



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105358984 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201480028069. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 14

G01N 33/567(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

61/800, 891 2013. 03. 15 US

C12Q 1/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029691 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/145047 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 普罗格诺西斯生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州圣地亚哥

(72) 发明人 约翰·安德鲁·阿尔金 马克·S·朱

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理

有限公司 11129

代理人 吴泳历

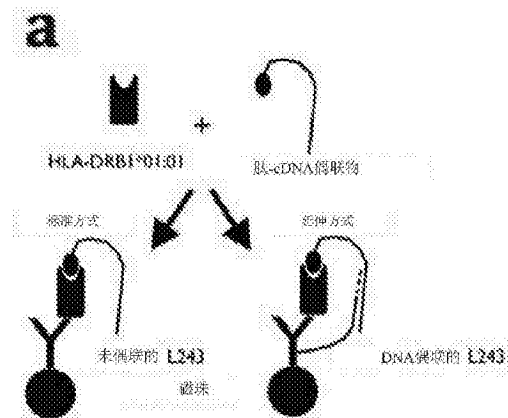
权利要求书2页 说明书30页 附图6页

(54) 发明名称

用于检测肽 /MHC/TCR 结合的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于检测肽与 MHC 分子结合以及肽 :MHC 复合物与 TCR 结合的组合物和方法。在优选的实施例中,所述组合物和方法是以高度倍增的方式进行。可以用本发明公开的所述组合物和方法提供肽与 MHC 分子结合的直接信息。本发明还提供了用于同时检测大量的结合至 MHC 分子和 / 或 T 细胞的肽的方法。还公开了用于检测大量的肽与 MHC 分子和 / 或 T 细胞竞争性结合的方法。本发明还提供了用于同时检测大量的特异性 TCRs 的方法。本发明所述的组合物和方法可用于疫苗设计,研究和监控自身免疫疾病和传染病,治疗的免疫原性检测以及组织分型。



1. 一种与多聚核苷酸偶联的 MHC- 结合肽。
2. 含有至少两个 MHC- 结合肽的, 且每条均与多聚核苷酸偶联的库, 其中用特异性结合所述多聚核苷酸的探针识别每条所述的多聚核苷酸。
3. 包含至少两条 MHC- 结合肽, 且每条均与多聚核苷酸偶联的组合物, 其中所述至少两条 MHC- 结合肽是多聚化的或寡聚化的。
4. 根据权利要求 3 所述的组合物, 其中所述至少两条 MHC- 结合肽与相同的多聚核苷酸偶联且因此被多聚化或寡聚化。
5. 根据权利要求 3 所述的组合物, 其中所述至少两条 MHC- 结合肽每条分别与多聚核苷酸偶联, 其中所述多聚核苷酸介导所述至少两条 MHC- 结合肽的多聚化或寡聚化。
6. 根据权利要求 5 所述的组合物, 其中所述介导通过核苷酸序列互补进行。
7. 用于检测肽与 MHC 分子结合的方法, 包括: 用多聚核苷酸-肽偶联物接触所述 MHC 分子, 所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;
用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触所述多聚核苷酸-肽偶联物;
检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合; 并
使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽和所述 MHC 分子的结合相互关联。
8. 用于同时检测肽库的肽与 MHC 分子结合的方法, 包括:
将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽, 所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;
用所述多聚核苷酸-肽偶联物库接触所述 MHC 分子;
用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触每个多聚核苷酸-肽偶联物;
检测所述探针与每个与所述探针特异性结合的相应的多聚核苷酸的结合; 并
使所述探针和每个相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和所述 MHC 分子的结合相互关联。
9. 用于在肽库中检测每条所述的肽与 MHC 分子竞争性结合的方法, 包括:
将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述肽, 所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;
用所述多聚核苷酸-肽偶联物的库接触所述 MHC 分子;
用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物;
检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合; 并
使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽与所述 MHC 分子的结合相互关联,
其中所述肽与所述 MHC 分子竞争性结合。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法, 进一步包括在所述肽库的肽中, 对比每条所述的肽与所述 MHC 分子的结合。
11. 检测肽与 TCR 结合的方法, 包括: 用 MHC 分子和多聚核苷酸-肽偶联物与所述 TCR 接触; 所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;
用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触所述多聚核苷酸-肽偶联物;
检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合; 并
使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽和所述 TCR 的结合相互关联。

12. 用于同时检测肽库与 TCR 结合的方法,包括:

将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;

用所述多聚核苷酸-肽偶联物池和 MHC 分子接触所述 TCR;

用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针与所述多聚核苷酸-肽偶联物接触;

检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合;并

使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽与所述 TCR 的结合相互关联。

13. 用于在肽库中检测每条所述肽与 TCR 竞争性结合的方法,包括:

将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;

用所述多聚核苷酸-肽偶联物池与 MHC 分子接触所述 TCR;

用特异性结合每条所述多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物;

检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合;并

使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和所述 TCR 的结合相互关联,

其中所述肽竞争性地结合所述 MHC 分子和所述 TCR。

14. 根据权利要求 11-13 任一所述的方法,其中所述 TCR 选自由 T 细胞上的 TCR、可溶的 TCR、分离的 TCR、和固定的 TCR 组成的组。

15. 根据权利要求 7-14 任一所述的方法,进一步包括用对照与检测到的所述肽与所述 MHC 分子或所述 TCR 的结合相比较。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,进一步包括为了在感染、自身免疫、过敏、或癌症中识别抗原,或为了设计疫苗,通过所述对照选择检测到的所述肽的结合。

17. 根据权利要求 7-16 任一所述的方法,其中所述多聚核苷酸和所述探针选自由 DNA, cDNA, RNA, mRNA, rRNA, tRNA, PNA, 类 DNA 分子或类 RNA 分子组成的组。

18. 根据权利要求 7-17 任一所述的方法,其中通过凝胶电泳、杂交、PCR、qPCR、或核苷酸测序检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合。

19. 根据权利要求 7-18 任一所述的方法,其中所述 MHC 分子是被固定的。

20. 根据权利要求 7-19 任一所述的方法,其中所述多聚核苷酸-肽偶联物是多聚化的或寡聚化的。

21. 以高通量方式进行的权利要求 7-20 任一所述的方法。

用于检测肽 /MHC/TCR 结合的方法

相关申请

[0001] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时专利申请 No. 61/800, 891 的优先权, 实际上其内容通过引用完全包含在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明属于免疫学领域, 且涉及免疫系统中的蛋白相互作用。具体而言, 本发明涉及肽 -MHC 相互作用以及检测其相互作用的方法和组合物。

背景技术

[0003] 免疫学从根本上关注宿主和免疫原之间的相互作用, 宿主是其免疫系统产生反应的生物体, 免疫原是该反应所针对的物质。这种相互作用的结果决定了宿主的命运: 形成致病性免疫, 肿瘤; 形成改变自身免疫原, 癌症; 形成自身免疫原, 自身免疫性; 以及形成无害的环境免疫原, 过敏。DNA 测序能力的改进为在高分辨率和宽覆盖范围探索这些不同免疫结果的遗传基础提供了工具, 可参考宿主和免疫原的基因组 (Peng et al., 2009, Curr. Opin. Microbiol. 12:432-438; Benichou et al., 2012, Immunology 135:183-191)。

[0004] 宿主和免疫原之间最重要的蛋白质界面之一是肽: 主要组织相容性 (p:MHC) 复合物, 其包括与免疫原 - 衍生肽物理结合的宿主编码的跨膜蛋白 (MHC)。该复合物提供了两个平行的抗原传递系统: (1) 细胞内途径, 其中内源蛋白质被加工成短肽, 例如, 大约 7-10 个氨基酸的肽, 且由所有的有核细胞在 MHC I 类复合体中传递; 和 (2) 内体途径, 其中被吞噬的外源蛋白被加工成大约 10-25 个氨基酸且通过专门的抗原传递细胞在 MHC II 类复合体中传递 (Germain, 1994, Cell 76:287-299)。一旦传递给这些途径之一的适应性免疫系统, 免疫原 - 衍生肽能触发高度抗原特异性应答, 例如, 细胞免疫应答对应体液免疫应答, 或免疫原反应对应致耐受性反应。

发明内容

[0005] 公开了用于检测肽 /MHC 结合的方法和组合物。本文提供了 MHC 结合肽偶联多核苷酸。在某些实施例中, 多核苷酸可以是 DNA, cDNA, RNA, mRNA, rRNA, tRNA, PNA, DNA 样分子或 RNA 样分子。

[0006] 还提供了至少两个偶联多核苷酸的 MHC- 结合肽的文库, 其中每个多核苷酸由特异性结合所述多核苷酸的探针来鉴定。在某些实施例中, 多核苷酸和探针可以是 DNA, cDNA, RNA, mRNA, rRNA, tRNA, PNA, DNA 样分子或 RNA 样分子。

[0007] 本发明提供了包含至少两个偶联多核苷酸的 MHC- 结合肽的组合物, 所述至少两个 MHC- 结合肽是多聚的或寡聚的。一方面, 至少两个 MHC- 结合肽被相同的多核苷酸偶联且因此多聚或寡聚。在其它实施例中, 至少两个 MHC- 结合肽各自偶联一个单独的多核苷酸, 其中多核苷酸介导至少两个 MHC- 结合肽的多聚化或寡聚化。在一些实施例中, 多聚化或寡聚化通过核苷酸序列的互补性来调解。

[0008] 在一个实施例中,公开了用于检测肽与 MHC 分子的结合的方法。所述方法包括:用多聚核苷酸-肽偶联物接触 MHC 分子,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用特异结合所述多聚核苷酸的探针接触所述多聚核苷酸-肽偶联物;检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合;以及,使所述探针与所述多聚核苷酸的结合和所述肽与所述 MHC 分子的结合相互关联。

[0009] 在另一个实施例中,提供了用于同时检测肽库与 MHC 分子的结合的方法。所述方法包括:将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每个所述肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸-肽偶联物池接触所述 MHC 分子;用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应多聚核苷酸的结合;以及使所述探针和每条相应多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和 MHC 分子的结合相互关联。在另一个实施例中,所述方法进一步包括对比结合,例如,在所述的肽库中的肽之间,以每条所述的肽和 MHC 分子的结合特异性和/或结合亲和性的方式进行对比结合。

[0010] 而在另一个实施例中,本发明提供了一种用于在肽库中检测每条所述的肽与 MHC 分子的竞争性结合的方法,包括:将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸-肽偶联物池接触所述 MHC 分子;用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合;以及使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和 MHC 分子的结合相互关联,其中所述肽竞争地与所述 MHC 分子结合。在另一个实施例中,所述方法进一步包括对比结合,例如,在所述的肽库中的肽之间,以每条所述的肽和 MHC 分子的结合特异性和/或结合亲和性的方式进行对比结合。

[0011] 一方面,本发明公开了一种用于检测肽与 T 细胞结合的方法,包括:用 MHC 分子和多聚核苷酸-肽偶联物接触所述 T 细胞,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触所述多聚核苷酸-肽偶联物;检测所述探针和所述多聚核苷酸的结合;以及,使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽与所述 T 细胞的结合相互关联。

[0012] 另一方面,提供了一种用于同时检测肽库与 T 细胞结合的方法。该方法包括:将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸-肽偶联物池和 MHC 分子接触所述 T 细胞;用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合;以及使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和所述 T 细胞的结合相互关联。在一个实施例中,本发明所述的肽与所述 T 细胞的 TCR 结合。

[0013] 而另一方面,本发明描述了一种用于检测肽库中每条所述的肽与 T 细胞竞争性结合的方法,包括将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸-肽偶联物池和 MHC 分子接触所述 T 细胞;用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合;以及使所述探针和每

条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和所述 T 细胞的结合相互关联,其中所述肽竞争地与所述 MHC 分子和所述 T 细胞结合。在一个实施例中,本发明所述的肽与所述 T 细胞的 TCR 结合。

[0014] 在任一实施例或其任一组合中,所述 TCR 可以是 T 细胞上的 TCR,可溶的 TCR,被分离的 TCR,和被固定的 TCR。TCR 的任何功能性片段或部分也被包含在本发明中。

[0015] 在任一实施例或其任一组合中,本发明所述的方法可以进一步包括用对照与检测到的所述肽与所述 MHC 分子、所述 T 细胞、或所述 TCR 的结合相比较。在进一步的实施例中,在任一实施例或其任一组合中所公开的本发明所述的方法进一步包括基于识别感染、自身免疫、过敏、或癌症中的抗原的目的、或基于设计疫苗的目的,通过对照选择检测到的所述肽的结合。

[0016] 在任一实施例或其任一组合中,所述多聚核苷酸和所述探针选自由 DNA、cDNA、RNA、mRNA、rRNA、tRNA、PNA、类 DNA 分子或类 RNA 分子组成的组。在任一实施例或其任一组合中,所述探针与所述多聚核苷酸的结合可以通过凝胶电泳、杂交、PCR、qPCR、或核苷酸测序检测。

[0017] 在任一实施例或其任一组合中所公开的本发明的所述方法中,所述 MHC 分子可以是固定的。在另一个实施例中,在任一所述实施例或其任一组合中所公开的本发明的所述方法中的所述多聚核苷酸-肽偶联物是多聚化的或寡聚化的。而在另一个实施例中,本发明的所述方法是以高通量的方式进行的。

[0018] 在本发明公开的任一实施例中,现有公开的方法进一步包括下述步骤的一步或多步:使所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间结合以达到平衡;在适宜的条件下洗涤所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间形成的复合物以去除未结合的或非特异性结合的多聚核苷酸-肽偶联物;使所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间的复合物分离,例如,在一个合适的时间段内;以及检测仍然结合在 MHC 分子上的多聚核苷酸-肽偶联物。

[0019] 在前述任一实施例中,可以在一种或多种阻断剂存在的情况下让所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间的复合物分离。一方面,所述一种或多种阻断剂阻止所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子结合或重新组合。在某些实施例中,所述阻断剂与所述多聚核苷酸-肽偶联物竞争结合至所述 MHC 分子。一方面,所述阻断剂与 MHC 复合物之间的结合并不产生所述多聚核苷酸-肽偶联物与所述 MHC 分子之间特异性结合的指示信号。

[0020] 在本文公开的任一实施例中,在一个或多个分子伴侣存在的情况下可能发生所述多聚核苷酸-肽偶联物与所述 MHC 分子的结合。在一些实施例中,所述分子伴侣选自由伴侣蛋白、化学伴侣、HLA-DM 及其类似物、具有与 HLA-DM 相同或相似伴侣功能的小分子、对氯苯酚 (pCP) 及其类似物、以及二甲亚砜 (DMSO) 和其类似物组成的组。

附图说明

[0021] 图 1(上半部分)表示多元肽-MHC 结合分析。在汇集的结合区域针对一组用计算机编程的肽-cDNA 偶联物测试 MHC 分子。结合上的肽通过高通量 DNA 测序鉴定,其具有的动力学范围能显示出差异竞争性的 MHC 结合剂的范围(此处说明:按顺序三角形>圆形>

方形)。

[0022] 图 1(下半部分)表示用于 T 细胞特异性检测的多元分析。将 MHC 分子与多价肽-cDNA 偶联物以及包含 T 细胞的生物样品孵育。然后将结合了肽 cDNA:MHC 复合物的 T 细胞分离并用高通量测序检测。

[0023] 图 2 表示采用汇集的“特征肽 (eigenpeptides)”来报告个体的 HLA 信息的多元肽-MHC 结合分析的使用。将 HLA 分子从具有不同 HLA 基因型的捐献者的血液中分离出来,并针对肽-cDNA 偶联物的复合物池将其进行测试。借助于 IEDB,用肽上的结合 HLA 分子的重点区域尽可能独特地 (“特征肽 (eigenpeptides)”)设计该复合物池以覆盖所有列出的人类单倍体型。结合上的肽-cDNA 偶联物的下一代测序提供关于存在的 HLA 分子的信息。在这一实施例中,两个被描述的个体共享他们 2 种 HLA 单倍体型中的一种。

[0024] 图 3a 表示一种制备肽-cDNA 池的典型方法。在计算机中设计出靶标的寡核苷酸序列,在微阵列中通过平行合成低成本地将所述序列制备出来并释放,然后将其转化至肽-cDNA 偶联物中。

[0025] 图 3b 表示蛋白酶分析。将肽-cDNA 偶联物池固定在磁珠上,用蛋白酶处理,并通过释放的 cDNA 测序来检测被蛋白酶切除后剩余的部分。

[0026] 图 4 表示肽-cDNA 偶联物与 MHC 分子的序列特异性结合。将肽-cDNA 偶联物与序列 YKTIAFDDEEARR (“YK”) (SEQ ID NO:1) 或 YPKYVKQNTLKLAT (“YP”) (SEQ ID NO:2) 孵育或单独放置 (“空白”),或者在生物素化的 HLA-DR1 (“DR1”) 或 HLA-DR3 (“DR3”) MHC 分子存在的情况下进行上述孵育。孵育之后,结合复合物在链霉亲和素磁珠上被捕获、冲洗、并洗脱。被洗脱的 DNA 通过凝胶电泳 (a) 显影,并用 qPCR (b) 进行定量。已知肽序列 YKTIAFDDEEARR (SEQ ID NO:1) 和 YPKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:2) 分别与 DR3 和 DR1 分子结合。

