

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99815378.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 100389196C

[22] 申请日 1999.11.24 [21] 申请号 99815378.8

[30] 优先权

[32] 1998.12.4 [33] US [31] 09/205,995

[86] 国际申请 PCT/US1999/028096 1999.11.24

[87] 国际公布 WO2000/034467 英 2000.6.15

[85] 进入国家阶段日期 2001.7.3

[73] 专利权人 抗原表达公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 徐民桢 丘 刚 罗伯特·汉弗莱斯

[56] 参考文献

US5726020A 1998.3.10

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 7 页 说明书 90 页

[54] 发明名称

癌细胞疫苗

[57] 摘要

公开了 Ii 蛋白质表达的或免疫调节功能的一种专一性调节剂。特别公开了几种类型的 Ii 调节剂, 包括那些其功能是通过与编码哺乳动物 Ii 蛋白质的 RNA 分子形成双螺旋分子对 Ii 蛋白质的合成在翻译水平上有抑制作用的。这类调节剂包括由核苷酸碱基组成的共聚物和可表达的逆基因构建物, 组成共聚物的核苷酸碱基特别能与编码哺乳动物 Ii 蛋白质的 RNA 分子杂交。另一方面, 还公开了包含表达 Ii 的专一性调节剂的 MHC 类型 II - 正效抗原提呈细胞。例如, 这样的细胞在显示与 MHC 类型 II 蛋白质相关的自身决定簇肽方面是有用的。还发现了本发明的一些内容在治疗某些疾病方法方面的应用。例如, 通过增强对不良细胞的免疫攻击力, 治疗病人恶性肿瘤和自身免疫紊乱。另外的应用是从细胞中分离自我决定簇肽。

1. 一种 Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性调节剂，其通过与编码哺乳动物 Ii 蛋白质的 RNA 分子形成双螺旋分子而起到相关功能，形成该双螺旋分子的功能是在翻译水平上抑制 Ii 蛋白质的合成，该专一性调节剂由选自 SEQ ID NO: 11、32、40、48、52、53、54、55、62 和 64 的核酸序列组成。
2. 如权利要求 1 所述的专一性调节剂，其中核苷酸连接于包括磷酸酯和糖组成部分的骨架，所述骨架选自磷酸二酯、硫代磷酸酯、磷酸甲基酯、磷酸酰胺酯、磷酸三酯、2'-脱氧核糖、2'-O-烷基核糖、2'-O-甲基核糖、2'-O-烯丙基核糖、2'-O-替代烷基核糖、吗啉、和酰胺键组成的一组中选择出的部分。
3. 如权利要求 2 所述的专一性调节剂，其中核苷酸的碱基选自腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、2, 6-二氨基嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、和 5-丙炔基胞嘧啶。
4. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其在终端或内部位点结合一个或多个化学基团，这些基团交叉连接于杂交的 RNA 分子上。
5. 如权利要求 4 所述的专一性调节剂，其中化学基团是烷基化基团。
6. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其结合于催化杂交 RNA 分子剪切的化学基团。
7. 如权利要求 6 所述的专一性调节剂，其中化学基团是螯合剂。

8. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其作为一种剪切 RNA 分子的核酶。
9. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其结合于可嵌入编码哺乳动物 Ii 蛋白的 RNA 分子核苷酸的化学基团上，以稳定杂交。
10. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其结合于增强细胞摄取的化学部分。
11. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其结合于指向由专门的细胞类型摄取的化学部分。
12. 如权利要求 3 所述的专一性调节剂，其结合于改善毒性方面药理学性质的化学部分。
13. 如权利要求 1 所述的专一性调节剂，其是以药学上可接受的载体来配置的。
14. 如权利要求 13 所述的专一性调节剂，其中药学上可接受的载体增强 Ii 专一性调节剂向细胞群体的传递。
15. 如权利要求 14 所述的专一性调节剂，其中药学上可接受的载体是脂质体。
16. 如权利要求 13 所述的专一性调节剂，其中药学上可接受的载体增强 Ii 专一性调节剂向专门细胞群体的传递。
17. 如权利要求 16 所述的专一性调节剂，其中药学上可接受的载体是带有附着分子的脂质体，此附着分子增强对专门细胞群的传递。

- 18.** 一种 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞, 所述抗原提呈细胞中含有 Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性调节剂, 其通过与编码哺乳动物 Ii 蛋白质的 RNA 分子形成双螺旋分子而起到相关功能, 形成该双螺旋分子的功能是在翻译水平上抑制 Ii 蛋白质的合成, 该专一性调节剂由选自 SEQ ID NO: 11、32、40、48、52、53、54、55、62 和 64 的核酸序列组成。
- 19.** 如权利要求 18 所述的 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞, 它是恶性细胞。
- 20.** 如权利要求 18 所述的 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞, 它是非恶性细胞。
- 21.** 一种离体显示自我决定簇肽的方法, 此自我决定簇肽在 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞表面, 与 MHC 类型 II 蛋白质相关, 此方法包括:
- (a) 提供 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞;
 - (b) MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞中导入 Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性调节剂, 该专一性调节剂的功能通过与编码哺乳动物 Ii 蛋白质的 RNA 分子形成双螺旋分子来实现, 形成双螺旋分子的功能是在翻译水平上抑制 Ii 蛋白质的合成, 该专一性调节剂由选自 SEQ ID NO: 11、32、40、48、52、53、54、55、62 和 64 的核酸序列组成。
- 22.** 如权利要求 21 所述的方法, 其中 Ii 专一性调节剂是通过电穿孔导入到 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞中。
- 23.** 一种体外制备用于治疗病人恶性肿瘤的细胞的方法, 所述的细胞通过增强对恶性肿瘤的免疫攻击, 治疗病人恶性肿瘤, 所述的方法包括:

(a) 提供恶性细胞群，其是 MHC II 类分子-正效，或诱导 MHC 类型 II 分子的表达；

(b) 将如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达的专一性调节剂导入到步骤 a) 的表达 MHC 类型 II 的恶性细胞内，以增强内源性抗原决定簇的提呈。

24. 如权利要求 23 所述的制备方法，进一步包括使步骤 b) 产生的细胞失去复制能力。

25. 如权利要求 23 所述的制备方法，其中 Ii 蛋白表达的专一性调节剂是通过电造孔技术被导入到表达 MHC 类型 II 的恶性细胞内。

26. 如权利要求 23 所述的制备方法，其中步骤 a) 的恶性细胞群是从病人体内获得的。

27. 一种体外制备用于治疗病人恶性肿瘤的细胞或其衍生细胞的方法，所述的细胞或其衍生细胞通过增强对恶性肿瘤的免疫攻击来治疗病人恶性肿瘤，所述的方法包括：

(a) 提供表达或包含恶性肿瘤抗原决定簇的细胞群，其是 MHC II 类分子-正效，或诱导 MHC 类型 II 分子的表达；

(b) 将如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达的专一性调节剂导入步骤 a) 的表达 MHC 类型 II 的细胞内，以增强内源性抗原决定簇的提呈。

28. 如权利要求 27 所述的制备方法，进一步包括使步骤 b) 产生的细胞失去复制能力。

29. 如权利要求 27 所述的制备方法，其中 Ii 蛋白表达的专一性调节剂是通过电造孔技术被导入表达 MHC 类型 II 的细胞内。

30. 如权利要求 27 所述的制备方法, 其中步骤 a) 的细胞群是从病人体内获得的。
31. 如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达的或免疫调节功能的专一性调节剂在制备治疗病人恶性肿瘤的药物中的应用。
32. 如权利要求 31 所述的应用, 其中专一性调节剂的量在每天 10 μg 与 100 μg 之间。
33. 如权利要求 31 所述的应用, 其中给药的方式是从由下列方式组成的一组方式中挑选的: 静脉内注入、体腔内注入、通过皮肤吸收、通过黏膜表面吸收和通过胃肠道吸收。
34. 如权利要求 31 所述的应用, 其中 Ii 蛋白表达的或免疫调节功能的专一性调节剂是用药学上可接受的载体被给药的。
35. 一种体外制备用于治疗个体非恶性病症的细胞的方法, 所述的细胞通过增强对个体不良细胞群的免疫攻击来治疗个体非恶性病症, 所述的方法包括:
- (a) 提供从不良细胞群中得到的细胞, 其是 MHC II 类分子-正效, 或诱导 MHC 类型 II 分子的表达; 和
- (b) 将如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达的专一性调节剂导入步骤 a) 表达 MHC 类型 II 的细胞内, 以增强 MHC 类型 II 对抗原决定簇的提呈。
36. 如权利要求 35 所述的制备方法, 进一步包括使步骤 b) 产生的细胞失去复制能力。

37. 如权利要求 35 所述的制备方法, 其中 Ii 蛋白表达的专一性调节剂是通过电造孔技术被导入到表达 MHC 类型 II 的细胞内。
38. 如权利要求 35 所述的制备方法, 其中不良细胞群包含与自身免疫紊乱有关的自身反应 T 淋巴细胞。
39. 如权利要求 35 所述的制备方法, 其中不良细胞群包含病毒感染的细胞。
40. 如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达的或免疫调节功能的专一性调节剂在制备治疗病人自身免疫疾病的药物中的应用。
41. 如权利要求 40 所述的应用, 其中给药量每天在 10 μg 和 100 μg 之间。
42. 如权利要求 40 所述的应用, 其中给药的方式是从由下列方式组成的一组方式中挑选的: 静脉内注入、体腔内注入、通过皮肤吸收、通过黏膜表面吸收和通过胃肠道吸收。
43. 如权利要求 40 所述的应用, 其中 Ii 蛋白表达的或免疫调节功能的专一性调节剂是用药理学上可接受的载体被给药的。
44. 一种体外从细胞中分离抗原决定簇肽的方法, 它包括:
- (a) 提供细胞, 其是 MHC II 类分子-正效, 或诱导 MHC 类型 II 分子的表达;
 - (b) 将如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达专一性调节剂导入表达 MHC 类型 II 细胞内;
 - (c) 增溶溶解由步骤 b) 产生的表达 MHC 类型 II 细胞;

(d) 从步骤 c) 的增溶溶解的细胞中提纯 MHC 类型 II 分子和结合的自我决定簇肽;

(e) 从步骤 d) 的 MHC 类型 II 分子中分离自我决定簇肽。

45. 如权利要求 44 所述的方法, 其中 Ii 蛋白专一性调节剂是通过电造孔技术被导入到表达 MHC 类型 II 分子的细胞内。

46. 一种体外制备用于治疗病人致病自身免疫应答的自我决定簇肽的方法, 所述的方法包括:

(a) 提供从病人体内得到的细胞, 其是 MHC II 类分子-正效, 或诱导表达 MHC 类型 II 分子;

(b) 将如权利要求 1 所述的 Ii 蛋白表达专一性调节剂导入到表达 MHC 类型 II 的细胞内;

(c) 增溶溶解由步骤 b) 产生的表达 MHC 类型 II 的细胞;

(d) 从步骤 c) 增溶溶解的细胞中提纯 MHC 类型 II 分子和连接的自我决定簇肽;

(e) 从步骤 d) 的 MHC 类型 II 分子中分离自我决定簇肽。

47. 如权利要求 46 所述的制备方法, 其中 Ii 蛋白的专一性调节剂通过电造孔技术被导入到表达 MHC 类型 II 细胞内。

48. 如权利要求 46 所述的制备方法, 其中细胞是 T 淋巴细胞, 它表达在致病过程中有活性的 T 细胞受体。

49. 如权利要求 46 所述的制备方法, 其中细胞是病原自身免疫应答的靶细胞。

50. 如权利要求 46 所述的制备方法, 其中细胞是被病毒感染。

癌细胞疫苗

本发明的技术背景

对特异性抗原的免疫应答是通过 T 淋巴细胞对这些抗原的肽片段的识别来调节的。在抗原提呈细胞中，经过处理的抗原的肽片段结合于主要组织相容性复合体（MHC）分子的抗原肽结合部位。然后，这些肽-MHC 复合体被转移到细胞表面，并被辅助性 T 淋巴细胞或细胞毒性 T 淋巴细胞上的 T 细胞受体所识别（外源肽和提呈 MHC 分子的相邻表面）。有两类传递肽的 MHC 分子：MHC 类型 I 和 MHC 类型 II。

MHC 类型 I 分子将抗原提呈给 CD8-正效细胞毒性 T 淋巴细胞，然后，此细胞被激活，可以直接杀死抗原提呈细胞。MHC 类型 I 分子专门从内源性合成蛋白质接受肽。例如：传染性病毒，在它们合成期间，于内质网上。

MHC 类型 II 分子将抗原提呈给 CD4-正效辅助性 T 淋巴细胞（T 辅助性细胞）。一旦其被激活，T 辅助性细胞作用于激活细胞毒性 T 淋巴细胞（T 杀伤细胞）并通过物理接触和细胞素的释放激活 B 淋巴细胞。与 MHC 类型 I 分子不同，MHC 类型 II 分子结合外源性抗原，其通过非特异性或特异性的胞吞作用被内在化。在合成期间，MHC 类型 II 分子与内源性抗原的结合受到阻断，而被结合的恒定链蛋白（Ii）所取代。这些 MHC 类型 II-Ii 蛋白质复合体从内质网转移至后高尔基区室中，在那里，Ii 由于蛋白质水解而被释放。而外源性抗原肽被结合[Daibata

等人,《分子免疫学》(Molecular Immunology), 31: 255-260 (1994); Xu 等人,《分子免疫学》(Molecular Immunology), 31: 723-731(1994)]。

MHC 类型 I 和 MHC 类型 II 分子在细胞中有明显的分布。即使在不同类型的细胞中表达的水平有所不同,几乎所有的有核细胞都表达 MHC 类型 I 分子。免疫系统的细胞在其表面充分表达 MHC 类型 I, 而肝脏细胞表达水平相对较低。无核细胞表达少或不表达 MHC 类型 I。MHC 类型 II 分子在 B 淋巴细胞和巨噬细胞被高度表达, 在其它组织细胞不被表达。但是, 许多其它细胞类型可由于暴露给细胞素被诱导表达 MHC 类型 II 分子。

在正常情况下, 由于 Ii 蛋白总是与新生的 MHC 类型 II 分子一同合成, 内源性肽(带有自我决定簇潜在性地导致自身免疫疾病)不与 MHC 类型 II 分子结合。由于包含有自我决定簇肽和 MHC 类型 II 分子的复合体从不被身体免疫监视系统发觉, 对这些决定簇的耐受力不会发生。如果在发育的个体中, MHC 类型 II 分子不被 Ii 抑制, 那么, 内源性自我决定簇就被 MHC 类型 II 分子提呈, 启动了对那些内源性抗原的自身免疫应答。这就是某些自身免疫疾病的情况。在恶性肿瘤细胞中发生了这样的效应时, 对肿瘤内源性抗原的自身免疫应答可以用于治疗, 限制肿瘤细胞的生长或消除肿瘤细胞。

增加 MHC 类型 II 分子的表达而不伴随 Ii 蛋白增加的治疗作用在 MHC 类型 II-负效, Ii-负效肿瘤中显示出来。[Ostrand-Rosenberg 等人,《免疫学杂志》(Journal of Immunol, 144:4068-4071 (1990); Clements 等人,《免疫学杂志》(Journal of Immunol), 149:2391-2396(1992); Baskar 等人,《细胞免疫学》(Cell Immunol), 155:123-133(1994); Baskar 等人,《医学实验杂志》(J.Exp.Med.),

181:619-629(1995);Armstrong 等人, (Proc.Natl.Acad.Sci. USA94: 6886-6891(1997)]。在这些研究中, 将 MHC 类型 II 分子基因转染到 MHC 类型 II-负效的鼠肉瘤中产生了 MHC 类型 II 正效, 但 Ii-负效肿瘤细胞系。将这些细胞注射到 MHC 相容宿主导致亲本肿瘤的延迟生长。Ii 蛋白基因与 MHC 类型 II 基因共同转染到鼠细胞系, 由于 Ii 链阻断了内源性肿瘤抗原的提呈而抑制了 MHC 类型 II 基因对肿瘤的治疗效果。类似的结果也在鼠黑素瘤产生 [Chen and Ananthaswamy, 《免疫学杂志》(Journal of Immunology) 151:244-255(1993)]。

这些治疗探索的成功被认为涉及到了树状细胞 (dendritic cells) 的自然活动。树状细胞是专门的清扫者, 它把外源性抗原加工成肽并从它们细胞表面的 MHC 抗原将其提呈给 T 淋巴细胞。树状细胞有能力通过 MHC 类型 I 和 MHC 类型 II 提呈抗原, 能使它们激活 T 辅助细胞和 T 杀伤细胞。人们认为, 激发强有力的 T 杀伤细胞的应答需要有效的 T 辅助细胞应答, 由树状细胞产生的联合活动导致高强度的抗肿瘤应答[Ridge 等人, 《自然》(Nature) 193:474-477(1998);Schoenberger 等人, 《自然》(Nature) 193:480-483(1998)]. 巨噬细胞系的树状细胞发现肿瘤细胞、摄食和加工特异的肿瘤抗原和与肿瘤相关的抗原。树状细胞移动到淋巴结, 随之流动到肿瘤的所在位置, 停留于那里的淋巴结皮层附近, 在此处, 新的 T 细胞产生。于淋巴结皮层, 识别出树状细胞上肿瘤决定簇的静止的 T 杀伤细胞被激活和增殖, 随后, 作为有活性的抗肿瘤杀伤 T 细胞被释放于循环系统中。

即使与 T-辅助细胞的活动相互作用或合格的树状细胞通过 MHC 类型 I 分子提呈抗原并因此激活 T 杀伤细胞, 与 T 辅助细胞和 T 杀伤细胞同时发生相互作用也不是必需的; 在 T 辅助细

胞引起活化后的一些时间内，被激活的树状细胞仍保持它们激发 T 杀伤细胞的能力。由 MHC 类型 II 或 MHC 类型 I 提呈的各个抗原肽决定簇不需要从单一的抗原蛋白质中得来，从恶性肿瘤细胞得来的两个或多个抗原可被加工和被树状细胞提呈。因此，只许可一个大概不是肿瘤特异性的决定簇，携带着它而具有能够激活 T 杀伤细胞的能力，这些 T 杀伤细胞作用于其它的也许是多个肿瘤特异性决定簇。(Therefore, licensing to one determinants, perhaps not tumor specific, carries with it the power to license activation of T killer cells to other, perhaps tumor-specific, determinants)。这些较小的或隐蔽的决定簇被用于各种各样的治疗目的 [Mooudil 等人, 《免疫学杂志》 (J.Immunol.159: 2574-2579 (1997))]。

MHC 类型 II 抗原提呈的实验中的改变被认为是对这些较小的决定簇扩大的免疫应答。通常无法利用于对 MHC 类型 II 分子作用的一系列肽提供了用于 MHC 类型 II 提呈的多种肽的丰富来源。这一系列决定簇的开发导致应答的 T 辅助细胞数目的扩大。这些扩大的群体可以激发树状细胞能力 (licensing), 它们一些直接朝向肿瘤特异性决定簇和与肿瘤相关的决定簇。虽然, 正常的细胞潜在地具有肿瘤细胞决定簇, 对正常细胞仅仅有少量的细胞损坏发生。这是因为抗肿瘤应答的多种效应器的应答 (大量的杀伤 T 细胞、周围活化的细胞素、有吞噬作用的巨噬细胞和它们的产物) 都不直接朝向正常细胞。

正常的 MHC 类型 II 抗原提呈可被 MHC 类型 II 分子与 Ii 蛋白相互作用的抑制所替代。这是由减少 Ii 蛋白的总量 (例如, 减少表达) 或干扰 Ii 免疫调节功能来完成的。抑制 Ii 表达用各种各样的反义技术来完成。反义寡核苷酸与 mRNA 的 AUG 部位相互作用, 据说可用于 Ii 蛋白减少 MHC 类型 II 对外源性抗原的提呈。 [Bertolino 等人, 《国际免疫学》 (Internat.

