

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/78



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808173.0

A61K 38/16 A61K 39/395

C12N 15/09 C12N 15/29

C12N 15/62 C12N 15/63

C12N 15/64

[43] 公开日 2004 年 7 月 14 日

[11] 公开号 CN 1512888A

[22] 申请日 2002.2.12 [21] 申请号 02808173.0

[30] 优先权

[32] 2001. 2.12 [33] US [31] 60/268,402

[86] 国际申请 PCT/US2002/004195 2002.2.12

[87] 国际公布 WO2002/069886 英 2002.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2003.10.13

[71] 申请人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

[72] 发明人 M·G·罗森布拉姆 L·陈

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 周承泽

权利要求书 5 页 说明书 108 页 序列表 8 页
附图 11 页

[54] 发明名称 修饰蛋白、人工毒素及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及在保持蛋白化合物生物学活性的同时降低其抗原性的方法，本发明还涉及具有较低抗原性同时又具有生物学活性的蛋白组合物。这些方法及组合物有益于需要这种化合物和组合物的个体。本发明还涉及经剪切的和/或具有较低抗原性的修饰毒素化合物。这种人工毒素具有治疗、诊断和预防作用，特别是可以作为免疫毒素。本发明还提供了利用这些免疫毒素治疗肿瘤的方法。

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

- 1.一种除 SEQ ID NO:1 毒素之外的重组 gelonin 毒素,该毒素含有核心毒素区,该核心毒素区被定义为 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 110—210。
- 2.如权利要求 1 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区外,该重组毒素含有至少 10 个 SEQ ID NO:1 的连续氨基酸残基。
- 3.如权利要求 2 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区外,该重组毒素含有至少 20 个 SEQ ID NO:1 的连续氨基酸残基。
- 4.如权利要求 3 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区外,该重组毒素含有至少 30 个 SEQ ID NO:1 的连续氨基酸残基。
- 5.如权利要求 4 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区外,该重组毒素含有至少 50 个 SEQ ID NO:1 的连续氨基酸残基。。
- 6.如权利要求 1 所述的重组 gelonin 毒素,其中,除核心毒素区的氨基酸外,至少有 10 个 SEQ ID NO:1 的氨基酸缺失。
- 7.如权利要求 1 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区的氨基酸外,至少有 20 个 SEQ ID NO:1 的氨基酸缺失。
- 8.如权利要求 1 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区的氨基酸外,至少有 30 个 SEQ ID NO:1 的氨基酸缺失。
- 9.如权利要求 1 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区的氨基酸外,至少有 5 个 SEQ ID NO:1 的氨基酸被替代。
- 10.如权利要求 9 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区的氨基酸外,至少有 10 个 SEQ ID NO:1 的氨基酸被替代。
- 11.如权利要求 10 所述的重组 gelonin 毒素,除核心毒素区的氨基酸外,至少有 20 个 SEQ ID NO:1 的氨基酸被替代。
- 12.一种蛋白化合物,其特征在于,所述化合物由权利要求 1 所述的重组 gelonin 毒素和第二多肽组成。
- 13.如权利要求 12 所述的蛋白化合物,其中,第二多肽连接到重组 gelonin 毒素上。
- 14.如权利要求 13 所述的蛋白化合物,其中,第二多肽通过一个接头连接到重组 gelonin 毒素上。
- 15.如权利要求 12 所述的蛋白化合物,其中,第二多肽和重组 gelonin 毒素形成融合蛋白。

- 16.如权利要求 12 所述的蛋白化合物, 其中, 第二多肽是抗体。
- 17.如权利要求 16 所述的蛋白化合物, 其中, 抗体含有一个抗原结合区。
- 18.如权利要求 16 所述的蛋白化合物, 其中, 抗体是直接针对肿瘤抗原的。
- 19.如权利要求 12 所述的蛋白化合物, 其中, 第二多肽具有酶活性。
- 20.一种用以下过程制备的经过修饰的酶:
 - a)用抗体确定酶上的一个或多个抗原区;
 - b)从酶上去除一个或多个抗原区以形成经过修饰的酶; 以及
 - c)确定经过修饰的酶具有酶活性。
- 21.如权利要求 20 所述的经过修饰的酶, 其中, 确定方法包括分析经过修饰的酶的酶活性。
- 22.如权利要求 20 所述的经过修饰的酶, 它还包括用抗原性小于一个或多个被取代区域的氨基酸区域取代一个或多个抗原区域。
- 23.如权利要求 22 所述的经过修饰的酶, 其中, 一个或多个较低抗原性区域通过在蛋白质数据库中搜索同源区来确定。
- 24.如权利要求 23 所述的经过修饰的酶, 其中, 数据库是人蛋白质数据库。
- 25.如权利要求 20 所述的经过修饰的酶, 其中, 抗原区对人具有抗原性。
- 26.如权利要求 20 所述的经过修饰的酶, 其中, 抗体是多克隆抗体。
- 27.如权利要求 26 所述的经过修饰的酶, 其中, 多克隆抗体来源于人。
- 28.如权利要求 20 所述的经过修饰的酶, 其中, 酶是植物毒素。
- 29.如权利要求 28 所述的经过修饰的酶, 其中, 植物毒素是 gelonin。
- 30.如权利要求 20 所述的经过修饰的酶, 它还含有附着在经过修饰的酶上第二多肽。
- 31.如权利要求 30 所述的经过修饰的酶, 其中, 第二多肽连接到经过修饰的酶上。
- 32.如权利要求 30 所述的经过修饰的酶, 其中, 第二多肽与经过修饰的酶形成融合蛋白。
- 33.如权利要求 30 所述的经过修饰的酶, 其中, 第二多肽是抗体。
- 34.如权利要求 30 所述的经过修饰的酶, 其中, 第二多肽是毒素。
- 35.如权利要求 30 所述的经过修饰的酶, 其中, 第二多肽是第二种酶。
- 36.如权利要求 30 所述的经过修饰的酶, 其中, 第二多肽可以促进调亡。
- 37.一种制备具有减弱的抗原性的修饰蛋白的方法, 所述方法包括:
 - a)选择一个想要施用于第一受试者的蛋白质;

b)利用来自于第一受试者或与第一受试者同种的第二受试者的抗血清确定第一受试者中抗原性的蛋白质区域;

c)制备确定区缺失的修饰蛋白; 以及

d)确定修饰蛋白具有减弱的抗原性。

38.如权利要求 37 所述的方法, 所述方法还包括:

d)搜索人蛋白质数据库以确定低抗原性区域与蛋白质抗原区域的同源性;

e)用所确定的低抗原性区域的全部或部分替代抗原区以形成修饰蛋白。

39.如权利要求 38 所述的方法, 其中, 替代步骤是利用编码修饰蛋白的核酸分子通过重组技术完成的。

40.如权利要求 37 所述的方法, 其中, 修饰蛋白是通过去除确定区域来制备的。

41.如权利要求 37 所述的方法, 其中, 缺失区域至少含有 5 个氨基酸残基。

42.如权利要求 41 所述的方法, 其中, 缺失区域至少含有 10 个氨基酸残基。

43.如权利要求 42 所述的方法, 其中, 缺失区域至少含有 15 个氨基酸残基。

44.如权利要求 43 所述的方法, 其中, 缺失区域至少含有 20 个氨基酸残基。

45.如权利要求 44 所述的方法, 其中, 缺失区域至少含有 25 个氨基酸残基。

46.如权利要求 40 所述的方法, 其中, 缺失的抗原区被与被去除的氨基酸残基数目相同的氨基酸替代。

47.如权利要求 37 所述的方法, 其中, 所述区域用 ELISA 方法确定。

48.如权利要求 37 所述的方法, 其中, 受试者是哺乳动物。

49.如权利要求 48 所述的方法, 其中, 哺乳动物是人。

50.一种人源化的重组 gelonin 毒素, 该毒素中至少有 3 个来自于一个或多个抗原区 1, 2, 3 或 4 的氨基酸被在人体内抗原性低于被替代的氨基酸的氨基酸替代。

51.如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素, 其中, 至少有 3 个来自于抗原区 1 的氨基酸被替代。

52.如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素, 其中, 至少有 3 个来自于抗原区 2 的氨基酸被替代。

53.如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素, 其中, 至少有 3 个来自于抗原区 3 的氨基酸被替代。

54.如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素, 其中, 至少有 3 个来自于抗原区 4 的氨基酸被替代。

55.如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素, 其中, 至少有 3 个来自于至少 2 个抗原区的氨基酸被替代。

56.如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素，其中，至少有 3 个来自于抗原区 1-4 中一个或多个的氨基酸被替代。

57.一种用以下过程制备的重组 gelonin 毒素：

a)在 gelonin 毒素中确定至少一个在哺乳动物中具有抗原性的区域；以及

b)用在哺乳动物中抗原性较低的区域替代至少一部分抗原区。

58.如权利要求 57 所述的重组 gelonin 毒素，其中，步骤 a)中确定的抗原区是重组 gelonin 毒素。

59.如权利要求 57 所述的重组 gelonin 毒素，其中，所述过程还包括将确定的抗原区与哺乳动物氨基酸序列比较，从而找到在哺乳动物中具有低抗原性的区域。

60.如权利要求 57 所述的重组 gelonin 毒素，其中，所述过程还包括在哺乳动物中确定低抗原性的区域。

61.如权利要求 60 所述的方法，其中，哺乳动物是人。

62.一种杀伤肿瘤细胞的方法，所述方法包括给细胞提供有效量的免疫毒素，所述免疫毒素含有 gelonin 的核心毒素区和能特异性靶向肿瘤细胞的单链抗体。

63.如权利要求 62 所述的方法，其中，免疫毒素包括 SEQ ID NO:1。

64.如权利要求 62 所述的方法，其中，抗体是靶向肿瘤抗原的。

65.如权利要求 62 所述的方法，其中，抗体是鼠抗体。

66.如权利要求 62 所述的方法，其中，肿瘤细胞是黑色素瘤细胞。

67.如权利要求 66 所述的方法，其中，抗体包括 9.2.27 或 ZME-018。

68.如权利要求 66 所述的方法，其中，免疫毒素是 scfvMEL-2018 或 scfvMEL-2025。

69.如权利要求 62 所述的方法，其中，肿瘤细胞存在于病人体内。

70.如权利要求 69 所述的方法，其中，免疫毒素包含在药学上可接受的组合物中。

71.如权利要求 62 所述的方法，其中，免疫毒素是通过将能够表达免疫毒素的表达构建物施用于癌症细胞而提供的。

72.如权利要求 71 所述的方法，其中，表达构建物是病毒载体。

73.如权利要求 72 所述的方法，其中，病毒载体是腺病毒载体、腺相关病毒载体、肝炎病毒、疱疹病毒、慢性病毒、逆转录病毒或牛痘病毒。

74.一种治疗病人肿瘤的方法，所述方法包括给病人施用有效量的组合物，所述组合物含有携带 gelonin 核心毒素区的免疫毒素和特异性靶向肿瘤细胞的单链抗体。

75.如权利要求 74 所述的方法,其中,所述肿瘤为前列腺癌,肺癌,脑癌,皮肤癌,肝癌,乳腺癌,淋巴瘤,胃癌,肠癌,卵巢癌,胰腺癌,骨癌,骨髓肿瘤,头颈肿瘤,宫颈癌,食管癌,眼癌,胆囊癌,肾癌,肾上腺癌,心脏肿瘤,结肠癌,或血液肿瘤。

