴定不同的 T 细胞子集,如 1 型 (Th1 和 Tc1), 2 型 (Th2 和 Tc2) 细胞。用新鉴定的黑素瘤肽 (15-mer) 刺激从转移性黑素瘤患者获得的 PBMC 48h,并用基于珠子的多元测试来测量培养上清液中的细胞因子。有色柱表示使用所示肽的细胞因子水平 (下图),和空心柱表示使用稀释剂的那些。显示了三种不同 T 细胞子集,1 型,2 型和 IL-10 型的代表性细胞因子产生。通过 IL-1a 和 IP-10 的上调来鉴定 1 型应答,而通过 2 型细胞因子如 IL-4, IL-5 和 IL-13 的上调而没有 IP-10 的上调来鉴定 2 型应答。将 EPIMAX 用于鉴定特征在于 IL-10 上调 (IL-10 型) 的新 T 细胞应答。

图 27 描绘了使用 EPIMAX 方法鉴定的 4 个黑素瘤抗原,即 gp100, MART-1, NY-ESO1 和 TRP-1 内的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的新抗原决定部位的概述。通过用 EPIMAX 筛选 13 个个体的 PBMC 来鉴定这些新的抗原决定部位。

表 1 描述了用 EPIMAX 鉴定的 CD8+ T 细胞的抗原决定部位的概述。显示了鉴定的 15-mer 肽及其氨基酸序列编号。一些 15-mer 肽用 9-mer 或 10-mer 重叠肽来集中, 并显示于表中。

个体	前或后	肽文库	鉴定的抗原 决定部位	抗原决定部位 序列	准确的抗原决 定部位	应答 类型
094-001	前	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>26-35</sub>	1
	后	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>26-35</sub>	1
	前	NY-ESO1	p24	NY-ESO1 <sub>93-107</sub>	NY-ESO1 <sub>94-102</sub>	1
	后	NY-ESO1	p24	NY-ESO1 <sub>93-107</sub>	NY-ESO1 <sub>94-102</sub>	1
	前	gp100	p60	gp100 <sub>237-251</sub>		1
094-004	前	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>26-35</sub>	1
	后	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>26-35</sub>	1
094-007	前	NY-ESO1	p39	NY-ESO1 <sub>153-167</sub>		1
	后	NY-ESO1	p39	NY-ESO1 <sub>153-167</sub>		1
094-009	后	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>21-35</sub>	1
	后	MART-1	p13	MART-1 <sub>49-63</sub>	MART-1 <sub>53-62,54-62</sub>	1
	后	gp100	p52	gp100 <sub>205-219</sub>	gp100 <sub>208-217</sub>	1
094-010	后	NY-ESO1	p21	NY-ESO1 <sub>81-95</sub>		10
	后	gp100	p140	gp100 <sub>557-571</sub>		1
094-012	后	NY-ESO1	p31	NY-ESO1 <sub>153-167</sub>		1
094-015	后	NY-ESO1	p38	NY-ESO1 <sub>149-163</sub>		0
	后	NY-ESO1	p40	NY-ESO1 <sub>157-171</sub>	NY-ESO1 <sub>160-169</sub>	0
	后	NY-ESO1	p41	NY-ESO1 <sub>161-175</sub>	NY-ESO1 <sub>161-170</sub>	1/10
	后	gp100	p73	gp100 <sub>289-303</sub>		10

表 2 描绘了用 EPIMAX 鉴定的 Th0, Th1 和 Th2 细胞的抗原决定部位的概述。显示了鉴定的 15-mer 肽及其氨基酸序列编号。

个体	前或后	肽文库	鉴定的抗原 决定部位	抗原决定部位 序列	应答 类型	增殖
094-004	后	NY-ESO1	p38/ p39	NY-ESO1 <sub>149-167</sub>	0	是
		NY-ESO1	p42/ p43	NY-ESO1 <sub>165-183</sub>	0	是
		TRP-1	p118	TRP-1 <sub>469-483</sub>	1	是
		TRP-1	p124	TRP-1 <sub>493-507</sub>	1	是
094-009	后	MART-1	p10/ p11	MART-1 <sub>37-55</sub>	2	是
		gp100	p152	gp100 <sub>605-619</sub>	0	是
		TRP-1	p48	TRP-1 <sub>189-203</sub>	0	是
094-012	后	gp100	p32	gp100 <sub>125-139</sub>	2	是
		gp100	p40	gp100 <sub>157-171</sub>	2	是
		gp100	p71	gp100 <sub>281-295</sub>	2	是
		gp100	p78	gp100 <sub>309-323</sub>	2	是
		gp100	p152	gp100 <sub>605-619</sub>	2	是
094-015	后	gp100	p1/p2	gp100 <sub>1-18</sub>	0	是
		gp100	p152	gp100 <sub>605-619</sub>	0	是
		MART-1	p11	MART-1 <sub>41-55</sub>	0	是 (CD4/ CD8)

表 3 描绘了用 EPIMAX 鉴定的 IL-10 型 CD4+ T 细胞的抗原决定部位的概述。显示了鉴定的 15-mer 肽及其氨基酸序列编号。

个体	前或后	肽文库	鉴定的抗原 决定部位	抗原决定部位 序列	应答 类型	增殖
094-004	前	MART-1	p10	MART-1 <sub>37-51</sub>	10	否
	后	MART-1	p10	MART-1 <sub>37-51</sub>	10	否
	前	TRP-1	p113	TRP-1 <sub>449-463</sub>	10	否
094-005	前	gp100	p93	gp100 <sub>369-384</sub>	10	否
094-006	前	MART-1	p8	MART-1 <sub>37-51</sub>	10	否
094-007	前	NY-ESO1	p43	NY-ESO1 <sub>169-183</sub>	10	否
094-009	前	NY-ESO1	p39/p40	NY-ESO1 <sub>169-183</sub>	10	临界
	前	TRP-1	p50	TRP-1 <sub>197-211</sub>	10	临界
094-010	后	NY-ESO1	p23	NY-ESO1 <sub>89-103</sub>	10	是
094-*013	后	NY-ESO1	p23	NY-ESO1 <sub>89-103</sub>	10	

图 28 是描绘了根据本发明评价的三名黑素瘤患者免疫应答的图。用 MART-1, gp100, NY-ESO1 和 TRP-1 重叠肽的转移性黑素瘤患者 (13 名个体) 获得的 PBMC 的 EPIMAX 分析产生了 16 个诱导 1 型应答的肽, 15 个诱导 0/2 型应答的肽和 9 个诱导 IL-10 型的肽。在培养的第 2 天测量细胞因子。各自显示了各个 T 细胞子集中的 IL-1 $\alpha$  和 IP-10 水平。每个点表示用鉴定的单个肽刺激这些个体 PBMC 培养物的各个分开孔中的细胞因子水平。该结果清楚地表明了 IL-1 $\alpha$  和 IP-10 在 1 型应答中完全相关。

图 29A-D 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。用编码 NY-ESO1 的肽簇或单个肽刺激从黑素瘤患者获得的 PBMC。显示了培养 48 小时时培养物上清液中的 IL-10 水平 (图 29A)。NY-ESO1 肽#39 和#40 是抗原决定部位。为了研究 IL-10 产生的来源, 在抗 CD28/CD49d mAb 和莫能菌素存在下用肽#39 刺激 PBMC 8 小时, 并用 IL-10 特异性 mAb 染色。如图 29B 中所示的, 约 0.11% 的 CD4+ T 细胞响应 NY-ESO1 肽#39 而产生了 IL-10。该结果表明了 EPIMAX 允许在黑素瘤患者中产生 IL-10 的黑素瘤抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞。

接着,为了评价该产生 IL-10 的 T 细胞是否具有调节特性,将 transwell 中的肽#39 或无关 15-mer 肽刺激的 PBMC 加入“第三方”MLR 中来测试通过这些可溶性介质的释放对 T 细胞扩展的抑制。为了避免肽特异性 T 细胞应答的影响,MLR 使用 CFSE 标记的 CD4<sup>+</sup> T 细胞和异源成熟 DC,这两种细胞都来自健康志愿者。用 NY-ESO1 肽#39 但没用对照肽刺激的个体 PBMC 显著抑制了 MLR 中的增殖(图 29C, 29D)。这些结果表明 EPIMAX 方法可以鉴定肿瘤抗原特异性调节 T 细胞。

图 30 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。用编码 NY-ESO1 的单个肽刺激两个不同时间点即 DC 接种前和 8 次 DC 接种后的与图 29A-D 中相同黑素瘤患者获得的 PBMC。显示了培养 48h 时培养物上清液中的细胞因子/趋化因子水平。该结果证明了在接种疫苗后 IL-10 型信号消失,表明在接种疫苗后 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生 IL-10 的功能丢失。这些结果证明了用 EPIMAX 测试通过 DC 疫苗调节 T 细胞应答的另一个实例。

图 31 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。我们已经在 7 名黑素瘤患者中鉴定了黑素瘤抗原中 9 个诱导 IL-10 型应答的不同抗原决定部位。用各个个体特异性鉴定的 15-mer 肽孵育从黑素瘤患者获得的 PBMC 48h。该图显示了通过用鉴定的 IL-10 型肽孵育抑制了自发 IP-10 的产生。这是用 EPIMAX 鉴定产生 IL-10 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞抑制功能的另一个证明。

图 32 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。显示了用鉴定的诱导 IL-10 的 15-mer 肽的各个 PBMC 培养物中的 IL-1 $\beta$  和 IP-10 水平。每个点表示用鉴定的唯一单个 15-mer 肽的 PBMC 培养物中各个分开孔中的细胞因子水平。该结果显示了在鉴定的 IL-10 型应答中 IL-1 $\beta$  和 IL-10 相关,因此两种细胞因子在 EPIMAX 中是鉴定 IL-10 型细胞的良好标记。

图 33 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图。将从三名正常健康志愿者获得的新鲜 PBMC 分成 3 批。用编码流感病毒基质蛋白质(Flu-MP)的 15-mer 重叠肽簇刺激各批的 PBMC,重复两份( $2 \times 10^5$  细胞/孔,每个肽 10 $\mu$ M),因此形成 6 褶样品。显示了培养 48h 时的 IP-10 水平。黑条和阴影表示没有用肽的培养物中的

IP-10 平均 $\pm 3SD$  值。测定 IP-10 水平超过该背景的平均 $+3SD$  对响应肽簇诱导 IP-10 是阳性的。正常捐献者#1 中, 12 个肽簇中的 9 个评价为阳性, 高于 6 褶样品中的 4 个, 表明该捐献者具有非常广泛的 Flu-MP 特异性 T 细胞所有组成部分。相反, 正常捐献者#3, 没有簇诱导 IP-10 的上调。EPIMAX 允许鉴定对抗给定抗原蛋白的全部宽度 T 细胞应答。此外, 该研究显示了 EPIMAX 是高度可再现的测试。

图 34 是根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图。显示了图 33 中所示相同研究中的 IL-6 和 IP-10 水平。惊人地, 在正常捐献者#3 中, 没有鉴定出 IP-10 产生, 但许多肽簇对于 IL-6 产生评分为阳性。该结果证明了显示在 EPIMAX 中不同系列细胞因子的测量可以鉴定不同 T 细胞子集的实例。

图 35 是根据本发明评价的正常健康捐献者免疫应答的图。显示了图 33 中所示研究中的 IL-1a 和 IP-10 水平。每个点表示用肽簇的 PBMC 培养物中各个分开孔中的细胞因子水平。在所有捐献者中, EPIMAX 中的 IL-1a 和 IP-10 水平非常相关, 证实了这两个标记在 1 型应答中完全相关。

图 36 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图。将从捐献者#1 获得的冷冻 PBMC 融化, 并用编码 Flu-MP 的 15-mer 肽簇或单个肽刺激。显示了 IL-1a 和 IP-10 的水平。每个点表示用肽簇或单个肽的 PBMC 培养物中各个分开孔中的细胞因子水平。即使用冷冻的 PBMC, IL-1a 和 IP-10 的水平非常相关 ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.9121$ ), 表明这两个标记可以用于鉴定 EPIMAX 中的 1 型应答, 不管 PBMC 是新鲜或冷冻获得的。

图 37 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图。用编码 Flu-MP 的 15-mer 肽簇刺激从捐献者#1 获得的新鲜或冷冻 PBMC。显示了 IL-1a 和 IP-10 的水平。如图 37 中所示的, 簇#6 和#12 都诱导了新鲜和冷冻 PBMC 中 IL-1a 和 IP-10 的上调。该研究证明了冷冻 PBMC 可以用于使用 EPIMAX 来监控抗原特异性 T 细胞应答。

图 38A, 38B 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图。将从捐献者#1 获得的冷冻 PBMC 融化并用编码 Flu-MP 的肽簇或单个肽在 6-褶中刺激 ( $2 \times 10^5$  细胞/孔,  $10 \mu M$  每个肽)。显示了培养 48 小时时的 IP-10 水平 (图 37A)。另一个研究中, 用相同浓度

的 15-mer 肽刺激较高数量的 PBMC ( $2 \times 10^6$  细胞/孔), 重复三份。如图 37B 中所示的, 尽管在两个研究中, 肽#58 和#59 启动了 IP-10 产生, 样品和对照培养物之间的反差更高, 其中 EPIMAX 中使用了更高的 PBMC/孔。因此, 每孔较高数量的 PBMC 有助于降低 EPIMAX 测试中的可变性和敏感性。鉴于 PBMC 中抗原特异性 T 细胞的低频率 (通常  $10^5$  PBMC 中 1 个), 似乎合理的是当少数细胞响应肽刺激时, 用 EPIMAX (或实际上任何种类的测试) 不可以检测细胞应答。因此, 常规 EPIMAX 测试中, 我们使用  $5 \times 10^5$  PBMC/孔。

图 39A 和 39B 是描绘了正常健康志愿者对抗 EPIMAX 测试中鉴定的肽的免疫应答的图。将 PBMC 以  $1 \times 10^6$  细胞/ml 重悬浮于 CM 中, 并将 1ml 细胞悬浮液放入培养管中, 并用 Flu-MP 文库的所示单个肽刺激 7 天。收集培养的 PBMC 并用所示肽脉冲的 DC 在莫能霉素的存在下再次刺激 5h。细胞渗透后, 用特异性 mAb 检测细胞质内的细胞因子。显示了  $CD3^+CD4^+$  T 细胞群中产生细胞因子的细胞百分比 (图 39A)。用显性肽的刺激诱导了特异性  $CD4^+$  T 细胞的增殖。首先用 1mM CFSE 将捐献者的 PBMC 染色。将 PBMC 以  $1 \times 10^6$  细胞/ml 重悬浮于 CM 中, 并将 1ml 细胞悬浮液放入培养管中, 用 Flu-MP 文库的所示单个肽刺激 6 天。用抗 CD3 和 CD4 mAb 将刺激的细胞染色, 并用流式细胞计数器基于 CFSE 稀释来分析  $CD4^+$  T 细胞增殖。显示了  $CD3^+CD4^+$  T 细胞群中的 CFSE-细胞百分比 (图 39B)。这些结果证明了 EPIMAX 允许鉴定功能 Flu-MP 特异性  $CD4^+$  T 细胞的抗原决定部位的证据。

图 40 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图。从图 33 中的捐献者#2 获得 PBMC。将冷冻的 PBMC 融化并用 Flu-MP 簇#11 或簇#11 内的单个 15-mer 肽刺激 ( $5 \times 10^5$  细胞/孔,  $20 \mu\text{M}$  每个肽)。显示了培养 48h 时细胞因子的含量。这些结果表明肽#52 和#53 是 Flu-MP 特异性 T 细胞的抗原决定部位, 显示了鉴定特异性  $CD4^+$  T 细胞的新抗原决定部位的另一个实例。

图 41A, 41B 是描绘了正常健康个体对抗 EPIMAX 测试中鉴定的肽的免疫应答的图。用 CFSE 标记图 40 研究中所用的 PBMC, 并用 Flu-Mp 簇#11 内的单个肽刺激。在培养第 8 天分析 CFSE 稀释的  $CD4^+$  T 细胞 (图 41A)。另一个研究中, 在培养第 6, 7, 8 和 10 天分析 CFSE-

稀释的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群 (图 41B)。这些研究证明了用 EPIMAX 鉴定的肽 (Flu-MP 肽#52 和#53) 诱导了肽特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖, 且增殖的 CD4<sup>+</sup> T 细胞群在肽刺激的第 7 或 8 天达到峰值。该研究显示了鉴定特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞新抗原决定部位的另一个实例, 并验证了在培养的第 8 天进行增殖 CD4<sup>+</sup> T 细胞群的分析是有效的。

图 42 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图。从未经受 DC 接种的黑素瘤患者获得 PBMC。个体接受装载杀灭的异源黑素瘤细胞系的自源 DC 疫苗。可能的是 DC 疫苗诱导了该个体中在用于 DC 疫苗的异源黑素瘤细胞系上表达的异源抗原特异性的 T 细胞。为了检测这种可能性, 用编码 HLA-B\*4001 的 15-mer 重叠肽刺激个体的 PBMC, HLA-B\*4001 在黑素瘤细胞系上表达, 但在个体细胞上表达。如图 42 中所示的, 簇#1 内的肽#5 和肽#7 诱导了 PBMC 培养物中的 IP-10 产生。如所期待的, 这两个抗原决定部位对于个体是抗原决定部位, 因为两个肽都含有氨基酸错配。这些结果证明 EPIMAX 可以鉴定异源抗原特异性 T 细胞应答。因此该方法可以用于鉴定器官移植环境中的异源抗原特异性 T 细胞。

图 43 是描绘了根据本发明评价的 1-型糖尿病个体免疫应答的图。从服用免疫抑制药物如骁悉 (cellcept) 和泼尼松龙 (Predonisolone) 的 1 型糖尿病个体获得 PBMC。用编码 IA-2 的单个 15-mer 肽刺激新鲜的 PBMC ( $5 \times 10^5$  细胞/孔), IA-2 十一种在  $\beta$ -胰岛细胞上特异性表达的自体抗原。显示了培养 48h 时的 IP-10 水平。15-mer 肽#47, 60, 61, 62, 64 和 66 诱导了 PBMC 培养物中 IP-10 产生的上调。

该研究证明了该个体具有宽的 IA-2 特异性 1 型细胞的所有组成部分。此外, 6 个中的 5 个 (肽#47, 60, 61, 62 和 66, 序列显示于表 4 中) 是 T 细胞的新抗原决定部位。因此, 该研究表明 EPIMAX 允许我们鉴定自身免疫性疾病模型中的抗原决定部位和 T 细胞应答类型, 甚至在免疫抑制药物的药物治疗下。

肽#47	IA-2 <sub>789-803</sub>
肽#60	IA-2 <sub>841-855</sub>
肽#61	IA-2 <sub>845-859</sub>
肽#62	IA-2 <sub>849-863</sub>
肽#64	IA-2 <sub>857-871</sub>
肽#66	IA-2 <sub>865-879</sub>

图 44A 和 44B 是描绘根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定各种类型的免疫应答。用 survivin 肽文库的 5 个肽簇（7-8 个肽/簇）孵育接种疫苗前黑素瘤患者获得的 PBMC。Survivin 簇#3 诱导 IP-10 的下调和 IL-10 的上调。然后用簇#3 的单个肽孵育 PBMC 来鉴定该负责的肽，肽#15。IL-10 的上调与 IL-1b 相关。图 44A 和 44C 显示了关于 IP-10 的数据，图 44B 和 44D 显示了关于 IL-10 的数据，图 44E 和 44G 显示了关于 IL-1 $\alpha$  的数据，和图 44F 和 44H 显示了关于 IL-1 $\beta$  的数据。

图 45 是描绘了根据本发明评价的正常健康志愿者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答。从 5 名健康志愿者新鲜血液中分离 PBMC，用 survivin 肽#15 孵育 48 小时并根据本发明的方法来评价。测量培养物上清液中产生的 IP-10，并以相对于其中没有加入肽的培养物的值（%）给出了图 45 中的数据。Survivin 肽#15 显示出在全部五名志愿者中以非 MHC 限制方式抑制 IP-10 产生。

图 46A 和 46B 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答。在 survivin 肽#15 和/或活流感病毒（Charles River Laboratories, CT）存在或不存在下将黑素瘤患者的 PBMC 培养 18 小时。用 Luminex 测量 IP-10（图 46A）和 IL-10（图 46B）的浓度。显示出 Survinin 肽#15 抑制活流感病毒刺激的 PBMC 的 IP-10 产生。

图 47 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图，其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答。在 survivin 肽#15 或肽#16（11 个氨基酸与肽#15 相同）的存在下用滴定浓度的 TSST-1

刺激黑素瘤患者的 PBMC 5 天。5 天后,加入滴定的胸腺嘧啶核苷(1 $\mu$ Ci/孔)。16 小时后收集平板,并通过 Wallac 闪烁计数器来测量结合的放射性。显示出 survivin 肽#15 抑制 TSST-1 刺激的 T 细胞增殖。

图 48A-48D 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图,其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答。使用缀合各自 mAb (Miltenyi) 的微珠子来耗尽黑素瘤患者 PBMC 中的 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, BDCA-4<sup>+</sup>, 或 BDCA-1 或 3<sup>+</sup> 细胞。作为阴性对照,将 PBMC 通过没有任何珠子的柱子(没有消耗)。将耗尽的细胞以 1M/ml 重悬浮于 CM 中,并在 survivin 肽#15 存在或不存在下用活流感病毒刺激。在 48 小时收集上清液,并用 Luminex 分析 IL-10 和 IP-10 水平。数据表明 CD14<sup>+</sup> 或 CD56<sup>+</sup> 细胞是肽#15 诱导 IL-10 分泌必需的。

图 49A 和 49B 是描绘了根据本发明评价的黑素瘤患者免疫应答的图,其允许鉴定由非 T 细胞引起的各种类型的免疫应答。用 5 $\mu$ M CFSE 将黑素瘤患者的 PBMC 染色,并用 10 $\mu$ M survivin 肽#15 (图 49B) 或对照肽#6 (图 49A) 培养 4 天。用 FACS 分析 NK 群。那些 CD56<sup>+</sup> 细胞没有降低 CFSE 的强度,表明它们没有增殖(未显示)。因此,表明肽#15 维持了 CD3-CD56<sup>+</sup> NK 细胞的存活。

可以理解通过说明而非限制本发明的方式显示了在此所述的特定实施方案。本发明的主要特征可以用于各种实施方案中而没有脱离本发明的范围。本领域技术人员使用不多于常规的实验将认识到或能够确定在此所述特定方法的各种等价物。认为这样的等价物在本发明范围内并由权利要求来涵盖。

说明书中提及的所有出版物和专利申请表示本发明所属领域技术人员的水平。所有出版物和专利申请在此引入作为参考,达到好像各个单独的出版物或专利申请特意和单独表明来引入作为参考的相同程度。

根据本发明的公开内容不需要过度的实验就可以形成和实施在此所公开和要求的组合物和/或方法。尽管根据优选的实施方案已经描述了本发明的组合物和方法,本领域技术人员清楚可以将改变应用于组合物和/或方法以及在此所述方法的步骤或连续步骤中而没有脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地,清楚的是化学和生理学都相

---

关的特定试剂可以取代在此所述的试剂，同时可以获得相同或相似的结果。认为所有这样本领域技术人员清楚的相似替代物和改变在所附权利要求限定的本发明的精神、范围和概念内。

