

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95197361.4

C07K 14/74  
 C08B 37/00 C12N 5/08  
 C12N 9/24 C12Q 1/48  
 C12Q 1/68 A61K 31/70  
 A61K 38/46 A61K 39/00  
 G01N 33/566

[43]公开日 1998年2月11日

[11] 公开号 CN 1173184A

[22]申请日 95.12.6

[30]优先权

[32]94.12.6 [33]US[31]08/349,883

[86]国际申请 PCT/US95/15913 95.12.6

[87]国际公布 WO96/17870 英 96.6.13

[85]进入国家阶段日期 97.7.16

[71]申请人 巴里·E·洛森伯格

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 巴里·E·洛森伯格

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

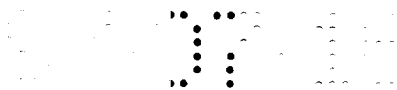
代理人 巫肖南

权利要求书 6 页 说明书 36 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 凝集素酶及糖配体的鉴定、纯化和应用

[57]摘要

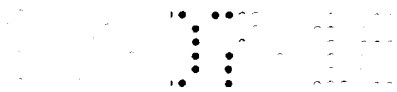
在本发明的各个方面提供了能特异结合凝集素酶的糖配体和这种配体的肽模拟物，并提供了能特异结合糖配体和肽模拟物的凝集素酶。本发明的其它方面包括用于鉴定、纯化和生产这种糖配体、模拟物和凝集素酶的方法，以及这种组合物在治疗各种疾病和修饰细胞的功能方面的应用。本发明的另一些方面涉及各种与糖配体、该配体的肽模拟物和/或凝集素酶有关的疾病的诊断。



## 权 利 要 求 书

---

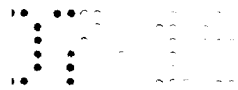
1. 一种组合物,其含有一种基本纯化的能特异结合一种凝集素酶的糖配体。
- 5       2. 如权利要求 1 的组合物,其还含有一个与所述糖配体结合的多肽或脂质部分。
3. 一种组合物,其含有一种基本纯化的糖配体,其中所述糖配体是一种寡糖。
4. 一种组合物,含有一种大致纯净的糖配体,其中,所述糖配体是一种
- 10       多糖。
5. 一种鉴定能与一种凝集素酶结合的糖配体的方法,该方法包括以下步骤:
  - a. 让一种含有糖配体的样品与一种被怀疑能与这种配体结合的凝集素酶接触; 和
  - 15       b. 检测所述配体和凝集素酶是否已发生结合。
6. 如权利要求 5 的方法,其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。
7. 如权利要求 6 的方法,其中所述 MHC 的衍生基因产物是 I 型分子。
8. 如权利要求 5 的方法,其中所述 MHC 的衍生基因产物是 II 型分子。
- 20       9. 如权利要求 5 的方法,其中所述 MHC 的衍生基因产物是一种非典型的 I 型分子。
10. 如权利要求 5 的方法,其中所述凝集素酶是非 MHC 的衍生基因的产物。
11. 如权利要求 5 的方法,其中所述糖配体与一个多肽或脂质部分结
- 25       合。
12. 如权利要求 5 的方法,其中所述糖配体或所述凝集素酶带有一个可检测的标记。
13. 如权利要求 5 的方法,其中所述糖配体或所述凝集素酶与一种细胞结合。
- 30       14. 一种鉴定与一种糖配体结合的一种凝集素酶的方法,包括以下步骤:
  - a. 让一种含有糖配体的样品与一种被怀疑能与这种配体结合的凝集素酶接触; 和
  - b. 检测所述配体和凝集素酶是否已发生结合。



- a. 让一种含有凝集素酶的样品与一种被怀疑能与这种凝集素酶结合的糖配体接触；和
- b. 检测所述凝集素酶和配体是否已发生结合。
15. 如权利要求 14 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。
- 5 产物。
16. 如权利要求 14 的方法，其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。
17. 如权利要求 14 的方法，其中所述糖配体结合于一个多肽或脂质部分上。
- 10 18. 如权利要求 14 的方法，其中所述糖配体或所述凝集素酶带有一个可检测的标记。
19. 如权利要求 14 的方法，其中所述糖配体或所述凝集素酶是与一种细胞结合的。
20. 一种纯化能特异地结合于一种结合剂上的糖配体的方法，包括以下
- 15 步骤：
  - a. 让一种含有糖配体的样品与一种能与这种配体结合的结合剂接触，以形成一种配体—结合剂复体；
  - b. 将所述复合体与其余样品分离；和
  - c. 从所述复合体上解离糖配体，以得到纯化的糖配体。
- 20 21. 如权利要求 20 的方法，其中所述结合剂是一种凝集素。
22. 如权利要求 20 的方法，其中所述结合剂是一种抗体。
23. 如权利要求 20 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。
24. 如权利要求 20 的方法，其中，所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生
- 25 基因产物。
25. 如权利要求 20 的方法，其中所述糖配体结合于一个多肽或脂质部分上。
26. 一种纯化能特异地结合于一种糖配体上的凝集素酶的方法，包括以下
- 30 步骤：
  - a. 让一种含有凝集素酶的样品与一种能与这种凝集素酶结合的糖配体接触，以形成一种配体—凝集素酶复合物；



- b. 将所述复合体与其余样品分离；和
  - c. 从所述复合体上解离凝集素酶，以得到纯化的凝集素酶。
27. 如权利要求 26 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。
- 5        28. 如权利要求 26 的方法，其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。
29. 如权利要求 26 的方法，其中所述糖配体结合于一个多肽或脂质部分上。
30. 一种鉴定能够修饰凝集素酶表达细胞的功能的糖配体的方法，包括
- 10 以下步骤：
- a. 让一种含有所述糖配体的样品接触一种凝集素酶表达细胞；和
  - b. 随后分析所述细胞以测定其功能。
31. 如权利要求 30 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。
- 15        32. 如权利要求 30 的方法，其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。
33. 如权利要求 30 的方法，其中所述糖配体结合于一个多肽或脂质部分上。
34. 一种鉴定能够修饰糖配体表达细胞的功能的凝集素酶的方法，包括
- 20 以下步骤：
- a. 让一种含有所述凝集素酶的样品与一种糖配体表达细胞接触；和
  - b. 随后分析该细胞，以测定其功能。
35. 如权利要求 34 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生的基因产物。
- 25        36. 如权利要求 34 的方法，其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。
37. 一种修饰凝集素酶表达细胞的功能的方法，包括让该细胞与一种糖配体接触，该糖配体能与所述凝集素酶结合。
38. 如权利要求 37 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因
- 30 的产物。
39. 如权利要求 37 的方法，其中所述凝集素酶是一种非 MHC 衍生的基



因的产物。

40. 如权利要求 37 的方法, 其中所述寡糖配体结合于一个多肽或脂质部分上。

41. 一种修饰糖配体表达细胞的功能的方法, 包括让该细胞与一种能结合所述配体的凝集素酶接触。

42. 如权利要求 41 的方法, 其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。

43. 如权利要求 41 的方法, 其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。

44. 一种鉴定一种肽的方法, 该肽能够结合于一种凝集素酶的糖配体结合位点上, 该方法包括以下步骤:

a. 让一种已知凝集素酶和一种能与所述凝集素酶结合的糖配体, 与一种含有待鉴定的肽的试验样品接触;

b. 在上述反应之后测定结合于所述凝集素酶上的寡糖配体量; 和

c. 比较结合于所述试验样品上的寡糖配体量和结合于对照样品上的寡糖配体量, 其中, 与结合于对照样品上的寡糖配体量相比, 结合于试验样品上的寡糖配体量的减少, 表示所述肽与凝集素酶结合。

45. 如权利要求 44 的方法, 其中在接触所述寡糖配体之前, 使所述肽和所述凝集素酶接触。

46. 如权利要求 44 的方法, 其中所述寡糖配体或所述凝集素酶含有一种可检测的标记。

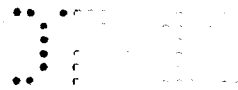
47. 如权利要求 44 的方法, 其中所述凝集素酶或所述寡糖配体与一种细胞结合。

48. 如权利要求 44 的方法, 其中所述试验样品含有一个肽文库。

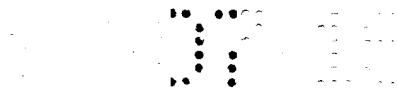
49. 一种修饰一种细胞以使其能产生一种糖配体的方法, 包括将编码一种凝集素酶的表达载体导入该细胞, 以实现这种凝集素酶的表达, 其中, 上述表达能导致该细胞产生所述寡糖配体。

50. 如权利要求 49 的方法, 其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。

51. 如权利要求 49 的方法, 其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。



52. 一种用一种调制个体体内对抗原的免疫反应的方法，包括给药权利要求 1 的寡糖配体和所述抗原。
53. 如权利要求 52 的方法，其中所述给药会导致对所述抗原的免疫反应的增强。
- 5 54. 如权利要求 52 的方法，其中所述给药会导致对所述抗原的免疫反应的减弱。
55. 如权利要求 52 的方法，其中所述给药还包括一种免疫抑制剂。
56. 如权利要求 52 的方法，其中所述抗原和所述寡糖配体是共价结合的。
- 10 57. 如权利要求 52 的方法，其中把一种佐剂与所述抗原和寡糖配体同时给药。
58. 一种用于治疗一种与凝集素酶相关的病症的方法，包括给药有效量的权利要求 1 的寡糖配体。
59. 如权利要求 58 的方法，其中所述病症是一种与 MHC 有关的病症。
- 15 60. 如权利要求 58 的方法，其中所述与 MHC 有关的病症是一种自身免疫病。
61. 如权利要求 58 的方法，其中所述与 MHC 有关的病症是血色素沉着症。
62. 如权利要求 58 的方法，其中所述病症是一种感染。
- 20 63. 如权利要求 58 的方法，其中所述病症是移植排斥。
64. 一种用于治疗与一种凝集素酶有关的病症的方法，包括给药有效量的一种凝集素酶，该凝集素酶与一种糖配体的结合特异性同与所述疾病有关的凝集素酶的相类似。
65. 如权利要求 64 的方法，其中所述凝集素酶是 MHC 的一种衍生基因产物。
- 25 66. 如权利要求 64 的方法，其中所述凝集素酶是一种非 MHC 的衍生基因的产物。
67. 如权利要求 64 的方法，其中所述病症是一种与 MHC 有关的病症。
68. 如权利要求 67 的方法，其中所述与 MHC 有关的病症是一种自身免疫病。
- 30 69. 如权利要求 64 的方法，其中所述与 MHC 有关的病症是血色素沉着



症。

70. 如权利要求 64 的方法，其中所述病症是一种感染。

71. 如权利要求 64 的方法，其中所述病症是移植排斥。

5 72. 一种用于检测血色素沉着症的遗传因素的方法，包括检测一种出现在 I 型 MHC 分子重链上的突变，该突变会降低所述重链与  $\beta_2$  微球蛋白结合的能力。

73. 如权利要求 72 的方法，其中所述突变能消除一个关于加入磷酸基团的信号。

10 74. 如权利要求 72 的方法，其中所述突变使所述重链上的磷酸基团失去脱磷酸化的能力，脱磷酸化的能力用于诊断血色素沉着症，该所述血色素沉着症是因为 I 型 MHC 分子的重链与  $\beta_2$  微球蛋白的结合力降低所致，该方法包括：

a. 从待检测的个体体内提取 I 型 MHC 重链；

15 b. 在适于 I 型 MHC 重链与  $\beta_2$  微球蛋白结合的条件下使所述重链与  $\beta_2$  微球蛋白接触；和

c. 检测所述重链与所述  $\beta_2$  微球蛋白的结合，其中与一种对照重链和  $\beta_2$  微球蛋白的结合相比，所述重链与  $\beta_2$  微球的结合减少是血色素沉着症的特征。。

20 75. 一种蛋白，它具有通过其与一种糖的互补作用来区别自我和非我的能力，而且它不是一种免疫球蛋白分子或 T 细胞受体分子。

76. 一种用于治疗患者的疾病的方法，该疾病的特征为能由患者的胃肠道异常吸收一种金属，所述方法包括给药治疗剂量的一种糖，这种糖能特异地结合由 IgGSF 上的一个基因编码的一种蛋白。

77. 如权利要求 76 的方法，其中所述金属是铁。

25 78. 一种用于治疗患者的自身免疫疾病的方法，包括给药治疗剂量的一种糖模拟物，该模拟物能特异地结合由 IgGSF 上的一个基因所编码的一种蛋白。



## 说明书

### 凝集素酶及糖配体的 鉴定、纯化和应用

5

本发明大致涉及糖生物学领域。

主要组织相容性复合体(MHC)能编码多种基因产物, 其中的很多种产物在机体对病原生物的防御中起着主要作用。上述分子包括典型的移植抗原及结构上相关的分子, 在细胞内转运外源肽的蛋白, 血清补体蛋白, 淋巴因子  
10 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和肿瘤坏死因子 $\beta$ , 细胞色素和热激蛋白。

由MHC上的基因编码的典型移植抗原, 是一类高度多态的分子, 最初发现其具有决定排斥外源移植细胞和组织的作用。大量的实验研究证实了典型移植抗原具有自我识别的作用。在目前被认可的范例中(以下被称作“旧范例”), 移植抗原起到呈递源于自体和外源蛋白的肽的作用, 以便由免疫系统的细胞进行识别。  
15