76.如权利要求 74 所述的方法,其中,免疫毒素包括 SEQ ID NO:1。

77.如权利要求 74 所述的方法,其中,抗体靶向黑色素瘤细胞。

78.如权利要求 77 所述的方法,其中,免疫毒素是 scfvMEL-2018 或 scfvMEL-2025。

79.一种治疗病人肿瘤的方法,所述方法包括给病人施用有效量的组合物,所述组合物含有如权利要求 50 所述的人源化重组 gelonin 毒素。

80.如权利要求 79 所述的方法,其中,组合物还含有抗体。

81.如权利要求 80 所述的方法,其中,抗体是人源化的。

82.如权利要求 80 所述的方法,其中,抗体是单链抗体。

83.如权利要求 80 所述的方法,其中,抗体与肿瘤细胞上的抗原结合。

84.如权利要求 83 所述的方法,其中,肿瘤细胞是骨癌细胞,脑癌细胞,乳腺癌细胞,宫颈癌细胞,结肠癌细胞,胶质瘤细胞,牙龈癌细胞,头颈肿瘤细胞,肾癌细胞,淋巴瘤细胞,肝癌细胞,肺癌细胞,黑色素瘤细胞,卵巢癌细胞,前列腺癌细胞,胃癌细胞或舌癌细胞。

85.如权利要求 84 所述的方法,其中,肿瘤细胞是黑色素瘤细胞。

86.如权利要求 82 所述的方法,其中,单链抗体是 9.2.27 或 ZME-018。

87.如权利要求 79 所述的方法,它还包括对病人进行化疗、放疗、基因治疗或第二免疫治疗。

88.如权利要求 79 所述的方法,它还包括从病人体内切除癌前病变组织或癌组织或肿瘤。

修饰蛋白、人工毒素及其制备方法

发明领域

本发明涉及分子生物学和毒理学领域，更具体地说，本发明涉及修饰蛋白的制备方法，该蛋白是较短的和/或较低抗原性的多肽，以及含有上述多肽的组合物。本文描述了植物毒素 gelonin 的较短和低抗原性版本。这种修饰蛋白具有治疗和诊断价值，如可以作为免疫毒素。

相关领域说明

肽、多肽和蛋白有许多预防、诊断和治疗价值。但是一个缺点是这些蛋白化合物会在那些希望利用其价值的个体体内激发对这些化合物的免疫反应。对这些化合物的免疫反应会降低或完全消除其达到的效果。因此，大家都希望降低化合物的抗原性或免疫原性，因为这些化合物的效应会因其在宿受试者内激发免疫反应而降低。

为了获得预防、诊断和治疗价值，许多研究和开发的焦点集中到一类特别的蛋白质—单克隆抗体上。在过去二十年中能识别各种细胞表面抗原的高特异性免疫毒素已得到开发和研究。免疫毒素有一个具有吸引力的特征就是，只要有少数几个分子成功到达正确的细胞室内就可以产生细胞毒效应。含有各种毒素如皂甙、响尾蛇毒素、蓖麻毒蛋白 A 链 (RTA)、假单胞菌外毒素 (PE)、diphtheria 毒素 (DT) 和 gelonin 的免疫毒素也已构建出来。

与免疫毒素体内应用有关的问题一般包括：血管损伤导致的毛细血管渗漏综合征，由于网状内皮系统识别毒素部分而产生的错误靶向，靶抗原表达异质性以及由于抗毒素抗体产生而导致的约 14 天的狭窄治疗窗。尽管有明显的抗肿瘤效应，但是抗毒素抗体和抗结合物抗体的产生也阻碍了病人反复使用免疫毒素进行治疗。延长病人使用免疫毒素的时间也会引起许多问题。含有 RTA 和 PE 的免疫结合物已被发现在病人体内具有很强的免疫原性。另外，免疫毒素构建物 (大约 30KDa) 内蛋白的大小也被怀疑能阻止免疫结合物向实体肿瘤内有效渗透。在大多数情况下，对 I 型蛋白如 RTA 进行结构修饰是不成功的 (Munishkin 等, 1995)。但是已经制备出来许多几个氨基酸被修饰的 RTA 突变体。1995 年 Wool 等人描述了 45 个单个氨基酸缺失的 RTA。尽管没有检测这些缺失突变体与天然 RTA 的相对生物学活性，其中只有那些 8 个单个氨基酸缺失的突变体具有生物学活性。然而有趣的是，研究 RTA 的价值有限，因为 RTA 与其他毒素如 gelonin 只有 30% 的同源序列。

基于单克隆抗体(Mab)的治疗通常特定应用于人类肿瘤的诊断和治疗。但是,这些药物用在临床上所取得的疗效是很有限的,因为这些治疗方法本身就有一些缺点,如抗原表达的异质性,由于抗体分子较大而很难渗透入实体肿瘤内,以及抗体所具有的抗原性(Roselli 等, 1993; Berkower, 1996; Pullybland 等, 1997; Panchagnula 等, 1997; Panchal, 1998)。为了解决这些问题,许多分子方法被应用到将常规抗体结构改装成鼠:人嵌合体、完全人源抗体或从新塑造抗体的框架使其含有亲本结构的小而简单(单链)形式的抗原结合区(Bird 等, 1988; Kipriyanov 等, 1994; Owens 等, 1994; McCartney 等, 1995; Worn 等, 1998)。单链抗体(scFv, sfv)保留了其亲本免疫球蛋白的结合特性,含有抗体 V_L 和 V_H 区,二者由一个人工设计的易弯曲的肽链相连(Wels 等, 1992; Kurucz 等, 1993)。而且,与当前应用在临床和诊断中的传统抗体及其 Fab 片断相比,scFvs 可能更优越,因为分子较小可以使其更好地渗透到肿瘤组织中,改善其药代动力学特性,并且与静脉注射的鼠抗体相比具有较低的抗原性。

在黑色素瘤细胞上的表达量要比正常组织高许多的为数不多的几个靶抗原中,有一个抗原的表面区为高分子量的糖蛋白(gp240),见于大多数黑色素瘤细胞系和新鲜肿瘤标本中(Kantor 等, 1982)。两个识别这一抗原上不同表位的鼠抗原(定名为 9.2.27 和 ZME-018)已被分离和描述(Morgan 等, 1981; Wilson 等, 1981)。鼠单克隆抗体 ZME-018 具有高度的黑色素瘤特异性,与各种正常组织很少发生反应,因而使其成为进一步研究中颇有前景的候选者。通过检测这个抗体靶向到黑色素瘤部位的能力发现该抗体能够选择性地浓集在转移瘤中(Macey 等, 1988; Koizumi 等, 1988)。

要成功开发肿瘤靶向性药物部分依赖于治疗药物的位点特异性投送,也依赖于所投送药物的生物学活性。单克隆抗体已被用于赋予那些无选择性的细胞毒药物如毒素、放射性核酸和生长因子以选择性(Williams 等, 1990; Rowlinson-Busza 等, 1992; Wahl, 1994)。其中一个分子就是 gelonin,它是一种 29-Kda 核糖体灭活植物毒素,具有与蓖麻毒蛋白 A 链(RTA)相同的活性和作用机制,但是其稳定性更高,毒性更低(Stirpe 等, 1992; Rosenblum 等, 1995)。我们实验室以前的研究已经鉴定和检测了植物毒素 gelonin 和各种抗体之间多种化学结合物的生物学特性(Boyle 等, 1995; Xu 等, 1996; Rosenblum 等, 1999)。在以前的研究中,抗体 ZME-018 通过化学方法偶联到纯化的 gelonin 上,试验证实这个免疫结合物对组织培养物和人肿瘤异种移植模型中的抗原阳性黑色素瘤细胞具有特异的细胞毒性(Rosenblum 等, 1991; Mujoo 等, 1995)。但是与普通的免疫毒素一样,这个免疫结合物在病

人体内也会产生抗原性的问题。

鉴于免疫毒素具有副作用并且在解决这些问题上取得的进展有限，因此有必要开发出低抗原性的蛋白、多肽和肽用于治疗、预防以及诊断疾病和病情。有一种关于非抗体多肽如毒素的思路是替换毒素分子上具有抗原性的序列。这一思路已被成功地用于以人免疫球蛋白框架区替代鼠免疫球蛋白框架区从而得到了一个人/鼠嵌合分子，但是这一思路在用到其他分子特别是植物来源的毒素和酶上时还没有成功过，利用本文所描述的方法也没有成功实现这一思路。

发明概述

本发明涉及构建和制备蛋白化合物的方法，该蛋白化合物是经过修饰而形成的修饰蛋白，具有许多未修饰或天然蛋白所没有的优点。本发明还涉及用这些方法所制备的组合物。

在本发明的一些实施方式中，重组 gelonin 毒素是经过改变天然 gelonin 毒素序列而得到的。与天然 gelonin 蛋白序列相比，重组 gelonin 毒素具有替代或去除的氨基酸，该毒素在美国专利 5,631,348 号中已有描述，本文已纳入作为参考，其 GenBank 序列号为 L12243。本发明的重组 gelonin 毒素不含有 SEQ ID NO:1 的所有氨基酸，但是在一些实施方式中含有核心毒素区，即 SEQ ID NO:1 的 110—210 氨基酸残基。本发明的其他化合物包括含有 SEQ ID NO:1 的核心区及其相邻的 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 或更多个连续氨基酸残基的重组 gelonin 毒素。需要说明的是，本发明的化合物也包括那些含有 SEQ ID NO:1 的连续氨基酸残基的多个区的化合物。例如，一个化合物可以含有 SEQ ID NO:1 的核心区和核心区前的 10 个连续氨基酸残基以及核心区后的 20 个连续氨基酸残基。

本发明的重组 gelonin 毒素也包括将天然序列截短的 gelonin 毒素，这种毒素至少缺少 SEQ ID NO:1 的 5, 10, 20, 30, 40, 50 或更多个氨基酸残基。在本发明的一些实施方式中，毒素含有核心毒素区，但是却不含有核心区之外的任何氨基酸。除了删除之外，本发明的重组 gelonin 毒素还可以含有替代去除氨基酸的氨基酸残基。例如，gelonin 蛋白序列上的第 7 位甘氨酸残基可以被非甘氨酸残基或修饰的氨基酸所替代。如果第 7 位的甘氨酸残基仅仅是被去除，则 SEQ ID NO:1 上第 8 位的丙氨酸就变成了第 7 位，但是不能认为是替代，因为氨基酸的位置仅仅是移动了一个位置。需要说明的是至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 或更多个氨基酸可以被替代。

