

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/00

C07K 14/74 C12N 15/09

C12N 15/12

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98810746.5

[43]公开日 2000 年 12 月 27 日

[11]公开号 CN 1278183A

[22]申请日 1998.10.13 [21]申请号 98810746.5

[30]优先权

[32]1997.10.29 [33]US[31]08/960,190

[86]国际申请 PCT/US98/21520 1998.10.13

[87]国际公布 WO99/21572 英 1999.5.6

[85]进入国家阶段日期 2000.4.28

[71]申请人 苏诺尔分子公司

地址 美国佛罗里达州

[72]发明人 P·R·罗德 J·阿塞维多

M·布克哈特 焦进安 黄庆祥

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 黄革生

权利要求书 5 页 说明书 96 页 附图页数 26 页

[54]发明名称 可溶性 MHC 复合体及其使用方法

[57]摘要

本发明涉及主要组织相容性复合体(MHC)分子的新复合体及这些复合体的用途。一方面,本发明涉及包括有Ⅱ类β2链修饰,如删除了基本上整个Ⅱ类β2链的单链MHCⅡ类复合体。另一方面,本发明描述了含免疫球蛋白恒定链或片段的单链MHCⅡ类复合体的特征。本发明进一步提供了含至少一个单链MHCⅡ类分子的多特异性MHC复合体。本发明的MHC复合体可用于多种应用中,包括:1)鉴定和分离可调节所选T细胞之活性的肽,包括是T细胞受体拮抗剂和部分激动剂的肽的体外筛选,及2)抑制或诱导哺乳动物体内免疫应答的方法。

ISSN 1000-4274

权 利 要 求 书

1. 含有肽结合沟和具有至少一个氨基酸取代或缺失的 II 类 $\beta 2$ 链的空 sc-MHC II 类分子。

2. 权利要求 1 的空 sc-MHC II 类分子，其中还含有免疫球蛋白轻链恒定区或其片段。

3. 含肽结合沟和共价连接的免疫球蛋白轻链恒定区或片段的空 sc-MHC II 类分子。

4. 通过在呈递肽和空 sc-MHC 分子之间能形成复合体的条件下，使呈递肽与权利要求 1、2、或 3 的空 sc-MHC II 类分子接触而产生的有负载 sc-MHC 分子。

5. 含有重组融合的呈递肽和具有至少一个氨基酸取代或缺失的 II 类 $\beta 2$ 链的 sc-MHC II 类融合蛋白质。

6. 权利要求 5 的 sc-MHC II 类融合蛋白质，其中还含有免疫球蛋白轻链恒定区或其片段。

7. 含有重组融合的呈递肽和共价连接的免疫球蛋白轻链恒定区或片段的 sc-MHC II 类融合蛋白质。

8. 含肽结合沟的空 sc-MHC II 类分子，其中所述分子包含依次共价连接的：

- a) MHC II 类 $\beta 1$ 链或其呈递肽结合部分，
- b) 具有至少一个氨基酸取代或缺失的 II 类 $\beta 2$ 链，
- c) 肽接头序列，和
- d) MHC II 类 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 链或其呈递肽结合部分。

9. 权利要求 8 的空 sc-MHC II 类分子，其中的 II 类 $\beta 2$ 链氨基酸缺失是基本上整条 II 类 $\beta 2$ 链的缺失。

10. 权利要求 9 的空 sc-MHC II 类分子，其中还含有共价连接至 MHC II 类 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 链或其呈递肽结合部分的免疫球蛋白轻链恒定区片段。

11. 含肽结合沟的空 sc-MHC II 类分子，其中所述分子包括依次



共价连接的:

- a) MHC II 类 $\beta 1$ $\beta 2$ 链或其呈递肽结合部分,
- b) 肽接头序列,
- c) MHC II 类 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 链或其呈递肽结合部分, 和
- d) 免疫球蛋白轻链恒定区片段。

12. 权利要求 11 的空 sc-MHC II 类分子, 其中所述免疫球蛋白轻链恒定区片段是鼠或人的 C_κ 链。

13. 权利要求 11 的空 sc-MHC II 类分子, 其中所述免疫球蛋白轻链恒定区片段是鼠或人的 C_λ 链。

14. 通过在呈递肽和空 sc-MHC II 类分子之间能形成复合体的条件下, 使呈递肽与权利要求 8 或 11 的空 sc-MHC II 类分子接触而产生的有负载 sc-MHC 分子。

15. 含肽结合沟的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述 sc-MHC II 类融合分子含有依次共价连接的:

- a) 呈递肽,
- b) MHC II 类 $\beta 1$ 链或其呈递肽结合部分,
- c) 具有至少一个氨基酸取代或缺失的 MHC II 类 $\beta 2$ 链,
- d) 肽接头序列; 和
- e) MHC II 类 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 链或其呈递肽结合部分。

16. 权利要求 15 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述 II 类 $\beta 2$ 链缺失包括 II 类 $\beta 2$ 链中至少 2、5、10、25、50、60、70、80、90 或更多氨基酸的缺失。

17. 权利要求 16 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述 II 类 $\beta 2$ 链氨基酸缺失是基本上整条 II 类 $\beta 2$ 链的缺失。

18. 权利要求 15 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述 II 类 $\beta 2$ 链取代包括 II 类 $\beta 2$ 链中 2、5、10、25、50、60、70、80、90 或更多氨基酸的取代。

19. 权利要求 18 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述 II 类 $\beta 2$ 链取代包含 Cys¹¹⁷ 至 Ser¹¹⁷ 的取代。



20. 权利要求 15 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中还含有共价连接至 MHC II 类 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 链或其呈递肽结合部分的免疫球蛋白轻链恒定区片段。

21. 含肽结合沟的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述融合分子含有依次共价连接的:

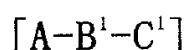
- a) 呈递肽,
- b) MHC II 类 $\beta 1$ $\beta 2$ 链或其呈递肽结合部分,
- c) 肽接头序列,
- d) MHC II 类 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 链或其呈递肽结合部分, 和
- e) 免疫球蛋白轻链恒定区(Ig-C_L)或片段。

22. 权利要求 21 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述免疫球蛋白轻链恒定区片段是鼠或人的 C_λ 链。

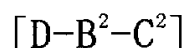
23. 权利要求 21 的空 sc-MHC II 类分子, 其中所述免疫球蛋白轻链恒定区片段是鼠或人的 C_λ 链。

24. 权利要求 22 或 23 的 sc-MHC II 类融合分子, 其中所述免疫球蛋白轻链恒定区(Ig-C_L)片段长度约在 80—130、90—120 或 100—110 个氨基酸之间。

25. 含有下式之 sc-MHC 类的空多特异性 MHC 复合体:



||



其中,

- a) A 代表至少 1 个空 sc-MHC II 类分子,
- b) B₁、B₂ 各自独立地是相同或不同的连接分子,
- c) C₁、C₂ 各自独立地是相同或不同的效应分子或是-H; 和
- d) D 代表至少 1 个空 sc-MHC II 类分子、配基结合分子或-H。

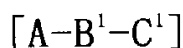
26. 包括含肽结合沟之空 sc-MHC II 类分子的多特异性 MHC 复合体, 该复合体用式 A-B-C、B-A-C 或 A-C-B 表示, 其中 A 是至少一个 sc-MHC II 类分子, B 是连接分子而 C 是效应分子或-H, 条件是当复合



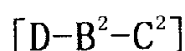
体由 A-C-B 表示时, -C-不是-H。

27. 通过在呈递肽和至少一个空 sc-MHC II 类分子之间能形成特异结合复合体的条件下使呈递肽与权利要求 25 或 26 的多特异性 MHC 复合体接触而形成的有负载多特异性 MHC 复合体。

28. 包含具有肽结合沟之 sc-MHC 分子的多特异性 MHC 复合体融合分子, 该复合体用下式表示:



||



其中,

- a) A 代表至少一个含有重组融合呈递肽的 sc-MHC II 类分子,
- b) B₁、B₂各自独立地是相同或不同的连接分子,
- c) C₁、C₂各自独立地是相同或不同的效应分子或是-H; 和
- d) D 代表至少一个含重组融合呈递肽的 sc-MHC II 类分子、配基结合分子或是-H。

29. 包含具有肽结合沟之 sc-MHC II 类分子的多特异性 MHC 融合分子, 该复合体用式: A-B-C、B-A-C 或 A-C-B 表示, 其中 A 是至少一个含重组融合呈递肽的 sc-MHC II 类分子, B 是连接分子而 C 是效应分子或-H, 条件是当复合体由式 A-C-B 表示时, -C-不是 H。

30. 编码权利要求 1、3、5 或 7 之 sc-MHC II 类分子的 DNA 区段。

31. 编码权利要求 22 和 26 之多特异性 MHC 分子至少一部分的 DNA 区段。

32. 含权利要求 27 之 DNA 区段的 DNA 载体。

33. 含权利要求 29 之 DNA 区段的 DNA 载体。

34. 制备具有 β 2 II 类链修饰之 sc-MHC II 类分子的方法, 该方法包括:

- a) 提供含 DNA 载体的细胞, 其中该 DNA 载体包括编码具有 β 2 II 类链修饰的 sc-MHC II 类分子之 DNA 序列,
- b) 在允许 sc-MHC II 类分子表达的条件下在培养基中培养细胞;



并

c) 从细胞或培养基中纯化 sc-MHC II 类分子。

35. 权利要求 34 的方法，其中具有 $\beta 2$ II 类链修饰的 sc-MHC II 类分子是权利要求 1、3、5 或 7 中所述的 sc-MHC II 类分子。

36. 制备多特异性 MHC II 类复合体的方法，该方法包括：

a) 提供含一种或多种 DNA 载体的细胞，该载体含编码多特异性 MHC 复合体或其能特异结合连接分子的部分的 DNA 序列，

b) 在允许多特异性 MHC 分子表达的条件下于培养基中培养细胞；

并

c) 从细胞或培养基中纯化多特异性 MHC 分子。

37. 抑制哺乳动物内免疫应答的方法，包括给哺乳动物施用有效量的权利要求 4、5、7、17 或 28 的 sc-MHC 复合体。



说明书

可溶性 MHC 复合体及其使用方法

发明背景

1. 发明领域

本发明涉及主要组织相容性复合体 (MHC) 分子的新复合体和表达方法及这些复合体的使用。例如，一方面，本发明涉及包括被修饰的 II 类 $\beta 2$ 链的 MHC II 类分子。另一方面，本发明涉及包括共价连接的免疫球蛋白恒定区的 I 类和 II 类 MHC 复合体。本发明还涉及多特异性 MHC 复合体，以及表达和纯化 MHC 复合体的方法。本发明的 MHC 复合体可用于多种应用中，包括筛选能在体外和体内调节 T-细胞活性的肽。

2. 背景

由抗原性肽引起抗原特异的 T-细胞应答。

肽通常作为识别和应答外来抗原之免疫系统机制的一部分而结合于 MHC 的结合沟中。结合的抗原性肽与 T-细胞受体相互作用并调节免疫应答。抗原性肽通过非共价方式结合于由多态性氨基酸残基组成的特殊“结合口袋”中。

天然存在的 MHC II 类分子是由 α 和 β 链组成的杂二聚糖蛋白。这些分子的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 结构域一起折叠形成肽结合沟。抗原性肽通过肽上的锚定氨基酸和 $\alpha 1$ 及 $\beta 1$ 结构域之间的相互作用与 MHC 分子结合。对与流感病毒肽结合的人 II 类 HLA-DR1 复合体的晶体学分析表明，结合肽的 N-和 C-末端从结合沟中伸出，使得肽的 C-末端靠近 β 链的 N-末端。参阅如 J. Brown 等人，自然，364: 33(1993); L. Stern 等人，自然，368: 215(1994)。MHC I 类和 II 类分子有不同的结构域组成。参阅如 A. Rudensky 等人，自然，353: 622(1991)。有关 MHC 分子的讨论也参阅美国专利 5,284,935; 5,260,422; 5,194,425; 5,130,297; WO 92/18150; WO 93/10220 和 WO 96/04314。



尤其是, J. Brown 等人(出处同前)已报道 MHC II 类 β 2 链在 MHC II 类复合体的正确折迭中起关键作用。

α 和 β 链跨膜结构域在 MHC 分子的装配和/或胞内运输中起重要作用。例如, TM 结构域中的氨基酸改变会导致缺陷 MHC 分子。MHC α 和 β 链跨膜和胞质结构域已公开。参阅 P. Cosson 等人, 科学, 258: 659(1992); W. Wade 等人, 免疫学, 32: 433(1995); H. Kozono 等人, 自然, 369: 151(1994)及 J. Brown 等人(出处同前)。

与抗原性肽复合的 MHC 分子可通过几种不同机制诱导选择性免疫抑制。参阅如 J. Guery 等人, 免疫学评述(Critical Reviews in Immunology), 13(3/4): 195(1993)。

更特别的是, 已报道如果抗原呈递细胞还运送共刺激信号, 则抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)表面的肽-MHC 复合体将只诱导对 MHC 结合肽特异的 T-细胞系的克隆扩充。一种推荐的方法利用了对 T-细胞激活的这种要求, 并报道了通过在缺乏共刺激信号条件下与结合于 MHC 分子上的抗原性肽相互作用, 可抑制 T-细胞的发育。参阅 M. Nicolle 等人, 临床研究杂志(J. Clin. Invest.), 93: 1361—1369(1994); 和 S. Sharma 等人, 美国国家科学院院报, 88: 11465—11469(1991)。

另一推荐方法包括用含结合肽的 MHC 分子抑制 T-细胞发育。结合肽可以是 T-细胞受体(TCR)的拮抗剂或不完全激动剂。参阅 B. Evavold 等人, 今日免疫学, 14(12): 602—609(1993)。

已尝试对 TCR 结合的抗原性肽进行修饰, 以检查出负责特异 T-细胞应答的残基。确定抗原性肽中这样的“活化”氨基酸将有助于了解有可能充当 TCR 激动剂或拮抗剂起作用的那些氨基酸序列。参阅 Evavold, B. 等人, 见上文。

推测在确定与 MHC 分子结合之多种抗原性肽的性质的基础上可开发新疫苗。参阅 Chicz 等人, 今日免疫学, 15(4): 155—160(1994)。

前面的研究已显示 MHC II 类杂二聚体分子能结合外源肽。然而, MHC II 类链经常解离。在分散状态下, MHC II 类链有可能不适于结合



呈递肽。参阅 Stern, L. J. 和 D. C. Wiley, 细胞 68: 465 (1992); Scheirle, A. B. 等人, 免疫学杂志 149: 1994 (1992); Kozano H. 等人, 自然 369: 151 (1994)。

为获得完全可溶并有功能的 MHC 复合体已进行多种尝试。例如, 在某方法中, 用包括暴露于蛋白水解酶、盐和/或去污剂之类粗糙介质中的生化技术从细胞中已分离了 MHC 复合体。这些介质经常必须通过透析或结合反应除去。参阅如, J. M. Turner 等人, 生物化学杂志 252: 7555 (1977); T. A. Springer 等人, PNAS (美国) 73: 2481 (1976)。

然而, 对于大量分离完全可溶并有功能的 MHC 复合体, 这些方法经常不是最适宜的。

能调节 T-细胞活性的很有用的 MHC I 类和 II 类复合体及制备复合体的方法已公开于 PCT 申请公开号 WO 96/04314 (1995 年 7 月 31 日提出申请) 中。所公开的 MHC 复合体通常结合特异性肽配基。

发明概述

本发明涉及完全可溶并有功能的新 MHC I 类和 II 类复合体, 如空单链 MHC II 类复合体, 有负载的单链 MHC II 类复合体, 单链 MHC II 类肽融合复合体, 多特异性单链 MHC II 类复合体 (空的、有负载的, 或包括融合肽的) 及这些复合体的使用。

总的说来, 我们已发现, 通过将免疫球蛋白轻链恒定区融合至 MHC 复合体上, 能促进 MHC 复合体的可溶性表达。我们还发现, 通过修饰 MHC II 类复合体的 II 类 β 链, 包括删除整个 II 类 β 链, 可促进 MHC 复合体的可溶性表达。

我们以前在 PCT 申请公开号 WO 96/04314 及 PCT 申请公开号 WO 97/28191 (1996 年 1 月 31 日提出申请) 中公开了非常有用的单链 (“sc-”) MHC I 类和 II 类复合体, 其中每一篇均全部在此引用作为参考。所公开的 sc-MHC I 类和 II 类复合体包括重组融合了呈递肽的 sc-MHC 分子 (sc-MHC 肽融合分子)、空 sc-MHC 分子 (未重组融合呈递肽) 及有负载的 sc-MHC 复合体 (包括非共价结合的呈递肽)。

我们已发现, 通过融合免疫球蛋白轻链恒定区 (即 Ig-C_L) 和/或修

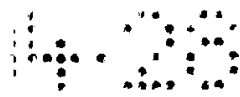
饰 II 类 sc-MHC 分子中的 $\beta 2$ 链, 有可能促进前面公开的 sc-MHC I 类和 II 类分子的可溶性表达。Ig-C_L 融合包括将 Ig-C_L 链或其合适片段加到 sc-MHC I 类或 II 类复合体上。II 类 $\beta 2$ 链修饰包括删除、取代或添加氨基酸到 II 类 $\beta 2$ 链上, 包括删除整个 II 类 $\beta 2$ 链。Ig-C_L 融合及 II 类 $\beta 2$ 链修饰增强了 sc-MHC 分子的可溶性表达, 且不显著影响 sc-MHC 分子的特异结合活性。

本发明进一步提供了新的多特异性 MHC 复合体。这些复合体通常包括一个或多个 sc-MHC I 类或 II 类分子、一个或多个配基结合分子、一个或多个连接分子及一个或多个可选择的效应分子。如此处所用, 术语“配基结合分子”包括免疫球蛋白、免疫球蛋白衍生的单链分子及受体配基。选择复合体的 sc-MHC 和配基结合分子部分以特异结合预期的靶结构, 并在一个 MHC 复合体内提供潜在的多结合特异性。如果期望, 通过下文详述的 Ig-C_L 融合和/或 II 类 $\beta 2$ 链修饰, 可在多种细胞类型中促进完全有功能之多特异性 MHC 复合体的可溶性表达。

术语“本发明的 MHC 复合体”或相关术语用于此处以表示本文及 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中公开的 sc-MHC I 类和 II 类分子, 该 sc-MHC 分子包括本文所提供的被修饰 II 类 $\beta 2$ 链和/或融合的 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段。该术语还包括以具有或不具有被修饰 II 类 $\beta 2$ 链和/或融合 Ig-C_L 链或 Ig-C_L 链片段形式提供的多特异性 MHC 复合体。

本发明的 MHC 复合体在体外和体内有许多用途。

例如, 本发明的 MHC 复合体可用于检测和分析诸如肽之类的多种配基。尤其是, MHC II 类复合体也可供诸如检测有致病性质的 T-细胞的诊断目的使用。MHC 复合体另外可用于功能性细胞和分子试验中, 用于结构分析中, 包括 X-射线晶体学、核磁共振成像、诸如计算机图解显示之类的计算技术。很显然, 预期 MHC 复合体的单链形式和增强的可溶性表达可简化数据收集和分析的数个方面。MHC 复合体也可用于筛选中以鉴定和分离 TCR 和/或 MHC 激动剂及拮抗剂, 尤其是可抑制天然 TCR 和 MHC 复合体间相互作用的小分子。另外, 有多种已知技术



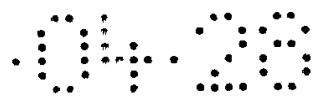
可用于筛选能够阻断本发明 MHC 复合体和 TCR 或 MHC 复合体特异性抗体间相互作用的小分子。

本发明的 MHC 复合体在体内有重要的用途。例如，这些复合体可用于对抗诸如免疫相关失调或疾病中所涉及的那些致病性抗原呈递细胞 (APC)；或用于免疫哺乳动物，如人，以抵抗如存在于 APC 表面并执行或协助其它分子执行致病或其它有害功能的细胞外区域之类的 MHC 结构。尤其是，可利用本发明的 MHC II 类复合体，按如下述之类的免疫方法制备抗体。由可用于治疗策略的方法产生的抗体设计用来调节体内免疫应答，如通过抑制或减少识别预期抗原的特异 APC 的数目而调节。尤其是，可选择特异结合 MHC 表位的单克隆抗体，以便能靶向、并优选清除掉免疫失调或疾病或其他病理学中所涉及的限制性 APC 亚型或群体。如下文将更完整叙述的，APC 或其结合抗体可以是未修饰的，或若期望，还可与药物、毒素、放射性核素或其他试剂如酶之类共价连接。

另外，本发明的 MHC 复合体可用于筛选免疫细胞，如体外表达预期靶结构的 T-细胞。它已被用于多种环境中，以获得和增殖表达如细胞受体糖蛋白、脂蛋白、脂类、糖脂及碳水化合物之类靶结构的所选 T-细胞。显然，本发明的一个多特异性 MHC 复合体可用于选择表达多种靶结构的细胞。

用于本文中时，术语“呈递肽”指例如用下文公开试验所测定能调节 T-细胞受体活性的肽，这种调节或者是诱导 T-细胞增殖，抑制或钝化 T-细胞发育，这些试验依次包括以下步骤：培养 T-细胞使其增殖、用本发明的 MHC 复合体 (带有融合的或非共价结合的肽) 接触 T-细胞并随后评估是否复合体抑制了 T-细胞的进一步发育。

术语“空的”用于此处时，是指缺乏共价或非共价结合的呈递肽的本发明 MHC 复合体。典型的空 MHC 复合体包括由一条多肽链组成的空 II 类 MHC 复合体，而非多个多肽的复合体。空 MHC 复合体的另一例子是包括含融合多肽之一或多个 sc-MHC II 类分子的空多特异性 II 类 MHC 复合体。空 MHC 复合体包括能特异结合肽的肽结合沟或裂缝。

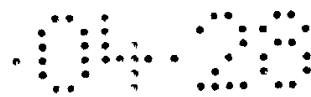


术语“有负载的”用于此处时，指含有与 MHC 复合体的肽结合沟或裂缝非共价结合之呈递肽的本发明空 MHC 复合体。非共价结合比较合适的是通过呈递肽和空 MHC 复合体的肽结合沟或裂缝之间稳定的氢键发生的结合。非共价结合可在体外或体内进行。有负载之 MHC 复合体的例子是由多肽单链而非多肽复合体组成的有负载 sc-MHC II 类复合体。

本发明的 MHC 复合体具有显著的优势。例如，如上文所提及，所提供的被修饰 II 类 $\beta 2$ 链和/或 Ig-C_L 链可促进复合体的可溶性表达。因此，MHC 复合体的生产和使用受到了积极的影响。此外，关于含预期呈递肽(负载的，或共价连接的)的 MHC 复合体，早期的实践要求从抗原呈递细胞中纯化出有负载的 MHC 分子。这些有负载的肽通常被紧密地结合，并且不能用目的肽有效地交换。相反，MHC 复合体可包含能容易地从表达细胞中大量分离的单个抗原性肽。通过使用这些 MHC 复合体，将促进与 T-细胞受体相互作用的分析。另外，因为肽中只有少数氨基酸(约 4—6 个)对于与特定 MHC 分子的结合比较重要，所以有很多种肽可被呈递而与 T-细胞相互作用。因此，可将不同肽的文库与 MHC 分子连接以便进行 T-细胞呈递。

本发明的 MHC 复合体还有进一步的优点。例如，多特异性 MHC 复合体能特异结合一个以上靶结构，从而能够用一种复合体检测表达多个靶结构的细胞。因为多特异性 MHC 复合体可包括多个结合位点，因此结合力可增强。此外，许多多特异性 MHC 复合体(如那些小于约 50—70kDa)不大，这使得在许多应用中，例如使细胞成象和运送药物、毒素或放射性核素之类的所需小分子至细胞的应用中，这种复合体可能比整个抗体更有用。

本发明的多特异性 MHC 复合体具有另外的用途和优点。例如，依据本发明，在温度、浓度、缓冲液条件等控制条件下，体外组合多特异性 MHC 复合体的单链部分是可能的。尤其是，可以组合多链多特异性 MHC 复合体的单链，以产生新的同或异二聚体的多特异性 MHC 复合体。若期望，用如下文所特别提供的一种或多种标准技术的联合可纯



化所产生的复合体。或者，多特异性 MHC 复合体的单链可原位组合。即在培养细胞内组合，并自如下所述的那些细胞中纯化。

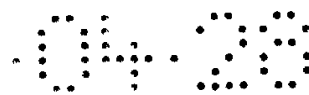
本发明的 MHC 复合体还提供了进一步的优点。例如，空的 I 类或 II 类 MHC 复合体可用于筛选中以鉴定天然 TCR 所识别的肽。MHC 复合体的其它优点包括在抑制免疫应答的方法(如具自身免疫失调或变态反应之类免疫失调个体的治疗)和诱导所需免疫应答[如在哺乳动物是或可能变成无免疫应答的情况下，如在免疫系统因病毒侵染(如，在 AIDS 中)或化疗(如，用于治疗癌症的放射疗法中)而受到抑制的情况下]的方法以及诸如 HLA 定型和体内诊断成象之类的诊断方法中的应用。也包括直接施用编码 MHC 肽融合复合体的 DNA 构建体。

本发明的空 MHC 分子具有特殊的好处。例如，空的 sc-MHC 或多特异性 II 类分子可容易地与多种合适的呈递肽结合以形成有负载的 MHC 分子。方便地装载本发明空 MHC 分子的能力使得可筛选许多呈递肽，以评估每种呈递肽调节 T-细胞受体活性的能力。

本发明的多特异性 MHC 复合体通常包括 1 个或多个 sc-MHC I 类或 II 类分子(相同或不同的)，可多达约 2 个至 5 个这样的分子。按照本发明，sc-MHC 分子可包括修饰的 $\beta 2$ II 类链和/或融合的 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段，以促进复合体的可溶性表达。典型的多特异性 MHC 复合体包括含有一个 sc-MHC II 类分子，有时含修饰的 $\beta 2$ II 类链的 II 类复合体。另外，含一个或多个已知类型之 sc-MHC 分子(IA^d, DR1, DR2, DP, IE, QP, 等)的嵌合型多特异性 MHC 复合体也在本发明的范围之内。

优选的 sc-MHC 分子(I 类和 II 类)的结构已完整公开于 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中。

简短地说，以前所公开的 sc-MHC I 类和 II 类分子按所期望的可以是空的、有负载的或可包括融合的或被负载的呈递肽。例如，sc-MHC II 类分子可具有与 MHC α 或 β 链共价连接的呈递肽。一般说来，呈递肽通过肽接头与 α 或 β 链的 N-末端连接。sc-MHC 分子通常将被截短(尤其是不包括所有的跨膜部分)，或如果期望，在某些例子中它可以



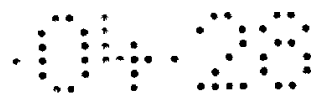
是“全长的”并包括跨膜部分或其部分,和胞质结构域或其部分。sc-MHC 分子还可包括与跨膜结构域相邻、在本领域中有时被称为“铰合部”的部分。参阅 Kabat, G. A. 等人, 见下文。

在期望获得完全可溶性 MHC 复合体的情况下, sc-MHC II 类分子通常不包括所有的跨膜部分, 虽然假如单链分子是完全有功能并可溶的, 它也可包括跨膜部分的合适片段(如 1—5 个氨基酸)。优选的 sc-MHC II 类分子将包括下文提供的 $\beta 2$ II 类修饰和/或 Ig-C_L 链或 Ig-C_L 链片段融合体。在期望提高溶解度和帮助纯化 MHC 复合体的情况下, 或加到切割位点上, 可将如下文所公开之类的合适蛋白质标签加到 MHC 复合体上。

如 PCT 申请 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中所公开的, 含融合呈递肽之 sc-MHC 分子通常还包括插入到 MHC 链和呈递肽之间的柔性接头序列。接头序列理想地能够使呈递肽相对于 MHC 结合沟有效定位, 从而呈递肽能调节 T-细胞受体活性, 这种调节或者是诱导 T-细胞增殖, 或者是抑制或钝化 T-细胞发育。通过包括下文所公开试验的多种体外和体内试验可测定 T-细胞活性。典型的试验是那些依次包括以下步骤的体外试验: 培养 T-细胞使其增殖, 用 MHC 肽融合复合体接触 T-细胞并随后评估 MHC 复合体是否抑制 T-细胞的进一步发育。

如 PCT 申请 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中所进一步公开的, 对于包括肽融合的 sc-MHC 分子来说, MHC α 和 β 链亚基作为单链融合蛋白连接在一起, 且呈递肽一般与融合蛋白的 β 链连接。这样的连接单链复合体能提供许多好处。特别是, 在还原复合体成为单个分子的过程中, 分子的产量和稳定性一般可被增强。对于不可能以活性形式有效产生的可溶性分子, 这可能尤为重要。如下文将更完整描述的, 通过下文公开的 II 类 $\beta 2$ 链修饰和/或 Ig-C_L 链或 Ig-C_L 链片段融合进一步增强了 sc-MHC 分子的产量。

如下文将更详细公开的, 本发明的 MHC 复合体包括可含多种 I 类 (H-2 或 HLA) 或 II 类 (IA, IE, DR, DQ, 或 DP) MHC 分子的 sc-MHC 分子。典型的 MHC 链包括与诸如变态反应或自身免疫应答之类免疫应答有关



的那些 MHC 链。其他的例子已公开于 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中。

正如所提到的，我们已惊奇地发现，当 II 类 $\beta 2$ 链被修饰、特别是被删除时，本发明的 MHC II 类复合体显示增强的可溶性表达并能特异结合。II 类 $\beta 2$ 链可以是例如已知 DNA 序列的 IA、IE、DR、DQ 或 DP 链。

在本发明作为例证的一个实施方案中，本发明的 MHC 复合体包括其中 $\beta 2$ II 类链的至少一个氨基酸已缺失的 sc-MHC II 类分子。被缺失的氨基酸可以是连续或不连续的，最多达基本上全长 $\beta 2$ II 类链。

在另一作为例证的实施方案中，MHC 复合体包括 II 类 $\beta 2$ 链中有 1 个或多个氨基酸添加或取代。特别包括 II 类 $\beta 2$ 链中能使半胱氨酸残基之间的交联减到最小或消除的那些氨基酸取代。取代可以是连续或不连续的，最多可达基本上全长 II 类 $\beta 2$ 链。

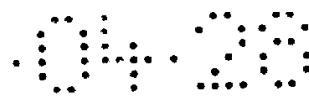
如上所述，我们还发现 Ig-C_L 链与 sc-MHC 复合体的融合能促进该复合体的可溶性表达。因而在作为例证的一个实施方案中，本发明的 MHC 复合体包括与 Ig-C_L 链融合的 sc-MHC 分子。Ig-C_L 链可通过合适的肽接头序列直接或间接地与单链 MHC β 或 α 链融合。

Ig-C_L 链可获自已知 DNA 序列的 κ -或 λ -型免疫球蛋白轻链恒定区。 κ -型 Ig-C_L 链在此经常被称为“C _{κ} 链”，而 λ -型 Ig-C_L 链经常被称为“C _{λ} 链”。

进一步提供的是包括与所需 sc-MHC 分子融合之合适 Ig-C_L 片段的本发明 MHC 复合体。此片段可包括所需全长 C _{κ} 或 C _{λ} 链的一个或多个氨基酸缺失。所述一个或多个缺失氨基酸可以是连续或不连续的，基本上可多达全长 C _{κ} 或 C _{λ} 链。

本发明进一步提供了含有其中至少一个氨基酸已被取代之融合 Ig-C_L 链的本发明 MHC 复合体。取代可以是连续或不连续的，最长可达基本上全长 C _{κ} 或 C _{λ} 链。如果期望，Ig-C_L 链也可包括 1 个或多个氨基酸的添加。

如上所提到，如果期望，与 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段融合的本



发明 MHC 复合体还可包括修饰的 II 类 $\beta 2$ 链, 以增强可溶性表达。

因此本发明提供了多种 II 类 MHC 复合体, 其中可包括能促进 MHC 复合体的可溶性表达并保持该复合体特异结合活性的 II 类 $\beta 2$ 链修饰和/或 Ig-C_L 链(或合适片段)的融合。

本发明还涉及多特异性 MHC 复合体。多特异性复合体通常包括一个或多个 sc-MHC I 类或 II 类分子、一个或多个配基结合分子和一个或多个可任选的效应分子。复合体进一步包括一个或多个共价或非共价连接的连接分子。各组分的次序不重要, 只要每一组分均发挥其预期功能即可。

更特别的是, 在一实施方案中, 多特异性 MHC 复合体包括由连接分子连接的多条链。例如, 一条链可包括与第一连接分子及一任选效应分子融合的 sc-MHC II 类分子。该第一连接分子可以共价或非共价地与第二连接分子连接, 后者进一步与配基结合分子和任选效应分子连接。第一和第二连接分子通过共价或非共价键(如氢键)连接起来。

在本发明的另一实施方案中, 多特异性 MHC 复合体由单条链组成。例如, 该链可包含与配基结合分子和任选的效应分子共价连接的 sc-MHC II 类分子。因此, 术语“多特异性”指由含有潜在多结合特异性之单个 MHC 复合体组成的单链和多链分子。

此处关于本发明多特异性 MHC 复合体所用的术语“连接分子”指能共价(如通过二硫键)或通过氢键非共价地与另一蛋白质或多肽特异结合并形成特异结合对的蛋白质或多肽。一般地, 通过连接分子特异结合的本分子在本文中有时被称为第二连接分子, 该第二连接分子与(第一)连接分子相同或不同。典型的连接分子包括免疫球蛋白恒定链(H 或 L)或其合适的片段, 以及卷曲螺旋和螺旋-转角-螺旋基元, 如下文更完整叙述的那些。具体地说, Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段是连接分子的一种类型。

此处关于本发明多特异性 MHC 分子所用的术语“效应分子”指含有能特异结合抗体(多克隆、单克隆或嵌合抗体)之表位的分子。一般地说, 此抗体将是单克隆抗体。该术语还包括细胞毒素、受体配基、

