

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

C12P 19/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819234.9

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1675542A

[22] 申请日 2003.8.6 [21] 申请号 03819234.9

[30] 优先权

[32] 2002.8.8 [33] US [31] 60/402,521

[86] 国际申请 PCT/US2003/024548 2003.8.6

[87] 国际公布 WO2004/015070 英 2004.2.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.8

[71] 申请人 贝勒医学院

地址 美国德克萨斯州

共同申请人 奥佩艾克萨药品公司

[72] 发明人 臧敬五

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 刘 玥

权利要求书 4 页 说明书 21 页 序列表 4 页
附图 2 页

[54] 发明名称 T 细胞的分离和鉴定

[57] 摘要

本发明涉及改进的自体同源的 T 细胞疫苗及其生产的改进方法。本发明也指向利用自体同源的 T 细胞疫苗治疗自身免疫性疾病，例如多发性硬化症或风湿性关节炎的方法。本发明进一步指向与 T 细胞相关的疾病的诊断。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 用于分离特异于目标抗原的一种或多种T细胞的方法，包括：
 - (a) 将包括T细胞的样品与所述的抗原或其衍生物一起培养；
 - (b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种
- 5 或多种T细胞，其中所述的第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR，而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13。
2. 权利要求1的方法，其中所述的抗原是自身抗原。
3. 权利要求2的方法，其中所述的自身抗原选自髓磷脂碱性蛋白、蛋白脂质蛋白质、髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白、胶原II型肽、热休克蛋白、MAGE、PSA、CA125、GAD蛋白质和与肿瘤相关的抗原。
- 10 4. 权利要求1的方法，其中所述的抗原是自身抗原的免疫显性表位。
5. 权利要求4的方法，其中所述的免疫显性表位选自髓磷脂碱性蛋白的第83-99位残基和髓磷脂碱性蛋白的第151-170位残基。
- 15 6. 权利要求1的方法，其中利用分别针对所述的第一和第二标记的抗体，或任选地与结合所述第二标记的抗体组合而同时结合第一和第二标记的双特异抗体来选择表达所述的第一和第二标记的细胞。
7. 权利要求6的方法，其中所述的一种或多种抗体是荧光标记的。
8. 权利要求7的方法，其中通过荧光激活的细胞分类术来选择所述
- 20 的T细胞。
9. 权利要求6的方法，其中所述的第一抗体是与磁性微珠结合的。
10. 权利要求9的方法，其中通过磁性激活细胞分类术来选择所述的T细胞。
11. 权利要求1的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养
- 25 至7天。
12. 权利要求1的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养少于1天。
13. 权利要求12的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养少于16小时。
- 30 14. 权利要求13的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养少于12小时。
15. 权利要求14的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养

少于8小时。

16. 权利要求15的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养少于4小时。

5 17. 权利要求16的方法，其中将所述的抗原与所述的样品一起培养少于2小时。

18. 通过权利要求1的方法分离的T细胞。

19. 权利要求1的方法，其中所述分离的T细胞是 T_H1 或 T_H2 T细胞或其组合。

20. 用于定量样品中T细胞数目的方法，其中所述的T细胞特异于一种或多种目标抗原，该方法包括：

(a) 将包括T细胞的样品与所述的抗原或其衍生物一起培养；

(b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞，其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR，而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13；以及

15 (c) 确定通过步骤(b)选择出来的T细胞的数目。

21. 用于诊断患者中自身免疫性疾病的方法，包括：

(a) 将来源于所述患者的包括T细胞的样品与跟所述疾病有关的一种或多种自身抗原一起培养；

(b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞，其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR，而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13。

22. 用于监测患者中自身免疫性疾病的方法，包括：

(a) 将来源于所述患者的包括T细胞的样品与一种或多种自身抗原一起培养；

25 (b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞，其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR，而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13；以及

(c) 确定通过步骤(a)选择出来的自身反应性T细胞的数目。

23. 用于治疗患者中自身免疫性疾病的方法，包括：

30 (a) 将来源于所述患者的包括T细胞的样品与一种或多种自身抗原一起培养；

(b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种

或多种T细胞,其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR,而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13;

(c) 使所述的选择出来的自身反应性T细胞失活; 以及

5 (d) 将通过步骤(b)而失活的所述自身反应性T细胞施用于所述的患者。

24. 生产用于治疗患者中自身免疫性疾病组合物的方法, 包括:

(a) 将来源于所述患者的包括T细胞的样品与一种或多种自身抗原一起培养;

10 (b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞,其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR,而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13; 以及

(c) 使所述的自身反应性T细胞失活。

25. 权利要求23或24的方法, 进一步包括扩展在步骤(b)中选择出来的自身反应性T细胞的数目。

15 26. 通过权利要求24或25的方法生产的用于治疗患有自身免疫性疾病的患者的组合物。

27. 用于分离编码T细胞受体或其部分的核酸的方法, 其中所述的T细胞受体特异于目标抗原, 该方法包括:

(a) 将包括T细胞的样品与所述的抗原一起培养;

20 (b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞,其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR,而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13; 以及

25 (c) 利用至少一个特异于T细胞受体基因可变区的第一引物和特异于T细胞受体基因恒定区的第二引物来从通过步骤(b)分离的T细胞扩增编码T细胞受体的所述核酸。

28. 用于分离编码一种或多种T细胞受体或其部分的一种或多种核酸的方法, 其中所述的一种或多种T细胞受体特异于一种或多种目标抗原, 该方法包括:

(a) 将包括T细胞的样品与所述的一种或多种抗原一起培养;

30 (b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞,其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR,而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13; 以及

(c) 利用至少一个特异于T细胞受体基因可变区的第一引物和特异于T细胞受体基因恒定区的第二引物来从通过步骤(b)分离的T细胞扩增编码一种或多种T细胞受体的一种或多种核酸。

29. 用于确定患者中编码一种或多种T细胞受体或其部分的核酸的所有组成成分的方法, 其中所述的一种或多种T细胞受体特异于一种或多种目标抗原, 该方法包括:

(a) 将来源于所述患者的包括T细胞的样品与一种或多种所述的抗原一起培养;

(b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞, 其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR, 而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13;

(c) 利用至少一个特异于T细胞受体基因可变区的第一引物和特异于T细胞受体基因恒定区的第二引物来从通过步骤(b)分离的T细胞扩增所述的编码一种或多种T细胞受体的一种或多种核酸; 以及

(d) 确定通过步骤(c)扩增的所述的一种或多种核酸的核苷酸序列。

30. 用于确定自身免疫的患者中编码一种或多种T细胞受体或其部分的核酸的所有组成成分的方法, 其中所述的一种或多种T细胞受体特异于一种或多种目标自身抗原, 该方法包括:

(a) 将来源于所述的自身免疫的患者的包括T细胞的样品与所述的一种或多种自身抗原一起培养;

(b) 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种T细胞, 其中第一标记选自CD69、CD4、CD25、CD36和HLADR, 而第二标记选自IL-2 IFN γ 和TNF α IL5 IL-10和IL-13;

(c) 利用至少一个特异于T细胞受体基因可变区的第一引物和特异于T细胞受体基因恒定区的第二引物来从通过步骤(b)分离的T细胞扩增所述的编码一种或多种T细胞受体的一种或多种核酸; 以及

(d) 确定通过步骤(c)扩增的所述的一种或多种核酸的核苷酸序列。

30

T细胞的分离和鉴定

发明领域

5 本发明一般性地涉及诊断和治疗例如多发性硬化症（MS）的自身免疫性疾病的领域。更特别地，涉及抗原特异的T细胞的分离。此外，本发明涉及利用抗原特异的T细胞来治疗例如MS的自身免疫性疾病。

背景

10 由细胞毒性的T淋巴细胞或T辅助细胞上的T细胞受体（TCR）形成的细胞间识别复合物和抗原递呈细胞（APC）上的MHC/肽复合物是在不同类的细胞-细胞相遇时的共同识别成分，其在个体生物内T细胞的所有组成成分的发育期间（阳性选择；阴性选择；外周存活）和在适应性免疫应答的控制（T辅助细胞）和效应阶段（T杀死细胞）期间
15 活化T细胞。

在适应性的免疫应答中，抗原由高变异度的分子，例如抗体或TCRs来识别，这些分子表达足够不同的结构而能够识别任何抗原。抗体可结合抗原表面的任何部分。然而，TCRs只限于与结合APCs表面上的主要组织相容性复合体（MHC）的I类或II类分子的短肽结合。肽
20 /MHC复合物的TCR识别触发T细胞的活化（无性系的扩展）。

