

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C07K 16/46
C07K 14/31



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813694. X

[43] 公开日 2004 年 7 月 7 日

[11] 公开号 CN 1511164A

[22] 申请日 2001.7.26 [21] 申请号 01813694. X

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 3 [33] GB [31] 0018901.9

[86] 国际申请 PCT/EP2001/008625 2001.7.26

[87] 国际公布 WO2002/012899 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.30

[71] 申请人 默克专利有限公司

地址 德国达姆施塔特

[72] 发明人 F·J·卡尔 G·卡特

K·海伦多恩

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 4 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 细胞呈递的肽

[57] 摘要

本发明涉及把蛋白质加到细胞中后测定呈递在哺乳动物细胞表面的肽的方法。本发明也涉及基于此肽的测定的诊断试验或由这些肽的测定导致的修饰分子，这些修饰分子例如药物实体优选具有特定的生物学活性并且与相应的未加修饰的分子相比具有降低的或增加的免疫原性。根据本发明的方法优选以利用质谱分析(MS)的工具来建立。

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

1. 用于开发具有特定的生物学活性且与具有相同生物学活性的任何未经修饰的蛋白质或多肽相比具有降低的或增加的免疫原性的药物蛋白质或多肽或疫苗抗原的方法，所述方法通过如下步骤实施：

(i) 使细胞与所述蛋白或多肽接触，在细胞或其胞吐小泡上产生一个表面肽库，该库不同于未进行接触的参考细胞上展示的表面肽库，

(ii) 就结合于所述细胞或其胞吐小泡表面的肽，分析所述细胞或其胞吐小泡，

(iii) 根据标准方法确定归属于该药物蛋白或多肽或疫苗抗原的序列中的所述肽。

2. 权利要求 1 的方法，还包括以下步骤：

(iv) 修饰所述肽，以改变它们与 MHC 分子的结合，和

(v) 根据标准方法，通过把一个或多个修饰的肽序列并入所述蛋白或多肽分子的序列中，构建编码最终的药物蛋白或多肽的序列变体。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中步骤 (ii) 对所述细胞或其胞吐小泡的分析采用质谱 (MS) 来完成。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中应用 MALDI-MS。

5. 根据权利要求 3 的方法，其中应用 ESI-MS。

6. 根据所述权利要求之任一项的方法，其中药物蛋白或多肽经修饰，以致于在细胞与所述蛋白或多肽接触之后，所述肽中的一个或多个不再发生结合。

7. 根据权利要求 1 到 6 之任一项的方法，其中根据步骤 (i) 结合于细胞或胞吐小泡表面上的肽是与 MHC 分子相结合的形式，并且其中根据步骤 (ii) 对所述细胞或其胞吐小泡的分析采用 MS 来完成。

8. 根据权利要求 1 到 6 之任一项的方法，其中根据步骤 (i) 结合于细胞或胞吐小泡表面上的肽是胞内肽酶和运输途径的产物。

9. 根据权利要求 1 到 8 之任一项的方法，其用于开发具有降低的免疫原性的药物蛋白或多肽，其中通过消除或降低免疫原性肽与 MHC 分子的结合，并任选地如权利要求 1 所述测试修饰肽与细胞表面的结合，完成对免疫原性肽的修饰。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中通过在药物蛋白或多肽内的所述肽的序列区域中替代、插入或缺失一个或多个氨基酸残基来消除或降低所述肽与 MHC 分子的结合。

11. 根据权利要求 1 到 8 之任一项的方法，其用于开发具有增强的免疫原性的药物蛋白和多肽，其中通过增强所述肽与 MHC 分子的结合，并任选地如权利要求 1 所述测试修饰肽与细胞表面的结合，完成对所述肽的修饰。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中通过在所述肽的序列区域中替代、插入或缺失一个或多个氨基酸残基以提高该肽作为 T 细胞表位的活性、和/或扩大限制该 T 细胞表位的 MHC 类型的范围、和/或把几个完全不同的表位组合成单一的实体来加强所述肽与 MHC 的结合。

13. 开发疫苗的方法，按如下步骤实施：

(i) 使具有免疫原活性的蛋白质或多肽或微生物与细胞接触，在所述细胞或其胞吐小泡上产生一个表面肽库，此库不同于未进行接触的参考细胞上展示的表面肽库，

(ii) 分析表面结合有肽的所述细胞或其胞吐小泡，

(iii) 根据标准方法确定归属于该蛋白或多肽的序列中的所述肽，和

(iv) 根据标准方法，通过把一个或多个所述肽并入疫苗分子的序列中，构建编码最终药物疫苗的序列变体，其中对所述细胞或其胞吐小泡的分析采用 MS 进行。

14. 根据权利要求 1 到 13 之任一项的方法，其中使用经工程化产生 MHC 分子的人细胞系。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中未经工程化的亲本细胞系不产生 MHC 分子。

16. 根据权利要求 14 的方法，其中亲本细胞系不产生 MHC I 类分子。

17. 根据权利要求 14 的方法，其中亲本细胞系不产生 MHC II 类分子。

18. 根据权利要求 1 到 13 的方法，其中对不产生自身 MHC 分子的非人源细胞进行工程化以使其产生 MHC 分子，并按所述使用这些细胞。

19. 根据权利要求 1 到 18 之任一项的方法，其中 MHC 分子来自 MHC II 类。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中 MHC 分子是 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP。

21. 根据权利要求 1 到 18 之任一项的方法，其中 MHC 分子来自 MHC I 类。

22. 根据权利要求 19 的方法，其中使用提供全面包括了不同 MHC 同种异型和基因型的混合物的细胞系或细胞样品组合。

23. 根据权利要求 1 到 22 之任一项的方法，其中所述肽来源于外源蛋白质或微生物。

24. 根据权利要求 1 到 22 之任一项的方法，其中所述肽来源于内源蛋白质。

25. 根据权利要求 1 到 24 之任一项的方法，其中使用加入蛋白质或多肽或微生物之后在 MHC 分子上呈递肽的人树突细胞或其胞吐小泡。

26. 根据权利要求 1 到 24 之任一项的方法，其中使用加入蛋白质或多肽之后在 MHC 分子上呈递肽的人抗原呈递细胞或其胞

吐小泡。

27. 根据权利要求 1 到 26 之任一项的方法,其中在分析肽之前富集 MHC 分子。

28. 根据权利要求 1 到 27 之任一项的方法,其中在分析之前将肽从细胞表面洗脱下来。

29. 根据权利要求 1 到 27 之任一项的方法,其中在分析之前将肽从 MHC 分子上洗脱下来。

30. 开发诊断试验的方法,通过如下步骤实施:

(i) 分析适当人细胞的表面肽,和

(ii) (a) 制备出现在该细胞表面上的肽谱,和任选地,与其它谱进行比较以鉴定与该人细胞有关的异常或疾病,或, (b) 测定该细胞表面上特定肽的序列,作为一种手段以确定可以用于鉴定与该人细胞有关的异常或疾病的特定肽。