[0027] 图 5 表示肽-cDNA 偶联物与 MHC 分子的多重结合。通过来自 DNA 模板的体外转录和翻译制备出具有序列 YPKYVKQNTLKLAT (“YP(WT)”) (SEQ ID NO:3), YPKYVKQNTLKLAA (“YP(T14A)”) (SEQ ID NO:4) 和 YPKAVKQNTLKLAT (“YP(Y4A)”) (SEQ ID NO:5) 的肽-cDNA 偶联物。然后将上述三种肽-cDNA 偶联物与生物素标记的 HLA-DR1 (“DR1”) MHC 分子分别孵育 (“1-丛”) (“1-plex”) 或等比例混合孵育 (“3-丛”) (“3-plex”)。孵育后,在链霉亲和素磁珠上捕获结合复合物,并将其洗涤并洗脱。洗脱后的 DNA 用 qPCR 定量。肽 YPKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:3), YPKYVKQNTLKLAA (SEQ ID NO:4) 和 YPKAVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:5) 与 DR1 分子的结合分别显示出高、高和低亲和性。

[0028] 图 6 表示根据本发明特定实施例记载的用于检测特异性肽:MHC 结合的分析条件。

[0029] 图 7 表示根据本发明特定实施例记载的在多聚核苷酸-肽偶联物池中检测特异性肽:MHC 结合。

[0030] 图 8 表示根据本发明特定实施例记载的利用延伸实验检测特异性肽:MHC 结合。

发明内容

A. 定义

[0031] 除非另有规定,本文中使用的所有技术名词、符号和其它技术与科技术语或用辞意为具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同的含义。在一些实例中,具有普遍理

解的含义的术语出于清楚和 / 或便览的目的在本文中被定义, 并且本文中这种定义的内容不应当被必然地解释为表示出与本领域普遍理解的含义实质的不同。大部分本文记载或涉及的技术和工艺能被本领域技术人员很容易地理解并利用常规的方法论进行常规使用。

[0032] 出于每份出版物通过引用被个别并入的同等的目的, 所有与本申请有关的出版物, 包括专利文件、科技文献和数据库, 以及参考书目和附加文件通过引用的方式将其全部内容并入。如果本文提出的某个定义与本文通过引用被并入的专利、申请、公开的申请和其它出版物中列出的定义矛盾或不一致, 则以本文提出的定义为准。

[0033] 尽管与本文记载的相似或相同的方法或材料可以被用于实践或检验本发明, 但适当的方法与材料如下文所示。所述材料、方法和实例仅仅是说明性的, 且并不用它们来限制本发明。本发明的其它特征对于下面的详细说明和权利要求是显而易见的。在本文提供的特定实施例的下述说明中, 将结合附图进行说明, 所述附图构成说明书的一部分, 并且在所述附图中通过图解的方式说明, 在特定的实施例中可以实践本发明。可以理解的是, 可以使用其它实施例并在不脱离本发明范围的条件下做一些结构上的改动。

[0034] 所提供的实施例的实践将采用属于本领域技术的分子生物学和诸如此类的常规技术, 除非另有说明。下述文献充分说明了此类技术。参见例如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. Ausubel et al. eds., 1987 and updated); *Essential Molecular Biology* (T. Brown ed., IRL Press 1991); *Gene Expression Technology* (Goeddel ed., Academic Press 1991); *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes* (A. Bothwell et al. eds., Bartlett Publ. 1990); *Gene Transfer and Expression* (M. Kriegler, Stockton Press 1990); *Recombinant DNA Methodology* (R. Wu et al. eds., Academic Press 1989); *PCR: A Practical Approach* (M. McPherson et al., IRL Press at Oxford University Press 1991); *Cell Culture for Biochemists* (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); *Mammalian Cell Biotechnology* (M. Butler ed., 1991); *Animal Cell Culture* (J. Pollard et al. eds., Humana Press 1990); *Culture of Animal Cells*, 2nd Ed. (R. Freshney et al. eds., Alan R. Liss 1987); *Flow Cytometry and Sorting* (M. Melamed et al. eds., Wiley-Liss 1990); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Techniques in Immunocytochemistry*, (G. Bullock & P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); *Handbook of Experimental Immunology*, (D. Weir & C. Blackwell, eds.); *Cellular and Molecular Immunology* (A. Abbas et al., W. B. Saunders Co. 1991, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. Coligan et al. eds. 1991); the series *Annual Review of Immunology*; the series *Advances in Immunology*; *Oligonucleotide Synthesis* (M. Gait ed., 1984); and *Animal Cell Culture* (R. Freshney ed., IRL Press 1987).

[0035] 纵观本发明的公开内容, 本发明的很多方面是用范围的形式表示的。应当被理解的是, 范围形式的说明内容仅仅是出于方便和简洁的目的, 并且不应当被理解为发明内容的僵化限定。因此, 范围的说明应当被认为具体地公开了该范围内所有可能的亚范围和个体数值。例如, 如 1-6 的范围的说明应当被认为具体地公开了如 1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6

等亚范围,以及该范围内的个体数值,如,1、2、3、4、5 和 6。这适用于不考虑范围宽度的情况。

[0036] 如本文所使用的,“一”或“一个”表示“至少一个”或“一个或多个”。

[0037] “个体”表示任何活的生物,包括人类和其它哺乳动物。

[0038] 用“受试者”表示某种有机体,所述生物体是所提供的组合物、方法、试剂盒和装置的施用对象。在一个实施例中,所述受试者是哺乳动物或细胞、组织、器官或哺乳动物的一部分。哺乳动物包括,但不限于,人类、和非人类动物,包括家畜、运动动物、啮齿动物和宠物。

[0039] 如本文所使用的,“组合物”指两种或多种产物或化合物的任意混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊状物、水性的、非水性的或其任意组合。

[0040] “多聚核苷酸”指任意长度的核苷酸的聚合形式,不是核糖核苷酸就是脱氧核糖核苷酸,或其类似物。该术语指该分子的初级结构,因此包括双链和单链 DNA,以及双链和单链 RNA。它还包括修饰的多聚核苷酸,比如甲基化的和 / 或帽子结构的多聚核苷酸。

[0041] 术语“核酸”和“核酸序列”指寡核苷酸,核苷酸、多聚核苷酸、和上述任意物质的片段,包括基因组来源或合成来源的,可以是单链或双链的,并且可以代表正义链或反义链的 DNA 或 RNA (例如, mRNA、rRNA、tRNA),或指肽核酸 (PNA)、或指任何天然来源或合成来源的类 DNA 或类 RNA 的物质。该术语包含核酸,即,寡核苷酸,包括天然核苷酸的已知的类似物、天然存在的核酸、合成的核酸、以及重组的核酸。

[0042] 适用于多聚核苷酸的“重组子”,表示该多聚核苷酸是经克隆、酶切和 / 或连接步骤,以及可导致其结构不同于自然发现的多聚核苷酸的其它程序的多种组合的产物。

[0043] 如本文所使用的,“基本纯”(“substantially pure”)表示充分均匀到看似不含易被检测到的杂质,所述杂质经本领域技术人员用来检测这种纯度的分析的标准方法测定,例如薄层色谱法 (TLC)、凝胶电泳和高效液相色谱 (HPLC),或者达到进一步纯化程度的基本纯将不再可检测地改变其物理和化学性质,例如物质的酶活性和生物活性。

[0044] 用于纯化化合物以制备基本化学纯的化合物的方法是本领域技术人员熟知的。然而,基本化学纯的化合物可以是立体异构物或异构体的混合物。在这样的实例中,进一步纯化可以增加所述化合物的具体活性。

[0045] 如本文所使用的,“生物活性”指化合物的体内活性或在体内施用化合物、组合物或其它混合物产生的生理反应。因此生物活性包含这种化合物、组合物和混合物的治疗效果和药学活性。可以在被设计用于检测或使用这种活性的体外系统中观察生物活性。

[0046] 如本文所使用的,“经重组方式的制备”指使用了重组核酸方法的制备方法,该重组核酸方法依赖于用于表达被克隆核酸编码的蛋白的分子生物学的知名方法。

[0047] 如本文所使用的,与产物“基本相同”表示与产物充分相似以至于其有利的性质基本上未改变,从而使该基本相同的产物能被用于代替产物。

[0048] 如本文所使用的,“等同”,在指核酸的两条序列时,表示所讨论的两条序列编码相同序列的氨基酸或相同的蛋白。它还包含在适度条件下,优选高严格度条件下杂交的那些,借以所编码的蛋白保持所需的性质。

[0049] 如本文所使用的,当“等同”被用于指两条蛋白或肽时,它表示所述的两条蛋白或肽具有基本相同的仅有氨基酸保守性置换的氨基酸序列,所述氨基酸保守性置换基本不改

变所述蛋白或肽的一种或多种活性或功能。当“等同”指性质时,所述性质不需要表现出相同的程度(例如,两条肽能表现出同一类型酶活性的不同比率),但所述活性优选是基本相同的。“互补”,当指两个核酸分子时,表示所述核酸的两条序列能够杂交,优选低于 25%,更优选低于 15%,更为优选低于 5%的错配出现在相对的核苷酸之间,最优选不出现错配。优选地,所述两个核酸分子在高严格度的条件下杂交。

[0050] 如本文所使用的:决定错配百分比的“杂交严格度”如下:1) 高严格度:0.1×SSPE, 0.1% SDS, 65℃;2) 中严格度:0.2×SSPE, 0.1% SDS, 50℃(也称为适当严格度);和 3) 低严格度:1.0×SSPE, 0.1% SDS, 50℃。可以理解的是使用替代的缓冲液、盐和温度可以实现等同的严格度。

[0051] 术语“基本”同一或同源或相似因相关领域技术人员所理解的内容而异,一般指至少 70%,优先指至少 80%,更优选指至少 90%,最优选指至少 95%的同一性。

[0052] 可替换地使用术语“多肽”、“肽”、和“蛋白”表示任意长度的氨基酸的聚合体。这些术语还包括经包括糖基化、乙酰化和磷酸化在内的反应的翻译后修饰的蛋白。

[0053] 如本文所使用的,“其片段”“其区域”和“其部分”指基本保留了全长多肽的至少一种功能的片段、区域和部分。

[0054] 本文可替换地使用术语“模拟物”、“肽模拟物”和“类肽物”,这些术语一般指模拟选定的天然肽或蛋白功能域(如,结合域,包括但不限于, MHC 分子或其特异性结合某种肽的部分或区域)的三级结合结构或活性的肽、部分肽或非肽分子。

[0055] 肽模拟物包括重组的和化学修饰的肽及非肽试剂。在知道所提供的肽:MHC 复合物和其肽的结合与结构特征的情况下,本领域技术人员能设计出具有等同或基本等同的结构和/或功能的类肽物,例如,与给定的分子或复合物相比具有相同、大约相同、较高、或较低结合亲和性。所述模拟物包括那些完全由合成的、非天然的氨基酸类似物组成的物质,和由天然肽氨基酸和氨基酸非天然类似物组成的嵌合分子。所述模拟物进一步包括具有氨基酸保守性置换的多肽,只要这种置换也基本不改变所述模拟物的结构和/或活性。

[0056] 本文提供的多肽和肽,以及用在所提供的复合物、组合物、组合和方法中的多肽和肽,可以包括“模拟物”(“类肽物”)形式。

[0057] 如本文所使用的,多肽(蛋白)或多聚核苷酸(即亲本多肽或多聚核苷酸)的变体是与母体多肽的氨基酸序列或母体多聚核苷酸的核酸序列相比,分别在氨基酸序列或核酸序列中包含了一个或多个修改的蛋白或多聚核苷酸。序列的修改包括替换,包括与所述有利的多肽或多聚核苷酸相比,进行保守性置换、删除、添加和插入。氨基酸“保守性”置换是与所述母体多肽的相应氨基酸相比发生具有相似结构或相似化学性质的氨基酸的替换。氨基酸非保守性置换是氨基酸的电荷、疏水性和/或大小实质性改变的情况下发生的替换。典型地,变体多肽具有至少 75%的序列同一性,优选地至少 80%、85%、90%、95%、或 95%的序列同一性,例如在一段 40 或更多,例如 60、80、100 或更多的连续氨基酸上至少 85%、90%或 95%的氨基酸同一性(“高度同源性(hard homology)”)。

[0058] 多肽的变体可以通过常规手段获得,包括编码该多肽的 DNA 的随机突变或定位突变。然后利用常规技术将生成的 DNA 片段克隆至适合表达的宿主中,例如 E. coli 或哺乳动物细胞,并检测保留了所需活性的克隆子。术语“变体”还包括自然产生的等位变异体。

[0059] “衍生物”指经基本序列的修饰的,例如与其它化学基团或蛋白基团联接或复合

或本领域熟知的翻译后修饰技术,衍生自母体多聚核苷酸或多肽的多肽或多聚核苷酸。这种衍生物包括多肽或其变体的氨基酸删除和 / 或添加,其中所述衍生物保持基本蛋白的活性。

[0060] 其它衍生物包括侧链修饰,非天然氨基酸的并入和 / 或在肽、多肽或蛋白合成期间和使用交联剂期间的它们的衍生物。

B. MHC、MHC 结合肽、和它们对于疾病的影响

i. MHC

[0061] 如本文所使用的,术语“主要组织相容性复合体”和缩写“MHC”表示在所有脊椎动物中发现的基因的复合物,所述基因在正常免疫反应中通过结合肽在淋巴细胞和抗原呈递细胞之间起信号功能,并通过 T 细胞受体 (TCRs) 将它们呈递为可能的识别功能。在细胞内的天然装置中, MHC 分子可以在细胞内处理结构内结合肽并将这些肽呈递到抗原呈递细胞的表面至 T 细胞的表面。

[0062] MHC 蛋白通常被分为两类: I 类 MHC 蛋白和 II 类 MHC 蛋白。如本文所使用的,术语“ I 类 MHC”或“ I 类”指 I 类主要组织相容性复合体蛋白、结合肽、或基因,而术语“ II 类 MHC”或“ II 类”指 II 类主要组织相容性复合体蛋白、结合肽、或基因。人类的 MHC 区域,也被称为 HLA,在六号染色体上被发现,并包括 I 类基因区域和 II 类基因区域。 I 类 MHC 基因区域包括 I 类 α 基因 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。 II 类 MHC 区域包括 II 类 α 链和 β 链基因的 DP、DQ 和 DR 亚区域 (即, DP α 、DP β 、DQ α 、DQ β 、DR α 、和 DR β)。

[0063] I 类 MHC 蛋白是一类包含糖蛋白重链 (α 链) 的整合膜蛋白,所述糖蛋白重链具有三个胞外区 (即, $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$),一个跨膜区,和一个胞浆区。 I 类 MHC α 链 (或 I 类重链) 可以是任何天然存在的多肽,或人工突变的 α 链基因编码的多肽,该多肽至少与 I 类 MHC α 基因 (如 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 基因) 产物的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域实质对应。当 I 类 MHC α 链保持生物活性时可以省略跨膜区和胞浆区。 I 类 MHC α 链可以是 $\alpha 2$ 区域经或不经普通糖基化的任意变体,或 I 类 α 基因的任意等位变异体,以及任何等同物,包括合成或重组产生的,例如对天然存在的变体进行定点突变产生的等同物。 I 类 MHC 分子可以是 I 类 MHC α 链与可溶的被称为 β_2 -微球蛋白链 (也叫 I 类轻链、或 I 类 β 链) 的亚基共价或非共价结合而成的复合物。 I 类 β 链可以是任何天然存在的多肽,或人工突变的 β_2 -微球蛋白基因编码的多肽,该多肽至少与 β_2 -微球蛋白基因的产物实质对应。 I 类 β 链可以是 β_2 -微球蛋白的任何等位变异体,以及任何等同物,包括合成或重组产生的,例如,通过对天然存在的变体定点突变产生的。

[0064] II 类 MHC 蛋白是一类包含一条 α 链和一条 β 链的异二聚体整合膜蛋白。所述 α 链具有两个胞外区 (即, $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$),一个跨膜区,和一个胞浆区。 β 链包含两个胞外区 (即, $\beta 1$ 和 $\beta 2$),一个跨膜区,和一个胞浆区。 II 类 MHC α 链 (或 II 类重链) 可以是任何天然存在的多肽,或人工突变的基因编码的多肽,该多肽至少与 II 类 MHC α 基因的产物的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 胞外区实质对应。当 II 类 MHC α 链保持生物活性时可以省略跨膜区和胞浆区。 II 类 MHC α 链可以是 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域经或不经普通糖基化的任意变体,或 II 类 α 基因的任意等位变异体,以及任何等同物,包括合成或重组产生的,例如对天然存在的变体进行定点突变产生的等同物。 II 类 MHC 分子可以是 II 类 MHC α 链和 II 类 MHC β 链 (也叫 II 类轻链、或 II 类 β 链) 的共价或非共价结合而成的复合物。 II 类 β 链可以是任何天然存在

的多肽,或人工突变的 II 类 β 基因编码的多肽,该多肽至少与 II 类 MHC β 基因的产物的 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 胞外区实质对应。当 II 类 MHC β 链保持生物活性时可以省略跨膜区和胞浆区。II 类 MHC β 链可以是 $\beta 1$ 区域经或不经普通糖基化的任意变体,或 II 类 β 基因的任意等位变异体,以及任何等同物,包括合成或重组产生的,例如,对天然存在的变体进行定点突变产生的等同物。

[0065] 大多哺乳动物 MHC 分子,包括人类 MHC 分子是本领域熟知的。在不被任何理论限制的情况下,本发明可以采用任何 I 类或 II 类 MHC 分子。

[0066] 术语“MHC-肽复合物”、“MHC-肽分子”、“肽-MHC 复合物”和“肽-MHC 分子”可以被互换地使用。形成肽结合槽且该肽结合槽结合了肽的 MHC 蛋白的任何部分可以做为本发明的肽-MHC 复合物。术语 MHC 分子的“结合位点”、“结合槽”和“结合域”可以被互换地使用,除非另有说明。本领域熟知,I 类和 II 类分子的区域结构形成抗原结合位点、或肽结合槽。肽结合槽指 MHC 蛋白形成肽可结合的空穴的部分。根据本发明,MHC 链的“部分”指 MHC 链上足以形成与 MHC 蛋白另一条链上的充足部分相连的肽结合槽的任意部分。肽结合槽的构造在结合抗原肽时能被改变,从而使对 T 细胞受体 (TCR) 重要的与 MHC 蛋白和 / 或肽结合的氨基酸残基能够适当排列。

