



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108369226 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680073368.8

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22)申请日 2016.12.15

代理人 何伟

(30)优先权数据

15200619.3 2015.12.16 EP

1650493-8 2016.04.12 SE

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/081141 2016.12.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/102921 EN 2017.06.22

(71)申请人 TCER公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72)发明人 H.格隆伦德

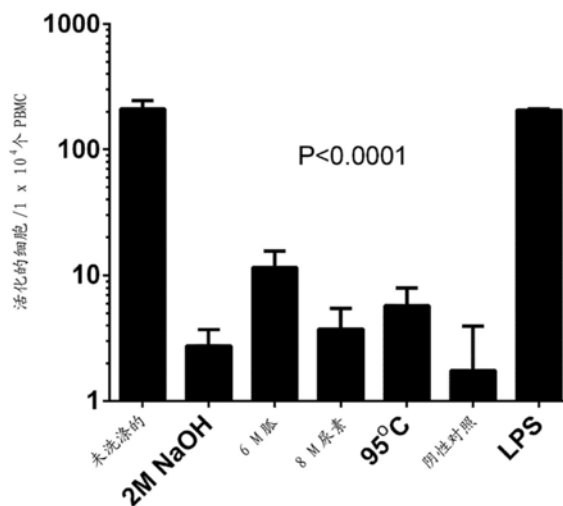
权利要求书3页 说明书14页 附图7页

(54)发明名称

T细胞反应性平台

(57)摘要

本申请涉及用于体外测定抗原特异性T细胞活化的方法,包括以下步骤:(a)提供具有与其紧密缔合的候选抗原多肽的可吞噬颗粒,其中与多肽缔合的颗粒已被进行变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰后续步骤;(b)提供活的抗原呈递细胞;(c)在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下将洗涤的颗粒与抗原呈递细胞接触;(d)提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;(e)在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,将T细胞样品与已和颗粒接触的抗原呈递细胞接触;和(f)确定T细胞样品中T细胞活化的程度。



1. 测定抗原特异性T细胞活化的方法,包括以下步骤:
 - a. 提供具有与其紧密缔合的候选抗原多肽的可吞噬颗粒,其中与多肽缔合的颗粒已被进行变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰后续步骤;
 - b. 提供活的抗原呈递细胞;
 - c. 在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下将洗涤的颗粒与抗原呈递细胞体外接触;
 - d. 提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;
 - e. 在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,将T细胞样品与在已和颗粒体外接触的抗原呈递细胞接触;和
 - f. 确定T细胞样品中T细胞活化的程度。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法进一步包括步骤(a'),其使候选多肽与可吞噬颗粒紧密缔合,和/或步骤(a''),其使与颗粒缔合的候选抗原经历变性洗涤。
3. 测定抗原特异性T细胞活化的方法,包括以下步骤:
 - a. 提供可吞噬颗粒;
 - b. 将候选抗原多肽与颗粒紧密缔合;
 - c. 对与多肽缔合的颗粒进行变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰随后的步骤;
 - d. 提供活的抗原呈递细胞;
 - e. 在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下,使洗涤的颗粒与抗原呈递细胞体外接触;
 - f. 提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;
 - g. 在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,使T细胞样品和与颗粒接触过的抗原呈递细胞体外接触;和
 - h. 确定T细胞样品中T细胞活化的程度。
4. 根据前述权利要求中任一项的方法,还包括将T细胞活化程度与相关参照比较的步骤,其中,与参照相比,样品中更程度的T细胞活化表明候选抗原导致样品中抗原特异性T细胞活化。
5. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中确定T细胞样品中T细胞活化的程度涉及确定样品中活化的T细胞的分数。
6. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中针对相同的T细胞样品测定几种候选抗原。
7. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中针对相同的T细胞样品测定至少10种候选抗原。
8. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述颗粒具有的最大尺寸为小于 $5.6\mu\text{m}$ 、优选小于 $4\mu\text{m}$ 、更优选小于 $3\mu\text{m}$ 、甚至更优选在 $0.5\text{-}2\mu\text{m}$ 之间或最优选约 $1\mu\text{m}$ 。
9. 根据权利要求8的方法,其中所述颗粒基本上是球形的。
10. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受高pH,例如至少pH 13,更优选至少pH 14,最优选至少pH 14.3。
11. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受低pH。
12. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受高温,如至少 90°C ,更优选至少 92°C ,最优选至少 95°C 。

13. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受变性剂,如足够浓度的尿素或盐酸胍,所述浓度为例如至少5M、6M、7M或8M。

14. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述变性洗涤导致所述抗原中的内毒素的量使得在所述T细胞活化测定中,内毒素的最终浓度小于100pg/ml,优选小于50pg/ml,更优选小于25pg/ml,且最优选小于10pg/ml。

15. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述颗粒具有顺磁性。

16. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽与所述颗粒共价连接。

17. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽通过金属螯合物与所述颗粒连接。

18. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗原呈递细胞和所述T细胞样品来自同一个体。

19. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗原呈递细胞和所述T细胞样品来源于相同的血液样品。

20. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗原呈递细胞和所述T细胞样品来源于来自相同个体的PBMC样品。

21. 根据权利要求20的方法,其中所述PBMC样品是新鲜的或已冷冻过的。

22. 根据权利要求1-18中任一项的方法,其中所述T细胞样品来源于肿瘤,优选肿瘤中的淋巴管。

23. 根据权利要求1-18中任一项的方法,其中所述T细胞样品来源于腹水。

24. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述T细胞样品包含CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。

25. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中被洗涤的颗粒、抗原呈递细胞和T细胞样品同时接触。

26. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中测定T细胞样品中T细胞活化的程度包括测定与抗原呈递细胞接触的T细胞的分数,T细胞对所述抗原的响应是通过分泌IFN- γ 、IL-17、IL-22或其组合。

27. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述方法用于诊断多发性硬化症或跟踪多发性硬化过程,并且涉及测定T细胞样品中T细胞活化的程度,包括测定与抗原呈递细胞接触的T细胞的分数,T细胞对所述抗原的响应是通过分泌IL-17和/或IL-22。

28. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中使用ELISpot或FluoroSpot技术测定T细胞样品中的T细胞活化程度。

29. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽包含至少50个氨基酸,优选至少75个氨基酸,最优选至少100个氨基酸。

30. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽为蛋白质表位特征标签(PrEST)的形式。

31. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述T细胞样品来自人,并且所述候选抗原多肽序列来自人。

32. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽来源于已知与疾病相关的抗原或疑似与疾病相关的抗原。

33. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽来自以下多肽:

- a. 已知在受自身免疫性疾病影响的组织或细胞中高度表达的多肽；
- b. 已知与肿瘤疾病有关的多肽；
- c. 已知与自身免疫性疾病有关的多肽；
- d. 已知与传染病有关的多肽；或
- e. 已知与过敏或类似超敏反应有关的多肽。

34. 根据前述任一项的方法，其用于诊断测试受试者中的自身反应性，包括以下步骤：

a. 提供具有与其紧密缔合的候选的肽自身抗原的可吞噬颗粒，其中与多肽缔合的颗粒已经受变性洗涤，导致内毒素水平足够低，从而不干扰随后的步骤；

b. 提供来自测试受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 样品，其包含活的T细胞和活的抗原呈递细胞；

c. 在允许由抗原呈递细胞吞噬颗粒并允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下，将PBMC样品与所述颗粒体外接触；

d. 对在接触的PBMC样品中活化的T细胞的分数进行定量；和

e. 将定量的分数与来自健康受试者的相应定量分数进行比较，其中，测试受试者中更高的活化T细胞分数表明测试受试者中针对候选的自身抗原的自体反应性。

T细胞反应性平台

技术领域

[0001] 本发明涉及测定抗原特异性T细胞活化的诊断和分析方法领域。

背景技术

[0002] 适应性免疫系统构成免疫系统的分支,其是可以特异地适应和响应生物体遇到的不同病原体或细胞破坏性挑战,而不是以更通用的方式进行反应的先天免疫系统。适应性系统包括体液免疫,即B细胞分泌的抗体和T细胞介导的免疫。适应性免疫系统的特异性在于B细胞和T细胞上表达的B细胞和T细胞受体。通过混合基因片段的复杂系统,身体产生几乎无限多样的B细胞和T细胞,每种细胞都表达某种蛋白质或肽的特异性受体。

[0003] T细胞是形成适应性免疫系统的主要部分的淋巴细胞,其在细胞介导的免疫中起着核心作用。定义的T细胞受体(TCR)在细胞表面表达,并且每种受体识别在MHC(主要组织相容性复合体)分子的情况下呈递的抗原衍生肽。存在几种类型的T细胞,每种在细胞免疫应答中都具有不同的功能。

[0004] 简而言之,有具有不同的功能的两种主要类型的T细胞。CD8阳性细胞毒性T细胞将结合存在于细胞上I类MHC受体上的肽(在人类中称为I类人类白细胞抗原(HLA))。所有有核细胞都表达I类HLA。如果呈递的肽被认为是外来的(最常见的是病毒感染的迹象),则细胞毒性T细胞将通过蛋白质粒酶B或穿孔素杀死细胞。表达表面标记物CD4的辅助性T细胞(Th)不杀伤,而是通过分泌细胞因子协调免疫反应,所述细胞因子为蛋白,其放大细胞之间的促炎信号,以及有时放大抑制信号。T辅助细胞的另一个重要功能是诱导B细胞的类别转换,例如,将分泌IgM的B细胞变成分泌IgG的细胞,这将增加针对抗原的体液免疫应答。

[0005] T辅助细胞将通过其TCR结合在MHC-II上呈递的其相应肽(在人类中称为II类HLA),即在所谓的抗原呈递细胞(APC)或内皮细胞上特异性表达的受体。T细胞活化取决于发生Th-APC相互作用的微环境和在APC上表达的所谓的共刺激分子的类型。T辅助细胞可以分化成不同的Th亚群,例如,促炎性Th1、Th2、Th17细胞或称为调节性T细胞(Treg)的抑制性T辅助细胞类型。后一种子集对于控制免疫应答非常重要,因为不受限制的免疫系统是有害的并且可以导致组织损伤和自身免疫。

