

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

A61K 47/48

A61P 35/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194071.6

[45] 授权公告日 2002 年 8 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1089606C

[22] 申请日 1995.6.7

[21] 申请号 95194071.6

[30] 优先权

[32] 1994.7.11 [33] SE [31] 9402430-4

[86] 国际申请 PCT/SE95/00681 1995.6.7

[87] 国际公布 WO96/01650 英 1996.1.25

[85] 进入国家阶段日期 1997.1.10

[73] 专利权人 法马西亚及厄普约翰公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

[72] 发明人 L·亚伯拉罕森 P·比约克

M·德尔斯藤 T·卡兰

[56] 参考文献

WO9201470A1 1992.2.6 A61K39/00

审查员 魏春宝

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

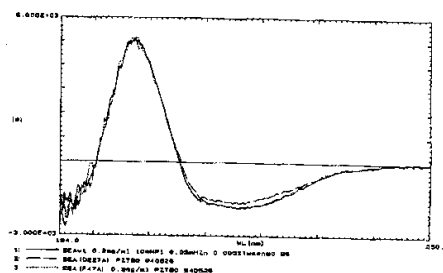
代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 一种修饰的超抗原和一种寻找靶物化合物的缀合物和该缀合物的用途

[57] 摘要

一种缀合物,包括(a)一种结合预测定结构的生物特异性亲和配对物(寻找靶物基团)和(b)一种肽,其(i)包含自超抗原衍生的氨基酸序列,和(ii)具有结合 T 细胞受体 V β 链的能力,和(iii)与所述肽从其中衍生的超抗原相比,具有修饰的结合 MHC II 类抗原的能力,各部分共价连接在一起。



ISSN 1000-4274

权 利 要 求 书

1. 缀合物, 包括

a. 一种能结合至预先确定的与疾病相关的细胞表面结构的生物特异性亲和配对物, 和

5 b. 一种肽, 其

i. 包含自一超抗原衍生的氨基酸序列,

ii. 具有结合 T 细胞受体 V β 链的能力, 和

iii. 被突变, 因而与肽自其中衍生的超抗原相比, 具有降低的结合 MHC II 类抗原的能力,

10 各部分共价连接在一起。

2. 权利要求 1 的缀合物, 它具有激活 T-淋巴细胞, 以溶胞在其细胞表面具有所述细胞表面结构的细胞的能力。

3. 权利要求 2 的缀合物, 其中疾病选自癌症, 病毒感染, 自身免疫病, 寄生虫寄生。

15 4. 权利要求 3 的缀合物, 其中疾病是癌症。

5. 权利要求 4 的缀合物, 其中生物特异性亲和配对物包含多肽结构。

6. 权利要求 5 的缀合物, 其中生物特异性亲和配对物和肽融合在一起。

20 7. 权利要求 6 的缀合物, 其特征不在于生物特异性亲和配对物是抗体或者抗体的抗原结合片段。

8. 权利要求 7 的缀合物, 其特征不在于所述的超抗原是选自其结合 MHC II 类抗原需要锌离子的超抗原。

9. 权利要求 8 的缀合物, 特征在于超抗原是葡萄球菌肠毒素 A。

25 10. 权利要求 9 的缀合物, 其中 SEA 在一个密码子上发生了突变, 其编码当超抗原结合于 MHC II 类抗原时, 与锌配位的氨基酸残基。

11. 用于治疗哺乳动物疾病症状的前述任一权利要求的缀合物, 症状是指通过表达疾病特异结构而与症状相关的特异细胞的出现, 其中生物特异性亲和配对物定向于疾病特异性表面结构。

说明书

一种修饰的超抗原和一种寻找靶物化合物的 缀合物和该缀合物的用途

- 5 超抗原主要是病毒或细菌来源蛋白质，能同时与哺乳动物细胞 MHC II 类抗原和 T 细胞受体 V β 链结合。这种结合引起 T - 淋巴细胞的激活和荷载 MHC II 类抗原细胞的溶胞。当与超抗原接触时，V β 链结合部分适当程度的多态性引起相对大部分的 T - 淋巴细胞被激活（与通过正常抗原加工途径的激活作用相比）。
- 10 最初超抗原的定义是与各种葡萄球菌肠毒素（SEA，SEB，SEC₁，SEC₂，SED，和 SEE）相关的。近来发现新的命名为 SEH 的葡萄球菌肠毒素（Kegong 等，J. Exp. Med. 180（1994）1675 - 1683）。引起兴趣后，又发现了超抗原。例子其中包括中毒性休克综合症毒素 1（TSST - 1），与皮癣皮肤（scalded skin）综合症有关的表皮脱落毒素（Exft），链球菌热原外毒素 A，B 和 C（SPE A，B 和 C），鼠乳腺肿瘤病毒蛋白质（MMTV），链球菌 M 蛋白质，梭状芽苞产气荚膜杆菌（Clostridial perfringens）肠毒素（CPET）。超抗原及其性质的综述参见 Kotzin 等（Adv. Immunol. 54（1993）99 - 166）。
- 15 假单孢杆菌外毒素 A 被看好为功能性超抗原，因为有结果表明这种毒素可以在细胞内通过使细胞生产生成在细胞表面表达的片段，所述片段具有结合 V β 链的能力并接着激活 T 细胞。（假单孢杆菌外毒素 A，Legaard 等，Cell. Immunol. 135（1991）372 - 382）。
- 20 已经建议通过常规免疫系统激活而实现的治疗效果，将超抗原用于多种疾病的治疗（Kalland 等，WO 9104053；Terman 等，WO 9110680；Terman 等，WO 9324136；Newell 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88（1991）1074 - 1078）。
- 25 与疫苗相关，已建议使用突变过的从而排除它们 TCR 结合能力的超抗原（Kappler & Marrack，WO 9314634）。
- 30 先前已经说明了超抗原的突变（Kappler & Marrack，WO 9314634；Kappler 等，J. Exp. Med. 175（1992）387 - 396；Grossman

等, J. Immunol. 147 (1991) 3274 - 3281 ; Hufnagle 等, Infect. Immun. 59 (1991) 2126 - 2134) 。

我们自己以前曾建议为了溶胞表达抗体定向结构的细胞, 而将超抗原和抗体的缀合物用于治疗 (Dohlsten 等, WO 9201470 ; Lando 等, 5 Cancer Immunol. Immunother. 36 (1993) 223 - 228 ; Kalland 等, Med. Oncol. Tumor Pharmacother. 10 (1993) 37 - 47 ; Lando 等, J. Immunol. 150 (8, 第二部分) (1993) 114A (Joint Meeting of the American Association of Immunologists and Clinical Immunology Society, Denver, Colorado, USA, May 21 - 25 (1993)) ; Lando 10 等, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Annu. Meet. 33 (0) (1992) 339 (Annual meeting of the American Association for Cancer Research, San Piego, California, USA, May 20 - 23 (1992)) ; Dohlster 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 9287 - 9291) 。建议接受治疗的疾病是癌症, 病毒感染, 寄生虫寄生, 15 自身免疫疾病和其它与表达疾病特异表面结构细胞相关的疾病。至今进行的实验工作重点在于包含重组 SEA 和各种抗癌抗体的缀合物上。与未结合形式的超抗原相比, 这种缀合物具有一定程度降低的结合 MHC II 类抗原的能力。没有确定降低的 MHC II 类抗原结合能力对实现最佳溶胞和最佳治疗效果是否是有利的。

20 Ochi 等人先前已描述了用与肿瘤特异抗独特型抗体化学缀合的 SEB 的免疫治疗实验 (J. Immunol. 151 (1993) 3180 - 3186) 。

在优先申请实行期间, 瑞士专利局另外引用了 Buelow 等人的文献 (J. Immunol. 148 (1992) 1 - 6) , 其中描述了蛋白质 A 和 SEB 片段的融合, 但没有强调 MHC II 类抗原结合, 或者将这种融合产物用于细胞 25 杀伤; 和 Hartwig 等人的文献 (Int. Immunol. 5 (1993) 869 - 875) , 其中说明了突变影响超抗原链球菌红斑 (erthrogenic) 毒素 A 的未融合形式的 MHC II 类抗原结合。

发明目的

30 本发明的第一个目的是在抗定向细胞毒性全身免疫刺激方面改善现有技术已知的超抗原 - 抗体缀合物。刺激产生活化的 T - 淋巴细胞, 该刺激决定于超抗原与 T 细胞受体和 MHC II 类抗原两者的结合能力。

本发明的第二目的是提供生物特异性亲和配对物（例如抗体）和具有经修饰的对 MHC II 类抗原的亲亲和的超抗原之间的缀合物。现已证明暴露抗原（抗缀合物的抗体/生物特异性亲和配对物所定向的抗原）细胞的超抗原抗体依赖细胞溶胞（SADCC）的选择性较之其它暴露 MHC II 类抗原的细胞得到提高。

本发明的第三个目的是提供缀合物，其可以用作患癌症，自身免疫疾病，寄生虫寄生，病毒感染或其它与在细胞表面表达特异于各种疾病的结构的细胞相关的疾病的哺乳动物的治疗中的活性成份。