[0067] I 类 MHC 结合域 (或结合槽) 主要由 I 类 MHC α 链的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域组成。在优选的实施例中,I 类 MHC 结合域包括 α 链和 β_2 -微球蛋白的可以起到稳定 I 类 MHC 分子总体结构的作用的 $\alpha 3$ 区域。I 类 MHC 结合域还可以被定义为 I 类 MHC 分子的胞外区。在某些方面,当保持生物活性时胞外区的部分可以被省略。对于大多数 I 类 MHC 分子来说,在缺少肽时 α 和 β 链可能产生相互作用。然而,在所述结合槽装满肽之前,I 类 MHC 的所述两条链复合物本身就是不稳定的。

[0068] II 类蛋白的肽结合槽包括 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 区域的部分。在一个实施例中,II 类 MHC 结合域最低程度地包括 $\alpha 2$ 和 $\beta 2$ 区域,它们被认为是稳定了所述 MHC 结合槽的总体结构。II 类 MHC 结合域还被定义为 II 类 MHC 分子的胞外区。在某些方面,当保持生物活性时可以省略所述胞外区的部分。

[0069] 在某些方面,本文提供了一种的可溶的 MHC 蛋白,其包括适于形成肽结合槽的 MHC 链任意部分,包括 MHC 链的胞外区的任一适宜部分。可溶的 MHC 蛋白缺少能将分子锚定入含脂底物中的氨基酸序列,例如 MHC 跨膜区和 / 或 MHC 胞浆区。

ii. MHC 结合蛋白、和 MHC 结合蛋白库 / 池

[0070] 本发明的 MHC 结合肽 (如,抗原肽或 T 细胞抗原表位) 可以包含能结合至 MHC 蛋白的任意肽。在优选的实施例中,所述肽以肽-MHC 复合物结合至 TCR 的方式与 MHC 蛋白结合。在更优选的实施例中,所述肽-MHC 复合物,在结合 TCR 时,引导 T 细胞应答。本发明的所述 MHC 结合肽可以是 I 类 MHC 结合肽和 / 或 II 类 MHC 结合肽。I 类 MHC 结合肽可以是能够在由特定 I 类 MHC 分子组成的结合槽中进行选择性结合以形成 I 类 MHC-肽复合物的多肽。I 类 MHC 结合肽具有典型的 8-10 个氨基酸残基长度,还可以更长或更短并保持活性。II 类 MHC 结合肽可以是能够在由特定 II 类 MHC 分子的 α 和 β 链组成的结合槽中进行选择性结合以形成 II 类 MHC-肽复合物的多肽。II 类 MHC 结合肽的典型长度为 10-25 个氨基酸残基,更典型的长度是 13-18 个氨基酸残基,还可以更长或更短并保持活性。在某些实施例中,MHC 结合肽 (包括 I 类 MHC 结合肽和 II 类 MHC 结合肽) 可以是自身肽和非自身肽

(self or non-self peptide),或合成肽。在某些方面,MHC 结合肽可以被加工,例如,被抗原呈递细胞(APC)加工。在另一些方面,在与本发明的MHC分子接触之前,MHC结合肽不被细胞加工。

[0071] 本文提供了候选的MHC结合肽,每一个被制备成用于结合MHC分子和/或结合TCR的候选物。同样地,“候选的MHC结合肽”、“候选的抗原肽”和“MHC结合肽”可以被互换地使用。与MHC分子结合并与MHC分子共同被TCR识别的MHC结合肽,被认为是抗原肽。

[0072] 在细胞中,I类MHC蛋白典型地呈递来自细胞质中主动合成的蛋白的抗原肽。相比而言,II类MHC蛋白典型地呈递来自进入胞吞途径的外源蛋白或来自ER中合成的蛋白的抗原肽。细胞内转运允许抗原肽与MHC蛋白有关。所产生的MHC肽复合物然后转移至可与TCR发生相互作用的细胞表面。然而,可以通过本领域技术人员熟知的任何适当的方法获得或制备本发明所述的候选的MHC结合肽。在某些实施例中,所述候选的MHC结合肽可以是水解产生的肽。在其他实施例中,所述候选的MHC结合肽是合成产生的肽,包括随机产生的肽,特别设计的肽,以及在一些肽中至少一些氨基酸位置是受保护的而其它位置是随机的肽。

[0073] 肽与MHC肽结合槽的结合可以控制被TCR所识别的MHC和/或肽氨基酸残基的空间排列。在利用本发明的方法识别MHC结合肽时,能测定肽和MHC分子是如何结合的。例如,可以测定通常保持不变的肽主要的MHC锚定氨基酸。另一方面,还可以测定在不同的肽中有所不同的表面裸露的氨基酸。在一个实施例中,MHC结合肽的长度为约5至约40个氨基酸残基,优选为约6至约30个氨基酸残基,更优选为约8至约20个氨基酸残基,进一步更优选为约9至约11个氨基酸残基,包括长度为5至40个氨基酸的以整数(即,5,6,7,8,9...40)增加的任何大小的肽。当天然的II类MHC结合肽为9-40个氨基酸时,在近乎所有的实例中,在不丧失MHC结合活性或T细胞识别作用的条件下,所述肽可被缩短成一个约9-11个氨基酸的核心。不受限于任何理论,本发明的MHC结合肽包含在本发明或其任何组合的任何实施例中公开的肽中。

[0074] 本发明使用的肽可包括包含了抗原的至少某一部分的肽,所述抗原选自自身抗原、传染原、毒素、过敏原、或其混合物组成的组。但是,本发明一方面是使用合成的肽在一定的特异性和/或亲和性的范围内去识别结合了特定MHC的肽,以及在一定的特异性和/或亲和性的范围内去鉴别由特异性T细胞识别的抗原。因此,优选的肽来自合成的肽库,包括但不限于,通过PCR(包括在模板肽的各个位点引入随机突变)制备的肽库。肽库(在本文中可与“肽池”互换地使用)可以包括至少2、多达约5、约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、以及约90条肽。在其它实施例中,肽库包括多达约 1×10^2 、约 2×10^2 、约 3×10^2 、约 4×10^2 、约 5×10^2 、约 6×10^2 、约 7×10^2 、约 8×10^2 、约 9×10^2 、约 1×10^3 、约 2×10^3 、约 3×10^3 、约 4×10^3 、约 5×10^3 、约 6×10^3 、约 7×10^3 、约 8×10^3 、约 9×10^3 、以及约 1×10^4 条肽。在不受任何理论限制的条件下,本发明的肽库可以包括多达约 1×10^4 、约 2×10^4 、约 3×10^4 、约 4×10^4 、约 5×10^4 、约 6×10^4 、约 7×10^4 、约 8×10^4 、约 9×10^4 、或约 1×10^5 条肽。在某些实施例中,本发明的肽库可以包括多于 1×10^5 条肽。在一些实例中,T细胞识别仅受一些位于肽核心区的氨基酸控制,并且在这些实例中,具有数百条至数千条肽的肽库足以识别功能性的肽-MHC复合物。

[0075] 公众能够获得关于肽与MHC复合物结合的广博的知识,以至于为了某个给定的

MHC 复合物,他可以设计在少于所有可用位点中变化的 MHC 槽结合肽。例如, MHCBN 是从公开的文献和现有数据库中汇编的主要组织相容性复合体 (MHC) 结合肽和非结合肽的综合数据库。该数据库具有 (a) 肽的源蛋白和 (b) MHC 分子的序列和结构数据。MHCBN 具有一些网络工具,包括:(i) 基于查询序列的肽图谱的绘制;(ii) 在任意领域检索;(iii) 创建数据组;和 (iv) 在线数据提交 (Bhasin et al., 2003, *Bioinformatics* 19(5):665-666)。在某些实施例中, MHCBN 被用来设计一整套本发明的肽 -cDNA 偶联物 (或其它肽 - 多聚核苷酸偶联物)。在优选的实施例中,通过与所有列出的人类 HLA 分子的已知结合,用免疫表位数据库 (IEDB) 设计了一整套肽 -cDNA 偶联物 (例如 >200)。IEDB 中列出了对于 207 个 II 类人 HLA 分子的结合研究。这套“特征肽”可以被选来使每个成员尽可能有限地结合一套 HLA 分子,因而提供范围和特异性 (如图 2 所示)。可以针对分离自来自已知 HLA 类型的健康捐献者的外周血单核细胞 (PBMCs) 的 II 类 HLA 分子来检测这套肽。通过与多数 HLA 基因型结合,该分析可以鉴定一组参照肽,然后将它们做为有用的内标组,用于更复杂的肽组的研究。

[0076] 在本发明的一个实施例中,所述的 MHC 结合肽来自候选的抗原肽库,其中库里的每一条所述的肽在足以使所述肽与 MHC 分子的肽结合槽结合的某段特定的序列上包括保守氨基酸。在一个更具体的实施例中,所述 MHC 结合肽来自候选的抗原肽库,其中库里的每一条所述的肽在足以使所述肽与 MHC 分子的肽结合槽结合的某段特定的序列上包括约 4-5 个保守氨基酸。

[0077] 在一个实施例中,通过遗传工程设计库中的候选肽 (候选的抗原肽或 MHC 结合肽),利用聚合酶链式反应 (PCR) 或任何其它适合的手段来构建编码所述肽的 DNA 片段。采用 PCR 技术,通过使用在特定三联体密码子中随机突变的寡核苷酸,所合成的片段池编码所有在这些位置上的可能的密码子组合。优选地,某些位置的氨基酸保持不变,它们是需要与 MHC 肽结合槽结合的保守氨基酸,并且不与 T 细胞受体接触。

iii. MHC 和 MHC 结合肽在疾病中的意义

[0078] 肽 -MHC 结合一般与免疫活性和 / 或无活性有关,因此它在广泛的健康状况和疾病中具有重要意义,包括但不限于,炎症、过敏症、自身免疫病、各类癌症、和感染 (病毒或细菌)。免疫抑制,例如癌症,相关的生病患者,可以受益于消除免疫抑制和 / 或提高肿瘤特异性免疫反应的应对策略。一方面,所述癌症是肾上腺癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、胆囊癌、神经癌、胃肠道癌、心脏肿瘤、肾癌、肝癌、肺癌、肌肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、副甲状腺癌、阴茎癌、前列腺癌、唾液腺肿瘤、皮肤癌、脾脏肿瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、或子宫癌。与此相反,具有较强的免疫活性的生病患者,如炎症、自身免疫病、过敏、和哮喘患者,可以受益于下调免疫反应的应对策略。在某些实施例中,所述自身免疫病是爱迪生氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎、白塞氏病 (Behçet's disease)、自身免疫性大疱性类天疱疮、自身免疫性心肌病、克罗恩氏病、自身免疫性慢性疲乏综合征、慢性阻塞性肺疾病 (COPD),包括慢性支气管炎、肺气肿、慢性喘息性支气管炎、自身免疫性皮炎、自身免疫性 I 型糖尿病、自身免疫性癫痫、川崎病、自身免疫性血管球性肾炎、格雷夫斯病、肺出血肾炎综合征 (Goodpasture's syndrome)、格林 - 巴利综合征、狼疮肾炎、多发性硬化、重症肌无力、自身免疫性心肌炎、自身免疫性帕金

森氏病、小儿自身免疫性神经精神障碍、自身免疫性天疱疮 / 类天疱疮、自身免疫性恶性贫血、自身免疫性结节性多动脉炎、自身免疫性多肌炎、自身免疫性原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、自身免疫性风湿热、类风湿性关节炎、自身免疫性肉状瘤病、硬皮病、干燥综合征、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性溃疡性结肠炎、自身免疫性葡萄膜炎、自身免疫性白斑病、韦氏肉芽肿病、或肝豆状核变性。

[0079] 当与参考相比时,用本发明的方法鉴别的肽可以具有显著低于、低于、等于、约等于、高于、或显著高于 MHC 分子的结合亲和性和 / 结合特异性。所述参考可以是在一个对照的正常受试者中,或在一个患者对照的正常组织或细胞中,或在一群这样的对照的正常受试者或对照的正常组织或细胞中检测的结合特定 MHC 分子的结合亲和性和 / 或结合特异性。根据患者的需求,用本发明方法鉴别的所述肽可以被用于提高、抑制、或调节患者的免疫反应。

[0080] 肽-MHC 复合物在决定免疫结果方面的重要性也通过大规模越来越多的人类全基因组关联研究来展示,所述人类全基因组关联研究已经将基因组 HLA 位点与多样化的结果紧密联系起来,如自身免疫 (Wong and Wen, 2003, *Curr. Mol. Med.* 3:1-15; Fernando et al., 2008, *PLoS Genet.* 4:e1000024; Handunnetthi et al., 2010, *Genes Immun.* 11:99-112)、过敏 (Marsh et al., 1973, *Science* 179:691-693; Moffatt et al., 2010, *N. Engl. J. Med.* 363:1211-1221)、易感染性 (International HIV Controllers Study, 2010, *Science* 330:1551-1557) 和 药 物 反 应 (Daly et al., 2009, *Nat Genet.* 41:816-819; Chung et al., 2004, *Nature* 428:486; Hung, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102:4134-4139)。所述 MHC 的特定等位基因已经与多种疾病联系起来,包括免疫疾病,如多发性硬化 (multiple sclerosis, MS)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、寻常型天疱疮 (pemphigus vulgaris, PV)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)。有人指出,特定 MHC 蛋白在与 I 类 MHC 或 II 类 MHC 分子的复合物形式中“不正确地”识别加工过的被呈递给 T 细胞的自身肽。例如,MS 易感性与 II 类 MHC 区域,并且特定的 II 类 MHC 单倍型使得 MS 风险增加。与 HLA-DR2 单倍型 (DRB1*1501) 最为相关。已经证明 HLA-DR2 (由 DRB1*1501 基因, DRA 编码) 将人类髓磷脂基础蛋白的至少两条肽 (85-99 和 148-162 残基) 呈递给 T 细胞。MBP (85-99) 肽与纯化的 DR2 高亲和性地结合,并且 MBP (148-162) 肽的亲合性较低但明显。

[0081] 这些潜在的关联是 HLA 中存在个体内的变异是极端的事实:每种 HLA 单倍型编码 3 个 I 类复合物和 3 个 II 类复合物,这些单倍型共显性表达并代表基因组中大部分多态位点。这种变异导致总计大于 104 种不同的可能的 I 类和 II 类 HLA 分子,它们中有 ~ 12 种将出现在任何给出的个体中。这种复杂性在人口层面上提供了广泛的保护,确保了至少有一部分人口具有呈递抗原的能力,所述抗原来自给定的病原体威胁。然而,必然的结果是,在可以被呈递给 T 细胞的抗原肽的范围上存在个体内固有的非均一性,导致了免疫反应相应的非均一性。解决这种非均一性是个性化用药和本发明的重要目标。

[0082] 因为本发明提供了方法,用于理解哪些肽被给定的 MHC 分子识别,而哪些肽被受试者呈递用来引发免疫反应,所以本领域技术人员可以领会,本文公开的方法可用于多种目的,包括:(a) 为了设计疫苗而用于鉴别肽表位;(b) 用于使针对病毒、自身抗原、过敏原的特异性 T 细胞应答的鉴定和监测变得可能;(c) 用于在感染、自身免疫、过敏性反应、或癌

症中识别新的抗原；(d) 用于检测以蛋白为基础的治疗的潜在的免疫原性。

C. 多聚核苷酸 - 肽偶联物

[0083] 本发明所述的多聚核苷酸 - 肽偶联物包括本文中互换地使用的寡核苷酸或多聚核苷酸,其可以是较大的核苷酸结构,如质粒的一部分。在某些实施例中,所述多聚核苷酸可以是单独的或作为较大结构的一部分的寡核苷酸,修饰的寡核苷酸和寡核苷。所述多聚核苷酸可以是单链 DNA (ssDNA)、双链 DNA (dsDNA)、单链 RNA (ssRNA)、或双链 RNA (dsRNA)。一方面,所述多聚核苷酸部分可以是线性形式的或环形形式的,或寡核苷酸部分可以包括线性和环形片段两种。寡核苷酸的修饰包括,但不限于,3' OH 或 5' OH 基团的修饰,核苷酸碱基的修饰,糖基团的修饰,和磷酸基团的修饰。

[0084] 本发明所述多聚核苷酸 - 肽偶联物的多聚核苷酸可以包括核糖核苷酸(包含作为唯一的或主要的糖基团的核糖),脱氧核糖核苷酸(脱氧核糖作为主要的糖基团),或根据已建立的使用最先进技术修饰的糖或糖类似物可以被包括在本发明所述的多聚核苷酸中。因此,除核糖和脱氧核糖之外,所述糖基团可以是戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、果胶糖、木糖、来苏糖、和糖“类似物”环戊基。所述糖可以是吡喃糖苷形式或呋喃糖苷形式。在这些糖或糖类似物以及各自的“核苷”的制备中这类糖或类似物本质上附着于杂环基(核酸碱基),是公知的。

[0085] 在本发明所述的修饰的寡核苷酸中附着于所述糖或糖类似物基团的磷衍生物(或修饰的磷酸基团)可以是一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、烷基磷酸盐、链烷磷酸盐、磷硫酰、二硫代磷酸酯等等。上述磷酸盐类似物的制备,及它们与核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸的合并也是公知的。

