

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G12N 11/06 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710170321.6

[43] 公开日 2008年5月21日

[11] 公开号 CN 101182509A

[22] 申请日 2007.11.12  
[21] 申请号 200710170321.6  
[30] 优先权  
    [32] 2006.11.10 [33] US [31] 60/858,287  
[71] 申请人 李炯明  
    地址 美国宾夕法尼亚州  
[72] 发明人 李炯明

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司  
    代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 4 页 说明书 15 页 附图 7 页

[54] 发明名称

用于抗原特异性 T 细胞纯化的固相 T 细胞选择

[57] 摘要

本发明涉及用于抗原特异性 T 细胞纯化的固相 T 细胞选择。本发明的方面涉及将细胞与基层结合的方法、将靶 T 细胞从 T 细胞群中除去的方法、将同种反应性 T 细胞从诸如骨髓或干细胞移植细胞的样品中清除的方法以及测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法。

1. 将细胞与基层结合的方法，所述方法包含：
  - a. 提供基层，
  - b. 将所述基层与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷在允许 3-氨基丙基三乙氧基硅烷与所述基层结合的条件下接触，
  - c. 将步骤 b 的所述基层与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪在允许 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷结合的条件下接触；以及
  - d. 将步骤 c 的所述基层与细胞在允许所述细胞与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪结合的条件下接触。
  
2. 将细胞与基层结合的方法，所述方法包括：
  - a. 提供蛋白包被的基层，
  - b. 将所述蛋白包被的基层与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪在允许 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪与所述蛋白包被的基层结合的条件下接触；以及
  - c. 将步骤 b 的所述基层与细胞在允许细胞与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪结合的条件下接触。
  
3. 将靶 T 细胞从 T 细胞群中除去的方法，所述方法包含：
  - a. 将抗原提呈细胞与抗原接触，使得所述抗原提呈细胞提呈抗原，
  - b. 使用如权利要求 1 或 2 所述的方法将所述抗原提呈细胞结合到基层上，
  - c. 将 T 细胞群与步骤 b 的与基层结合的所述抗原提呈细胞在允许对步骤 a 的抗原特异的 T 细胞与步骤 b 的所述抗原提呈细胞结合的条件下接触；以及
  - d. 将对步骤 a 的抗原非特异的 T 细胞洗脱。

4. 将同种反应性 T 细胞从样品中清除的方法，所述方法包含：
  - a. 使用如权利要求 1 或 2 所述的方法将得自受体的抗原提呈细胞与基层结合，
  - b. 使包含供体细胞的样品通过步骤 a 的所述基层，由此将所述样品与步骤 a 的得自受体的抗原提呈细胞在允许来自所述样品中的对步骤 a 的抗原特异的 T 细胞与步骤 a 的抗原提呈细胞结合的条件下接触；以及
  - c. 将非同种反应性细胞从所述基层洗脱。
  
5. 测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法，所述方法包含：
  - a. 将抗原提呈细胞(APCs)用第一标记物标记，
  - b. 将 T 细胞用不同于步骤 a 的所述第一标记物的第二标记物标记，
  - c. 使用如权利要求 1 或 2 所述的方法将步骤 a 的 APCs 固定在第一表面上，
  - d. 将步骤 c 的 APCs 与所关注的抗原接触，使得所述 APCs 提呈抗原，
  - e. 将淋巴细胞加至第二表面，
  - f. 将所述两个表面接触，使得步骤 e 的淋巴细胞的层形成为与步骤 d 的 APCs 的层紧密接触，形成装配物，
  - g. 将步骤 f 的所述装配物孵育足够长的时间以允许免疫突触形成，
  - h. 检测形成的免疫突触的数目；以及
  - i. 通过用形成的免疫突触总数除以淋巴细胞总数来测定抗原特异性 T 细胞的频率。
  
6. 测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法，所述方法包含：
  - a. 将抗原提呈细胞(APCs)用第一标记物标记，
  - b. 将 T 细胞用不同于步骤 a 的所述第一标记物的第二标记物标记，

- c. 将步骤 a 的标记的 APCs 与步骤 b 的标记的 T 细胞混合,
- d. 将步骤 c 的所述混合物与第一表面接触,
- e. 将步骤 d 的所述表面用第二表面覆盖, 形成装配物,
- f. 将步骤 e 的所述装配物孵育足够长的时间以允许免疫突触形成,
- g. 检测形成的免疫突触的数目; 以及
- h. 通过用形成的免疫突触总数除以淋巴细胞总数来测定抗原特异性 T 细胞的频率。

7. 如权利要求 1-6 所述的方法, 其中所述基层选自玻璃、塑料、金属、金属合金、陶瓷或聚合物。

8. 如权利要求 1-6 所述的方法, 其中用聚合物或蛋白包被所述基层。

9. 如权利要求 1-6 所述的方法, 其中所述基层为珠子。

10. 如权利要求 8 所述的方法, 其中包被所述基层的蛋白包含 BSA。

11. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述细胞包含抗原提呈细胞、肿瘤细胞以及被病原体感染的细胞。

12. 如权利要求 1-6 所述的方法, 其中所述细胞是非贴壁细胞。

13. 如权利要求 1-6 所述的方法, 其中所述基层是玻璃载玻片。

14. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述抗原提呈细胞为非贴壁细胞。

15. 如权利要求 1-6 所述的方法，其中所述基层包含聚对苯二甲酸乙二酯。

16. 如权利要求 1-4 所述的方法，其中所述基层在柱中。

17. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述供体细胞包含骨髓或外周干细胞。

18. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述供体细胞包含骨髓或外周干细胞。

19. 如权利要求 5 所述的方法，其中步骤 a 的所述第一标记物包含第一荧光染料，并且步骤 b 的所述第二标记物包含第二荧光染料。

20. 如权利要求 6 所述的方法，其中步骤 a 的所述第一标记物包含第一荧光染料，并且步骤 b 的所述第二标记物包含第二荧光染料。

## 用于抗原特异性T细胞纯化的固相T细胞选择

### 发明领域

本发明的领域包括细胞在基层上的固定和用于抗原特异性 T 细胞纯化的固相 T 细胞选择。本发明的方面涉及将细胞与基层结合的方法、将靶 T 细胞从 T 细胞群中除去的方法、将同种反应性 T 细胞从骨髓移植细胞中清除的方法以及测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法。

### 发明背景

贴壁细胞的贴壁特性已被用于多种方法，如基于细胞的微阵列、组织工程以及分离和扩增特异细胞群的方法。通过使用细胞外基质蛋白(如胶原或纤连蛋白)或其衍生的肽以及聚合物处理诸如明胶包被的玻璃片的表面增强贴壁性质。这样的方法经常依赖于疏水相互作用。这类技术的主要局限性是不能将其应用延伸至非贴壁细胞例如树突状细胞或 EBV 转化的 B 细胞。另外，依赖于非共价键，相互作用能够导致细胞从基层的释放。

已开发了多种技术用于选择和扩增或除去抗原特异性 T 细胞。扩增特异细胞群能够增强其在诸如干细胞移植过程中的治疗免疫效果，其中患者能够得益于例如增加显示抗肿瘤效果的淋巴细胞群。同样重要的是从群中除去 T 细胞的方法。例如，从供体淋巴细胞中除去同种反应性 T 细胞以降低潜在致命的移植物抗宿主病的发生和严重性。所述方法可应用差异密度离心、磁珠或与特异肽缔合且与荧光染料结合的 MHC 四聚体。这些方法通常昂贵、耗时，并且效率低。经常失去抗原特异性。其它方法使用淘选的抗原提呈细胞，如单核细胞的膜层，但这些方法限于贴壁细胞，要求知晓 MHC 限制表位肽以选择抗原特异性细胞，并且可能要求特殊的离心机(如 Elutra™)。

测定给定样品中抗原特异性 T 细胞的频率有多种方法。最常用的

是流式细胞术细胞内细胞因子测定、ELISPOT 测定以及 MHC - 四聚体测定。这些方法测定活化的抗原特异性细胞毒性 T 细胞的含量(即浓度), 但要求特殊的仪器, 如 ELISPOT 读数器或流式细胞计。这些方法通常耗时和费事, 并且昂贵。