MHC上的基因编码两种不同类型的抗原, I型抗原和II型抗原。事实上, I型抗原能在机体内的所有具核细胞上表达, 并在基于细胞毒性胸腺衍生(T)的淋巴细胞介导的细胞杀伤的免疫反应的介导中起作用。细胞毒性T淋巴细胞起到杀伤病毒感染的细胞和肿瘤细胞的作用。所述I型MHC分子由一个约45千道尔顿(KDa)的重链组成, 该重链与一个被称为 $\beta_2$ 微球蛋白( $\beta_2$ M)的12KDa的蛋白非共价地结合。所述旧范例中称I型抗原为源于在细胞内合成的自体和外源蛋白的呈递肽片段。  
20

所述I型分子因其在移植中的作用而被发现, 并被称作“典型的”I型分子, 以区别于后来发现的被称作“非典型的”I型分子的一类I型分子。编码非典型的I型MHC分子的基因包括迄今已鉴定的MHC基因座上的大部分基因。非典型的I型MHC分子在总体结构上与典型的I型MHC移植抗原相关, 具有广泛的序列同源性和一个与 $\beta_2$ M非共价地连接的重链。一般而言, 非典型的I型MHC分子的多态性程度不如典型的I型MHC分子的高, 而且其在组织分布上也更受限制。几种类型的非典型的I型分子主要在胃肠  
25 (GI)道中表达, 如果其出现在免疫系统中的话则会影响其功能。  
30

MHC II型抗原主要由机体内的特化抗原呈递细胞表达。这种细胞局限



于产生抗体的 B 淋巴细胞，巨噬细胞以及分布于机体的各种组织里的树状细胞。细胞表面的 II 型分子由一个 32KDa 的  $\alpha$  链和一个与其非共价的结合的  $\beta$  链组成。按照旧范例的理解，II 型分子的主要作用是向特殊类型的 T 淋巴细胞呈递源于自身或外源的蛋白质的肽，以支持细胞毒性 T 淋巴细胞的发育，  
5 针对真菌的感染产生免疫性，并帮助 B 淋巴细胞产生对有荚膜细菌感染应答的保护性抗体。MHC II 型抗原能呈递由细胞从周围环境中摄取的蛋白所产生的肽片段，与其不同的是，典型的 I 型分子能呈递源于内源合成蛋白的肽。

业已发现，在人群中有一种人体自身免疫疾病更倾向于与由遗传 MHC 的某些基因的个体相关。对于多种上述疾病而言，这一相关集中于 MHC 上  
10 编码 II 型组织相容性抗原的区域。上述疾病不是通过 MHC 基因的简单的孟德尔分离进行遗传的，因为一对相同的双胞胎中只有一个同胞可能患这种疾病。这一特征表明，其它遗传因子或环境因子也参与了自身免疫性的发生中起作用，只不过 MHC 上的基因在这一过程中起主导作用。

关于 MHC 基因功能的旧范例提供了几种解释 MHC 基因在自身免疫疾  
15 病中的作用的理论。其中包括 II 型 MHC 分子在细胞中的异常表达引起自身免疫反应或由特殊 MHC 基因产物进行的自身肽的异常识别。不过，上述理论有待进一步证实。另外，旧范例不能提供解释被称为血色素沉着症的 MHC - 相关铁储存疾病的基础的有用的假说。通过动物研究及与涉及几种 I 型基因的基因组结构而了解到 MHC 编码的 I 型分子涉及这种疾病，因为在上述  
20 动物中  $\beta_2M$  基因的缺乏会导致这种疾病。

本文公开了一个与糖识别分子相关的新范例，所述分子至少包括某些 I 型、II 型抗原和其它相关分子，其中有一些是免疫球蛋白 G 超家族(IgGSF)。该范例提出，糖识别分子在识别及修饰糖结构方面起着关键作用。因此，需要开发治疗涉及糖识别问题的与 MHC 相关的疾病及其它疾病的新途径，特  
25 别是需要提供关于应用所述新范例的组合物、装置及方法。

在本发明的各个方面，提供了能特异结合凝集素酶(Leczymes)的糖配体和这种配体的肽模拟物(mimetopes)，并提供了能特异结合糖配体及肽模拟物的凝集素酶。本发明的其它方面包括鉴定、纯化和生产上述糖、模拟物及凝集素酶的方法，以及将这种组合物用于治疗各种疾病和修饰细胞功能的用途。  
30 另一些方面，本发明涉及与糖配体、这种糖配体的肽模拟物和/或凝集素酶相关的各种疾病的诊断。还提供了对细胞进行调节以便产生一种糖配体的



方法，该方法是这样进行的：将一种编码凝集素酶的表达载体导入所述细胞中，其中，所述凝集素酶的表达能产生所述糖配体。

5 在一个典型的实施方案中，可以通过向患者给药一种糖配体或一种肽模拟物调制免疫反应。在另一个示例性实施方案中，通过检测 I 型 MHC 分子上的一个突变可以诊断血色素沉着症，该突变会降低 I 型 MHC 分子与  $\beta_2$  微球蛋白结合的能力。在另一个典型的实施方案中，通过服用一种合适的糖，可以调节吸收金属异常的患者对铁或其它金属的摄取。

10 本发明源于一个关于多细胞生物中自身识别分子及其它分子功能的意义深远的新范例，所述生物包括具有一类不同的吞噬细胞的哺乳动物。该新范例认为，多种迄今已知为肽识别和呈递结构的自身识别分子在含糖分子的识别和修饰中起着更为重要的作用。在本文中应用的“含糖分子”是指具有至少一个单糖或糖残基的分子。因此，所述新范例的自身识别分子及其它分子具有特异结合含糖分子的能力，并能通过催化糖的再加入或催化对一个或几个现存糖残基的化学修饰而对所述含糖分子进行化学修饰。因此，所述含  
15 糖分子是所述新范例的自身识别分子及其它分子的底物。另外，在酶促修饰以后，所述自身识别及其它分子能与修饰过的含糖分子特异结合，其亲和力与结合原来识别的分子时相同或比之更大。

20 在本文中所用的“凝集素酶”是指任何能催化一种含糖底物的化学修饰的细胞蛋白，这种修饰会导致具更多的糖或化学修饰糖的产物产生，而该产物又能特异地识别修饰过的底物。“凝集素酶”一词因同一基础分子同时具备凝集素结合活性和酶促活性而得名。凝集素酶是本领域众多熟知的肽识别分子的代表。这类分子至少包括某些 I 型和 II 型 MHC 编码的分子，以及该分子的免疫球蛋白基因超家族(IgGSF)的其它成员，其中一些不是自身识别分子。典型的凝集素酶包括那些能催化一种含糖分子磷酸化、乙酰化、羧基化和/或硫酸盐化的酶。凝集素酶可以在细胞内、在细胞表面起作用，或是从细胞中分泌出来。  
25

凝集素酶能以其分子的同一种异构型表现出酶促活性和糖结合活性，或者这些活性分别归属于该分子的不同异构型。例如，凝集素酶的 RNA 的差异剪接会产生该凝集素酶的酶促活性异构型，其含有将这种凝集素酶引导至  
30 细胞上正常情况下与糖基化相关的位点，如内质网或高尔基复合体。不同的 RNA 的差异剪接，还能产生这样的凝集素酶异构型：它具有糖识别能力并含

有将受体引导至细胞表面或从细胞中输出的信号。另外，在细胞里或在细胞表面上表达的一种凝集素酶的同一种分子可以同时兼具酶促活性及糖识别能力。

5 在 I 型或 II 型分子中，并且可能在其它凝集素酶中，凝集素酶功能可能位于在由 MHC 编码的分子上部所形成的沟槽里。旧范例将该沟槽称作肽结合沟，但新范例提出，该沟槽的主要作用是识别糖结构及由该凝集素酶修饰过的该糖结构的后来构型。

10 可以分离大致纯化的糖配体的组合物，它能特异地结合一种凝集素酶。在本文中所用的“糖配体”是指一种含糖分子，其中的糖的部分是由凝集素酶识别的配体的一部分。糖配体是由一个或几个糖残基组成，这些残基连接成直链或支链构型。因此，糖配体包括单糖、二糖、三糖、寡糖或多糖。

15 由多个糖残基组成的糖配体其各残基间连键的类型和位置的差异可以变化。例如，可用于产生糖配体的糖残基包括葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、甘露糖和唾液酸。还可以用本领域已知的化学方法对一种配体的糖残基进行乙酰化、磷酸化和/或硫酸盐化。糖配体还可以与诸如类脂、糖脂、蛋白、糖蛋白、蛋白聚糖、葡糖胺聚糖或有机分子之类的其它分子化学结合。这些结合分子可以使糖配体有以下特征：与凝集素酶的接合能力提高或其在体内的稳定性提高。

20 事实上，糖配体可能因为有一个以上的糖配体与主链结构结合而是多价的。主链结构可以是诸如血清白蛋白之类的天然蛋白或是诸如合成肽之类的合成分子。将多个糖配体连接到主链结构上的方法是本领域的公知方法，例如，包括生物素一亲和素连接(Rothenberg 等，“美国国家科学院院刊”(Proc.Natl.Acad.Sci.(USA))90：11939 - 11943(1993)，该文献被收作本文的参考)。

25 上述新范例的应用，提供了用于治疗因凝集素酶引起的病症的新方法。例如，这些病症可能包括自身免疫性疾病、血色素沉着症、炎症、移植排斥和感染。上述病症中的很多种可能部分是因淋巴细胞对糖结构的异常识别所致。因此，给患者服用一种能够与所述异常识别分子结合的糖配体就能克服因所述异常识别所引起的疾病。

30 存在有多种在修饰特定类型分子的能力方面有差别的凝集素酶。导致这种差异的部分原因是凝集素酶对其底物的凝集素结合位点特异性存在差别。



因此，一部分凝集素酶结构是所述底物的识别位点。凝集素酶的催化位点可以与底物的识别位点相同或是不同于底物识别位点的位点。在对底物进行修饰以后，由于凝集素酶的底物识别位点和催化位点的配位结合或是由于配体的多价与其对原始底物的结合亲和性相比，凝集素酶所表现出的对修饰底物的结合亲和性相同或更大。

5 本发明所提供的凝集素酶包括一大类结构上相关的分子，其中很多包含于 IgGSF 中。基因的 IgGSF 系列具有进化同源性(即：拥有共同的祖先)，但并不一定在功能上相关、遗传上连锁或受统一的调节。曾根据其具有一个或几个与免疫球蛋白(Ig)的基础结构单元同源的区域来定义 IgGSF 产物，称作 Ig 10 同源性单元。所述单元的特征是：其初级氨基酸序列长度为大约 70 - 100 个残基，包括一个基本上不变的跨度为 50 - 70 个残基的二硫键，以及几个其它较保守的残基，由这些残基维持一个被称为 Ig 折叠的三级结构(参见 Hunkapiller 和 Hood，“免疫学进展”(Adv.Immunol.)44：1 - 63，(1989))。

15 所述 IgGSF 基因能编码多种具有已知的免疫功能的分子，如免疫球蛋白、T 淋巴细胞受体、典型的和非典型的 MHC 分子、各种 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面分子或  $\beta_2M$ 。另外，IgGSF 能编码几种细胞表面分子，已知其功能为作为细胞与细胞粘着的受体。例如，这种粘着分子包括神经细胞粘着分子癌胚抗原。当然，那些不能修饰糖配体的糖的部分的 IgGSF 分子或不能识别修饰过的产物的 IgGSF 分子不是凝集素酶。

20 IgGSF 的凝集素酶包括由位于 MHC 片段里的基因编码的酶。在人体中，MHC 是位于第 6 染色体的短臂上的一个连续的 DNA 片段。人体的完整 MHC 被称作为 HLA 复合体。在小鼠中，MHC 位于第 17 染色体上，它包括 H - 2、Q、T 和 M 复合体。在本文中所用的“MHC 的衍生基因产物”是指任何含有由位于 MHC 里的基因编码的至少一种多肽的分子。作为 MHC 衍生 25 的基因产物的凝集素酶包括 I 型和 II 型分子。作为人体凝集素酶的 I 型和 II 型分子是由 HLA - D 区的基因编码的，如 HLA - DP、HLA - DN、HLA - DM、HLA - DO、HLA - DQ 或 HLA - DR，或 HLA - A、HLA - B、HLA - C 基因座的各种等位基因，或 HLA - X、HLA - J、HLA - H、HLA - G 和 HLA - F 基因。

30 作为 I 型 MHC 分子的凝集素酶具有一个约 45KDa 的多态的重链或  $\alpha$  链，它与一个被称为  $\beta_2M$  的小的非多态蛋白非共价地相结合。所述重链是一

种 MHC 编码的基因产物，该基因位于或接近人 HLA 复合体的 A、B 或 C 区，和位于或接近小鼠 H - 2 复合体的 K 或 D/L 区。尽管 $\beta_2M$  是由位于不同染色体上的 MHC 外面的基因编码，但 I 型分子的重链是由位于 MHC 里的基因编码，因此，I 型分子属于 MHC 编码的基因产物的定义范畴。

5        作为 II 型分子的凝集素酶包括由与一个 28KDa 的  $\beta$  链非共价地结合的 34KDa 的  $\alpha$  链组成的 MHC 衍生的基因产物。另一个被称为不变链的链在向细胞质膜转运期间与 II 型异源双体瞬时结合。