[0086] 被并入本发明所述多聚核苷酸 - 肽偶联物的多聚核苷酸基团中的杂环基团、或核酸碱基可以是天然存在的主要的嘌呤和嘧啶碱基,(即如上所述的尿嘧啶或胸腺嘧啶,胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤),以及所述主要碱基的天然存在的和合成的修饰。本领域技术人员知道大量的包含各种杂环基团和各种糖基团(和糖类似物)的“合成的”非天然核苷在本领域中是可行的。

[0087] 在不受任何理论限制的情况下,如本文公开的任一实施例或其任意组合中所描述的,特异性结合本发明所述多聚核苷酸 - 肽偶联物的多聚核苷酸的探针也可以是任何天然的或修饰的多聚核苷酸或衍生物。

[0088] 可以使用各种方法将多聚核苷酸结合至候选的 MHC 结合肽。例如,如实施例 1 中所述,可以从 DNA 分子经 CoA- 介导的合成或嘌呤霉素 - 介导的合成制备得到肽 - cDNA 偶联物。每种方法可以在高复杂度的条件下进行,例如通过使用高复杂度的微阵列做为 DNA 模板来源。为此,一种方法是通过所述多聚核苷酸 - 肽偶联物的多聚化或寡聚化。本领域技术人员熟知的任何适合于本发明的方法都可以使用。例如,如实施例 2 所述,可以通过由多价衔接头介导的或经多聚核苷酸杂交的多聚化反应获得多化合价的肽 - cDNA 偶联物分子。用于多聚核苷酸 - 肽偶联物的多聚化的这些方法还可以相互配合进行,从而获得更高的有序倍增。

[0089] 另一个实施例中,使用了廉价的平行寡核苷酸合成方法。合成大量计算机设计的 DNA 模板,每个包含 T7 启动子,核糖体结合位点,用于编码 N- 和 C- 端肽标签的序列,以及用于编码定制的肽序列的可变区域。然后将这些寡核苷酸在体外转录并翻译,在这一过程中,

每条被翻译的肽变成与编码它的 RNA 共价耦合,接着被反转录成 cDNA。图 3(a) 示出了池制备工艺的示意概述,阐明了其本质上平行与可扩展特点。图 3(b) 示出了拼接了丙型肝炎病毒 (HCV) 多聚蛋白的数千条肽 -cDNA 偶联物的池的制备以及它们在分析 HCV NS3/4A 蛋白酶活性方面的作用,并且 Shiryaev et al, 2012, PLoS ONE 7(4):e35759 中记载了更多细节。

[0090] 在优选的实施例中,本发明所述的多聚核苷酸 - 肽偶联物在接触 MHC 分子之前不与任何表面、薄膜、等结合、复合、或连接、也不固定在任何表面、薄膜等上面。例如,一方面,本发明所述的多聚核苷酸 - 肽偶联物,包括多聚化的或寡聚化的偶联物,不与细胞膜或病毒颗粒结合、复合、或连接。在一个实施例中,本文公开的所述多聚核苷酸 - 肽偶联物不与噬菌体包膜蛋白结合、复合、或连接。

D. 检测肽与 MHC 分子结合的方法

[0091] 本文还提供了用于检测候选的 MHC 结合肽与 MHC 分子结合的方法。在优选的实施例中,本发明完成了对多个候选 MHC 结合肽组成的池或库与特定的 MHC 分子竞争性结合的检测。在一个实施例中,提供了一种可扩展的、多元的竞争性结合分析,该分析可以检测涵盖所有个体的 II 类 HLA 分子的大分子可定制的肽组。对于给定的 MHC 分子,同时检测多个候选 MHC 结合肽的能力,和它们与 MHC 分子结合的相对亲和性和 / 或特异性使本发明对于人类疾病的诊断、治疗、和 / 或预后尤其有用。

[0092] 一个实施例中,公开了用于检测肽与 MHC 分子的结合的方法。所述方法包括:将所述 MHC 分子与多聚核苷酸 - 肽偶联物接触,所述多聚核苷酸 - 肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;将所述多聚核苷酸 - 肽偶联物与能特异性结合至所述多聚核苷酸的探针接触;检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合;并且,使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽与所述 MHC 分子的结合相互关联。

[0093] 在另一个实施例中,提供了用于同时检测肽库与 MHC 分子的结合的方法。所述方法包括:将多聚核苷酸 - 肽偶联物提供给每个所述肽,所述多聚核苷酸 - 肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸 - 肽偶联物池接触所述 MHC 分子;用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸 - 肽偶联物;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应多聚核苷酸的结合;并且使所述探针和每条相应多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和 MHC 分子的结合相互关联。在另一个实施例中,所述方法进一步包括,在所述的肽库中的肽之间,每条所述的肽和所述 MHC 分子的对比结合。

[0094] 而在另一个实施例中,本文提供了一种用于在肽库中检测每条所述的肽与 MHC 分子的竞争性结合的方法,包括:将多聚核苷酸 - 肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸 - 肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸 - 肽偶联物池接触所述 MHC 分子;用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸 - 肽偶联物;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合;以及使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和 MHC 分子的结合相互关联,其中所述肽竞争地与所述 MHC 分子结合。在另一个实施例中,所述方法进一步包括,在所述的肽库中的肽之间,每条所述的肽和所述 MHC 分子的对比结合。

[0095] 在一个实施例中,本文公开的所述方法被用于多元肽 -MHC 结合分析。如图 1(上半部分)所示,在汇集的结合区域针对一组用计算机编程的肽 -cDNA 偶联物测试 MHC 分子。

结合上的肽通过高通量 DNA 测序鉴定,其具有的动力学范围能显示出差异竞争性的 MHC 结合剂的范围。

[0096] 在所述任一的方法实施例或其组合中, MHC 分子可以先与多聚核苷酸-肽偶联物接触,接着洗去未结合上的偶联物,然后将 MHC-偶联物复合物与所述多聚核苷酸的特异性探针接触。在另一个实施例中,多聚核苷酸-肽偶联物可以在所述混合物和 MHC 分子接触之前先与探针接触。而在另一个实施例中, MHC 分子可以与多聚核苷酸-肽偶联物和探针同时接触,并且所述多聚核苷酸-肽偶联物不需要先和所述探针接触。

[0097] 在一个实施例中,所述 MHC 分子被固定于载体上。所述载体可以是分子、微粒、组合物、或其它微观物体,所述微观物体可以与至少一种 MHC 分子直接或间接地偶联,而在优选的实施例中,可以与多种 MHC 分子直接或间接地偶联。在某些实施例中,所述载体指所述偶联物的骨架,各种分子可以附着于该骨架上。在特定的实施例中,所述载体包括水溶性多聚体,包括但不限于天然和合成的多糖,及其衍生物,例如葡聚糖和葡聚糖衍生物,淀粉及淀粉衍生物,纤维素衍生物,直链淀粉和果胶,以及某些树胶及其衍生物,例如阿拉伯胶和褐藻酸的盐类;具有适宜的反应功能的均聚物(氨基酸),例如多聚赖氨酸、多聚组氨酸或多聚鸟氨酸;天然和合成的多肽和蛋白,例如牛血清白蛋白、免疫球蛋白类、和其它哺乳动物白蛋白;和具有亲核官能团的合成的多聚体,例如聚乙烯醇、聚烯丙基醇、聚乙二醇和被取代的聚丙烯酸酯。

[0098] 在某些实施例中,所述载体是分子。在其它实施例中,所述载体是表面。所述表面可以是塑料表面,或组成硝酸纤维素膜、尼龙膜、乳胶颗粒、或金颗粒的表面。在某些实施例中,所述 MHC 分子是被纤维素化的并且所述载体被链霉亲和素修饰。可以经别的方式修饰所述 MHC 分子和所述载体用于本发明。

[0099] 在一些实施例中,所述载体是能进行生物降解的,所述载体是不产生免疫性的,所述载体具有净中性电荷或净负电荷,和/或所述载体是被荧光标记的。所述载体可以共价地或非共价地结合于表面,例如塑料表面,或组成硝酸纤维素膜、尼龙膜、乳胶颗粒、或金颗粒的表面。在一些实施例中,所述载体是大体上为球形的磁珠或多孔磁珠。在某些实施例中所述载体是磁珠,所述磁珠优选地包括选自自由玻璃、硅、羟基羧酸的聚酯、二羧酸的聚酐、或羟基羧酸和二羧酸的共聚物组成的组的物质。在一些实施例中,所述载体为分支的多聚体,例如树状聚物。在优选的实施例中,当所述载体为树状聚物时,所述树状聚物包括选自自由聚乙二胺、聚酰氨基醇、聚亚烷基亚胺、聚亚烷基、聚醚、聚硫醚、聚磷、聚硅氧烷、聚酰胺和聚芳基聚合物组成的组的物质。

[0100] 在一些实施例中,所述 MHC 分子/载体复合物进一步包括接头。接头可以是能够在其它分子之间建立共价连接的双功能分子。适于做为接头的双功能分子的实例包括但不限于戊二醛、碳二亚胺、N,N'-苯二马来酰亚胺、N-琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶)丙酸盐、对苯醌、二乙烯砜(DVS)和环氧化为衍生物例如环氧氯丙烷和在通过引用并入本文的美国专利申请 6,627,460 中记载的其它环氧化物衍生物。优选地,连接元件在水环境中应当是稳定的。在一些实施例中,所述 MHC 分子/载体复合物进一步包括间隔物。间隔物可以是具有多个可供其它元件共价附着的位点的蛋白或多肽。尽管不是本发明实施所必需,但间隔物可以提供增加能附着于所述偶联物的钴啉醇酰胺基团数量的合适的方式,从而增加这种偶联物在各种分析中使用时的灵敏度。蛋白间隔物的实例包括但不限于牛血清白蛋白、卵白

蛋白、球蛋白等。多肽间隔物的实例包括但不限于同聚多肽,例如多聚赖氨酸、多聚组氨酸、多聚鸟氨酸等。如本领域技术人员所明了的,间隔物的选择依赖于所使用的 MHC 分子,所使用的载体,以及所使用的连接元件。在某些方面,间隔物元件可以是多糖或多聚核酸。在制备水溶性中间偶联物之前可能需要对这些多聚体进行化学修饰。

[0101] 在优选的实施例中,带有唯一的多聚核苷酸标签(如, DNA- 标签)的肽库可以检测出很多用于单反应中的结合的肽,并通过高通量测序报告这些肽。该基于分析方法的多聚核苷酸-偶联物具有如下优势:

[0102] (a) 特定的内容。所选择的以生物信息学方式限定的多聚核苷酸序列在阵列中以平行合成的方式制备,然后将其转化成相应的 cDNA-肽偶联物。可以很容易编排该系统以显示来自任何所选择的免疫原的肽。例如,本发明的发明人已经用 1 个氨基酸的阶梯分辨率合成并证实了覆盖 3011 个氨基酸 HCV 蛋白质组的蛋白酶测定集合(Kozlov et al., 2012, PLoS One 7:e37441)。

[0103] (b) 固有的竞争性的倍增。蛋白酶体(I类)和内体(II类)的蛋白水解过程导致复杂的肽环境,并且本发明的发明人在 MHC 结合方面利用了肽-肽竞争。在一个实施例中,在可能存在肽内竞争的情况下,本发明提供了一种生物学相关的方法增加了肽-MHC 结合分析的复杂性,所述肽-MHC 结合分析通过液相法而不是固定化肽法进行。一方面,本发明提供的方法将大量的被发现结合 MHC 分子的肽缩小至最优的结合物,例如,肽微阵列研究中公开的那些肽(Gaseitsiwe et al., 2009, Clin Vaccine Immunol. 16:567-573; Gaseitsiwe et al., 2010, Clin Vaccine Immunol. 17:168-175)。

[0104] (c) 下一代测序读数。在其它优势中,下一代测序具有高灵敏度,可以在大量的肽库中检测结合物。

[0105] 在一个实施例中,肽-cDNA 偶联物被用作 MHC 结合的多元探针。例如,在实施例 3 中,在链霉亲和素磁珠上生物素化并固定 II 类 MHC 分子 HLA-DR3 和 HLA-DR1,并且用两条已知的分别与 HLA-DR3 和 HLA-DR1 结合的肽,在不发生交叉结合的情况下,与 II 类 MHC 分子结合。包含所述的两条肽的所述肽-cDNA 偶联物经凝胶电泳和定量聚合酶链式反应测定所述偶联物中多聚核苷酸的成分。该结果反映了每个偶联物与预期的 MHC 分子结合而不是与其它 HLA-DR 家族的成员结合。在另一个实施例中,分别使用了三条已知的与 HLA-DR1 分子高亲和性、高亲和性和低亲和性地结合的肽。结果显示了,在偶联物分别出现(1-丛)(1-plex)和偶联物混合孵育并检测(3-丛)(3-plex)的两种情况下的,三种偶联物预期的结合情况。

[0106] 在一个实施例中,多个肽的肽-MHC 结合分析的倍增是利用下一代测序读数进行。例如,从甲型 H1N1 流感(influenza A)病毒中选出 45 条候选肽,根据是这 45 条肽在不同毒株中是保守的并且被预测能结合多数普通 HLA-DR 分子。制备出对应于这 45 条序列的肽-cDNA-偶联物,并将它们与重组的生物素化的 HLA-DR3 孵育。在这个实施例中,选择 HLA-DR3 做为典型的 HLA 分子,因为经测定它与 45 条肽的结合,它是一个对不同的肽具有广泛结合亲和性的分子。在不受任何理论的束缚下,可以使用其它 MHC 分子。被报道的 45 条肽与 MHC 分子的结合亲和性可以做为参考。在一个实施例中,将从这 45 条肽的多重检测和单丛检测中获取的信号与它们报道的结合亲和性相比较。一方面,本发明的所述方法提供了包括了已知的阳性结果和阴性结果的全面的数据矩阵,做为一个理想的系统来检测和优

化新的分析方式。

[0107] 在优选的实施例中，本文公开的所述方法是竞争性的。在优选的实施例中，本文所公开的方法使用测序读数。就其本身而言，在某些实施例中，用本发明的方法生成的数据类型与单从结合实验乃至肽微阵列实验中已经生成的数据类型十分不同。在一个实施例中，多重竞争性结合方式表现为起始的肽与它们的亲和性表现出较强的偏离。在同样允许从池中识别出最优的结合物的情况下，在某些方面，例如，由于高灵敏度和大动态范围的下一代测序，低亲和性的结合物从非结合物中被区分出来。在优选的实施例中，低亲和性的结合物从非结合物中被区分出来，并且同时最优的结合物也从池中被识别出来。在一个实施例中，本文所公开的所述方法与以前报道的亲和性结合使用，例如，从而开发出将序列丰度和结合亲和性相关联的分析方法。

[0108] 在一个实施例中，对分离自人类样品，例如人血样品的 HLA 组进行了肽-MHC 结合分析。在另一个实施例中，进行了肽-MHC 结合分析鉴定个体化的病原体抗原表位。一方面，多元肽-MHC 结合分析方法被用于特定的重组 HLA 分子。另一方面，多元肽-MHC 结合分析方法被用于分离自人血的大量基于基因型的 HLA 分子组。从人体原代细胞中分离 HLA 分子的工艺已经确立 (Fissolo et al., 2009, Mol. Cell Proteomics. 8:2090-2101)，但是做为 HLA 分子来源的被转染的细胞或细胞系反映出传统分析方式需要大量单一的 HLA 种类的事实。相反，对于通过灵敏的下一代测序的多元分析读数，就不再需要分离单一的 MHC-肽配对物了。在优选的实施例中，本文公开的方法不需要分离单一的 MHC-肽配对物。在一个实施例中，本文公开的方法是灵敏的，并且所需要的 HLA 材料显著减少。在一个实施例中，检测了肽-cDNA 偶联物与来自匿名人类捐献者的外周血单核细胞 (PBMCs) 的 II 类 HLA 分子组的结合。PBMCs 代表了一种容易获得的生物样品类型，且 II 类 HLA 蛋白中的某一蛋白可以被大量表达。在某些方面，所述方法包括：(a) 将多聚核苷酸-肽偶联物与细胞孵育；裂解细胞；免疫沉淀 HLA 分子；洗脱所述偶联物；或 (b) 裂解细胞；免疫沉淀 HLA 分子；将多聚核苷酸-肽偶联物与细胞孵育；洗脱所述偶联物；或 (c) 将多聚核苷酸-肽偶联物与细胞孵育；将肽从细胞中直接洗脱。一方面，使用了上述 45 份流感病毒编码的肽与 10 位患流感的人类捐献者的 HLA 分子结合。在一个实施例中，为每一位捐献者个体提供了流感病毒：II 类 HLA “presentome”的快照。在一些实施例中，这种快照可以反映哪些肽是由哪些捐献者提供而非他人提供的大概情况。在一些实施例中，将这种结合情况然后与关于捐献者的流感表位的两个正交的信息源相比较：(i) 用传统的酶联免疫斑点法 (ELISpot) 得到的 10 位捐献者对于相同的 45 条肽组的 T 细胞反应情况，以及 (ii) 与 17 个具有已知结合亲和力的 HLA-DR 分子交叉试验的 10 位捐献者的 HLA 基因型。

[0109] 一方面，本文公开的肽-MHC 结合分析是对免疫应答期间，尤其是 T 细胞应答期间，由 T 细胞识别的抗原表位的预测。尽管与 MHC 相互作用的能力是肽产生 T 细胞应答所必须的几个因素之一（其它关键因素是肽的蛋白水解生成，以及在 T 细胞库内结合 T 细胞的可能性），但有证据表明，MHC 相互作用具有很大的影响，并且可以做出有力的预测。