发明说明

10 本发明的主要方面是一种缀合物，包含

a. 定向于一结构的生物特异性亲和配对物，所述结构是人们欲与缀合物结合的，

b. 一种肽，其

i. 自超抗原衍生，

15 ii. 具有结合 T 细胞受体 V β 链的能力，且

iii. 具有与该肽自其中衍生的超抗原相比经修饰的结合 MHC II 类抗原的能力（野生型超抗原 = SA（wt））。

所述肽与所述亲和配对物通过桥（B）互相共价连接。

20 优选缀合物具有活化 T - 淋巴细胞的能力并指导 T - 淋巴细胞选择地溶胞细胞，在这些其选择溶胞的细胞表面上暴露有亲和配对物定向的结构。这意谓着在 SADCC 介导方法中（超抗原抗体依赖细胞的细胞毒性），该缀合物将引起细胞溶胞。参见下文中的实验部分和我们先前关于超抗原和抗体之间缀合物的公开文献（例如，Dohlsten 等，WO 9201470）。

25 本发明缀合物具有类似于现有技术中公开的超抗原 - 抗体缀合物的结构（Dohlsten 等，WO 9201470，本文中引作参考），即本发明缀合物具有下面通式：



30 其中 T 代表生物特异性亲和配对物，SA(m) 是经修饰的超抗原（上文提到的肽），且 B 是将 T 和 SA(m) 连接在一起的共价桥。

原则上 T 可以是任何通过生物特异性亲和结合的结构。最重要的情况下，T 能结合细胞表面结构，优选如上文给出的疾病特异结构。这种

T 定向结构一般不同于 (a) 超抗原衍生肽 (SA (m)) 结合的 V β 链表位和 (b) 未经修饰的超抗原结合的 MHC II 类抗原表位。生物特异性亲和配对物 T 可以主要从白细胞介素 (例如白细胞介素 - 2), 激素, 抗体和抗体的抗原结合片段, 生长因子等中间选择。参见例如参加会议

5 “癌症治疗的分子研究”, Ashville, North Carolina, November 7 - 11, 1993, 的 Woodworth 的文章, 细胞因子毒素的临床前及临床进展。与免疫球蛋白 (例如蛋白质 A 和 G 和 L) 的恒定区, 凝集素, 链霉亲和素, 生物素等结合的多肽在优先权日被认为有较小重要性。

在优先权日, 优选 T 是抗体或抗体抗原结合片段 (包括 Fab, F(ab)₂, Fv, 单链抗体等), 特别强调定向抗所谓 C 242 的表位 (Lindholm

10 等, WO 9301303) 或抗其它癌特异表位抗体的抗体活性片段 (如 Fab)。

在 T 是抗体的情况下, 其主要是单克隆或一定数目的单克隆 (例如 2, 3, 4, 5 或更多) 的混合物。在非治疗用途情况下, T 可以是多克隆抗体。

15 T 不一定必须具有多肽结构。

修饰的超抗原 SA (m) 主要是突变超抗原, 但可能也可以是化学修饰超抗原, 包括保持 T 细胞受体 V β 链结合能力的超抗原片段。

术语“突变的超抗原”指通过取代, 插入或去除天然超抗原中的一个或几个氨基酸而在基因组水平上修饰超抗原结合 MHC II 类抗原的天然能力。

20

在本发明化学缀合物中可以等同使用通过突变去除整个氨基酸序列的部分氨基酸而得到的超抗原片段和通过超抗原的酶解或化学分解而得到的片段。

经修饰的超抗原 SA (m) 可以包括自不同超抗原衍生的并且可能已经突变的一个或几个氨基酸序列, 例如下文将提到的优选超抗原的结合物。

25

如此得到的修饰的超抗原 SA (m) 与天然超抗原相比具有降低的免疫原性和毒性。

能与 T 细胞受体 V β - 链交叉反应的其它基团/物质可能也可以与上文给出的突变超抗原 (SA (m)) 等同使用。这样的基团/物质可以是非多肽结构。

30

在优先权年来，本发明最令人感兴趣的产物候选者包括突变形式的具有多 MHC II 类抗原结合位点和/或与 Zn^{2+} 配位能力的超抗原，例如 SEA，SED，SEE 和 SEH。

T 以及 SA (m) 可以通过重组技术制备。

- 5 桥 B 可以选择现有技术公开的 (Pohlsten 等, WO 9201470), 即优选是亲水性的并具有一个或几个选自酰胺, 硫醚, 醚, 二硫化物等的结构。在桥具有未取代未断裂烃链的情况下, 优选不具有芳香环如苯基。最重要的桥是以重组技术获得的桥, 即缀合作用以基因组水平发生。在这种情况下, 寡肽桥包含亲水性氨基酸残基, 优选如 Gln, Ser, Gly, Glu, 和 Arg。也包括 Pro 和 His。在优先权年期间已决定出优选的桥是包括三个氨基酸残基的肽 (GlyGlyPro)。
- 10

- 本发明缀合物中每个生物特异性亲和配对物可以包括一个或几个修饰的超抗原, 反之亦然。这意谓着上式中的 T 除生物特异配对物之外可以包含一个或几个修饰的超抗原。类似地, SA (m) 可以包含一个或几个生物特异性亲和配对物 T。亲和配对物 T 和 SA (m) 也可以包括其它结构。每个亲和配对物的修饰的超抗原数优选是一个或两个。
- 15

- 合成本发明新的缀合物主要根据两条主要途径进行: 1. 通过重组技术, 2. T 对 SA (m) 的化学连接。这些方法对本领域普通熟练技术人员来说是非常熟悉的并包括很多变化。可见本发明主要涉及人工缀合物, 即自然界中未发现的缀合物。
- 20

修饰的超抗原与生物特异性亲和配对物 T 的化学物连接经常使用存在于每个化合物中许多位置上的功能基团 (例如伯氨基或羧基)。因此终产物会含有缀合物分子的混合物, 这些缀合物分子就发生连接的位置来说是不同的。

- 25 对于重组缀合物 (融合蛋白), 就连接位置来说, 所得缀合物质将是均一的。经修饰的超抗原的氨基末端与生物特异性亲和配对物的羧基末端连接, 或者反过来生物特异性亲和配对物的氨基末端与修饰超抗原的羧基末端连接均有此结果。对于抗体, 如完整抗体和抗原结合片段 (Fab, Fv 等), 无论轻链或者重链可以用于这种融合。现在优选重组缀合物, 优选 Fab 片段以及经修饰的超抗原氨基酸末端与抗体重链 (CH 1) 的第一恒定区连接, 不排除也可以给出很好结果的与轻链或与 VH 和 VL 域的类似连接。
- 30

有两种不同的在大肠杆菌中获得大量超抗原（包括修饰和融合形式）的方法：细胞内生产或分泌。对于本发明缀合物优选后一方法，因为它提供了正确折叠蛋白质从外周胞质和从培养基中纯化的纯化作用。细胞内生产导致复杂的纯化过程，且经常需要蛋白质体外再折叠（为使蛋白质获得正确的三级结构）。上文不排除也可以在其它宿主细胞中生产活性缀合物，例如真核细胞，如酵母或哺乳动物细胞。

突变超抗原的制备和具有经修饰的结合（亲和）MHC II类抗原能力的突变体的选择也可以根据已知技术进行（参见，例如，Kappler等，J. Exp. Med. 165（1992）387 - 396）。也可以参见我们的实验部分。

缀合物结合T细胞受体V β 链，结合靶结构的能力，以及引起靶细胞溶解的能力决定于i. a. 自超抗原衍生的肽（SA(m)），生物特异性亲和配对物（T）和桥（B）的结构和长度。本领域普通技术人员通过研究构效关系并借助于已公开的与现有技术已知超抗原抗体缀合物的那些模型（参见上文指出的公开文献），能够在结合能力和引起胞溶能力方面优化本发明缀合物。也可以见下文的实验部分。

经修饰的结合MHC II类抗原能力指比值 IC_{50} （SA(wt))： IC_{50} （SA(m))<0.9（90%），如<0.5（<50%）和也可能<0.01（<1%）。或者另一个方法，本发明缀合物经修饰的结合能力可以以相关常数比， K_d （SA(wt))： K_d （SA(m))来测定， K_d 以nM测定，且具有与比值 IC_{50} （SA(wt))： IC_{50} （SA(m))相同的限制条件。 IC_{50} （SA(wt))， IC_{50} （SA(m))， K_d （SA(wt))和 K_d （SA(m))的测定见下文实验部分。

现有技术已知一些超抗原可以有两个或多个结合MHC II类抗原的位点（Fraser等，In：Superantigens：A Pathogens view on the immune system. Eds. Huber & Palmer, Current Communications in Cell Molecular Biology 7（1993）7 - 29）。对于这种类型超抗原，应该至少在一个结合位点修饰结合能力，例如减小上文提到的大小。用超抗原修饰可能足以产生两个MHC II类抗原结合位点亲和的变化差异，尝试地>10%且优选通过在至少一个位点减小亲和而产生这种变化差异。

超抗原以不同亲和结合不同亚基的 TCR V β 链。在本发明融合蛋白/缀合物中，所用的超抗原可以是被修饰的，从而使一个或几个亚基具有改变的亚基特异性或改变的亲和。有充分理由相信 TCR V β 亲和和通过 TCR 的刺激作用之间存在抛物线型关系，即中等程度的亲和将给出最大刺激作用。因此，一旦包括修饰超抗原的融合蛋白质/缀合物能明显刺激基本上呈递所有人 V β 亚基分布的静息 T 细胞群而使其增殖时，就已取得修饰超抗原对 TCR V β 的合适的亲和。所述 T 细胞群可以是随机选择人个体中集中的 T 细胞。“明显”是指刺激作用可以测出。实验部分表 II（右栏）的结果表明引起本发明缀合物/融合蛋白 SADCC 的能力经常基本上是与包括野生型超抗原融合物相同。