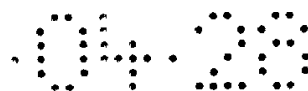
药物、放射性核素、或诸如众所周知的 myc、6xHIS 或 EE 标志之类的蛋白质“标志”。典型的标志已公开于 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191。正如从以下内容中可更明显看到的，某些情况中连接分子可以是如本文所提供的效应分子(如 Ig-C_L 链或片段)。

如果期望，有时可通过合适的肽接头将多特异性复合体的一个亚基与另一亚基连接。术语“亚基”意指由如 sc-MHC 分子、配基结合分子或效应分子组成的多特异性 MHC 复合体的单元部分。亚基通常以按预期用途所选择的相继次序互相连接。合适的肽接头可用于按预期隔开亚基，以提供亚基间更强的柔性。典型的肽接头序列和用于检测肽接头序列功能性的试验公开如下。

本发明还涉及含有编码本发明 MHC 复合体之序列的核酸区段(RNA、mRNA、cDNA 或基因组 DNA)。获得编码多种 sc-MHC I 类和 II 类复合体之 DNA 区段的方法已公开于 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中。

简短地说，编码目的 sc-MHC I 类或 II 类分子的核酸可获自多种来源，包括可公开得到的 MHC 链序列的聚合酶链式反应(PCR)扩增。按照本发明，核酸部分可包括能促进完全可溶并有功能的复合体表达的 β 2 II 类链修饰和/或融合的 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段。在大多数情况下，核酸部分被插入到能在预期细胞，通常为真核或原核细胞内表达 MHC 复合体的 DNA 载体(即 DNA 表达载体)中。为了增加细胞内 MHC 复合体的表达，核酸部分可包括诸如启动子、前导序列和/或任选的增强子序列之类有效连接的控制元件或与其相融合。或者，如果需要，可按已知方法将核酸部分最优化，以用于无细胞翻译体系中。

正如以下讨论中将更明显看到的，在某些情况下，核酸部分或携有其的 DNA 载体将只编码本发明 MHC 复合体的一部分。例如，所提供的一些多特异性 MHC 复合体是能从一或多个 DNA 载体表达的多链分子。由 DNA 载体编码的表达单链可与另一种表达单链在体外或原位(即在细胞内)结合以形成复合体。例如，通过将多核酸部分或携有其的 DNA 载体引入合适细胞中并表达该复合体，可制备多特异性 MHC 复合

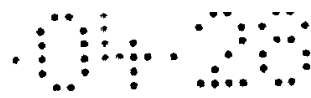


体。然后通过翻译、加工和装配途径而在细胞中装配多特异性 MHC 复合体。或者，可分别收获复合体的单个链并在控制条件下，如通过透析反应而体外联合。

一般地，本发明的核酸部分被制成使天然 MHC 控制元件最少的形式。术语“控制元件”意指那些影响目的蛋白质转录、翻译和/或加工的已知核酸序列。在多数情况下，蛋白质表达将由包括启动子、任选增强子元件和前导序列在内的与核酸部分有效连接的预定转录控制元件所驱动。在本发明的一个方面，Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段被连接至核酸部分上，且有时会包括来自 Ig-C_L 链的内含子和外显子序列，例如在能进行 RNA 剪接的细胞类型中表达 MHC 复合体时即可如此。当期望在原核细胞中表达 MHC 复合体时，可去除内含子。如下文所将详述的，可将多种 Ig-C_L 链或其合适片段与 MHC 复合体融合以促进可溶性表达。

本发明还提供了获得大量完全可溶并有功能的 MHC 复合体的方法。一般说来，这些方法包括：在合适细胞中表达 MHC 复合体，培养该细胞，并从中纯化复合体(若需要)以获得基本纯的 MHC 复合体。正如早些时候所提到的，在一些多特异性复合体的例子中，理想的是在体外或原位组合 MHC 单链以促进所需复合体的生产。这些方法可用于从多种装置中大量(即，至少毫克级)表达和纯化所需的 MHC 复合体，包括滚瓶、旋转瓶、组织培养皿、生物反应器或发酵罐。明显地，所提供的 II 类 β 2 链修饰和/或 Ig-C_L 链或 Ig-C_L 链片段融合对本发明的分离和纯化方法有积极的影响。

本发明的分离和纯化 MHC 复合体的方法是非常有用的。例如，对于显示有所需的结合活性或潜在的多结合活性(如，体外或体内免疫反应性 T-细胞的抑制或与预期免疫细胞的特异结合)的 MHC 复合体，获得表达和纯化 MHC 复合体的方法是非常有用的。能生产至少毫克水平的预期 MHC 复合体的方法特别有用，如，可以将 MHC 复合体制成适于医疗、研究、家庭或商业用途的试剂盒中的一种组分。此外，有大量 MHC 复合体可供使用，对简化结构分析，以及期望时进一步纯化和/或



检测均很有用。

本发明的纯化方法通常包括层析方法，它们能被特制成用于自其天然相关细胞组分中纯化预期 MHC 复合体的形式。一般地，这些方法包含 MHC 复合体亚基的特异结合。显然可应用多种策略纯化本文公开的多特异性 MHC 复合体，包括设计为选择一种或多种 sc-MHC 分子、配基结合分子、连接分子、效应分子和融合 Ig-C_L 链或 Ig-C_L 链片段的层析方法。

本发明还涉及体外筛选以检测天然 MHC 复合体所识别的肽，包括能诱导 T-细胞发育的肽以及诸如 MHC 拮抗剂之类能拮抗天然 MHC 复合体的肽或部分激动剂。

本发明还提供了抑制哺乳动物，尤其是人体内免疫应答的方法，包括给哺乳动物施用有效量的本发明 MHC 复合体，如 sc-MHC II 类肽融合复合体、有负载的 sc-MHC II 类复合体、多特异性 II 类肽融合体、有负载的多特异性 II 类肽融合复合体，等等。本发明的方法包括治疗遭受或易患自身免疫失调的哺乳动物，所述疾病例如是多发性硬化症、胰岛素依赖型糖尿病或类风湿性关节炎，或者治疗易产生不期望的免疫应答的哺乳动物，如有慢性变态反应的个体或接受了器官或皮肤移植手术之类移植外科手术的病人。

按照本发明，用一种或结合使用多种可选择策略可抑制免疫应答。特别地，在缺乏或近乎缺乏共刺激信号的情况下服用有效量的本发明一种或多种 MHC 复合体，可诱导 T-细胞的无反应性或凋亡。一般地，MHC 复合体不包含全长 MHC 分子的完整跨膜结构域或其部分。

还提供了用于抑制哺乳动物内免疫应答的方法，包括施用编码本发明 MHC 复合体的有效量 DNA 区段(或携有其的载体)。如前文所提到，在希望使用编码含多条链之本发明多特异性 MHC 复合体的 DNA 区段的情况下，施用有效量的编码各链的两种或多种 DNA 序列常常是有用的。一般地，所编码蛋白质在体内或体外的共表达和装配将形成多特异性 MHC 复合体。在某些情况下，与编码诸如 CD80 或 CD86 之类合适的 T-细胞刺激因子的基因一起施用编码 MHC 复合体的一种或多种 DNA

序列可能也是合乎需要的。当用于本文中时，术语“T-细胞共刺激因子”指能提供共刺激信号，从而在一种或多种 MHC 融合复合体存在时能激活 T-细胞增殖的肽。用本文公开的试验可测定这样的 T-细胞增殖激活。

进一步提供了诊断方法，包括用本发明的 MHC 复合体，如已被修饰而含有放射性核素(如 ^{125}I , ^{32}P 或 ^{99}Tc)或其它可检测标志的 MHC 复合体进行的 HLA 定型和体内诊断成象。

本发明还包括通过应用本文所公开的 MHC 复合体检测和纯化 T-细胞之类免疫细胞的方法。因此可将 T-细胞之类能特异结合 MHC 复合体的细胞与按已知方法(如流速细胞仪，免疫淘选)不能结合的其它细胞基本上分开，其量足以制备基本纯的 T-细胞群体。这样的 T-细胞可用于许多临床和研究中，如无免疫应答病人的免疫系统重建，及检测与不希望有的免疫反应相关的呈递肽的体外筛选。

附图简述

图 1 是编码单链 IA^d/OVA 323-229MHC 融合分子(即 sc- IA^d/OVA)(SEQ ID NO: 24)之基因的图解表示。 $\text{IA}^d\beta$ 2 链由 IA^d/OVA 单链基因(SEQ ID NO: 24)的第 452—734 位核苷酸编码。 $\text{IA}^d\beta$ 2 链跨越第 150—243 位氨基酸(SEQ ID NO: 25)。图中示出了 Kozak 共有序列。箭头指示信号肽酶切割位点。 $\text{IA}^d\beta$ 1— β 2 和 $\text{IA}^d\alpha$ 结构域中的“//”代表为清晰起见而省略的氨基酸和核苷酸序列。OVA 323—339 肽(SEQ ID NO: 26)(虚线)在 sc- IA^d /空白 MHC 分子中是不存在的。

图 2A 和 2B 是说明 sc- IA^d/OVA 分子的细胞表面表达(2A)和 T-细胞诱导活性(2B)的图表。

图 3A—3N 是概括 DNA 载体 SDE3、pMB959、pMB808、pIADK 和 pDRHK 合成的图。

图 4A 和 4B 是含(4A) IA^d 和(4B) DR-2 链的 sc-MHC II 类融合肽融合体的图。所用缩写词如下：SP，信号肽序列；PEP，融合的抗原性肽序列；L1，10 氨基酸接头；L2，氨基酸接头；EE，抗体标志；IgG-C_L，免疫球蛋白轻链恒定区； α TMCy，胞质跨膜结构域。除序列“PEP”被

删除外，可以用相同的图表示相应的空分子。有负载的分子将具有与 sc-MHC II 类结合沟非共价结合的“PEP”序列。

图 5A 和 5B 是显示可溶性单链 MHC II 类/肽蛋白质表达的聚丙烯酰胺凝胶电泳或免疫印迹。图 5A 显示用 12% SDS-PAGE 分析并用考马斯蓝染色的 sc-IA^d 样品(泳道 1—3)。给出了分子量标准的迁移。sc-II 类蛋白质(泳道 4—6)也被转移至尼龙膜，用特异于 OVA323—339 肽的小鼠抗血清进行探测。图 5B 显示用 10%SDS-PAGE 分析的 scDR2 Δ β 2 样品的抗 DR 亲和纯化分布图。亲和纯化的蛋白质显示于泳道 3—5(还原条件)和泳道 7—9(非还原条件)。

图 6A—C 是说明单链 II 类/肽蛋白质特异激活 T-细胞应答的图。图 6A 显示对与 IA^d 结合之 OVA323—339 特异的 DO11.10 T-细胞杂交瘤被刺激而产生 IL-2。图 6B 显示两种不同的 T-细胞杂交瘤 GD12(特异于 gD246—261 和 IA^d)或 DO11.10 被刺激，从而以呈递肽特异方式分泌 IL-2。图 6C 显示固定化的带 OVA 肽之 sc-IA^d/空蛋白质或 sc-IA^d/OVA 融合蛋白质(但非空融合蛋白质)刺激 IL-2 从 DO11.10 细胞中的释放。

图 7 是显示抗 T-细胞受体抗体(抗-TcRmAb)或 sc-IA^d/OVA 能诱导 T-细胞凋亡的溴化乙锭染色凝胶照片。

图 8A 和 8B 是表明 sc-IA^d/OVA 的体内表达抑制 T-细胞克隆扩充的图。

图 9A 和 9B 是多特异性 sc-II 类/肽 IgG-C_L 二聚体(9A)和 sc-II 类/肽 IgG-C_L: 单链抗体分子(9B)的图示。

图 10A 和 10B 显示下文实施例中所用的寡核苷酸(10A)和多肽序列(10B)。

发明详述

如上所述，本发明提供了完全可溶并有功能的新 MHC 复合体。MHC 复合体包括含融合 Ig-C_L 链或片段和/或修饰的 II 类 β 2 链的 sc-MHC I 类和 II 类复合体。已发现通过将 Ig-C_L 或合适 Ig-C_L 片段融合到 MHC 复合体上，和/或通过修饰 II 类 β 2 链，有可能显著地增加 MHC 复合体的可溶性表达。如上所提到，若需要，本发明的多特异性 MHC 复合体可



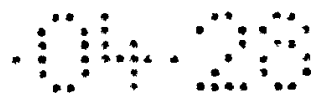
包括被修饰的 II 类 $\beta 2$ 链和/或 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段,以促进可溶性表达。

大体上,本发明的 MHC 复合体的制备包括常规重组步骤,包含如:寡核苷酸引物介导的位点特异性诱变,聚合酶链式扩增反应(PCR),质粒 DNA 的制备,用限制酶切割 DNA, DNA 的连接, mRNA 的分离,将 DNA 引入合适细胞,培养该细胞,所表达 MHC 复合体的分离和纯化。通常参阅 Sambrook 等人,《分子克隆:实验室手册》(第二版(1989)); Ausubel 等人,《分子生物学最新方法》, John Wiley & Sons, 纽约(1989)。这些方法适于制备本文所公开的 MHC 复合体,包括空的或有负载的 MHC 分子,如:空的或有负载的多特异性 MHC 复合体,部分空的或有负载的 sc-MHC II 类分子,和含融合呈递肽的 MHC 复合体。

以下涉及含融合呈递肽、肽接头等等的 sc-MHC 肽融合复合体之制备的讨论,已公开于 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中。应当理解,该论述普遍适用于制备和使用本发明的 MHC 复合体,包括空的或有负载的复合体。从下文应当理解,为了制备空的或有负载的 MHC 复合体,编码融合呈递肽的 DNA 序列不包括在编码空或有负载分子的核酸构建体中。

编码所需 MHC 蛋白质(即杂二聚体 MHC 分子)的 DNA 可获自多种来源中的任何一种,包括例如下文实施例 1 所公开的细胞系。编码 MHC 蛋白质的 DNA 的其它来源是已知的,如人类淋巴母细胞。一旦分离,即可用聚合酶链式反应(PCR)或本领域已知的其他方法扩增编码 MHC 蛋白质的基因。用于扩增 MHC 蛋白质基因的合适 PCR 引物可将限制位点加到 PCR 产物上。PCR 产物还优选包括编码接头序列或这种序列连接所需限制酶切位点的序列。合适的引物、PCR 条件和表达载体构建技术公开于例如以下实施例及附图中。

接头序列优选编码能有效地将呈递肽定位到 MHC 分子结合沟内的肽的核苷酸序列。用于本文中时,短语“呈递肽被有效定位于 MHC 分子的结合沟中”或“能调节 T-细胞活性的 MHC 融合复合体”,或其他类似短语意指与 MHC 蛋白质连接的呈递肽所处的位置使得呈递肽融合



复合体能调节 T-细胞受体的活性，按以下公开的试验测得或者是诱导 T-细胞增殖或者是抑制或钝化 T-细胞发育。一个典型试验包括以下连续步骤：培养 T-细胞使其增殖，用本发明 MHC 复合体接触 T-细胞及随后评估该复合体是否抑制 T-细胞的进一步发育。

一般地，sc-MHC 肽融合复合体包括通过共价连接肽接头序列分隔的 MHC 单链。例如，sc-MHC II 类分子通常包含通过合适的单链接头序列而与 MHC II 类 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 链相连接的 MHC II 类 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 链。如上文所提及的，II 类 $\beta 2$ 链通常如下文所示被修饰。因而单链接头序列应使连接的 MHC 复合体能折迭成活性形式，即 MHC 分子能调节 T-细胞活性的形式。这样的有效单链接头序列能容易地根据经验测定。因而，例如，可克隆和表达编码其中 α 和 β 链通过接头序列连接的单链 MHC 复合体的 DNA 构建体，并检测单链 MHC 复合体以确定此复合体能否调节 T-细胞受体的活性，如由下文所公开的试验测得或者是诱导 T-细胞增殖或者是抑制 T-细胞发育。

为了使其具有柔性，单链接头优选主要包含带小侧链的氨基酸，如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸。优选接头序列的约 80% 或 90% 或更多包含甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸残基，特别是甘氨酸和丝氨酸残基。一般地，接头序列不包含会抑制柔性的脯氨酸残基。对于那些包括带共价连接肽之 sc-MHC II 类分子的 MHC 融合复合体，接头序列被适当地连接到 MHC 分子的 β 链上，尽管如果需要接头肽序列也可连接到 MHC 分子的 α 链上。典型的肽接头序列包含约 7—20 个氨基酸，优选约 8—16 个氨基酸，更优选约 8—12 个氨基酸。接头序列通常是柔性的，以使呈递肽不被约束于个别不合乎需要的构象中。为了共价连接呈递肽至 MHC II 类 β 链分子上，接头的氨基酸序列应能跨越从 MHC II 类 β 链 N-末端残基至呈递肽 C-末端残基约 30 埃 (Å) 的距离。参阅例如已公开的 PCT 申请的图 1A 和 1B。当这样的 β + 肽链与 α 链一起表达时，连接的呈递肽应折迭成 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 结合沟，导致有功能的 MHC 分子，如公开的 PCT 申请中图 1C 中所概述的。例如，一合适的接头序列是与例如 MHC II 类蛋白质 $\beta 1$ 结构域的第一个氨基酸相连接的 ASGGGGSGGG (SEQ ID

NO: 35) (即, Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly)。可使用不同的接头序列, 包括已成功用于将抗体可变区连接在一起的许多柔性接头设计中的任一种(即 M. Whitlow 等人, 方法: 酶学方法指南 (Methods: A Companion to Methods in Enzymology), 2: 97-105(1991))。用常规计算机技术也可确定单链接头序列的合适大小和序列。

其他合适接头序列可根据经验鉴定。例如, 可克隆和表达编码包括接头序列的 MHC 融合复合体的 DNA 构建体, 并检测融合复合体以确定该复合体是否能调节 T-细胞受体的活性, 即按下文公开试验测定或者是诱导 T-细胞增殖或者是抑制或钝化 T-细胞发育。接头序列的合适大小和序列也可用常规计算机模拟技术, 基于 MHC 复合体的预计大小和形状确定。

多数情况下, 在含编码接头序列和 MHC 蛋白质之融合核苷酸序列的 DNA 构建体内设计了限制性位点, 以使编码目的呈递肽(如抗原性或者拮抗剂呈递肽)的基本上任何核苷酸序列均能连接到此构建体内。例如, 在下文实施例举例说明的一个系统中, 在前导序列末端与接头起始处之间包含了合适的限制位点(如 *Afl* II 和 *Nhe* I 位点), 以方便各种呈递肽插入于 MHC 分子的 β 链基因中。参阅, 例如, 已公开的 PCT 申请之图 3 和以下实施例。典型前导序列的核苷酸和氨基酸序列描述于 PCT 申请公开 WO 96/04314 的图 18A 和 18B。也可参阅以下实施例及 PCT 申请公开 WO 97/28191。

MHC 融合复合体的呈递肽组分应能如上所述调节 T-细胞活性。对于含 II 类 MHC 分子的 MHC 融合复合体, 呈递肽通常具有约 4—35 个氨基酸, 更优选约 6—30 个氨基酸, 还更优选约 8—25 个氨基酸。对于含 I 类 MHC 分子的 MHC 融合复合体, 优选呈递肽具有约 4—25 个氨基酸, 更优选约 6—20 个氨基酸, 还更优选约 6—15 个氨基酸, 更优选约 8—10 个氨基酸。I 类和 II 类 MHC 分子显示优先结合不同的肽序列。最近, 已在 II 类结合肽中鉴定出了确定 MHC 等位基因特异性肽基元的锚定残基(F. Sinigaglia 等人, 免疫学最新观点 (Curr. Opin. in

Immun.), 6: 52—56(1994))。例如, 在人 II 类 HLA-DR1 分子中, 在肽的氨基末端(第 1 位)附近经常发现有芳香族氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸), 在第 4 位发现有疏水残基(如甲硫氨酸或亮氨酸), 在第 6 位发现有小氨基酸(如丙氨酸或甘氨酸)。其它 MHC 分子具有不同的基元, 例如, 对于 II 类分子, 参阅 Sinigaglia., 出处同前; 对于 I 类分子, 参阅 K. Parker 等人, 免疫学杂志, 152: 163—175(1994)。为了促进最佳的 MHC 结合, 优选呈递肽包含所需的 MHC 结合基元。因而, 例如, 在人 II 类 HLA-DR1 MHC 分子中, 优选呈递肽的氨基末端(第 1 位)附近有芳香族氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸), 呈递肽的第 4 位有疏水残基(如甲硫氨酸或亮氨酸), 呈递肽的第 6 位有小氨基酸(如丙氨酸或甘氨酸)。对于本发明的免疫抑制方法(如治疗自身免疫疾病或变态反应, 或抑制不希望有的 T-细胞应答的方法), 呈递肽优选与已知或推测在所针对的疾病中负责活化 T-细胞的肽相同或有同源性(例如至少有多于 80%或 90%的共有序列)。因而, 例如, MPB 肽 80—105 被分离自多发性硬化症病人的 MPB 特异性 T-细胞的 30%以上所识别[参阅 E. Meinl 等人, 临床研究杂志(J. Clin. Invest.), 92: 2633—2643 (1993)], 并适合作为本文所公开的用于免疫抑制应用的 MHC 融合复合体中的呈递肽。参阅以下实施例 3。此外, 特殊呈递肽的活性, 即抗原性或拮抗剂或部分激动剂, 可用本文所公开的方法, 包括下文公开的体内试验, 根据经验容易地测定。

如上及 PCT 申请 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中所述, 单链 MHC 融合复合体是合乎需要的, 即宁要由单个多肽组成的融合复合体, 而不要多链聚集体, 如其中 α 和 β 链及肽通过非共价相互作用结合的天然杂三聚体 II 类/肽复合体。就单链 MHC II 类复合体来说, α 和 β 链亚基作为单链融合蛋白质与呈递肽连接, 其中呈递肽优选连接到链融合蛋白质的 β 链上。典型的 sc-MHC II 类融合复合体描述于图 1、4A 和 4B 中。优选使用接头序列连接 α 和 β 链。用于连接 MHC 分子各结构域的这种接头序列在本文中有时被称为“单链接头序列”, 由此区别于上述插入于呈递肽和 MHC 分子之间并将它们共价连接的接头序列。

这样的接头序列见下文图 1 所示。

优选单链 MHC II 类复合体在 $\beta 2$ 结构域的羧基末端和 $\alpha 1$ 结构域的氨基末端之间连接，尽管 MHC 复合体的多个结构域可通过其他位置连接。

本文所提供的复合体的 MHC 分子在氨基酸序列上与天然 MHC 分子，如人的 MHC 分子 (I 类或 II 类)、小鼠或其他啮齿类动物或其他哺乳动物的 MHC 分子一致比较合适。优选融合复合体的 MHC 分子的氨基酸序列至少约 70% 将与诸如上文所提及之类天然 MHC 分子的氨基酸序列相同，更优选融合复合体的 MHC 分子的氨基酸序列至少约 90% 与天然 MHC 分子的氨基酸序列相同，还更优选融合复合体的 MHC 分子的氨基酸序列约 98% 至全部与天然 MHC 分子的氨基酸序列相同。

除了呈递肽不与分子共价连接之外，本发明的空 MHC 复合体，特别是空的单链 MHC 分子可按上述任何合适的方法制备。例如，如 PCT 申请 WO 97/28191 和下文实施例 1—3 中所公开的，将编码 OVA 呈递肽之寡核苷酸和接头- $\beta 1$ - $\beta 2$ 基因片段连接起来的步骤即可省略。在另一实施例中，通过使用标准重组 DNA 操作，可将呈递肽从已具有共价连接的呈递肽的本发明 MHC 分子中除去。例如，可用合适的限制酶 (如 Afl II 和 Nhe I) 除去编码 sc-IA^d/OVA 呈递肽的 DNA。

如上所述，我们已发现，通过修饰 II 类 $\beta 2$ 链有可能促进多种 sc-MHC 复合体的可溶性表达。具体地说，我们发现 $\beta 2$ II 类链对于 MHC 复合体的特异结合是非必需的。如前文所提到，按本发明修饰的 II 类 $\beta 2$ 链可以是 DNA 序列已知的 IA、IE、DR、DQ 或 DP 链中任何一种。II 类 $\beta 2$ 链的 DNA 序列可获自多种来源，如 Kabat, E. A. 等人，(1991) 《有免疫学价值的蛋白质的序列》(第 5 版) 公共卫生机构，国立卫生研究所，其内容被引用作为参考。

尤其是，人 II 类 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 链结构域一般分别对应于第 1—94 位和第 95—188 位氨基酸，其中第 1 位对应于成熟 II 类 β 链的 N-末端氨基酸。这些位置可变化 1—5 个氨基酸，这依特定的 II 类分子而定。典型的 II 类 $\beta 2$ 链缺失包括 $\beta 2$ 结构域起始的第 95 位氨基酸至 $\beta 2$ 结构域

末端第 188 位氨基酸的缺失。参阅以下实施例 3。或者说，可从第 95—188 位之间缺失一个或多个连续或不连续氨基酸，甚至缺失长达整个 II 类 $\beta 2$ 链。

更特别的是，II 类 $\beta 2$ IA^d 链是由跨越 $IA^d/OVA323-229$ MHC 分子第 452—734 位核苷酸的 DNA 序列所编码的（见图 1 和 SEQ ID NO: 24）。 $IA^d/OVA \beta 2$ 链跨越第 150—243 位氨基酸（SEQ ID NO: 25）。对于涉及制备含 II 类 IA^d 或 DR $\beta 2$ 链的单链 MHC 分子的内容，也可参阅以下实施例 1 和 3。

如上所提及，在本发明的一个实施方案中，提供了带 $\beta 2$ II 类链缺失的 MHC II 类复合体。该 $\beta 2$ II 类链缺失可跨越至少 1 个氨基酸，优选至少 5、10、25、50、60、70、80 或 90 个氨基酸，更优选 II 类 $\beta 2$ 链的基本上所有氨基酸。在另一实施方案中，MHC 复合体可包括含一个或多个非连续氨基酸缺失至多达基本上整个 II 类 $\beta 2$ 链缺失的被修饰 $\beta 2$ II 类链。

优选的非连续缺失可跨越至少 2 个氨基酸，优选 II 类 $\beta 2$ 链的至少 5—10 个或更多个氨基酸。

在本发明另一作为例证的实施方案中，MHC II 类复合体可包括其中一个或多个氨基酸被其它氨基酸取代的 $\beta 2$ II 类链修饰。优选的 II 类 $\beta 2$ 链取代可以是保守或非保守氨基酸取代，其中链内至少 1 个氨基酸、优选至少 2、5、10、25、50、60、70、80、90 或更多氨基酸被保守或非保守氨基酸取代。因此，用苯丙氨酸取代酪氨酸是保守氨基酸取代的一个例子，而用丙氨酸取代精氨酸代表了非保守氨基酸取代。优选地，保守或非保守氨基酸取代是亲水或中性的氨基酸。尤其是，可用非半胱氨酸残基取代 $\beta 2$ II 类链中的一个或多个半胱氨酸残基，以使交联潜力实质性地减小或消除。优选至少 1 个或多个、最好所有半胱氨酸残基均被非半胱氨酸残基取代。参阅以下实施例 3，它公开了其中一个半胱氨酸残基被丝氨酸取代的 II 类 $\beta 2$ 链例子。

其他 II $\beta 2$ 链修饰也在本发明的范围之内。例如，II 类 $\beta 2$ 链可被修饰成在 II 类 $\beta 2$ 结构域的第 95 位和最后第 188 位之间包括一个或

多个氨基酸添加。更特别的是， $\beta 2$ 链可被修饰成包括一个或多个优选为中性或亲水残基的添加。优选地，被修饰的 II 类 $\beta 2$ 链包括至少一个中性或亲水性氨基酸，更优选 2、5、10、15 或 20 个氨基酸，甚至多达约 25—30 个氨基酸。在此实施方案中，限制被添加的氨基酸残基的数目至大约 II 类 $\beta 2$ 链的长度常常是合乎需要的。因而，在多数情况下，对于每一个加入此链中的氨基酸，除去等量或几乎相等数量的 II 类 $\beta 2$ 链残基将是比较理想的。在某些例子中，除去 $\beta 2$ II 类链附近的额外序列，如接头序列和/或 $\beta 1$ 链序列将能进一步提高溶解性，并对呈递肽和 MHC 分子之间的特异结合无消极影响。这样的构建体可按本文所述方法容易地制备并检测。

按照本发明的 II 类 $\beta 2$ 链修饰可用多种标准重组技术完成，包括使用限制酶或 PCR 引物以从编码 II 类 $\beta 2$ 链的预扩增 DNA 序列中切出编码一个或多个氨基酸的核酸。制备这种缺失体的优选方法包括用诱变 DNA 寡核苷酸引物和 PCR 扩增预定的 $\beta 2$ 链位点而进行的寡核苷酸引物介导的定点诱变。

如上所述，本发明的 MHC 复合体可包括连接于，例如复合体 C 末端的共价连接的 Ig-C_L 链。在一实施方案中，MHC 复合体包括融合的哺乳动物 Ig-C_L 链，优选全长小鼠或人的 Ig-C_L 链(C_κ 或 C_λ)。小鼠和人 Ig-C_L 链的核酸和蛋白质序列已公开。参阅例如，《基础免疫学》(Fundamental Immunology)，(1993)第 3 版，W. Paul. 编，Rsen. Press Ltd.，纽约；和 Kabat，E. A.，出处同前。

术语 Ig-C_L 链还指因一个或多个氨基酸取代或添加而与公开的全长序列不同的免疫球蛋白轻链恒定区。例如，用常规重组方法，可将氨基酸在链的一端或两端加到公开的 Ig-C_L 链序列上。此外，若需要，可通过重组方法取代链中一个或多个特定的氨基酸，优选中性或亲水性氨基酸取代。如果需要，取代可以是保守或非保守取代。一般地，氨基酸添加将包括约 1—30 个中性或亲水氨基酸，优选约 2、5、10、20 或 25 个这样的氨基酸。取代 Ig-C_L 链中另一氨基酸的氨基酸一般为保守或非保守氨基酸置换。如下文对于 Ig-C_L 链片段所指出的，含融

合 Ig-C_L 链的本发明 MHC 分子将是完全可溶并有功能的。

在某些例子中，将诸如小鼠或人 C_κ 链片段之类合适 Ig-C_L 链片段融合至本文所公开的 MHC 复合体上将是合乎需要的。短语“合适 Ig-C_L 链片段”意指全长 Ig-C_L λ 或 κ 序列的一部分，当它与预期 MHC 复合体融合时，将形成如下文所定义的完全可溶并有功能的复合体。Ig-C_L 链片段(C_κ 和 C_λ 型都可)可按标准重组方法制备，且可以是全长序列的连续或不连续缺失体。例如，可通过 PCR 扩增小鼠或人的目的 C_κ 或 C_λ 链片段，随后将 PCR 产物连至编码 MHC 复合体的 DNA 区段或载体中，制备合适 Ig-C_L 片段。可按需要操作 PCR 产物，以包含限制酶切割位点。制备 Ig-C_L 链片段的特别优选方法是用诱变 DNA 引物和 PCR 扩增预定 β 2 链位点而进行的寡核苷酸介导的定点诱变。一般地，合适的小鼠或人 C_κ 链片段长度大约为 80—130 个氨基酸，优选约 90—120 个氨基酸，更优选约 100—110 个氨基酸。含适于 PCR 扩增之小鼠或人 C_κ 链 DNA 的细胞在本领域中是已知的。参阅下文实施例。

上述 II 类 β 2 链修饰、Ig-C_L 链和 Ig-C_L 链片段融合不会显著影响本发明 MHC 复合体特异结合配基的能力。也就是说，通过修饰 II 类 β 2 链和/或通过将 Ig-C_L 链或 Ig-C_L 链片段融合至 MHC 复合体上，MHC 复合体与合适的对照、如含全长 II 类 β 2 链并缺乏融合 Ig-C_L 或片段的 sc-MHC 复合体相比，其特异结合未降低超过约 30%，优选不超过 10%，更优选不超过 5%或更少。典型的结合试验公开于下文实施例中，包括标准蛋白质印迹和 T-细胞刺激试验。

如上所提及，本发明的 MHC 复合体是完全可溶并有功能的。术语“完全有功能的”或类似术语意指在有 II 类 β 2 链修饰和/或融合 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段存在时，融合蛋白质能特异结合配基。检测这种特异结合的试验公开于本文中。

术语“完全可溶”或类似术语意指融合蛋白质在低离心力离心(如在标准离心机中低于约 30,000 转/分钟)时不容易从含水缓冲液，如细胞培养基中沉淀出来。此外，如果在低浓度或者无阴离子或非离子型去污剂存在时，融合蛋白质保持在温度高于约 5—37℃、pH 中性或

近中性的水溶液中，则 MHC 复合体是可溶的。在这些条件下，可溶性蛋白质将经常具有低沉降值，如少于约 10—50S 单位。此处提及的水溶液一般具有缓冲化合物以维持 pH 值，一般在约 pH5-9 范围内，离子强度在约 2mM—500mM 之间。有时加入蛋白酶抑制剂或温和的非离子型去污剂。此外，如果需要还可加入牛血清清蛋白 (BSA) 之类的载体蛋白质至数 mg/ml。典型的含水缓冲液包括标准磷酸缓冲盐溶液、tris 缓冲盐溶液或其它众所周知的缓冲液及细胞培养基配方。

本发明还涉及单链和多链多特异性 MHC I 类和 II 类复合体。多链多特异性复合体用以下通式表示：



其中，

- a) A 是一个或多个 sc-MHC I 类或 II 类分子，
- b) B₁、B₂ 各自独立地是一个或多个相同或不同的连接分子，
- c) C₁、C₂ 各自独立地是一个或多个相同或不同的效应分子，或-H；