31. 通过权利要求 1 到 8 之任一项的方法获得的蛋白质或多肽作为药物治疗实体的用途。

32. 通过权利要求 11 到 13 之任一项的方法获得的蛋白质或多肽作为疫苗的用途。

33. 通过权利要求 9 或 10 的方法获得的蛋白质或多肽作为具有降低的免疫原性的药物治疗实体的用途。

34. 检测细胞或其胞吐小泡表面上来源于蛋白质或多肽的肽的方法,通过如下步骤实施:

(i) 使细胞与所述蛋白质或多肽或编码该蛋白质或多肽的基因接触,在该细胞或其胞吐小泡上产生一个表面肽库,该库不同于未进行接触的参考细胞上展示的表面肽库,

(ii) 分析表面上结合有所述肽的所述细胞或其中的胞吐小泡,和

(iii) 根据标准方法确定归属于该蛋白或多肽的序列中的所述肽,其中对细胞或胞吐小泡的分析通过 MS,优选 MALDI-MS 进行。

细胞呈递的肽

本发明涉及把蛋白质加到细胞中后测定呈递在哺乳动物细胞表面的肽的方法。本发明也涉及基于此肽的测定的诊断试验或由这些肽的测定导致的修饰分子，这些修饰分子例如药物实体优选具有特定的生物学活性并且与相应的未加修饰的分子相比具有降低的或增加的免疫原性。根据本发明的方法优选以利用质谱分析（MS）的工具来建立。

哺乳动物细胞摄取蛋白质（或细胞内产生特异蛋白质）之后，蛋白质将随后被降解，而且通常这些蛋白质的肽段（常与其它蛋白结合在一起）会出现在细胞表面。具体地，可以降解蛋白肽段，随后某些肽与主要组织相容性复合体（MHC）分子结合，在许多情况下，它们能被 T 细胞识别以启动免疫应答。这样的免疫应答可以是有益的，例如当免疫系统对导出该肽段的特异蛋白的产生细胞实施消除时；也可以是有害的，例如当免疫系统产生与特异蛋白（例如药物蛋白质）结合并限制其活性的抗体时。

迄今为止，对于一个给定的蛋白，还不可能准确地预测出降解将发生在蛋白质的哪个位置，以致也不能可靠地预测出展示在细胞表面的确切肽段。对于 MHC 分子，在预测与 MHC 结合的肽基序方面已取得了一些成功，但实际上，其中一些肽在接触 MHC 分子之前就被降解并且目前尚不能可靠地预测哪些肽会被降解。因此，检测细胞表面肽的标准方法是把这些肽洗脱下来并随后对其测序。这些方法不属于常规方法，而且在需要分析多个细胞类型或多个 MHC 分子上的细胞表面肽时也是不切实际的。

本发明的一个目的是提供检测细胞表面肽，尤其是多种 MHC 分子所呈递的肽的方法。此外，本发明的另一个目的是将这些信息用于设计药物分子或者疫苗分子，或者用于诊断试验。

对于药物分子，本发明的一个具体目的是鉴定细胞摄取或产生蛋白质之后由 MHC 分子呈递的肽，并用这些信息来改变该蛋白质以便这些肽不

再被呈递。

对于疫苗分子，本发明的一个具体目的是鉴定细胞摄取或产生蛋白质之后由 MHC 分子呈递的肽，并将一个或多个这样的肽用在疫苗分子中以便刺激免疫系统。

对于药物和疫苗分子两者而言，本发明的一个具体目的是鉴定由多种不同 MHC 分子呈递的肽以便包括不同群体中的不同同种异型和基因型变体。

对于诊断试验，本发明的一个具体目的是测定细胞摄取或产生蛋白质之后由 MHC 分子呈递的肽，并利用此测定作为检测生物学或生理学事件的试验（例如感染的检测试验）的基础。

对于诊断试验，本发明的一个具体目的是鉴定由测试个体的细胞呈递的肽。

本发明为精确而全面地分析细胞表面肽，尤其是与 MHC 分子结合的肽提供了条件。细胞表面上的肽谱或肽的身份特别可以用质谱分析（MS）来确定。

先前 MHC/肽复合物已被纯化用于特定目的。事实上，对于 MHC I 类和 II 类分子，它们的免疫富集和纯化方法一直是阐明肽 - MHC 结合相互作用以及阐明 MHC 结合基序的有用工具。有关的实例包括 US 5,989,565 和 US 6,077,519，其中提供了通过酸洗脱患者肿瘤细胞或树突细胞群表面的肽来鉴定自体 T-细胞表位的方法。洗脱下来的肽的序列对于设计用于制备疫苗的合成肽是有用的。

相似地，Salter 等[US 5,487,982]提供了遗传工程温度敏感型 MHC I 类分子，从而使得可以容易地从体外生长的工程细胞上除去与此突变的 MHC I 类分子结合的肽。

本领域的其它例子包括 Langlade-Demoyen 等[WO9744667]，他们将纯化的 MHC-肽复合物作为亲和试剂用于富集可在体内和体外肿瘤免疫疗法中和其它用途中使用的肿瘤特异性 T-细胞。相似地，US 5,763,585，US 5,734,023 以及另外的一些提供了纯化特定 MHC 肽复合物的方法，其中所

述复合体可以作为治疗实体用于比如自身免疫疾病的治疗中；Deshpande等[WO9740852]公开了与MHC II类蛋白有增强的结合作用的修饰肽，而且当该复合体作为重组融合蛋白提供时，还预期用于治疗与自身反应性T-细胞有关的疾病。

WO9734143和US5,792,604提供了鉴定由细胞分泌途径内源性加工的MHC I类限制性抗原的方法。这个生物学试验需要接触过抗原的细胞毒性T细胞和作用“指示剂”的靶细胞源，其中分泌到培养基中的经加工的肽将指导所述靶细胞发生溶胞作用。这个方案可用于鉴定能影响供体细胞的内源性加工途径的物质。用于鉴定MHC I类和MHC II类限制性T细胞表位的另外一些复杂的以生物学为基础的方案包括WO 00/67761，它提供了利用遗传疫苗接种以及树突细胞和脾细胞的分离进行体外生物学T细胞激活试验的方法。

本发明人认识到基于MS的仪器可以用于分析完整细胞或细胞抽提物，并且可以把数据应用于治疗性分子或诊断试验的合理开发途径中。

生物来源的复杂大分子只有在被电离后，它们才易于接受质谱分析(MS)。在对用于MS的生物分子进行电离时，有两个方法可供选择，即电喷射离子化(ESI)和基质辅助激光解析离子化(MALDI)，它们已成为本领域的公认技术。在ESI中，将样品泵过带电荷的窄毛细管，通过平行气流使之雾化，直到最终静电排斥使分析物离子解吸进入质谱仪。ESI是一项连续的流式技术，因此易于连接上游样品分离技术例如液相层析(LC)或毛细管电泳(CE) [Cao & Moini (1998) Am. Soc. Mass Specrom. 9: 1081-1088]。这些特征与MALDI-MS技术有明显差别，后者是把样品埋在仪器样品板上的结晶基质材料中。通过激光激发基质实现电离作用，解吸附的分析物离子被加速进入质量分析仪。因此MALDI是一个不连续的过程，使用多重激光脉冲产生离子，数据累积地收集在质量分析仪中。