本发明缀合物/融合蛋白的主要用途

本发明缀合物主要为了治疗和正常超抗原和抗体之间缀合物治疗的疾病一样的疾病。参见上文提到的公开文献。因此本发明缀合物可以作为主要治疗或者作为与外科或其它药物相关的辅助治疗给药。

本发明药物组合物包括本领域已知的、但现在包含本发明新缀合物的制剂。因此组合物可以是冻干的颗粒材料，无菌或消毒制备的溶液，片剂，安瓿等形式。载体可以存在，如水（优选用例如 PBS 缓冲至生理 pH 值）或其它惰性固体或液体材料。常规情况下通过使缀合物混合、溶于、结合到，或者与一种或几种水溶性或水不溶性含水或无水载体化合来制备组合物，如果需要，可以一同加入合适的添加剂和佐剂。载体和条件不反作用地影响缀合物活性是绝对必要的。象水这样的包括在表达的载体中。

本发明缀合物一般以配制前剂量出售或给药，每剂含有有效量缀合物，以现在的结果为基础，相信在 10 μ g - 50mg 范围内。准确剂量具体情况各不相同，取决于患者的体重和年龄，给药途径，疾病类型，抗体，超抗原，键联形式（- B -）等。

给药途径是本领域一般已知的那些途径，即靶细胞溶胞有效量或治疗有效量的本发明缀合物与靶细胞接触。上文具体指明的大部分是指肠胃外给药，如给哺乳动物如人注射或输液（皮下，静脉内，动脉内，肌肉内）。本发明缀合物可以局部或全身给药。

“靶细胞溶胞有效量”是指有效激活和定向并使 T - 淋巴细胞破坏靶细胞的量。

优先权年末已决定包括未修饰超抗原的缀合物/融合蛋白优选给药途径是每天 3 小时静脉内输注, 并结合使用退烧药(扑热息痛)。在 4 天间重复给药, 在患者体内产生抗融合蛋白/缀合物的第二抗体之前停止给药。这种剂量方案可能也适用于本发明缀合物/融合蛋白。

5 应用的其它领域

本发明缀合物也可以用在定性或定量测定寻找靶物基团(T)定向的结构。这些方法一般是本领域人员公知的。因此修饰的超抗原可以用作免疫测定包括免疫组织化学中的标记基团, 意味着该标记基团接着被例如一种抗体检测, 该抗体定向于肽(SA(m)), 并用酶, 同位素, 荧光团或一些现有技术已知的其它标记基团标记。另一种免疫测定方法是在细胞群中测定在细胞表面表达能结合寻找靶物基团(T)的结构的细胞。这种用途是指 SADCC 测定中来自细胞群的样品与 T-淋巴细胞与本发明缀合物一起在温孵。如果温孵产生细胞溶胞表明细胞群包含在细胞表面表达所述结构的细胞。

15

实验部分

生产重组蛋白质

抗体

主要用单克隆抗体 C 215 作为模型物质进行与本发明相关的实验工作。该抗体定向抗 GA - 733 家族(参见例如 EP 376 746)参见其中引用的参考文献和 Larsson 等, Int. J. Canc. 32 (1988) 877 - 82)。已断明 C 215 表位对人癌症治疗没有足够的特异性。在优先权日从用野生型 SEA 的融合产物的实验判断, 相信 mab C 242 (Lindholm 等, WO 9301303) 是一个较好的候选者。

细菌菌株和质粒

25

大肠杆菌菌株 UL 635 (xyl - 7, ara - 14, T4^R, ΔompT) 和 HB 101 (Boyer and Roulland - Dessoix, J. Mol. Biol. 41 (1969) 459 - 472) 被分别用于表达和克隆。载体 pKP 889 被用来表达 Fab - SEA 融合蛋白(自鼠抗体 C 215 衍生), 载体 pKP 943 和 pKP 1055 用来分泌 SEA (图 1)。Fab - SEA 表达载体 pKP 889 与 pKP 865 相同 (Dohlsten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 印刷中), 只不过 C_H1 和 SEA 之间的间隔区是 GlyGlyAlaAlaHisTyrGly。pKP 943 的表达产生具有天然氨基末端的 SEA。使用 pKP 1055 产生在氨基末端

30

加一个 Gly 残基的 SEA。在两个载体中，来自葡萄球菌蛋白 A (Uhlén 等, J. Biol. Chem. 259 (1984) 1695 - 1702) 的信号用于转录和翻译，一种合成信号肽用于分泌 (L. Abrahmsén, 未发表)。

体外诱变

- 5 在 Perkin Elmer Thermocycler 上进行聚合酶链反应来进行突变。反应混合物 (100 μ l) 含有: 购自 Perkin Elmer Cetus 的 1 $\times$ PCR 缓冲液 (10mM Tris/HCl, pH 8.3, 1.5mM MgCl₂, 0.001 % (w/v) 明胶), 另外的 2mM MgCl₂, 0.4mM dNTPs (Perkin Elmer Cetus), 2.5 单位 Ampli Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus, USA) 和 100ng DNA 模板。加入引物, 使其终浓度为 0.8 μ M。原来的模板是包含与 Betley 等 (J. Bacteriol. 170 (1988) 34 - 41) 公开的相同的金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因的质粒, 只不过所述基因的第一个密码子 (编码 Ser) 变成 TCC 以在该基因的 5' 终端提供一个 Bam HI 位点。然后使用包含通过沉默突变引入的更多单一限制性酶切位点的衍生物。用一套引物进行紧接着限制性酶切位点的突变引入。其中一个引物跨越突变和限制性酶切位点。对于大多数突变得用两套引物, 在两个连续步骤中进行 PCR。新的限制性酶切位点与每个突变一起引入以使易于鉴别。在 Gene Assembler (Pharmacia Biotech AB, Sweden) 上合成用作引物的寡核苷酸。为证实每一突变, 在 Applied Biosystem DNA - 序列测定仪上使用其 Taq DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing 药盒测定核苷酸序列的相关部分。
- 10
- 15
- 20

蛋白质制备和分析

- 进行不同基因构建物的大肠杆菌细胞在室温 (Fab - SEA 载体) 和在 24 - 34 $^{\circ}$ C (分泌载体, 最佳温度取决于突变) 下生长过夜。肉汤是补加有卡那霉素 (50mg/l) 的 2 $\times$ YT (16g/l 细菌培养用胰化蛋白胨, 10g/l 细菌培养用酵母提取物, 5g/l NaCl)。通过加入异丙基 - β - D - 硫半乳糖苷达终浓度为 100 μ M 来诱导融合蛋白。(用于非融合 SEA 表达中的蛋白质 A 启动子是组成型的)。以 5000 $\times$ g 离心使细胞成片状沉淀物, 通过一小时振荡期间在冰上使事先冷冻的细胞片状物在 10mM Tris - HCl (pH 7.5) 中小心融化而释放外周胞质内含物。以 9500 $\times$ g 离心 15 分钟澄清外周质提取物。不用进一步纯化而使用 Fab - SEA 蛋白质。通过在抗 SEA 抗体柱上的亲和层析进一步纯化 SEA 和 Gly -
- 25
- 30

SEA。自用 SEA 预免疫的兔身上事先采集多克隆兔抗 - SEA 抗体，并在蛋白质 G Sepharose® (Pharmacia Biotech) 上亲和层析进行纯化。
蛋白质分析

在预制的聚丙烯酰胺 SDS Tris - Glycine Novex 凝胶 (4 - 20%
5 梯度或均匀 12 % , Novex 新实验技术) 上分离蛋白质，用考马斯蓝染色或者用于 Western 印迹法。在 Western 印迹法分析中用多克隆兔抗 SEA 抗体 (上文) 检测 SEA，接着用猪抗兔 Ig 抗体，和兔抗辣根过氧化物酶抗体和过氧化物酶。对于 Fab - SEA 融合蛋白也使用了过氧化物酶缀合的识别 k 链的鼠抗体 (AAC 08P, Serotech LTD, England)。3,3'-
10 - 二氨基联苯胺 (Sigma) 用于过氧化物酶显色。

在室温 (22 - 25 °C)，在含有 0.02mM ZnSO₄ 和 0.005 % (v/v) Tween® 20 的 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 8.2) 中，在 J - 720 分光偏振计中 (JASCO, Japan) 得到圆二色 (CD) 谱。扫描速度是 10nm/min，且每个谱是五次连续扫描的平均结果。池径长度是 1mm，蛋白质浓度为
15 0.2 至 0.5mg/ml。平衡时盐酸胍 (Gdn - HCl) 变性在 23 °C 通过 222nm 处的 CD 而测定，其中蛋白质浓度为 0.3mg/ml，池径长度是 1mm。这些数据用来计算未折叠蛋白质的表观组分 (F_{app})。将这个数据套入两位点折叠方法 (Hurle 等, Biochemistry 29 (1990) 4410 - 4419) 得到未折叠平衡参数。

