



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02804248.4

[43] 公开日 2005 年 8 月 10 日

[11] 公开号 CN 1653337A

[22] 申请日 2002.1.29 [21] 申请号 02804248.4

[30] 优先权

[32] 2001. 1.29 [33] US [31] 60/264,969

[32] 2001. 8.22 [33] US [31] 09/935,476

[86] 国际申请 PCT/US2002/002708 2002.1.29

[87] 国际公布 WO2002/061435 英 2002.8.8

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.29

[71] 申请人 埃皮缪纳股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·悉尼 A·塞特 H·M·格雷
S·索斯伍德

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 56 页 附图 16 页

[54] 发明名称 A2 超基序亚单位疫苗

[57] 摘要

描述了在携带 A2 超型等位基因的个体中有效的疫苗设计的方法。采用已知的 A2 - 超型结合肽的单一氨基酸替换类似物和大肽文库大致地明确了 A2 - 超型分子的肽结合特异性。虽然注意到每个分子具有独特的偏爱性,但发现特异性有很大的重叠。在肽配基 2 位存在的疏水和脂肪族残基 L、I、V、M、A、T 和 Q 通常可为 A2 超型分子耐受。C - 末端对 L、I、V、M、A 和 T 耐受。对肽结合有次要影响的检验揭示存在等位基因的特异性偏爱,还鉴定到共有的特征,并用于明确 A2 超基序。共有的特征也与交叉反应性相关;发现超过 70% 高亲和力结合 A * 0201 的肽能结合至少 2 种其它 A2 超型分子。最后,提供了在预测结合于 A2 超型分子的肽的算法中使用的系数。

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

1. 一种鉴定 HLA-A2 超基序限制肽的方法，其特征在于，所述方法包括：
使由 8-11 个氨基酸组成的肽与 A*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、
5 A*0206、A*0207、A*6802 和 A*6901 等位基因编码的 3 种或多种 HLA 分子接触；：
所述肽中从该肽 N 末端算起的第 2 位氨基酸是 L、I、V、M、A、T 或 Q，C 末端
氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T，
测定 IC₅₀ 值；
鉴定能结合至少 3 种 HLA 分子且 IC₅₀ 值小于 500nM 的肽，作为 HLA-A2 超基
10 序限制肽。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 V、A、T 或 Q。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 L、I、M 或 Q。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 I 或 Q。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述 C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或
15 T。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述 C 末端氨基酸是 T。
7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肽衍生自 HIV 抗原、HBV 抗原、HCV
抗原、HPV 抗原、PSA 抗原、EB 病毒抗原、KSHV 抗原、拉沙病毒抗原、MT 抗原、
p53 抗原、CEA 抗原、TSA 抗原、MAGE 抗原或 Her2/neu 抗原。
- 20 8. 一种鉴定免疫原 HLA-A2 超基序限制肽的方法，其特征在于，所述方法包
括：
使由 8-11 个氨基酸组成的肽与 A*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、
A*0206、A*0207、A*6802 和 A*6901 等位基因编码的 3 种或多种 HLA 分子接触以
形成肽/HLA-A2 复合物；所述肽中从该肽 N 末端算起的第 2 位氨基酸是 L、I、V、
25 M、A、T 或 Q，C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T，
测定所述肽/HLA-A2 复合物是否能诱导 CTL 应答；
鉴定在含有至少 3 种 HLA 分子的复合体中能诱导 CTL 应答的肽，作为 HLA-
A2 超基序限制肽。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 V、A、T 或 Q。
30 10. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 L、I、M 或 Q。
11. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 I 或 Q。
12. 权利要求 8 所述的方法，其中所述 C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T。

13. 权利要求 8 所述的方法, 其中所述 C 末端氨基酸是 T。

14. 如权利要求 8 所述的方法, 其中所述肽衍生自 HIV 抗原、HBV 抗原、HCV 抗原、HPV 抗原、PSA 抗原、EB 病毒抗原、KSHV 抗原、拉沙病毒抗原、MT 抗原、p53 抗原、CEA 抗原、TSA 抗原、MAGE 抗原或 Her2/neu 抗原。

5 15. 一种制造 HLA-A2 超基序限制肽的方法, 其特征在于, 所述方法包括:
提供感兴趣抗原的氨基酸序列;

鉴定所述序列中推定的 T 细胞抗原表位, 其中推定的抗原表位由 8-11 个氨基酸组成, 其中从该表位 N 末端算起的第 2 位氨基酸是 L、I、V、M、A、T 或 Q, C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T。

10 制备感兴趣抗原的包含该抗原表位的一个或多个肽片断;

使该肽与 A*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、A*0206、A*0207、A*6802 和 A*6901 等位基因编码的 3 种或多种 HLA 分子接触;

测定 IC₅₀ 值; 和

15 选择能结合至少 3 种的 HLA 分子, IC₅₀ 值小于 500nM 的肽, 作为 HLA-A2 超基序限制肽。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述肽的第 2 位氨基酸是 V、A、T 或 Q。

17. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述肽的第 2 位氨基酸是 L、I、M 或 Q。

18. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述肽的第 2 位氨基酸是 I 或 Q。

20 19. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述 C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T。

20. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述 C 末端氨基酸是 T。

21. 如权利要求 15 所述的方法, 其中抗原是 HIV、HBV、HCV、HPV、PSA、EB 病毒、KSHV、拉沙病毒、MT、p53、CEA、TSA、MAGE 或 Her2/neu。

25 22. 一种制造免疫原 HLA-A2 超基序限制肽的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

提供感兴趣抗原的氨基酸序列;

鉴定所述序列中推定的 T 细胞抗原表位, 其中推定的抗原表位由 8-11 个氨基酸组成, 其中从该表位 N 末端算起的第 2 位氨基酸是 L、I、V、M、A、T 或 Q, C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T。

30 制备所述感兴趣抗原的包括该抗原表位的一个或多个肽片断;

测定肽/HLA-A2 复合物是否能诱导 CTL 应答,

选择含有至少有 3 种 HLA 分子的复合物中能诱导 CTL 应答的肽, 作为 HLA-

A2 超基序限制肽。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 V、A、T 或 Q。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 L、I、M 或 Q。

25. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述肽的第 2 位氨基酸是 I 或 Q。

5 26. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述 C 末端氨基酸是 L、I、V、M、A 或 T。

27. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述 C 末端氨基酸是 T。

28. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述抗原是 HIV、HBV、HCV、HPV、PSA、EB 病毒、KSHV、拉沙病毒、MT、p53、CEA、TSA、MAGE 或 Her2/neu。

10

A2 超基序亚单位疫苗

5 技术领域:

本文描述的内容涉及设计在大部分人群中，具体是在那些特征性具有 A2 超型等位基因的人群中有效的疫苗。可设计包含 A2 超基序的亚单位疫苗对这样的人群起作用。

10 背景:

某给定哺乳动物的基因组成编码 3 与此种动物免疫系统相关的结构。虽然人群中存在着大量的遗传多样性，比较人和其他物种甚至更多，但还是有共同的特征和作用。在哺乳动物中，一些与免疫功能相关的分子称为主要组织相容性复合物。

MHC 分子分为 I 型或 II 型分子。II 型 MHC 分子主要在参与起动和维持免疫应答的细胞上表达，如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞等。II 型 MHC 分子由辅助 T 淋巴细胞识别并诱导辅助 T 淋巴细胞增殖和放大对展示的特异性免疫原性肽的免疫应答。I 型 MHC 分子在几乎所有有核细胞上表达并由细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs) 识别，然后 CTLs 破坏携带抗原的细胞。CTLs 在肿瘤排斥和对抗病毒感染中特别重要。

CTLs 识别以肽片段结合 I 型 MHC 分子形式的抗原而不是完整的外来抗原本身。抗原通常必须由细胞内源性合成，一部分蛋白抗原在细胞质中降解成小肽片段。一些这种小肽移位到前高尔基腔室中并与 I 型重链反应以协助合适的折叠和与微珠蛋白 $\beta 2$ 亚基相结合。此肽-I 型 MHC 分子复合物随之发送到细胞表面而表达并被特异性 Ls 潜在识别。

对人 MHC I 类分子、HLA-A2.1 晶体结构的研究表明，肽结合沟由 I 型重链 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域折叠产生 (Bjorkman 等, *Nature* 329:506(1987))。然而，这些研究没有确定结合于此沟的肽的特性。

Buus 等, *Science* 242:1065(1988)首先描述了用酸洗脱法从 MHC 分离结合的肽的方法。随后, Rammensee 和他的同事 (Falk 等, *Nature* 351:290(1991)) 发展了特征鉴定结合于 I 型分子的天然加工的肽的方法。其它研究者成功地实现了用常规自动测序从 B 类 I 型分子洗脱的肽方法在不同 HPLC 组分中更丰富肽的直接氨基酸测序 (Hunt 等, *Science* 225:1261(1992))。Rotzschke 和 Falk 介绍了 MHC I 类分

子中自然加工的肽的特征的综述 (Rotzschke 和 Falk, *Immunol. Today* 12:447(1991)).PCT 出版物 WO 97/34621, (纳入本文参考文献中)描述了具有 A2.1 等位基因结合基序的肽。

Sette 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3296(1989) 显示 MHC 等位基因特异性基序可用于预测 MHC 结合能力。Schaeffer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4649(1989) 表明 MHC 结合与免疫原性相关。其他学者 (De Bruijn 等, *Eur. J. Immunol.*, 21:2963-2970(1991); Pamer 等, *Nature* 353:852(1991)) 提供了 I 型结合基序可在动物模型中用于鉴定潜在性免疫原性肽的初步证据。对某给定 I 型同型的一些人等位基因特异的 I 型基序还有待描述。理想的情况是这些不同的等位基因组合频率应足够高以覆盖大部分或者也许绝大部分远交人群。

尽管技术得到发展, 以前的技术尚没有提供基于此工作的有用的人肽为基础的疫苗或治疗剂。

概述

本发明提供预期在大部分目标人群中有效的疫苗的设计参数。遵循本文提出的指南, 制备针对具体传染性生物体或病毒或肿瘤的疫苗, 评估相关抗原以确定最可能影响对感染或肿瘤的细胞毒性 T 细胞应答的抗原表位位置。通过本文提出的方法分析该抗原的氨基酸顺序, 可能鉴定到一套适当的抗原表位。不难测定由这些抗原表位组成的肽的结合 1 个或多个具有 A2-超型特征的 HLA 等位基因的能力。通常, 以 500nM 或更少 IC_{50} 的亲合力结合的肽, 具有诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL) 应答的高度可能性。这些肽这样做的能力也可能不难验证。然后可根据如此鉴定的免疫原性肽设计设苗。此疫苗本身可由肽本身、预期在体内可产生比肽的前体, 或编码在体内产生这些肽的核酸组成。

因此, 一方面, 本发明涉及鉴定病原或肿瘤特征性抗原中抗原表位方法。用此方法鉴定的抗原表位比任意选择的肽更可能增强携带 A2-超型等位基因的个体的免疫应答。此方法包括分析抗原的 8-11 氨基酸区段的氨基酸序列, 其中 2 位氨基酸是小的或脂肪族疏水残基 (L、I、V、M、A、T 或 Q) 且该区段 C 末端氨基酸也是小的或脂肪族疏水残基 (L、I、V、M、A 或 T)。在一较佳实施方案中, 2 位残基是 L 或 M。在另一较佳实施方案中, 此区段包含 9-10 氨基酸。在又一较佳实施方案中, 当该区段断是 10-聚体时, 其包含 1 位的 Q 或 N 和/或 8 位的 R、H 或 K, 缺少 3 位的 D、E 和 G。2 位和 C 末端为 V 也是优选的。

包含具有 HLA-A2.1 分子结合基序亚序列的免疫原性肽的组合物本文也有描

述。此肽中能结合相应 MHC 等位基因的免疫原性表位宜长 8-11 个残基，更佳长 9-10 个残基，并在某些位置如 2 位和 C 末端包含保守残基。而且此肽在本文所确定的不包含负结合残基，如 9 个氨基酸长度的肽在 1、3、6 和/或 7 位和 10 个氨基酸长度的肽在 1、3、4、5、7、8 和/或 9 位。本发明明确了选择性有效结合 HLA-A2.1 的肽在基序中的位置。

一些免疫原性靶蛋白上的抗原表位可采用本文描述的序列基序来鉴定。合适抗原的例子包括前列腺癌特异性抗原 (PSA)，乙型肝炎核心和表面抗原 (HBVc, HBVs) 丙型肝炎抗原，EB 病毒抗原，人免疫缺陷 1 型病毒 (HIV1)，卡波西肉瘤疱疹病毒 (KSHV)，人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原，拉沙病毒，结核分枝杆菌 (MT)，p53, CEA, 10 锥虫表面抗原 (TSA) 和 Her2/neu。这些肽和编码它们的核酸可用于体内和体外治疗和诊断用的药物组合物中。

定义:

术语“肽”在本说明书中可与“寡肽”交换使用以命名一残基系列，通常是由 α -氨基和毗邻氨基酸的羧基之间的肽键彼此相连的 L-氨基酸。寡肽一般长度小于 250 氨基酸，且可小于 150、100、75、50、25 或 15 氨基酸长度。此外，本发 15 明的寡肽可不包含天然抗原的 15 个以上的毗连氨基酸。

用于描述肽化合物的术语遵循常规惯例，每个氨基酸残基中氨基在左边 (N 末端) 羧基在右边 (C 末端)。在提供的所选出的本发明具体实施方案的公式中，氨基和羧基末端，虽然没有具体显示，是采取其在生理 PH 值时的形式，除非另有说明。在氨基酸结构式中，每个残基通常用标准 3 个字母或单字母名称表示。L-型 20 氨基酸残基用大写单字母或三字母符号第一个字母大写表示，具有 D 型氨基酸的 D 型用小写单字母或小写三字母符号表示。甘氨酸没有不对称碳原子简写为“Gly”或 G。

“免疫原性肽”或“抗原表位”是包含等位基因-特异性基序的肽或氨基酸序 25 列，此种肽序列会结合 MHC 分子并诱导 CTL 应答。本发明的免疫原性肽能结合适当的 HLA-A2 分子并诱导对衍生该免疫原性肽的抗原的细胞毒性 T 细胞应答。本发明的免疫原性肽长度小于 15 个残基，经常长度小于 12 个残基，通常由约 8-11 个之间的残基组成，9 或 10 个残基较佳。

30 免疫原性肽可用本发明的算法方便地鉴定。此种算法是产生能选出免疫原性肽的评分的数学程序。通常使用的算法评分具有一个“结合阈值”，能选也具有高度可能性以特定亲和力结合并进而具有免疫原性的肽。此种算法是根据某肽的某具体

位置的具体氨基酸对 MHC 结合的作用或在含肽的基序中一具体置换对结合的作用。

结合结果常用“ IC_{50} ”表示。 IC_{50} 是在结合试验中观察到的能抑制 50%参比肽结合的肽浓度。试验的条件如本文所述（也就是限制 HLA 蛋白和标记肽浓度），这些值接近 K_D 值。测定结合的试验在 PCT 出版物 WO 94/20127 和 WO 94/03205 中有详细描述。应当指出如果试验条件变化 IC_{50} 值可以变化，通常很剧烈，这取决于所用的具体试剂（如 HLA 制剂等）。例如，浓度过量的 HLA 分子会提高某给定配体的表观 IC_{50} 测定值，因此不能反映真实 K_D 值。

结合通常用相对于参比肽的比率表示。由于具体试验的灵敏度可增加或减少，测试肽的 IC_{50} 可能稍有变化。然而，相对参比肽的结合不会显著改变。例如，在参比肽 IC_{50} 增加 10 倍情况下进行试验，测试肽的 IC_{50} 值也会变化约 10 倍。因此，为避免含糊不准，评价其肽是否是好的、中等的、弱的或负结合剂一般根据其 IC_{50} ，相对于标准肽的 IC_{50} 。如实施例 1 中所述，结合可以报造为一种比率或者此比率可用于归一化 IC_{50} 值。

如本所用，对 HLA I 型分子的高亲和力定义为以小于 50nM 的 IC_{50} 值或 K_D 值结合。中等亲和力是以约 50 至 500 nM 之间的 IC_{50} （或 K_D ）结合。

“保守残基”是在某肽中特殊位置比随机分布预期高得多的频率出现的氨基酸。通常保守残基是 MHC 结构的提供与免疫原性肽接触点的残基。在确定长度的一个肽中有 1 到 3 个保守残基，2 个较佳，确定了免疫原性肽基序。这些残基一般与肽结合沟紧密接触，它们的侧链埋在此沟的特殊袋中。通常，一个免疫原性肽包括至多 3 个保守残基，更经常是 2 个保守残基。

如本文所用，“负结合残基”是如果出现在某些位置（如 9-聚体的 1、3 和/或 7 位）会产生不结合或弱结合的肽进而没有免疫原性即不能诱导 CTL 应答的氨基酸。

术语“基序”指确定长度肽中残基的模式，通常约 8-11 个氨基酸，被特殊 MHC 等位基因所识别此种。此种肽基序一般在每种人 MHC 等位基因中不同并且高保守残基和负残基模式不同。

等位基因的结合基序可用精确度增加程度确定。在一种情况中，所有保守残基出现在肽中的正确位置并且在 1、3 和/或 7 位没有负残基。

“超基序”是 2 种或多种 HLA 等位基因编码的 HLA 分子共有一种肽结合特异性。带有超基序的抗原表位可被 2 种或多种 HLA 抗原以高或中等亲和力（如本文所述）优选识别。

“HLA 超型或家族”，如本文所用，指以共有肽结合特异性为基础分组的几套 HLA 分子。对带有某些氨基酸基序的肽共有一些相似结合亲和力的 HLA I 型分子可

分组为 HLA 超型。术语 HLA 超家族、HLA 超型家族和 HLA xx-类超型分子 (xx 指一具体 HLA 型) 是同义词。

短语“分离的”或“生物学纯化”指充分或基本上没有天然状态下所发现的通常伴随成分的物质。因此, 本发明的肽不含有通常在原来环境中相伴随的物质, 如抗原呈递细胞上的 MHC I 分子。即使蛋白分离到同质性或优势条带, 仍有 5-10% 天然蛋白的痕量污染物与所需蛋白共纯化。本发明的分离肽不含有这种内源性共纯化蛋白。

附图的简要说明

10 图 1. HLA-A*0201 的 2 位和 C 末端的精细特异性。显示 2 位 (a) 或 C 末端 (b) 特殊残基优先作为携带以 500nM 或更高 IC50 结合 A*0201 的特殊残基的肽百分比的函数。在 2 位 (a) 或 C 末端 (b) 携带特殊残基的肽的 ARB 值如本文所述计算, 相对于具有最高结合能力的残基进行指数化。2 位 L 肽的平均 (几何) 结合能力为 1991nM。C 末端 V 肽的平均 (几何) 结合能力为 2133nM。此分析中包括的肽有至少 1 个耐受的锚定残基, 如文中所述, 在 2 位或 C 末端。

15 图 2. A*0201 基序图。8-聚 (b)、10-聚 (c) 和 11-聚 (d) 肽的 A*0201 基序概要图。在次要锚定位置, 所示优选 (或有害) 残基以至少 3 倍于 (或小于 3 倍) 同一位置带其它残基的相同大小肽的平均结合能力相结合。在主要锚定位置, 优选残基是以同一位置最佳残基 10 倍以内的平均结合能力相结合的残基。耐受的
20 主要锚定残基是以同一位置最佳残基的 10 到 100 倍之间的平均结合能力相结合的残基。

图 3. HLA-A2-超型分子的 2 位精细特异性。如文中所述计算了每种 A2-超型分子的 2 位携带特殊残基的肽的 ARB 值, 相对每个特殊分子具有最高 ARB 的残基进行指数化。携带具有最高 ARB 残基的肽的平均 (几何) 结合能力对 A*0202, A*0206 和 A*6802 分别为 55, 59, 89 和 41nM。

25 图 4. HLA-A2-超型分子 C 末端的精细特异性。如文中所述计划处了每种 A2-超型分子的 C 末端携带特殊残基的肽的 ARB 值。相对每个特殊分子具有最高 ARB 的残基进行指数化。携带具有最高 ARB 残基的肽的平均 (几何) 结合能力对 A*0202, A*0203, A*0206 和 A*6802 分别为 291, 48, 250 和 553nM。

30 图 5. A*0202 基序图。9-聚 (a)、10-聚 (b) 肽的 A*0202 基序概要图。在次级锚定位置, 所示优选 (或有害) 残基以至少 3 倍于 (或小于 3 倍) 同一位置带其它残基的相同大小肽的平均结合能力相结合。在主要锚定位置, 优选残基是以同一位置最佳残基 10 倍以内的平均结合能力相结合的残基。耐受的
主要锚定残基

是以同一位置最佳残基的 10 到 100 倍之间的平均结合能力相结合的残基。

图 6. A*0203 基序图。9-聚 (a)、10-聚 (b) 肽的 A*0203 基序概要图。在次要锚定位置, 所示优选 (或有害) 残基以至少 3 倍于 (或小于 3 倍) 同一位置带其它残基的相同大小肽的平均结合能力相结合。在主要锚定位置, 优选残基是以同一位置最佳残基 10 倍以内的平均结合能力相结合的残基。耐受的主要锚定残基是以同一位置最佳残基的 10 到 100 倍之间的平均结合能力相结合的残基。

图 7. A*0206 基序图。9-聚 (a)、10-聚 (b) 肽的 A*0206 基序概要图。在次要锚定位置, 所示优选 (或有害) 残基以至少 3 倍于 (或小于 3 倍) 同一位置带其它残基的相同大小肽的平均结合能力相结合。在主要锚定位置, 优选残基是以同一位置最佳残基 10 倍以内的平均结合能力相结合的残基。耐受的主要锚定残基是以同一位置最佳残基的 10 到 100 倍之间的平均结合能力相结合的残基。

图 8. A*6802 基序图。9-聚 (a)、10-聚 (b) 肽的 A*6802 基序概要图。在次要锚定位置, 所示优选 (或有害) 残基以至少 3 倍于 (或小于 3 倍) 同一位置带其它残基的相同大小肽的平均结合能力相结合。在主要锚定位置, 优选残基是以同一位置最佳残基 10 倍内平均结合能力相结合。耐受的主要锚定残基是以同一位置最佳残基的 10 到 100 倍之间的平均结合能力相结合的残基。

图 9. 次要和主要锚定对 9- (a) 和 10-聚 (b) 肽的 A2-超型结合能力影响的 A2 超基序共有序列小结。所示残基显著影响了对 3 种或多种 A2-超型分子的结合。受影响分子的数量在括号中列出。在次要锚定位置, 仅在对 1 种以上分子没有有害影响时认为该残基是优选的。对 1 种分子有害的优选残基用简化字体和下划线表示。对主要锚定位置的评估根据单个替换和肽文库分析, 如文中所讨论的那样。