并且

- d) D 是与上述 A 相同或不同的一个或多个 sc-MHC I 类或 II 类分子，或 D 是一个或多个配基结合分子。

进一步提供了用以下通式表示的单链多特异性 MHC I 类或 II 类复合体：A-B₁-C₁，B₁-A-C₁，和 A-C₁-B₁，其中 A、B₁、C₁ 如上文所定义，条件是当多特异性 I 类或 II 类复合体用 A-C₁-B₁ 表示时，C₁ 不是-H。

关于以上提供的每个通式，单线代表共价键(如肽键)，而双线代表一个或多个共价键，例如那些连接免疫球蛋白重链之类的二硫键；或双线代表氢键。括号指示括号内分子(即亚基)的排列次序可柔性变动。因而，亚基的次序是不重要的，只要每个亚基发挥各自预期功能即可。

如上所述，在显示代表多特异性 MHC 复合体的每一通式中，亚基 A、B₁、B₂、C₁、C₂ 和 D 各自独立地代表一个或许多个分子。在亚基代

表许多个分子的例子中，每个分子通常与相同类型的分子连接(如，sc-MHC II 类分子与另一 sc-MHC II 类分子重组连接)。此外，这些连接分子的数目通常约 2—10 个，优选约 2—5 个，更优选 2 个这样的分子，最优选 1 个这样的分子。sc-MHC II 类分子可各自独立地包括共价连接的呈递肽，或者，sc-MHC II 类分子可以是空的，并可按本文所述方法引入合适的呈递肽。每个亚基或含亚基的多个分子可通过合适的肽接头间隔开，以增强所期望的柔性。

按照本发明，修饰含 II 类 $\beta 2$ 链的那些多特异性 MHC 复合体的 $\beta 2$ II 类链常常是合乎需要的。可替代地或额外地，Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段可被融合到多特异性 MHC 复合体上。例如，关于所提供的多特异性 MHC 复合体，上述通式中的 B₁ 或 B₂ 可各代表 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段，如小鼠或人的 C_L 链片段。在此实施方案中，多链多特异性 MHC 分子可包括 CH₁ 之类的合适重链恒定结构域或其合适片段，以使复合体能形成特异结合对。

本发明的多特异性 MHC 复合体可包括全部或部分来自免疫球蛋白的一个或多个连接分子。若复合体包括 1 个以上连接分子(如多链多特异性分子)，则连接分子可以是相同或不同的类型(IgG, IgA, IgM, IgD 或 IgE 类)。因此，嵌合型多特异性 MHC 复合体也在本发明的范畴内。例如，如上所指出，连接分子可以是免疫球蛋白轻链(κ 或 λ 类型)，或连接分子可以是重链恒定区或片段。因此典型的连接分子对包括 C_L(κ 或 λ 类型)，CH₁；CH₂CH₂；或 CH₃，CH₃ 链；或它们的按本文所述试验测定能形成特异结合对的合适片段。其他合适的连接分子例子包括能形成特异结合对的螺旋-转角-螺旋和卷曲螺旋蛋白质基元。

免疫球蛋白连接分子可以来源于动物(例如，啮齿类动物，如小鼠或大鼠)或人，或可为嵌合的或人源化的(参阅，如 Morrison 等人，PNAS81, 6851(1984)；Jones 等人，自然 321, 522(1986))。典型的连接分子包括那些能被诸如下文公开的抗独特型抗体以及如公开于 Linscott's 指南(40Glen Drive, Mill Valley California 94941)及美国典型培养物保藏中心(ATCC) 12301 Parklawn Drive,

Rockville, Md20852 中的市售抗独特型抗体特异结合的分子。

本发明多特异性 MHC 复合体的一个例子是图 9A 中所示的双特异性复合体。在此实施方案中，双特异性 MHC 复合体包括形成特异结合对的两个 sc-MHC II 类肽复合体和两个 Ig-C_L 连接分子。两个 sc-MHC II 类肽复合体可以是相同或不同的，尽管在某些情况中优选它们是相同的以增加双特异性 MHC 复合体的结合力。

图 9B 中显示了另一例子。在此实施方案中，双特异性复合体包括 sc-MHC II 类肽复合体和 sc-Fv 抗体(常被称为“单链抗体”)。该双特异性复合体还包括形成特异结合对的 Ig-C_L 和 IgG_{C_{H1}} 连接分子。sc-MHC II 类肽复合体及 sc-Fv 抗体可结合相同或不同的分子，如 T-细胞受体或 T-细胞上的其它分子。

按照本发明的双特异性复合体可包括一个或几个配基结合分子。配基结合分子可以是如图 9B 中所示的单链抗体，或可以是能特异结合抗原的其片段或免疫球蛋白可变区(如 Fv)。这样的抗原结合性免疫球蛋白片段或可变区是已知的。参阅例如公开于 Brookhaven 蛋白质数据库(Brookhaven 蛋白质数据库，化学系，Brookhaven 国家实验室，Upton, 纽约(1973)和 Kabat 等人(见上文)中的蛋白质序列。

适于包括在本发明多特异性复合体中的单链抗体可用数种众所周知的方法制备。通常参阅 Pastan, I 和 Fitzgerald D., (1991)科学 254: 1173; Webber, 等人, 分子免疫学(1995), 32: 249; 和 PCT 申请公开 WO 96/05228 和 WO 97/28191 中关于制备和使用单链抗体的内容。典型的单链抗体是能特异结合诸如糖蛋白和脂蛋白之类的细胞表面靶目标的那些单链抗体。具体糖蛋白的例子包括但不限于 CD2、CD3、CD4、CD8、CD28、CD40、CD45、CTLA4 和 Fas。参阅 Gillilan L. K., 等人(1996)组织抗原 47: 1 中有关可结合这些分子的单链抗体的制备和鉴定方面的内容。

在另一实施方案中，上文式 I 中所示的配基结合分子 D 可以是受体配基，该配基可将复合体限制在细胞受体结合伙伴上。典型的受体配基包括 FasL。

作为制备含融合单链抗体之多特异性 MHC 复合体的可选择方法，在某些情况下将预期抗体(或其抗原结合片段)，如单克隆抗体偶联至本发明的 MHC 复合体上是有用的。例如，当编码所需抗体可变区的 DNA 序列未知时，这样的方法可能比较有用。一般地，偶联将包括标准蛋白质偶联反应，如概述于 Means, G.E. 和 Feeney, R.E. (1974) 《蛋白质的化学修饰》(Chemical Modification of Proteins), Holden-Day 中的那些反应。也可参阅, S.S. Wong (1991) 《蛋白质偶联和交联化学》(Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking), CRC Press. 典型的单克隆抗体包括能特异结合 CD28、CTLA4 或 FAS 的那些抗体。

如以前所提到，本发明还涉及包括非免疫球蛋白连接分子的多特异性 MHC 复合体。例如，第一和第二连接分子可以是包含如螺旋-转角-螺旋或亮氨酸拉链基元之类蛋白质-蛋白质结合基元或由它们所组成的蛋白质(或多肽)。这些结合基元的许多例子已被描述(参阅如 Horberg, 等人, (1993) 科学 262: 1401; Kamtekar 等人(1993) 科学 262: 1680; Harris, 等人, 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) (1996) 236: 1356)。这样的蛋白质-蛋白质结合基元通常形成特异结合对，并常发现于例如 fos、jun 等等转录因子中。下文实施例 14 公开了优选的非免疫球蛋白连接分子。

另外，应当理解，可用数种众所周知的方法修饰本发明的多特异性 MHC 复合体，使其适于预期用途。例如，复合体可按已知方法被二硫化物稳定化(参阅如 PCT 申请公开 W0/29350)。

本发明的 MHC 分子分子量将根据不同的参数而变化，包括是否分子是可溶或全长的(包括膜结合型)和/或是否选择 Ig-C_L 链或合适片段融合至 MHC 分子上。可溶的 MHC II 类融合复合体通常具有大于约 45kDa 的分子量，无跨膜和胞质结构域的成熟 α 和 β 链各自的分子量将大于约 20kDa，更通常是约 21—26kDa。一般地，无跨膜和胞质结构域的成熟单链 MHC II 类分子将具有约 48—50kDa 的分子量。对于全长(膜结合型)分子，成熟 α 和 β 链通常将具有大于约 25kDa 的分子量，优选分

插入编码 MHC 分子的序列及编码呈递肽的序列之间并用合适的连接酶连接起来。

DNA 区段中还可包括其他核苷酸序列。例如，控制编码 MHC 复合体之序列表达的启动子序列或指导 MHC 复合体至细胞表面或培养基中的前导序列可包括在构建体中或存在于此构建体将插入的表达载体中。典型的启动子包括免疫球蛋白或病毒启动子，如巨细胞病毒 (CMV) 启动子。参见以下实施例。构建体中还可包括强翻译起始序列，以增强翻译起始效率。优选的起始序列是 Kozak 共有序列 (CCACCATG) (SEQ ID NO: 1)。

优选包括于 DNA 构建体中的前导序列含有效放置的限制位点，以使编码目的呈递肽的寡核苷酸可以如需要与 MHC 分子连接。合适的限制位点可掺入前导序列的 3'-末端，在本文中有时被称为接点序列，例如长度约 2—10 个密码子，它被置于呈递肽编码区之前。尽管其他切割位点也可掺入呈递肽编码区之前，但其中一个典型的限制位点是 Afl II 位点。如上所述，这样的限制位点与一般置于接头编码序列起始处的另一个限制位点结合使用能使编码多种呈递肽的序列快速和直接地插入 MHC 复合体的 DNA 构建体中。典型的前导序列包含强翻译起始位点和其 mRNA 的 3' 末端加帽位点。例如，前导序列可连接到 I 类 MHC 分子的 $\alpha 1$ 结构域上，或前导序列可连接到 II 类 MHC 分子的 $\beta 1$ 结构域上。优选的前导序列能提供 MHC 融合复合体的分泌表达。

特殊的 sc-MHC II 类构建体例子包含连接在一起的、依次编码下述的核苷酸序列： β 链前导序列/呈递肽/接头序列/ $\beta 1-\Delta \beta 2$ 链/单链接头序列/ $\alpha 1-\alpha 2$ 链； β 链前导序列/呈递肽/接头序列/ $\beta 1-\Delta \beta 2$ 链/单链接头序列/ $\alpha 1-\alpha 2$ 链/Ig-C_L 链；和 β 链前导序列/呈递肽/接头序列/ $\beta 1-\beta 2$ 链/单链接头序列/ $\alpha 1-\alpha 2$ 链/Ig-C_L 链；其中 Δ 符号表示如上所述的 $\beta 2$ II 类链修饰，优选多达和包括基本上整个 $\beta 2$ 链的 $\beta 2$ II 类链缺失。sc-MHC II 类构建体的其它例子是刚提及的连接核苷酸序列，不同之处仅在于 Ig-C_L 链被合适 Ig-C_L 链片段取代。MHC DNA 构建体被适当地引入细菌、杆状病毒-昆虫细胞及哺乳动物表达系统，

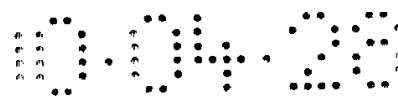
包括本文公开的那些特异表达系统。然后表达 MHC 复合体，若需要，还对其纯化以获得基本纯的 MHC 复合体。

如上所提到，本发明的 MHC 复合体包括那些含有 II 类 $\beta 2$ 链修饰和/或 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段融合以促进完全可溶并有功能的分子表达的复合体。然而，如果需要，MHC 复合体可作为细胞膜、如免疫细胞膜的部分提供。制备和使用膜结合形式的 MHC 复合体的方法已公开于 PCT 申请公开 96/04314。

构建表达本发明 MHC 复合体两条链的单个表达载体可能比较合乎需要，即编码 MHC 融合复合体 α 和 β 链的各序列均连接到一个表达载体中，即使不是单链分子也可以。这样的表达载体可能比 MHC 复合体的每条链各用独立载体的情况有更好的结果，在难于选择已引入载体的细胞时尤为如此。构建编码 MHC 复合体(如多特异性 MHC 复合体)各链以及其他因子，尤其是 B7 或 B7-2 之类 T-细胞共刺激因子的单个表达载体可能也合乎需要，即，编码 MHC 复合体各链的序列和编码共刺激因子的序列均连接到单个表达载体中，以使进行一次转化步骤即可。另外，此方法还可避免对已转化或转染两次或多次的细胞可能比较困难的筛选工作。

作为编码本发明多特异性 MHC 复合体的 DNA 载体的一个实例，该 DNA 载体可包括编码合适的连接分子的 DNA 区段，该 DNA 区段被重组融合至编码 sc-MHC II 类分子的另一 DNA 区段的 5' 或 3' 末端，包括例如重组融合的呈递肽。如果需要，该 DNA 序列可任选地融合至编码效应分子的序列上。优选的连接分子来自能特异结合另一免疫球蛋白轻链或重链恒定区的免疫球蛋白轻链或重链恒定区，用 SDS-PAGE 凝胶电泳测得分子量在约 20—30kDa 之间。

本发明的多特异性 MHC 复合体可用一种或多种策略联合生产。例如，通过在合适细胞中共表达：i) 编码 A-B₁-C₁ 链的 DNA 表达载体，和 ii) 如上定义编码 D-B₂-C₂ 链的 DNA 分子，可制备双特异性 MHC 复合体。在连接分子整个或部分来自免疫球蛋白的情况下，可使用制备和使用编码免疫球蛋白重链和轻链的 DNA 表达载体的合适方法(参阅，如 Near

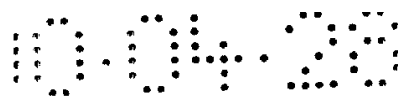


MHC 分子，优选编码呈递肽的 DNA 序列与 MHC 分子的 α 结构域连接，最好是使得呈递肽将与该 α 链的 N-末端连接。如上所述，优选在前导序列末端和接头起始处之间加入限制位点，以使基本上任何编码目的呈递肽（即抗原性或拮抗剂）的寡核苷酸均能与 β 链基因连接。

如前文所述， $\beta 2$ II 类链可被修饰并/或将 Ig-C_L 链或片段融合至 MHC 复合体上，以促进可溶性表达。用已知方法可分离和纯化所表达的 MHC 融合复合体。例如，在一种具体方法中，离心培养基，然后用亲和或免疫亲和层析纯化上清液，例如蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析或免疫亲和方案，包括使用可与表达的融合复合体如连接的 MHC 或其免疫球蛋白区结合的单克隆抗体。例如，可以用广为人知并公开于例如 Harlow, E. 等人，《抗体，实验室手册》(Antibodies, A Laboratory Manual) (1988) 中的方法，在单克隆抗体 L243-Sepharose 柱上通过亲和层析纯化含有人 HLA-DR1 序列的 MHC 融合复合体。L243 单克隆抗体对正确折迭的 HLA-DR1 分子的构象表位是特异的 (J. Gorga 等人，生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 262: 16087—16094)，因此优选用于纯化有生物活性的 MHC 融合复合体。MHC 复合体还可包含有助于纯化的序列。参阅，如下文中公开 6xHis 和 EE 标志的使用的实施例 7 和图 4A。

可按上文和 PCT 申请 WO 96/04314 和 WO 97/28191 以及下文实施例，包括实施例 1—8 所述制备单链 MHC 复合体。例如，可从合适的细胞系获得编码所需 MHC 蛋白质的 DNA，用 PCR 或其他方式扩增分离的基因。至于 MHC II 类分子，可将 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 基因片段克隆入载体，随后克隆编码带插入其中的单链接头序列的 $\beta 1$ - $\beta 2$ 结构域的基因片段。然后在合适宿主中表达此单个载体，再收获单链分子，需要的话还进行纯化。参阅下文实施例，包括实施例 1—8。还可参阅授予 Ladner 等人的美国专利 5, 260, 203，其中论述了单链抗体的制备，该方法通常可应用于本发明的单链 MHC 融合复合体。

在一种典型的制备方法中，具体地通过用 PCR 从 B 细胞系或其它 MHC 分子来源中分离编码区，获得 MHC II 类分子 α 和 β 链的编码区。



编码单链 β - α 融合 MHC 融合分子的序列可通过用如上所述连接 β 链基因至成熟 α 链(尤其是连接到 α 链基因的第二个密码子)的单链接头序列置换编码 β 链基因跨膜结构域的序列而构建。为进行单链融合复合体的膜结合型表达, α 链基因可适当地包含它的跨膜区, 或者, 为进行单链 MHC 融合复合体的可溶性表达, α 链基因可在胞外区域末端被截短。优选在 β 链前导序列和 β 链第一个密码子之间包含有对呈递肽比较合适的限制位点及接头。如上文所述, II 类 $\beta 2$ 链可缺失以促进可溶性表达, 此时 $\beta 1$ 链将与单链接头连接。可替代地或另外地, 可通过融合合适 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 片段至分子上, 优选在编码 β 链的末端, 进一步修饰所产生的构建体。然后基本上任何呈递肽的编码区均可作为寡核苷酸引入产生的限制位点内。再将此构建体适当地置于哺乳动物或细菌启动子, 包括本文公开的那些特异启动子的控制之下。应当理解, 通过连接至编码所需 Ig-C_L 链或片段的合适载体上, 可完成 Ig-C_L 链或合适 Ig-C_L 链片段的融合。参阅, 如 Near 等人(出处同前)和论述合适载体的以下实施例。

如上所提及, 本发明 MHC 复合体可包括多种效应分子。合适的效应分子包括那些赋予 MHC 复合体所需的生物学、化学或物理学性质的分子。更特别地, 效应分子可以是例如植物或细菌来源的细胞毒素, 如白喉毒素(DT)、志贺菌毒素、相思豆毒蛋白、霍乱毒素、蓖麻毒蛋白、皂草素、假单胞菌外毒素(PE)、美洲商陆抗病毒蛋白或 gelonin。这些毒素的生物学活性片段在本领域中是众所周知的, 包括例如白喉毒素 A 链和蓖麻毒蛋白 A 链。另外, 该毒素可以是在细胞表面有活性的因子, 诸如磷脂酶(如磷脂酶 C)。另一例子中, 效应分子可以是化疗药物, 如长春酰胺、长春新碱、长春碱、氮甲喋呤、阿霉素、博来霉素或顺式铂氨, 或另外地, 效应分子可以是放射性核素, 如碘-131、钇-90、铈-188 或铋-212。参阅如, Moskaug 等人, 生物化学杂志 264, 15709(1989); Pastan, I. 等人, 细胞 47, 641, 1986; Pastan 等人, 作为新型治疗剂的重组毒素 (Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents), 生化年鉴 (Ann. Rev. Biochem.) 61, 331,

(1992); “嵌合毒素” Olsnes 和 Phil, Pharmac. Ther., 25: 355(1982); PCT 申请公开 WO 94/29350; PCT 申请公开 WO 94/04689; 及美国专利 5, 620, 939, 各文献均在此引用作为参考。

合适效应物的更进一步例子是蛋白质标志,它是在生理 pH 下带电荷的多肽,如 6xHIS。在这种情况下,如果需要,用于纯化 MHC 复合体的合适合成基质应是例如可购买到的金属琼脂糖凝胶,诸如 Ni-Sepharose 或其他能在约 pH6-9 结合 6xHIS 的合适基质。EE 表位和 myc 表位是合适蛋白质标志更进一步的例子,这些表位可被一种或多种市售单克隆抗体特异结合。一般地,多种能被抗体,优选可购得的单克隆抗体特异结合的表位,能用作本发明 MHC 复合体的标志。

在本发明的一些实施方案中,将 MHC 复合体融合至带化学裂解位点或蛋白酶切割位点,如凝血酶或蛇毒蛋白酶切割位点的蛋白质标志可能是有用的,这样可以使该标记(或与该标志融合的有关 MHC 亚基)以可控制方式除去。

从前文应当理解,在某些情况下,诸如蛋白质标志之类的效应分子也可以是连接分子。效应分子可通过诸如 SPDP、碳二亚胺等等之类异双功能蛋白质交联剂与 MHC 复合体偶联。参阅 Meany 和 Feeney, 见上文; Wong, 见上文。

对于某些应用来说,非重组地修饰本发明 MHC 复合体将是有益的。例如,这可通过偶联所需因子而达到,尽管如果需要,该因子常常可重组融合至复合体上。例如,除诸如药物、酶、激素、能结合的螯合剂(如放射性核素)等上述因子之外,MHC 复合体还可包括多种药用因子,以及可用于疾病诊断或治疗的其他蛋白质和多肽。为了诊断的目的,MHC 复合体可以被标记或未标记。例如,可适当应用多种的标记,诸如放射性核素、荧光团、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、如半抗原之类的配基,等等。

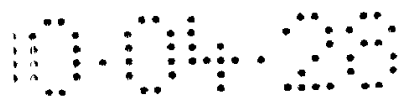
如上所提及,在某些情况下,通过包含融合的肽接头序列而灵活地放置本发明 MHC 复合体亚基可能是合乎需要的。数种合适的肽接头及其相应检测方法已被描述,并很容易适合于与复合体一起使用。另

外，在某些情况下，按众所周知的技术将因子添加到与 MHC 复合体融合的肽接头上可能是有用的。有用因子的例子包括光度计可检测标记，如染料或荧光团；以及酶（如 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，这些酶能形成光度计可检测标志）。总体参阅美国专利 5,434,051 关于合适的光度计可检测标志的论述。或者，可以用不涉及肽接头的多种其他方式将因子与本文公开的多特异性 MHC 复合体偶联，其中一些方法公开于下文中。

此外，如果需要，本发明的 MHC 复合体可通过如碳水化合物或脂肪酸添加等被翻译后修饰。例如，MHC 复合体可被糖基化修饰。蛋白质上的糖基化位点在本领域中是已知的，一般是 N-连接（天冬酰胺连接）或 O-连接（丝氨酸或苏氨酸连接）的。这样的糖基化位点可通过 MHC 复合体蛋白质序列的分析容易地鉴定出来。如 SDS-PAGE 凝胶电泳所显示，MHC 复合体可被合适的真核细胞糖基化。SDS-PAGE 凝胶电泳和其它相关方法可与酶消化之类常规生化技术结合，以检测与本发明 MHC 复合体结合的碳水化合物。优选的消化酶例子包括如可购自 New England Biolabs (Beverly MA) 并按制造商指示使用的内切糖苷酶和外切糖苷酶。因此，可很容易分析本发明 MHC 复合体中是否存在糖基，尤其是寡糖基。

在某些情况下，获得基本纯的糖基化形式的本发明 MHC 复合体可能是有用的。尤其是，在某些时候，当作为治疗剂施用，这样的糖基化 MHC 复合体在体内可能降解较少，从而增加了循环半寿期（参阅如，Goto, M. 等人，生物技术 (Bio/Technology) 6: 67(1988)）。因此，本发明的方法很适于获得大量基本纯的糖基化 MHC 复合体。

如果需要，本发明的 MHC 复合体可用一种技术或结合多种技术纯化。生产 MHC 复合体的典型方法包括在能表达该复合体的细胞中进行表达。例如，通过在昆虫细胞，如基于杆状病毒的蛋白质表达系统中表达 MHC 复合体，可获得 MHC 复合体。参阅例如下文实施例 5。合适的昆虫细胞包括那些能被杆状病毒感染的昆虫细胞，如来自秋粘虫（如 SF9 细胞）或粉纹夜蛾的细胞（参阅，如，Ausubel 等人，分子生物学最



新方法, John Wiley & Sons, 纽约, 1989; Summer 和 Smith, 用于杆状病毒载体和昆虫细胞培养操作的方法手册 (A Manual of Methods for Baculovirus Vector and Insect Cell Culture Procedures): Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555, Colledge Station, 德克萨斯 (1988); D.R. O' Reilly 等人, 杆状病毒表达载体: 实验室手册 (Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual), W.H. Freeman & Co., 纽约 (1992)). 合适的昆虫细胞还优选能在如转瓶、滚瓶、多组织培养皿、生物反应器或发酵罐中大规模生产外源蛋白质。

除了在昆虫细胞中表达本发明 MHC 复合体之外, 还可利用诸如哺乳动物细胞之类的其他真核细胞生产 MHC 复合体。参阅例如下文实施例 6。总的说来, 这些方法包括: 将编码 MHC 复合体的合适哺乳动物表达载体引入哺乳动物细胞中, 并在支持 MHC 复合体生产的条件下培养该细胞。合适的哺乳动物细胞是最好能在如转瓶、滚瓶、多组织培养皿、生物反应器或发酵罐中表达大量外源蛋白质的细胞。

术语“载体”(包括“表达载体”)用于此处意指能被引入宿主细胞导致目的核酸表达的任何感兴趣的核酸序列。载体可包括例如线性核酸序列、质粒、粘粒、噬菌粒和染色体外 DNA。特别地, 载体可以是重组 DNA。同样用于此处的术语“表达”或“基因表达”意指目的核酸序列的蛋白质产物的生产, 包括 DNA 的转录和 RNA 转录物的翻译。

用于表达本发明 MHC 复合体的其它合适细胞包括原核生物, 如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌; 以及其他真核生物, 诸如动物细胞和酵母株系, 如酿酒酵母和粟酒裂殖酵母。经常优选哺乳动物细胞, 如 J558、NS0、COS、CV-1、SP2-0、CHO、HeLa、p3-X63Ag8 或骨髓瘤细胞。参阅下文实施例 4—6。

除了本文公开的特殊细胞外, 可检测其他细胞表达 MHC 复合体的能力。总的说来, 检测几乎任何植物、昆虫、哺乳动物、细菌、真菌或酵母细胞表达、优选大规模表达本文所公开 MHC 复合体的能力是有可能的。

例如，检测细胞表达本发明 MHC 复合体情况的一种方法如下。通过将编码目的 MHC 复合体的 DNA 序列(最好位于合适载体中)用如转化或转染等方式引入细胞，进行蛋白质表达实验。导入编码目的 MHC 复合体的 DNA 序列后，在有利于 MHC 分子生产的条件下培养宿主细胞。然后用例如 ELISA、蛋白质印迹或 SDS-PAGE 凝胶电泳监测蛋白质表达以确定细胞是否在细胞内或细胞培养基中表达显示正确预定分子量的 MHC 分子。一般地，按 ELISA 或 SDS-PAGE 凝胶所测定，合适的细胞将能生产约 $1\text{ng}/1 \times 10^6$ 细胞/天至 $1000\text{ng}/1 \times 10^6$ 细胞/天或者更多。

在某些情况下，在合适真核细胞中瞬时表达本发明 MHC 复合体可能比较合乎需要。例如，如果真核细胞是昆虫或哺乳动物细胞，则通过合适 DNA 表达载体方式瞬时表达 MHC 复合体可能是有用的。

可依据涉及相容性的因素根据经验选择用于表达本文公开之 MHC 复合体的合适载体。例如，载体应与所用宿主相容，并具有适合于该宿主的合适复制子。另外，该载体必须能容纳编码 MHC 复合体的 DNA 序列。具体地说，对于本发明的多特异性 MHC 复合体，载体按需要可编码多特异性复合体的一部分，例如其中一半或其他预先选择的部分。

更特别的是，在细菌中复制的合适载体通常包括如：(i)在大肠杆菌中有功能、来自如 pBR322，优选来自众所周知的 pUC19 载体的复制起点；(ii)可选择的抗生素抗性基因，如氨苄青霉素和/或新霉素抗性基因；(iii)转录终止区，如大肠杆菌 trp 操纵子的终止区；(iv)转录启动子，如 phoA、tac、tac-lac、lacZ, lac^{uv5}、T7 或 T3 启动子；(v)前导序列，如 pelB 或 ompA 前导序列；(vi)编码目的 MHC 复合体的 DNA 区段和(vii)转录终止子，如来自大肠杆菌核糖体 RNA 位点的 T1T2 序列。如前面所提及，MHC 复合体将包括诸如基本上整条链被缺失之类的被修饰 II 类 $\beta 2$ 链，且/或 MHC 复合体包括诸如小鼠或人 C_L 片段之类的融合 Ig-C_L 链。

已发现，用特定的诱导条件可促进细菌内本发明 MHC 复合体的可溶性表达。术语“诱导条件”意指这样的培养条件，其中消耗掉培养

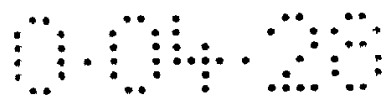


基中的一种必需营养物(如氨基酸或诸如磷酸盐之类的无机盐),从而诱导与编码 MHC 复合体之序列有效连接的特殊启动子的表达。因而优选进行细菌表达的编码 MHC 复合体的载体或区段被制成在这些诱导条件下表达最大化的形式。可在此诱导条件下培养的宿主细胞的具体例子包括下文实施例中提供的细菌。

例如,下文所述的 *phoA* 启动子是在缺乏磷酸盐的诱导条件下于细菌中表达 MHC 复合体的特别优选元件的例子。见下文实施例 4。构建体中还可包含强翻译起始序列以增强翻译效率。一般地,当培养基中磷酸盐被用完时,*phoA* 启动子的诱导被迅速启动。

通过在较长的生长期间诱导宿主细胞,可在细菌中表达编码 MHC 复合体的 DNA 载体。未与任何特殊理论结合,已发现诱导超过近 2—8 小时、优选约 4—6 小时,似乎可增强 MHC 复合体的表达。例如,制备包括与编码所需 MHC 复合体之序列有效连接的 *phoA* 启动子(强)的 DNA 载体。见下文实施例 3 和 4。然后用该 DNA 载体转化宿主细胞,使宿主细胞培养基中的磷酸盐经过几个小时、一般约 2—10 小时、更典型的是 4—6 小时消耗掉。已发现,当消耗掉了培养基磷酸盐时,强 *phoA* 启动子被诱导,显著增加了可溶并完全有功能的 MHC 复合体的量。

可设计另外的 DNA 载体,以便在真核细胞中表达 MHC 复合体。优选将 DNA 载体制成适于在细菌宿主中复制的形式,以便得到合适量的 DNA 载体。例如, DNA 载体通常可包括: (i) 在大肠杆菌中有功能的复制起点; (ii) 可选择的抗生素抗性基因; (iii) 强病毒启动子如巨细胞病毒(CMV)启动子和任选的增强子元件; (iv) 编码所需 MHC 复合体的 DNA 区段; (v) 生长激素多聚腺苷酸化序列,如牛生长激素(bgh)polyA 序列; 和(vi)编码可选择性真核标记的 DNA,例如强病毒启动子如猿猴病毒 40(SV40)启动子之类连接至与病毒多聚腺苷酸化序列(如 SV40 polyA 序列)融合的抗生素抗性基因(如新霉素)上。合适 DNA 载体的例子公开于下文实施例 6。如前文所提及, MHC 复合体常常包括被修饰的 II 类 $\beta 2$ 链, 优选基本上整条链的缺失, 和/或 MHC 复合体将包括融合的 Ig-C_L 链或诸如小鼠或人 C_κ 片段之类的合适 Ig-C_L 链片段。

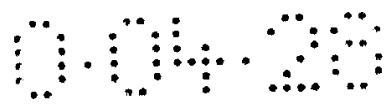


可按常规技术修饰用于所需哺乳动物细胞的本发明 DNA 载体，使在一种或多种其他哺乳动物细胞中的可溶性表达最优化。例如，编码上述新霉素抗性基因的真核标记可被例如编码胸苷激酶 (TK) 基因的 DNA 所置换，以促进在 TK⁻ (TK 缺陷型) 哺乳动物细胞中表达 sc-MHC 融合蛋白质。可以用本领域众所周知的其他方法 (如变换启动子、抗生素抗性基因，用免疫球蛋白、SV40、腺病毒或乳头瘤病毒启动子置换 CMV 启动子，等等) 修饰 DNA 载体，使 MHC 复合体在所需哺乳动物细胞中的表达最优化。或者，可将编码 sc-MHC 蛋白质的 DNA 序列插入众所周知适于在酵母或昆虫细胞中表达的载体内。见如 Ausubel 等人，见上文。

适合于在哺乳动物细胞中表达本发明 MHC 复合体的其它 DNA 表达载体包括来源于 pEE13 或 pCDNA-3 载体的 DNA 载体，如 SCE1，其中 MHC 复合体被置于合适的巨细胞病毒启动子的下游。见公开的各项 PCT 申请中的实施例及下文实施例 6。其他已知的 DNA 表达载体也可按本发明用于表达 MHC 复合体 (见如 Ausubel 等人，见上文和 Sambrook 等人，见上文)。

有多种标准方法可用于将编码所需 MHC 复合体的 DNA 区段或者携有该区段的 DNA 载体引入所需细胞中。例如，可以通过任何可接受的途径，诸如磷酸钙或 DEAE 葡聚糖介导的转染或转化、病毒或噬菌体感染 (用编码 MHC 复合体的重组病毒)、电穿孔、脂质体介导的转移或 biolistic 转移，按照常规技术 (参阅如 Cockett 等人，生物技术 (Bio/Technology) 8: 662 (1990); Ausubel 等人，见上文; 和 Sambrook 等人，见上文)，将 DNA 区段或 DNA 载体引入合适细胞中。然后在支持 MHC 复合体表达的条件下培养细胞，如在微载体或中空纤维培养系统、悬浮系统、与滚瓶、旋转瓶、生物反应器或发酵罐有关的培养系统; 使所选择的培养系统保持在培养基、空气和温度最适条件下。若需要，可优化培养条件，使其适于大规模生产所需的 MHC 复合体。见下文实施例 4—6。

在某些情况下，在将导致载体发生染色体整合的条件下增殖含编码 MHC 复合体之载体 (包括可选择标记) 的真核细胞可能比较合乎需



要。通过标记选择而获得的细胞系特别适用于组成型表达 MHC 复合体。

本发明的 MHC 复合体可包括多种 I 类或 II 类 MHC 分子。例如，参照图 1 中所描述的可溶性 sc-MHC II 类肽融合分子，其中 $IA^d\beta 1-\beta 2$ 和 $IA^d\alpha 1-\alpha 2$ II 类分子可被其它 I 类 (H-2 或 HLA) 或 II 类 (IA、IE、DR、DQ 或 DP) 分子独立地取代。或者， $IA^d\beta 1-\beta 2$ 和 $IA^d\alpha 1-\alpha 2$ II 类分子可以被 I 类或 II 类分子的呈递肽结合部分独立地取代。例如，图 4A 和 4B 显示了含 IA^d (图 4A) 或 DR2 (图 4B) 链的 sc-MHC II 类分子。通常 I 类或 II 类分子具有已知的 DNA 序列，从而可以用本文公开的重组 DNA 技术将该分子 (或其呈递肽结合部分) 制成 MHC 复合体的一部分。