20 体外结合和功能测定
原料

试剂：使用自英国 Gibco, Middlesex 购得的 RPMI 1640 培养基。该培养基 pH 7.4，并含有 2mM L - 谷氨酰胺 (Gibco, Middlesex, 英国)，0.01M HEPES (Biological Industries, 以色列)，1mM NaHCO₃
25 (Biochrom AG, 德国)，0.1mg/ml 硫酸庆大霉素 (Biological Industries, 以色列)，1mM 丙酮酸钠 (JRH Biosciences Industries, USA)，0.05mM 巯基乙醇 (Sigma Co., USA)，100 倍浓的非基本氨基酸 (Flow Laboratories, 苏格兰)，并补充有 10 % 胎牛血清 (Gibco, Middlesex, 英国)。如上所述获得重组 SEA (wt)，SEA(m)
30 和融合产物 C 215 Fab - SEA (wt) 和 C 215 Fab - SEA (m)。自美国 Cetus 公司购得人重组 IL - 2。自美国 Sigma 公司购得丝裂霉素 C。自德国

Merck 公司购得 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 。自英国 Imperial 公司购得不含镁和钙的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。

细胞: 自美国典型细胞培养物中心 (American Type Cell Culture Collection) (Rockville, MD, USA) 得到人结肠癌细胞系 Colo 205 和 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji (表达 HLA - DR3 / W10, - DP 7, - DQ w1/w2)。EBV 转化的淋巴母细胞样 B 细胞系 BSM 是自 Van De Griend 博士, Dept of Immunology, Dr Daniel den Hoed Cancer Center, Leiden, 荷兰, 得到的慷慨赠送的礼物。细胞反复进行用 Gen - Probe Mycoplasma T. C. 试验, Gen - Probe Inc. San Diego, USA 的支原体污染试验。

SEA 激活的细胞系是通过激活外周血中单核细胞而制备的。自 University Hospital of Lund 的血液供者身上得到血沉棕黄层血样。在 2×10^6 个细胞/ml 浓度时用含 10 % FCS 培养基中丝裂霉素 C 处理的 SEA 包被 BSM 细胞 (与 100ng/ml SEA 预温) 刺激 PBMs。T 细胞系用 20U/ml 人重组 IL - 2 两星期再刺激一次并用丝裂霉素 C 处理的 SEA 包被 BSM 细胞一星期刺激一次。用在测定之前将细胞系培养 4 - 12 星期。

按照台盼蓝排斥测定的, 效应细胞的生存力超过 50 %。

测定野生型和突变体 SEA 的 MHC II 类抗原结合特性

放射性碘化方法。使用乳过氧化物酶技术的酶珠 (NEN, Boston, MA) 用 10 至 25mCi Na^{125}I 标记合适量的野生型或突变体 SEA。用叠氮化钠猝灭以终止反应, 并且通过 PD - 10 柱 (Pharmacia Biotech AB, 瑞典), 用 R10 培养基作为洗脱缓冲液, 从游离碘中分离蛋白质结合放射活性。选择条件, 使 I - 125 和蛋白质之间的计量比 $\leq 2:1$ 。通过在 TSK SW 3000 HPLC 柱上进行大小排阻层析来校准放射化学纯度。只对野生型 SEA 检测放射碘化学对结合活性的作用, 发现没有影响 (数据未给出)。

定向结合测定。预先在 R10 培养基中培养的 $6 \times 10^4/100\mu\text{l}$ Raji 细胞一式三份被加入到圆锥形聚丙烯试管中, $100\mu\text{l}/\text{试管}$ 连续稀释的 ^{125}I - 标记野生型或突变体 SEA。细胞用 2ml 1 % (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), pH 7.4, 冲洗, 以 $300 \times g$ 离心 5 分钟, 并抽吸。这一过程重复两次。最后, 在 γ 计数器 (Packard

Instruments Co, Downers Grove, IL, USA) 中分析细胞的细胞结合放射活性。扣除非特异结合后(即只是与 R10 培养基保温后的结合), 根据 Scatchard (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660 - 72) 计算饱和时的表观相关常数, K_d , 结合位点数, N 。

- 5 抑制测定(突变体 SEAs 对 ^{125}I - 标记野生型 SEA 结合的抑制)。这些抑制实验按照定向结合测定说明的那样进行, 稍加改进。简言之, 使 $50\mu\text{l}$ ^{125}I - 标记的野生型 SEA 与过量未标记野生型或突变体 SEA ($50\mu\text{l}$ /试管) 竞争结合 $6 \times 10^4/100\mu\text{l}$ Raji 细胞。定向测定中使用 $\approx 40\%$ 结合放射活性的示踪物浓度产生, 获得抑制测定中的最大灵敏度。竞争者替代能力以达到结合放射活性的 50% 抑制的浓度 (IC_{50}) 来表示。用下式计算突变体相对于野生型 SEA 的结合亲和:

$$\text{IC}_{50}(\text{SEA}(\text{wt})) : \text{IC}_{50}(\text{SEA}(\text{m}))$$

- 15 为了分析突变体是否象野生型 SEA 一样竞争结合 Raji 细胞上相同的位点, 用 SEA 突变体获得的结合数据以对数 - 分对数函数作图, 并用野生型 SEA 相应数据做平行试验。

- 抑制测定(未标记野生型 SEA 和 SEA 突变体对荧光标记野生型 SEA 结合的抑制)。Raji 细胞 (2.5×10^5) 与抑制剂在 37°C 保温 30 分钟, 所述抑制剂(野生型或突变体 SEA; $0-6000\text{ nM}$) 在 $50\mu\text{l}$ CO_2 - 独立的补充有 10% FCS, 谷氨酰胺和庆大霉素的培养基 (Gibco) 中稀释。
- 20 加入荧光素缀合的野生型 SEA, 达到 30 nM 终浓度, 样品在 37°C 温育另外半小时。样品用补充有 1% BSA 的冰冷冻 PBS (PBS - BSA) 冲洗三次, 最后在冰上在 0.4 ml PBS - BSA 中保存直到其被用于分析。在 FACStar[®] (Becton Dickinson) 流式细胞仪上自每一样品中用 10000 个活细胞分析绿色荧光并用 LYSIS II 程序计算平均荧光值。
- 25 SEA (wt), SEA (m) 和它们与 C 215 Fab 融合蛋白的 SDCC 和 SADCC 测定。

- SDCC 测定。用体外激发 SEA 特异 T 细胞系作为效应物细胞, 在标准 4 小时 $^{51}\text{Cr}^{3+}$ 释放测定中分析 SEA (wt), SEA (m) 和它们与 C 215 Fab 的融合蛋白抗 MHC II⁺ 类 Raji 细胞的细胞毒性。简言之, 在存在或不存在 (对照) 添加剂情况下, 以确定的效应子对靶细胞比例, 在微量滴定井中以每 0.2 ml 培养基 (RPMI, 10% FCS) 2.5×10^3 个细胞培养 ^{51}Cr 标记 Raji 细胞。以 $100 \times ([\text{cpm 实验释放} - \text{cpm 背景释放}] / [\text{cpm 总释}$
- 30

放 - cpm 背景释放]) 计算特异性细胞毒性百分率。对于未融合蛋白, 效应子与靶细胞比是 30:1, 对于融合蛋白, 该比例是 40:1。

抗人结肠癌细胞 SADCC。使用体外激发 SEA 特异 T 细胞系作为效应子细胞在标准 4 小时 $^{51}\text{Cr}^{3+}$ 释放测定中分析 C 215 Fab - SEA (wt),

- 5 C 215 Fab - SEA (m), SEA (wt) 和 SEA 突变体抗 C 215⁺ MHC II 类结肠癌细胞 SW 620 的细胞毒性。主要地, 在有或没有 (对照) 添加剂情况下以效应子对靶细胞之间 30:1 的比例在微量滴定井中以每 0.2ml 培养基 (RPMI, 10 % FCS) 2.5×10^3 个细胞培养 $^{51}\text{Cr}^{3+}$ 标记的 SW 620 细胞。象 SDCC 测定一样计算特异性细胞毒性百分率。

10 体内功能实验

肿瘤细胞。cDNA 编码人肿瘤相关抗原 C 215 (B 16 - C 215) (Dohlsten 等, Monoclonal antibody - superantigen fusion proteins:

- 15 Tumor specific agents for T cell based tumor therapy; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, In press, 1994) 转染的 B 16 - F 10 黑素瘤细胞象贴壁细胞一样生长至几至铺满。培养基由补加有 5×10^{-5} β - 巯基乙醇 (Sigma, St Louis, MO, USA) 的 RPMI 1640 (GIBCO, Middlesex, UK), 2mM L - 谷氨酰胺 (GIBCO), 0.01M Hepes (Biological Industries, 以色列) 和 10 % 胎牛血清 (GIBCO) 组成。细胞通过在 0.02 % EDTA 中短暂培养而解吸, 并悬浮于冰冷却 1 % 同系鼠血清 (载体) 的磷酸盐缓冲盐水中, 浓度为 4×10^5 个细胞/ml。

- 20 动物和动物治疗。进行了 T 细胞受体 V β 3 链转基因的 12 - 19 周大的 C 57B1/6 鼠 (Dohlsten 等, Immunology 79 (1993) 520 - 527)。尾静脉内注入 0.2ml 载体中十万个 B 16 - C 215 肿瘤细胞。在第 1, 2 和 3 天, 以图 5a 和 5b 中指明的剂量给小鼠静脉内注射 0.2ml 载体中的 C 215 Fab - SEA (wt) 或 C 215 Fab - SEA (D227A)。
- 25 根据相同的程序, 对照鼠只注射载体。肿瘤细胞注射后第 21 天, 颈脱位杀死小鼠, 取出肺, 置于 Bouin's 溶液中, 并计数肺转移数。