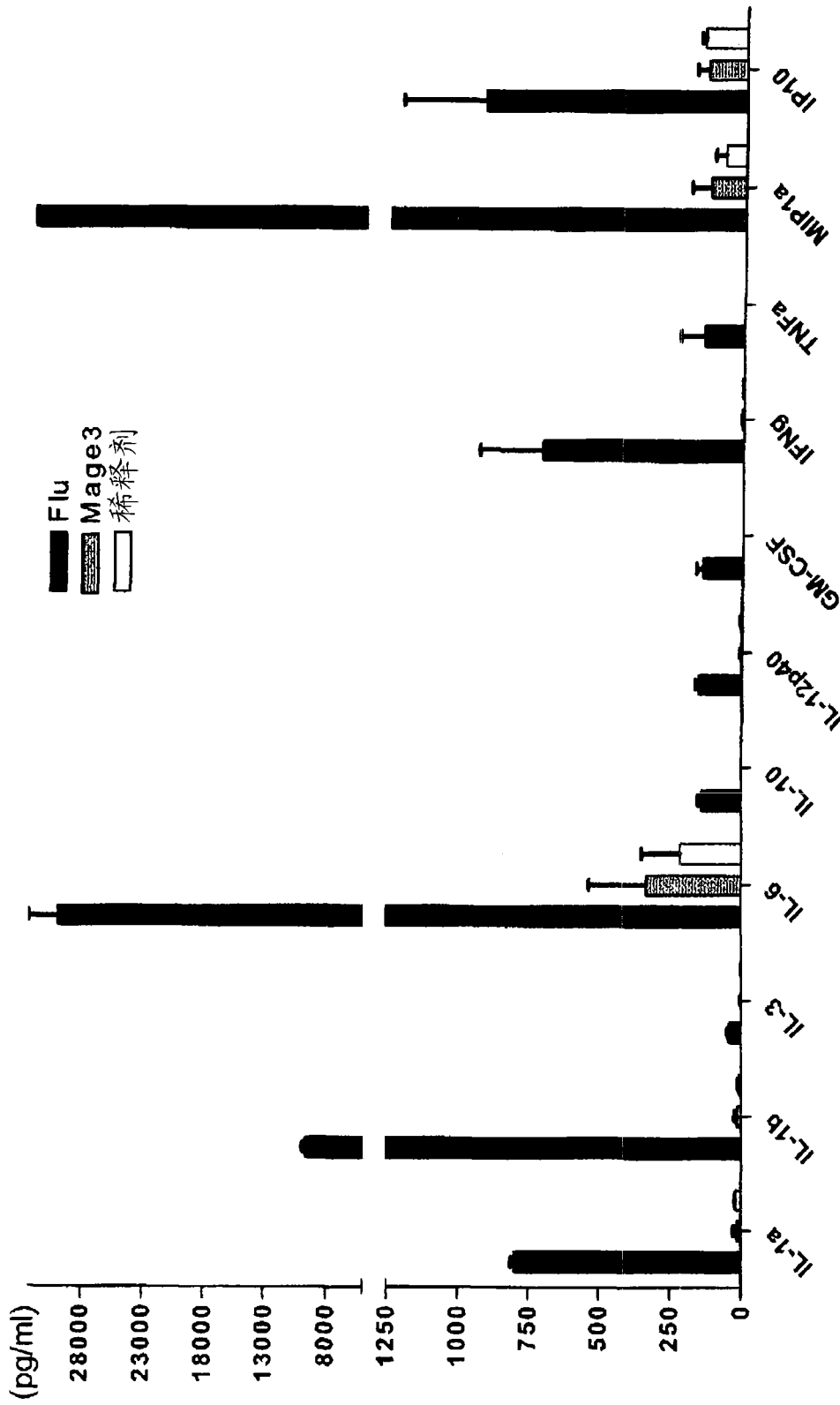


图 1

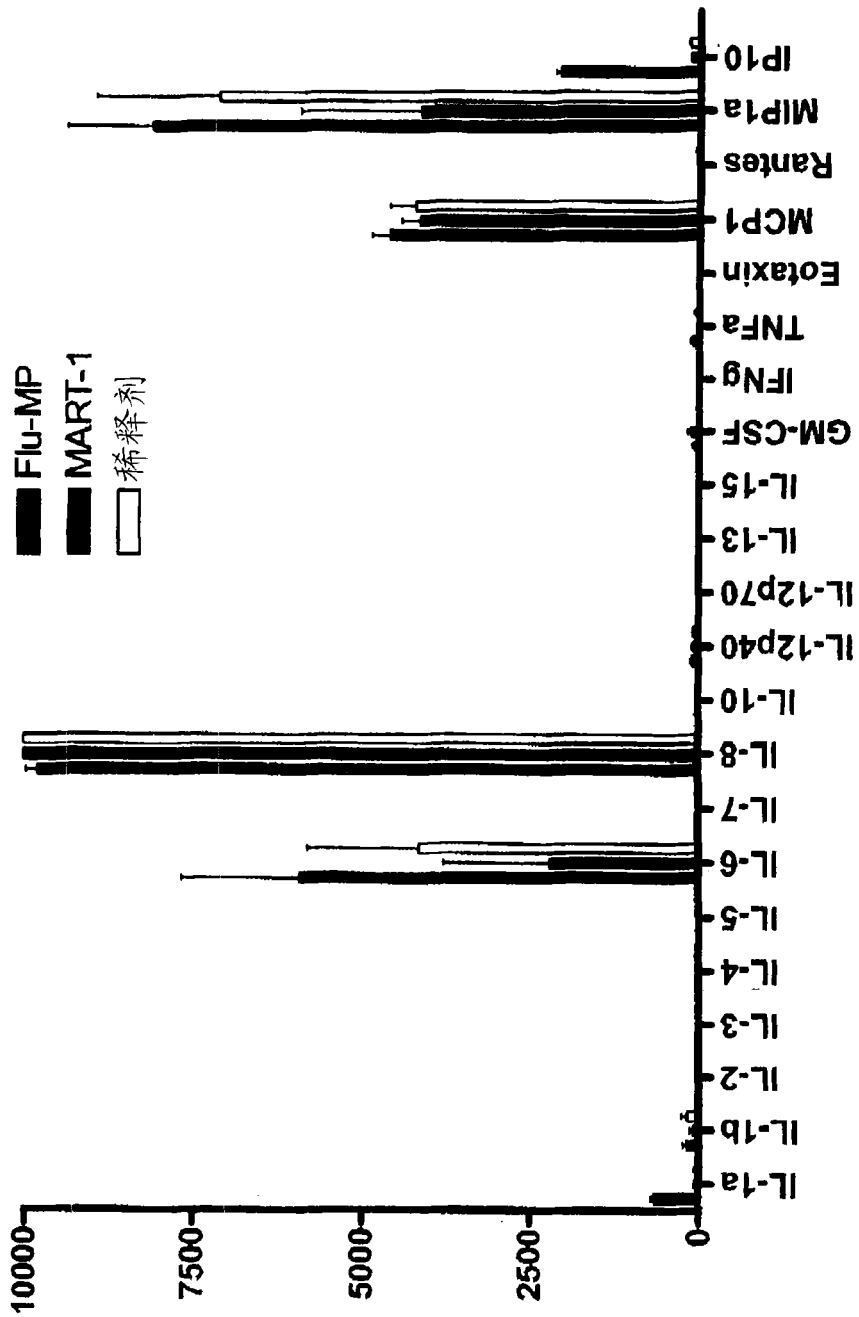
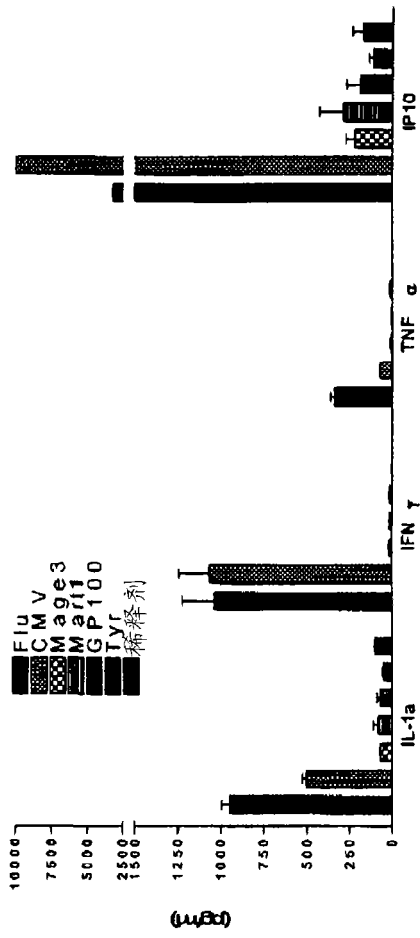
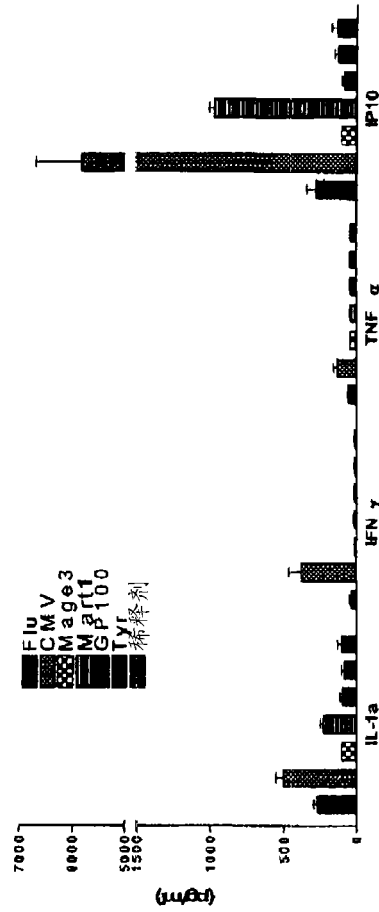


图 2

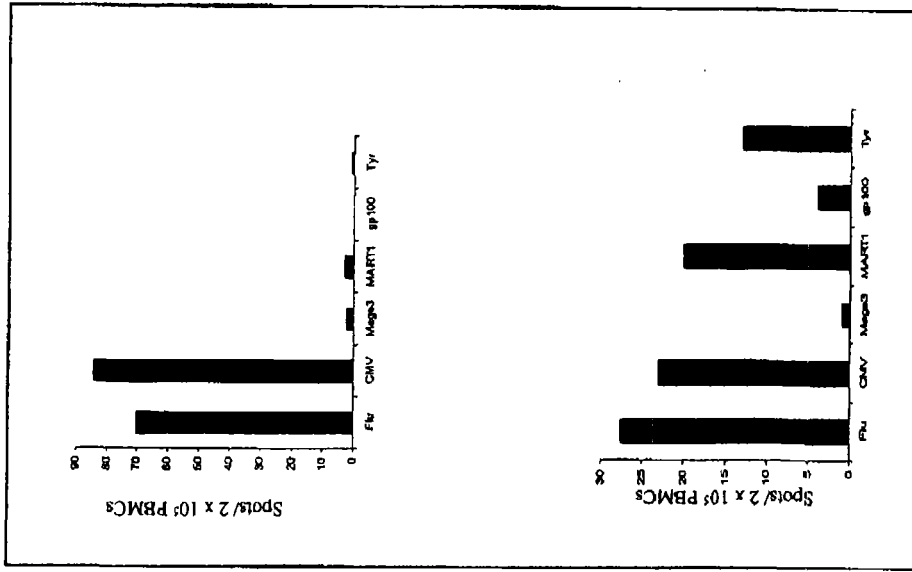
患者1



患者2



直接的IFN-gamma ELISPOT



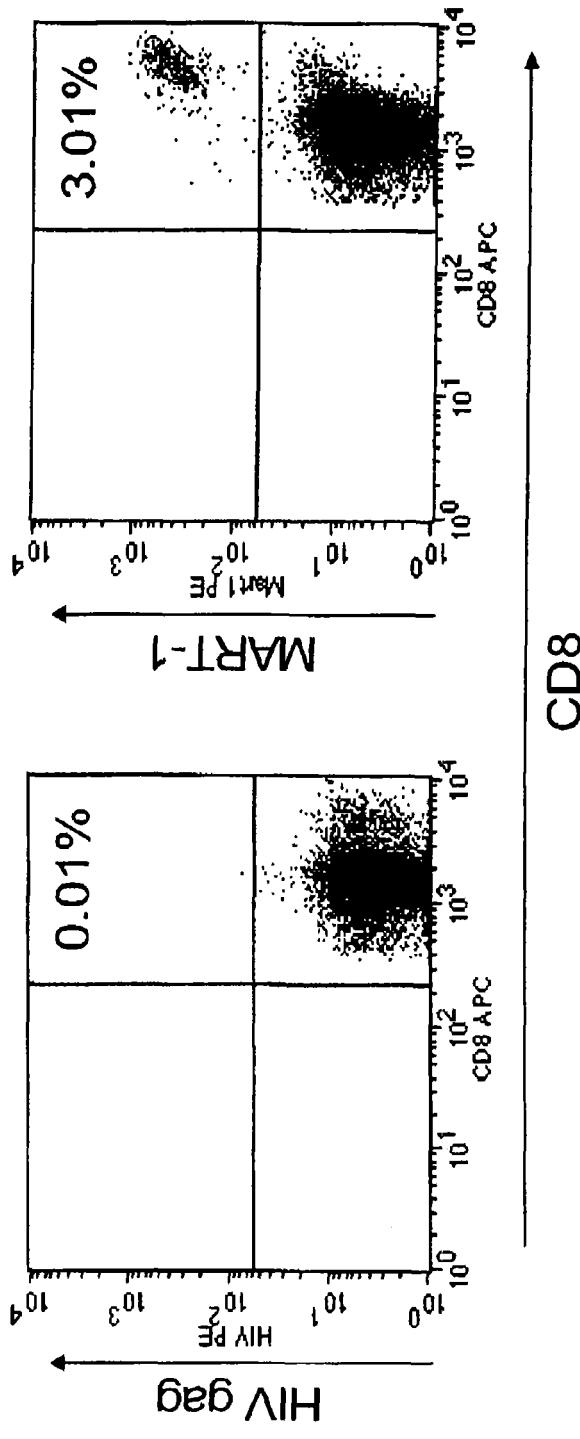


图 4A

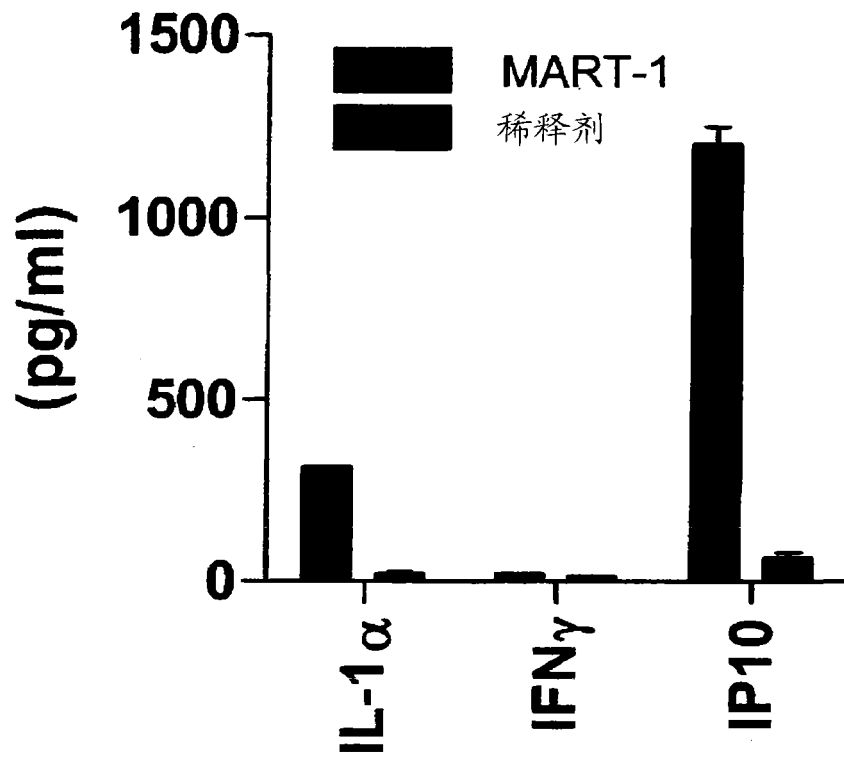


图 4B

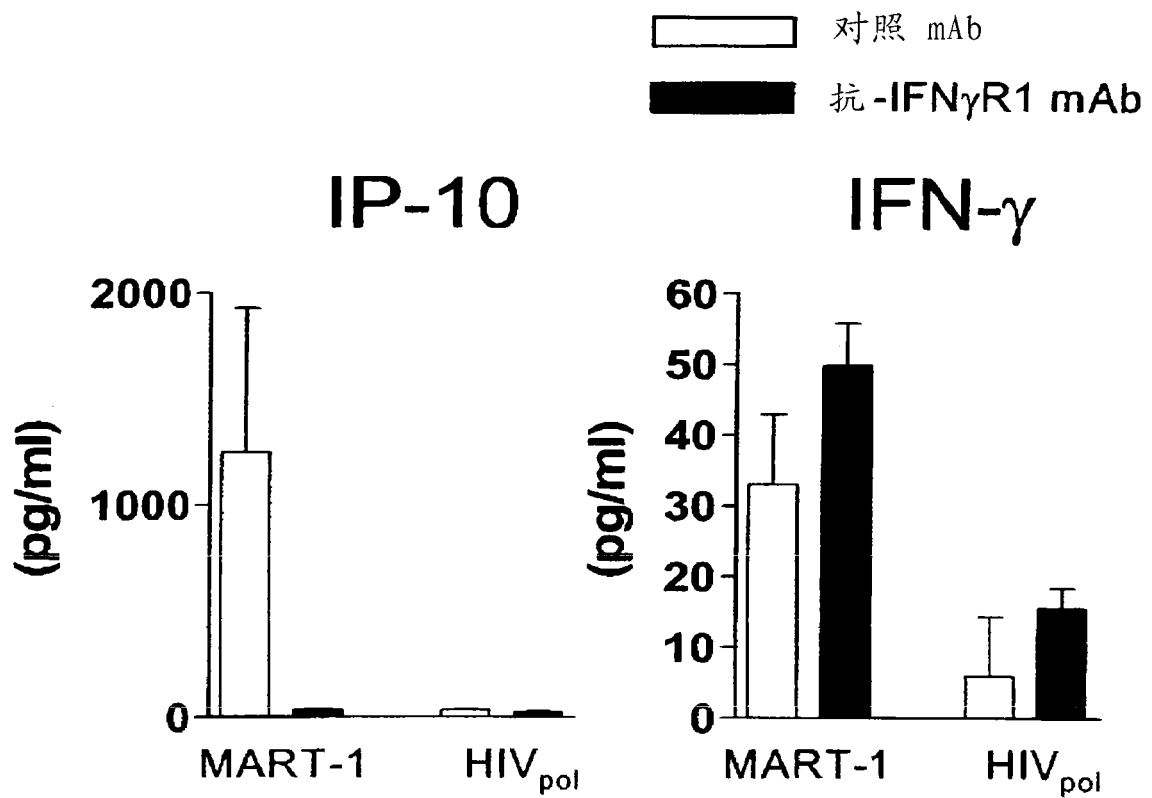


图 4C

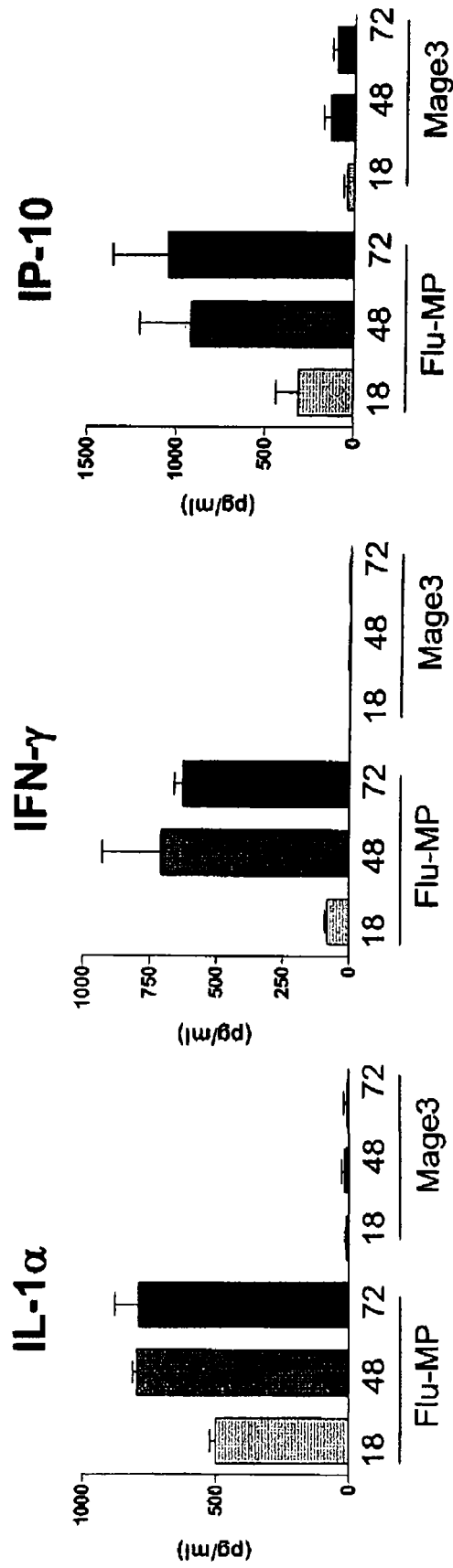


图 5

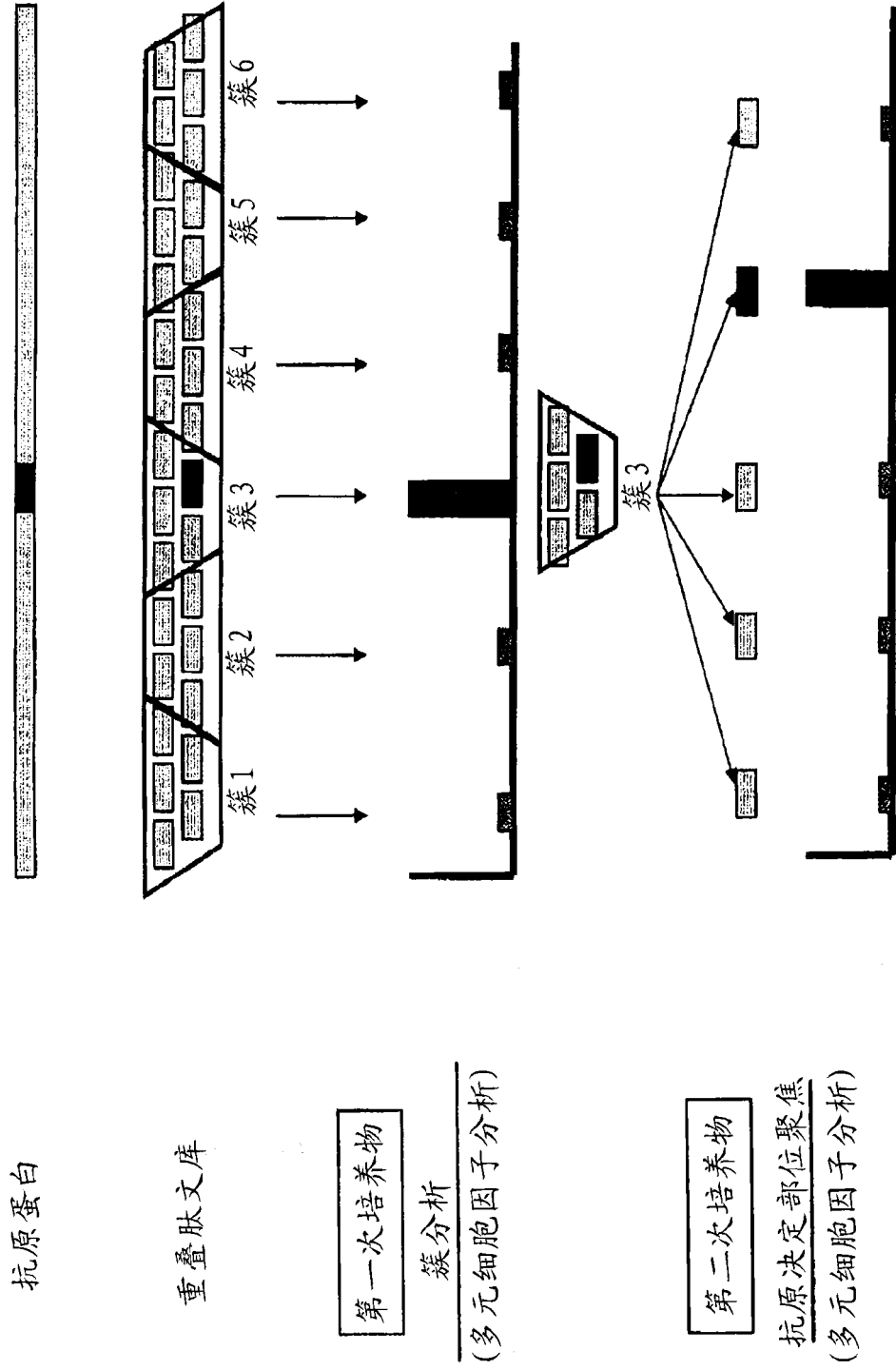
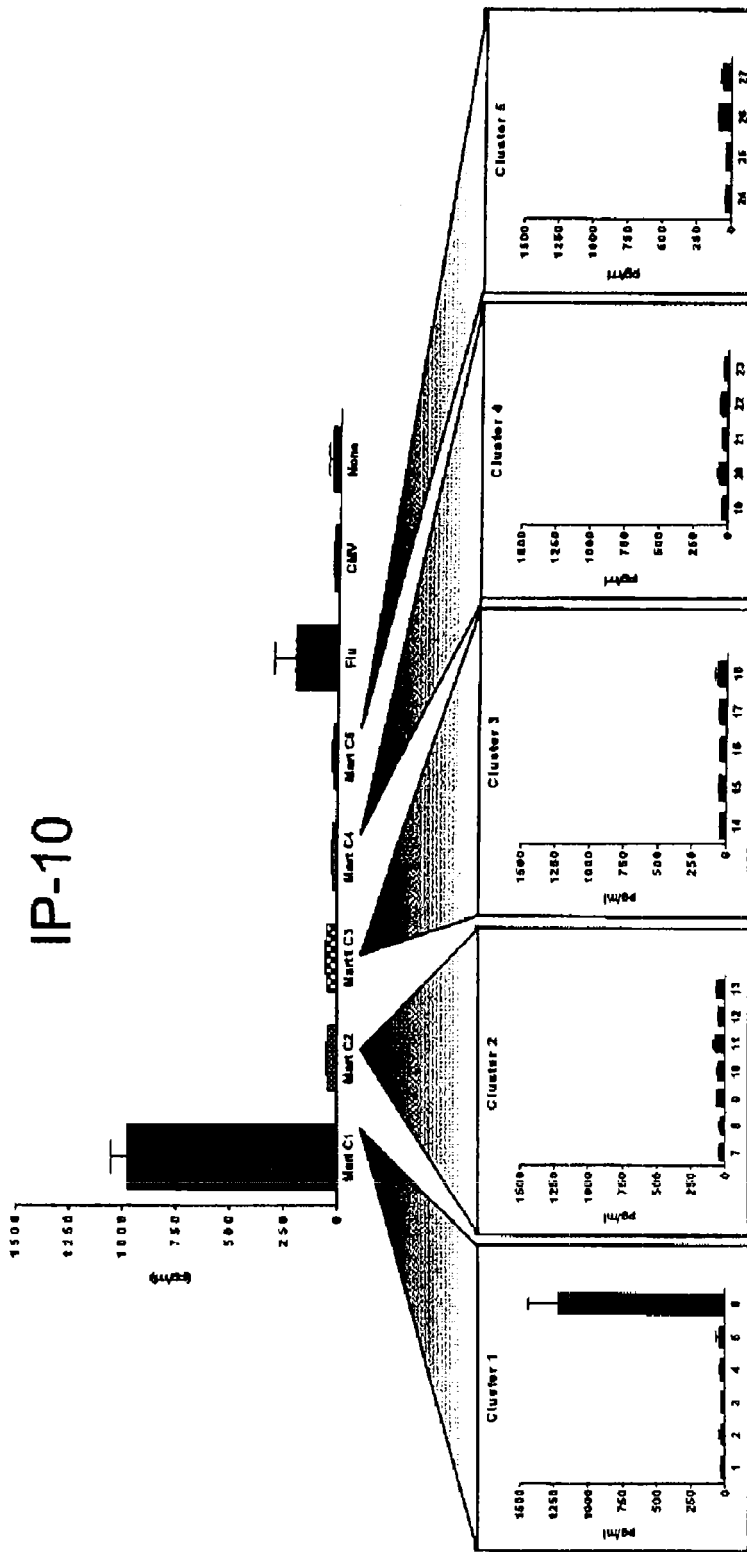