TCRs是由两个链组成的异二聚体，这两个链可以是 $\alpha\beta$ （ α - β ）或 $\gamma\delta$ （ γ - δ ）。TCRs的结构与免疫球蛋白（Ig）的结构非常相似。每个链具有两个作为免疫球蛋白折叠的胞外结构域。氨基末端结构域是高度可变的并且被称为可变（V）结构域。最接近膜的结构域是恒定（C）结构域。这两个结构域类似于免疫球蛋白的结构域，并且类似于Fab片段。每个链的V结构域具有3个互补的决定区（CDR）。每个TCR链在
25 接近膜的一侧，具有短的连接序列，其中半胱氨酸残基在两个链之间形成二硫键。

编码 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 异二聚体的基因只在T细胞系中表达。4个TCR基因座
30（ α 、 β 、 γ 和 δ ）具有与Ig非常相似的胚系组织结构。 α 和 γ 链是通过V和J节段的重排而产生的，而 β 和 δ 链是通过V、D和J节段的重排而产生的。TCR链的基因节段位于不同的染色体上，除 δ 链基因节段是位于 α

链的V和J基因节段之间以外。 δ -链基因节段的位置具有显著性： α -链基因节段的有效重排缺失了 δ -链的C基因，因此在给定的细胞中， $\alpha\beta$ 异二聚体不能与 $\gamma\delta$ 受体共表达。

在小鼠中，约有100个 $V\alpha$ 和50个 $J\alpha$ 基因节段，而只有一个 $C\alpha$ 节段。
5 δ -链基因家族约有10个V、2个D和2个J基因节段。 β -链基因家族具有20-30个V节段和两个包含1个 $D\beta$ 、6个 $J\beta$ 和1个 $C\beta$ 的相同的重复。最后， γ -链基因家族包含7个V和3个不同的J-C重复。在人类中，该组织结构与小鼠的相似，但是节段的数目不同。

α 和 β 链中基因节段的重排与Igs的相似。 α 链，类似于Ig的轻链，是由V、J和C基因节段编码的。 β 链，类似于Ig的重链，是由V、D和J基因节段编码的。 α 链基因节段的重排导致VJ连接，而 β 链的重排导致VDJ连接。在重排基因的转录、RNA加工和翻译后， α 和 β 链表达后通过T细胞膜中的二硫键而连接。

TCR基因节段侧接包含七聚物和九聚物的识别信号序列（RSS），
15 其中含有12个核苷酸（1个转弯）或23个核苷酸（两个转弯）的间插序列。如在Igs中，由重组活化的基因（RAG-1和RAG-2）编码的酶负责重组过程。RAG1/2识别RSS并且以与Ig重排中相同的方式连接V-J和V-D-J节段。简而言之，这些酶切割基因节段和RSS之间的1个DNA链，并且催化编码序列中发夹结构的形成。随后信号序列被切除。

α 链中V和J节段、 β 链中V、D和J节段的组合连接产生大量的潜在分子，由此产生TCRs的多样化。也通过基因节段的交替连接而实现TCRs中的多样性。相对于Ig， β 和 δ 基因节段可以以备选的方式相连。 β 和 δ 基因节段中RSS侧面的基因节段可在 β 链中产生VJ和VDJ，而在 δ 链上产生VJ、VDJ和VDDJ。如在Ig的情况中，也通过基因节段连接中的
25 易变性而产生多样性。

被称为互补决定区（CDRs）的TCR的高变异度的环识别由MHC分子和结合肽组成的复合表面。 α 和 β 的CDR2环只接触APC表面上的MHC分子，而CDR1和CDR3环同时接触肽和MHC分子。与Ig相比较，在CDR1和CDR2中TCRs具有更有限的多样性。然而，以TCRs中CDR3
30 环的多样性比Ig的要高，因为TCRs可连接多于一个的D节段，而导致连接多样性的增加。

认为许多自身免疫性疾病的发病机理是由自身免疫T细胞对存在

于生物体中的自身抗原的应答所引起的。与无性系选择范例相抵触，在胸腺中并不是所有的自身反应性T细胞都是缺失的。具有针对广谱的自身抗原的TCRs的那些T细胞代表了正常T细胞所有组成成分的部分，并且天然地在外周中循环。还不清楚为什么在其进化期间，容许自身反应性T细胞在胸腺中进行分化，并且为外周所接纳。虽然还不理解其生理学作用，但是当这些自身反应性T细胞被活化时，它们在自身免疫病理学的诱导中赋予潜在的风险。还可以从没有自身免疫性疾病结论的正常个体分离自身反应性T细胞。已经证实自身反应的抗原识别本身不足以介导自发裂解过程。自身反应性T细胞成为病原的一个先决条件是它们必须是活化的。

自身反应性T细胞涉及自身免疫性疾病，例如多发性硬化症（MS）和风湿性关节炎（RA）的发病机理。一般相信，MS中自身反应性T细胞的发病机理是由于T细胞对髓磷脂抗原，特别是对髓磷脂碱性蛋白（MBP）的应答而产生的。发现MBP-活性的T细胞在体内发生活化，并且与对照个体相比，在患有MS的患者的血液和脑脊髓液中以更高的前体频率出现。这些MBP-活性的T细胞产生 T_H1 细胞因子，例如IL-2、TNF α 和 γ -干扰素（IFN γ ），其有助于炎症细胞迁移进入中枢神经系统并且加剧MS中髓磷脂-破坏性的炎症性应答。

也已经显示髓磷脂活性的T细胞与动物中实验性的自身免疫脑脊髓炎（EAE）的发病机理有关，该炎症类似于MS。可在易感动物中通过注射在佐剂中乳化的髓磷脂蛋白质来主动诱导EAE，或通过注射髓磷脂活性的T细胞系和来源于髓磷脂敏化的动物的细胞克隆来被动诱导EAE。当在体外活化时，需要极少数目的髓磷脂活性的T细胞来诱导EAE，而具有相同活性的100-倍以上的静止T细胞不能介导EAE。

已经证明可通过用失活的髓磷脂活性的T细胞进行疫苗接种来预防和治疗EAE，该方法被称为T细胞疫苗接种（Ben-Nun等人，自然Nature, 1981; 292:60-61）。T细胞疫苗接种诱导由抗-独特型的T细胞和抗-动力型（ergotypic）的T细胞组成的调节性免疫应答，其导致髓磷脂活性的T细胞的耗尽。通过耗尽髓磷脂活性的T细胞，在EAE和其他实验性的自身免疫性疾病模型中观察到治疗作用（Lider等人，科学Science, 1988; 239:820-822; Lohse等人，科学Science, 1989; 244:820-822）。

由于在自身免疫性疾病模型中的成功，T细胞疫苗接种进展到在患有MS的患者中进行临床试验。根据在实验性模型，例如EAE中的结果，相信自身反应性T细胞的减少可能改善MS和其他自身免疫性疾病的临床病程。

5 在引导性的临床试验中，用放射自体同源的MBP-活性的T细胞克隆进行疫苗接种来引发CD8⁺细胞溶解型的T细胞应答，该应答特异地识别和裂解循环的MBP活性的T细胞（Zhang等人，科学Science, 1993; 261:1451-1454, Medaer等人，柳叶刀Lancet, 1995:346:807-808）。用放射MBP-活性的T细胞克隆进行3次皮下接种导致MS患者中循环的
10 MBP活性的T细胞减少。

在初级的临床试验中，通过用放射自体同源的MBP-活性的T细胞进行3次皮下注射来对患者进行接种，使在复发减少的MS患者和次级渐进的MS患者中循环的MBP活性的T细胞减少（Zhang等人，JNeurol., 2002; 249:212-8）。通过测量复发的比率、扩展的无力状态的积分和MRI病变活性，证实T细胞疫苗接种对每组患者都是有益的。
15 然而，在上次注射后的大约12个月以后，有加速病程进展的趋势。明显加速进展的显著性是未知的，但是可能与通过针对MBP活性的T细胞的T细胞疫苗接种诱导的免疫力的逐渐下降有关。在大约10-12%的免疫患者中，MBP活性的T细胞在大约与加速进展的同时重新出现。有时，重新出现的MBP活性的T细胞来源于不同的克隆群体，该群体在疫苗接种前未被检测到，表明MBP-活性的T细胞可能发生了无性系的转变或表位的扩散。已经在上述研究中观察到MBP活性的T细胞的无性系转变（Zhang等人，1995）并且可能与正在发展的疾病过程相关。