较佳实施方案的说明

本发明涉及部分基于抗原表位的疫苗设计方法。这种方法的基础是已明确确定的以下发现, 即发现诱导 CTL 免疫应答的机制包括作为与展示在抗原呈递细胞上的 HLA 分子相结合的约 8-11 氨基酸的肽, 来呈递 CTL 抗原表位的步骤 HLA 分子是 MHC I 类产物, 其中此产物在大部分有核细胞上表达。

MHC I 类等位基因的产物一般按特征分为 A、B 和 C HLA 分子。每种分类中, 人群中有多数等位基因变种; 确实, 相信有远超过 500 种 I 型和 II 型等位基因。由于不能诱导细胞毒性 T 细胞应答除非待免疫个体的细胞表面含有 I 型 HLA 分子呈递的抗原表位, 重要的是该抗原表位是能够结合此个体表达的 HLA 的表位。

因此, 设计有效疫苗的出发点是保证该疫苗于产生能有效呈递的大量抗原表

位。也许有可能给予代表抗原表位本身的肽。这种给予依赖于对象细胞上显示存在“空”的 HLA 分子。在使用免疫原性肽本身的一种方法中，将这些肽与待处理对象的抗原呈递细胞活体外一起培育，然后将细胞回输给该对象。

另钱，8-11 个氨基酸肽可通过给予含有编码它的核苷酸序列的核酸在原位产生。提供这种核酸分子的方法在 WO 99/58658 中有描述，其内容纳入本文参考文献中。此外，免疫原性肽可作为较大肽分子的一部分给予被切割后释放出所需的肽。较大肽可包括外来氨基酸，通常越少越好。因此，含这种氨基酸的肽一般为 25 个氨基酸或更少，更常见的是 20 个氨基酸或更少和 15 个氨基酸或更少。前体也可是含有多个不同或相同 CTL 抗原表位的异聚物或均聚物。当然，也可采用能产生多种多样免疫原性肽的肽和核酸的混合物。肽疫苗、核酸分子或者异-或均聚物的设计取决于包含的所需抗原表位。本发明提供了鉴定在整个 A2 超型特征性个体范围宽阔人群中有效的相关抗原表位的范例。以下几页描述了鉴定 A2 超基序实验的方法和结果。

优选此种肽包含能结合 HLA-A2 超型等位基因的抗原表位。这些基序可用于确定任何所需抗原中的 T 细胞表位，尤其是那些与人类病毒疾病、癌症或自身免疫性疾病相关的表位，其潜在抗原或自身抗原靶标的氨基酸顺序是已知的。

一些潜在靶蛋白质上的抗原表位可根据 HLA 结合基序鉴定。合适抗原的例子包括前列腺特异性抗原 (PSA)，乙型肝炎核心和表面抗原 (HBVc, HBVs) 丙型肝炎抗原，EB 病毒抗原，黑色素瘤抗原 (如 MAGE-1)，人免疫缺陷病毒 (HIV) 抗原，人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原，p53，CEA，锥虫表面抗原 (TSA) 和 Her2/neu。

可合成包含来自这些抗原的肽然后在试验中测试它们结合相应 MHC 分子的能力，例如，该试验采用纯化的 I 型分子和放射性碘化的肽和/或表达空 I 型分子的细胞，采用例如免疫荧光染色和流式显微荧光仪，肽-依赖 I 型分子装配的试验和抑制肽竞争识别 CTL。能结合 I 型分子的肽可进一步评估它们作为受感染或免疫接种个体的 CTL 的靶标的能力，以及它们在体外或体内诱导初次 CTL 应答的能力，CTL 应答产生的 CTL 细胞群能与病毒感染靶细胞或肿瘤细胞反应作为潜在治疗剂。

MHC I 类抗原由 HLA-A、B 和 c 基因座编码。HLA-A 和 B 抗原在细胞表面以大约相同的密度表达，而 HLA-C 表达低得多 (也许低 10 倍之多)。每个基因座有许多等位基因。本发明的肽结合基序对每个等位基因亚型有相对特异性。

对于肽疫苗，这种肽宜包含人群中广泛分布的 MHC I 类分子所识别的基序，或包含遗传多样性人群所识别的基序。由于 MHC 等位基因在不同的民族和种族中以不同频率出现，目标 MHC 等位基因的选择也许依赖于目标人群。表 1 列出不同种族中

在 HLA-a 基因座产物上不同等位基因的频率。例如，绝大部分高加索人群可由能结合 4 种 HLA-A 等位基因亚型的肽所覆盖，即 HLA-A2.1, A1, A3.2 和 A24.1。类似地，绝大部分亚洲人群可通过加入能结合第五种等位基因 HLA-A11.2 的肽来包含。

5

表 1

A 等位基因/亚型	N(69)*	A(54)	C(502)
A1	10.1(7)	1.8(1)	27.4(138)
A2.1	11.5(8)	37.0(20)	39.8(199)
A2.2	10.1(7)	0	3.3(17)
A2.3	1.4(1)	5.5(3)	0.8(4)
A2.4	-	-	-
A2.5	-	-	-
A3.1	1.4(1)	0	0.2(0)
A3.2	5.7(4)	5.5(3)	21.5(108)
A11.1	0	5.5(3)	0
A11.2	5.7(4)	31.4(17)	8.7(44)
A11.3	0	3.7(2)	0
A23	4.3(3)	-	3.9(20)
A24	2.9(2)	27.7(15)	15.3(77)
A24.2	-	-	-
A24.3	-	-	-
A25	1.4(1)	-	6.9(35)
A26.1	4.3(3)	9.2(5)	5.9(30)
A26.2	7.2(5)	-	1.0(5)
A26 V	-	3.7(2)	-
A28.1	10.1(7)	-	1.6(8)
A28.2	1.4(1)	-	7.5(38)
A29.1	1.4(1)	-	1.4(7)
A29.2	10.1(7)	1.8(1)	5.3(27)
A30.1	8.6(6)	-	4.9(25)
A30.2	1.4(1)	-	0.2(1)
A30.3	7.2(5)	-	3.9(20)
A31	4.3(3)	7.4(4)	6.9(35)
A32	2.8(2)	-	7.1(36)
Aw33.1	8.6(6)	-	2.5(13)
Aw33.2	2.8(2)	16.6(9)	1.2(6)
Aw34.1	1.4(1)	-	-
Aw34.2	14.5(10)	-	0.8(4)
Aw36	5.9(4)	-	-

此表汇编自 B. Dupont, *Immunobiology of HLA*, Vol. I, 组织相容性试验, 1987, Springer-Verlag, 纽约 1989。

*N=黑人; A=亚洲人; C=高加索人。括号中数字表示分析中个体的数目。

5 可能发生 HLA-A2.1 基序携带肽与其它 HLA-A2 等位基因-特异分子的交叉反应性结合。认为享有与 HLA-A2.1 结合特异性的那些等位基因-特异性分子包含有 HLA-A2.1 超型。A2 超型 HLA 分子的 B 袋特征为包含残基 F/Y₉、A₂₄、M₄₅、E/N₆₃、K/N₆₆、V₆₇、H/Q₇₀ 和 Y/C₉₉ 的共有序列基序(此命名采用单字母氨基酸码, 其中下标表示肽位置)。类似地, A2 超型 F 袋特征为包含残基 D₇₇、T₈₀、L₈₁ 和 Y₁₁₆(155)
10 的共有序列基序。约 66%结合 A*0201 的肽在 3 种或多种 A2 超型等位基因中有交叉反应。

A2 超型如本文定义的那样与活细胞结合试验 (del Guercio, M.-F. 等, *J. Immuno.* 154:685, 1995) 的交叉反应数据 (Fruci, D 等, *Hum. Immunol.* 38: 187, 1993) 和结合于 HLA-A2 等位基因-特异分子的天然加工肽测序获得的数据
15 (Sudo, T. 等, *J. Immuno.* 155:4749, 1995) 相一致。因此 HLA 分子家族(即结合这些肽的 HLA-A2 超型)包括至少 9 种 HLA-A 蛋白: A*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、A*0206、A*0207、A*6802 和 A*6901。

如本文所述, HLA-A2 超基序包括肽配体和 L、I、V、M、A、T 或 Q 作为抗原表位 2 位的主要锚定残基及 L、I、V、M、A 或 T 作为 C 末端的主要锚定残基。与
20 本发明权利要求最为相关的 HLA-A2 基序包含 2 位的 V、A、T 或 Q 和 C 末端锚定位置的 L、I、V、M、A 或 T。含有 1 个 HLA-A2 超基序的肽抗原表位可结合 1 个以上的 HLA-A2 超型分子。

可用于鉴定本发明的肽的程序已公开在 Falk 等, *Nature* 351:290(1991)中, 纳入本文参考文献中。简单来说, 此方法包括大规模分离 MHC I 类分子, 通常采用免疫沉淀或亲和层析, 从适当细胞或细胞系中分离。本领域熟知的分离所需 MHC
25 分子的其他方法的例子包括离子交换层析、凝集素层析、大小排阻、高效配基层析和上述技术的组合。

在一典型例子中, 使用免疫沉淀分离所需等位基因。一些操作可使用, 取决于所用抗体的特异性。例如, 等位基因-特异性 mAb 试剂可用于 HLA-A、HLA-B 和 HLA-c
30 分子的亲和纯化。可获得用于分离 HLA-A 分子的几种 mAb 试剂。单克隆 BB7.2 适于分离 HLA-A2 分子。使用标准技术用这些 mAb 制备的亲合柱已成功地用于分别纯化 HLA-A 等位基因产物。

除了等位基因-特异性 mAbs, 广泛反应性的抗-HLA-A、B 和 C mAbs, 如 W6/32 B9.12.1 和 B1.23.2, 可用于如下面实施例部分描述的另一种亲和纯化方案。

与分离的 MHC 分子的肽结合沟相结合的肽通常用酸处理洗脱。也可通过各种标准变化方法将肽从 I 型分子上解离下来, 如加热、PH、洗涤剂、盐、离液剂或它们的组合。

将肽片断进一步用反相高效液相色谱 (HPLC) 从 MHC 分子中分离出来并测序。可用许多其它本领域熟知的标准方法分离肽, 包括过滤、超滤、电泳、大小层析、特异性挤体沉淀离子交换层析、等电聚焦等方法。

测序分离的肽可根据标准技术如埃德曼降解 (Hunkapiller, M.W. 等, *Methods Enzymol.* 91, 399 [1983]) 进行。其它适于测序的方法包括质谱测序前面描述的各个肽 (Hunt 等, *Science* 225:1261 (1992), 纳入本文参考文献中)。来自不同 I 型分子的大批异质性肽 (如合并的 HPLC 组分) 的氨基酸测序通常可揭示每种 I 类等位基因的特征性序列基序。

明确了不同的 I 型等位基因的特异性基序使得能鉴定氨基酸序列已知的抗原蛋白质的潜在的肽表位。一般, 鉴定潜在的肽表位是用电脑扫描所需抗原的氨基酸序列中基序的存在。

鉴定携带基序的表位后, 随之合成诸表位基序。结合 MHCI 型分子的能力可用许多不同方法测量。一种方法是如相关申请中描述的 I 型分子结合试验, 在下面叙述。其它文献中描述的方法包括抑制抗原呈递 (Sette 等, *J.Immunol.* 141:3893 (1991), 体外装配试验 (Townsend 等, *Cell* 62:285 (1990) 和使用突变细胞的基于 FACS 的试验, 如 RMA.S (Melief 等, *Eur.J.Immunol.* 21:2963 (1991))。

如本文所述, 较高的 HLA 结合亲和力与较强的免疫原性相关连。较强的免疫原性可以几种不同方式表现。免疫原性可能与是否引起免疫应答, 具体应答反应的力度以及产生应答的多种多样人群的范围相一致。例如, 一种肽可能在多个系列的人群中引起免疫应答, 但不产生强有力的应答。根据本文所述的原则, 已发现接近 90% 的高结合性肽是免疫原性肽, 与中等亲和力结合的肽的大约 50% 形成对照。此外, 较高结合亲和力的肽产生更强有力的免疫原性应答。结果, 如果采用高亲和力结合肽, 诱导类似生物效果所需肽时就较少。因此, 本发明的较佳实施方案中, 高亲和力结合表位特别有用。然而, 采用中等或高结合肽已取得了超过先前技术的很大改进。

本发明在本领域首次确定了 HLA I 型分子结合亲和力和互不关联的肽表位的免疫原性之间的关系。在这些提到的互不关联的肽的实验中, 要指出的是即使采

用更长的片断，体内肽的细胞加工会产生这类肽。因此，包含 1 个或多个抗原表位的更长肽在本发明范围内。结合亲和力和免疫原性之间的关系可通过两种不同实验方法分析 (Sette 等, *J.Immunol.*,153:5586-5592, 1994)。在第一种方法中，对 HLA 结合亲和力范围超过 10,000 倍幅度的潜在表位的免疫原性在 HLA-A*0201 转基因小鼠中作了分析。在第二种方法中，对所有携带 A*0201 结合基序的大约 100 个不同乙型肝炎病毒 (HBV) 衍生的潜在表位的抗原性，采用急性肝炎病人的 PBL(外周血淋巴细胞)作了评估。依照这些方法，确定了大约 500nM(50nM 或更小较佳)的亲和力阈值与肽表位诱导 CTL 应答的能力相关。这些数据对天然加工的肽和合成的 T 细胞表位的 I 型结合亲和力测定是真实的。这些数据也表明在形成 T 细胞应答中决定基选择的重要作用 (见,如 Schaeffer 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:4649-4653,1989)。

因此，CTL-诱导肽宜包括 IC₅₀ 为 500nM 或更小的 I 型 HLA 分子。就肿瘤相关抗原的携带基序肽表位而言，已显示 200nM 结合亲和力阈值与产生的 CTL 细胞群对肿瘤细胞的杀伤相关。

在一较佳实施方案中，评估 HLA-A2 等位基因-特异性分子的结合能力后，对表现出高或中等亲和力的肽考虑作进一步分析。可在该超型家族的其他成员上测试所选出的肽。在较佳实施方案中，将表现出交叉反应性结合的肽用于疫苗或细胞筛选分析。

例如，对在 HLA-A2 结合试验中检验阳性的肽，即结合亲和力值为 500nM 或更小的肽，测试了这些肽体外诱导特异性 CTL 应答的能力。例如可检验与肽一起培育的抗原呈递细胞在应答细胞群体中诱导 CTL 应答的能力。抗原呈递细胞可以是正常细胞如外周血单个核细胞或树突细胞 (Inaba 等, *J.Exp.Med.*166:182(1987); Boog, *Eur.J.Immunol.*18:219[1988])。

另外方便地利用了内部加工肽负载 I 型分子能力有缺陷的突变哺乳动物细胞系，如小鼠细胞系 RMA-S(Karre 等, *Nature*,319:675(1986);Ljunggren 等, *Eur.J.Immunol.*21:2963-2970(1991)),和人的体细胞性 T 细胞杂交株, T-2(Cerundolo 等, *Nature*,345:449-452(1990))及用转染了编码人 I 型分子的合适基因的细胞，当肽从外部加入时，测试该肽在体外诱导初次 CTL 应答的能力。其它可用的真核细胞系包括各种昆虫细胞系如蚊子幼虫 (ATCC 细胞系 CCL 125,126,1660,1591, 6585, 6586), 桑蚕(ATTC CRL 8851), 粘虫(ATTC CRL 1711), 蛾(ATTC CCL 80)和果蝇细胞系如施奈德细胞系 (见 Schneider *J.Embryol.Exp.Morphol.*27:353-365[1927])。

在正常献血员或病人静脉穿刺或 leukapheresis 后方便地分离得到外周血淋巴

细胞作为 CTL 前体细胞的应答细胞源使用。在一实施方案中，将合适的抗原呈递细胞与 10-100 μ M 肽在无血清培养基中适当培养条件下培养 4 小时。将肽-负载抗原呈递细胞随后与应答细胞群在体外最适培养条件下培养 7 到 10 天。阳性 CTL 活化可通过测试培养物中是否存在能杀伤放射性标记靶细胞，包括特异性肽-脉冲的靶细胞和表达产生该肽序列的有关病毒或肿瘤抗原内源加工形式的靶细胞的 CTL。

CTL 特异性和 MHC 限制通过测试对表达适当或不适当的人 MHC I 类分子的不同肽靶细胞的杀伤来确定。在 MHC 结合试验中检验阳性并引起特异性 CTL 应答的肽本文称为免疫原性肽。

10 Kast 等 (J.Immunol.152:3904-3912,1994) 证明携带基序的肽占能结合等位基因-特异性 HLA I 型分子的表位的 90%。在此项研究中，所有可能的 9 个氨基酸长度且有 8 个氨基酸重叠的肽 (240 肽)，覆盖了 16 型人乳头瘤病毒 E6 和 E7 蛋白质的全部序列，测试了它们结合在不同民族中高频率表达的 5 种等位基因-特异性 HLA I 型分子的能力。这一套无偏倚的肽可评估 HLA I 型基序的预测值。从一套 240 种

15 肽中，鉴定出 22 种肽以高或中等亲和力结合等位基因-特异性 HLA 分子。在这 22 种肽中，20 种 (也就是 91%) 是携带基序肽。因此，此研究证明这些基序在鉴定疫苗中包含的肽表位时的价值：应用以基序为基础的鉴定技术消除了 90% 潜在表位的筛选工作量。可得到的肽的量和筛选过程的复杂性使综合评估抗原很困难，如果不用这些基序就不可能。

20 本发明的免疫原性肽表位可包括在多表位疫苗组合物中，此疫苗组合物含有相同抗原的其它肽表位、相同来源的抗原和/或来自不同来源的抗原。此外，II 型抗原表位可和 I 型抗原表位一起包含在疫苗中。同一抗原的肽表位也许是顺序相毗连的毗邻抗原表位或可获自该蛋白质的不同区域。

如下面更详细描述，免疫原性肽可合成制备，如用化学合成或重组 DNA 技术或分离自天然来源如全病毒或肿瘤。虽然肽宜基本上没有其它天然产生的宿主细胞蛋白质及其片断，但在一些实施方案中肽可以合成偶联于天然片断或颗粒。

多肽或肽可以有不同长度，以中性 (无电荷) 形式或者盐形式，没有修饰如糖基化、侧链氧化或磷酸化或者含有这些修饰，所处条件下的修饰不会破坏本文所述的多肽的生物活性。

30 当需要基本维持长肽的所有生物活性时，肽尽可能小为好。可能的话，本发明的最优化肽表位长度 9 或 10 个氨基酸残基为理想，此大小与结合于细胞表面 MHC I 类分子的内源加工的病毒肽或肿瘤细胞肽相当。

具有所需活性的肽可进行必要修饰以提供某些所需属性，如提高的药理特性，同时提高或至少基本保持未修饰肽结合所需 MHC 分子和活化适当 T 细胞的所有生物活性。例如，可使肽经历各种变化，如置换，保守或非保守性置换，这些变化在它们的使用中可提供某些优点，如提高的 MHC 结合。保守性置换意味用另一生物学和/或化学性质类似的氨基酸残基替换一氨基酸残基，如一疏水残基替换另一疏水残基，或一极性残基替换另一极性残基。置换包括组合如 Gly,Ala;Val,Ile,Leu,Met;Asp,Glu;Asn,Gln;Ser,Thr,Lys,Arg;和 Phe,Tyr。单一氨基酸置换的效果可用 D-氨基酸探测。这些修饰可采用熟知的肽合成程序进行，如在 Merrifield,Science 232:341-347(1986),Branny 和 Merrifield,肽,Gross 和 Meienhofer, 10 编.(纽约, 学术出版社), pp.1-284(1979);Stewart 和 Young,固相肽合成 (Rockford, Ill.,Pierce),第二版(1984)有描述。

此种肽也可通过延伸或缩短化合物的氨基酸序列进行修饰，如加入或去除氨基酸。本发明的肽或类似物也可能通过改变某些残基的顺序或组成进行修饰，不难理解对生物活性必需的某些氨基酸残基，如位于关键接触位置的或保守性残基，通常不作改变以避免对生物活性产生不良作用。非关键氨基酸不限于那些在蛋白 15 中天然产生的如 L- α -氨基酸，但可包括非天然氨基酸如 β - γ - δ -氨基酸以及许多 L- α -氨基酸的衍生物如天然氨基酸的 D-异构体。

通常，采用一系列单个氨基酸替换的肽来确定静电电荷、疏水性等对结合的作用。例如，沿肽长度的一系列正电荷（如 Lys 或 Arg）或负电荷（如 Glu）氨基酸 20 替换显示对各种 MHC 分子和 T 细胞受体的敏感性的不同模式。另外，可采用小的相对中性分子如 Ala、Gly、Pro 或类似残基的多处替换。这种置换可产生均寡聚物或异寡聚物的多表位肽。替换或加入的残基数量和类型取决于基本接触点和追求某些功能属性之间必要的距离（如疏水性对亲水性）。与亲代肽的亲合力相比，对 MHC 分子或 T 细胞受体的提高的结合亲和力也可通过置换而实现。在任何情况下， 25 这些置换一般采用经过挑选的氨基酸残基或其它分子片断，以避免可能破坏此种结合的空间和电荷干扰。

氨基酸替换通常是单个残基。替换、缺失、插入或它们任一组合可联用以得到最后的肽。替换性变体是其中肽的至少一个残基被去除并在其位置插入一个不同残基的变化。这些替换当需要精细调节肽的特性时，一般依照下表 2 实施。

30

表 2

原先的残基	示范性替换
Ala	Ser
Arg	Lys, His
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Lys; Arg
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; His
Met	Leu; Ile
Phe	Tyr; Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

比表 2 所列保守性差的选择替换使功能(如对 MHC 分子或 T 细胞受体的亲和力)大为改变, 即选择的残基在其维持 (a) 替换区域肽主链的结构, 如片层或螺旋构象, (b) 分子在靶位置的电荷或疏水性或 (c) 侧链大小上的作用差别很大。通常预期在肽特性上产生最大变化的替换是其中的 (a) 亲水性残基, 如丝氨酰替换(或被替换) 为疏水性残基如亮氨酰、异亮氨酰、苯丙酰、缬氨酰或丙氨酰; (b) 具有阳电荷侧链的残基如谷氨酰或天冬氨酰; 或 (c) 具有大侧链的残基如苯丙氨酸替换(或被替换) 为没有侧链的残基如甘氨酸。

此种肽也可包括免疫原隆肽中 2 个或多个残基的等排物。本文定义的等排物是可替换为第二个序列的 2 个或多个残基的序列因为第一个序列的空间构象适合第二个序列的特异性结合位点。此术语特别包括本领域熟练技术人员熟知的肽主链修饰。这些修饰包括氨基氮、 α -碳、氨基羰基的修饰、酰胺键的完全替换、延伸、缺失或主链交联。一般见 Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol III (Weinstein ed., 1983)。