Immunology) 3:435-443(1991)]。但是, Ii 蛋白的表达效果和 MHC 类型 II 分子对内源性抗原的提呈效果还没有得到检测。最近, Humphreys 等人[美国专利 5,726,020 (1998)]证明了三个反义寡核苷酸和一逆基因构件物, 它们能导致表达 MHC 类型 II 分子的抗原提呈细胞表达出对 Ii 蛋白表达的有效抑制。将用这种机理使 Ii 受到抑制的肿瘤细胞植入小鼠体内, 与植入未经处理的亲本肿瘤细胞的小鼠相比, 其存活期大大延长。此观察指出, Ii 蛋白的抑制使一系列抗原决定簇提呈增加, 其可以激发更多的对肿瘤细胞有效的免疫应答。

本发明的概述

本发明一方面涉及到 Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性的调节剂。特别公开了几种类型专一性的 Ii 调节剂, 其中包括那些调节剂, 其功能为通过与编码哺乳动物 Ii 蛋白的 RNA 分子结合形成双螺旋分子, 其在翻译水平上抑制 Ii 蛋白的合成。这类包括由特别与编码哺乳动物 Ii 蛋白的 RNA 分子杂交的核苷酸碱基组成的共聚物(例如, 反义寡核苷酸)和可表达的逆基因构建物, 其编码特别使 Ii RNA 杂交的 RNA 分子。另一方面涉及包含有 Ii 表达专一性调节剂的 MHC 类型 II-正效抗原提呈细胞。这样的细胞是有用的, 例如, 在与 MHC 类型 II 蛋白质联合的自我决定簇肽的显示中。于另一个实施方案中, 本发明涉及到治疗疾病的方法。例如: 恶性肿瘤和自身免疫性疾病, 在病人体内, 增强对不良细胞的免疫攻击力。这些方法涉及提供 MHC 类型 II-正效抗原提呈细胞和导入 Ii 蛋白表达的专一性调节剂, 以增强内源性抗原决定簇提呈。因此, 这些细胞或产物可用于刺激病人的免疫系统。

本发明的详细叙述

上述发现的结合共同表明,在 MHC 类型 II 抗原提呈细胞中 Ii 蛋白表达的抑制消除了 Ii 蛋白的功能,且深刻改变了由 MHC 类型 II 分子提呈给免疫系统的抗原表位的范围和选择。前面也表明, Ii 蛋白在细胞中的表达可以被抑制,用专一性寡核苷酸的反义技术或逆基因构建物,可使其得到专门和有效的抑制。美国专利 No 5,726,029 (Humphreys 等人)可作为从前工作的例证,公开的这项专利在此通过引证被并入本文。本发明部分根据对 Ii 蛋白表达产生抑制的另外成分地发现。这些成分以及它们被鉴定的方法也于此公开。由这些发现而引起的是发现了抗原决定簇提呈的增强导致了从个体清除相关细胞群的免疫应答,抗原决定簇提呈的增强是由于阻断 Ii 蛋白表达或个体内细胞免疫调节功能而产生的结果。这个发现在本发明中被利用于实现几个有用的治疗目标,它们许多是直接用于从个体中清除不良细胞群。

本发明的一个方面是 Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性调节剂(寡核苷酸 3' -CTCGGTACCTACTGG-5' 被专门排除在外)。这个专一性的 Ii 调节剂对表达 MHC 类型 II 分子细胞的传递改变了结合于细胞 MHC 类型 II 分子上的抗原决定簇的范围和选择,这样就改变了那个细胞的抗原提呈。几种成分作为专一性的 Ii 调节剂而起作用,可以根据它们的作用机理进行分类。

在一个实施方案中, Ii 专一性的调节剂通过与编码哺乳动物 Ii 蛋白的 RNA 分子形成双螺旋分子而起作用。双螺旋分子的形成在翻译水平上抑制了 Ii 蛋白的合成。这个专一性的调节剂可以包含若干核苷酸碱基,它们依照 Watson-Crick 碱基配对方式,以核苷酸碱基与 Ii RNA 其它碱基进行结合的形式在聚合物骨架上适当地有间隔地分布。参与形成双螺旋分子的 Ii RNA 序列

可以是无限制的, 其在蛋白质编码片段(外显子)、在插入片段(内含子)、在外显子和内含子间的重叠部位(拼接部位)、在蛋白质翻译的起始部位(AUG 部位)、在向 AUG 部位的上游区(例如, CAP 部位或其它的有顺序的专门调节部位)、在自编码片段的下游区(于 3'多腺苷酸化序列-专一的调节部位)。

两种一般类型的专一性的调节剂可被用于与 Ii RNA 形成双螺旋分子。第一种类型的是包含 10-50 核苷酸碱基的化学合成共聚物。该共聚物包含有核苷酸碱基序列, 对 RNA 分子的靶部分, 它是互补的, 其另外被称为反义序列。这样的共聚物的一个例子是反义寡核苷酸。该共聚物依据两种机理抑制从 RNA 翻译蛋白质。一种方法是阻断到 RNA 部分的入口, RNA 必需与核糖体、拼接体以及 RNA 成熟和翻译必需的因子相互作用。第二种方法涉及到一种酶即核糖核酸酶 H 效力的加强, 此酶能把被杂交到 DNA 上的 RNA 序列分成几小段。这样, DNA 或类似共聚物的 DNA 与 RNA 相应片段的结合导致在共聚物结合部位的断裂。

依照 Watson-Crick 碱基配对原则, 该共聚物杂交到靶 RNA 上。共聚物的序列由靶 RNA 互补序列限定。该共聚物可以与一个长度的核苷酸序列化学合成, 此长度起码为 6 个靶 RNA 互补核苷酸, 一般为 12-25 个。从统计学看, 于细胞内的 RNA 群体中, 有 15 个序列的核苷酸就是独一无二的, 这能使任何特别的 RNA 被高度专一性地作为目标。对于包含 20 个碱基对的的共聚物与 RNA 有着约 10^{-17} M 的 Kd 值(Kd values)的也是非常稳定的结合。

在一些情况下, 培养的细胞自发地吸收足够量的共聚物, 获得有用的效应。这样的摄取呈现了需要生化能和有某些细胞表面蛋白质的参与的活性过程。摄取也可能由胞饮作用而发生。

此途径可被培养于含有共聚物的高渗培养基的细胞增强，在此之后，于稍低渗培养基中的细胞的重悬浮引起细胞内胞饮泡的突然发生。在另外情况下，应用脂类或脂质体、用电造孔法或用链球菌溶血素 O 处理去透过细胞膜等方法可以辅助摄取。与培养的细胞相比，活体内细胞摄取共聚物常常更容易。细胞用电造孔法摄取共聚物的最适条件于下列例 2 中揭示。

靶 RNA 潜在的部位是那些对与有功能的蛋白质复合体的结合开放的部位，另外还有对与共聚物结合开放的部位。这样的部位可用核糖核酸酶 H (Rnase H) 来鉴定，此酶可剪切杂交于 DNA 上的 RNA。在核糖核酸酶 H 存在的情况下，将 DNA 寡核苷酸单独地或混合加入到以 5'-放射性磷标签的 RNA 中，在用 RNA 的凝胶电泳造孔法和放射性显影照片之后，寡核苷酸和其它杂交的共聚物被鉴定。在例 1 中提供了这样的用 Ii 反义寡核苷酸的实验。本发明发现的 Ii RNA 部位对 RNase H 的剪切是最开放的，此部位是 AUG 起始密码子的区域和前体 mRNA 第一拼接部位区域。

本发明中“寡核苷酸”的术语是指包含若干核苷酸单位的多核苷酸，核苷酸单位是由以磷酸二酯键连接的自然发生的碱基和呋喃戊糖 (pentofuranosyl sugars) 形成的。“共聚物”的术语包括寡核苷酸和从非自然发生的或寡核苷酸的修饰亚基形成的结构相关的分子。这些修饰发生在核苷酸的碱基部分、核苷酸的糖部分或核苷酸间键合群。另外的键合群也常取代自然寡核苷酸的糖和磷酸骨架，产生共聚物，下面将详细讨论。

这样的寡核苷酸的修饰和产生的特征容易利用于本领域的一种技术中。作为修饰的例证，在以下的专利中提供：美国专利 No.4,469,863(1984)；美国专利 No.5,216,141(1993)；美国专利 No.5,264,564(1993)；美国专利 No.5,514,786(1996)；美国

专利 No.5,587,300(1996); 美国专利 No.5,587,469(1996); 美国专利 No.5,602,240(1997); 美国专利 No.5,610,289(1997); 美国专利 No.5,614,617(1997); 美国专利 No.5,623,065(1997); 美国专利 No.5,623,070(1997); 美国专利 No.5,700,922(1997); 和美国专利 No.5,726,297(1998); 公开的这些专利在此通过引证被并入本文。

杂交到互补 RNA 上的寡核苷酸的能力具有化学修饰的很强的耐受性。因此, 许多不同功能的共聚物是可能的。尤其, 糖磷酸酯骨架在不丧失形成 Watson-Crick 碱基对能力的情况下可以被广泛地改变。根据已明确的, 核苷酸含糖、含氮杂环物和磷酸部分。一些合成的寡核苷酸类似物缺乏糖或磷酸部分, 但二者按照碱基配对以反义寡核苷酸相同的方式仍可以杂交以及可以被用于同样的目的。这些包含核苷酸碱基的共聚物在功能上是同与 RNA 杂交的寡核苷酸相等的。以下概述一些寡核苷酸的修饰, 其改变和改善了它们作为反义应用的性质。

1. 磷酸酯非桥接 (non-bridging) 氧原子之一被硫取代 [Agrawal 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:7079-7083(1998)], 被硒取代 [Mori 等人, 《核酸研究》17:8207-8219(1989)], 被硼取代 [Porter 等人, 《核酸研究》25:1611-1617(1997)], 以此产生负电荷的类似物。

2. 两个非桥接的氧原子被硫取代 [Vaughn 等人, 《核酸研究》24:4558-4564(1996)]。

3. 非桥接氧原子被酯化, 或被甲基取代, 或被氮原子取代产生不带电荷的磷酸酯 [Hayakawa 等人, 《有机化学杂志》60:925-930(1995); Iyer 等人, Tetrahedron.52:1441-14436(1996); Zhang 等人, 《生物有机医药化学》6:1911-1916 (1996)], 磷酸酯 [Sarin 等人, Proceedings of the National Academy of Science USA

85:7448-7451(1988)]或磷酸酰胺酯[Agrawal 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7079-7083(1988)]。

4. 两个桥接的氧原子以不同的排列和结合被硫或氮取代 [Gryaznov 等人, 〈核酸研究〉 24:1508-1514 (1996); Goodchild, Bioconjugate Chem.1:165-187(1990)]。

5. 上述的取代作用是结合的 (例如, 产生硫代甲基磷酸酯) [Padmapriya & Agrawal, 〈生物有机医药化学〉 3:761-764(1993)]。

6. 核苷间磷酸群被不包含磷和不带电荷的原子的其它排列所取代 [Sanghvi & Cook, Carbohydrates: 〈在反义疗法中合成的方法和应用〉. An overview. Chap.1. In: 〈反义研究中糖的修饰〉. (Sanghvi, Cook)(ACS Symposium Series, 580). American Chemical Society, Washington, DC 1-22(1995); De Mesmaeker 等人, 〈化学研究报告〉 28:366-374(1995); Kiely, 〈核酸研究〉 20:1339-1344(1994)]。

7. 糖是核糖或 2'-脱氧核糖。核糖的 2'-羟基群被烷基化或被卤素、氨基、碳取代基所替代[Kiely, 〈核酸研究〉 20: 1339-1344(1994); De Mesmaeker 等人, 〈化学研究报告〉 28: 366-374 (1995); Sanghvi & Cook, Carbohydrates:在反义疗法中, 合成的方法和应用。An Overview. Chap.1. In:反义研究中糖的修饰 (Sanghvi, Cook) (ACS Symposium Series, 580) American Chemical Society, Washington DC 1-22 (1995); Freier & Altmann, 〈核酸研究〉 25:4429-4443(1997)]或硫氢基所替代[Hamm & Piccirilli, 〈有机化学杂志〉 62:3415-3420(1997)]。

8. 糖环周围的立体化学在 1'位置改变产生 α -核苷系列 [Lavignon 等人, 〈反义研究及其发展〉 2:315-324(1992)],在 2'位

置 产生阿拉伯糖系列或在 3'位置产生木糖系列[Seel 等人, Helv.Chim.Acta.79:1451-1461(1996)]。

9. 糖是呋喃糖或吡喃糖[Pitsch 等人, Helv. Chim. Acta. 78:1621-1635(1995)], 戊糖或己糖[Herdewijn, Liebigs Annalen 1996: 1337-1348(1996)]。

10. 对通过并和穿过 C3-C5 位置或于糖和碱基之间的第二个环来改善杂交, 呋喃核糖环是更牢固的[Tarkoy 等人, Helv. Chim. Acta. 77:716-744(1994); Herdewijn, Liebigs Annalen 1996:1337-1348 (1996)]

11. 核苷酸是通过 3'-5' (如通常的) 或 2'-5'连接的[Maran 等人, 〈科学〉 265:789-792(1994)]。

12. 糖被吗啉取代[Summerton 等人, 〈反义核酸药物〉 D.7:63-70(1997)]。

13. 糖磷酸骨架被肽骨架取代, 产生“肽核酸”(pna) [Egholm 等人, 〈自然〉 365:566-568(1993)]。

普遍地, 下列的修饰的子集合(subset)是最常用的:

糖是 2'-脱氧核糖或 2'-O-甲基核糖[或 2'-O-烯丙基核糖或 2'-O-(2-甲氧基)乙基核糖]以及磷酸酯群为下列之一:

1. 未修饰的磷酸二酯。

2. 有被硫(硫代磷酸酯)、甲基(甲基磷酸酯)或取代氮[磷酸酰胺酯(phosphoramidate)]所替代的非桥接的氧。

3. 有桥接到被 NH 取代的[磷酸酰胺酯 (phosphoramidate) C3'的氧原子。

在寡核苷酸的等同物中, 肽核酸和吗啉衍生物作为有效的共聚物得到最普遍的应用。吡咯-咪唑聚酰胺也可被应用 [Gottesfeld, J.M., 〈自然〉 387:202-205(1997)]。

每种修饰有不同的特性, 各种修饰可以在一条单个的寡核苷酸链上结合产生具有所需性质的共聚物。例如, 可激活核糖核酸酶的磷酸二酯键或硫代磷酸酯键的中心区组可被旁侧序列结合, 此旁侧序列对外切核酸酶更有抗性。[美国专利 No.5,491,133 (1996)]共聚物的碱基可以是修饰提供, 它不会被 Watson-Crick 碱基配对干扰。这样的修饰通常用于增加杂交的稳定性。实例为 5-被取代的胞嘧啶或尿嘧啶, 特别是 5-丙炔基 (propynyl) 胞嘧啶和 5-丙炔基(propynyl)尿嘧啶, 分别取代 C 或 U 和 T, 氨基嘌呤取代 A [Freier & Altmann, 〈核酸研究〉 25:4429-4443(1997)]。

由于 mRNA 的二级结构和三级结构, 分子的一些部分对于共聚物杂交可能是不能进入和不可利用的。对蛋白质结合可利用的 RNA 部位, 对共聚物的结合更有可能进入。这些包括 5'-帽结构和发生核糖体的装配的 AUG 起始密码子, 前体 RNA 的拼接部位和聚腺苷酸化作用信号 [Goodchild 等人, Proceeding of the National Academy of Science USA 85:5507-5511(1988); Dominski & Kole, Mol. Cell. Biol. 14:7445-7454(1994)]。在翻译的脱细胞研究中, 发现 mRNA 的 5'-帽结构和 AUG 起始密码子是特别有效的部位, 也发现杂交到帽结构的寡核苷酸阻碍核糖体的结合与多核糖体的装配 [Goodchild 等人, Arch. Biochem. Biophys. 263:401-409(1988)]。

在下列 1 和 3 例证部分的实例详述的最初研究中, 于表 1 中序列鉴定号 40 (SEQ ID NO: 40) 列出的与 AUG 起始区域互补的共聚物和序列鉴定号 32 列出的与在 Ii mRNA 中第一拼接供体互补的共聚物在杂交及 Ii 抑制上显示出最大的活性。