25 尽管已经表明T细胞疫苗接种对于耗尽髓磷脂活性的T细胞是有效的，并且对MS患者有潜在的好处，但该治疗仍然有若干问题。对于每个患者的T细胞疫苗治疗必须个别地加以考虑，因为髓磷脂活性的T细胞的T细胞受体是高度不同的，并且在不同的MS患者之间是不同的（Vandevyver等人，Eur. J. Immunol., 1995; 25:958-968, Wucherpfennig等人，J. Immunol., 1994; 152:5581-5592, Hong等人，J. Immunol.,
30 1999; 163:3530-3538）。

除个别地考虑每个患者外，利用目前的方法最多需要8周的时间来产生给定的T细胞疫苗。T细胞疫苗的生产开始于从患者的脑脊髓液

(CSFMCs) 或外周血 (PBMCs) 分离单核细胞。然后将分离的单核细胞与髓磷脂肽一起培养 7-10 天, 以活化髓磷脂活性的 T 细胞。然后通过测量在 3 天期间内在存在髓磷脂肽时, [³H]-胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入来测试培养物对于髓磷脂肽的特异增殖。然后将测试为对于髓磷脂肽的特异性增殖是阳性的培养物连续地稀释来获得无性系的 T 细胞系或直接进行扩展。然后将细胞培养至多达到 6-8 周以扩展 T 细胞。当最后的 T 细胞疫苗产物是无性系的时, 该 T 细胞是均质的, 具有单一的 Vβ-Dβ-Jβ 基因使用模式。通常, 将 3 至 6 个无性系的细胞系合并而产生异质的制剂, 具有多重的 Vβ-Dβ-Jβ 使用模式。当最后的 T 细胞疫苗产物是通过直接扩展产生时, 该 T 细胞是异质的, 具有多于一个的 Vβ-Dβ-Jβ 基因使用模式。

个别考虑 T 细胞疫苗接种的特性, 和对生产每个疫苗所需要的长时间的细胞培养使得在目前方法论下的治疗是昂贵的, 并且是劳动密集的。细胞培养所需要的延长的时间也造成显著的污染风险。最后, 髓磷脂活性的 T 细胞的无性系转变或表位扩散的可能性可能需要在随后的 T 细胞疫苗生产中对于每个患者使用不同的 Vβ-Dβ-Jβ 基因使用模式。

因此, 需要发展用于分离具有针对例如 MBP 的抗原特异性的 T 细胞的改进方法, 其可能用来生产用于治疗患有 T 细胞-介导的疾病, 例如患有 MS 的患者的 T 细胞疫苗。也需要发展用于生产具有异质的 Vβ-Dβ-Jβ 基因使用模式, 以解决自身反应性 T 细胞的无性系转变的 T 细胞疫苗的改进方法。

发明概述

本发明一般性地指向用于分离抗原特异的 T 细胞, 更特别的是特异于自身或自身抗原的 T 细胞的方法。用于分离一种或多种特异于目标抗原的 T 细胞的方法, 一般包括培养包括获得自具有所述抗原或其衍生物的患者 T 细胞的样品; 选择表达一种或多种第一标记和一种或多种第二标记的一种或多种 T 细胞, 其中第一标记选自 CD69、CD4、CD25、CD36 和 HLADR; 而第二标记选自 IL-2、IFNγ、TNFα、IL5、IL-10 和 IL-13。

本发明的方法对于分离在自身免疫性疾病的发病机理中起作用的

自身反应性T细胞特别有用。

本发明的方法也允许对自身免疫性疾病进行诊断，以及监测疾病的进展并用于监测对该疾病的治疗效果。

5 本发明的方法也允许制备用于治疗与T细胞有关的自身免疫性疾病的自体同源T细胞疫苗。

用于疫苗制备的方法一般包括如上所述分离抗原特异的T细胞，然后是任选的后续培养步骤，其中提供对分离的抗原特异的T细胞群的扩展。

10 本发明尤其也指向T细胞疫苗和包括用本发明方法分离的抗原特异性T细胞的药物组合物。

本发明的方法也用于鉴定T细胞受体及其编码核酸。

附图简述

15 图1表明在多发性硬化症患者中，在刺激前（左侧）、用MBP的第83-99位残基刺激后（中间）以及用MBP的第83-99位残基刺激后（右侧），表达CD69和 γ IFN的细胞（上部）和表达CD69和TNF α 的细胞（下部）的FACS鉴定。

20 图2表明在健康的对照患者中，在刺激前（左侧）、用MBP的第83-99位残基刺激后（中间）以及用MBP的第83-99位残基刺激后（右侧），表达CD69和 γ IFN的细胞（上部）和表达CD69和TNF α 的细胞（下部）的FACS鉴定。

发明详述

1. 定义

25 为了帮助了解本发明，如下定义若干术语。

"自体抗原"或"自身抗原"，如在此所使用的，是指哺乳动物中天然的抗原或表位，其在所述的哺乳动物疾病中是免疫原性的，在哺乳动物种属中是保守的，并且可能涉及自身免疫的发病机理。

30 "CD"、"分化簇"或"共同的决定簇"，如在此所使用的，是指由抗体识别的细胞表面分子。一些CDs的表达是特异于特定的细胞系或成熟途径的，并且其它CDs的表达根据活化状态、位置或相同细胞的分化而变化。

"来源于"或"其衍生物",在核苷酸序列的范围中,是指核苷酸序列不只限于所描述的特异序列,而是包括该序列中的变异,其可包括核苷酸的加入、缺失、取代或修饰,其对该所述序列的改变程度仍保持
5 在中等或高度严谨条件下与所述序列的互补序列杂交的能力。在肽或多肽序列的范围中,"来源于"或"其衍生物"是指肽或多肽不只限于所描述的特异序列,并且包括该序列中的变异,其可能包括氨基酸的加入、缺失、取代或修饰,其在所列出序列中的变异程度仍保留引发对所述序列的免疫应答的能力。

当使用"免疫原性的"来描述肽或多肽时,它是指肽或多肽能够诱导
10 T细胞介导的免疫应答或抗体免疫应答,或两者皆有。

"涉及免疫的疾病"是指其中免疫系统涉及疾病的发病机理的疾病。涉及免疫的疾病的亚类是自身免疫性疾病。自身免疫性疾病包括但
15 不限于,风湿性关节炎、重症肌无力、多发性硬化症、牛皮癣、系统性红斑狼疮、自身免疫甲状腺炎(桥本氏甲状腺炎)、甲状腺机能亢进、炎症性肠病、自身免疫眼色素视网膜炎、多发性肌炎,和某些类型的糖尿病。鉴于所公开的内容,本领域的技术人员可容易地认识到通过本发明的组合物和方法能治疗其他的自身免疫性疾病。

"PCR"指聚合酶链式反应,例如,如在美国专利号4,683,202(1987年7月28日授予Mullis)中所一般描述的,其在此引入作为参考。PCR
20 是扩增技术,其中所选择的寡核苷酸或引物可在存在聚合因子(例如DNA或RNA聚合酶)和三磷酸核苷时,与核酸模板杂交,由此可从引物形成延伸产物。然后可使这些产物变性并且在扩增所存在的核酸的数目和数量的循环反应中用作模板,这可便于对其进行后继检测。多种PCR技术是本领域已知的并可联合用于在此所公开的内容中。

"肽"或"多肽"是连接的氨基酸序列并且可能是天然的、合成的、
25 或天然和合成物的修饰物或组合。

"引物"指无论是天然的、合成的或其修饰物的寡核苷酸,其能够作为足够与模板分子上的特异核苷酸序列互补的核苷酸合成的起始
30 点。

"探针"指无论是天然的、合成的或其变体的寡核苷酸,其能够特异地与足够互补的核苷酸序列结合。

"T细胞介导的疾病"指由于T细胞识别自身抗原而产生的疾病。

当"疗法"或"治疗"涉及保护动物免于遭受疾病时,是指预防、抑制、压制,或完全地消除疾病。预防疾病包括在疾病发病前将本发明的组合物施用于动物。抑制疾病包括在疾病诱导后,但在其在临床上出现前将本发明的组合物施用于动物。压制疾病包括在疾病的临床出现后,将本发明的组合物施用于动物。

2. 分离抗原特异的T细胞

a. 分离单克隆的抗原特异的T细胞

可通过与抗原靶和抗原递呈细胞一起培养而在细胞培养物中活化和扩展T细胞。一旦活化, T细胞发生细胞信号的复合物级联, 其导致许多基因产物的转录和表达。在此所描述的本发明利用特异于活化的T细胞的基因产物来鉴定并分离具有所需要的抗原特异性的T细胞。