图 6



MART-1肽#6含有MART1 A2显性抗原决定部位AAGIGIL TV (27-35)

图 7

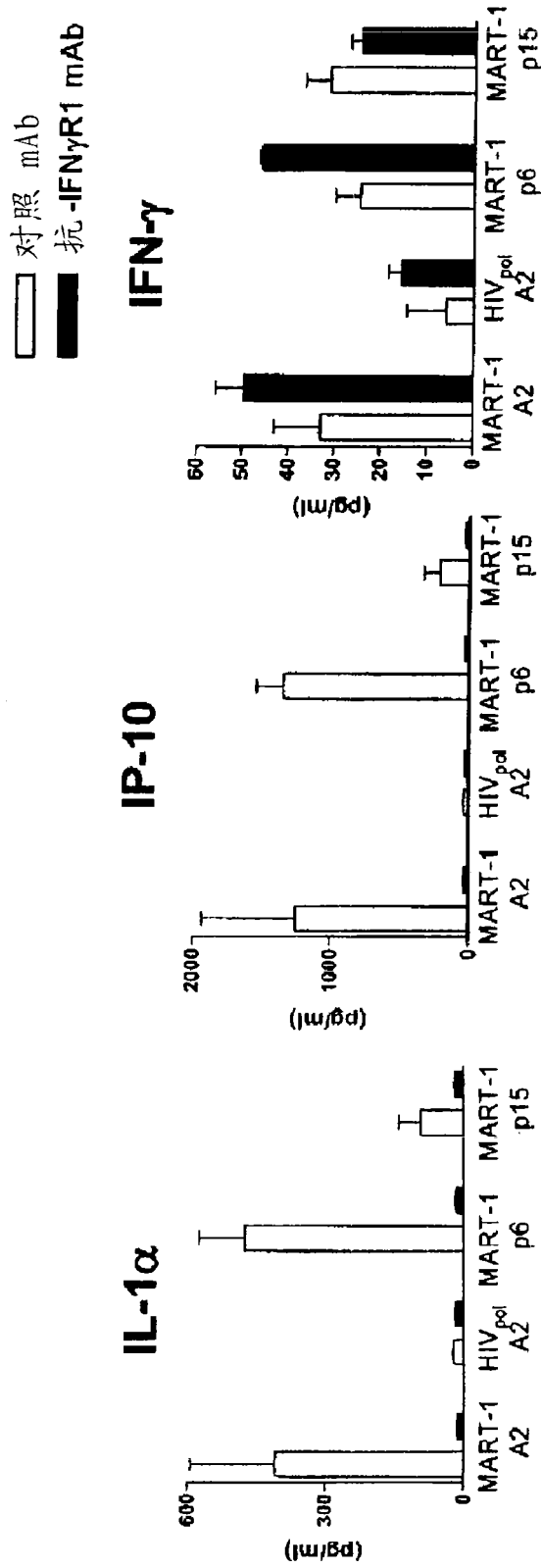


图 8

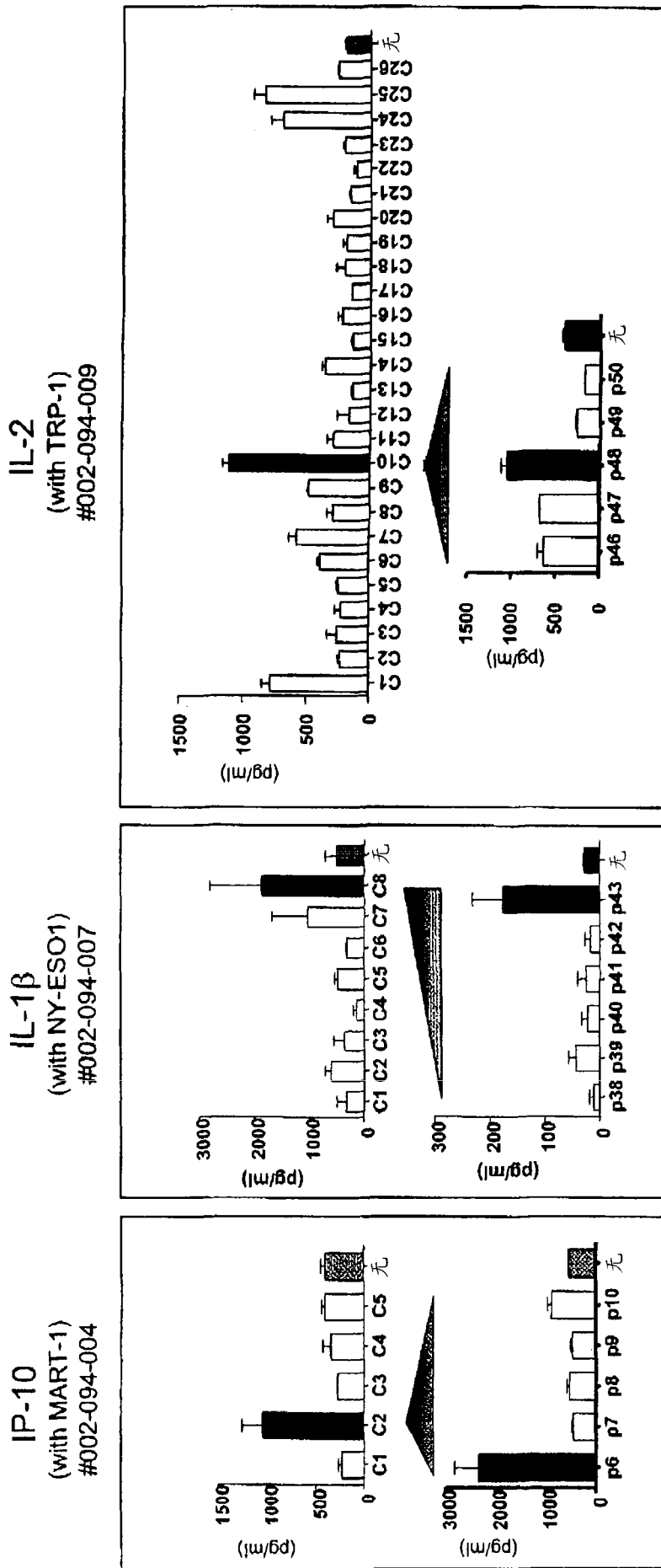


图 9

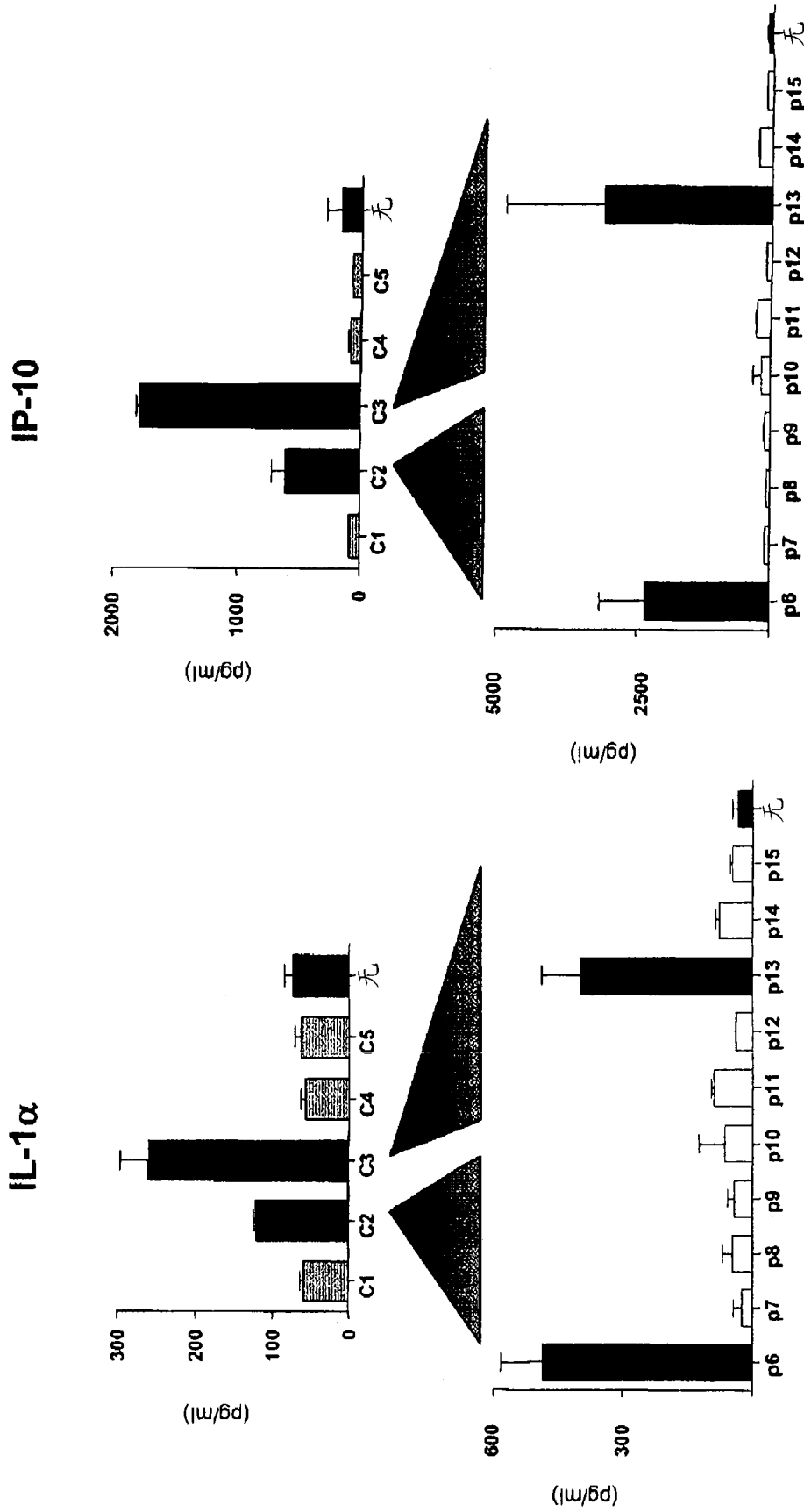


图 10

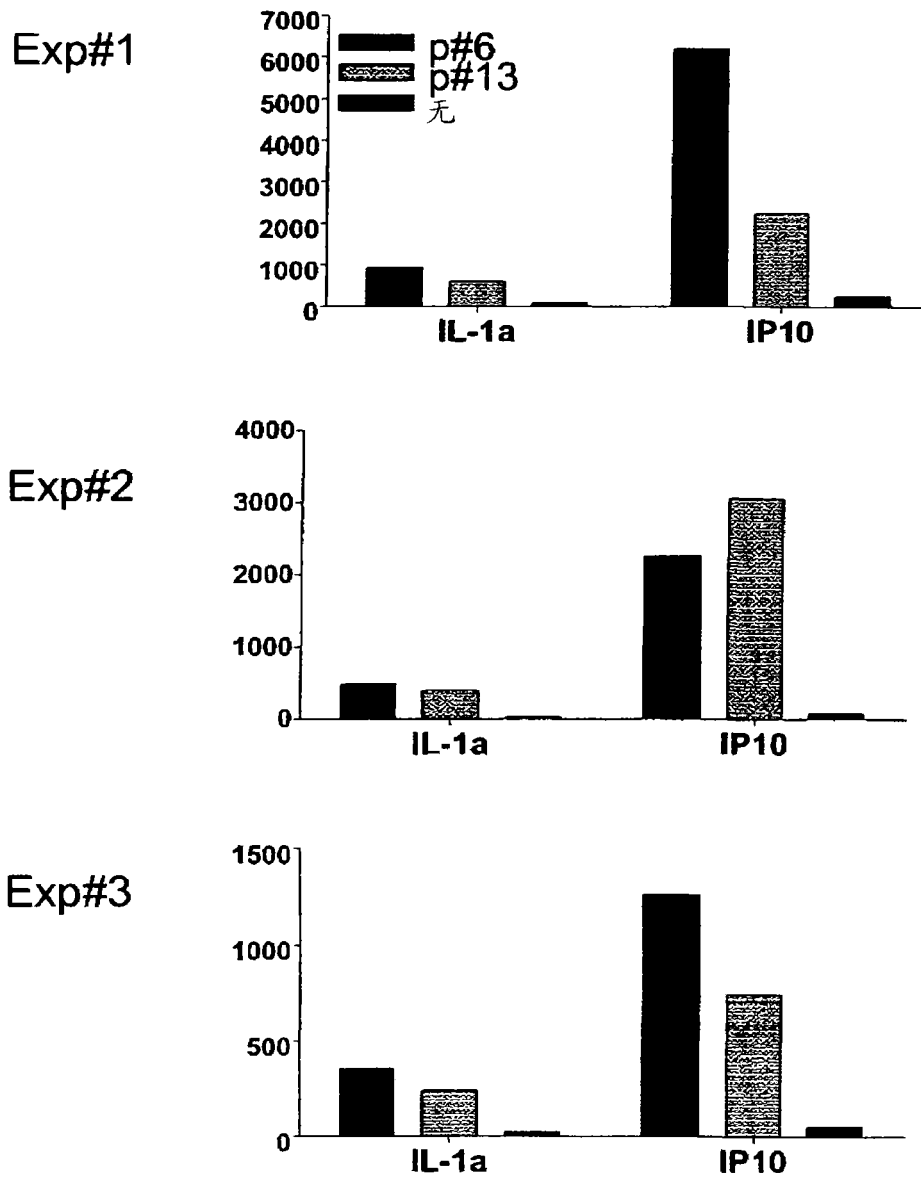


图 11

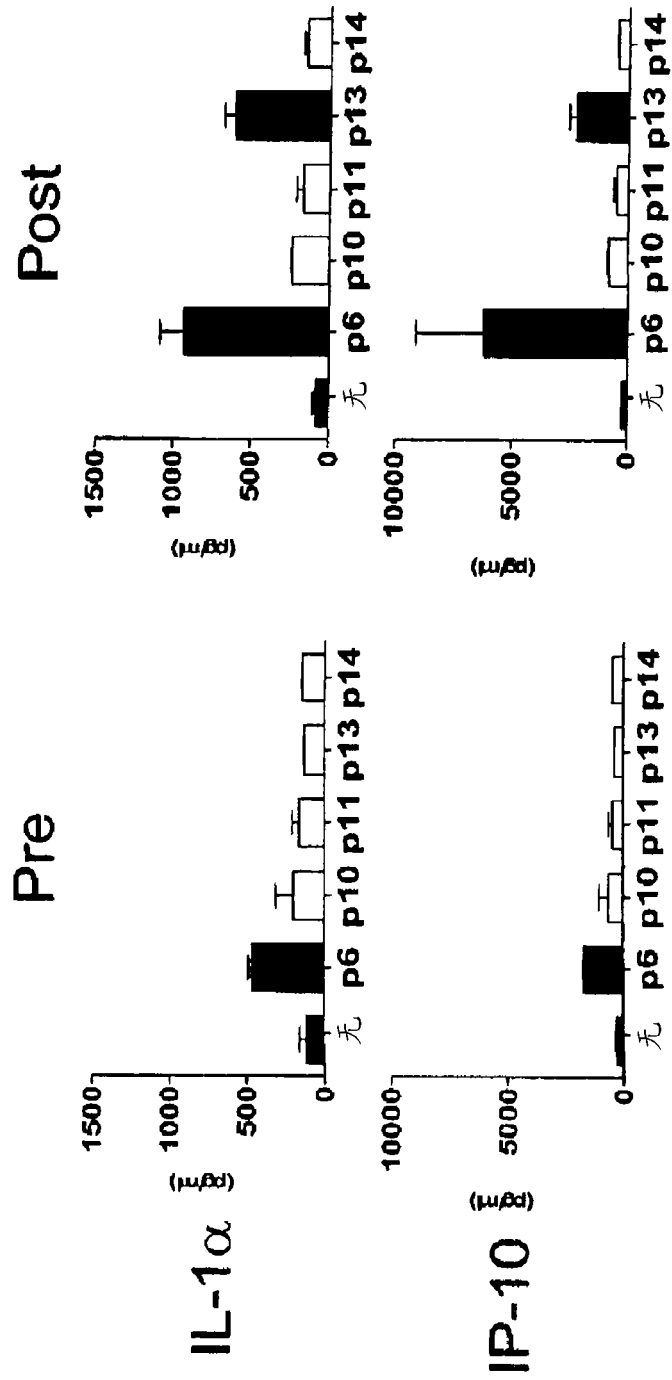


图 12A

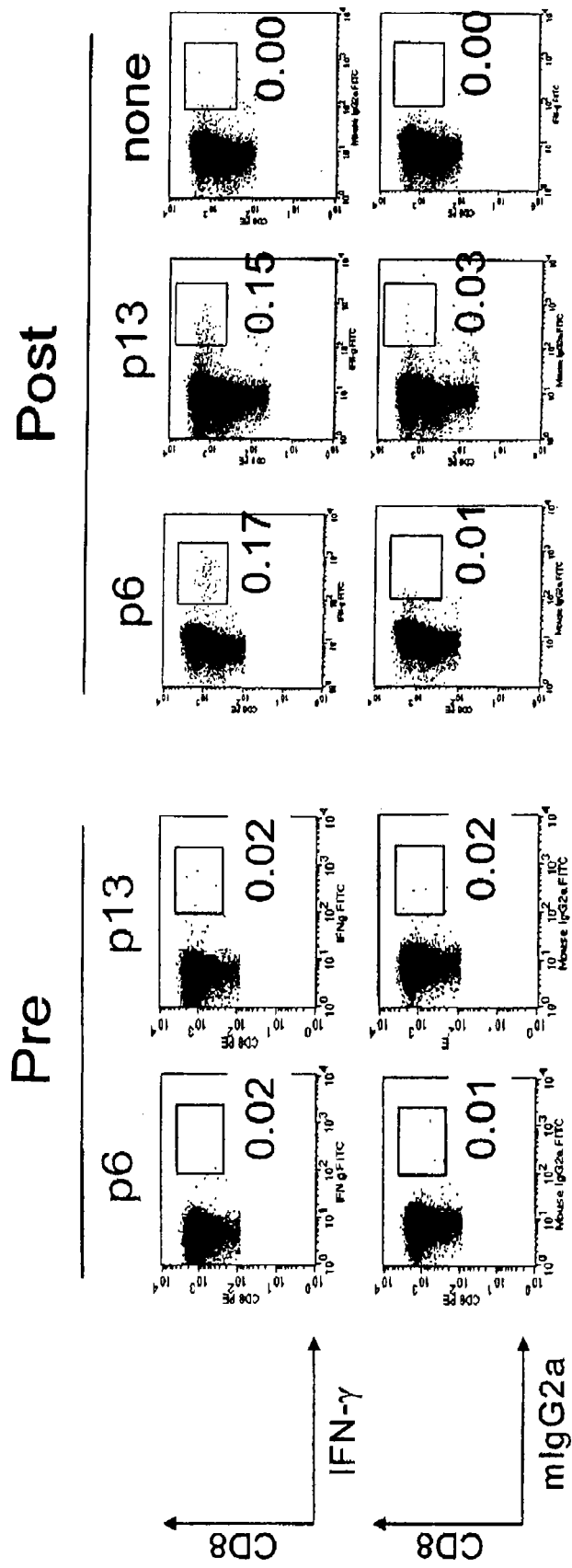


图 12B

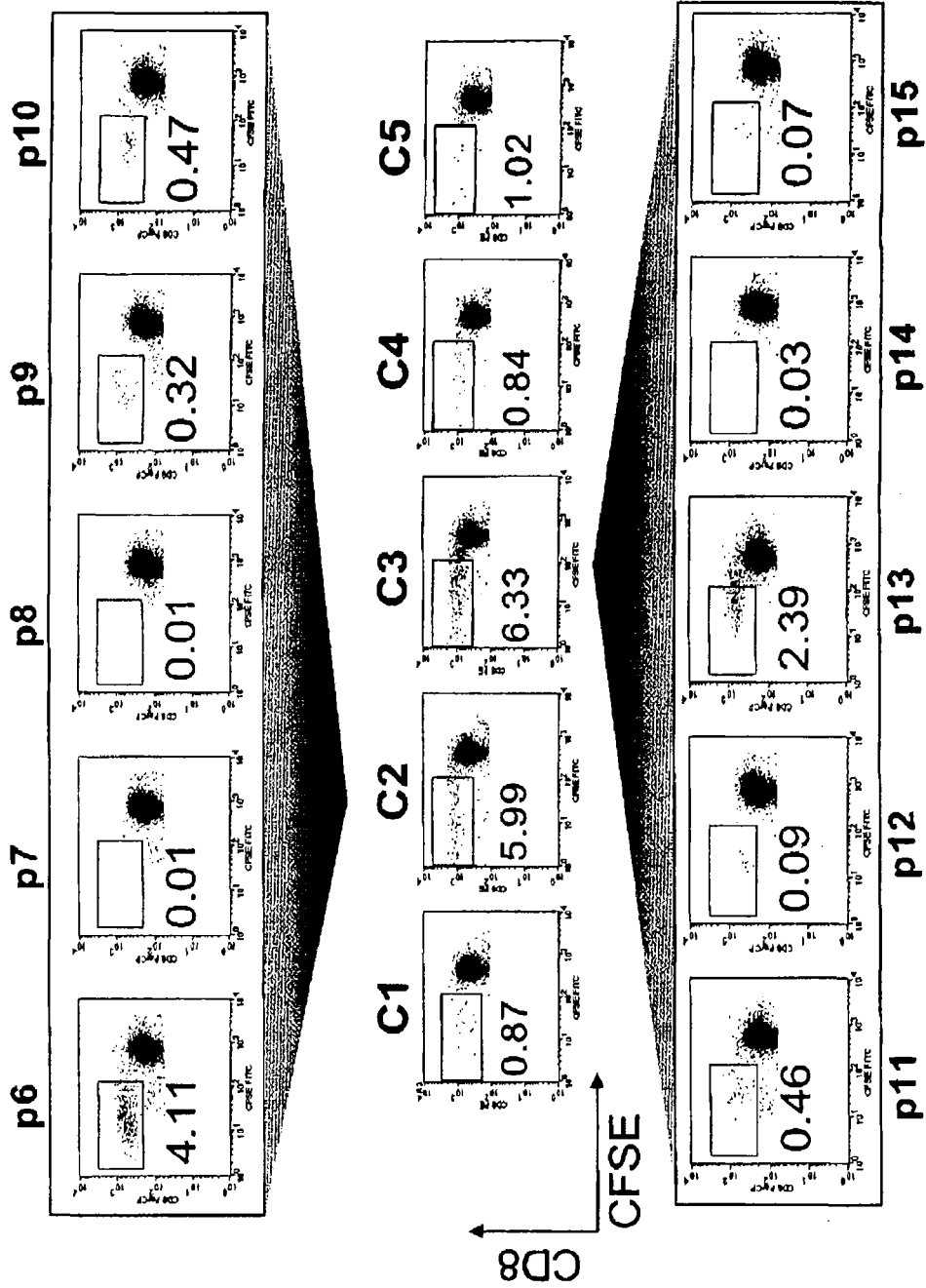


图 13

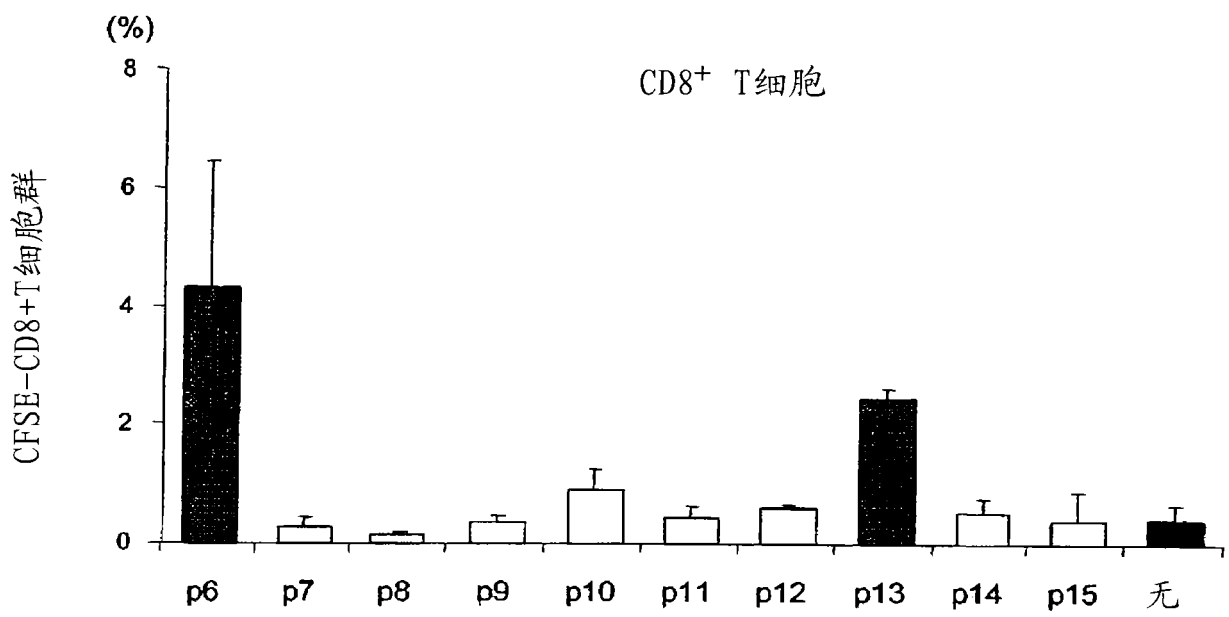


图 14



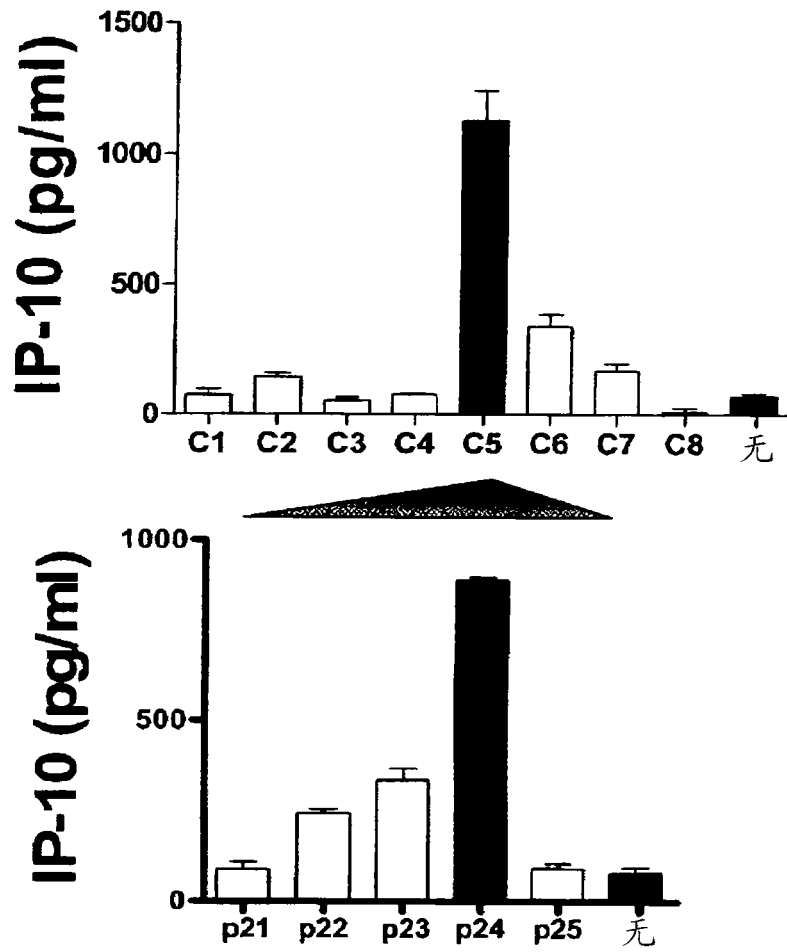


图 16A

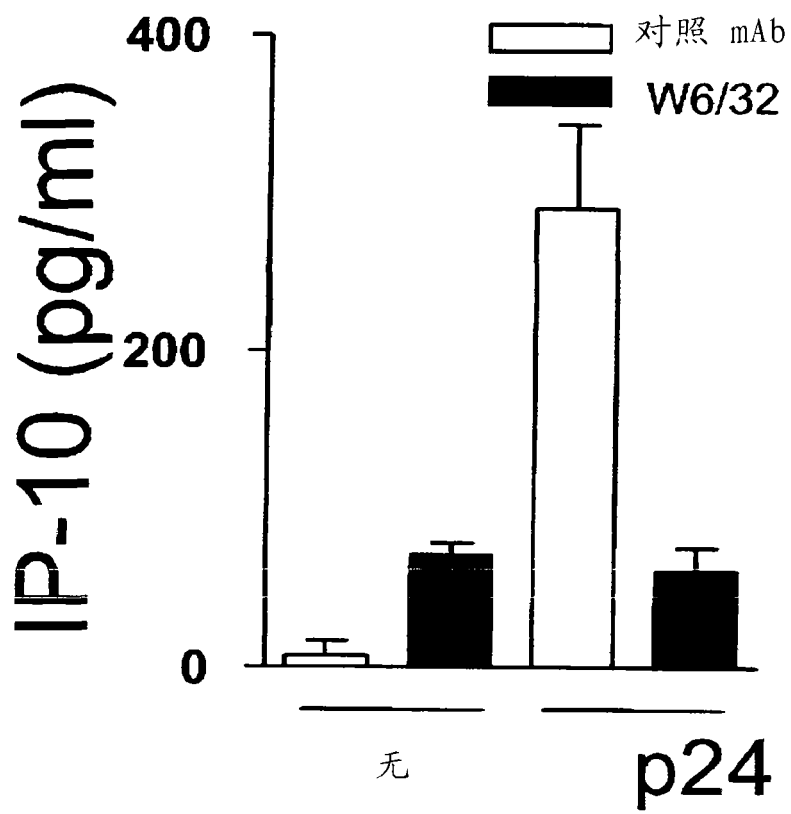


图 16B

93 NY-ESO1 p24 107



A	M	F	A	T	P	M	E												
	M	P	F	A	T	P	M	E	A										
		P	F	A	T	P	M	E	A	E									
			F	A	T	P	M	E	A	E	L								
				A	T	P	M	E	A	E	L	A							
					T	P	M	E	A	E	L	A	R						
						P	M	E	A	E	L	A	R	R					

无

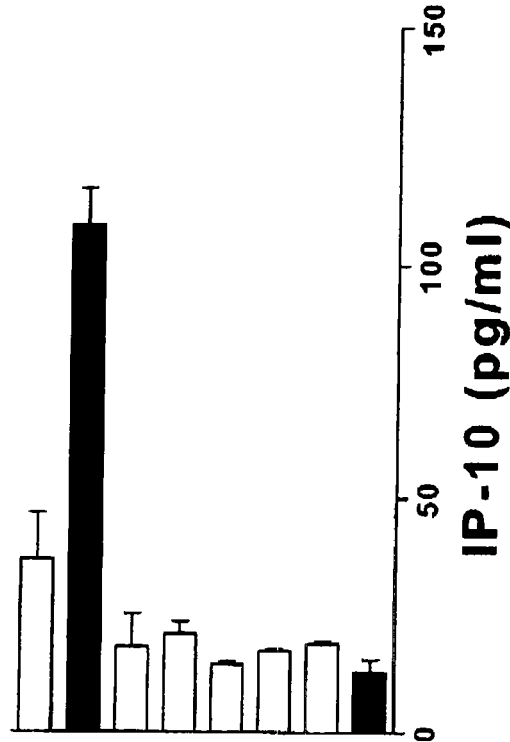


图 16C

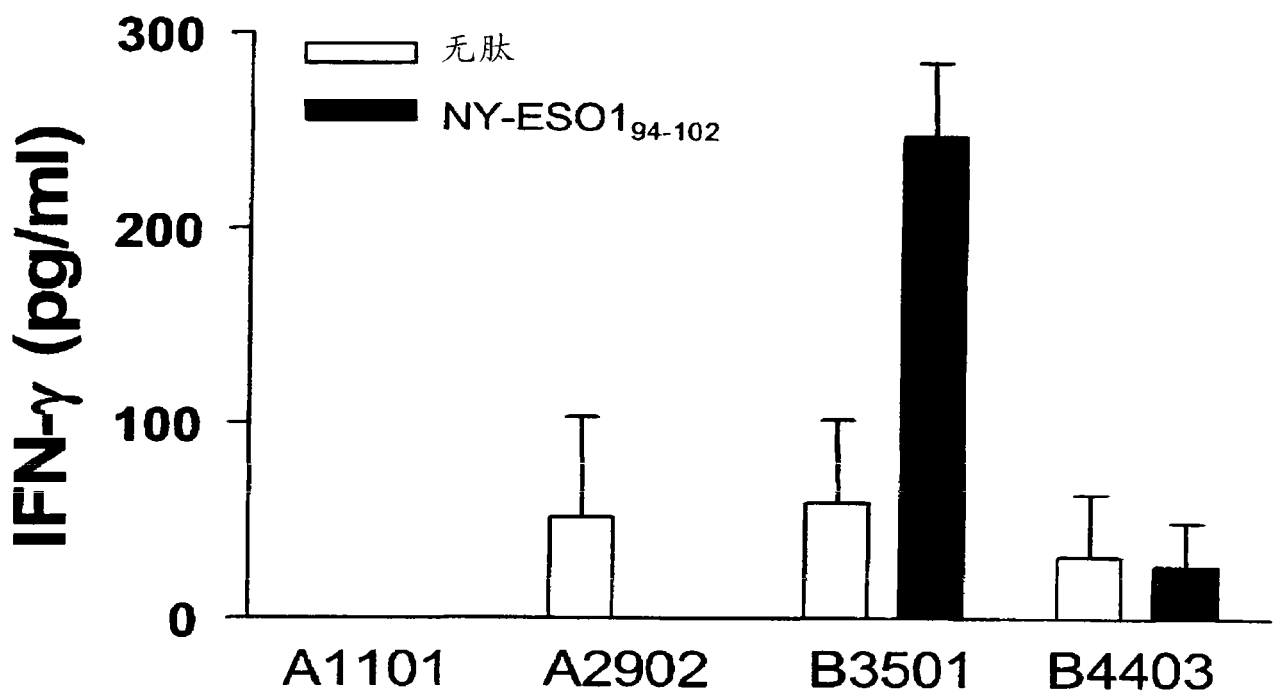


图 16D

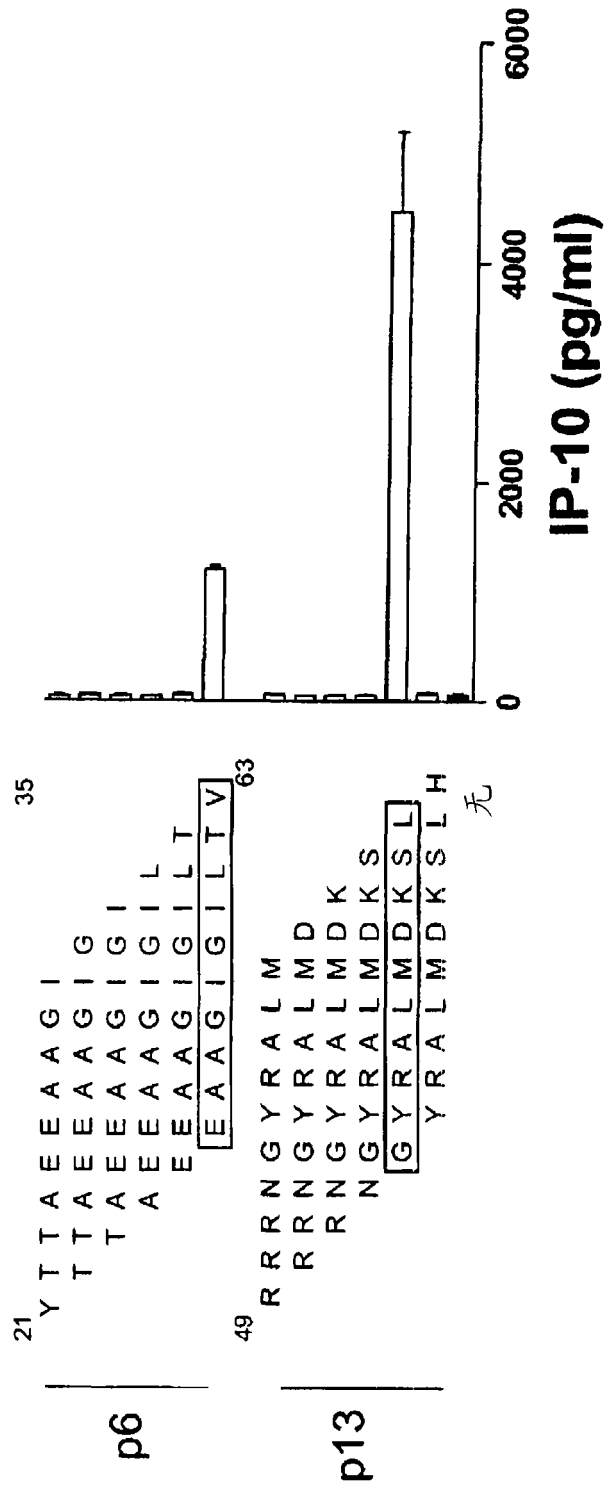


图 17

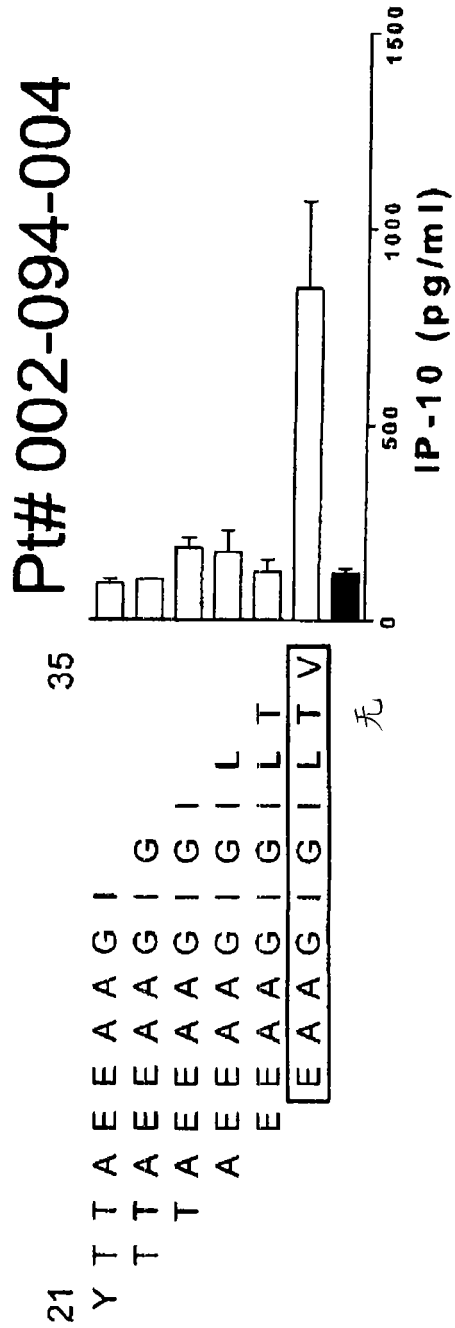
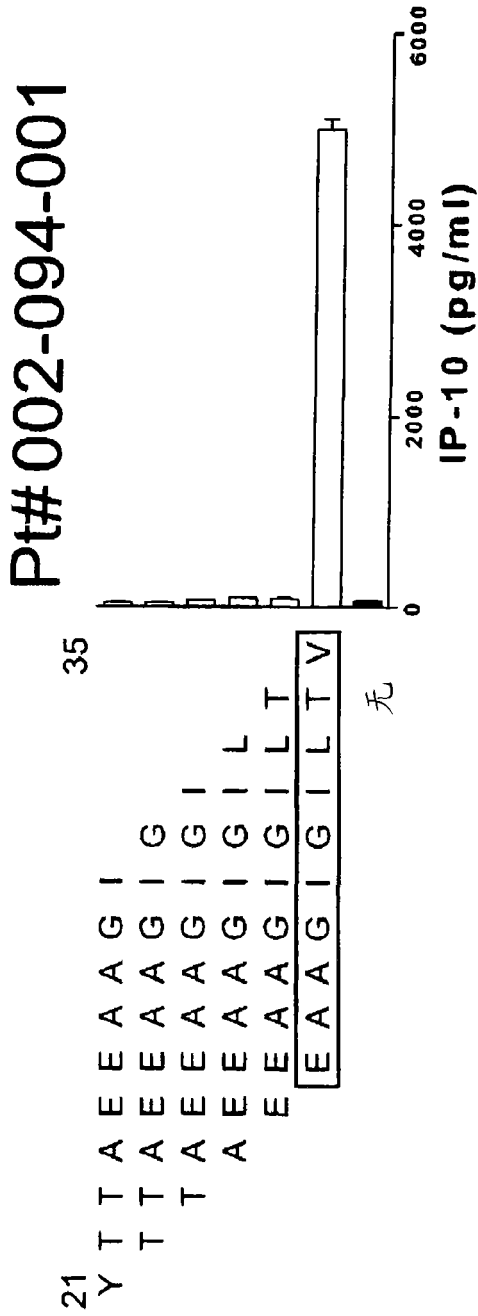