在本发明的另外一个实施方式中，重组 gelonin 毒素可以连接第二个多肽。在

一些例子中, 这第二多肽的作用在于引导 gelonin 毒素到达特定类型的细胞(包括具有特定基因型或表型的细胞, 如肿瘤细胞或被病原体感染的细胞)、肌体的某一部位或其他特定位置。因此, 本发明的蛋白化合物包括含有重组 gelonin 毒素如修饰 gelonin 毒素和第二多肽的化合物。在一些实施方式中, 两个多肽连接在一起, 而在另外一些实施方式中, 多肽是通过基因工程方法重组在一起形成融合蛋白。融合化合物可以通过一个接头彼此相连。需要说明的是本发明的修饰蛋白也可以包括附加的多肽组合物, 其中的全部或部分多肽彼此共价相连。

本发明涉及多聚多肽组合物, 其中不止一个多肽实体以单一化合物形式存在。因此, 修饰蛋白可以连接第二、第三、第四、第五、第六或多个多肽。另外, 两个或多个修饰蛋白也可以单一蛋白化合物形式存在。在本发明的一些实施方式中, 第二多肽是抗体, 如具有抗原结合区的抗体。需要说明的是, 抗体可以直接与肿瘤抗原、癌基因产物、细胞受体或使多聚多肽组合物局域化的任何其他化合物结合。如本文所描述的, 第二多肽可以是酶、细胞因子、细胞毒分子、生长因子、配基或受体, 或者能调节细胞生长的任何分子。

本发明的其他组合物包括通过下述过程制备的经修饰的酶: a) 利用抗体确定酶上的一个或多个抗原区; b) 从酶上去除一个或多个抗原区以形成经过修饰的酶; 以及 c) 确定经修饰的酶是否具有酶的活性。酶是能催化细胞内特定化学反应的生物学实体; 可以是蛋白或核酸分子。然而需要说明的是, 与酶有关的任何方法一般都适用于多肽。多肽上的抗原区是能被抗体或特定有机体的 T 细胞受体识别的区域。很容易理解, 这个区域对一个物种来说具有抗原性而对另一个物种可能就不具有抗原性, 因而化合物的抗原性是一种与特定有机体相关的特征。需要说明的是, 除了去除抗原区的部分氨基酸外, 多个抗原区的氨基酸也可以从本发明的酶上同时去除。从多肽上去除氨基酸的抗原区可以包括下列抗原区的全部或部分: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1, 3, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 或更多。在一些例子中, 去除的抗原区可以被低抗原性序列所替代。当然, 很容易理解抗原区两侧的氨基酸也可以被去除, 例如为了方便的目的。这样, 抗原区一侧或两侧的 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 或更多个氨基酸可以被去除或替代。

在一些实施方式中, 抗体用于鉴定抗原区。需要说明的是抗体可以是多克隆抗体。抗体的有机体来源是同种的其他有机体, 这样修饰蛋白可能具有较弱的抗原性。因此, 如果要想使酶或蛋白在人体内的抗原性较弱, 在某些实施方式中就要用人的抗体去鉴定抗原区或确定修饰蛋白的抗原性是否比未修饰蛋白(天然的或重组全长

蛋白)弱。在优选实施方式中,通过比较经过修饰的酶或蛋白与未经修饰的酶或蛋白的抗原性来评价经过修饰的酶或蛋白的抗原性是否减弱或降低;可以通过以下步骤完成:i)在给予有机体修饰蛋白前取样本并用该样本去比较修饰蛋白和该蛋白的未修饰版本的抗原性;或ii)在给予有机体修饰蛋白后取样本并用该样本去比较修饰蛋白和该蛋白的未修饰版本的抗原性。样本可以是含有抗体或免疫细胞的任何组合物,包括体液如血液(血清)。然后用免疫检测方法如 ELISA 检测样本。需要说明的是,有机体可以是没有接触过未修饰蛋白的,尽管提供样本的有机体以前接触过未修饰蛋白更合适。在一些实施方式中,比较合适的是样本取自单克隆抗体杂交瘤的培养基。

在本发明的另外一些方面,可以通过分析修饰化合物的活性如酶活性来确定修饰蛋白或酶是否具有活性。

根据本发明的方法,任何酶都可以修饰。这些酶可以是水解酶(如脱胺酶、酯酶、糖苷酶、脂肪酶、核酸酶、肽酶、磷酸酶、磷酸二酯酶和蛋白酶);异构酶(差向异构酶、变位酶和消旋酶);连接酶或合成酶(乙酰辅酶 A 合成酶、氨基乙酰 tRNA 合成酶和羧化酶);裂解酶(如醛缩酶、脱羧酶、脱水酶和核酸环化酶);氧化还原酶(如脱氢酶、二氧合酶、氢化酶、单加氧酶、氮还原酶、叶绿醇和还原酶);以及转移酶(乙酰转移酶、氨基转移酶、糖苷转移酶、激酶、甲基转移酶、核苷转移酶、磷酸化酶和磺基转移酶)。在一些特定实施方式中,酶被归为毒素类,这就意味着它对细胞、组织或有机体是有毒性效应的。特别要注意的是,植物产生的毒素如 gelonin 也是本发明的一部分。如上面所讨论的经过修饰的酶,和本发明的修饰 gelonin 多肽一样可以连接到另外的多肽上。很容易理解的是,与修饰 gelonin 有关的任何一个实施方式都适用于经过修饰的酶,反之亦然。

本发明还涉及制备具有减弱的抗原性的修饰蛋白的方法,特别是在某些与有机体有关的例子中。在某些实施方式中,该方法包括:a)选择一个准备给予第一有机体的蛋白;b)利用第一有机体或与第一有机体同类的第二有机体的抗血清确定蛋白上的抗原区;c)制备所确定的抗原区缺失的修饰蛋白;以及 d)确定修饰蛋白的抗原性是否减弱。正如上述所讨论的,最后一步可以用样本如血清来完成,这种样本来自于先前曾接触过修饰蛋白未修饰版本的个体或来自于对修饰蛋白的免疫反应减弱的个体。

需要进一步注意的是制备修饰蛋白的方法包括筛选人类蛋白质数据库的步骤,以便找到与蛋白的抗原区同源的低抗原性区域,然后用所确定的全部或部分低抗原性区域代替抗原区从而形成修饰蛋白。检索大型人类蛋白质数据库不是必须的但是

是所期望的。这样, 如果通过独立检索人源蛋白质数据库发现某个特定人源蛋白具有与抗原区同源的或一致的序列, 那么这个方法就包括在本发明的范围之内。例如, 有人可能发现人源蛋白的序列与鼠源酶具有同源性并且该序列的抗原性较弱; 那么本发明就涉及到用人源蛋白上的氨基酸残基替代鼠源蛋白上的区域。本发明的方法和组合物包括替代、删除和/或修饰多肽上的氨基酸残基。替代的残基应使剩余氨基酸的顺序和数目与替代前的多肽一致。可以用保守的或非保守的残基来替代。删除一个残基不应改变剩余氨基酸的顺序, 但却使多肽的氨基酸数目减少一个。修饰的残基是经过化学改变的; 这种改变也不应改变多肽上剩余氨基酸的顺序和数目。

在一些实施方式中, 方法包括应用重组核酸技术达到修饰蛋白或酶的目的。这样, 想要修饰的酶的 cDNA 需要改造从而以编码低抗原性区的核苷酸序列替代编码抗原区的核苷酸序列。另外, 也可以通过删除确定的抗原区的方法获得修饰蛋白。被删除的区域被认为是缺失区。缺失区可能含有至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 或更多个氨基酸残基。而且修饰蛋白可以有不止一个抗原区被删除或替代, 该区两侧的氨基酸也可以被删除或替代。需要说明的是缺失抗原区可以用同样数目的氨基酸残基替代。

在本发明的方法中, 可以用 ELISA 方法确定抗原区或评价修饰蛋白。有机体可以是哺乳动物, 如人。

本发明的其他一些组合物包括人源化的重组 gelonin 毒素, 该毒素至少有 3 个来源于 1 个和多个抗原决定簇 1, 2, 3 或 4 的氨基酸被低抗原性的氨基酸所替代, 所说的低抗原性是指与含有替代氨基酸的重组 gelonin 毒素相比在人体内的抗原性较弱。gelonin 毒素的抗原决定簇在其他地方已有描述。需要说明的是至少有 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 或更多个来源于抗原决定簇 1, 2, 3 或 4 的氨基酸被替代、删除或修饰。至少 2、3 或 4 个抗原决定簇的氨基酸可以被改造。

本发明的一些附加实施方式提供了一种重组 gelonin 毒素, 该毒素的制备过程如下: a) 在 gelonin 毒素上确定至少一个在哺乳动物体内有抗原性的区域; 和 b) 以在该哺乳动物体内具有较低抗原性的区至少代替抗原区的一部分。需要说明的是, gelonin 毒素是重组的, 也就是说编码于经过体外改造的核苷酸序列。该过程也可以包括比较确定的抗原区与哺乳动物氨基酸序列, 从而确定一个在哺乳动物体内具有较低抗原性的区。在一些实施方式中, 哺乳动物指的是人。如上面所提及的, 此处所描述的任何方法和植物都可以适用于本文描述的其他方法和组合物。

本发明也涉及利用本发明的组合物进行治疗的方法。这些方法可用于治疗任何以杀伤或清除某种细胞或有机体为治疗方式的疾病,本发明的毒素可以对这些细胞或有机体产生毒性效应。需要说明的是,与一种组合物或方法有关的实施方式也可用于本发明的其他任何组合物或方法。

在一些实施方式中,提供了一种杀伤癌细胞或肿瘤细胞的方法,该方法是通过给予细胞以有效剂量的免疫毒素,其中包括 gelonin 毒素的全部或部分序列,如毒素的核心区,以及抗体的全部或部分序列,抗体的作用在于引导免疫毒素靶向到达某种特定细胞。“有效剂量”是指该剂量足以达到预期的目的。对于杀伤癌细胞或肿瘤细胞的方法来说,有效剂量是指该剂量足以杀伤癌细胞或肿瘤细胞。本发明的其他方法包括治疗肿瘤的方法,该方法是通过给予病人以有效剂量的含免疫毒素的组合物,该免疫毒素由 gelonin 的核心区和能特异地引导免疫毒素到达癌细胞的单链抗体组成。对于治疗来说,“有效剂量”是指该剂量足以使肌体产生治疗效果。在整个申请文件中,“治疗效果”是指与医学治疗相关的任何改善或增强肌体健康状况的表现。对于包括前期癌、癌症和过度增生性疾病的癌症患者来说(也可适用于其他疾病),治疗效果包括而但不限于下列例子:患者生存期的延长,肿瘤发展减缓或延迟,过度增殖减弱,肿瘤生长速度减缓,转移延迟,癌细胞或肿瘤细胞增殖速率降低,以及由于身体状况的改善而导致的患者疼痛减弱。

在本发明的一些实施方式中,毒素是指 gelonin。其中的一些实施方式中的免疫毒素含有 SEQ ID NO:1 的全部或部分氨基酸序列。需要说明的是,免疫毒素的氨基酸数目可以比全长 gelonin 蛋白少几个,尽管在一些实施方式中免疫毒素含有全长序列。需要进一步说明的是毒素可以被来源化,也可以是本文所描述的任何毒素或构建物。