[0110] 生物分子结合是一种既联结（分子相互结合在一起的比例）又分离（分子相互分离的比例）的处于平衡状态的功能。在某些方面，结合分析报告了有多少正在进行的处于平衡的结合（联结与分离的卷积）。然而，在其它方面，特定的肽-MHC 复合物的缓慢分离是肽引发 T 细胞应答的独立且关键的要求。参见，例如，Yin et al., “HLA-DM constrains

epitope selection in the human CD4T cell response to vaccinia virus by favoring the presentation of peptides with longer HLA-DM-mediated half-lives,” *J Immunol.* 2012, 189:3983-94. See also Lazarski et al., “The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance,” *Immunity.* 2005, 23:29-40. 这些参考文献记载的内容通过引用的方式全部并入本文中。

[0111] 一方面,本文公开了一种检测多肽与MHC分子特异性结合的方法,包括在多聚核苷酸-肽偶联物(所述负载肽的探针)与所述MHC分子之间建立一种平衡,洗去未结合上的多聚核苷酸-肽偶联物分子,并留下已结合上的MHC复合物使其分离一段时间(例如,≥约30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、或约16小时),在一种或多种与MHC结合但不产生信号的阻断剂种类存在的情况下时间是可选择的,然后检测仍然结合在所述MHC分子上的所述多聚核苷酸-肽偶联物。在一个实施例中,所述一种或多种阻断剂种类与所述多聚核苷酸-肽偶联物的肽基团竞争性结合至所述MHC分子,从而阻止肽与所述MHC分子重新联结。

[0112] 在本文公开的任一实施例中,可以在所述多聚核苷酸-肽偶联物与所述MHC分子结合前,结合期间或结合后加入化学伴侣。一方面,生理上的肽-MHC结合发生在蛋白伴侣(如,HLA-DM)存在的情况下,所述蛋白伴侣能促进肽装载至MHC分子或从MHC分子上卸载,并起到塑造与MHC结合并应答T细胞的肽库的作用。一方面,可以通过添加分子伴侣来提升本文公开的多元肽:MHC分析的生物学用途,所述分子伴侣,例如具有相同和相似效果的重组HLA-DM和小分子伴侣,重演了该功能。这些包括对氯苯酚(pCP)或二甲亚砜(DMSO)。参见Marin-Esteban et al., *J Biol Chem.* 2004, 279:50684-90,该文公开了HLA-DM的化学类似物可以诱导HLA-DR分子中的肽的感受态。Marin-Esteban et al.的记载内容通过引用的方式被全部并入本文中。

E. 检测肽与TCR或T细胞结合的方法

[0113] 本发明还提供了用于检测候选MHC-结合肽与TCR或T细胞结合的方法。在优选的实施例中,本发明完成了对多个MHC-结合肽库与特定的MHC分子/TCR组合的竞争性结合的检测。在一个实施例中,多聚核苷酸-肽偶联物(如,肽-cDNA偶联物)与作为多元检测特异性T细胞的探针的MHC分子结合。一方面,所述多聚核苷酸-肽偶联物是多聚化的或寡聚化的。

[0114] 一方面,本文公开了一种用于检测肽与T细胞结合的方法,包括:将所述的T细胞与MHC分子多聚核苷酸-肽偶联物接触,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;将所述多聚核苷酸-肽偶联物与特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触;检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合;且,使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽和所述T细胞的结合相互关联。

[0115] 另一方面,提供了用于同时检测肽库与T细胞结合的方法。该方法包括:向每一条所述的肽提供多聚核苷酸-肽偶联物,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸-肽偶联物库和MHC分子与所述T细胞接触;将每一个所述的多聚核苷酸-肽偶联物与特异性结合每条所述多聚核苷酸的探针接触;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应多聚核苷酸的结合;并且使所述探针和每条相应多聚核苷酸的

结合与每条相应的肽和所述 T 细胞的结合相互关联。在一个实施例中,本发明所述的肽与所述 T 细胞的 TCR 结合。

[0116] 而另一方面,本文描述了一种用于在肽库中检测每条所述肽与 T 细胞竞争性结合的方法,包括:将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽与多聚核苷酸;用所述多聚核苷酸-肽偶联物库和 MHC 分子与 T 细胞接触;用特异性结合至每条所述多聚核苷酸的探针与每个所述多聚核苷酸-肽偶联物接触;检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应多聚核苷酸的结合;并使所述探针和每条相应多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和所述 T 细胞的结合相互关联,其中所述肽竞争性结合 MHC 分子和所述 T 细胞。在一个实施例中,所述肽与所述 T 细胞的 TCR 结合。

[0117] 在本文公开的任一实施例或其组合中,本发明所述的方法可以进一步包括用对照与检测到的所述肽与所述 MHC 分子或所述 T 细胞的结合相比较。在进一步的实施例中,如任一实施例或其任一组合中公开的本发明的所述方法还进一步包括通过对照选择检测到的所述肽的结合,用于鉴别感染、自身免疫、过敏、或癌症中的抗原,或用于疫苗设计。

[0118] 在任一前述方法实施例或其任一组合中,可以先用多聚核苷酸-肽偶联物接触 MHC/TCR 对,接着洗去未结合上的偶联物,然后用所述多聚核苷酸特异探针接触所述 MHC-TCR 偶联物复合物。在另一个实施例中,在用 MHC/TCR 对接触所述混合物之前,可以先用探针接触多聚核苷酸-肽偶联物。而在另一个实施例中,可以同时用多聚核苷酸-肽偶联物和探针接触 MHC/TCR 对,并且所述多聚核苷酸-肽偶联物不需要先与所述探针接触。

[0119] 在本文公开的任一实施例或其任意组合中,所述多聚核苷酸和多聚探针选自自由 DNA、cDNA、RNA、mRNA、rRNA、tRNA、PNA、类 DNA 分子或类 RNA 分子组成的组。在本文所公开的任一实施例或其任意组合中,所述探针与所述多聚核苷酸的结合可以通过凝胶电泳、杂交、PCR、qPCR、或核苷酸测序检测。

[0120] 在使用结合探针去检测特异 T 细胞方面存在的挑战是,肽:MHC 复合物和所述 TCR 之间的低亲和性。在这一点上,在一个实施例中,所述多聚核苷酸-肽偶联物是多聚化的或寡聚化的,克服了低亲和性的问题。在一个实施例中,用分支的衔接头分子制备多价偶联物,其中一些相同的肽共价地与单识别 DNA 标签结合。一方面,每个包含两个相同的肽的偶联物被制备并检测。可以容易地改变该方法以适应优选实施例中的高次倍增。在另一个优选的实施例中,所述方法以高通量的方式进行。

[0121] 在一个实例中,使用了 T 细胞系 HA1.7 和 131.5。在与 HLA-DR1 的复合物中,HA1.7 和 131.5 分别识别肽 PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:6) 和 QYIKANSKFIGITE (SEQ ID NO:7) 是公知的 (Hennecke and Wiley, 2002, J Exp Med. 4:571-581; De Magistris et al., 1992, Cell. 68:625-634)。具有序列 PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:6) 和 QYIKANSKFIGITE (SEQ ID NO:7) 的偶联物被制备成 1 价、2 价和 4 价。然后将所述偶联物与重组表达的 HLA-DR1 孵育。此外,在反应开始或肽-MHC 结合的初始期之后将 HA1.7 和 131.5 T 细胞添加到结合反应中。孵育后,洗涤细胞以去除未结合上的物质(这些物质可以包括偶联物、MHC 分子、和 MHC:偶联物复合物),然后洗脱结合上的偶联物并用它们的 cDNA 标签检测。在一个实施例中,在确定 T 细胞检测能力之后,将两种 T 细胞系以不同比例结合,用来确定此次分析的灵敏度和多样性。在另一个实施例中,同时用两种类型的偶联物做为检测物来确定此次分析的灵敏度和多样性。

[0122] 在本发明的方法中,所述 T 细胞受体可以是用来鉴别被所述受体识别的肽表位的 T 细胞受体。一方面,所述 T 细胞受体来自患有 T 细胞介导的疾病的患者,例如自身免疫疾病或过度增生性疾病。在其它实施例中,所述靶标 T 细胞受体来自不同情况的患者,例如被病原微生物感染的患者或癌症患者。对被特异的 T 细胞结合的抗原的了解因各种原因具有治疗价值。优选地,所述 T 细胞受体是 $\alpha\beta$ T 细胞受体。 $\alpha\beta$ T 细胞(表达 $\alpha\beta$ T 细胞受体)是哺乳动物物种和鸟类中发现的 T 淋巴细胞谱系,它表达抗原受体(即,TCR),包括一条 α 链和一条 β 链。在不受任何理论限制的条件下,所述 T 细胞受体可以是 $\gamma\delta$ T 细胞受体。

[0123] 所述 T 细胞受体可以通过细胞表达或做为可溶的 T 细胞受体。在前面的实施例中,所述 T 细胞受体可以通过自然表达所述受体(如,T 细胞克隆或杂交瘤)的 T 细胞或重组表达 T 细胞受体的其它细胞表达。在后面的实施例中,所述可溶的 T 细胞受体被更好地固定在基质或固体支撑物上用来与 MHC 和多聚核苷酸-肽偶联物接触。

[0124] 简言之,基质或固体支撑物指,在不显著影响 T 细胞受体与 MHC 肽复合物的特异性结合能力的前提下,能与可溶的 T 细胞受体形成键合的任意的固体有机支撑物、人工膜、生物高聚物支撑物、或无机支撑物。典型有机固体支撑物包括多聚物例如聚苯乙烯、尼龙、苯酚-甲醛树脂、丙烯共聚物(如,聚丙烯酰胺)。典型的生物高聚物支撑物包括纤维素、多聚葡聚糖(如,SephadexTM),琼脂糖、胶原蛋白和克质。典型的无机支撑物包括玻璃珠(多孔的和无孔的),不锈钢、金属氧化物(如,多孔陶瓷如 ZrO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , 和 NiO)和砂砾。可溶的 T 细胞受体可以通过多种方法与固体支撑物键合,包括吸附、交联(包括共价键合)、和包载。吸附可以通过范德华力、氢键结合、离子键结合、或疏水结合。典型的用于吸附固定的固体支撑物包括高分子吸附剂和离子交换树脂。固体支撑物的交联涉及在固体支撑物和 T 细胞受体之间形成化学键。交联通常使用双功能或多功能试剂来激活和将碳基、氨基、硫基、羟基或所述受体的其它功能基团附着于所述固体支撑物。包载涉及凝胶(使用有机的或生物多聚物)、囊泡(包括微型胶囊)、半透膜或其它基质,例如通过使用胶原蛋白、凝胶、琼脂、三乙酸纤维素、藻酸盐、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚亚安酯、环氧树脂、角叉菜胶、和卵清蛋白。

[0125] 靶标 T 细胞受体可以用可检测的标记进行标记。适用的可检测的标记包括任何可以通过分光镜、光化学手段、生物化学手段、免疫化学手段、电学手段、光学手段或化学手段检测到的化合物。本发明中有用的标记包括用于与被标记的链酶亲和素偶联物染色的生物素、磁珠(如,DynabeadsTM)、荧光染料(如,荧光素、德克萨斯红、若丹明、绿色荧光蛋白,等等)、放射性标记(如, 3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , 或 ^{32}P)、酶(如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其它在 ELISA 中经常使用的酶),以及比色标记,如胶体金或有色玻璃或塑料(如,聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶,等)制成的磁珠。

[0126] 如本文所使用的,“TCR 识别”或“TCR 结合”指 TCR 与 MHC-肽复合物的能力,其中以任何标准法(如,免疫法或其它结合法)测定的结合程度经统计显著高于分析中的背景对照。结合法是本领域公知的。例如,可以使用生物大分子相互作用分析仪(BIAcore 仪)测定两种蛋白之间的复合物的结合常数。通过监测缓冲液通过芯片的时间内折射率的变化来测定所述复合物的离解常数。其它合适的测定一种蛋白与另一种结合的分析方法包括,例如,免疫法,如酶联免疫吸附试验(ELISA)和放射性免疫测定(RIA),或通过荧光、紫外吸

收、圆二色谱、或核磁共振对蛋白的光谱性质或光学性质的改变进行监测从而测定结合。

[0127] 在一个实施例中,还可以额外地测定,当与本发明制备的 MHC-肽复合物结合时, T 细胞表达的 T 细胞受体是否对结合进行了 T 细胞应答。当 TCR 识别结合至抗原肽的 MHC 蛋白,从而改变带有 TCR 的 T 细胞的活性时,发生 T 细胞应答。如本文所使用的,“T 细胞应答”可以指,在 T 细胞的 TCR 与 MHC-肽复合物结合时发生的激活、无反应性诱导、T 细胞死亡。如本文所使用的, T 细胞的“激活”指在所述 T 细胞中诱发可导致该 T 细胞产生细胞产物(如,白细胞介素-2)的信号传导途径。“无反应性”指 T 细胞对抗原的降低的反应性。可以通过,例如,在 MHC-肽与 TCR 结合之后测定 T 细胞产生的 IL-2 量来测定激活和无反应性。与被刺激的 T 细胞相比,无反应性的细胞会减少 IL-2 的产生。另一种测定无反应性 T 细胞降低的活性的方法包括测定 T 细胞使用它的 TCR 进行的细胞内和/或细胞外钙动员。如本文所使用的,“T 细胞死亡”指所述 T 细胞所有功能本质上地永久停止。在本发明所述的方法中,在额外的诱导 T 细胞激活所需的共刺激信号不存在的情况下,所述 T 细胞通常会与所述 MHC-肽复合物冲突。但是,在某些情况下,某些类型或某种程度的 T 细胞应答是可测定的。

[0128] 可以通过任何适当的测定 T 细胞活性的方法来测定 T 淋巴细胞对 MHC-肽复合物结合的应答能力。这些方法是本领域技术人员所熟知的。例如,在 T 细胞被抗原刺激物或促有丝分裂刺激物刺激后, T 细胞激活特性可以通过下述方法测定,包括但不限于,测定 T 细胞产生的 IL-2 的量(如,通过免疫法或生物法);测定 T 细胞产生的其它细胞因子的量(如,通过免疫法或生物法);测定细胞内和/或细胞外钙动员(如,通过钙动员分析);测定 T 细胞增殖(如,通过增殖分析,如放射性同位素渗入法);测定所述 T 细胞表面的细胞因子受体的上调情况,包括 IL-2R(如,通过流式细胞仪、免疫荧光法、免疫印迹);测定所述 T 细胞表面的与 T 细胞激活相关的其它受体的上调情况(如,通过流式细胞仪、免疫荧光法、免疫印迹);测定细胞骨架的重组情况(如,通过免疫荧光法、免疫沉淀、免疫印迹);测定与 T 细胞相关的信号转导蛋白的表达和活性的上调情况(如,通过激酶分析、磷酸化分析、免疫印迹、RNA 分析);以及测定所述 T 细胞特异性效应物的功能(如,通过增殖分析、细胞毒性分析、B 细胞分析)。用于进行上述每项检测的方法是本领域技术人员所熟知的,并且所述这些方法被包括在本发明中。

[0129] 在一个实施例中,在任一实施例或其组合中公开的方法可以被用于疫苗设计或疫苗研发。当疫苗在传染性疾病背景下最好被确立时,研发工作的重心最近已经扩展至抗肿瘤疫苗,和用于治疗过敏和自身免疫疾病的耐受性疫苗。鉴于传统疫苗是基于整个病原体(无论是死亡还是衰减的),现代的方法(所谓的“二代”和“三代”疫苗)致力于免疫原亚基(尤其是蛋白或肽),因为这些具有如下主要优点:较低的风险、较高的稳定性,并且,最重要的是,对免疫应答更精细的控制的条件。本发明提供了用于研发成功的亚基疫苗的方法,即,用于在所述亚基上选择表位的方法,所述亚基做为 MHC 结合肽被有效地呈递给 T 细胞。

[0130] 在一个实施例中,感兴趣的免疫原的整个蛋白质组(如,细菌或病毒病原体)被表示为肽-cDNA 偶联物。在单个的结合池中将这些偶联物与来自被接种者群体的 HLA 孵育(无论是在代表性层面上还是在个性化医疗方案的个人层面上)。然后通过竞争性结合反应,以完全模拟体内天然的抗原加工环境的方式,从所述池中选择出最优的结合物,并且这

些结合物通过下一代测序以灵敏的高通量方式被报告。相同的方法还可以被用于发现有用的肽-MHC 四聚体组合,从而提供研究和监控 T 细胞免疫应答的方法。在另一个实施例中,本文公开的所述方法被用于研发以蛋白为基础的治疗方法,例如,为预防潜在的引发有害反应的蛋白序列,用于预筛选对抗患者的 HLA 分子的治疗方法。

[0131] 一方面,本文公开的所述肽-MHC 结合分析的应用涉及使用基于基因型的 MHC 组,所述 MHC 组采自患者样品,如,来自患者或普通对照的外周血。因为 MHC 分子是细胞表面表达的蛋白,一方面,分析方式涉及使用完好的细胞作为能捕获和分离 MHC-肽结合探针的固体支撑物,如,本文公开的多聚核苷酸-肽偶联物。在一个实施例中,所述多聚核苷酸-肽偶联物与细胞孵育,将所述细胞颗粒化并洗涤,以洗去未结合上的和/或非特异性结合的多聚核苷酸-肽偶联物,洗涤后将与所述细胞保持结合的多聚核苷酸-肽偶联物洗脱并定量。在一些实施例中,所有在细胞表面表达的 MHC 蛋白都能用于该分析,这些细胞的生理丰度达到无需通过一组 MHC-结合抗体捕获的水平。在其它实施例中,本文公开的所述方法避免将内部细胞成分暴露给所述多聚核苷酸-肽偶联物(所述肽探针),它可能非特异性地与所述内部细胞成分结合。在一些实施例中,细胞表面成分而非 MHC 分子被去除、阻断、或掩蔽,例如,阻止其与所述多聚核苷酸-肽偶联物非特异性结合。本领域已经阐明了肽与细胞表面表达的 MHC 的结合,参见如 Ceppellini et al., "Binding of labelled influenza matrix peptide to HLA DR in living B lymphoid cells," Nature 1989, 339:392-4, 通过引用的方式将该文记载的全部内容并入本文。