具有各种氨基酸拟似物或非天然氨基酸修饰的肽对提高肽的体内稳定性特别有用。稳定性可用许多方法测试。例如, 已用肽酶和各种生物培养基如人血浆和

血清测试了稳定性。参见 Verhoef 等, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 11:291-302(1986)。本发明肽的半衰期可用 25%人血清 (v/v) 试验方便地测定。操作一般如下。特合并的人血清 (AB 型, 非加热无活) 在使用前用离心法脱去脂质。该血清随后用 PRMI 组织培养液稀释至 25%用于测试肽的稳定性。在预定时间间隔中, 5 取出少量反应溶液加入 6%含水三氯乙酸或乙醇中。将不透明的反应样品冷却 (4 °C) 15 分钟随后离心沉降已沉淀的血清蛋白质。然后采用稳定性-特异性层析条件作反相 HPLC 确定此肽的存在。

可修饰本发明的肽或具有 CTL 刺激活性的类似物以提供除提高的血清半衰期外其他所需属性。例如, 此肽诱导 CTL 活性的能力可通过联接含有至少一个能诱导 T 辅助细胞应答的表位序列而增强。10

在一些实施方案中, 此 T 辅助肽是大部分人群 T 辅助细胞所能识别的肽。这可通过选择能结合许多、大多数或所有 MHC II 类分子的氨基酸序列来实现。这些序列称为“疏松的 MHC-限制性” T 辅助序列。疏松的 MHC-限制性氨基酸序列的例子包括来自抗原的序列如破伤风毒素 830-843 位 (QYIKANSKFIGITE)、恶性疟原虫环孢子 (CS) 蛋白 378-398 位 (DIEKKI AKMEKASSVFNVNS) 和链球菌 18kD 蛋白 1-16 位 (YGAVDSILGGVATYGAA) 序列。15

另外, 可能以疏松的 MHC-限制性方式采用自然界中未发现的氨基酸序列制备能刺激 T 辅助淋巴细胞的合成肽。这些合成化合物称为泛-DR-结合表位或 PADRE™ 分子 (Epimmune, 圣迭哥, 加州), 可根据它们对大部分 HLA-DR(人 MHC II 类) 分子的结合活性进行设计 (如见美国专利号 5, 736, 142)。20

将特别优选的免疫原性肽/T 辅助表位偶联物以一间隔分子相连。此间隔物通常含有较小的中性分子如在生理条件下基本上不带电荷的氨基酸或氨基酸拟似物。此间隔分子一般选自如 Ala、Gly 或其它非极性氨基酸或中性氨基酸的中性间隔物。应理解这种任选的间隔物不需包含相同的残基因此可以是异质或同质寡聚物。当存在时, 此间隔物通常至少为 1 或 2 个残基, 更多的是 3 到 6 个残基。或者, CTL 肽可不用间隔与 T 辅助肽相连。25

免疫原性肽可直接或通过一间隔, 在 CTL 肽的氨基或羧基末端与 T 辅助肽相连。免疫原性肽或 T 辅助肽的氨基末端可以酰化。示范性 T 辅助肽包括破伤风类毒素 830-843、流感 307-319、疟原虫环孢子蛋白 382-398 和 378-389。30

在一些实施方案中, 可能需要本发明的药物组合物至少包含一种诱发 CTL 的成分。业已鉴定到脂质可作为能诱发体内抗病毒抗原 CTL 的制剂。例如, 可将棕榈酸残基连接于赖氨酸残基的 α 和 ϵ 氨基并随后通过一个或多个连接残基如 Gly、

Gly-Gly-、Ser、Ser-Ser 等与免疫原性肽联接。该脂化肽可随后直接以胶束形式、掺入到脂质体中或以佐剂，如不完全弗氏佐剂乳化面注射。在一较好实施方案中，特别有效的免疫原包括与赖氨酸的 α 和 ϵ 氨基相连的棕榈酸，通过接头如 Ser-Ser 连接于免疫原性肽的氨基末端。

- 5 诱发 CTL 应答的脂质的另一例子，大肠杆菌脂蛋白如三棕榈酰-S-甘油半胱氨酰丝氨酰-丝氨酸 (P_3CSS) 当与适当肽共价相连时可用于诱发病毒特异性 CTL。见 Deres 等, *Nature* 342:561-564(1989)。本发明的肽可与 P_3CSS 偶连，例如给予个体此脂肽以特异引起对靶抗原的 CTL 应答。此外，诱导中和性抗体也可用与显示有适当表位的肽相偶联的 P_3CSS 来诱发，这两个组合物可组合以更有效诱导对感
- 10 染的体液和细胞介导应答反应。

此外，可将其他的氨基酸加到肽末端以提供肽之间的连接，偶连于一载体支持物或更大的肽，修饰此肽或寡肽的物理或化学性质等等。可将氨基酸如酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸或天冬氨酸等引入此肽或寡肽的 C 或 N 末端。在一些例子中 C 末端的修饰可能改变此肽的结合特性。另外，此肽或寡肽的序列，可

15 通过末端-NH₂ 酰化如烷酰基 (C1-C20) 或 2-巯基乙醇乙酰化，末端羧基酰胺化如氨水、甲胺等修改而与天然序列不同。在一些情况中，这些修饰可提供连接载体或其它分子的位点。

本发明的肽可用许多方法制备。由于它们大小较短，此种肽（互不相关表位或多表位肽）可在溶液或固体载体上按常规技术合成。各种自动化合成仪可购买

20 到并按已知操作方案使用。参见 Stewart 和 Young, 固相肽合成, 第二版., Pierce Chemical Co.(1984), 同上。

另外，本发明肽的制备可包括使用重组 DNA 技术，其中将编码感兴趣的免疫原性肽的核苷酸序列插入到一表达载体中，转化或转染到适当宿主细胞中并在适合于表达的条件下培养。这些程序一般为本领域所知，其一般描述见 Sambrook 等，

25 “分子克隆，实验室手册”，冷泉港出版社，纽约（1982），纳入本文参考文献中。因此，可采用包含本发明 1 个或多个肽序列的融合蛋白来呈递适当的 T 细胞表位。

由于本文预期长度肽的编码序列可用化学技术合成，例如用 Matteucci 等，*J.Am.Chem.Soc.*103:3185(1981)的磷酸三酯法合成，可简单地通过用适当的碱基替换那些编码天然肽序列的碱基来进行修饰，然后提供合适的接头将编码序列与本

30 领域通常可得到的表达载体相连，用此载体转化合适宿主以产生所需的融合蛋白。一些这类载体和合适的宿主系统现在已可得到。为表达此融合蛋白，提供与编码序列操作性连接的起始和终止密码子、启动子和终止子区域以及通常的复制系统

以准备表达载体在理想的细胞宿主中表达。例如，与细菌宿主相容的启动子序列在含有插入所需编码序列的方便的限制位点的质粒中提供。将所得表达载体转化入合适的细菌宿主中。当然，采用适当载体和调控序列酵母或哺乳动物细胞宿主也可使用。

5 本发明的肽和药物及其疫苗组合物可用于对哺乳动物特别是人给药，治疗处理和/或预防感染和癌症。可用本发明免疫原性肽治疗的疾病的例子包括前列腺癌，乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病、肾癌、宫颈癌、淋巴瘤、CMV 感染和 condyloma acuminatum。

就药物组合物而言，本发明的免疫原性肽通常给予已患癌症或感染了感兴趣病毒的人。那些在潜伏期或感染急性期的病人可用此免疫原性肽或与其它治疗方法（如果适当）联合治疗。在治疗应用中，病人使用的组合物的量足以诱导对感染的疾病因子或肿瘤抗原的有效 CTL 应答并治愈或至少部分抑制症状和/或并发症。达到这样效果的适当量定义为“治疗有效剂量”或“单位剂量”。有效产生这样作用的量取决于例如肽的组成、给药方式、所治疾病的病期和严重性、病人体重和
15 全身健康状况、开药医师的判断。一般人的首次免疫（治疗或预防性给药）剂量范围 70kg 病人为约 1.0 μ g 到 20,000 μ g 肽，较佳为 100 μ g、-150 μ g、-200 μ g、-250 μ g、-300 μ g、-400 μ g 或-500 μ g、20,000 μ g，接着以相同剂量范围依照数周到数月的加强注射作加强免疫，取决于病人反应和状况可通过测量病人血液中特异性 CTL 活性而定。在使用重组核酸的实施方案中，滴定所给予的物质以获得
20 适当的治疗反应。必须记住的是本发明的肽和组合物通常可用于严重的疾病状态，即威胁生命或可能威胁生命的情形。在这些例子中，鉴于本发明组合物中的外源性物质如相对无毒性的肽已最小化，使用大大过量的这些组合物是可能的且治疗医师可能觉得是需要的。

对于治疗应用，应在急性感染时出现感染最初症状或检测到或手术切除肿瘤或
25 诊断后不久开始给药。随后给予加强剂量直到至少症状大为缓解并在这之后维持一段时间。在慢性感染时，也许需要加载剂量然后给予加强剂量。

用本发明组合物治疗感染个体可能促进解决急性感染个体的感染。对易感染（或易于）发展为慢性感染的个体，此组合物在防止急性感染变成慢性的方法中特别有用。当易感染个体在感染前或感染中被确认，例如本文所述，此组合物可
30 针对他们，尽量减小对较大群的用药需要。

此肽组合物也可用于治疗慢性感染和刺激免疫系统以消除携带者中的病毒感染细胞。重要的是在配方中提供的免疫增效肽的量和服药方式应足以有效激活细

胞毒性 T 细胞应答。因此，治疗慢性感染，免疫剂量后也许需要在设定的间隔，如 1 至 4 周时作加强免疫，可能需延长时间以有效免疫个体。在慢性感染的例子中，用药必须连续直到至少临床症状或实验室测试表明感染已消除或大大缓解并在之后持续一段时间。

5 用于治疗的药物组合物是肠胃外、局部、口服或区域用药。本发明的肽可以编码该肽的核酸形式使用。药物组合物优选肠胃外给药，如静脉内、皮下、皮内或肌肉内。因此，本发明提供了肠胃外用药的组合物，其包含免疫原性肽溶解或悬浮在可接受运载体中的溶液，优选含水运载体。可使用各种含水运载体如水、缓冲水、0.8%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可用常规的熟知的无菌技术灭菌或过滤灭菌。所得水溶液可包装使用或冻干，此种冻干制备在使用前无
10 菌液体组合。该组合物可含有接近生理条件所需的药物学上可接受辅助物质，如 PH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨聚糖单十二酸酯（？）、油酸三乙醇胺盐等。

本发明的 CTL 刺激肽浓度在药物配方中可能变化很大，即重量从低于 0.1%，常常在 2%或至少约 2%到 20%至 50%或更多，主要按流体体积、粘度等选择，按
15 所选的具体给药方式而定。此肽组合物的人用单位剂量形式一般包括在药物组合物中，该药物组合物含有可接受运载体的人用单位剂量，优选含水运载体，采用本领域技术人己知的流体体积给药将此种组合物给予病人。

本发明的肽也可通过脂质体给药，脂质体的作用是将此靶向具体的组织如淋巴
20 组织或选择性靶向感染细胞以及提高此肽组合物的半衰期。脂质体包括乳剂、泡沫剂、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散剂、薄片层等。在这些制备物中掺入了待输送的此肽作为脂质体的一部分，单独或与结合性分子如淋巴细胞中常见的受体一起，例如结合 CD45 抗原的单克隆抗体或与其它治疗或免疫原性组合物一起给药。因此，可将装满或带有本发明的肽的脂质体直接用于淋巴细胞部位，在
25 那里脂质体随后递送所选的治疗/免疫原性肽组合物。用于本发明的脂质体可从自标的运载体形成脂质，一般包括中性和带负电荷的磷脂和固醇如胆固醇制备。脂质的选择通常要考虑如脂质体大小，酸不稳定性和脂质体在血流中的稳定性。己有许多方法用于制备脂质体，参见如 Szoka 等，*Ann.Rev.Biophys.Bioeng.*9:467(1980)，美国专利号 4,235,871，4,501,728，4,837,028 和 5,019,369。

30 为了靶向免疫细胞，掺入脂质体中的配体可能包括对所需免疫系统细胞的细胞表面决定簇特异性的抗体或其片断。含肽的脂质体悬浮液可通过静脉内、区域、局部等给药，剂量则根据特别是给药方式、被递送的肽、待治疗疾病的病期而不

同。

对于固体组合物，可采用常规的无毒性固体运载体，包括例如药物等级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。对于口服，制备药学上可接受的无毒组合物可通过加入常用的赋形剂，如前面列出的运载体和一般为 10-95%的活性成分，即本发明的一种或多种肽，浓度 25%-75%更佳。

对于气雾剂给药，此免疫原性肽宜与表面活性剂和推进剂一起以精细的分离形式提供。典型的肽百分比为 0.01%-20%重量，1%-10%更佳。当然，表面活性剂必须无毒且宜溶于推进剂。这类试剂的代表是含 6 到 22 个碳原子的脂肪酸的酯或部分酯，如具有脂肪族多羟基醇或其环化酐的己酸、辛酸、十二烷酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、olestercic 和油酸。混合酯如混合或天然甘油酯可使用。表面活性剂可占该组合物 0.1%-20%，占 0.25-5%更佳。该组合物的其余部分是普通的推进剂。运载体也可包括，（如需要）用于鼻内输送的卵磷脂。

因此，本发明一个方面的内容涉及包含如本文所述活性成分：免疫原性肽的免疫有效量的疫苗。此肽也可以用编码在接受者中表达的本发明肽的核酸形式给予。可将此肽与其自身运载体相连接或作为活性肽单位的均聚物或异聚物引入宿主包括人中。此聚合物的优点在于提高免疫学反应并且当使用不同的肽组成此聚合物时，加强了其诱导与病毒或肿瘤细胞不同抗原决定簇反应的抗体和/或 CTLs 的能力。本领域熟知的有用运载体包括如甲状腺球蛋白、白蛋白如人血清白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸如聚（赖氨酸：谷氨酸）、流感、乙型肝炎病毒核心蛋白、乙型肝炎病毒重组疫苗等。此疫苗也可包含生理耐受性（可接受的）稀释剂如水、磷酸缓冲盐水或盐水，更常包含佐剂。不完全弗氏佐剂、磷酸铝、氢氧化铝或明矾等物质是本领域熟知的佐剂。如上面提到的，CTL 应答可通过将本发明的肽与脂质，如 P₃CSS 偶联而诱发。如本文所述，对于肽组合物的免疫接种，可通过注射、气雾剂、口服、皮肤或其它途径，宿主免疫系统对疫苗的应答是产生大量针对所需抗原的特异性 CTL 细胞，因此宿主至少对后来的感染具有部分免疫力或对发生慢性感染有抵抗力。

在一些例子中，需要将本发明的肽疫苗与能诱导对感兴趣病毒的尤其是对病毒包膜抗原的中和抗体应答的疫苗联用。

出于治疗或免疫接种目的，本发明的肽可以编码一种或多种本发明肽的核酸形式给予。该核酸可编码本发明的肽以及任选的一种或多种其它分子。常规上使用一些方法将核酸递送给病人。例如，核酸可直接作为“裸露 DNA”递送。此方法

在 Wolff 等, *Science* 247:1465-1468(1990)和美国专利号 5,580,859 及 5,589,466 中有所描述。核酸也可使用弹道方法递送, 如在美国专利号 5,204,253 中所述。也可给予只包括 DNA 的颗粒。另外, DNA 可粘附于颗粒如金颗粒上。

也可将核酸与阳离子化合物如阳离子脂质复合后递送。脂质-介导的基因传递方法例如在 WO 96/18372;WO 93/24640;Mannino 和 Gould-Fogerite,*BioTechniques* 6(7):682-691(1988);Rose 美国专利号 5,279,833;WO 91/06309;和 Felgner 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:7413-7414(1987) 中所述。

本发明的肽也可用减毒病毒宿主表达, 如牛痘或鸟痘。此方法包括使用牛痘病毒作为表达编码本发明肽的核苷酸序列的载体。导入急性或慢性感染宿主或者非感染宿主后, 重组牛痘病毒表达该免疫原性肽, 从而诱导宿主 CTL 应答。在免疫方案中有用的牛痘载体和方法如在美国专利号 4,722,848 中所述。另一载体是 BCG(Bacille Calmette Guerin)。BCG 载体如在 Stover 等, (*Nature* 351:456-460(1991)) 中所述。许多其它对本发明肽的治疗用药或免疫接种有用的载体, 如伤寒沙门菌载体等, 通过本文描述本领域技术人员会。

给予编码本发明肽的核酸的一种较佳方法采用了编码本发明多个表位微小基因构建物任选地与其它分子一起给予。为了产生编码所选 CTL 表位(微小基因)的 DNA 序列在人细胞中表达, 须反向翻译该表位的氨基酸序列。采用人密码子使用表来指导每个氨基酸的密码子选择。将编码这些表位的 DNA 序列直接毗连, 产生编码一连续多肽序列的分子。为了优化表达和/或免疫原性, 可将其他成分加入该小基因设计中。可被反向翻译和包含在该微小基因序列中的氨基酸序列的例子包括: 辅助性 T 淋巴细胞表位、前导(信号)序列和内质网定位信号。此外, CTL 表位的 MHC 呈递可通过包括将合成的(如聚丙烯酰胺)或天然产发的接序列毗邻于 CTL 表位而得到促进。

微小基因序可通过装配编码该微小基因的正链和负链的寡核苷酸而转变成 DNA。合成重叠的寡核苷酸(30-100 碱基长)、磷酸化, 纯化并用熟知的技术在适当条件下退火。这些寡核苷酸的两末端用 T4 DNA 连接酶相连。编码 CTL 表位多肽的这种合成性微小基因随后可克隆到理想的表达载体中。

通常可将本领域技术人员熟知的标准调节序列包括在此载体中以确保在靶细胞中表达。需要几种载体元件: 具有微小基因插入的下游克隆位点的启动子; 用于有效转录终止的聚腺苷酸化信号; 大肠杆菌复制起始点和大肠杆菌选择标记(如氨卡青霉素或卡那霉素抗性)。许多启动子可用于此目的, 如人巨细胞病毒(hCMV)启动子。其它适合的启动子序列见美国专利号 5,580,859 和 5,589,466。

可能需要其他的载体修饰以优化微小基因的表达和免疫原性。在一些例子中，有效的基因表达需要内含子，可将一个或多个合成的或天然产生的内含子加入到微小基因的转录区域。也可考虑包括 mRNA 稳定性序列以增加微小基因的表达。最近提出免疫刺激序列（ISS 或 CpG）在 DNA 疫苗免疫原性中发挥作用。这些序列如果发现能提高免疫原性，可包括在载体中、微小基因编码序列外。

在一些实施方案中，可采用双顺反子表达载体来产生微小基因编码的表位和所包含的第二个蛋白质以增强或减弱免疫原性。如果共同表达可有效提高免疫应答的蛋白质或多肽的例子包括细胞因子（如 IL2、IL12、GM-CSF），细胞因子诱导分子（如 LeIF）或共刺激分子。此外，如使用辅助性 T 淋巴细胞（HTL）抗原，可将该 HTL 表位加入细胞内靶信号，与 CTL 表位分开来表达。这样可将 HTL 表位导入不同于 CTL 表位的细胞腔室，这可更有效促进 HTL 表位进入 MHC II 类通路，从而有利于和提高 CTL 诱导。与 CTL 诱导相反，通过共表达免疫抑制分子（如 TGF- β ）特异减弱免疫应答对一些疾病时可能有益。

一旦选定表达载体，将该微小基因克隆至启动子下游的多接头区域。将此质粒转化到合适的大肠杆菌菌株中，用标准技术制备 DNA。微小基因的取向和 DNA 序列以及载体中包括的所有其它元件用限制性酶切图和 DNA 序列分析验证。接受正确质粒的细菌细胞可贮存作为主细胞库和工作细胞库。

可通过在大肠杆菌中发酵接着纯化来产生治疗用量的质粒 DNA。取工作细胞库的等分用于接种发酵培养基（如 Terrific 肉汤），根据熟知的技术在摇瓶或生物反应器中培养至饱和。质粒 DNA 可采用标准的生物分离技术如 Quiagen 提供的固相阴离子交换树脂来纯化。如果需要，超螺旋 DNA 可用电泳或其它方法与开环和线性形式分离。

纯化的质粒 DNA 可用许多配方制备用于注射。最简单的是将冻干的 DNA 在无菌磷酸缓冲盐水（PBS）中重建。许多方法已有描述，也有一些新技术。如上面所述，核酸可与阳离子脂质方便地配制。共同归类为保护性、相互作用性、非凝聚性（PINC）的糖脂、融合性脂质体、肽和化合物也可与纯化质粒 DNA 组成复合物以影响变量如稳定性、肌肉内分散或者输送给特异器官或细胞类型。

靶细胞致敏可用作微小基因编码的 CTL 表位的表达和 MHC I 类呈递的功能性试验。可将此质粒 DNA 导入适于作为标准 CTL 铬释放试验靶细胞的哺乳动物细胞系。所用的转染方法取决于最后的制剂。电穿孔可用于“裸露”DNA，而阳离子脂质允许直接体外转染。可共转染质粒表达的绿色荧光蛋白（GFP）以增加用荧光激活细胞分类术（FACS）的转染细胞。这些细胞随后用铬-51 标记并作为表

位特异性 CTL 系的靶细胞。细胞溶解、⁵¹Cr 释放的检测表明产生了微小基因编码的 CTL 表位的 MHC 呈递。

体内免疫原性是微小基因 DNA 制剂功能试验的第二种方法。表达适当的人 MHC 分子的转基因小鼠可用此 DNA 产物免疫。用药剂量和途径是制剂依赖的（如 IM 代表 PBS 中 DNA，IP 代表脂质-复合的 DNA）。免疫后 21 天，收集脾细胞并在编码每个待测试表位的肽存在情况下重刺激一周。用标准技术分析这些效应细胞（CTL）对负载了肽的铬-51 标记的靶细胞的细胞溶解作用。被负载了对应于微小基因编码表位的 MHC 致敏的靶细胞溶解，表明 DNA 疫苗在体内功能为诱导 CTL。

10 具有适当单倍型的转基因动物也可提供了优化微小基因 DNA 体内免疫原性的有用工具。此外，动物如猴子，具有保守性 HLA 分子能与人类 MHC 分子识别的 CTL 表位起交叉反应，可用于测定 CTL 表位的人类免疫原性（Bertoni 等，*J.Immunol.*161:4447-4455(1998)）。

需要这些体内研究以说明疫苗开发的关键性变量，这是体外试验不易评估的，如用药途径、疫苗配方、组织的生物分布和参与的主要和次要淋巴器官。由于其简单性和灵活性，与在高等动物如非人灵长类动物中更麻烦和花费更大的研究相比，HLA 转基因小鼠代表另一种吸引人的选择，至少对初始的疫苗开发研究如此。

抗原肽也可用于诱导活体外的 CTL。产生的 CTL 可用于治疗对其它常规治疗方式或对肽疫苗治疗方法不起反应的病人的慢性感染（如病毒或细菌）或肿瘤。对特殊病原（感染病原或肿瘤抗原）的 CTL 应答可通过在组织培养中一起培养病人的 CTL 前体细胞（CTLp）和抗原呈递细胞(APC)及相应的免疫原性肽来诱导。在适当时间（通常 1-4 周）培养后，CTLp 被激活、成熟和扩增成为效应 CTL，将其回注给该病人，它们会在病人体内破坏其特异性靶细胞（感染细胞或肿瘤细胞）。