10        由于具有跨膜区和胞质尾区，凝集素酶可以在细胞表面表达，与典型的移植抗原相同。凝集素酶还能以类似于某些非典型 I 型分子的方式与细胞表面连接。例如，许多非典型的 I 型 Qa 和 Tla 分子是通过磷酸酰肌醇(PI)连键与细胞表面连接。而 Q10 基因的产物似乎能被分泌(Devlin 等，“欧洲分子生物学学会会刊”(EMBO J.)4：369 - 374(1985))。大部分 Qa 和 Tla 抗原缺乏典型的 I 型胞质外显子，包括外显子 7 里的磷酸化位点(Thor 等，“免疫学杂志”(J.Immunol.)，151：211 - 224(1993))，尽管跨膜结构域和所述第 7 外  
15        显子存在于 Q1 和 Q2 基因产物中。

20        所述 I 型 MHC 重链构成 3 个外部结构域( $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  和  $\alpha_3$ )，各自具有约 90 个氨基酸、一个约 40 个氨基酸的跨膜结构域和一个约 30 个氨基酸的胞质锚定片段。 $\beta_2M$  在大小和结构方面类似于所述重链的外  $\alpha_3$  结构域。对 I 型 MHC 分子的胞外部分进行的 X 射线晶体学分析表明， $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  结构域相互作用，并在细胞膜的最外部，而  $\alpha_3$  和  $\beta_2M$  结构域相互作用，并且更接近细胞膜。相互作用的  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  结构域形成一个平台，该平台具有一个位于该分子的上表面的深沟或裂缝。

25        上述关于典型的 I 型 MHC 分子功能的旧范例将分子上部的该沟看作是一个肽结合位点。该位点大到足以结合一种长约 8 - 20 个残基的肽，并能呈递自身产生和外源的肽，以便为某些 T 淋巴细胞识别。大量的研究业已证实，所述 MHC 典型的 I 型分子能结合约为所述沟的长度的肽。另外，对一种自一个细胞中纯化的典型的 I 型分子进行的 X 射线结晶学分析表明，有一种肽停留在所述的沟中。然而，如上所述，本发明的新范例提出，如典型的 I 型分子的沟，典型的 II 型 MHC 分子的肽结合沟也适于结合糖配体。

30        作为 II 型 MHC 分子的凝集素酶包括与 I 型分子共有重要结构特征的那些酶。所述 II 型分子是一种膜结合糖蛋白，它具有外结构域、一个跨膜片段

和一个胞质锚定片段。其 $\alpha$ 链具有两个被称作 $\alpha_1$ 和 $\alpha_2$ 的外结构域，而 $\beta$ 链具有两个外结构域 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 结构域。X射线结晶学证实， $\alpha_2$ 和 $\beta_2$ 结构域作为一种近膜结构相互作用，该作用类似于I型分子的 $\alpha_3$ 结构域与 $\beta_2$ M结构域之间的相互作用。II型分子的 $\alpha_2$ 和 $\beta_2$ 结构域一起在该分子的表面形成一个裂缝，该裂缝十分类似I型重链的 $\alpha_2$ 和 $\alpha_3$ 结构域所形成的裂缝。有大量证据表明，II型分子上的沟能够结合并呈递自身的和外源的肽，以便由T淋巴细胞识别。业已从所述II型分子上分离到的肽，长度为13 - 18个氨基酸，略长于通常从MHC的典型的I型分子上分离的8聚肽或9聚肽的长度。如上文所述，本发明的新范例提出，II型MHC分子上的肽结合沟与上述典型的I型MHC分子上的沟类似，也适于结合糖配体。

凝集素酶也能由非典型的I型基因编码。在小鼠中，编码凝集素酶的基因位于所述典型的组织相容性抗原下游的MHC的Q、T及M区域。人体中有编码已知非典型的I型分子的类似区域，如HLA - F和HLA - G。从总体上看，非典型的I型基因的多态性程度低于典型的I型基因的多态性程度，并表现出有不同的表达方式。小鼠的Q、T和M复合基因由大约45个基因组成，编码具有有限的组织分布的非多态分化抗原。

与作为典型的I型MHC分子的凝集素酶相比，已知为非典型的I型MHC分子的凝集素酶表现为有限的组织分布。例如，Q和T基因的产物Qa和Tla抗原是在淋巴细胞亚群上表达(参见Flaherty等，“免疫学鉴定性评论”(Critical Reviews In Immunology), 10: 131 - 175(1990))。以前，没有认定非典型的I型基因的令人信服的功能，尽管已暗示其为 $\gamma\delta$ T细胞的可能的限制因子(Hershberg等，“美国国家科学院院刊”(Proc.Nat.Acad.Sci.(USA)), 87: 9727 - 31(1993)。也曾报导过Qa和Tla抗原能在肠道上皮上表达(Wu等，“实验医学杂志”(J.Exp.Med.)174: 213 - 218(1991); Hershberg等，“美国国家科学院院刊”(Proc.Natl.Acad.Sci.)(USA)87: 9727 - 97231(1990); Wang等，“免疫遗传学”(Immunogenet.), 38: 370 - 372(1993))，但其功能尚不清楚。本发明的新范例提出，至少某些非典型的I型分子是凝集素酶。

由小鼠MHC上的一个基因所产生的非典型的I型分子Q2即为凝集素酶的一个例子，它参与铁的转运(见实施例I)。在这种情况下，粘蛋白或其它含糖分子作为铁螯合剂，并且还必然含有用于由Q2基因表达的凝集素酶的配体。关于Q2的基因以头接头的关系相对于另一个很可能是编码一种粘蛋白

的基因定位。两个基因拥有一个单一的启动子区，位于这两个基因之间，该启动子在结构上类似于参与铁代谢的 $\beta$ -珠蛋白启动子。按照在所述新范例中将凝集素酶的功能定义为受体/配体和受体/底物相互作用的做法，很容易理解上述两个基因的协同调节。有趣的是，该 Q2 基因与其它非典型的 I 型

5 基因的区别在于，它是高度多态的，不同品系的小鼠，其 Q2 分子的氨基酸序列明显不同。尽管存在以上差异，但来自不同小鼠品系的 Q2 分子都是以其共同调节的基因产物的受体起作用，因为作为凝集素酶，根据各种 Q2 基因产物的凝集素识别和酶功能，Q2 可以酶促修饰其配体/底物，并可以识别

10 所得到的产物。因此，如在所述新范例中所定义的凝集素酶的组合的酶促/识别能力可以维持针对广泛的遗传多态性的受体/配体关系。

凝集素酶具有多种酶促活性。例如，凝集素酶可能具有糖基转移酶促活性，这一活性使得催化糖基(单或糖)由糖基核苷酸向诸如蛋白、糖或类脂的受体分子转移。然而，并非所有的糖基转移酶都是凝集素酶。

目前仅有一种已知其能同时在细胞质中和细胞上表达的糖基转移酶( $\beta$

15  $_{1,4}$ -半乳糖基转移酶)(参见 Shur, “当今细胞生物学评论”(Curr. Opin. in Cell Biol.), 5: 854 - 863(1993))。这种酶同时具有糖识别能力和糖催化活性，并参与多种细胞与细胞间的互作和细胞与基质间的互作。 $\beta$  $_{1,4}$ -半乳糖基转移酶的细胞表面表达形式的一个标志是，在进行酶促修饰后它不再具有对它所产生的产物的结合活性(Miller 等, “自然”(Nature) 357: 590 -

20 593(1992))。因此，这种特殊的转移酶不是凝集素酶，因为它不具有识别其酶促产物的能力。

IgGSF 的凝集素酶也能由位于 MHC 外面的基因编码。例如，CD - 1 是 IgGSF 基因的一种产物，它在结构上与所述 I 型 MHC 分子相关，但 CD - 1 重链是由 MHC 外的一个基因编码。T - 6 CD - 1 分子是由表皮中的

25 一种特化的抗原呈递细胞(朗氏细胞)表达，并能随 II 型 MHC 抗原一起内化到该细胞里，表明 T - 6 具有免疫功能。

可以制备含一种基本纯化的糖配体的组合物，该糖配体由一种凝集素酶特异地结合。在本文中所用的“基本纯化的”是指一种基本上不含其它污染分子的糖配体，所述污染分子如类脂、蛋白、核酸、糖或其它正常情况下不

30 与糖配体结合分子。而且，在本文中，“特异地结合是指具有足够的互补性，以便在存在足够的、至少  $10^{-4}$  摩尔、优选是  $10^{-6}$  摩尔或更多的凝集素酶的

情况下，能获得一定浓度的未结合的底物。例如，大致纯净的糖配体可以用众所周知的生化方法纯化一种糖源而获得或是通过化学或酶促合成而获得。

本发明的糖配体可以包括已知的含糖分子，如糖蛋白，蛋白聚糖、糖脂或粘多糖，它们具有糖基化的 N - 连接形式或 O - 连接形式。例如，蛋白聚糖包括粘蛋白和由透明质酸盐(酯)糖基化的蛋白聚糖、硫酸软骨素、肝素、5 硫酸乙酰肝素或硫酸皮肤素。例如，糖脂包括甘油酯、鞘氨脂和神经酰胺。

含有基本纯化的糖配体的样品可以由多种来源获得，如体液、组织或细胞。所述来源可以来自任何一种植物或任何动物(如哺乳动物)或任何有机体。糖配体来源还包括一种已通过将一种表达载体导入而修饰过的细胞，该载体编码一种酶或蛋白，当其表达时含有一种糖配体。10

含有糖配体的样品可以从一种由化学方法生产的糖库中获得。所述糖库可以通过混合天然来源的糖和酶促产生来源的糖而制得。另外，来自所述糖库的单个的糖可以用一种可检测标记，如荧光标记进行标记，以便对糖配体进行结构测定。

15 可以用本领域公知的方法对含糖配体的样品进行处理，以便进一步纯化该糖配体。例如，所述方法包括纯化糖缀合物，通过化学法或代谢法标记糖缀合物，从糖缀合物上释放糖并鉴定所释放的糖的结构(例如，参见 Ausabal 等，“当今分子生物学方案”(Current Protocols in Molecular Biology) 卷 2，第 17 章，(Green Publishing Associates and Wiley Interscience，New York,1994); Fukuda 和 Kobata，“糖生物学：一种实用方法”(Glycobiology A Practical Approach), (IRL Press, New York 1993),两篇文献均被收作本文的参20 考)。另外，所述方法可用于结构鉴定，包括糖配体测序。对自组织或细胞中纯化的糖配体的结构的阐释有利于将来通过直接化学合成或酶促合成或由一种天然来源纯化生产这种配体。

25 可以用几种方法鉴定能够与凝集素酶结合的糖配体。在一种方法中，让一种含有糖配体的样品与一种被怀疑能结合该配体的凝集素酶在适当条件下接触，以便所述配体能与所述凝集素酶进行特异结合。举例来说，适当条件包括使得所述特定凝集素酶和所述糖配体能够结合的适当缓冲液浓度和 pH，以及时间和温度。经过合适的反应时间以后，可以测定与凝集素酶结合的30 的糖配体量，例如，将一个可检测的部分如一种放射核素或荧光标记连接到糖配体上，并在所有未结合的糖配体都被从配体-凝集素酶复合体上除去之

后测定与凝集素酶接合的标记的量。

在本文中所用的“可检测的标记”是指这样一种分子，因该分子的物理、化学或生物学特征，其存在能够被检测到。例如，可检测的标记包括放射性同位素、荧光分子、酶/底物系统，或可以肉眼检测的分子。对糖分子进行可检测地标记的方法在本领域中广为人知，例如，包括用  $\text{NaB}(\text{}^3\text{H})_4$  还原或用放射性标记的糖进行合成(例如，参见 Varki, 同上, 1994 和 Rothenberg 等, “美国国家科学院院刊” (Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)), 90: 11939 - 11943(1993)), 这两篇文献均被收作本文的参考, 以及 Fukuda 和 Kobata, 同上, 1993)。另外, 制备标记的糖分子的试剂盒可由商业渠道方便地获得, 如 Oxford Glyco Systems(Rosedale, NY)。

例如, 从配体-凝集素酶复合物上除去未结合的标记配体的方法可依赖于凝集素酶与一种载体的结合。可用于本发明的载体以及将蛋白与这种载体结合的方法在本领域中广为人知(例如, 参见 Harlow 和 Lane, “抗体: 实验指南” (Antibodies: A laboratory Manual)(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988), 该书被收作本文的参考)。举例来说, 所述载体包括琼脂糖凝胶、琼脂糖或聚苯乙烯。

经过一段合适的反应时间并在通过诸如洗涤的方法除去载体上的所有未结合标记之后, 与载体结合的标记量使得与载体上的凝集素酶结合的糖配体量可直接测定。另外, 也可以间接测定与支持体结合的标记糖配体量: 在所述反应阶段之后, 测未结合的标记量, 并从反应开始时加入的标记量中扣除所测得的未结合的标记的量。

为了精确测定与凝集素酶特异结合的标记配体的量, 可进行一个对照反应, 在该对照反应中, 除了不加入凝集素酶或是用一种无关的蛋白, 如血清蛋白取代凝集素酶之外, 所有条件都与标记配体与凝集素酶之间的结合反应的条件相同。该对照反应可以测定标记的糖配体的非特异发生的结合的量, 如标记的配体与载体而不是载体上的凝集素酶的结合量。因此, 为了测定在试验的条件下与凝集素酶特异结合的配体量, 必须从由包括标记的糖配体和凝集素酶的反应所获得的结合值中扣除由对照反应中所获得的非特异结合值。