在第一个方面, 本发明指向用于分离特异于目标抗原的T细胞的方法。将包括T细胞的样品与特定的抗原一起培养, 其导致特异于目标抗原的T细胞的活化。样品可与该抗原一起培养1至7天。样品也可与该抗原一起培养少于1天。样品也可与该抗原一起培养少于16小时。样品也可与该抗原一起培养少于12小时。样品也可与该抗原一起培养少于8小时。样品也可与该抗原一起培养少于4小时。样品也可与该抗原一起培养少于2小时。

然后可通过选择表达如上所述活化的T细胞的基因产物的T细胞来分离特异于目标抗原的T细胞。可通过选择具有亚型特异性基因产物或细胞表面标记(例如, CD4对CD8)的T细胞来分离活化的T细胞的亚型。

目标抗原包括髓磷脂碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白质(PLP)、髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白(MOG)或其片段。目标抗原也可能是免疫显性的片段, 包括但不限于, MBP的第83-99位残基或第151-170位的残基。目标抗原也可能是两个或多个令人感兴趣的单个的抗原的组合。

用于活化T细胞的抗原或其衍生物可能是任何能够引发对目标抗原的免疫应答的免疫原。活化抗原可能是目标抗原或其衍生物。活化抗原可能是MBP、PLP、MOG, 或其片段和/或衍生物。活化抗原也可能是免疫显性的片段, 包括但不限于, MBP的第83-99位残基或第151-170位的残基, 或其片段和/或衍生物。活化抗原也可能是两个或多个单

个的活化抗原的组合。活化抗原可被使用一次或多次，以活化特异于目标抗原的T细胞。

5 T细胞可能存在于任何包括单核细胞的样品中。可从MS患者的外周血或大脑脊髓液或从RA患者的滑膜液中分离样品。来自具有其他自身免疫性疾病的患者的T细胞可类似地从涉及该疾病的外周血和/或组织分离。可利用本领域公知的离心技术，包括但不限于Ficoll®梯度，在样品中富集单核细胞。也可利用对于T细胞基因产物的表达进行阳性选择、阴性选择、或其组合来在样品中富集T细胞。

10 用于鉴定或阴性选择活化的T细胞的基因产物可能是细胞表面标记或细胞因子，或其组合。用于鉴定活化的T细胞的细胞表面标记包括但不限于，CD69、CD4、CD8、CD25、HLA-DR、CD28和CD134。CD69是在B和T淋巴细胞、NK细胞和粒性白细胞上发现的早期活化标记。CD25是IL-2受体和活化的T细胞和B细胞的标记。CD4是TCR的共同受体并且是胸腺细胞、T_H1-型和T_H2-型T细胞、单核白细胞和巨噬细胞的标记。CD8也是TCR的共同受体和细胞毒性T细胞的标记。CD134只在活化的CD4⁺T细胞中表达。

20 用于阴性选择活化T细胞的细胞表面标记，包括但不限于CD36、CD40和CD44。CD28作为独立于T细胞受体途径的刺激T细胞活化的途径而起作用，并且在CD4⁺和CD8⁺细胞上表达。CD36是膜糖蛋白并且是血小板、单核白细胞和内皮细胞的标记。CD40是B细胞、巨噬细胞和树突状细胞的标记。CD44是巨噬细胞和其他吞噬细胞的标记。可利用对于辅助T细胞或细胞毒性T细胞的细胞表面基因产物表达（例如，CD4对CD8）进行的阳性选择、阴性选择或其组合来分离T细胞的亚型。

25 用于鉴定本发明的活化T细胞的细胞因子包括但不限于，由T_H1-型T细胞（细胞介导的应答）和T_H2-型T细胞（抗体应答）产生的细胞因子。用于鉴定活化的T_H1-型T细胞的细胞因子包括但不限于IL-2、 γ 干扰素（ γ IFN）和组织坏死因子 α （TNF α ）。用于鉴定活化的T_H2-型T细胞的细胞因子包括但不限于IL-4、IL-5、IL-10和IL-13。也可利用对于辅助T细胞或细胞毒性T细胞的细胞因子基因产物表达（例如， γ IFN对IL4）进行的阳性选择、阴性选择，或其组合来分离T细胞的亚型。

30 可通过鉴定表达CD69、CD4、CD25、IL-2、IFN γ 、TNF α 或其组

合的细胞来分离特异于目标抗原的活化的 T_H1 -型T细胞。也可通过鉴定表达CD69和CD4以及IFN γ 或TNF α 的细胞来分离特异于目标抗原的活化的 T_H1 -型的T细胞。可通过鉴定表达CD69、CD4、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13，或其组合的细胞来分离特异于目标抗原的活化的 T_H2 -型T细胞。可通过鉴定表达CD69、CD4、CD25、IL-2、IFN γ 、TNF α 或其组合的细胞和表达CD69、CD4、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13或其组合的细胞来分离特异于目标抗原的活化的 T_H1 -型T细胞和 T_H2 -型T细胞的组合。

可通过本领域公知的，利用抗体的免疫选择技术来鉴定用于对本发明的活化T细胞进行阳性或阴性选择的基因产物，所述的技术包括但不限于，荧光激活细胞分类术（FACS）、磁性细胞分类技术、淘选技术和色谱法。可在一个或多个步骤中对活化的T细胞上的两个或多个标记进行免疫选择，其中每个步骤阳性或阴性选择一种或多种标记。当两个或多个标记的免疫选择是在利用FACS的一个步骤中进行时，可利用不同的荧光基团标记两个或多个不同的抗体。

可利用由氧化铁和多糖涂层组成的超顺磁微珠进行磁性细胞分类法。优选地，该微珠的直径可以为大约50纳米，并且体积为一般哺乳动物细胞的大约百万分之一。微珠优选是足够小的，以保持允许与细胞表面抗原快速、有效的结合的胶态悬浮体。优选地，该微珠不干扰流式细胞光度术，是可生物降解的，并且可忽略对细胞功能的影响。与微珠偶联的抗体可能直接或间接地借助于第二抗体与配体的例如荧光素的结合。

抗体的种类可能是IgG、IgM、IgA、IgD和IgE，或其片段或衍生物，包括Fab、F(ab')₂、Fd和单链抗体、双抗体（diabodies）、特异抗体、双官能抗体及其衍生物。抗体可能是单克隆抗体、多克隆抗体、亲和纯化的抗体或其混合物，其显示出与特异于活化的T细胞的基因产物表位或由此衍生的序列的足够的结合特异性。抗体也可能是嵌合的抗体。

可通过与本领域已知的一种或多种化学药品、肽或多肽部分的附着来衍生抗体，从而允许鉴定和/或选择与该抗体结合的活化T细胞。该抗体可以与例如荧光染料的化学药品部分结合。通过荧光标记抗体而结合的活化T细胞可利用，包括但不限于荧光激活细胞分类（FACS）

的技术来分离。抗体也可与磁性颗粒，例如顺磁微珠（Miltenyi Biotec，德国）结合。通过磁性标记抗体而结合的活化的T细胞可利用，包括但不限于磁性细胞分类的技术来分离。

5 对于细胞表面表达的基因产物，抗体可直接与基因产物结合并可用于细胞选择。对于以低浓度表达的细胞表面基因产物，磁性荧光脂质体（Scheffold等人，自然医学Nature Med 6:107-110，2000）可用于细胞选择。以低水平表达时，常规的荧光标记抗体不能足够灵敏地检测出细胞表面表达的基因产物的存在。包含荧光基团的脂质体可与具有目标特异性的抗体结合，由此允许对细胞表面表达的基因产物进行
10 检测。

对于胞内基因产物，例如细胞因子，可在透化细胞后使用该抗体。备选地，为了避免由于透化而杀死细胞，如果胞内基因产物最终是从细胞分泌出来的，可在其分泌通过细胞膜时，利用细胞表面上的"捕捉"抗体加以检测。该捕捉抗体可能是特异于两个不同抗原的双抗体：(i)
15 令人感兴趣的分泌的基因产物和(ii)细胞表面蛋白。细胞表面蛋白通常可能是存在于T细胞，或特别是淋巴细胞上的任何表面标记（例如，CD45）。捕捉抗体可能首先结合细胞表面蛋白，然后在令人感兴趣的胞内基因产物分泌通过膜时与其结合，由此保持基因产物留在细胞表面上。然后可使用特异于捕获的基因产物的标记抗体来结合捕获的基
20 因产物，从而进行活化的T细胞的选择（Manz等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1921-1925，1995，其在此引入作为参考）。