25 也发现此种肽可作为诊断试剂。例如，本发明的肽能用于测定具体个体对此肽或相关肽治疗方案的是感性，因此对修改现有治疗方案或确定受影响个体的预后有所帮助。

例如，本发明的肽可用于四聚物染色试验，以评估外周血单个核细胞在接触病原或免疫原后是否有抗原特异性 CTL 存在。采用 HLA-四聚复合物来直接显现抗原特异性 CTL（见如 Ogg 等，*Science* 279:2103-2106,1998;和 Altman 等，*Science* 174: 30 94-96, 1996）并确定抗原特异性 CTL 细胞群在外周血单个核细胞样品中的频率。使用本发明肽的四聚物试剂可如下产生：使结合等位基因的特异性 HLA 分子或超型分子的肽，在相应 HLA 重链和 β 2-微珠蛋白存在时重折叠以产生四分子的复合

物。该复合物在预先加入蛋白质位点的重链羧基末端生物素酰化。然后加入链霉亲和物素诱导四聚物形成。通过荧光标记链霉亲和物素，该四聚物可用于染色抗原特异性细胞。然后用流式细胞仪可鉴定这些细胞。这种分析可用于诊断或预后目的。

5 此外，这种肽也可用于预测哪个个体会发生慢性感染的很大风险。

本专利申请涉及美国专利序列号 08/589,108（提交于 1/23/96，现已作废），和涉及美国专利序列号 08/205,713（提交于 3/4/94），是美国专利序列号 08/159,184（提交于 11/29/93）的延续部分，现已作废，后者是美国专利序列号 73,205（提交于 6/4/93）的延续部分，现已人废，后者是美国专利序列号 08/027,146（提交于 3/5/93）的延续部分，现已作废。本应用也涉及美国专利序列号 60/013,980（提交于 3/21/96）现已作废，美国专利序列号 08/454,033（提交于 5/26/95），美国专利序列号 08/349,177（提交于 12/2/94）和美国专利序列号 08/753,622（提交于 1/27/96），现已作废。上述提到的各专利申请纳入本文参考文献中。

15 实施例

实施例 1: 肽

如先前 Ruppert,J.等，“结合 HLA-A2.1 分子的肽中次要锚定残基的显著作用”，*Cell* 74:929-937(1993)所述合成了所用的肽或作为原始材料从 Chiron Mimotopes (Chiron 公司，澳洲)购买。将合成的肽通过反相 HPLC 纯化至匀质性超过 95%。合成肽的纯度用分析性反相 HPLC 和氨基酸分析、测序和/或质谱测定。将冻干肽在 20 100% DMSO 中重悬浮为 4-20mg/ml，随后以 PBS+0.05%(v/v)NP40(Fluka Biochemika,Buchs,瑞士)稀释剂所需浓度。

实施例 2: MHC 纯化

25 EBV 转化的细胞系 JY(A*0201)、M7B(A*0202)、FUN(A*0203)、DAH(A*0205)、CLA(A*0206)、KNE(A*0207)、AP(A*0207)和 AMAI(A*6802)用作 MHC 分子主要来源。单个 MHC 等位基因转染的 721.221 系也用作 A*0202 和 A*0207 来源。细胞在体外用添加有 2mM L-谷氨酸 (GIBCO,Grand Island,纽约)、100U(100 μ g/ml)青霉素-链霉素溶液 (GIBCO) 和 10%热灭活 FCS(Hazelton Biologics)的 RPMI 1640 30 培养基培养维持 (Flow Laboratory,McLean, 维吉尼亚)。大规模培养物在滚瓶中维持。从细胞裂解物中纯化 HLA 分子 (Sidney,J.等，“用胶过滤测定 MHC/肽相互作用”，*Curr Prot Immunol* 18.3.1-18.3.19(1998))。简言之，使细胞在 50mM Tris-HCl、

pH8.5、含 1%(v/v)NP-40、150mM NaCl、5mM EDTA 和 2mM PMSF 中以 10^8 细胞/ml 浓度裂解。使裂解物随后通过 $0.45 \mu\text{M}$ 过滤器, $10,000\times g$ 离心 20 分钟去除细胞核和碎片, 用单克隆抗体亲和层析纯化 MHC 分子。

为为亲和纯化, 将失活的琼脂糖 CL4B 和蛋白 A 琼脂糖柱用作预柱。经反复
5 通过偶联了抗 HLA(A、B、C)抗体 W6/32 的蛋白 A 琼脂糖珠捕获 I 类分子(Sidney,J. 等, 同上)。HLA-A 分子进一步通过 B1.23.2 柱从 HLA-B 和-C 分子中纯化。通过 2 到 4 次后, 用 10 倍柱体积的 10mM Tris-HCl, pH8.0, 1%(v/v)NP-40, 2 倍柱体积的 PBS, 2 倍柱体积含 0.4%(w/v)n-辛基糖苷的 PBS 洗涤 W6/32 柱。I 型分子用 50mM 二甲胺(溶于含 0.4%(w/v)n-辛基糖苷的 0.15M NaCl 中, pH 11.5)洗提。加入 1/26
10 体积的 2.0M pH 6.8 Tris 到洗脱液中以降低 pH 到~8.0。然后在 Centriprep 30 浓缩器中以 2000rpm 离心浓缩洗脱液(Amicon,Beverly, 麻萨诸塞州)。蛋白质的纯度、浓度和去除(杂质)步骤的有效性用 SDS-PAGE 和 BCA 试验监测。

实施例 3: MHC-肽结合试验

15 测定肽与可溶 I 型分子结合的定量试验依据对放射性同位素标记的标准肽结合的抑制。如前面描述进行这些试验(Sidney,J.等, 同上)。简言之, 将 1-10nM 放射性同位素标记肽室温与 $1 \mu\text{M}$ 到 1nM 的纯化的 MHC 在 $1 \mu\text{M}$ 人 $\beta 2$ -微球蛋白(Scripps Laboratories, 圣迭哥, 加州)和蛋白酶抑制剂混合物存在时共同培养。培养 2 天后, 放射性结合的 MHC 百分比用 TSK 2000 柱通过大小排阻凝胶过滤层
20 析测定。或者, 放射性结合的 MHC 百分比通过在 W6/32 抗体包被板上捕获的 MHC/肽复合物并用 TopCount 微量闪烁计数器(Packard Instrument 公司, Meriden,CT)测定每分钟结合计数(Southwood 等, *Epimmune Technical Report Epi 063-99*)。

用于 A*0201、A*0202、A*0203、A*0205、A*0206 和 A*0207 试验的放射性同位素标记的标准肽, 是 HBV 核心 18-27 表位(序列 FLPSDYFPSV)的 F6>Y 类似物。
25 此肽对各个分子的平均 IC_{50} 分别为 5.0、4.3、10、4.3、3.7 和 23nM。HBV pol 646(序列 FTQAGYPAL)或 MAGE 1282(序列 YVIKVSARV)的 C4>A 类似物在 A*6802 试验中用作标记。它们对 A*6802 的 IC_{50} 分别为 40 和 8 nM。

在竞争性试验中, 计算产生放射性同位素标记肽结合 50%抑制的肽浓度。首先以 1 或 2 种高剂量测试这些肽。然后在后续试验中测定产生阳性抑制的肽的 IC_{50} ,
30 试验中测试了 2 到 6 种稀释度。在所用条件下, 当[标记] \ll [MHC]和 $\text{IC}_{50} \geq$ [MHC]时, 测定的 IC_{50} 值是真实 K_d 值的合理近似值。每个竞争肽在 2 到 4 次独立实验中测试。作为阴性对照, 也在每次实验中测试了未用放射性同位素标记的探针。

实施例 4: 另一种结合试验

将 EB 病毒 (EBV) -转化的纯合子细胞系, 纤维母细胞, CIR 获 721.22 转染子用作 HLA I 型分子的来源。这些细胞体外在添加有 2mM L-谷氨酸 (GIBCO, Grand Island, 纽约)、50 μ M 2-ME、100 μ g/ml 链霉素、100U/ml 青霉素 (Irvine Scientific) 和 10% 热灭活 FCS (Irvine Scientific, Santa Ana, 加州) 的 RPMI 1640 培养基培养维持。细胞在 225-cm² 组织培养瓶中培养或在滚瓶装置中大规模培养。用 IEC-CRU5000 离心机和 259 转头 1500 RPM 离心收集细胞并用磷酸缓冲盐水 (PBS) (0.01M PO₄, 0.154M NaCl, pH7.2) 洗 3 遍。

10 沉淀细胞并 -70°C 储存或用洗涤剂裂解液处理以制备洗涤剂裂解液。细胞裂解液通过将洗涤剂原液 [1% NP-40 (Sigma) 或 Renex30 (Accurate Chem.Sci. 公司, Westbury, 纽约 11590), 150mM NaCl, 50mM Tris, pH8.0] 以 50-100x10⁶ 细胞/ml 洗涤剂液加到细胞沉淀 (来先已计数过) 中制备。将蛋白酶抑制剂混合物加入到已测量过体积的洗涤剂原液中然后立即加入到细胞沉淀中。加入的蛋白酶抑制剂混合物产生以下最终浓度: 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 2mM; 抑酶肽, 5 μ g/ml; 亮抑酶肽, 10 μ g/ml; 胃酶抑素, 10 μ g/ml; 碘乙酰胺, 100 μ M 和 EDTA, 3ng/ml。使细胞裂解 4°C 进行 1 小时并定期混合。通常以 50-100ml 洗涤剂溶液裂解 5-10x10⁹ 个细胞。4°C 以 15,000xg 离心 30 分钟, 然后使上清组分通过 0.2 μ 过滤单元 (Nalgene) 澄清裂解液。

20 H1A-A 抗原的纯化采用 mAb-偶联琼脂糖珠制备的亲和柱而实现。为产生抗体, 将细胞在大组织培养瓶中 (Corning 25160-225) 用含 10% FBS 的 RPMI 培养。通过硫酸铵分离然后蛋白-A-琼脂糖 (Sigma) 亲和层析从澄清的组织培养液中纯化得到抗体。简言之, 缓慢搅拌将饱和硫酸铵加入到组织培养上清液中至 45% (体积对体积), 4°C 过夜沉淀免疫球蛋白。沉淀的蛋白质以 10,000xg 离心 30 分钟而收获。将沉淀物然后溶解在最小体积的 PBS 中并转入透析袋 (Spectro/Por2, Mol.wt.cutoff 12,000-14,000, Spectrum Medical Ind.)。以 PBS (蛋白质溶液的 20 倍体积) 透析 4°C 24-48 小时、更换透析缓冲液 4-6 次。透析后的蛋白溶液通过离心 (10,000xg 30 分钟) 和用 1N NaOH 调节溶液 pH 至 pH8.0 而澄清。根据生产商说明水合蛋白-A-琼脂糖 (Sigma) 并准备蛋白-A-琼脂糖柱。10ml 柱床体积的柱一般可结合 50-100mg 小鼠 IgG。

30 对于大加载体积采用蠕动泵或对于较小体积 (<100ml) 通过重力将蛋白样品加载到蛋白-A-琼脂糖柱上。用几体积 PBS 洗涤此柱, 以分光光度计在 A280 监测洗

脱液直到达到基线。结合的抗体用 0.1M 柠檬酸在适当 pH (用 1N NaOH 调节到合适 pH) 下洗脱。pH6.5 用于小鼠 IgG-1, pH4.5 用于 IgG2a, pH3.0 用于 IgG2b 和 IgG3。用 2M Tris 碱中和洗脱液。合并含抗体 (以 A280 监测) 的组分, 以 PBS 透析并用 Amicon Stirred Cell 系统 (带有 YM30 膜的 Amicon 8050 型) 进一步浓缩。

5 抗 A2 mAb、BB7.2 用于亲和纯化。

HLA-A 抗原用 mAb 偶联琼脂糖珠制备的亲和柱纯化。该亲和柱通过培育蛋白-A-琼脂糖珠 (Sigma) 和上述亲和纯化的 mAb 制备。每 ml 珠 5 到 10mg mAb 是较佳比例。MAb 结合珠用硼酸盐缓冲液 (硼酸盐缓冲液: 100 mM 四硼酸钠, 154mM NaCl, pH8.2) 洗涤直到洗出液显示 A280 在基线上。加入溶于 200 mM 三乙醇胺中的二甲基 pimelimidate(20mM)使 mAb 共价交联结合于蛋白-A-琼脂糖 (Schneider 等, *J.Biol.Chem.*257:10766(1982)。室温下在旋转器中培育 45 分钟后, 用 10-20ml 的 20mM pH8.2 乙醇胺洗涤珠 2 次去除过量的交联试剂。每次之间, 将珠浆液室温下置于旋转器上 5 分钟。用硼酸盐缓冲液和 PBS 加 0.02%叠氮化钠洗涤珠。

15 然后使细胞裂解液 (5-10x10⁹ 细胞同等物) 缓慢通过 5-10ml 亲和柱 (流率为 0.1-0.25ml/每分钟) 以使抗原结合于固定的抗体。裂解液通过柱后, 随之用 20 倍柱体积的洗涤剂储存液加 0.1%十二烷基硫酸钠, 20 倍柱体积的 0.5M NaCl, 20mM Tris, pH8.0 和 10 倍柱体积的 20mM Tris, pH8.0 洗涤此柱。结合 mAb 的 HLA-A 抗原用碱性缓冲液 (50mM 二甲胺水溶液) 洗脱。另一种方法是, 也用酸性溶液如 0.15-0.25M 乙酸洗脱结合的抗原。取洗脱液一等分 (1/50) 用比色试验 (BCA 试验, Pierce) 或 SDS-PAGE, 或两者作蛋白定量。SDS-PAGE 分析如 Laemmli 所述进行 (Laemmli, 英国, *Nature* 227:680(1970)), 用已知量的牛血清白蛋白 (Sigma) 作为蛋白标准品。等位基因特异性抗体用于纯化特异性 MHC 分子。在 HLA-A2 例子中, 使用 mAb BB7.2。

25 用于测定肽与 I 型 HLA 分子结合的方案详细描述已出版 (Sette 等, *Mol.Immunol.*31:813,1994; Sidney 等, *Current Protocols in Immunology* Margulies, 编, John Wiley 和 Sons, 纽约, Section 18.3, 1998)。简言之, 将纯化的 MHC 分子 (5 到 500nM) 与各种未标记的肽抑制剂和 1-10nM¹²⁵I-放射性同位素标记探针肽在含 0.05% Noudet P-40(NP40)的 PBS 中(或 20%w/v 洋地黄皂苷用于 H-2 IA 试验)在蛋白酶抑制剂混合物存在情况下培育 48 小时。蛋白酶抑制剂(各购自 CalBioChem, La Jolla, 加州)的最终浓度为 1mM PMSF、1.3nM 1.10 邻二氮杂菲、73 μ M 胃酶抑素、30 8mM EDTA、6mM N-乙基马来酰亚胺和 200 μ M N-α -对位甲苯磺酰基-L-赖氨酸氯甲基酮(TLCK)。所有试验在 pH7.0 进行。

5 培育后，将 MHC-肽复合物通过在 7.8mm x15cm TSK200 柱（TosoHaas 16215, Montgomeryville, PA）上作凝胶过滤与游离肽分离，用含 0.5% NP40 和 0.1% NaN_3 的 PBS pH6.5 以 1.2 ml/分钟洗脱。使 TSK 柱的洗脱液通过 Beckman170 放射性同位素探测器，对放射活性作图并用 Hewlett-Packard 3396A 积分仪积分，确定了肽结合组分。

放射性同位元素标记肽用氯胺-T 方法碘化。在每次试验中使用了特异性放射性同位素标记的探针肽。通常，在初步实验中，在存在固定量的放射性同位素标记的肽时滴定各个 MHC 制品以确定结合 10-20%总放射性必须的 HLA 分子的浓度。所有后续抑制试验和直接结合试验用这些 HLA 浓度进行。

10 由于在这些条件： $[\text{标记}] < [\text{HLA}]$ 和 $\text{IC}_{50} \geq [\text{HLA}]$ 下，测定的 IC_{50} 值是真实 K_d 值的合理近似值。肽抑制剂一般在浓度范围 $120 \mu\text{g/ml}$ 到 1.2ng/ml ，在 2 到 4 次完全独立的实验中测试。为比较不同实验获得的数据，将每个测试肽 IC_{50} （通常为未用放射性同位素标记的探针肽）的 IC_{50} 。除以阳性抑制对照，也即包括在每次结合试验中的参比肽的 IC_{50} ，计算出各肽的相对结合指数。为用于数据库和实验
15 间比较，汇总相对结合值。这些值可随后通过将感兴趣肽的相对结合值除以参比肽的标准历史 IC_{50} 值转变成标准化的 IC_{50}nM 值。此种数据汇总方法经证明对于比较不同日期测试的肽或不同批纯化的 MHC 是最精确和一致的。例如，本文描述的 HLA-A2.1 结合试验的标准参比肽（或阳性对照）是具有序列 FLPSDYFPSV 的肽，在多次重复结合试验中其平均历史 IC_{50} 为 5nM 。此标准值可用于标准化本文所述
20 HLA-A2.1 结合试验报告的 IC_{50} 值。因此，测试 HLA-A2.1 携带基序肽的相对结合值可通过将测试的 HLA-A2.1 携带基序肽的相对结合值除以标准参比品的 IC_{50} 值即 5nM 转变为标准化的 IC_{50} 。

实施例 5：顺序和结合分析

25 采用实施例 3 所述试验，将各测试肽的 IC_{50} 除以阳性抑制对照的 IC_{50} 计算出各肽的相对结合值。这些值随后，可通过将感兴趣肽的相对结合值除以阳性抑制对照的 IC_{50} 转变成 IC_{50}nM 值。这种数据汇总方法已证明对于比较不同日期测试的肽或不同批纯化的 MHC 是最精确和一致的。标准化的相对结合值（ARB）也可计算出具有特别特征的所有肽的几何平均值或相对结合平均值（ARB）（Ruppert, J. 等，
30 “结合 HLA-A2.1 分子的肽中次要锚定残基的显著作用”，*Cell* 74:929-937(1993)；Sidney, J. 等，“HLA-A3-类超基序的明确显示常见 HLA 分子的重叠肽结合组成成分”，*Hum Immunol.* 45:79-93(1996)；Sidney, J. 等，“结合 HLA-B7-类似 I 型分子的肽

的特异性和简并性”, *J.Immunol.*157:3480-3490(1996);Kondo,A.等,“结合 HLA-A24 人 I 型分子的肽中次要锚定残基的显著作用”, *J.Immunol.*155:4307-4312(1995); Kondo,A.等,“两种不同 HLA-A*0101-特异性亚基序阐明了另一种肽结合模式”, *Immunogenetics* 45:249-258(1997);Gulukota,K.等,“预测结合主要组织相容性复合体分子的肽的两种互补方法”, *J.Mol.Biol.*267:1258-1267(1997);Southwood,S.等“几种常见 HLA-DR 类型共有大的重叠肽结合组成成分”, *J.Immunol.*160:3363-3373(1998)。

基于 ARB 的影响到肽结合于 HLA-A2 超型分子的次要相互作用图已如前所述获得 (Ruppert, J. 等,“结合 HLA-A2.1 分子的肽中次要锚定残基的显著作用”, *Cell* 74:929-937(1993); Sidney,J.等,“HLA-A3-类超基序的明确显示常见 HLA 分子的重叠肽结合组成成分”, *Hum Immunol.*45:79-93(1996); Sidney,J.等,“结合 HLA-B7-类 I 型分子的肽的特异性和简并性”, *J.Immunol.*157:3480-3490(1996);Kondo,A.等,“结合 HLA-A24 人 I 型分子的肽中次要锚定残基的显著作用”, *J.Immunol.*155:4307-4312(1995); Kondo,A.等,“两种不同 HLA-A*0101-特异性亚基序阐明了另一种肽结合模式”, *Immunogenetics* 45:249-258(1997);Gulukota,K.等,“预测结合主要组织相容性复合体分子的肽的两种互补方法”, *J.Mol.Biol.*267:1258-1267(1997)。基本上选出了有给定大小(8、9、10 或 11 个氨基酸的肽)和至少一个耐受性主要锚定残基进行分析。对各个大小组的肽的结合能力通过测定在特殊位置含特异性氨基酸残基的肽的 ARB 值作了分析。为测定主要锚定位置的特异性,将 ARB 值相对于带有最佳结合相关残基的肽的 ARB 进行标准化。对于次要锚定决定基,将 ARB 值相对于整个肽组的 ARB 进行标准化。例如,测定了所有 1 位含 A 或 7 位含 F 等的 9-聚肽的 ARB 值。由于某些氨基酸罕见,一些分析残基如前所述根据各自化学相似性进行分类 (Ruppert, J. 等, 同前; Sidney,J.等, 同前; Sidney,J.等, 同前; Kondo,A.等, 同前; Kondo,A.等, 同前; Gulukota,K.等, 同前; Southwood,S.等, 同前)。

HLA-A2-超型分子的频率

为选择代表主要民族中频率最高的等位基因形式的一组 A2-超型分子,采用了 D.Mann 和 M.Fernandez-Vina 的未发表的人群分类数据。这些数据与发表的数据一致 (Sudo,T.等,“HLA I 型等位基因的 DNA 分类: I. HLA-A2 和- A28 亚组”, *Hum.Immunol.*33:163-173(1992);Ellis,J.M.等,“HLA-A2 等位基因在五种美国人群中的频率” *Hum.Immunol.*61:334-340(2000);Krausa,P.等“HLA-A*02 中的遗传性多

态现象：不同人群中表现出显著的等位基因变化”，*Tissue Antigens* 45:233-231(1995) 和 Imanishi,T.等“在不同民族中 HLA 及互补基因座的等位基因和单倍型的频率” Tsuji,K.等 (eds) :*HLA* 1991,第十一届国际组织相容性专题讨论会和大会论文汇编, 第一卷, 牛津大学出版社, 牛津, pp.1065-1220(1992)), 并列在表 3 中。对所考虑
5 的 4 个主要民族, 显然 7 个 HLA 等位基因代表了绝大部分 A2-超型等位基因。包括在此组的有 A*0201、A*0202、A*0203、A*0205、A*0206、A*0207 和 A*6802。每个这些等位基因存在于 2%或更多的普通人群中, 在至少一个主要民族中也超过 5%频率出现。其他等位基因在任何一个主要民族人群中仅有 1.3%或不到的稀少频率, 而且在一般人群中此种稀少等位基因没有一种频率超过 1%。基于这些观察,
10 选择 A*0201、A*0202、A*0203、A*0205、A*0206、A*0207 和 A*6802 来研究在 A2-超型中所定义肽的结合特异性和交叉反应。

A2-超型分子的主要锚定位置

前面研究表明对命名为 A2-超型的一组 I 型分子有着大重叠肽结合特异性。这
15 里, 对 A2-超型分子的主要肽结合特异性作了更详细地检测。一些结果前面已发表, 这里列出的仅作为参考目的 (Ruppert, J. 等, 同上; 和 Sidney,J.等, “HLA-A*0207 肽结合组成成分局限于 A*0201 组成成分的一个亚组”, *Hum.Immunol.*58:12-20(1997))。