对于MALDI，最通常的是通过飞行时间(TOF)检测器来实现质量分析，这种仪器测量从致电离激光脉冲到实现检测之间的飞行时间，从而使得可以计算质量电荷比(m/z)。在不同的商业仪器中，对这些检测器进行了多

种技术改进。一些型号能够分析源后衰变 (post-source decay) 离子碎片用于肽序列推导和其他结构测定。尽管可以利用其他仪器样式, 但基于 ESI 的仪器的连续流式本质使扫描分析仪得到应用 (例如四极或扇形磁场 (magnetic sector) 质量分析仪)。一个典型样式是串联 MS 系统, 借此两个质量分析仪串联排列并通过一个含有惰性气体的“碰撞室”相互连接。后一个特征使得能够产生由碰撞引起的衰变离子和测定给定输入样品的肽序列。可以安排多重杂合的仪器样式用于分析细胞表面 (MHC) 结合的肽。

在分析从 MHC 分子 (尤其是 MHC I 类分子) 上洗脱的肽时已经应用到 MS, 参见 Cox 等的综述 [Cox, A. L. 等 (1997), pp 141-160, 《MHC1 : A Practical Approach》 Fernandez N. & Butcher G. 编, Oxford University Press, Oxford, 英国]。De Jong 给出了本领域的更为新近的综述 [De Jong, A. (1998) Mass Spectrometry Reviews 17: 第 311-335 页]。因此, 在用麻疹病毒疫苗处理细胞后, 分析从 MHC II 类等位基因 DRB1*0401 上酸洗脱下来的自身肽时, Ovysyannikova 等利用了 MALDI-TOF 方法 [Ovysyannikova 等 (2001) J. Immunol. Methods 246: 第 1-12 页]。相似地, 在鉴定小鼠朗氏细胞上与 MHC II 类结合的肽时, Sickman 等使用了 LC 和 MALDI-MS 技术的联合 [Sickman, A. 等 (2000) Analyst 125 : 第 569-573 页]。

然而, 本发明吸收和发展了所有这些现有技术, 使用基于 MS 的仪器, 第一次提出了一个通用方案用于阐明与 MHC I 类和 MHC II 类分子结合的肽的类型。在第一个实施方案中, 本发明提供了通过肽序列内的氨基酸替代除去结合相互作用以开发治疗性蛋白质的方法, 其中所述治疗性蛋白质当对测试对象 (最优选地人类对象) 给药时, 不具有或具有降低的引起 MHC 介导的免疫应答的能力。本发明的一个目的是提供用于开发治疗性分子的方法, 当对测试对象给药时, 这种治疗分子具有降低的引起免疫应答的能力。

本发明的一个目的是提供检测细胞表面肽的方法, 尤其是在所述肽与 MHC 分子结合时。

本发明的一个目的是提供检测呈递在细胞表面、形式上与 MHC 分子结

合的肽的方法。

本发明的一个目的是提供检测呈递在细胞表面、与多种不同的 MHC 分子结合的肽的方法。

本发明的一个目的是提供检测来自外源蛋白由此与 MHC 分子结合的肽的方法。

本发明的一个目的是提供检测来自内源蛋白由此与 MHC 分子结合的肽的方法。

本发明的一个目的是提供在经过如下过程后检测细胞表面上的肽的方法，所述过程是：使目的细胞接触外源蛋白或外源微生物，以致这些细胞的表面肽库不同于参考细胞（除了没有接触过外源蛋白外与上述细胞相同的细胞）表面展示的肽库。

这些外源蛋白可以是抽提自哺乳动物源（例如细胞系或离体组织）的纯化制品，或者可以是工程化后表达所述蛋白的任何生物源中纯化得到的重组制品。该蛋白可以是天然存在的蛋白或一个或多个天然蛋白的融合物。该蛋白可以是体外来源的，即是天然元件的组装，或者是完全合成的或设计的，在自然界中无对应物存在。

这些外源蛋白可以是例如一类蛋白，例如抗体分子及其衍生物、细胞因子、生长因子、白三烯、止血因子 (haemostatic factor)，或者可以是细胞毒素或者具有酶的能力或功能。最优选的蛋白是治疗性蛋白质。

应认识到，针对治疗性蛋白质所诱导产生的不利免疫应答已经限制了几种治疗性蛋白质的效能。实施包括单克隆抗体 [Schroff, R. W. 等 (1985) *Cancer Res.* 第 45 卷: 第 879-885 页; Shawler, D. L. 等 (1985) *J. Immunol.* 第 135 卷: 第 1530-1535 页] 以及一些人源蛋白例如尤其是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 [Wadhwa, M. 等 (1999) *Clin. Cancer Res.* 第 5 卷: 第 1353-1361 页] 和干扰素 $\alpha 2$ [Russo, D. 等 (1996) *Br. J. Haem.* 第 94 卷: 第 300-305 页; Stein, R. 等 (1988) *New Engl. J. Med.* 第 318 卷: 第 1409-1413 页]。因此，十分需要建立能够鉴定参与诱导针对治疗性蛋白质的免疫应答的决定簇的方法。

诱导免疫应答产生的一个主要因素是蛋白质中存在通过呈递在 MHC II 类分子上能够刺激 T 细胞活性的肽，即所谓的 T 细胞表位。为了消除或降低免疫原性，所期望的是鉴定和除去蛋白质上的 T 细胞表位。本发明的一个目的是提供能够检测和鉴定 T 细胞表位的方法。

外源蛋白被吞噬和加工后，与 DR、DQ 或 DP 型 MHC II 类分子结合进行呈递。MHC II 类分子由专业抗原呈递细胞（APCs），例如尤其是巨噬细胞、树突细胞表达。肽与特定的 MHC II 类分子结合以便呈递在 APC 表面的能力取决于许多因素，其中最值得注意的是肽的一级序列。这不但影响到它接受蛋白酶剪切的倾向，而且影响到它与 MHC II 类分子的肽结合裂隙的结合亲和力。APC 表面上的 MHC II 类分子/肽复合物呈递给特定 T 细胞受体（TCR）一个结合面，所述 TCR 能够识别由肽和 MHC II 类分子的暴露残基共同提供的决定簇。本领域有一些方法可以用来鉴定能够与 MHC II 类分子结合的合成肽。由于加工途径或其他现象，这些合成肽并非在所有情况下（尤其在体内）都可以起到 T 细胞表位的作用。本领域还有一些计算机方法可以用来预测潜在的 T 细胞表位或者识别实验测定的 T 细胞表位中的序列基序。方案包括 W098/52976 提供的预测 MHC II 类分子结合肽的技术，它是用计算机穿线法来鉴定只与可能的人 MHC II 类 DR 同种异型亚群有潜在结合能力的肽序列。