结果

葡萄球菌肠毒素 A 的“丙氨酸扫描”。

- 30 最初不知道 SEA 的结构, 只能推断什么支链是表面可接近的。因此大部分突变体从同源超抗原排列中选择 (Marrack 和 Kappler, Science 248 (1990) 705 - 711)。保守的 (主要是极性的) 残基按照下面推

理选择, 即保留形式中这些超抗原中的一些超抗原期望与 HLA - DR 结合 (Chitagumpala 等, J. Immunol. 147 (1991) 3876 - 3881) 。

根据公开文献 (Cunnningham 和 Wells, Science 244 (1988) 1081 - 1085) 使用丙氨酸取代。在这一工作过程中可得到的情报是: i) 已证明 Zn^{2+} 离子对于 SEA 和 MHC II 类抗原 (HLA - DR) 之间的相互作用是重要的 (Fraser 等, Pro. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 5507 - 5511), ii) 已公开葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 的突变分析 (Kappler 等, J. Exp. Med. 175 (1992) 387 - 396), 和 iii) 公开了 SEB 结构 (Swaminathan 等, Nature 359 (1992) 801 - 806) 。

发现具有严重降低的 HLA - DR, D227A 亲和的第一种突变体与 Zn^{2+} 离子配位非常差 (没给出数据)。假设 SEA 和 SEB 是一般折叠, 新的数据表明有两个 MHC II 类抗原结合区; 一个包含 Zn^{2+} 离子, 而一个相当于 SEB 中确定的位点。在这一假设的基础上进行第二次突变。这第二批突变体以在氨基末端携带一个甘氨酸的 SEA 形式中表达。首先该延伸表明对野生型 SEA 的结合性质无影响 (下一节) 。

从单克隆抗体结合分析 (表 I) 判断, 在一个功能形式中, 多数突变体被大肠杆菌表达和分泌。得到非常低数量的突变体 E154A/D156A 和 R160A。自然从本研究中排除这些突变体。在残基 128, 187, 225 或 227 有 Ala 取代的突变体不被单克隆抗体 1E 识别。后两个突变体显现降低水平的表达 (在 34 °C 比在 24 °C 更明显), 且在变性但不还原的条件下, 在 SDS - PAGE 中迁移较快 (所有其它突变体象野生型 SEA 一样迁移, 数据未给出)。从 CD 谱分析判断, D227A 的结构与天然 SEA 稍有不同 (图 2), 但其稳定性非常接近野生型 SEA (如对盐酸胍变性的抗性所测定的)。突变体和天然 SEA (SEA (wt)) 之间计算的 $\Delta\Delta G$ 值是 0.16 kcal/mol, 并且只是大约 ΔG° 值的 4 % (数据未给出)。CD 分析中所有信号都低, 可能是 β - 折叠片结构。最近报导了 His 225 配位 Zn^{2+} (未公开数据, Fraser 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 5507 - 5511))。因为 ASP227 包括在 Zn^{2+} 配位作用中 (上文) 并可假定和 His 225 位于相同的 β - 折叠片中, 这表明这两个残基参与构成锌配位蛋白质中发现的锌结合核 (Vallee 和 Auld, Biochemistry 29 (1990) 5647 - 5659) 。

与 MHC II 类抗原和 T 细胞受体结合

从与荧光标记野生型 SEA 竞争暴露大量 MHC II 类抗原的 Raji 细胞所需要的量计算 MHC II 类抗原亲和。通过比较结合荧光达到 50 % 抑制的浓度 (IC_{50}) 和作为竞争剂的野生型 SEA 所需的浓度来计算突变体替代能力。对于野生型 SEA 和一些突变体, 将这一分析结果与其中以 ^{125}I 标记野生型 SEA 被用作示踪剂的分析的结果相比较。从表 II 可以看出从这两个抑制分析得到的数值很好地相互关联。

对于六种选择的突变体, 直接用 ^{125}I 标记突变体 SEA 测定与 MHC II 类抗原的结合 (表 II)。对于突变体 H 50A, 从定向结合测定和抑制测定得到的值很好地相互关联, 但对于突变体 F47A, 发现很大差异: 定向结合表明只有比野生型 SEA 弱 7 倍的结合, 但两者竞争分析证明 70 倍左右减少的结合。另外两种突变体的数据表明两种不同的相互作用。对于突变体 H 225A 和 D 227A, 也是在这种分析中, 亲和低于检测限。

先前我们已证明由癌活性抗体 Fab 片段和 SEA 组成的融合蛋白被用来使细胞毒性 T 细胞定向特异性溶胞癌细胞, 而 SEA 和 T 细胞受体 (TCR) 之间的相互作用太弱, 其自身不能检测到 (Dohlsten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 印刷中)。因此, 与涉及分离超抗原的分析相反, 用 Fab 融合前后序列进行 SEA 和 TCR 之间相互作用的功能测定, 结果不受 MHC II 类抗原结合支配。所以, 在铬释放测定中监测不同缀合物使 T 细胞溶胞被 Fab 部分识别的细胞的效率。该分析证明影响 MHC II 类抗原结合的突变不影响 TCR 结合 (表 II)。

突变的生物学效应

以刺激外周淋巴细胞分裂的能力测量增殖效应。与 MHC II 类抗原竞争非常不强的所有三种突变体诱导极少或不诱导增殖, 中间突变体 H 187A 具有某些增殖能力, 而其它被研究的突变体不能从野生型中明显区别开来 (表 III)。Harris 等人 (Infect. Immun. 61 (1993) 3175 - 3183) 最近报导了 SEA 突变体 F47G 和 L48G 具有相似的 T 细胞刺激活性的严重减少。很明显任何两个建议的结合区强的降低作用会产生对诱导增殖的能力的严重影响。这表明 SEA 交联两个引起 TCR 二聚化作用的 MHC II 类抗原分子, 这需要产生信号转导。

相反, 不同突变体体外指导受激 SEA T 细胞溶胞具有靶细胞的 MHC II 类抗原的效率与结合能力相互关联, 而不是与竞争能力相互关联 (表

III)。例如, F47A 和 D227A 的效率只分别降低 2.5 倍和 300 倍。因此, 显而易见, 对于二价也没有一成不变的要求。活化 T 细胞表面明显较大数目的 TCRs 导致多价态的价态增高可能部分屏蔽 SEA/MHC II 类抗原相互作用中较低亲合力的效应。先前通过使用包含一个抗 - CD₃ 部分和一个抗癌部分的癌特异性双功能抗体已证明不需要二聚化作用来控制 T 细胞细胞毒性 (Renner 等, Science 264 (1994) 833 - 35)。

体内功能性实验: 结果见图 6a 和 6b。用 C 215 Fab - SEA (wt) 和 C 215 Fab - SEA (D227A) 对鼠进行治疗, 两者在减少 B 16 - C 215 黑素瘤细胞肺转移数方面都是高度有效的。标靶的超抗原的两种变体治疗效果基本上是相同的。以 5 μ g/注射剂量用 C 215 Fab - SEA (wt) 治疗导致 70% 的致死率。相反, 用同剂量的 C 215 Fab - SEA (D227A) 治疗时, 没有鼠死亡。总之, SEA (D227A) 是具有降低的毒性并且当参入 Fab - SEA 融合蛋白质时保持治疗效果的突变体的一个例子。

讨论

最近已报导了 SEB 和 HLA - DR 之间复合物的结构 (Jardetzky 等, Nature 368 (1994) 711 - 718)。鉴定包括在这一相互作用之中的大多数 SEB 残基也保守于 SEA 中。我们关于突变体 D277A 的数据表明 SEA 的这一位点(氨基近侧位点)和 MHC II 类抗原之间相互作用的弱亲和, K_d 值比 8 μ M 高。最近报导 SEB 和 HLA - DR 之间相互作用的 K_d 是 1.7 μ M (Seth 等, Nature 369 (1994) 324 - 27)。研究 SEB, TCR 和 HLA - DR 之间不同的相互作用, 表明不存在 TCR 时 SEB 和 HLA - DR 之间的复合物不能稳定存在。细胞质基因组共振实验表明这是因为非常快的不正常状态 (off - rate)。如果 SEA 交联两个 MHC II 类抗原分子, 接着进行 TCR 的二聚化作用获得的亲合力效应可以解释 SEA 怎么可以在远低于 K_d 的浓度下诱导增殖效应。假设突变 F47A 降低氨基近侧位点的亲和低于显著性, Zn²⁺ 位点的 K_d 是大约 95nM。这一假设最近被一个发现增加了其可信性, 即突变体 F47R, F47R/H50A 和 F47R/L48A/H50D 表明和 F47A 具有相同的 MHC II 类抗原亲和 (未公开)。

以 SEB 结构 (Kappler 等, J. Exp. Med. 175 (1992) 387 - 396) 和同源性序列排列 (Marrack 和 Kappler, Science 248 (1990) 705 - 711) 为基础, 肯定表明 His 225 和 Asp 227 位于相同的 β - 平面