使用载体的优点是, 能以对凝集素酶过量的量加入标记的配体, 因而可以鉴定糖配体与凝集素酶之间低水平的结合亲和性。用于测定两种分子之间

的结合亲和性的方法，如 Scatchard 分析法在本领域中众所周知，所述两种分子可以在溶液中，或是其中之一可与一种载体结合。当两种分子都在溶液中时，可用于测定配体与凝集素酶结合的方法的例子之一是平衡透析。

测定标记的糖配体与凝集素酶结合的方法也可以在凝集素酶与细胞结合的条件下进行。在细胞表面表达凝集素酶的细胞能以类似于采用载体的方式结合标记的糖配体，在经过一段合适的反应时间后，用本领域众所周知的方法，如离心或过滤将该细胞同未结合的糖配体分离。能在细胞质中表达凝集素酶的细胞也可用于测定糖配体与凝集素酶的结合，只要细胞膜经过足够的透化处理，使得糖配体能够接近细胞里的凝集素酶。在结合试验，如抗原抗体结合试验中采用细胞的方法，在本领域中广为人知(例如，参见 Harlow 和 Lane，同上，1988)，而且，一般可应用于糖配体与凝集素酶之间的结合试验。

凝集素酶表达细胞可以是一种能天然表达凝集素酶的细胞，如能表达由 I 型或 II 型 MHC 编码的凝集素酶的淋巴细胞。凝集素酶表达细胞也可以是一种通过向该细胞中导入一种编码凝集素酶的表达载体而得到的能表达凝集素酶的细胞。凝集素酶表达细胞可以用本领域公知的方法从体内来源获得，如机械破碎组织或用酶消化组织，以便从其周围基质中释出细胞(例如，参见 Freshney，“动物细胞培养”(Culture of Animal Cells)(Alan R.Liss, New York, 1993)，该文献被收作本文的参考)。凝集素酶表达细胞可以是一种可从公共细胞保藏机构，如美国模式培养物保藏所获得的细胞系。

在本领域中，众所周知的是，两种分子间的结合，可以在两种分子中的任一种含有可检测的标记的情况下进行。因此，如果凝集素酶含有可检测的标记而糖配体与一种载体结合或由一种细胞表达的话，也可以对与结合于载体或细胞上的可检测地标记过的糖配体进行鉴定。可以用标记蛋白的方法对凝集素酶进行可检测标记，这些方法在本领域中广为人知，并且包括诸如生物素化或掺入放射性同位素标记的前体的方法。糖配体表达细胞可以从组织或器官中获得的细胞，或是如从公共保藏机构获得的细胞系。

用于结合糖配体和载体的方法取决于该配体的化学特性。因此，可以用适于将糖、肽或脂质结构结合到载体上的化学方法，通过糖部分或结合于糖配体上的其它分子实现所述结合。用于将糖、蛋白或脂质结合到各种类型的载体上的方法在本领域中广为人知。

无须可检测标记即可测定糖配体与凝集素酶的结合，只要通过测定配体或凝集素酶的一种物理特征，如紫外线辐射的吸收。这种通过物理特征对蛋白或糖进行定量的方法在本领域中广为人知。所述遵循配体或凝集素酶的物理特征的能力可用于结合实验，在该结合实验中，采用了一种载体或一种表  
5 达细胞或是两种分子都在溶液中。如果某种配体是某种凝集素酶的酶促活性的底物的话，也可以测定这种糖配体与这种凝集素酶的结合。在这种情况下，可以根据测得的底物转化动力学，如通过 Michealis - Menten 方程测定结合 (Delvin, “生物化学教科书”(Textbook of Biochemistry)(Wiley - Liss Inc. New York, 1992), 该书被收作本文的参考)。

10 鉴定能结合凝集素酶的糖配体的方法可以用一种单一的纯化的糖配体或有限数量的糖配体进行，所述糖配体可以用上述常规方法或通过一种结合剂结合进行纯化。在本文中所用的“结合剂是指可以特异结合糖配体的化学或生物分子。例如，一种结合一种糖配体的凝集素酶就是一种可用于纯化这种配体的结合剂。另外，如果一种抗体能够与一种糖配体的糖、蛋白或脂  
15 质部分进行特异反应的话，它也是一种结合剂。

也可以用本文所公开的方法对纯化的糖配体进行可检测标记。未纯化的糖配体，如存在于一种含有其它分子的样品中的糖配体也可用于结合试验，只要其结合于一种载体上或是由一种细胞表达，通过检测凝集素酶的结合测定结合。在这种情况下，如果未纯化的糖配体可以结合凝集素酶，就可以对  
20 所述含有配体的样品进行纯化并在随后进行结合试验，以得到纯化状态的糖配体。

可以用纯化蛋白或糖蛋白的常规方法从细胞中提取纯化的凝集素酶，例如，本领域中众所周知的用于纯化 I 型或 II 型分子的方法。还可以从经分子生物学技术修饰后能表达凝集素酶的细胞中提取凝集素酶。可以把编码一种  
25 凝集素酶的基因克隆到一种表达载体上，然后将其导入一种宿主细胞。载体在本领域中众所周知，例如，包括克隆载体、表达载体以及质粒或病毒载体(例如，参见 Goedell, “酶学方法”(Methods in Enzymology), 卷 185(Academic Press, New York, 1990), 它被收作本文的参考)。载体的例子之一是一种杆状病毒载体，可将其用于在昆虫细胞中表达凝集素酶，并导致新的糖配体在所述细胞  
30 上表达。

含有编码一种凝集素酶的核酸分子的载体，也可以含有一个启动子或增

强子，这些因子可以是组成型的或诱导型的，如果必要的话也可以是组织专一性的。宿主细胞在本领域也是众所周知的，并可以选择合适的宿主细胞来获得要用的特异载体。例如，可以采用一种杆状病毒转移载体，由杆状病毒 DNA 感染昆虫细胞系，如 SF21 细胞。克隆所述转化细胞，以便产生一种稳定的细胞系，它能提供一种表达的凝集素酶源或提供一种由所述表达的凝集素酶修饰过的糖配体源。

编码一种凝集素酶的基因可以表达成一种融合蛋白，以便于纯化该凝集素酶或对凝集素酶进行进一步加工。例如，所述凝集素酶可以与先前表达 CD22  $\beta$  凝集素(Stamenkovic 等，“细胞”(Cell), 66, 1133 - 1144(1991))相同的方法，以嵌合蛋白形式产生，该嵌合蛋白与构成免疫球蛋白分子的 Fc 结合域的 CH2 和 CH3 结构域融合。利用结合载体上的获自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白 A(通过商业渠道很容易得到)，可以纯化含有 Fc 的嵌合凝集素酶。另外，所述含有嵌合凝集素酶的载体可直接用于测定糖配体的结合。

上述用于鉴定与凝集素酶结合的糖配体的方法，也可用于鉴定与糖配体结合的凝集素酶。例如，在合适条件下，让一种含有凝集素酶样品与被怀疑为与凝集素酶结合的糖配体接触，使糖配体与凝集素酶进行特异结合。例如，用于鉴定其结合的凝集素酶包括纯化的凝集素酶或包含于一种复杂的混合物，如由一种 cDNA 表达文库表达的蛋白混合物中的凝集素酶。用于产生 cDNA 表达文库的方法在本领域中广为人知(例如，参见 Sambrook 等，“分子克隆:实验指南”(Molecular Cloning :A Laboratory manual)(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)，该书被收作本文的参考)。

也可以用亲和柱及相关技术纯化糖配体。例如，可以在适当条件下让一种含有糖配体的样品与所述结合剂接触，以便形成一种配体结合剂复合体。例如，合适的条件包括使糖配体能与结合剂结合的合适缓冲液浓度和 pH，以及时间和温度。通过诸如洗涤之类的分离方法将所述配体-结合剂复合体同其余样品分离，并将配体从所述复合体上解离下来。

作为另一个例子，与一种糖配体结合的凝集素酶可以包括一种用于纯化这种配体的结合剂。抗体也可以含有一种结合剂，如果它能与糖配体的糖、蛋白或脂质部分进行特异反应的话。

如果所述结合剂结合于一种载体，如琼脂糖、琼脂糖凝胶或塑料上的

上公开的用于测定糖配体与凝集素酶的结合的方法，也能用于将结合剂与一种载体结合。

5 用于从配体-结合剂复合体上解离糖配体的方法取决于结合剂的性质。例如，如果该结合剂是一种凝集素酶，用于解离所述复合体的方法就可能涉及用一种糖结构对该复合体进行竞争抑制，该糖结构对于所述凝集素酶上结合糖配体的同一位点具有结合亲和性。用于从结合剂上解离糖配体的其它已知措施包括，例如极端 pH、高盐浓度或离子序列高的试剂(例如，参见 Harlow 和 Lane，同上，1988)，该文献被收作本文的参考，以及 Varki，同上，1994)。用上述方法纯化的糖配体适于进行上述结构分析，以便将来能够  
10 能够通过化学或酶促合成法生产这种配体。

可产生一种能特异结合于寡糖或多糖型糖配体上、对糖或蛋白部分或脂质部分有抗性的抗体上，只要这些部分是与所述配体结合。糖配体的肽主链(如粘蛋白的肽主链)的特异抗体，可用于从不同细胞或不同个体中纯化一种粘蛋白源，因为含有糖的肽之间的肽主链比该分子上的糖的部分更保守。用于  
15 于生产蛋白、糖或脂质的特异抗体，如多克隆抗体、单克隆抗体或抗体片段等的方法在本领域中是众所周知的(例如，参见 Harlow 和 Lane，同上，1988)。

可以用一些方法来纯化凝集素酶，由此该凝集素酶与一种糖配体特异结合。在所述方法中，让一种含有凝集素酶的样品在合适条件下与一种糖配体  
20 接触，以便形成配体-凝集素酶复合体。例如，合适的条件包括使凝集素酶能够与糖配体结合的合适的缓冲液浓度和 pH，以及时间和温度。然后用诸如洗涤之类的方法从其余样品中分离出该配体结合剂复合体，并从该复合体上解离凝集素酶。

如果所述糖配体结合于一种载体，如琼脂糖、琼脂糖凝胶或塑料上的话，可以实现对凝集素酶的纯化。如上公开的用于测定糖配体与凝集素酶的  
25 结合的方法，用来将糖配体与一种载体结合的方法，同样可用于将糖配体与一种载体结合。用于从配体-凝集素酶复合体上解离凝集素酶的方法，可以采用本文中所公开的用于从配体-凝集素酶复合体上解离糖配体的方法。

可以这样鉴定修饰凝集素酶表达细胞的功能的糖配体：让一种含有糖配体的样品在合适条件下与所述细胞接触，使所述配体与细胞上的凝集素酶进行  
30 特异结合。在一段合适的使配体与凝集素酶结合的时间后，对细胞进行评

价，以便测定其功能。能修饰凝集素酶表达细胞的功能的糖配体是这样的，当其与所述细胞接触时能使该细胞的功能不同于未接触所述配体的同一种细胞的功能。

关于在本文中所用的细胞的“功能”，其包括任何可以检测到的细胞活性。细胞的功能因研究的细胞的性质而异。例如，T淋巴细胞的功能可能包括以下活性，如产生某些细胞因子，获得细胞介导的淋巴细胞裂解能力，调节由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的能力或辅助B淋巴产生抗体的能力。因此，一种能够与T淋巴细胞上的凝集素酶结合，并接着影响所述细胞的特异糖配体，能够通过增强或减弱上述T淋巴细胞的任一种功能来影响所述细胞的功能。作为另一个例子，向胃肠道上皮细胞中添加一种复合糖将影响铁的吸收。

糖配体与凝集素酶表达细胞的接触可以在体外、在细胞培养基中进行。用于测定淋巴细胞或其它细胞的功能的方法在本领域中广为人知(例如，参见Colligan等，“当今免疫学方案”(Curr. Protocols in Immunol.) (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1992); Mishell和Shiigi，“细胞免疫学方法精选”(Selected Meth. in Cell Immunol.) (W. H. Freeman and Co. New York, 1980)，以上文献均被收作本文的参考)。

上述用于鉴定能修饰凝集素酶表达细胞的功能的糖配体的方法，同样能用于鉴定修饰糖配体表达细胞的凝集素酶。

通过把细胞与一种能结合凝集素酶的糖配体接触，可以修饰凝集素表达细胞的功能。另外，本发明提供了通过将细胞与一种能结合凝集素酶的糖配体接触来修饰糖配体表达细胞的功能的方法。能修饰细胞功能的糖配体或凝集素酶的鉴定即可应用于体外又可应用于体内。例如，可以给患者服用能够增强或减弱与某种病症有关的细胞的功能活性的配体或凝集素酶，以便治疗这种疾病。

例如，可以用如下方法鉴定能够与凝集素酶的糖配体结合位点结合的肽：让一种含有一种或几种肽的待测样品在合适的条件下与一种凝集素酶接触，使肽能够与该凝集素酶结合。然后，把该凝集素酶与糖配体反应，已知该糖配体和其结合。该反应是在适于所述糖配体与所述凝集素酶结合的条件下进行。或者在反应开始时同时加入肽、凝集素酶和糖配体。

可以直接将所述糖配体加入到所述含有肽和凝集素酶的混合物中，或是在从凝集素酶上除去所有的未结合肽之后加入。在上述反应结束以后，测定与凝集素酶结合的糖的量，并与在不含肽的对照样品中与凝集素酶结合的糖配体量进行比较。如果在含肽的样品中与凝集素酶结合的糖配体量低于在对照样品中与凝集素酶结合的糖配体量，则可以认为所述肽已结合到所述凝集素酶的糖配体结合位点上，因此，它是所述糖配体的一种肽膜拟物。