[0006] 存在几种适用于测定抗原特异性T细胞活化的方法,包括ELISpot、Fluorospot、用流式细胞术对细胞因子进行细胞内染色、FASCIA、增殖测定(例如胸苷掺入、CFSE或BrdU染色)、用MHC-I或II的四聚体进行特异性TCR-检测、以及分泌细胞因子的ELISA或Luminex分析。

[0007] 利用ELISpot技术,可以直接检测细胞响应刺激时特定细胞因子的释放。将细胞接种在膜上并测量分泌细胞因子的细胞的数量。根据正在测量的细胞因子,可以测量不同的变体,例如巨噬细胞或T细胞活化。FluoroSpot基于ELISpot技术,可同时读取几种不同的所分泌的细胞因子。这允许更精确和细致的细胞活化评估。这两种方法都提供了测量T细胞活化的快速而简单的方式。

[0008] 近年来,大量重组表达的蛋白质,即用克隆技术和细菌或哺乳动物表达系统产生

的蛋白质,已经通过大规模的努力如Human Atlas Project而被生产出来。发明人已经认识到,能够筛选特异性活化T细胞的抗原的这种多肽集合将具有重要的科学和实践意义。例如,针对多肽文库筛选受到如自身免疫性疾病、肿瘤疾病、过敏或传染病影响的患者的T细胞样品是令人感兴趣的,从而确定患者的T细胞与哪种表位反应。目前的方法通常集中在确定患者的免疫系统产生的抗体针对的是哪个表位(即体液应答),未能提供关于适应性免疫系统的主要部分即T细胞介导的免疫性的相关信息。因此,能够大规模确定导致患者或一组患者中的T细胞活化的抗原可以获得新的疾病生物标志物库、实现更好的诊断、支持监测患者中疾病进展、帮助确定治疗目标等。

[0009] 由于实际原因,目前存在的大的多肽集合通常由大肠杆菌表达的蛋白质组成,因此含有大量源自宿主细胞外膜的内毒素。由于环境污染,即使在真核宿主中制备的或通过非生物肽合成制备的多肽集合都含有实际上显著水平的内毒素。在制备大的集合时,建立一种消除内毒素至低于检测水平的方法是不切实际的,因为内毒素倾向于与蛋白质结合并且一旦它们污染了多肽样品则通常是难以除去的。

[0010] 不幸的是,测定T细胞活化的试验的常见问题是,即使与T细胞接触的低水平的内毒素都会导致活化,这掩蔽了通常非常低水平的抗原特异性活化。被测试的T细胞群中只有一小部分以抗原特异性的方式与给定抗原发生反应(在来自最近遇到抗原的受试者血液中的级别为1/10000),而大部分细胞会对内毒素有应答,产生高水平的背景。考虑到无处不在的内毒素污染,用当前多肽集合进行上述筛选是不可行的。

[0011] 因此,本领域仍然需要用于测定抗原特异性T细胞活化的方法,其能够耐受候选抗原制备物中的内毒素污染,使得能够筛选大的多肽集合。本发明的目的是提供用于测定抗原特异性T细胞活化的改进的方法和手段。

[0012] 定义

[0013] 内毒素,例如脂多糖(LPS),其包含共价连接的脂质和在革兰氏阴性细菌如大肠杆菌的外细胞壁上发现的多糖亚基。

[0014] CD4⁺T细胞或T辅助细胞是通过细胞因子分泌来协调免疫应答的细胞。它们都可以抑制或增强其他免疫细胞,例如刺激B细胞的抗体类别转换、细胞毒性T细胞的扩增或增强吞噬细胞。它们通过APC上的II类MHC的抗原呈递而被活化,并且它们表达对特定抗原内约15个氨基酸的区段(所谓的T细胞表位)具有特异性的T细胞受体(TCR)。

[0015] CD8⁺T细胞或细胞毒性T细胞是杀死肿瘤细胞、被感染的细胞或其他受损的细胞的细胞。与CD4⁺T细胞不同,它们不需要APC进行活化。它们的T细胞受体识别由I类MHC呈递的抗原衍生肽(大约9-11个氨基酸长),所有有核细胞均表达该蛋白。

[0016] 抗原特异性T细胞活化是需要TCR与MHC(HLA)分子上存在的确定肽之间的相互作用并结合共刺激的过程。

[0017] 蛋白质表位特征标签(PrEST):重组产生的肽,其是来自宿主(例如人)的蛋白质片段,代表其所来源的蛋白质的独特肽序列(参见Lindskog M,Rockberg J,Uhlen M,Sterky F.Selection of protein epitopes for antibody production.Biotechniques.2005;38(5):723-7)。

[0018] 抗原呈递细胞(APC)通常是树突细胞(DC)、B细胞或巨噬细胞,其是吞噬细胞或内化细胞外有机体或蛋白质(即抗原)的细胞,并且在加工后将II类MHC上的抗原衍生的肽呈

递至CD4⁺T细胞。在血液中,单核细胞是最丰富的抗原呈递细胞。

[0019] 可吞噬颗粒被定义为能够被免疫系统细胞,特别是单核细胞吞噬的颗粒。

[0020] 外周血单核细胞(PBMC)是通过全血的密度梯度离心制备的人血液的一部分。PBMC部分主要由淋巴细胞(70-90%)和单核细胞(10-30%)组成,而红细胞、粒细胞和血浆已被去除。

附图说明

[0021] 图1.比较不同的用于去除内毒素的洗涤方法。评估当响应经历不同洗涤的蛋白偶联珠粒时单核细胞的活性,比较不同变性洗涤相对于未洗涤珠子的有效性。希望取得较低的活化。使用单因素ANOVA确定P-值。钉书钉形线(staple)表示SD。

[0022] 图2.用细胞增殖试验测量T细胞活化。使用来自卵清蛋白致敏小鼠的脾细胞的胸苷掺入分析。比较卵清蛋白偶联的珠子、牛血清白蛋白偶联的珠子和培养基。用students T检验确定P值并在 $p < 0.05$ 时标明。钉书钉形线表示SD。

[0023] 图3.比较多发性硬化症(MS)患者和健康对照者中当用疑似MS中的自身抗原刺激时的T细胞活化的FNY/IL-22/IL-17Fluorospot试验。用Mann-Whitney-U检验确定P值并在发现时标明。钉书钉形线表示平均值的CI95%。

[0024] 图4.在多发硬化症患者中对125种蛋白质的文库进行自动抗原筛选。比较MS患者的PBMC与健康对照的PBMC的T细胞活化。图A,通过IL22-FluoroSpot进行活化测定。图B,通过IL17-FluoroSpot进行活化测定。图C,通过IFN γ FLUOROSPOT进行活化测定。患者的T细胞对文库中一些蛋白质的反应明显的多。空心方块和实心圆圈分别表示患者和对照的PBMC的平均活化,钉书钉形线表示平均值的CI95%。使用双向ANOVA确定P值。星号表示P值。

[0025] 图5.珠子尺寸对T细胞活化的影响。对来自卵清蛋白致敏小鼠的脾细胞进行增殖试验(具有胸苷掺入)。与直径为5.6 μ m、1 μ m和0.2 μ m的不同尺寸珠子偶联的卵清蛋白的比较。使用students T-测试确定P值,且当发现 $p < 0.05$ 时标明。钉书钉形线表示SD。

发明内容

[0026] 本发明涉及以下项目。以下各项中公开的主题应被视为以与专利权利要求中披露的主题相同的方式公开。

[0027] 1.测定抗原特异性T细胞活化的方法,包括以下步骤:

[0028] a.提供具有与其紧密缔合的候选抗原多肽的可吞噬颗粒,其中与多肽缔合的颗粒已被进行变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰后续步骤;

[0029] b.提供活的抗原呈递细胞;

[0030] c.在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下将洗涤的颗粒与抗原呈递细胞体外接触;

[0031] d.提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;

[0032] e.在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,将T细胞样品与在已和颗粒体外接触的抗原呈递细胞接触;和

[0033] f.确定T细胞样品中T细胞活化的程度。

[0034] 2.根据项目1所述的方法,其中所述方法进一步包括步骤(a'),其使候选多肽与可

吞噬颗粒紧密缔合,和/或步骤(a”) ,使与颗粒缔合的候选抗原经历变性洗涤。

[0035] 3. 测定抗原特异性T细胞活化的方法,包括以下步骤:

[0036] a. 提供可吞噬颗粒;

[0037] b. 将候选抗原多肽与颗粒紧密缔合;

[0038] c. 对与多肽缔合的颗粒进行变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰随后的步骤;

[0039] d. 提供活的抗原呈递细胞;

[0040] e. 在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下,使洗涤的颗粒与抗原呈递细胞体外接触;

[0041] f. 提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;

[0042] g. 在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,使T细胞样品和与颗粒接触过的抗原呈递细胞体外接触;和

[0043] h. 确定T细胞样品中T细胞活化的程度。

[0044] 4. 根据前述项目中任一项的方法,还包括将T细胞活化程度与相关参照比较的步骤,其中,与参照相比,样品中更高层次的T细胞活化表明候选抗原导致样品中抗原特异性T细胞活化。

[0045] 5. 根据前述项目中任一项的方法,其中确定T细胞样品中T细胞活化的程度涉及确定样品中活化的T细胞的分。

[0046] 6. 根据前述项目中任一项的方法,其中针对相同的T细胞样品测定几种候选抗原。

[0047] 7. 根据前述项目中任一项的方法,其中针对相同的T细胞样品测定至少10种候选抗原。

[0048] 8. 根据前述项目中任一项的方法,其中所述颗粒具有的最大尺寸为小于 $5.6\mu\text{m}$ 、优选小于 $4\mu\text{m}$ 、更优选小于 $3\mu\text{m}$ 、甚至更优选在 $0.5\text{--}2\mu\text{m}$ 之间或最优选约 $1\mu\text{m}$ 。