根据对共聚物结合可利用区域的鉴定, 另外的重叠共聚物被合成并发现了以上述区域为目标的最具活性的序列(表 5)。这些共聚物此前已被测定, 其对抑制作用的活性(表 6A)和细胞毒性(表 6B)已被检测。按照这些标准最具活性的化合物, 序鉴定号 54 是与 AUG 起始物是互补的, 也对 MHC 类型 II 的表达及细胞的复原和生存能力产生最小的影响。序列号鉴定 62 列出的共聚物也显示出强烈的活性, 它与同结合 RNA 分子拼接部位结合的外显子部分互补的序列相应, 特别与在第一拼接供体区域的序列相应。

如下列例证部分所提供的: 专一性的共聚物杂交于专一性的 Ii RNA 片段[如用 RNase H 测定揭示的]及抑制 Ii 蛋白的表达[如用免疫荧光荧光激活细胞分类器(FACS)测定揭示的]。在与翻译起始部位互补的共聚物中, 序列鉴定号 54 (SEQ ID NO 54), 序列鉴定号 53 (SEQ ID NO 53), 序列鉴定号 52 (SEQ ID NO 52), 序列鉴定号 40 (SEQ ID NO 40), 序列鉴定号 55 (SEQ ID NO 55) 在 RNase H 的测定上是有效的, 在抑制 Ii 的表达上特别具活性。与结合拼接部位的外显子部分互补的共聚物, 序列鉴定号 32 和序列鉴定号 62 在测定上是有效的在抑制表达上也是具活性的。结合于外显子和内含子拼接部分的交界处区域的另外共聚物抑制内含子拼接, 因而抑制代表 Ii 蛋白表达。特别是, 与第一个外显子 3'端部分互补的和与第一个内含子 5'端部分互补的寡核苷酸抑制内含子拼接, 因而也抑制 Ii 蛋白表达。在寡核苷酸中, 与终端密码子 3'区域互补的, 例如序列鉴定号 64 抑制 Ii 蛋白

表达。在寡核苷酸中，与起始密码子 5 区域互补的，例如序列鉴定号 48 抑制 Ii 蛋白表达。在寡核苷酸中，与编码 CLIP 肽区域互补的，例如序列鉴定号 11 抑制 Ii 蛋白表达。

除了上述的骨架修饰，其它基团可被连接与共聚物的部位以各种各样的方式增强它的活性。这些基团被分为一些功能类型。象烷基化物化学基团和其它有活性的种类，被连接与共聚物的末端部位或内部部位成交联共聚物，与 RNA 分子杂交。其它化学基团被连接，以催化剪切杂交 RNA 分子（例如，螯合剂）。控制共聚物的核酶也促进 Ii RNA 的剪切。另外类型的连接于共聚物的化学基团嵌入 RNA 分子的核苷酸碱基，以稳定共聚物与 Ii RNA 的杂交。还有其它的化学部分增强共聚物的细胞摄取（例如多聚赖氨酸）。还有其它的，直接传递或摄取共聚物到专门的组织或细胞类型。这些不同的基团或者连接于共聚物的终端羟基团，或连接于内部的磷酸酯。除此之外，它们可被连接于结合在内部糖或碱基残基之上的接头，或者连接于插在于链中的核苷酸之间的接头上[见 review Goodchild, Bioconjugate Chem.1:165-187(1990)] 交联和烷基化基团包含下列各项：

1. 氮芥类衍生物[Knorre & Vlassov, 〈核酸研究和分子生物学进展〉 32:291-320(1995)]。

2. 重氮甲烷衍生物[Nakatani 等人, 〈美国化学学会杂志〉 119: 7626-7635 (1997)。

3. 连接于通过间隔区链的核苷碱基上的各种部位的碘乙酰胺或溴乙酰胺功能[Meyer 等人, 〈美国化学学会杂志〉 111:8517-8519(1989); Kido 等人, 〈核酸研究〉20:1339-1344(1992); Coleman & Pires, 〈核酸研究〉 25:4771-4777(1997)]。

4. 吩嗪 di-N-oxide[Nagai & Hecht, 〈生物化学杂志〉 266:23994-23002(1991)]。

5. 被光活化的或被细胞色素 C 还原酶活化成甲川基醌 (quinone methide) 的萘醌[Chatterjee & Rokita, 〈美国化学学会杂志〉 112:6397-6399(1999)]。

6. 卟啉[Le Doan 等人, 〈生物化学〉 1:108-113(1990)]和在光活化作用后的钇(II)-粪卟啉[Fedorova 等人, FEBS Letters 259:335-337(1990)]。

7. 可能用于胞嘧啶部位的 5-methyl-N,N-ethanocytosine [Webb & Matteucci, 〈核酸研究〉 14:7661-7674(1986)]。

8. 被光活化的扫若仑[Bhan & Miller, Bioconjugate Chem. 1: 82-88(1990)]。

连接于催化杂交结合 RNA 链水解作用的共聚物的基团包括有:

1. 葡萄球菌核酸酶[Zuckermann 等人, 〈美国化学学会杂志〉 110:1614-1615(1988)]。

2. 咪唑和伯胺[Ushijima 等人, J.Bba.Gen.Subjects 1379:217-223(1998)]或二胺[Reynolds 等人, 〈核酸研究〉 24:760-765(1996)]。

3. 组胺[Hovinen 等人, 〈有机化学杂志〉 60:2205-2209(1995)]。

连接于促进催化 RNA 水解作用的的共聚物促进金属上的螯合物基团。包括下列一些实例：

1. 亚氨基乙酸酯 [Matsmura 等人, 〈化学学会杂志〉 1994:2019-2020(1994)]。

2. 菲绕啉[Perrin 等人, 〈生物化学〉 33:3848-3854(1994)]。

3. 2,2'-二吡啶和 2, 2': 6', 2''-三吡啶[Bashkin 等人, 〈有机化学杂志〉 61:2314-2321(1996)]。

4. texaphyrin [Magda, 〈美国化学学会杂志〉 119:2293-2294 (1997)]。

5. 乙底酸 (EDTA) [Joseph 等人, 〈科学〉 278:1093-1098 (1997)]。

6. 卟啉[Sigman, 〈生物化学〉 29:9097-9105(1990)]

7. 博莱霉素[Bergstrom & Gerry, 〈美国化学学会杂志〉 116: 12067-12068(1994)]。

8. 2, 6-吡啶二羧酸酯[Bergstrom & Gerry, 〈美国化学学会杂志〉 116: 12067-12068 (1994)]。

9. 2,2'-dipocylamine [Bergstrom & Gerry, 〈美国化学学会杂志〉 116:12067-12068(1994)]。

从锤头和发夹有催化作用的活性部位核糖酶可被加入到共聚物中, 产生可催化互补 RNA 剪切的人工核糖酶[Santoro andJoyce, 〈RNA 剪切 DNA 酶的一般目的〉 94:4262-

4266(1997)]。在自然界, 于 RNA 加工期间, 一定数目的核糖酶在 RNA 专门部位的剪切中起着重要的作用。这些可以被分成数个类型, 除了其它一些性能不太好的类型外, 包括有基团、基团、锤头状的、发夹状的和 HDV 核糖酶 [Cech & Bass, *Annu. Rev. Biochem.* 55:599-629(1986)]. 在催化上有活性作用的反义寡核苷酸的发展也一直受到 Christoffersenhe & Marr, 〈医药化学杂志〉 38:2023-2037(1995)的重新审视。可替换地, 同样的原理可被用于在逆基因构建物中控制核糖酶, 以下将对此进行详细的讨论。

连接于共聚物的插入基团的实例包括:

1. 荧光插入物 [Endo & Komiyama, 〈有机化学杂志〉 61:1994-2000(1996)]
2. 吡啶 [Lancelot 等人, 〈生物化学〉 24:2521-2529(1985); Asseline 等人, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81:3297-3301(1984); Asseline 等人, *EMBO J.* 3:795-800(1984); Asseline 等人, 〈生物化学杂志〉 260: 8936-8941(1985)]
3. 蒽醌 [Deshmuk 等人, *Bioconjugate Chem.* 6:578-586(1995)]
4. 柔红霉素 [Timofeev 等人, *Tetrahedron. Lett.* 37:8467-8470(1996)]
5. Methidium [Timofeev 等人, *Tetrahedron. Lett.* 37:8467-8470(1996)]
6. 黄恶唑 [Ishiguro 等人, 〈核酸研究〉 24:4992-4997(1996)]

7. 菲[Puri 等人, Tetrahedron. 53:10409-10432(1997)]
8. 茈[Mann 等人, Bioconjugate Chem. 3:554-558(1992)]

连接于促进细胞摄取共聚物的基团包括:

1. 通过生物膜转移的融合肽和其它肽[Bongartz 等人, 〈核酸研究〉 22:4681-4688(1994); Allinquant 等人, 〈细胞生物学杂志〉 128:919-927(1995); Chaloin 等人, 〈生物化学生物物理研究〉 243:601-608(1998)]
2. 聚赖氨酸[Degols 等人, 〈反义研究及其发展〉 2:293-301(1992)]
3. 胆固醇和胆酸[Chow 等人, 〈反义研究及其发展〉 4:81-86(1994)]

用于增加细胞摄取共聚物的复合体、佐剂和配制物 (formulations) 其它类型的专一性调节剂包括:

1. 脂质体[Zelphati & Szoka, 〈药物研究〉 13:1367-1372 (1996);Juliano & Akhtar, 〈反义研究及其发展〉 2:165-176(1992)]
2. 包含有非活性 Sendai 病毒或其它融合蛋白的脂质体 [Kitajima 等人, 《生物化学杂志》 272:27099-27106(1997); Morishita 等人, Gene 149:13-19(1994);Kitajima 等人, Arthritis. Rheum. 40:2118-2127(1997)]
3. 环状糊精 [Zhao 等人, Antisense. Res. Dev. 5:185-192(1995)]

4. Fusogenic 肽 [Hughes 等人, 《药物研究》 13:404-410(1996); Morris 等人, 《核酸研究》 25:2730-2736(1997)]

5. 阳离子脂类 [Zelphati & Szoka, 《药物研究》 13:1367-1372(1996); Capaccioli 等人, 《生物化学生物物理研究》 197:818-825(1993)]

6. 包含结合于核酸的部分和结合于在细胞表面广泛表达的整合蛋白受体的其它部分的肽 [Bachmann 等人, 《分子医学免疫学杂志》 76:126-132(1998)]

7. 链球菌溶血素-O [Giles 等人, 《核酸研究》 26:1567-1575(1998)]

8. 聚氮丙啶 [Boussif 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7297-7301(1995)]

9. 阳离子磷酸脂 [Le Bolch 等人, Tetrahedron Lett. 36:6681-6684(1995)]

10. dendrimers [Hughes 等人, 《药物研究》 13:404-410 (1996)]

11. 阳离子面亲水脂分子 [Walker 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1585-1590(1996)]

连接于促进选择摄取进入专一性细胞类型或组织的共聚物的基团包括有:

1. 被直接摄取入单核细胞和巨噬细胞的拟糖蛋白, 这些细胞具有使糖蛋白内化的膜凝集素 [Bonfils 等人, 《核酸研究》 20:4621-4629(1992)]。

2. 作为核运输信号的肽[Delatorre 等人, Tetrahedron. Lett. 35:2733-2736(1994)]。

3. 以中性白细胞为靶的胆固醇、胆酸和四肽, fMFLY[Chow 等人, 《反义研究及其发展》 4:81-86(1994)]。

4. 以具有甘露糖专一性表面凝集素的巨噬细胞为靶的甘露糖[Akhtar 等人, Tetraheadron Lett. 36:7333-7336(1995)]。

5. 以肝为靶的无唾液酸基糖蛋白[Rajur 等人, Bioconjugate Chemistry 8:935-940(1997)]。

6. 似胰岛素生长因子 1 (其增加被表达胰岛素生长因子 1 受体的细胞的摄取) 的肽类似物[Basu & Wickstrom, Bioconjugate Chemistry 8:481-488(1997)]。

7. 增加被表达对白细胞介素-1 β 受体的细胞摄取的白细胞介素-1 β 。

用于共聚物被直接摄取进入专一性细胞或组织类型的复合体、佐剂和配制物包括有:

1. 与连接于无唾液酸基血清类粘蛋白的聚赖氨酸或由以肝专一性无唾液酸糖蛋白受体为靶的无唾液酸糖蛋白合成的寡核苷酸[Bunnell 等人, Somat. Cell. Mol. Genet. 18:559-569 (1992); Wu & Wu, 《生物化学》 267:12436-12439(1992); Lu 等人, J. Nucl. Med. 35:269-275(1994)]。

2. 与连接于运铁蛋白并以高水平表达运铁蛋白受体的细胞为靶的聚赖氨酸合成的寡核苷酸[Citro 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7031-7035(1992)]。

3. 与连接于叶酸并以快速分裂细胞为靶的聚赖氨酸合成的寡核苷酸, 这些细胞表达对维生素寡核苷酸的受体[Citro 等人, 《英国癌症杂志》 69:463-467(1994); Leopold 等人, 《血液》 85:2162-2170(1995)]。

4. 与抗生蛋白链菌素连接的甘露糖结合于被生物素酰基化的寡核苷酸, 其被直接摄取进入有甘露糖专一性表面凝集素的巨噬细胞[Bonfils 等人, *Bioconjugate Chem.* 3:277-284 (1992)]。

5. 以肝细胞为靶的半乳糖基化的聚氮丙啶[Zant 等人, *Bioconjugate Chem.* 8:839-844(1997)]。

在优选的实施方案中, 共聚物连接于一个或更多的上述的化学部分, 这些化学部分改善共聚物的药理学性质和毒性情况。可以被影响的药理学性质包括(但不仅限于此)生物药效率、稳定性、在血清和(或)在与生理学相关的区室中的半衰期、毒性和可能有害或无害的对抗生物学效应。例如, 共聚物的物理性质可由于连接如胆固醇那样的亲脂的或带电荷的部分而改变[Ojwang, *J. Acq. Immun. Defic. Syndrome* 7:560-570(1994)]。这种改变影响共聚物的生物学性质[Chow 等人, 《反义研究及其发展》 4:81-86(1994); Demirhan 等人, *Virus Genes* 9:113-119 (1995)]。另一个例子是连接于以后可以结合在抗生蛋白链菌素上的生物素的共聚物。这个产物被肾清除比非连接的寡核苷酸慢 10 倍以上, 其降低系统清除率 50%, 并使更多的共聚物改为朝向肝[Kang 等人, *Drug Metab. Dispos.* 23:55-59(1995)]。

其它类型与 Ii RNA 形成双螺旋分子抑制翻译的专一性调节剂是可表达的逆基因构建物。本发明中的这样的逆基因构建物是可表达的 DNA 构建物, 它的表达指向与编码野生型 Ii 的 RNA 分子片段互补的 RNA 的合成与翻译。当在产生 Ii 细胞中共表达

时，逆基因构建物的 RNA 产物可以杂交到编码 Ii RNA 上，因而形成双螺旋结构。双螺旋结构的形成抑制编码 Ii 的 mRNA 的翻译，从而减少了细胞中 Ii 蛋白的水平。

优选的是，逆基因构建物是用 cDNA 合成的或是编码有机体中 Ii 的片段，这有机体与在其内逆基因构建物将表达的细胞类型相应。本发明的方法和组成一般能应用于哺乳动物系统。编码 Ii 蛋白的 cDNA 可从由各种各样哺乳动物系统中分离出的 mRNA 产生，核酸序列已被测定[Singer 等人，EMBO J. 3:873-877(1984); Strubin 等人，EMBO J. 3:869-872(1984); Henkes 等人，《核酸研究》16:11822(1988)]编码 Ii 的哺乳动物基因已被鉴定为是高度保守的。例如，编码小鼠和人 Ii 的 cDNA 序列已被测定出大约 85%是同源的。在小鼠和大鼠之间的保守程度大于 90%[Henkes 等人，《核酸研究》16:11822(1988)]。根据哺乳动物 Ii 基因的高度保守性，从实际上任何感兴趣的哺乳动物系统得来的 cDNA 文库可用探针筛选（例如，来源于人或小鼠）分离出相应的 Ii 基因。

用于构建逆基因构建物的表达载体选择背景是受到在其内表达是需要的细胞类型的影响。极其多样的适当载体可被利用，本领域的技术之一无需过分实验就能从许多有用载体中选择适当的载体。同样，有效表达的调节信号在这样的细胞类型的基础上进行选择，在此细胞类型中表达是需要的。在本领域中，熟知需要这样的调节信号，并且一般也已知这样信号的非限制来源。

在优选实施方案中，逆基因构建物是从病毒表达载体被表达的。病毒表达载体具有增强转染哺乳动物细胞能力的特性。这样的载体非限制地包括 MFG 逆转录病毒载体、如 pLJ、pEm 和 alphaSGC 载体的逆转录病毒载体以及腺病毒载体。为了鉴定具

有表达的高功效和给定细胞功能的特殊构建物，这些载体在测定系统中可有筛选一定数目逆基因构建物的特殊效用。除此之外，这些载体可表达具有增强结合和（或）被特殊细胞类型摄取性质的蛋白质。因为这样的载体包含增强在一般性质哺乳动物的细胞中和（或）在特殊的细胞类型中逆基因构建物表达的转录启动子，它们也可被优选。例如，从某个器官或组织类型的癌中分离出来的那些。

逆基因构建物可通过将 Ii cDNA 或片段导入以逆向适当表达的载体中产生，与野生型的方向相比，是与启动子相关的逆向。根据这样的事实，即已知 mRNA 被假定有复杂的二级结构，其可干扰它杂交于互补分子上的能力，全长逆基因构建物（即编码 mRNA 分子的逆基因构建物，这种分子与编码 Ii 的全长 mRNA 互补）不总是最有效的设计。为了开发用于 Ii 抑制的更有效的构建物，经常需要进行常规实验以鉴别小于全长的 cDNA 片段，并且当引入逆基因构建物时，这种片段在抑制 Ii 合成中是有效的。这样实验的例子在这个应用的实例部分详细叙述。

在设计小于全长构建物时，经常需要鉴别编码 Ii 的 mRNA 的功能重要区域，并且设计逆基因构建物以便由逆基因构建物编码的 mRNA 与功能重要区域互补。例如，功能重要区域包括涉及 mRNA 的核糖体识别区域、翻译起始部位、mRNA 剪接点和聚腺苷酸化需要的翻译末端密码子的 3'区域。