图 18

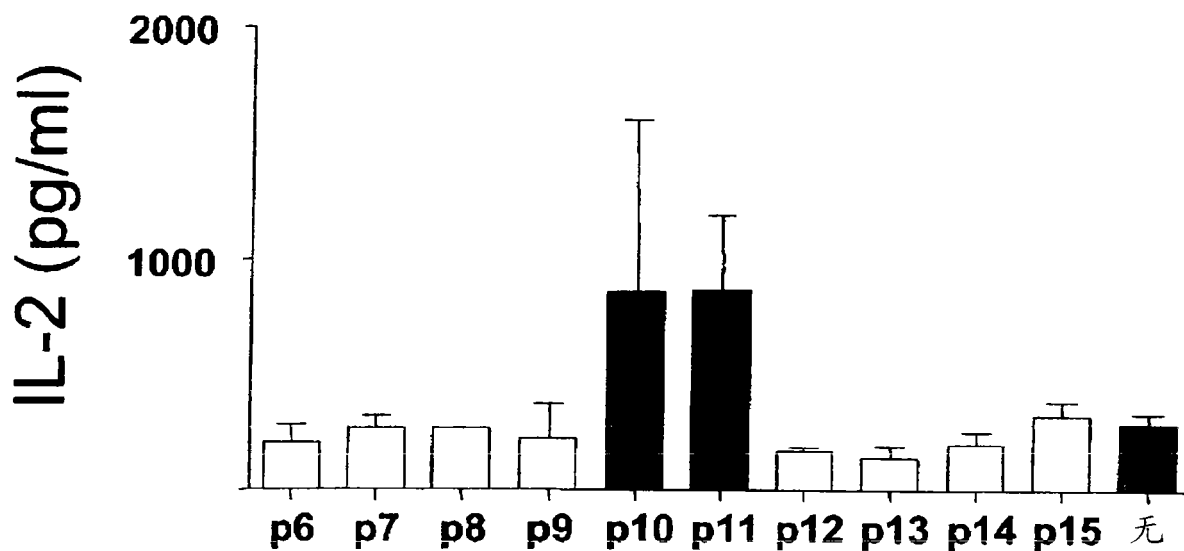


图 19

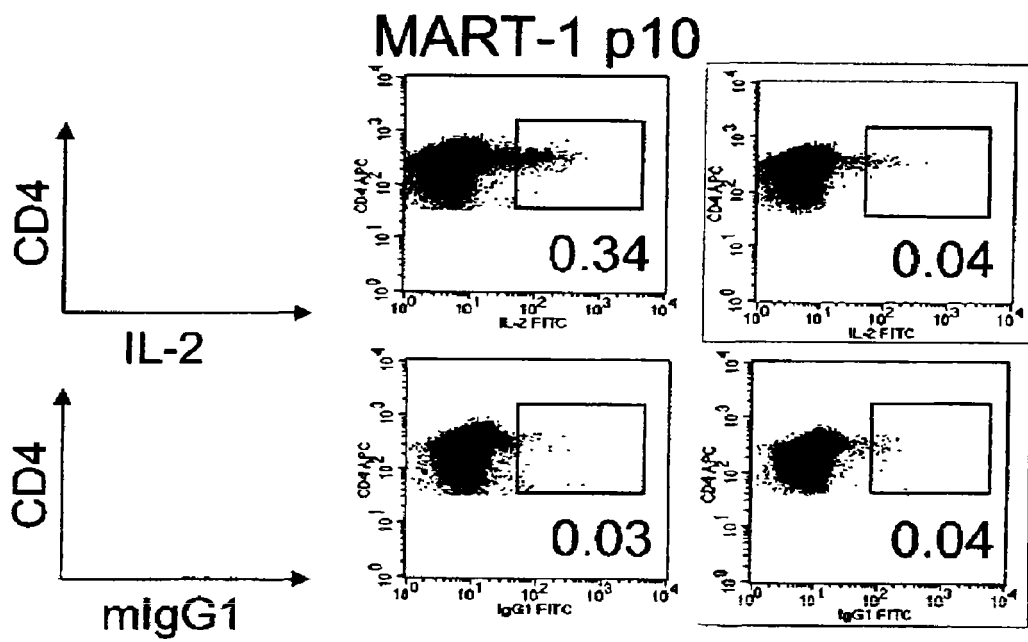


图 20

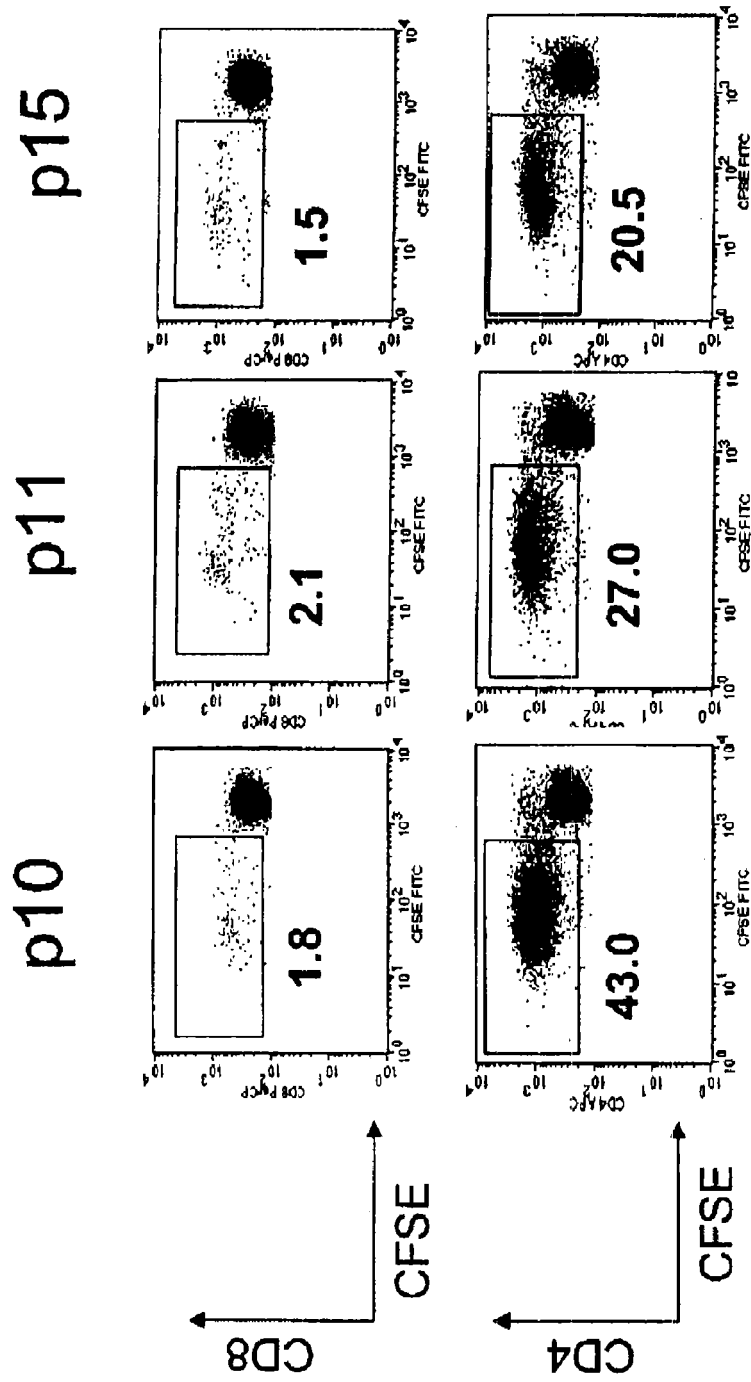


图 21A

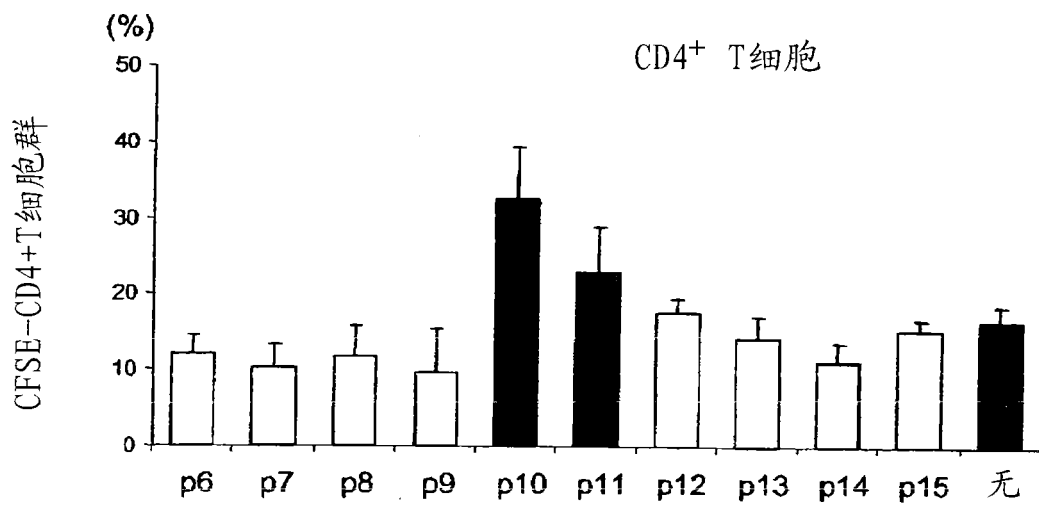


图 21B

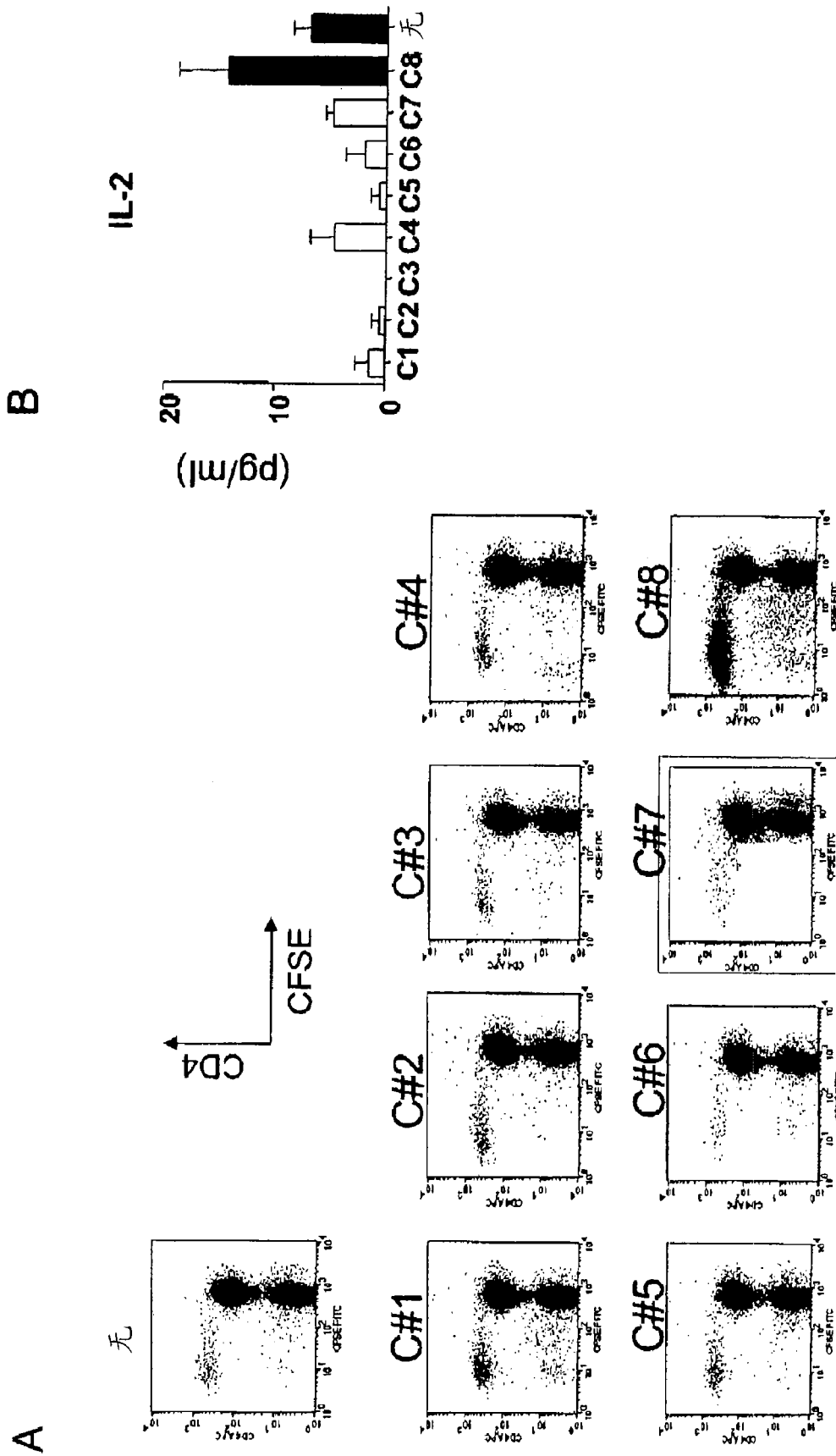


图 22A, B

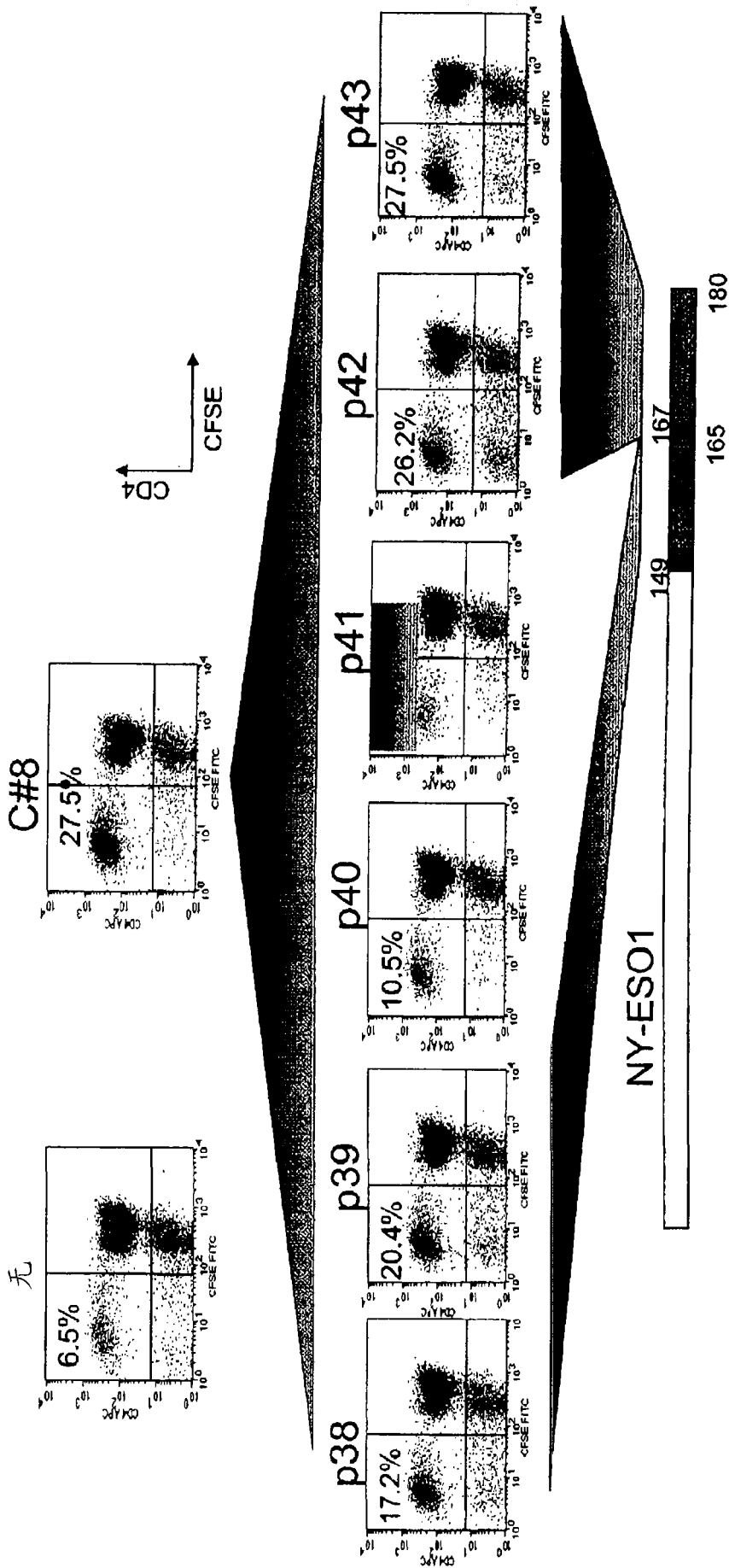


图 220

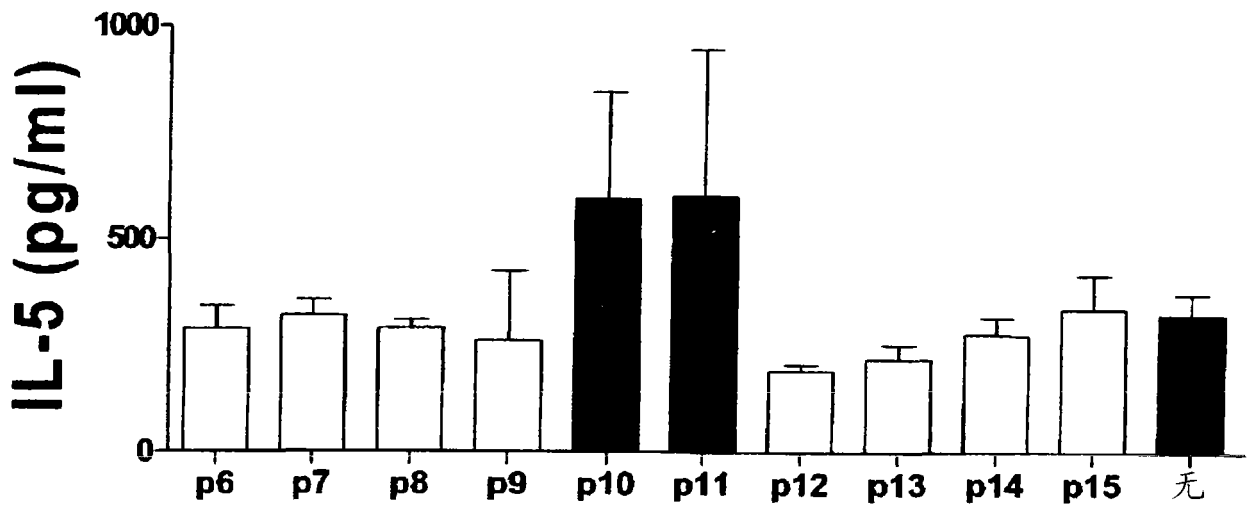


图 23

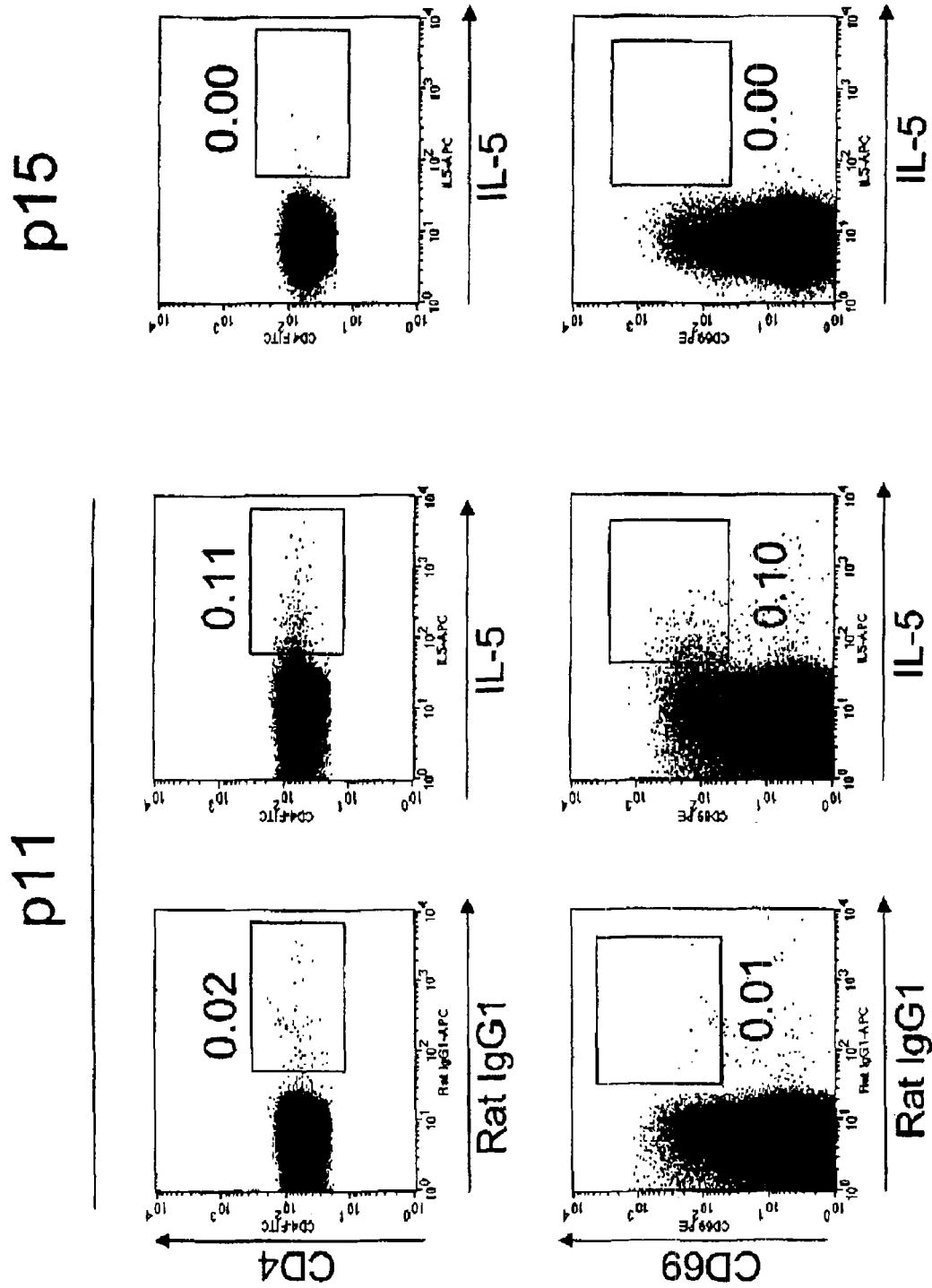
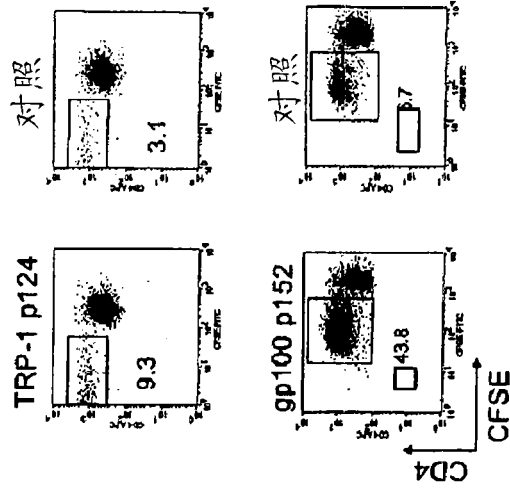