[0132] 下述示例性的实施方式和实施例用于进一步描述和说明本发明的各方面,但不以任何明确或含蓄的方式、状态、或形式限制本发明的保护范围。

[0133] 通过下述示例性的实施方式进一步说明本发明:

[0134] 1. 一种与多聚核苷酸偶联的 MHC-结合肽。

[0135] 2. 含有至少两个 MHC-结合肽的,且每条均与多聚核苷酸偶联的库,其中用特异性结合所述多聚核苷酸的探针识别每条所述的多聚核苷酸。

[0136] 3. 包含至少两条 MHC-结合肽,且每条均与多聚核苷酸偶联的组合物,其中所述至少两条 MHC-结合肽是多聚化的或寡聚化的。

[0137] 4. 根据实施例 3 所述的组合物,其中所述至少两条 MHC-结合肽与相同的多聚核苷酸偶联且因此被多聚化或寡聚化。

[0138] 5. 根据实施例 3 所述的组合物,其中所述至少两条 MHC-结合肽每条分别与多聚核苷酸偶联,其中所述多聚核苷酸介导所述至少两条 MHC-结合肽的多聚化或寡聚化。

[0139] 6. 根据实施例 5 所述的组合物,其中所述介导通过核苷酸序列互补进行。

[0140] 7. 用于检测肽与 MHC 分子结合的方法,包括:用多聚核苷酸-肽偶联物接触所述 MHC 分子,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;

用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触所述多聚核苷酸-肽偶联物;

检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合;并

使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽和所述 MHC 分子的结合相互关联。

[0141] 8. 用于同时检测肽库的肽与 MHC 分子结合的方法,包括:

将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽,所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸;

用所述多聚核苷酸-肽偶联物库接触所述 MHC 分子；
用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触每个多聚核苷酸-肽偶联物；
检测所述探针与每个与所述探针特异性结合的相应的多聚核苷酸的结合；并
使所述探针和每个相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽和所述 MHC 分子的结合相互关联。

[0142] 9. 用于在肽库中检测每条所述的肽与 MHC 分子竞争性结合的方法，包括：

将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述肽，所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸；

用所述多聚核苷酸-肽偶联物的库接触所述 MHC 分子；

用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物；

检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合；并

使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽与所述 MHC 分子的结合相互关联，

其中所述肽与所述 MHC 分子竞争性结合。

[0143] 10. 根据实施例 8 或 9 所述的方法，进一步包括在所述肽库的肽中，对比每条所述的肽与所述 MHC 分子的结合。

[0144] 11. 检测肽与 TCR 结合的方法，包括：用 MHC 分子和多聚核苷酸-肽偶联物与所述 TCR 接触；所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸；

用特异性结合所述多聚核苷酸的探针接触所述多聚核苷酸-肽偶联物；

检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合；并

使所述探针和所述多聚核苷酸的结合与所述肽和所述 TCR 的结合相互关联。

[0145] 12. 用于同时检测肽库与 TCR 结合的方法，包括：

将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽，所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸；

用所述多聚核苷酸-肽偶联物池和 MHC 分子接触所述 TCR；

用特异性结合每条所述的多聚核苷酸的探针与所述多聚核苷酸-肽偶联物接触；

检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合；并

使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽与所述 TCR 的结合相互关联。

[0146] 13. 用于在肽库中检测每条所述肽与 TCR 竞争性结合的方法，包括：

将多聚核苷酸-肽偶联物提供给每条所述的肽，所述多聚核苷酸-肽偶联物包括所述肽和多聚核苷酸；

用所述多聚核苷酸-肽偶联物池与 MHC 分子接触所述 TCR；

用特异性结合每条所述多聚核苷酸的探针接触每个所述的多聚核苷酸-肽偶联物；

检测所述探针与每条特异性结合每个所述探针的相应的多聚核苷酸的结合；并

使所述探针和每条相应的多聚核苷酸的结合与每条相应的肽与所述 TCR 的结合相互关联；

其中所述肽竞争性地结合所述 MHC 分子和所述 TCR。

[0147] 14. 根据实施例 11-13 任一所述的方法，其中所述 TCR 选自由 T 细胞上的 TCR、可

溶的 TCR、分离的 TCR、和固定的 TCR 组成的组。

[0148] 15. 根据实施例 7-14 任一所述的方法,进一步包括用对照与检测到的所述肽与所述 MHC 分子或所述 TCR 的结合相比较。

[0149] 16. 根据实施例 15 所述的方法,进一步包括为了在感染、自身免疫、过敏、或癌症中识别抗原,或为了设计疫苗,通过所述对照选择检测到的所述肽的结合。

[0150] 17. 根据实施例 7-16 任一所述的方法,其中所述多聚核苷酸和所述探针选自由 DNA, cDNA, RNA, mRNA, rRNA, tRNA, PNA, 类 DNA 分子或类 RNA 分子组成的组。

[0151] 18. 根据实施例 7-17 任一所述的方法,其中通过凝胶电泳、杂交、PCR、qPCR、或核苷酸测序检测所述探针与所述多聚核苷酸的结合。

[0152] 19. 根据实施例 7-18 任一所述的方法,其中所述 MHC 分子是被固定的。

[0153] 20. 根据实施例 7-19 任一所述的方法,其中所述多聚核苷酸-肽偶联物是多聚化的或寡聚化的。

[0154] 21. 以高通量方式进行的实施例 7-20 任一所述的方法。

[0155] 22. 根据实施例 7-20 任一所述的方法,其进一步包括下述步骤的一步或多步:

使所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间结合以达到平衡;在适宜的条件下洗涤所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间形成的复合物以去除未结合的或非特异性结合的多聚核苷酸-肽偶联物;让所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间的复合物分离;并且检测仍然结合在 MHC 分子上的多聚核苷酸-肽偶联物。

[0156] 23. 根据实施例 22 所述的方法,其中在一种或多种阻滞剂 (blocker) 存在的情况下使所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子之间的复合物分离。

[0157] 24. 根据实施例 23 所述的方法,其中所述一种或多种阻滞剂 (blocker) 阻止所述多聚核苷酸-肽偶联物和所述 MHC 分子结合或重新组合。

[0158] 25. 根据实施例 23 或 24 所述的方法,其中所述阻滞剂 (blocker) 与所述多聚核苷酸-肽偶联物竞争结合至所述 MHC 分子,并且所述阻滞剂 (blocker) 与 MHC 复合物之间的结合不产生所述多聚核苷酸-肽偶联物与所述 MHC 分子之间特异性结合的指示信号。

[0159] 26. 根据实施例 7-25 任一所述的方法,其中在一个或多个分子伴侣存在的条件下发生所述多聚核苷酸-肽偶联物与所述 MHC 分子的结合。

[0160] 27. 根据实施例 26 所述的方法,其中所述分子伴侣选自,由伴侣蛋白、化学伴侣、HLA-DM 及其类似物、具有与 HLA-DM 相同或相似伴侣功能的小分子、对氯苯酚 (pCP) 及其类似物、二甲亚砜 (DMSO) 及其类似物组成的组。

实施例 1

肽-cDNA 偶联物的制备

[0161] 可以从 DNA 分子经 CoA- 介导的合成或嘌呤霉素-介导的合成制备得到肽-cDNA 偶联物。每种方法可以在高复杂度的条件下进行,例如通过使用高复杂度的微阵列做为 DNA 模板来源。

CoA- 介导的合成

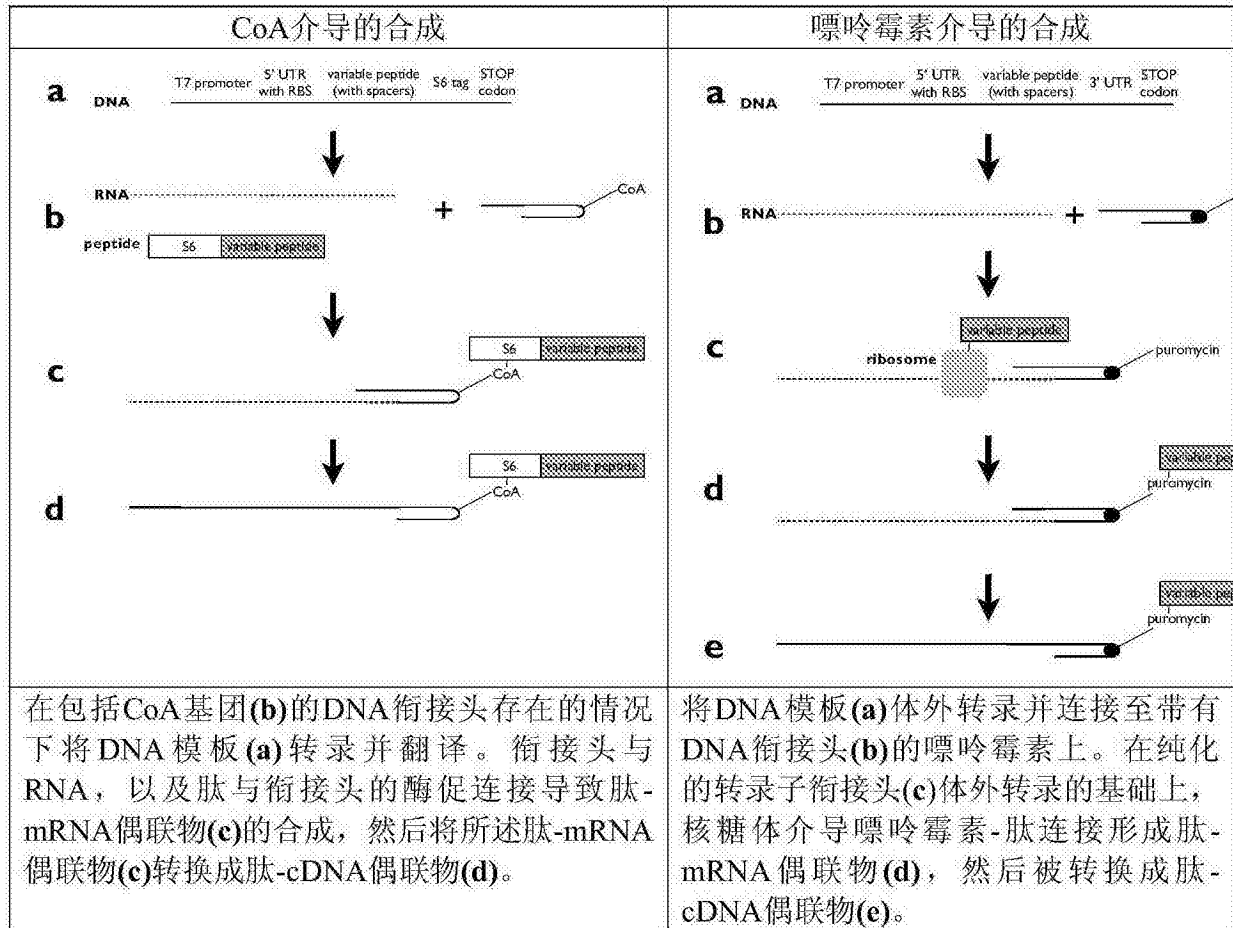
[0163] 在这种方法中,每条序列在一个独立的隔间里进行反应。如表 1(左)所示,肽-从包含下述元件(从 5' 端至 3' 端)的 DNA 模板合成得到 cDNA 偶联物:(i) T7 启动子,(ii) 含有核糖体结合位点 (RBS) 的 5' UTR 序列,(iii) 编码可变的肽的序列(侧面有间隔区残

基), (iv) 编码 S6 标签的序列, (v) 终止密码子。在单一的孵育混合物中, 这些 DNA 模板被转录成 mRNAs, 所述 mRNAs 被翻译成肽, 而所述 mRNAs 和肽相互之间共价连接。包括 DNA 发夹结构 (与转录的 mRNAs 的保守 3' 端互补的突出区域) 的多功能衔接头分子与辅酶 A (CoA) 分子借助聚乙二醇 (PEG) 连接物基团共价连接, 通过上述共价连接产生肽-mRNA 连接产物。mRNA 与衔接头的连接由 T4DNA 连接酶介导, 而通过 SFP 合成酶介导的 CoA 分子与 S6 标签的连接产生肽与衔接头的连接产物。然后用反转录酶将肽-mRNA 偶联物转换成肽-cDNA 偶联物, 接着用 RNase 降解 mRNA。然后通过带有 DNA 诱饵的磁珠上捕获, 将制备好的肽-cDNA 偶联物从反应混合物中分离, 所述 DNA 诱饵与存在于所有偶联物中的保守 DNA 序列互补。做为可选择的进一步纯化的步骤, 将 SFP 合成酶和过量的生物素化的 S6 肽一起添加至磁珠捕获的物质中。在该反应中, 将包含未反应的 CoA 分子的物质被生物素化然后用链霉亲和素磁珠将其消耗。

[0164] 嘌呤霉素-介导的合成

[0165] 该方法不需要让每条序列在一个独立的隔间里进行反应。如前所述 (Kozlov et al., 2012, PLoS One 7:e37441) 以及如表 1 (右) 所示, 用包含下述元件 (从 5' 端至 3' 端) 的 DNA 模板合成得到肽-cDNA 偶联物: (i) T7 启动子, (ii) 含有核糖体结合位点 (RBS) 的 5' UTR 序列, (iii) 编码可变的肽的序列 (侧面有间隔区残基), (iv) 终止密码子, (v) 3' UTR 区域。为了合成偶联物, 将 DNA 模板转录成 mRNA。然后将该 mRNA 纯化并与包含 DNA 分子 (与转录的 mRNAs 的保守 3' 端互补的区域) 的多功能衔接头分子连接, 所述 DNA 分子通过接头基团与嘌呤霉素分子共价连接。将所形成的衔接头-mRNA 偶联物纯化并翻译形成肽-mRNA 偶联物。核糖体介导新形成的肽与相关的衔接头-mRNA 偶联物的嘌呤霉素分子之间的连接。然后通过加入反转录酶将以这种方式形成的肽-mRNA 偶联物转换成肽-cDNA 偶联物, 接着用 RNase 处理降解 mRNA。然后通过带有 DNA 诱饵的磁珠上捕获, 将制备好的肽-cDNA 偶联物从反应混合物中分离, 所述 DNA 诱饵与存在于所有偶联物中的保守 DNA 序列互补。

[0166] 表 1: 制备肽-cDNA 偶联物的典型方法



实施例 2

肽 -cDNA 偶联物的多聚化

[0167] 本实施例描述了多聚化肽 -cDNA 偶联物的典型方法。可以修改实施例 1 描述的制备方案,从而实现需要多价肽 -cDNA 偶联物分子的应用。这些用于多聚化肽 -cDNA 偶联物的方法还可以相互配合进行,以获得更高的有序倍增。

[0168] 多价接头介导的多聚化

[0169] 在这个方案中,介导肽与 mRNA 之间的连接的接头分子被修饰成包括多个肽捕获分子。例如,在 CoA 介导的合成中,所述捕获分子是 CoA,而在嘌呤霉素介导的合成中,所述捕获分子是嘌呤霉素。在所述肽 -cDNA 合成过程中,多条肽被连接在一个 mRNA 分子上。

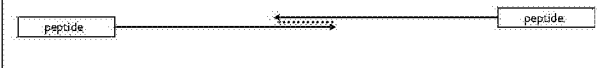

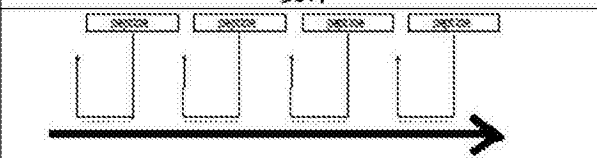
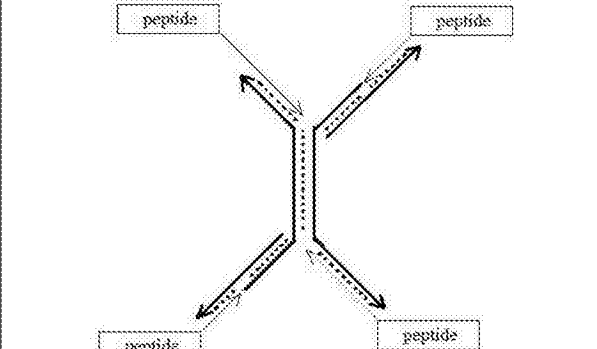
[0170] 为了合成用于 CoA 介导的合成的二价接头,使用了包含两个碱基上的氨基修饰的 DNA 发夹。这些位点与双功能 PEG 交联分子上的 NHS- 酯基团起反应。所述 PEG 交联分子,如马来酰亚胺,的其它功能是,可以通过与过量的 CoA 三锂盐反应与 CoA 相连。所形成的双 -PEG 化的,双 -CoA 修饰的接头通过凝胶电泳纯化,并在实施例 1 所述的肽 -cDNA 合成步骤中做为接头使用。

[0171] 通过杂交的多聚化

[0172] 在这个方案中,用这样一种方法制备肽 -cDNA 偶联物,即,可通过核酸杂交使多个偶联物相互之间连接形成多价的偶联物。可以有各种实施方式。在一种实施方式中,可以用互补的标签序列设计 DNA 模板以便混合时它们可形成杂交对(表 2 的实施方式 1)。在另一种备选的实施方式中,可以保存肽 -mRNA 偶联物制备的片段并将其与随后形成的肽 -cDNA