正如 W098/52976 和 WO00/34317 中认识到的，鉴定 T 细胞表位是消除表位的第一步。在这些文献中，通过在治疗性蛋白质一级序列内应用合理的氨基酸替代来除去预测的 T 细胞表位。本发明的一个目的是提供开发修饰蛋白质的方法，其中通过减少潜在 T 细胞表位的数目来改变免疫特征。本发明所鉴定的序列是在经历存在于任何具备能力的 APC 或类似细胞中的天然胞内加工事件之后呈递在携带 MHC 的细胞表面或者与 MHC 制品结合的肽序列。而且，根据本发明方案鉴定的肽可以检测自任一种 MHC 同种异型或同种异型的混合物（包括，对于 MHC II 类分子而言，具有 DR、DQ 或 DP 特异性的那些）。

虽然本发明为检测展示在细胞表面、尤其是与命名为 I 类和 II 类的

MHC 分子结合的肽提供了可能，但并不旨在被限制于完整细胞，而是还包括对胞吐小体(exosome)表面的肽的分析。在来源于正常表达 MHC II 类分子的细胞的胞吐小泡(exosomal vesicle)的表面存在高密度的肽 - MHC 复合物。在某些情况下从 APC 表面产生的胞吐小体的量可以增加，而且有一些公知的方法可以用来富集或分离胞吐小体 [Raposo, G. 等(1996) J.Exp. Med.第 183 卷:第 1161-1172 页; Clayon, A.等(2001) J. Immunol. Methods 第 247 卷 : 第 163-174 页]。因此，对 APC 制品和来自 APC 的胞吐小体颗粒制品的分析同等地属于本发明的范围。

总之，本发明涉及以下方面：

· 用于开发具有特定的生物学活性且与具有相同生物学活性的任何未修饰的蛋白质或多肽相比具有降低的或增加的免疫原性的药物蛋白质或多肽或疫苗抗原的方法，该方法通过如下步骤实施：

(i) 使所述蛋白或多肽与细胞接触，在该细胞或其胞吐小泡上产生一个表面肽库，该表面肽库与未进行接触的参考细胞上展示的表面肽库不同，

(ii) 针对结合于所述细胞或其胞吐小泡表面的肽，分析所述细胞或其胞吐小泡，和

(iii) 根据标准方法，确定归属于该药物蛋白质或多肽或疫苗抗原序列中的所述肽。

· 还包括如下步骤的相应方法：

(iv) 修饰所述肽，以期改变它们与 MHC 分子的结合，和

(v) 根据标准方法，通过将一个或多个修饰肽序列并入所述蛋白或多肽分子的序列中，构建编码最终的药物蛋白质或多肽的序列变体。

· 相应的方法，其中步骤 (ii) 对所述细胞或其胞吐小泡的分析通过质谱 (MS)，优选 MALDI-MS 和 ESI-MS 来完成。

· 相应的方法，其中药物蛋白质或多肽经修饰，以致在所述蛋白质或多肽与细胞接触后所述肽中的一个或多个不再与 MHC 分子结合。

· 相应的方法，其中根据步骤 (i) 结合在细胞或胞吐小泡表面的肽是

与 MHC 分子相结合的形式，并且其中根据步骤 (ii) 对所述细胞或其胞吐小泡的分析采用 MS 来完成。

· 相应的方法，其中根据步骤 (i) 结合在细胞或胞吐小泡表面的肽是胞内肽酶和运输途径的产物。

· 用于开发具有降低的免疫原性的药物蛋白质或多肽的相应方法，其中通过消除或降低免疫原性肽与 MHC 分子的结合，并任选地如权利要求 1 所述测试修饰肽与细胞表面的结合，完成对免疫原性肽的修饰。

· 相应的方法，其中通过在所述药物蛋白质或多肽内的所述肽的序列区域中替代、插入、缺失一个或多个氨基酸残基来消除或降低所述肽与 MHC 分子的结合。

· 用于开发具有增强的免疫原性的药物蛋白质或多肽的方法，其中通过增强所述肽与 MHC 分子的结合，并任选地如权利要求 1 所述测试修饰肽与细胞表面的结合，实现对所述肽的修饰。

· 相应的方法，其中通过在所述肽的序列域中替代、插入、缺失一个或多个氨基酸残基以提高该肽作为 T 细胞表位的活性、和/或扩大限制该 T 细胞表位的 MHC 类型的范围、和/或把几个完全不同的表位组合成单一的实体来加强所述肽与 MHC 的结合。

· 开发疫苗的方法，按如下步骤实施：

(i) 使具有免疫原活性的蛋白质或多肽或微生物与细胞接触，在所述细胞或其胞吐小泡上产生一个表面肽库，此库不同于未进行接触的参考细胞上展示的表面肽库，

(ii) 分析表面结合有肽的所述细胞或其胞吐小泡，

(iii) 根据标准方法确定归属于该蛋白质或多肽的序列中的所述肽，
和

(iv) 根据标准方法，通过把一个或多个所述肽并入疫苗分子的序列中，构建编码最终药物疫苗的序列变体，其中对所述细胞或其胞吐小泡的分析是采用 MS 进行的。

· 相应的方法，其中使用经工程化产生 MHC 分子的人细胞系。

- 相应的方法，其中亲本（未经工程化的）细胞系不产生 MHC 分子。
- 相应的方法，其中亲本细胞系不产生 MHC I 类分子。
- 相应的方法，其中亲本细胞系不产生 MHC II 类分子。
- 相应的方法，其中对不产生自身 MHC 分子的非人源细胞进行工程化以使其产生 MHC 分子，并按所述使用这些细胞。
- 相应的方法，其中 MHC 分子来自 MHC II 类。
- 相应的方法，其中 MHC 分子是 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP。
- 相应的方法，其中 MHC 分子来自 MHC I 类。
- 相应的方法，其中使用细胞系或细胞样品的组合，所述组合提供了全面地包括不同 MHC 同种异型和基因型的混合物。
- 相应的方法，其中所述肽来源于外源蛋白质或微生物。
- 相应的方法，其中所述肽来源于内源蛋白质。
- 相应的方法，其中使用加入蛋白质或多肽或微生物之后会在 MHC 分子上呈递肽的人树突细胞或其胞吐小泡。
- 相应的方法，其中使用加入蛋白质或多肽或微生物之后会在 MHC 分子上呈递肽的人抗原呈递细胞或其胞吐小泡。
- 相应的方法，其中在分析肽之前先富集 MHC 分子。
- 相应的方法，其中在分析之前先将肽从细胞表面洗脱下来。
- 相应的方法，其中在分析之前先将肽从 MHC 分子上洗脱下来。
- 相应的方法，其中使用 MALDI-MS。
- 相应的方法，其中使用 ESI-MS。
- 开发诊断试验的方法，通过如下步骤实施：
 - (i) 分析适当人细胞的表面肽，和
 - (ii) (a) 制备出现在该细胞表面上的肽谱，和任选地，与其它谱进行比较以鉴定与该人细胞有关的异常或疾病，或，(b) 测定该细胞表面上的特定肽的序列，作为一种手段以确定可以用于鉴定与该人细胞有关的异常或疾病的特定肽。
- 通过上述任一种方法获得的蛋白质或多肽作为药物治疗实体的用