过继 T 细胞疗法目前作为治疗人类中恶性疾病的方法被研究。对黑素瘤、鼻咽癌、霍奇金淋巴瘤及白血病的临床研究显示有希望的结果。临床上其包括采集免疫学致敏的 T 细胞、体外活化和扩增这些淋巴细胞以及将这些细胞重新引入宿主中以造成肿瘤的消退。有多种用于刺激、分离和离体扩增效应性细胞毒性 T 细胞的方案, 每一方案使用抗原提呈细胞、细胞因子、抗原形式和浓度以及刺激周期持续时间的不同组合。然而, 有若干临床瓶颈限制其临床应用。这些包括定量的限制(不能产生足够数量的抗原特异性 CD8 T 细胞)和定性的限制(由于过量提供细胞因子和共刺激而产生功能障碍的细胞毒性 T 细胞)。

例如, 在治疗鼻咽癌、霍奇金淋巴瘤的临床试验中通常需要数月(4至5个月)来制造足够数量和质量的 EBV 特异的细胞毒性 T 细胞。另外, 产生这些效应性 T 细胞的成本高得令人却步, 不允许其广泛应用。

## 发明概述

本发明涉及用于抗原特异性 T 细胞纯化的固相 T 细胞选择。本发明的方面涉及将细胞与基层结合的方法、将靶 T 细胞从 T 细胞群中除去的方法、将同种反应性 T 细胞从诸如骨髓或干细胞移植细胞的样品中清除的方法以及测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法。

本发明的一方面涉及将细胞与基层结合的方法。在该方法中, 使基层与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷连接剂(硅烷连接剂)接触, 使得硅烷连接剂与基层结合。然后, 将硅烷连接剂与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪连接剂(PEG 连接剂)接触, 使得 PEG 连接剂与硅烷连接剂结合。然后将 PEG 连接剂与细胞在允许细胞与 PEG 连接剂结合的条件下接触。

本发明另一方面涉及将细胞与基层结合的另一方法。此方法中, 将蛋白包被的基层与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三

嗪连接剂接触，使得连接剂与蛋白包被的基层结合。然后，将基层和连接剂与细胞在允许细胞与 2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪结合的条件下接触。

本领域技术人员会认识到本发明的不同实施方案中所使用的基层能够是玻璃、聚合物、金属、金属合金或任何合适的基层。另外，所述基层能够用聚合物、肽或蛋白包被，并能够成形为片、珠或其它方便的形式。

在另一实施方案中，所述基层为用例如牛血清白蛋白(BSA)或其片段的蛋白包被的聚对苯二甲酸乙二酯(PET)或玻璃。

本发明的另一方面涉及将靶 T 细胞从 T 细胞群中除去的方法。在此方法中，将抗原提呈细胞与抗原接触，使得抗原提呈细胞提呈抗原。然后使用上文讨论的本发明的任何方法将抗原提呈细胞结合到基层上。将 T 细胞群与已与基层结合的抗原提呈细胞接触，使得对该抗原特异的 T 细胞与抗原提呈细胞结合。然后将对抗原非特异的 T 细胞洗脱。

本发明的另一方面涉及将同种反应性 T 细胞从诸如骨髓或干细胞移植细胞的细胞样品中清除的方法。在此方法中，使用上文讨论的本发明的任何方法将得自受体的抗原提呈细胞与基层结合。使供体细胞通过基层并与得自受体的抗原提呈细胞在允许任何对该抗原特异的供体 T 细胞与抗原提呈细胞结合的条件下接触。然后将非同种反应性细胞从基层洗脱。在一实施方案中，可将所述基层包含在柱或其它适当的器皿或容器中。

本发明的另一方面涉及测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法。首先，将抗原提呈细胞用例如荧光染料标记，而将 T 细胞用例如不同于用于标记抗原提呈细胞的荧光染料的荧光染料标记。然后，使用上文讨论的本发明的任何方法将抗原提呈细胞固定在表面上。然后将抗原提呈细胞与所关注的抗原接触，使抗原提呈细胞提呈该抗原，然后，将淋巴细胞加入到第二表面并且将两个表面装配，使得形成与抗原提呈细胞层紧密接触的淋巴细胞层。然后将装配物孵育足够长的时间以允许免疫突触形成。然后，对形成的免疫突触进行检测和计数。

通过用形成的免疫突触的总数除以淋巴细胞总数来测定抗原特异性 T 细胞的频率。

在另一实施方案中，将抗原提呈细胞用例如荧光染料标记，而将 T 细胞用例如不同于用于标记抗原提呈细胞的荧光染料的荧光染料标记，如上文所提到的。然后将抗原提呈细胞和 T 细胞浓缩并混合在一起。能够形成单层细胞，这些细胞在例如玻璃载玻片上或在例如玻璃载玻片之间。然后将装配物孵育足够长的时间以允许免疫突触形成。然后，对形成的免疫突触进行检测和计数。通过用形成的免疫突触的总数除以淋巴细胞总数来测定抗原特异性 T 细胞的频率。

与以前的方法相比，本发明的方法提供数个优势。在以前的选择抗原特异性 T 细胞的方法中，自发贴壁在表面的细胞，如单核细胞，倾向于随时间从表面浮起，并且因此不用于选择蛋白或肿瘤细胞特异性 T 细胞。另外，以前的方法要求特殊的离心机用于淘选单核细胞或抗原特异性 T 细胞的选择仅限于当 MHC 限制表位肽是已知的时。另外，不自发贴壁在表面的抗原提呈细胞，如树突状细胞、EBV 转化的 B 细胞(LCL)及其它现在能够被用于选择抗原特异性 T 细胞。本领域技术人员会认可，本发明的方法能够利用许多种不同的细胞，包括但不限于本文所述的那些细胞。

过继 T 细胞疗法目前作为治疗人类中恶性疾病的方法被研究。对黑素瘤、鼻咽癌、霍奇金淋巴瘤及白血病的临床研究显示有希望的结果。临床上其包括采集免疫学致敏的 T 细胞、体外活化和扩增这些淋巴细胞以及将这些细胞重新引入宿主中以造成肿瘤的消退。有多种用于刺激、分离和离体扩增效应性细胞毒性 T 细胞的方案，每一方案使用抗原提呈细胞、细胞因子、抗原形式和浓度以及刺激周期持续时间的不同组合。然而，有若干临床瓶颈限制其临床应用。这些包括定量的限制(不能产生足够数量的抗原特异性 CD8 T 细胞)和定性的限制(由于过量提供细胞因子和共刺激产生功能障碍的细胞毒性 T 细胞)。

例如，在治疗鼻咽癌、霍奇金淋巴瘤的临床试验中通常需要数月(4至5个月)来制造足够数量和质量 EBV 特异的细胞毒性 T 细胞。另外，生产这些效应性 T 细胞的成本高得令人却步，不允许其广泛应用。

为了克服这些障碍，我们开发了新的固相T细胞选择方法以纯化和扩增抗原特异性T细胞。在此方法中，我们实验室开发的固定剂将类淋巴母细胞细胞系(LCL)固定在固体载体的表面上，以选择并纯化T细胞。基础假设是抗原特异性T细胞识别其关联抗原(cognate antigen)，并且与其的结合快于非抗原特异性T细胞。我们的数据确实证明比非抗原特异性T细胞更优先选择抗原特异性T细胞。除去漂浮的细胞后，由于免疫突触的形成随后将抗原特异性T细胞在表面上“浓缩”。然后通过加入低剂量IL-2 (20 U/ml)来扩增这些活化的T细胞。选择和扩增的联合使我们能够在一周内产生纯度>60%且总细胞>10<sup>8</sup>的LCL特异性T细胞。2周内第二轮的T细胞选择和扩增后能够达到超过90%纯度的LCL特异性T细胞。当用LCL选择T细胞时可将LMP2特异性T细胞富集至>30%，该LCL是用LMP2表位肽冲击的。此新的T细胞纯化方法不仅容易进行，而且快速和便宜。

#### 附图的简要说明

图1是显示通过固相T细胞选择方法进行EBV特异性T细胞纯化的示意图。

图2是显示通过固相T细胞选择方法的EBV特异性T细胞纯化的图。

图3是显示选择时间的影响的图。

图4是显示T细胞选择和扩增之后的细胞计数的柱状图。

图5是显示细胞毒性实验结果的图。

图6是显示通过固相T细胞选择方法进行LMP2特异性T细胞纯化的一般方案的示意图。

图7显示由CLG冲击的LCL选择而产生的CLG特异性T细胞溶解用CLG冲击的T2细胞系，并且对于用CMV pp64肽P<sub>495-503</sub>冲击的T2细胞系不具有显著的杀灭。每一个点代表三次重复实验数据的平均值。