偶联物混合（表 2 的实现方式 2）。在备选的实施方式中，通过包含多个互补区域的分离的接头 DNA 模板介导多聚化（表 2 的实施方式 3 和 4）。

[0173] 表 2 :肽 -cDNA 偶联物的多聚化

实现方式	设计	说明
1		由两个cDNA标签（实线）之间的互补序列介导的二聚化
2		由mRNA标签（虚线）和cDNA标签（实线）之间内在的互补性介导的二聚化
实现方式	设计	说明
3		由包含与cDNA标签互补的重复序列的DNA接头（粗实线）介导的多聚化
4		由包含与cDNA标签互补的区域的DNA组装接头（3粗实线）杂交介导的多聚化

实施例 3

肽 -MHC 结合分析

[0174] 为了检测不同的肽与 MHC 的结合，用生物素化的 MHC 分子与肽 -cDNA 偶联物孵育过夜，然后在负载有链酶亲和素的磁珠上捕获所述 MHC 分子。洗涤所述磁珠以去除未结合上的物质，然后在变性条件下将剩下的，MHC- 结合肽 -cDNA 偶联物洗脱，并用凝胶电泳、qPCR 和 / 或 DNA 测序进行检测。

[0175] 在图 4 所示的实验中，采用下述序列：YKTIAFDEEARR (SEQ ID NO:1) 和 YPKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:2) 通过实施例 1 所述的 CoA- 介导的合成制备肽 -cDNA 偶联物。这些序列分别来自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium Tuberculosis*) 和甲型 H1N1 流感 (*Influenza A*) 病毒。选择它们是因为已知它们可以分别与 II 类 MHC 分子 HLA-DR3 和 HLA-DR1 结合，而不会出现交叉结合 (Sidney et al., 2002, *J Immunol.* 169:5098-5108)。用生物素化的 YKTIAFDEEARR (SEQ ID NO:1) 和 YPKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:2) 肽 -cDNA 偶联物与 HLA-DR3 和 HLA-DR1 单体孵育过夜（如 Sidney et al., 2001, *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter18:Unit 18.3 中所描述），采用链霉亲和素磁珠使其固定，用 PBST 洗涤 3 遍，然后将所述结合的偶联物洗脱，通过凝胶电泳和定量聚合酶链式反应进行分析。图 XX 中示出的结果表明，通过两种读数方式检测被洗脱的肽 -cDNA 偶联物，并且每个偶联物都结合了预

期的 MHC 分子而非其它 HLA-DR 家族成员。

[0176] 在图 5 所示的实验中,制备了具有序列 YPKYVKQNTLKLAT (“YP(WT)”) (SEQ ID NO:3), YPKYVKQNTLKLAA (“YP(T14A)”) (SEQ ID NO:4), 和 YPKAVKQNTLKLAT (“YP(Y4A)”) (SEQ ID NO:5) 的肽-cDNA 偶联物。已知 YP(WT), YP(T14A), 和 YP(Y4A) 的肽分别与 HLA-DR1 分子高亲和性、高亲和性、低亲和性地结合。然后用生物素化的 HLA-DR1 单体与这三种偶联物各自分别孵育 (1-丛) (1-plex) 或等比例混合孵育 (3-丛) (3-plex), 然后洗脱并用如上所述的 qPCR 分析。图 5 显示,在偶联物分别出现 (1-丛) (1-plex) 和偶联物混合孵育并检测 (3-丛) (3-plex) 的两种情况下,检测了三种偶联物 (高亲和性、高亲和性、低亲和性) 预期的结合情况。

实施例 4

肽:MHC-T 细胞结合分析

[0177] 为了定量不同的 T 细胞特异性,可以按照实施例 3 所示的,用 MHC 分子与多价肽-cDNA 偶联物孵育过夜。在每条肽与 MHC 分子“探针”、未结合的肽-cDNA 偶联物和未结合的 MHC 分子结合的情况下,获得的孵育混合物包含多价肽-cDNA 偶联物。然后将获得的孵育混合物施加至包含 T 细胞的生物样品中。经过一段时间的孵育后,将所述细胞颗粒化并洗涤,以洗去未与 T 细胞结合的物质。然后将结合上的物质洗脱并用凝胶电泳、qPCR 和/或 DNA 测序检测。

实施例 5

肽-MHC 结合分析

[0178] 在本实施例中,来自流感病毒的具有 14 个氨基酸的肽 (SEQ ID NO:2, “YP”), 已知其与 MHA 分子 HLA-DRB1*01:01 结合,将它与具有特定序列的含 50 个核苷酸的 DNA 寡聚核苷酸进行化学偶联。如图 6 所示,纯化后,在重组的 HLA-DRB1*01:01 存在 (“DR1”) 或不存在 (“只有磁珠”) 的情况下将获得的 YP 偶联物进行孵育,然后用负载有抗-HLA-DR 抗体 (L243) 的磁珠捕获,洗涤,洗脱并用所连接的 DNA 的特异性引物通过 qPCR 检测。

[0179] 如图 6 所示的是 3 个连续实验 (i), (ii), 和 (iii) 的 qPCR 结果。图 6a 是实验 (i) 在不同孵育温度和时长下的 qPCR 结果。图 6b 是孵育中使用了不同浓度的 YP 偶联物的实验 (ii) 的 qPCR 结果。图 6c 是使用了新管洗脱的实验 (iii) 的 qPCR 结果。

[0180] 根据实验 (i) 的结果,确定在实验 (ii) 和 (iii) 中使用 37°C /16hr 的孵育条件。根据实验 (ii) 的结果,确定在实验 (iii) 中使用 18pM,在复杂的偶联物池中获得单一物质的浓度范围中的一个浓度。实验 (iii) 表明,在这些反应条件下,当使用新的洗脱管时,在磁珠上与 DR1 结合的 YP 偶联物扩增了 100 倍。

实施例 6

在多聚核苷酸-肽偶联物池中检测肽:MHC 特异性结合

[0181] 利用 HLADRB1*01:01 结合物的共用数据库 (可用链接:http://bio.dfci.harvard.edu/DFRMLI/datasets/IEDB_DRB1_0101.htm) 设计了一个包括 4000 个普通设计的肽-cDNA 偶联物的池,并通过嘌呤霉素技术将其合成。已知的与 MHA 分子 HLA-DRB1*01:01 结合的肽“YP” (14 个氨基酸, SEQ ID NO:2) 和不与 MHA 分子 HLA-DRB1*01:01 结合的“YK” (12 个氨基酸, SEQ ID NO:1), 各自负载有明显的含 50 个核苷酸的 DNA 寡聚核苷酸,在与本库其它成员可比较的浓度下,将它们与 4000-丛组混合,从而制备产生二级库。仅使用

磁珠或使用 HLA 分子 DR1, 将获得的二级库应用于图 6 所示的分析中。

[0182] 分别显示了 YP (图 7a)、YK (图 7b) 和嘌呤霉素库 (图 7c) 的特异性引物组的 qPCR 结果。然而, 与仅用磁珠相比, 在使用 DR1 的情况下, 特异的偶联物 (YP) 在混合的库中被扩增了 1000 倍 (如图 7a 所示), 而在 DR1- 非特异性偶联物 (YK) 上没有观察到这种扩增 (如图 7b 所示)。与仅用磁珠相比, 在使用 DR1 的情况下, 所述库自身也被扩增了 1000 倍 (如图 7c 所示)。

实施例 7

通过延伸检测肽 :MHC 的特异性结合

[0183] 从结核分枝杆菌 (M Tuberculosis) 中获得的, 已知与 MHA 分子 HLA-DRB1*03:01 结合的 12 氨基酸的肽 (SEQ ID NO:1, “YK”), 与具有特定序列的 50 核苷酸的 DNA 寡聚核苷酸进行化学偶联。进行图 6 所示的 MHC 结合分析 (“标准方式”), 或用图 8a 描述的另外的“延伸分析方式”。在这种延伸分析方式中, 磁珠结合的抗 -HLA-DR 抗体 (“L243”) 与 40 核苷酸的 DNA 标签偶联, 所述 DNA 标签在其 3' 端包括了一个与 YK DNA 标签的最后 7 个碱基互补的 7 个核苷酸的序列。洗涤后, 加入 DNA 聚合酶用于延伸所述标签, 用延伸产物特异性的 qPCR 引物组检测所得的产物。

[0184] 图 8b 所示的是采用延伸分析方式和标准方式在抗体的指示浓度下得到的 qPCR 结果。这些结果表明, 与仅用磁珠相比, 在使用 DR1 的情况下, 延伸分析方式能使 YK 信号扩增 1000 倍。

[0185] 所有标题都是为了方便读者, 并且不应当被用于限制标题下正文的意思, 除非有特别说明。

[0186] 上述出版物或文件的引用, 并非为了承认它们中的任何一篇是相关的现有技术, 也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的任何承认。

[0187] 虽然上面已经描述了本发明的各个实施例, 但它应当被理解为, 这些实施例仅用来做示例, 而非用来限制。而且, 各种图表可以基于公开的目的描述一个示例性结构或其它布局, 这样做是为了帮助理解包含在公开内容中的特征和功能。本发明并不局限于说明性的示例性结构和布局, 但可使用多种可供选择的结构和布局来实施本发明。此外, 尽管通过上述的各种示例性实施例和实现方式描述了本发明, 但应当被理解为, 一个或多个实施例中描述的各种特征和功能的适用范围不局限于在它们被描述的那个特定实施例中。它们反而可以被单独地或以某些组合的方式应用于本发明一个或多个其它实施例中, 无论这些实施例中有没有描述, 也无论这些特征是否做为被描述的实施例的一部分出现。因此本发明的保护范围不应当被限制在上述任一示例性的实施例中。