更特别的是，本发明的 MHC I 类或 II 类分子包括变态反应或自身免疫相关的 MHC 分子，诸如与多发性硬化症 (MS) 相关的 HLA-DR2 (DRB1*1501)；HLA-DR4，HLA-DQ8 和 HLA-DQ7，它们均与类风湿性关节炎 (RA) 相关；与胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 相关的 HLA-Q8 (DQB1*0302)；与腹腔疾病相关的 HLA-DQw2；与 SJL/J 小鼠中实验性自身免疫脑脊髓炎相关的 IA 结构域；与 NOD 小鼠中的自发性糖尿病相关的 IAg7；与 DBA/1 小鼠中胶原诱导的关节炎相关的 IAq；或它们的肽结合部分。见下文实施例 3。

通过用可检测分子 (如 ^{125}I ， ^{131}I ， ^3H 或生物素) 标记呈递肽，并在足以使呈递肽装载到相应全长 MHC 分子上的条件下使标记的呈递肽接触 I 类或 II 类 MHC 片段，可容易地鉴定出 I 类和 II 类 MHC 分子的呈递肽结合部分。一般地，当于相当或相关负载条件下，与相应的全长 MHC 分子相比时，I 类或 II 类 MHC 分子的呈递肽结合部分将结合被标记呈递肽的至少约 50% (摩尔百分比)，更优选 60%、70%、80%、90% 或更多。某些 MHC 分子的某些呈递肽结合部分也已有报道。

总的说来，装载呈递肽至空 MHC 分子上的方法包括将纯化的 MHC 复合体与约 20—50 倍摩尔过量的呈递肽在升高的温度 (如约 $37^{\circ}C$) 温育约 20—60 小时。这些装载反应的最适 pH 可依 MHC 复合体中的具体 MHC II 类分子及所用呈递肽而变化，然而，通常装载呈递肽的最适 pH

为约 pH4.5-pH7. 可容易地用这些方法将几乎任何呈递肽装载至 MHC II 类复合体上。见下文实施例 8。也参阅 Stern, L. J. 等人, 1992, 细胞 68: 465; Sette, A. S. 等 1992, 免疫学杂志 148: 844。

而且, 可以通过与合适的可检测分子标记呈递肽, 使标记的呈递肽接触 MHC 复合体, 随后经例如 HPLC 凝胶过滤膜过滤、免疫吸收或旋转超滤监测在预期 pH 或 pH 范围内的装载情况, 对呈递肽和 MHC 复合体对的装载 pH 进行最优化。可以用标准分离技术将在特定 pH 或 pH 范围有负载的 MHC 复合体与未装载的被标记肽分开。通常, 将特殊呈递肽装载至 II 类 MHC 复合体中的最适 pH 或 pH 范围是导致至少约 50% (摩尔百分比), 更优选 60%、70%、80%、90% 或更多的 II 类 MHC 复合体被该肽结合的 pH 或 pH 范围。

有多种呈递肽可被装载或共价连接 (如重组融合) 至 MHC 复合体上。例如, 可将 OVA (323-339) 和 HSV-1 gD (246-261) 呈递肽融合或装载至可溶性的 sc-IA^d MHC II 类分子上 (参阅例如下文实施例 1 和 3)。其它的合适呈递肽包括变态反应相关肽, 例如来自昆虫变应原, 如室内粉尘螨变应原 DERp I; 家畜变应原, 如猫变应原 Fel d I 植物变应原, 如豚草变应原 Amb a I 和 Amb a V; 和神经元鞘蛋白的肽。例如, 下文的实施例 3 提供了氨基酸 84-102 的免疫显性 MBP 表位。令人感兴趣的其它可能的呈递肽包括蛋白脂质蛋白 (如氨基酸 30-49 的免疫显性表位和氨基酸 180-199 的免疫显性表位, 它们均与 MS 有关); 来自结构蛋白质, 如与 RA 相关的 II 型胶原的肽; 来自酶和肽激素, 如谷氨酸脱羧酶和与 IDDM 相关的胰岛素的肽。

MHC 复合体的典型呈递肽将具有约 4-35 个氨基酸, 优选约 6-30 个氨基酸, 更优选约 8-25 个氨基酸。尽管这些肽的 DNA 序列可用本领域已知技术容易地测定, 但优选这样的呈递肽由已知序列的 DNA 编码。其他合适的呈递肽包括猜测与变态反应、自身免疫疾病或二者均相关的那些呈递肽。按下文及 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中公开的 T-细胞试验, 可容易地检测这样的肽调节 T-细胞活性的能力。

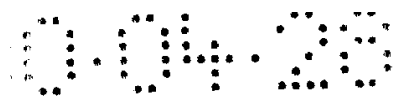
如前面所提到，可以多种方式纯化本发明的 MHC 复合体。例如，基本纯的 MHC 复合体通常优选至少 90—95%均质，对于许多药物、临床和研究应用来说，最优选至少 98—99%均质。一旦部分纯化，或达到制剂中所期望的均一性，则对于治疗应用来说，MHC 复合体应基本上无污染物。

还有多种其它纯化方法适用于本文公开的 sc-II 类 MHC 分子和多特异性 MHC 分子。例如，可以将诸如 EE 或 myc 之类本领域已知的其它标志融合至目的 sc-II 类 MHC 分子或多特异性 MHC 分子上，以制成“被标记”复合体。这样的“被标记”复合体可用数种已知的免疫亲和方法纯化，如应用金属琼脂糖载体或含能特异结合该标志并间接与 MHC 分子结合之抗体或其抗原结合片段、优选单克隆抗体片段的其它层析载体。还有其它一些已知的蛋白质纯化方法可用于纯化此“标记”分子，如免疫沉淀。这类方法的例子描述于下文实施例 7 中。

在多数情况下，本发明的 MHC 复合体将能修饰 T-细胞之类免疫细胞的活性。一般地，选择合适的呈递肽与所需的 MHC 复合体结合(通过装载或重组方法)，以激活肽特异性 T 细胞应答(如细胞因子分泌)。或者，可选择呈递肽，以通过例如本文公开方法诱导肽特异性 T 细胞的凋亡而抑制 T-细胞活性。检测本文公开的 MHC 复合体的生物活性的几种试验描述如下。见下文实施例 2、9—13。

更尤其是，本发明 MHC 复合体可用于许多治疗和相关应用中，包括调节各种免疫系统应答，如细胞凋亡、变态反应、细胞因子释放、免疫抑制和免疫细胞诱导。其中特别令人感兴趣的是直接或间接影响 T-细胞的那些免疫系统应答。例如，可检测带融合(共价连接)或非共价装载的呈递肽的 MHC 复合体抑制免疫反应性 T-细胞的能力，方法按诸如实施例 11 所描述的操作，其中公开了检测 Ig 类转换抑制及体内 T-细胞扩充抑制的方法。这些方法很容易适用于检测本发明的几乎任何 MHC 复合体抑制体内免疫反应性 T-细胞的能力。

对于某些治疗应用，可以施用编码与呈递肽连接之本发明所需 MHC 分子的 DNA 表达载体，以体内表达融合复合体。这样的方法避免了一



般与重组蛋白质制备相关的昂贵纯化步骤，并避免了与常规方法相关的抗原吸收和加工的复杂性。见下文实施例 12。

本发明还包括体外鉴定 T-细胞受体识别分子肽、包括能诱导 T-细胞发育的肽以及能拮抗 T-细胞受体的肽，即 T-细胞受体 (TcR) 拮抗剂或部分激动剂的方法。

抑制免疫应答的另一种方法涉及施用本文公开的含呈递肽的一种或多种多特异性 MHC 复合体有效量，所述呈递肽是 T-细胞拮抗剂或部分激动剂。

现已显示，若 APC 还运送共刺激信号，则 APC 表面上的肽-MHC 复合体将只诱导特异于 MHC 结合肽之反应性 T-细胞系的克隆扩充。在缺乏 APC 送递的共刺激信号时，人们认为这些反应性 TH 细胞被诱导至变态反应状态。分离自 APC 的可溶性杂三聚肽/MHC II 类复合体已显示可抑制 TH 细胞的免疫应答 (Sharma, S. D. 等人, 1991, 美国国家科学院院报 88: 11465—11469; Nicolle, M. W., 1994, 临床研究杂志 93: 1361—1369)。

本文公开的含有作为 T-细胞受体拮抗剂或部分激动剂的呈递肽的 MHC 复合体可作为无共刺激信号的可溶性复合体施用。

此外，本文公开的含有改变了与 CD4 受体之间结合情况的被修饰 II 类 $\beta 2$ 结构域的 MHC 复合体也可用于诱导 T-细胞至变态反应状态。

或者，本发明 MHC 复合体可以有效量的含有编码“全长”MHC 融合复合体 (即含一个或多个全长 MHC 蛋白质的复合体，该蛋白质包括有跨膜部分和与 MHC 分子共价连接的具拮抗剂或部分激动剂活性的呈递肽) 之 DNA 载体的 DNA 序列形式施用。

如上述 PCT 申请 WO 96/04314 中所公开的，sc-MHC I 类和 II 类分子可用于检测和鉴定肽。例如，本发明包括可用于对 T-细胞的未鉴定表位作图的方法，步骤如下：将编码随机肽文库或选定肽的序列克隆入本发明表达载体系统的呈递肽位置，如上文鉴定的含编码 sc-MHC 复合体的 DNA 序列及任选地编码接头序列的 DNA 序列的那些表达载体系统。可以合适地利用合适 cDNA 或基因组 DNA 文库的限制片段 (见

Sambrook, 等人, 见上文, Ausubel 等人, 见上文)作为插入表达载体的序列的来源, 或者将诸如已知序列的合成寡核苷酸之类的选定寡核苷酸用做插入序列。用含基因融合体, 即编码 MHC 分子的序列与编码附加肽的序列连接在一起的载体转化或转染合适的宿主, 诸如哺乳动物细胞和上述鉴定的其它细胞。在适当条件下培养转化子, 并筛选细胞表达按下文公开试验测得与 T-细胞克隆有反应性的目的融合复合体的情况。然后挑出反应性菌落并分离出载体。对 DNA 插入物的序列分析将表明哪一种克隆肽序列对应于 T-细胞克隆所识别的表位。空 sc-MHC 分子可以相同方式使用, 不同之处仅在于肽是被装载于空分子上, 而非用重组方法加入。本文公开的多特异性 MHC 复合体的相关用途在本发明的范围之内, 条件是对某些多特异性 MHC 复合体, 将应用一种以上的合适载体, 这些载体将编码多特异性 MHC 复合体的适当部分。

用体外或体内试验可容易地测定 sc-MHC 分子(带负载或融合的呈递肽)调节 T-细胞受体活性(包括 T-细胞应答失活)的能力。一般地, 用于这些试验的 T-细胞可由 T-细胞杂交瘤之类的转化 T-细胞系或分离自哺乳动物(如人或小鼠之类啮齿类动物)的 T-细胞提供。其它的合适 T-细胞包括: 1)可公开获得或可用已知方法制备的 T-细胞杂交瘤, 2)T 辅助细胞, 及 3)T 细胞毒性细胞, 优选细胞毒性 CD4⁺细胞。T-细胞可用已知方法从哺乳动物中分离。见例如 R. Shimonkevitz 等人, 实验医学杂志 158: 303 (1983)及下文的实施例。体外试验的合适例子已公开于 PCT 申请公开 W0 96/04314 和 W0 97/28191 中。具体地说, 公开的各 PCT 申请公开了使用含空的或有负载的肽结合位点的 sc-MHC II 类分子以及含重组融合呈递肽的分子的试验和方法。从下文应当理解, 公开于已公开的各 PCT 申请中的试验和使用方法可容易地适于本发明的 MHC 复合体。本发明多特异性 MHC 复合体的相关用途前已公开, 它们也在本发明的范围之内。

下面是测定含融合肽的本发明 MHC 复合体是否能调节 T-细胞活性的典型试验。应当理解, 该试验适于多种 MHC 复合体, 诸如本文公开

的那些有负载 MHC 复合体。该试验通常按下文的相继步骤 1—4 进行。T-细胞适当地表达可被检测并显示 T-细胞激活或激活后 T-细胞活性调节的标记。因而，例如下文实施例 2 和 9 中所公开的，可应用激活时表达白介素-2 (IL-2) 的小鼠 T-细胞杂交瘤 D0 11.10。检测 IL-2 浓度以确定具体的呈递肽是否能调节此 T-细胞杂交瘤的活性。这样的合适试验通过以下顺序步骤进行：

1. 从诸如感兴趣的 T-细胞杂交瘤中得到或从哺乳动物中分离携有特异于肽/MHC 复合体的 T-细胞受体的 T-细胞。

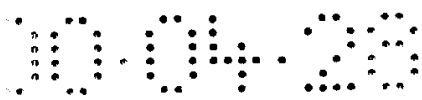
2. 在允许增殖的条件下培养 T-细胞。

3. 将增殖的 T-细胞与所选的 MHC 融合复合体接触。

4. 使 T-细胞与抗原呈递细胞接触以提供激活必需的信号，并分析标志，例如检测 IL-2 的生产。IL-2 产量增加，如 24 小时后 IL-2 产量增加 100% 或更多，更通常的是 24 小时后 IL-2 产量增加 1000% 或更多，表明 MHC 融合复合体可调节 T-细胞的活性并能抑制免疫应答。下文实施例 9 举例说明了这样的试验。该试验适用于分析不含跨膜部分的可溶性截短 MHC 复合体的活性。此外，该试验适用于鉴定含有作为 T-细胞受体拮抗剂或部分激动剂起作用的共价连接呈递肽的 MHC 融合复合体。该试验还可方便地与本发明的有负载 MHC 复合体一起使用。

在适于增殖的条件下温育试验中所用的 T-细胞。例如，将 D011.10 T 细胞杂交瘤在约 37℃ 和 5% 二氧化碳中适当温育于完全培养基（补充有 10% FBS、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺和 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇的 RPMI 1640）中。将系列稀释的 MHC 融合复合体加入 T-细胞培养基中。加至 T-细胞中的 MHC 融合复合体的合适浓度一般在 10^{-12} — 10^{-6} M 范围内。T-细胞活化信号由已装载适当抗原性肽的抗原呈递细胞提供。我们认为，最好使用产生稍低于最大 T-细胞活化的抗原剂量和 APC 数来检测 MHC 融合复合体对 T-细胞应答的抑制。与 MHC 融合复合体接触后 IL-2 产量的降低表明融合复合体可调节 T-细胞的活性并能抑制免疫应答。

或者，不检测诸如 IL-2 之类表达蛋白质，而可以通过用本领域接



受的放射标记技术检测抗原依赖型 T-细胞增殖的变化,适当地测定 T-细胞活化的调节。例如,可以向试验培养基中导入标记(如氘标记的)核苷酸。由该标记核苷酸掺入 DNA 的情况可测量 T-细胞的增殖。此试验不适于生长不需抗原呈递的 T-细胞,如 T-细胞杂交瘤。它适于检测 MHC 融合复合体对分离自哺乳动物之未转化 T-细胞的 T-细胞活化调节。与 MHC 复合体接触后 T-细胞增殖水平降低表明融合复合体可调节 T-细胞的活性并能抑制免疫应答。对于测量 MHC 融合复合体对体内 T-细胞克隆扩充中抗原特异性改变的影响,优选体外 T-细胞增殖试验。

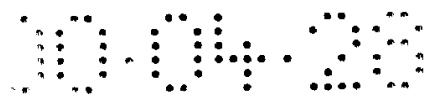
这些体外试验可用于选择和鉴定由随机文库之 DNA 或其他寡核苷酸编码的、能调节 T-细胞受体活性(包括 T-细胞发育的活化或抑制)的肽。具体地说,可以将编码随机肽文库或所选肽的 DNA 序列克隆入表达载体系统的呈递肽位置,所述载体例如是上文鉴定的含编码 MHC 分子之 DNA 序列及任选的编码接头序列的 DNA 序列的载体系统。适当地,可以将基因组 DNA 文库中适当 cDNA 的限制片段(见 Sambrook 等人,上文)用作插入表达载体中的序列的来源,或者,将诸如已知序列的合成寡核苷酸之类的所选寡核苷酸用作插入序列。用含基因融合体,例如编码 MHC 复合体的序列与编码呈递肽的序列连接在一起的载体转化合适的宿主,如哺乳动物细胞和上文所鉴定的其他细胞。在合适条件下培养转化子,并通过与所选择的 T-细胞接触而筛选细胞表达目的 MHC 复合体的情况。上述试验,例如测量 IL-2 产量或 T-细胞增殖的试验,可用于测定是否与 MHC 复合体接触可调节 T-细胞活化。例如,APC 刺激的 T-细胞的 IL-2 产量增加可鉴定出那些能调节 T-细胞活性的 MHC 融合复合体。或者,可用体外试验鉴定上文所述的多价 MHC 复合体,其中包含可增强 T-细胞应答的呈递肽。

也可合适地使用体内试验测定 MHC 复合体调节 T-细胞活性的能力,包括抑制或钝化 T-细胞发育的能力。例如,可分析 MHC 融合复合体抑制免疫球蛋白类别转换(即 IgM 变成 IgG)的能力(参阅如 P. Linsley 等人,科学, 257: 792—795 (1992))。这样的试验特别描述于下文实施例 13 中。

还提供了使用含 MHC 融合分子之本发明 MHC 复合体的诊断方法，包括体内诊断成像和 HLA 定型(参阅如 A. K. Abbas, 细胞和分子免疫学(Cellular and Molecular Immunology), 328 页(W. B. Saunders Co. 1991))。例如，用于体内成像时，可以给哺乳动物施用具放射性标记(如 ^{125}I , ^{32}P , ^{99}TC)或其他可检测标记的 MHC 融合分子，并对受试者用已知方法扫描 MHC 分子的结合情况。这样的哺乳动物分析可有助于许多失调的诊断和治疗，包括例如此处公开的不期望有的免疫应答的诊断和治疗。

含空肽结合结构域的本发明 MHC 复合体，例如本文公开的空 sc-MHC II 类分子，可用于筛选非共价结合于 MHC 分子的肽结合沟或裂缝中的呈递肽。这样的筛选可用于鉴定那些可结合特殊 MHC 分子，例如 IA^d 、DR1、IE、DP 和 DQ 之类 II 类 MHC 分子的呈递肽。例如，可用可检测标志(例如， ^{125}I 、生物素或本文公开的其它蛋白质标志)修饰 sc- IA^d /空分子，然后用于筛选随机肽文库。标记蛋白质和筛选文库的方法是众所周知的(参阅例如 Sambrook 等人，见上文，和 Ausubel 等人，见上文，John Wiley & Sons, 纽约，1989；此处引用作为参考)。多种随机肽文库中的任何一种均可被适当地应用[参阅如 J. Scott 等人，科学，249: 386(1990)；J. Devlin 等人，科学，249: 404(1990)；S. Cwirla 等人，PNAS (USA), 87: 6378 (1990)；J. Hammer 等人，实验医学杂志，176: 1007(1992)；D. O' Sullivan 等人，免疫学杂志，147: 2663(1991)]。能结合 sc- IA^d /空分子的肽可用于制备相应的有负载分子。然后可在此处所述的任何 T-细胞试验中检测有负载分子，以察看被鉴定肽是否能调节 T-细胞活性。

还可利用试验评估本发明 MHC 复合体治疗免疫失调的潜在用途。例如，实验性变应性脑脊髓炎(EAE)是小鼠中的自身免疫疾病，是已被接受的多发性硬化症模型。可以处理合适的小鼠品系，以产生 EAE，然后施用 MHC 融合复合体，并评估动物以确定施用 MHC 融合复合体后 EAE 的发展是否被抑制或阻止。这样的试验具体描述于 PCT 申请公开 WO 96/04314 和 WO 97/28191 中。



本发明 MHC 复合体诱导免疫应答的能力，包括对所针对疾病的免疫接种，可以用体内试验容易地测定。例如，可给诸如小鼠之类的哺乳动物施用包括融合重组肽的本发明 MHC 复合体或编码 MHC 融合复合体的 DNA，在最初用药时及其周期性地多数(如在施用融合复合体或 DNA 后 2、5 和 8 周时)从哺乳动物获取血样。从血样中收集血清并测定由免疫接种引起的抗体的存在情况。并可测定抗体浓度。下文实施例 12 和 13 具体描述了这样的试验。

在某些情况下，直接施用编码本发明 MHC 复合体、尤其是包括融合呈递肽的 MHC 复合体的 DNA 构建体，以在受试细胞中表达复合体是有用的。例如，可以将携带含融合呈递肽之 MHC 复合体的编码区、并适当地处于诸如 CMV 启动子之类恰当启动子和任选增强子的控制下的 DNA 直接注射入被试者骨骼肌中。为了保证 MHC 融合分子的展示将引起被试者体内的免疫应答，优选将编码共刺激因子的 DNA 载体与编码 MHC 呈递肽融合体的 DNA 一起施用于被试者。优选共施用的 DNA 载体包括例如含有处于 CMV 启动子控制下的 CD80 或 CD86 编码区的那些载体。所表达的 CD80 和 CD86 蛋白质可提供共刺激信号，以协助启动免疫应答。

诱导诸如哺乳动物之类被试者中免疫应答的这种方法具有明显优于现有方法的优越之处。外源蛋白质抗原呈递中的起始步骤是天然抗原与抗原呈递细胞(APC)的结合。在结合至 APC 后，抗原通过吞噬作用、受体介导的胞吞或胞饮进入细胞。这样的内化抗原被定位到胞内膜结合小泡(称为内体)中。内体-溶酶体融合后，抗原被位于溶酶体中的细胞蛋白酶加工成小肽。该肽与这些溶酶体内的 MHC II 类分子的 α 和 β 链相联系。事先在粗面内质网中合成的这些 MHC II 类分子被相继转运至高尔基复合体、然后至溶酶体区室中。肽-MHC 复合体被展示在 APC 的表面，以进行 T 和 B 细胞的活化。因而，抗原内蛋白水解加工位点的可接近性、溶酶体中所产生肽的稳定性及肽对 MHC 分子的亲和性是具体表位免疫原性的决定因素。这些因素不会因施用佐剂而改变。然而，直接表达 MHC 融合复合体(即 MHC 直接共价连接至呈递肽上)

应避免了这样的复杂情况，能诱导针对 MHC 融合分子上所携带表位的免疫应答。

然而，不采取直接给受试者施用编码 MHC 复合体的 DNA，而可以给受试者施用已引入这种 DNA 的宿主相容性抗原呈递细胞。也就是说，可以将编码本发明一种或多种 MHC 复合体的 DNA 引入宿主相容性抗原呈递细胞中，并将该转化或转染的抗原呈递细胞施用于目标宿主，因位点的定向性，将发生与适当 T-细胞的最有效相互作用。通过施用于被试者，这种设计细胞可在体内于细胞表面上表达该 DNA 编码的 MHC 复合体。可给被试者施用这种工程化细胞，以便如本文所公开诱导免疫应答或抑制免疫应答，这取决于细胞中其它共刺激信号的表达。也就是说，如果通过服用，细胞可在缺乏有效量共刺激信号或存在有效量耐受诱导信号的条件下提供 MHC 复合体，或者提供含有具拮抗剂或部分激动剂活性之呈递肽的 MHC 复合体，则可将该细胞施用于宿主以抑制免疫应答。例如，表达于细胞表面上、能与 T 细胞上的耐受诱导型受体(如 CTLA-4 或 Fas)相互作用的因子，可提供有效量的耐受诱导信号。或者，如果细胞在有有效量共刺激信号存在时可提供 MHC 复合体，例如细胞表面上表达诸如 B7 或 B7-2 之类的 T-细胞共刺激因子，则可将该细胞施用于哺乳动物宿主以诱发哺乳动物中的免疫应答，如本文所公开。优选构建如上述编码 MHC 复合体的两条链、以及 T-细胞共刺激因子(如果应用的话)的表达载体，并将该载体引入宿主相容性 APC 中，以制备可供施用的细胞。

本领域人员应当认识到，术语“宿主相容性”抗原呈递细胞意指与待引入该细胞的被试者或“宿主”属于相同单元型的抗原呈递细胞。优选转化的宿主相容性抗原呈递细胞是能迁移至已引入该细胞的被试者的淋巴结，并能在此位置表达 MHC 复合体的那些细胞。

本发明的 MHC 复合体及编码这种复合体的 DNA 构建体具有许多治疗用途。例如，可以施用 MHC II 类融合复合体以抑制哺乳动物的免疫应答，例如治疗患有或易患自身免疫失调(诸如多发性硬化症、胰岛素依赖型糖尿病、类风湿性关节炎，等等)的哺乳动物，包括人。还适于



治疗那些遭受或可能遭受不期望有的免疫应答的被试者，例如进行诸如心脏、肾、皮肤或其它器官移植之类的某类型外科移植手术的病人。在这样的情况下，治疗方案在外科手术之前开始比较合适。

依据本发明，有许多独特的方法可用于抑制哺乳动物的免疫应答。

具体地说，如上所述，在已公开的 PCT 申请中已显示，若还送递诸如来自抗原呈递细胞的共刺激信号，则 MHC 分子将只诱导 T-细胞系特异的克隆扩充。在缺乏共刺激信号，或至少缺乏送递 T-细胞增殖有效量的这种 T-细胞共刺激信号时，该 T-细胞将被诱导至变态反应或细胞凋亡状态，导致克隆缺失。

因此，在用于抑制免疫应答的一种治疗方法中，通过在基本缺乏任何共刺激信号的条件下施用有效量的一种或多种本发明 MHC II 类复合体，例如 MHC 融合复合体从而诱导对特异 T-细胞的变态反应并有效抑制不希望有的免疫应答。例如，可以施用“截短的”可溶性 MHC 复合体，即不含跨膜部分的 MHC 复合体。可特异于不希望有免疫应答的 T-细胞选择被施用的可溶性 MHC 融合复合体的呈递肽，以诱导关于那些 T-细胞的变态反应状态。用上文鉴定的体外方案可容易地鉴定和选择这样的呈递肽。

本发明的 MHC 复合体可通过注射，如腹膜内或静脉内注射适当地引入哺乳动物。局部用药，例如滴眼液，及通过鼻或肺吸入施用也应是有可能的。MHC 复合体，至少用于治疗用途的那些复合体，可在哺乳动物细胞中生产并在使用前纯化，以使其基本上或完全无任何细菌物或致热原。具体治疗应用的最适剂量可用常规方式测定。

本发明的 MHC 复合体，包括含有融合呈递肽的那些复合体，可以在含有融合复合体的治疗或药物组合物中被适当地引入受试者（特别是人或家畜，如牛之类的哺乳动物）。可以按本领域已知方法制备和使用本发明的这种药物组合物。例如，可在单位剂量或多剂量容器（例如密封的安瓿和小瓶中）中提供含治疗有效量 MHC 复合体的制剂，并可保存于冻干条件下，只需在临用前加入无菌液体载体（如对于注射来说是

水)即可。对许多用途还优选脂质体配方。肠胃外施用的其它组合物也比较合适,包括含水或不含水的无菌注射液,其中可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使药剂与预期接受者的血液等渗的溶质;含水和不含水的无菌悬液,其中可包括悬浮剂和增稠剂。

在用于抑制免疫应答的另一种治疗方法中,施用含有不能有效补充 T-细胞上 TCR-CD4 受体的被修饰 II 类 $\beta 2$ 结构域的本发明 MHC 复合体。使 T-细胞受体与肽-MHC 复合体相互作用而阻断与 CD4 的结合时,可导致部分激动剂 T-细胞信号传导和 T-细胞变态反应(Madrenas 等人,实验医学杂志,185: 219-229(1997))。MHC 融合复合体可如上述装载了呈递肽或共价连接了呈递肽。MHC 融合复合体可以是缺少全部或部分跨膜部分的截短形式,并可作为可溶性蛋白质如上所述施用。或者,MHC 融合复合体可以是全长的,即包含跨膜蛋白质。用这些复合体进行的治疗包括给哺乳动物施用有效量的包含编码本发明全长 MHC 融合复合体之 DNA 载体的 DNA 序列,所述全长 MHC 融合复合体含有被修饰的 II 类 $\beta 2$ 结构域。或者,治疗将包括给哺乳动物施用有效量的在表面上表达本发明全长 MHC 融合复合体的细胞,所述全长 MHC 融合复合体含有被修饰的 II 类 $\beta 2$ 结构域。

用于抑制免疫应答的另一种治疗方法包括施用本发明的多特异性 MHC 复合体,该多特异性 MHC 复合体含有 MHC 复合体和与 T-细胞上的耐受诱导受体可相互作用的一种或多种附加结合活性。例如,附加的结合活性可由与 T-细胞表面蛋白质(如 CTLA-4 或 Fas)有特异性相互作用的蛋白质或肽,诸如单链抗体或 FasL 所决定。CTLA-4 与 Fas 的作用导致 T-细胞功能的下调或 T-细胞的凋亡。MHC 复合体可以如上所述用呈递肽装载或共价连接呈递肽。多特异性 MHC 复合体可以是缺少跨膜部分的截短形式,并可作为如上所述的可溶性蛋白质施用。

用于抑制免疫应答的另一种治疗方法涉及施用含有共价连接的呈递肽的本发明 MHC 复合体,该呈递肽是 T-细胞受体拮抗剂或部分激动剂(参阅 A. Sette 等人,免疫学年鉴(Annu. Rev. Immunol.), 12: 413-431(1994))。MHC 融合复合体可以是截短的形式并可作为如上所

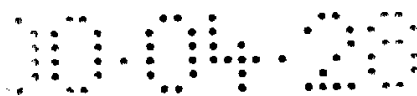
述的可溶性蛋白质施用。或者，该 MHC 融合复合体可以是全长的，即包含跨膜部分。用这些复合体进行的治疗将包括给哺乳动物施用有效量的含有 DNA 载体的 DNA 序列，所述 DNA 载体编码本发明的全长 MHC 融合复合体及作为 TCR 拮抗剂或部分激动剂的呈递肽。参阅例如以上论述及关于这种 MHC 融合复合体的制备及其免疫抑制治疗用途的下文实施例 3、11—13。作为 TCR 拮抗剂或部分激动剂的呈递肽可用上文鉴定的体外方法容易地鉴定和选择。含有作为 T-细胞受体拮抗剂或部分激动剂的 MHC 融合复合体特别优选用于治疗变态反应和自身免疫疾病，诸如多发性硬化症、胰岛素依赖型糖尿病和类风湿性关节炎。

此外，如上文及 PCT 申请 WO 96/04314 中所讨论的，可以给受试者施用已导入了编码本发明 MHC 复合体的 DNA 的宿主相容性抗原呈递细胞，以抑制免疫应答。通过施用，细胞在缺乏有效量 T-细胞共刺激信号时可表达 MHC 复合体，即诱导 T-细胞变态反应，和/或被施用的细胞表达含有具拮抗剂或部分激动剂活性之连接呈递肽的 MHC 融合复合体。

本发明的不同免疫抑制疗法也可以与诸如抗炎药之类的其他已知免疫抑制剂联合使用，以达到对 T-细胞介导失调的更有效治疗。例如，可以将免疫抑制性 MHC 融合复合体与诸如皮质类固醇和非类固醇药物之类抗炎剂联合使用，以治疗自身免疫失调和变态反应。

本发明还提供了在诸如人之类哺乳动物中引发免疫应答的方法，包括给人之类哺乳动物接种疫苗以抗感染性因子或癌症之类的所针对疾病，尤其是黑素瘤癌症，或疟疾之类的其它失调。

这些方法包括给哺乳动物施用有效量的含 DNA 载体之 DNA 序列，该 DNA 载体编码含跨膜部分的本发明 MHC 复合体，和/或施用含跨膜部分的这种 MHC 融合复合体和/或施用含编码这种 MHC 复合体之 DNA 的宿主相容性抗原呈递细胞。MHC 复合体表达载体的制备如上文及以下实施例 1—3 中所述。施用质粒 DNA、接受给药的被试者细胞摄取该 DNA 及蛋白质的表达方法均已被报道(参阅 J. Ulmer 等人, 科学, 259: 1745—1749(1993))。



在一种作为例证的方法中，将编码 MHC 复合体的 DNA 与编码 T-细胞共刺激因子的 DNA、如编码 CD80 或 CD86 的 DNA，一起施用于哺乳动物。CD80 基因及其表达描述于 D. Harlant 等人，美国国家科学院院报，91: 3137—3141(1994) 中。通过被试者细胞摄入该 DNA，将表达 T-细胞共刺激因子并能提供共刺激信号，从而协助免疫应答的起始。参阅已公开的 PCT 申请及未决的美国申请关于涉及含 CD80 或 CD86 基因之表达载体构建的内容。

尽管如上所述给人之类哺乳动物施用编码 MHC 复合体的 DNA 是引起被试者中免疫应答的一种方法，MHC 复合体还可通过其它途径适当地施用。因此，如上所述，可以给被试者施用已引入编码 MHC 复合体之 DNA 的宿主相容性抗原呈递细胞，以诱发免疫应答。通过施用，细胞在有有效量的 T-细胞共刺激信号如 CD80 或 CD86 存在下表达 MHC 复合体，以引起免疫应答，和/或被施用的细胞表达能引起免疫应答的全长 MHC 复合体，例如由下文实施例详述的操作测得 T-细胞增殖增加所显示。

或者，可以给受试者直接施用能引起免疫应答的本发明合适 MHC 复合体，例如，含有能刺激或诱导 T-细胞增殖之共价连接的抗原呈递肽的 MHC 复合体。尽管按需要可以在一些应用中使用空的或有负载的复合体，但通常 MHC 复合体将包括重组融合的呈递肽。