上, 因此支链可能是邻侧的。因此, 很可能这两个残基构成锌配位蛋白质中发现的锌结合核 (Vallee 和 Auld, Biochemistry 29 (1990) 5647 - 5659)。与这些突变体相似, 在残基 128 或 187 处取代的突变体也被除 1E 之外的所有单克隆识别。Fraser 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 5507 - 5511) 证明 Zn^{2+} 结合 SEA, 并且是与 MHC II 类抗原高亲和和相互作用所需要的。对于锌的亲和不加入 HLA - DR 的影响。以该发现和对 Zn^{2+} 的高亲和为基础 (K_d 大约为 $1\mu M$), SEA 排他性地提供了配位作用, 并建议包括四重折叠配位。我们的数据表明, 包括四个残基 N 128, H 187, H 225 和 D 227。前两个残基的功能还不清楚; 代替提供配体, N 128 可以帮助 D 227 的去质子化作用。关于这点的理由是取代 D 227 的效应比取代 H 225 的效应更严重。

先前已报导 MHC II 类不同超抗原亲和和刺激 T 细胞增殖的能力之间无相关关系 (Chintagumpala 等, J. Immunol. 147 (1991) 3876 - 3881)。超抗原对不同 TCR $V\beta$ - 链的不同亲和可能会部分地解释这些结果。这里我们发现相同缺少的相关关系, 但与各超抗原相反, 突变体具有如 Fab - SEA 前后序列所示相同的 TCR 亲和 (如 SADCC 所测定的)。缺少相关关系最可能的解释是在该项分析中鉴别的两个结合区代表两个不同的结合位点不仅得到共同有效结合, 并且也导致 MHC II 类抗原的两个分子的交联, 接着产生 T 细胞受体的两个分子二聚化作用。这将表明两个位点的亲和对获得增殖效应是重要的。高亲合力产生于包括两分子的 SEA, TCR 和 MHC II 类抗原的六聚复合物内的相互作用。因此尽管有低的定向亲和, SEA 对 MHC II 类抗原的强亲和/亲合力使 SEA 与 TCR 相互作用。

其它生物特异性亲和配对物: 用重组技术制备出 SEA (D227A) 和葡萄球菌蛋白质 A IgG - 结合结构域的融合蛋白, 并在大肠杆菌中表达。这一试剂已成功地用来使 T - 淋巴细胞靶向于 CD7 和 CD38 阳性而 HLA - DP, - DQ 和 - DR 阴性的 Mot 4 和 CCRF - CEM 细胞 (自 ATCC 获得)。Mot 4 和 CCRF - CEM 细胞与抗 - CD7 或抗 CD38 鼠单克隆 (Dianova, Hamburg, Germany) 一起预温孵。为了加强鼠单克隆和融合蛋白 IgG - 结合部分之间的结合, 也加入了兔抗鼠 Ig 抗体。

与蛋白质 A - SEA (wt) 相比较, 蛋白质 A - SEA (D227A) 具有降低的结合表达 MHC II 类抗原 Daudi 细胞的能力。

表 I

证明突变体结构完整性。监测六个单克隆抗体的结合。

突变		单克隆抗体					
		1A	2A	3A	1E	4E	EC-A1
5	野生型	+	+	+	+	+	+
	D11A/K14A	+	+	+	+	+	+
	D45A	+	+	+	+	+	+
	F47A	+	+	+	+	+	+
	H50A	(+)	+	(+)	+	+	+
	K55A	+	+	+	+	+	+
10	H114A	+	+	+	+	+	+
	K123A/D132G	+	+	+	+	+	+
	N128A	+	+	+	-	+	+
	K147A/K148A	+	+	+	+	-	+
	E154A/D156A	ND	ND	ND	+	ND	ND
	R160A	ND	ND	ND	+	ND	ND
15	H187A	+	+	+	-	+	+
	E191A/N195A	+	+	+	+	+	+
	D197A	+	+	+	+	+	+
	H225A	+	+	+	-	+	+
	D227A	+	+	+	-	+	+

20 脚注: “+”表示结合, “-”表示与野生型 SEA 相比 50 至 90 % 结合。
ND 表示没有测定。

25

30

表 II

SEA 突变体与 MHC II 类抗原和 T 细胞受体的结合。后者监测其用不同突变体 Fab - SEA 融合蛋白定向激活细胞毒性 T 细胞以特异地溶胞癌细胞的能力 (SADCC)。

5	突变	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _d (nM)	SADCC (野生型 ¹ 的%)
		SEA-FITC ¹	¹²⁵ I-SEA ¹	¹²⁵ I 标记 ¹	
	野生型	50	38	13	100 ²
	Gly-SEA	50	ND	ND	100 ²
	D11A/K14A	50	ND	ND	ND
	D45A	53	ND	ND	ND
10	F47A	3150	2943	95	100
	H50A	150	132	32	100
	K55A	44	ND	ND	ND
	H114A	48	ND	ND	ND
	K123A/D132G	188	75	12/237	100
	N128A	1150	ND	2.9/76	100
15	K147A/K148A	58	ND	ND	ND
	H187A	1030	602	97	100
	E191A/N195A	51	ND	ND	ND
	D197A	78	ND	ND	ND
	H225A	>9000	9600	ND	ND
	D227A	>9000	>10000	>8000	100

脚注: 1) ND 表示没测定。2) 在 Fab - SEA 前后序列中, C_H1 和 SEA 终端的间隔是 Gly。

表 III

突变的生物效应。监测刺激静息 T 细胞增殖的能力和指导细胞毒素细胞溶胞暴露靶细胞的 MHC II 类抗原的能力 (SDCC = 超抗原依赖介导的细胞的细胞毒性)。

5	突变	增殖	SDCC
		%	EC ₅₀ (相对)
	野生型	100	1
	Gly-SEA	ND	1
	D11A/K14A	ND	0.8
10	D45A	50	1.3
	F47A	<0.2	2.5
	H50A	20	1.4
	K55A	100	1.3
	H114A	ND	1
	K123A/D132G	40	2.1
	N128A	40	1.2
15	K147A/K148A	ND	0.7
	E154A/D156A	ND	ND
	R160A	ND	ND
	H187A	15	4
	E191A/N195A	100	1.1
	D197A	ND	1.3
20	H225A	<0.2	3×10 ²
	D227A	<0.01	3×10 ²

脚注: ND 表示未测定。

图的说明

- 25 概述: : 突变体 SEA (D227A) (= SEA (m9) 或突变体 m9) 是优先权日最推崇的 SEA 变体。因此选择该突变体代表体外和体内结果 (图 3 - 6)。

图 1

- 30 用来表达 SEA 和 C 215 Fab - SEA 的质粒的示意图。产物基因后的编码区和两个转录终止区用框表示。编码卡那霉素抗性蛋白的基因标记为 Km。lacI 是乳糖阻抑物基因。V_H和 C_{H1} 表示编码鼠抗体 C 215 重链 Fd 片段的基因。类似地 V_K和 C_K 表示编码 k 链的基因。Rop 是编码来自

pBR 322 的复制调控蛋白的基因。指导产物基因转录的启动子如箭头所示, 在 pKP 889 中是 trc 启动子, 在另外两个载体中, 启动子来自葡萄球菌蛋白 A (spa)。包含复制源的区以 ori 表示。pKP 943 和 pKP 1055 编码的 SEA 之间的唯一差别是后者在 N 末端加了一个甘氨酸残基。包含

5 在后者载体中的 SEA 基因也含有更多单一的, 由沉默突变引入的限制性酶切位点。

图 2

野生型 SEA 和突变体 F47A 和 D227A 的圆二色性谱, 指出每个 MHC II 类抗原结合区最严重的减少的突变。实线是野生型 SEA 曲线, 突变体

10 曲线是虚线或中间打点线, 分别是 F47A 和 D227A。

图 3 表示 SEA (wt) 和 SEA (D227A) 的超抗原依赖性介导细胞的细胞毒性 (SDCC) 的浓度依赖性。

图 4 表示 C 215 Fab - SEA (wt) 和 C 215 Fab - SEA (D227A) 的超抗原依赖性细胞介导的细胞毒性 (SDCC) 的浓度依赖性。

15 图 5 表明 C 215 Fab - SEA (wt) 和 C 215 Fab - SEA (D227A) 与自由的 SEA (wt) 相比, 其超抗原 mAb 依赖性细胞介导的细胞毒性 (SADCC) 的浓度依赖性。

图 6a 比较用 C 215 Fab - SEA (wt) 和 C 215 Fab - SEA (D227A) 治疗 B 16 - C 215 黑素瘤细胞肺转移 C57B1/6 鼠获得的治疗效果。