途。

- 通过上述任一种方法获得的蛋白质或多肽作为疫苗的用途。
- 通过上述任一种方法获得的蛋白质或多肽作为具有降低的免疫原性的药物治疗实体的用途。
- 检测细胞或其胞吐小泡表面上来源于蛋白质或多肽的肽的方法，按如下步骤实施：

(i) 使细胞与所述蛋白质或多肽或编码该蛋白质或多肽的基因接触，在该细胞或其胞吐小泡上产生一个表面肽库，该库不同于未进行接触的参考细胞上展示的表面肽库，

(ii) 分析表面上结合有所述肽的所述细胞或细胞中的胞吐小泡，和

(iii) 根据标准方法确定归属于该蛋白质或多肽的序列中的所述肽，其中对细胞或胞吐小泡的分析通过 MS，优选 MALDI-MS 进行。

因此，根据本发明第一主要实施方案的路线的程序在于应用本文的方法：

1. 鉴定目标蛋白氨基酸序列内的一个或多个可被加工的 T 细胞表位。

2. 设计目标蛋白的新序列变体，使所鉴定的潜在 T 细胞表位中的一个或多个氨基酸被修饰，以实质性地降低或消除 T 细胞表位活性，这可以通过肽与 MHC 分子或完整细胞的结合或其他方式来测定。重要的是，通过一定的方式制备这些序列变体，以避免该序列变体产生新的潜在 T 细胞表位；否则再次修饰这些新的潜在 T 细胞表位，以便实质性地降低或消除 T 细胞表位活性。

3. 构建这些序列变体，测试所述变体以鉴定一个或多个具有期望性质的变体。

根据此路线，可以产生和测试大量变体蛋白，最优选的实现手段是重组 DNA 技术，但也可以考虑其他方法包括化学合成法。预期，可以在给定的潜在 T 细胞表位内进行多个单氨基酸替代以消除表位。可以考虑在单个表位中进行氨基酸替代组合。

在本发明的一个主要方面，使哺乳动物细胞群与测试蛋白一起温育，

或者用编码测试蛋白的基因转染这些细胞，在蛋白被摄取或表达并被降解后，确定细胞表面上的肽谱或肽身份。具体地，MHC 分子，尤其是多种 MHC 分子，可以呈递这些肽。作为本实施方案的一个方面，分析呈递在许多不同 MHC 分子上的肽是重要的；因此，优选在多种细胞群上进行此分析，而所述细胞群包括了在全球群体中发现的 MHC 同种异型和基因型的极大部分。这样的细胞群可以通过从全球群体中采取多种细胞群来获得，也可以通过应用经构建产生多种 MHC 类型的细胞来获得。尤其有用的是那些不产生内源 MHC 分子并且其细胞表面展示低的肽背景的细胞系。

由于人类 MHC 同种异型和基因型的数量巨大，而且每一个都有与来自任一给定蛋白的不同肽谱结合的能力，故之前用于全面鉴定 T 细胞表位的方法（如上所述）主要包括预测方法而非生化方法（测试肽与许多类型的 MHC 的结合）或生物学方法（主要测试肽对 T 细胞的激活或刺激）。对于结合 MHC II 类的肽，这些预测方法包括基序和人工神经网络技术，籍此可以分析大量的 T 细胞表位序列以确定出这些表位共有的氨基酸特异组合，以便用于随后对其他肽的预测分析。但对于 MHC II 类，这些预测方法有局限性，它们常漏掉一部分 T 细胞表位（假阴性）或者把事实上没有 T 细胞表位活性的一些肽定位为 T 细胞表位（假阳性）。预测方法的另一个主要限制（在应用合成肽的生化和生物学方法中也存在）是未能考虑到给定蛋白的加工，而这种加工会影响到哪些肽可被 MHC 分子呈递。因此，需要不会产生明显的假阴性和假阳性、可以精确而全面地鉴定 T 细胞表位的改进方法，在这一点上，本发明为实现这样的改进提供了条件。

对于根据本发明第一个实施方案的人药物蛋白开发，一个具体的应用是制备其上能激活和（或）刺激 T 辅助细胞的表位已被去除的蛋白。在这种情况下主要感兴趣的是被 MHC II 类呈递的肽。为了开发在大部分人都有效的药物蛋白，有必要鉴定蛋白内部能被众多 MHC 同种异型中的一种或多种呈递的肽，然后改变这些肽以除去其与 MHC 结合的能力。以前，由于难于精确预测由 MHC II 类呈递的肽以及难于预测能与大量不同同种异型和基因型人 MHC II 类分子中的一种或多种结合的肽，故限制了对

MHC II类呈递的肽的全面鉴定。对与MHC I类结合的肽的预测更为可靠，与这些肽相比，结合MHC II类的肽在长度上的变化更大，并且在主要结合口袋以外有一些更显著影响肽结合的氨基酸。因此，对MHC II类，为了全面鉴定潜在的T细胞表位，有必要建立比现有可获得的方法更加精确和全面的方法，用于预测或检测与众多MHC II类同种异型和基因型中的一种或多种结合的肽。获得这样一个方法的主要好处是可以产生全部主要（或全部）T细胞表位都得以鉴定然后除去的药物。

应用本发明开发药物的优选方法包括以下步骤：

1.对于可能用作药物的测试蛋白，把其加入到选择的人源细胞系或人源细胞样品中。

2.经过一段适当时间后，分析细胞的表面肽，尤其是在细胞上直接应用MALDI-MS、或者在细胞组分（尤其是MHC组分）上应用MALDI-MS、或者在将肽从细胞表面洗脱下来后应用尤其是MALDI-MS或ESI-MS进行分析。

3.从给定的蛋白出发，确定出展示于细胞表面上属于测试蛋白的肽。

4.修饰在（2）中展示在细胞表面的肽，以消除其与MHC分子的结合，在某些情况下，测试修饰肽与细胞表面的结合情况（见上）。

5.把适当修饰并入蛋白序列的一个或多个肽中以消除其与MHC分子的结合，产生最终的药物蛋白分子。

根据本发明的第二个主要实施方案，提供了可供开发疫苗分子或能作为疫苗起作用的分子的路线。尽管本路线可以同样地应用于开发疫苗分子来治疗或预防非人物种的疾病；但最优选开发用于人的疫苗。对于使用本发明进行的疫苗开发，一个具体的应用是制备如下肽或蛋白，它们具有激活和/或刺激T-细胞的主要表位，主要是T辅助细胞表位但对需要杀伤细胞的应用还有细胞毒性T细胞表位（主要是MHC I类限制的）。为了开发在大部分人中都有效的疫苗，有必要鉴定蛋白质中能被众多MHC同种异型和基因型中的一种或多种呈递的肽，然后从这些肽中选择一个或多个表位包括在最终疫苗分子里。这些表位可以包含被MHC I类限制或被