在真核细胞中，起始核糖体与 mRNA 结合的机理不同于原核生物的机理。在真核生物中，最靠近 5'-端的甲硫氨酸特异性密码子通常是用做翻译起始点的。真核 mRNAs 的 5'末端具有包括在 5'-5'焦磷酸酯连接（经常称为 5'帽结构）中连接第一个未修饰核苷酸的甲基化鸟苷酸残基的修饰末端。例如，实验已经证明，缺乏 5'-帽结构的 mRNA 不能被有效翻译。因此，真

核生物中翻译起始似乎涉及 5'-帽结构的识别及 AUG 密码子周围的共有序列的定位。接近蛋白编码序列的核糖体识别的共有序列是“5'-ACCAUGG-”。

通过将基因组的 DNA 序列（其编码初级转录物）与相应的 cDNA 序列（从加工的转录物产生）比较，可以测定在初级转录物中的剪接点的定位。在这种比较中鉴定的不连续性标记内含子/外显子的边界。这种边界研究已经揭示了在内含子/外显子边界的中等保守的，短共有序列及仅在 3'剪接点上游的富含嘧啶区域的趋势。另外，前两个（GU）最后两个（AG）内含子位置发现完全保守的核苷酸碱基。

聚腺苷酸化需要多聚 A 信号，AAUAAA，以及自多聚 A 附加部位往下游的约 30 个核苷酸。聚腺苷酸化稳定 mRNA，因此延长细胞中的半衰期。

在下面实例部分所述的实验中设计和试验了用于抑制鼠细胞中 Ii 表达的逆基因构建物。鼠 Ii 蛋白由 215 个氨基酸的残基组成[Singer 等人，EMBO J. 3:873-877(1984)]。因此，编码该分子的全长 cDNA 包括 645 个碱基对的编码序列。

在以下例子中，设计和检测了几种逆基因构建物。发现它们有一些抑制在 SaI/CIITA 细胞中 Ii 蛋白的表达。Ii 蛋白表达的抑制(达到 60%的细胞)在一些但非所有 mIi 逆基因构建物的转染子中被观察到。表中序列鉴定号 (SEQ ID NOS): 68、71、72、75、77、78 和 79 的所列的逆基因构建物显著抑制 Ii 蛋白表达。

如上所述，用逆基因构建物抑制蛋白质表达的效率在很大程度上依赖于靶 RNA 的二级结构。在此所述的实验证明，Ii 蛋

白对逆基因构建物引起的表达抑制特别敏感。这样的结论是基于以下事实：几种逆基因构建物显示了显著的抑制 Ii 蛋白表达的能力。而且，全长的逆基因构建物的截断变体甚至产生较高度的抑制。此项实验工作结果与已知的在哺乳动物 Ii 基因之间的高度保守性一起被认为可有确实根据地预见在其它哺乳动物系统（包括人类系统）中逆基因构建物的活性。

在可替换的实施方案中，Ii 专一性的调节剂是由专门杂交于 Ii 基因的核苷酸碱基组成的共聚物。这个杂交阻断靶细胞 Ii 基因的转录和表达调节。在两条反向平行 DNA 链的核苷酸碱基 Watson-Crick 互补配对保持的时候，杂交是通过形成 Hoogsteen 配对来进行的。可替换的是，治疗剂的核苷酸碱基配对可以通过形成 ‘D 环’，是与细胞 DNA 一条链核苷酸碱基序列反向平行的。相应的共聚物成分及其传递给细胞的方法在上面已有论述。

在另一个实施方案中，专一性的 Ii 调节剂是 20-1000 道尔顿 (Daltons) 的有机分子。通过以增强结合 MHC 类型 II 子的内源性抗原决定簇的方式改变 Ii 蛋白与 MHC 类型 II 分子的相互作用，此有机分子抑制 Ii 蛋白功能，例如，于靶细胞的内质网中。本发明中有机分子的例子包括（但不局限于）肽、拟肽和小的有机分子。在对 MHC 类型 II 分子和 Ii 蛋白的晶体学和核磁共振证据的基础上，通过合理设计的程序，鉴定具有专一性 Ii 调节剂功能的有机分子。更加特殊的是，在 Ii 蛋白和 MHC 类型 II 分子之间相互作用的部位也被测定，并且，模仿在相互作用部位的此二种蛋白质肽片段的复合物也已被制备和测定，用于破坏 MHC 类型 II/Ii 蛋白复合体的形成。可以替换的是，通过准备复合物的（combinatorial）文库或者用多数的系统上各种各样的化学基团来鉴定这样的小有机分子。然后，这样的复

合物以几种测定方式被检测。在于体外的化学水平上，在专一性的组织蛋白酶和其它细胞内蛋白酶是否存在的情况下，Ii 蛋白与 MHC 类型 II 蛋白质的分离可被测定。从这样测定的候选分子进一步测定其对内源性合成抗原决定簇提呈的增强，例如，从以转染基因形式编码的鸡蛋溶菌酶中。主要的复合物然后要进行功能上的测定，例如，在以下讨论的诱导肿瘤免疫原性在癌细胞疫苗模型中的增强。

在优选的实施方案中，已用药理学合格的载体配制出 Ii 蛋白表达免疫调节功能的专一性调节剂。此载体就以下方面有优选的性质，例如（也不限于此），防止变性作用、稳定性、通过一般物理化学手段和（或）通过对细胞表面受体的粘附产生的向靶细胞群体表面的吸附作用。药理学合格的载体也可增强 Ii 专一性调节剂对细胞群体的传递。

在一个实施方案中，药理学合格的载体是脂质体，或是一种或多种脂类的小泡状制备物，或是有一种或多种需要性质（例如，保护作用、分室作用或向靶细胞群传递）的脂多糖。

在另一个实施方案中，药理学合格载体增强 Ii 专一性调节剂向专门细胞群体的传递。这方面的一个例子是与束缚、吸附或粘附其上的分子相互作用的配置物（例如，脂质体或其分子具有通过与靶细胞表面互补受体分子相互作用而结合于靶细胞群表面的性质的小泡状制备物）。

本发明的另一个方面与 Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性调节剂被导入其中的细胞有关。上述的 Ii 专一性调节剂向相应的受体细胞的导入可通过各种各样的方法达到。采用的方法取决于被传递的专一性调节剂、专一性调节剂的配制物和受体细胞。这些细胞在疾病的治疗上和从这样的细胞提呈的表位

中开发新型诊断和治疗试剂（抗原肽及其它们的衍生物）上有几种用途。

相应的受体细胞是表达 MHC 类型 II 分子和表达通过 MHC II 类型 分子提呈抗原功能的细胞。此细胞或可自然发生，或可从处理一个或更多细胞产生。这些将在下面讨论。表达 MHC 类型 II 分子的细胞在此被称为 MHC 类型 II -正效。适应于上述需要的细胞在此被称为 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞。

自然发生的起作用的抗原提呈细胞表达 MHC 类型 II 分子和其它辅助功能，这些辅助功能是在它们朝向并入 MHC 类型 II 肽结合部位的过程中加工、交换（trafficking）、结合和编辑抗原肽所需要的。除此之外，这些细胞表达细胞表面相互作用的分子，例如，B7、CD24、CD40、白细胞介素受体、白细胞介素和其它这样对与 MHC 类型 II 前后相关的（in the context）的抗原肽识别有最适应答所需要的蛋白质。如果是非自然发生，所需要辅助功能的表达可在细胞中被诱导，或是使用如干扰素 γ (gamma)或粒细胞巨噬细胞群刺激因子的细胞素诱导，或是用任何上述的免疫应答强化剂通过基因转染诱导。本发明包括这样的细胞及其衍生物，以及它们的后代。

本发明的一个最终目的是产生能显示与 MHC 类型 II 蛋白质相关的专一性抗原肽的细胞。因此，接受 MHC 类型-II 正效抗原的提呈细胞必须表达或者包含有这样的肽。在优选的实施方案中，MHC 类型 II -正效抗原提呈细胞从细胞的融合发生的，这是包含有抗原提呈机构和有关的 MHC 类型 II 分子的细胞与包含有对其需要有免疫应答的决定簇抗原肽的细胞或此细胞衍生物的融合。在无数的例子中，产物是一类专门的抗原提呈细胞（例如，树状细胞、巨噬细胞、B 淋巴细胞或某种多效细胞）和表达有重要性抗原表位的细胞的融合。这样表达抗

原表位的细胞包括例如，恶性细胞、病毒感染或转变细胞、与诱导自身免疫应答有关的细胞和通过抗个体基因型网状机理调节自身免疫应答的细胞[例如，表达在类风湿性关节炎中与致病相关的 T 细胞受体 (TCR)]。融合产物可能是显著异原的细胞制备物，或者是于体外新获得的，或者是在体外复制后获得的。它们可能是从这样的体外融合中衍生出的细胞系或是从这样的细胞系中衍生出克隆制备物。

可替换的是，可接受 MHC 类型 II -正效抗原提呈细胞是从导入遗传物质或蛋白质衍生物产生的，这样的导入是从携带所需抗原表位的细胞到自然表达抗原提呈机理和相关 MHC 类型 II 分子的细胞。例如，cDNA 是由细胞内有多腺苷酸尾的 mRNA 制备物合成的。此 cDNA 制备物是由已确立的程序传递给需要合成抗原表位的另外细胞的。用基因枪或其它技术传递 DNA 的方法被利用，并作为本领域一项技术可被成功应用[美国专利 No.5,593,972(1997); 美国专利 No.5,643,578(1997); 美国专利 No.5,716,613(1998); 美国专利 No. 5,741,486(1998)]。除此之外，如美国专利 No.5,627,025(1997)所揭示的（其内容在此被并入本文），与肿瘤相关的或肿瘤专一性蛋白质的基因，或者这样蛋白质基因的片段可被传递到病人的树状细胞或其它的专一性抗原提呈细胞群。从这样方法产生的细胞群可被用于在天然异原细胞系水平或群体水平上的疫苗。

在一个实施方案中，可接受 MHC 类型 II -正效抗原提呈细胞是恶性细胞或包含从恶性细胞衍生出的成分。这样的细胞包括（但不限于此）癌细胞和其它胃、结肠、直肠、乳腺、肺、前列腺、膀胱、胰腺和脑部的肿瘤细胞，以及黑素瘤、白血病和淋巴瘤细胞。在优选的实施方案中，细胞在细胞表面受体[例如，与 MHC 类型 I 或 MHC 类型 II 分子相关的(in the context

of)]表达个体基因型决定簇。这样的个体基因型决定簇可能从如免疫球蛋白或 T 细胞受体中衍生, 并被 MHC 分子提呈。由于个体基因型肽是从细胞群专门受体中衍生的, 抗原决定簇是真正地肿瘤专一性的。B-淋巴恶性肿瘤的免疫球蛋白受体包含在它们与抗原结合部位的个体基因型的肽序列。这样的受体和它们个体基因型的肽对那些细胞群体是独一无二的。在另一个实施方案中, 可接受 MHC 类型 II 分子的抗原提呈细胞是非恶性肿瘤细胞。那些细胞包括(不限于此)包含病毒、细菌、寄生虫和其它病原体的细胞。也包括在免疫系统中具有功能的细胞, 例如, T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、树状细胞和自然杀伤细胞。

上述的细胞在疾病治疗和从由这样细胞提呈的表位取得的新诊断试剂和治疗试剂的开发上有几种用途。沿着这条线索, 本发明也提供了治疗疾病的治疗试剂和治疗方法。本发明的一个方面是显示自我决定簇肽的方法, 此肽在 MHC 类型 II-正效抗原提呈细胞表面, 与 MHC 类型 II 蛋白质有关。自我决定簇肽在此定义为其可以结合于 MHC 类型 II 分子抗原肽结合部位用于向 T 淋巴细胞提呈的肽。这样的肽可以从在抗原提呈细胞本身内合成的蛋白质中衍生, 或是从蛋白质传递到抗原提呈细胞, 例如, 对于抗原或补体的细胞表面受体。此方法包括提供在以上已详述的包含有所需要的自我决定簇肽的 MHC 类型 II -正效抗原提呈细胞。一旦提供此方法, Ii 蛋白表达或免疫调节功能的专一性调节剂就被导入到细胞中, 影响与 MHC 类型 II 蛋白质相关的自我决定簇肽的显示。Ii 专一性的调节剂可以是上述的任何形式。在优选方案中, I i 专一性调节剂或者是由核苷酸碱基组成的共聚物, 或者是可表达的逆基因构建物。导入这样成分的细胞或是恶性细胞, 或是非恶性细胞; 或是从用这样被处理细胞的内源性决定簇进行免疫接种能得到所需治疗

效果的个体中取得，或或是从其它个体中取得。除此之外，导入这样成分的细胞或是从个体中刚刚获得的样本；或是在培养之后，包括构建了细胞系或无性繁殖系（克隆）的样本。Ii 专一性调节剂首选用电造孔法导入受体细胞。

在另一方面，本发明提供了通过增强对恶性肿瘤的免疫攻击力来治疗病人体内恶性肿瘤的方法。这是通过生产和使用肿瘤细胞疫苗来实现的。肿瘤细胞疫苗是经过处理包含恶性肿瘤抗原表位（通过 MHC 类型 II 分子提呈表位）的细胞来产生的，其尽力引动病人的免疫系统朝向恶性肿瘤。这种类型的治疗是通过两种方法之一来实现的：1）用活体外方法，此方法中，细胞在体外得到处理并生产肿瘤疫苗细胞，然后再被导入到病人体内。2）在活体内直接产生肿瘤疫苗细胞。在第一种方法中，恶性肿瘤细胞群可从多样来源获得。这样的制备物可来自于从病人获得的非选择性的肿瘤细胞群体，其可与相伴的正常细胞分离或不分离，或来自于从细胞系或这样细胞系的克隆中获得的。这样的细胞可从已建立的恶性细胞系中或新鲜恶性组织（例如，直肠或卵巢腺癌）的移出物中获得。如有必要，获得的细胞群体可在体外被扩大。可替换的是，也可用非恶性细胞。

无论是何来源，细胞必须表达或包含被处理的恶性细胞抗原决定簇。除此之外，如果细胞不能自然表达足够量的 MHC 类型 II 分子，必须诱导它们这样做。这可以用上述的方法来完成。

一旦获得或产生了适合的细胞群体，就可用前面已描述过的方法将 Ii 表达的专一性调节剂导入细胞，首选的方法是电造孔法。在专一性调节剂导入后，细胞一般被进一步培养一段时间，在此期间需要 Ii 表达抑制剂在抑制 Ii 表达中施加它的作用，需要带有内源性抗原决定簇的 MHC 类型 II，此后需要具有表面表达的复合体。

经处理的细胞然后被导入到病人体内。可替换为，被处理细胞的衍生物可被导入到病人体内。细胞的导入可以是静脉内的、皮下的、腹膜内的或肌内的。在优选的方案中，在导入病人体内前，已使被导入的细胞失去复制能力（例如，用放射处理或固定法）。已确认的有关癌疫苗免疫治疗的科学实验报告已在如下文献中讨论[Clements 等人,《免疫学》149:2391-2396(1992); Baskar 等人,《细胞免疫学》155:123-133(1994); Baskar 等人,《医学实验杂志》181:619-629(1995); Hersey,《药物》47:373 (1994) 和 Pardoll,《今日免疫学》14:310(1993)。

由本发明提供的治疗病人恶性肿瘤的第二个方面涉及到将专一性的 Ii 调节剂导入到未从病人体内取出的可达到的肿瘤细胞中，将 Ii 专一性调节剂以充足的量给以病人诱导抗癌免疫应答。这种应答的特征是由活性的诱导和（或）T 淋巴细胞的数目来决定的，T 淋巴细胞有杀伤癌细胞的功效和（或）调节其它细胞去杀伤癌细胞的功效。诱导抗癌免疫应答需要的量将因每个病人和专门的恶性肿瘤而异。在一个实施方案中，所需量在每天 10 μ g 和 100 mg 之间。

给药的适当途径包括但不限于静脉注入（例如，通过注射）、通过皮肤或粘膜表面注入（例如，表面敷用）、用适当的载体颗粒包被后用基因枪插入（例如，胶体金）。特别是，由放射学家所做的用微注射注入内脏转移瘤，通过荧光镜透视检查使靶组织显影的方法已被誉为典型的方法学。这样的给药也可通过注入到体腔中或注入到腔中包含的腔液中，例如，在卵巢癌的病例中。通过这些方法 I 专一性调节剂接触到和被导入到原发的或转移的肿瘤细胞中，从而增强 MHC 类型 II 分子将内源性肿瘤决定簇由肿瘤细胞提呈给免疫系统。

在一个实施方案中，专一性的 Ii 调节剂是用药理学可接受的载体给予的。简言之，有很好确立的在全身或局部注入后保护治疗用的寡核苷酸的方法，传递到目标的方法和进入到所选细胞群的方法。全身或局部治疗的方法将适用于肿瘤和它的提呈。例如，有腹部转移瘤和腹水的卵巢癌将用腹膜内注入寡核苷酸来治疗，所给药剂以适当的配置形式增强恶性细胞对其的摄取。这些方法已在于此引证的文献和专利中被提出，或于美国专利 5,098,890 号(1992); 美国专利 5,273,745 号(1993); 美国专利 5,290,551 号(1994); 美国专利 5,637,483 号(1997); 美国专利 5,648,223 号(1997); 美国专利 5,679,647 号(1997); 美国专利 5,693,522 号(1997) 和美国专利 5,788,963 号(1998)，其中有关内容通过在此引证被并入本文。

与以上描述类似的方法可被应用于启动个体免疫系统朝向非恶性的然而是不良的细胞。本发明的另一方面是通过增强对个体不良细胞群的免疫攻击力来治疗个体非恶性疾病的治疗方法。不良细胞群的细胞通常是直接从病人体内获得，而如前面所述的是在体外处理，使其产生 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞，它包含一般针对不良细胞群的抗原决定簇。如上所述，一旦适合的受体细胞群产生，Ii 蛋白表达的专一性调节剂被导入到受体细胞增强 MHC 类型 II 对抗原决定簇的提呈。这种导入的优选方法是电穿孔法。然后，细胞再被导入到个体内。这可通过上述的方法来完成。如前所述，在优选的实施方案中，细胞在再被导入到个体内之前，使其失去复制功能。