可以用下面的分析方案鉴定肽模拟物，该方案采用一种含有可检测标记的糖配体和一种与一种载体结合或由一种细胞表达的凝集素酶。本文所公开的用于鉴定与凝集素酶结合的糖配体的方法，可用于产生所述用于鉴定糖配体的肽模拟物的分析方案。

可以通过化学方法合成一种特定的肽序列，或是用生物学方法，如通过重组 DNA 技术(例如，参见 Sambrook 等，同上，1989)产生。还可将一种复杂的肽混合物用于鉴定肽模拟物。例如，这种复杂的混合物可以包括特定序列的混合物，或可以是一些序列的半随机或随机的文库。用诸如在玻珠或微量滴定板上化学合成或在如噬菌体表面生物生产的方法制备肽文库在本领域中是众所周知的(例如，参见 Huse 等，“科学”(Science)246：1275 - 1281(1989)，它被收作本文的参考)。

能够与凝集素酶的糖配体结合位点结合的肽可能也具有糖配体的某些功能特征，因此被视为这种糖配体的功能性模拟物。这种肽模拟物可用于修饰细胞的功能，也可用于治疗涉及一种能够与该模拟物结合的凝集素酶的疾病。

可以如下方法对一种细胞进行修饰，以使其能产生一种糖配体：将编码凝集素酶的表达载体导入一种细胞中，以实现这种凝集素酶的表达，从而导致所述细胞产生所述糖配体。能产生一种特定的糖配体的细胞可用于产生特殊类型的配体，这些配体能从该细胞中提纯。另外，这种细胞可用于结合试验，以便鉴定与配体结合的凝集素酶。

可用一种抗原和一种与凝集素酶结合的糖配体来调节个体，如人或其它动物体内的免疫反应，其中该抗原是所述免疫反应是需要的。例如，凝集素酶包括与免疫系统有关的主要组织相容性复合体分子，注射一个糖配体和一种抗原能调节免疫反应。在本文中所用的“调节”是指增强或减弱。通过给药一种与抗原结合的糖配体可以实现免疫反应的增强，使得通过凝集素酶

把抗原作为呈递细胞的目标。

用本领域众所周知的方法，可使抗原与糖配体通过所述抗原与配体的糖、任何蛋白或脂质共价结合而结合。使抗原与糖配体共价连接的实际方式取决于待连接的各种分子的性质，以及该连接方法是否会破坏抗原的任何重要的抗原决定簇或糖配体结合其靶凝集素酶的能力。可以用上述结合试验方便地评价这种不利作用。

可以有一个以上抗原分子或一个以上糖配体连接在一起形成免疫原。可将上述分子抗原或糖配体或二者同时制备成多价型，并可用于诱发比含有单一的抗原分子和单一的糖配体分子的免疫原诱发的免疫反应更强的免疫反应。

用于增强个体的免疫反应的方法为本领域技术人员所熟知，并需要对诸如剂量、给药途径、佐剂的使用、或给药方案之类的参数进行优化(例如，参见 Harlow 和 Lane，第 5 章同上，1988)。该方法同样适用于糖配体。在给药一种抗原和一种糖配体之后获得了增强的免疫反应，此时，与给药所述抗原和糖配体之前所表现出的免疫反应参数相比，免疫反应参数水平从统计学

反应水平明显提高

之类的免疫抑制剂，可以获得减弱的免疫反应。用所述制剂减弱人或动物对一种抗原的免疫反应的方法在本领域中广为人知。

5 通过给药有效剂量的能与某种凝集素酶结合的糖配体可以治疗与该凝集素酶相关的病症。本文中所用的“疾病”包括任何疾病，遗传性疾病或获得性疾病，前提是凝集素酶发病中起作用。可以用本文所述方法改善的病症包括炎症、移植排斥，还可包括具有遗传和环境基础的疾病，如铁储存疾病、自身免疫性或癌症。另外，可以用本文所述方法改善的其它病症，包括由诸如病毒、细菌、酵母或寄生虫之类的感染剂引起的疾病。感染剂通过与在宿主细胞上表达的凝集素酶或配体结合能产生进入并感染宿主细胞的能力。也可  
10 将一种糖的肽模拟物用于治疗与一种的凝集素酶有关的病症，该凝集素酶可以结合这种模拟物。

对于与一种凝集素酶有关的病症，可以通过给药一种凝集素酶来治疗，该凝集素酶有与该病症有关的凝集素酶相似的、对糖配体的结合特异性。可以用凝集素酶治疗的病症包括上述可用糖配体治疗的疾病。因此，对于患者  
15 体内由凝集素酶介导的异常自身识别，可以通过给药一种凝集素酶进行治疗。所述凝集素酶可以与由所述异常自身反应性凝集素表达细胞检测到的靶细胞上的天然糖配体结合，因此，能阻止所述自身反应性凝集素酶表达细胞识别所述靶细胞并与其进行异常反应的能力。

一种被称为血色素沉着症的铁代谢疾病也可用本文所公开的方法治  
20 疗，因为铁代谢缺陷的基础可能在于凝集素酶功能。在高浓度情况下，铁是一种毒性无机分子，它参与很多种常见病的病理生理学。所述疾病包括(但不限于)癌症(Stevens 等，“新英格兰医学杂志”(N. Engl. J. Med.) 319 : 1047(1988); Stevens 等，“内科肿瘤学与肿瘤药疗法”(Med. Oncol. Turnor Pharmacother), 7: 177 - 181(1990)、心脏病(Kannel 等, 1976; Sullivan 等, “柳叶刀”(Lancet) 1 : 1293 - 1294(1981); Salonen 等, “循环”(Circulation), 86 : 80 - 3811(1992))、再灌注损伤(Zweier, “生物化学杂志”(J. Biol. Chem.) 263: 1353 - 1357(1988))和类风湿性关节炎(Blake 等, “关节炎与风湿病”(Arthritis Rheum.), 27: 495 - 501(1984))。毫无疑问的是，铁的严重过量会导致多种疾病，笼统地称之为血色素沉着症，它是已知的困扰人类的最常见遗传病。

血色素沉着症是通过活跃的转运增强从胃肠道吸收铁而引起的，但导致

潜在的代谢缺陷的基因目前尚不清楚。负责铁吸收的基因的鉴定和一种动物模型的开发(在该模型中,铁的过量是从胃肠道活跃地增加吸收铁所致),将大大促进对血色素沉着症的理解并增加对铁代谢的一般机理的了解。正如本文所公开的,一种MHC编码的凝集素酶可能涉及血色素沉着症的发病机理。

5 通常,在出现症状之前血色素沉着症并不引起临床上的重视,已有某些研究表明,在发生组织损伤后除去铁并不一定能改善器官的功能(Cundy, 等,“临床内分泌学”(Clin. Endocrinol.) 38: 617: 620(1993); Westera 等,“美国临床病理学杂志”(Am. J. Clin. Path.), 99: 39 - 44(1993))。血色素沉着症是一种尚缺乏有效的诊断和治疗手段的疾病,它更多地得益于早期诊断和有效的治疗(参见 Edwards 等,“医院实践增刊”(Hosp. Pract. Suppl.), 3:30 - 36(1991); Edwards 和 Kushner,“新英格兰医学杂志”(N. Engl. J. Med.), 328:1616 - 1620(1993))。

15 未治疗过的血色素沉着症的特征是实质细胞中铁过量,铁的过量是有毒性的,在很多情况下,它可能是多种并发症的诱因。所述并发症包括肝病(包括肝硬化和肝癌)、关节病、促性腺激素分泌不足的性腺发育不足、骨髓发育不全、皮肤病、糖尿病和心肌病(参见 Halliday 和 Powell,“铁和人类疾病”(Iron and Human Disease), Lauffer, RB, (ed). 131 - 160(1992))。在美国,报导有 1.5 - 2 百万例血色素沉着症的实际病例,其中有 25 % 的晚期诊断或未治疗的患者发展成肝癌。

20 对于未治疗的血色素沉着症来说,铁普遍沉着于肝脏的肝细胞中,高饱和和运铁蛋白及高浓度血清铁蛋白与肝脏活检相结合是目前所能采用的最佳诊断检验方法(Fairbanks,“医院实践”(Hosp. Pract.) 26: 17 - 24(1991))。铁主要存在于肝细胞的细胞质中,通过电子显微术发现也存在于溶酶体空泡中,在更为罕见的情况下,还发现铁沉积于线粒体中(参见 Iancu, 25 Ped. Pathol. 10: 281 - 296(1990))。其它肝毒素,如醇和肝炎等能加重由铁沉积导致的损害(Piperno 等,“肝脏病杂志”(J. Hepat.), 16: 364 - 368(1992))。由于会增加肝脏损伤,血色素沉着症患者被告戒不要饮酒,也不要吸烟,因为在肺部也可能发生铁的沉着。

30 在文献中报导,血色素沉着症是一种常染色体隐性疾病,其中,有关基因位于第 6 人体染色体上,与人 MHC(HLA 复合体)的 A 基因座连锁,(Simon 和 Brissot “肝脏病”(Hepatol.), 6: 116 - 124(1988))。文献记载有大约

73 % 的案例与人 HLA - A3 连锁。不过，其它遗传的基因座也与这种病有关，特别是在非洲(Gorduke 等“新英格兰医学杂志”(N. Engl. J. Mde.), 326 : 95 - 100(1992))和非洲 - 美洲人群中(Barton 等, “血液”(Blood), 85 : 95a(1993))。

5       目前已认识到血色素沉着症是人类中最常见的遗传病，远远超过了胰囊性纤维变性、苯酮尿和肌肉营养不良症的总和(Leggett 等, “临床化学”(Clin. Chem.), 36 : 1350 - 1355(1990))。对这种遗传病的高发病率的解释是，在多个连锁基因上发生的突变产生类似的表型。血色素沉着症在欧洲人种的人群中的发病率提高，在纯合体和杂合体中的发病率分别为大约 0.3 %  
10      和 13 %。

      已在人 MHC 基因座上鉴定了几个标记基因，包括最近报导的 D6S105，并将血色素沉着症基因的基因定位缩短到 A 基因座的 1 厘摩之内(Jazwinska 等, “美国遗传学杂志”(Am. J. Genet.), 53 : 347 - 352(1993))，并且位于近 HLA - F 的着丝粒上(Gasparini 等, “人类分子遗传学”, (Hum. Mol. Genet.),  
15      5 : 571 - 576(1993))。已报导过的其它候选血色素沉着症基因位于近 HLA - A 20 - 200kb 的端粒上(el kahloun 等, “人类分子遗传学”(Hum. Mol. Genet.), 2 : 55 - 60(1993))。尽管上述候选基因中的一些被认为是单拷贝的，但已发现其中的称为 HCGII、VI 和 VII 的 3 个基因是多拷贝基因。因此，尽管在确定血色素沉着症基因的定位方面已取得进展，但至今尚未分离到这种基因。  
20

      大多数用于铁过量研究的动物模型并不完全适合于血色素沉着症的研究，因为它们不能反映因活跃转运所致的从消化道对铁的吸收增强。不过，缺乏编码  $\beta_2M$  基因的小鼠纯合体( $\beta_2 - / -$ 小鼠(Koller 等, “科学”(Science), 248 : 1227 - 1230(1990); Zijlstra 等, “自然”(Nature), 344 : 742 -  
25      746(1990))提供了一种极好的研究血色素沉着症用的动物模型。这种小鼠的细胞表面缺乏可检测的 I 型蛋白，尽管生化标记证实 I 型基因产物正被合成。活化天然杀伤(NK)细胞能裂解来自  $\beta_2 - / -$  动物的活化淋巴细胞，这再次表明了 I 型表达存在缺陷(Liao 等, “科学”(Science), 253 : 199 - 202(1991))。上述小鼠最初是为了研究  $\beta_2M$  在发病中的作用而开发的。尽管小鼠正常发育和进食，但其不能产生有效数量的 CD8 + T 细胞。因此，已从免疫学角度对  
30      这种小鼠进行了认真研究。

$\beta_2 - / -$  小鼠能较好地抵御病毒感染, 尽管感染的过程比正常动物体内的长(Eichelberger 等, “实验医学杂志” (J. Exp. Med.), 174: 875 - 878(1991); Muller 等, “自然” (Nature), 255: 1575 - 1579(1992))。它能排斥同种异体移植(Zijlstra 等, “实验医学杂志”(J. Exp. Med.), 175: 885 - 889(1992))并且与正常小鼠相比, 它表现出较高的 Ig 生产水平和更快的抗体类型的类型转换。尽管在出生时 CD8 + T 细胞低至不可检测到, 但研究已证实, 这种动物能够产生 CD8 + T 细胞, 而且在适当条件下能发生细胞毒性 CD8 + T 细胞反应(Apasov 和 Stikovsky, “免疫学杂志”(J. Immunol.), 152: 2087 - 2097(1994))。报导过的这种动物的另一种显著的异常性是, 在老龄(大于 2 年)时会发生高血糖(葡萄糖 > 300mg/dl)。曾有人提出在  $\beta_2 - / -$  小鼠中糖尿病的发生与自身免疫有关(Faustman 等, “科学”(Science), 254: 1756 - 1761(1991)), 不过, 这种说法曾受到怀疑(Serreze 等, “糖尿病”(Diabetes), 43: 505 - 509(1994); Wicker 等, “糖尿病”(Diabetes), 43: 500 - 504(1994))。