也发现某些形式的细胞因子在细胞表面上以低浓度表达。例如， γ IFN在细胞表面上显示低浓度，具有与胞内 γ IFN表达相似的动力学（Assenmacher等人，Eur J. Immunol，1996，26:263-267）。对于在细
25 胞表面上表达的细胞因子的形式，常规的荧光标记抗体或包含脂质体的荧光基团可用于检测令人感兴趣的细胞因子。本领域的普通技术人员可认识到用于检测和选择特异于活化的T细胞的胞外和胞内基因产物的其他技术。

通过本发明分离的T细胞至少90%可能是从全血富集的。也可能从
30 全血富集至少95%的T细胞。也可能从全血富集至少98%的T细胞。也可能从全血富集至少99.5%的T细胞。

b. 分离的单克隆抗原特异的T细胞

在第二个方面，本发明指向通过本发明第一个方面的方法分离的特异于目标抗原的T细胞。

c. 分离多克隆的抗原特异的T细胞

5 在第三个方面，本发明指向用于分离特异于一种或多种目标抗原的T细胞的方法。将包括T细胞的样品与一种或多种抗原一起培养，其导致特异于一种或多种抗原的T细胞的活化。然后可根据本发明的第一个方面来分离特异于一种或多种抗原的T细胞。

10 T细胞可具有异质的V β -D β -J β 基因使用模式，其表达各自特异于目标抗原的不同TCRs。T细胞也可具有异质的V β -D β -J β 基因使用模式，其表达特异于多于一种目标抗原的不同TCRs。如下所述，包括异质的V β -D β -J β 基因使用模式的T细胞可用来配制能在接种了疫苗的患者中预防表位扩散的多克隆的T细胞疫苗。

d. 分离的多克隆抗原特异的T细胞

15 在第四个方面，本发明指向通过本发明第三个方面的方法分离的特异于一种或多种目标抗原的T细胞。

3. 定量抗原特异的T细胞的数目

在第五个方面，本发明指向通过确定由本发明第一或第三个方面的方法分离的T细胞的数目来实现确定样品中特异于一种或多种目标抗原的T细胞的相对频率的方法。

20 4. 诊断自身免疫性疾病

在本发明的第六个方面，可通过从患者获得样品，并且由本发明第一或第三个方面的方法分离自身反应性T细胞来诊断患有自身免疫性疾病的患者。可通过比较患者和对照中自身反应性T细胞的水平来诊断自身免疫性疾病。可根据本发明第五个方面的方法来确定自身反应性T细胞的水平。

25 5. 监测自身免疫性疾病的发展

在本发明的第七个方面，可根据本发明第五个方面，通过确定来自患有自身免疫性疾病的患者的样品中自身反应性T细胞的频率来监测自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的症状严重度可能与自身反应性T细胞的数目相关。此外，样品中自身反应性T细胞数目的增加可用来作为应用治疗使症状的严重度最小化，和/或在症状出现前治疗疾病的指标。

6. 生产用于治疗自身免疫性疾病的疫苗

在本发明的第八个方面，可生产组合物用于治疗自身免疫性疾病，其中使已经通过本发明的第一或第三个方面的方法分离的自身反应性T细胞（并且任选地，如在此所描述的，在培养物中扩展）失活。

5 可利用许多本领域公知的技术来使自身反应性T细胞失活，这些技术包括但不限于，化学药品失活或放射。可利用许多本领域公知的技术在失活的前后来保存自身反应性T细胞，这些技术包括但不限于深低温保藏。如下所述，该组合物可在自身免疫患者中用作减少自身反应性T细胞的疫苗。

10 该组合物可以是利用本领域公知的方法生产的药物组合物。可由技术人员，使用公认的诊断和治疗原理来生产药物组合物，其可在疾病或紊乱的治疗中用作临床前和临床的治疗剂。

这种原理是本领域已知的，并且在例如，Braunwald等人编辑的，**Harrison's Principles of Internal Medicine**，第11版，McGraw-Hill，出版者，纽约，N. Y. (1987) 中有阐明，其在此引入作为参考。该药物组合物可施用于受到该组合物有益作用的任何动物。接受该药物组合物的动物可以是人类或其他的哺乳动物。

a. 疫苗

20 在第九个方面，本发明指向由本发明第八个方面的方法生产的组合物。该组合物可以是在自身免疫患者中用于耗尽自身反应性T细胞的疫苗。

7. 治疗自身免疫性疾病

在第十个方面，可通过施用本发明第九个方面所述的组合物在具有自身反应性T细胞的患者中治疗自身免疫性疾病。该组合物可以是在患者中导致自身反应性T细胞耗尽的疫苗。

25 疫苗可包括包含同质（“单克隆”）或异质（“多克隆”）的V β -D β -J β 基因使用模式的自身反应性T细胞。临床研究表明，接受自体同源的单克隆T细胞疫苗接种的自身免疫患者可显示针对髓磷脂活性的T细胞的免疫性的逐渐下降。有时，重新出现的自身反应性T细胞可能来源于不同的克隆群体，表明髓磷脂活性的T细胞可以进行与发展的疾病进程潜在相关的无性系转变或表位扩散。在由自身反应性T细胞介导的自身免疫性疾病中，无性系转变或表位扩散可能是个问题。包括能够减少

自身反应性T细胞的多重群体的，多克隆自身反应性T细胞的疫苗可以避免无性系转变或表位扩散的问题。

该组合物可以是以任何手段给药从而实现其预定目的的药物组合物。例如，给药方式可以是非肠胃的、皮下的、静脉内的、动脉内的、
5 皮内的、肌内的、腹膜内的、透过皮肤起作用的、透过粘膜的、脑内的、鞘内的，或心室内的途径。备选地，或同时发生地，给药方式可以是口服途径。药物组合物可通过快速浓注，或通过随时间的逐步灌注而进行肠道外给药。

给药剂量依赖于受体的年龄、性别、健康和重量，同时进行的治
10 疗的种类、以及治疗的频率、和所需要的作用的特性。药物组合物的给药的剂量范围可能是足够大的，以产生预期的效果，借此例如，如本发明第七个方面所测量的，实现自身反应性T细胞的减少，并且显著地预防、抑制或治疗自身免疫性疾病。剂量不能太大而产生不良副作用，例如不需要的交叉反应、全身性的免疫抑制、过敏反应等。

15 药物组合物可进一步包括合适的药物学上可接受的，包含赋形剂和辅助剂的载体，其可促进将活性组合物加工成为药物学上可使用的制剂。药物组合物的添加剂可包括佐剂，例如明矾、壳聚糖，或本领域已知的其他佐剂的包涵物。（参见例如，Warren等人，Ann. Rev. Immunol. 4:369-388 (1986)；Chedid, L., Feder. Proc. 45:2531-2560
20 (1986)，其在此引入作为参考）。药物组合物也可进一步包括脂质体，利用本领域已知的方法和化合物来增加递送或生物活性。

用于非肠胃方式给药的合适剂型包括失活的T细胞的水溶液，例如，在水溶液中的水溶盐。此外，可施用包括失活的自身反应性T细胞的油悬浮物。合适的脂性溶剂或媒介物包括脂肪油类，例如，芝麻油
25 或合成脂肪酸的酯类，例如油酸乙酯或三酸甘油酯。含水的注射悬浮物可包含增加悬浮物粘性的物质，包括例如，羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。悬浮物也可包含稳定剂。

可利用常规的药物学上可接受的，用于注射给药的非肠胃媒介物来配制失活的自身反应性T细胞。这些媒介物可以是无毒性和治疗性的，
30 并且许多剂型在Remington's Pharmaceutical Sciences (上述)中有阐明。赋形剂的非限制性实例是水、盐水、Ringer's溶液、葡萄糖溶液和Hank's平衡盐溶液。药物组合物也可包含少量的添加剂，例如保

持等渗性、生理pH和稳定性的物质。

配制失活的自身反应性T细胞，达到其总的细胞浓度为包括大约 5×10^2 个细胞/ml至大约 1×10^9 个细胞/ml。用于预防、抑制或治疗自身免疫性疾病的失活的自身反应性T细胞的优选剂量可以在大约 2×10^6 个
5 细胞至大约 9×10^7 个细胞的范围内。