通常，不良细胞群是疾病发生的原因或是其产物。藏匿病毒或其它细胞内病原体的细胞群体就是一例。这样的细胞表达由病原体编码的蛋白质并被激发对病原体的应答。涉及到病原体免疫应答的细胞群是另外一例。

藏匿着病毒或其它细胞内病原体的细胞对病原体感染表达专一性的分子。宿主细胞结构基因的一些上游调节区域可以被由病原体编码的反式作用因子激活或者被其激发。宿主细胞蛋白质也可作为对病原体免疫应答的成分被激发,例如,细胞素。这样的对被感染细胞有绝对或相对专一性的蛋白质可被加工和由被感染细胞或宿主抗原提呈细胞提呈,例如,巨噬细胞或树状细胞。当提呈病原体蛋白质的细胞或被激发对病原体做出应答的细胞与靶向 Ii 蛋白的反义试剂适当接触的时候,通过 MHC 类型 II 分子,另外的抗原决定簇被提呈, MHC 类型 II 分子引起 T 辅助细胞群的扩大,然后其又加强了 MHC 类型 I 对病原体有限制的免疫应答。这种方法增强了 MHC 类型 II 对附加的病毒抗原决定簇或者对病毒感染细胞有着绝对或相对专一性的抗原决定簇的提呈。MHC 类型 II 有限的辅助细胞的诱导引起增强杀伤 T 淋巴细胞对病毒感染细胞的破坏和增强治疗性免疫球蛋白的诱导。在这一点上,只有被病毒感染细胞的部分需要用 Ii 反义疗法治疗并被重新导入到病人体内。特别是在 Epstein-Barr 病毒感染正常 B 细胞(在这样的细胞中, Ii 显示出对抗-EBV 免疫应答抑制的非常过度的表达)的病例中,此治疗法在增强抗-EBV 免疫应答上是有效的。与其类似的是,在 HIV 感染的可对表达 MHC 类型 II 抗原起作用的 CD4+ T 淋巴细胞的病例中,通过用抗 Ii 构建物处理这些细胞,抗 HIV 免疫应答将会得到增强。监测治疗效率的过程可采用现在通常使用的程序。将病毒 DNA 导入到细胞和组织的方法是由美国专利 4,689,320 号(1987)和美国专利 5,620,896 号(1997)提供的,它们的相关内容在此通过在此引证被并入本文。

在另外的实施方案中,不良细胞群体包含自身反应 T 淋巴细胞。涉及到致病的免疫应答的细胞也表达专门对这些细胞群的抗原决定簇。这样,由自身反应 T 淋巴细胞引起的自身免疫

疾病可以用本发明的成分和方法来治疗。表达 MHC 类型 II 分子的致病 T 细胞可通过这些分子提呈它们的 T 细胞受体 (TCR) 的个体基因型肽。用上述的方法, 这样的细胞群可被用于诱导病人的对致病 T 细胞的免疫应答。从以上所述一些方法适合制备癌细胞疫苗。这些方法特别包括但不限于扩增培养用做制备 T 细胞疫苗的致病 T 细胞和用编码 T 细胞受体 (TCR) 链或片段的核酸共聚物转染另外的细胞群, 例如, 树状细胞。诱导 MHC 类型 II 有限的辅助细胞导致增强其它杀伤 T 淋巴细胞对致病 T 细胞的破坏。在这一点上, 只有部分致病 T 细胞或者其培养物或克隆需要用 Ii 反义疗法处理以及重新导入到病人体内。

例如, 类风湿性关节炎被提议用细胞毒素 T 细胞的破坏作用来调解, 这些细胞直接指向发炎关节处的抗原。这样的细胞毒素 T 细胞具有独特的 T 细胞受体 (TCR), 其可以被加工和提呈给免疫系统。增强其它 T 细胞对这些 TCR 衍生的个体基因型肽的免疫应答将改善类风湿性关节炎病人的临床状态。到这样病理 T 淋巴细胞表达 MHC 类型 II 分子的程度, 导入专一性的 Ii 蛋白表达调节剂将导致启动辅助 T 细胞对相关 TCR 表位的应答。如以上讨论, 与产生受体 MHC 类型 II 正效抗原提呈细胞相关联, 这样的治疗可能也受到树状细胞进入 (licensing) 的增强的影响。如上所述, 这种治疗方式包括但不限于 T 细胞群的分离和 TCR 基因对树状细胞的转染。

先前监察自身免疫病治疗的程序也适用于本治疗效果的监察程序。这样有关的方法在包括于此引证的文献中被提出或被美国专利 5,614,192 号提出或评论, 其有关内容在此通过引证被并入本文。

在另外的实施方案中, 患有自身免疫疾病的病人的治疗是通过在病程中的适当时间给予专一性的 Ii 表达调节剂来完成

的。这就是，治疗是按着调节对与自身免疫应答扩大的毒性期相关的抗原决定簇的应答来安排时间的，而不是在抑制性 T 细胞调节的自体免疫反应的缓解中。这样定时的治疗安排已有描述，例如，在鼠辅助性（adjuvant）关节炎和实验性的过敏脑脊髓炎的病例中。于此方法中，给病人足够量的 Ii 功能的专一性调节剂以诱导抗病的免疫应答。抗病免疫应答的特征是：减少对病理性免疫应答起作用的 T 淋巴细胞的活性和（或）数目，和（或）诱导能调节对病理性免疫应答起作用细胞的活性和（或）数目的 T 淋巴细胞的活性和（或）数目。诱导抗病免疫应答所需给药量随每个病人和专门的疾病而有所变化。在一个实施方案中，每日所需量在 10 μ g 和 100 mg 之间。适宜的给药途径包括，例如，关节间隙的注射、静脉和体腔内注入和表面的敷用。在疾病的进行过程中或在疾病急剧恶化阶段准确按时给药在一定程度上诱导对疾病的抑制。

在一个实施方案中，Ii 功能的专一性调节剂在给予病人时，使用药理上可接受的载体，其可保护复合物和（或）增强对一定组织的靶向和对其的摄取。已有很好确立的在局部或全身注入时保护寡核苷酸的方法和传递给目标以及进入所选择细胞群的方法。局部和全身的给药方法将适合于自身免疫疾病和它的显示。例如，将 Ii 表达或免疫调节功能的专一性调节剂注入一个关节间隙来治疗由类风湿关节炎引起的这个膝关节的急性发炎。与共聚物和其它专一性的 Ii 功能调节剂的给药有关的方法在上面已提出，并在于此引证的文献和专利中提出。这样的方法在以下引证的文献或专利中提出，专利为：美国专利 5,356,779 号（1994）；美国专利 5,672,473 号（1997）；美国专利 5,731,160 号（1998）；美国专利 5,736,507 号（1998），专利的有关内容通过在此引证被并入本文。

本发明也提供了分离细胞中自我决定簇肽的方法。通过用上述的方法诱导 MHC 类型 II 抗原提呈自我决定簇肽，然后溶解和提纯与同它们有关联的自我决定簇肽共提纯的 MHC 类型 II 分子，从而获得自我决定簇肽。

包含所需的自我决定簇肽的细胞可刚刚从病人体内获得或从这些细胞的培养物中获得。如果细胞不是自然的抗原提呈细胞，例如，不表达 MHC 类型 II 分子，可以通过上述的步骤使其在体外得到处理，从而显示所需要的活性。一旦受体抗原提呈细胞产生，上述的 Ii 蛋白表达专一性调节剂就被导入到细胞中，细胞被培养足够的时间，使之能对专门的抑制剂表达和产生增强 MHC 类型 II 抗原对抗原决定簇肽提呈的结果。细胞然后按标准的程序被溶解，以及 MHC 类型 II 分子和相关的抗原决定簇肽从溶解的细胞中提纯。提纯的步骤包括但不限于去污可溶解的与植物凝集素有亲和力的富集膜蛋白的免疫提纯。自我决定簇肽然后从免疫提纯的 MHC 类型 II 分子中释放出来，例如，通过酸处理。释放的免疫决定簇肽再被分离和鉴定。通过高压液体层析法来完成提纯，用质谱分析法来完成鉴定。推断的自我决定簇肽的序列通过这样肽的化学合成，接着用物理化学和生物学的分析来确定。这样的方法是在由 Urbande 等人，《免疫学评论》17: 387-397 (1997) 评论的文献中提出的。

本发明也找到了治疗病人病原性自身免疫应答的应用方法。更特殊的是，为了降低对病原性自身免疫应答的调节，在自身免疫病周期的某些阶段内源性抗原的提呈的增强受到了刺激。并且还显示出[例如，在某些如鼠辅助 (adjuvant) 关节炎的关节炎疾病的动物模型中]：在疾病侵入发展的起始阶段之后，朝向启动病理过程的同样抗原决定簇的抑制性 T 淋巴细胞也抑制这些免疫应答。在降低病程调节的第二个时期（临床上作为

缓解的指标), 由 Ii 抑制使细胞中内源性自身抗原提呈的治疗性的增强将降低疾病的调节。并且, 在缺少共同刺激信号的细胞(例如, 无 B7 的细胞, 其中, B7 的表达受到用 B7 反义构建物处理的抑制)中, Ii 的抑制将产生无反应性的应答。

用标准技术首先将细胞群(例如, 表达 T 细胞受体的在病理过程中具有活性的 T 淋巴细胞、或自身免疫疾病病程中的靶细胞、或病毒感染的细胞)从个体中分离出来。如有必要, 在这样的细胞中用上述的技术可诱导 MHC 类型 II 分子。然后, 细胞群用专一性的 Ii 蛋白表达调节剂处理。细胞再被溶解以及 MHC 类型 II 分子和相关的肽被提纯, 例如, 通过用单克隆抗体对 MHC 类型 II 分子的免疫沉淀反应。肽从 MHC 类型 II 分子中分离(例如, 用酸处理), 再用如高性能液体层析分离之后, 具有特征的个体肽用质谱分析仪测定。从它的在质谱分析时离子片段的模式中, 推断出肽的序列, 通过用推断的序列合成的肽的质谱分析来确认。生物学测定可以进一步确定合成肽与病的过程和它的消退的相关性。一种或多种形式的被鉴定肽, 或者称为同系物, 然后被导入到此病人体内或其他有同样病理过程的病人体内, 以影响临床上的改变。这些被治疗的病人被监测到有缓解的迹象。

与这个步骤有关的方法在于此引证的文献中被提出, 或由美国专利 5,356,779 号(1994); 美国专利 5,672,473 号(1997); 美国专利 5,736,507 号(1998); 美国专利 5,773,570 号(1998)提出, 其中相关内容在此通过引证被并入本文。

上面公开的方法的意义重要优点是: 短暂地或偶而地使用所公开的成分就可导致启动免疫系统对抗专门疾病或相关疾病的决定簇。在这样的启动后, 不用另外的反义治疗免疫系统就能抵制肿瘤细胞或病源性的自身反应 T 细胞。与此相对照, 在

最通常的应用反义治疗来控制疾病上（例如，象 HIV 那样的病毒性疾病），当中断使用反义药物时，疾病（或病毒）出现反弹。这种方法另外的首选价值是：对免疫应答的抗疾病启动的诱导可以用公开的反义成分在身体内外继续进行。

本发明的另一个方面与个体的遗传治疗有关，通过增加自身免疫破坏被激发的组织中的 Ii 蛋白治疗组织专一性自身免疫紊乱。这种治疗方法是在上面提出的通过减少 Ii 蛋白表达以增强 MHC 类型 II 分子对自我决定簇提呈的方法在概念上的镜象。相反，这种方法在细胞激活的活动中其结果是增加了 Ii 蛋白的存在。在以上所谈的细胞激活活动中，MHC 类型 II α 链和 β 链增加了的表达并无伴随着增加 Ii 蛋白的表达导致了增强自身抗原的提呈。这个增加了的自身抗原的提呈导致破坏组织的自身免疫应答。治疗上在组织中增加 Ii 减少了 MHC 类型 II 分子对内源性抗原的提呈，同时减小了自身免疫反应，从而减小了组织的破坏。通过增加 Ii 的基本表达，在靶组织中的 Ii 蛋白增加了。这是通过导入在启动子控制下的 Ii 基因来完成的，在靶组织细胞中此启动子具有活性。更好的是，启动子是组织专一性的，在非靶组织中，其只有最微小的活性。Ii 基因和启动子是以表达构件物的形式提供。合适的表达构建物（例如，病毒载体）和适当的将表达构建物导入病人细胞中的方法在上面已提出。对基因治疗各种各样方法常见的步骤和成分将根据得到的有用的临床效果来选择。

这种方法可被用于治疗（DM）糖尿病，此病的结果是胰腺 β 细胞的破坏。在胰岛素启动子的控制下，将 Ii 基因插入敏感的个体中导致增强 Ii 蛋白在胰腺 β 细胞中的表达。治疗结果是保护了胰腺 β 细胞免受自身免疫诱导的破坏。除此之外，上述的方法可用于治疗一些形式的可引起甲状腺小囊细胞破坏的甲

状腺炎。插入在甲状腺球蛋白启动子控制下的 Ii 基因将导致在甲状腺小囊细胞中 Ii 表达的增强。保护它们免受自身免疫诱导的破坏。

实施例

实施例 1 与反义寡核苷酸杂交的 Ii RNA 位点的鉴定

在 RNA 与 DNA 杂交的位点上核糖核酸酶 H 剪切 RNA 的作用被用于鉴定与反义寡核苷酸杂交的 Ii RNA 的位点。一系列去氧寡核苷酸被用于杂交测定，每个去氧寡核苷酸包含 18 个碱基，它们的序列从头至尾与 Ii RNA 片段以交错重叠的模式互补（见表 1）。RNA 被转录并在 5'端用 ^{32}P 标记。这个用 ^{32}P 标记的 Ii mRNA 样本在具有核糖核酸酶 H 的情况下分别与每个寡核苷酸一起培养。杂交于 RNA 的寡核苷酸指导核糖核酸酶 H 在杂交区域剪切 RNA。剪切的位点由从 RNA 5'端度量的标记产物的长度来表明。通过聚丙烯酰胺胶电泳法和放射自显影照片分析反应的产物（见表 2）。正如剪切产物的产生易于变化所表明的那样，一些（但不是所有的）寡核苷酸有效地杂交于 RNA 上。在不具有寡核苷酸的情况；或者具有寡核苷酸而缺乏核糖核酸酶的情况；或者具有有意义的寡核苷酸的对照（序列鉴定号：46）；或者具有带有一个内部缺失的反义寡核苷酸（序列鉴定号：43，序列鉴定号：44 和序列鉴定号：45）的情况，Ii RNA 没有剪切都可观察到。得到强烈剪切的寡核苷酸序列又通过硫代磷酸酯键重新合成用于在例 3、例 4 和例 5 中提出的反义效力的另外研究。此项研究是用小鼠 Ii P31 mRNA 进行的，但杂交位点分析的类似程序可应用于任何种 RNA。

表 1 用核糖核酸酶 H 的反义磷酸二酯寡核苷酸序列定位实验

序列鉴定号	序 列	核苷酸位置
5	5'- CAT GTT ATC CAT GGA CAT	318-301
6	5'- CAT GGA CAT TGG ACG CAT	309-292
7	5'- TGG ACG CAT CAG CAA GGG	300-283
8	5'- CAG CAA GGG AGT AGC CAT	291-274
9	5'- AGT AGC CAT CCG CAT CTG	282-265
10	5'- CCG CAT CTG GCT CAC AGG	273-256
11	5'- GCT CAC AGG TTT GGC AGA	264-247
12	5'- TTT GGC AGA TTT CGG AAG	255-238
13	5'- TTT CGG AAG CTT CAT GCG	246-229
14	5'- CTT CAT GCG AAG GCT CTC	237-220
15	5'- AAG GCT CTC CAG TTG CAG	228-211
16	5'- CAG TTG CAG GTT CTG GGA	219-202
17	5'- GTT CTG GGA GGT GAT GGT	210-193
18	5'- GGT GAT GGT CAG CTT GTC	201-184
19	5'- CAG CTT GTC TAG GCG GCC	192-175
20	5'- TAG GCG GCC CTG TTG CTG	183-166
21	5'- CTG TTG CTG GTA CAG GAA	174-157
22	5'- GTA CAG GAA GTA AGC AGT	165-148
23	5'- GTA AGC AGT GGT GGC CTG	156-139
24	5'- GGT GGC CTG CCC AGC CAA	147-130
25	5'- CCC AGC CAA GAG CAG AGC	138-121
26	5'- GAG CAG AGC CAC CAG GAC	129-112

27	5'- CAC CAG GAC AGA GAC ACC	120-103
28	5'- AGA GAC ACC GGT GTA CAG	111-94
29	5'- GGT GTA CAG AGC TCC ACG	102-85
30	5'- AGC TCC ACG GCT GCA CCT	93-76
31	5'- GCT GCA CCT TTC TGG CTC	84-67
32	5'- TTC TGG CTC TCT AGG GCG	75-58
33	5'- TCT AGG GCG GTT GCC CAG	66-49
34	5'- GTT GCC CAG TAT GGG CAA	57-40
35	5'- TAT GGG CAA CTG TTC ATG	48-31
36	5'- CTG TTC ATG GTT AGA GAT	39-22
37	5'- GTT AGA GAT GAG GTC GCG	30-13
38	5'- GAG GTC GCG TTG GTC ATC	21-4
39	5'- GCG TTG GTC ATC CAT GGC	15- -3
40	5'- TTG GTC ATC CAT GGC TCT	12- -6
41	5'- GTC CTC CAT GGC TCT AGC	9 - -9
42	5'- CAC AGG CGC TGC TGC TGC	-23 - -40
43	5'- ATC CAT GGC TCT AGC C_CT (5'- ATC CAT GGC TCT AGC CTC)*	6 - -13(-11 deleted) (6 - -12)
44	5'- TCT AGC C_CT AGT TTT TCC (5'- TCT AGC CTC TAG TTT TTC)*	-4 - -22(-11 deleted) (-4 - -21)

45	5'- AGT TTT T_CC CAC AGG CGC	-14 - -31(-20 deleted)
46	5'- ATG GAT GAC CAA CGC GAC	1- 18(sense)
47	5'- CTA GTT TTT CCC ACA GGC	-12 - -29
48	5'- CTG CTG CTG TTG CTG CTG	-40 - -57