图8显示由不同选择时间产生的淋巴细胞溶解自体LCL，而当在LCL中加入MHC I类抗体(w6/32)时，没有对K562和LCL的显著百

分溶解(作为代表,显示来自5分钟选择T细胞的细胞毒性数据)。每一个点代表三次重复实验数据的平均值。

图9显示由固定的LCL选择方法产生的M27L特异性T细胞识别其目标并且相对于不匹配的单核细胞偏爱溶解黑素瘤细胞。

图10显示CEA CAP1-6D特异性T细胞选择和扩增。选择前有0.2%的CAP1-6D特异性T细胞。第一次选择和扩增后,CAP1-6D特异性T细胞的频率增加至10%。第二次选择和扩增后,CAP1-6D特异性T细胞的频率增加至35%。

图11显示WT1特异性T细胞选择和扩增。选择前有0.2%的WT1特异性T细胞。第一次选择和扩增后,WT1特异性T细胞的频率增加至11%。第二次选择和扩增后,WT1特异性T细胞的频率增加至40%。

#### 发明的详细描述

本发明涉及将细胞与基层结合的方法、将靶T细胞从T细胞群中除去的方法、将同种反应性T细胞从诸如骨髓移植细胞的样品中清除的方法以及测量样品中抗原特异性T细胞的频率的方法。

在一实施方案中,本发明涉及将细胞与基层结合的方法,该方法包含下述步骤:(i)提供基层;(ii)将所述基层与3-氨基丙基三乙氧基硅烷连接剂接触,使得连接剂与基层结合;(iii)将所述基层和3-氨基丙基三乙氧基硅烷连接剂与2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪接触,使得2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪与3-氨基丙基三乙氧基硅烷连接剂结合;以及(iv)与细胞在允许细胞与2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪结合的条件下接触。

在另一实施方案中,本发明涉及将细胞与基层结合的方法,该方法包括下列步骤:(i)提供蛋白包被的基层;(ii)将所述蛋白包被的基层与2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪连接剂接触,使得所述连接剂与蛋白包被的基层结合;以及(iii)将基层和连接剂与细胞在允许细胞与2-O-4,6-二氯-s-三嗪-聚乙二醇-2-O-4,6-二氯-s-三嗪结合的条件下接触。

基层是任何想要的在尺寸上稳定的固体，其可以由陶瓷物质、玻璃、金属、结晶材料、塑料、聚合物或共聚物、其任何组合、或一种材料在另一种材料上的包被组成。例如，但不限于(半)贵金属如金或银；玻璃材料如钠玻璃、Pyrex 玻璃、Vycor 玻璃、石英玻璃；金属或非金属氧化物；硅、磷酸单铵盐及其它这样的结晶材料；过渡金属；塑料或聚合物，包括树枝状聚合物，如聚氯乙烯、聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸甲酯、聚(醋酸乙烯酯-马来酸酐)、聚(二甲基硅氧烷)单甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯亚胺；共聚物如聚(醋酸乙烯酯-共-马来酸酐)、聚(苯乙烯-共-马来酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸)等。在优选实施方案中，可修饰基层以实现生物分子的固定，例如，但不限于，用金或银包被、形成有图案的表面，等等。

本发明的另一实施方案涉及将靶 T 细胞从 T 细胞群中移除的方法，所述方法包含下列步骤：(i)将抗原提呈细胞与抗原接触，使得所述抗原提呈细胞提呈抗原；(ii)使用本发明的任何方法将所述抗原提呈细胞结合到基层上；(iii)将 T 细胞群与已与基层结合的抗原提呈细胞接触，使得对该抗原特异的 T 细胞与抗原提呈细胞结合；以及(iv)将对所述抗原非特异的 T 细胞洗脱。

本发明的另一实施方案涉及将同种反应性 T 细胞从移植细胞中除去的方法，所述方法包含：(i)使用本发明的任何方法将得自受体的抗原提呈细胞与基层结合；(ii)将供体细胞通过基层，由此将供体细胞与得自受体的抗原提呈细胞在允许对抗原特异的供体 T 细胞与抗原提呈细胞结合的条件下接触；以及(iii)将非同种反应性细胞从基层洗脱。

本发明的另一实施方案涉及测量样品中抗原特异性 T 细胞的频率的方法，所述方法包含：(i)将抗原提呈细胞(APCs)用荧光染料标记；(ii)将 T 细胞用不同于用于 APCs 的荧光染料的荧光染料标记；(iii)使用本发明的任何方法将 APCs 固定在表面上；(iv)将 APCs 与所关注的抗原接触，使 APCs 提呈抗原；(v)将淋巴细胞加入到第二表面；(vi)将两个表面装配，使得形成与 APCs 层紧密接触的淋巴细胞层；(vii)将装配物孵育足够长的时间以允许免疫突触形成；(viii)检测形成的免疫突触的数量；以及(ix)通过用形成的免疫突触总数除以淋巴细胞总数

来测定抗原特异性 T 细胞的频率。或者，如上文所提到的，将抗原提呈细胞用荧光染料标记，而将 T 细胞用不同于用于标记抗原提呈细胞的荧光染料的荧光染料标记。然后将抗原提呈细胞和 T 细胞浓缩并混合在一起。能够形成单层细胞，这些细胞在两片玻璃载玻片之间。然后将装配物孵育足够长的时间以允许免疫突触形成。然后，对形成的免疫突触进行检测和计数。通过用形成的免疫突触总数除以淋巴细胞总数来测定抗原特异性 T 细胞的频率。

## 实施例

### **实施例 1 - 将细胞固定在玻璃表面或聚对苯二甲酸乙二酯(PET)表面**

所需材料:

磷酸盐缓冲的盐水(PBS) pH8.5

pH 2 的 PBS (基于 pH 0-14 的 pH 试纸用 1N HCl 粗调)

PBS

pH 0-14 的 pH 试纸(EM Science, cat. 9590)

pH 6.5-10 的 pH 试纸(EMD Chemicals Inc, cat. 9583)

活化 PEG 聚合物

饱和碳酸氢钠溶液

5% BSA 的 PBS 溶液，无菌

原理：BSA 会自发附着在玻璃或 PET 表面上。活化 PEG 聚合物在其每一端具有活化官能基团，其会分别连接在 BSA 和细胞表面蛋白上。

过程:

将 3 ml 的 5% BSA 加入到 100ml Pyrex 烧杯中，并在室温下放置过夜。倾出 BSA 溶液并用 PBS 洗涤三次以除去非附着的 BSA。

将 5 ml PBS 加入到含有 0.4 克活化 PEG 聚合物的 50 ml 圆锥形管中(pH 会立即变为酸性)。剧烈搅拌后，将溶液加入到用 BSA 预处理过的 100ml Pyrex 烧杯中。用 pH 试纸监控 pH 以保持 pH 在 8 至 9。在室温(20°C)经过 15 分钟后，倾出，并用 PBS 漂洗三次以除去残余的未反

应聚合物。加入 3 ml PBS (pH 2)。加入酸性 PBS 后,能够立即或在 24 小时后将细胞固定在表面上。

制备用于固定的细胞: 如果指明,在固定前首先辐照细胞。将  $15 \times 10^6$  EBV 转化的 B 细胞(LCL)或其它类型的细胞用 50 ml PBS 洗涤两次。将不含蛋白的细胞悬浮在 2.5 ml PBS (pH8.5)中,并沿内壁缓慢引入到 Pyrex 烧杯中。用无菌盖子盖上,在显微镜下移动进行观察。2-3 分钟内不要干扰,使得细胞尽快沉淀在表面上。然后将烧杯移至细胞培养箱(37°C 和 5% CO<sub>2</sub>)。30 分钟后,小心摇动并倾出培养基。用 10% FCS/RPMI 小心洗涤 3 次以除去漂浮的细胞。在进一步实验之前允许固定的细胞于培养箱中在 10% FCS/RPMI 1640 或 10% NABS/RPMI 1640 中恢复 1 小时。