在某些实施方式中,免疫毒素中的抗体部分可以是人源化的和/或单链抗体。在本发明的方法中,尽管抗体可能不是全长序列,但是都可以引导免疫毒素到达靶细胞,因此使免疫毒素具有特异性的靶向作用。在一些实施方式中,抗体(包括抗体片段)可以特异地与靶细胞表面的抗原结合。在一些特定的实施方式中,抗体的靶位是肿瘤抗原。抗体可以是任何哺乳动物抗体,需要特别说明的是抗体也可以是小鼠、兔、大鼠、羊或猴抗体。尽管抗体来源于不同物种,但根据本发明的方法或本领域普通技术人员所熟知的其他方法可以将其人源化。在抗体为单链抗体的情况下,抗体可以是 9.2.27 或 ZME-018,这些是针对黑色素瘤的抗体。在一些特定的实施例中,免疫毒素是本文所描述的 scfvMEL-2018 或 scfvMEL-2025(SEQ ID NO:11)。

能作为靶向性治疗靶位的癌细胞可以来自于下列组织：前列腺、肺、脑、皮肤、肝、乳腺、淋巴结、胃、睾丸、卵巢、胰腺、骨、骨髓、头颈、颈、食管、眼、胆囊、肾、肾上腺、心、结肠、或血液。另外，肿瘤病人可以患有上述器官/组织的一种癌。在本发明的一些实施方式中，癌细胞指黑色素瘤细胞。需要说明的是癌细胞或肿瘤细胞可以在病人体内。在某些实施方式中，给予病人有效剂量的治疗组合物是指该剂量足以达到预期的目的，如治疗。例如对于癌症来说，预期效果可以指杀伤癌细胞或肿瘤细胞。

免疫毒素可以包含在药学上可接受的组合物内。作为治疗方案的一部分，病人也可以接受其他抗肿瘤治疗，如化疗、放疗、基因治疗、手术、或其他免疫治疗。

在一些特定实施方式中，需要说明的是免疫毒素的给药可以通过给予细胞或病人含有编码免疫毒素的核酸序列并能表达免疫毒素的表达载体来实现。在一些实施方式中，表达载体是病毒载体，包括而不限于：腺病毒载体、腺相关病毒载体、肝炎病毒、疱疹病毒、痘状核病毒、逆转录病毒、或牛痘病毒。

权利要求和/或某些特定场合中，数词“一个”在和术语“含有”联用时可以表示“一个”，但也可以表示“一个或多个”，“至少一个”，以及“一个或不止一个”。

本发明的其他客体、特色和优势将在下面的详细描述中加以阐明。但是，应当理解的是详细描述和特定实施例在说明本发明的特定实施方式时仅仅是以说明的方式阐明的，对于本领域的普通技术人员来说，在本发明的精神和范围内根据这些详细描述就很容易地理解对本发明作出的各种变化和修正。

附图简介

下面的附图是说明书的一部分，用于进一步说明本发明的某些方面。通过参考一个或多个附图并结合此处对特定实施方式的详细描述可以更好地理解本发明。

图 1. ELISA 分析人血清标本中的抗-rGelonin 抗体。

图 2. 人抗-gelonin 抗体识别的 rGelonin 上的表位。

图 3A-3B. Gelonin 缺失构建物。显示的是 Gelonin 缺失构建物的结构。

图 4. PCR 方法构建的 sfvMEL/rGel 融合毒素并连接到 pET-32a 来源载体上的示意图。

图 5. sfvMEL/rGel 融合蛋白构建物的全部 DNA 序列分析。

图 6. 亲本 ZME-rGel 化学结合物和 sfvMEL/rGel 融合蛋白构建物(即 sfvMEL/rGel)结合能力比较。用 ELISA 和抗-gelonin 多克隆兔抗体分析与 A-375

细胞的结合。两个构建物与靶细胞的结合相同，尽管重组融合构建物的结合稍微高一点。

图 7. 亲本 ZME-rGel 化学结合物和 sfvMEL/rGel 融合蛋白构建物对抗原阳性 A375 人黑色素瘤细胞的体外细胞毒性比较。细胞接种到培养板中，然后用不同剂量的 sfvMEL/rGel 融合蛋白构建物、ZME-rGel 化学结合物处理 72 小时，以不加重重组 gelonin 的为对照。两个免疫结合物的 IC_{50} 大约为 8nM，而重组 gelonin 的 IC_{50} 要高几个数量级，大约为 2×10^3 nM。

图 8. ZME 抗体对 sfvMEL/rGel 免疫毒素的竞争性抑制作用。不同浓度的重组免疫毒素加到处于对数生长期的 A375 人黑色素瘤细胞中，设 4 复孔。在培养板的其他列孔中加入固定浓度的 ZME 抗体 (50 μ g/ml) 和不同剂量的 sfvMEL/rGel 免疫毒素，孵育 72 小时。游离 ZME 抗体的加入可以使免疫毒素的细胞毒性下降约 3 倍。

图 9. 在裸鼠右腹部接种黑色素瘤，肿瘤长大后用盐水（对照）或 sfvMEL/rGel (2mg/kg 或 20mg/kg，总剂量) 连续处理（静脉注射）4 天（箭头所指）。测量肿瘤体积 30 天。在此期间，对照的盐水处理组肿瘤从 30mm² 增加到 150mm²。低剂量免疫毒素处理组肿瘤从 30mm² 增加到 60mm²。高剂量免疫毒素处理组肿瘤大小无明显变化，保持原来的 30 mm²。

图 10. 体外细胞毒试验比较 scfvMEL-CFR2018（也叫 sfvMEL-CFR2018）和 scfvMEL-CFR2025 对 A375-M 黑色素瘤的细胞毒性。

说明性实施方式的描述

低抗原性蛋白和多肽作为组合物给予有免疫系统的有机体时具有巨大的优势。本文描述了涉及和制备这种蛋白和多肽的方法，蛋白和多肽是这些方法的结果分子。对于这些方法来说酶是特别让人感兴趣的候选者，因为酶有望在保持其酶活性的同时降低其在受试者内的抗原性，这些受试者因而还能享受这些蛋白酶活性的益处。因此在本发明的某些实施方式中提供了核酸和多肽组合物，其中包含植物毒素，如 gelonin。蛋白可以设计成在提供一种多肽的毒性功能的同时与另一种多肽相结合，如靶向分子。这些人工毒素具有广泛的应用。

I. 蛋白化合物

在某些实施方式中，本发明涉及含有蛋白分子的新型组合物，该蛋白分子是通过将天然或野生型蛋白修饰而得到的。在一些实施方式中，蛋白化合物的某些氨基酸缺失；在另外的实施方式中，蛋白分子的氨基酸残基被替代，同时还有一些实施方式的蛋白化合物氨基酸的缺失和替代同时存在。而且蛋白化合物所包含的氨基酸分子可以来源于不同的多肽实体。在本文中，“蛋白分子”、“蛋白组合物”、“蛋

白化合物”、“蛋白链”或“蛋白材料”通常是指但不限于：大于约 200 个氨基酸的蛋白，或者从一个基因翻译出的全长内源序列；大于约 100 个氨基酸的多肽；和/或 3—100 氨基酸的肽。上述所有的“蛋白”术语在此处可以交换使用。而且，这些术语也可以用于融合蛋白或蛋白结合物。

在某些实施方式中一个蛋白分子的大小含有而不少于至少约 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 或更多个氨基酸残基，以及在此范围内的任何数目。本发明的化合物可以包括含有上述数目的来自于 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:11 的连续氨基酸残基。需要说明的是有关 SEQ ID NO:1 的实施方式也适用于有关本文描述的其他任何氨基酸序列的实施方式，包括 SEQ ID NO:11，如果合适，反之亦然。

相应的，术语“蛋白组合物”包含氨基分子序列，该序列至少含有天然合成蛋白中 20 种普通氨基酸的一个，或者至少一个修饰的或不常见氨基酸，这些氨基酸包括在而不少于下面表 1A 中所列出的。

表 1A 修饰或不常见氨基酸			
缩写	氨基酸	缩写	氨基酸
Aad	2-aminoadipic acid	EtAsn	N 乙酰天冬酰胺
Baad	3-aminoadipic acid	Hyl	羟赖氨酸
Bala	β -丙氨酸, β -氨基丙酸	Ahyl	异羟赖氨酸
Abu	2-氨基丁酸	3Hyp	3-羟基脯氨酸
4Abu	4-氨基丁酸, 哌啶酸 (aminoheptanic acid)	4Hyp	4-羟基脯氨酸
Acp	6-氨基己酸	Ide	异锁链[赖氨]素
Ahe	2-氨基庚酸	Aile	异-异亮氨酸
Aib	2-氨基异丁酸	MeGly	N-甲基甘氨酸, 肌氨酸
Baib	3-氨基异丁酸	MeIle	N-甲基异亮氨酸
Apm	2-氨基庚二酸	MeLys	6-N-甲基赖氨酸
Dbu	2,4-二氨基丁酸	MeVal	N-甲基缬氨酸

Des	锁链[赖氨]素	Nva	原缬氨酸
Dpm	2, 2'-二氨基庚二酸	Nle	原亮氨酸
Dpr	2, 3-二氨基丙酸	Orn	鸟氨酸
EtGly	N-乙酰甘氨酸		

此处所用的“氨基分子”是指氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物，这些都是本领域普通技术人员所熟知的。在某些实施方式中，蛋白分子的残基是连续的，没有任何非氨基分子打断氨基分子序列。而在另外一些实施方式中，序列可以含有一个或多个非氨基分子部分。在某些特别的实施方式中，蛋白分子的残基序列可以被一个或多个非氨基分子打断。

1. 功能方面

本发明涉及修饰蛋白，特别是那些对受试者有治疗价值的修饰蛋白，因为这些修饰蛋白具有与未修饰蛋白相似的功能活性，并且修饰蛋白比未修饰蛋白具有更多的优点，如抗原性较弱和/或引起的副作用较少，和/或具有更好的或更持久的疗效。因此，本申请在提及修饰蛋白的功能或活性时，本领域的普通技术人员应当理解其中包括一种蛋白，该蛋白：1) 具有和未修饰蛋白相同的活性或特异性，但也可能具有不同的活性水平；以及 2) 比未修饰蛋白具有更多的优点。活性的确定可以用本领域普通技术人员熟知的方法进行，特别是与蛋白活性有关的方法，以及为了比较的目的可以包括使用修饰蛋白和未修饰蛋白的天然和/或重组版本。

2. 修饰蛋白

本发明的修饰蛋白可以有氨基酸的缺失和/或取代；因此，具有缺失氨基酸的蛋白、具有替代氨基酸的蛋白以及同时具有缺失和替代氨基酸的蛋白都是修饰蛋白。在一些实施方式中，这些修饰蛋白还可以含有插入的或添加的氨基酸，例如形成融合蛋白或含有接头的蛋白。“缺失修饰蛋白”缺少一个或多个天然蛋白的氨基酸残基，但是仍具有天然蛋白的特异性和/或活性。“缺失修饰蛋白”也可以具有减弱的免疫原性或抗原性。缺失修饰蛋白的一个例子是至少一个抗原区缺失了一个氨基酸的蛋白，所谓的抗原区是指蛋白上的一个区，该区可以决定该蛋白在某个特定有机体中的抗原性，这样就可以确定修饰蛋白所要给予的有机体种类。