Ii mRNA 序列[Koch 等人 EMBO 杂志 6: 1677-1683, (1987)]是这样编号的, 以至第一个 AUG 密码子的 A 在核苷酸序列序列鉴定号 39, 序列鉴定号 40, 序列鉴定号 41, 序列鉴定号 43 和序列鉴定号 46 中是核苷酸 1。作为负对照的包括: 寡核苷酸序列鉴定号 43, 序列鉴定号 44 和序列鉴定号 45 (每个都有内部缺失) 和具有有意义的序列定位作用的寡核苷酸序列鉴定号 46。对序列鉴定号 43 和 44 。*天然的序列 (无缺失) 在括号中表示, 其用于表 4 中的序列实验。

表 2 对小鼠 Ii 反义寡核苷酸易受影响位点的核糖核酸酶 H 的定位

寡核苷酸	核苷酸位置	信号
序列鉴定号: 5	318-301	-
序列鉴定号: 6	309-292	+
序列鉴定号: 7	300-283	+
序列鉴定号: 8	291-274	±
序列鉴定号: 9	282-265	-
序列鉴定号: 10	273-256	±
序列鉴定号: 11	264-247	+++
序列鉴定号: 12	255-238	+

序列鉴定号: 13	246-229	+
序列鉴定号: 14	237-220	-
序列鉴定号: 15	228-211	-
序列鉴定号: 16	219-202	+
序列鉴定号: 17	210-193	+
序列鉴定号: 18	201-184	+++
序列鉴定号: 19	192-175	-
序列鉴定号: 20	183-166	-
序列鉴定号: 21	174-157	-
序列鉴定号: 22	165-148	++
序列鉴定号: 23	156-139	±
序列鉴定号: 24	147-130	-
序列鉴定号: 25	138-121	-
序列鉴定号: 26	129-112	-
序列鉴定号: 27	120-103	++
序列鉴定号: 28	111-94	+++
序列鉴定号: 29	102-85	-
序列鉴定号: 30	93-76	+
序列鉴定号: 31	84-67	++
序列鉴定号: 32	75-58	+++
序列鉴定号: 33	66-49	-
序列鉴定号: 34	57-40	-
序列鉴定号: 35	48-31	-
序列鉴定号: 36	39-22	±
序列鉴定号: 37	30-13	+++
序列鉴定号: 38	21-4	+++
序列鉴定号: 39	15 - -3	+++
序列鉴定号: 40	12 - -6	+++

序列鉴定号: 41	9 - -9	-
序列鉴定号: 42	-23 - -40	-
序列鉴定号: 43	6 - -13 (-11 deleted)	-
序列鉴定号: 44	-4 - -22 (-11 deleted)	-
序列鉴定号: 45	-14 - -31 (-20 deleted)	-
序列鉴定号: 46	1 - 18 (sense)	-
无寡核苷酸		-
无核糖核酸酶 H		-

每个寡核苷酸的反义寡核苷酸序列鉴定号、它们的核苷酸在 Ii mRNA 的开始位置和以-、+ 到+++的级别判断的产物强度均在表中表示出来。

实验

化合物 磷酸二酯脱氧寡核苷酸是通过整合 DNA 技术合成的, Inc.(Coralville,IA)。每个寡核苷酸的序列鉴定号、核苷酸序列和在 Ii mRNA 中的核苷酸数目都在表 1 中列出。

Ii mRNA 的制备 根据制造的实验报告, 包含鼠 Ii P31 cDNA 的 pBluescript KS 质粒被 Xho I 线性化并用 T7-Ribomax 大规模 RNA 生产系统在体外转录 (Promega, Madison, WI)。DNA 模板通过用 RQ1 核糖核酸酶-游离的脱氧核糖核酸酶处理被去除 (Promega, Madison, WI) 并且 RNA 产物用小牛肠碱性的磷酸酯酶脱磷酸 (Promega, Madison WI)。RNA 用 T4 多核苷酸激酶以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 在 5'端标记 (Promega, Madison, WI)。所有的步骤都是根据标准的生物学技术来进行的 (Sambrook, J., E.F.Fritsh, T.Maniatis.1990.《分子克隆》 第二版 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。

杂交位点的核糖核酸酶 H 定位 将 ^{32}p -标记的小鼠 Ii P31 mRNA ($5 \times 10^5 \text{cpm}$) 与 2 mg 酵母菌 tRNA 混合于 $1 \times$ 核糖核酸酶 H 缓冲液中, 于 70°C 加热 3 分钟并在室温下缓慢冷却。加入反义寡脱氧核糖核酸 ($0.2\text{--}1 \text{ pmol}$) 并在 37°C 培养 30 分钟, 然后加入 0.5 单位的 E.coli 核糖核酸酶 H (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 给予 10 ml 的终反应容积。在 37°C 培养 10 分钟后, 通过加入 8 ml 电泳负载缓冲液并在 90°C 加热 5 分钟后在冰上冷却, 使反应停止。将 5 ml 的制备物在以后暴露于 X 射线胶片的 6% 聚丙烯酰胺胶中并在 50 瓦下电泳 2 小时。主要的 RNA 剪切产物通过检查放射自显影照片来鉴定, 它们的强度在表 2 中总结。

实施例 2 通过电造孔法将寡核苷酸传递到细胞中的适宜条件

在这里是用小鼠的 SaI/CIITA 细胞来进行上述的研究的, 但也可应用到任何哺乳动物细胞系。

将寡核苷酸传递进入哺乳动物细胞的电造孔法的不同条件被测试, 用以确定产生最大摄取和有着细胞最小损伤的条件。用电压和电容的各种各样的结合, 使 SaI/CIITA 小鼠肉瘤细胞被电造孔。荧光素标记的硫代磷酸酯寡核苷酸 (序列鉴定号 64) 被用于探测核定量寡核苷酸的摄取。对照细胞是在没有荧光素标记的寡核苷酸存在的情况下被电造孔的。电造孔细胞被培养一个小时, 然后用锥虫蓝染色排除法测量它的存活能力。用荧光激活细胞分类器 (FACS) 测量对荧光素标记的寡核苷酸摄取。荧光激活细胞分类器驱使单个细胞通过激光束, 它可激活荧光素标记的部分。通过光束的每个细胞的荧光强度用光电倍增管来测量。为了排除死细胞和成群的细胞, 从每个细胞向前和两侧的分散光线同时被测量。在分析之后 (例如, 对一万个细胞), 数据用电脑辅助以二维直方图显示出来, 其中纵坐标是表示被

检测细胞数目的线性量，横坐标是表示每个细胞荧光量的对数量。从电造孔法最优测定得出的数据在表 3 中表示，其中代表具有荧光强度的所有细胞百分数的正效细胞百分数大于对照细胞的百分数。最大的寡核苷酸摄取和细胞的存活率出现在用 200V 和 1200 mF 结合的情况（见表 3A）。用 2 mM 寡核苷酸，超过 90% 的细胞在这样的条件下有最大的荧光（见表 3B）。

表 3 用电造孔法摄取寡核苷酸的适宜条件

A

寡核苷酸	伏特	电 容 (mF)	正效细胞	存 活 率
-	-	-	1.0%	75.9%
+	-	-	53.8%	72.1%
-	200	1200	0.0%	72.3%
+	100	600	60.2%	72.7%
+	100	1200	75.0%	70.5%
+	100	1800	76.7%	70.4%
+	200	600	75.9%	74.8%
+	200	1200	80.1%	73.6%
+	200	1800	71.3%	74.8%
+	300	600	69.1%	67.9%
+	300	1200	52.0%	53.9%
+	300	1800	21.2%	47.8%

B

寡核苷酸	伏特	电容 (mF)	正效细胞	存活率
-	-	-	0. 4%	54. 1%
+	-	-	49. 3%	70. 9%
-	400	1200	3. 3%	39. 0%
+	200	300	64. 5%	72. 6%
+	300	300	76. 8%	62. 0%
+	400	300	71. 7%	52. 0%
+	500	300	76. 0%	27. 0%
+	200	400	84. 7%	59. 1%
+	300	400	91. 5%	70. 2%
+	400	400	37. 9%	43. 3%
+	500	400	83. 0%	28. 8%
+	200	1200	90. 2%	81. 8%
+	300	1200	89. 6%	53. 6%
+	400	1200	84. 3%	31. 9%
+	500	1200	88. 7%	18. 2%

两个实验如下进行：A) 用 0. 017 微摩尔荧光标记的硫代磷酸酯寡核苷酸序列鉴定号 64 和 2. 15 微摩尔磷酸二酯寡核苷酸，以及 B) 用 2 微摩尔荧光标记硫代磷酸酯寡核苷酸序列鉴定号 64。

实验

化合物 用于此项研究的硫代磷酸酯反义寡核苷酸序列号 64 (见表 5) 是用荧光 5'标记。它用整合 DNA 技术, Inc.合成和 HPLC 提纯的 (Coralville,IA)。

细胞培养 SaI/CIITA 小鼠肉瘤细胞系是在 Iscove's Modified Dulbecco's 培养基 (IMDM, JRH 《生物科学》, Lenexa, KS) 中维持。在 37°C 和 5% CO₂ 以及湿润的大气条件下, 用 5% FCS(FetalClone I, HyClone Laboratories, Logan, UT)、2 mM L-谷氨酰胺、200 U/ml 青霉素和 200 mg/ml 链霉素补充。

电造孔法 细胞被清洗两次, 并在无补充的 RPMI-1640 培养基中重悬浮。将于包含各种量的 5'-荧光标记硫代磷酸酯寡核苷酸序列鉴定号 64 的 500 μ l 培养基中的 2.5×10^6 细胞加入到 4 mm-gap 小杯中, 在冰上培养 10 分钟并在电细胞操纵器 ECM600 系统中进行造孔(BTX Inc., San Diego, CA)。在电造孔后细胞在室温中放置 10 分钟, 与等量的有 2X 补充的 IMDM 混合, 并在分析前置于 37°C, 5%CO₂ 中培养一小时。细胞的存活率用锥虫蓝染色排除法测量。寡核苷酸的摄取用 FACS 细胞分析法测定, 细胞用 0.2M 甘氨酸 (pH4.4) 清洗一次, 用 Hanks'缓冲盐溶液清洗两次, 用 2%甲醛水溶液于冰上放置 15 分钟固定。细胞的存活率和显示寡核苷酸摄取的细胞百分率在表 3 中表示。

实施例 3 通过硫代磷酸酯反义寡核苷酸对 Ii 在细胞中表达的专一性抑制

以上确定的对反义寡核苷酸混合的适宜方法也用于测定 Ii 反义寡核苷酸在肿瘤细胞系 Ii 蛋白表达上的效果。SaI/CIITA 鼠肉瘤细胞系被用于这样的测定。这些细胞可通过包含 MHC 类型 II 转录激活因子 CIITA 基因的质粒被稳定地转染, 并高水平表达 MHC 类型 II 和 Ii 蛋白。

在例 1 中测定的牢固地杂交于鼠 Ii RNA 上的第 13 序列是作为硫代反义寡核苷酸被合成的。这些寡核苷酸通过电造孔法被导入到 SaI/CIITA 细胞中。培养 24 小时后, 用荧光抗体测定

Ii 和 MHC 类型 II 蛋白质的水平。如例 2 所述, 结合抗 MHC 类型 II 抗体或抗 Ii 抗体的存在可用荧光激活细胞分类器 (FACS) 定量。Ii 蛋白或 MHC 类型 II 分子表达的抑制是以与对照 Ii 负效细胞和 MHC 类型 II 负效细胞 (无 CIITA 转染的 SaI 肉瘤母细胞) 显示同样的荧光强度并用反义寡核苷酸处理的细胞的百分率来测量的。这个测量是根据被表明的蛋白质表达完全抑制的细胞的反射部分来进行细胞计数的, 由于 Ii 蛋白部分抑制的细胞可能未被计算在内, 此测量可能对抑制水平估计不足。

在表 4 中所表示的测定结果指明, 不同的寡核苷酸产生各种水平的 Ii 抑制。显示出最大活性的是: 与 AUG 启动子区域互补的寡核苷酸序列号 40 (表 1) 和与 Ii RNA 上第一个剪接受体位点互补的寡核苷酸序列号 32。具有有意义的寡核苷酸 (序列号 46) 和无寡核苷酸进行的对照反应不显示抑制。MHC 类型 II 蛋白质的表达在任何细胞中都是不受影响的, 这说明由反义寡核苷酸产生的抑制是专门针对 Ii 表达的。

然后另外重叠的寡核苷酸被合成以找到靶向这些区域的活性最强的序列 (表 5)。这些寡核苷酸如前一样被测定, 也要检测它们对 Ii 抑制的活性 (表 6A) 和细胞毒性 (表 6B)。最有活性的复合物序列鉴定号 54 是与 AUG 启动子互补的, 对 MHC 类型 II 表达、细胞的复原和存活力也显示出最小的作用。在第一个剪接受体区域最好的复合物是序列鉴定号 62。在 3' 非翻译区域与聚腺苷酸化部位互补的反义寡核苷酸序列鉴定号 64 也显示出一些活性。

表 4 通过硫代磷酸酯反义寡核苷酸对 Ii 而非 I-E 表达的抑制

	Ii 负 效 细 胞				I-E 负 效 细 胞			
寡核 苷 酸	%		FOLD		%		FOLD	
序列 鉴定 号:	平均 值	标准 差	平均 值	标准 差	平均 值	标准 差	平均值	标准差
无	10. 8%	5. 3%	1. 0	0. 0	2. 6%	1. 3%	1. 0	0. 0
46	6. 2%	0. 1%	0. 7	0. 3	2. 8%	0. 9%	1. 1	0. 2
11	21. 3%	14. 7%	1. 9	0. 4	2. 5%	1. 1%	1. 0	0. 0
18	16. 6%	6. 3%	1. 6	0. 2	2. 4%	1. 0%	0. 9	0. 1
28	13. 0%	5. 8%	1. 2	0. 1	2. 8%	1. 5%	1. 0	0. 1
31	22. 1%	12. 2%	2. 0	0. 1	2. 5%	0. 9%	1. 0	0. 1
32	23. 5%	10. 5%	2. 2	0. 1	2. 8%	1. 2%	1. 1	0. 1
38	21. 1%	13. 6%	1. 9	0. 3	2. 8%	0. 9%	1. 1	0. 2
39	31. 0%	16. 9%	2. 8	0. 2	2. 3%	0. 8%	0. 9	0. 1
40	34. 4%	9. 1%	3. 4	0. 8	2. 8%	0. 7%	1. 1	0. 3
41	23. 8%	1. 2%	2. 5	1. 1	2. 3%	0. 4%	0. 9	0. 3
42	10. 7%	3. 8%	1. 0	0. 2	2. 7%	1. 0%	1. 1	0. 1
41	5. 3%	0. 4%	0. 5	0. 2	2. 6%	0. 7%	1. 0	0. 2
47	13. 7%	7. 6%	1. 3	0. 1	2. 5%	0. 8%	1. 0	0. 2
48	20. 8%	10. 6%	1. 9	0. 0	3. 0%	0. 7%	1. 2	0. 3

从两个独立的实验报告得出：Ii 和 I-E 负效细胞百分率的平均值和标准差（SD）以及与没有反义寡核苷酸存在处理的对照细胞相比的负效细胞的倍数。

表 5 用于测定在敏感部位最有活性的复合物的反
义硫代磷酸酯寡核 苷酸

序列 鉴定 号	序 列	核苷酸 位置
49	5' GTCGCGTTGGTCATCCAT	18 - 1
50	5' TCGCGTTGGTCATCCATG	17 - -1
51	5' CGCGTTGGTCATCCATGG	16 - -2
39	5' GCGTTGGTCATCCATGGC	15 - -3
52	5' CGTTGGTCATCCATGGCT	14 - -4
53	5' GTTGGTCATCCATGGCTC	13 - -5
40	5' TTGGTCATCCATGGCTCT	12 - -6
54	5' TGGTCATCCATGGCTCTA	11 - -7
55	5' GGTCATCCATGGCTCTAG	10 - -8
41	5' GTCATCCATGGCTCTAGC	9 - -9
56	5' CACGGCTGCACCTTTCTG	88 - 71
57	5' CGGCTGCACCTTTCTGGC	86 - 69
31	5' GCTGCACCTTTCTGGCTC	84 - 67
58	5' TGCACCTTTCTGGCTCTC	82 - 65
59	5' CACCTTTCTGGCTCTCTA	80 - 63
60	5' ACCTTTCTGGCTCTCTAG	79 - 62
61	5' CTTTCTGGCTCTCTAGGG	77 - 60
32	5' TTCTGGCTCTCTAGGGCG	75 - 58
62	5' CTGGCTCTCTAGGGCGGT	73 - 56
63	5' GGCTCTCTAGGGCGGTTG	72 - 54
64	5' GACAAGCTTGGCTGAGCA	1276- 1261

表 6 通过硫代磷酸酯反义寡核苷酸 II 对 Ii 而非 I-E 表达的抑制

A

寡核苷酸 序列鉴定号	Ii 负效细胞				I-E 负效细胞			
	%		倍数		%		倍数	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
无	1.6%	0.5%	1.0	0.0	1.6%	0.7%	1.0	0.0
49	10.8%	0.7%	7.2	1.8	1.8%	1.4%	1.0	0.4
50	8.6%	4.1%	5.4	1.0	1.5%	1.0%	0.8	0.3
51	6.3%	1.6%	4.4	2.4	1.6%	1.1%	1.0	0.2
39	12.7%	5.1%	8.0	0.8	1.5%	0.9%	0.9	0.2
52	15.2%	9.1%	9.3	0.3	1.5%	0.9%	0.9	0.1
53	15.6%	4.9%	10.0	0.1	1.4%	0.8%	0.9	0.2
40	15.1%	5.1%	9.7	0.3	1.7%	1.1%	1.0	0.3
54	19.9%	5.5%	12.8	0.3	1.4%	1.0%	0.8	0.3
55	13.6%	2.4%	8.9	1.2	1.5%	0.8%	0.9	0.1
41	9.7%	3.3%	6.2	0.2	1.4%	0.9%	0.8	0.2
56	6.1%	3.1%	3.8	0.8	1.7%	1.2%	1.0	0.3
57	8.9%	5.5%	5.4	1.9	1.5%	0.6%	1.0	0.0
31	7.4%	4.2%	4.5	1.3	1.5%	0.9%	0.9	0.2
58	8.2%	4.5%	5.1	1.3	1.8%	0.8%	0.9	0.1
59	7.8%	4.7%	4.8	1.5	1.8%	1.1%	1.1	0.2
60	8.0%	3.8%	5.0	0.9	1.5%	1.1%	0.9	0.3
61	5.1%	1.7%	3.2	0.1	1.7%	0.8%	1.0	0.0
32	9.1%	5.7%	5.5	2.0	1.4%	0.7%	0.9	0.0
62	14.1%	8.4%	8.6	2.8	1.5%	1.0%	0.9	0.2
63	6.6%	4.3%	4.0	1.6	1.7%	1.1%	1.0	0.2
64	7.4%	1.0%	4.9	0.9	1.4%	0.9%	0.9	0.2