序列表

SEQ ID NO	序列
1	YKTIAFDDEARR
2	YPKYVKQNTLKLAT
3	YPKYVKQNTLKLAT

4	YPKYVKQNTLKLAA
5	YPKAVKQNTLKLAT
6	PKYVKQNTLKLAT
7	QYIKANSKFIGITE

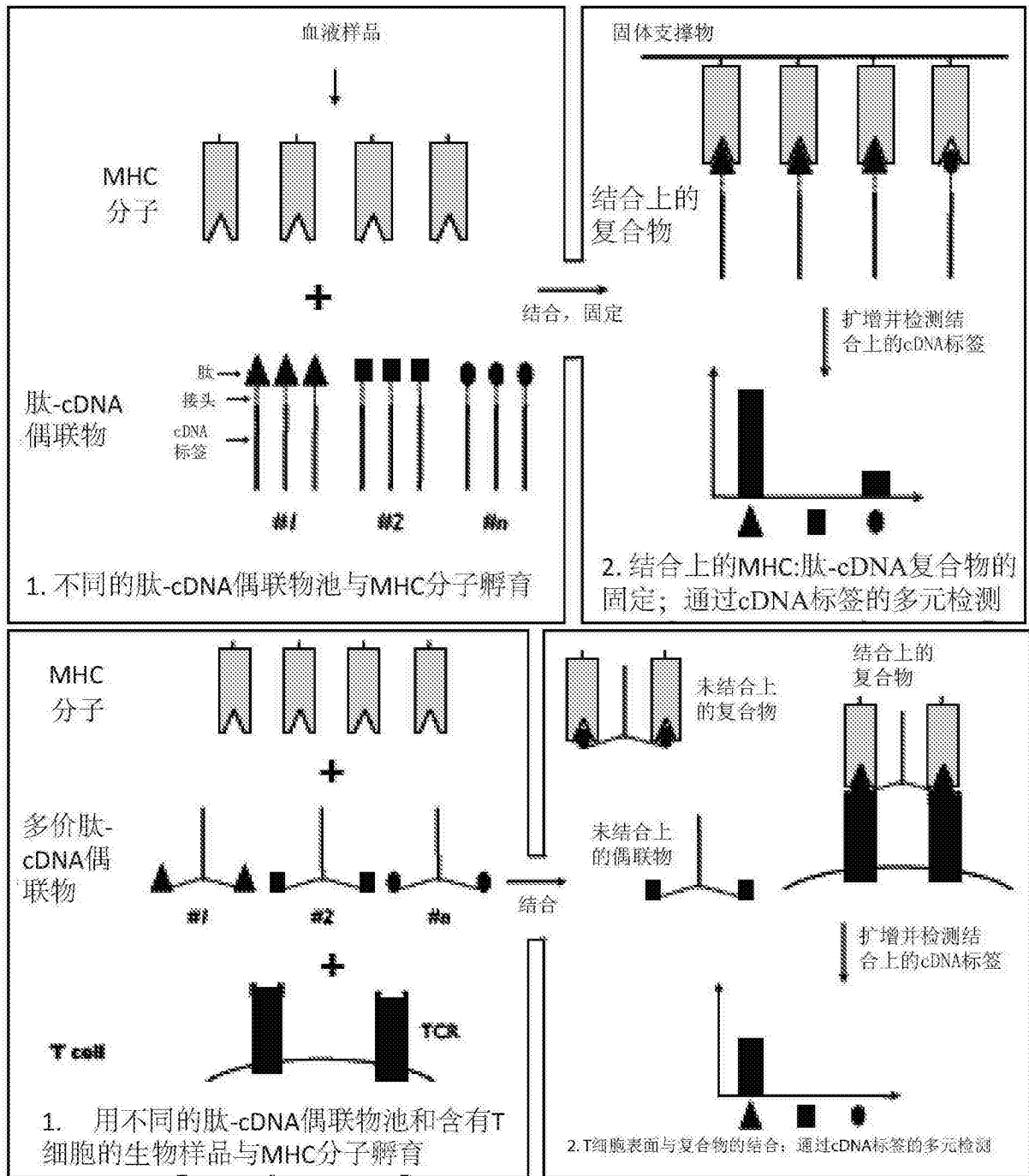


图 1

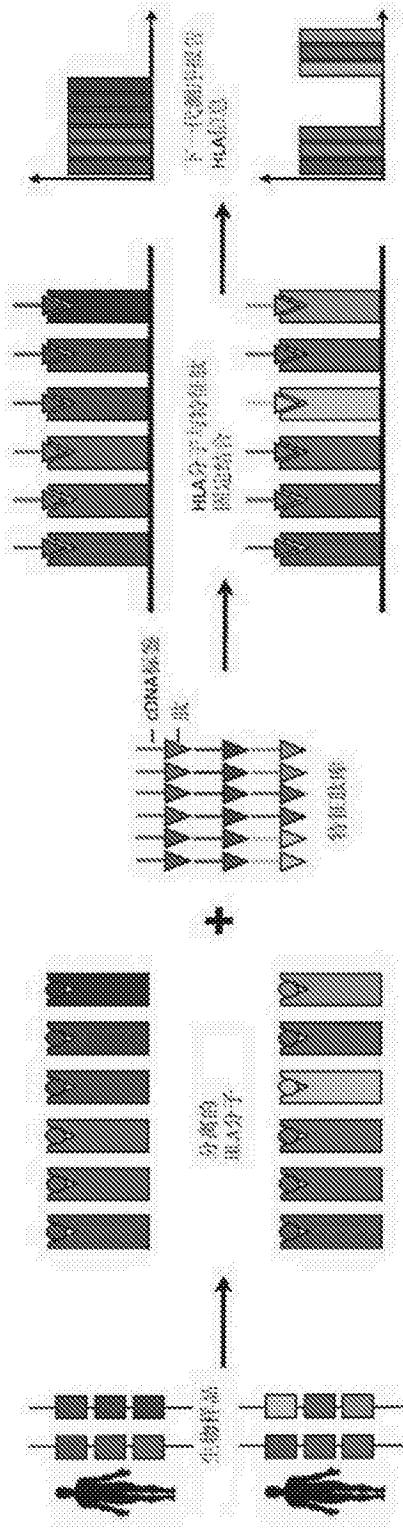


图 2

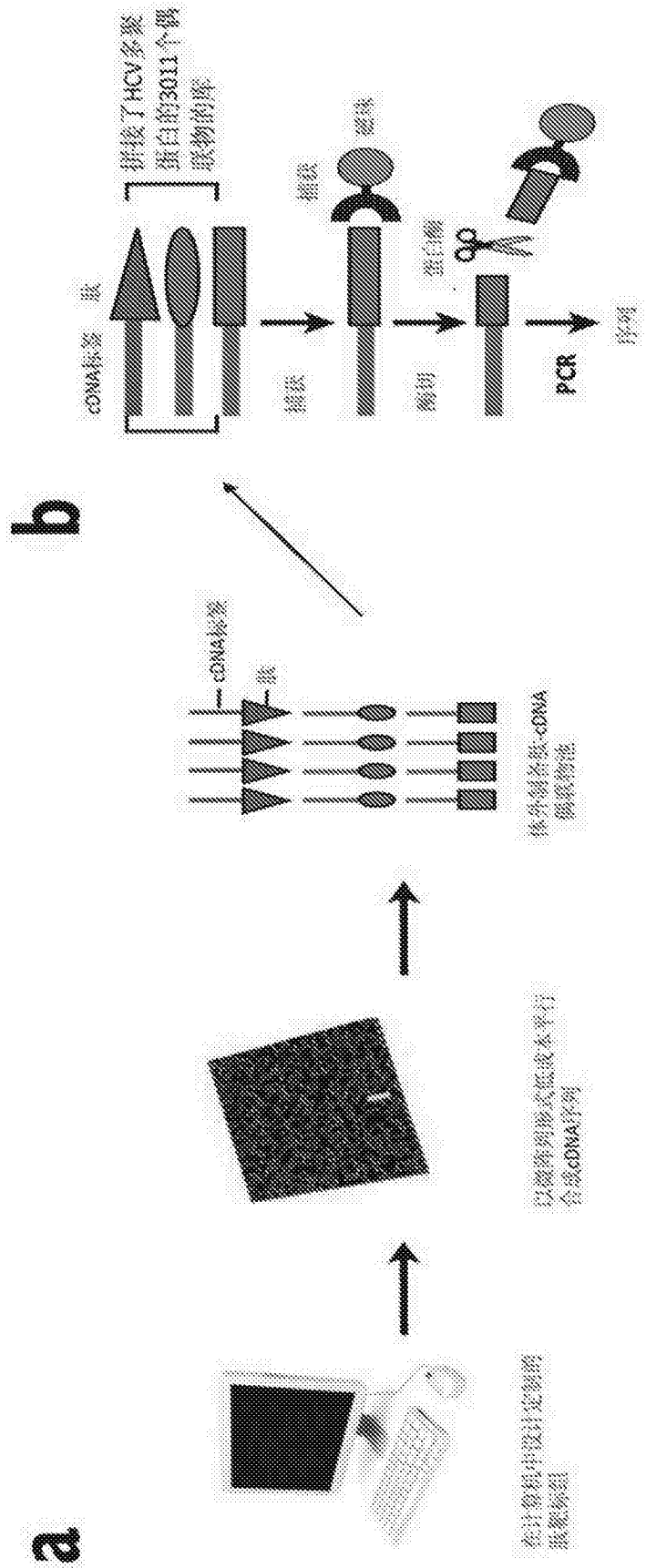


图 3

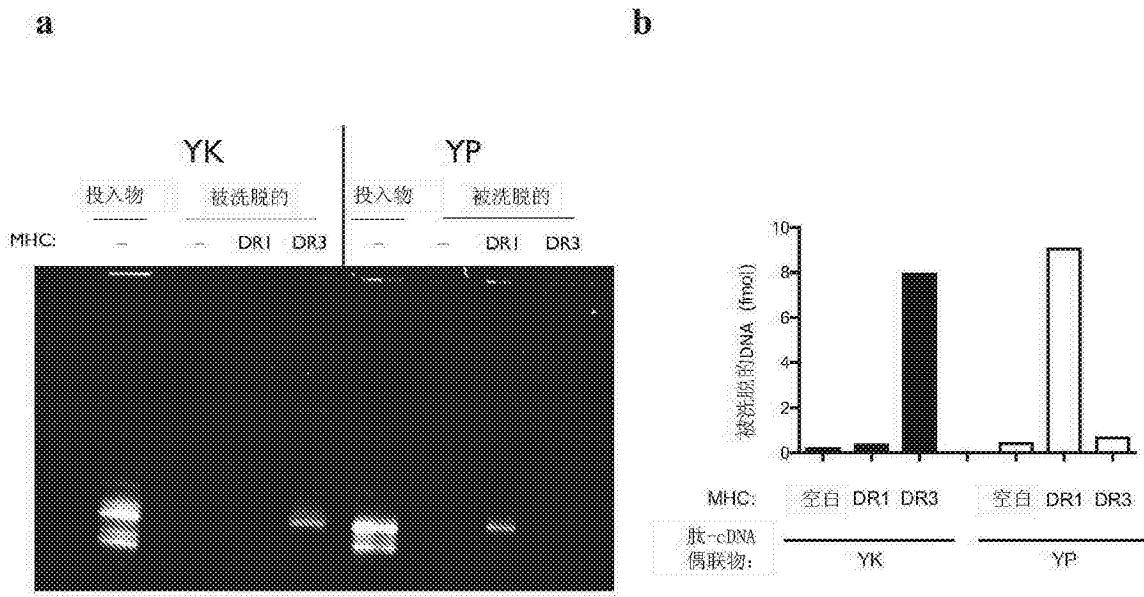


图 4

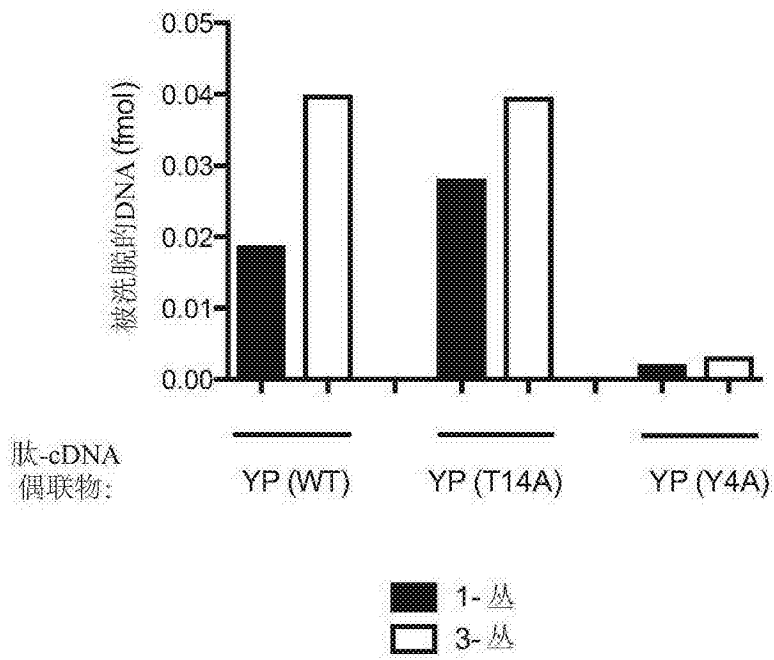


图 5

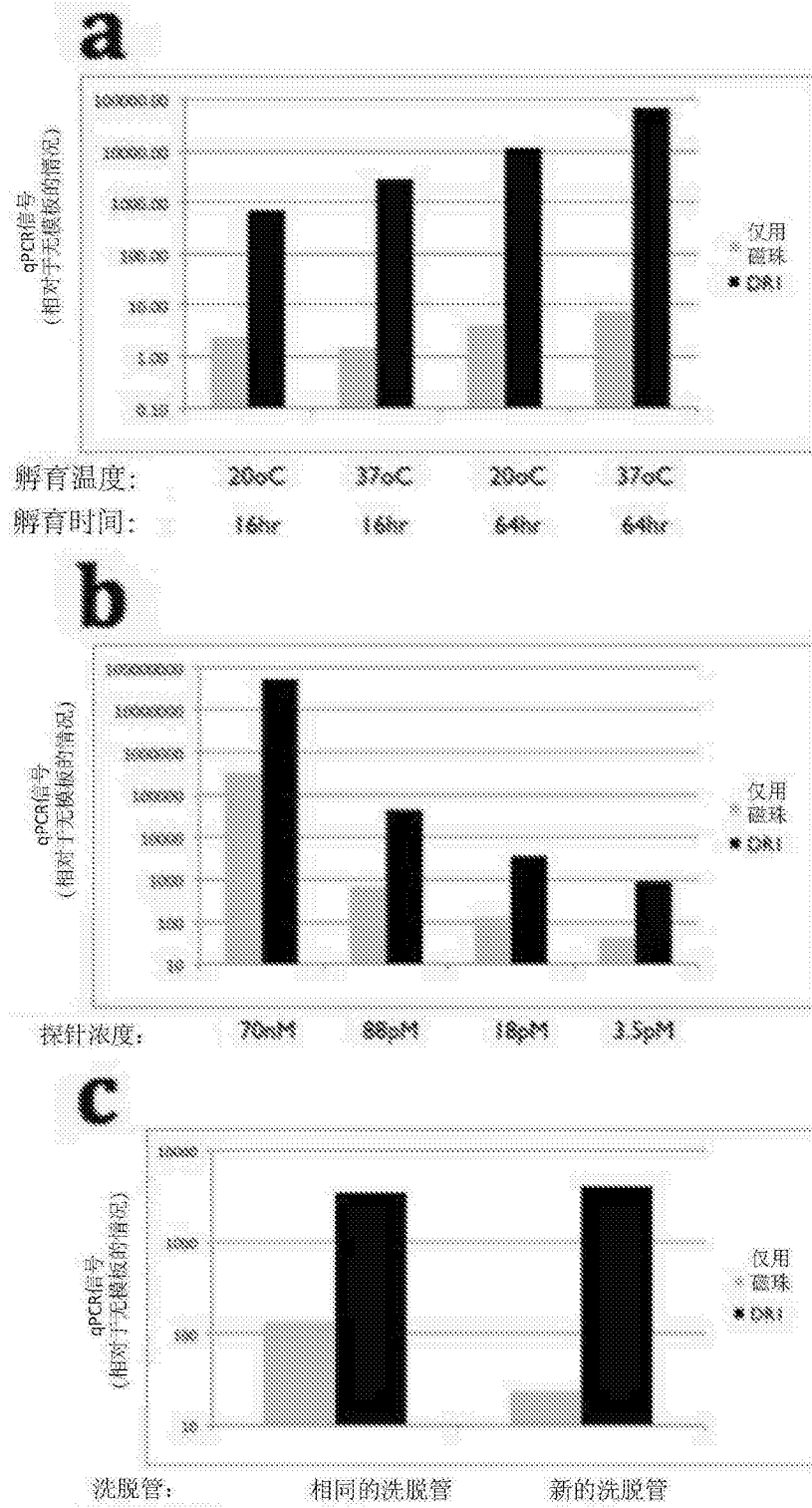


图 6

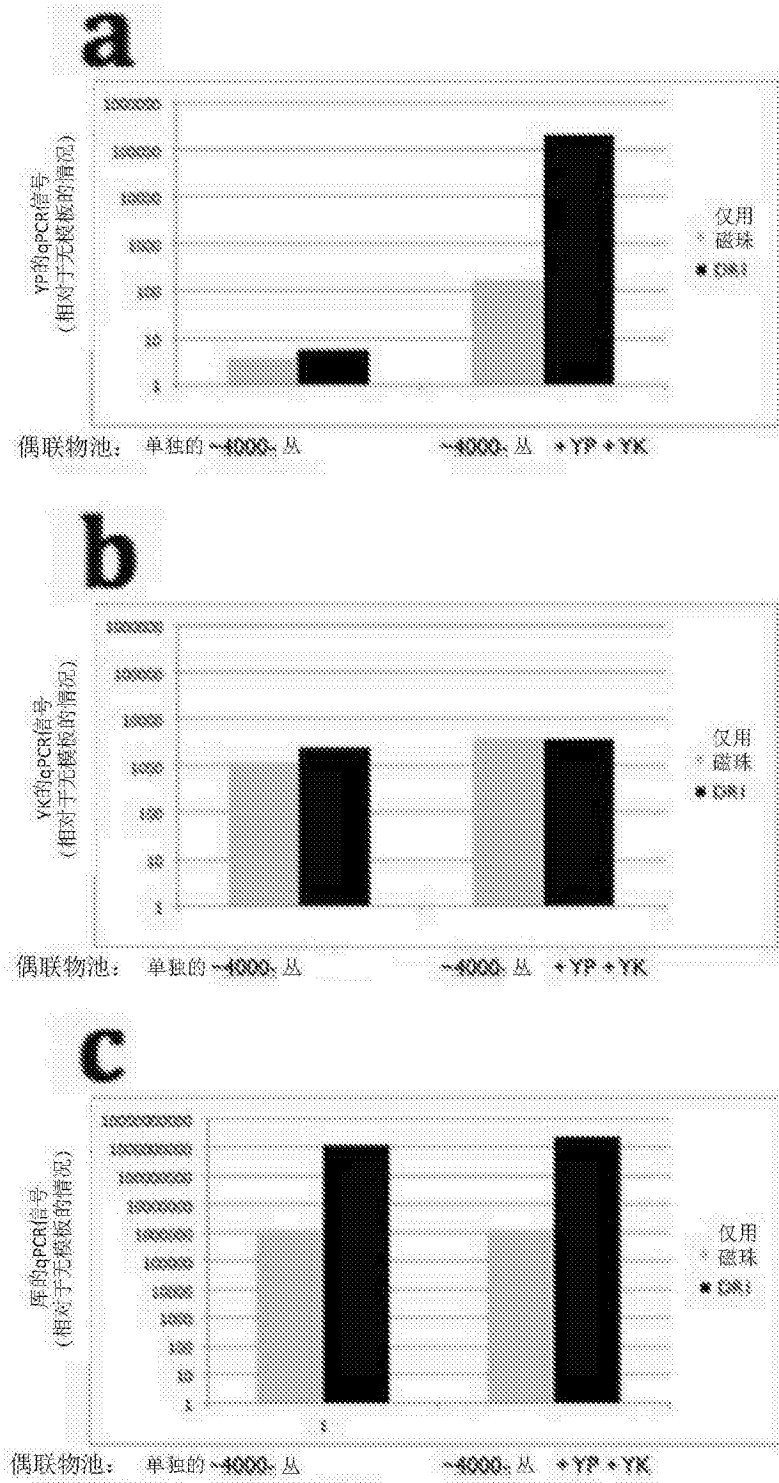


图 7

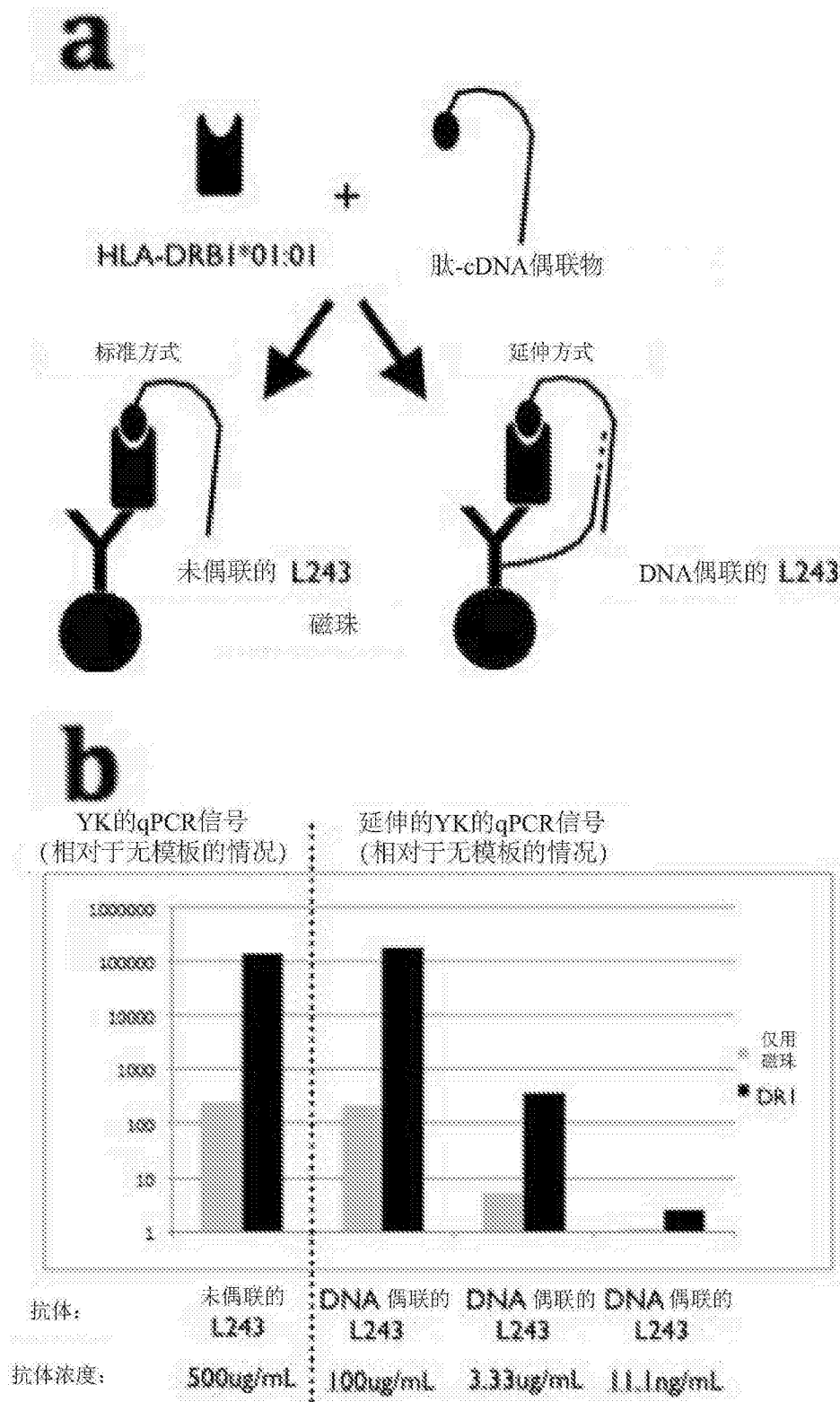


图 8

专利名称(译)	用于检测肽/MHC/TCR结合的方法		
公开(公告)号	CN105358984A	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201480028069.3	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	普罗格诺西斯生物科学公司		
申请(专利权)人(译)	普罗格诺西斯生物科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	普罗格诺西斯生物科学公司		
[标]发明人	约翰安德鲁阿尔金 马克S朱		
发明人	约翰·安德鲁·阿尔金 马克·S·朱		
IPC分类号	G01N33/567 G01N33/53 C12Q1/00		
CPC分类号	C12Q1/6804 G01N33/538 G01N2333/003 G01N2333/70539 C07K7/08 G01N33/56977		
优先权	61/800891 2013-03-15 US		
其他公开文献	CN105358984B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于检测肽与MHC分子结合以及肽:MHC复合物与TCR结合的组合物和方法。在优选的实施例中，所述组合物和方法是以高度倍增的方式进行。可以用本发明公开的所述组合物和方法提供肽与MHC分子结合的直接信息。本发明还提供了用于同时检测大量的结合至MHC分子和/或T细胞的肽的方法。还公开了用于检测大量的肽与MHC分子和/或T细胞竞争性结合的方法。本发明还提供了用于同时检测大量的特异性TCRs的方法。本发明所述的组合物和方法可用于疫苗设计，研究和监控自身免疫疾病和传染病，治疗的免疫原性检测以及组织分型。