[0049] 9. 根据项目8所述的方法,其中所述颗粒基本上是球形的。

[0050] 10. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受高pH,例如至少pH 13,更优选至少pH 14,最优选至少pH 14.3。

[0051] 11. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受低pH。

[0052] 12. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受高温,如至少 90°C ,更优选至少 92°C ,最优选至少 95°C 。

[0053] 13. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述变性洗涤涉及使所述与多肽缔合的颗粒经受变性剂,如足够浓度的尿素或盐酸胍,所述浓度为例如至少5M、6M、7M或8M。

[0054] 14. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述变性洗涤导致所述抗原中的内毒素的量使得在所述T细胞活化测定中,内毒素的最终浓度小于 100pg/ml ,优选小于 50pg/ml ,更优选小于 25pg/ml ,且最优选小于 10pg/ml 。

[0055] 15. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述颗粒具有顺磁性。

[0056] 16. 根据前述项目中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽与所述颗粒共价连接。

[0057] 17. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述候选抗原多肽通过金属螯合物与所述颗粒连接。

- [0058] 18. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞和所述T细胞样品来自同一个体。
- [0059] 19. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞和所述T细胞样品来源于相同的血液样品。
- [0060] 20. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞和所述T细胞样品来源于来自相同个体的PBMC样品。
- [0061] 21. 根据项目20的方法,其中PBMC样品是新鲜的或已冷冻过的。
- [0062] 22. 根据项目1-18中任一项的方法,其中所述T细胞样品来源于肿瘤,优选肿瘤中的淋巴管。
- [0063] 23. 根据项目1-18中任一项的方法,其中所述T细胞样品来源于腹水。
- [0064] 24. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述T细胞样品包含CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。
- [0065] 25. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中被洗涤的颗粒、抗原呈递细胞和T细胞样品同时接触。
- [0066] 26. 根据前述项中任一项的方法,其中测定T细胞样品中T细胞活化的程度包括测定与抗原呈递细胞接触的T细胞的分数的T细胞对所述抗原的响应是通过分泌IFN- γ 、IL-17、IL-22或其组合。
- [0067] 27. 根据前述项中任一项的方法,其中所述方法用于诊断多发性硬化症或跟踪多发性硬化过程,并且涉及测定T细胞样品中T细胞活化的程度,包括测定与抗原呈递细胞接触T细胞的分数的T细胞对所述抗原的响应是通过分泌IL-17和/或IL-22。
- [0068] 28. 根据前述项目中的任一项所述的方法,其中使用ELISpot或FluoroSpot技术测定T细胞样品中的T细胞的活化程度。
- [0069] 29. 根据前述项目中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽包含至少50个氨基酸,优选至少75个氨基酸,最优选至少100个氨基酸。
- [0070] 30. 根据前述项目中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽为蛋白质表位特征标签(PrEST)的形式。
- [0071] 31. 根据前述项目中任一项所述的方法,其中所述T细胞样品来自人,并且所述候选抗原多肽序列来自人。
- [0072] 32. 根据前述项目中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽来源于已知与疾病相关的抗原或疑似与疾病相关的抗原。
- [0073] 33. 根据前述项目中任一项的方法,其中所述候选抗原多肽来自以下多肽:
- [0074] a. 已知在受自身免疫性疾病影响的组织或细胞中高度表达的多肽;
- [0075] b. 已知与肿瘤疾病有关的多肽;
- [0076] c. 已知与自身免疫性疾病有关的多肽;
- [0077] d. 已知与传染病有关的多肽;或
- [0078] e. 已知与过敏或类似的超敏反应有关的多肽。
- [0079] 34. 根据前述任一项的方法,其用于诊断测试受试者中的自身反应性,包括以下步骤:
- [0080] a. 提供具有与其紧密缔合的候选的肽自身抗原的可吞噬颗粒,其中与多肽缔合的

颗粒已经受变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰随后的步骤;

[0081] b. 提供来自测试受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 样品,其包含活的T细胞和活的抗原呈递细胞;

[0082] c. 在允许由抗原呈递细胞吞噬颗粒并允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,将PBMC样本与所述颗粒体外接触;

[0083] d. 对在接触的PBMC样品中活化的T细胞的分数进行定量;和

[0084] e. 将定量的分数与来自健康受试者的相应定量分数进行比较,其中,测试受试者中更高的活化T细胞分数表明测试受试者中针对候选的自身抗原的自体反应性。

具体实施方式

[0085] 本发明提供了用于测定抗原特异性T细胞活化的方法和手段,在下面更详细地公开。通过解决与在测定抗原特异性T细胞活化中使用内毒素污染的多肽相关的问题,所述方法和手段能够实现并促进对新的和现有的多肽集合的大规模筛选,以用于发现生物标志物、诊断、监测患者中的疾病进程、确定治疗目标等。

[0086] 测定抗原特异性T细胞活化的方法

[0087] 在第一方面,本发明提供了用于测定抗原特异性T细胞活化的体外方法,其包括以下步骤:

[0088] a. 提供具有与其紧密缔合的候选抗原多肽的可吞噬颗粒,其中与多肽缔合的颗粒已经过变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰该方法的任何后续步骤 (b-f);

[0089] b. 提供活的抗原呈递细胞 (APC);

[0090] c. 在允许由抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下,将洗涤的颗粒和与颗粒在体外接触过的抗原呈递细胞接触;

[0091] d. 提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;

[0092] e. 在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,将T细胞样品与抗原呈递细胞在体外接触;和

[0093] f. 确定T细胞样品中T细胞活化的程度。

[0094] 该方法还可以包括:步骤 (a') 使候选多肽与可吞噬颗粒紧密缔合;和/或 (a'') 使与颗粒缔合的候选抗原经历变性洗涤。因此,第一方面的方法可以包括以下步骤:

[0095] a. 提供可吞噬颗粒;

[0096] b. 将候选抗原多肽与所述颗粒紧密缔合;

[0097] c. 使与多肽缔合的颗粒进行变性洗涤,产生足够低的内毒素水平,从而不干扰该方法的任何后续步骤 (d-h);

[0098] d. 提供活的抗原呈递细胞;

[0099] e. 在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下,使洗涤的颗粒与抗原呈递细胞在体外接触;

[0100] f. 提供待分析的T细胞样品,其包含活的T细胞;

[0101] g. 在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,使T细胞样品和与颗粒接触过的抗原呈递细胞在体外接触;和

[0102] h. 确定T细胞样品中T细胞活化的程度。

[0103] 洗涤的颗粒、抗原呈递细胞和T细胞样品可以在同一容器中同时接触。对于允许细胞抗原特异性活化的条件,使T细胞样品和与颗粒接触过的抗原呈递细胞接触的步骤中的条件必须使得来自非抗原特异性T细胞活化的背景足够低以不干扰测定。

[0104] 候选抗原多肽

[0105] 候选抗原多肽优选包含至少50个氨基酸,甚至更优选至少75个氨基酸,最优选至少100个氨基酸。候选抗原多肽可以是蛋白质表位特征标签(PrEST)的形式。由PrEST组成的大型蛋白质文库已经存在,例如在Human Atlas Project中创建的文库(Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A等, Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science. 2015; 347(6220): 1260419)。PrEST含有对于相应的全长蛋白质来说独特的氨基酸序列,并已用于大规模的Human Atlas Project项目中,以生成大多数人类蛋白质的抗体。对相同的人类蛋白使用几种PrEST可增加找到相关T细胞表位的机会。抗原多肽大于APC呈递的片段,这也确保了每种抗原的多种表位将被呈现,因为APC对抗原的降解不是一个统一的过程。换句话说,使用具有特定大小的多肽抗原是通过利用APC的吞噬途径实现的,并且允许使用更少的抗原多肽改善抗原的检测,这与将抗原在能够无需细胞加工就直接结合MCH受体的短肽中呈递相反。

[0106] 候选抗原多肽可以来自已知与疾病有关的抗原或疑似与疾病有关的抗原。例如,候选抗原多肽来源于以下多肽:

[0107] a. 已知在受自身免疫性疾病影响的组织或细胞中高度表达的多肽,例如胰岛素原、髓鞘相关蛋白;

[0108] b. 已知与肿瘤疾病有关的多肽,例如雌激素受体、表皮生长因子受体、细胞周期蛋白依赖性激酶1;

[0109] c. 已知与自身免疫性疾病有关的蛋白,例如髓鞘少突胶质细胞蛋白、髓鞘碱性蛋白、转醛醇酶;

[0110] d. 已知与传染病有关的多肽,例如病毒衣壳抗原、细菌肠毒素;

[0111] e. 已知与过敏或类似的超敏反应有关的多肽,例如Canf 1、Eqc1、Feld1;

[0112] f. 已知的肿瘤抗原,由通过例如p53、ERBB2 (Erb-B2受体酪氨酸激酶2)、PIK3CA (磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶)中的常见突变形成的新生抗原;

[0113] g. 已知的修饰蛋白质,如瓜氨酸化、变体或磷酸化的蛋白。

[0114] T细胞样品和候选抗原多肽来自相同物种或不同物种。例如,为了研究自身免疫或肿瘤疾病,T细胞样品和候选抗原多肽优选来源于相同的物种。为了研究传染病,T细胞样品来自宿主,而候选抗原多肽来自感兴趣的病原体。为了研究过敏或类似的超敏反应,T细胞样品来自感兴趣的受试者,而候选抗原多肽来源于已知或疑似引起受试者过敏或其他超敏反应的不同物种。

[0115] T细胞样品可以来源于人,并且候选抗原多肽序列可以来源于人。

[0116] 颗粒性质

[0117] 颗粒可被抗原呈递细胞吞噬(APC;在下面讨论)。APC可以吞噬许多不同材料和形状的颗粒。相反,颗粒的大小限制了吞噬作用。尺寸太小,则细胞不会被触发以吞噬颗粒。尺寸太大,则细胞将无法吞噬颗粒,因为它无法容进细胞。