在第一系列研究中, 将非保守赖氨酸(K)替换引入 2 个前述能结合多个 A2-超型
20 分子的两种肽的每个位置: 1) HCV NS3 590 9-聚肽 (序列 YLVAYQATV), 2) HBV 核心 18 F₆>Y 10-聚类似物肽 (序列 FLPSDYFPSV)。测试了这些肽结合 A*0201、A*0202、A*0203、A*0205、A*0206、A*0207 和 A*6802 的能力。在表 4a 和 4b 中, 结合能力以相对于亲代肽的比率表示。结合能力在最佳结合剂 10 倍内的肽认为
25 为较佳; 相对结合能力小于最佳结合剂 10-100 倍的肽认为耐受。破折号 (“-”) 表示小于 0.01 的相对结合。在 HCV NS3 590 肽 (表 4a) 例子中, 在 2 位和 C 末端的 K 替换导致对各 HLA 分子的结合下降了 100 多倍。在 A*6802 中当 1 和 5 位作 K 替换时, 也发现结合下降了 100 多倍。当在其它几个位置尤其是 3 和 7 位作替换时, 发现结合能力下降范围为 10-100 倍。当研究 10-聚 HBV 核心 18 F₆>Y 配体时 (表 4b), 当肽在 2 位和 C 末端替换时, 再次发现结合能力下降 100 多倍。结合的
30 显著降低也在 7 位替换后观察到。

总之, 这些数据提示 A2-超型分子通过 2 位和 C 末端锚定残基能结合 9-和 10-聚肽配体。朝向肽中部的存在其他主要或次要锚定残基由结合 9-和 10-聚肽的能力

通常为 7 位替换所减弱的得到证明。

表 3
A2-超型分子等位基因在 4 个主要民族中的表型频率

等位基因	表型频率				
	黑人	高加索人	东方人	西班牙人	平均
A*0201	22.3	45.6	18.1	37.1	30.8
A*6802	12.7	1.8	0.0	4.2	4.7
A*0206	0.0	0.4	9.3	6.3	4.0
A*0207	0.0	0.0	11.0	0.0	2.7
A*0205	5.2	1.8	0.3	3.0	2.5
A*0203	0.0	0.0	8.8	0.0	2.2
A*0202	6.4	0.0	0.5	1.3	2.0
A*6901	0.0	0.7	0.3	1.3	0.6
A*0211	0.0	0.0	0.0	1.3	0.3
A*0212	0.0	0.0	0.3	0.8	0.3
A*0213	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1
A*0214	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
总体	43.1	48.2	45.0	51.9	47.1

5

表 4a
HCV NS3 590

序列									相对结合能力					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*6802
Y	L	V	A	Y	Q	A	T	V	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
K									0.40	0.050	0.31	0.19	0.29	-
	K								-	-	-	-	-	-
		K							0.53	0.093	0.60	0.63	0.064	0.022
			K						0.36	0.19	0.44	1.0	0.41	0.17
				K					0.17	0.026	0.30	0.23	0.16	-
					K				0.54	0.033	0.27	0.24	0.10	0.060
						K			0.054	0.016	0.32	0.14	0.065	0.043
							K		0.24	0.13	0.37	0.79	0.14	0.13
								K	-	-	-	-	-	-

表 4b

HBV 核心 18 F₆>Y

序列										相对结合能力						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*0207	A*6802
F	L	P	S	D	Y	F	P	S	V	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
K										0.43	0.75	0.72	0.36	1.7	0.24	-
	K									-	-	-	-	-	-	-
		K								0.44	0.39	13	0.27	0.17	-	0.22
			K							0.95	0.82	3.4	0.61	1.3	1.3	0.43
				K						0.60	0.75	12	0.60	0.76	0.85	0.77
					K					0.58	0.70	6.8	0.40	0.39	1.8	1.6
						K				-	-	0.079	-	-	0.027	-
							K			0.25	0.22	6.1	0.076	0.29	0.25	0.092
								K		0.14	0.18	0.21	0.18	0.25	0.14	0.42
									K	-	-	-	-	-	-	-

2 位和 C 末端锚定残基的特异性

- 5 基于这些结果,对 A2-超型分子在 2 位和 C 末端的配体特异性采用其他的 HCV NS3 590 和 HBV 核心 18 F₆>Y 单替换类似物以及聚丙烯酰胺(肽 953.01; 序列 ALAKAAAV)的单替换类似物作了分析。为了这些分析,锚定残基的较佳氨基酸定义为结合能力在最佳残基 10 倍以内的相关氨基酸。相对结合能力在 0.01 和 0.1 之间的氨基酸定义为耐受,结合能力低于 0.01 的相关氨基酸认为是非耐受。
- 10 附表中,破折号(“-”)表示低于 0.01 的相对结合。结合能力以每个分子相对于最高结合亲和力的相关类似物的比率表示。

- 发现在 2 位为 2 个小的脂肪族疏水残基通常上耐受的,而其它残基包括大的极性、芳香族和带电荷残基一般不能很好耐受(表 5a、5b 和 5c)。L、I、V 和 M 作为锚定残基在大部分(>80%)情况下较佳(表 5d)。表 5d 中等位基因/肽组合指
- 15 与相对结合范围在 1-0.1(较佳)或 0.1-0.001(耐受)相关的给定残基的许多例子。A、T、Q 和 S 较少选为锚定残基,但>80%检测情况为较佳或耐受。其它检测的氨基酸在任何情况下没有较佳的且罕见耐受。

表 5a
HCV NS3 590
相对结合能力

残基	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*6802
<u>V</u>	0.28	0.28	0.23	0.36	0.53	0.69
T	0.58	0.24	0.11	0.34	0.74	1.0
L	1.0	1.0	1.0	0.19	1.0	0.029
I	0.49	0.24	0.64	0.24	0.81	0.045
Q	0.91	0.55	0.46	1.0	0.57	-
P	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-
F	0.016	-	0.012	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-

表 5b
HBV 核心 18 F₆>Y
相对结合能力

5

残基	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*0207	A*6802
I	0.18	0.66	0.41	0.82	1.0	0.31	0.53
L	1.0	0.46	1.0	0.79	0.36	1.0	0.088
V	0.065	1.0	0.10	1.0	0.60	0.10	0.91
T	0.013	0.35	0.025	0.25	0.11	-	1.0
Q	0.26	0.049	0.49	0.074	0.15	0.053	-
F	-	-	0.015	-	-	-	0.046
D	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-

表 5c
聚丙氨酸肽 ALAKAAAV
相对结合能力

残基	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*6802
L	1.0	0.92	0.22	0.77	0.49	0.011
M	0.43	0.73	0.70	0.43	0.51	0.010
V	0.051	1.0	0.40	1.0	1.0	0.68
I	0.063	0.56	1.0	0.16	0.44	0.073
T	0.025	0.75	0.091	0.20	0.35	1.0
A	0.013	0.26	0.070	0.089	0.075	0.31
S	-	0.12	0.023	0.011	0.025	0.057
G	-	0.031	0.011	-	0.017	-
P	-	-	-	-	-	0.016
C	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-

表 5d

总结

等位基因/肽组合

5

残基	测试	较佳	耐受	较佳%	耐受或较佳%
V	19	17	2	89.5	100.0
L	19	16	3	84.2	100.0
I	19	16	3	84.2	100.0
M	6	5	1	83.3	100.0
T	19	14	4	73.7	94.7
A	6	2	4	33.3	100.0
Q	13	8	3	61.5	84.6
S	6	1	4	16.7	83.3
G	6	0	3	0.0	50.0
F	19	0	4	0.0	21.1
P	19	0	1	0.0	5.3
C	6	0	0	0.0	0.0
K	19	0	0	0.0	0.0
N	6	0	0	0.0	0.0
D	19	0	0	0.0	0.0

在 C 末端, 发现 V 在所有 3 个亲代肽中是 A*0201、A*0206 和 A*6802 的最佳残基, 在 3 个亲代肽的 2 个中是 A*0203 和 A*0205 的最佳残基 (表 6a、6b 和 6c)。总的来说, 不管测试的肽 V 或 L 是每个分子的 C 末端最佳残基,。表 6d 中等位基因/肽组合指与相对结合范围在 1-0.1 (较佳) 或 0.1-0.001 (耐受) 相关的给定残基的许多例子。脂肪族/疏水氨基酸 V、L 和 I 在超过 66.7% MHC-肽情况中是较佳锚定残基。M、A 和 T 约 50% 时间为耐受。其它检测的残基根本没有接受或罕见耐受。

A*0201 的肽结合特异性的重评估

10 利用 4000 多种长 8-11 个残基的肽的数据库更详细地研究了 A*0201 结合的精细特异性。发现 30%wt 在 2 位携带 L 或 M 的肽以 500nM 或更高亲和力结合 A*0201 (图 1a)。5-15% 携带脂肪族残基 I、V、A、T 和 Q 的肽以 500nM 或更高 IC_{50} 结合。没有其它残基包括芳香族(F、W 和 Y), 带电荷(R、H、K、D 和 E), 极性(S 和 N) 及小(C、G 和 P) 残基, 与 500nM 或更高 IC_{50} 相关。

15 与单个替换分析一致, 发现 V 是最佳的 A*0201 C 末端锚定残基 (图 1b)。总体上, 31.9% 在 C 末端有 V 的肽是 A*0201 结合剂。I、L、S、M、T 和 A 也耐受, 7.1% 到 28.6% 的肽以 500nM 或更高 IC_{50} 结合。

下面分析了肽长度 (8 到 11 个残基之间) 和结合能力之间的相互关系。发现 27.6% 的 9 聚肽以 500nM 或更低 IC_{50} 结合与前面的评估 (Ruppert,J.等,*supra*) 有很好的 consistency (表 7a)。按最佳大小的一组肽标准化 ARB 值, 并列出来作为参考。

20 更长的肽也能结合, 尽管程度有所下降; 17.8% 的 10-聚肽和 14.5% 的 11-聚肽亲和力为 500nM 或更高。最后, 发现 8-聚肽很少结合 A*0201, 3.5% 的肽结合能力超过 500nM。

25 进一步分析了 A*0201 肽结合数据库以评估 A*0201 基序的严谨性。如所预计的那样, 在每个锚定位置有较佳残基的肽结合最频繁 (48.7%), 平均相对结合能力比文库中的其它肽高 (表 7b)。有 1 个较佳残基和 1 个耐受残基的肽结合也相对频繁, 频率范围为 17.6% 到 28.4%。最后, 在两个主要锚定位置具有至少 1 个非耐受残基或都为耐受残基的肽结合罕见, 结合频率在 0-7.1% 范围。就主要锚定残基偏爱作为配体大小的函数, 没有检测到显著不同。

30

表 6a

HCV NS3 590

相对结合能力

残基	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*6802
V	1.0	0.83	1.0	0.51	1.0	1.0
I	0.22	0.14	0.60	0.30	0.17	0.075
L	0.95	1.0	0.72	1.0	0.38	0.062
T	0.16	0.012	0.11	0.017	0.034	-
F	0.066	-	0.044	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-
Q	-	-	-	-	-	-

表 6b

HBV 核心 18 F₆>Y

相对结合能力

残基	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*0207	A*6802
I	0.21	0.70	0.15	0.19	0.26	0.15	0.39
V	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L	0.18	0.43	0.23	0.26	0.077	0.23	0.087
T	0.033	0.045	0.027	0.022	0.10	0.027	-
P	0.023	-	-	-	0.012	0.010	-
D	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-
Q	-	-	-	-	-	-	-

5

表 6c
聚丙氨酸肽 ALAKAAAV
相对结合能力

残基	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0206	A*6802
<u>I</u>	0.18	0.29	0.37	0.11	0.10	0.38
V	1.0	0.73	0.20	1.0	1.0	1.0
L	0.040	1.0	1.0	0.36	0.085	0.26
M	0.025	0.18	0.031	0.049	0.034	-
A	0.072	-	0.077	-	-	0.025
S	-	-	0.011	-	-	-
T	-	-	0.043	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-
R	-	-	-	-	-	-
Y	-	-	-	-	-	-

表 6d
总结
等位基因/肽组合

5

残基	测试	较佳	耐受	较佳%	耐受或较佳%
V	19	19	0	100.0	100.0
I	19	18	1	93.3	100.0
L	19	14	5	66.7	100.0
M	6	1	4	20.0	83.3
T	19	3	9	20.0	63.2
A	6	0	3	0.0	50.0
S	6	0	1	0.0	16.7
P	19	0	3	0.0	15.8
F	19	0	2	0.0	10.5
C	6	0	0	0.0	0.0
G	6	0	0	0.0	0.0
N	6	0	0	0.0	0.0
R	6	0	0	0.0	0.0
K	13	0	0	0.0	0.0
Y	6	0	0	0.0	0.0
D	13	0	0	0.0	0.0
Q	13	0	0	0.0	0.0

表 7a
结合作为肽大小的函数

肽长度	(n)	结合肽%	ARB
8	171	3.5	0.072
9	2066	27.6	1.0
10	1451	17.8	0.27
11	179	14.5	0.20
总体	3867	22.2	

表 7b
结合作为主要锚定基的序函数

5

基序		(n)	结合% 肽	ARB
2 位	C 末端			
较佳	较佳	526	48.7	1.0
较佳	耐受	1446	28.4	0.31
耐受	较佳	558	17.6	0.098
非耐受	较佳	27	0.0	0.031
较佳	非耐受	66	6.1	0.026
耐受	耐受	1337	7.1	0.026
非耐受	耐受	46	0.0	0.015
非耐受	非耐受	71	0.0	0.014
耐受	非耐受	105	0.0	0.013
总体		4182	20.7	

为鉴定次要锚定残基的作用,通过测定在特异的但大小依赖性位置含特殊氨基酸残基的肽的 ARB 值进一步分析了各组中肽的 A*0201 结合能力。8-11-聚序列相应残基/位置对的 ARB 值,列于表 8a-8d。表 8a-8d 中所有的肽在主要锚定位置具有至少 1 个较佳和 1 个耐受残基。在次要锚定位置对应于结合能力 3 倍或更大增加的值以加深的黑体字表示。与结合亲和力减少 3 倍相关的负作用用下划线和斜体字表示。确定为较佳或耐受锚定的残基以黑体字表示。锚定位置分析物产生的 ARB 值的描述见图 1。为使用此表所示的值作为预测运算法的系数,将非耐受锚定残基的值设为 0.001,相当于结合能力减少 1000 倍,以过滤掉非基序肽。

15 在表 8a、8b、8c 和 8d 中,一组 93 个 8-聚肽、1389 个 9-聚肽、953 个 10-聚

肽及 95 个 11-聚肽的分析结果分别根据不同病毒、细菌或致病原的天然产生的序列。所列 ARB 值的计算按 Sidney 等, *Human Immunology* 62:1200(2001)和 Sidney 等, *J.Immunology* 157:3480(1996)中所述进行。对 9-聚和 10-聚肽, 分别考虑了各残基产生的 ARB 值。为研究 8-聚和 11-聚肽 (分别见表 8a 和 8d), ARB 值根据化学相似残基分组, 如 Rvppert 等, *Cell* 74:929(1993)中所述。8-聚、9-聚、10-聚及 11-聚组的几何平均结合能力分别为 14420nM、1581nM、3155nM 和 3793nM。

5 汇总图见图 2a-2d。在大部分位置, 可检测到一些次要影响, 多数 (55%) 负影响涉及酸性 (D 和 E) 或碱性 (R、H 和 K) 残基。脯氨酸 (P) 和大极性残基 (Q 和 N) 也经常断裂。尽管每种具体大小与独特偏爱相关, 在大部分情况下
10 (79%) 优选残基是芳香族残基(F、W 或 Y),或疏水性残基 (L、I、V 或 M)。多数肽长度表现出对 3 位 F、Y 和 M 的偏爱。类似的, 所有大小的肽享有在 C-2 位芳香族或疏水残基的偏爱。

表 8a

8-聚肽
位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.47	0.052	2.0	0.57	1.8	8.9	0.83	0.28
C	1.3	0.0010	0.70	1.3	0.59	2.3	1.1	0.0010
D	<u>0.23</u>	0.0010	0.42	0.43	0.34	0.43	0.50	0.0010
E	<u>0.23</u>	0.0010	0.42	0.43	0.34	0.43	0.50	0.0010
F	2.5	0.0010	1.4	1.3	<u>0.27</u>	3.4	1.2	0.0010
G	1.5	0.0010	17	1.8	2.7	0.38	4.8	0.0010
H	0.95	0.0010	<u>0.30</u>	0.54	0.61	0.40	0.55	0.0010
I	2.4	0.17	1.4	2.0	9.9	1.5	1.0	0.35
K	0.95	0.0010	<u>0.30</u>	0.54	0.61	0.40	0.55	0.0010
L	2.4	1.0	1.4	2.0	9.9	1.5	1.0	0.34
M	2.4	0.73	1.4	2.0	9.9	1.5	1.0	0.13
N	0.90	0.0010	1.0	0.51	0.38	0.38	0.66	0.0010
P	<u>0.33</u>	0.0010	0.38	0.40	0.75	0.50	3.4	0.0010
Q	0.90	0.076	1.0	0.51	0.38	0.38	0.66	0.0010
R	0.95	0.0010	<u>0.30</u>	0.54	0.61	0.40	0.55	0.0010
S	1.3	0.0010	0.70	1.3	0.59	2.3	1.1	0.0010
T	1.3	0.075	0.70	1.3	0.59	2.3	1.1	0.11
V	2.4	0.084	1.4	2.0	9.9	1.5	1.0	1.0
W	2.5	0.0010	1.4	1.3	<u>0.27</u>	3.4	1.2	0.0010
Y	2.5	0.0010	1.4	1.3	<u>0.27</u>	3.4	1.2	0.0010

15

表 8b
9-聚肽
位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.8	0.052	1.2	2.3	1.9	0.45	2.3	0.80	0.28
C	0.70	0.0010	0.57	2.7	1.4	2.1	0.86	1.2	0.0010
D	<u>0.065</u>	0.0010	1.2	1.7	0.84	0.52	<u>0.21</u>	0.34	0.0010
E	<u>0.065</u>	0.0010	<u>0.14</u>	1.5	<u>0.31</u>	0.58	<u>0.32</u>	1.4	0.0010
F	9.1	0.0010	4.4	1.1	2.4	2.6	6.8	4.1	0.0010
G	0.84	0.0010	0.58	1.6	0.69	0.43	0.28	0.79	0.0010
H	0.68	0.0010	0.79	0.83	3.8	<u>0.26</u>	1.7	1.3	0.0010
I	1.3	0.17	1.8	0.56	2.1	2.0	1.5	0.45	0.35
K	1.5	0.0010	<u>0.14</u>	0.56	0.57	<u>0.17</u>	<u>0.19</u>	0.46	0.0010
L	1.9	1.0	2.2	0.70	1.3	2.6	2.9	2.1	0.34
M	1.4	0.73	4.6	<u>0.20</u>	0.97	1.5	1.0	<u>0.30</u>	0.13
N	1.1	0.0010	0.78	0.52	<u>0.32</u>	0.90	0.47	0.47	0.0010
P	<u>0.074</u>	0.0010	0.64	0.62	0.47	0.89	1.6	1.6	0.0010
Q	<u>0.33</u>	0.076	1.2	0.74	1.0	0.83	0.62	0.78	0.0010
R	1.6	0.0010	<u>0.13</u>	0.47	0.47	<u>0.17</u>	<u>0.17</u>	0.49	0.0010
S	0.99	0.0010	0.65	1.2	0.45	0.97	0.51	2.0	0.0010
T	0.60	0.075	0.53	2.1	0.59	1.9	0.98	1.3	0.11
V	0.93	0.084	1.2	0.56	1.7	2.7	0.75	<u>0.30</u>	1.0
W	0.58	0.0010	25	5.1	2.7	1.3	7.6	1.9	0.0010
Y	10	0.0010	4.3	0.52	3.2	1.0	7.4	1.7	0.0010

表 8c
10-聚肽
位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1.3	0.052	1.7	1.6	1.4	1.1	0.62	1.2	1.0	0.28
C	0.63	0.0010	1.3	1.3	1.8	0.51	1.3	2.6	1.2	0.0010
D	<u>0.12</u>	0.0010	0.85	1.4	1.1	1.1	0.39	<u>0.22</u>	0.38	0.0010
E	<u>0.11</u>	0.0010	<u>0.17</u>	2.8	<u>0.28</u>	0.75	0.43	0.40	0.92	0.0010
F	4.4	0.0010	4.1	1.4	3.2	2.3	3.0	5.0	5.3	0.0010
G	1.5	0.0010	0.44	2.1	0.91	0.91	0.81	0.67	1.1	0.0010
H	0.54	0.0010	0.90	0.76	1.2	0.42	0.74	1.6	0.52	0.0010
I	1.4	0.17	3.1	0.67	2.4	1.6	2.7	1.5	0.57	0.35
K	1.8	0.0010	<u>0.13</u>	0.44	<u>0.26</u>	0.39	0.48	<u>0.22</u>	0.47	0.0010
L	1.9	1.0	3.6	1.2	1.3	1.3	4.5	2.5	1.2	0.34
M	1.4	0.73	9.8	1.1	0.58	1.7	2.2	4.6	0.38	0.13
N	0.58	0.0010	0.56	1.4	0.39	1.1	0.43	<u>0.33</u>	0.79	0.0010
P	<u>0.11</u>	0.0010	0.53	0.66	0.40	0.92	0.86	1.7	0.85	0.0010
Q	<u>0.30</u>	0.076	0.97	<u>0.30</u>	1.7	0.48	0.41	<u>0.32</u>	0.70	0.0010
R	1.1	0.0010	<u>0.19</u>	0.35	<u>0.33</u>	0.77	<u>0.27</u>	<u>0.17</u>	0.38	0.0010
S	1.7	0.0010	0.38	0.60	0.43	0.58	0.49	0.87	1.1	0.0010
T	0.83	0.075	0.44	1.1	1.6	0.89	1.0	0.49	1.2	0.11
V	1.2	0.084	0.96	0.54	2.0	2.2	1.1	1.8	1.4	1.0
W	0.71	0.0010	1.8	4.2	3.5	1.1	2.6	4.8	1.5	0.0010
Y	9.0	0.0010	7.4	0.74	0.67	0.52	2.0	2.7	2.0	0.0010