$\beta_2 - / -$  小鼠会发生类似于人体血色素沉着症的铁过量。 $\beta_2 - / -$  小鼠会自发地发生肝癌。上述发现与  $\beta - \text{GAP}$  基因的分子生物学数据(见例 I)的结合, 提示这种小鼠会发生铁过量。对这种小鼠的组织进行的组织化学检测证实了上述假设。在所有动物的肝脏和某些动物的肾、脾和肺中发现有铁的沉着。另外, 这些动物中有 16 % 会出现肝病, 或为肝癌, 或为肝坏死。因此, 对于  $\beta_2 - / -$  缺陷型小鼠的临床发现与血色素沉着症的病理学足够相似, 这使得  $\beta_2 - / -$  小鼠成为可用于研究人类血色素沉着症的潜在机理的有吸引力的模型。更重要的是,  $\beta_2 - / -$  小鼠证实  $\beta_2\text{M}$  与这种疾病有关。

$\beta - \text{GAP}$  启动子同时调节  $\beta - \text{GAP}$  基因和编码凝集素酶的非典型的 I 型基因的能力支持 I 型凝集素酶与血色素沉着症有关的说法, 这两种基因均在肠道中表达。由  $\beta - \text{GAP}$  启动子调节的非典型的 I 型基因是一种凝集素酶, 它能识别并修饰与  $\beta - \text{GAP}$  基因产物结合的一种糖结构,  $\beta - \text{GAP}$  基因产物能直接或间接地与铁结合(即,  $\beta - \text{GAP}$  可能是铁的一种载体)。破坏  $\beta_2\text{M}$  表达会导致由非典型的 I 型分子提供的对凝集素酶功能调节的丧失, 引起铁过量和血色素沉着症。

可以把糖配体或凝集素酶用来制成用于治疗诸如血色素沉着症、自身免疫病、移植排斥、炎症或感染之类的疾病的药品。可以用本文披露的方法和

组合物治疗的自身免疫病包括：系统性自身免疫病，如关节强硬性脊椎炎、多发性硬化、类风湿性关节炎、硬皮病、斯耶格伦综合症或系统性红斑狼疮，和器官特异性自身免疫病，如阿狄森病，古德帕斯彻综合症、格雷夫斯病、淋巴瘤性甲状腺肿、自发性血小板减少性紫癜、重症肌无力或恶性贫血。由于人类的血色素沉着症很可能是由 $\beta$ -GAP启动子启动的凝集素酶引起的，因此，用具有与涉及某种疾病的凝集素酶相同或相似的结合特异性的糖配体、凝集素酶或竞争分子进行治疗，可以调制这种疾病的进程。可以给药能与参与血色素沉着症的非典型的I型凝集素酶结合的糖配体，以抑制与 $\beta$ -GAP铁载体的结合。

10 可遵循的用糖配体治疗诸如自身免疫性的疾病的方法，可能首先要求鉴定涉及该病发生的凝集素酶。接着，用本文所公开的方法鉴定能与所述凝集素酶结合的候选的糖配体。这样，然后即可在体外检验所述候选糖配体，来鉴定那些能够阻遏所表现出的自身免疫反应的糖配体，此时，来自患者的自身反应性免疫细胞上的凝集素酶能识别在该患者的细胞上表达的一种糖分子  
15 (它是所述自身反应性细胞的目标)，而表现出自身免疫。可以通过细胞功能，如通过细胞增殖或细胞因子的释放来测定自身免疫反应(例如，参见Colligan等，同上，1992；Mishell和Shiigi，同上，1980)。然后，可以把最佳的候选糖配体用作治疗这种疾病的药品。

本文所披露的用于治疗血色素沉着症的方法也适用于治疗多种因铁过  
20 量所致的其它医学疾病或并发症。由于有多个凝集素酶基因涉及对铁代谢的调控，因此突变的类型、其在所述基因上的位置以及个体内突变的凝集素酶基因的数量和类型是能影响个体体内铁过量程度的因子。个体所表现出的铁过量的程度取决于以上因子，本文所公开的用于治疗血色素沉着症的方法也可用于治疗其它因铁过量所致的疾病。举例来说，这些疾病包括肝病(包括肝  
25 硬变和肝癌)、关节病、促性腺激素分泌不足的性腺发育不足、骨髓发育不全、皮肤病、糖尿病和心肌病(参见Halliday和Powell，“铁和人类疾病”(Iron and Human Disease)，Lauffer，RB，(ed).131 - 160(1992))。

为了调节血色素沉着症或其它铁储存疾病，以有效剂量给药所述糖配体或模拟物。可以单一剂型，或以药团形式给药或在较短时间内输液给受治对  
30 象给药所述全部有效剂量，或用分级治疗的方法给药，其中，在较长的时间内给药多个剂量。本领域技术人员知道，为了在受治对象达到有效剂量所需

的糖配体浓度取决于多种因素，包括：受治对象的年龄和健康状况，以及用药途径和待用的治疗次数和糖配体的药物形式。就上述因素而言，有经验的医生可以调整具体用量，以达到对受治对象的有效剂量。

糖配体或凝集素酶也可用于体内治疗与凝集素酶有关的自身免疫病。在自身免疫病中，在淋巴细胞上表达的一种凝集素酶能把一种自身糖配体认作5 为外源糖配体，结果导致免疫定向性破坏表达所述自身糖配体的细胞。因此，给药能与所述与涉及异常自我识别的凝集素酶结合的糖配体、模拟物或其它竞争分子，可以阻止淋巴细胞识别或活化，导致自身免疫病症状的减轻或消失。或者，给药一种对由自身反应性淋巴细胞的凝集素酶识别的自身糖配体10 有相同或不相似的结合特异性的凝集素酶，同样可以治疗自身免疫病。

可以将糖配体或凝集素酶用于治疗由诸如病毒、细菌、酵母或寄生虫之类的感染剂引起的疾病。感染剂已发展成能表达其自身的外部受体，该受体15 能识别所述细胞表面的糖结构或凝集素酶，使所述感染剂能够进入被感染的细胞。因此，向暴露给一种感染剂的个体给药一种合适的糖配体或凝集素酶，可以阻止感染剂与靶细胞的结合，从而抑制感染的程度并因此减少该病的传布。

本发明的糖配体或凝集素酶可用于治疗移植排斥。因为排斥是基于移植受体的淋巴细胞对外源分子的识别，所以，用一种能够与涉及外源抗原识别20 的移植受体的淋巴细胞的凝集素酶结合的糖配体治疗，可以抑制导致移植排斥的识别。同样，给药一种具有与涉及外源抗原识别的移植受体淋巴细胞的凝集素酶相同或相似的结合位点专一性的凝集素酶，可以抑制导致移植排斥的识别。

在作为含有一种可以药用的载体的药物组合物使用时，本发明的糖配体或凝集素酶特别有用。可以药用的载体为本领域所熟知，例如，包括诸如生理25 缓冲盐溶液之类的水溶液或其它溶剂或载体，如乙二醇、甘油，诸如橄榄油之类的油，或可注射的有机酯类。

可以药用的载体中可以含有生理学上能够接受的化合物，例如，该化合物可以起到稳定或加强糖配体或凝集素酶的吸收的作用。例如，上述生理学上能够接受的化合物包括糖、如葡萄糖、蔗糖、葡聚糖，抗氧化剂，如抗坏30 血酸或谷胱甘肽，螯合剂，低分子量蛋白或其它稳定剂或赋形剂。本领域技术人员可以了解到，对可以药用的载体、包括生理学上可以接受的化合物的

选择取决于，举例来说，组合物的给药途径。

本领域技术人员会了解到，能以各种途径向受治对象给药含有糖配体或凝集素酶的药用组合物，例如，所述途径包括：直接滴注、经口或不经肠给药，如静脉内、肌内、皮下或腹膜内给药。可以通过注射或插管法服用所述组合物。如果必要，还可以将所述用组合物掺入脂质体或微球体中，或在其它聚合物基质中进行微囊化 (Gregoriadis, “脂质体技术”(Liposome Technology) 卷 1 (CRC Press, Boca Raton, FL, 1984), 该文献被收作本文的参考)。由诸如磷脂或其它脂质组成的脂质体是无毒的、生理学上可以接受的, 并且是可以代谢的载体, 它较容易制备和服用。

5 可以体内给药一种编码凝集素酶的表达载体, 以治疗一种因凝集素酶所致的病症。例如, 一种因突变的凝集素酶所致的病症, 如贫血可以这样治疗: 给药一种编码与铁转运有关的功能性凝集素酶的表达载体, 并在消化道细胞中实现该载体的表达。

15 特定凝集素酶在细胞里的表达水平能影响由该细胞表达的糖配体的性质。如果一种糖配体的表达与某种疾病有关, 可以通过降低负责产生该配体的凝集素酶的表达来从细胞中消除这种配体。因此, 一个表达载体可能含有编码互补于编码凝集素酶的一部分核苷酸序列的反义核苷酸序列的外源核酸分子, 以便在合适条件下导入细胞时该表达载体能产生一种的反义核酸分子, 该分子能在细胞里选择性地与所述凝集素酶基因或信息链杂交, 从而影响所述凝集素酶在该细胞中的表达。例如, 所述反义核酸分子能与细胞中的一种凝集素酶基因杂交, 并能减少或抑制该凝集素酶基因的转录。同样, 所述反义分子能够与细胞中编码所述凝集素酶的信息链杂交, 并能减少或抑制翻译、加工和细胞稳定性, 或 RNA 的半衰期。

25 表达载体也可用于作用于与某种疾病有关的凝集素酶或糖配体的表达, 这种作用是通过: 将一种编码核酶的外源核酸分子导入细胞中, 该核酶能特异地裂解编码凝集素酶或一种糖配体的肽主链的 RNA。因此, 通过将所述核酶导入与某些疾病有关的细胞中可以减少涉及这种疾病的所述凝集素酶或糖配体的表达, 因此能减轻或抑制病变。可以用化学方法合成反义核酸分子或核酶, 并用重组 DNA 技术将其整合到一种表达载体中。也可以将所述反义核酸分子或核酶直接加入细胞中, 而该反义核酸分子无须被整合到表达载体。



用于将表达载体导入细胞的方法在本领域广为人知。所述方法披露于以下文献中：Sambrook 等，同上，1989；Kriegler M., "基因转移和表达：实验指南" (Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual) (W. H. Freeman and Co. New York NY (1990)，两篇文献均被收作本文的参考)，例如，包括转染法，如磷酸钙转染法、电穿孔法、脂质转染法或病毒感染法。

重组病毒载可用于将外源核酸分子导入哺乳动物细胞中，举例来说，包括腺病毒载体，疱疹病毒载体和逆转录病毒衍生的载体。例如，可以将编码一种凝集素酶的病毒载体包装到病毒里，以便能够输送该遗传信息，并在经该病毒感染后在胃肠道的上表细胞中表达这种凝集素酶。另外，还可将含有反义序列或对编码一种凝集素酶的核苷酸序列具有特异性的核酶的重组病毒导入个体体内的细胞中，以便抑制由所述凝集素酶或一种具有类似的糖结合特异性的凝集素酶介导的疾病。

重组病毒感染可能比直接 DNA 递送的选择性更强，因为病毒具有仅感染某些类型细胞的天然能力。对于这种用于选择性感染的天然能力可加以利用，以便将感染局限于一个混合细胞群体里的仅仅某些细胞类型。例如，腺病毒可用于主要对上皮来源的细胞进行限制性病毒感染。另外，可以用重组 DNA 技术对逆转录病毒进行修饰，使其能表达一种特殊的受体或配体，这种受体或配体能为病毒基因的递送提供进一步的特异性。能产生高感染率、稳定的遗传整合和高水平外源基因表达的逆转录输送系统为本领域所熟知。

如上所述，现有的重组病毒输送系统能提供将遗传信息输入选择的细胞类型的方法。病毒系统的选择取决于所需的靶细胞类型，而载体的选择取决于所需的用途。本领域技术人员很容易获得重组病毒载体，而且，本领域技术人员可以用标准重组 DNA 方法很容易地对这种载体进行修饰(例如，参见 Krieger, "基因转移和表达：实验指南" (Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual), (W. H. Freeman and Company, 1990); Goeddel, "酶学方法" (Methods in Enzymology), 卷 185, (Academic Press, 1990); 和 Stoker, "分子病毒学，实用方法" (Molec. Virol., A Practical Approach) (Davison 和 Elliot 著, IRL Press, 1993)，以上三篇文献被收作本文的参考。

基于一种凝集素酶的血色素沉着症或其它铁储存疾病的遗传因素可以

通过检测由 MHC 的基因座上的基因编码的 I 型 MHC 分子的重链上的突变进行诊断。所述方法可用于诊断具有铁储存疾病症状的个体。个体的重链上的突变的正确诊断有助于查清这种疾病的潜在原因。并且通过鉴定突变体的特定凝集素酶，用本发明所公开的方法将突变的凝集素酶的鉴定用于鉴定适用于治疗所述疾病的糖。