[0118] 颗粒可以具有的最大尺寸为小于5.6 μm 、优选小于4 μm 、更优选小于3 μm 、甚至更优

选在0.5-2 μm 之间或最优选约1 μm 。颗粒可以是基本上球形的,在这种情况下,尺寸指的是直径。

[0119] 与细菌相似的大小促进APC的完全吞噬作用。这是为了确保抗原被APC降解并随后通过MHC II呈递给T细胞。最佳尺寸取决于具体APC的类型,并可以通过常规实验来确定(参见实施例5,图5)。

[0120] 颗粒可以具有顺磁性,这通过允许颗粒被磁体收集和/或保持就位而促进了下面讨论的变性洗涤。但是,也可以通过其他方式进行洗涤,例如通过将颗粒保持在柱中,或通过重力或通过离心使颗粒沉降。

[0121] 抗原多肽与颗粒的缔合

[0122] 抗原多肽以允许进行如下所述的变性洗涤而不使抗原从颗粒中解离出来的方式与颗粒缔合。

[0123] 实施例1中显示了使多肽与颗粒缔合的一种可能方式。然而,精确的缔合方式对于本发明的方法来说并不重要。优选地,候选抗原多肽与颗粒共价连接。或者,候选抗原多肽可以通过金属螯合物与颗粒连接。

[0124] 例如,与金属螯合配体例如亚氨基二乙酸连接的颗粒可以结合金属离子例如 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 或 Fe^{3+} 。这些金属螯合物进而可以以很高的强度与含有例如组氨酸或半胱氨酸(cystein)的蛋白质和肽结合。因此,具有金属螯合物的颗粒可以以允许严苛洗涤以减少结合的肽/蛋白质中的LPS和其他污染成分的量的方式非共价吸附肽/蛋白质。

[0125] 变性洗涤

[0126] 进行变性洗涤以将候选抗原多肽中的内毒素水平降低至不干扰确定抗原特异性T细胞活化程度的后续步骤的水平。

[0127] 由于内毒素与多肽紧密缔合,进行变性洗涤(其被定义为至少短暂破坏二级和三级结构)是非常有利的,并且在许多情况下对于从多肽中解离内毒素是至关重要的。在本发明中,即使非常低量的内毒素也会造成干扰。

[0128] 抗原呈递细胞在摄取后将抗原多肽降解成小片段,因此短暂和不可逆的变性(破坏3D-结构)都是可以容忍的。与本发明公开的颗粒缔合使得能够处理会变为不溶或聚集的变性蛋白质。

[0129] 如实施例2和图1所示,在本发明的范围内变性洗涤的具体方式并不是关键性的。例如,变性洗涤可涉及使缔合的多肽经历高pH值、低pH值、高温、变性剂或其组合。优选地,变性洗涤涉及使缔合的多肽经历高pH或强变性剂,如8M尿素或6M盐酸胍。最优选地,变性洗涤涉及使缔合的多肽经受至少13.0、更优选至少14.0、最优选至少14.3的高pH。变性可涉及使缔合的多肽用1-5M、优选1-3M、更优选1.5-2.5M、最优选2M的强碱例如NaOH或KOH,优选NaOH洗涤。

[0130] 变性洗涤的具体优点是可以选择条件使得具有颗粒和缔合的多肽的制剂被灭菌。如果制剂被活微生物污染,细胞培养的后续步骤会受到破坏。具体而言,高pH洗涤(例如 $\text{pH} > 14$)可方便地同时且快速地消毒制剂并实现有效消除内毒素的变性洗涤。

[0131] 有利的是,变性洗涤除了将内毒素冲走之外还使内毒素降解或失活。高pH洗涤(例如 $\text{pH} > 14$)对内毒素具有灭活作用。

[0132] 洗涤可以包括单次洗涤或多次重复洗涤,例如2、3、4或5次洗涤。

[0133] 变性洗涤必须导致候选抗原多肽中的内毒素水平与本发明公开的用于测定抗原特异性T细胞活化的方法相容,使得内毒素不会对产生太高的干扰,因而能够充分检测到抗原特异性T细胞活化。使用本发明实施例2中所述的单核细胞活化测定(IL-1 β /IL-6FluoroSpot)可方便地测试剩余的内毒素水平。内毒素的耐受水平受环境影响,特别是抗原浓度。然而,抗原中内毒素的量优选为,使得在T细胞活化测定中,内毒素的最终浓度小于100pg/ml(即0-100pg/ml),优选小于50pg/ml,更优选小于25pg/ml,最优选小于10pg/ml。测量样品中内毒素的方法是已知的,例如LAL测定法。

[0134] 抗原呈递细胞(APC)和T细胞样品

[0135] 在本发明的背景下,APC是专门的抗原呈递细胞,例如单核细胞/巨噬细胞或树突细胞。APC可以是原代细胞或永生细胞。

[0136] APC必须与T细胞样品的T细胞相容,使得它们能够在T细胞可以与之反应的抗原特异性背景(MHC限制的)中将抗原呈递给T细胞。APC和T细胞样品优选从相同的物种获得并且相对于MHC受体是供体匹配的。但是,也可以使用来自不同物种的基因工程化APC。

[0137] 如果抗原呈递细胞和T细胞样品来自同一个体,则避免了APC和T细胞之间错配的任何可能性。

[0138] 抗原呈递细胞和T细胞样品可以来源于相同的血液样品,从实践的角度来看这是有利的。抗原呈递细胞和T细胞样品可以来自同一个体的PBMC样品。从外周血样中获得PBMC是一个常规方案,它提供了可以同时并且从同一个体中提供APC和T细胞的便利来源。

[0139] PBMC样品可以新鲜使用或冷冻。从物流角度来看,使用冷冻细胞的可能性具有很大的实际优势。

[0140] T细胞样品可以来源于肿瘤,优选肿瘤中的淋巴管。

[0141] T细胞样品也可来自腹水。

[0142] T细胞样品可以包含完整的PBMC,包括CD4⁺和CD8⁺T细胞、纯化的T细胞群或缺乏特定T细胞群的PBMC。

[0143] 确定T细胞活化程度

[0144] 所述方法可以进一步包括将T细胞活化程度与相关参照进行比较的步骤,其中与参照相比,样品中更高层次的T细胞活化表明候选抗原导致样品中的抗原特异性T细胞活化。该参照对于定义“活化”是关键性的,因此优选与参照样本相比来定义活化程度。参照样品可以为例如,当分析患者样品时为来自正常健康个体的样品,当分析肿瘤或肿瘤引流淋巴结样品时为来自正常组织的样品,或当跟踪治疗效果时为治疗之前的样品。参照样品用于设定诊断/预后结论的阈值,并确定抗原特异性阳性(即活化)或阴性(即下调)。

[0145] 确定T细胞样品中T细胞活化的程度可以涉及确定样品中活化的T细胞的分数,即活化的T细胞相对于样品中总T细胞的数量。相对于参照样品中活化细胞的分数,活化细胞分数将提供针对特定抗原的T细胞活化强度的测量。优选地,在每次分析中,在没有用抗原孵育的样品(即阴性对照)中确定各样品中的自发活化水平(“背景活化水平”)。背景活化可以在分析中得到补偿;换句话说,可以在净值上计算活化分数,其中减去针对阴性对照的活化分数。

[0146] 如实施例3中所示,可以使用ELISpot/FluoroSpot-技术或增殖测定(即胸苷掺入)确定T细胞样品中的T细胞活化程度。然而,适用于该目的的其他测定和技术也是已知的并

且也可以使用。测定T细胞样品中的T细胞活化程度可以包括测定与抗原呈递细胞接触的T细胞的分數,其响应是通过分泌干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素17 (IL-17)、白细胞介素22 (IL-22) 或其组合,例如通过ELISpot或FluoroSpot测定。其他相关分析物(细胞因子的组合)可用于分析特定的疾病或病症。例如,当分析过敏患者时,可以分析Th2细胞因子而不是Th1/Th17细胞因子。T-reg细胞因子在癌症、过敏以及跟踪疫苗治疗时是重要的。因此,FluoroSpot技术能够分析各种条件下各种候选抗原肽的相关活化概况。这获得了关于例如患者之间的异质性、疾病的严重程度和进展的信息。

[0147] 如实施例3所示,IL-17和/或IL-22分泌的测定出乎意料地比IFN- γ 更好地区分了MS患者和健康对照。因此,确定T细胞样品中T细胞活化的程度优选包括确定与抗原呈递细胞接触的T细胞的分數,对所述抗原的响应是通过分泌IL-17和/或IL-22,并且该方法用于诊断多发性硬化症,或者跟踪多发性硬化症的过程。换句话说,优选分析来自患有MS或疑似患有MS的受试者的T细胞样品在响应候选抗原时的IL-17和/或IL-22的分泌。

[0148] 多重分析

[0149] 如实施例4所示,可以针对相同的T细胞样品测定几种候选抗原。优选地,针对相同的T细胞样品测定至少10种候选抗原。使用本发明的方法,额外的样品不会使实验室工作增加很多。这里存在本发明方法的一个优点,即很容易筛选大量的抗原而不费力气。这样做的一个优点是,例如能够对可能的自身抗原进行大量筛选,这增加了找到真正的自身抗原的机会。

[0150] 诊断自身反应性

[0151] 第一方面的方法可以是用于诊断测试受试者中的自身反应性的方法,包括以下步骤:

[0152] a. 提供可吞噬颗粒,其具有与其紧密缔合的候选肽自身抗原,其中与多肽缔合的颗粒已进行变性洗涤,导致内毒素水平足够低,从而不干扰随后的步骤;

[0153] b. 提供来自测试受试者的外周血单核细胞(PBMC)样品,其包含活的T细胞和活的抗原呈递细胞;

[0154] c. 在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒并且允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下,将PBMC样品与颗粒在体外接触;