20 图 6b 表明图 6a 中表示的治疗中 C 215 - SEA (wt) 和 C 215 - SEA (D227A) 的毒性。

说明书附图

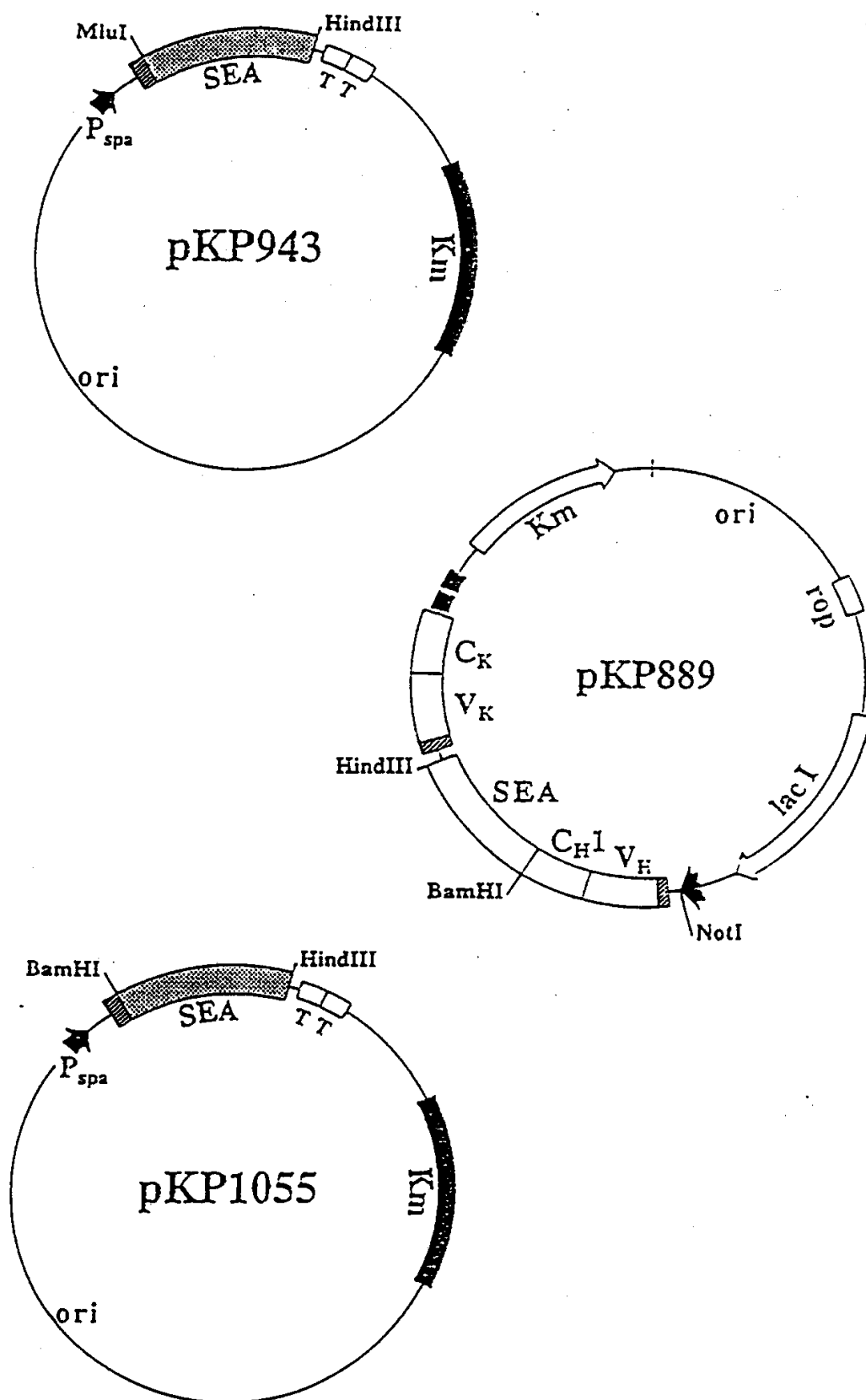
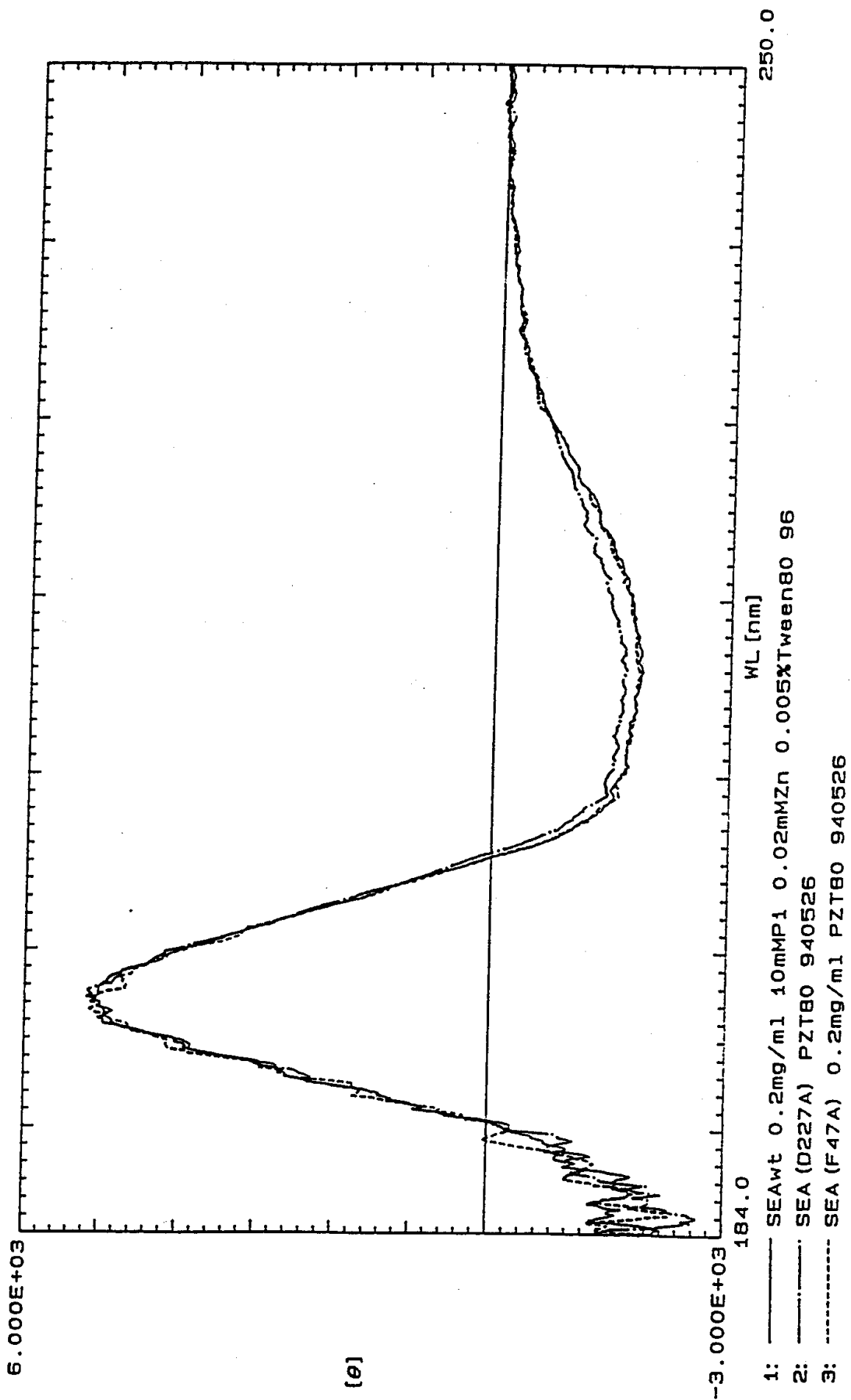