替代或替换突变体一般都会在一个或多个蛋白位点上有一个氨基酸被另一种氨基酸所代替，并且可以通过设计而改变多肽的一种或多种特性，特别是降低其免疫原性/抗原性、减轻其在受试者内的副作用、或者增强其疗效。这种替代优选保守方式，即用具有同样形状和电荷的氨基酸来替代。保守替代是本领域所熟知的，例如以下替代：丙氨酸到丝氨酸；精氨酸到赖氨酸；天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸；

天冬氨酸到谷氨酸；半胱氨酸到丝氨酸；谷氨酰胺到天冬酰胺；谷氨酸到天冬氨酸；甘氨酸到脯氨酸；组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺；异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸；亮氨酸到异亮氨酸或缬氨酸；赖氨酸到精氨酸；蛋氨酸到异亮氨酸或亮氨酸；苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸；丝氨酸到苏氨酸；苏氨酸到丝氨酸；色氨酸到酪氨酸；酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸；以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。多肽的一个抗原区可以被一个低抗原性区所替代；低抗原性区可以含有天然蛋白一样的相应残基，也可以有某些保守替代和/或非保守替代。

除了删除或替代，修饰蛋白还可以还有插入的残基，一般为在多肽上添加至少一个残基，其中包括靶向肽的插入、多肽的插入，或者仅仅是单个残基的插入。下面要讨论的末端添加就是所谓的融合蛋白。

术语“生物学功能等效”在本领域已是熟知的概念，在本文中对它进一步详细定义。据此，如果一个序列与其天然多肽相比具有约 70%到 80%、或者约 81%到 90%、甚至约 91%到 99%的氨基酸都是一样的、假如蛋白的生物活性得以保持，那么我们就认为修饰蛋白的生物学功能与其天然蛋白是等效的。

同样可以理解的是氨基酸序列和核酸序列也可以含有添加的残基，如添加 N 端或 C 端氨基酸，或者 5'或 3'碱基，如上所述在本文描述的一个序列中也是基本的，只要该序列符合前面提到的标准，包括其表达的蛋白能保持生物学活性。序列末端添加特别适于核酸序列，例如可以在编码区的 5'或 3'端两侧添加各种非编码序列，或者添加各种内部序列，即内含子，这在基因内部常常出现。

下面的讨论基于蛋白上氨基酸的变化制备一个等效的，甚至是有所改善的次生分子。例如，蛋白结构上的某些氨基酸可以被其他氨基酸替代而不会造成某些结构如结合位点与底物分子结合能力的明显丢失。由于一个蛋白的结合能力和性质决定了其生物学功能活性，因此蛋白序列上的某些氨基酸可以被替代，或者改变其 DNA 的编码序列，从而制备出一个具有相同性质的蛋白。发明人需要认真考虑如何在一个基因的 DNA 序列上引入各种变化而不导致其生物利用度或活性的明显丢失，就象下面所讨论的。表 1 显示的是编码特定氨基酸的密码子。一个蛋白分子如果符合下列标准则与第二个分子有同源性或被认为是同源的：1)在同一位置上至少有 30%的蛋白分子序列与次生分子一致；2)在同一位置上有一些序列与次生分子一致，并且非一致的残基至少有 30%是本文所描述的保守替代；或者 3)至少有 30%的蛋白分子序列与次生分子一致，但是可能有一些非一致残基散布在一致残基之间。本文所用到的术语“同源的”也适用于蛋白分子的一个区，而不仅仅是整个分子。如果“同源性”或“同源的”以定量方式来表示，如“50%同源性”或“50%是同源的”，

则对于上面的同源性标准 1)、2)、3) 来说, 应从 30% 调整到 50%。这样, 需要说明的是两个蛋白分子或蛋白分子上的区之间可能至少具有 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或更高的同源性。

在进行这些改变时, 氨基酸的亲水指数是需要考虑的因素。氨基酸的亲水指数对于一个蛋白内在生物活性的重要性在本领域是不言而喻的 (Kyte 和 Doolittle, 1982)。氨基酸的相对亲水特征影响结果蛋白的二级结构, 其二级结构又决定了蛋白与其他分子如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原及其类似物质的相互作用。

同样在本领域很容易理解的是根据亲水性可以更好地选择类似氨基酸的替代。美国专利 4, 554, 101 号中提到一个蛋白的最大局部平均亲水性是由其邻近的氨基酸所决定的, 并且与蛋白的生物学特性密切相关。如美国专利 4, 554, 101 号所描述的, 下面是不同氨基酸残基的亲水性值: 精氨酸(+3.0); 赖氨酸(+3.0); 天冬氨酸(+3.0±1); 谷氨酸(+3.0±1); 丝氨酸(+3.0); 天冬酰胺(+0.2); 谷氨酰胺(+0.2); 甘氨酸(0); 苏氨酸(-0.4); 脯氨酸(-0.5±1); 丙氨酸(-0.5); 组氨酸(-0.5); 半胱氨酸(-1.0); 甲硫氨酸(-1.3); 缬氨酸(-1.5); 亮氨酸(-1.8); 异亮氨酸(-1.8); 酪氨酸(-2.3); 苯丙氨酸(-2.5); 色氨酸(-3.4)。

很容易理解当一个氨基酸被另一个具有相同亲水性值的氨基酸替代时就能够产生一种生物学等效和免疫学等效的蛋白。在这些变化中, 氨基酸的替代较佳的是亲水性值差别在±2 内的, 更佳的是在±1 内的, 最佳的是在±0.5 内的。

正如上面所列出的, 氨基酸的替代一般是基于氨基酸侧链取代基的相对一致性, 如亲脂性、亲水性、电荷、大小等。本领域的普通技术人员都知道典型的替代应该考虑上述各种因素, 包括: 精氨酸和赖氨酸; 谷氨酸和天冬氨酸; 丝氨酸和苏氨酸; 谷氨酰胺和天冬酰胺; 以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

表 2 列出了一系列可用本发明的方法进行修饰的蛋白和多肽。在用本发明的方法降低非人源多肽在人体内的抗原性时需要特别注意。需要说明的是具有治疗价值的非人源多肽也包括在本发明的范围之内。说明书中讨论的任何其他蛋白或多肽也可以通过本发明的方法进行修饰。

表 2

蛋白类	蛋白亚类	蛋白种	蛋白亚种
1) 毒素	核糖体抑制蛋白		
		Gelonin	
		蓖麻毒蛋白 A 链	
		假单胞菌外毒素	
		白喉毒素	

		米托菌素	
		Saporin	
2) 细胞因子 /生长因子	白介素	IL-1, IL -2, IL -3, IL -4, IL -5, IL -6, IL -7, IL -8, IL -9, IL -10, IL -11, IL -12, IL -13, IL -14, IL -15, IL -16, IL -17, IL -18, IL -19	
	肿瘤坏死因子		
	白三烯		
	干扰素	IFN α , IFN β , IFN γ	
	集落刺激因子	GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF	
	白细胞抑制因子		
	成纤维细胞生长因子	bFGF, FGF, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-8, FGF-9, FGF-18, FGF-20, FGF-23	
	血管内皮生长因子		
3) 酶	氧化还原酶		
	转移酶	转移一碳基团	甲基转移酶
			羧基和氨甲酰 转移酶
			脒基转移酶
		转移醛基或酮基	
		乙酰转移酶	乙酰转移酶
			酰氨基转移酶
		糖苷转移酶	己糖苷转移酶
		转移除甲基之外的烷基或芳基	
		转移含氮基团	转氨酶
		转移含磷酸根基团	磷酸转移酶
			二磷酸转移酶
			核苷转移酶
		转移含硫基团	硫转移酶
			磺基转移酶
			辅酶 A 转移酶
		转移含硒基团	
	水解酶	作用于酯键	
		糖苷酶	
		作用于醚键	
		作用于肽键(肽水解酶)	
		作用于碳-氮键, 其他肽键	
		作用于酸酐	
		作用于碳-碳键	
		作用于卤键	
		作用于磷酸-氮键	
		作用于硫-氮键	

		作用于碳-磷酸键	
		作用于硫-硫键	
	裂解酶	碳-碳裂解酶	
		碳-氧裂解酶	
		碳-氮裂解酶	
		碳-硫裂解酶	
		碳-卤裂解酶	
		磷酸-氧裂解酶	
	异构酶	消旋酶和表位酶	
		顺反异构酶	
		分子内氧化还原酶	
		变位酶	
		磷酸转移酶(磷酸变位酶)	
	连接酶	形成碳-氧键	
		形成碳-硫键	
		形成碳-氮键	
		形成碳-碳键	
		形成磷酸酯键	

按照本发明的方法制备修饰蛋白的另一个实施方式是利用肽模拟物。模拟物是含肽分子，模拟蛋白质二级结构的元件。见 Johnson(1993)。利用肽模拟物的内在原理在于蛋白质存在一个肽主链，由它决定氨基酸侧链的走向，以此来促进分子之间的相互作用，如抗原和抗体之间的相互作用。模拟肽应该与天然分子具有相同的分子间相互作用特性。这些原则与上面提到的其他原则一起被用于设计次生修饰蛋白分子，这些修饰蛋白与天然蛋白具有相同天然特性，但在某些情况下，甚至具有更优越的特性。

3. 多聚多肽化合物

本发明涉及的蛋白化合物可以含有来自多个多肽的氨基酸序列。例如，蛋白化合物或蛋白分子可能含有一个修饰毒素加上一个抗体的抗原结合区。多聚多肽蛋白分子也可能是两个或多个蛋白化学结合而形成的，或者是由同一核酸分子编码的两个或多个多肽形成的融合蛋白。含有一个毒素分子和一个有活性的第二多肽的融合蛋白或结合蛋白被称为“双毒素”。因此，多聚多肽蛋白分子可以由第一多肽的全部或部分序列加上第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽、第六多肽、第七多肽、第八多肽、第九多肽、第十多肽、或更多多肽的全部或部分序列组成。

一般来说，人工毒素本身没有能力结合到细胞表面或进入特定细胞内。因此，这些药物需要与其他药物/蛋白化学结合或融合，这些药物/蛋白能够与特定靶细胞结合并且一旦结合就可以有效内化到细胞内。表 3 提供了一系列可与本发明的毒素

结合或融合的蛋白和多肽。特别是在某些实施方式中包括引导人工蛋白化合物到达特定位置如特定类型的细胞或肌体的特定部位。本发明还包括将毒素分子的全部或部分序列连接到表 2 列出的任何一种蛋白的全部或部分序列上。需要说明的是本发明包括而不限于表 2 和表 3 列出的例子。