结果:  $3.5 \pm 0.2 \times 10^6$  LCL 细胞可被固定在 100 ml Pyrex<sup>TM</sup> 烧杯的表面上。当被置于细胞培养箱中时固定后 24 小时  $88 \pm 2\%$  的这些细胞存活。

## **实施例 2 - 抗原特异性 T 细胞选择**

在 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中将 50 ml 完全培养基(CM)中的  $50 \times 10^6$  个外周血单核细胞(PBMC)加入到  $5 \times 10^6$  LCL 中,所述完全培养基由含有 10% 热灭活的正常 AB 血清的 RPMI 1640 培养基组成。在第 7 天,对这些初次激活的淋巴细胞进行计数,并用固定在固体载体表面上的 LCL 细胞进行选择。

固相 T 细胞选择过程:

第一轮选择: LCL (以 8000 rad 辐照)被固定在 100 ml Pyrex 烧杯表面上之后,加入 3 ml 温 CM 中的浓度为  $25 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  的初次激活的淋巴细胞(第 7 天)。在 5、10 和 15 分钟考查选择时间。用移液管除去非贴壁细胞。将余下的贴壁细胞用温 CM 小心洗涤 3 次,并在孵育 15-30 分钟后再次洗涤。24 h 后,通过用移液管小心搅拌而除去贴壁细胞,并将其转移至培养瓶的 100 ml CM 和 rhIL-2 中(最终浓度 20U ml<sup>-1</sup>)。每 2-3 天加入 rhIL-2。在第 14 天,通过流式细胞术细胞内细胞因子测定(ICC)分析培养的细胞。图 1 图示说明了 T 细胞选择的一般方案。

第二轮选择：在第14天通过5分钟选择产生的T细胞被用于第二轮T细胞选择和扩增。在第21天，通过ICC分析培养的细胞。

### 传统EBV特异性T细胞刺激方法

作为对照，我们还用传统刺激方法制备了多克隆EBV特异性T细胞。在培养瓶中将 $50 \times 10^6$  PBMC与自体LCLs (以8000 rad辐照)以10:1的应答者/刺激质比率进行共培养。在第7天对其再次刺激，然后在第14天以4:1的应答者/刺激质比率再次刺激。从第7天开始，然后每2-3天加入IL-2至最终浓度为 $20 \text{ U ml}^{-1}$ 。在第21天，通过ICC分析培养的细胞。

结果：我们用来自3个供体的PBMC进行了T细胞选择实验，并且将某些有代表性的数据显示如下。

在第7天，通过细胞内细胞因子测定(ICC)在用LCL初次激活的淋巴细胞中测量产生IFN- $\gamma$ 的CD8+ T细胞(供体1，平均值2%)。参见图2。随后用固定在玻璃表面上的LCL细胞(■)选择这些淋巴细胞(选择时间5分钟)，并且然后用IL-2扩增。在第14天，通过ICC在培养的细胞中测量产生IFN- $\gamma$ 的CD8+ T细胞。然后再次用固定在玻璃表面上的LCL细胞(■)选择这些培养的细胞，并且然后用IL-2扩增。在第21天，通过ICC在培养的细胞中测量产生IFN- $\gamma$ 的CD8+ T细胞。作为对照，相同的初次激活的淋巴细胞也用LCL刺激，而不进行两次每周一次的选择(第7天和第14天)(▲)。用IL-2扩增T细胞后，在第14天(第一次刺激后7天)和第21天(第二次刺激后7天)通过ICC测量产生IFN- $\gamma$ 的CD8+ T细胞。

选择时间的影响参见图3。在第7天，用固定在玻璃表面上的LCL细胞选择如图2所示的相同的初次激活的淋巴细胞(供体1)。选择时间为5、10和15分钟。作为对照，也用LCL刺激这些相同的初次激活的淋巴细胞，而不以4:1的应答者/刺激质比率进行选择。在第14天，通过细胞内细胞因子测定(ICC)测量产生IFN- $\gamma$ 的CD8+ T细胞。

T细胞选择和扩增后的细胞计数参见图4。如图3所示的第一轮T细胞选择和扩增(供体1)7天后，通过Vi-细胞计数器对T细胞计数。

细胞毒性实验参见图 5。通过固相 T 细胞选择方法(选择时间 5 分钟)产生的 T 细胞(供体 1)能够杀灭自体 LCL，但不能杀灭 K562 细胞系。

### **实施例 3 - LMP2 特异性 T 细胞选择**

过程：通常在PBMC被LCL初次激活之后不存在可检测的LMP2特异性T细胞。然后再次用LCL刺激初次激活的淋巴细胞，并用IL-2扩增。

LCLs (以8000 rad辐照)被固定在100 ml Pyrex烧杯表面后，将贴壁细胞用10-20  $\mu\text{M}$ 选定的LMP2表位肽在37°C冲击2 h。除去培养基，并将贴壁细胞在温PBS中洗涤3次。然后加入3 ml温CM中的浓度为 $25 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 的培养的淋巴细胞。选择时间为5分钟。用移液管除去非贴壁细胞。将剩余的贴壁细胞用温CM小心洗涤三次，并在孵育15-30分钟后再次洗涤。第二天，通过用移液管小心搅拌而除去贴壁细胞，并将其转移至培养瓶的100 ml CM和rhIL-2中(最终浓度20U  $\text{ml}^{-1}$ )。每2-3天加入rhIL-2。选择后第7天，通过ICC分析培养的细胞。图6图示说明了T细胞选择的一般方案。

通过固相T细胞选择方法进行LMP2特异性T细胞纯化，参见图6。

结果：本实验中使用 4 种 LMP2 肽(均限制于 HLA-A\*0201):

LLW: LLWTLVVLL

CLG: CLGGLLTMV

FLY: FLYALALLI

TVC: TVCGGIMFL

选择前 LMP2 特异性 T 细胞的频率(平均值, 供体 5)为:

LLW: 0.8%

CLG: 0.8%

FLY: 0.8%

TVC: 0.8%

总 LMP2-特异性 T 细胞: 3.2%

总 EBV-特异性 T 细胞: 15%

选择后 LMP2 特异性 T 细胞的频率(平均值)为:

LLW: 1.5%

CLG: 4%

FLY: 10%

TVC: 7%

总 LMP2 特异性 T 细胞: 22%

总 EBV-特异性 T 细胞: 70%

#### **实施例 4 - 人细胞分离柱的构建**

我们用这种新的活化 PEG 聚合物和玻璃珠构建了人细胞分离柱。用牛血清白蛋白(BSA)包被玻璃珠。然后在上文所述的条件下加入活化的 PEG 聚合物,使得 PEG 聚合物连接在 BSA 上。按照上文所述的条件下加入 LCLs 使得 LCLs 最终结合在玻璃珠上。

这是为了在人干细胞移植中除去 T 细胞以治疗恶性疾病。除去 T 细胞的目的是减少急性 GVHD (移植物抗宿主病)。目前 T 细胞的除去是通过珠子、光除去方法,其很昂贵并且效率低。细胞分离柱由受体抗原提呈细胞如 LCL 或单核细胞制成,其中这些细胞通过活化的 PEG 聚合物固定在玻璃珠表面。允许供体淋巴细胞流过柱。那些同种反应性 T 细胞(即能够识别受体抗原提呈细胞的供体 T 细胞)会被选择并保留在柱中。从柱中流出的细胞不能引起 GVHD。该过程能够显著降低 T 细胞清除的成本和工作量。

#### **实施例 5 - 用固定的 LCLs 进行 LMP2 特异性 T 细胞选择**

在 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中将 50 ml 培养基中的  $100 \times 10^6$  外周血单核细胞 (HLA\*A0201+) 用负载有 EBV LMP2 肽 CLGGLLTMV (CLG) 的  $10 \times 10^6$  单核细胞活化,所述培养基由含有 10% 热灭活的正常 AB 血清的 RPMI 1640 培养基组成。在第 7 天,有 0.8% 的 CLG 特异性 T 细胞。

在将辐照的(80Gy)自体 LCLs 如 实施例 1 所述固定之后,将其用肽 CLG 再次加载 1 小时,所述自体 LCLs 在固定前用 2  $\mu$ M 肽 CLG 冲