B

寡核苷酸序列鉴定号	存活率		复原率	
	平均值	标准差	平均值	标准差
无	75. 0%	7. 2%	100. 0%	0. 0%
49	85. 5%	3. 6%	104. 8%	12. 3%
50	86. 3%	3. 3%	113. 4%	8. 3%
51	83. 1%	8. 3%	95. 4%	48. 8%
39	81. 9%	3. 3%	89. 9%	8. 5%
52	86. 6%	4. 3%	90. 3%	10. 0%
53	85. 6%	1. 2%	119. 3%	5. 7%
40	86. 0%	1. 6%	120. 8%	10. 0%
54	85. 0%	9. 1%	93. 4%	29. 7%
55	86. 7%	0. 4%	89. 0%	1. 3%
41	85. 1%	0. 9%	83. 7%	5. 0%
56	88. 1%	4. 8%	84. 4%	16. 9%
57	83. 6%	4. 8%	94. 8%	25. 6%
31	87. 3%	2. 4%	90. 9%	7. 4%
58	90. 5%	4. 5%	82. 3%	2. 4%
59	86. 1%	4. 0%	74. 9%	1. 0%
60	88. 5%	2. 5%	79. 8%	0. 1%
61	89. 8%	2. 6%	108. 5%	14. 3%
32	87. 7%	0. 6%	77. 8%	26. 7%
62	85. 5%	0. 4%	89. 0%	20. 4%
63	90. 5%	0. 2%	90. 1%	4. 8%
64	86. 9%	0. 0%	95. 4%	28. 8%

实验

化合物 通过整合 DNA 技术, Inc. 合成硫代磷酸酯反义寡核苷酸和 HPLC 提纯 (Coralville, IA)。

电穿孔法 如例 2 所述, 在 200V 和 1200 μ F 的条件下, 与单个的寡核苷酸一起 (50 μ M), 进行 SaI/CIITA 细胞的电穿孔。在确定 MHC 类型 II 和 Ii 蛋白的数量之前, 细胞培养 24 小时。

测定结合 MHC 类型 II 蛋白质的膜 细胞与 20 μ g/ml 鼠抗小鼠 I-E^k 单克隆抗体 MS/114.15.2 一起(American Type Culture Collection, Rockville, MD)于冰上培养 60 分钟, 用 Hanks'平衡盐溶液清洗两次, 然后在室温下以 1:100 的比例用山羊抗鼠 IgG(南方生物技术协会 Inc., Birmingham, AL)的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 F(ab')₂ 稀释 30 分钟。后用溶液冲洗细胞三次, 再用 2% 甲醛水溶液于冰上固定 15 分钟。用荧光激活细胞分类器 (FACS) 分析来测定表明存在 MHC 类型 II 蛋白质的荧光细胞的百分率。

对细胞内 Ii 蛋白的测定 细胞用 2% 甲醛水溶液固定, 用 1 M 甘氨酸冲洗一次, 用包含 20 mM HEPES 和 0.2% 皂角苷的 Hanks' 缓冲盐溶液冲洗两次。细胞首先用作为杂交瘤培养上清液的鼠抗小鼠 Ii 单克隆抗体 In.1(Koch, N.等人, 《自然》299: 644-645, 1982)沾染, 清洗后与用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗鼠 IgG 的 F(ab')₂ 一起培养。细胞如上一样再被清洗和固定。用荧光激活细胞分类器 (FACS) 测定单个细胞的免疫荧光。

实施例 4 在抑制 Ii 蛋白表达上, 各种骨架修饰的相关效力

在此项研究中, 于例 3 中测定的最具活性的反义序列序列鉴定号 54 被用于比较在 Ii 蛋白表达的抑制方面各种骨架修饰的

相关效力。预备了同样序列的四种骨架修饰（表 7）：(1) 硫代磷酸酯（序列鉴定号 54），(2) 于中间的磷酸二酯和在 5'和 3'端 2'甲氧基（methyloxy）修饰的硫代磷酸酯的混合骨架（序列鉴定号 65），(3)于中间的硫代磷酸酯和在 5'和 3'端 2'甲氧基修饰的硫代磷酸酯的混合骨架（序列鉴定号 66），和 (4) 2'甲氧基修饰的磷酸二酯（序列鉴定号 67）。10 mM 和 50 mM 的每种寡核苷酸通过电穿孔法注入到 SaI/CIITA 肉瘤细胞中，然后培养 24 或 48 小时。Ii 蛋白表达的抑制水平以及作用于 MHC 类型 II 蛋白质表达的寡核苷酸的效能通过荧光激活细胞分类器（FACS）的分析来定量。如表 8 所表示的，每个都具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸序列鉴定号 54 和序列鉴定号 66 引起对 Ii 蛋白的类似的抑制而没有影响到 MHC 类型 II 的表达。其它两种有磷酸二酯骨架的寡核苷酸对 Ii 表达显示出较少的抑制。在具有和不具有寡核苷酸存在的情况下测试细胞的存活率，其显示出所有的寡核苷酸都有最小的细胞毒性作用。由于硫代磷酸酯寡核苷酸的合成消耗较低、高产和快速的更新，此类型骨架的共聚物被应用于所有的序列实验中。

表 7 有不同骨架结构的寡核苷酸序列

序列鉴定号	序列和成分
54	5' TsGsGs TsCsAs TsCsCs AsTsGs GsCsTs CsTsA 3' 所有为硫代磷酸酯。
65	5' TsGsGs TsCA TCC ATG GCsTs CsTsA 3' 2' OMe 2' OMe 第一和后 4 是硫代磷酸酯与 2'甲氧基的。中央 9 碱基是磷酸二酯。
66	5' TsGsGs TsCsAs TsCsCs AsTsGs GsCsTs CsTsA 3' 2' OMe 2' OMe 所有为硫代磷酸酯。第一和后 4 是 2 甲氧基的。
67	5' TGG TCA TCC ATG GCT CTA 3' 2' OMe 2' OMe 2' OMe 2' OMe 所有为磷酸二酯，2 为甲氧基的。

表 8 通过以不同骨架结构的反义寡核苷酸对 Ii 表达的抑制

寡核苷酸		Ii 负效细胞		I-E 负效细胞		存活率	
序列鉴定号	CONC	24 小时	48 小时	24 小时	48 小时	24 小时	48 小时
无		8.33%	25.40%	4.06%	6.46%	64.02%	45.50%
54	10 mM	20.68%	63.06%	4.76%	5.74%	66.67%	38.10%
	50 Mm	32.36%	60.16%	4.36%	6.14%	62.35%	44.90%
65	10 mM	10.56%	45.30%	3.72%	5.58%	63.86%	49.09%
	50 mM	18.84%	46.88%	3.48%	6.96%	62.79%	48.57%
66	10 mM	20.66%	62.24%	4.10%	6.26%	72.13%	44.83%
	50 mM	29.78%	62.82%	4.30%	7.46%	69.12%	47.73%
67	10 mM	7.84%	46.90%	3.90%	6.18%	61.90%	48.57%
	50 mM	8.79%	41.24%	4.36%	6.68%	66.20%	47.06%

实验

化合物 如表 7 所列，通过整合 DNA 技术，Inc. 反义寡核苷酸被合成和被 HPLC 提纯（Coralville, IA）。电造孔法、细胞培养和对细胞内 Ii 和表面 I-E 表达的荧光激活细胞分类器（FACS）测定同例 3。

实施例 5 通过逆基因构建物对 Ii 蛋白表达的抑制

在这些实验中，SaI 肉瘤细胞首先被向上调节对 MHC 类型 II 分子表达的 CIITA 反式作用因子的基因转染[Armstrong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6886(1997)]，从而产生 SaI/CIITA 细胞。几种 Ii 逆基因构建物是通过将表 9 所列与 Ii mRNA 序列相应的（已表明相应序列的编号）DNA 序列插入表达载体而制成的。

逆基因构建物然后转染到 SaI/CIITA 细胞中。通过在包含培养基的潮霉素中生长,挑选接受了表达载体的细胞。用单克隆抗体 In.1. 使细胞在细胞内被沾染从而表达 Ii。然后用荧光激活细胞分类器 (FACS) 的分析来定量这些细胞对 Ii 的表达。

在一些 mIi 逆基因构建物的转染中,可观察到 Ii 蛋白表达的抑制(上至 60%的细胞)。于表 10 中总结的数据表明,由表中所列序列鉴定号 68,序列鉴定号 71,序列鉴定号 72,序列鉴定号 75,序列鉴定号 77,序列鉴定号 78 和序列鉴定号 79 的序列制成的逆基因构建物在被处理细胞的可观的部分明显地抑制 Ii 蛋白的表达。

表 9 逆基因构建物的序列

序列鉴定号 68

-26TGTG GGAAAACTA GAGGCTAGAG CCATGGATGACCAACGCGAC
CTCATCT CTAACCATGAACAGTTGCCC ATA CTGGGCAACC
GCCCTAGAGAGCCAGAAAG77

序列鉴定号 69

32ATACTGGGCAACC GCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCCGTG
GAGCTCTGTA CACCGGTGTCTCTGTCCTGG TGG CTCTGCT
CTTGGCTG136

序列鉴定号 70

234ACCT GTGAGCCAGA
TGCGGATGGCTACTCCCTTGCTGATGCGTCCAATGT CCATG
GATAACATG CTCCTTGGGCCTGTGAAGAA CGTTACCAAG

TACGGCAACA TGACCCAGGA CCATGTGATG CATATG
CTCA368

序列鉴定号 71

314 AAGAA CGTTACCAAG TACGGCAACATGACCCAGGA
CCATGTGATG CATCTG CTCA CGAGGTCTGG
ACCCCTGGAGTACCCGCAGC TGAAGGGGAC CTTCCCAGAG
AATCTGAAGC ATCTTAAGAACTCCATGGAT
GTCGTGAACT458

序列鉴定号 72

-92GGGTCCCAGA CACACAGCAG CAGCAGCAGC
AGCAGCAGCA GCAACAGCAG CAGCAGCAGC AGCGCC
TGTG GGAAAACTA GAGGCTAGAG CCATGGATGA
CCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAACAGTTGCCCATACT
GGGCAACCGCCC TAGAGAGCCAGAAAG77

序列鉴定号 73

-2 CCATGGATGACCAACGCGAC CTCATCTCTA
ACCATGAACA GTTGCCC ATA CTGGGCAACC
GCCCTAGAGAGCCAGAAAG
gtatgtgtgaataccagcagagagcccttacctctgg
aggacacagaatgcaggcctggggaggacacagagctctgttg81 (内含子 1)

序列鉴定号 74

78GTGCAGCCGTG GAGCTCTGTA CACCGGTGTC
TCTGTCCTGG TGG CTCTGCTCT
TGGCTGGGCAGGCCACCACTGCTTACTT CCTGTACCAG
CAACAGGGCCGCCTAGAC

AAGCTGACCATCACCTCCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCT
TCGCATGAAGCTTCCG
AAATgcgtgctccacctgtccctcacctcacagacatcatttctccatttagccc
ctcccgatctgcct67 (内含子 2)

序列鉴定号 75

-92 GGGTCCCAGA CACACAGCAG
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAG
CAGCAGCAGCGCC TGTG GGAAAACTAGAGGCTAGAG
CCATGGATGACCAACGC15

序列鉴定号 76

last 13 (内含子 1) tccgtcccaacagATACTGGGCAACC
GCCCTAGAGAGCCAGAAAGGT GCAG CCGTG GAG
CTCTGTA CACCGGTGTCTCTGTCCTGG TGG CTCTGCT
CTTGGCTG136

序列鉴定号 77

-92GGGTCCCAGA CACACAGCAG CAGCAGCAGC
AGCAGCAGCA GCAACAGCAG CA GCAGCAGC AGCGCC
TGTG GGAAAACTA GAGGCTAGAG
CCATGGATGACCAACG
CGACCTCATCTCTAACCATGAACAGTTGCCCATACTGGGCA
ACCGCCCTAGAGAGCC AGAAAGGTGCAGCCGTG
GAGCTCTGTA97

序列鉴定号 78

50AACAGCAGCAGCAGCAGCAGCGCCTGTGGGAAAACTA
GAGGCTAGAGCCATGG ATGACCAACG

CGACCTCATCTCTAACCATGAACAGTTTCCCATACTGGGCAA
CCGCC CTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCCGTG
GAGCTCTGTA97

序列鉴定号 79

26TGTGGGAAAACTAGAGGCTAGAGCCATGGATGACCAAC
G CGACCTCATCTCTA
ACCATGAACAGTTGCCCATACTGGGCAACCGCC
CTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGC CGTGGAGCTCTGTA97

表 10 逆基因构建物的活性

序列鉴定号	RGC 构建物	在 Ii 基因的位置	*Ii 抑制作用
68	pcDNA3.1(+)/mIi (-26, 77)	5'UT 至第一外显子	(+)
69	pcDNA3.1(+)/mIi (32,136)	第一和第二外显子	(-)
70	pcDNA3.1(+)/mIi(234,368)	第三和第四外显子	(-)
71	pcDNA3.1(+)/mIi(314,458)	第四和第五外显子	(+)
72	pcDNA3.1(+)/mIi(-92,77)	5'UT 至第一外显子	(+)
73	pcDNA3.1(+)/mIi(-2,1 in81)	第一外显子和第一内含子	(-)
74	pcDNA3.1(+)/mIi(78,2 in67)	第二外显子和第二内含子	(-)
75	pcDNA3.1(+)/mIi(-92,15)	5'UT 和 AUG	(+)
76	pcDNA3.1(+)/mIi(1 in13,136)	第二内含子至第三外显子	(-)
77	RSV.5/MIi(-92,97)	5'UT 至第一外显子	(+)
78	RSV.5/MIi(-50,97)	5'UT 至第一外显子	(+)
79	RSV.5/Ii(-26,97)	5'UT 至第一外显子	(+)

*在用这些构建物的 SaI/CIITA 稳定转染的筛选中，Ii 抑制（上至约 60%）被观察到（+）。

实验

逆基因构建物的产生 各种 Ii 逆基因构建物是从两个质粒之一制成的。由 pcDNA3.1(+)制成的构建物 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 利用巨细胞病毒启动子启动基因的表达。由 RSV.5 制成的构建物则利用劳斯肉瘤病毒启动子 [Long 等人,《人类免疫学》31: 229-235 (1991)]。两种质粒都包含潮霉素抗性基因, 用它挑选被转染的细胞。mIi 逆基因片段是通过聚合酶链反应 (PCR) 产生的。PCR 片段被 NheI 和 ApaI 水解, 然后在用同样的核酸内切酶水解的 pcDNA3.1(+)内被克隆。mIi 逆基因片段的插入通过 NheI 和 ApaI 水解被进一步证实。PCR 片段被 Sal I 和 BamHI 水解, 然后在用同样的核酸内切酶水解的 RSV.5 质粒内被克隆。所有 mIi 片段都被序列分析进一步证实。

细胞 SaI/CIITA 细胞 (Maryland 大学, Baltimore, MD, Ostrand-Rosenberg 博士的贡献)被培养于包含 5% FCS(Fetal Clone I, HyClone Laboratories, Logan, UT) 的 IMDM (JRH 生物学, Lenexa, KS) 中。

转染 依照制造指令, 用 lipofectin (GIBCO BRL) 使 mIi 逆基因构建物转染 SaI/CIITA 细胞。简言之, 将 10 μ l lipofectin 和 3-5mg 质粒 DNA 与 100 μ l Opt.MEM I (GIBCO BRL) 分别轻轻地混合。反应保持在室温下 40 分钟。再将两种反应物轻轻地混合在一起, 在室温下保持 15 分钟。同时, 将 10⁵ SaI/CIITA 细胞用 Opt.MEM I 清洗并在 800 μ l Opt.MEM I 内重悬浮。脂质体 / DNA 反应物缓慢地在 SaI/CIITA 细胞内沉降, 然后将细胞于 37 °C 培养 12-24 小时。用 2 ml 培养基取代转染介质, 细胞被培养 24-48 小时后, 将 800 单位潮霉素 B (ICN 《药理学》, Inc., Costa Mesa, CA) 加入到于 96-井形平皿内挑选出的被转染细胞中。

荧光激活细胞分类器 (FACS) 分析 潮霉素对抗性细胞在细胞内被沾染 (见例 3 和例 4 的详述步骤) 用于表达有单克隆抗体, In.1. 的 Ii。被沾染细胞用荧光激活细胞分类器分析。

实施例 6 用 Ii 蛋白抑制的固定疫苗细胞对抗肿瘤攻击

进行了多项实验开发用 Ii 蛋白抑制的肿瘤细胞作为肿瘤细胞疫苗保护宿主免受亲代肿瘤的攻击。在这些实验中, 首先用向上调节 MHC 类型 II 分子表达的 CIITA 反式作用因子基因转染 SaI 肉瘤细胞, [Armstrong 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6886 (1997)] 从而产生 SaI/CIITA 细胞。被转染的细胞同样表达 MHC 类型 I 和 MHC 类型 II 分子。没有转染 CIITA 基因, SaI 细胞只表达 MHC 类型 I 分子。SaI/CIITA 细胞与表达 MHC 类型 II 分子一起, 也表达显著量的 Ii 蛋白。因为 CIITA 反式作用因子也作用于从 Ii 蛋白结构基因上游 (以及在第一个内含子内) 基因调节单位, 所以发生了 Ii 蛋白与 MHC 类型 II 分子的共表达 [Zhu 和 Jones, 《分子和细胞生物学》10: 3906 (1990); Moore 等人《免疫学杂志》161: 1844 (1998)]。