8. 确定TCR的所有组成成分

在第十一个方面，本发明指向通过扩增来自本发明的第一或第三个方面分离的T细胞的编码一种或多种T细胞受体的核酸，来确定自身免疫患者中编码一种或多种T细胞受体或其部分的核酸的所有组成
10 成分的方法，其中利用引物对进行所述的扩增。引物对的第一引物可以是长度为大约15至30个核苷酸的寡核苷酸，其与包括TCR基因可变区的核酸杂交。引物对的第二引物可以是长度为大约15至30个核苷酸的寡核苷酸，其与包括TCR基因恒定区的核酸杂交。可使用引物对来扩增与TCR基因的V β -D β -J β 区域杂交的核酸。

15 可以从样品，利用本领域已知的任何特别的PCR技术或设备，通过聚合酶链式反应（PCR）来扩增编码来自T细胞的一种或多种T细胞受体或其片段的核酸（“靶序列”）。例如，PCR扩增可以遵循下列方法，其中制备的反应混合物包含下列成分：5 μ l 10 \times PCR缓冲液II（100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl），3 μ l 25 mM MgCl₂，1 μ l
20 10 mM dNTP混合物，0.3 μ l Taq聚合酶（5 U/ μ L）（AmpliTaq Gold, Perkin Elmer, Norwalk, Conn.），30 pmol的第一引物，30 pmol的第二引物，以及1 μ l的样品DNA。聚合酶在至少95 $^{\circ}$ C的温度是稳定的，具有50-60的持续合成能力，并具有每分钟大于50个核苷酸的延伸率。

进行PCR反应的扩增模式为95 $^{\circ}$ C 1分钟（变性），56 $^{\circ}$ C 20秒（退
25 火），以及72 $^{\circ}$ C 40秒（延伸），总共为40个循环。在第一个循环开始前，反应混合物可进行大约5分钟至15分钟时间的起始变性。类似地，在最后的循环完成后，反应混合物可以进行大约5分钟至10分钟时间的最终延伸。某些PCR反应可进行少至15-20个循环或多至50个循环。根据特异的PCR反应，对于扩增模式的每个步骤可使用更长或更短的
30 保温时间和更高或更低的温度。

包括靶序列的样品可以是核酸，例如基因组DNA、cDNA、预先经PCR扩增的DNA，或DNA的任何其他形式。可直接或间接地从包括T

细胞，例如外周血单核细胞 (PBMC) 的任何动物或人类组织来分离样品。基因组DNA可直接从包括T细胞的组织分离。cDNA可通过逆转录从包括T细胞的组织直接分离的mRNA来间接地分离得到。

可由两步的PCR反应间接地扩增基因组DNA、cDNA或任何其他形式的DNA而分离样品DNA来增强检测靶序列的能力。例如，可以进行第一次PCR扩增反应以扩增较大的初级片段，并且包括能使第一和第二引物有选择地与其相反链结合的片段。然后利用初级片段作为模板，用第一和第二引物进行第二次PCR扩增反应，以扩增包括靶序列的片段。如果在第一次PCR反应中使用第一或第二引物来扩增初级片段，则第二PCR反应是"半巢式的"。如果在第一次PCR反应中不使用第一或第二引物来扩增初级片段，则第二次PCR反应是"巢式的"。

在例证性的两步PCR反应中，可利用与TCR基因的V β 区退火的第一初级引物和与TCR基因的C β 区退火的第二初级引物进行第一次PCR反应来扩增编码一种或多种来自T细胞的T细胞受体的一种或多种核酸，其扩增从V β 经过V β -D β -J β 接合点延伸到C β 的初级片段，然后是可能为巢式或半巢式的第二次PCR反应。根据所公开的内容，有经验的技术人员能够选择合适的引物和反应条件用于靶序列的PCR扩增。

扩增靶序列后，可通过许多方法检测扩增产物。例如，可将扩增产物的等分加载到电泳凝胶上，对其应用电场按大小分离DNA分子。在另一个方法中，可将扩增产物的等分加载到用SYBR绿、溴化乙啶，或能结合DNA并发出可检测信号的另一分子染色的凝胶上。干凝胶可包含与靶序列杂交的标记寡核苷酸，从而可通过将凝胶暴露于感光胶片而获得放射自显影照片。

包括下列实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域的技术人员将应认识到本实施例中所公开的技术，随后由本发明人发现的代表性技术，在本发明的实施中起很好的作用，并且因此可认为其构成实施的优选模式。然而，本领域的技术人员将根据所公开的内容，认识到在所公开的具体实施方案中可产生许多变化，并且仍然能获得同样的或相似的结果而不背离本发明的精神和范围。

30

实施例1

分离用于T细胞疫苗接种的髓磷脂活性的T细胞

1. 制备PBMC和初级刺激

在2小时内，对来自MS患者和对照患者的新鲜血液样本进行收集。备选地，可从MS患者的脑脊髓液（CSFMCs）获得单核细胞。通过标准的Ficoll梯度分离法从全血分离外周血单核细胞（PBMCs）。具体地，用Hanks平衡盐溶液（HBSS）稀释肝素化的血液（1:1血液/HBSS），然后缓慢地覆盖在离心管中的Ficoll-泛影葡胺溶液，并且在1800 rpm，18℃-25℃，不刹车离心20分钟。然后通过加入过量的HBSS并且在1700 rpm，18℃-25℃离心10分钟洗涤PBMCs。在RPMI 1640培养基中通过离心将纯化的PBMCs洗涤3次，随后将其重悬在AIM V培养基（Gibco, Grand Island, N. Y.）中。计数细胞数目并且将细胞以200,000个细胞/孔的密度接种到96孔的U型底培养平板上。所有的平板标记有患者的号码和患者的首字母。于37℃，在存在表1中列出的合成肽时培养细胞，其中表1中列出的合成肽相应于3个髓磷脂蛋白质，髓磷脂碱性蛋白（MBP）、蛋白脂质蛋白质（PLP）和髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白（MOG）的已知的免疫显性区域，其浓度为20 µg/ml。将平板置于37℃的CO₂培养箱中，并且每日目测检查。不换培养基培养细胞7-10天，以有选择地使特异于抗原的T细胞生长。

表1-活化肽

20

髓磷脂抗原肽	氨基酸序列	
髓磷脂碱性蛋白，肽-1（MBP-1）	ENPVVHFFKNIIVTPRTP	SEQ ID NO. 1
髓磷脂碱性蛋白，肽-2（MBP-2）	SKIFKLGGRDSRSGSPMARR	SEQ ID NO. 2
蛋白脂质蛋白质，肽-3（PLP-3）	LFCGCGHEALTGTEKLIETY	SEQ ID NO. 3
蛋白脂质蛋白质，肽-4（PLP-4）	WTTCQSI AFPSKTSASIGSL	SEQ ID NO. 4
髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白， 肽-6（MOG-6）	GQFRVIGPRHPIRALVG	SEQ ID NO. 5
髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白， 肽-7（MOG-7）	EVELPCRISPGKNATGMEVGW	SEQ ID NO. 6

2. 鉴定和选择抗原特异的T细胞

然后选择上述细胞的指示活化的T细胞的基因产物的表达。参见上

述第2(a)节。为了检测最终从细胞分泌的胞内细胞因子 γ IFN或TNF α ，使用细胞因子捕捉试剂(Miltenyi Biotec)(如上所述)。简而言之，为了结合细胞表面上的CD45分子或其他活化的T细胞表面标记，例如CD69，首先将细胞因子捕捉试剂(一般结合活化的T细胞标记和分泌的细胞因子的特异抗体)与细胞一起在4-8℃培养。然后将细胞和结合的细胞因子捕捉试剂在37℃培养45分钟，以容许细胞内的 γ IFN或TNF α 也与细胞因子捕捉试剂结合，因为细胞因子是在培养期间从细胞内部分泌的。然后利用特异于与荧光染料PE耦联的目标细胞因子的抗体来检测通过细胞因子捕捉试剂而现在与细胞表面结合的 γ IFN或TNF α 。

利用结合不同荧光染料的抗体来检测细胞表面分子CD4和CD69。首先通过门控选择CD4⁺细胞群体，然后在该群体内，通过FACS分离"双-阳性"(CD69和IFN γ 或CD69和TNF α)染色的细胞并且进行无菌收集。然后在存在放射的自体同源的PBMCs时，通过用rIL-2、PHA、抗CD3或其他普遍的T细胞促分裂原刺激7-10天，直接使分离的髓磷脂活性的T细胞扩展。在培养物中增殖髓磷脂-活性的T细胞系，直到细胞总数达到大约两千万。