击 4 小时。在细胞培养箱中将活化的淋巴细胞( $90 \times 10^6 \pm 10$  在 3 mL 培养基中,  $37^\circ\text{C}$ )加入到固定的抗原提呈细胞中。检测了不同的选择时间(3、5、7.5、10 和 15 分钟)。在每一选择时间的终点除去非贴壁细胞。用  $37^\circ\text{C}$  的培养基小心洗涤剩余的贴壁细胞。在  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 分钟后重复洗涤。在载体表面, 在 3、5、7.5、10 和 15 分钟选择的细胞中产生 IFN- $\gamma$  的细胞分别增加到 10%、17%、24%、21%和 19% (平均值)。然后在 T 细胞选择后的第二天以及之后每隔一天通过加入 IL2 (20u/ml) 扩增所选的淋巴细胞。在第 8 天, 在选择时间为 5、7.5 和 15 分钟的扩增的细胞中产生 IFN- $\gamma$  的细胞分别增加到 55%、70%和 65% (平均值)。在选择时间为 5、7.5 和 15 分钟的最终扩增的细胞群中分别有  $80 \times 10^6$ 、 $100 \times 10^6$  和  $100 \times 10^6$  (平均值)个细胞。超过 90% (平均值)的这些细胞群为 CD3+CD8+。细胞毒性杀灭示于图 7。

#### 实施例 6 - 用固定的 LCLs 进行 EBV 特异性 T 细胞选择

在  $75 \text{ cm}^2$  培养瓶中将 50 ml 培养基中的  $100 \times 10^6$  外周血单核细胞 (HLA\*A0201+)用  $10 \times 10^6$  经辐照的 (80Gy)自体 LCLs 活化, 所述培养基由含有 10%热灭活的正常 AB 血清的 RPMI 1640 培养基组成。在第 7 天, 有 1.8%的 EBV 特异性 T 细胞。

将经辐照的自体 LCLs 如实施例 1所述固定。在细胞培养箱中将活化的淋巴细胞( $90 \times 10^6 \pm 10$  在 3 mL 培养基中,  $37^\circ\text{C}$ )加入到固定的抗原提呈细胞中。检测了不同的选择时间(1、3、5、10 和 15 分钟)。在每一选择时间的终点除去非贴壁细胞。用  $37^\circ\text{C}$  的培养基小心洗涤剩余的贴壁细胞。在  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 分钟后重复洗涤。在载体表面, 在 1、3、5、10 和 15 分钟选择的细胞中产生 IFN- $\gamma$  的细胞分别为 22%、44%、20%、12%和 8% (平均值)。然后, 在 T 细胞选择后的第二天以及之后每隔一天通过加入 IL2 (20u/ml)扩增所选的淋巴细胞。在第 7 天, 在选择时间为 3、5、10 和 15 分钟的扩增的细胞中产生 IFN- $\gamma$  的细胞分别增加到 80%、65%、50%和 45% (平均值)。在选择时间为 3、5、10 和 15 分钟的最终扩增的细胞群中分别有  $30 \times 10^6$ 、 $100 \times 10^6$ 、 $120 \times 10^6$  和  $120 \times 10^6$  (平均值)个细胞。当将自体单核细胞用 EBV LMP2 肽

**LLWTLVVLL (LLW)、CLG 和 FLYALALLI (FLY)**一起冲击并与通过选择和扩增所产生的淋巴细胞共培养时，由 3、5、10 和 15 分钟选择而产生的淋巴细胞中产生 IFN- $\gamma$  的细胞分别有 17%、19%、9% 和 7% (平均值)。这里通过固相选择方法产生的淋巴细胞识别和杀灭自体 LCL，但对 K562 没有显著的杀灭；当在 LCL 中加入 MHC I 类抗体(w6/32)时，该淋巴细胞对自体 LCL 也没有显著的杀灭(图 8)。

### 实施例 7 - 用固定的 LCLs 进行黑素瘤特异性 T 细胞选择

在 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中将 50 ml 培养基中的  $100 \times 10^6$  外周血单核细胞 (HLA\*A0201+) 用负载有 M27L (Melan-A 26-35 变体 ELAGIGILTV) 的  $5 \times 10^6$  个经辐照的 (30Gy) 自体树突状细胞活化，所述培养基由含有 10% 热灭活的正常 AB 血清的 RPMI 1640 培养基组成。在第 7 天，有 0.8% 的 M27L 特异性 T 细胞。

在将经辐照的 (80Gy) 自体 LCLs 如 **实施例 1** 所述固定之后，将其用肽 M27L 再次加载 1 小时，所述自体 LCLs 在固定前用 10  $\mu$ M 肽 M27L 冲击 4 小时。在细胞培养箱中将活化的淋巴细胞 ( $90 \times 10^6 \pm 10$  在 3 mL 培养基中，37°C) 加入到固定的抗原提呈细胞中。检测了不同的选择时间 (3、5、7.5 和 10 分钟)。在每一选择时间的终点除去非贴壁细胞。用 37°C 的培养基小心洗涤剩余的贴壁细胞。在 37°C 孵育 30 分钟后重复洗涤。在载体表面，在 3、5、7.5 和 10 分钟选择的细胞中产生 IFN- $\gamma$  的细胞分别为 6%、7.4%、8% 和 8% (平均值)。然后，在 T 细胞选择后的第二天以及之后每隔一天通过加入 IL2 (20u/ml) 扩增选择了 10 分钟的淋巴细胞。在第 7 天，在设门的 CD3+ 细胞 ( $220 \times 10^6$ , >90% 为 CD3+ 细胞，平均值) 中产生 IFN- $\gamma$  的细胞为 65% (平均值)。参见图 9。

### 实施例 8 - 用固定的 LCLs 进行 CEA CAP1 6D 特异性 T 细胞选择

最初将 PBMCs (HLA\*A0201+) 用负载有 CEA CAP1 6D 的 DCs (10 $\mu$ M) 活化，然后通过用 CEA CAP1 6D (10 $\mu$ M) 冲击的单核细胞进行再刺激后，存在 0.2% (平均值) 的 CAP1-6D 特异性 T 细胞。用负载有 CEA CAP1 6D (10 $\mu$ M) 的固定的 LCL 进行第一次选择 (10 分钟选择时

间), 然后用 20U/ml 的 IL2 扩增 7 天后, 存在  $10^8$  (平均值) 细胞, 其中 10% (平均值) 为 CAP1-6D 特异性 T 细胞(图 10)。将这些淋巴细胞用负载有 CEA CAP1 6D ( $10\mu\text{M}$ ) 的固定的 LCL 进行第二次 T 细胞选择(10 分钟选择时间), 然后扩增 7 天。存在  $10^8$  (平均值) 的细胞, 其中 35% (平均值) 为 CAP1-6D 特异性 T 细胞(图 10)。

### 实施例 9 - 用固定的 LCLs 进行 WT1 特异性 T 细胞选择

最初将 PBMCs (HLA\*A0201+) 用负载有 WT1 的 DCs ( $10\mu\text{M}$ ) 活化, 然后通过用 WT1 ( $10\mu\text{M}$ ) 冲击的单核细胞进行再刺激后, 存在 0.2% (平均值) 的 WT1 特异性 T 细胞。用负载有 WT1 ( $10\mu\text{M}$ ) 的固定的 LCL 进行第一次选择(10 分钟选择时间), 然后用 20U/ml 的 IL2 扩增 7 天后, 存在  $10^8$  (平均值) 个细胞, 其中 11% (平均值) 为 WT1 特异性 T 细胞(图 11)。将这些淋巴细胞用负载有 WT1 ( $10\mu\text{M}$ ) 的固定的 LCL 进行第二次 T 细胞选择(10 分钟选择时间), 然后扩增 7 天。存在  $10^8$  (平均值) 的细胞, 其中 40% (平均值) 为 WT1 特异性 T 细胞(图 11)。

对本领域技术人员很显然能够对本发明做出各种修改或变化, 而不背离本发明的精神和范围。因此本发明旨在覆盖本发明的修改和变化, 条件是其落在所附权利要求及其等同的范围内。