用于引起免疫应答的另一种治疗方法涉及施用本发明的多特异性 MHC 复合体，该多特异性 MHC 复合体包含 MHC 复合体及一种或多种能与 T-细胞上的共刺激受体相互作用的附加结合活性。例如，这种附加结合活性可由能与诸如 CD28 之类 T-细胞表面蛋白特异相互作用的蛋白质或肽，如单链抗体、CD80 或 CD86 所确定。由 CD28 提供的共刺激信号决定了 TCR 参与的结果，因为它们能增强 T-细胞的增殖及效应细胞的功能，诸如细胞因子产生和细胞溶解。如上所述，MHC 复合体可装载了呈递肽或共价连接了呈递肽。如上所述，多特异性 MHC 复合体可以是缺少跨膜部分的截短形式，并作为可溶性蛋白质施用。

本发明诱导免疫应答的方法，包括给被试者接种疫苗以抵抗目标

疾病，可与诱导免疫应答的已知方法联合使用。例如，本发明的 sc-MHC II 类复合体或编码这种 MHC 复合体的 DNA 构建体可与疫苗组合物配合或混合施用于被试者，以提高或延长这种疫苗组合物的所需效果。

此外，本发明的 MHC 复合体、编码这种复合体的 DNA 载体和含这种 DNA 载体的宿主相容性抗原呈递细胞均可通过多种其他途径施用于被试者。例如为了诱发免疫应答，优选本领域技术人员已知的方法将编码抗原性 MHC 融合复合体的 DNA 载体单独或与编码共刺激因子的 DNA 一起皮内施用于被试者。这样的给药会导致皮内抗原呈递细胞(如树突细胞)的转化和 T-细胞的增殖。MHC 融合复合体及编码这种融合复合体的 DNA 载体还可通过其他途径施用于被试者，如口服或经皮方式。

除了治疗人类疾病之外，本发明的 MHC 复合体，诸如包括融合呈递肽的那些复合体，和编码这种复合体的 DNA 构建体将对兽医应用具有重要价值，例如，可用于治疗牛、绵羊等之类家畜和狗、猫之类宠物的失调。

尽管本文公开的 MHC 复合体或编码这种复合体的 DNA 构建体可单独施用于被试者，它们也可作为药物组合物的一部分使用。药物组合物通常包含一种或多种本发明 MHC 复合体或编码这种复合体的 DNA 构建体，还含有一种或多种可接受载体。载体必须是“可接受的”，即与配方中的其它成分相容并对其接受者无害。例如，对于肠胃外用药，诸如注射药方，可制备含水的无菌溶液或悬浮液，或其它药学可接受溶液。这样的药物组合物可用本领域已知方法适当地制备。

具体治疗中所用的具体 MHC 复合体或编码它的 DNA 构建体的实际优选用量将随以下因素而变化：所用的具体活性化合物，配制的具体组合物，运用模式，施用的具体位置，病人体重，总体健康状态，性别等等，被治疗的具体病症，等等，及包括护理医生或兽医在内的本领域技术人员所认识到的其它这种因素。具体给药方案的最适给药比率可由本领域技术人员用如前述原则及此处公开试验所进行的常规剂

量测定实验容易地决定。

如前文所述，本发明的空 MHC 复合体，如空 sc-MHC II 类复合体，可与合适的呈递肽混合以形成本发明有负载的 sc-MHC 复合体。应当理解，这样的有负载复合体在如上所述需要施用 MHC 肽融合复合体的某些情况中可以合适地应用。在使用编码 MHC 肽融合复合体之 DNA 构建体的情况下，可应用一种或多种编码合适空单链 MHC 复合体的 DNA 构建体，条件是提供合适呈递肽非共价结合至空 MHC 分子的肽结合沟或裂缝中的合适条件。用于结合合适呈递肽至空单链 MHC 分子上的条件的例子更完整地论述于下文。本发明的有负载 MHC 复合体，如有负载的 MHC II 类肽融合复合体，在如上所述人、家畜和宠物失调的治疗中有一定用途。

应当理解，本发明的 MHC 复合体可按 PCT 申请公开 WO 96/04314 中所述方法用于构建转基因小鼠株系。这样的小鼠株系可作为例如其中 T-细胞之类特异免疫细胞活性可被调节的模型系统。

术语“特异结合”或类似术语意指按照如蛋白质印迹、ELISA、RIA、凝胶迁移率变动分析、酶免疫试验、竞争试验、饱和试验或本领域已知的其它合适蛋白质结合试验所测定，本文公开的分子能与另一分子结合，从而形成特异结合对，但它不识别和结合其他分子。关于检测蛋白质之间特异结合的合通常规方法，通常参阅 Ausubel 等人，见上文，Sambrook 等人，见上文，和 Harlow 和 Lane，《抗体：实验室手册》，CSH Publications，纽约(1988)。

还应理解，“启动子”意指在基因转录起始前转录酶复合体结合其上的 DNA 区段。为了构建转基因小鼠，优选的启动子包括由 Ohashi 等人在“细胞”65，305—317(1991)中所描述的 IA^d 启动子和大鼠胰岛素启动子。

本文所提及的所有文件均全文在此引用作为参考。

以下非局限性实施例用以说明本发明。

实施例 1 带有一个 TM 结构域的单链 II 类 MHC 分子(sc-IA^d/OVA)的构建和细胞表面表达

根据本文所述方法,用以下方法制备 sc-IA^d/OVA 融合分子(见图 1 和 SEQ ID NO: 24 和 25):

进行逆转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR),从分离自 A20-1.11 细胞的总 RNA 中扩增 IA^dα 和 β 链基因片段[K. Kim 等人,免疫学杂志,122: 546(1979)].为了便于克隆,通过 PCR 在基因片段两端引入合适的限制酶位点。通过 PCR,将编码一个 10 氨基酸肽接头的 DNA 序列引入 β 1-β 2 基因片段的 5' 末端,并将 Kozak 共有序列引入 β 信号序列的 5' 末端。编码 24 氨基酸接头及 OVA 抗原性肽的区域由退火寡核苷酸产生。在 pBlueScript-II 载体(Stratagene)中装配 PCR 片段和双链寡核苷酸,产生 sc-IA^d融合基因(见图 1 和 SEQ ID NO 24)。为了进行哺乳动物表达,通过亚克隆 sc/IA^d-OVA 基因(包括 α 链 TM 和胞质区域)到 pEE13 (Cell Tech)中 CMV 启动子的下游,产生 pSCT1 载体。pEE13 载体还携带有可选择的谷氨酸合成酶基因。

用以下方法检测 sc-IA^d/OVA 融合分子的细胞表面表达情况:选择被携有 sc-IA^d/OVA 融合基因之表达载体转染了的浆细胞瘤 NS-O 细胞,并用流式细胞仪检查 II 类分子的表面表达情况。用携带 sc-IA^d/OVA 融合基因的线性 pSCT1 DNA 通过电穿孔转染 NS-O 细胞。通过生长于无谷氨酰胺的培养基中选择细胞。14-21 天后,转染子(即 T12 细胞)变得比较明显,对其分析 II 类 MHC 分子的表面表达情况。用 FITC 偶联的抗 IA^dmAb (AMS-32.1; PharMingen)染色细胞,并用流式细胞仪检查荧光。用同型配对的 FITC 偶联抗 IA^kmAb (10-3.6; PharMingen)作为阴性对照。

图 2A 显示了有功能的单链融合分子的细胞表面表达。用 IA^d和抗 IA^kmAb,通过流式细胞仪分析稳定的转染子。T12 转染子的结果与其它三个独立转染子中所见相似(m. f. i. =平均荧光强度)。结果证明在转染了 sc-IA^d/OVA 表达载体的细胞表面上 sc-IA^d/OVA 的表达增强。对于 II 类分子的细胞表面表达,不需要有完整的 β TM 结构域;连接 β 和 α 链的柔性接头可代替 β TM 结构域的功能。最后,结果还证明共价连接呈递肽至单链 MHC II 类分子上促进了 MHC 分子的稳定装配和表面表

达。连接呈递肽至 β 链上还能使得单链 MHC 融合分子进行稳定装配和细胞表面表达。

实施例 2 细胞表面 sc-IA^d/OVA 融合复合体诱导体外 T-细胞应答

为了检查 OVA 肽是否正确折迭进入 sc-IA^d 融合复合体, 测定 sc-IA^d/OVA 转染细胞刺激 T-细胞的能力。其中使用表达 T-细胞受体 (TcR) 的小鼠 T-细胞杂交瘤 (DO 11.10)。TcR 识别 IA^d 前后序列中的 OVA323—339 肽。当这些细胞的 TcR 与 APC (在此是 sc-IA^d/OVA 转染子) 相互作用时, DO11.10 细胞分泌白介素-2 (IL-2)。在存在 T12 转染子之 NS-0 细胞 (1×10^5 /孔) 的条件下培养 DO11.10 细胞 (2×10^5 /孔) 24 小时, 并用 IL-2 特异 ELISA (PharMingen) 测定释放入培养基中的 IL-2。用作抗原呈递阳性对照的 20mM OVA 323—339 脉冲处理带有小鼠 IA^d 的 B 细胞淋巴瘤 A20-1.11 (1×10^5 /孔) [K. Kim 等人, 免疫学杂志, 122: 549 (1979)]。在只有 T12 细胞的培养基中未检测到 IL-2。如图 2B 所示, NS-0 细胞 (未转染) 不能刺激 DO11.10 细胞, 而转染了 sc-IA^d/OVA 融合基因的细胞很强地刺激 DO11.10 细胞释放 IL-2。这些结果与对另两个 sc-IA^d/OVA 转染子观察到的相似。IL-2 分泌的程度与对用 OVA 肽脉冲的带 IA^d 的 APC 观察到的相当。结果证明 OVA 肽正确折叠到 sc-IA^d 融合复合体中, 并且 IA^d 前后序列中的折迭 OVA 肽能被 DO11.10 细胞表面上的 TcR 识别。

实施例 3 单链 II 类分子基因和单链 II 类-IgG C_L 融合基因的构建

使用两种不同的 IA^d 限制性肽: 来自小鸡卵清蛋白 (Buus, S. 等人, 科学 235: 1353 (1987)) 的 OVA323—339 (ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO:26)) 和来自 HSV-1 糖蛋白 D (Grammer, S. F., 等人, 免疫学杂志 145: 249 (1990)) 的 gD 246—261 (APYSTLLPPELSETP (SEQ ID NO: 27))。将编码这些肽的寡核苷酸插入 sc-IA^d 基因中信号肽序列和肽接头之间 (见例如图 1 和 3A、B)。构建产生的融合基因编码不带肽 (sc-IA^d/空分子)、带有 OVA 323—339 肽 (sc-IA^d/OVA) 或 gD 246—261 肽 (sc-IA^d/gD) 的 sc-IA^d 融合蛋白质。

此实施例所述载体制备的详细方案如图 3A—3N 中所示。构建中用

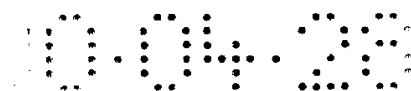
于 sc-II 类基因上的引物表如表 1 所示。进行逆转录酶-聚合酶链式反应 (RT-PCR)，从分离自 A20-1.11 细胞的总 RNA 扩增 IA^d α 和 β 链基因片段。以下寡核苷酸对用于开始的 PCR 扩增：IA^d β 前导序列基因片段-OPR132 (SEQ ID NO: 2)，OPR 133 (SEQ ID NO: 3)；IA^d β 1-β 2 基因片段-OPR102 (SEQ ID NO: 4)，OPR104 (SEQ ID NO: 5)；和 IA^d α 1-α 2-OPR100 (SEQ ID NO: 6)，OPR101 (SEQ ID NO: 7)。为了便于片段克隆，在随后的 PCR 扩增中于基因片段两端引入限制位点。通过 PCR，将编码 10 氨基酸肽接头的序列引入 β 1-β 2 基因片段的 5' 端，将 Kozak 共有序列 (SEQ ID NO: 1) 引入 β 信号序列的 5' 端。由退火寡核苷酸得到编码 24 氨基酸接头和抗原肽的区域。在 pBlueScript-II 中装配 PCR 片段及双链寡核苷酸，得到 sc-IA^d 融合基因，如图 3A 和 3B 中所示。

为了进行可溶性表达，sc-II 类融合基因编码用于正确分泌和加工的信号肽、插入抗原性或自身反应性肽的区域、肽接头序列、II 类 β 1-β 2 结构域、单链肽接头序列和 II 类 α 1-α 2 结构域。为了便于纯化和使 sc-II 类分子能够结合连接蛋白质和/或效应分子，可以将附加的序列插入 II 类 α 1-α 2 结构域之后。所述序列包括编码 6 组氨酸残基 (6 × His 或 6H)、抗体标志序列 (EE 标志) 或 IgG C_L 结构域的那些序列。

例如，sc-IA^d-IgG C_κ 融合构建体的制备进行如下：用寡核苷酸引物 IADF100 (SEQ ID NO: 8)、IADB100 (SEQ ID NO: 9) PCR 扩增 OVA-IA^d β 1-β 2-sc 接头-IA^d α 1-α 2 模板 (见实施例 1)。这些反应在 OVA 序列 5' 端加上了 EcoRV 位点，在 α 2 序列 3' 端加上了 κ 外显子/内含子序列和 BstB I 位点。将 sc-IA^d/OVA PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体中并验证序列。然后将融合基因亚克隆入带 CMV 启动子、小鼠 IgG κ 前导序列、克隆区、小鼠 κ 内含子和小鼠 κ 恒定区外显子序列的哺乳动物表达载体 pSUN6 (描述如下)。产生的载体被称为 pIADK。

1. 将多发性硬化症相关基因插入 II 类 MHC 分子

将多发性硬化症相关的 HLA-DR2 (1501) 基因连接成类似于 sc-IA^d 基因的单链形式 (见图 4A 和 4B)。sc-DR2 基因产物可与多发性硬化症



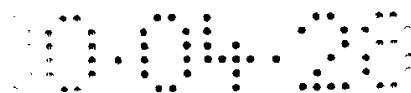
相关肽，如 MBP (83—102)Y83: Y-D-E-N-P-V-V-H-F-F-K-N-I-V-T-P-R-T-P-P (SEQ ID NO: 28) 复合(共价或非共价) (Arimilli, S. 等人(1995), 生物化学杂志 270: 971)。如先前所述(见 PCT 申请公开 WO 96/04314)分离 DRA1*0101 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 基因片段(编码氨基酸 1—192)。用将 HindIII 和 Xho I 位点加至其 5' 端、将 BamH I 位点加至其 3' 端的引物(OPR158, DR1A-B)通过 PCR 再扩增此基因片段。将 HLA-DR2 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 基因片段亚克隆(用 HindIII 和 BamH I)入带克隆区(HindIII、BamH I 和 EcoR I 位点)的穿梭载体 pJRS161.1, 以验证序列。将 HLA-DR2 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 基因片段亚克隆(用 Xho I 和 EcoR I)入细菌穿梭载体 SBIA, 此载体带克隆区(Nco I、Nhe I 和 Spe I 位点)、14 氨基酸的接头序列(T-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-S-S, SEQ ID NO: 29)和第二克隆区(Xho I、BamH I 和 EcoR I 位点)。将编码 EE 抗原标志(E-E-E-E-Y-M-P-M-E-P-G-终止子(SEQ ID NO: 30))的退火寡核苷酸(OPR203000 (SEQ ID NO: 12), OPR203001 (SEQ ID NO: 13))亚克隆入第二克隆区的 BamH I 和 EcoR I 位点之间。产生的载体被称为 SBDE1。还将 HLA-DR2 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 基因片段亚克隆入(用 Xho I 和 EcoR I)细菌穿梭载体 SIA, 该载体带克隆区(Nco I、Nhe I 和 Spe I 位点)、24 氨基酸的单链接头序列(T-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-S-S (SEQ ID NO: 31))和第二克隆区(Xho I、BamH I 和 EcoR I 位点)。将编码 EE 抗原标志的退火寡核苷酸(OPR203000, OPR203001)亚克隆入第二克隆区的 BamH I 和 EcoR I 位点之间。产生的载体被称为 SDE3。参阅 Kabat, E. A., (出处同前)关于涉及 HLA-DR2 (1501) 基因序列的内容。

对于 HLA-DRB1*1501 基因, 自人淋巴细胞系 D0208915 (ASHI 保藏机构登记号 9008) 分离总 RNA。用寡核苷酸引物 (DR2B-F (SEQ ID NO: 14), DR2B-B2 (SEQ ID NO: 15)) 进行 DRB1*1501 β 1- β 2 基因片段 (氨基酸 1-188) 的 cDNA 合成和 PCR 扩增。这些引物将 Nhe I 位点和一个 8 氨基酸接头序列加入到 β 1 序列的 5' 一端, 将 Spe I 和 EcoR I 位点加入到 β 2 序列的 3' 端。将该 DRB1*1501 PCR 产物克隆入 (Nhe I /EcoR I) 带 AflII、Nhe I 和 EcoR I 限制位点的载体。将编码 MBP (84-102)

(D-E-N-P-V-V-H-F-F-K-N-I-V-T-P-R-T-P-P (SEQ ID NO: 32))的退火寡核苷酸(MBPF, MBPR)亚克隆入 DRB1*1501 载体的 Af1 II 和 Nhe I 位点之间。将编码 24 氨基酸的单接头序列(T-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-S-S SEQ ID NO: 31)的 DNA 片段插入 DRB1*1501 载体的 Spe I 和 EcoR I 位点之间。最后, 将上述 DRA1*0101 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 基因片段(编码氨基酸 1—192)插入 sc-接头序列之后。所得载体携有 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ - $\beta 2$ -sc 接头-DRA1*0101 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 基因片段, 将其用做进一步操作的模板。

1. MHC II 类 $\beta 2$ 结构域中的缺失提高了可溶性表达

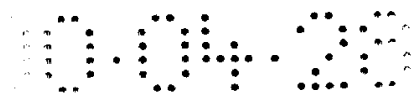
为了检测增加的可溶性表达, 制备在 $\beta 2$ 结构域中带缺失的单链 DR2 构建体(见图 4B)。在一例子中, 通过用适当的寡核苷酸引物(对细菌表达是 MB201806 (SEQ ID NO: 16)和 MB175959 (SEQ ID NO: 17), 对于杆状病毒表达是 MB201807 (SEQ ID NO: 18)和 MB175959 (SEQ ID NO: 17))对 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ - $\beta 2$ 模板进行 PCR 扩增, 删除整个 $\beta 2$ 结构域。这些反应将 MBP 序列改变为: Y-D-E-N-P-V-V-H-F-F-K-N-I-V-T-P-R-T-P-P (SEQ ID NO: 28)。将用于细菌表达的 PCR 产物克隆入细菌表达载体 8BIA (来自 pKC62, pKC62 描述于 1997 年 3 月 7 日递交的共同未决的美国申请 08/813,781 中, 其内容被引用作为参考)。该载体带有 phoA 启动子和 pelB 前导序列, 可用于克隆基因片段的诱导型可溶性表达。将 PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体中, 并验证序列。进行细菌表达时, 将 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ 片段(Nco I -Spe I)亚克隆入 SBDE1 载体, 得到 SDRB2 表达载体。进行杆状病毒表达时, 将 pGEM-T 中的 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ 片段克隆(Nsi I -Nco I)入被修饰成在多角体蛋白启动子控制下编码 mellitin 信号肽的 pBlueBac4.5 变体(Invitrogen)中。将 SBDE1 的 14 氨基酸接头-DR2 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -EE 标志融合基因片段(Spe I -EcoR I)亚克隆入带 MBP-DRB1*1501 $\alpha 1$ 片段的 pGEM-T 载体。将单链 DR2 Δ $\beta 2$ /MBP 片段克隆(Nsi I /EcoR I)入被修饰成在多角体蛋白启动子控制下编码 mellitin 信号肽的 pBlueBac4.5 变体(Invitrogen)。所得载体被称为 pMB959。



上述 pKC62 载体 (pSUN19) 已根据布达佩斯条约保藏于 12301 Parkman Drive, Rockville, MD 的美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。此 DNA 载体保藏于 1997 年 2 月 26 日, 保藏号为 97896。pKC62 载体包括 phoA 启动子、被修饰的 pelB 序列、基因 10 核糖体结合位点和细菌噬菌体基因 VIII 启动子。按标准方法, 该 DNA 载体可容易地在大肠杆菌或其他合适宿主细胞中增殖。

为了进一步修饰 $\beta 2$ 结构域, 用适当的寡核苷酸引物 (MB201807 (SEQ ID NO: 18) 和 MB201810 (SEQ ID NO: 21) 以及 MB201809 (SEQ ID NO: 20) 和 MB201808 (SEQ ID NO: 19)) PCR 扩增 pCI-neo/DR2 模板, 以将氨基酸 117 位的半胱氨酸密码子突变成丝氨酸密码子, 随后用 MB201807 (SEQ ID NO: 18) 和 MB201808 (SEQ ID NO: 19) 进行重叠 PCR。这些反应将 MBP 序列改变成如下序列: Y-D-E-N-P-V-V-H-F-F-K-N-I-V-T-P-R-T-P-P (SEQ ID NO: 28)。将 PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体中, 验证序列。进行杆状病毒表达时, 将 pGEM-T 中的 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ -mod $\beta 2$ 片段克隆 (Nsi I -Nco I) 入被修饰成在多角体蛋白启动子控制下编码 mellitin 信号肽的 pBlueBac4.5 变体 (Invitrogen) 中。将 SDE3 中 24 氨基酸的接头-DR2 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -EE 标志融合基因片段 (Spe I -EcoR I) 亚克隆入带 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ -mod $\beta 2$ 片段的 pGEM-T 载体中。将单链 DR2 $\Delta \beta 2$ /MBP 片段克隆 (Nsi I /EcoR I) 入被修饰成在多角体蛋白启动子控制下编码 mellitin 信号肽的 pBlueBac4.5 变体 (Invitrogen) 中。所得载体被称为 pMB808。

为了制备 sc-DR2-IgG C_κ 融合构建体, 用寡核苷酸引物 OPR215 (SEQ ID NO: 22)、OPR216 (SEQ ID NO: 23) PCR 扩增 MBP-DRB1*1501 $\beta 1$ - $\beta 2$ -sc 接头-DRA1*0101 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 模板。这些反应将 Age I 位点加到 MBP 序列的 5' 端, 改变 MBP 序列成 Y-D-E-N-P-V-V-H-F-F-K-N-I-V-T-P-R-T-P-P (SEQ ID NO: 28), 并将 κ 外显子/内含子序列及 Cla I 位点加至 $\alpha 2$ 序列的 3' 端。将 sc-DR2/MPB PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体中, 证实序列。随后将融合基因亚克隆入带 CMV 启动子、小鼠 IgG κ 前导肽序列、克隆区、小鼠 κ 内含子和人 κ 恒定区外显子序列的哺



乳动物表达载体 pKCM180 (下文详述) 中。产生的载体称为 pDRHK。

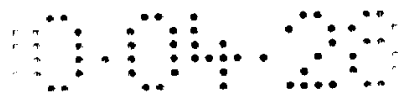
如下制备哺乳动物 Ig-C_κ 表达载体 pSUN6 和 pKCM180: 载体骨架是带 CMV 启动子以驱动克隆基因表达的质粒 pCDNA3 (Invitrogen)。用 HindIII/Xho I 切开该质粒, 并插入“轻链多接头”DNA 片段以产生起始 pCDNA:LCPL 载体。该接头包含限制位点 HindIII、Kpn I、Cla I、Pml I、EcoRV、Age I、Xma I、BamH I 和 Xho I, 以促进随后的克隆步骤。将含轻链前导序列、抗 CKMB κ 轻链基因组片段和 3' UTR 的 Sma I/Bcl I DNA 片段克隆入 pCDNA/LCPL 的 EcoRV/BamH I 位点。该片段中的小鼠内含子、外显子和 3' UTR 来自 pneo/20-10VL, [描述于 Near, 等人, (1990) 分子免疫学 (Mol. Immunol.) 27: 901 中]。随后进行诱变, 以消除和引入合适限制酶位点, 得到 pSUN6 载体。该载体带有 CMV 启动子, 其后是轻链前导序列和抗 CKMB κ 轻链基因组序列, 后者的可变区基因以 EcoRV/BstB I 片段存在, 而小鼠 κ 恒定区基因序列以 EcoN I/Xho I 片段存在。

为了制备人 C_κ 表达载体, 用带人 κ 恒定区的恰当 PCR 扩增片段取代 pSUN6 的小鼠 κ 恒定区序列 (EcoN I/Xho I)。产生的载体 pKCM180 带有 CMV 启动子, 随后是轻链前导序列、抗-CKMB κ 轻链可变区外显子、小鼠内含子和人 κ 轻链外显子序列。

上述 pDRHK 和 pIAdk 载体已按布达佩斯条件保藏于上列地址的 ATCC。两 DNA 载体保藏于 1997 年 9 月 17 日, 保藏号分别为 209274 (pDRHK) 和 209275 (pIAdk)。这些 DNA 载体按标准方法可容易地在多种合适哺乳动物宿主细胞中增殖。

实施例 4 细菌细胞中可溶性 sc-MHC II 类分子的表达

通过标准分子克隆方法, 用 SDE3 质粒 (如可溶性 sc-DR2 Δ β 2/MBP, 见实施例 3) 转化 MM294 大肠杆菌菌株 (Sambrook 等人, 见上文)。该载体携带有赋予氨苄青霉素抗性的基因。将转化的 MM294 细胞在高磷酸盐培养基 (10mM KH₂PO₄, 于已知成分培养基中—50 μg/ml 氨苄青霉素, 0.4% 葡萄糖, 0.15% 酪蛋白氨基酸, 0.0002% 硫胺素, 4mM tricaine, 10mM FeSO₄, 9.7mM NH₄Cl, 0.29mM K₂SO₄, 0.07mM CaCl₂,



0.53mM $MgCl_2$, 50mM NaCl, 40mM MOPS, pH7.4) 中 $30^{\circ}C$ 生长过夜。为了诱导 sc-DR2 基因产物的表达, 将细胞转移至低磷酸盐培养基 (0.1mM KH_2PO_4 于已知成分培养基中) 中, 于 $30^{\circ}C$ 培养 8 小时。收获细胞并重悬于 PBS+1% Triton-X100。超声处理破细胞壁, 并在离心后收集可溶性物质。用 MAS-96p (Harlan Sera-Lab) 作为捕获单抗 ($0.1 \mu g/\text{孔}$), HRP 偶联 L243 ($0.1 \mu l/ml$) (ATCC HB-55) 作为探针单抗, 通过构象特异性的 DR 特异性夹心 ELISA 检测所表达的 sc-DR2 分子。通过与亲和素过氧化物酶 ($0.25 \mu g/\text{孔}$) 温育、随后与 ABTS 底物 (Kirkegaard 和 Perry) 温育检测抗体结合。纯化的天然 DR2 用作阳性标准。这样的试验结果如表 2 所示。

表 2 细菌细胞中 sc-DR2 的生产	
构建体	检测到的 DR2
SDE3 (sc-DR2- $\Delta \beta 2$ /MBP)	$1 \mu g/g$ 细胞沉淀

这些结果显示, 缺少 $\beta 2$ 结构域的 sc-DR2 分子以能够被特异于正确折迭的天然 HLA-DR 构象的抗体所识别的形式表达。这是一个意外的结果, 因为 II 类分子的 $\beta 2$ 结构域已知与 $\alpha 2$ 结构域有相互作用, 并被认为在复合体的正确折迭中起重要作用 (见 Brown, J. H. 等人, 1993 自然 364: 33)。而且, 除去该结构域似乎提高了细菌细胞中 sc II 类分子的可溶性表达。这是没有料想到的, 因为带完整 $\beta 2$ 结构域的 sc-DR2 构建体在大肠杆菌中以不溶的形式表达。

1. 在细菌细胞中大规模生产 MHC 复合体

用细菌表达系统可完成可溶性 sc II 类分子的大规模生产。例如, 可以向含 80L 合成生长培养基的发酵罐中接种携有 sc-DR2 融合基因的转化 MM294。按标准细菌发酵技术维持细胞。一旦生长培养基中的磷酸盐被消耗完, 将诱导 sc-DR2 基因产物的表达。可以在适当的时间通过连续流动离心或用 Millipore Pellicon 切向流微孔过滤装置过滤收集细胞。可以用 Gaulin 压碎器破碎细胞, 随后离心获得含有 sc-MHC II 类分子的可溶性物质。预期每批发酵将生产约 0.01-0.1 克量的可溶性 MHC II 类分子。

实施例 5 在昆虫细胞中表达可溶性 sc-MHC II 类分子

用杆状病毒表达系统 (Invitrogen), 从 SF9 昆虫细胞中获得可溶性 sc-IA^d 和 sc-DR2 分子。按制造商说明书 (Invitrogen), 分别将编码不带肽 (sc-IA^d/空分子)、带有 OVA 323—339 肽 (sc-IA^d/OVA)、或带有 gD 246—261 肽 (sc-IA^d/gD) 的可溶性 sc-IA^d 的构建体亚克隆入 pBlueBac III 中杆状病毒多角体蛋白启动子下游。如上所述制备 sc-DR2 构建体 pMB959 和 pMB808。然后将融合基因分别重组入杆状病毒, 再与线性化 wt AcMN-PV (野生型) 一起进行脂质体介导的 SF9 昆虫细胞共转染。经有限稀释克隆后, 制备纯化的重组病毒原种。

更具体地说, 通过在补充有 10% 胎牛血清的 Hink's TMN-FH 昆虫培养基中感染 SF9 细胞 (1×10^6 细胞/ml), 进行可溶性 sc-IA^d 融合基因产物的生产。感染复数 (MOI) 约为 10。5 天后, 收集培养物上清液, 然后在亲和纯化前用 1M Tris 调至 pH8.0。用 M5/114 (Bhattacharya, A., M.E. Dorf, T.A. Springer. 1981. 免疫学杂志 127: 2488) 作为捕获单抗 ($0.1 \mu\text{g}/\text{孔}$), 用生物素偶联的 AMS-32.1 (Wall, K.A., M.I. Lorbver, M.R. Loken, S. McClatchey, 和 F.W. Fitch. (1993) 免疫学杂志 131: 1056) ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) (PharMingen) 作为探测单抗, 通过灵敏的 IA^d 特异性夹心 ELISA 检测表达的 sc-IA^d 分子。通过与亲和素过氧化物酶 ($0.25 \mu\text{g}/\text{孔}$) 温育、随后与 ABTS 底物 (Kirkegaard 和 Perry) 温育, 检测抗体的结合。

在另一实施例中, 检测在 $\beta 2$ 结构域中带修饰的可溶性 sc-DR 融合基因产物的生产。如上所述完成 SF9 细胞的感染。用 MAS-96p (Harlan Sera-lab) 作为捕获单抗 ($0.1 \mu\text{g}/\text{孔}$), HRP 偶联的 L243 ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) (ATCC HB-55) 作为探测单抗, 通过构象特异性的 DR 特异性夹心 ELISA 检测表达的 sc-DR2 分子。通过与亲和素过氧化物酶 ($0.25 \mu\text{g}/\text{孔}$) 温育、随后与 ABTS 底物 (Kirkegaard 和 Perry) 温育检测抗体的结合。纯化的天然 DR2 用作阳性标准。这些试验的结果如表 3 所示。

表 3 从昆虫细胞中生产 sc-DR2	
构建体	检测量
Pmb959 (sc-DR2- Δ β 2/MBP)	1.0 μ g/ml
PMB808 (sc-DR2-mod β 2/MBP)	0.1 μ g/ml

如上所述，这些结果是未料到的，因为 II 类分子的 β 2 结构域被认为在复合体的折迭中起重要作用 (参阅 Brown, J.H. 等人, 1993, 自然 364: 33)。缺少此结构域或在此结构域中有修饰的 sc-DR2 分子能被特异于正确折迭的天然 HLA-DR 构象的抗体所识别。此外，该结构域的去掉或修饰似乎提高了昆虫细胞中 sc-II 类分子的可溶性表达。这是没有料想到的，因为带完整 β 2 结构域的 sc-DR2 构建体在该系统中表达水平很低。

1. 昆虫细胞中大规模生产 MHC 复合体

可以进行可溶性 sc-II 类分子的大规模生产。例如，可以用约 2×10^{10} 个 SF9 昆虫细胞分别接种含 20L 生长培养基的 3 个旋转瓶。可按标准细胞培养技术维持细胞并用 50% 氧气：50% 氮气连续充气。然后用重组杆状病毒原种之一接种每个旋转瓶，并在合适时间用 Millipore Pellicon 切向流微孔过滤装置通过过滤收集 SF9 培养基。

实施例 6 哺乳动物细胞中可溶性 sc-IA^d 分子的表达

哺乳动物细胞系的转染和选择进行如下：在冰冷 PBS 中洗 1×10^7 NS0 细胞两次，重悬于 760 μ l 冷 PBS 中，并与 40 μ g (1 μ g/ μ l) Sal I 线性化质粒 SCE1 DNA (即对于 sc-IA^d/OVA 分子的可溶性形式) 混合。冰浴 5 分钟后，用 Gene Pulser (Biorad) 电穿孔该细胞，以运送 250 伏特、960 μ Fd 的脉冲。将脉冲过的细胞冰置 2—5 分钟，并加入到 30ml 非选择性培养基 (IMDM, 10%FBS, 2mM 谷氨酰胺, 5000 单位/ml 青霉素, 5000 μ g/ml 链霉素) 中。将细胞铺板到 96 孔平底组织培养板中，24 小时后，向每孔中加入 150 μ l 选择性培养基 (IMDM, 10%透析 FBS, 5000 单位/ml 青霉素, 5000 μ g/ml 链霉素, 1 $\times$ 核苷, 1 $\times$ 谷氨酸+天冬酰胺)。每周一次通过取出 100 μ l/孔旧培养基并加入 100 μ l/孔新鲜选

择培养基而给平板补充选择培养基，使细胞逐渐消耗培养基中的所有残留谷氨酰胺。SCE1 质粒上所带的谷氨酰胺合成酶基因能使得转染细胞在无谷氨酰胺的培养基中选择性生长。被质粒转染了的细胞的集落在 14—21 天后变得明显。