表 8d
11-聚肽
位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0.34	0.052	1.8	2.7	2.4	2.2	1.0	<u>0.23</u>	<u>0.074</u>	1.3	0.28
C	2.2	0.0010	<u>0.17</u>	<u>0.21</u>	0.98	1.4	1.9	0.63	0.79	1.4	0.0010
D	<u>0.21</u>	0.0010	0.40	12	0.94	<u>0.30</u>	<u>0.21</u>	<u>0.25</u>	<u>0.28</u>	1.5	0.0010
E	<u>0.21</u>	0.0010	0.40	12	0.94	<u>0.30</u>	<u>0.21</u>	<u>0.25</u>	<u>0.28</u>	1.5	0.0010
F	1.2	0.0010	6.1	0.40	2.6	<u>0.11</u>	1.4	8.8	6.1	<u>0.17</u>	0.0010
G	3.3	0.0010	<u>0.13</u>	1.0	<u>0.30</u>	14	21	5.3	0.76	9.0	0.0010
H	12	0.0010	0.42	0.58	<u>0.12</u>	<u>0.088</u>	1.4	0.51	<u>0.16</u>	<u>0.33</u>	0.0010
I	4.4	0.17	9.2	1.4	2.4	3.7	0.87	2.1	5.5	0.83	0.35
K	12	0.0010	0.42	0.58	<u>0.12</u>	<u>0.088</u>	1.4	0.51	<u>0.16</u>	<u>0.33</u>	0.0010
L	4.4	1.0	9.2	1.4	2.4	3.7	0.87	2.1	5.5	0.83	0.34
M	4.4	0.73	9.2	1.4	2.4	3.7	0.87	2.1	5.5	0.83	0.13
N	<u>0.12</u>	0.0010	<u>0.092</u>	1.7	0.57	1.3	<u>0.19</u>	1.6	1.1	<u>0.21</u>	0.0010
P	<u>0.056</u>	0.0010	1.7	0.38	1.4	<u>0.13</u>	0.35	1.1	<u>0.088</u>	12	0.0010
Q	<u>0.12</u>	0.076	<u>0.092</u>	1.7	0.57	1.3	<u>0.19</u>	1.6	1.1	<u>0.21</u>	0.0010
R	12	0.0010	0.42	0.58	<u>0.12</u>	<u>0.088</u>	1.4	0.51	<u>0.16</u>	<u>0.33</u>	0.0010
S	2.2	0.0010	<u>0.17</u>	<u>0.21</u>	0.98	1.4	1.9	0.63	0.79	1.4	0.0010
T	2.2	0.075	<u>0.17</u>	<u>0.21</u>	0.98	1.4	1.9	0.63	0.79	1.4	0.11
V	4.4	0.084	9.2	1.4	2.4	3.7	0.87	2.1	5.5	0.83	1.0
W	1.2	0.0010	6.1	0.40	2.6	<u>0.11</u>	1.4	8.8	6.1	<u>0.17</u>	0.0010
Y	1.2	0.0010	6.1	0.40	2.6	<u>0.11</u>	1.4	8.8	6.1	<u>0.17</u>	0.0010

对给定大小的肽也观察到几种不同偏爱模式。例如，8-聚肽在 1 或 3 位对 9-、
5 10-和 11-聚肽偏爱的疏水或芳香族残基没有任何偏爱。11-聚肽在整个肽中部多个位置独偏爱 G。

其它 A2-超型分子的主要锚定特异性

在下面分析中，评估四个靠近 A*0201 的最普遍 A2 超型等位基因 A*0202、
10 A*0203、A*0206 和 A*6802 的主要锚定特异性。A2 超型结合数据库中的肽常常反

映出利用基于 A*0201 偏性的选择，如只选择 A*0201 结合肽或选择 A*0201 算法得分高的肽。结果，在大部分情况中，只有其具较佳超型和耐受的残基的肽可得到非 A*0201 分子的肽结合数据。尽管有此限制，得到了约 400 种肽的数据库可供研究。没有得到足够大小的数据库来分析 A*0205 和 A*0207，虽然 A*0207 特异性分析已在先前发表了 (Sidney,J.等，同前)。

2 位特异性的分析总体于图 3a-d 中。通常,V、T、A、I 和 M 在每个分子情况下均耐受。也发现等位基因特异性偏爱。在 A*0202 例子中 Q 是最偏爱的残基。其它残基 (L、I、V、A、T 和 M) 则耐受，大致相当于 0.08-0.30 范围的 ARB。相反，A*0203 偏爱 L、M 和 Q。残基 V、A、I 和 T 与较低的总体结合亲和力相关。对 A*0206 发现了第三种模式，其中 Q、V、I、A 和 T 均很好耐受，ARB 值在 0.47 和 1.0 之间，而 L 和 M 没那么耐受。最后，对 A*6802，V 和 T 是最佳残基，ARB>0.45。A 也是偏爱的，但 ARB 较低 (0.13)。I 和 M 观察到结合显著下降，ARB 在 0.050 和 0.020 之间。L 和 Q 不耐受，ARB<0.010。在 C 末端，I、V、L、A、M 和 T 为所有测试的 A2 超型分子所耐受，ARB>0.060 (图 4a-d)。I 和 V 是各等位基因最偏爱的两个残基；V 是 A*0203、A*0206 和 A*6802 的最佳残基。L 通常是次最偏爱残基。T、A 和 M 常与较低 ARB 值相关。

总之，为 A*0201 偏爱或耐受的 2 位和 C 末端锚定残基也为其它 A2 超型分子良好耐受。尽管每个等位基因在 2 位具有某种独特的偏爱模式，每个等位基因在 C 末端表现出的偏爱模式完全类似。

对结合 A2 超型分子的肽的次要影响

分析了相同文库的肽配基以确定 A*0202、A*0203、A*0206 和 A*6802 的配基大小偏爱。对每个等位基因，ARB 值按最佳大小肽组标准化。我们发现对每个分子 9-11 聚肽均很好耐受，ARB>0.36 (表 9a-d)。对 A*0203、A*0206 和 A*6802，9 聚肽最佳，但 10-聚肽在 A*0202 中最佳。对所有等位基因，8-聚肽耐受差得多，每个均 ARB<0.11。

表 9a A*0202

肽长度	(n)	ARB
8	6	0.050
9	268	0.79
10	120	1.0
11	16	0.90
总体	410	

表 9b A*0203

肽长度	(n)	ARB
8	6	0.11
9	272	1.0
10	122	0.75
11	16	0.36
总体	416	

表 9c A*0206

肽长度	(n)	ARB
8	6	0.066
9	268	1.0
10	120	0.38
11	16	0.66
总体	410	

5

表 9d A*6802

肽长度	(n)	ARB
8	6	0.071
9	268	1.0
10	120	0.60
11	16	0.47
总体	410	

接着检测了次要锚定残基对肽结合 A*0202、A*0203、A*0206 和 A*6802 能力的影响。可得到的肽数目仅允许分析 9-和 10-聚配基。9-和 10-聚肽的 ARB 值作为在特定位置存在特殊残基的函数列于表 10-13 中，汇总图见图 5-8。如上所述，正和负作用定义为分别与结合亲和力 3 倍或更大增加或减少相关。

在表 10a 和 10b 中，对一组 268 个 9-聚肽和一组 120 个 10-聚肽分别测试了结合 A*0202 等位基因。在表 11a 和 11b 中，对一组 272 个 9-聚肽和一组 122 个 10-聚肽分别测试了结合 A*0203 等位基因。在表 12a 和 12b 中，对一组 268 个 9-聚肽和一组 120 个 10-聚肽分别测试了结合 A*0206 等位基因。在表 13a 和 13b 中，对一组 268 个 9-聚肽和一组 120 个 10-聚肽分别测试了结合 A*6802 等位基因。所有肽根据不同病毒、细菌或致病原的天然产生序列并在主要锚定位置具有至少 1 个较佳或耐受残基。ARB 值根据化学相似残基分组，一般如 Roppert 等，*Cell*

74:929(1993)中所述。在次要锚定位置对应于结合能力 3 倍或更大增加的值以黑体字表示。与结合亲和力减少 3 倍的负作用用下划线和斜体字表示。确定为较佳或耐受的锚定残基以黑体字表示。为利用此表中所示值作为预测算法的系数，将非耐受锚定残基的值设为 0.001，相当于结合能力降低 1000 倍，以过滤掉非基序肽。

- 5 在表 10a、10b、11a、11b、12a、12b、13a 和 13b 中各组的平均几何结合能力分别为 401nM、342nM、85nM、95nM、387nM、643nM、838nM 和 1055nM。

一般，有害作用经常与带电荷残基（D、E、R、H 或 K）相关。另外 35%有害影响可归因于 G 或 P。正影响相对平均来源于碱性（R、H、K），酸性（D 和 E），疏水性（F、W、Y、L、I、V、M）或小（A、P）残基。

- 10 虽然每个分子有独特的偏爱和厌恶模式，一些共同倾向可见于 10-聚肽例子中。例如，对所有分子，Q 和 N 在 1 位较佳，R、H 和 K 在 8 位较佳。D、E 和 G 对 10-聚肽在 3 位都是有害的。对 9-聚肽中没有发现共有序列的偏爱或厌恶。

表 10a

9-聚肽

位置 (ARB)

15

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.1	0.16	4.2	1.5	0.86	<u>0.23</u>	2.4	1.1	0.43
C	<u>0.30</u>	0.0010	0.71	1.2	2.1	2.1	0.95	0.95	0.0010
D	<u>0.083</u>	0.0010	<u>0.097</u>	1.2	0.78	0.71	<u>0.23</u>	0.95	0.0010
E	<u>0.083</u>	0.0010	<u>0.097</u>	1.2	0.78	0.71	<u>0.23</u>	0.95	0.0010
F	2.0	0.0010	2.1	0.59	1.9	0.51	0.77	3.0	0.0010
G	0.46	0.0010	0.66	1.9	<u>0.23</u>	0.36	0.71	0.64	0.0010
H	1.6	0.0010	0.34	0.74	0.58	0.43	1.8	1.1	0.0010
I	1.1	0.17	1.1	1.4	0.79	2.2	0.75	0.41	1.0
K	1.6	0.0010	0.34	0.74	0.58	0.43	1.8	1.1	0.0010
L	1.1	0.081	1.1	1.4	0.79	2.2	0.75	0.41	0.76
M	1.1	0.14	1.1	1.4	0.79	2.2	0.75	0.41	0.17
N	0.37	0.0010	0.35	<u>0.24</u>	1.8	0.87	1.5	1.3	0.0010
P	0.42	0.0010	2.8	0.43	0.55	<u>0.26</u>	0.75	1.9	0.0010
Q	0.37	1.0	0.35	<u>0.24</u>	1.8	0.87	1.5	1.3	0.0010
R	1.6	0.0010	0.34	0.74	0.58	0.43	1.8	1.1	0.0010
S	<u>0.30</u>	0.0010	0.71	1.2	2.1	2.1	0.95	0.95	0.0010
T	<u>0.30</u>	0.18	0.71	1.2	2.1	2.1	0.95	0.95	0.15
V	1.1	0.29	1.1	1.4	0.79	2.2	0.75	0.41	0.92
W	2.0	0.0010	2.1	0.59	1.9	0.51	0.77	3.0	0.0010
Y	2.0	0.0010	2.1	0.59	1.9	0.51	0.77	3.0	0.0010

表 10b
10-聚肽
位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1.2	0.16	1.1	0.81	1.4	3.1	0.56	1.4	2.4	0.43
C	<u>0.27</u>	0.0010	0.44	3.0	1.2	0.95	0.43	1.6	1.5	0.0010
D	<u>0.16</u>	0.0010	<u>0.28</u>	2.2	9.1	3.6	2.2	<u>0.0077</u>	1.8	0.0010
E	<u>0.16</u>	0.0010	<u>0.28</u>	2.2	9.1	3.6	2.2	<u>0.0077</u>	1.8	0.0010
F	3.9	0.0010	5.8	1.3	0.83	2.8	1.3	1.5	1.1	0.0010
G	<u>0.32</u>	0.0010	<u>0.098</u>	0.88	1.0	0.44	<u>0.32</u>	1.0	0.59	0.0010
H	2.1	0.0010	2.0	0.52	0.89	<u>0.21</u>	0.74	9.9	<u>0.22</u>	0.0010
I	0.76	0.17	0.85	0.65	0.67	0.60	6.7	0.40	0.60	1.0
K	2.1	0.0010	2.0	0.52	0.89	<u>0.21</u>	0.74	9.9	<u>0.22</u>	0.0010
L	0.76	0.081	0.85	0.65	0.67	0.60	6.7	0.40	0.60	0.76
M	0.76	0.14	0.85	0.65	0.67	0.60	6.7	0.40	0.60	0.17
N	4.2	0.0010	0.38	1.4	0.66	0.36	<u>0.26</u>	0.79	0.91	0.0010
P	0.46	0.0010	1.1	<u>0.091</u>	2.3	2.5	<u>0.14</u>	1.2	3.8	0.0010
Q	4.2	1.0	0.38	1.4	0.66	0.36	<u>0.26</u>	0.79	0.91	0.0010
R	2.1	0.0010	2.0	0.52	0.89	<u>0.21</u>	0.74	9.9	<u>0.22</u>	0.0010
S	<u>0.27</u>	0.0010	0.44	3.0	1.2	0.95	0.43	1.6	1.5	0.0010
T	<u>0.27</u>	0.18	0.44	3.0	1.2	0.95	0.43	1.6	1.5	0.15
V	0.76	0.29	0.85	0.65	0.67	0.60	6.7	0.40	0.60	0.92
W	3.9	0.0010	5.8	1.3	0.83	2.8	1.3	1.5	1.1	0.0010
Y	3.9	0.0010	5.8	1.3	0.83	2.8	1.3	1.5	1.1	0.0010

表 11a
9-聚肽
位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.95	0.077	4.4	2.3	1.2	0.36	4.3	1.4	0.17
C	0.41	0.0010	0.83	1.4	0.91	0.86	1.8	1.7	0.0010
D	0.42	0.0010	<u>0.069</u>	0.73	<u>0.28</u>	0.36	0.56	0.64	0.0010
E	0.42	0.0010	<u>0.059</u>	0.73	<u>0.28</u>	0.36	0.56	0.64	0.0010
F	3.3	0.0010	0.71	0.55	1.5	<u>0.28</u>	<u>0.075</u>	1.3	0.0010
G	1.1	0.0010	1.8	1.5	0.86	1.3	3.2	1.2	0.0010
H	0.63	0.0010	4.2	0.91	1.9	0.71	0.95	<u>0.30</u>	0.0010
I	1.1	0.070	0.77	0.85	0.63	1.9	1.2	0.56	0.56
K	0.63	0.0010	4.2	0.91	1.9	0.71	0.95	<u>0.30</u>	0.0010
L	1.1	1.0	0.77	0.85	0.63	1.9	1.2	0.56	0.14
M	1.1	0.63	0.77	0.85	0.62	1.9	1.2	0.56	0.17
N	0.36	0.0010	1.3	0.59	2.1	1.3	0.97	1.3	0.0010
P	<u>0.015</u>	0.0010	1.0	0.55	1.2	1.8	1.0	4.4	0.0010
Q	0.36	0.51	1.3	0.59	2.1	1.3	0.97	1.3	0.0010
R	0.63	0.0010	4.2	0.91	1.9	0.71	0.95	<u>0.30</u>	0.0010
S	0.41	0.0010	0.83	1.4	0.91	0.86	1.8	1.7	0.0010
T	0.41	0.45	0.83	1.4	0.91	0.86	1.8	1.7	0.26
V	1.1	0.10	0.77	0.85	0.63	1.9	1.2	0.56	1.0
W	3.3	0.0010	0.71	0.55	1.5	<u>0.28</u>	<u>0.075</u>	1.3	0.0010
Y	3.3	0.0010	0.71	0.55	1.5	<u>0.28</u>	<u>0.075</u>	1.3	0.0010

表 11b

10-聚肽

位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2.1	0.077	1.5	1.1	3.8	1.3	0.56	1.7	3.0	0.17
C	0.68	0.0010	<u>0.33</u>	1.0	0.82	0.69	0.69	2.2	1.1	0.0010
D	<u>0.32</u>	0.0010	<u>0.074</u>	3.7	1.1	2.4	0.60	16	2.8	0.0010
E	<u>0.32</u>	0.0010	<u>0.074</u>	3.7	1.1	2.4	0.60	16	2.8	0.0010
F	8.3	0.0010	6.4	0.66	1.0	1.3	1.7	<u>0.23</u>	1.3	0.0010
G	1.0	0.0010	<u>0.32</u>	0.59	0.63	1.0	<u>0.33</u>	3.8	2.6	0.0010
H	0.75	0.0010	3.9	1.4	0.62	0.55	0.77	4.7	<u>0.085</u>	0.0010
I	<u>0.29</u>	0.070	0.83	0.60	1.1	0.57	3.3	0.65	0.52	0.56
K	0.75	0.0010	3.9	1.4	0.62	0.55	0.77	4.7	<u>0.085</u>	0.0010
L	<u>0.29</u>	1.0	0.83	0.60	1.1	0.57	3.3	0.65	0.52	0.14
M	<u>0.29</u>	0.63	0.83	0.60	1.1	0.57	3.3	0.65	0.52	0.17
N	6.0	0.0010	0.43	2.8	0.75	1.3	<u>0.17</u>	0.89	0.91	0.0010
P	<u>0.019</u>	0.0010	0.90	<u>0.091</u>	1.1	4.9	3.6	1.4	2.5	0.0010
Q	6.0	0.51	0.43	2.8	0.75	1.3	<u>0.17</u>	0.89	0.91	0.0010
R	0.75	0.0010	3.9	1.4	0.62	0.55	0.77	4.7	<u>0.085</u>	0.0010
S	0.68	0.0010	<u>0.33</u>	1.0	0.82	0.69	0.69	2.2	1.1	0.0010
T	0.68	0.045	<u>0.33</u>	1.0	0.82	0.69	0.69	2.2	1.1	0.26
V	<u>0.29</u>	0.10	0.83	0.60	1.1	0.57	3.3	0.65	0.52	1.0
W	8.3	0.0010	6.4	0.66	1.0	1.3	1.3	<u>0.23</u>	1.3	0.0010
Y	8.3	0.0010	6.4	0.66	1.0	1.3	1.3	<u>0.23</u>	1.3	0.0010

表 12a

9-聚肽

位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.95	0.52	0.91	1.6	0.74	<u>0.21</u>	1.3	0.53	0.16
C	0.35	0.0010	0.47	1.1	1.4	0.75	0.72	1.6	0.0010
D	0.81	0.0010	0.51	1.4	2.2	1.2	<u>0.21</u>	0.64	0.0010
E	0.81	0.0010	0.51	1.4	2.2	1.2	<u>0.21</u>	0.64	0.0010
F	2.5	0.0010	1.4	0.85	1.9	1.6	2.0	3.3	0.0010
G	0.67	0.0010	<u>0.33</u>	2.4	<u>0.24</u>	0.34	0.81	0.82	0.0010
H	1.7	0.0010	<u>0.13</u>	0.47	0.62	0.61	0.85	0.83	0.0010
I	0.77	0.49	4.1	0.82	0.86	2.4	0.74	0.46	0.54
K	1.7	0.0010	<u>0.13</u>	0.47	0.62	0.61	0.85	0.83	0.0010
L	0.77	0.061	4.1	0.82	0.86	2.4	0.74	0.46	0.23
M	0.77	0.18	4.1	0.82	0.86	2.4	0.74	0.46	0.071
N	0.48	0.0010	0.39	<u>0.29</u>	2.0	0.94	1.3	1.0	0.0010
P	<u>0.11</u>	0.0010	0.47	<u>0.32</u>	<u>0.27</u>	<u>0.19</u>	2.1	1.4	0.0010
Q	0.48	1.0	0.39	<u>0.29</u>	2.0	0.94	1.3	1.0	0.0010
R	1.7	0.0010	<u>0.13</u>	0.47	0.62	0.61	0.85	0.83	0.0010
S	0.35	0.0010	0.47	1.1	1.4	0.75	0.72	1.6	0.0010
T	0.35	0.47	0.47	1.1	1.4	0.75	0.72	1.6	0.11
V	0.77	0.53	4.1	0.82	0.86	2.4	0.74	0.46	1.0
W	2.5	0.0010	1.4	0.85	1.9	1.6	2.0	3.3	0.0010
Y	2.5	0.0010	1.4	0.85	1.9	1.6	2.0	3.3	0.0010

表 12b

10-聚肽

位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2.4	0.52	0.62	1.2	2.1	0.55	<u>0.17</u>	0.53	5.3	0.16
C	0.61	0.0010	<u>0.23</u>	0.71	1.4	0.80	0.56	1.2	0.78	0.0010
D	<u>0.068</u>	0.0010	<u>0.099</u>	2.7	11	3.2	1.2	0.38	4.0	0.0010
E	<u>0.068</u>	0.0010	<u>0.099</u>	2.7	11	3.2	1.2	0.38	4.0	0.0010
F	3.0	0.0010	4.1	0.80	1.2	2.6	1.8	2.1	0.45	0.0010
G	0.71	0.0010	<u>0.072</u>	0.81	0.61	0.48	0.71	0.73	0.41	0.0010
H	1.4	0.0010	<u>0.17</u>	0.56	0.66	0.86	0.96	5.0	<u>0.25</u>	0.0010
I	0.42	0.49	3.8	0.67	0.76	0.90	4.9	0.79	1.0	0.54
K	1.4	0.0010	<u>0.17</u>	0.56	0.66	0.86	0.96	5.0	<u>0.25</u>	0.0010
L	0.42	0.061	3.8	0.67	0.76	0.90	4.9	0.79	1.0	0.23
M	0.42	0.18	3.8	0.67	0.76	0.90	4.9	0.79	1.0	0.071
N	6.1	0.0010	<u>0.28</u>	1.8	0.47	0.82	<u>0.14</u>	<u>0.20</u>	0.34	0.0010
P	<u>0.17</u>	0.0010	0.84	1.2	0.57	0.83	<u>0.26</u>	1.3	3.6	0.0010
Q	6.1	1.0	<u>0.28</u>	1.8	0.47	0.82	<u>0.14</u>	<u>0.20</u>	0.34	0.0010
R	1.4	0.0010	<u>0.17</u>	0.56	0.66	0.86	0.96	5.0	<u>0.25</u>	0.0010
S	0.61	0.0010	<u>0.23</u>	0.71	1.4	0.80	0.56	1.2	0.78	0.0010
T	0.61	0.47	<u>0.23</u>	0.71	1.4	0.80	0.56	1.2	0.78	0.11
V	0.42	0.53	3.8	0.67	0.76	0.90	4.9	0.79	1.0	1.0
W	3.0	0.0010	4.1	0.80	1.2	2.6	1.8	2.1	0.45	0.0010
Y	3.0	0.0010	4.1	0.80	1.2	2.6	1.8	2.1	0.45	0.0010