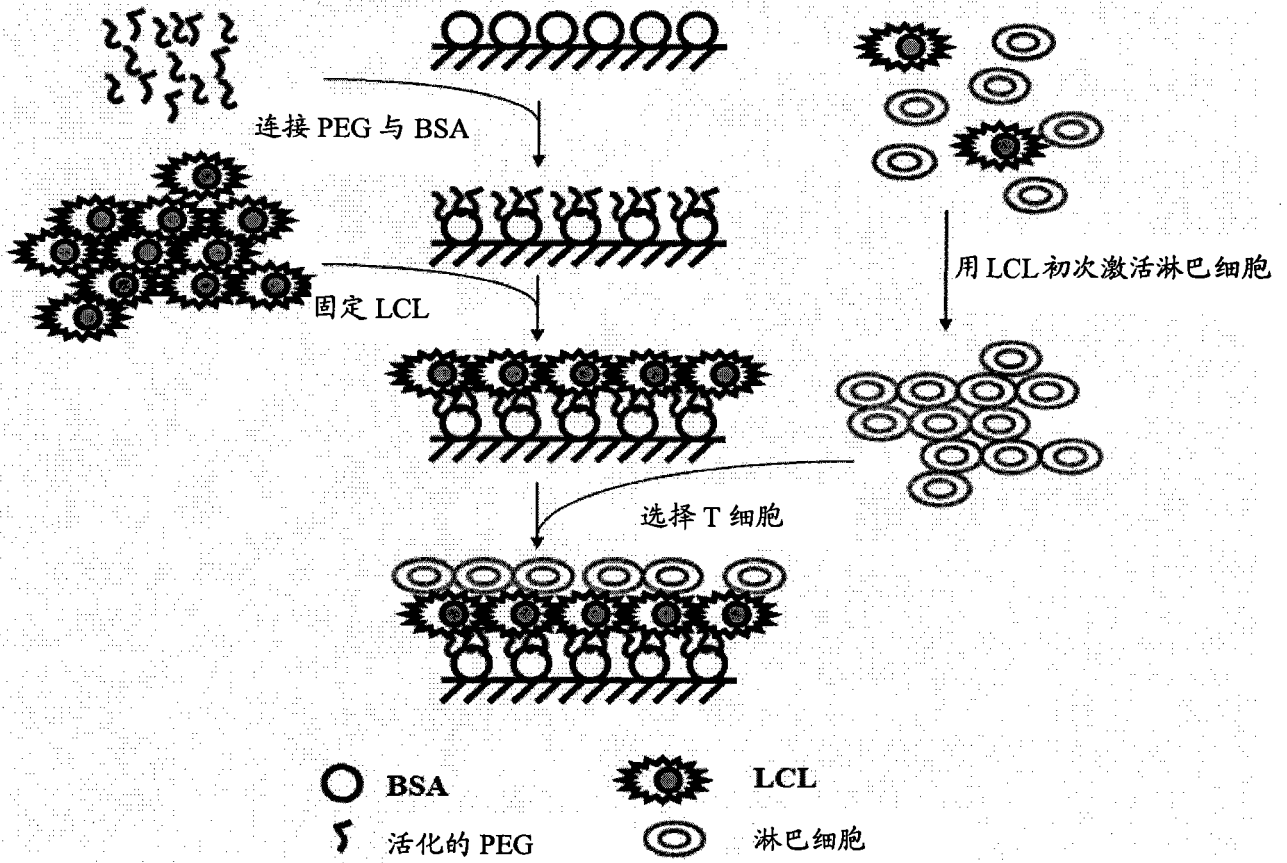


图 1

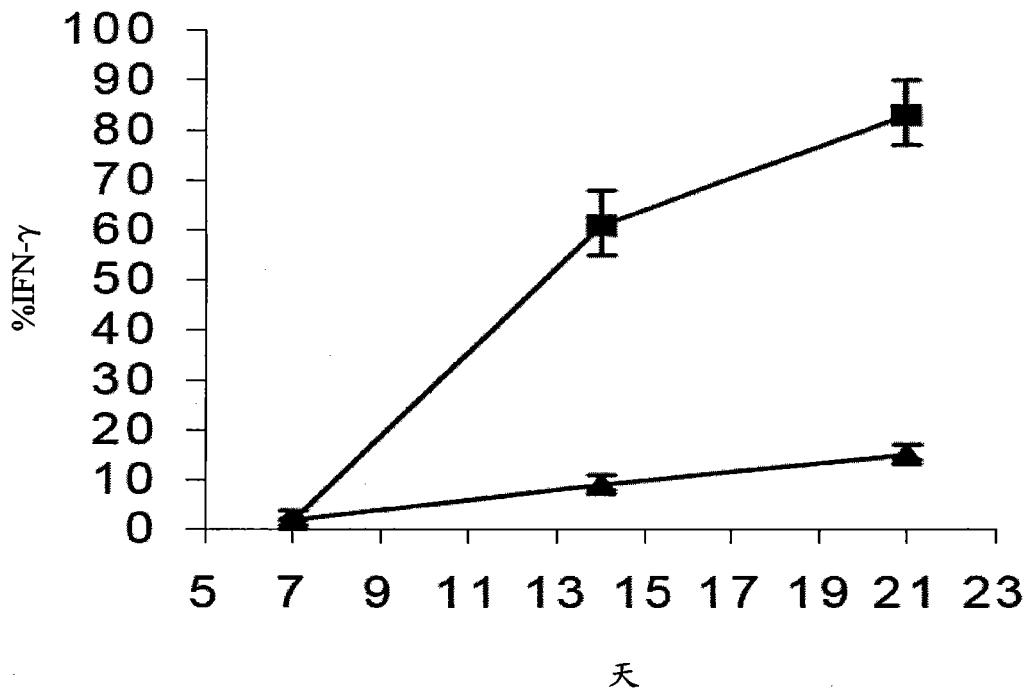


图 2

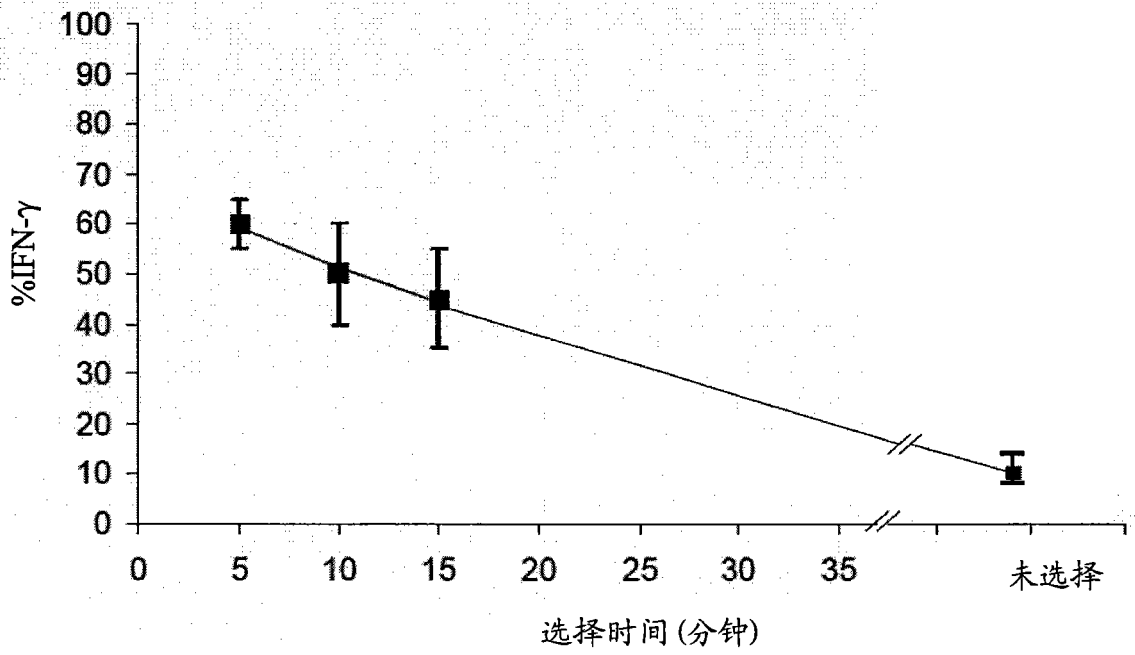


图 3

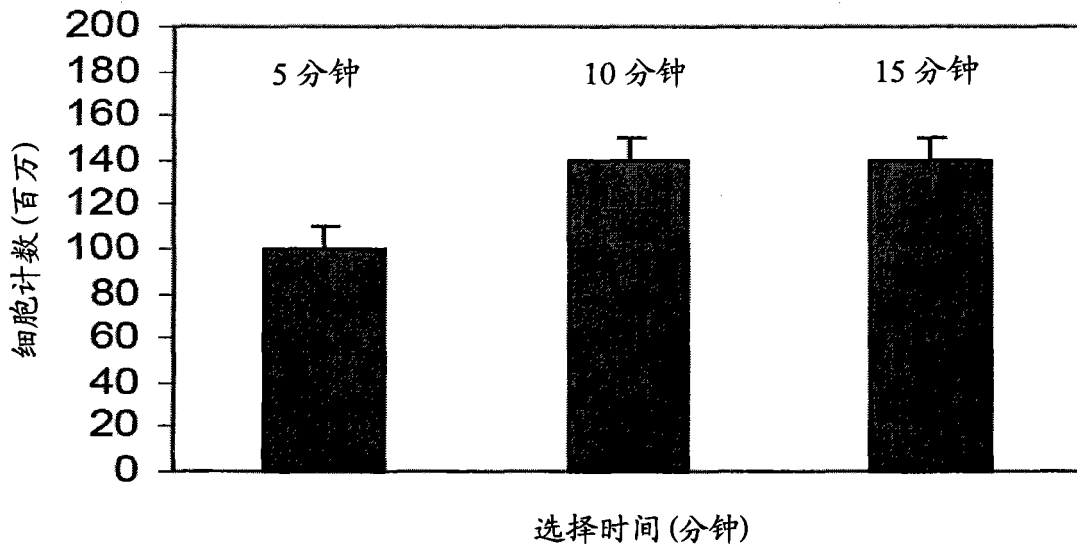


图 4

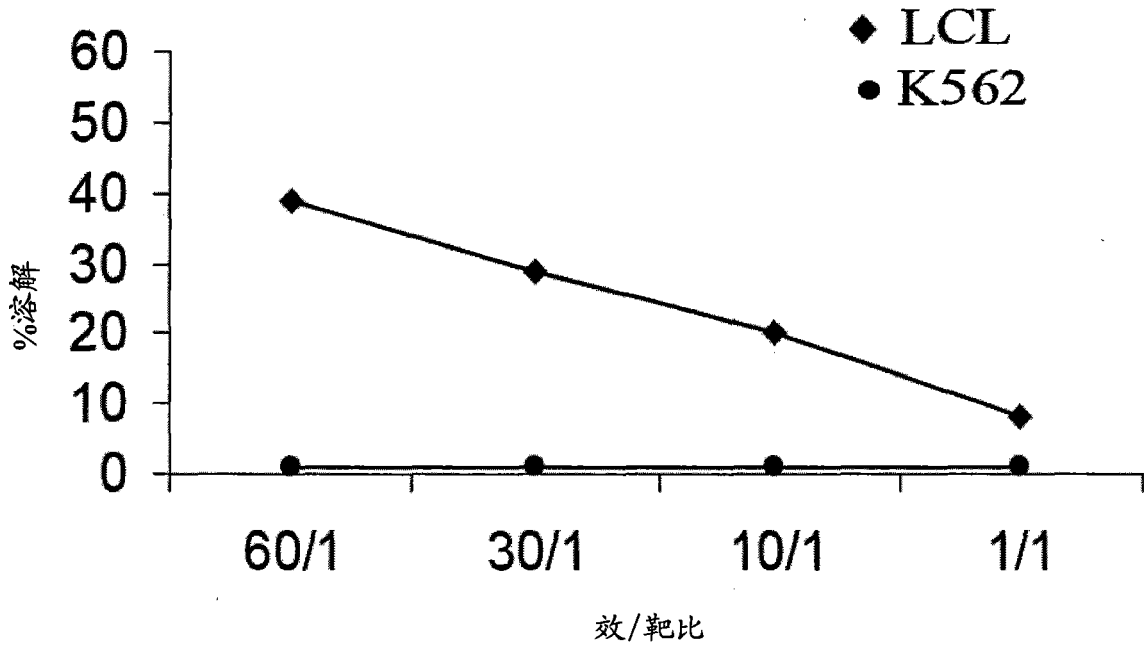


图 5

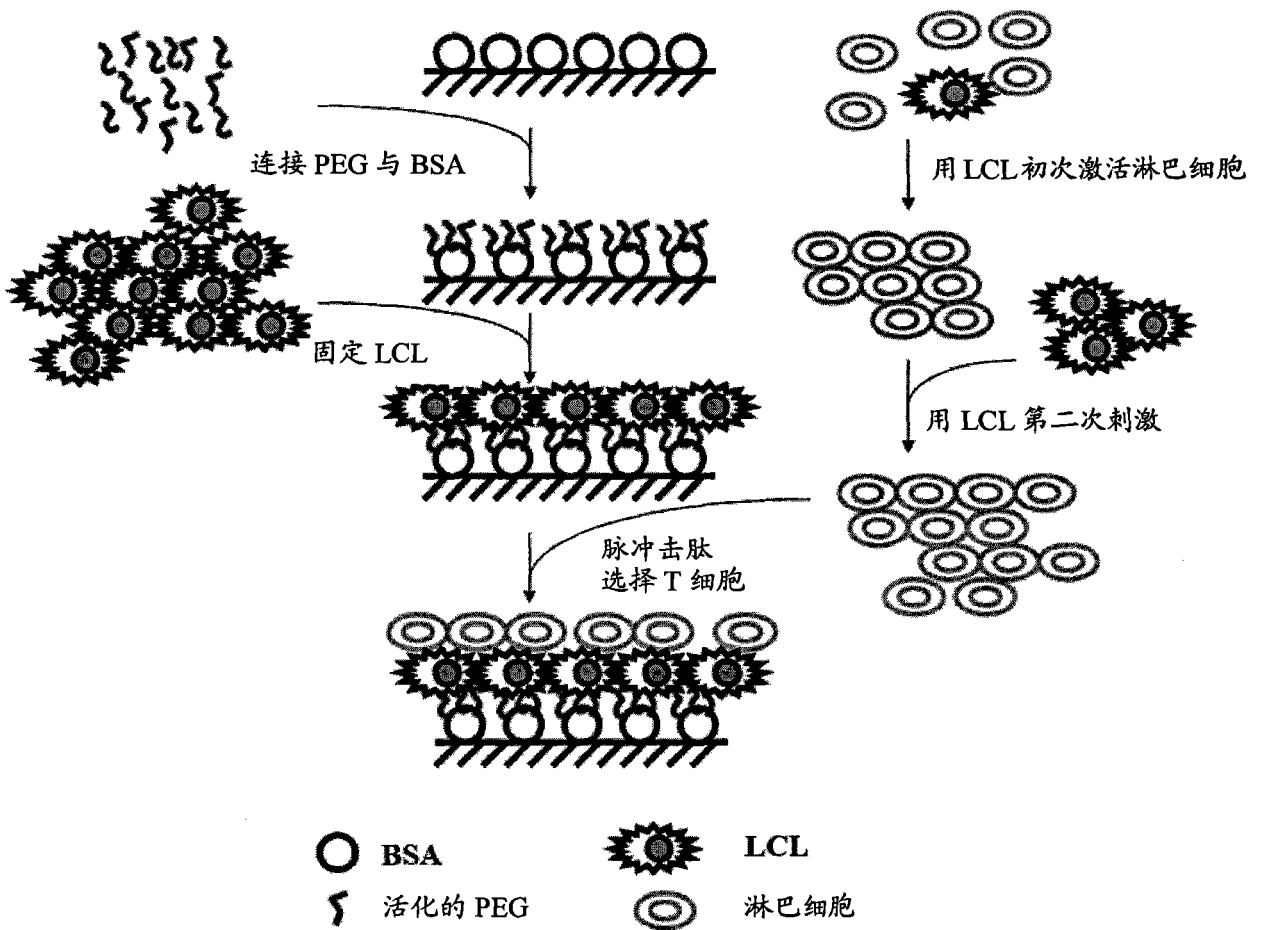


图 6

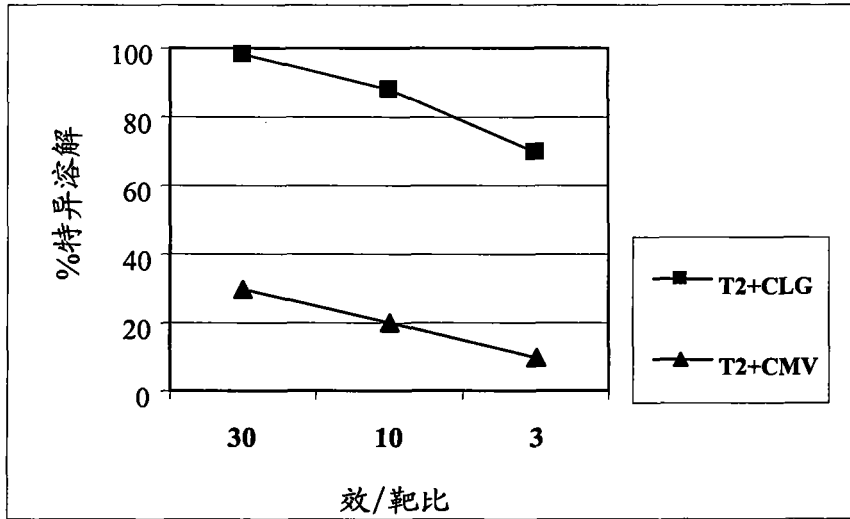


图 7

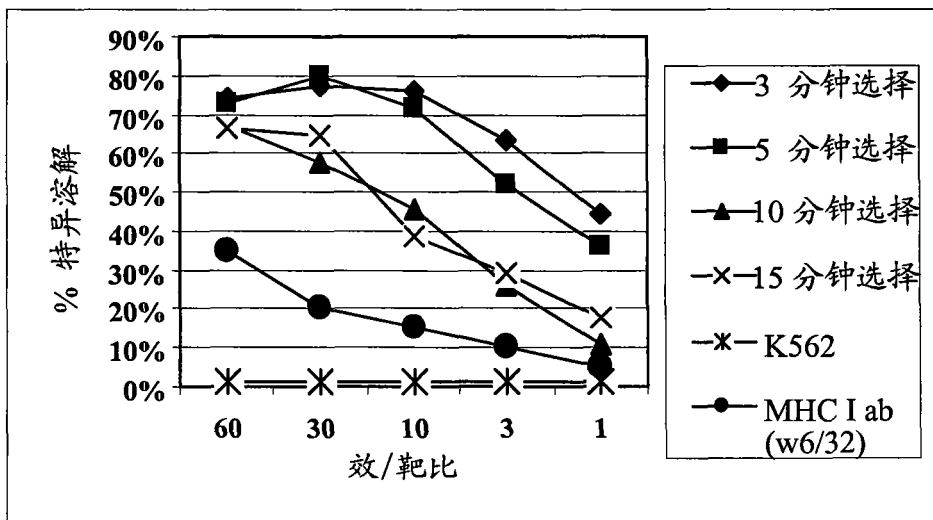