[0155] d. 对接触的PBMC样品中活化的T细胞分數进行定量;和

[0156] e. 将定量的分數与来自健康受试者的同样定量的分數进行比较,其中,测试受试者中更高比例的活化T细胞表明测试受试者中针对候选自身抗原的自身反应性。

[0157] 如实施例4所示,本发明提供了一种同时快速筛选大量自身抗原的强大工具,并且不限于MS。可根据疾病和患者容易地设计可筛选的候选蛋白质文库。

[0158] 只要抗原特异性T细胞是该疾病的特征并且抗原文库适应于所述疾病,则该方法可用于除自身免疫病症之外的其他炎性疾病。

[0159] 术语“包含”应被解释为包括但不限于。所有参照文献在此通过引用并入。本发明分成具有标题和小标题的部分仅仅是为了提高易读性,并且不能以任何方式被解释为限制,特别地,该部分彼此不以任何方式排除或限制将在不同的标题和子标题下的特征结合。

[0160] 实施例

[0161] 实施例1:与珠子偶联的多肽

[0162] 将多肽与含有游离羧酸基团的珠子共价偶联。在该实施例中使用了 Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid (ThermoFischer Scientific) (1 μ m直径的球体)。使用二喹啉甲酸、BCA、蛋白质测定来测量偶联前后的蛋白质浓度以确保偶联成功。测试几种多肽,并且每1mg珠粒平均偶联48.7 μ g(平均值:48.7,SD:20.5,N=10)。根据制造商的说明书,每1mg珠粒可偶联50 μ g多肽,表明在本实施例中完成的偶联效率高。

[0163] 实施例2:通过变性洗涤除去内毒素

[0164] 为了测试通过不同类型的变性洗涤除去的内毒素,测试了四种不同的变性洗涤条件:(a)高pH(2M NaOH,pH14.3),(b)加热(95 $^{\circ}$ C)和变性剂((c)8M尿素和(d)6M盐酸胍)。使用单核细胞活化测定(IL-1 β /IL-6FluoroSpot)测试剩余的内毒素水平,因为内毒素强烈增加了单核细胞活性,因此单核细胞活化可用于监测剩余的内毒素。

[0165] 与未洗涤的珠子相比,所有测试类型的变性洗涤都能显著降低单核细胞活化的量(参见图1)(所有洗涤 $P < 0.0001$)。变性洗涤非常有效,以至于洗涤过的珠子刺激细胞的程度与阴性对照相当。用2M NaOH洗涤后产生最低量的内毒素,紧随其后的是8M尿素。

[0166] 实施例3:T细胞活化测定

[0167] FluoroSpot

[0168] 用来自16名多发性硬化症患者和9名健康对照的样品进行FluoroSpot测定。将来自患者和对照的PBMC与疑似自身抗原一起在FluoroSpot平板中孵育。如图3所示,一些MS患者表现出显著更高数量的活化细胞(图a)。MS患者具有平均数为37.4(95%CI:13.0-52.9)的分泌IL-22的活化细胞,而健康对照具有平均数为3.3(95%CI:0.97-5.6)的活化细胞。差值的 P 值=0.0062。对于分泌IL-17的活化细胞,患者中的数量为14.7(CI95%:5.3-24.1),其与0.28(CI95%:1.4-2.0)形成对比,差值的 P 值 < 0.0007 (图b)。然而,对于分泌IFN γ 的细胞,无统计学显著性差异,对于患者平均数为80.0(CI95%:22.3-138),对照为33(CI95%:7.1-59.0), $P=0.495$ (图c)。使用Mann-Whitney-U检验计算显著性。

[0169] 这些结果表明,可以用FluoroSpot测定来测量偶联珠子的抗原的T细胞活化,并且可以进行患者与健康对照的比较。令人惊讶的是,T细胞活化的典型标记物IFN γ 在患者与对照比较中显示出最弱的差异。然而,IL-17和IL-22两者在患者和对照之间显示出较强的显著差异,表明它们是在MS中寻找自身抗原时更适合分析的细胞因子。

[0170] 增殖测定

[0171] 用胸苷掺入进行增殖测定。将来自卵清蛋白(OVA)免疫小鼠的脾细胞与OVA或BSA偶联的珠子一起孵育以测量抗原特异性增殖。与珠子一起孵育的细胞的增殖被表达为刺激指数(SI)。(如图2所示,与OVA-珠子一起孵育的细胞的增殖增加,SI为2.69(95%CI:1.6-3.78, $P < 0.005$)。与BSA一起孵育的细胞的增殖没有增加,SI为0.9(95%CI:0.7-1.1, $P=0.37$)。

[0172] 这些结果表明,通过增殖测定可以测量具有与珠子偶联的抗原的免疫细胞(在本实施例中为脾细胞)活化。它还显示观察到的增殖是抗原特异性的,因为偶联OVA的珠子刺激增殖,但偶联BSA的珠子完全不能诱导增殖。实验显示与珠子偶联的抗原可用于体外刺激抗原特异性T细胞增殖。胸苷掺入只是测量增殖的一种方法,因此用于测量增殖的其他方法也是适用的,例如CFSA稀释和BrdU掺入测定。

[0173] 实施例4:MS中针对125种蛋白质文库的自身抗原筛选

[0174] 鉴定多发性硬化症中的自身抗原;使用IFN γ /IL-22/IL-17A FluoroSpot作为T细胞活化测定来测量针对大量与珠子偶联的PrEST的T细胞活化。像这样的筛选通过检测与健康对照相比在来自MS患者的PBMC中刺激更高的T细胞应答的那些抗原来识别可能的自身抗原,并且有助于决定进一步分析哪种抗原。

[0175] 如图4所示,在筛选16名患者和9名健康对照时,当使用双向ANOVA分析时,可以看到患者的平均活化细胞数目和对照的平均活化细胞数目之间的统计学显著性差异。对于分泌IL-22的活化T细胞,在5种抗原中观察到差异:抗原#6 ($P < 0.0001$), 抗原#18 ($P < 0.0001$), 抗原#23 ($P < 0.0001$), 抗原#29 ($P < 0.0001$) 和抗原#33 ($P < 0.05$) (图a)。对于分泌IL-17的活化T细胞,在相同的5种抗原中观察到患者与对照之间的差异:抗原#6 ($P < 0.05$), 抗原#18 ($P < 0.0001$), 抗原#23 ($P < 0.01$), 抗原#29 ($P < 0.0001$) 和抗原#33 ($P < 0.05$) (图b)。对于IFN γ , 仅针对抗原#18 ($p < 0.0001$) 观察到了差异 (图c)。

[0176] 这些结果表明,本发明的方法可以用作自身抗原筛选,这是一种鉴定MS中可能的新型自身抗原的工具。

[0177] 实施例5:鉴定可吞噬珠子的合适珠尺寸

[0178] 使用具有胸苷掺入的增殖测定来测试珠尺寸对抗原特异性T细胞活化的影响。将来自用卵清蛋白(OVA)免疫小鼠的脾细胞用不同大小的OVA偶联珠子刺激,以测量抗原特异性增殖。如图5所示,与直径为0.2 μm 的OVA-珠子一起孵育的细胞显示增殖增加,平均SI为4.1 (95%CI:2.4-5.8, $P = 0.007$)。与直径为1 μm 的OVA-珠子一起孵育的细胞显示增殖增加,平均SI为8.4 (95%CI:6.1-10.6, $P < 0.005$)。与直径为5.6 μm 的OVA-珠子一起孵育的细胞不能刺激增殖,平均SI为1.1 (95%CI:0.4-2.7, $P = 0.876$)。

[0179] 这些结果显示与不同大小珠子偶联的抗原可刺激细胞增殖。直径约1 μm 的珠子对于细胞刺激是最有效的,但珠子大小低至0.2 μm 的珠粒仍然有效。可以合理地预测尺寸大于1 μm 的珠子也可以起作用,尽管随着直径接近5.6 μm ,珠子就完全不能刺激细胞。有理由认为1 μm 是最佳尺寸,因为它与细菌的尺寸相似。我们的免疫系统已经发展到对这种大小的微生物/微粒进行吞噬和反应。正常的抗原呈递细胞具有10-15 μm 范围内的大小。

[0180] 材料和方法

[0181] 实施例1

[0182] 蛋白质与含有游离羧酸基团的顺磁珠子的共价偶联。

[0183] 在该实施例中,使用具有1 μm 直径的**Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid** (ThermoFischer Scientific),并且根据制造商的方案(使用NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)和EDC (乙基碳化二亚胺)的两步法)进行偶联过程。

[0184] 用MES-缓冲液(25mM MES (2-(N-吗啉代)乙磺酸), pH 6)将珠子洗涤两次。然后通过在MES-缓冲液中向珠子加入50mg/ml NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)和50mg/ml EDC (N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺)并在室温下孵育30分钟而使羧酸基团活化。用磁铁收集珠子,除去上清液,用MES缓冲液洗涤珠子两次。将总共100 μg 的蛋白质在MES-缓冲液中稀释至浓度为1mg/ml,并加入珠子中并在室温下孵育1小时。用磁铁收集珠子并除去上清液并保存以进行蛋白质浓度测量。未反应的活化的羧酸基团用50mM Tris (pH 7.4)淬灭15分钟。然后用PBS (pH 7.4)洗涤珠子,然后储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0185] 为了测量与珠子偶联的蛋白质的量,使用BCA蛋白质测定试剂盒(Pierce BCA蛋白

质测定试剂盒, ThermoFisher Scientific) 测量蛋白质在偶联前以及偶联后在上清液中的浓度。根据制造商的方案使用BCA测定。

[0186] 实施例2

[0187] 通过变性洗涤除去内毒素。

[0188] 珠子与在大肠杆菌中产生的重组蛋白偶联。在几种不同的变性条件下洗涤蛋白偶联珠子以确保去除内毒素。使用单核细胞反应性测定 (IL1 β /IL6FluoroSpot-测定, MABTECH, 瑞典) 测量剩余的内毒素。