MHC II 类限制或被二者限制的肽。本发明为鉴定 MHC I 类和 MHC II 类呈递的肽的提供了条件，因此构成开发更有效疫苗的基础。

MHC I 类表位和 MHC II 类表位的一个主要区别是通常产生 MHC-肽复合体中的肽的蛋白质的主要来源不同。据认为，外源蛋白主要导致产生与 MHC II 类结合的肽，而在细胞内表达的内源性蛋白由不同的肽酶和胞内运输途径加工，主要导致在细胞表面与 MHC I 类分子结合的肽。对于外源或内源蛋白，在一连串加工步骤过程中，来自蛋白的、可能正常与 MHC 结合的某些肽序列可以被破坏，以致于体内无法产生某些 T 细胞表位。对于这些肽，预测（或生化/生物学）方法在鉴定 T 细胞表位时不能考虑到加工过程。本发明的一个特征是从细胞表面鉴定到的肽是那些能够经过胞内加工和运输途径被 APC（或其他细胞）选择的肽。因为本发明集中于鉴定加工事件的真实产物，所以与使用预测或体外表位鉴定方法时相比，本发明降低了鉴定到假阳性和假阴性表位的比率。

因此，根据本发明第二个主要实施方案的路线的程序在于将本文方法应用于：

1. 鉴定目标蛋白氨基酸序列中的一个或多个 T-细胞表位。
2. 设计目标蛋白的新序列变体，其中对一个或多个氨基酸进行修饰以便 a 增加 T-细胞表位活性；和/或 b. 扩大限制 T 细胞表位的 MHC 类型的范围，这可通过肽与 MHC 分子或完整细胞的结合或其他方式来测定；和/或 c. 把几个完全不同的表位组合成单一（更小）实体。
3. 构建这些序列变体并测试所述变体以鉴定具有期望性质的一个或多个变体。

根据此路线，可以产生和测试大量变体蛋白，尽管可以考虑其他方法如化学合成法，但最优选用重组 DNA 技术来进行。

因此，应用本发明来开发疫苗的优选方法包括以下步骤：

1. 对于可能用作疫苗的蛋白，将其加入到选择的人源细胞系或人细胞样品中。
2. 经过一段适当时间后，分析细胞的表面肽，尤其是在细胞上直接应用

MALDI-MS、或者在细胞组分（尤其是 MHC 组分）上应用 MALDI-MS、或者在将肽从细胞表面洗脱下来后应用尤其是 MALDI-MS 或 ESI-MS 进行分析。

3. 从给定的蛋白出发，确定展示于细胞表面上属于测试蛋白的肽。
4. 选择在（2）中展示于细胞表面的一个或多个肽，用在最终疫苗分子中。

可以理解，为了分析细胞表面肽用于药物或疫苗用途，可以使用能提供全面地包括不同 MHC 同种异型和基因型的混合物的细胞系组合或人细胞样品组合，这些天然细胞样品将提供全面地包括了 MHC I 类和/或 MHC II 类限制性表位的混合物。尤其有用的是人树突细胞（或胞吐小体），加入测试蛋白后其可被激活，有效地在 MHC 分子上呈递肽。作为一种可选择方案，可以对人细胞系进行工程化以扩大其 MHC 库，这主要通过把编码一或多种 MHC 类型的基因转染入人源细胞系来实现，由此产生具有多种 MHC 类型的细胞用于细胞表面肽分析。尤其有用的是不产生自身 MHC 分子的非人源细胞，例如其中鼠源 MHC 基因已被缺失或失活的鼠细胞。分析细胞表面肽还可以在分析肽之前包括富集 MHC 分子这一可选择步骤，例如用免疫亲和柱进行富集。对于 MHC II 类，本发明用于细胞表面肽分析的方法有特殊的优势，即它为分析肽与非 DR 的同种异型的结合提供了条件。分析同种异型如 DQ 和 DP 所呈递的肽非常困难，因为目前还没有可以使用的预测方法，特别是对 DQ；据认为，MHC 分子 DQ 的两条链都对结合有贡献（与 DR 中仅涉及 S 链不同）。

根据本发明的第三个主要方面，提供了应用本发明开发诊断试验的路线。本实施方案的一个具体应用是制备呈递在细胞表面的肽谱，用以鉴定可能指示特定疾病或细胞受损的肽的异常存在、缺失或者式样。

因此，本发明的一个目的是提供经如下过程后检测细胞表面肽的方法，所述过程为：使感兴趣的细胞与外源蛋白或生物体或其他试剂接触，以致于它们的表面肽库不同于没有接触过外源蛋白或生物体的相同细胞的表面肽库。在本发明的实际应用中，可以通过把指示肽的质量登记入 MS 仪器

的质谱中，或者把指示肽的序列记入 CID（或类似）谱中，分解出“诊断肽”或“指示肽”的存在。同样的，可以参考来自未接触外源蛋白或试剂的参考样品的质谱来显示指示肽的存在。在指示肽的质量未知或者无法用任何手段预测的情况下，此比较分析尤其有价值。可以利用 *in silico* 方式通过减去一致的质量峰，进行比较分析，当失去特定质量峰可作为诊断指示时，此比较分析尤其具有价值。其他人也曾在生物样品的比较分析中利用 MS 技术。但是，就 Liotta 等[W00049410]而言，此比较分析集中于通过激光捕获显微切割技术（laser capture microdissection）获得的各个细胞的蛋白质内容。这是与本发明不同的，本发明在于根据从细胞表面上检测到的肽，尤其是细胞表面上与 MHC 分子结合的肽来进行诊断（比较、扣除或其他）。

应用 MS 技术的其他诊断方法包括 Little 等[US, 6,207,370]，他们开发了一个基于 MS 的诊断方法用于鉴定遗传疾病（即，个体的天生体质特征，而不是后天的情况和状态）。这个方法可以鉴定目标蛋白的质量，基于个体的遗传构成不同，群体中这个蛋白的质量是可变的。Geng 等 [Geng, M. (2000) *J.ChromatographyA*.第 870 卷: 第 295-313 页]公开了另外一种诊断方案，他们分析从血清蛋白样品的胰蛋白酶消化物获得的 MALDI-TOF 谱。他们的方法是探测“信号肽”，由此“信号肽”可以在复杂混合物中诊断出分析物蛋白的存在。这也是与本发明不同的，本发明在于根据从细胞表面上探测到的肽，尤其是在细胞表面与 MHC 分子结合的肽来进行诊断（比较、扣除或其他）。

因此，根据本发明的此路线，用于开发诊断试验的优选方法包括以下步骤：

- 1.分析适当人细胞的表面肽，尤其是在细胞上直接应用 MALDI-MS、或者在细胞组分（尤其是 MHC 组分）上应用 MALDI-MS、或者在将肽从细胞表面洗脱下来后应用尤其是 MALDI-MS 或 ESI-MS 进行分析。

- 2.制备展示于细胞表面的肽谱，如果需要的话，与其他谱进行比较以鉴定与此人细胞相关的异常或疾病；或者，对细胞表面特异肽的序列进行

确定, 作为一种手段来确定可用以鉴定与此人细胞相关的异常或疾病的特异肽。

对于本发明的所有实施方案, 得到完整序列对于确定肽的身份不是至关重要的, 因为有容易得到的、内容不断增加的各种蛋白序列数据库。少量内部序列信息(可以少到 2-3 个残基)与母体离子的已知质量联系在一起, 可足以表征一个肽的种类。已知目前有一些算法可用于检索未中断碎片离子数据集的数据库。其中有影响的实例包括 ProteinLynx Global Server 检索算法(Micromass, Wythenshawe, 英国)、来自 Matrix Science [www. matrix. Com] 的 Mascot、或者 Protein Prospector 软件包 (<http://prospector.ucsf.edu>) 或类似的算法。这些程序根据目的肽的质量来模拟数据库内序列条目的片段化。