图 8

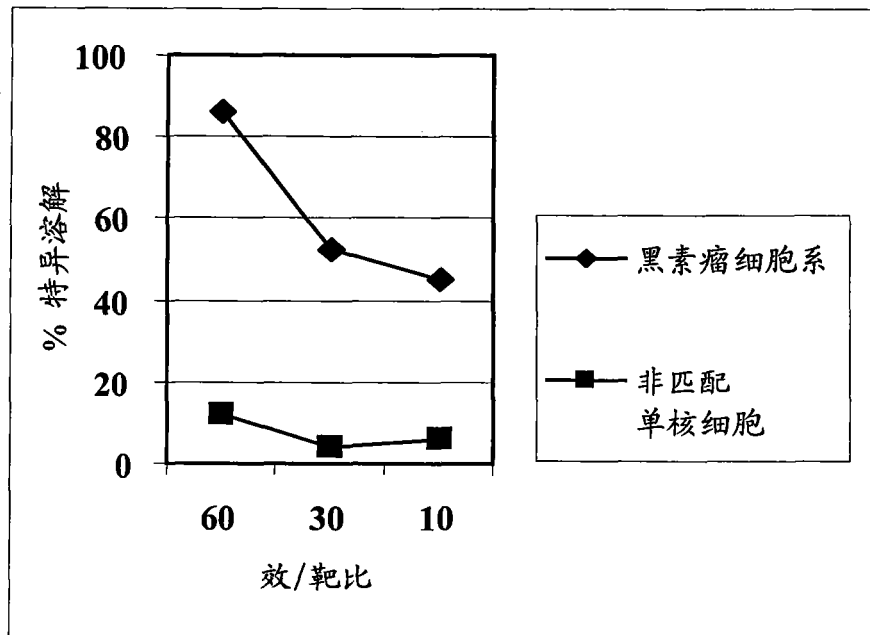


图 9

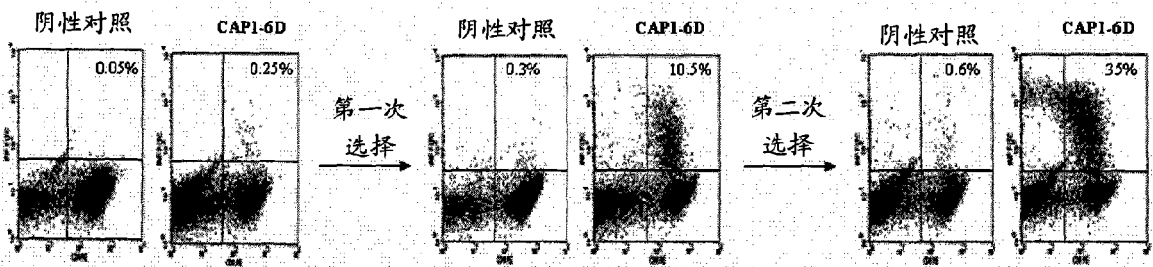


图 10

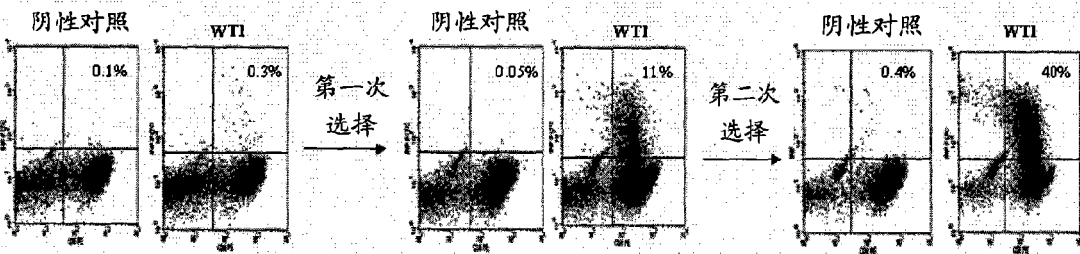


图 11

专利名称(译)	用于抗原特异性T细胞纯化的固相T细胞选择		
公开(公告)号	<a href="#">CN101182509A</a>	公开(公告)日	2008-05-21
申请号	CN200710170321.6	申请日	2007-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	李炯明		
申请(专利权)人(译)	李炯明		
当前申请(专利权)人(译)	李炯明		