实施例2

诊断MS

从患者收集2至100 ml的血液，并且将一种或多种合成肽直接加入全血中以引发或刺激T淋巴细胞。该肽相应于3个髓磷脂蛋白质，髓磷脂碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白质(PLP)和髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白(MOG)的已知免疫显性区域。将血液与肽一起培养1至7天以活化髓磷脂特异的T细胞。在该抗原初级期间的末尾，在短暂的再刺激分析中用抗原再激发细胞。

通过用去污剂溶液透化细胞膜，洗涤细胞，然后与一种或多种染色抗体一起培养来检测髓磷脂肽活化的T细胞以检测细胞表面上的CD4或CD69，或胞内检测IFN γ 或TNF α 。染色抗体是与不同的荧光染料结合的，因此当通过FASC分析，以488纳米激光激发时，它们以不同的波长发荧光。首先利用CD4⁺细胞进行门控来选择CD4⁺T细胞群，然后在该群体内，鉴定具有两个抗体(CD69和 γ IFN或CD69和TNF α)的免疫活性的细胞。与相似研究中的健康对照(图1，MS患者，图2，

健康对照)相比,在多发性硬化症(MS)患者中"双-阳性"髓磷脂-活性的T细胞的这个群体已经显示显著的增加。

利用这个方法,可在处理前、处理期间和处理后确定患者血液中循环的髓磷脂-活性的T细胞数目,以确定MS治疗对自身反应性T细胞群的影响。可以将双-阳性染色的细胞的百分比或双阳性染色的细胞的绝对数目确定为终点。

实施例 3

利用抗体-轭合的脂质体诊断MS

从患者获得全血,并用如实施例2中所述的一种或多种合成肽加以刺激。将血液与肽一起培养3至16小时以活化髓磷脂特异的T细胞。在该抗原-引发期间的末尾,在用与针对IFN γ 、TNF α 、或其组合的抗体轭合的磁性荧光脂质体染色前,在短暂的再刺激分析中用抗原再激发细胞。也用针对CD4和/或CD69的抗体染色细胞。如实施例2中所描述的,检测染色的髓磷脂-活性的T细胞。

实施例 4

确定TCR克隆的所有组成成分

可如实施例2和实施例3中所描述的经细胞分类法,通过分离出双-阳性染色的细胞群体来分析细胞群体中体现的T细胞受体(TCR)克隆的所有组成成分。从分离的细胞提取DNA,并且利用特异于25个已知TCR的可变的 β 链(V β)基因家族的寡核苷酸引物来进行定量的聚合酶链式反应(PCR)分析。该方法产生关于TCR V β 基因使用的分布信息,并且表明致病性T细胞群体的克隆性。也可使用该方法确定MS患者中是否存在髓磷脂-活性的T细胞群体的无性系或表位转变。

实施例 5

通过T细胞疫苗接种耗尽髓磷脂活性的T细胞

使MS-复发减轻(RR)的患者和MS-次级渐进(SP)的患者接受3次放射自体同源的髓磷脂活性的T细胞克隆的皮下注射,该克隆是通过直接扩展而分离的,其后在4、12和20周再进行3次附加的注射。监测患者在24个月期间内,在髓磷脂活性的T细胞的前体频率、复发比率、扩展无力状态的积分(EDSS)和MRI病变活性方面的变化。将该结果与以自身配对方式预接种疫苗的值相比较。此外, β -干扰素-1a临床试验中RR-MS(Jacobs等人,1996)和最新的 β -IFN-1b研究中SP-MS

(European Study Group Lancet, 352:1491-1497 (1998)) 的安慰剂手臂的临床资料被包括在内, 以提供MS比较的自然病史数据。在接种疫苗后的第20周没有检测到T细胞频率, 或T细胞频率实质性下降了。结果证实在患有MS的患者中通过T细胞接种疫苗而耗尽了髓磷脂活性的T细胞。

5 实施例 6

利用自体同源的髓磷脂活性的T细胞给MS患者接种疫苗

该接种疫苗的方法与用于上述临床研究的方法相似 (Zhang等人, 1993, Medaer等人, 1995)。简而言之, 在存在放射的PBMCs作为副属细胞来源时, 用植物凝集素 (PHA) (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 活化根据实施例1制备的髓磷脂活性的T细胞克隆。然后在补充有10%加热灭活的人AB血清和每mL 100单位的rIL-2的RPMI 1640培养基中培养细胞10天。随后用无菌的盐水洗涤活化的髓磷脂活性的T细胞3次以除去残余的PHA、rIL-2和细胞碎片, 最后重悬在2毫升的盐水中。照射后 (10,000 rads, ^{137}Ce 源), 在2个手臂上皮下注射细胞 (1 ml/手臂)。用于疫苗接种的T细胞的数目的范围是每次注射 40×10^6 到 80×10^6 个细胞, 并且根据相对的皮肤表面积推断实验动物中有效的T细胞剂量而进行选择 (Ben-Nun等人, 1981)。每个患者接受2次皮下注射, 然后在4、12和20周重复注射。

20 然后观察患者确定为无力发展的发病时间、EDSS、复发的比率和MRI病变活性。将结果与患者自己的预治疗过程以及在RR-MS和SP-MS患者中两个最近临床试验的安慰剂手臂进行比较, 其起评估MS自然病史的作用 (Jacobs等人, 1996), European Study Group, 1998)。通过在EDSS上至少增加1.0 (Poser等人, 1983), 持续至少2个月而确定发展的时间。研究上的恶化被定义为出现新的神经病学症状或预先存在的神经病学症状的恶化持续至少48小时, 伴随神经病学检验上的客观变化 (在EDSS上恶化至少0.5个点)。指导患者报告在确定时间的定期巡检之间发生的事件, 并且由神经病学家检验患者是否有显示恶化的症状。安全评估包括不利的事件、生命体征和定期巡检的体格检查。利用Wilcoxon's秩次和检验法分析T细胞疫苗接种前后的研究患者中临床可变量的差异。

30 实施例 7

疫苗接种后MS临床病程的变化

患者接受根据实施例1所制备的T细胞疫苗接种而没有副作用。疫苗接种后，在24个月的期间内在RR-MS患者中，平均的EDSS下降了。比较起来，在相同的观察期间，RR-MS (n=56) 自然病史中平均EDSS增加了0.61，正如在利用 β -IFN-1a试验进行的试验中所报道的 (Jacobs等人, 1996)。此外，具有未改变的或改善的EDSS的患者的比例比自然的MS病史患者要高。与MS自然病史中18%的患者相比，RR-MS治疗组中的患者即使有，也很少有在24个月内发展超过2.0的EDSS的。

在SP-MS群中，在24个月期间内的平均EDSS进度，与SP-MS自然病史中所记录的相比减慢了 (European Study Group, 柳叶刀 Lancet 1998; 352:1491-1497)。此外，利用Kaplan-Meier方法评估证实发展的时间显示，与MS患者的自然病史相比有相当大的延迟 (对于RR-MS在12个月为20%的发展，而对于SP-MS为9个月) (Jacobs等人, Ann. Neurol, 1996; 39:285-294, European Study Group, 1998)。

15

<110> Baylor College of Medicine
Opexa Pharmaceuticals Inc.
Zhang, Jingwu Z

<120> T细胞的分离和鉴定

<130> 213838-00068

<150> US 60/402, 521

<151> 2002-08-08

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(17)

<223> 人髓磷脂碱性蛋白的第110-126位氨基酸

<400> 1

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr
1 5 10 15

Pro

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽
 <222> (1)..(20)
 <223> 人髓磷脂碱性蛋白的第 167-186 位氨基酸

<400> 2

Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro
 1 5 10 15

Met Ala Arg Arg
 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)..(20)
 <223> 人髓磷脂蛋白脂质蛋白质的第 31-50 位氨基酸

<400> 3

Leu Phe Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Ile Glu Thr Tyr
 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)..(20)

<223> 人髓磷脂蛋白脂质蛋白质的第 181-200 位氨基酸

<400> 4

Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Ile Gly Ser Leu
 20

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(17)

<223> 人髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白的第 1-17 位氨基酸

<400> 5

Gly Gln Phe Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(21)