我们将用以下非限制性实施例来进一步阐释本发明。

实施例 1

使用 MALDI-TOF 检测与细胞表面 HLA-DR 结合的肽的方法

从 ECACC (Porton Down, 英国)获得 EBV 转化的人 B 细胞系 JESTHOM 和 BSM。B 细胞系 JESTHOM 是 HLA-DR1*0101 的纯合体, 细胞系 BSM 是 DRB1*0401 的纯合体。用供应商推荐的条件体外培养细胞系。在供应商推荐的条件下培养的鼠 NSO 细胞(ECACC 85110503)用作阴性对照细胞系。

从 Zeneca (Zeneca LSM, Northwich, 英国)得到合成肽。肽 HA1 是 13 肽, 与流感病毒血凝素蛋白的第 307-319 位残基对应(Rothbard, J. B.等(1988) Cell 52 : 515)。肽 MP1 是 13 肽, 与流感病毒基质蛋白的第 17-29 位残基对应[Rothbard, J. B.等(1988) 同上]。虽然这两个肽都已知可以与大量不同的 HLA-DR 特异性结合, 但观察到与 DR4 同种异型有不同的结合。MP1 与 DR4 结合而 MP1 没有表现出与 DR4 特异性的显著结合[Busch R.等(1990) Inf. Immunol. 2: 443]。

在一些实验中, 使用含有不稳定的生物素接头部分的类似肽。在这些实验中, 接头生物素-HPDP(Pierce, Chester, 英国)与 N-端半胱氨酸残基偶

联产生肽 HA1 B 和 MP1 B。这些序列与 HA1 和 MP1 相比除了此附加的半胱氨酸残基外均是一致的。除了偶联肽的纯化使用 HPLC 和标准洗脱分布图之外，使用与生物素-HPDP (Pierce,Chester, 英国)一起提供的方案实现偶联。用纯化的单克隆抗体 LB3.1 [ATCC 号 HB-298]进行抑制实验。该抗体使用蛋白质 A sepharose (Millipore, Conset, 英国)亲和层析和供应商推荐的方法从杂交瘤 LB3.1 条件培养基中纯化得到。杂交瘤用标准条件维持。LB3.1 在最大浓度 10 μ g/ml 下与肽和细胞共温育。

在测试与对照实验中，在用不同的合成肽处理之前，细胞在多聚甲醛中固定。在 50 μ l 完全培养基中用 3 \times 10⁶ 个细胞进行实验，此培养基中添加有 150 μ l 含终浓度为 50 μ M 的肽的肽结合缓冲液（50mM 磷酸盐柠檬酸盐缓冲液，pH4.0；0.1%NP40）。在 37 $^{\circ}$ C 温育 24 小时。为进行分析，离心收获肽处理过的细胞并用 PBS 洗 3 次。把细胞加入 0.5ml 微型离心管内，管中含有 50%乙腈-0.1%三氟乙酸的 10 μ l 等分试样。随后，在将样品点加在 MALDI 仪器样品盘上之前，剧烈混合每个样品 5 秒钟。在点加样品时使用两层法，其中，使 1 μ l 酸基质溶液（在 1:1:1 乙腈、甲醇和水的混合物中的 0.1M 芥子酸）在 MS 样品盘上变干。在这之后干燥 1 μ l 细胞和另外 1 μ l 芥子酸基质溶液。

在使用含有不稳定的接头质量标签的合成肽进行的实验中，通过在含有 100mM β -巯基乙醇（BME）的 PBS 中温育细胞来去除接头。与 BME 的温育在 37 $^{\circ}$ C 下进行 30 分钟；然后象之前一样，在将细胞加到 MALDI 样品盘上之前，用 PBS 洗细胞 3 次。

以阳离子模式使用 Voyager DE 质谱仪 (Perseptive Biosystems, Foster City, CA,美国)。用马心脏 apomyoglobin 和牛血清白蛋白 (Sigma, Poole, 英国)的混合物来校准仪器，在每次分析之前不足 30 分钟时进行检查，以便对于每一个标准品均在 0.1% 质量精度范围内。样品点在空气中干燥并在阳离子模式下分析。延迟萃取 (delayed extraction) 设定为 25kV 下 150ns，低质量阈值设定为 600Da。对于每个样品累积总共 125 次激光照射。

在 JESTHOM 细胞产生的谱中鉴定到肽 HA1 和 MP1 的预测质量峰。与之不同，从表达 HLA DR4 的 BSM 细胞中只能鉴定到肽 HA1。在实验中使用标记的肽时，在 BME 处理过的细胞的谱中鉴定到肽峰的质量迁移。虽然在用肽、标记的肽和 LB1.1 抗体的 3-方面竞争分析中可以发现相对离子丰度降低的一些迹象，但来自 LB1.1 温育过的细胞（抑制实验）的谱显示出抗体处理不能破坏肽的结合。来自用肽或肽组合物处理的鼠 NSO 细胞的谱显示出非常低丰度的目标离子峰，这提示细胞处理过程中有非特异的相互作用和/或洗涤不充分。

实施例 2

使用 MALDI-TOF 分析与 MHC DR 结合的肽的方法

通过免疫亲和层析从 JESTHOM 细胞膜上纯化出 HLA-DR1*0101。从 BSM 细胞中纯化出 HLA DRB1*0401。用以前描述的方法制备和处理溶解的细胞膜[Gorga 等 (1987) J. Biol. Chem. 第 262 卷: 第 16087-16094 页; Sette 等 (1989) J. Immunol.第 42 卷: 第 35-40 页]。抗-DR 单克隆抗体 LB3.1[ATCC 号 HB-298]用作免疫亲和试剂。该抗体用蛋白 A sepharose (Millipore, Conset, 英国)亲和层析和供应商提供的方法从杂交瘤 LB3.1 条件培养基中纯化得到。杂交瘤在标准条件下维持。用 InVitrogen (InVitrogen,Groningen NL)提供的 Linx 系统和供应商推荐的条件下,使 LB3.1 抗体与 sepharose 4B (Pharmacia Biotech, St. Albans, 英国)偶联。

将实施例 1 中所述的合成肽 HA1 和 MP1 与 HLA-DR1*0101 制品的 50 μ l 等分试样一起温育。肽以终浓度 50 μ M 在肽结合缓冲液 (50mM 磷酸盐柠檬酸盐缓冲液, pH4.0; 0.1% NP40) 中 37 $^{\circ}$ C 下实施此温育 26 小时。使用微量离心过滤器(Millipore, 美国)进行超滤并用 PBS 进行多轮(最少 4 轮)洗涤, 去除未结合的肽。将终体积减少到 20 μ l。在一些实验中, 在 MALDI-TOF 分析之前把肽从 MHC 上洗脱下来。在这种情况下, 通过用 0.1% TFA 水溶液抽提来进行洗脱。将洗脱物蒸干并直接用实施例 1 中的 MALDI 基质溶液重悬。在另外一些实验中, 将 MHC-肽复合体加载在仪器样品盘上, 在基质溶液中重悬。