对带有 SCE1 载体 (即 sc-IA^d/OVA 分子的可溶形式) 的转染子进行增殖，通过上述 IA^d 特异性 ELISA 试验对 MHC 分子的表达和分泌进行筛选。SCE1 载体的构建已描述于 PCT 申请公开 WO 96/04314 中。来自两个 SCE1 转染细胞系之培养物上清液的这种试验结果显示于表 4 中。这些结果表明转染细胞可产生和分泌 sc-IA^d/OVA 分子。

表 4

SCE1 转染子细胞培养物上清液的 IA ^d ELISA 试验	
培养物上清液 (未稀释)	吸光度
NSO (亲代细胞系)	0.444
E10 (SCE1 转染子)	0.781
E11 (SCE1 转染子)	0.960
来自昆虫细胞培养物的 sc-IA ^d /OVA (阳性对照)	2.44

1. IgG C_κ 片段的融合可促进可溶性表达

为了检测 sc- Π 类分子的表达水平是否可提高，制备 sc-IA^d/OVA 分子和 IgG C_κ 片段的基因融合体 (见实施例 3)。将此构建体按以下步骤转染入哺乳动物细胞系：在冰冷 PBS 中洗 1×10^7 NSO 细胞两次，重悬于 790 μ l 冷 PBS 中，并与 10 μ g (1 μ g/ μ l) Pvu I 线性化质粒 pIADK DNA 混合。冰置 10 分钟后，用 Gene Pulser (Biorad) 传递 250 伏特、960 μ Fd 的脉冲，电穿孔细胞。将经过脉冲的细胞冰置 10 分钟，再加入 10ml IMDM 培养基 (IMDM, 10%FBS, 2mM 谷氨酰胺, 5000 单位/ml 青霉素, 5000 μ g/ml 链霉素) 中。将细胞在 37℃、5%二氧化碳条件下于 T25 组织培养瓶中培养，24 小时后，加入 20ml 新霉素选择培养基 (IMDM 培养基, 1.5mg/ml G418)。然后将细胞以 200 μ l/孔转移至 96 孔平底组织培养皿中，温育于 37℃、5%二氧化碳中，并每 3—7 天换入新霉

素选择培养基。pIADK 载体带有可允许稳定转染细胞选择生长的新霉素抗性基因。被载体转染了的细胞集落在 14—21 天后变得明显。增殖带 pIADK 载体的转染子，并且用前述 IA^d 特异性 ELISA 筛选转染子表达可溶性 sc-分类 II -C_κ 分子的情况。由昆虫细胞产生的纯化 sc-IA^d/OVA 用作参照标准。来自 4 个 pIADK 转染细胞系的培养物上清液的该试验结果示于表 5 中。

表 5

哺乳动物细胞中 sc-IA ^d /OVA-C _κ 的生产	
细胞系	产生的可溶性 IA ^d
NSOB7	81ng/1 × 10 ⁶ 细胞/天
NSOE2	156ng/1 × 10 ⁶ 细胞/天
NSOG4	116ng/1 × 10 ⁶ 细胞/天
NSOD4	109ng/1 × 10 ⁶ 细胞/天

这些结果表明可溶性 sc-IA^d-C_κ 融合分子以能被两种构象特异性抗体识别的形式产生。基于这些结果，在装有 2 升新霉素选择培养基的旋转瓶中增殖和培养 NSOE2 转染子。

如以下实施例 7 所述纯化 sc-IA^d-C_κ 融合分子。

另外，在哺乳动物细胞中检测人 sc-II 类-C_κ 融合蛋白的可溶性生产。用 pDRHK 表达载体转染 CHO 细胞，并对其在新霉素选择性培养基(参阅上文)中的生长进行筛选。用两种不同的 ELISA 形式筛选稳定转染子生产可溶性 sc-DR2/MBP-C_κ 分子的情况。在第一种形式中，用抗人 κ 抗体作为捕获抗体，HRP 偶联的 L243 (ATCC HB-55) 作为探测单抗 L243 单抗特异于 HLA-DR 分子上的构象表位。因此，此试验形式可检测正确折迭的 DR2-C_κ 融合体。在第二种形式中，用抗-HLA-DR L227 单抗(ATCC HB-96)作为捕获抗体，HRP 偶联的 L243 (ATCC HB-55) 作为探测单抗。L227 和 L243 单抗分别特异于 HLA-DR 分子上的线性和构象表位。此试验形式可检测分子上正确折迭的 DR2 部分。通过与亲和素过氧化物酶温育、随后与 ABTS 底物(Kirkegaard 和 Perry)温育，检测抗体的结合。这些试验的结果显示于表 6。

表 6—哺乳动物细胞中 scDR2/MBP-C _κ 的生产		
细胞系	ELISA 读数(吸光度)	
	抗 κ 抗体:L243-HRP	L227mAB:L243-HRP
CHOE12	1.056	0.245
CHOA5	1.445	0.434
未转染 CHO(阴性对照)	0.078	0.071

结果表明, 转染细胞产生了可溶性 sc-DR2/MBP-C_κ 融合分子, 并释放入培养基中。可溶性 DR2/MBP-C_κ 分子折迭成构象正确的形式。

2. 在哺乳动物细胞中大规模表达 MHC 复合体

本文所述 NS0 和 CHO 细胞表达系统可用于生产大量 sc-MHC II 类分子(空的或与肽共价连接的分子)。例如, 可选择表达 sc-DR2/MBP-C_κ 分子的转染 CHO 细胞系, 并在三个分离的中空纤维生物反应器中生长至汇合。按标准生物反应器技术, 将约 1×10^9 CHO 细胞接种入中空纤维生物反应器柱体(Unisyn)的毛细管外空间(EC)。在转染 CHO 细胞生长期间, 新鲜的加氧培养基连续循环通过中空纤维。然后从 EC 室中收获可溶性 sc-MHC II 类分子(每天)30—120 天。预期每个生物反应器将得到约 0.1—1g 量的各种可溶性 MHC II 类分子。

实施例 7 可溶性 sc-MHC I 类和 II 类分子的纯化

将来自以上实施例 5 的昆虫细胞培养上清液通过蛋白 A 琼脂糖柱。然后将未结合物质过 MK-D6 单抗(参阅 Kappler, J.W., B. Skidmore, J. White, P. Marrack. 1981. 实验医学杂志, 153: 1198)蛋白 A 琼脂糖柱。用 20mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 1M NaCl、20mM Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤柱。用 50mM 甘氨酸-HCl (pH 11.0) 洗脱 sc-IA^d 融合蛋白并立即中和至 pH 8.0。用 Centricon 30 浓缩融合蛋白质并将缓冲液更换为 20mM Tris-HCl (pH 8.0)。这些方法可容易地应用于从携有 sc-II 类基因之哺乳动物细胞产生的培养上清液中大规模纯化可溶性 sc-II 类分子。一般地, 此纯化方法得到 200—1000 μg sc-IA^d/肽分子/升昆虫细胞培养基。

通过亲和柱洗脱物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)评估

制剂的纯度。凝胶显示主要带约为 50kDa (图 5A, 泳道 1、2 和 3)。如所预期的, 这些分子被糖基化, 并由于连接肽而显示质量稍有不同。蛋白质印迹分析证实了在 sc-IA^d/OVA 蛋白质样品中存在 OVA323-339 肽(图 5A, 泳道 5)。在其它蛋白质检测试验中, 纯化的固定 sc-IA^d/OVA 和 sc-IA^d/空蛋白质独立地被特异结合 IA^d 的单克隆抗体(如, MK-D6, M5/114, AMS-32.1, 39-10-8 或 34-5-3)结合。能特异结合 MHC 分子的其它单克隆抗体可公开获自数种来源, 诸如上述地址的 ATCC 和 Linscott's Directory。

在另一实例中, 利用使用 MK-D6 单抗的亲合层析方法从哺乳动物组织培养基中纯化 sc-IA^d/OVA-C_κ 融合分子(见实施例 6)。

用于 MHC II 类分子免疫亲和纯化的方法以前已有描述(Gorga, J.C., V. Horejsi, D.R. Johnson, R. Raghupathy 和 J.L. Strominger. (1987) 生物化学杂志, 262: 16087)。这些方法通常可应用于纯化本发明的可溶性 sc-MHC I 类或 II 类蛋白质。例如, 对于带有 HLA-DR 或 HLA-DQ 结构域的 sc-MHC II 类融合蛋白质, 可利用单克隆抗体 L243 和 G2a.5(分别对 DR 和 DQ 具免疫特异性, 可获自 ATCC)免疫纯化含这些结构域的 sc-MHC II 类分子。在一实例中, 这些方法被用于纯化昆虫细胞中产生的 sc-DR2 Δ β 2/MBP 分子(见实施例 5)。纯化结果如图 5B 所示。

如上所提到, 可溶性 sc-II 类分子可被设计为含标志。这样的“标记”分子可用标准技术方便地纯化。例如, 含 6×His 标志的分子可按前述方法在 Ni-IDA Sepharose Fast Flow 柱上亲和纯化。简单地说, 用 PBS、0.5M NaCl、0.2% (v/v) 吐温 20, pH8.0 平衡柱。粗洗涤之后, 可以用通过混合不同部分缓冲液 A (20mM Na₂HPO₄, pH7.0, 0.2M NaCl) 和缓冲液 B (20mM NaH₂PO₄, pH3.0, 0.2M NaCl) 产生的逐步 pH 降低洗脱 sc-MHC II 类蛋白质。另一实例中, 可以通过常规免疫亲和层析, 使用抗 EE 标志单抗-蛋白质 A Sepharose 柱纯化含 EE 标志的可溶性 sc-MHC II 类分子。可以用蛋白质 A Sepharose 柱通过常规亲和层析纯化 sc-II 类/IgG 融合分子。参阅 Ausubel 等人, 见上文; 和 Sambrook

等人，见上文。

对本领域技术人员显而易见的是，前述 sc-MHC II 类分子纯化方案可容易地适用于本发明其他 MHC 分子的大规模制备和纯化。

实施例 8 sc-MHC II 类/肽复合体的形成

为了检测实施例 7 中产生的 sc-IA^d/空融合分子是否能有效地结合肽，将 sc-IA^d/空分子固定，然后与 50 倍摩尔过量的 OVA323-339 在柠檬酸盐缓冲液 (pH5.0) 中于 37℃ 温育 20 小时。用 PBS 将这些复合体洗两次，并通过上述试验检测其刺激 T-细胞应答的能力。装载肽于 MHC II 类分子上的方法已有报道(见例如 Stern, L. J. 等人，见上文)。这些方法可容易地应用于装载基本上任何呈递肽至 MHC II 类复合体上。通常，这些方法包括将纯化的 II 类分子与 20-50 倍摩尔过量的肽在 37℃ 温育 20-60 小时。这些反应的最适 pH 依所用的具体 MHC II 类分子和肽而变化，然而，很好地装载呈递肽的最适 pH 一般在约 pH4.5-pH7 之间(Sette, A., S. 等人(1992)免疫学杂志, 148: 844)。用 HPLC 凝胶过滤、膜过滤、免疫吸收或旋转超滤可将 MHC II 类/肽复合体与游离肽分开。

我们发现实施例 7 中产生的固定化 sc-IA^d/空分子能有效地结合肽。见图 6C。

实施例 9 可溶性 sc-MHC II 类/肽复合体的功能

按本文所述方法检测以上实施例 4、5 和 6 中产生的可溶性 sc-IA^d II 类分子刺激 T-细胞杂交瘤细胞系释放 IL2 的能力。用可溶性 sc-IA^d/OVA 和 sc-IA^d/gD 分子 (PBS, pH7.0) 包被 96 孔 Immulon II 平板 (Dynatech) 中的孔过夜。然后将 T-细胞杂交瘤 D011.10 细胞系加入用 sc-IA^d/OVA 分子包被了的孔中，将 GD12 杂交瘤细胞系加入用 sc-IA^d/gD 包被了的孔中 (1×10^5 细胞/孔)。当 D011.10 细胞上的 TcR 与 IA^d/OVA 复合体相互作用时，细胞将分泌白介素-2 (IL-2) 和 IL-4。如图 6A 中所示，固定化的 sc-IA^d/OVA 诱导 D011.10 细胞剂量依赖性地释放 IL-2。这些结果证实实施例 5 中产生的 sc-IA^d/肽融合分子能被 D011.10 细胞的 TcR 识别。如所预期的，D011.10 细胞对 sc-IA^d/空分

子无应答。对 IL-4 的产生可见相似结果。

用 GD12 T-细胞杂交瘤获得抗原特异性的进一步证据。如图 6B 中所示, GD12 细胞对固定的 sc-IA^d/gD 应答很好, 但不被 sc-IA^d/OVA 分子刺激, 而 D011.10 细胞显示相反的应答特异性。

以前的研究已显示昆虫细胞中产生的 II 类杂二聚体分子可结合外源加入的肽 (Stern, L. J., 和 D. C. Wiley (1992) 细胞 68: 465, Scheirle, A., B. 等 (1992) 免疫学杂志 149: 1994, Kozono, H., 见上文)。可是, 也发现 IA^d α 和 β 链发生解离并不能呈递肽 (Kozono, H., 见上文)。为了检测实施例 5 中产生的 sc-IA^d MHC II 类分子是否稳定并能负载合适呈递肽, 按本文所述方法将纯化的 sc-IA^d/空分子与 OVA 323-339 肽温育 (如, 见实施例 8)。随后洗涤去除未结合肽, 发现固定化复合体能激活 D011.10 细胞 (图 6C)。这些结果一起表明单链形式可稳定 IA^d 分子, 可用于纯化和装载外源加入的或共价连接的肽。

在另一实例中, 利用 D011.10 细胞因子释放试验检测实施例 6 中产生的 sc-IA^d-C _{κ} 融合分子的功能性。简洁地说, 将纯化的 sc-IA^d-C _{κ} 融合蛋白质 (1.1 μ g/孔) 包被到 96 孔板上。昆虫细胞来源的 sc-IA^d 分子 (1.1 μ g/孔) 用做对照。或者, 最初将多克隆抗小鼠 κ 抗体 (200ng/孔) 包被到平板上, 然后加入融合蛋白质 (1.1 μ g/孔) 并用抗 κ 抗体捕获。用 PBS 洗平板两次并加入 1×10^5 个 D011.10 T-细胞 (200 μ l)。37 $^{\circ}$ C 24 小时后, 收集培养上清液并用 ELISA (PharMingen) 测定 D011.10 T-细胞释放入培养基中的 IL-2 量。IL-2 的释放量是 D011.10 T-细胞受体和 IA^d/OVA 复合体之间发生有功能的相互作用后 T-细胞活化水平的度量。IL-2 ELISA 的结果显示于表 7 中。

表 7-sc-IA ^d -C _{κ} 融合分子的功能性	
固定化蛋白质	释放的 D011.10 IL-2 (pg/孔)
NSOE2 sc-IA ^d /OVA-C _{κ}	500
昆虫细胞 sc-IA ^d /OVA (阳性对照)	528
昆虫细胞 sc-IA ^d /gD (阴性对照)	0
抗 κ 抗体捕获的 NSOE2 sc-IA ^d /OVA-C _{κ}	72

结果表明, sc-IA^d/OVA-C_k被固定化或被抗 κ 抗体捕获时都是有功能活性的。这些结果出乎预料, 因为我们以前发现 sc-IA^d和 IgG CH2-CH3 结构域之间的类似融合得到的分子不被 IA^d特异性 ELISA 试验或 T-细胞刺激试验所识别。

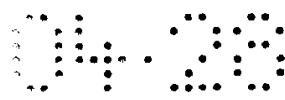
实施例 10 可溶性 sc-IA^d/肽融合复合体诱导细胞凋亡

利用 D011.10 细胞检测可溶性 sc-IA^d融合分子诱导 T-细胞凋亡的能力。与上述可溶性 sc-IA^d/OVA 分子温育过夜后, D011.10 细胞显示细胞形态学方面的显著变化, 包括核浓缩、细胞凋亡体的出现及 DNA 降解成寡核小体带(图 7, 泳道 4)。这些改变是细胞凋亡的特征[P. Walker 等人, 生物技术(BioTechniques), 15: 1032 (1993)]。在与抗 TcR 和抗 CD3 单抗温育的细胞中观察到相似的结果, 而在与固定化 sc-IA^d/空分子温育的细胞中观察到细胞形态学或 DNA 降解方面无变化(与图 7 的泳道 3 和 5 相比)。

图 7 解释如下: 将 D011.10 细胞温育于未处理的孔中或用 100ng/孔抗 TcR 单抗(H57-597, PharMingen)或 250ng/孔 sc-IA^d分子包被的孔中。24 小时后, 收获细胞(1.2×10^6 /样品)并分离 Triton X-100 可溶性 DNA [P. Walker 等人, 生物技术, 15: 1032 (1993)]。用 2%琼脂糖凝胶电泳分析样品, 并溴化乙锭染色以检测染色体 DNA 梯状化现象。泳道 2 来自未处理的 D011.10 细胞。泳道 1 和 6 显示 DNA 分子量标准。

实施例 11 用含可溶性 sc-IA^d MHC 融合分子的载体进行 DNA 接可抑制体内 T-细胞增殖

T-细胞的活化, 例如在 T 细胞的增殖中, 至少需要 2 个信号。通过 TcR 和 MHC II 类/肽融合复合体运送至 T-细胞的一个信号将杀死 T-细胞或使其无反应性。已发现在缺乏添加共刺激信号条件下, 可溶性 sc-IA^d/OVA 融合分子选择性杀死体内抗原特异性 T-细胞。这些结果表明单链 MHC 分子, 尤其是单链 MHC II 类分子特别适于抑制体内免疫系统功能。这些结果还表明, 当单链 MHC 分子与共刺激信号共表达于细胞中或单链 MHC 分子表达于已存在合适共刺激信号的细胞中时, 免



疫系统功能可被诱导。

为了抑制体内 T-细胞的克隆扩充，我们利用了哺乳动物表达载体 pEE13，该载体可通过标准方法修饰，以携带 sc-IA^d/OVA 融合基因。由表达载体的 CMV 启动子驱动 sc-IA^d/OVA 基因的转录。用 100 μg 质粒 DNA (1mg/ml 于 PBS 中) 肌内注射 (IM) BALB/C 小鼠后腿。14 或 28 天后再重复注射两次。对照组是在 0 周肌内注射盐水，并在 2 周和 4 周肌内注射编码 sc-IA^d/空分子的 100 μg 质粒。

然后两组均在最终 DNA 接种后 23 和 30 天从尾根部皮下注射 OVA323—339 肽 (在完全弗氏 H37Ra 佐剂中 100 μg/小鼠)。一周后，杀死小鼠并收集腹股沟和主动脉旁淋巴结。制备淋巴结细胞悬液，并通过温育于尼龙绒和葡聚糖 G-10 柱上除去抗原呈递细胞，将所得到的纯化 T-细胞群与用 OVA323—339 肽脉冲过的 APC 温育。来自 BALB/C 小鼠的脾 B 细胞用作 APC。用丝裂霉素 C (50—100 μg/ml 于 4 × 10⁶ 脾细胞/ml 的悬液中) 固定这些细胞以抑制 B 细胞的增殖，粗洗并将 OVA323—339 肽 (0—50 μg/孔) 加入纯化的 T-细胞 (2 × 10⁵ 细胞/孔) 中。使这些细胞在 37℃、5% 二氧化碳条件下于 96 孔圆底微量滴定板上增殖 4 天。这次，在培养终止前用 MTS (40 μl/孔) (Promega) 脉冲处理这些孔 4—6 小时。通过检测 490nm 的吸光度测定 MTS 的掺入，这是 T-细胞增殖的度量。

图 8A 和 8B 显示用来自被注射小鼠和对照小鼠的细胞进行的 T-细胞增殖试验的结果。图 8A 中，T-细胞分离自接受 sc-IA^d/空质粒 (和盐水) IM 注射的小鼠。图 8B 中，小鼠接受 sc-IA^d/OVA 质粒的 IM 注射。用 OVA 肽攻击小鼠两次，一周后从淋巴结中分离 T-细胞。如上所述进行 OVA 特异性 T-细胞增殖试验。与分离自注射有 sc-IA^d/空质粒的对照组之 T-细胞相比，分离自注射有 sc-IA^d/OVA 质粒的小鼠之 T-细胞显示 OVA 特异性增殖量方面有显著降低。这些结果证明可溶性 sc-IA^d/OVA 分子的表达抑制了体内抗原特异性 T-细胞的克隆扩充。

施用可溶性单链 MHC 分子 (如可溶性 sc-MHC II 类肽融合复合体或可溶性的有负载 sc-MHC II 类复合体) 或编码这些分子的 DNA 表达载体



将减轻哺乳动物内，尤其是人的免疫失调，所述疾病涉及不期望有的抗原特异性 T-细胞存在或增殖。例如，可以将可溶性单链 MHC 分子(如可溶性 sc-MHC II 类肽融合复合体)或编码这些分子的 DNA 表达载体与药学可接受载体物质，如生理盐水混合，并施用于患有或可能患有免疫失调的哺乳动物，如人，所述免疫失调包括不期望有的抗原特异性 T-细胞存在或增殖。其它药学可接受载体的例子是众所周知的(参阅，如 Remington 药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences), Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980)。用药的一种特殊方式是肌肉内方式，尽管还可用其它方式(如口服、鼻内、静脉内、肠胃外或经皮方式)，选择哪一种方式将取决于被治疗的疾病和动物的总体状况，这对本领域技术人员是显而易见的。可溶性单链 MHC 融合分子的剂量也将依据诸如免疫疾病的类型和严重性之类的因素变化，但通常是足以抑制体内诸如抗原特异性 T-细胞之类免疫细胞增殖的剂量。一般的剂量范围将是 1ng-10mg 可溶性 MHC II 类分子/kg 体重。可以按料想所需重复治疗，如每天治疗。类似的合适剂量可用于本文所公开之多特异性 MHC 复合体(负载或有重组融合的呈递肽)的给药。

还应当理解，带所有或大部分本发明 MHC 分子的细胞可以足够抑制或诱导 T-细胞的剂量施用于哺乳动物。可以用此处所述试验检测 T-细胞活性。

显而易见，也可使用其他可溶性的有负载单链 MHC 分子治疗体内不期望有的抗原特异性 T-细胞存在或增殖。例如，可以将约 6—30 个氨基酸长(包括在内)的呈递肽以至少等摩尔比率与合适的可溶性空单链 MHC 分子混合，以形成相应的有负载分子。然后将此有负载分子与药学可接受载体混合并施用于哺乳动物，如人，以治疗如上所述的免疫系统失调。

实施例 12 通过用表达肽连接的单链 MHC 分子的载体进行 DNA 接种进行免疫抑制的方法

检测 DNA 接种方法(尤其是肌肉或皮内)效果的一个模型系统例子如下。对三组 BALB/c 小鼠在两后腿肌内注射(IM) 100 μ g: (a) SCE1,

(b) SCT1, 或(c)盐水。在 0、2 和 4 周分别注射。首次 DNA 注射后 4 和 5 周, 在尾根部皮下注射 OVA 肽 323—339 ($100\mu\text{g}$ /小鼠, 于完全弗氏 H37Ra 佐剂中)。两周后(8 周), 通过尾部放血从每只小鼠收集血液, 随后以约 14, 000G 离心 3—5 分钟获得血清。如上所述测定 OVA 特异性 IgG 和 IgM 抗体的效价。OVA 特异性 IgG 抗体的水平是用肽免疫后小鼠中发生的 T_H 细胞介导性免疫球蛋白类别转换的指示。因此, 用肽连接的单链 MHC 表达载体进行 DNA 接种可引起肽特异性 IgG 抗体水平降低, 而不影响 IgM 抗体水平。

一可替代实验是检测 OVA 特异性 T_H 细胞克隆扩充或增殖。简洁地说, 在第二次 OVA 免疫后 7 天, 从腹股沟和主动脉旁淋巴结制备细胞悬液。通过温育于尼龙绒和葡聚糖 G-10 柱上去除悬液中的抗原呈递细胞, 将所得的纯化 T-细胞群与用 OVA323—339 肽脉冲过的 APC 一起温育。脾 B 细胞用作抗原呈递细胞。用丝裂霉素 C 固定这些细胞(在 4×10^6 脾细胞/ml 悬液中浓度为 $50-100\mu\text{g}/\text{ml}$), 以抑制 B 细胞的增殖, 粗洗涤并将各种浓度的 OVA323—339 肽加入纯化的 T-细胞中。如上所述进行 OVA 特异性 T-细胞增殖试验。肽反应性 T-细胞增殖的程度是用肽免疫后小鼠中发生的 T_H 细胞应答(即克隆扩充)的指示。因而, 用肽连接的单链 MHC 表达载体进行 DNA 接种可引起肽特异性 T_H 细胞增殖水平降低。

实施例 13 用可溶性的肽连接单链 MHC II 类分子进行免疫抑制

按以上实施例 4、5 和 6 产生的可溶肽连接 sc-II 类分子适于诱导 T_H 细胞中的变态反应状态。为了检测这点, 用以下方法可检查该分子对 T_H 细胞依赖型免疫球蛋白类别转换(即 IgM 至 IgG)和肽特异性 T 细胞系克隆扩充的影响。

a) IgG 类别转换

为了检查 IgM 到 IgG 的类别转换, 建立如下两个检测组:

i) 用完全弗氏佐剂 H37Ra 中的 100pg OVA323—329 在尾根部注射 10 只 BALB/c 小鼠, 7 天后加强注射以诱导对 OVA323—339 肽的免疫应答。在每次用 OVA 免疫的前一天和当天, 用 PBS 中的 $10-100\mu\text{g}$ 可溶

性 sc-IA^d/OVA 静脉内注射其中 5 只小鼠。此可溶性融合蛋白质可与展示于 OVA323—339 特异性 T_H 细胞上的 T-细胞受体 TcR 结合。由于缺少共刺激信号, 这些 T_H 细胞被诱导为变态反应状态。因为免疫球蛋白类别转换是 T_H 细胞依赖性过程, 预期在 sc-IA^d/OVA 处理过的小鼠中抗 OVA121—339 IgG 抗体的诱导显著减少。剩下的 5 个小鼠用作对照并将接受 PBS。由于存在未受阻的 T_H 细胞, 这些小鼠预期将积累抗 OVA323—339 IgG 抗体。

第二次免疫 10 天后, 通过尾部放血从每只小鼠中收集血液。于约 14, 000G 离心血液 3—5 分钟并收集血清。在用 Tris-HCl 包被缓冲液 (pH8.5) 中 1—50 μg/ml 卵清蛋白包被的 96 孔微量滴定板 (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) 上完成试验。然后用压力敏感型薄膜 (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) 覆盖平板并 4℃ 温育过夜。然后用洗涤液 (咪唑/NaCl, 0.4%吐温-20) 洗平板并以 100 μl/孔加入 3% BSA 溶液进行封闭。在平板旋转器上室温温育 30 分钟后, 用洗涤液洗平板 5 次。然后将小鼠血清 1:500 稀释于样品/偶联稀释剂 (2%明胶+0.1%吐温 20 于 TBS 中) 中, 然后在平板上连续稀释两份。对每种包被蛋白质建立两块相同的平板, 一块用于测定 IgM 效价, 而另一块用于测定 IgG 效价。室温温育 30 分钟后, 用洗涤液洗平板 5 次。将山羊抗小鼠 IGM-HRP 和山羊抗小鼠 IgG-HRP 偶联物 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, 1:100 稀释于样品/偶联稀释剂中) 加入适当的平板中。室温温育 30 分钟后, 用洗涤液洗平板 5 次, 然后与 100 μl/孔 ABTS 显色底物 (Kirkgaard & Perry 实验室, Inc., Gaithersburg, MD) 一起室温温育 10 分钟。用 100 μl/孔猝灭缓冲液 (Kirkgaard & Perry 实验室, Inc., Gaithersburg, MD) 终止反应, 并用自动微量平板 ELISA 读数器 (Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermont) 读 405nm 处的吸光度。将读出的吸光度对样品稀释度对数作图, 确定效价。然后比较 IgM 与 IgG 的效价。

由于在相应肽反应性 T_H 细胞中诱导的变态反应, 预计实施例 4, 5 和 6 中产生的可溶性肽连接单链 MHC II 类分子以肽特异性方式抑制



IgG 类别转换。

b) 体内肽特异性 T-细胞系的克隆扩充

实施例 10—11 中产生的可溶性肽连接单链 II 类分子对肽特异性 T-细胞系的克隆扩充的作用可在体内检测如下。治疗组(每组 4 只小鼠)与上述的相同。免疫接种方案如下: 用 10—100 μ g 在 PBS 中的可溶性 sc-IA^d/OVA 融合蛋白质静脉内注射小鼠, 24 小时后在尾根部皮下注射 50 μ g 在完全弗氏佐剂 H37Ra 中的 OVA323—339。6 和 7 天后重复这两种注射。第二套注射完成后 7 天, 处死小鼠。取出腹股沟和主动脉旁淋巴结, 并制成单细胞悬液。

悬液通过温育于尼龙绒和 Sephadex G-10 柱上除去抗原呈递细胞, 将所得的纯化 T-细胞群与用 OVA323—339 肽脉冲过的 APC 一起温育。脾 B 细胞用作抗原呈递细胞。用丝裂霉素 C 固定这些细胞 (50—100 μ g/ml 于 4×10^6 脾细胞/ml 悬液中) 以抑制 B 细胞增殖, 粗洗涤, 然后将各种浓度的 OVA323—329 肽加入纯化的 T-细胞中。增殖试验在 96 孔圆底微量滴定板中于 37℃、5%二氧化碳中进行 3—5 天。在培养终止前 18 小时用 1 μ Ci 3H-胸苷脉冲处理各孔, 并用 Skatron 细胞收获器收获细胞。用 LKB 液闪光谱计测定 DNA 中的 3H-胸苷掺入量, 作为 T-细胞增殖的度量。肽反应性 T-细胞增殖的程度是免疫接种后小鼠中发生的 T_H 细胞应答(即克隆扩充)的指示。

预期共注射实施例 4、5 和 6 中产生的可溶性单链 MHC II 类分子(与 OVA 免疫结合)将限制 OVA 反应性 T-细胞系的克隆扩充及随后体外增殖的量。

实施例 14 多特异性 MHC II 类复合体的制备

如上所述, 本发明的完全可溶并有功能的 MHC 复合体包括多特异性复合体。以下为制备含 sc-MHC II 类分子和配基结合分子的多特异性 MHC 分子的典型方法。

1. 双特异性复合体

A. 免疫球蛋白连接分子

图 9A 和 9B 分别显示含两个 sc-MHC II 类肽融合分子或一个 sc-MHC

II 类肽融合分子和一单链抗体的双特异性复合体的例子。

按本文所述方法可制备含两个 sc-MHC II 类肽复合体的双特异性复合体(图 9A)。例如,在一种方法中,构建了含有依次共价连接的 sc-MHC 分子(如 II 类 sc-MHC 分子)、连接分子(如 Ig-C_L 链)和任选的效应分子的第一种融合分子。此融合分子可与含有依次共价连接的 sc-MHC II 类肽融合分子、连接分子(如 Ig-C_L 链)和任选效应分子的第二种融合分子结合。如早先所提及,若期望,sc-MHC II 类分子可包括诸如基本上整条 $\beta 2$ 链缺失之类的 $\beta 2$ II 类链修饰以提高可溶性表达。该第一和第二融合分子可由 DNA 序列编码,优选由编码两分子的载体所编码。或者,该第一和第二融合分子可由分开的 DNA 序列编码,优选由包括在两个 DNA 载体上的 DNA 序列编码,这种情况下每个 DNA 序列编码其中一种融合分子。在任一种情况中,第一个或第二个融合分子都是作为分离的链表达的,并能在体外或在合适哺乳动物细胞中结合而形成双特异性复合体。如果需要,可按上述分离和纯化方法纯化双特异性复合体以形成基本纯的复合体。

图 9B 中所述含 sc-MHC II 类肽融合分子和单链抗体的双特异性复合体通常可按上述方法制备,不同之处在于第二融合分子将包含按顺序共价连接的 sc-Fv 抗体、连接分子(如 IgG C_H' 分子)和任选的效应分子。

B. 其他连接分子

如上所提及,有多种多肽已显示可形成特异结合对。例如,卷曲螺旋(如亮氨酸拉链)、螺旋-转角-螺旋多肽基元及相关结构已显示可促进单链抗体 Fv 片段、T-细胞受体分子 α 和 β 链及 MHC II 类分子 α 和 β 链的二聚化和寡聚化。参阅如, Pack 等人,生物技术, 11: 1271(1993); Pack 等人,分子生物学杂志, 246: 28 (1995); Chaing 等人,美国国家科学院院报 91: 11408 (1994); Scott 等人,实验医学杂志, 183: 2087 (1996)。

按制备和使用卷曲螺旋和螺旋-转角-螺旋结构的已知方法,构建含这种卷曲螺旋或螺旋-转角-螺旋连接分子的双特异性复合体是本发

明的目的之一。可用数个分子通过以下步骤制备双特异性复合体。首先，用标准合成方法制备一对寡核苷酸 DNA 引物，每个引物编码以下卷曲螺旋序列：

1. NH₂-SSADLVPRGSTTAPSAQLEKELQALEKENAQLWELQALE
KELAQ-COOH (SEQ ID NO: 33)
2. NH₂-SSADLVPRGSTTAPRAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALK
KLAQ-COOH (SEQ ID NO: 34)

参阅 Scott 等人，实验医学杂志，183: 2087(1996)。

或者，每个 DNA 寡核苷酸引物可编码 SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 34 之卷曲螺旋序列的合适部分，条件是所编码的该对序列按测定能形成特异结合对，如通过 Pack 等人(见上文)、Chaing 等人(见上文)和 Scott 等人(见上文)所报道方法检测。

然后，为构建含卷曲螺旋连接分子或其合适片段的双特异性 MHC 复合体，将 DNA 寡核苷酸引物之一共价连接至编码一个或多个目的 sc-MHC 分子(如 sc-MHC II 类分子)之 DNA 区段的 3' 端。然后将这样制备的 DNA 构建体任选地在引物 3' 端连接至编码所需的任选效应分子的 DNA 序列 5' 端。第二个 DNA 寡核苷酸引物共价连接于编码所需配基结合分子之 DNA 区段、诸如编码目的单链抗体的 DNA 区段的 3' 末端。这样制备的 DNA 构建体可进一步融合至编码所需的任选效应分子之 DNA 区段的 5' 端。一个具体例子是，该 DNA 区段可包括按顺序共价连接的：sc-MHC II 类分子/卷曲螺旋序列；sc-MHC II 类分子/卷曲螺旋序列/效应分子；单链抗体/卷曲螺旋序列；单链抗体/卷曲螺旋序列/效应分子。

所选择的一对 DNA 区段一般是能编码可二聚化的蛋白质的那些 DNA 区段。通常将所选的一对 DNA 区段引入一对合适载体中，以便在目的细胞类型中表达。或者，可以将所述 DNA 区段按需要插入到单个 DNA 载体上。按本发明的双特异性复合体可用其它策略生产。在一方法中，将编码复合体诸链中之一的每个载体引入细胞，于产生所编码蛋白质的条件下培养细胞。再分别自各细胞培养物中分离蛋白质，然

后在控制温度、盐、蛋白质和离子浓度等的条件下体外结合以最大限度地形成双特异性 MHC 复合体。或者，可以将两个载体引入同一合适细胞中，在有助于预期双特异性 MHC 复合体表达和装配的条件下培养细胞。如果需要，可按本文所述方法将双特异性 MHC 复合体以基本纯的形式从细胞中分离出来。合适细胞和载体的例子上文已论述。

本发明已参照其优选实施方案进行了叙述。然而，应当理解，通过对此内容的考虑，本领域技术熟练人员可在本发明的精神和范围内进行修饰和改进。

序 列 表

(1)一般资料:

(i) 申请人: **Rhode, Peter R.**

Acevdo, Jorge

Burkhardt, Martin

Jiao, Jin-an

Wong, Hing C.