<223> 人髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白的第 18-38 位氨基酸

<400> 6

Glu Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly
1 5 10 15

Met Glu Val Gly Trp
 20

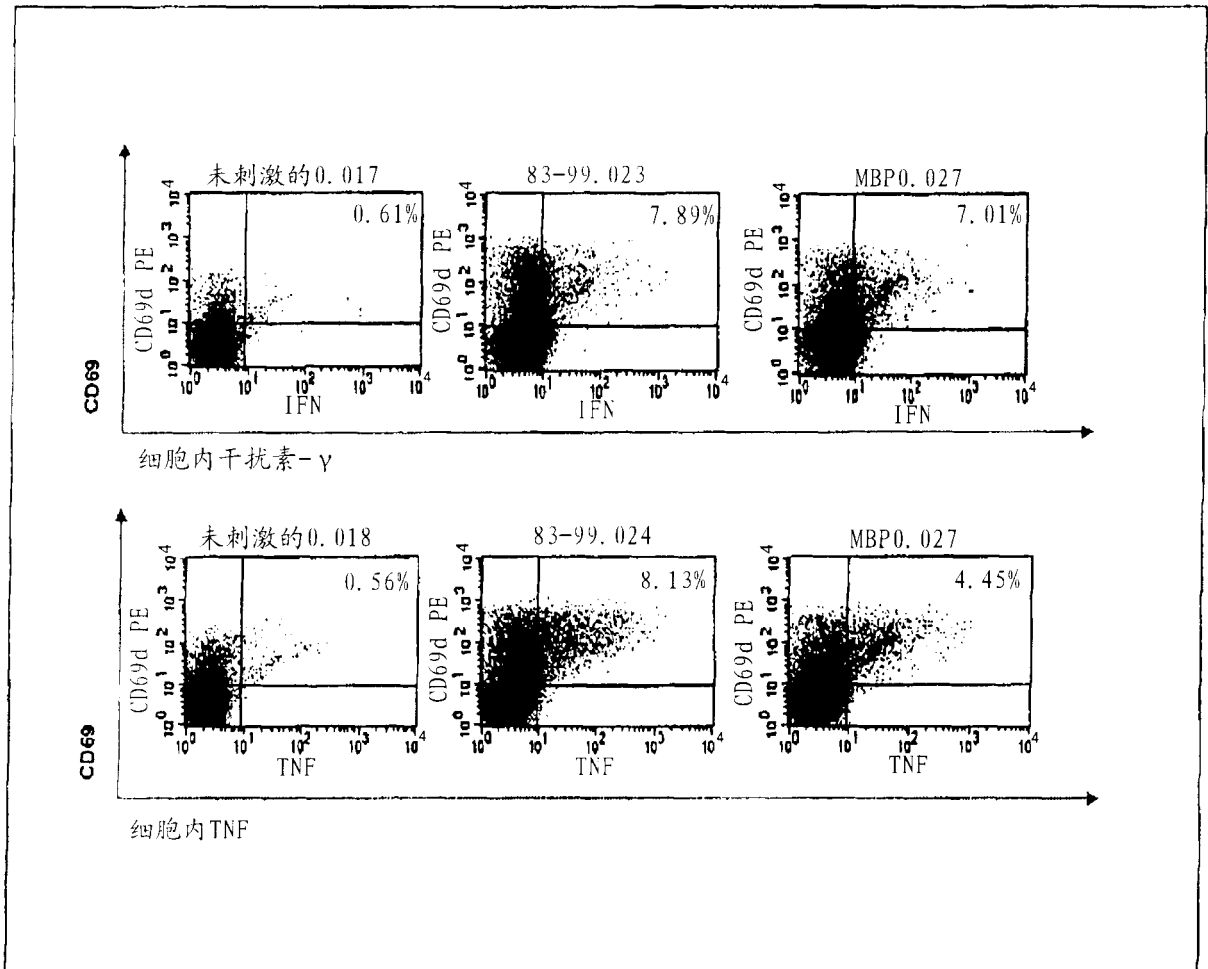


图 1

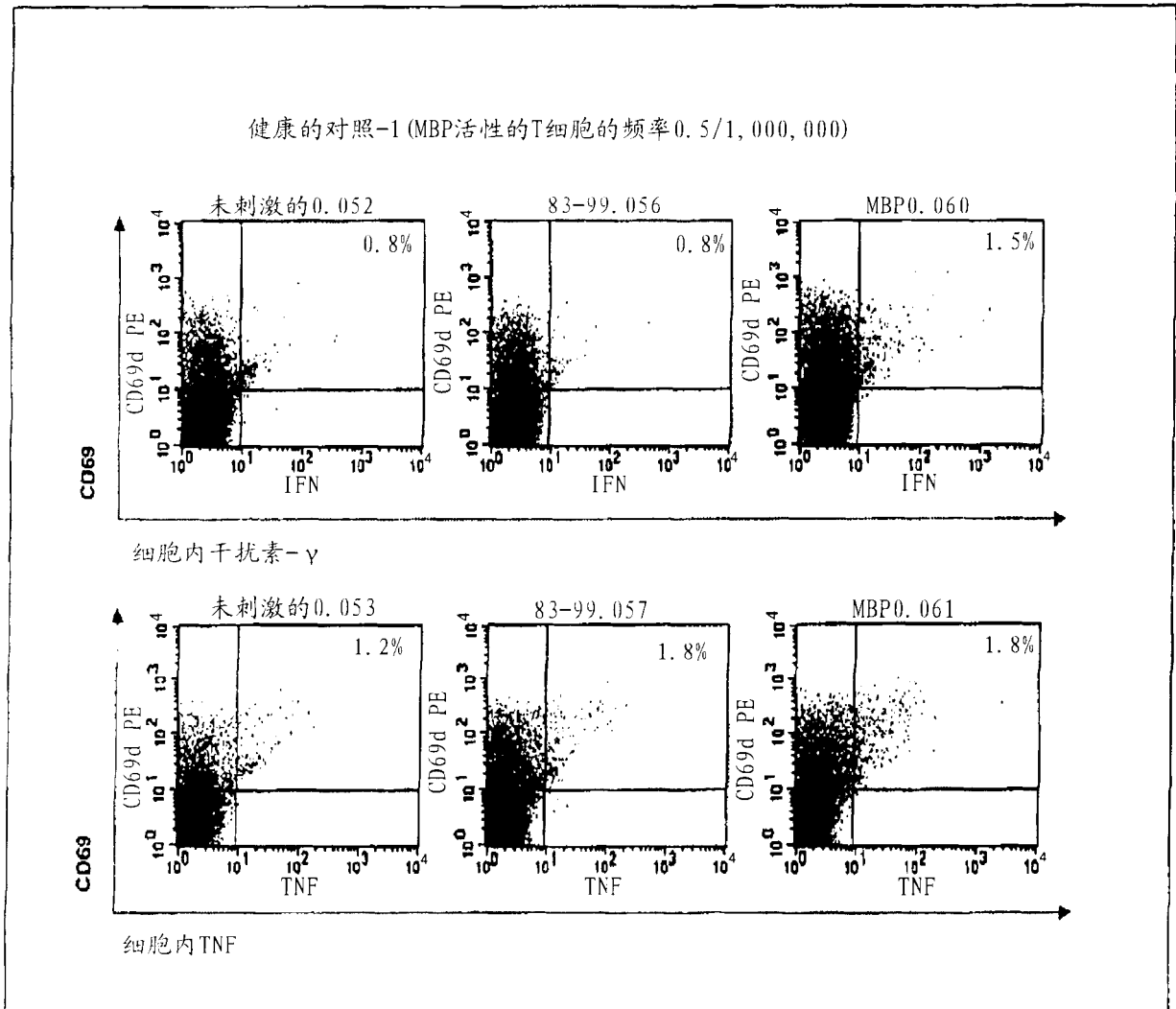


图 2

专利名称(译)	T细胞的分离和鉴定		
公开(公告)号	CN1675542A	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	CN03819234.9	申请日	2003-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒医学院		
申请(专利权)人(译)	贝勒医学院		
当前申请(专利权)人(译)	贝勒医学院		
[标]发明人	臧敬五		
发明人	臧敬五		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/12 A61K35/26 A61K39/00 C07K7/08 C12N5/0783 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 C12P19/34		
CPC分类号	A61K39/0008 A61K2035/122 G01N33/564 C12N5/0636 G01N33/505 G01N2800/285 A61K2039/5158 A61P9/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 G01N33/53		
代理人(译)	刘玥		
优先权	60/402521 2002-08-08 US		
其他公开文献	CN100567987C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及改进的自体同源的T细胞疫苗及其生产的改进方法。本发明也指向利用自体同源的T细胞疫苗治疗自身免疫性疾病，例如多发性硬化症或风湿性关节炎的方法。本发明进一步指向与T细胞相关的疾病的诊断。