[标]发明人	李炯明		
发明人	李炯明		
IPC分类号	C12N11/06 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 C12N2533/12 C12N5/0087 C12N2533/40		
代理人(译)	韩克飞		
优先权	60/858287 2006-11-10 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于抗原特异性T细胞纯化的固相T细胞选择。本发明的方面涉及将细胞与基层结合的方法、将靶T细胞从T细胞群中除去的方法、将同种反应性T细胞从诸如骨髓或干细胞移植细胞的样品中清除的方法以及测量样品中抗原特异性T细胞的频率的方法。

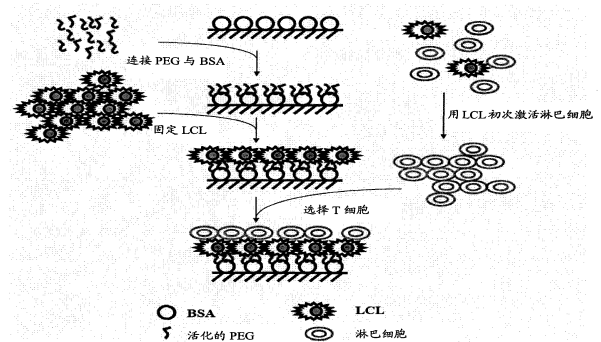


图 1