图 1

图 2



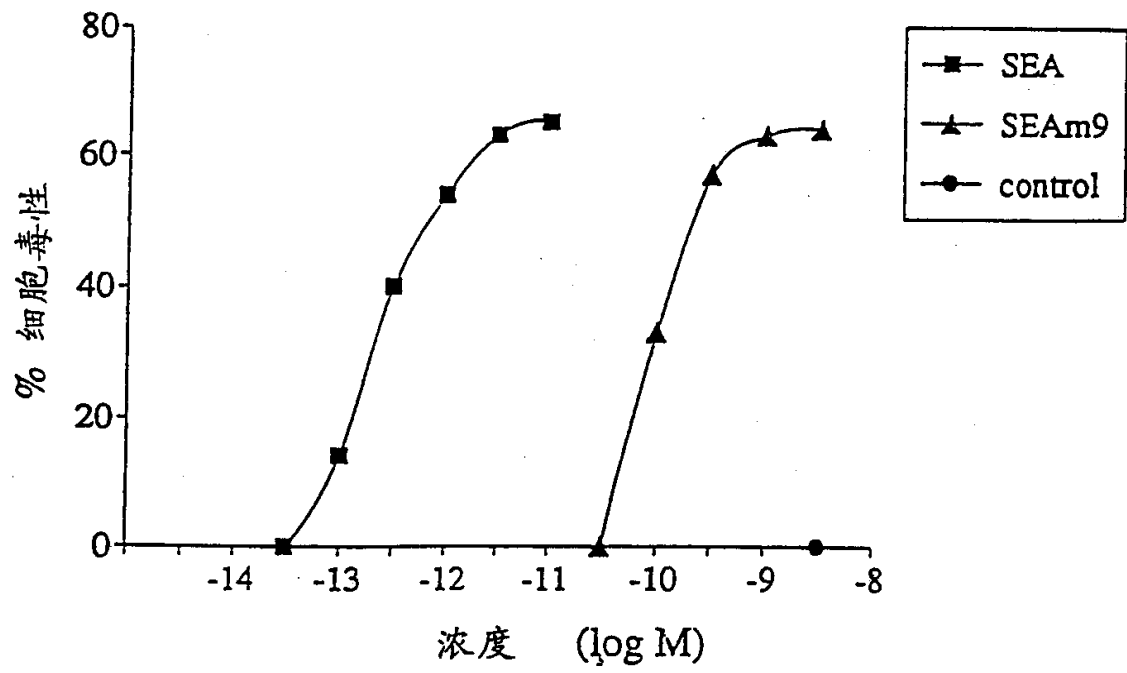


图 3

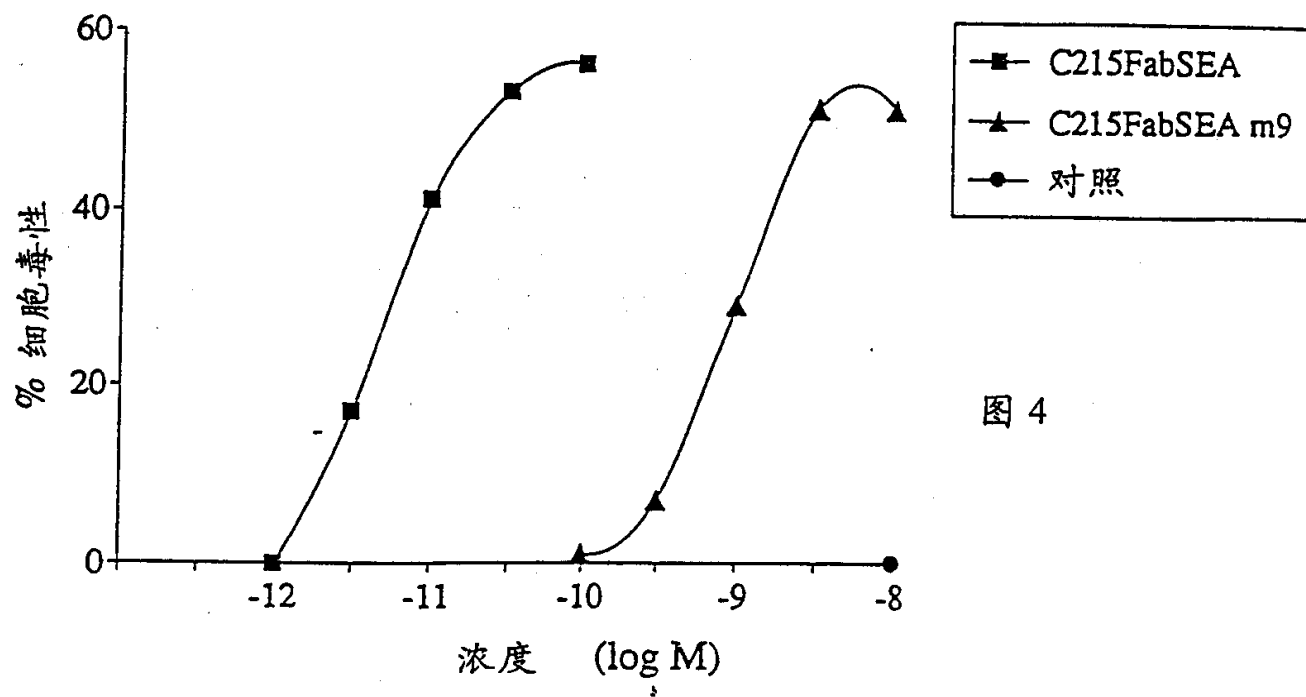


图 4

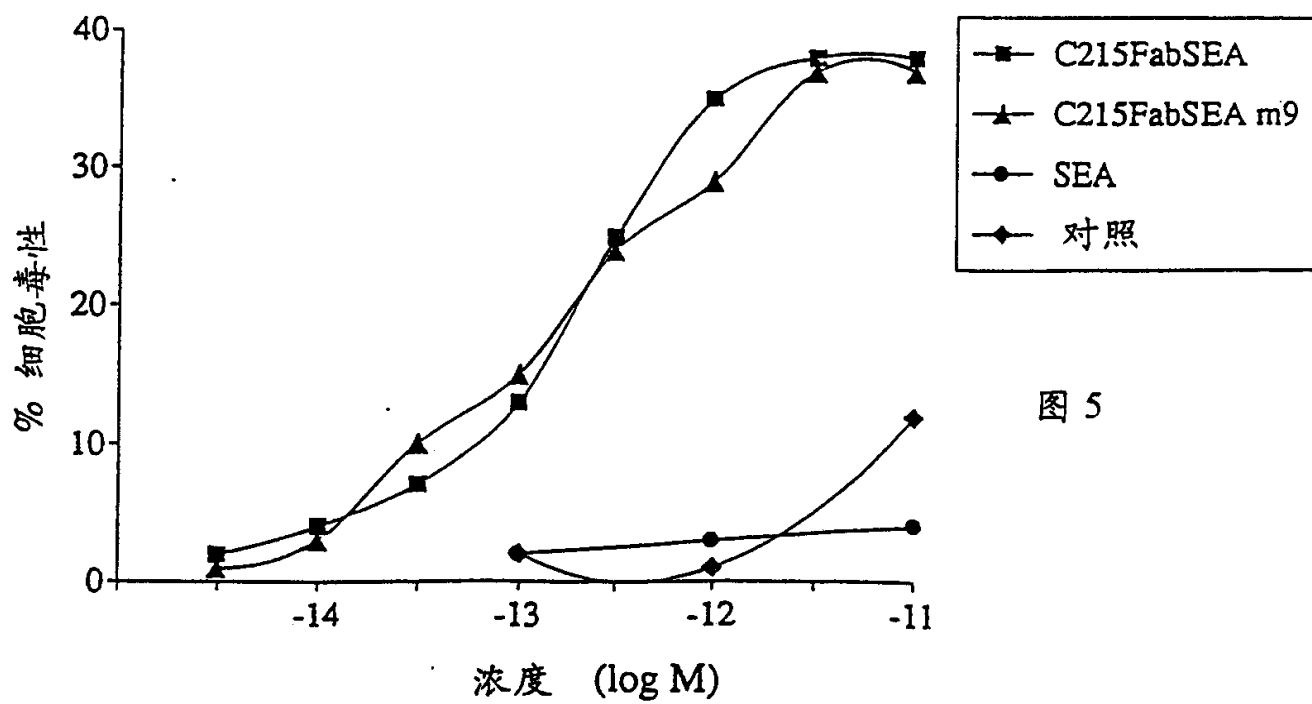


图 5

治疗效果

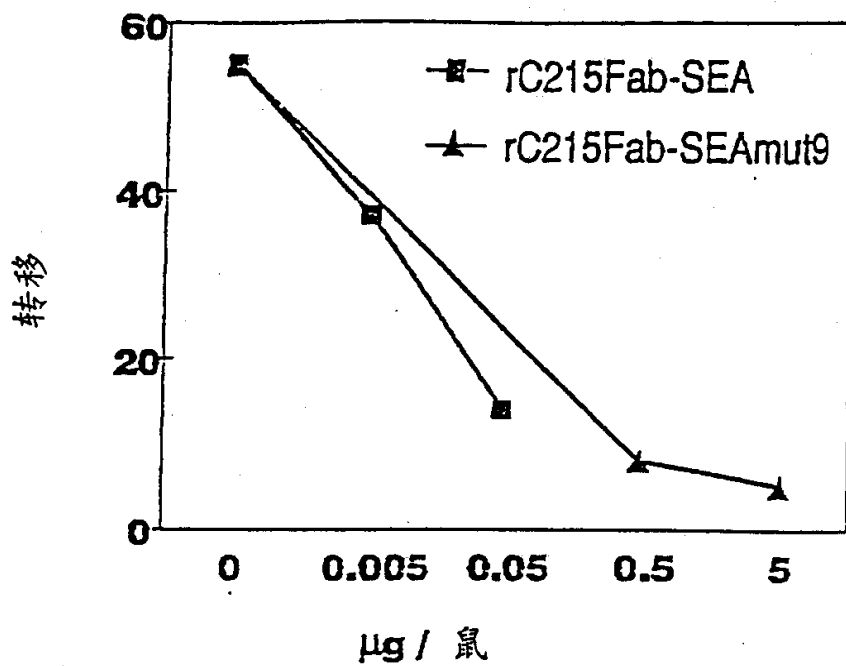


图 6A

毒性

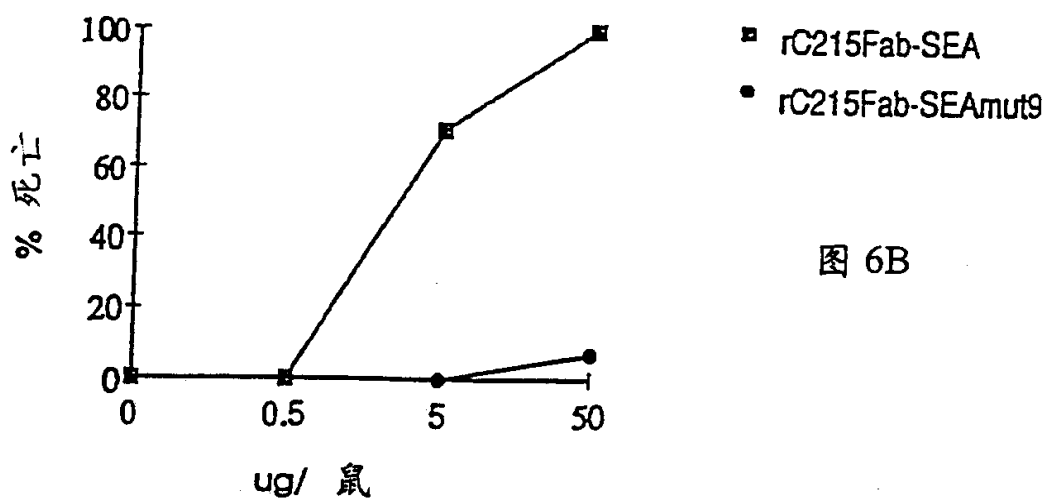


图 6B