不患有铁储存疾病，但被怀疑遗传了一种突变(所述突变会使所述患者在生命的晚期发生铁储存疾病)的患者同样能得益于用本文披露的方法检验突变。

用于诊断所述疾病的突变是这样一种突变，它能使所述重链对人 $\beta_2M$  的亲合力显著下降。例如，能导致磷酸化的信号缺失的发生于非典型的 I 型重链上的一个突变是用于诊断血色素沉着的突变，因为一个正常磷酸化的重链是该链与 $\beta_2M$  互作所必需的。能指示细胞对一种多肽上的丝氨酸或苏氨酸残基进行磷酸化的共有氨基酸序列在本领域中广为人知。用于诊断血色素沉着的突变也可以发生在所述重链的接近磷酸化位点的部位。如果加在该位点上的磷酸基团在细胞中不能除去的话，这种突变会降低所述重链与 $\beta_2M$  结合的能力。

用于检测非典型的 I 型重链上的磷酸化位点突变的方法可基于对蛋白的分析或对编码该蛋白的核酸的分析。为了进行蛋白测定，可以从患者的细胞或体液来源中纯化所述非典型的 I 型分子并可从 $\beta_2M$  上分离所述重链。纯化 I 型 MHC 分子和从 $\beta_2M$  上分离重链的方法在本领域中广为人知。然后可以对所分离的重链进行氨基酸测序、肽作图或其它类似的蛋白分析，以证实该序列上的磷酸化位点是否已发生突变。所述用于进行蛋白测定的方法为本领域技术人员所熟知。

可以用各种方法分析核酸，以检测核酸序列上的突变，如通过核酸测序、聚合酶链式反应或杂交。这些方法为本领域技术人员所熟知(例如，参见 Sambrook 等，同上，1989；Hames 和 Higgins，“核酸杂交：一种实用方法”(Nucleic Acid Hybridization: a practical approach)(IRL Press, New York, 1985)，两篇文献均被收作本文的参考)。

检测突变的重链与 $\beta_2M$  结合减弱的方法可用于诊断诸如血色素沉着证之类的铁储存病。在该方法中，可以从个体体内提取 I 型 MHC 分子的重链，并使其在适于这种非突变型链与 $\beta_2M$  结合的条件下与 $\beta_2M$  接触。平行进行一个对



照反应，其中含有与用于测试突变的重链相同或相似的 I 型重链的非突变型。在使所述重链与 $\beta_2M$  接触后，在合适条件下温育该反应，例如，包括足以控制重链与 $\beta_2M$  结合的合适缓冲液浓度和 pH，以及时间和温度。当与 $\beta_2M$  结合的该重量的级分显著少于与 $\beta_2M$  结合的对照重链的级分时，可以认为被

5 检验的来自患者的重链带有用于诊断铁储存病的突变。

例如，I 型重链与 $\beta_2M$  的结合可以用如下方法测定：将所述分子中的一种结合于一种载体上，将一种可检测的标记，如放射性核素或荧光标记结合于另一种分子上，并测定与所述载体结合的可检测标记的量，其中，所测出的标记量可以代表与 $\beta_2M$  结合的重链量。

10 以下实施例是用于说明本发明的，而不是限定本发明的范围。

### 实施例 1

#### $\beta$ - GAP 基因的克隆和表达

该实施例提供了一种鉴定和克隆源于各种动物的凝集素酶的方法，以阐明其在铁代谢病中的作用。

#### 15 小鼠 $\beta$ - GAP 基因的克隆

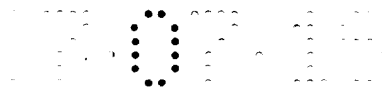
通过对获自 A/J 和 Balb/C 小肝脏的 DNA 进行 HaeIII 部分消化和将所得片段克隆到载体 Charon 4A 上构建基因组  $\alpha$  文库。用自 H - 2L<sup>d</sup> 基因中分离的 S15 探针筛选所述文库 (Margulies 等, “自然” (Nature), 295: 168 - 170 (1982), 该文献被收作本文的参考)。S15 是一个 3' I 型 MHC 小鼠探针,

20 由 522 个碱基对组成, 包括编码  $\alpha$  - 3 结构域的 36bp 的外显子 4 和 486bp 的内含子 (Evans 等, “美国国家科学院院刊” (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)), 79: 1994 - 1998 (1982))。探针是这样制备的: 从 M13RF 或 pUC18 上切除插入片段, 从二硫键交联的丙烯酰胺凝胶中纯化该片段 (Hansen, “分析生物化学” (Anal. Biochem.) 116: 146 - 151 (1981)), 并通过切口平移用 <sup>33</sup>P 标记

25 至比活度 > 10<sup>6</sup>cpm/ $\alpha$  g (Rigby 等, “分子生物学杂志” (J. Mol. Biol.) 113: 237 - 251 (1977))。用标准菌落杂交技术筛选文库 (具体参见 Sambrook 等, 同上, 1988)。

从所述文库中分离 17 个单一的  $\alpha$  克隆, 并进行限制酶消化作图。对这些克隆进行 BamHI 消化和凝胶电泳揭示, 来自 A/J 品系的 5 个克隆和来自

30 Balb/C 品系的 1 个克隆含有单一的 500bp BamHI 限制片段 (BB500)。用 BamHI 消化含有所述单一片段的 6 个克隆, 用凝胶纯化 BB500 片段, 并亚克隆到 M13



载体 Mpl8 和 mpl9 上(Yanisch - Perron 等, “基因” (Gene) 33: 103 - 119(1985)). 通过链终止法(Sanger 等, “美国国家科学院院刊” (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA))74: 5463 - 5467(1977)) 用  $^{35}\text{S}$  - ATP 对 DNA 进行测序. 在 6 % 尿素 - 聚丙烯酰胺梯度凝胶上分析反应物(Biggins 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)80: 3963 - 3965(1983)). 在一台 Vax - 11/785 计算机上用威斯康星大学计算机组项目对 DNA 序列进行组合和分析(Deverewx 等, “核酸研究” (Nucleic Acids Res.)12: 387 - 395(1984)).

DNA 序列对比证实, 所述 BB500 片段具有 93 % 以上的序列同源性. BB500 片段上的一个区域在  $\alpha$  克隆之间具有 100 % 的序列同源性, 它被称为  $\beta$  - GAP(球蛋白类似启动子), 因为它是一个与小鼠、兔或人  $\beta$  - 球蛋白启动子有 10 序列同源性的调节基序(见上文的具体比较). 所有 6 个片段(称作  $\beta$  - GAP1 - 6)之间具有高度的相似性,  $\beta$  - GAP4 的较小的例外是, 在 CCAAT 单元下游紧接着的一个 8bp 序列的 AAGAGGAG 已缺失. 所述序列之间还存在其它小的差别, 而且所分离到的  $\alpha$  克隆表现出有不同的限制图, 证实了各  $\alpha$  克隆含有 15 单一序列而不是克隆假象. 因此, A/J 品系的小鼠在其基因组内含有至少 5 个高度同源的  $\beta$  - GAP 序列.

#### 对所述小鼠的第 17 染色体上的 $\beta$ - GAP 序列作图

将 Southern 印迹用于测定所述 BB500 序列是否能鉴定位于所述小鼠的第 17 染色体上的基因. 通过 Southern 印迹用  $\beta$  - GAP6 BB500 探针评价来自几个中国仓鼠卵巢(CHO)小鼠体杂交细胞系的 DNA. 从所培养的细胞中提取 20 基因组 DNA, 用 EcoRI 消化, 在 0.8 % 的琼脂糖凝胶上电泳前转移到硝酸纤维素膜上. 在存在葡聚糖硫酸酯的情况下, 采用 Meinkof 和 Wahl 所披露的条件(“分析生物化学” (Anal. Biochem.)138: 267 - 284(1985))用 BB500 探针进行杂交, 最后在 60 °C 下在 0.2 × 氯化钠、柠檬酸钠缓冲液(pH7.0) (SSC) 25 中洗涤.

BB500 探针能与含有源于小鼠第 15 和第 17 染色体的 DNA 的 HM27 细胞系杂交, 并表现出与总基因组 BALB/cDNA 相同的带型. 缺乏 BALB/c 第 17 染色体的细胞系缺少可杂交的带, 表明该探针不能与 CHO DNA 进行非特异性结合. 通过 Southern 印迹用 BB500 探针检验了源于含有第 17 染色体以外的染 30 色体的其它 CHO 细胞系的 DNA, 并发现呈阴性(结果未显示). 上述结果表明所述  $\beta$  - GAP 序列均位于所述小鼠的第 17 染色体上.

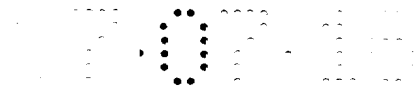
## 对鼠 O/TL 复合体作 $\beta$ - GAP 序列图

所述  $\beta$  - GAP 序列是小鼠基因组中分离的, 这提供几个对所述序列的位置进行精确作图的有力工具。首先, 对鼠 MHC 进行了充分鉴定, 尤其是对非典型的 I 型片段进行了充分鉴定; 其次, 可以对所存在的小鼠品系 MHC 上基因的位置进行精确定位。同类品系最初是通过同时饲养近交小鼠品系而形成的。在染色体交换的后代中产生了若干品系, 这些品系含有源自一个品系的 MHC 的一部分, 而该 MHC 的其余部分来自另一个品系。因此, 可以对品系间的限制片段长度多态性 (RFLP) 进行比较, 并确定所述带型是否与特定的 MHC 的基因座连锁 (参见 Klein, “主要组织相容性复合体的自然史” (Natural History of the Major Histocompatibility Complex), 50 - 73 (1986))。RFLP 分析是这样进行的: 从各种小鼠品系中获得纯化的基因组 DNA, 用 EcoRI 消化该 DNA 并用上述  $\beta$  - GAP6 BB500 探针进行 Southern 杂交。Southern 印迹显示, 该探针可以鉴定多达 10 个不同来自所检验的小鼠品系的 DNA 片段 (表 1)。其中 4 个片段, 30kb、20kb、16kb 和 10.5kb 的片段位于 MHC 基因座里。该 RFLP 分析证实, 至少有 4 ~ 6 个  $\beta$  - GAP 序列/基因组取决于检验的小鼠品系。另外, 对 RFLP 型的基传分析表明, 30kb 和 10.5kb  $\beta$  - GAP 带位于 Q1 和 Q4 之间的 Q 区, 而 20kb 和 16kb  $\beta$  - GAP 带位于所述 T 区。另外, 两个未表现出 RFLP 多态性的  $\beta$  - GAP 序列位于近典型的 I 型基因的端粒上。

## 20 将 $\beta$ - GAP 序列定位于恰好靠接非典型的 I 型基因处

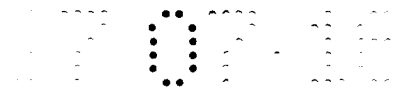
通过对从 C57BL/6 ( $H - 2^b$ ) 的  $\alpha$  文库中提取的 Q1 和 Q2 基因进行 DNA 序列分析发现, 位于 Q1 和 Q2 之间的 Q 区的两个  $\beta$  - GAP 基因序列直接与 Q1 和 Q2 连接。序列分析表明, Q1 和 Q2 基因均以头接头的方式与一个未知基因 (目前被定义为  $\beta$  - GAP 基因) 结合, 两个基因由一个单一的启动子/增强子区进行转录调节, 该区具有两个由一对 CAAT 和 TATA 框限定的启动子, 它们在 DNA 的相反链上相距大约 25bp。因此, 由于具有完整的启动子和一个共有的调节片段, 所述 I 型和  $\beta$  - GAP 基因将被从相反的链上转录, 其中 I 型基因 Q1 和 Q2 在上链从 5' 向 3' 转录, 而  $\beta$  - GAP 基因在下链上从 5' 向 3' 转录。

对来自 C57BL/6 的 Q1 和 Q2 基因, 以及来自 A/J ( $H - 2^k$ , Watts 等, “欧洲分子生物学学会会刊” (EMBO J.) 8: 1749 - 1759 (1980)) 的 TL 基因进行的序列分析表明,  $\beta$  - GAP 启动子和调节片段已取代了已知的参与了典型的



I 型基因的调节的常见典型的 I 型 5' 调节序列。β - GAP 启动子是一种有效的启动子，因为已知 Q2 基因能表达一种能在肠道中检测到的基因产物 (Wang 等, “免疫遗传学” (Immunogenet.), 38: 370 - 372 (1993))。上述结果表明, β - GAP 启动子能调节某些非典型的 I 型基因的表达。





以前, 已披露了从细菌到人类的范围的有机体的共同调节的头-头基因结构, 表明共同调节是一种被普遍采用的策略(Brickman 等, “分子生物学杂志”(J. Mol. Biol.)212: 669 - 682(1990); Xu 和 Doolittle, “美国国家科学院院刊”(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)), 87: 2097 - 2101(1990); Lennard 和 Fried, “分子细胞生物学”(Molec. Cell. Biol.)11: 1281 - 1294(1991); Heikkila 等, “生物化学”(J. Biol. Chem.), 268: 24677 - 24682(1993); Fererjian 和 Kafatos, “发育生物学”(Dev. Biol.)161: 37 - 47(1994); Sun 和 Kitchingman, “核酸研究”(Nucleic Acids Res.)22: 861 - 868(1994)). 在原核和真核系统中都已证实了两种基因产物之间的互  
10 作或与一种代谢途径的联系(Galvalas 等, “分子细胞生物学”(Mol. Cell. Biol.), 13: 4784 - 4792(1993); Lightfoot 等, “英国癌症杂志”(Br. J. Cancer), 69: 264 - 2673(1994)). 应当指出的是, 在迄今为止所研究过的  $\beta$  - GAP 克隆中, Q1 和 Q2 基因仍具有其自身的 CAAT 和 TATA 组件, 仅缺少所述常见典型的 I 型调节的增强子区域。