图 24

CFSE分析



细胞因子分析

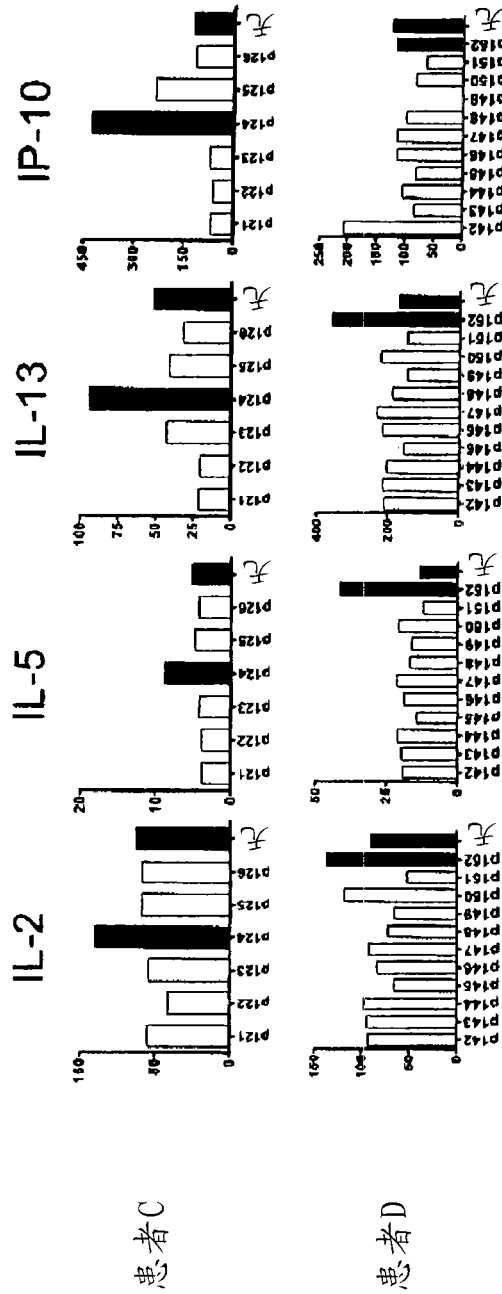


图 25

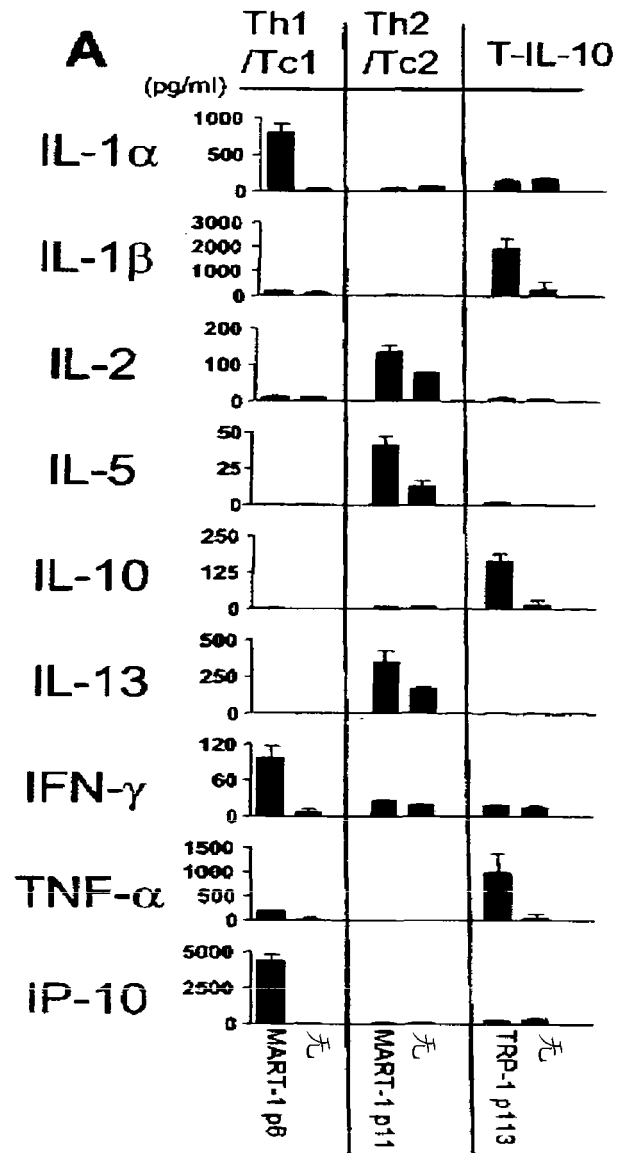


图 26

用EPIMAX鉴定新的抗原决定部位

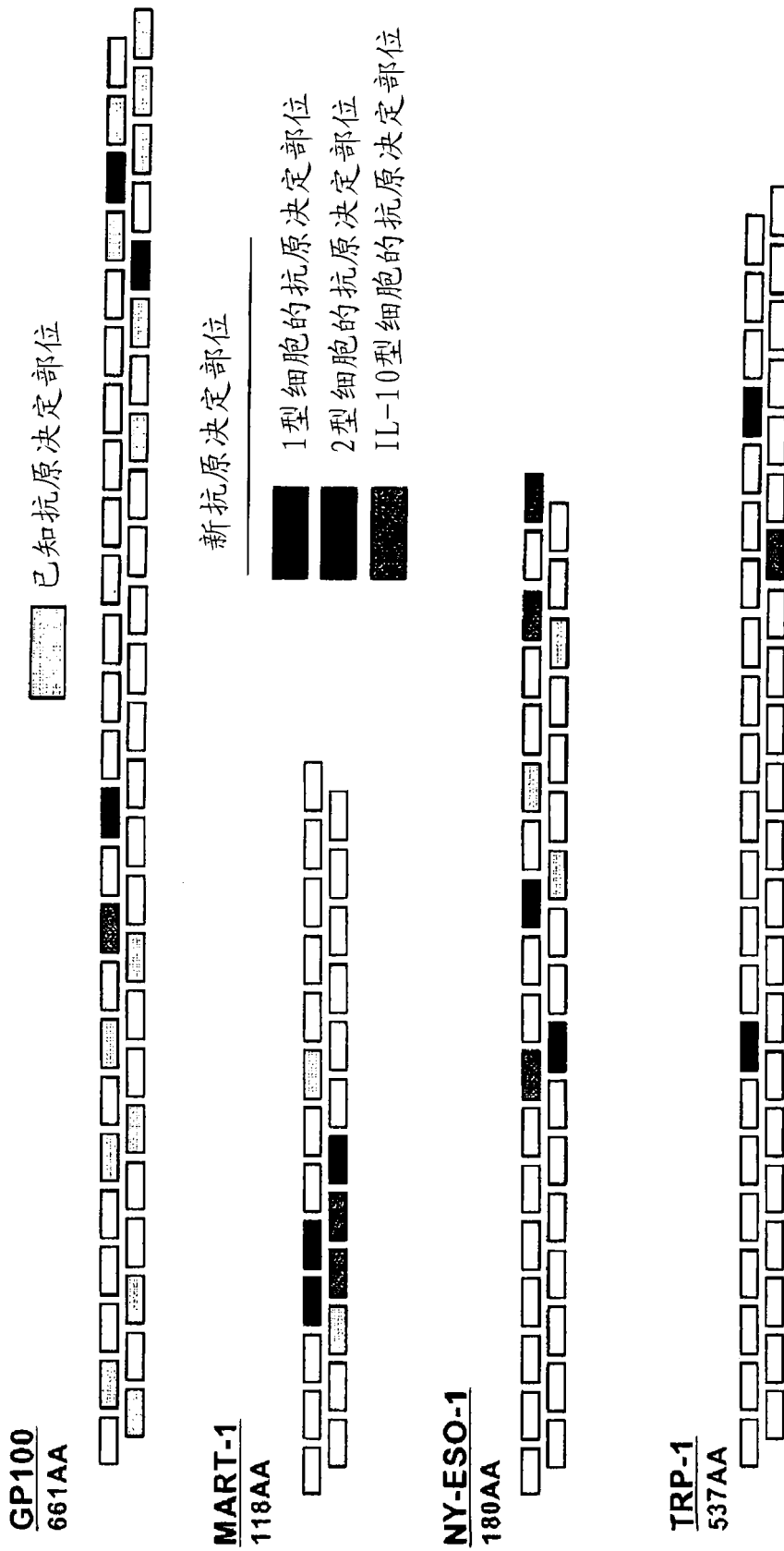


图 27

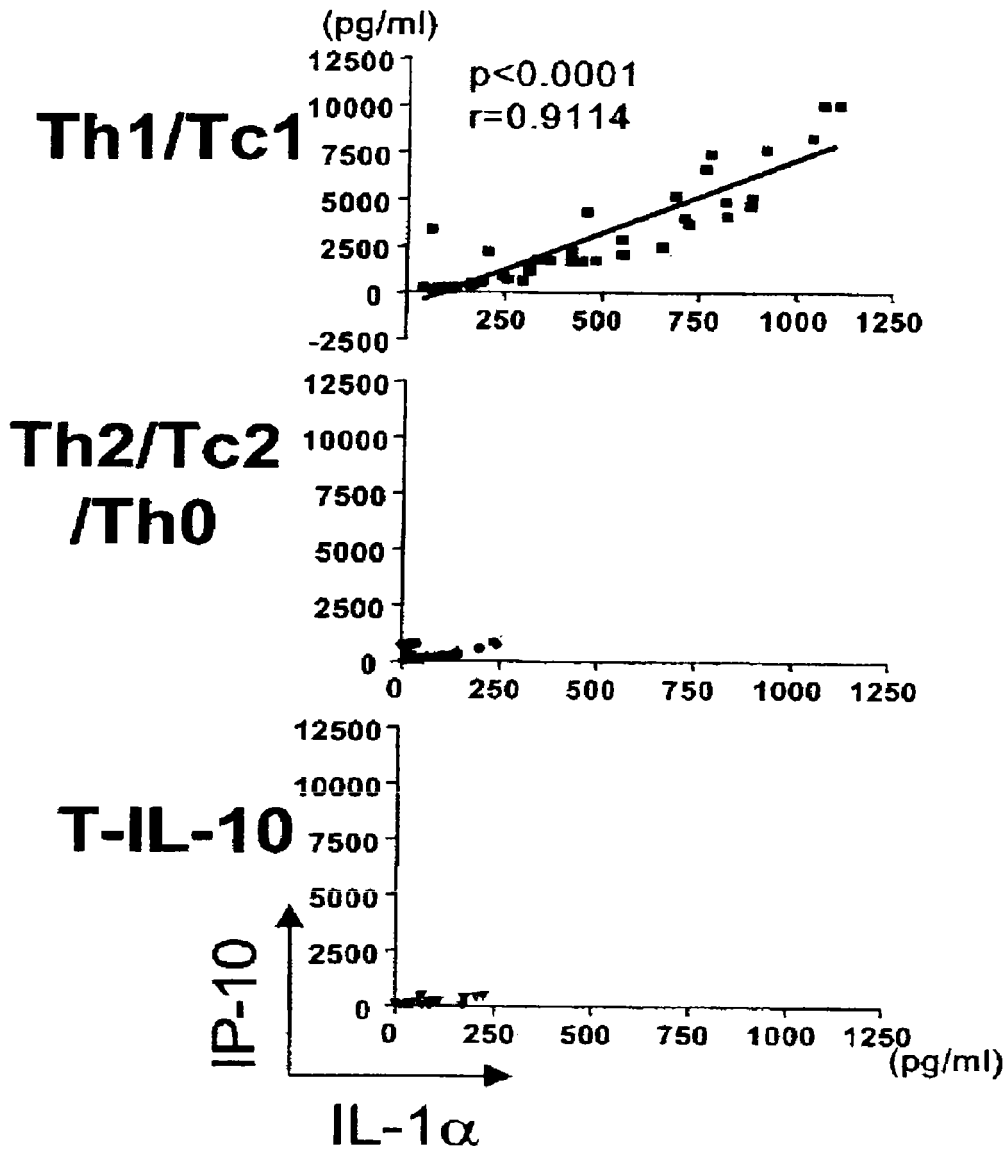


图 28

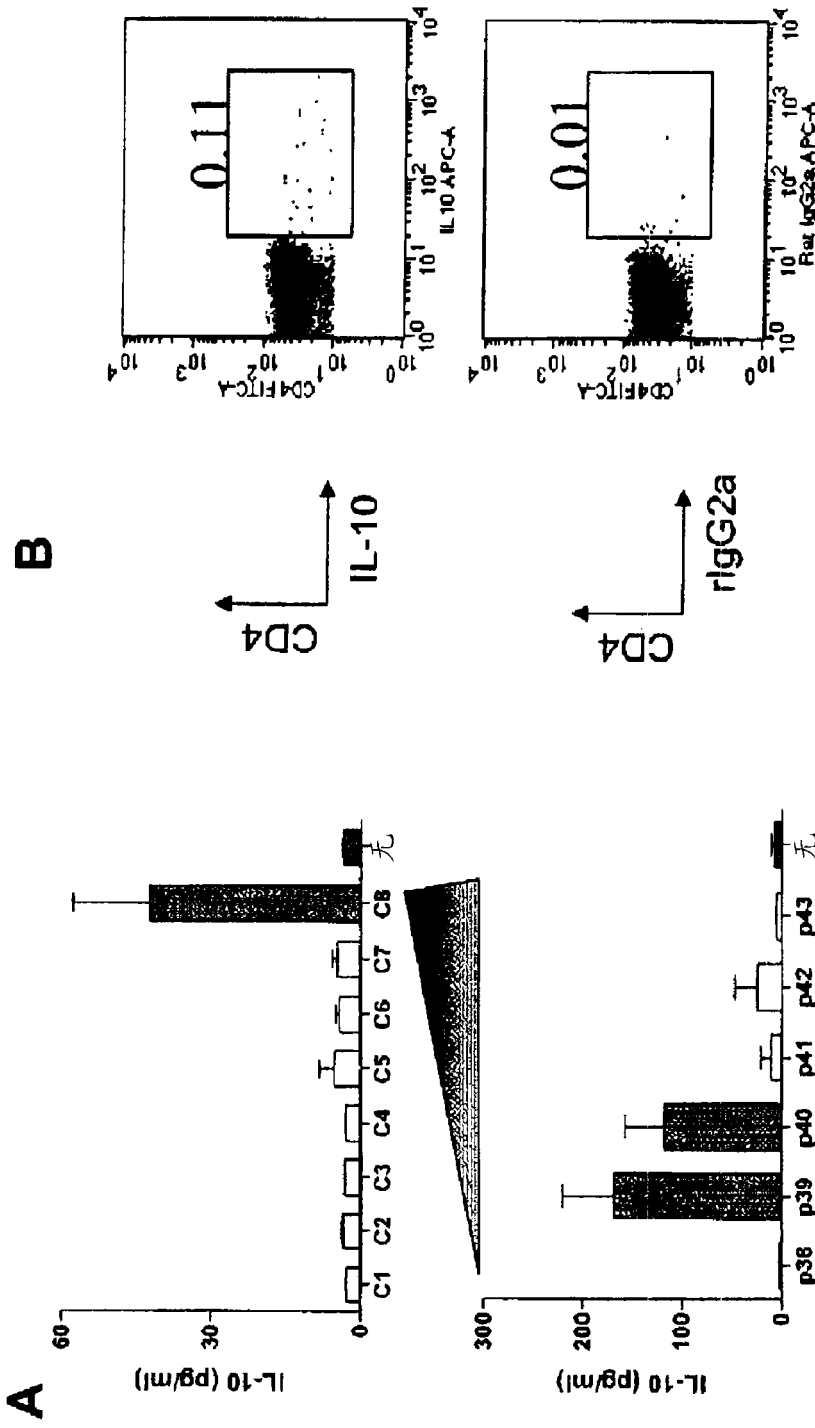


图 29

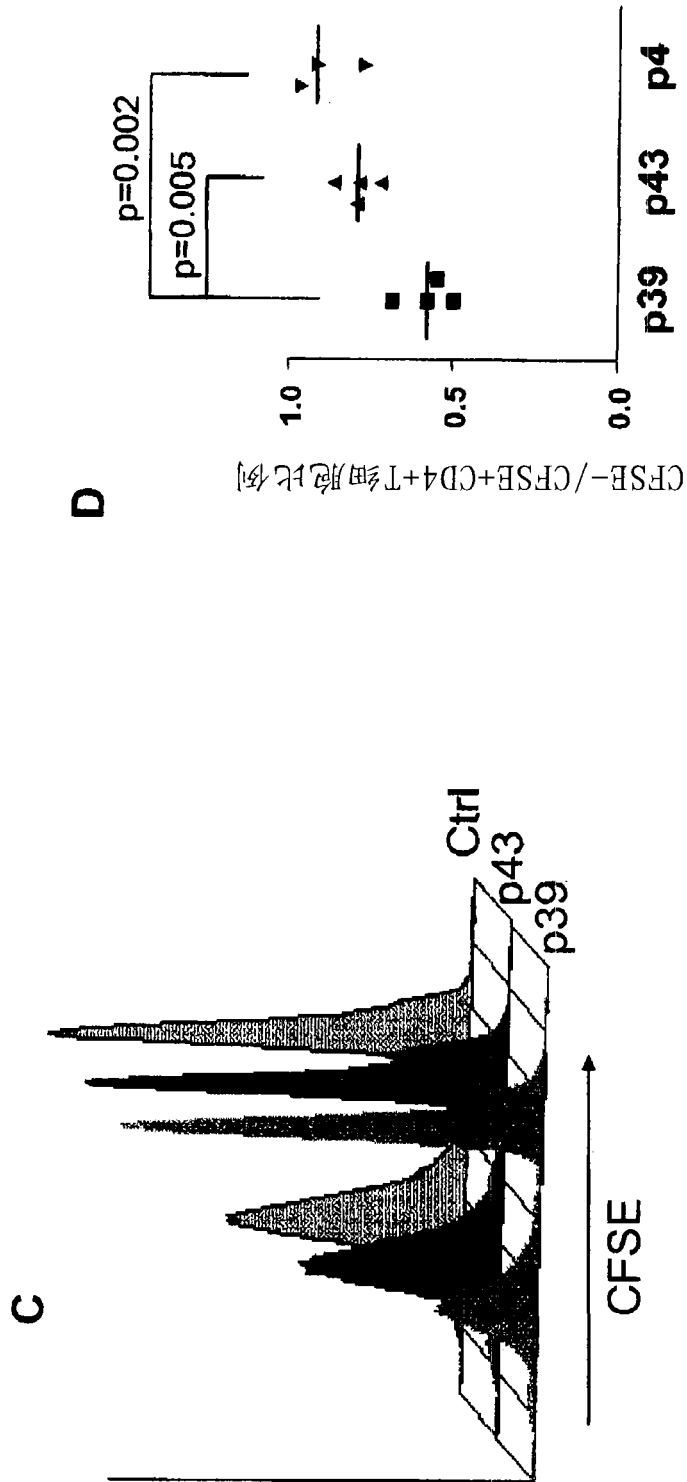


图 29

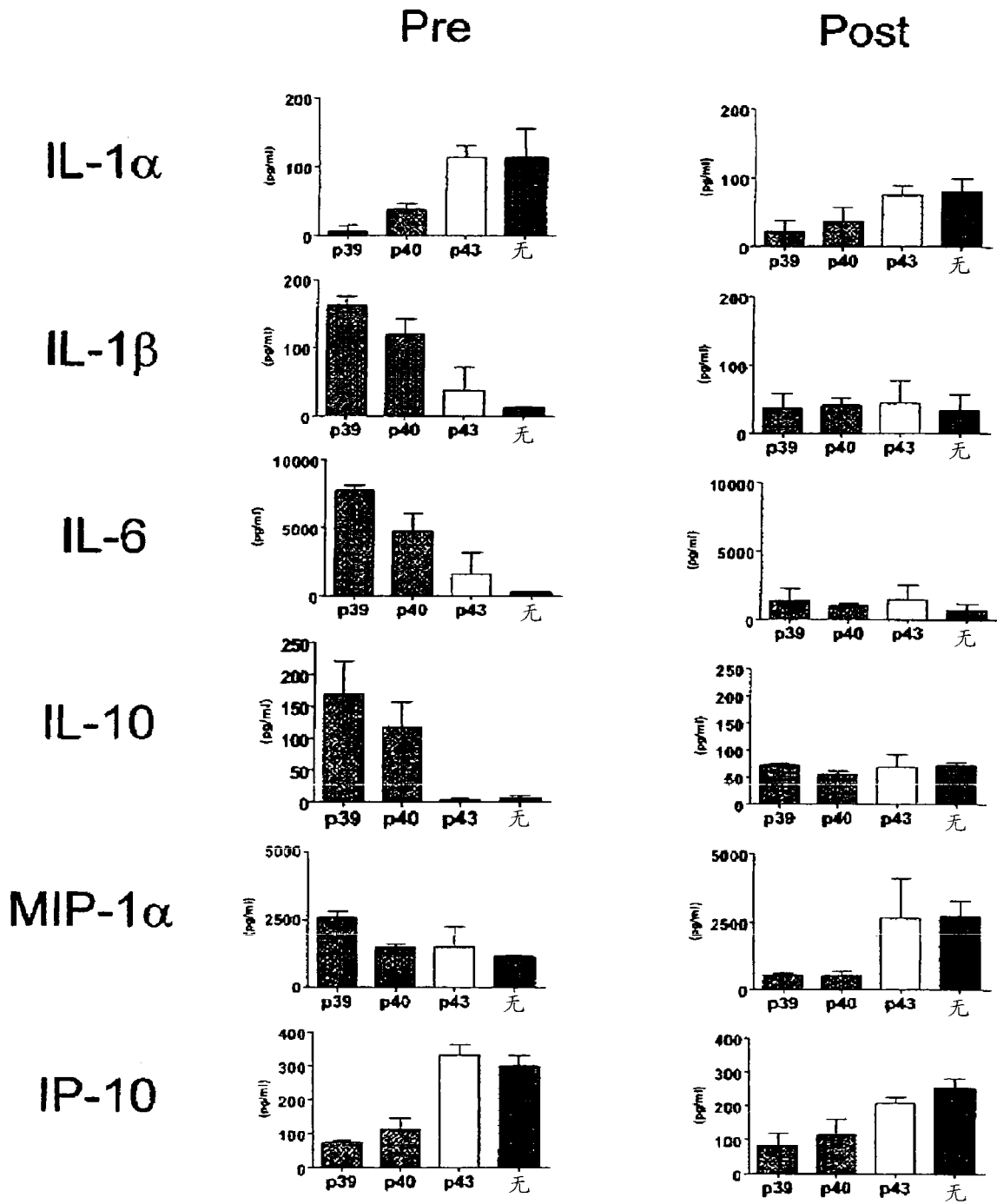


图 30

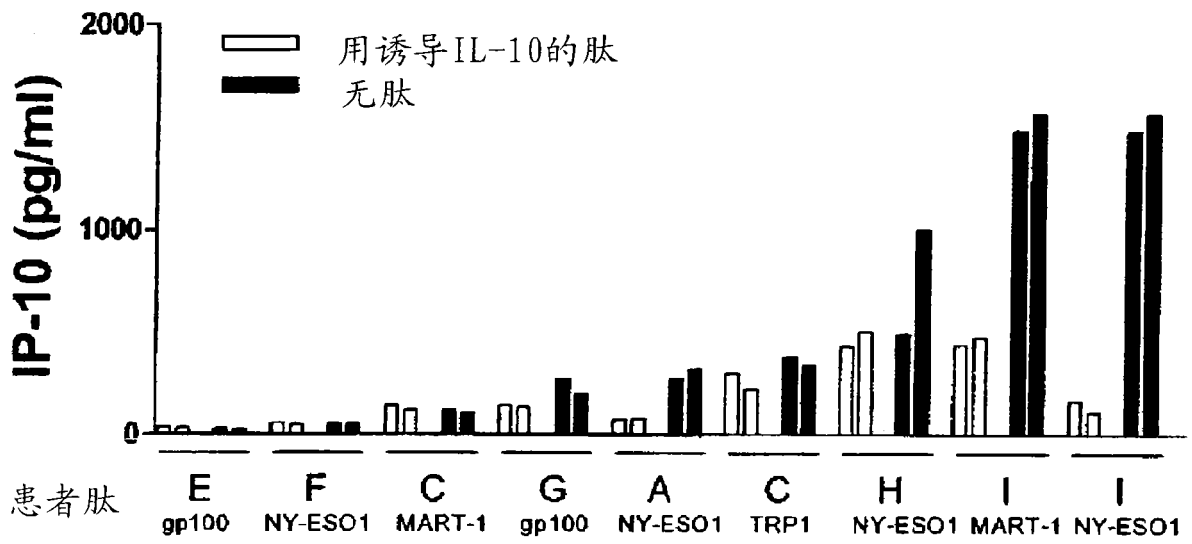


图 31

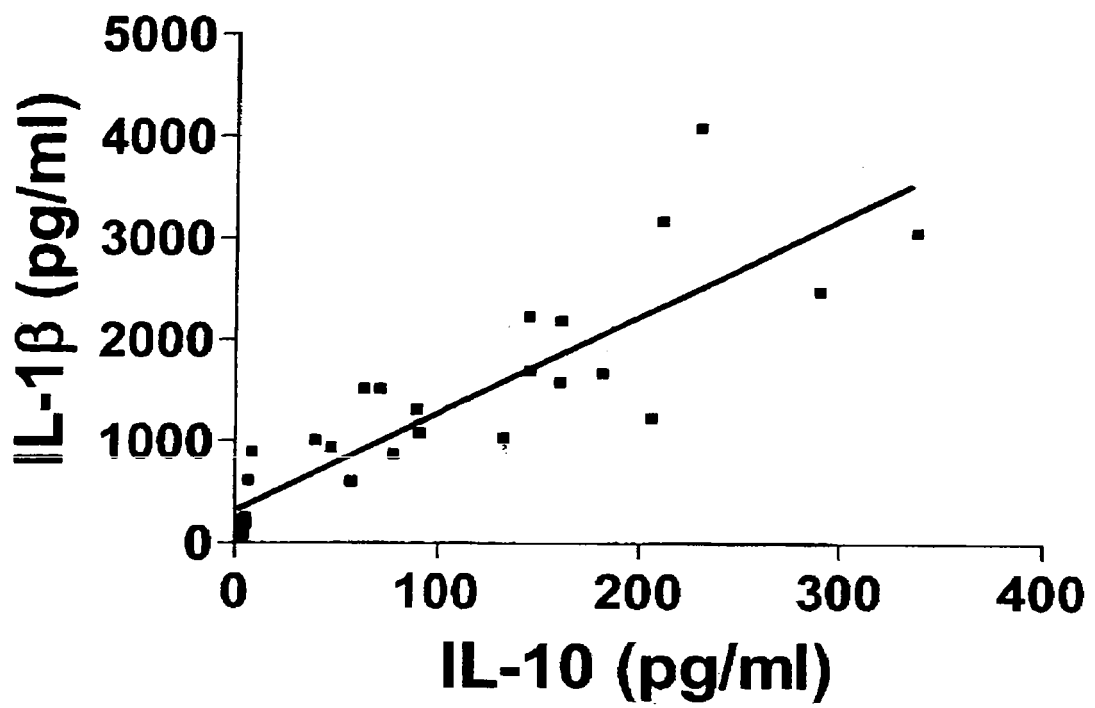


图 32

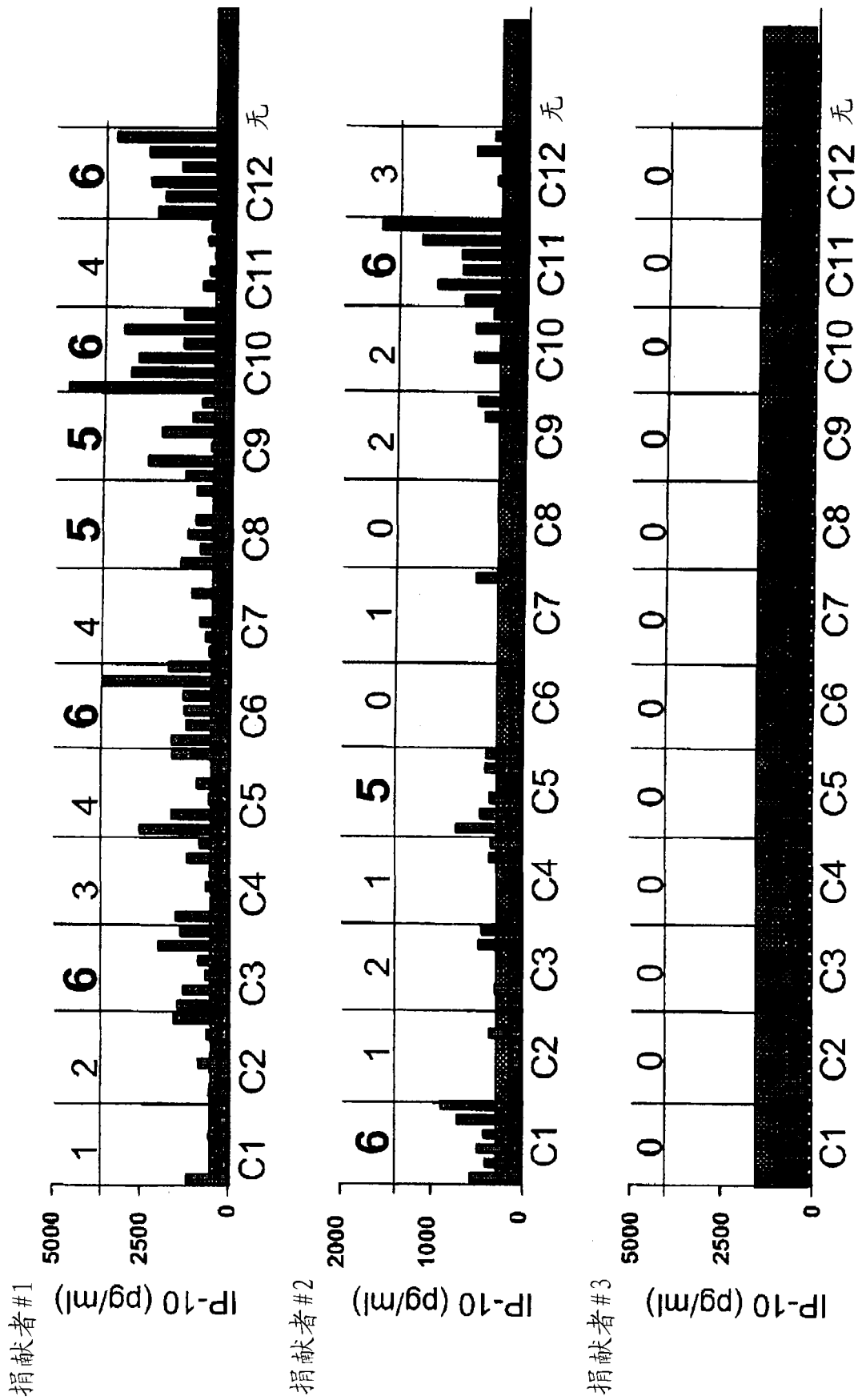


图 33

# IL-6 IP-10

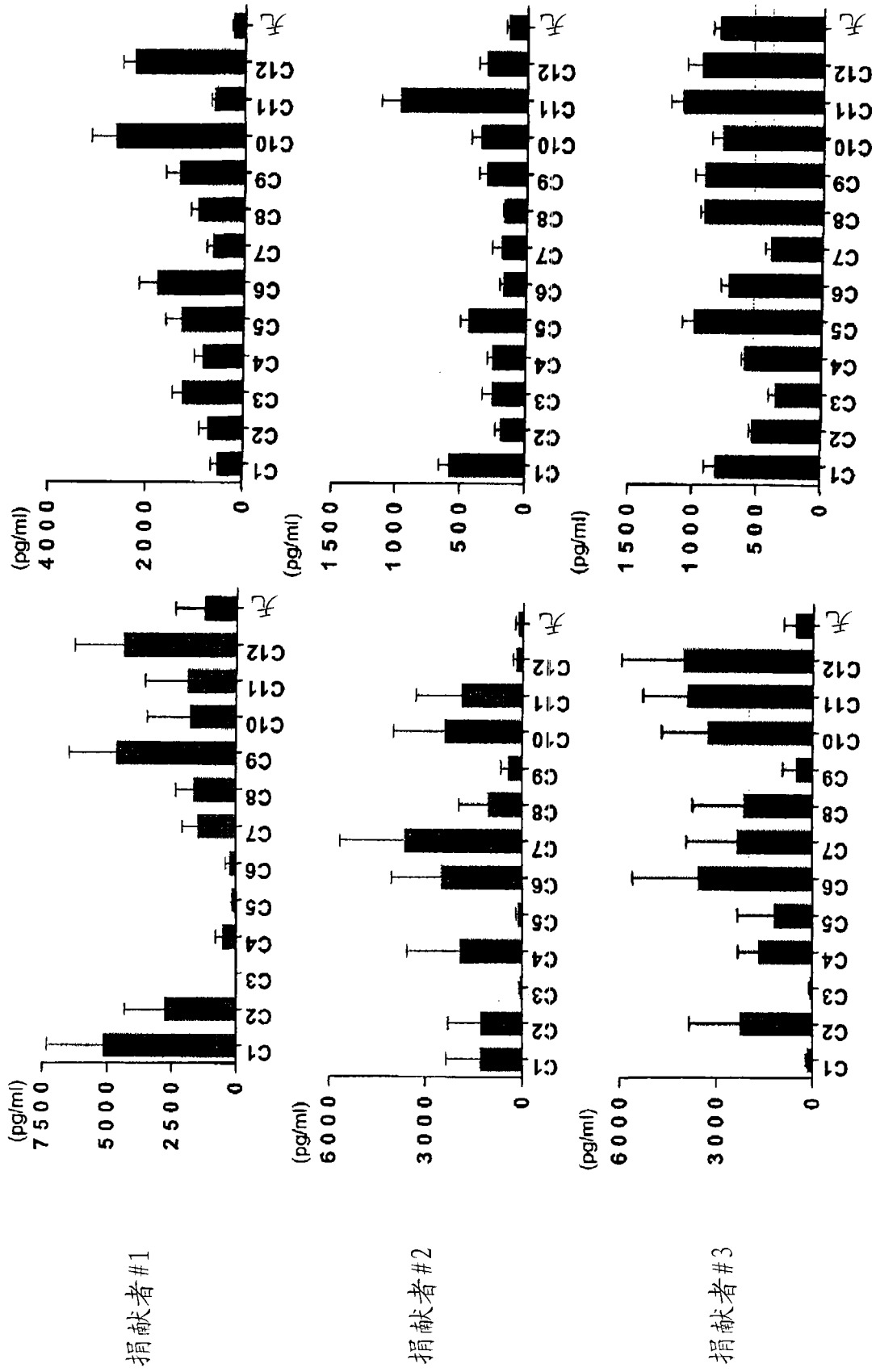


图 34

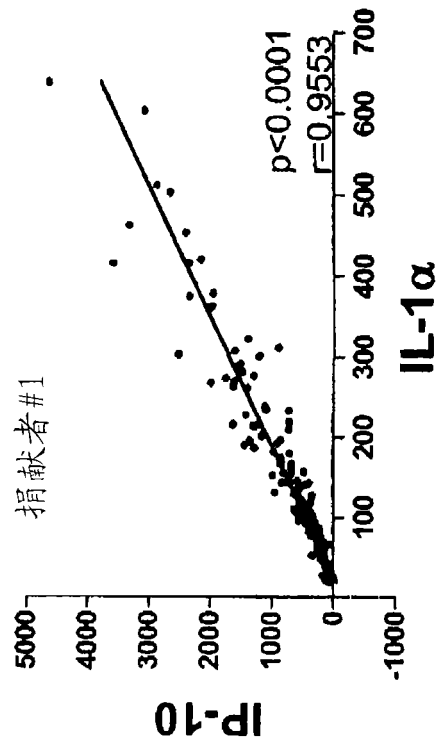
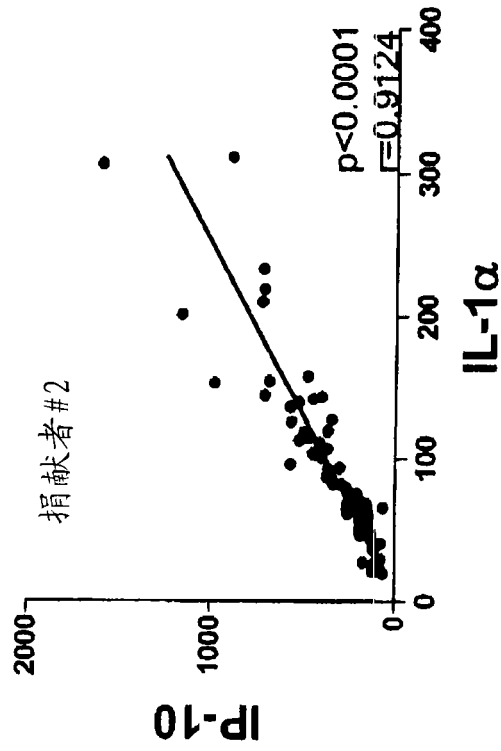