在 HLA-DR1*0101 制品产生的谱中鉴定到肽 HA1 和 MP1 的预测质量峰。与之不同，在来自 DRB1*0401 制品的谱中只能鉴定出 HA1 的质量峰。

实施例 3 用完整蛋白处理细胞后分析细胞表面肽的方法

从获自健康捐献者的 40ml 外周血样品富集人树突细胞。用肝素使血液抗凝，并用 histopaque 1077 (Sigma, Poole, 英国)密度梯度介质和供应商推荐的条件制备单核细胞组分。使用免疫磁性分离法通过负筛选获得树突细胞，其中所有试剂和条件由 Mitenyi Biotec (Bisely, 英国)提供。把树突细胞洗脱至多孔组织培养盘中，用于进行蛋白抗原处理。在实验过程中，细胞维持在添加有 10% (v/v) 胎牛血清和标准抗生素的 RPMI 培养基中。所有试剂来自 Life Technologies (Paisley, 英国)。

在这些研究中使用了重组链激酶制品。此野生型链激酶基因通过合同由 Genosys Biotechnologies Ltd (Cambridge, 英国)合成。使用重叠的合成引物和 Collen 等 [Collen D. (1996) *Circulation* 第 94 卷: 第 197-206 页] 提供的序列，通过聚合酶链式反应构建这个基因。以 453bp 的 EcoRI-HinDIII 限制性片段，把此合成基因克隆到细菌表达载体 pMEX (MoBiTec, Gottingen, 德国)上。用标准技术把 pMEX/链激酶基因转化入感受态大肠杆菌细胞株 TG1 中，并用纤维蛋白平板试验 [Astrup, T. 等(1952) *Arch. Biochem. Biophys.* 第 40 卷:第 346-351 页; Collen, D.等(1992) *Fibrinolysis* 第 6 卷:第 203-213 页] 选择分泌活性链激酶的单个转化克隆。培养最好的表达克隆并用顺序柱层析及以前描述的方法 [Collen, D. 等 (1992) *ibid*; Schott, B. 等 (1994) *Biotechnology* 第 12 卷: 第 185-189 页] 从培养上清液中纯化出重组蛋白。

用浓度 100 μ g/ml 的纯化链激酶温育树突细胞并过夜。在一些实验中，通过在培养基中加入抑制剂混合物来阻断抗原加工。在加入测试蛋白之前 1 小时加入抑制剂，其浓度如下：氯化铵 50mM、叠氮化钠 1mg/ml、氟奎和秋水仙素 500 μ M。所有化合物来自 Sigma (Sigma, Poole, 英国)。

蛋白处理过后，细胞从培养盘中移出并经 3 轮离心和 PBS 处理进行洗涤，以除去所有培养基和外部蛋白。用实施例 1 中给出的方法处理细胞用

于 MALDI-TOF 分析。为了确定归属于测试蛋白的肽的存在，收集和分析质谱。通过与从未经链激酶处理的对照细胞获得的谱相比，鉴定这些肽。

在从链激酶处理的细胞获得的谱中鉴定到属于链激酶的离子峰，而在用代谢抑制剂处理的细胞或未经链激酶处理的对照细胞的谱中未看到此离子峰。

实施例 4 测定用完整蛋白处理细胞后产生的肽序列的方法

根据实施例 3 的方法，用目的蛋白处理细胞。用含有 5% 乙腈、0.1% 甲酸的溶液进行多次 (4-6) 抽提，从细胞上洗脱肽。用 ESI-MS/MS 确定属于测试蛋白的序列的存在。

干燥洗脱下来的样品并用 0.1% 甲酸溶液重悬。通过直接与质谱仪的 Z-Spray 源相连接的组合式 CapLC 系统 (Micromass, Wythenshawe, 英国) 分离整个粗洗脱物。以每分钟 30 μ l 的流速把样品加载到 C18 前置柱中，并用 0.1% 甲酸溶液脱盐 3 分钟。流速减小到每分钟 1 μ l 并再次将样品加至 C18 180mm pepmep 柱上。用从含有 95% H₂O、5% 乙腈、0.1% 甲酸的溶剂溶液到含有 5% H₂O、95% 乙腈、0.1% 甲酸的溶剂溶液的标准洗脱梯度来洗脱柱子。

在装有 Z-Spray nanoflow 电喷雾离子源的 Micromass Q-ToF 2 仪器 (Micromass, Wythenshawe, 英国) 上获得电喷雾 MS 和 MS/MS 数据。在源温度为 80 $^{\circ}$ C、逆向气体流速为 40L/小时、以及将 2800V 电压应用于 nanospray 连续 LC 探测器时以阳离子模式运转仪器。以自动数据依赖性切换模式操作仪器，获得所有数据。

用选择的碎片离子 (碰撞诱导 glufibrinopeptide b 分解产生的) 以两点校正来校准仪器。所有数据用 ProteinLynx 软件自动处理，用 ProteinLynx Global Server 检索算法 (Micromass, Wythenshawe, 英国) 进行分析来实现蛋白鉴定。

通过硼硅酸盐针把粗样品注射入仪器中以实现手工数据采集。把样品浓度调整到大约 1 μ M。在注射之前用 C18 Zip Tip 一次性微型柱 (Millipore, 美国) 对样品脱盐。

为了确定属于测试蛋白的肽质量的存在，收集和分析谱图。通过与来自对照细胞（包括抗原加工被阻断的细胞）的谱进行比较，鉴定这些肽。链激酶处理之后，鉴定到属于链激酶的肽质量。在未经链激酶处理的细胞和代谢抑制剂处理的细胞中，相应的离子峰并不明显。

专利名称(译)	细胞呈递的肽		
公开(公告)号	CN1511164A	公开(公告)日	2004-07-07
申请号	CN01813694.X	申请日	2001-07-26
申请(专利权)人(译)	默克专利有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利有限公司		
[标]发明人	FJ卡尔 G卡特 K海伦多恩		
发明人	F·J·卡尔 G·卡特 K·海伦多恩		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61P31/12 C12N5/071 C12P21/00 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/531 G01N33/68 C07K16/46 C07K14/31		
CPC分类号	G01N33/6851 G01N33/6848 G01N33/5047 A61P31/12		
代理人(译)	刘金辉		
优先权	2000018901 2000-08-03 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及把蛋白质加到细胞中后测定呈递在哺乳动物细胞表面的肽的方法。本发明也涉及基于此肽的测定的诊断试验或由这些肽的测定导致的修饰分子，这些修饰分子例如药物实体优选具有特定的生物学活性并且与相应的未加修饰的分子相比具有降低的或增加的免疫原性。根据本发明的方法优选以利用质谱分析(MS)的工具来建立。