表 3

蛋白类	蛋白亚类	蛋白种	蛋白亚种
1) 抗体	多克隆抗体		
	单克隆抗体	非重组的	
		重组的	
			嵌合的
			单链的
			双链的
			多链的
2) 细胞因子/淋巴因子/生长因子	白细胞介素	L-1, IL -2, IL -3, IL -4, IL -5, IL -6, IL -7, IL -8, IL -9, IL -10, IL -11, IL -12, IL -13, IL -14, IL -15, IL -16, IL -17, IL -18, IL -19	
	表皮生长因子		
	集落刺激因子(CSF)	GM-CSF, G-CSF, M-CSF	
3) 能够结合到细胞表面并能内化的小化合物	烟碱		
	ATP		
	氨基酸		
	多巴胺		

a. 融合蛋白

一种特殊类型的插入突变体是融合蛋白。这种分子一般具有天然分子的全部或实体序列区, 在其 N 端或 C 端连接第二多肽的全部或部分序列。例如, 典型的融合蛋白是利用一个其他物种的引导序列使蛋白在异源宿主内得以重组表达。另外一种有用的融合是加上一个免疫活性区, 如抗体表位或其他尾巴, 从而促进融合蛋白的靶向作用或有利于其纯化。使用 6xHis 和 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)作为尾巴是大家所熟知的。在融合蛋白连接处含有一个剪切位点可以使我们在纯化后很容易地去掉外源多肽。其他有用的融合包括连接一个功能区, 如酶的活性位点, 糖基化区, 细胞靶向信号或跨膜区。

免疫毒素是本发明需要特别说明的一个实施方式。免疫毒素是一种细胞毒化合物, 至少由抗体的一部分和毒素分子的一部分组成。抗体和毒素可以互相融合或结合。关于免疫毒素的更详细描述见下文。

b. 结合蛋白

本发明还涉及结合多肽，如通常为单克隆类型的翻译蛋白、多肽或肽，至少连接一种药物而形成抗体结合物。为了增强抗体作为诊断和治疗药物的效果，通常连接或共价结合或复合至少一种期望的分子或部分序列。这种分子或序列可以是，但不限于，至少一种效应分子或报告分子。效应分子包括具有期望活性即细胞毒活性的分子。连接到抗体上的效应分子包括而限于：毒素、抗肿瘤药、治疗酶、放射性标记核酸、抗病毒药、螯合剂、细胞因子、生长因子和寡核苷酸或多聚核苷酸。与此相对应的是，报告分子可以是能用分析方法检测到的任何序列。连接到抗体上的报告分子包括而限于：酶、放射性标记物、半抗原、荧光标记物、磷光分子、化学发光分子、发色团、发冷光分子、光亲和分子、有色粒子或配基如生物素。

任何具有足够选择性、特异性或亲和性的抗体都可以作为抗体结合物的基础。这些特性可以通过本领域普通技术人员所熟知的传统免疫分析方法进行评价。除了标准的抗原结合位点外，抗体上可与生物活性分子结合的位点包括位于各种能与病原体、B 细胞超抗原、T 细胞辅助受体 CD₄ 和 HIV-1 包膜蛋白结合的各种区域结合的位点 (Sasso 等, 1989; Shorki 等, 1991; Silverman 等, 1995; Cleary 等, 1994; Lenert 等, 1990; Berberian 等 1993; Kreier 等, 1991)。另外还包括抗体自身结合 (Kang 等, 1988) 以及含有能被抗抗体识别的表位 (独特型表位) 的各种区域。

抗体结合物的某些特定例子是那些含有连接一种可检测标记物的抗体的结合物。“可检测标记物”是一些化合物和/或元件，这些化合物和/或元件由于其特殊的功能特性和/或化学特征可以被检测到，利用这些标记物可以检测到连接其上的抗体，和/或容易被纯化。另外的例子是一些由抗体和连接其上的细胞毒或抗细胞药物组成的结合物，被称为“免疫毒素”。

抗体结合物可以作为诊断试剂使用。抗体诊断试剂一般分为两类，体外诊断用的如用于各种免疫分析的试剂，和/或体内诊断用的试剂，一般称作“抗体示踪造影”。

许多适宜的造影剂都是本领域所熟知的，其连接到抗体上的方法也是本领域所熟悉的 (见美国专利 5, 021, 236; 4, 938, 948; 和 4, 472, 509 号，本文已纳入作为参考)。通常所用的显影物质为常磁性离子、放射性同位素、荧光色素、核磁共振可检测物质、X 射线造影剂。

对于常磁性离子来说，以举例说明的方式列举如下：铬(III)、镁(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、钆(III)、钆(III)和/或钆(III)，其中优选钆。在其他地方如 X 射线造

影中所用的离子包括而不限于：镧(III)、金(III)、铅(III)，特别是铋(III)。

用于治疗 and/或 诊断的放射性同位素包括： ^{211}Bi 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{36}Cl 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{152}Eu 、 ^{67}Ga 、 ^3H 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{59}Fe 、 ^{32}P 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{75}Se 、 ^{35}S 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和/或 ^{90}Y 。在某些实施方式中， ^{123}I 是优选的， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和/或 ^{111}In 也常常被选用，因为它们具有较低的能量和较宽的检测范围。本发明所色机的放射性标记的单克隆抗体可以通过本领域所熟知的制备。例如，通过与碘化钠或碘化钾以及化学氧化剂如次氯酸钠或酶解氧化剂如乳过氧化物酶反应可以使单克隆抗体被碘化。本发明的单克隆抗体可以通过配基交换过程标记上 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ，例如用二价锡溶液降解 pertechnetate ，然后将降解的 Tc 螯合到葡聚糖凝胶柱上并将抗体加入到柱子中。另外也可以用直接标记技术，即通过将 pertechnetate 、降解剂 SnCl_2 、缓冲液如苯二甲酸钠-镁溶液合抗体一起孵育。中介功能基团常被用作将以金属离子形式存在的放射性同位素结合到抗体上，这些基团是二乙撑三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

能够用作结合物的荧光标记物包括 Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5, 6-FAM, FITC, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Red, Renographin, ROX, TEMRA, Tetramethylrhodamine 和/或 Texas Red。

在本发明中说明的另一类抗体结合物是那些最初打算用于体外的，其中抗体连接到一个第二结合配基和/或一个酶(酶标记物)上，当酶与生色底物反应时可以产生有色的产物。适于作为连接物的酶包括尿素酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化物酶、或葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配基是生物素和/或亲和素以及链亲和素。这些标记物的应用都是本领域普通技术人员所熟知的，例如在美国专利 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 和 4,366,241 号中有描述；本文已纳入作为参考。

另外一种已知的将分子以位点特异性的方式连接到抗体上的方法包括抗体与以半抗原为基础的亲和标记物反应。以半抗原为基础的亲和标记物主要是和抗原结合位点上的氨基酸反应，因而会破坏这个位点，封闭特异性抗原反应。然而，这可能是一个缺点因为它会导致抗体结合物无法与抗原结合。

含有叠氮基团的分子也可用于和蛋白形成共价键，该反应是通过低强度紫外线照射而产生的活性氮中间物来完成的(Potter 和 Haley, 1983)。特别是嘌呤核苷酸的 2-和 8-叠氮类似物已被作为发光探针用于鉴别细胞粗提物中的核苷酸结合蛋

白(Owens 和 Haley, 1987; Atherton 等, 1985)。2-和 8-叠氮核苷酸也被用于寻找纯化蛋白上的核苷酸结合区(Khatoun 等, 1989; 和 Dholakia 等, 1989)以及用作抗体结合剂。

本领域中有几种熟知的方法可用于将抗体黏附或结合到其结合物上。其中有些方法是利用含有附着在抗体上的有机螯合剂如乙撑三胺五乙酸(DTPA); 乙烯三氨四乙酸(ethylenetriaminetetriaetic acid); N-卤代-对-甲苯磺酰胺和/或 tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycouril-3 的金属螯合复合物(美国专利 4,472,509 和 4,938,948 号, 本文已纳入作为参考)。在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐存在的条件下单克隆抗体也可以和酶反应。在这些偶联剂存在的条件下或通过与异硫氰酸盐反应可以制备含有荧光标记的结合物。在美国专利 4,938,948 号中, 用单克隆抗体和可检测造影物可以使乳腺癌显影, 可检测造影物是通过接头如甲基-对-氢苯甲亚胺盐或 N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟苯基)丙酸盐结合到抗体上的。

在另一个实施方式中, 描述了免疫球蛋白的衍生物, 该衍生物是通过在免疫球蛋白的 Fc 段引入巯基而生成的, 所使用的反应条件不会改变抗体的结合位点。用上述方法制备的抗体结合物具有更长的寿命, 更高的特异性和敏感性(美国专利 5,196,066 号, 本文已纳入作为参考)。在一篇文献中也报道了效应分子或报告分子的位点特异性连接方法, 该方法是把报告分子或效应分子连接到 Fc 段的碳水化合物残基上(O'Shannessy 等, 1987)。已有报道用该方法制备出颇具前景的诊断和治疗抗体, 目前正在进行临床试验。

i. 接头/偶联剂

多肽可以通过一个生物可释放键如一个可选择性裂解的接头或氨基酸序列与免疫毒素结合。例如, 可以考虑选择一个带有裂解位点的肽接头, 该位点可以被肿瘤内的或在肿瘤内活化的酶裂解。这种肽接头的例子包括可以被尿激酶、纤溶酶、凝血酶、因子IXa、因子Xa、或金属蛋白酶如胶原酶、明胶酶或基质降解酶裂解的接头。另外, 肽或多肽也可以结合在佐剂上。

氨基酸如可选择性裂解接头、合成接头, 或其他氨基酸序列可用于把蛋白序列切开。另外, 已知许多含二硫键的接头也被成功用于将毒素结合到靶向性药物上, 其中有些接头要比其他接头优越, 因为它们具有不同药理学特征和性能。例如, 含有空间隐藏的二硫键的接头是较佳的, 因为其在体内具有更好的稳定性。而且, 通过使用任一毒素序列, 包括 gelonin 和去糖基化的蓖麻蛋白 A 链, 就可以使本发明的某些优势得以实现。

作为一个一般的指导原则, 任何适于免疫毒素的生化交联子也可以被应用于本

发明中，其他的一些接头也可以考虑。

交联子可用于形成分子桥而将两个不同分子的功能基团连接到一起，如稳定剂和凝固剂。为了以 step-wise 方式将两个不同的蛋白连接起来，可以使用异源双功能交联子将不想要的同聚物去除。

需要说明的是，交联子也可用于本发明的修饰蛋白分子。双功能交联剂已被广泛用于各种目的，包括亲和基质的制备，分散结构的修饰与稳定，结合位点的鉴别以及结构研究。在本发明中，这种交联子也可以被用以稳定多肽或通过提高修饰蛋白的靶向能力或整体效力而使其具有更高的治疗价值。交联子也可以被裂解，如含二硫键的酸敏感交联子或其他交联子。带有两个一样功能基团的同源双功能分子被证明可以更有效地诱导同样的两个大分子和不同的大分子之间、或大分子的亚单位之间，以及多肽与其结合物上的特异性结合位点的交联。异源双功能分子含有两个不同的功能基团。利用两个不同功能基团的不同活性，对交联的控制更具有选择性和顺序性。根据双功能交联剂功能基团的特异性可以分为氨基、巯基、guanidino、吡啶基、羧基特异性基团。在这些交联剂中，针对自由氨基的交联剂应用特别广泛，因为它们经济、易于合成、使用的反应条件较温和。大多数异源双功能交联剂含有初级氨基反应性基团和巯醇反应性基团。