图 35

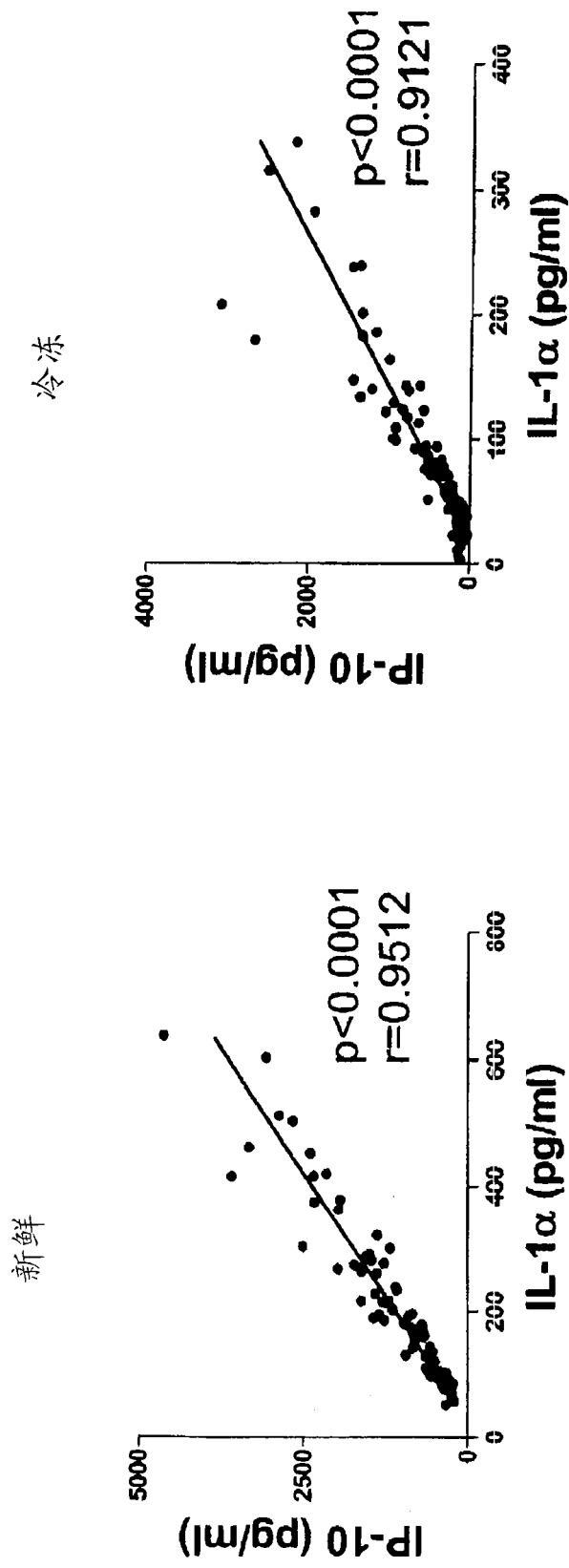


图 36

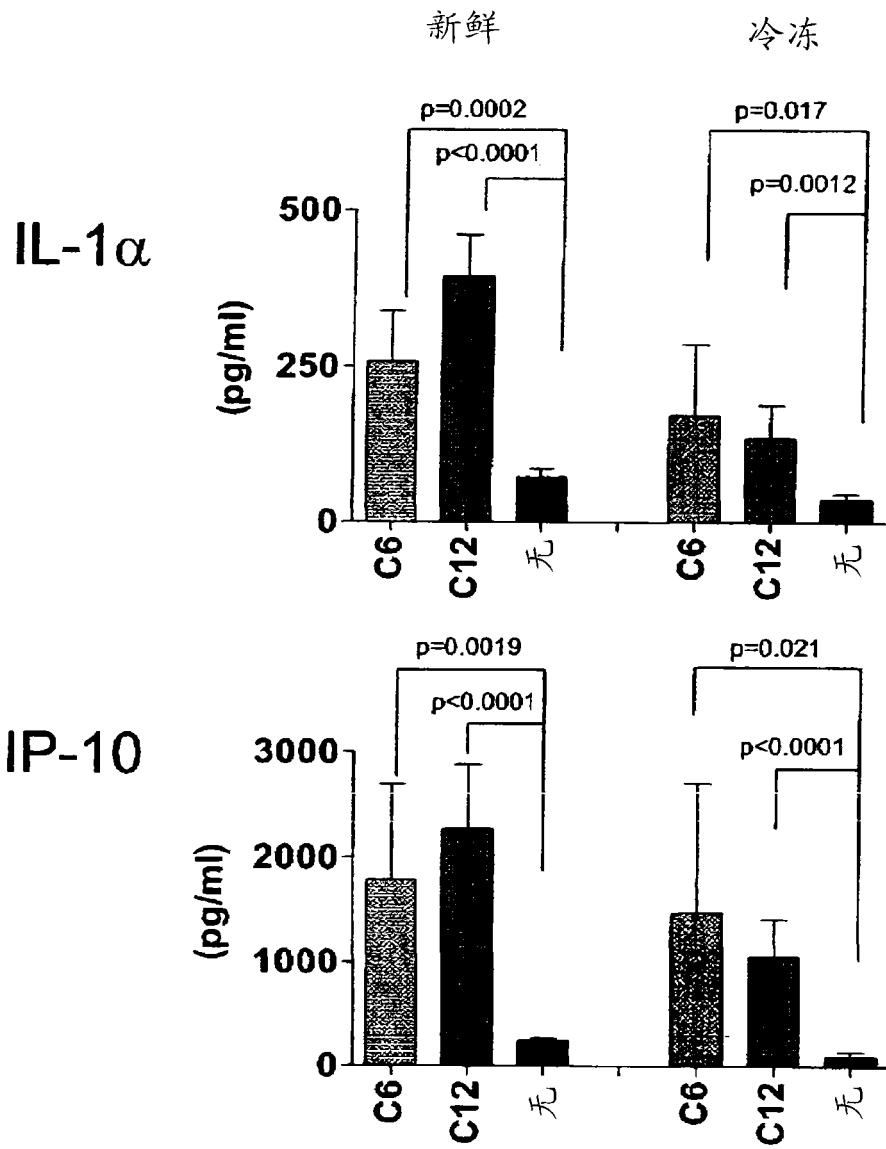


图 37

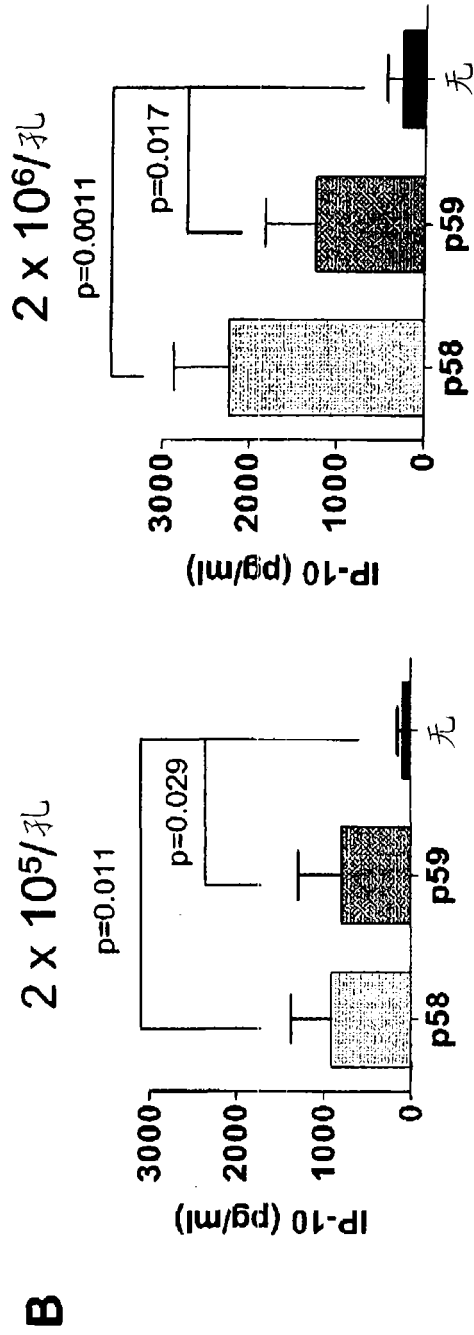
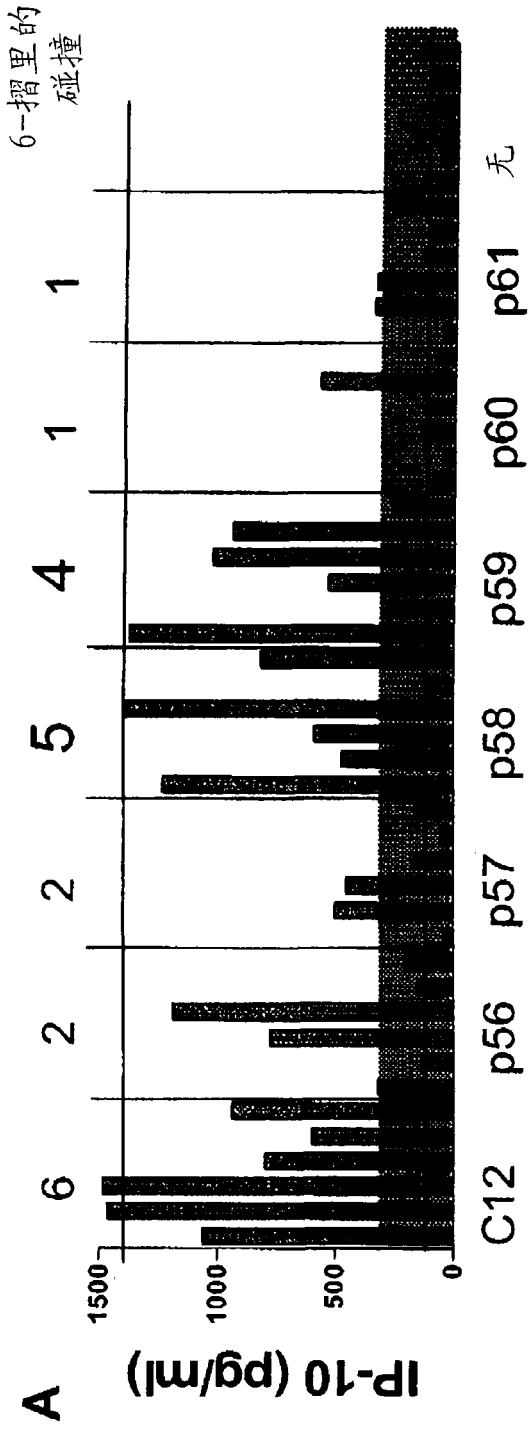