(ii)发明题目: 可溶性 MHC 复合体及其使用方法

(iii)序列数: 35

(iv)通讯地址:

(A)地址: **Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, LLp**

(B)街名: **130 Water Street**

(C)城市: **Boston**

(D)州名: **MA**

(E)国家: **美国**

(F)邮编: **02109**

(v)计算机可读形式:

(A)介质类型: **软盘**

(B)计算机: **可兼容机**

(C)操作系统: **DOS**

(D)软件: **FastSEQ 的 Windows 2.0 版**

(vi)当前申请信息:

(A)申请号:

(B)存档日期:

(C)分类:

(Vii)在先申请资料:

(A)申请号:

(B)存档日期:

(Viii) 代理人代理机构信息:

(A) 姓名: Corless, Peter F

(B) 登记号: 33,860

(C) 参考/文档号: 47594 - PCT

(iX) 电信信息:

(A) 电话: 617-523-3400

(B) 电传: 617-523-6440

(C) 电报:

(2) SEQ ID NO: 1 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1

CCACCATG

8

(2) SEQ ID NO: 2 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 43 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

CCCCCAAGC TTCCGGGCCA CCATGGCTCT GCAGATCCCC AGC

43

(2) SEQ ID NO: 3 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 34 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链



(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

CCCCCCTT AAGGTCCTTG GGCTGCTCAG CACC

34

(2) SEQ ID NO: 4 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 37 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

GGGGGGGCCA TGGCCGGAAG CTCCGAAAGG CATTTCCG

37

(2) SEQ ID NO: 5 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5

GC GGCGACTA GTCCACTCCA CAGTGATGGG GC

32

(2) SEQ ID NO: 6 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6

GGGGGGGCCA TGGCCGAAGA CGACATTGAG GCCGAC

36

(2) SEQ ID NO: 7 的资料:

(i) 序列特征:



- (A) 长度: 32 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7

GCGCGACTAG TCCAGTGTTT CAGAACCGGC TC

32

(2) SEQ ID NO: 8 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 31 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8

GGGGGGGATA TCTCTCAGGC TGTTACGCT G

31

(2) SEQ ID NO: 9 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 46 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9

GGGGGGTTCG AAAAGTGTAC TTACGGGGGG CTGGAATCTC AGGTTC

46

(2) SEQ ID NO: 10 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 37 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10



GGGGGGCTCG AGTATCAAAG AAGAACATGT GATCATC

37

(2) SEQ ID NO: 11 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 36 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11

GCGGCGGGAT CCGTTCTCTG TAGTCTCTGG GAGAGG

36

(2) SEQ ID NO: 12 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 42 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12

GATAAGAGGA AGAAGAGTAC ATGCCGATGG AACCCGGGTG AG

42

(2) SEQ ID NO: 13 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 43 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13

AATTCITTCAC CCGGGTTCCA TCGGCATGTA CTCTTCTTCC TCG

43

(2) SEQ ID NO: 14 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 75 个碱基对
- (B) 类型: 核酸



(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14

CCCCCGCTA GCGGAGGGGG CGGAAGCGGC GGAGGGGGGG ACACCCGACC ACGTTTCCTG 60
TGGCAGCCTA AGAGG 75

(2) SEQ ID NO: 15 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 48 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15

CCCCCGAAT TCCCCACTAG TCCATTCCAC TGTGAGAGGG CTTGTCAC 48

(2) SEQ ID NO: 16 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 35 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16

GGGGGGGCCA TGGCCTACGA CAGAACCCCG TGGTG 35

(2) SEQ ID NO: 17 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个碱基对

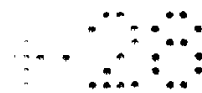
(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17

GGGGGGACTA GTTCGCCGCT GCACTGTGAA GC 32



(2) SEQ ID NO: 18 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 33 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18

GGGGGGTATG CATACGACGA GAACCCCGTG GTG

33

(2) SEQ ID NO: 19 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 33 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19

GGGGGGACTA GTCCACTTCG AGGAACTGTT TCC

33

(2) SEQ ID NO: 20 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 24 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20

CCTCCTGGTC TCCTCTGTGA GTGG

24

(2) SEQ ID NO: 21 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 24 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链



(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21

CCACTCACAG AGGAGACCAG GAGG

24

(2) SEQ ID NO: 22 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22

CCCCCACC GGTACGACAA GCCCGTGGTG

30

(2) SEQ ID NO: 23 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 45 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23

CCCCCATCG ATAAGTGTAC TTACGTGGGA GAGGGCTTGG AGCAT

45

(2) SEQ ID NO: 24 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1508 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 编码序列

(B) 位置: 6...1505

(D) 其它信息:

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24

CCACC ATG GCT CTG CAG ATC CCC AGC CTC CTC CTC TCA GCT GCT GTG GTG Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Val 1 5 10 15	50
GTG CTG ATG GTG CTG AGC AGC CCA AGG ACC TTA AGT ATC TCT CAG GCT Val Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Arg Thr Leu Ser Ile Ser Gln Ala 20 25 30	98
GTT CAC GCT GCT CAC GCT GAA ATC AAC GAA GCT GGT CGT GCT AGC GGA Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Ala Ser Gly 35 40 45	146
GGG GGC GGA AGC GGC GGA GGG GGA AAC TCC GAA AGG CAT TTC GTG GTC Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asn Ser Glu Arg His Phe Val Val 50 55 60	194
CAG TTC AAG GGC GAG TGC TAC TAC ACC AAC GGG ACG CAG CGC ATA CGG Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn Gly Thr Gln Arg Ile Arg 65 70 75	242
CTC GTG ACC AGA TAC ATC TAC AAC CGG GAG GAG TAC GTG CGC TAC GAC Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Val Arg Tyr Asp 80 85 90 95	290
AGC GAC GTG GGC GAG TAC CGC GCG GTG ACC GAG CTG GGG CGG CCA GAC Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp 100 105 110	338
GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG CCG GAG ATC CTG GAG CGA ACG CGG GCC Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Pro Glu Ile Leu Glu Arg Thr Arg Ala 115 120 125	386
GAG GTG GAC ACG GCG TGC AGA CAC AAC TAC GAG GGG CCG GAG ACC AGC Glu Val Asp Thr Ala Cys Arg His Asn Tyr Glu Gly Pro Glu Thr Ser 130 135 140	434
ACC TCC CTG CGG CGG CTT GAA CAG CCC AAT GTC GCC ATC TCC CTG TCC Thr Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Pro Asn Val Ala Ile Ser Leu Ser 145 150 155	482
AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC ACT CTG GTC TGT TCG GTG ACA Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn Thr Leu Val Cys Ser Val Thr 160 165 170 175	530
GAT TTC TAC CCA GCC AAG ATC AAA GTG CGC TGG TTC AGG AAT GGC CAG Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly Gln 180 185 190	578
GAG GAG ACA GTG GGG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT AGG AAT GGG GAC Glu Glu Thr Val Gly Val Ser Ser Thr Gln Leu Ile Arg Asn Gly Asp 195 200 205	626
TGG ACC TTC CAG GTC CTG GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT CAT CAG GGA Trp Thr Phe Gln Val Leu Val Met Leu Glu Met Thr Pro His Gln Gly 210 215 220	674
GAG GTC TAC ACC TGC CAT GTG GAG CAT CCC AGC CTG AAG AGC CCC ATC Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro Ser Leu Lys Ser Pro Ile 225 230 235	722
ACT GTG GAG TGG ACT AGT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGT GGT TCC Thr Val Glu Trp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 240 245 250 255	770

GGT GGC GGC GGT TCT GGC GGT GGC GGT TCC TCG AGT GAA GAC GAC ATT Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu Asp Asp Ile 260 265 270	818
GAG GCC GAC CAC GTA GGC TTC TAT GGT ACA ACT GTT TAT CAG TCT CCT Glu Ala Asp His Val Gly Phe Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Gln Ser Pro 275 280 285	866
GGA GAC ATT GGC CAG TAC ACA CAT GAA TTT GAT GGT GAT GAG TTG TTC Gly Asp Ile Gly Gln Tyr Thr His Glu Phe Asp Gly Asp Glu Leu Phe 290 295 300	914
TAT GTG GAC TTG GAT AAG AAG AAA ACT GTC TGG AGG CTT CCT GAG TTT Tyr Val Asp Leu Asp Lys Lys Lys Thr Val Trp Arg Leu Pro Glu Phe 305 310 315	962
GGC CAA TTG ATA CTC TTT GAG CCC CAA GGT GGA CTG CAA AAC ATA GCT Gly Gln Leu Ile Leu Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile Ala 320 325 330 335	1010
GCA GAA AAA CAC AAC TTG GGA ATC TTG ACT AAG AGG TCA AAT TTC ACC Ala Glu Lys His Asn Leu Gly Ile Leu Thr Lys Arg Ser Asn Phe Thr 340 345 350	1058
CCA GCT ACC AAT GAG GCT CCT CAA GCG ACT GTG TTC CCC AAG TCC CCT Pro Ala Thr Asn Glu Ala Pro Gln Ala Thr Val Phe Pro Lys Ser Pro 355 360 365	1106
GTG CTG CTG GGT CAG CCC AAC ACC CTT ATC TGC TTT GTG GAC AAC ATC Val Leu Leu Gly Gln Pro Asn Thr Leu Ile Cys Phe Val Asp Asn Ile 370 375 380	1154
TTC CCA CCT GTG ATC AAC ATC ACA TGG CTC AGA AAT AGC AAG TCA GTC Phe Pro Pro Val Ile Asn Ile Thr Trp Leu Arg Asn Ser Lys Ser Val 385 390 395	1202
ACA GAC GGC GTT TAT GAG ACC AGC TTC CTC GTC AAC CGT GAC CAT TCC Thr Asp Gly Val Tyr Glu Thr Ser Phe Leu Val Asn Arg Asp His Ser 400 405 410 415	1250
TTC CAC AAG CTG TCT TAT CTC ACC TTC ATC CCT TCT GAT GAT GAC ATT Phe His Lys Leu Ser Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Asp Ile 420 425 430	1298
TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAG GAG CCG GTT CTG AAA Tyr Asp Cys Lys Val Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu Lys 435 440 445	1346
CAC TGG GAA CCT GAG ATT CCA GCC CCC ATG TCA GAG CTG ACA GAA ACT His Trp Glu Pro Glu Ile Pro Ala Pro Met Ser Glu Leu Thr Glu Thr 450 455 460	1394
GTG GTG TGT GCC CTG GGG TTG TCT GTG GGC CTT GTG GGC ATC GTG GTG Val Val Cys Ala Leu Gly Leu Ser Val Gly Leu Val Gly Ile Val Val 465 470 475	1442
GGC ACC ATC TTC ATC ATT CAA GGC CTG CGA TCA GGT GGC ACC TCC AGA Gly Thr Ile Phe Ile Ile Gln Gly Leu Arg Ser Gly Gly Thr Ser Arg 480 485 490 495	1490
CAC CCA GGG CCT TTA TGA His Pro Gly Pro Leu 500	1508

[illegible]

(A) 长度: 500 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25

Met	Ala	Leu	Gln	Ile	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Val	Val
1				5					10					15	
Leu	Met	Val	Leu	Ser	Ser	Pro	Arg	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Gln	Ala	Val
			20					25					30		
His	Ala	Ala	His	Ala	Glu	Ile	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Ala	Ser	Gly	Gly
		35					40					45			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Glu	Arg	His	Phe	Val	Val	Gln
	50					55					60				
Phe	Lys	Gly	Glu	Cys	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Gly	Thr	Gln	Arg	Ile	Arg	Leu
65					70					75					80
Val	Thr	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Glu	Glu	Tyr	Val	Arg	Tyr	Asp	Ser
				85					90					95	
Asp	Val	Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gly	Arg	Pro	Asp	Ala
			100					105					110		
Glu	Tyr	Trp	Asn	Ser	Gln	Pro	Glu	Ile	Leu	Glu	Arg	Thr	Arg	Ala	Glu
		115					120					125			
Val	Asp	Thr	Ala	Cys	Arg	His	Asn	Tyr	Glu	Gly	Pro	Glu	Thr	Ser	Thr
		130				135					140				
Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Pro	Asn	Val	Ala	Ile	Ser	Leu	Ser	Arg
145					150					155					160
Thr	Glu	Ala	Leu	Asn	His	His	Asn	Thr	Leu	Val	Cys	Ser	Val	Thr	Asp
				165					170					175	
Phe	Tyr	Pro	Ala	Lys	Ile	Lys	Val	Arg	Trp	Phe	Arg	Asn	Gly	Gln	Glu
			180					185					190		
Glu	Thr	Val	Gly	Val	Ser	Ser	Thr	Gln	Leu	Ile	Arg	Asn	Gly	Asp	Trp
		195					200					205			
Thr	Phe	Gln	Val	Leu	Val	Met	Leu	Glu	Met	Thr	Pro	His	Gln	Gly	Glu
						215					220				
Val	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Glu	His	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Ile	Thr
225					230					235					240
Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Asp	Asp	Ile	Glu
			260					265					270		

```

Ala Asp His Val Gly Phe Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Gln Ser Pro Gly
      275      280      285
Asp Ile Gly Gln Tyr Thr His Glu Phe Asp Gly Asp Glu Leu Phe Tyr
      290      295      300
Val Asp Leu Asp Lys Lys Lys Thr Val Trp Arg Leu Pro Glu Phe Gly
      305      310      315      320
Gln Leu Ile Leu Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile Ala Ala
      325      330      335
Glu Lys His Asn Leu Gly Ile Leu Thr Lys Arg Ser Asn Phe Thr Pro
      340      345      350
Ala Thr Asn Glu Ala Pro Gln Ala Thr Val Phe Pro Lys Ser Pro Val
      355      360      365
Leu Leu Gly Gln Pro Asn Thr Leu Ile Cys Phe Val Asp Asn Ile Phe
      370      375      380
Pro Pro Val Ile Asn Ile Thr Trp Leu Arg Asn Ser Lys Ser Val Thr
      385      390      395      400
Asp Gly Val Tyr Glu Thr Ser Phe Leu Val Asn Arg Asp His Ser Phe
      405      410      415
His Lys Leu Ser Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Asp Ile Tyr
      420      425      430
Asp Cys Lys Val Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu Lys His
      435      440      445
Trp Glu Pro Glu Ile Pro Ala Pro Met Ser Glu Leu Thr Glu Thr Val
      450      455      460
Val Cys Ala Leu Gly Leu Ser Val Gly Leu Val Gly Ile Val Val Gly
      465      470      475      480
Thr Ile Phe Ile Ile Gln Gly Leu Arg Ser Gly Gly Thr Ser Arg His
      485      490      495
Pro Gly Pro Leu
      500

```

(2).SEQ ID NO: 26 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 16 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 26

```

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1          5          10          15

```

(2) SEQ ID NO: 27 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 27

Ala	Pro	Tyr	Ser	Thr	Leu	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Thr	Pro
1				5					10					15

(2) SEQ ID NO: 28 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28

Tyr	Asp	Glu	Asn	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro
1				5					10					15	
Arg	Thr	Pro	Pro												
				20											

(2) SEQ ID NO: 29 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 14 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29



Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 30 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30

Glu Glu Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu Pro Gly
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 31 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31

TSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSSS

24

(2) SEQ ID NO: 32 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

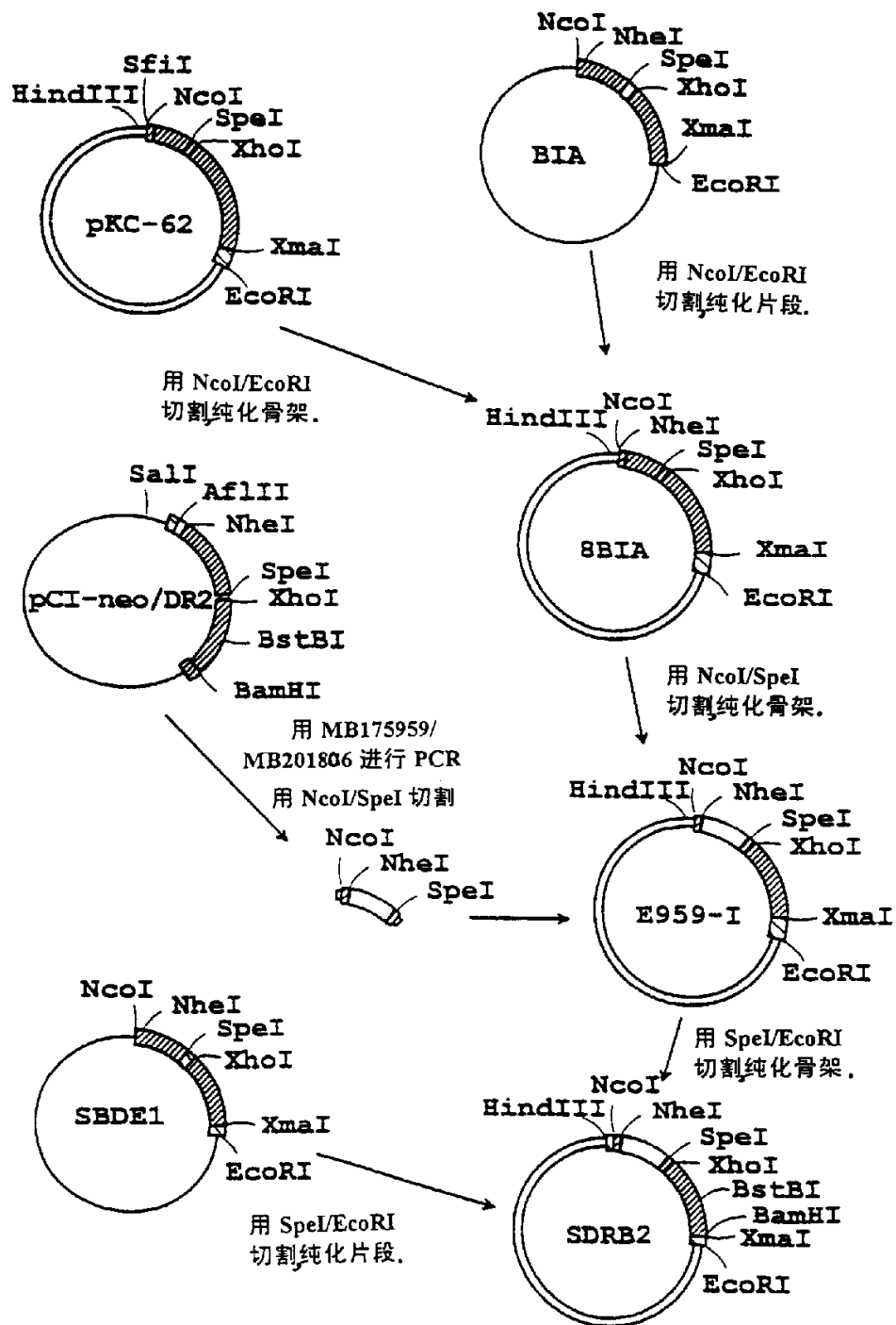


图 3I

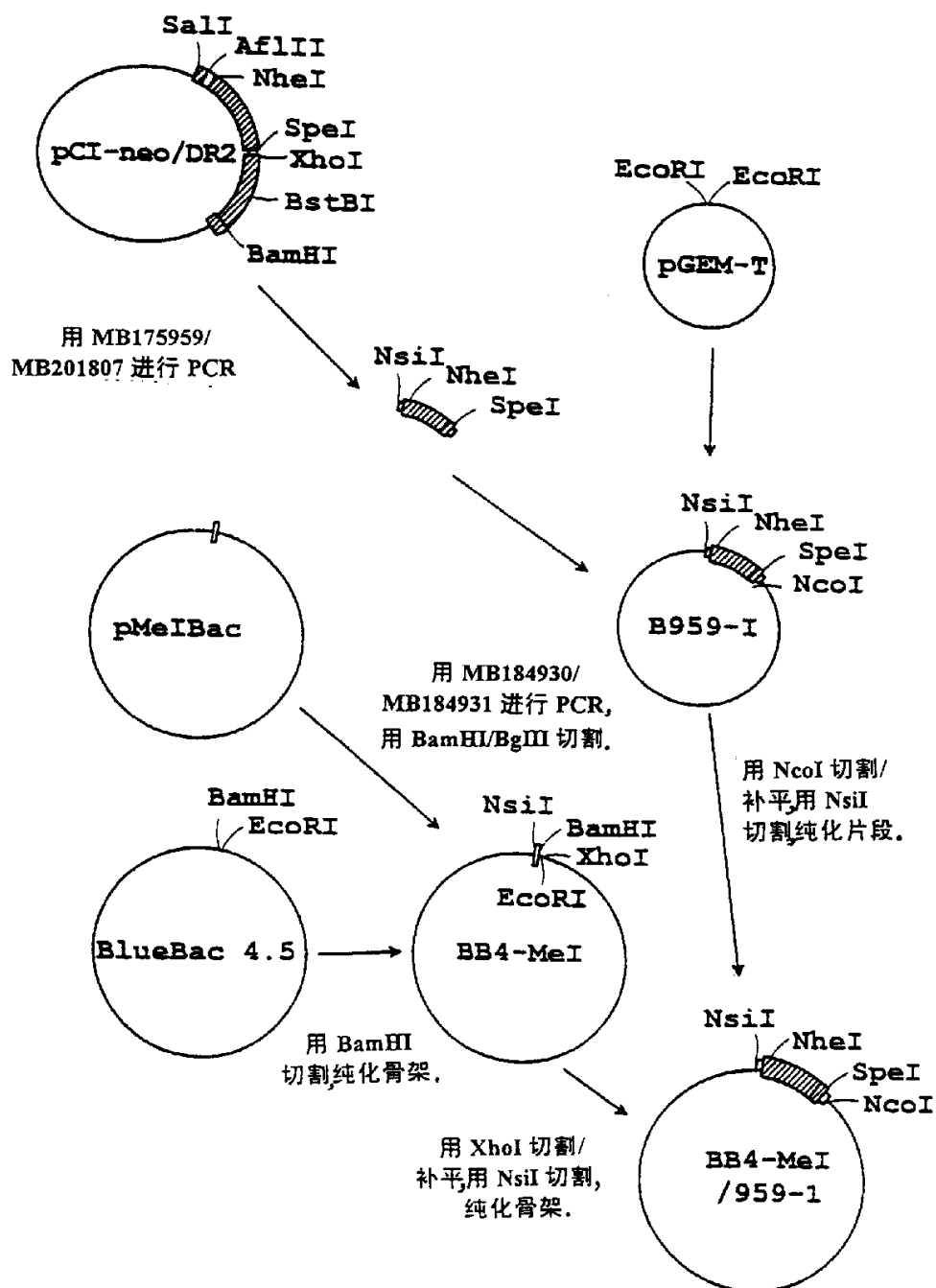


图 3J

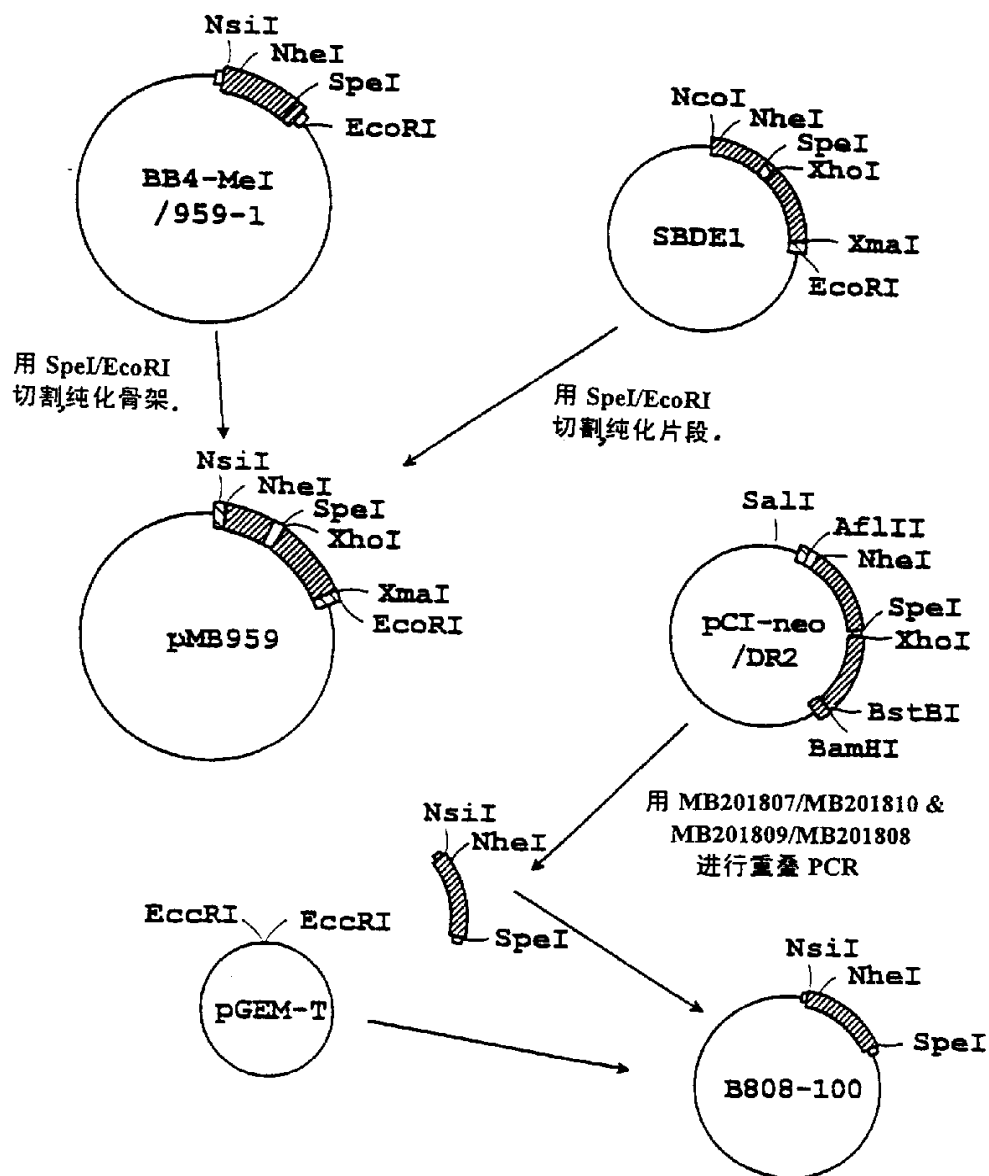
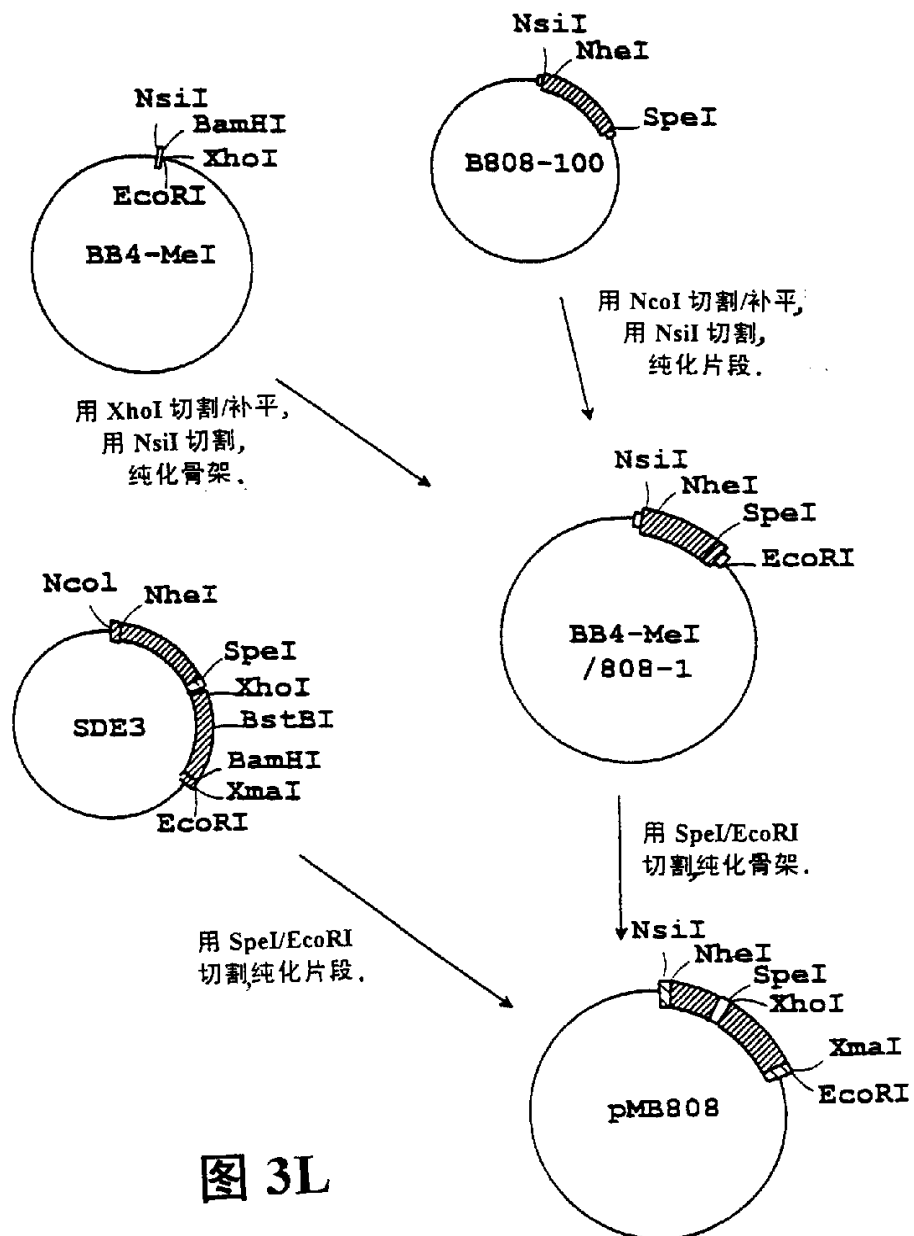