表 13a

9-聚肽

位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.36	0.13	6.8	0.98	0.71	<u>0.14</u>	3.4	0.71	0.15
C	1.0	0.0010	0.42	0.92	0.95	1.7	0.60	0.75	0.0010
D	352	0.0010	<u>0.30</u>	0.70	<u>0.28</u>	0.70	0.36	0.45	0.0010
E	352	0.0010	<u>0.30</u>	0.70	<u>0.28</u>	0.70	0.36	0.45	0.0010
F	7.6	0.0010	2.7	1.4	1.8	2.3	1.5	2.1	0.0010
G	<u>0.054</u>	0.0010	<u>0.24</u>	2.5	0.48	0.53	0.85	1.9	0.0010
H	<u>0.16</u>	0.0010	<u>0.27</u>	0.55	0.68	3.2	3.2	1.5	0.0010
I	2.2	0.052	0.88	1.3	1.1	0.80	0.65	0.57	0.80
K	<u>0.16</u>	0.0010	<u>0.27</u>	0.55	0.68	3.2	3.2	1.5	0.0010
L	2.2	0.0078	0.88	1.3	1.1	0.80	0.65	0.57	0.32
M	2.2	0.023	0.88	1.3	1.1	0.80	0.65	0.57	0.093
N	0.83	0.0010	1.6	0.45	0.36	0.71	0.46	1.8	0.0010
P	0.49	0.0010	2.8	0.43	24	2.3	0.71	1.7	0.0010
Q	0.83	0.0010	1.6	0.45	0.36	0.71	0.46	1.8	0.0010
R	<u>0.16</u>	0.0010	<u>0.27</u>	0.55	0.68	3.2	3.2	1.5	0.0010
S	1.0	0.0010	0.42	0.92	0.95	1.7	0.60	0.75	0.0010
T	1.0	0.45	0.42	0.92	0.95	1.7	0.60	0.75	0.062
V	2.2	1.0	0.88	1.3	1.1	0.80	0.65	0.57	1.0
W	7.6	0.0010	2.7	1.4	1.8	2.3	1.5	2.1	0.0010
Y	7.6	0.0010	2.7	1.4	1.8	2.3	1.5	2.1	0.0010

表 13b

10-聚肽

位置 (ARB)

残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.50	0.13	5.6	3.5	2.7	0.69	0.71	1.3	1.4	0.15
C	2.1	0.0010	1.4	1.4	<u>0.20</u>	0.72	<u>0.26</u>	1.1	0.55	0.0010
D	3.2	0.0010	<u>0.042</u>	4.8	4.3	0.68	<u>0.28</u>	<u>0.10</u>	1.2	0.0010
E	3.2	0.0010	<u>0.042</u>	4.8	4.3	0.68	<u>0.28</u>	<u>0.10</u>	1.2	0.0010
F	1.1	0.0010	2.7	1.4	1.3	1.5	4.9	0.98	2.2	0.0010
G	<u>0.086</u>	0.0010	<u>0.16</u>	0.38	2.1	0.54	1.5	1.5	0.66	0.0010
H	0.73	0.0010	<u>0.16</u>	<u>0.15</u>	0.70	<u>0.18</u>	3.8	3.1	0.88	0.0010
I	1.2	0.052	1.2	1.2	2.8	1.8	1.7	0.96	0.74	0.80
K	0.73	0.0010	<u>0.16</u>	<u>0.15</u>	0.70	<u>0.18</u>	3.8	3.1	0.88	0.0010
L	1.2	0.0078	1.2	1.2	2.8	1.8	1.7	0.96	0.74	0.32
M	1.2	0.023	1.2	1.2	2.8	1.8	1.7	0.96	0.74	0.093
N	16	0.0010	<u>0.22</u>	1.5	<u>0.20</u>	8.4	3.2	<u>0.31</u>	1.6	0.0010
P	115	0.0010	<u>0.17</u>	<u>0.045</u>	<u>0.090</u>	0.60	<u>0.12</u>	0.96	1.8	0.0010
Q	16	0.0010	<u>0.22</u>	1.5	<u>0.20</u>	8.4	3.2	<u>0.31</u>	1.6	0.0010
R	0.73	0.0010	<u>0.16</u>	<u>0.15</u>	0.70	<u>0.18</u>	3.8	3.1	0.88	0.0010
S	2.1	0.0010	1.4	1.4	<u>0.20</u>	0.72	<u>0.26</u>	1.1	0.55	0.0010
T	2.1	0.45	1.4	1.4	<u>0.20</u>	0.72	<u>0.26</u>	1.1	0.55	0.062
V	1.2	1.0	1.2	1.2	2.8	1.8	1.7	0.96	0.74	1.0
W	1.1	0.0010	2.7	1.4	1.3	1.5	4.9	0.98	2.2	0.0010
Y	1.1	0.0010	2.7	1.4	1.3	1.5	4.9	0.98	2.2	0.0010

概括起来, 此章节中的数据详细描述了 9-和 10-聚肽结合 A*0202、A*0203、A*0206 和 A*6802 的基序。与肽结合, 每个基序具有特殊的与好或弱相关的特征。

5

共有的 A2-超基序

上述 A2 超型分子的基序非常类似并且有很大程度重叠。在此方面, 可鉴定出分子-特异性基序普遍共有的特征性的一个共有超基序 (图 9)。该共有基序特征是在肽配基的 2 位存在疏水和脂肪族残基。在此位置, V、L 和 M 优选, 而 T、Q、

A 和 T 都耐受。根据每个 A2 超型分子中各残基的偏爱等级, V 是最优先的残基。在 C 末端该共有基序特征是存在疏水和脂肪族残基 L、I、V、M、A 和 T。V 是最常见的最佳残基, 而 L 和 T 也认为是优选的, 通常是次最佳残基。M、A 和 T 认为是耐受残基。

- 5 用 A*0201、A*0202、A*0203、A*0206 和 A*6802 的次要锚定图产生了 9-和 10-聚肽的超型共有次要锚定基序 (图 9)。认为对 3 种或多种 A2 超型分子优选且对任何分子无害的残基为该超偏爱的共有基序。相反, 鉴定为对 3 种或多种分子有害的残基在共有基序中称为有害残基。该共有基序与详细的 A*0201 基序明显重叠, 包括对 1 和/或 3 位芳香族残基的偏爱和对 3 位带电荷残基的厌恶。

10

A*0201 结合亲和力和 A2 超型交叉反应之间的相互关系

- 由于与其它 A2 超型等位基因相比较四个主要民族 A*0201 占优势 (如见表 3), 确定 A*0201 结合肽也结合其它 A2 超型分子的程度令人感兴趣。发现以良好亲和力 ($IC_{50} < 500nM$) 结合 A*0201 的肽常常结合其它 A2 超型分子 (表 14a)。36.1% 到 73.6% 的 A*0201 结合肽能结合其它 A2 超型分子。分析 A2 超型简并性作为 A*0201 亲和力的函数也产生了有趣的结果。72.8% 的以 $IC_{50} < 500nM$ 结合 A*0201 的肽能结合 3 种或多种 A2 超型分子 (表 14b)。作为普遍规律, 某肽对 A*0201 的结合亲和力越高, 该肽也能结合 3 种或多种超型分子的可能性越大。超过 96% 以 20nM 或更高亲和力结合 A*0201 的肽, 也结合 3 种或多种 A2 超型分子。相反, 不能以大于 500nM 亲和力结合 A*0201 的 A2-超基序肽很少 (10%) 结合 3 种或多种 A2 超基序分子, 并且从不结合 4 种以上分子。

- 20 概括起来, 分析肽对 A*0201 和其它 A2 超型分子的交叉反应性结合证实了该 HLA 分子家族能识别它们肽配基中的相似结构特征。也证明了 A*0201 结合亲和力与结合多种 A2 超型等位基因的倾向相关。

25

表 14a

A2 超型分子之间的交叉反应性

等位基因	交叉反应的结合肽%					平均
	A*0201	A*0202	A*0203	A*0206	A*6802	
A*0201		54.9	73.6	50.2	36.1	53.7
A*0202	54.9		50.2	38.7	26.2	42.5
A*0203	73.6	50.2		42.7	30.0	49.1
A*0206	50.2	38.7	42.7		24.3	39.0
A*6802	36.1	26.2	30.0	24.3		29.2

表 14b

A*0201 结合肽的简并性

5

A*0201 亲和力	A2 超型等位基因结合 (肽%)						
	0	1	2	3	4	5	>=3
<=20	0.0	0.0	3.5	17.5	36.8	42.1	96.5
<=100	0.0	3.6	11.2	21.4	34.7	29.1	85.2
<=500	0.0	7.1	20.1	25.1	28.3	19.3	72.8
>500	40.0	33.3	16.7	10.0	0.0	0.0	10.0

分析

本分析的结果可详细描述能结合 HLA-A*0201 和其它 A2 超型分子的肽的特性。A2 超型分子不仅共有很大程度重叠的肽结合特异性，而且共有明显重叠的肽结合组成成分。鉴定与简并性 A2 超型分子结合能力相关的肽配基的特征，为超型关系提供了合理解释。

在先前研究中，分析了 A*0201 的肽结合特异性，构建了详细的基序包括次要锚定特征的鉴定。在本分析中，采用大 10 倍的数据库，我们证实了数据并将分析延伸到包括 8-和 11-聚肽。总体上，A*0201 对 8-和 11-聚肽的特异性与对 9-和 10-聚肽的很相似。例如，不论肽的大小，大部分对结合能力的负影响与次要锚定位置中存在带电荷残基相关，而大部分正影响与存在疏水残基相关。确定对 8-和 11-聚肽的详细基序应能更完全的鉴定抗原表位。使用基于 ARB 值的算法大大促进了 A*0201 结合肽的鉴定。在本分析中，采用了比以前大许多的数据库，使算法系数

精确。由于该较新的系数基于大许多的数据，它们在统计学上更精确并且应提供更有效确切的抗原表位预测。确实，近来的分析表明基于更大数据库的修订的 A*0201 9-聚体多项式运算法则，比基于小数据库的旧运算法则和中性网络预测方法都更精确。除了提高抗原表位预测的准确性（Ruppert,J.等，同前；Sidney,J.等，同前；Kondo,A.等，同前；Gulukota,K.等同前；Parker,K.C.等，“结合人 MHC I 类分子 HLA-A2 的肽的重要序列基序”，*J.Immunol.*149:3580-3587(1992)和 Milik,M.等，“预测特异性 I 型 MHC 结合肽序列的人造中性网络的应用”，*Nature(Biotech)*16:753-756(1998))，明确主要和次要锚定位位置的详细的肽结合基序可合理设计最佳配基。例如，可鉴定在主要和/或次要位置携带亚最适残基的天然顺序。亚最适残基可用最佳锚定残基替换，产生结合亲和力提高的抗原表位（Sidney,J.等，同前；Pogue,R.R.等，“HLA- A*0201-限制的人免疫缺陷病毒 Pol 肽氨基末端的改变提高了复合物的稳定性和体外免疫原性”，*Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 92:8166-8170(1995)和 Bakker,A.B.等，“MHC I 类结合能力提高的 CTL 表位的类似物诱导了识别野生型表位的抗黑色素瘤 CTL”，*Int.J.Cancer*,70:302-309(1997)）。这种类型修饰后，不能诱导应答的野生型肽或弱免疫原，可能成为高度免疫原性 Pogue,R.R.等，同前；Bakker,A.B.,等，同前；Parkhurst,M.R.,等，“在 HLA- A*0201-结合肽中经修饰的黑色素瘤抗原 gp100 的肽促进了黑色素瘤反应性 CTL 的诱导”，*J.Immunol.*157:2539-2548(1996);Rosenberg,S.A.等，“用于治疗转移性黑色素瘤病人的合成肽疫苗的免疫学和治疗评价”，*Nature(Med)*4:321-327(1998);Sarobe,P.等，“在次要 HLA-A2.1 结合位置氨基酸替代后提高了丙型肝炎病毒核心蛋白的 CTL 表位的体外能力和体内免疫原性”，*J.Clin.Invest.*102:1239-1248(1998)和 Ahlers,J.D.等“通过修饰天然肽序列提高了 HIV-1 疫苗构建物的免疫原性”，*Proc.Natl. Acad. Sci. USA*,94:10856-10861(1997)）。这些类似物肽诱导的 CTL 已显示在大部分情况下能识别表达野生型抗原序列的靶细胞。这个现象可能反映靶细胞识别表位结合所需的要求比激活原初 T 细胞诱导分化成为效应物所需的严谨性低（Cho,B.K.等，“记忆和原初 CD8T 细胞之间的功能差异”，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,96:2976-2981(1999); Sykulev,Y.等，“靶细胞上的一种肽-MHC 复合物可诱导细胞毒性 T 细胞应答的证据”，*Immunity* 4:565-571(1996)）。因此，本文描述的详细基序不仅促进对天然产生的 CTL 表位的鉴定，而且有利于设计结合能力和/或免疫原特性提高的基因工程表位。

也用单一替换类似物肽和肽文库研究了其它 A2 超型分子的肽结合特异性。与前面报导一致（del Guercio,M-F,等，“肽抗原与多种 HLA 等位基因的结合得的明

确 A2-类超型”, *J.Immunol.*154:685-693(1995)和 (Sidney,J.等, “发现 HLA I 型超基序的实际、生化和进化意义”, *Immunol Today* 17:261-266(1996));见 NIH-NIAID 合同 NO1-AI-45241 案卷的报告),我们发现 A2-超型分子的主要锚定基序非常相似。利用肽文库得以详细特征归鉴定每个分子的次要锚定残基的偏爱和厌恶。尽管每

5 种 A2-超型分子具有独特的特异性,但可能鉴定到以共有序列模式为基础的超基序。由于超基序描述了 A2-超型分子中共有的肽配基的特征,预期可有效鉴定高到交叉反应的肽并显示锚着固定的适当策略,可调节肽配基的超型简并性。本分析进一步的结果是产生了可在预测结合 A*0202、A*0203、A*0206 和 A*6802 肽的算法中用的系数。

10 由于迄今 HLA A*0201 在一般人群中 and 主要民族中都是最普遍的 A2-超型等位基因,故所用的肽筛选策略首先集中在鉴定 A*0201 结合肽上。已确定超过 70%的结合 A*0201 的肽也结合至少 2 种另外的 A2-超型分子,结合其它 A2-超型等位基因的倾向与 A*0201 结合亲和力相关。

总之,本文所述数据提供了命名为 A2-超型的一组 HLA-A 分子共有的肽结合

15 特异性的正式证据。不仅这些分子识别它们肽配基的主要和次要锚定位置上的类似特征,而且它们享有很大程度的重叠性肽结合组成成分。证明这些分子享有很大程度的重叠性肽组成成分对设计潜在的疫苗构建物有重要意义。确实, A2-超型在肽结合水平上的交叉反应性也许有免疫相关性的想法已在许多研究中得到证明,感染性疾病 (Khanna R.等 “在 EB 病毒 (EBV) 致癌基因潜在膜蛋白 1 (LMP1)

20 中细胞毒性 T 细胞表位的鉴定: LMP1-特异性细胞毒性 T 淋巴细胞对 EBV 感染细胞的 HLA A2 超型-限制的免疫识别的证据”, *Eur J Immunol*,28:451-458(1998);Bertoletti,A.等, “乙型肝炎病毒核衣膜 T 细胞表位 18-27 的分子特征:与 HLA T 细胞受体相互作用”,*Hepatology* 26:1027-1034(1997);Livingston,B.D.等, “用 HBV 核心 18-27 表位免疫在表达不同 HLA-A2 超型分子的人体中诱导了 CTL 应

25 答”, *Hum Immunol* 60:1013-1017,(1999);Bertoni,R.等, “人组织相容性白血球抗原结合超基序预测在急性肝炎病人中广泛交叉反应的细胞毒性 T 淋巴细胞反应”, *J Clin Invest* 100:503-513(1997);Doolan,D.L.等, “受多种 HLA-A 和 HLA-B 超型等位基因限制的 *P.falciparum* 的简并性细胞毒性 T 细胞表位”,*Immunity* 7:97-112(1997)) 和癌症 (Fleischhauer,K.等, “多种 HLA-A 等位基因可呈递人黑色素瘤抗原

30 Melan-A/MART-1 的免疫优势肽给肽特异性 HLA-A*0201+细胞毒性细胞系”, *J Immunol*,157:787-797(1996);Rivoltini,L.等, “通过 HLA-A2 亚型结合和呈递产生于黑色素瘤抗原 MART-1 和糖蛋白-100 的肽:对于以肽为基础的免疫治疗的意义”,

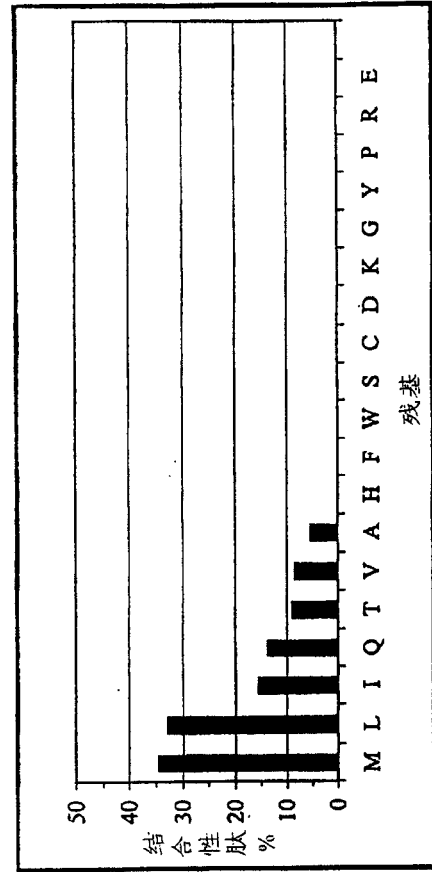
J Immunol,156:3882-3891(1996);Kawashima,I. “癌症免疫治疗的多表位方法：突体上皮肿瘤上表达的各种肿瘤相关抗原的几种 CTL 表位的鉴定”, *Hum Immunol* 59:1-14,(1998)。

5 实施例 6：预防性应用的肽组合物

本发明的疫苗组合物可用于防止人感染或治疗癌症。例如，可将含多种 CTL 和 HTL 表位的多表位肽表位组合物给予有感染 HCV 危险的个体。该组合物可作为含多种表位的一种脂化多肽提供。此疫苗可包含弗氏不完全佐剂的含水载体中使用。初次免疫的肽剂量对 70kg 病人是约 1 至 50,000 μ g 每人剂量。初次使用疫苗后 4 周给予加强剂量，然后评估病人免疫应答强度，采用的技术可测定 PBMC 样品中表位特异性 CTL 细胞群的存在。其它加强剂量按所需给予。发现此组合物作为抗 HCV 感染预防注射即安全又有效。

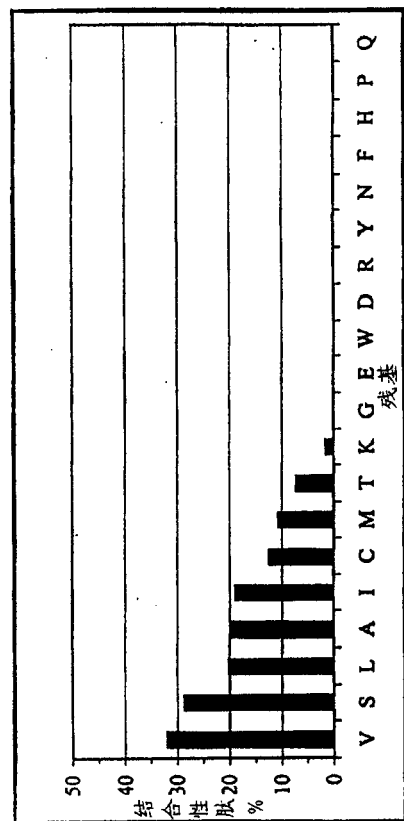
另外，该多表位肽的组合物可按照本领域已知的方法和本文所述方法作为核酸给予。

15 上述讨论旨在阐明本发明而不是限制其范围。本发明的其它变化对本领域普通技术人员是显然懂得的并包括在附加权利要求书中。本文引用的所有出版物、专利和专利申请包括在参考文献中。



残基	(n)	% 结合性肽	ARB
M	319	34.5	0.73
L	1719	32.6	1.00
I	498	15.5	0.17
Q	44	13.6	0.076
T	381	8.9	0.075
V	622	8.4	0.084
A	455	5.3	0.052
H	1	0.0	0.28
F	8	0.0	0.12
W	3	0.0	0.068
S	5	0.0	0.052
C	6	0.0	0.044
D	3	0.0	0.043
K	6	0.0	0.038
G	2	0.0	0.030
Y	19	0.0	0.030
P	10	0.0	0.028
R	6	0.0	0.027
E	4	0.0	0.022
N	0	0.0	0.0
总计	4111	21.0	

图 1a



残基	(n)	% 结合性肽 ARB
V	1111	1.00
S	7	0.36
L	1154	0.34
A	597	0.28
I	642	0.35
C	8	0.27
M	142	0.13
T	294	0.11
K	64	0.038
G	8	0.072
E	2	0.064
W	2	0.064
D	4	0.054
R	24	0.049
Y	41	0.048
N	2	0.046
F	1	0.032
H	3	0.032
P	3	0.032
Q	2	0.032
Total	4111	21.0

图 1b

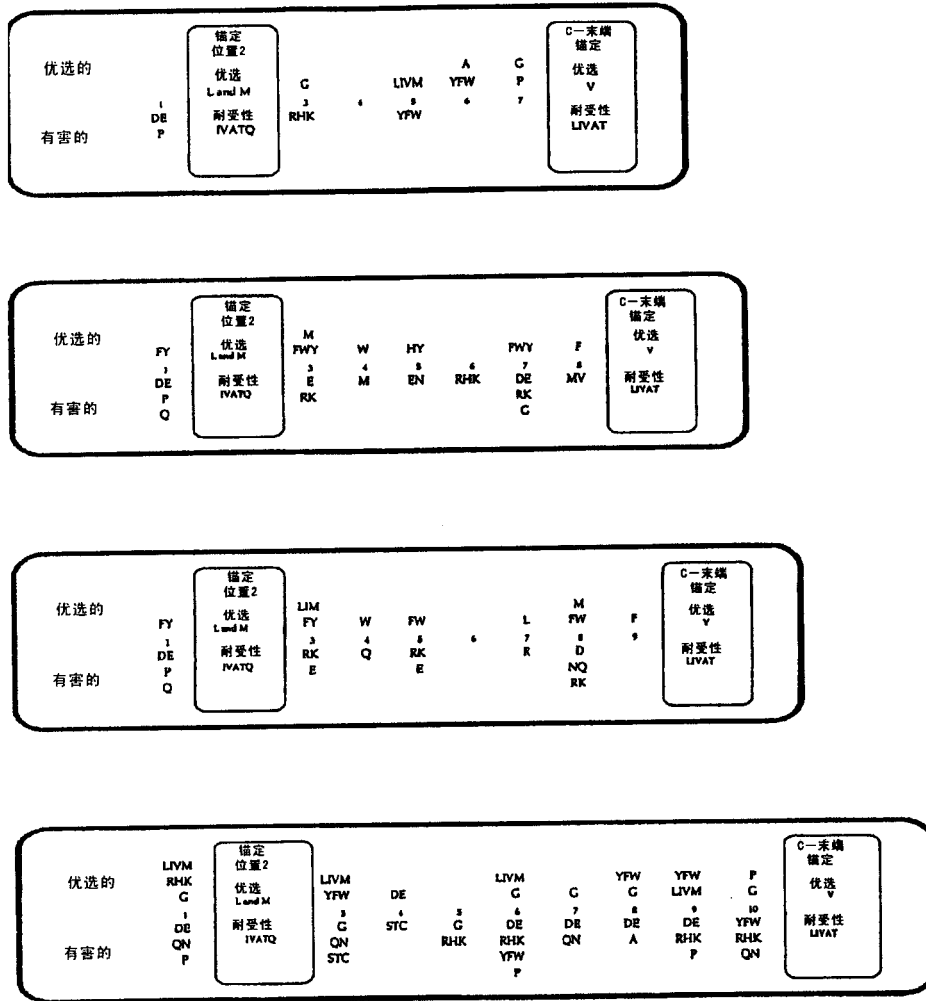


图 2

A*0202

残基	(n)	ARB
Q	5	1.00
V	28	0.29
T	24	0.18
I	45	0.17
A	15	0.16
M	46	0.14
L	247	0.081
总计	410	