图 38

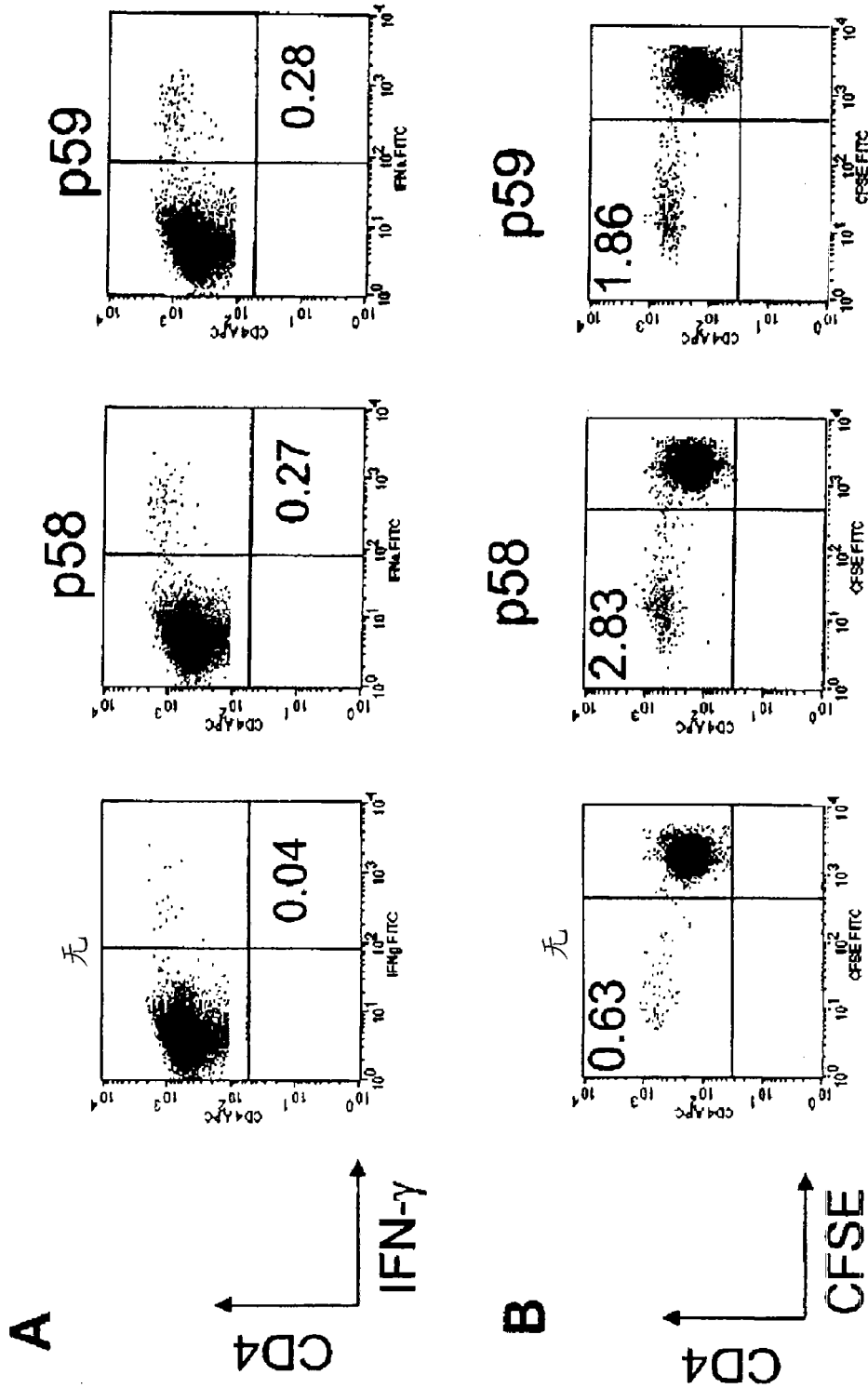


图 39

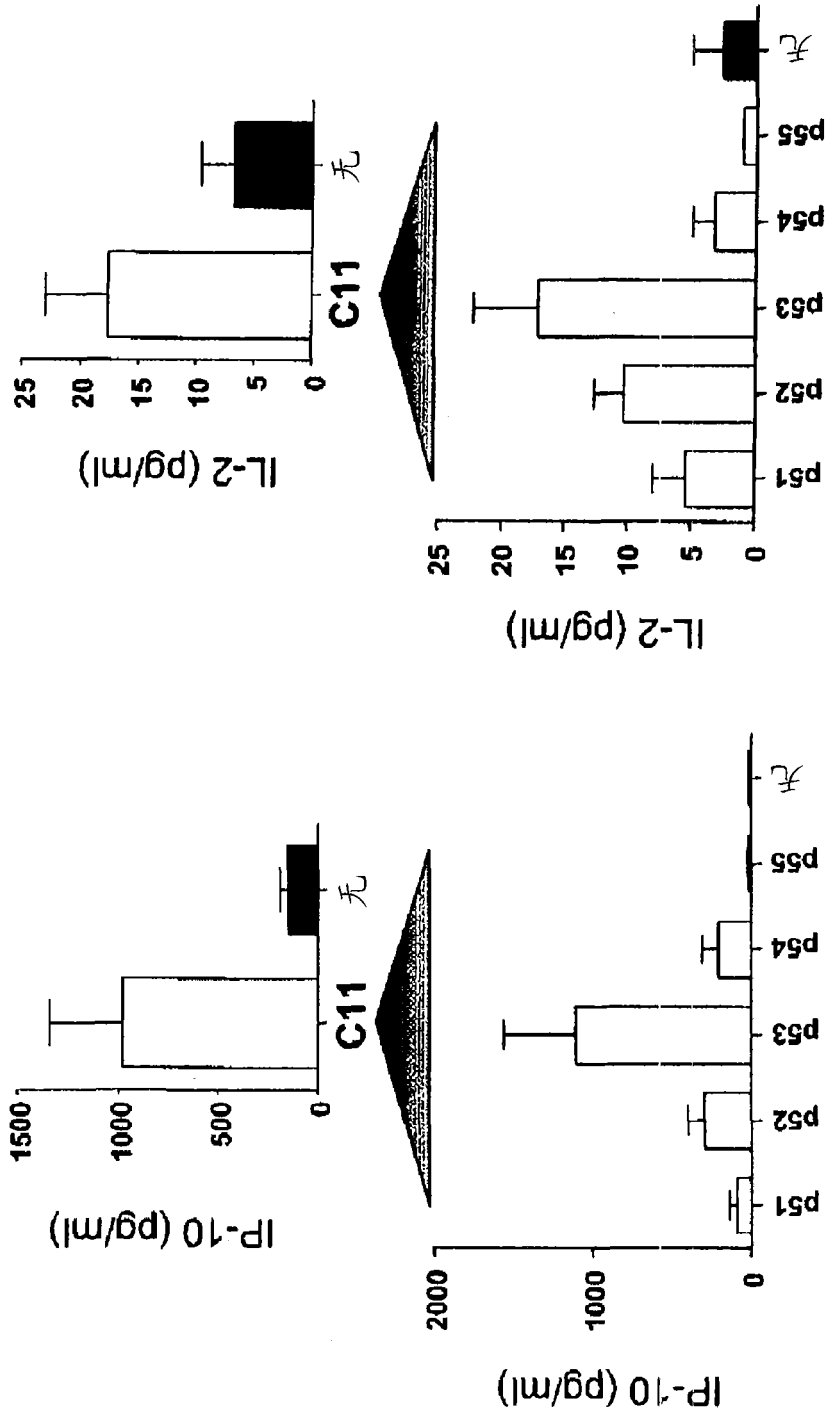


图 40

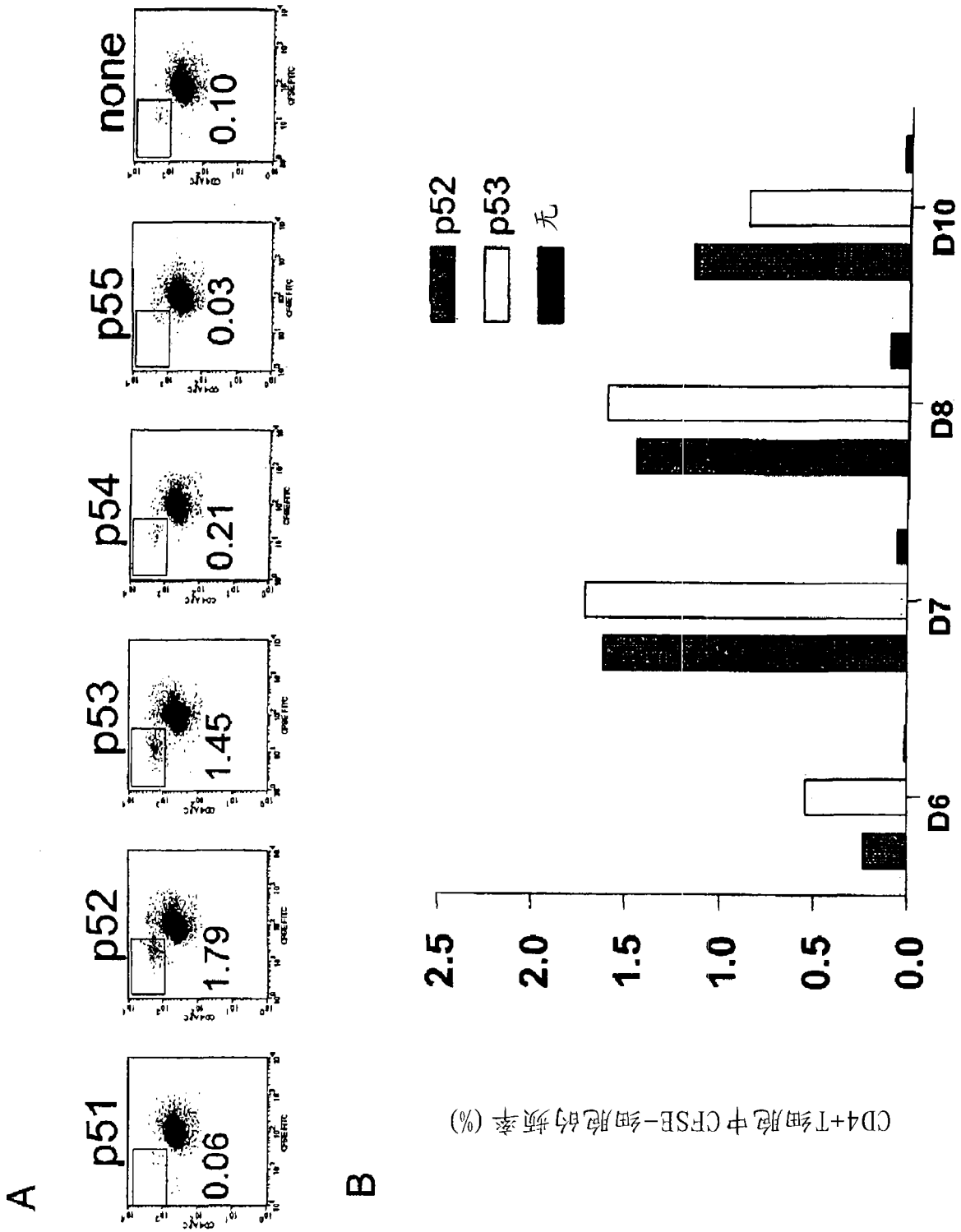


图 41

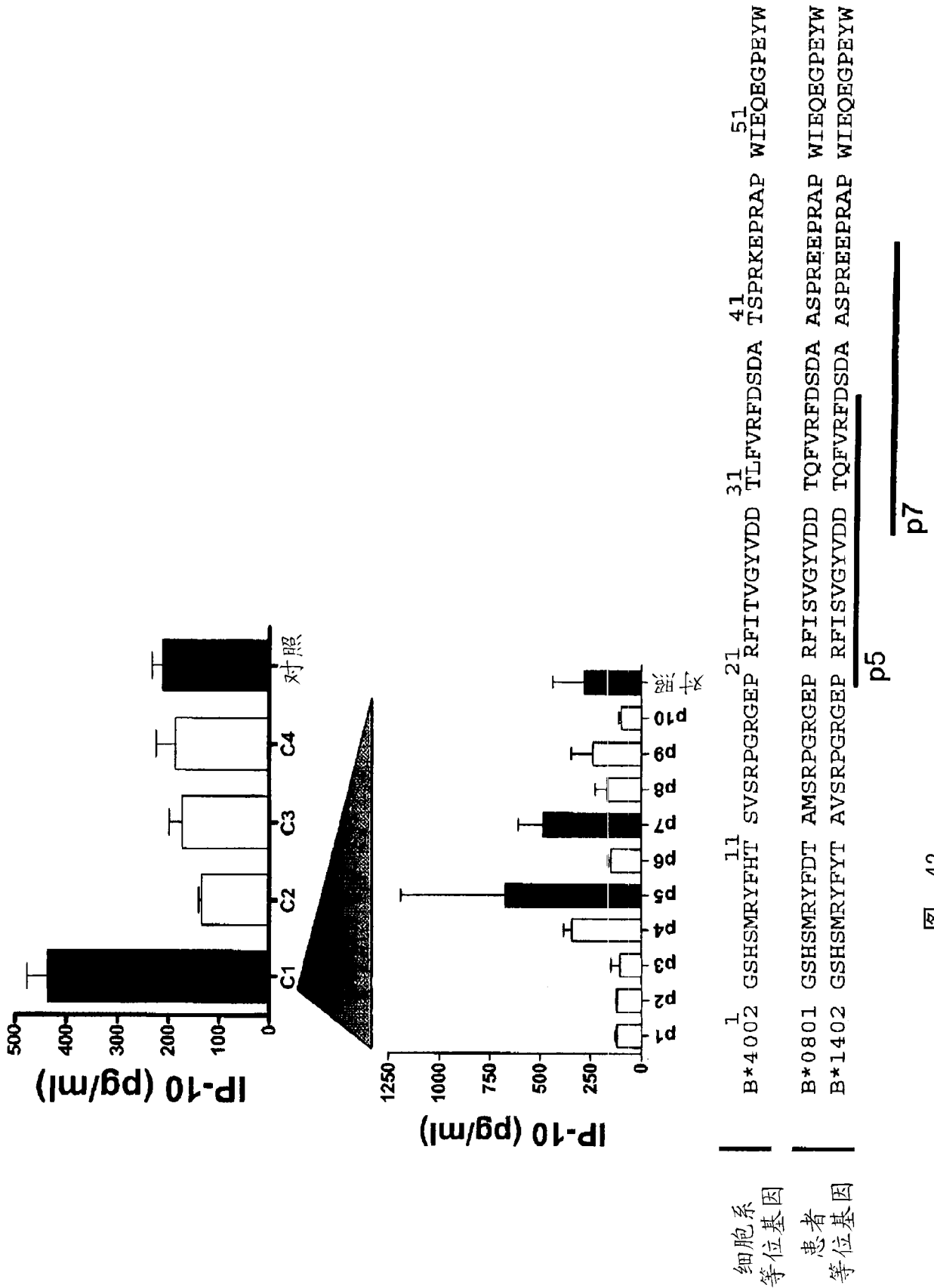


图 42

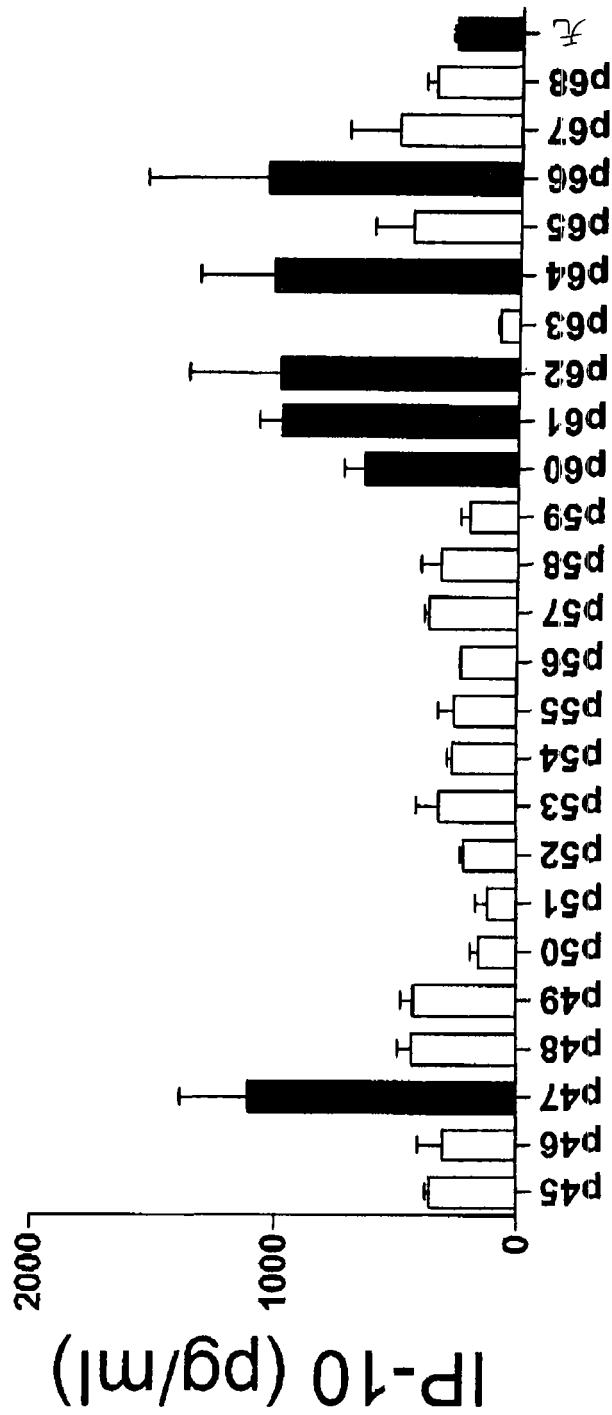


图 43

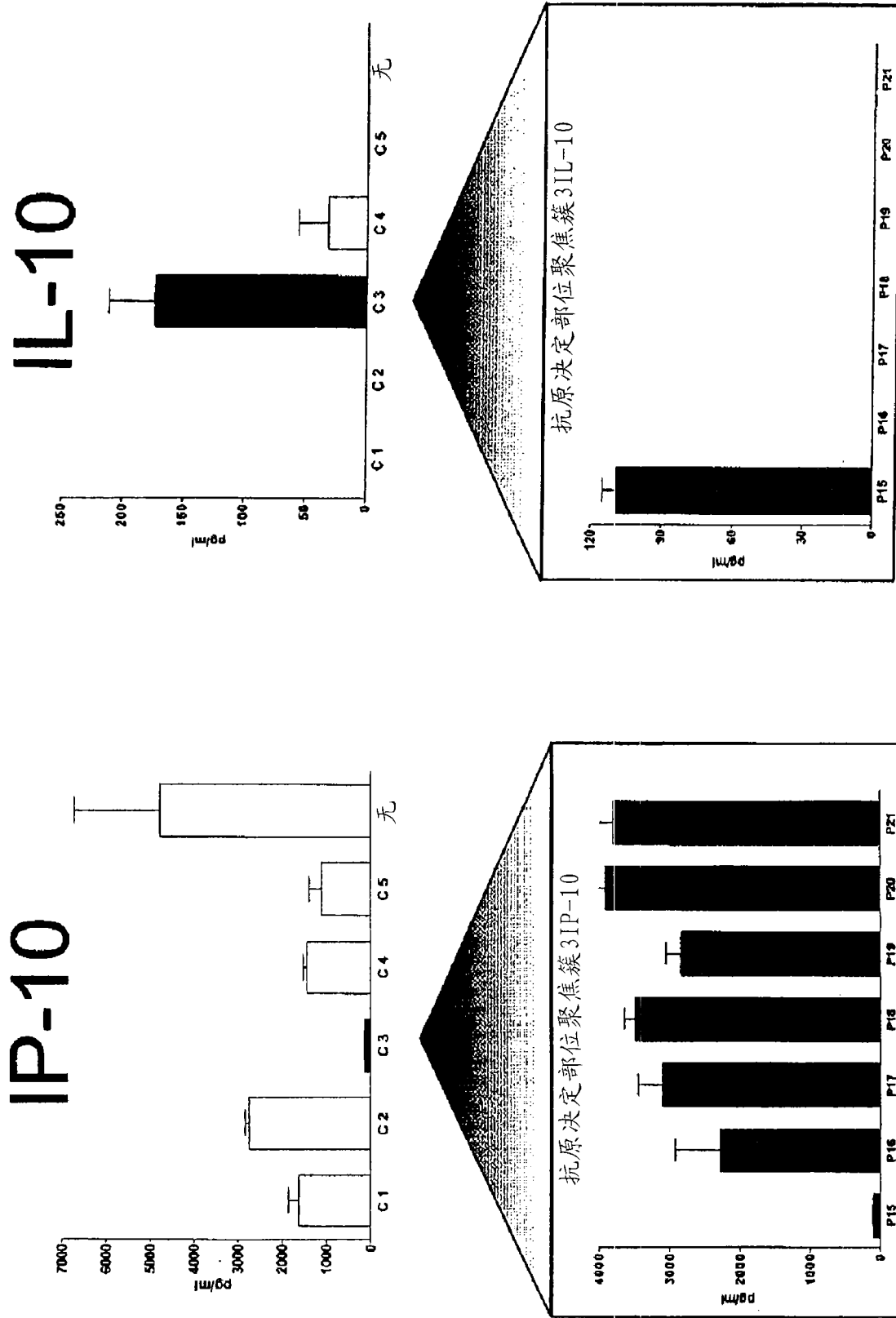


图 44a

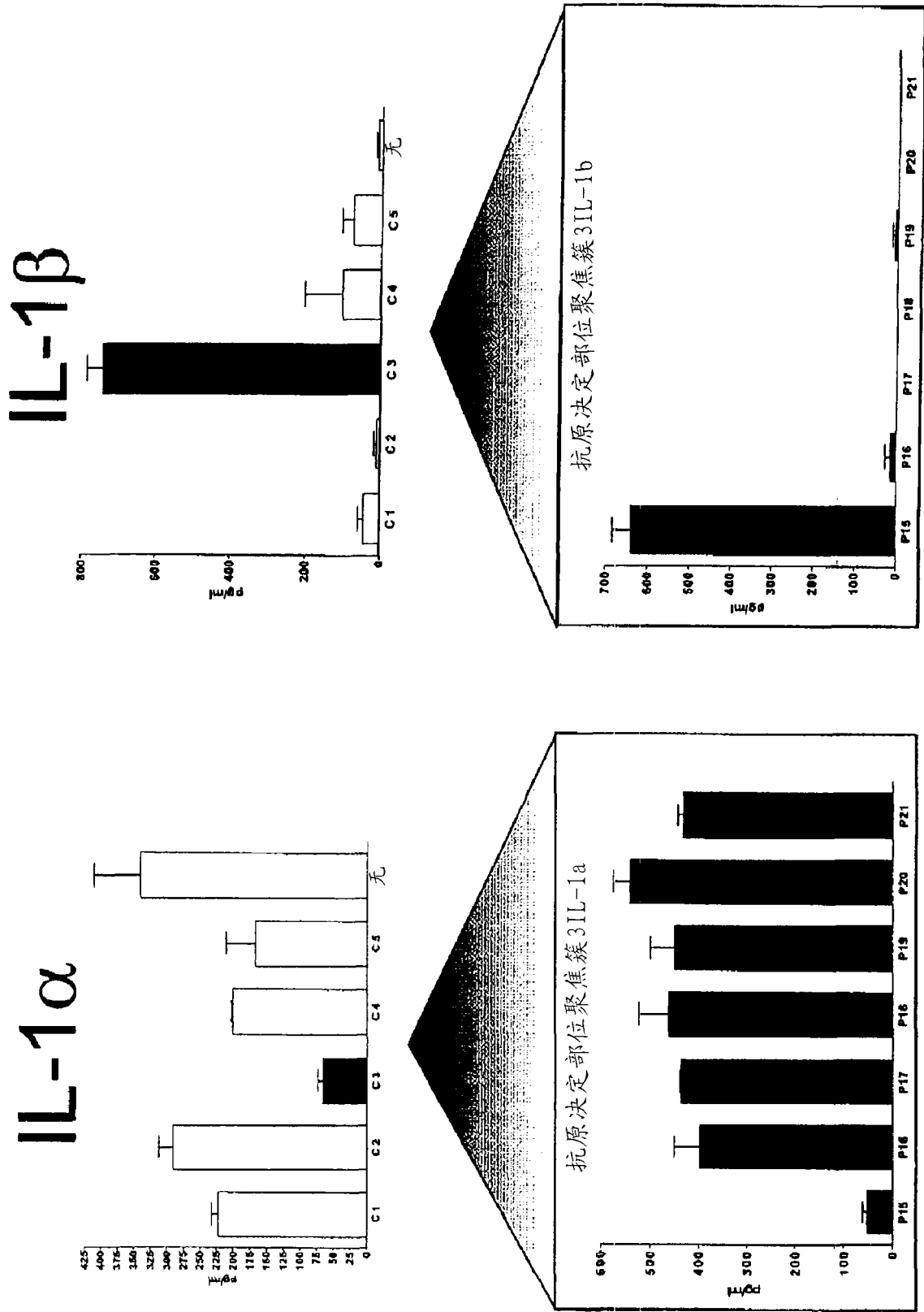


图 44b

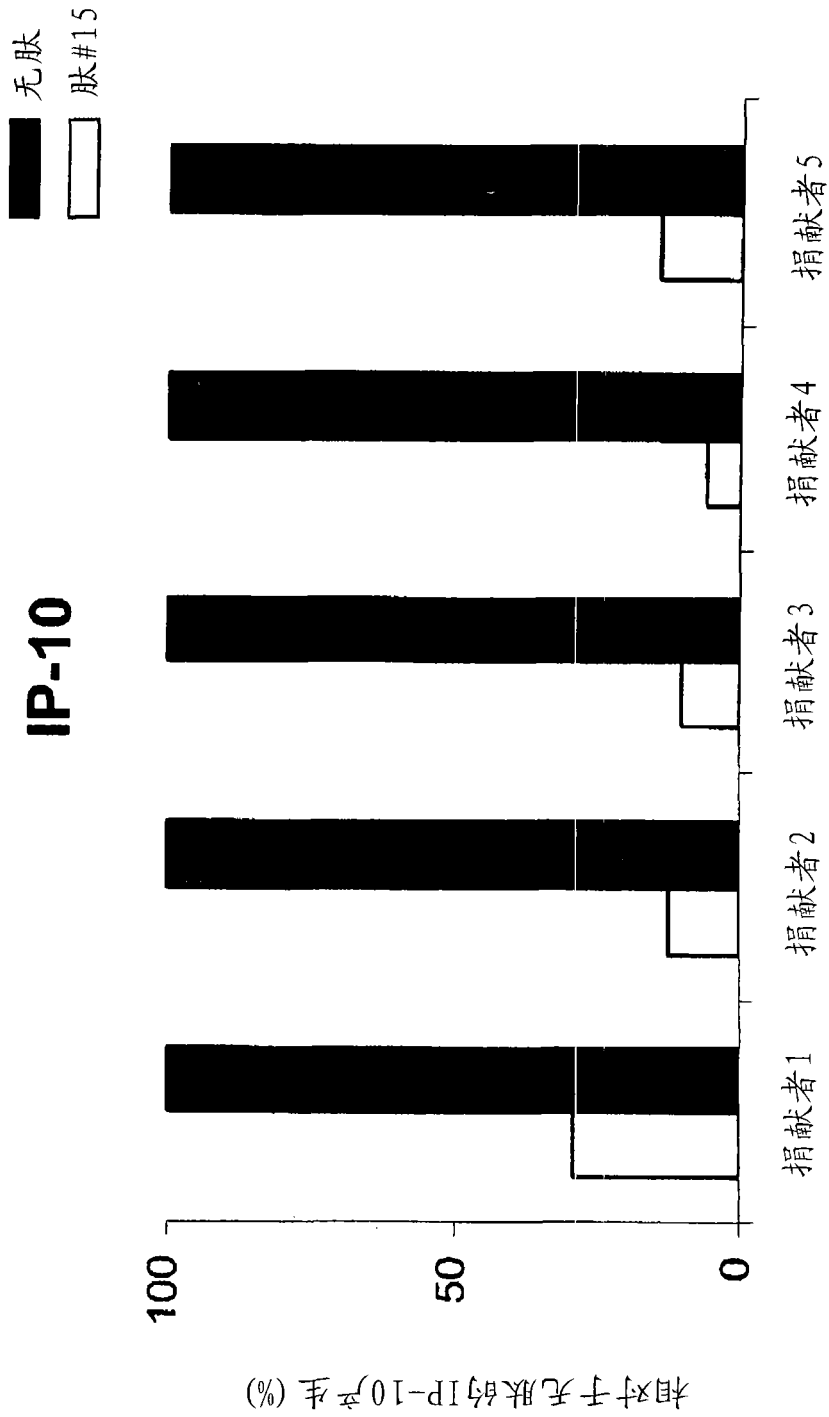


图 45

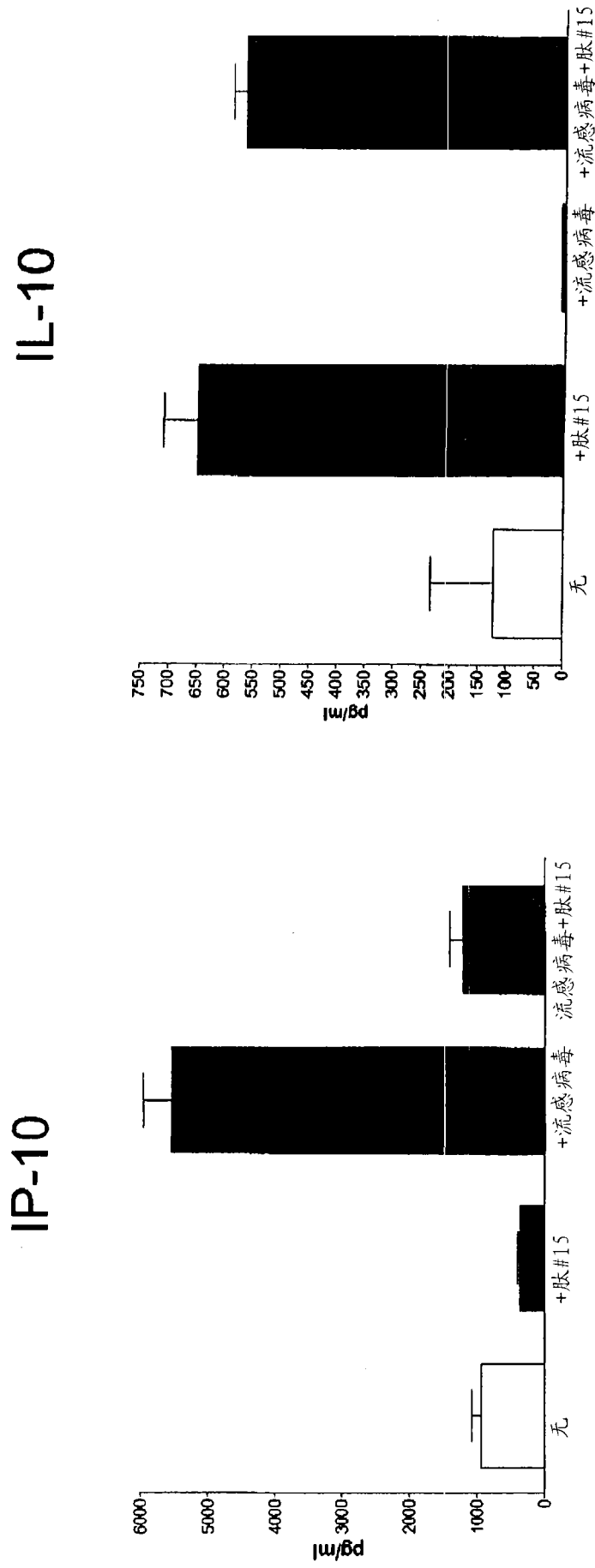


图 46

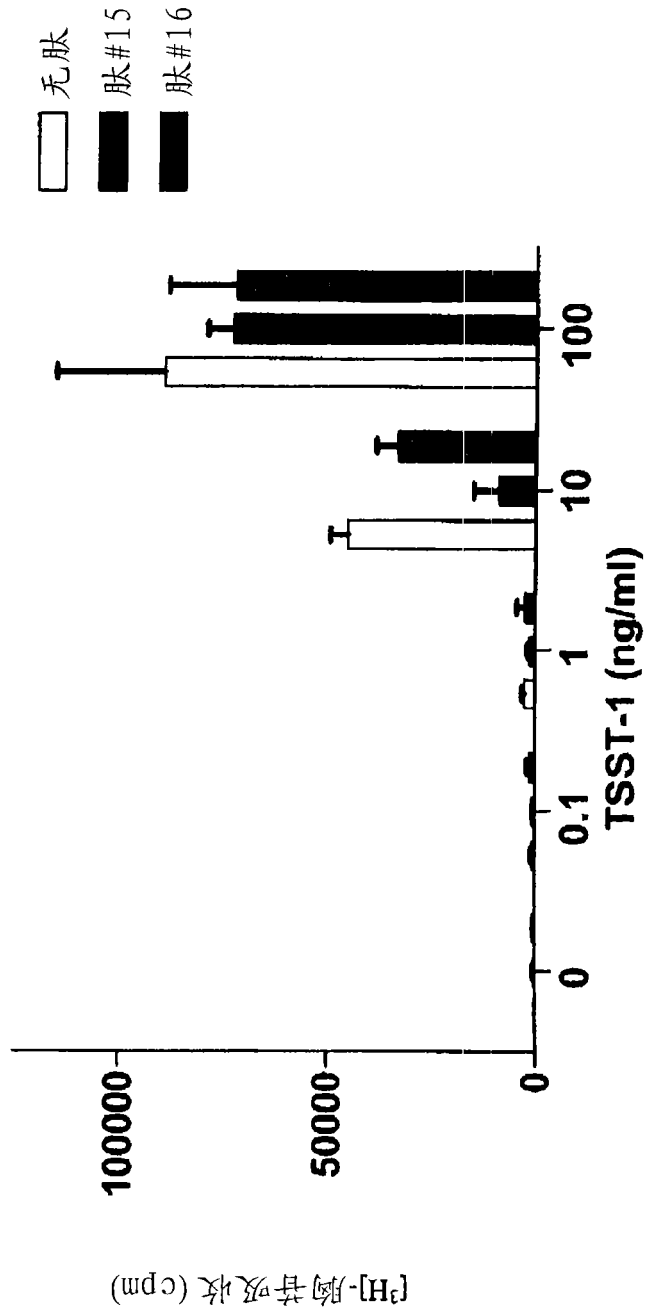


图 47

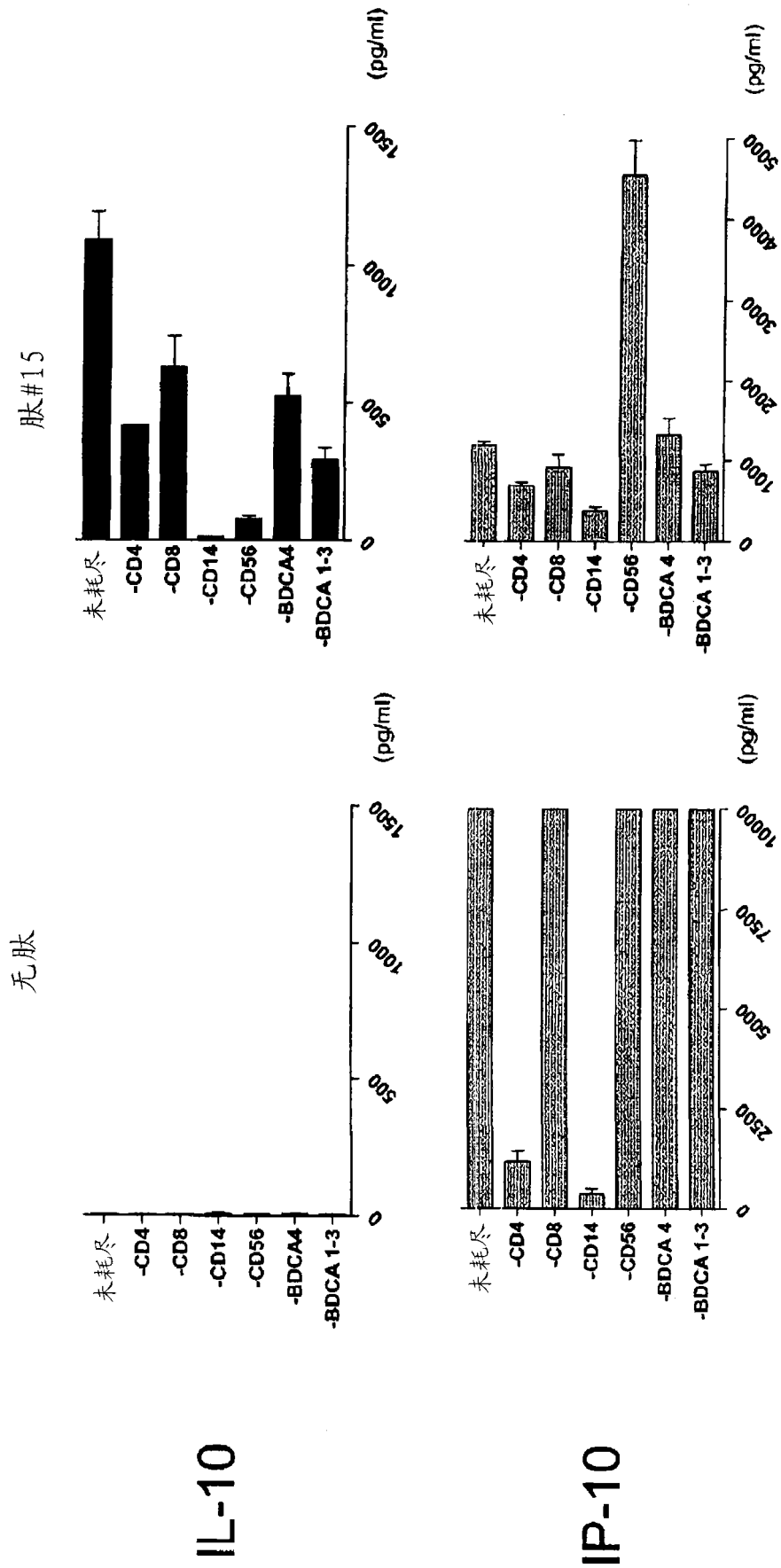


图 48

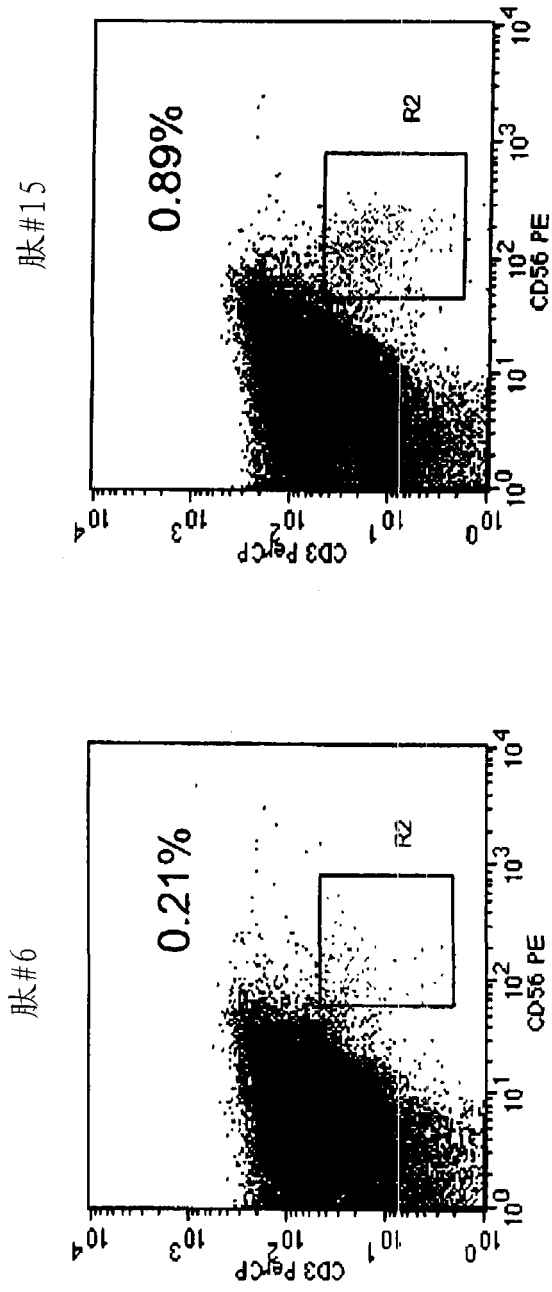


图 49

专利名称(译)	免疫应答评价方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1989410A</a>	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200580025001.0	申请日	2005-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒研究协会		