[0189] 为了去除内毒素, 将珠子用3种不同的洗涤缓冲液, 即2M NaOH (pH14.3)、8M尿素或6M胍 (盐酸胍) 中的一种在室温下在无菌水中洗涤, 或者将它们在95 $^{\circ}$ C在PBS中孵育。将珠子悬浮在缓冲液中并摇动4分钟, 用磁铁收集并除去上清液。重复3次。将热处理的珠子放入pH 7.4的PBS中并置于95 $^{\circ}$ C的加热块中达5分钟, 然后用磁铁收集并除去上清液。重复3次。然后用无菌PBS洗涤珠子3次以除去任何剩余的洗涤缓冲液。

[0190] 为了测量内毒素水平, 使用单核细胞反应性测定 (IL-1 β /IL-6FluoroSpot-测定, MABTECH, 瑞典)。通过Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, 瑞典) 梯度离心分离外周血单核细胞 (PBMC)。将细胞悬浮于cRPMI (含有10%胎牛血清、1%L-谷氨酰胺和1%青霉素-链霉素亲和素的RPMI 1640培养基) 中。对于每种类型的珠子和每种类型的洗涤, 在FluoroSpot板上的每个孔中一式四份地添加3,000,000个珠子。将未洗涤的珠子、LPS和培养基用作对照。将细胞以每孔10,000和5,000个细胞/200 μ l cRPMI细胞的浓度 (每种细胞浓度和每种珠子各2个孔) 添加到FluoroSpot板中。将平板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的潮湿环境中孵育18小时。然后根据制造商的方案培养平板并在FluoroSpot阅读器中读取。

[0191] 实施例3

[0192] FluoroSpot

[0193] 用IFN γ /IL17/IL22FluoroSpot (MABTECH) 进行FluoroSpot测定, 以分析患者与对照的T细胞活化与MS中的疑似自身抗原。该方案完全如实施例4中所述, 尽管这里仅分析对一种抗原而不是整个125种蛋白质文库的应答。

[0194] 增殖测定

[0195] 对来自卵清蛋白致敏小鼠的脾细胞进行胸苷掺入的增殖测定。作为刺激物, 使用与珠子 (Dynabeads[®]MyOne[™]Carboxylic Acid) 偶联的卵清蛋白 (SigmaAldrich) 和BSA (SigmaAldrich)。

[0196] 通过每月注射吸附在氢氧化铝上的100 μ g卵清蛋白 (Sigma) 对小鼠进行卵清蛋白免疫。第一次注射后三个月, 小鼠被杀死并收获脾脏。通过标准程序制备脾细胞, 如Thunberg等, 2009, Allergy 64:919中所述。

[0197] 将细胞在cRPMI中与卵清蛋白偶联的珠子或BSA偶联的珠子 (每个细胞10个珠子) 一起孵育5天。所有细胞在具有6%CO₂的潮湿空气中在37 $^{\circ}$ C孵育6天。对于最后18小时的孵育, 向细胞培养物中加入1 μ Ci/孔 [³H] 胸苷。用从被刺激的三份样品获得的每分钟平均计数 (cpm) 除以未刺激细胞的平均cpm值并表示为刺激指数 (SI)。 ≥ 2.0 的SI值通常被认为是阳性的。

[0198] 实施例4

[0199] 使用蛋白偶联珠子 (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid (ThermoFischer Scientific)) 作为刺激物和FluoroSpot (IFN γ /IL17/IL22FluoroSpot, MABTECH) 作为测定, 针对多发性硬化症中125种蛋白质的文库进行自身抗原筛选, 以用于测量T细胞活化。

[0200] 使用来自总共18名多发性硬化症患者和9名健康对照的外周血单核细胞 (PBMC)。这125种不同的蛋白质由来自Human Atlas Project的各种人类特异性的PrEST组成。根据制造商的方案将PrEST偶联至珠子 (如实施例1中所述)。

[0201] 根据标准方案, 通过Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, 瑞典) 梯度离心从静脉血液样品 (采集在BD Vacutainer EDTA-管中) 分离PBMC。将细胞在冷冻培养基 (45%FCS, 45%RPMI, 10%DMSO) 中冷冻并储存于-150°C。

[0202] 将125种不同的PrEST汇集到45个不同的池中以适应FluoroSpot的96孔格式, 随后用2M NaOH洗涤以去除内毒素 (如实施例2中所述)。在FluoroSpot平板的每个孔中加入3,000,000个珠子, 每个不同的池一式两份运行。使用抗CD3作为阳性对照, 仅有培养基和具有裸珠的培养基被作为阴性对照。

[0203] 将PBMC在37°C水浴中解冻并在cRPMI (RPMI 1640, 10%FCS, 1%L-谷氨酸和1%青霉素-链霉亲和素) 中洗涤。将200 μ l cRPMI中的250,000个细胞加入到每个孔中, 然后将平板在37°C和5%CO₂的潮湿环境中孵育44小时。孵育后, 根据制造商的方案 (Mabtech) 培养平板, 并在FluoroSpot阅读器中读取。

[0204] 实施例5

[0205] 使用来自卵清蛋白致敏小鼠的脾细胞和卵清蛋白偶联的珠子来评估不同大小珠子的有效性。根据实施例1中的方案, 将其表面上具有羧基的直径为5.6 μ m、1 μ m和0.2 μ m的顺磁珠子与卵清蛋白或牛血清白蛋白偶联。

[0206] 为了测试珠子刺激抗原特异性T细胞活化的有效性, 使用增殖测定 (具有³H胸苷掺入)。对于5.6 μ m珠子, 细胞浓度相比于珠子浓度是1:1, 对于1 μ m珠子是10:1, 而对于0.2 μ m珠子是500:1。细胞孵育期间的总蛋白质浓度对于5.6 μ m、1 μ m和0.2 μ m分别计算为125ng/ml、160ng/ml和160ng/ml。增殖测定以与实施例3相同的方式进行。