图 3K



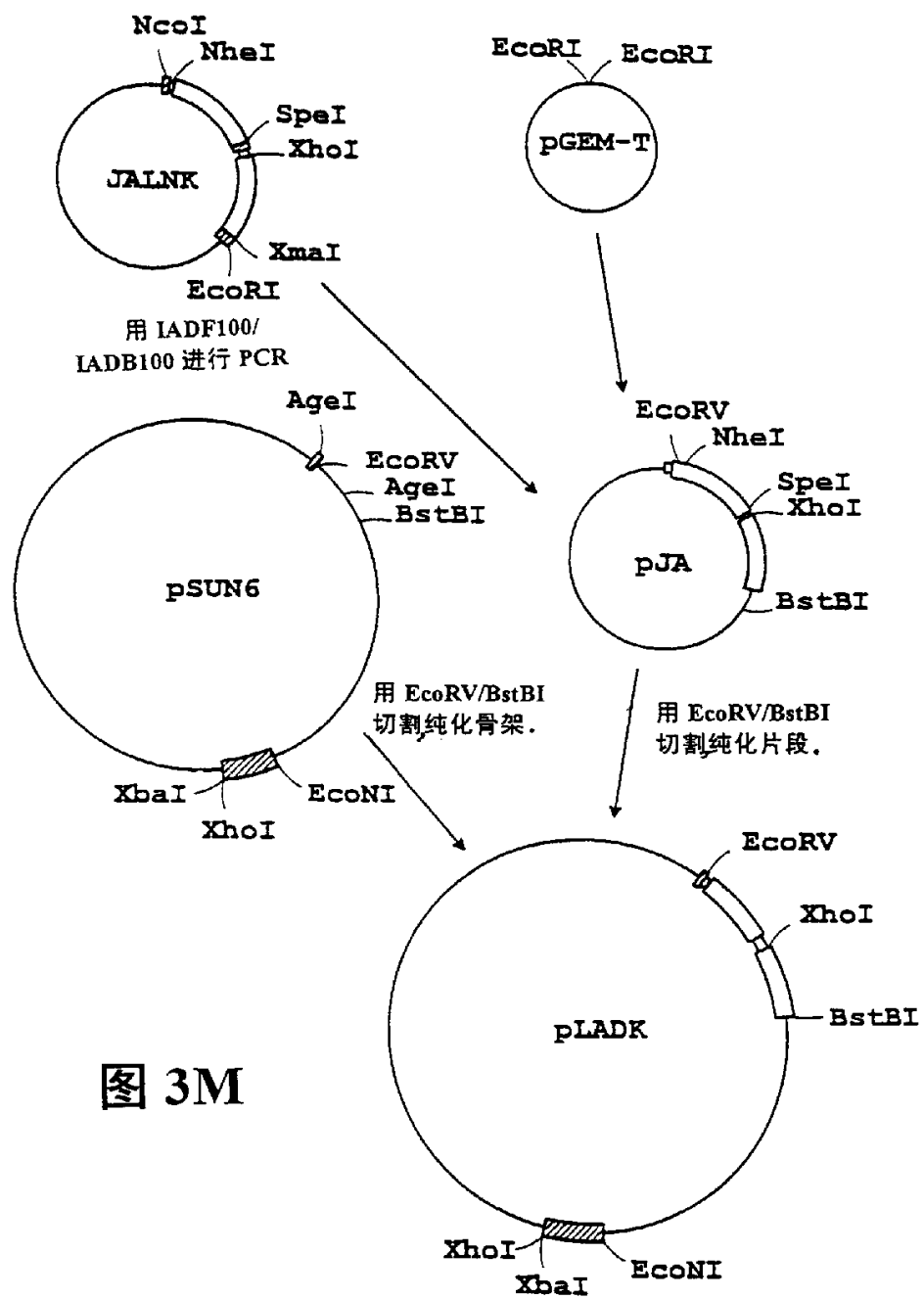


图 3M

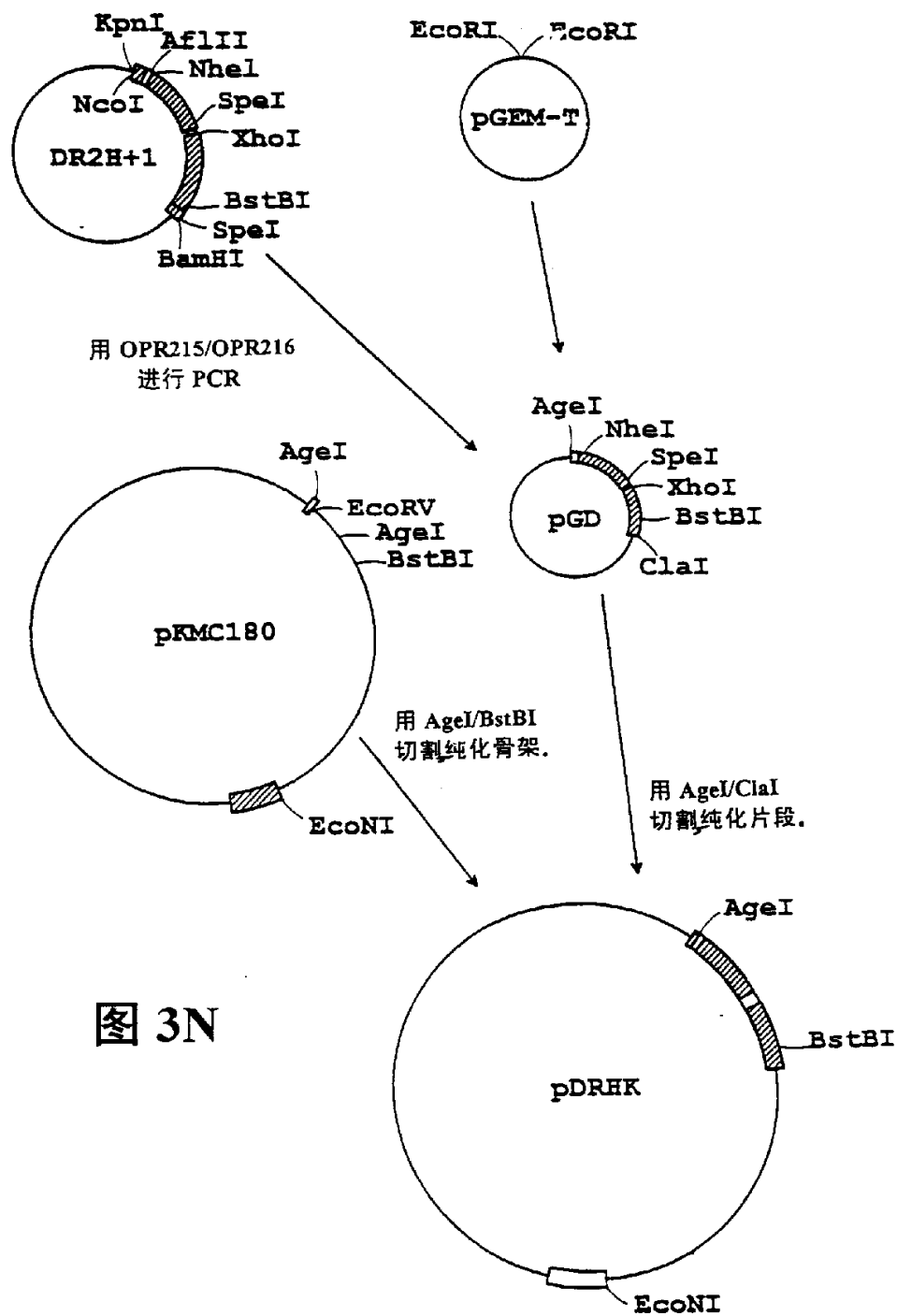


图 3N

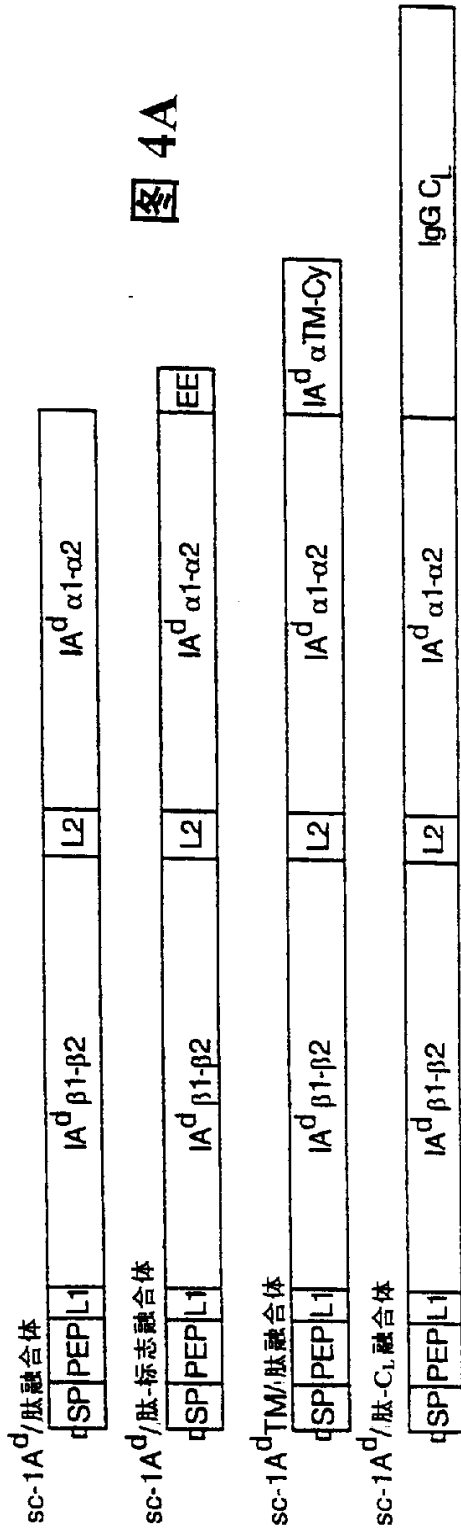


图 4A

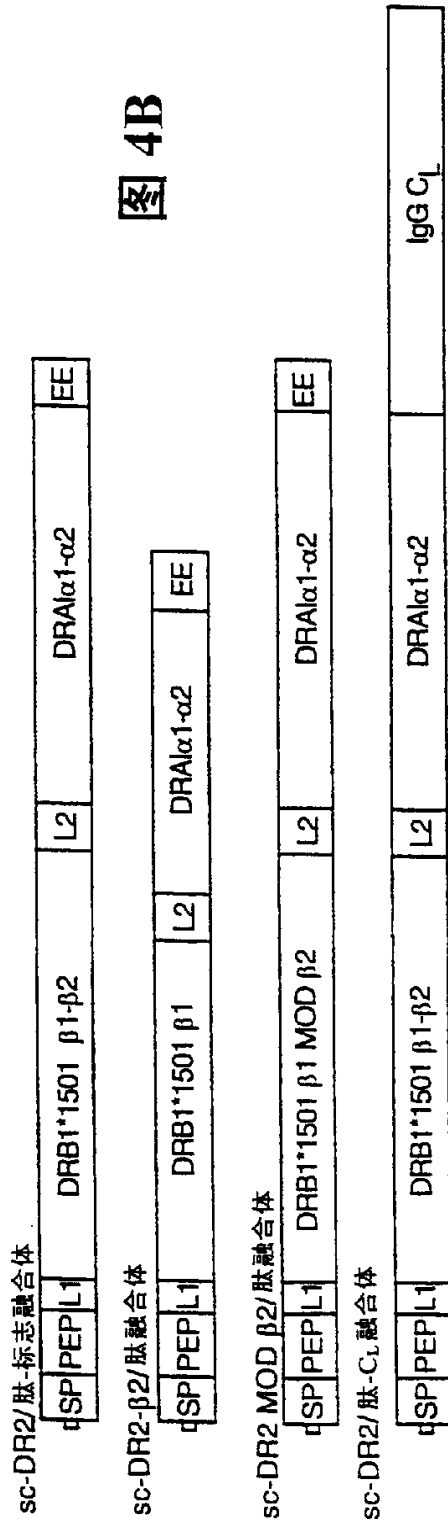


图 4B

1000
100
10
1

1000
100
10
1

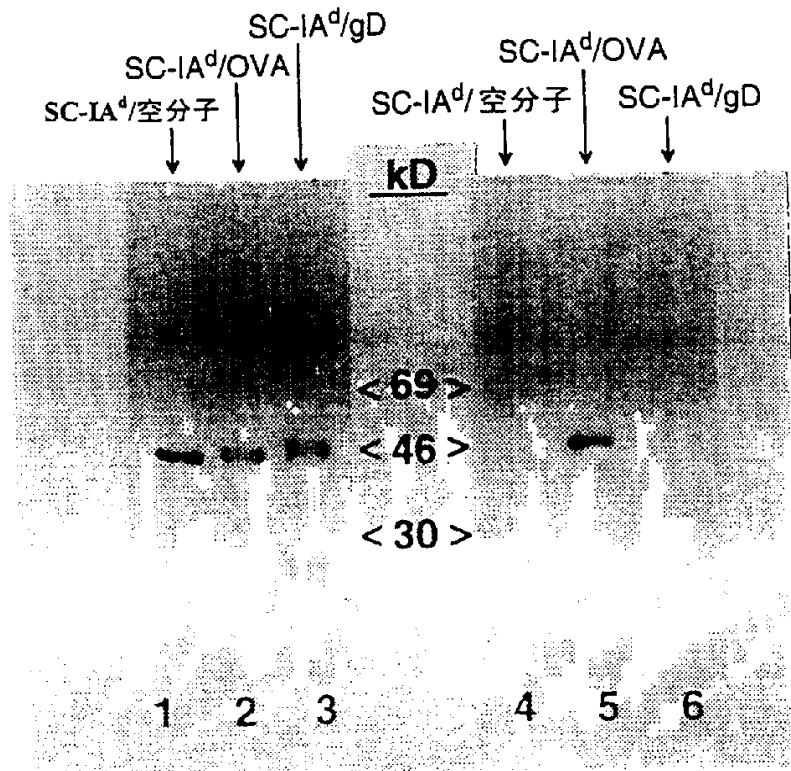


图 5A

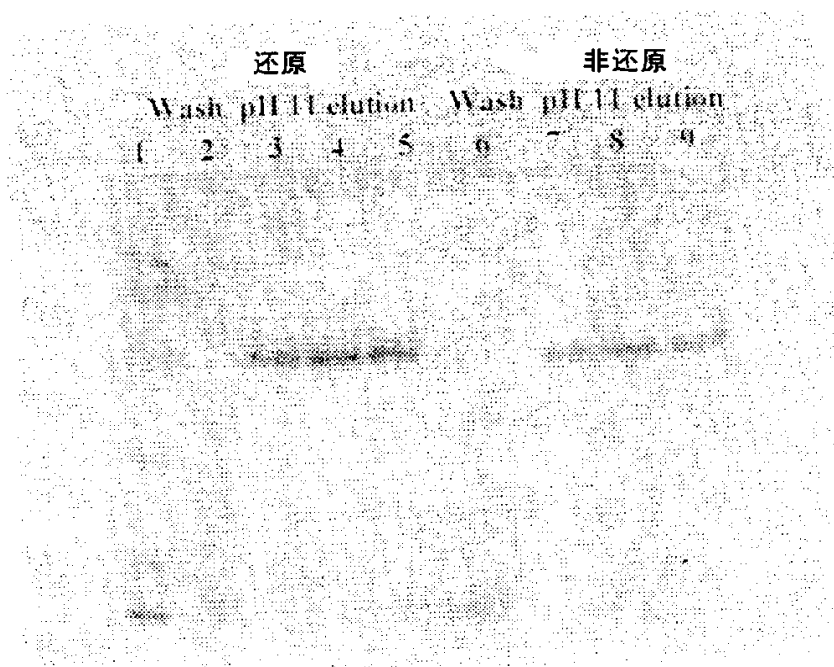
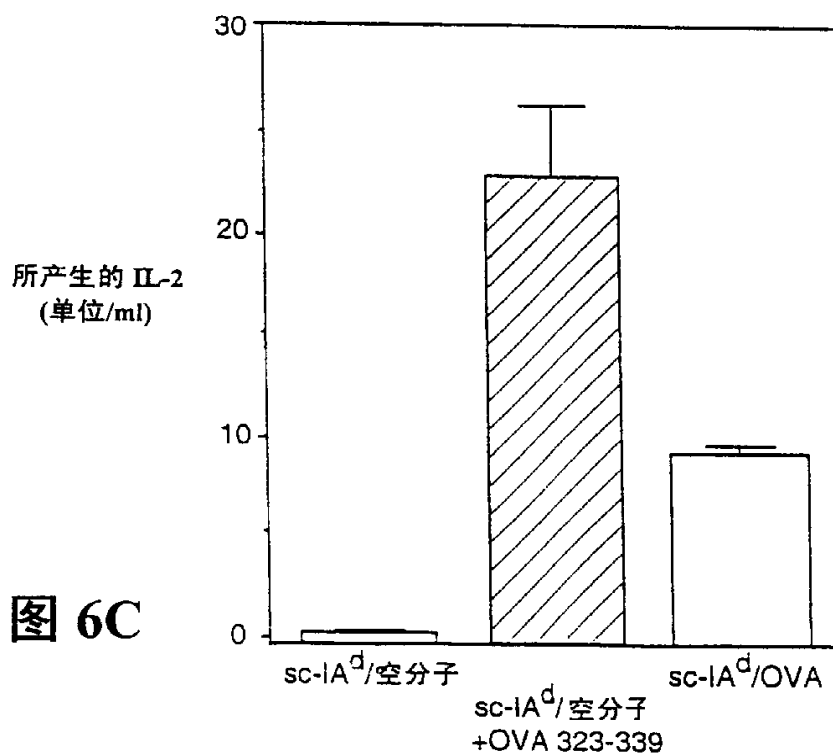
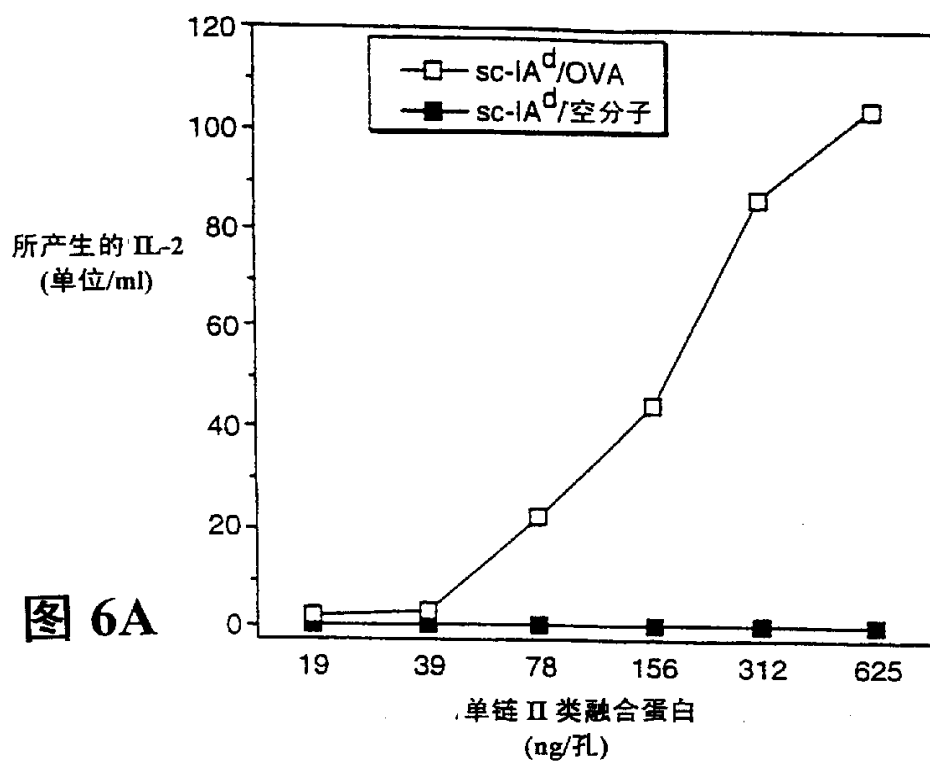
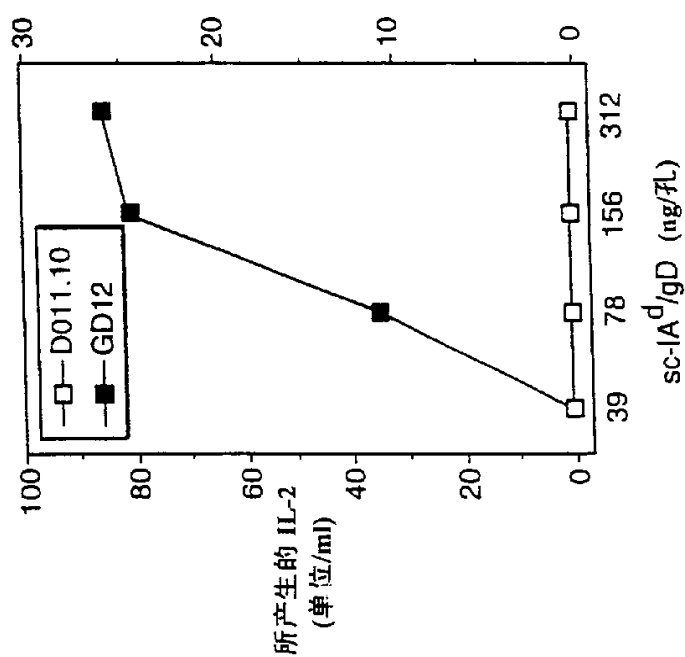
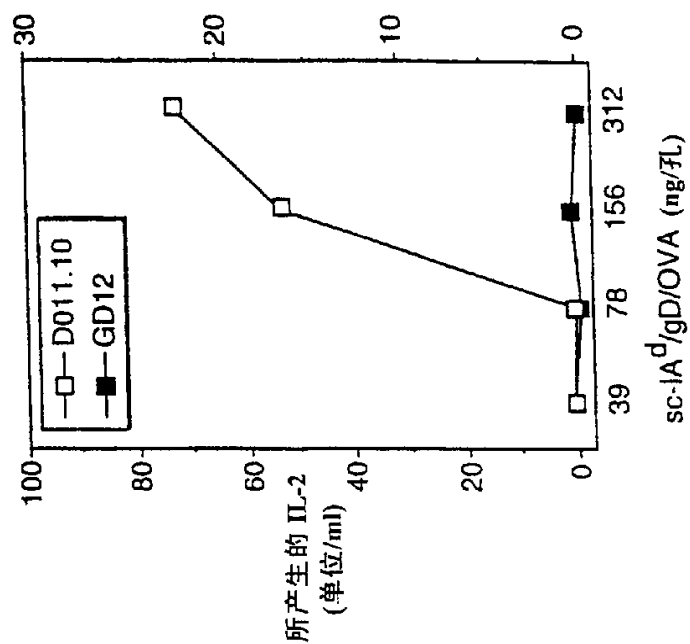


图 5B





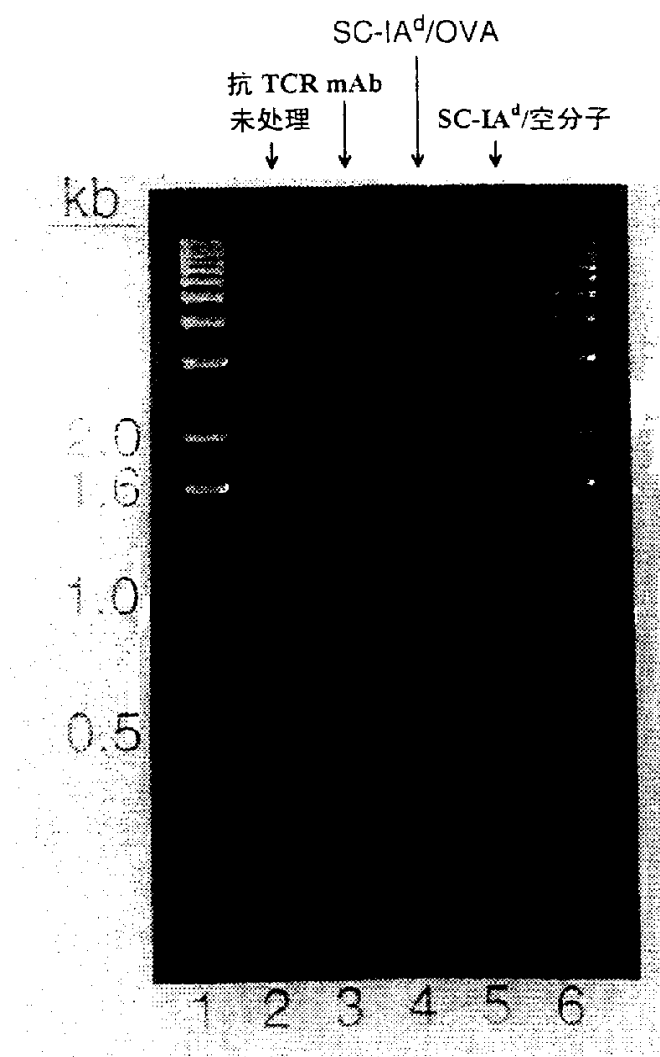


图 7

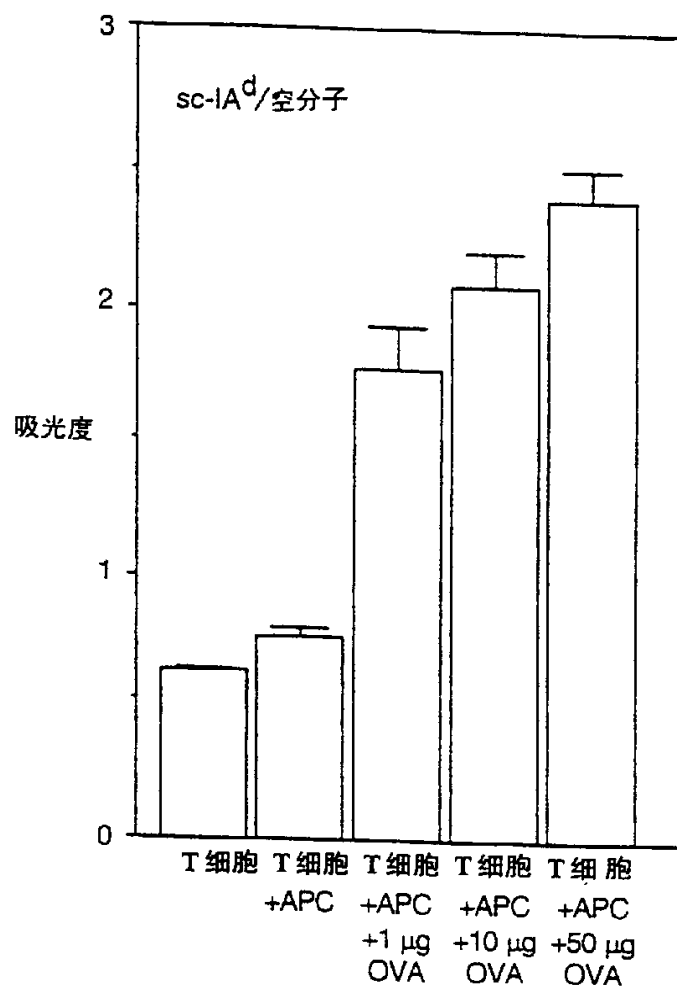


图 8A

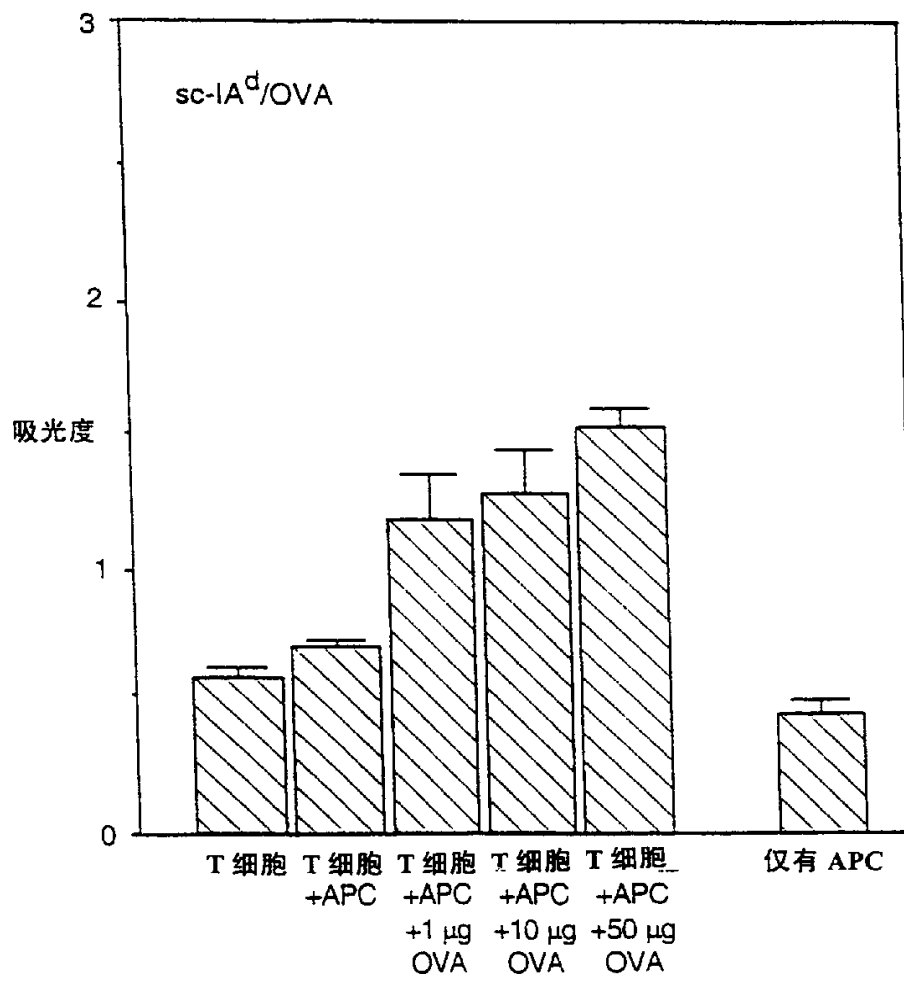


图 8B

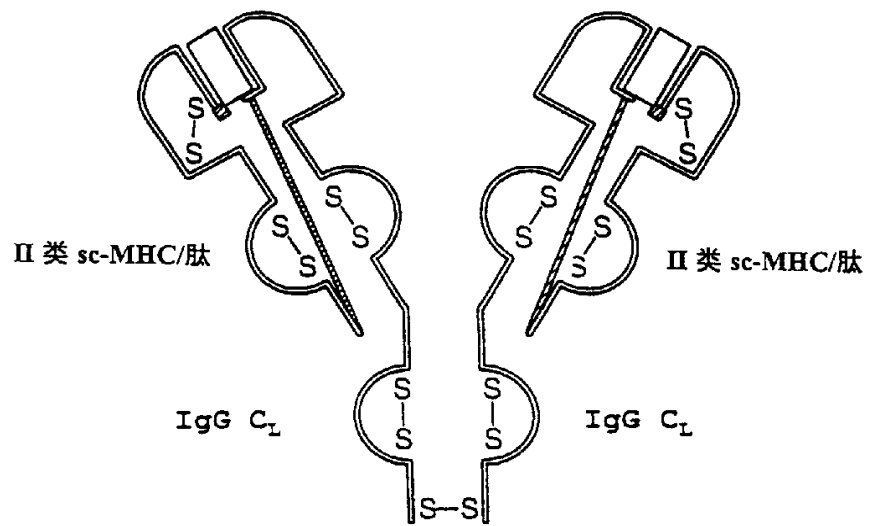


图 9A

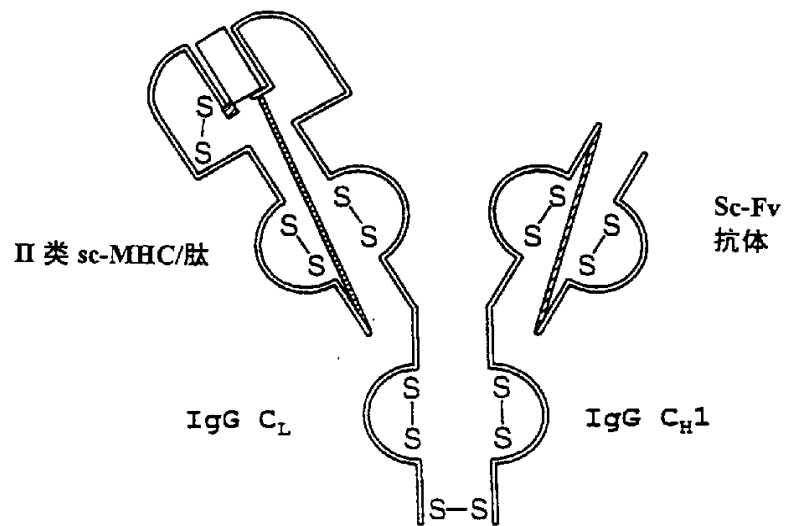


图 9B

	SEQ No.
CCACCATG	1
OPR132 5'-CCCCCAAGCTTCCCGGGCCACCATGGCTCTGCAGATCCCCAGC-3'	2
OPR133 5'-CCCCCACTTAAGGTCCTTGGGCTGCTCAGCACC-3'	3
OPR102 5'-GGGGGGGCCATGGCCGAACTCCGAAAGGCATTTTCG-3'	4
OPR104 5'-GCGGCGACTAGTCCACTCCACAGTGATGGGGC-3'	5
OPR100 5'-GGGGGGGCCATGGCCGAAGACGACATTGAGGCCGAC-3'	6
OPR101 5'-GCGGCGACTAGTCCAGTGTTTCAGAACCGGCTC-3'.	7
IADF100 5'-GGGGGGGATATCTCTCAGGCTGTTACGCTG-3'	8
IADB100 5'-GGGGGGGTTTCGAAAAGTGTAATTACGGGGGGGCTGGAATCTCAGGTTC-3'	9
OPR145 5'-GGGGGGGCTCGAGTATCAAAGAAGAACATGTGATCATC-3'	10
DR1A-B 5'-GCGGCGGGATCCGTTCTCTGTAGTCTCTGGGAGAGG-3'	11
OPR203000 5'-GATCCGAGGAAGAAGAGTACATGCCCATGGAACCCGGGTGAG-3'	12
OPR203001 5'-AATTCTCACCCGGGTTCCATCGGCATGTAATCTTCTCCTCG-3'	13
DR2B-F 5'-CCCCCGCTAGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCGGAGGGGGGGACA CCCGACCACGTTTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG-3'	14
DR2B-E2 5'-CCCCCGAATTCCCCACTAGTCCATTCCACTGTGAGAGGGCTTGTC AC-3'	15
MB201806 5'-GGGGGGGGCCATGGCCTACGACGAGAACCCCGTGGTG-3'	16
MB175959 5'-GGGGGGACTAGTTCGCCGCTGCACTGTGAAGC-3'	17
MB201807 5'-GGGGGGGTATGCATACGACGAGAACCCCGTGGTG-3'	18
MB201808 5'-GGGGGGGACTAGTTCCTTCCACTTCGAGGAACTGTTTCC-3'	19
MB201809 5'-CCTCCTGGTCTCCTCTGTGAGTGG-3'	20
MB201810 5'-CCACTCACAGAGGAGACCAGGAGG-3'	21
OPR 215 5'-CCC CCC ACC GGT TAC GAC AAC CCC GTG GTG-3'	22
OPR 216 CCC CCC ATC GAT AAG TGT ACT TAC GTG GGA GAG GGC TTG GAG CAT-3'	23

图 10A

OVA 323-399 ISQAVHAHAHAEINEAGR	26
Gd-246-261 APYSTLLPPELSETP	27
MBP (83-102) Y83 YDENPVVHFFKNIVTPRTPP	28
14 氨基酸接头 TSGGGGSGGGGSSS	29
EE 标志 EEEEYMPMEPG	30
24 氨基酸接头 TSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSS	31
MBP (S4-102) DENPVVHFFKNIVTPRTPP	32

图 10B