申请(专利权)人(译)	贝勒研究院		
当前申请(专利权)人(译)	贝勒研究院		
[标]发明人	J邦舍罗 JE康诺利 AK帕卢卡 H厄诺		
发明人	J·邦舍罗 J·E·康诺利 A·K·帕卢卡 H·厄诺		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 G01N33/564 G01N33/531 G01N33/00 A61K39/00 A61K38/00 A61K49/00 C12N15/10 C40B30/02 C40B30/04 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6878 C12N15/1034 C40B30/04 C40B40/10 G01N2800/52 G01N33/5023 G01N2800/24 G01N33/505 G01N33/6863 A61P19/02 A61P29/00		
代理人(译)	刘健 刘玥		
优先权	60/573912 2004-05-24 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明包括用于鉴定与个体HLS类型无关的T细胞抗原决定部位的组合物和方法，通过同时分析培养物的多个免疫反应性参数来鉴定至少一种抗原决定部位，其中在子集中引发目标免疫反应性的抗原决定部位被鉴定为关于该子集的靶向剂。

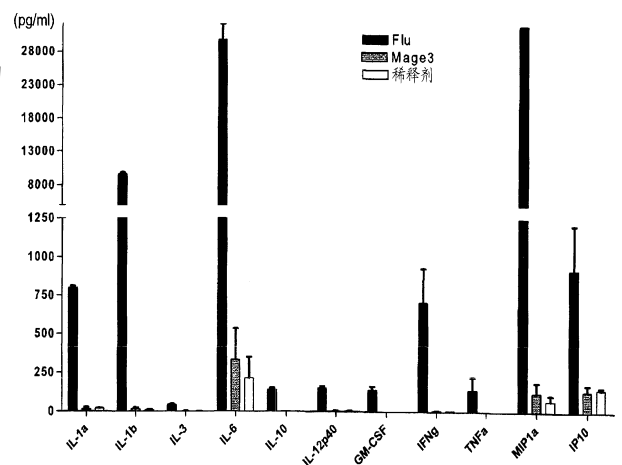


图 1