配基与脂质体交联方法的例子在美国专利 5,603,872 和 5,401,511 号中已有描述，本文已完整地纳入作为参考。各种配基都可以通过氨基交联共价结合到脂质体表面。脂质体，特别是含有磷脂酰乙醇胺(PE)的多层小囊(MLV)或单层小囊如微乳化脂质体(MEL)和大单层小囊(LUVET)都可以通过已有的方法制备。脂质体中的 PE 提供了一个位于脂质体表面的用作交联的活性功能残基—初级氨基。配基如表皮生长因子(EGF)已被成功地连接到 PE-脂质体上。配基共价结合到脂质体表面离散的位点上。这些位点在脂质体表面的数量和密度是由脂质体的形态和类型所决定的。脂质体表面也可能含有非共价结合位点。为了形成配基与脂质体的共价结合，交联剂的效率和生物相容性已被广泛研究。交联剂包括戊二醛(GAD)、双功能环氧己烷(OXR)，乙烯甘油二环氧丙醚(EGDE)和水溶性碳化二亚胺，优选 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)。利用交联合成化学，可识别物质的氨基与脂质体的交联得以完成。

在另外一个实施例中描述了异源双功能交联剂及其使用方法(美国专利 5,889,155 号，本文已完整纳入作为参考)。交联剂将亲核的酰肼基与亲电子的马来酰亚胺结合，使一个醛基与自由的巯醇耦合。交联剂可以被修饰以交联各种功能基团，因而可用于交联多肽和糖。表 3 列出了可用于本发明的某些异源双功能交联

剂。

表 4 异源双功能交联剂			
交联剂	反应方向	优点与应用	间隔臂长度 / 交联后
SMPT	初级氨基巯基	高度稳定性	11. 2A
SPDP	初级氨基巯基	疏醇化 可裂解交联	6. 8A
LC-SPDP	初级氨基巯基	间隔臂较长	15. 6A
Sulfo-LC-SPDP	初级氨基巯基	间隔臂较长 水溶性	15. 6A
SMCC	初级氨基巯基	稳定的马来酰亚胺活性基团 酶-抗体结合 半抗原-载体蛋白结合	11. 6A
Sulfo-SMCC	初级氨基巯基	稳定的马来酰亚胺活性基团 水溶性 酶-抗体结合	11. 6A
MBS	初级氨基巯基	酶-抗体结合 半抗原-载体蛋白结合	9. 9A
Sulfo-MBS	初级氨基巯基	水溶性	9. 9A
SIAB	初级氨基巯基	酶-抗体结合	10. 6A
Sulfo-SIAB	初级氨基巯基	水溶性	10. 6A
SMPB	初级氨基巯基	间隔臂较长 酶-抗体结合	14. 5A
Sulfo-SMPB	初级氨基巯基	间隔臂较长 水溶性	14. 5A
EDC/Sulfo-NHS	初级氨基羧基	半抗原-载体蛋白结合	0
ABH	无选择性碳水化合物	与糖基反应	11. 9A

有些特别的多肽如 gelonin 在其天然序列中不含有能被给定交联剂修饰的残基，这样就需要在其一级序列中引入保守的天然或合成氨基酸改变。

4. 蛋白质纯化

本发明除了在某些实施方式中涉及重组蛋白外，还涉及纯化蛋白的方法和过程，

包括修饰蛋白和重组蛋白。一般来说，这些技术包括在同一水平上的细胞内多肽和非多肽成分的粗分离。从其他蛋白中分离出多肽后，目的多肽可以通过色谱和电泳技术进行进一步的纯化以达到部分或完全纯化的目的(或纯化为均一物)。特别适宜制备的纯化肽的分析方法是离子交换层析、排阻层析；聚丙烯酰胺凝胶电泳；等电聚焦电泳。一种特别有效的肽纯化方法是快速蛋白液相色谱或高压液相色谱(HPLC)。另外，这些技术所使用的条件可以根据所纯化分子的特征如功能活性加以改变。

本发明的某些方面涉及编码蛋白或肽的纯化，在某些特定实施方式中涉及编码蛋白或肽的实质纯化。本文所用的术语“纯化蛋白或纯化肽”通常是指可从其他组分中分离出的组合物，其中蛋白或肽根据其天然获得状态可以被纯化到任何程度。因而纯化蛋白或纯化肽也指从天然产生的环境中分离出的蛋白或肽。“实质纯化”的蛋白或肽。

一般来说，“纯化的”是指蛋白或肽组合物已经过分离去除了各种其他组分，但组合物还实质性地保留了其表达的生物学活性。本文所用的术语“实质纯化”是指一个组合物中蛋白或肽是其主要组分，如蛋白或肽占组合物的约50%、约60%、70%、约80%、90%、约95%、96%、约97%、98%、约99%、99.2%、约99.4%、99.6%、约99.8%、99.9%或更高。

按照本发明所描述的本领域的普通技术人员可以很容易地掌握测定蛋白或肽纯化程度的各种方法。例如，这些方法包括确定活性组分的特异性活性，或用SDS/PAGE检测一个分离物中的蛋白量。评价一个分离物纯度的优选方法是比较一个分离物和其初提物的特异活性从而计算出纯化的程度，本文中用“纯化倍数”来表示。当然，用来表示活性的实际单位依赖于纯化后所用的特定分析方法以及表达的蛋白或肽是否还有可检测的活性。适用于蛋白纯化的各种技术都是本领域普通技术人员所熟知的。其中包括以硫酸胺、PEG、抗体或类似物质进行沉淀，或者热变性后离心；层析技术如离子交换层析、凝胶过滤、反相层析、羟磷灰石层析及亲和层析；等电聚焦电泳；凝胶电泳；以及上述技术和其他技术的联合应用。正如本领域普通技术人员所熟知的，各种纯化步骤的使用顺序可以调整，某些步骤也可以省略，最终找到一个合适的方法制备实质纯化的蛋白或肽。

没有一个统一的要求将蛋白或肽纯化到最大纯化状态。实际上，在某些实施方式中也用较低实质纯化的产物。利用较少的纯化步骤或同一纯化设计的不同形式可以达到部分纯化的目的。例如，利用HPLC系统进行阳离子柱层析能比利用低压层析系统得到更高倍数的纯化产物。相对低的纯化程度的方法在提高蛋白产物总回收

率，或保持蛋白活性方面有优势。

已知多肽的迁移率会由于 SDS/PAGE 的条件不同而不同，优势差别很明显 (Capaldi 等, 1977)。因而比较适宜的是根据纯化或部分纯化产物分子量的变化选择不同的电泳条件。

本发明的方法和组合物中也包括了肽标记物的使用。标记物利用了两个多肽之间的相互作用。用于相互作用的多肽的一部分可以作为标记物。例如，谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 的结合区可以作为标记物，这样谷胱甘肽链可用于富集含 GST 标记物的化合物。可被抗体或 T 细胞受体识别的氨基酸区是一种表位标记物，也可以使用。标记物可由人工连接到编码修饰蛋白的核酸片断上的核酸片断编码，这样整个核酸分子编码的就是一个融合蛋白。其他合适的融合蛋白是那些含有 β -半乳糖苷酶、泛素、六组氨酸或类似物质的蛋白。

5. 抗体

在某些实施方式中，本发明涉及抗体。例如单克隆抗体、单链抗体或人源化抗体的全部或部分序列可以化学结合或重组融合到另一个蛋白化合物如修饰的 gelonin 毒素上。另外，本发明的其他方面还包括识别针对特定抗原或抗原区的免疫反应，即抗体反应，这样就可以设计和/或制备出比天然形式的免疫原性低的蛋白化合物。如上面所描述的，除了针对全长蛋白的抗体以外，也可以制备与只含有核心表位区的小构建物反应的抗体，包括野生型和突变型表位。表位是抗原决定簇。抗原可以是能被抗体或 T 细胞受体特异性识别的任何物质。免疫原是可以诱导特异性免疫反应的抗原。

本文说用的术语“抗体”通常是指免疫结合物如 IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE。一般来说，IgG 和/或 IgM 是优选的，因为它们是生理状态下最常见的抗体而且在实验室条件下易于制备。

单克隆抗体 (Mab) 有其特定优势，如具有再生性及可以大规模制备，因此一般优选单克隆抗体。本发明提供人、小鼠、猴、大鼠、仓鼠、兔甚至鸡源的单克隆抗体。

本文所用的术语“抗体”指任何含有抗原结合区的抗体样分子，也包括抗体片断如 Fab', Fab, F(ab')₂, 抗体单链区 (DABs), Fv, scFv (单链 Fv) 及其类似物质。制备和使用各种抗体构建物的技术都是本领域所熟知的。抗体制备和特征化的方式也是本领域所熟知的 (见 Harlow 和 Lane, “抗体：实验室操作手册”，Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 本文已纳入作为参考)。

制备单克隆抗体的方法一般是按照制备多克隆抗体的方法开始。概括地说，多克隆抗体的制备是通过用本发明的免疫原性多肽组合物免疫动物，然后从这些免疫

动物中收集抗血清。另外,在本发明的某些实施方式中,血清是从接受特定抗原的人体内收集的。在工作环境中有可能接触特定抗原,这样那些由于职业原因接触特定抗原的人体内就会产生针对肽、多肽或蛋白的多克隆抗体。在本发明的某些实施方式中,来自于职业接触特定抗原的人的多克隆血清通过免疫检测方法被用于确定 gelonin 毒素上的抗原区。

许多种类动物都可用于制备抗血清。制备抗血清的常用动物是兔、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或山羊。由于兔有相对大量的血液体积,因此兔是优选的制备多克隆抗体的动物。

正如本领域所熟知的,一个组合物的免疫原性可能是会出现变化。因而常常需要激发宿主的免疫系统,这可以通过将肽或多肽免疫原连接到载体上来实现。常用的和优选的载体有钥孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白如卵白蛋白、鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可用作载体。将肽结合到载体上的方式是本领域所熟知的,包括戊二醛、*m*-马来酰苯甲酰-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯、碳化二亚胺和双-二氮化的联苯胺。

同样是本领域所熟知的,某个特定免疫原组合物的免疫原性可能因为免疫反应非特异刺激物即佐剂的使用而增强。合适的分子佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物,如细胞因子、毒素或合成组合物。

可以使用的佐剂包括 IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ 干扰素、GM-CSF、结核菌素(BCG)、氢氧化铝、胞壁酰二肽化合物如 thur-MDP 和 nor-MDP、CGP(MTP-PE)、脂质 A 和单磷脂质 A(MPL)。也可以考虑使用溶于 2% 鲨烯/吐温 80 中的含有三个细菌提取组分—MPL、海藻糖 dimycolate(TDM)和细胞壁骨架(CWS)的 RIBI。甚至 MHC 抗原都可用作佐剂。经常使用的优选佐剂包括完全福氏佐剂(非特异免疫反应刺激物,含有死的分枝结合杆菌)、不完全福氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