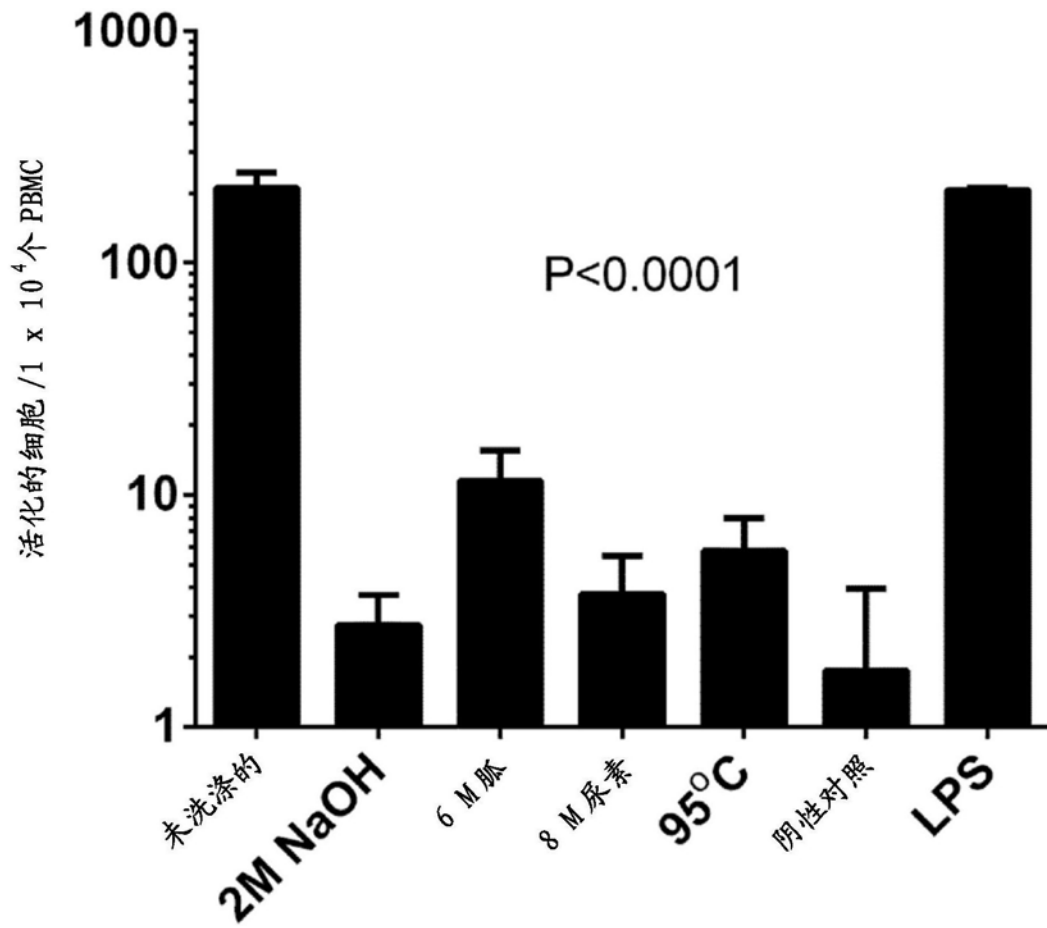


图1

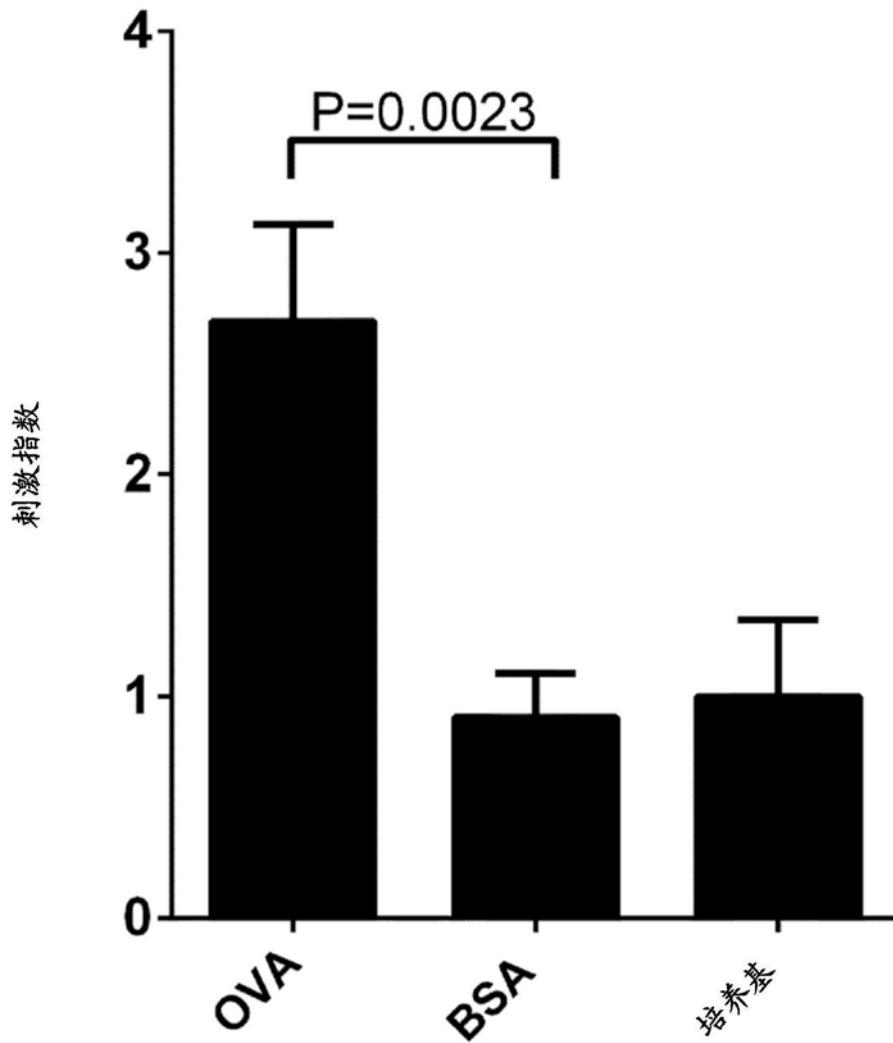


图2

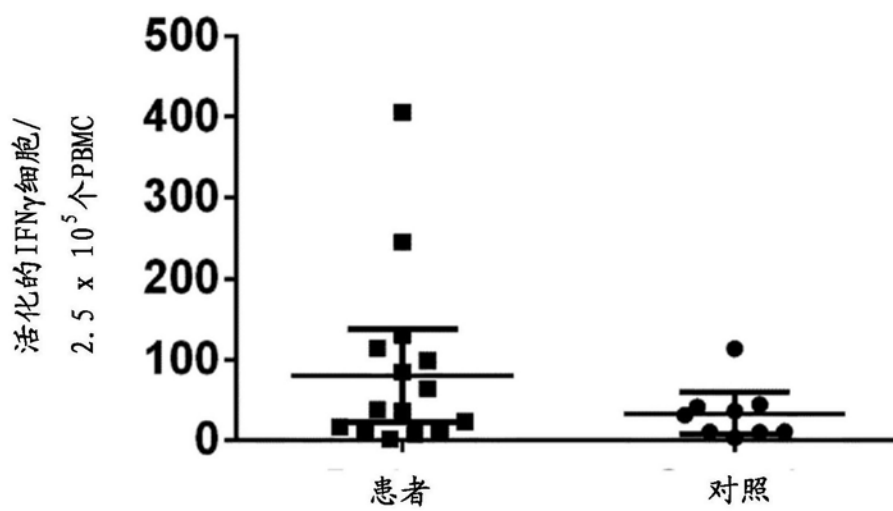


图3a

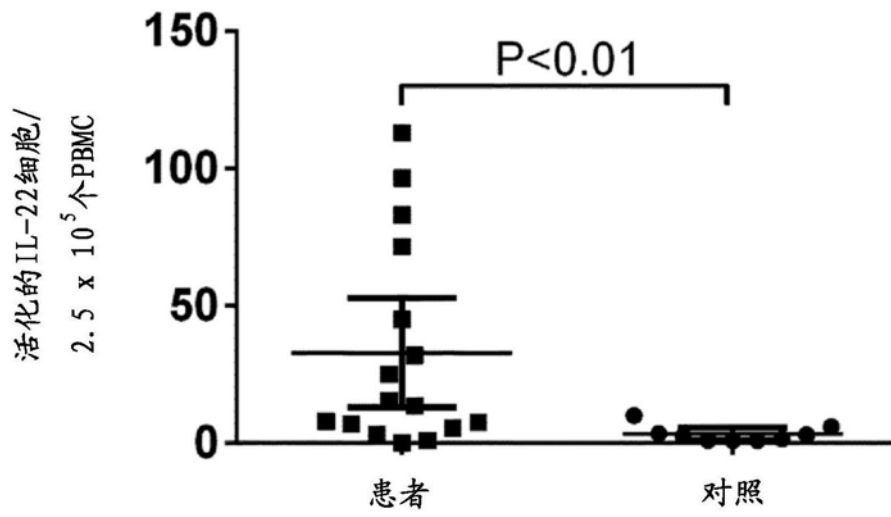


图3b

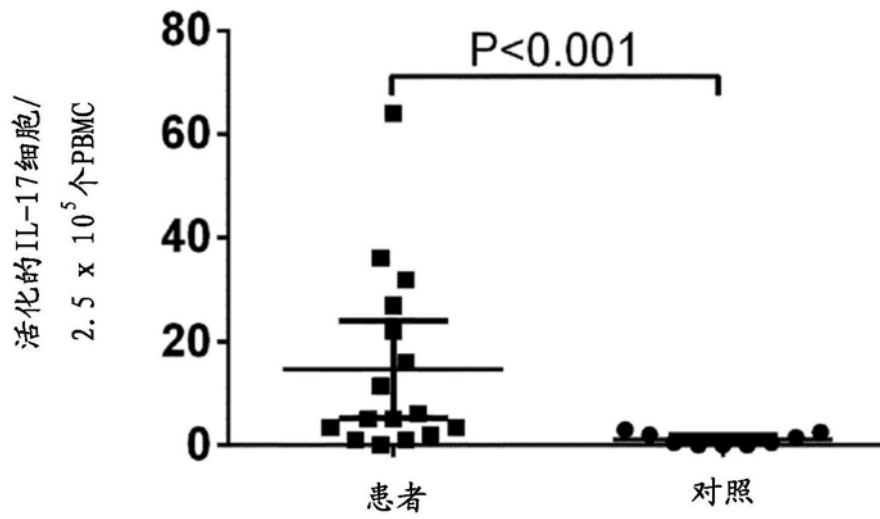


图3c

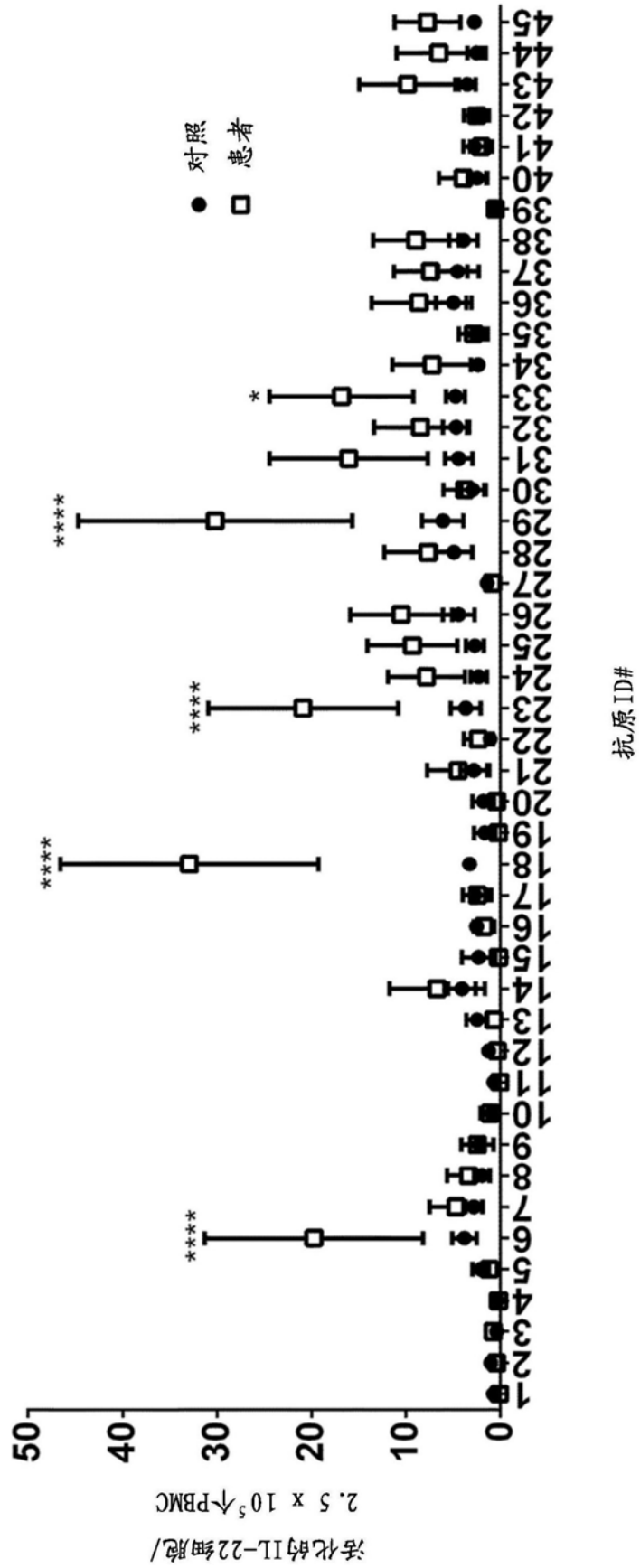


图4a

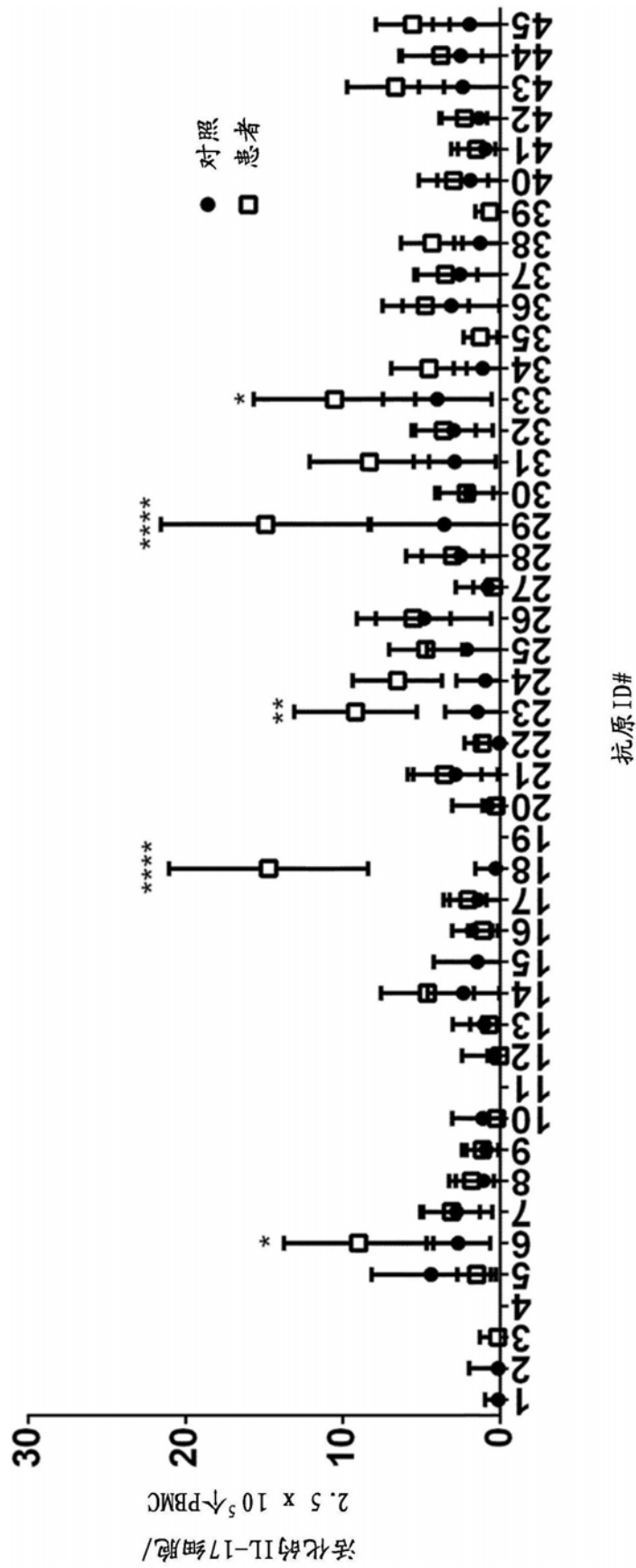


图4b

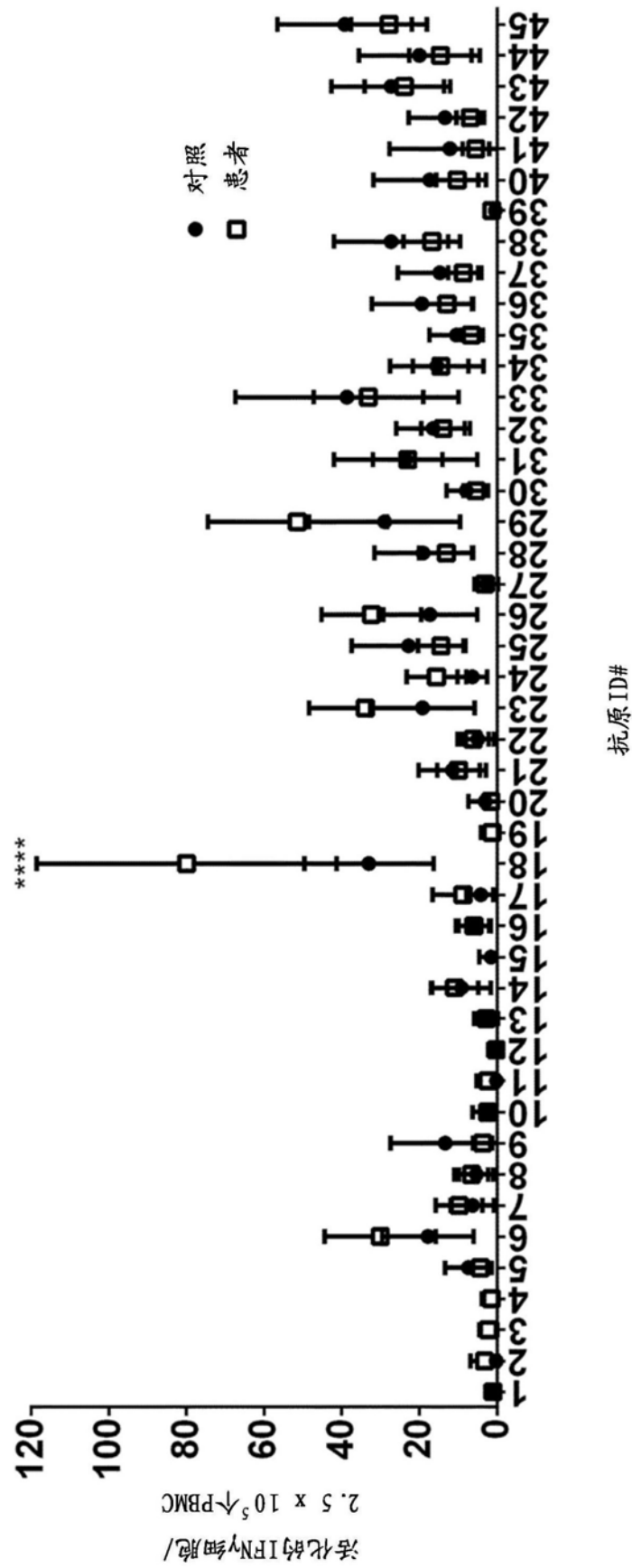


图4c

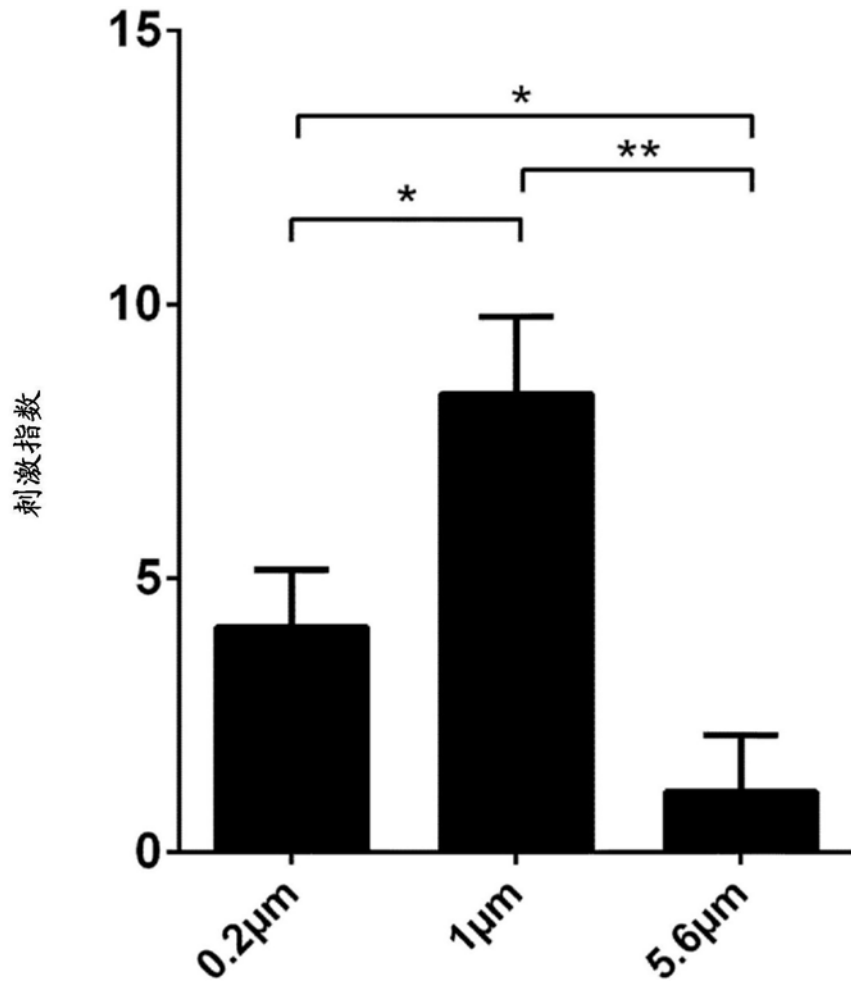


图5

专利名称(译)	T细胞反应性平台		
公开(公告)号	CN108369226A	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201680073368.8	申请日	2016-12-15
[标]发明人	H 格隆伦德		
发明人	H.格隆伦德		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/564		
代理人(译)	何伟		
优先权	1650493 2016-04-12 SE 2015200619 2015-12-16 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及用于体外测定抗原特异性T细胞活化的方法，包括以下步骤：
 (a)提供具有与其紧密缔合的候选抗原多肽的可吞噬颗粒，其中与多肽缔合的颗粒已被进行变性洗涤，导致内毒素水平足够低，从而不干扰后续步骤；
 (b)提供活的抗原呈递细胞；
 (c)在允许抗原呈递细胞吞噬颗粒的条件下将洗涤的颗粒与抗原呈递细胞接触；
 (d)提供待分析的T细胞样品，其包含活的T细胞；
 (e)在允许T细胞响应于由抗原呈递细胞呈递的抗原而特异性活化的条件下，将T细胞样品与已和颗粒接触的抗原呈递细胞接触；
 和(f)确定T细胞样品中T细胞活化的程度。