为了抑制 Ii 蛋白的表达用指向 Ii mRNA (序列鉴定号 54) 的反义寡核苷酸处理细胞 (表达 MHC 类型 I 分子、MHC 类型 II 分子和 Ii 蛋白)。用上面例 3 提出的方法来度量在 SaI/CIITA 细胞中 Ii 蛋白抑制的程度和 MHC 类型 II 分子缺少抑制的程度。反义寡核苷酸复合物序列鉴定号 54 在大约 35% 的 SaI/CIITA 细胞中深深地抑制了 Ii 蛋白, 而对 MHC 类型 II 分子表达的水平没有显著影响。为了防止在被接种宿主体内复制, 疫苗细胞用甲醛固定。

接受了 Ii 抑制疫苗细胞的小鼠被分成三个亚组, 每个亚组用以每只小鼠 2.5×10^5 、 7.5×10^5 和 20×10^5 个细胞的量的 SaI

肿瘤注入小鼠体内进行攻击。没有用抑制 Ii 的共聚物处理的固定 SaI/CIITA 细胞处理过的对照小鼠也用上述浓度的肿瘤细胞攻击。小鼠 6 个亚组的每一个亚组肿瘤的发病率在表 11 中表明。在第 13 天,所有的有腹水肿瘤的对照小鼠 (C) 已有 1.5-2.5 ml 的腹水而死亡。在接种 CIITA 基因转染免疫细胞的小鼠 (AS 小鼠) 中,在每只 2.5×10^5 细胞的亚组和每只 7.5×10^5 细胞的亚组,都有一只小鼠以 1.5-2.5 ml 的腹水死亡。在第 61 天,在每只 20×10^5 细胞的亚组,没有小鼠发生肿瘤。

这些观察表明,带有表达 MHC 类型 II 分子但很少或没有表达 Ii 蛋白肿瘤细胞的小鼠接种导致了保护性的肿瘤免疫。由于保护是对抗表达 MHC 类型 I 而不表达 MHC 类型 II 分子的亲代细胞,免疫是通过辅助细胞 T 来调节的,此细胞受 MHC 类型 II 分子限制,对于最后效应物的发生和杀伤 T 细胞的应答也是需要的。由于这些疫苗细胞诱导对抗具有 MHC 类型 I 正效但 MHC 类型 II 和 Ii 蛋白负效的亲代 SaI 细胞,保护是由两种 T 细胞调节的。首先,辅助 T 细胞被由没有免疫调节 Ii 蛋白的 MHC 类型 II 分子提呈的抗原决定簇刺激。其次,由于辅助 T 细胞的作用,受到 MHC 类型 I 分子限制的杀伤 T 细胞被刺激而扩增和具有活性。

表 11 在用复合物序列鉴定号 54 处理或未处理的固定的 SaI/CIITA 细胞接种的小鼠中，在用 SaI 肿瘤攻击后，肿瘤的发病率

	2.5×10^5		7.5×10^5		20×10^5	
天数	C	AS	C	AS	C	AS
9	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
11	2/5	0/5	4/5	0/5	5/5	0/5
13	2/5	0/5	4/5	0/5	5/5	0/5
15	2/5	0/5	4/5	1/5	5/5	0/5
17	2/5	0/5	4/5	1/5	5/5	0/5
19	2/5	1/5	4/5	1/5	5/5	0/5
21	2/5	1/5	4/5	1/5	5/5	0/5
31	2/5	1/5	4/5	1/5	5/5	0/5
41	2/5	1/5	4/5	1/5	5/5	0/5
61	2/5	1/5	4/5	1/5	5/5	0/5

在用序列鉴定号 54 处理（AS 指反义的亚组）或未处理的（“C”指对照的亚组）CIITA 基因转染肿瘤细胞接种的小鼠中，有等于或大于 1.5 ml 容积的肿瘤腹水的发病率都有记录。

实验

转染 CIITA 基因转染 SaI 细胞是用 50 μ M 复合物序列鉴定号 54 以 2×10^6 /ml 个细胞被培养的，并在 200V, 1200 μ fd 用 BTX ECM 600 电造孔系统被电造孔。然后细胞被培养于有 5% 牛胎儿血清的 IMDM 培养基中，培养 20 小时，后又对蛋白表达和固定进行免疫荧光分析。

固定 在室温下，于 pH7.2 的磷酸缓冲盐溶液中，用 0.15% 甲醛固定细胞 15 分钟并清洗。

接种 以每只小鼠 2.5×10^5 细胞的量将疫苗细胞注射于 15 只小鼠的腹膜内。用没有经过序列鉴定号 54 的共聚物处理的 SaI/CIITA 细胞注射于平行组的 15 只小鼠体内。

肿瘤攻击 在 27 天后，用经序列号 54 处理过的 SaI/CIITA 细胞接种的三个亚组（每个亚组中有 5 只小鼠）中的小鼠，以三种剂量的 SaI 亲代细胞对其进行攻击：分别为 2.5×10^5 、 7.5×10^5 和 20×10^5 个细胞。在平行组，用未经序列鉴定号 54 处理的固定的 SaI/CIITA 细胞接种的三个亚组的小鼠也分别以同样的三种剂量的 SaI 亲代细胞对其进行攻击。在前面的实验中，三种攻击使用的剂量决定了滴定细胞剂量/肿瘤死亡率曲线。

实施例 7 用 Ii 蛋白抑制的和被辐射的疫苗细胞对抗肿瘤攻击

此例实验与例 6 的方略是类似的，但主要有两个要素除外。首先，是在干扰素 γ 基因转染之后而不是在 CIITA 基因转染之后，MHC 类型 II 分子和 Ii 蛋白被诱导于 SaI 细胞。其次，疫苗细胞的存活率是通过辐射维持，而恶性能力（复制能力）被破坏。

优选通过干扰素的作用而不是 CIITA 来诱导 MHC 类型 II 分子有几个实际的科学和经济的理由。例如，干扰素 γ 的作用可以诱导另外的与肿瘤相关的抗原决定簇的适当加工和提呈所需要的功能。除此之外，允许肿瘤细胞在导入宿主后继续生活（没有复制）一些时间也是考虑了其有利的性质，例如，根据抗原决定簇的持续暴露、累积抗原剂量、免疫系统多数辅助和效应细胞相互作用的时期。

在这些实验中，SaI 肉瘤是通过带有插入 pGKNeo 质粒内的干扰素 γ 基因的电穿孔技术来转染的[Chen 和 Ananthaswamy, 《免疫学杂志》151: 244-255 (1993)]。起始选择量是 800 $\mu\text{g/ml}$ G418, 维持量是 400 $\mu\text{g/ml}$ G418。干扰素 γ 产生的细胞是通过有限的稀释液的培养和克隆群体的扩增来选择的, 此克隆群体是通过有用可见免疫荧光法从 ATCC 杂交瘤 T1B120 得到的 5/114.15.2 单克隆抗体的 MHC 类型分子表面表达来鉴定的。

制备了两种类型的疫苗保护细胞群: 1) 用序列鉴定号 54 共聚物转染抑制 I 蛋白表达的细胞, 和 2) 未转染的细胞。与 50 μM 共聚物序列鉴定号 54 一起, 以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 个细胞培养 CIITA 基因转染 SaI 细胞, 并在 200V、1200 μfd 下, 于 BTX ECM 600 电穿孔系统进行电穿孔。随后, 将细胞培养于有 5% 牛胎儿血清的 IMDM 培养基中 24 或 48 小时, 以后用对蛋白质表达或疫苗制备进行免疫荧光分析。接种之前, 细胞要在铯辐照器中接受 3500 拉德 (rads) 的辐射。

以每剂 2×10^6 个细胞的剂量, 将三种类型的受辐射的和经干扰素 γ 基因转染的细胞注射于小鼠体内: 1) 干扰素 γ 基因转染细胞 (在表 12 中的 “C”), 2) 用复合物序列鉴定号 54 处理后培养 24 小时的干扰素 γ 基因转染细胞, 因而致使在约 34% 的细胞中 Ii 蛋白受到抑制, 对 MHC 类型 II 分子没有作用 (在表 12 中的 “AS-24”), 3) 用复合物序列鉴定号 54 处理后培养 48 小时的干扰素 γ 基因转染细胞, 因而致使在约 45% 的细胞中 Ii 蛋白受到抑制, 对 MHC 类型 II 分子没有作用 (在表 12 中的 “AS-48”)。

在 24 小时后, 使每个接种组小鼠的亚组受到三个水平之一的 SaI 肉瘤细胞的攻击: 2×10^6 、 5×10^6 或 12.5×10^6 个细胞 (表 12)。在第 11 天对照亚组的 0/4、2/4 和 4/4 发生了 2-3 ml 腹水

并在第 13 天死亡。对于 AS-24 和 AS-48 小鼠在表 12 中报告的结果表示了以大于 2 ml 腹水的小鼠死亡的数据。在第 31 天，存活的小鼠没有恶性肿瘤的证据。

这些结果表明，通过用“工程”衍生的在其中 Ii 蛋白受到抑制而 MHC II 类型分子得到表达的肿瘤细胞接种，产生了对 MHC 类型 I 正效而对 MHC 类型 II 负效的亲代细胞有效的肿瘤保护性对抗。这也表明，在不存在 Ii 蛋白情况下由 MHC 类型 II 分子提呈的扩增的全部“辅助”决定簇引起了抗肿瘤应答的增强。

表 12 在用有固定的干扰素 γ 基因转染的经过或未经复合物序列鉴定号 54 处理的 SaI 细胞接种的小鼠中，以 SaI 肿瘤攻击后的肿瘤发病率。

	2×10^6			5×10^6			12.5×10^6		
天数	C	AS-24	AS-48	C	AS-24	AS-48	C	AS-24	AS-48
9	0/4	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5	0/4	0/5	0/5
11	0/4	0/4	0/5	2/4	0/5	0/5	4/4	0/5	0/5
13	0/4	0/4	0/5	2/4	0/5	0/5	4/4	0/5	0/5
15	0/4	0/4	0/5	2/4	0/5	0/5	4/4	0/5	0/5
17	0/4	0/4	0/5	2/4	0/5	0/5	4/4	0/5	0/5
19	0/4	0/4	0/5	3/4	0/5	0/5	4/4	0/5	0/5
21	0/4	1/4	0/5	3/4	3/5	3/5	4/4	1/5	2/5
24	0/4	1/4	0/5	3/4	3/5	4/5	4/4	1/5	2/5
29	0/4	1/4	0/5	3/4	3/5	4/5	4/4	1/5	2/5
31	0/4	1/4	0/5	3/4	3/5	4/5	4/4	1/5	2/5

序 列 表

<110> 徐民桢
丘刚
罗伯特·汉弗莱斯

<120> 癌细胞疫苗

<130> U.S. Application 09/205,995, (CIP)

<140> PCT/US99/28096

<141> 1999-11-24

<150> 09/205,995

<151> 1998-12-04

<150> 09/036,746

<151> 1998-03-09

<150> 08/661,627

<151> 1996-06-11

<160> 79

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the Ii gene.

<400> 1

ggatcatccat ggctc

15

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 2

atccatggct ctagcctc

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 3

tctagcctct agtttttc

18

<210> 4

<400> 4

000

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 5

catgttatcc atggacat

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 6

catggacatt ggacgcat

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 7

tggacgcatc agcaaggg

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 8

cagcaaggga gtagccat

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 9

agtagccatc cgcattctg

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 10

ccgcatctgg ctcacagg

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 11

gctcacaggt ttggcaga

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 12

tttggcagat ttcggaag

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 13

tttcggaagc ttcattgacg

18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 14
cttcattgacg aggtctctc

18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 15
aaggtctctcc agttgcag

18

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 16
cagttgcagg ttctggga

18

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 17
gttctgggag gtgatggt 18

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 18
ggtgatggtc agcttgtc 18

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 19
cagcttgctc aggcggcc 18

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 20
taggcggccc tgttgctg 18

<210> 21
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 21
ctgttgctgg tacaggaa 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 22
gtacaggaag taagcagt 18

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 23
gtaagcagtg gtggcctg 18

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 24

ggtggcctgc ccagccaa

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 25

cccagccaag agcagagc

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 26

gagcagagcc accaggac

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 27

caccaggaca gagacacc

18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 28
agagacaccg gtgtacag 18

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 29
ggtgtacaga gctccacg 18

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 30
agctccacgg ctgcacct 18

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 31
gctgcacctt tctggctc 18

<210> 32
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 32
ttctggctct ctagggcg 18

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 33
tctagggcgg ttgccag 18

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 34
gttgcccagt atgggcaa 18

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 35

tatgggcaac tgttcatg

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 36

ctgttcatgg ttagagat

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 37

gttagagatg aggtcgcg

18

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 38

gaggtcgcg tggtcac

18

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 39
gcggttggtca tccatggc 18

<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 40
ttggtcatcc atggctct 18

<210> 41
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 41
gtcatccatg gctctagc 18

<210> 42
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 42
cacaggcgct gctgctgc 18

<210> 43
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 43
atccatggct ctagccct 18

<210> 44
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 44
tctagcccta gtttttcc 18

<210> 45
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 45
agtttttccc acaggcgc 18

<210> 46
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 46

atgggatgacc aacgcgac

18

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 47

ctagtttttc ccacaggc

18

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 48

ctgctgctgt tgctgctg

18

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 49

gtcgcgttgg tcatccat

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 50
tcgcgttggt catccatg 18

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 51
cgcgttgggtc atccatgg 18

<210> 52
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 52
cgttgggtcat ccatggct 18

<210> 53
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 53
gttgggtcatc catggctc 18

<210> 54
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 54
tggtcatcca tggctcta 18

<210> 55
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 55
ggcatccat ggctctag 18

<210> 56
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 56
cacggctgca cctttctg 18

<210> 57
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 57

cggtgcacc tttctggc

18

<210> 58
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 58
tgcacctttc tggctctc

18

<210> 59
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 59
cacctttctg gctctcta

18

<210> 60
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 60
acctttctgg ctctctag

18

<210> 61
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 61
ctttctggct ctctaggg 18

<210> 62
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 62
ctggctctct agggcggt 18

<210> 63
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 63
ggctctctag ggcggttg 18

<210> 64
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: antisense oligonucleotide corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 64
gacaagcttg gctgagca 18

<210> 65
<400> 65

000

<210> 66
<400> 66
000

<210> 67
<400> 67
000

<210> 68
<211> 103
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 68
tgtgggaaaa actagaggct agagccatgg atgaccaacg cgacctcatc tctaaccatg 60
aacagttgcc catactgggc aaccgcccta gagagccaga aag 103

<210> 69
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 69
atactgggca accgccctag agagccagaa aggtgcagcc gtggagctct gtacaccggt 60
gtctctgtcc tgggtggctct gctcttggt g 91

<210> 70
<211> 134
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

```

<400> 70
acctgtgagc cagatgcgga tggctactcc cttgctgatg cgtccaatgt ccatggataa 60
catgctcctt gggcctgtga agaacgttac caagtacggc aacatgaccc aggaccatgt 120
gatgcatctg ctca                                     134

```

```

<210> 71
<211> 145
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region
of the mouse Ii gene.

```

```

<400> 71
aagaacgtta ccaagtacgg caacatgacc caggaccatg tgatgcatct gtcacgagg 60
tctggacccc tggagtaccc gcagctgaag gggaccttcc cagagaatct gaagcatctt 120
aagaactcca tggatggcgt gaact                                     145

```

```

<210> 72
<211> 169
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region
of the mouse Ii gene.

```

```

<400> 72
gggtcccaga cacacagcag cagcagcagc agcagcagca gcaacagcag cagcagcagc 60
agcgccctgtg ggaaaaacta gaggctagag ccatggatga ccaacgcgac ctcatctcta 120
accatgaaca gttgcccata ctgggcaacc gccctagaga gccagaaag          169

```

```

<210> 73
<211> 160
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region
of the mouse Ii gene.

```

```

<400> 73
ccatggatga ccaacgcgac ctcatctcta accatgaaca gttgcccata ctgggcaacc 60
gccctagaga gccagaaagg tatgtgtgaa taccagcaga gagcccttac ctctggagga 120

```

cacagaatgc aggcctgggg agggacacag agctctgttg

160

<210> 74
<211> 237
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 74
gtgcagccgt ggagctctgt acaccggtgt ctctgtcctg gtggctctgc tcttggctgg 60
gcaggccacc actgcttact tctgtacca gcaacagggc cgcttagaca agctgaccat 120
cacctcccag aacctgcaac tggagagcct tcgcatgaag cttccgaaat gtgcgtgctc 180
cacctgtccc tcacctcaca gacatcattt ctccatttag cccctcccga tctgcct 237

<210> 75
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 75
gggtcccaga cacacagcag cagcagcagc agcagcagca gcaacagcag cagcagcagc 60
agcgctgtg ggaaaaacta gaggctagag ccatggatga ccaacgc 107

<210> 76
<211> 104
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 76
tccgtcccaa cagatactgg gcaaccgccc tagagagcca gaaagggtgca gccgtggagc 60
tctgtacacc ggtgtctctg tcctggtggc tctgctcttg gctg 104

<210> 77

<211> 190
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 77
gggtcccaga cacacagcag cagcagcagc agcagcagca gcaacagcag cagcagcagc 60
agcgctgtg ggaaaaacta gaggctagag ccatggatga ccaacgcgac ctcattctcta 120
accatgaaca gttgcccata ctgggcaacc gccctagaga gccagaaagg tgcagccgtg 180
gagctctgta 190

<210> 78
<211> 148
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 78
aacagcagca gcagcagcag cgctgtggg aaaaactaga ggctagagcc atggatgacc 60
aacgcgacct catctctaac catgaacagt tgccataact gggcaaccgc cctagagagc 120
cagaaagggtg cagccgtgga gctctgta 148

<210> 79
<211> 124
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: Reverse gene construct corresponding to a specific region of the mouse Ii gene.

<400> 79
tgtgggaaaa actagaggct agagccatgg atgaccaacg cgacctcatc tctaaccatg 60
aacagttgcc catactgggc aaccgcccta gagagccaga aaggtgcagc cgtggagctc 120
tgta 124