#### 15 不同种间 $\beta$ - GAP 序列的保守性

为了证实  $\beta$  - GAP 序列是保守的, 而且为证实包括人在内的各种物种含有多拷贝的该基因, 用 EcoRI 消化各物种基因组 DNAs 的“Zoo 印迹”, 并用鼠  $\beta$  - GAP6 BB500 探针进行 Southern 印迹分析。在严格性差的条件下该印迹显示, 来自人、大鼠、小鼠、狗兔和猴的 DNA 带可检测到多样性。这表  
20 明多拷贝的  $\beta$  - GAP 序列存在于包括人在内的多种物种里。另外, 所述  $\beta$  - GAP 多基因家族的保守性早于鼠和人类的物种形成, 因此, 它们不是一种新近的基因复制和重排的产物。种间序列同源性的证据是明显的, 因为通常外显子和调节片段是倾向于保守的。其它实验证实了  $\beta$  - GAP 在兔、小鼠、鸡和人之间的序列同源性。因此, 保留同源性的特殊区域的模式表明,  $\beta$  - GAP 序  
25 列是通过选择压力保留的。

#### $\beta$ - GAP 序列与 $\beta$ - 珠蛋白启动子之间的同源性

所有 6 个 500bp  $\beta$  - GAP 克隆里的序列显示与小鼠、兔和人  $\beta$  - 珠蛋白启动子调节因子之间具有明显的序列和位置同源性。已鉴定了在  $\beta$  - 珠蛋白启动子的一个 106bp 片段上的重要的调节因子(Myers 等, “科学”(Science)232: 613 - 618(1986); Stuve 和 Myers, “分子细胞生物学”(Mol. Cell Biol.), 6: 3350 - 3358(1990)). Myers 及其同事利用饱和诱  
30



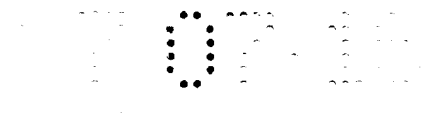
变和 5' 缺失启动子构建了一系列被用于鉴定 4 个调节序列的突变体。所述 4 个调节基序位于含有一个 CACC 因子(位置 - 95 至 - 87)的位置 - 95 至 - 26 之间, CCAAT 框和 TATA 框基序分别位于位置 - 79 至 - 72 和 - 30 至 - 26 之间, 而一个 11bp 的重复单元位于 CCAAT 框和 TATA 框之间(位置 - 53 至 - 32), 其含有两个不完全重复的重复单元( $\beta$ DRE)。通过缺失研究, 证实了  $\beta$ DRE 是表达珠蛋白基因所必需的这一事实。

将所述 6 个 500bp  $\beta$  - GAP 序列与来自各物种的  $\beta$  - 珠蛋白启动子序列进行比较; 证实了几个与  $\beta$  - 珠蛋白调节元件的明显序列同源性。对该区域的  $\beta$  - GAP 序列进行分析发现了 5 个存在于  $\alpha$  - 珠蛋白启动子上的调节基序。其中包括位于位置 - 127 至 - 123 之间的 5' CACCC 红细胞元件, 分别位于位置 - 109 至 - 105 和 - 30 至 - 26 之间的 CCAAT 框基序和 TATA 框基序, 位于位置 - 13 至 - 10 之间的共有帽序列, 和第五个涉及一个 10 和 11bp 序列(碱基对编号是根据用插入的间隙进行序列对比较来确定的, 并不代表从距转录起始位点的真实碱基对位置)的  $\beta$  - 珠蛋白  $\beta$ DRE 的更复杂的调节因子。

在所有  $\beta$  - GAP 克隆中, 4 个  $\beta$  DRE 调节基序的旁侧为位于位置 - 54 和 - 32 之间的 CCAAT 元件和 TATA 元件, 而另两个  $\beta$ DRE 就位于 TATA 框的上游(位置 - 11 至 + 1 和 + 3 至 + 12)。所有  $\beta$ DRE 的序列是保守的, 而且, 其中的两个在位置 - 54 与 - 32 之间是保守的。很明显, 在  $\beta$  - GAP 上保守的  $\beta$ DRE 在包括进化了 1 亿年以上的多种物种(小鼠、兔、鸡和人)的珠蛋白中是保守的。进化上保守性的发现表明,  $\beta$  - GAP 基因是一个古老的基因。

来自  $\beta$  - GAP 克隆的最终推断调节基序为 AGATAA(核苷酸 - 82 至 - 77), 它与转录结合因子 NF - E1 的 DNA 共有序列相同。这种 DNA 结合蛋白(NF - E1a、b 和 c)参与多种基因的红细胞和/或 T 细胞的特异性表达, 包括小鼠和鸡成体  $\beta$  - 珠蛋白, 血红素途径酶胆色素原(PGB)脱氨酶、T 细胞受体和白血病病毒 HTL VIII。

对  $\beta$  - GAP 和小鼠  $\beta$  - 珠蛋白启动子间的同源区域所作的仔细研究发现了以下特征: 1) 26 个 bp 里的 18 个吻合于包括共有 TATA 基序的位置 - 35 至 - 10(Bucher, “分子生物学杂志”(J.Mol.Biol.), 212 : 563 - 578(1990)); 2) 已证实包括  $\beta$  - GAP CCAAT 框、含有  $\beta$  - 珠蛋白调节因子 CACCC 的位置 - 113 至 - 109 一个区域为  $\beta$  - 珠蛋白在红细胞中的适当表达



所必需; 3)位于位置 - 109 至 - 105 之间的 CCAAT 元件能很好地配对; 4) 第四个配对片段包括一个  $\beta$  DRE 元件, 它位于在位置 - 64 至 - 45 之间的 CCAAT 框和 TATA 框之间(该区域的 19 个 bp 中有 16 个配对, 无间隙); 和 5) 一个由 Buch 定义的共有帽位点序列(Bucher, 同上, 1990)和一个被鉴定的 5 位于核苷酸 - 13 至 + 1 的推断转录起始位点。

在  $\beta$  - GAP 启动子上有几个显著的其它的推断调节序列。在位置 - 68 和 - 37 之间, TATA 元件远侧的前 5 个核苷酸是 4 个回文序列。该 5bp 重复 TCAGA 在 24bp 中出现了两次。这些重复的侧翼是和存在于一个类珠蛋白不完全同向重复元件里(位置 - 57 至 - 47)。两个较长的回文序列为 12bp 和 15bp 10 的不完全二重对称, 分别位于位置 - 67 至 - 56 和位置 - 51 至 - 37 之间, 其分别含有 7bp 的较小的内部回文序列 CCTCAGG(- 66 至 - 60)和 5bp 的重复序列 TCAGA(- 46 至 - 42)。含有两个大的 12 和 15bp 不完全回文序列、 $\beta$  - 珠蛋白不完全同向重复元件和两个 TCAGA 回文重复的  $\beta$  - GAP 的 33bp 类  $\beta$ DRE 区域有大约 50 % (16/33)的核苷酸序列同源于小鼠  $\beta$  - 珠蛋白启动子。

#### 15 紧邻着 $\beta$ - GAP 序列下游的基因在胃肠道中的表达

$\beta$  - 珠蛋白调节基序和  $\beta$  - GAP 启动子间保留同源性的特异区域的特征表明: 1)所述序列由共同的祖基因趋异进化而来; 和 2)  $\beta$  - GAP 序列上的保守区域在调节其相应基因的表达中起着重要作用。另外, 其与同铁代谢密切相关的基因启动子的同源性、红细胞特异性调节序列的存在和这些基因与导致人类血色素沉着症的基因座的非常接近表明,  $\beta$  - GAP 基因在铁代谢中起作用。 20

为了证实  $\beta$  - GAP 启动子调节下游的信息, 必须证实相关的基因编码可转录的信息。而且, 如果胃肠道是涉及血色素沉着症的发病, 所述信息应当是在涉及铁吸收的组织中表达, 即胃肠道。

25 用获自各种器官(包括胃肠道)的 polyA + RNA 进行 Northern 印迹分析。用来自  $\beta$  - GAP(Q2<sup>b</sup>)粘粒克隆的探针使印迹显影。按照生产商的说明通过 TRIzol™ 试剂法(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)制备细胞的总 RNA。通过寡脱氧胸苷酸(Oligo dT)纤维素层析(Stratagene, San Diego, CA)纯化 PolyA + 或 mRNA。在甲醛 - 琼脂糖凝胶上分析 RNA, 并按上述方法转移至 Zeta Bind 30 膜上(Evans 等, “美国国家科学院院刊”(Proc.Natl.Acad.Sci.)(USA)81: 5532 - 5536(1984))。含有被用作探针的  $\beta$  - GAP 序列的粘粒克隆获自一个

$\alpha$  文库。用 ApaI 和 KpnI 消化该克隆，以产生一个 10kb 的片段。用 BamHI 对该片段进行部分消化，得到一个包括  $\beta$  - GAP 序列的 2kb 片段和一个更下游的含有  $\beta$  - GAP 基因的编码序列的 8kb 片段。

Northern 印迹分析证实了产生于胃、十二指肠、空肠、肾组织里的 4 - 5kb 和 8kb 大小的多分散信息的存在。肾表现出较少的多分散性，仅有 8kb 带显著。以上结果表明， $\beta$  - GAP 启动子和上游  $\beta$  - GAP 编码序列是在胃肠道中表达，并与一个多基因家族相关，其中，空肠的 5kb 的信息最为突出。该探针也能识别肾组织和胃组织里的一条带，这一事实表明， $\beta$  - GAP 家族的有关成员可以在其它组织中起作用。

10 由 Northern 印迹法检测出的  $\beta$  - GAP mRNA 产物的大小和复杂度与  $\beta$  - GAP 基因编码的一类大的蛋白一致。这些特征更类似于粘蛋白蛋白家族分子，而不是铁转运家族分子。其与  $\beta$  - 珠蛋白的同源性、红细胞特异性调节序列的存在、以及典型的 I 型基因和  $\beta$  - GAP 基因与导致人类血色素沉着症（一种可遗传的铁代谢病）的位点的非常接近表明， $\beta$  - GAP 基因和非典型的 I 型基因与铁代谢起作用。掌握了以上知识和本文所公开的关于  $\beta_2M$  - 失效的小鼠具有异常高的肝癌发病率的事实后，会使人认识到这种小鼠具有类似于血色素沉着症的代谢和病理学状态。

#### 从小鼠空肠文库中提取鼠 $\beta$ - GAP cDNA

20 将一种  $\beta$  - GAP 粘粒探针用于筛选一个小鼠空肠 cDNA 文库 (Stratagen  $\alpha$  ZAP 表达盒)。用 Northern 印迹表明由  $\beta$  - GAP 探针识别的信息表所检查的组织中表达。分离产生正信号的克隆，并进行鉴定和纯化。用 EcoRI 消化从所选择的克隆中纯化的 DNA，并进行 Southern 印迹分析。用 800bp  $\beta$  - GAP 探针检测所述印迹，以证实其含有  $\beta$  - GAP 基因。

#### 人类 $\beta$ - GAP 基因的克隆

25 按照上述在 sCOS 中产生小鼠基因组文库的方法制备产生于 sCOS 粘粒载体里的人类基因组 DNA 文库 (Stratagene, San Diego CA)。通过用一个 I 型 MHC 探针筛选克隆，从人类 sCOS 粘粒文库中分离人类  $\beta$  - GAP 基因。该探针由 HLA - A2 基因的外显子 4 和 5 产生，这些基因编码高度保守的  $\beta_2M$  结合域和跨膜区。对选择到的含有 I 型序列的克隆进行检测，纯化得自这些克隆的  
30 粘粒，用限制酶 EcoRI 酶切，在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳并吸印到带电尼龙膜上。使印迹与所述 I 型探针杂交，剥离，并再与 800bp  $\beta$  - GAP 探针杂交。

## 实施例 II

### $\beta_2$ M 失效小鼠发生类似于血色素沉着症的铁过量

该例提供了一种分析动物模型里铁缺乏的方法，该模型中一种由 MHC 编码的凝集素酶功能从遗传上缺失了。另外，该小鼠可用于评价糖配体在治疗血色素沉着症和诸如动脉粥样硬化、关节炎和癌症的多种与铁有关的疾病时的体内用途。

有关  $\beta_2$ M 失效小鼠铁过量的资料记载于 Rothenberg 和 Voland 的文章中 (1994)。对来自标准食物饲养的 12 - 18 月龄失效小鼠的组织所做的组织学检查发现了肝坏死的证据。对所述组织进行铁染色显示，铁沉着于所有动物的肝脏和大约 10 % 动物的肾或肺中。所述标准食物中含有 350mg/kg 碳酸铁。当所述动物被放置在除碳酸铁外还含有 10mg/kg 硫酸铁的“饲养食物 (breeder diet)”上时，铁的储存急剧上升。上述体物体内铁的沉着也与年龄有关，最高的铁含量发现于最老的动物体内。综合以上资料表明， $\beta_2$ M 失效小鼠所发生的铁过量与食物和年龄相关。另外，我们还发现所述动物会发生肝癌，而其他曾报道过较老的动物会发生糖尿病 (Faustman 等，“科学” (Science), 254: 1756 - 1761 (1991))。这类病理学能反映人类的血色素沉着症。

尽管已结合上述实施例对本发明作了说明，应该明白的是，在不脱离本发明实质的前提下可以作出多种改进。因此，本发明的范围仅由权利要求书限定。

25

30