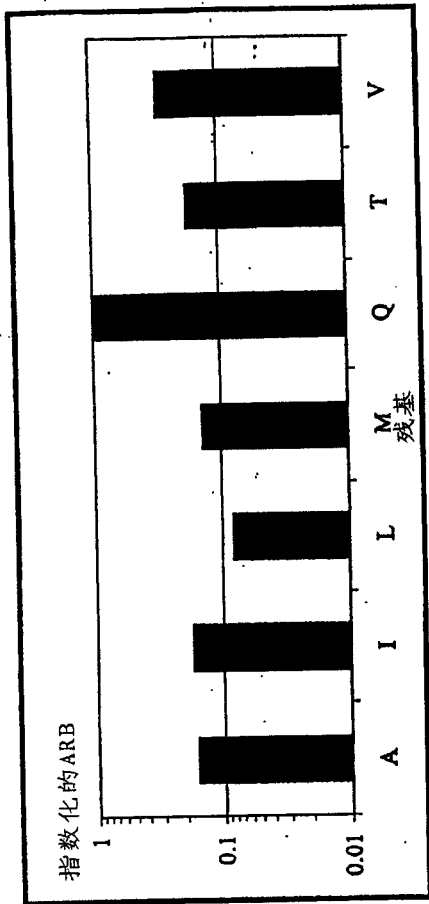


图 3a

A*0203

残基	(n)	ARB
L	252	1.00
M	47	0.63
Q	5	0.51
V	28	0.10
A	15	0.077
I	44	0.070
T	25	0.045
总计	416	

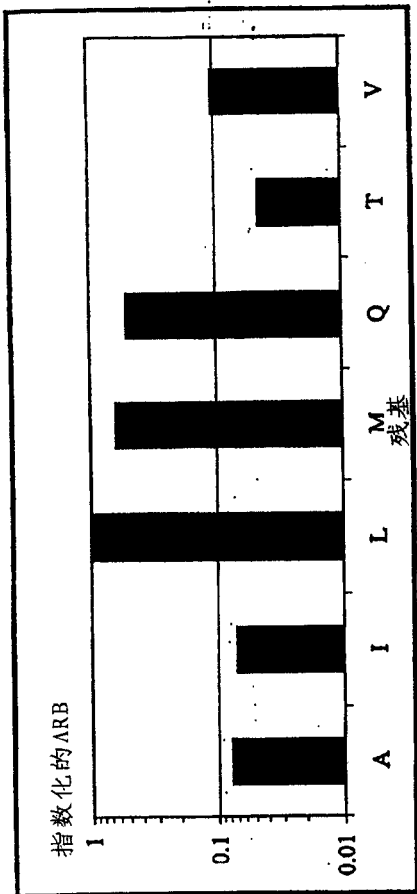
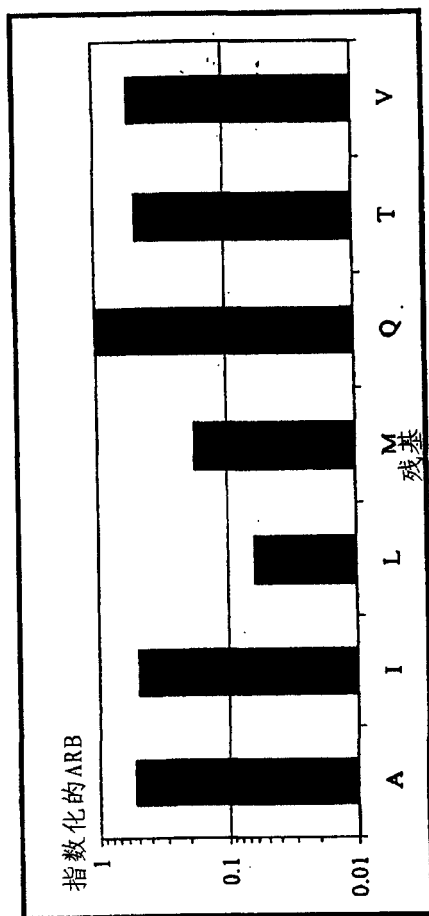


图 3b

A*0206

残基	(n)	ARB
Q	5	1.00
V	28	0.53
A	15	0.52
I	44	0.49
T	24	0.47
M	46	0.18
L	248	0.061
总计	410	



3C

A*6802

残基	(n)	ARB
V	28	1.00
T	24	0.45
A	15	0.13
I	44	0.052
M	46	0.023
L	248	0.0078
Q	5	0.00073
总计	410	

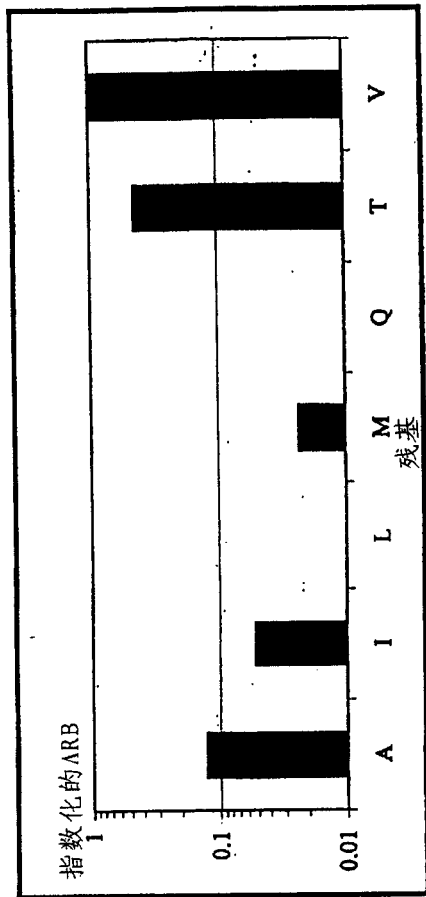


图 3d

A*0202

残基	(n)	ARB
I	54	1.00
V	153	0.92
L	122	0.76
A	60	0.43
M	8	0.17
T	13	0.15
总计	410	

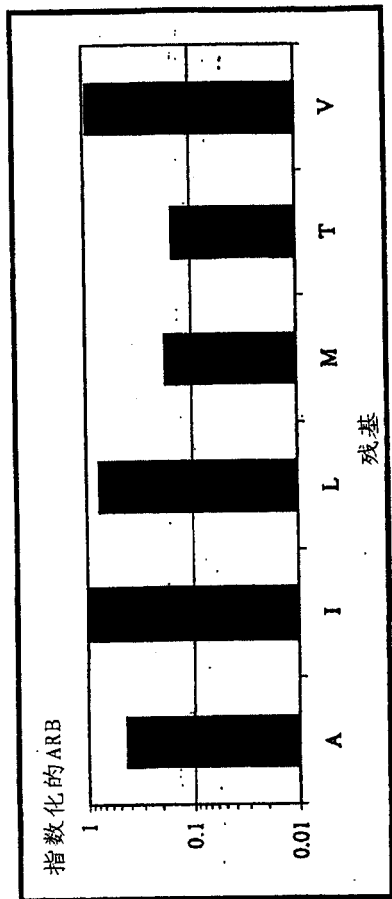


图 4a

A*0203

残基	(n)	ARB
V	156	1.00
I	54	0.56
T	13	0.26
A	61	0.17
M	8	0.17
L	124	0.14
总计	416	

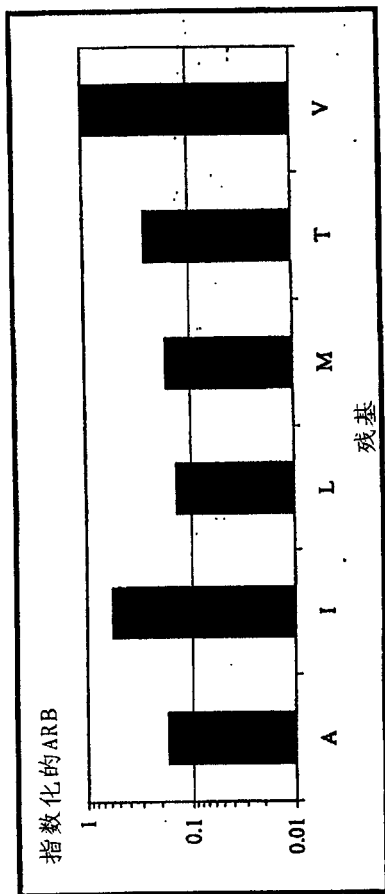


图 4b

A*0206

残基	(n)	ARB
V	153	1.00
I	53	0.54
L	122	0.23
A	61	0.16
T	13	0.11
M	8	0.071
总计	410	

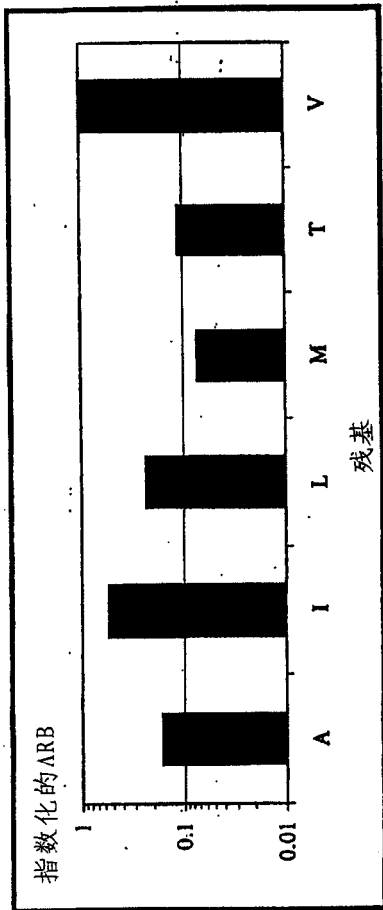


图 4C

A*6802

残基	(n)	ARB
V	153	1.00
I	53	0.80
L	122	0.32
A	61	0.15
M	8	0.093
T	13	0.062
总计	410	

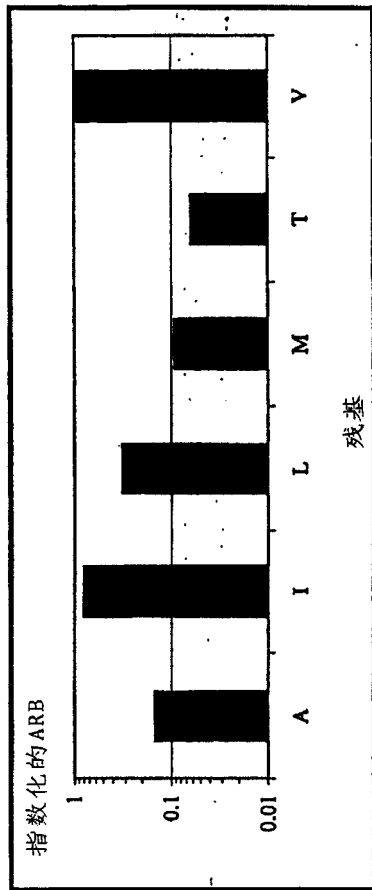
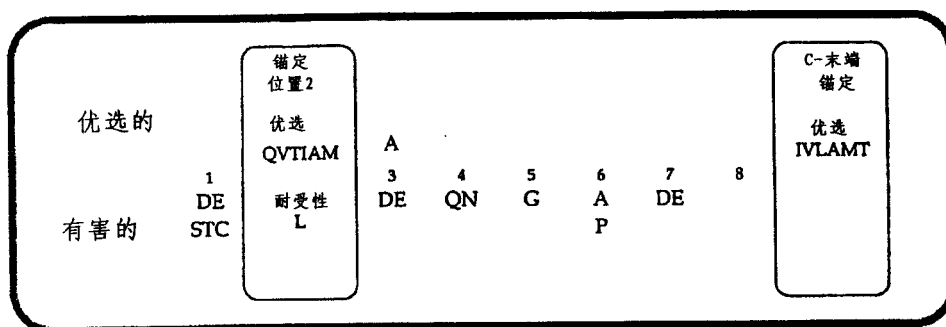


图 4d

a.



b.

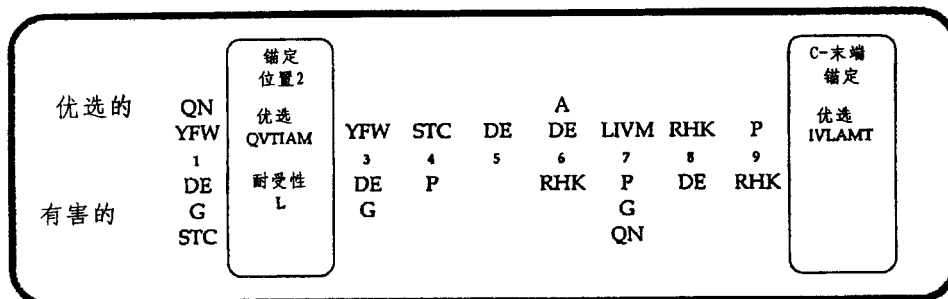
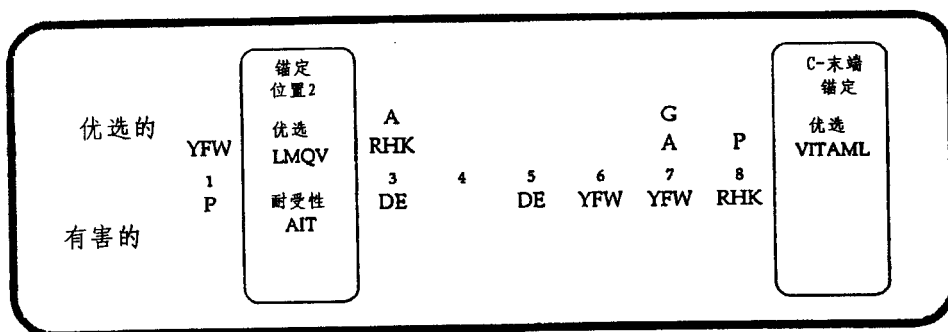


图 5

a.



b.

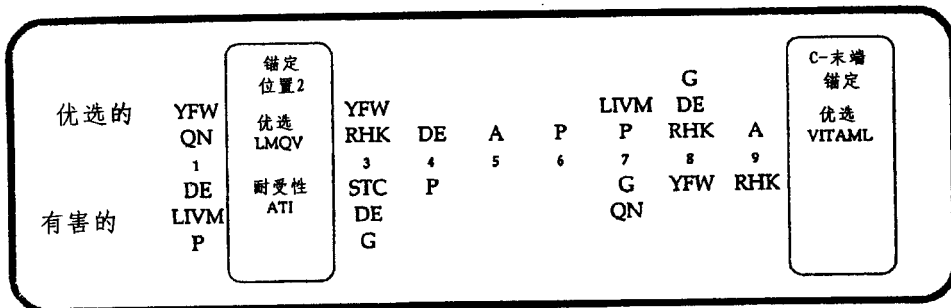
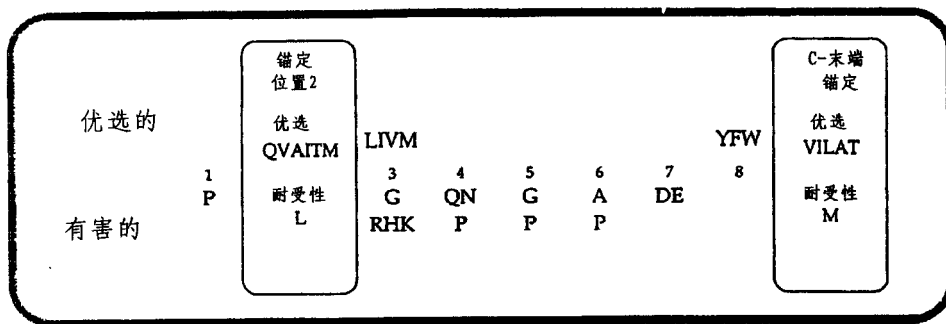


图 6

a.



b.

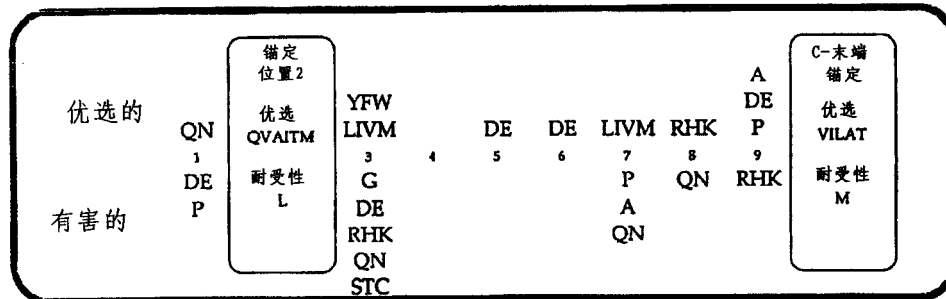
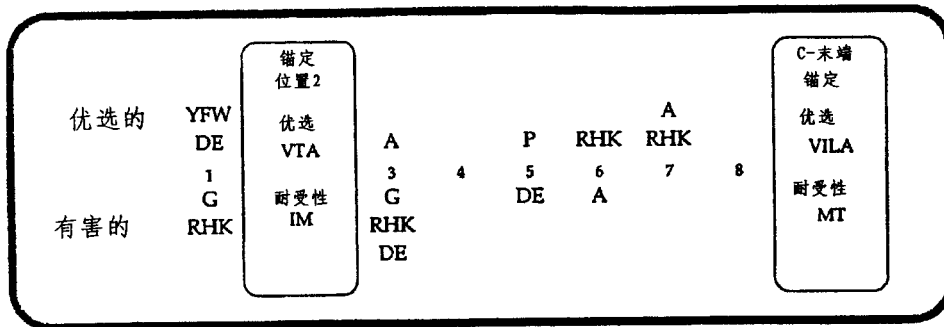


图 7

a.



b.

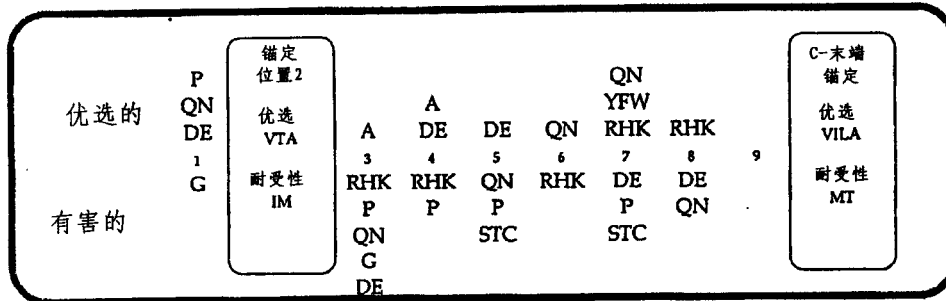


图 8

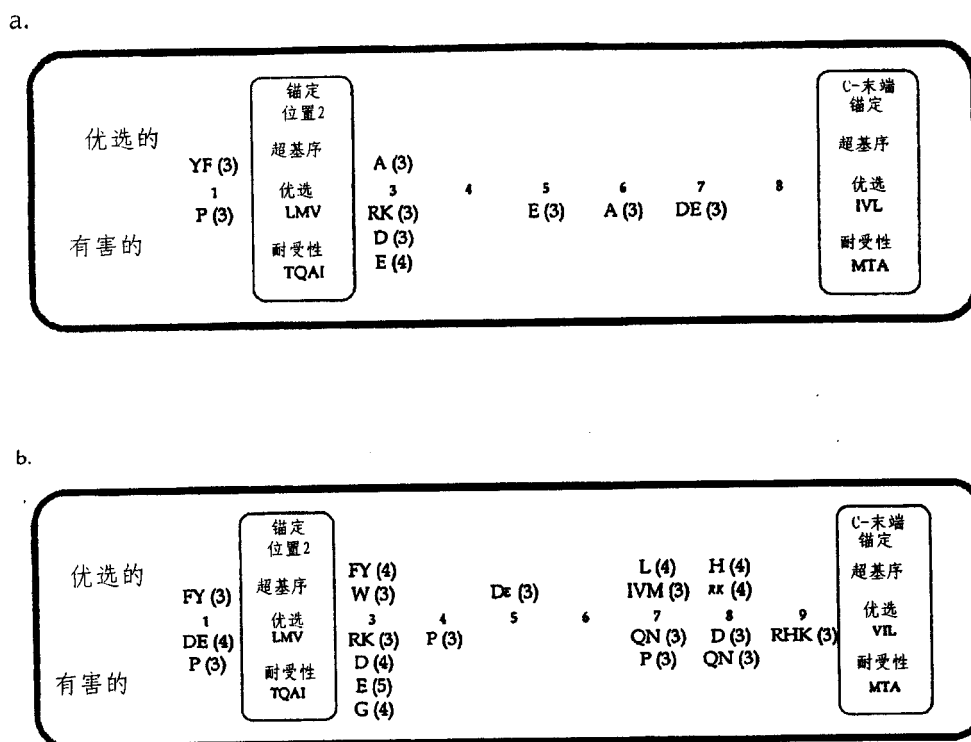


图 9

专利名称(译)	A2超基序亚单位疫苗		
公开(公告)号	CN1653337A	公开(公告)日	2005-08-10
申请号	CN02804248.4	申请日	2002-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮缪纳股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	埃皮缪纳股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	埃皮缪纳股份有限公司		
[标]发明人	J悉尼 A塞特 HM格雷 S索斯伍德		
发明人	J·悉尼 A·塞特 H·M·格雷 S·索斯伍德		
IPC分类号	G01N33/569 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2500/04 G01N33/6812		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/264969 2001-01-29 US 09/935476 2001-08-22 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了在携带A2超型等位基因的个体中有效的疫苗设计的方法。采用已知的A2 - 超型结合肽的单一氨基酸替换类似物和大肽文库大致地明确了A2 - 超型分子的肽结合特异性。虽然注意到每个分子具有独特的偏爱性，但发现特异性有很大的重叠。在肽配基2位存在的疏水和脂肪族残基L、I、V、M、A、T和Q通常为A2超型分子耐受。C - 末端对L、I、V、M、A和T耐受。对肽结合有次要影响的检验揭示存在等位基因的特异性偏爱，还鉴定到共有的特征，并用于明确A2超基序。共有的特征也与交叉反应性相关；发现超过70%高亲和力结合A*0201的肽能结合至少2种其它A2超型分子。最后，提供了在预测结合于A2超型分子的肽的算法中使用的系数。