除了佐剂以外,能上调 T 细胞免疫反应或下调抑制细胞活性的细胞生物反应调节剂(BRM)也可以共同使用。这种 BRM 包括而限于:甲氰咪胍(CIM; 1200mg/d)(Smith/Kline, PA);低剂量环磷酰胺(CYP; 300mg/m²)(Johnson/Mead, NJ),细胞因子如 γ 干扰素、IL-2 或 IL-12、或者具有免疫辅助功能的基因编码蛋白如 B-7。

用于制备多克隆抗体的免疫原组合物的量根据免疫原的特性以及免疫的动物的不同而有所不同。各种给药途径都可用于注射免疫原(皮下注射、肌肉注射、真皮内注射、静脉注射以及腹膜内注射)。可以在免疫后不同时间点通过采集免疫动物的血样来监测多克隆抗体的产生情况。

也可以进行第二次加强免疫。加强免疫过程和测抗体滴度的过程可以反复进行知道达到合适的抗体滴度。当达到预期的免疫原性水平后,给免疫动物放血,分离血清并储存,动物还可用于制备单克隆抗体。

单克隆抗体可以用熟知的技术很容易地制备出来,如美国专利 4,196,265 号中所描述的例子,本文已纳入作为参考。典型的技术包括以所选的免疫原组合物如纯化的或部分纯化的多肽、肽或肽片段免疫动物,应该是野生型的或突变的组合物。免疫组合物应以能有效激发抗体生成细胞的方式注射。

如果需要,单克隆抗体还可以通过过滤、离心和各种层析方法如 HPLC 或亲和层析进一步纯化。本发明的单克隆抗体的片段也可以从单克隆抗体上获得,其方法是用酶如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化,和/或通过化学降解过程裂解二硫键。另外,本发明所包括的单克隆抗体片段也可用自动化的肽合成仪进行人工合成。

也可以考虑用分子克隆技术制备单克隆抗体。其主要内容是:用免疫动物脾中分离的 RNA 制备组合的免疫球蛋白噬菌体文库,通过比较表达抗原的细胞和对照细胞筛选表达合适抗体的噬菌体。与传统的杂交瘤技术相比,这一方法的优点在于通过一轮筛选所得到的抗体就可以提高 10^4 倍,通过重链和轻链的结合可以产生新的特异性,从而可以提高发现合适抗体的几率。

人源化的单克隆抗体是指动物源的抗体经过基因工程技术的改造以人源序列代替抗体上的恒定区和/或可变区序列,同时保持其原有的抗原特异性。这种抗体通常来源于啮齿类动物抗体并且具有针对人源抗原的特异性。这种抗体一般用于体内治疗。这种策略有助于降低宿主对外源抗体的免疫反应同时具有人效应功能的选择性。

“人源化”抗体也包括在本发明之内,这些抗体是来源于小鼠、大鼠或其他物种嵌合抗体,具有人抗体的恒定区和/或可变区,是双特异性抗体,重组的和基因工程抗体及其片段。制备人源化免疫球蛋白的技术是本领域普通技术人员所熟知的。例如美国专利 5,693,762 号描述了含有一个或多个补体决定区(CDR's)的人源化免疫球蛋白的制备方法和组合物。当结合成一个完整抗体时,人源化的免疫球蛋白在人体内实际上是非免疫原性的并且与抗原如蛋白或其他含相应表位的化合物的亲和性得以保留。其他制备人源化抗体的方法包括在美国专利 6,054,297; 6,861,155 和 6,020,192 号种,本文已特地纳入作为参考。根据病人的疾病量身定做的抗体的制备方法同样也是已知的,这种量身定做的抗体也包括在本发明内。

6. 免疫检测方法

正如某些实施方式中所讨论的,本发明还涉及结合、纯化、去除、定量和/或其

他检测生物学组分如多肽和肽上抗原区的免疫检测方法。本发明的免疫检测方法可用于确定肽、多肽或蛋白上的抗原区，这些肽、多肽或蛋白具有治疗价值，特别是当其免疫原性或抗原性在受体内降低时。

免疫检测方法包括酶联免疫吸附法(ALISA)、放射免疫分析法(RIA)、免疫放射量测定法、荧光免疫分析法、化学发光分析法、生物发光分析法以及 Western 杂交，尽管还有其他几个方法也是本领域普通技术人员说熟知的。各种有用的免疫检测方法的具体步骤在科学文献中已有描述，如 Doolittle MH 和 Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B 等, 1993; De Jager R 等, 1993; 及 Nakamura 等, 1987, 本文已纳入作为参考。

一般的免疫检测方法都包括获取怀疑含有蛋白、多肽或肽的标本，然后按照本发明发明的方法将标本与单克隆或多克隆的第一抗体反应，反应条件要足以形成免疫复合物。

这些方法包括从细胞器、细胞、组织或有机体标本中纯化蛋白、多肽和/或肽的方法。在某些情况下，抗体可以去除标本中的抗原性蛋白、多肽和/或肽。优选的是抗体连接到固相支持物上，如以柱基质的形式，怀疑含有蛋白、多肽和/或肽抗原成分的标本与固定的抗体反应。不想要的成分可以从柱子中洗脱下来，留下可以被洗脱与固定抗体结合的免疫复合物。

免疫结合方法也包括检测和定量标本中抗原组分的方法和形成于结合过程中免疫复合物的方法。将得到的怀疑含有一种抗原或抗原区的标本与含有该抗原或抗原区的抗体的标本反应，然后检测和定量在特定条件下形成的免疫复合物。

对于抗原检测来说，所分析的生物标本可以是怀疑含有抗原或抗原区的任何标本，如组织切片或标本、匀浆的组织提取物、细胞、细胞器、分离和/或纯化形式的含上述抗原的任何组合物、甚至与细胞或组织接触的任何生物液体如血液和/或血清。

在适当条件下将所选的生物标本与抗体混和，反应一定的时间以便足以形成免疫复合物(初级免疫复合物)，一般来说只要简单地把抗体组合物加到标本中，混和孵育的时间要足够使抗体与存在的抗原形成免疫复合物。孵育结束后，一般要洗涤标本-抗体组合物如组织切片，ELISA 板子，点杂交膜或 Western 杂交膜，以便去除非特异结合的抗体，使那些特异结合到初级免疫复合物上的抗体被检测到。

通常情况下，形成的抗体复合物的检测方法都是本领域所熟知的并且可以用许多方法。这些方法一般都是基于检测标记物，如那些放射性的、荧光的、生物的和酶的标记物。涉及上述标记物的使用方法的有美国专利 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 和 4,366,241。本文已纳入作为参

考。当然,如果使用第二结合配基如二抗和/或生物素和/或亲和素配基结合重排可能会有更多的优势,这也是本领域所熟知的。

用于检测的抗体可以直接连接标记物,这样仅仅检测这个标记物就可以知道组合物中初级免疫复合物的量。另外,结合在初级免疫复合物中的一抗的量也可以通过能与一抗结合的第二结合配基来确定。在这种方法中,第二结合配基连接一个可检测标记物。第二结合配基本身也常常是抗体,因此被称作“第二”抗体。在适当条件下初级免疫复合物与标记的第二结合配基或抗体结合,经过一段时间后就可以形成次级免疫复合物。然后洗涤刺激免疫复合物以去除非特异结合的第二抗体或配基,检测刺激免疫复合物中剩余的标记物。

还有一种方法是通过两步来检测初级免疫复合物。如上面所描述的,与一抗有结合活性的第二结合配基如抗体用于形成第二免疫复合物。洗涤后在适当条件下次级免疫复合物与能结合二抗的第三结合配基或抗体反应结合,经过一段时间后就可以形成免疫复合物(第三免疫复合物)。第三配基或抗体连接有可检测标记物,因此可以检测形成的第三免疫复合物。如果需要这以系统具有信号放大作用。

Charles Cantor 所设计一种免疫检测方法利用两种不同的抗体。在第一步中,生物素标记的单克隆或多克隆抗体用于检测靶抗原,第二步中的抗体用于检测生物素复合物中的生物素。在这种方法中,被检测的标本首先孵育在含有第一步抗体的溶液中。如果有靶抗原存在,有些抗体就会结合到抗原上形成生物素标记抗体/抗原复合物。抗体/抗原复合物通过在链亲和素(或亲和素)溶液、生物素标记 DNA 溶液和/或互补的生物素标记 DNA 溶液中分别孵育而得以放大,每一步都在抗体/抗原复合物上添加生物素位点。反复进行放大步骤直到达到合适的放大程度,然后将标本孵育在含有抗生物素的第二步抗体溶液中。第二步抗体是标记的,例如用酶标记,该酶可以通过用生色底物进行组织酶学试验而检测抗体/抗原复合物的存在。达到合适的放大倍数后,可以在显微镜下看到形成产生的复合物。

另外一种已知的免疫检测方法是利用免疫 PCR(多聚酶链式反应)。PCR 方法的步骤在与生物素孵育之前都是和 Cantor 的方法一致,只是不需要多轮链亲和素和生物素标记 DNA 孵育, DNA/生物素/链亲和素/抗体复合物用低 pH 或高盐溶液洗涤以释放抗体。所得到的洗涤液以适宜的引物和合适的对照进行 PCR 反应。至少在理论上,PCR 巨大的扩增能力和特异性可以检测到单个的抗原分子。

a. ELISA

如上所述,免疫分析的最简单和/或最直接意义在于结合分析。优选的免疫分析方法是本领域所熟知的各种酶联免疫吸附分析(ELISAs)和放射免疫分析(RIA)。用

于检测组织切片的免疫组化方法也很有用处。但是，很容易理解的是检测方法不仅限于这些方法，蛋白印迹、点杂交、流式细胞术和/或类似的方法都可以使用。

在一个典型的 ELISA 分析中，抗体被固定在具有蛋白亲和性的表面上，如聚苯乙烯微量滴定板的孔内。然后将怀疑含有抗原的检测组合物如临床标本加到孔内。结合一段时间并将非特异结合的免疫复合物洗去后检测结合的抗原。一般通过加入连接有标记物的另一种抗体来检测。这种 ELISA 称为简单的“夹心 ELISA”。也可以加入第二抗体，然后在加入能与第二抗体结合的第三抗体，其中的第三抗体连接有可检测标记物。

在另一种典型 ELISA 中，怀疑含有抗原的标本被固定在培养板孔的表面，然后与抗体反应。结合一段时间并将非特异结合的免疫复合物洗去后检测结合的抗体。如果初始抗体连接有可检测标记物，则可以直接检测免疫复合物。另外，也可以用能与第一抗体结合的第二抗体检测免疫复合物，其中第二抗体上连接有可检测标记物。

另外一种 ELISA 是将抗原固定，在检测的时候利用抗体的竞争作用。在这种 ELISA 方法中，针对抗原的标记抗体加到孔内，使之与抗原结合，然后检测标记物。未知标本中抗原的量可以通过在包被孔内将标本与标记抗体混和而确定。如果标本中存在抗原，则这些抗原可与抗体反应从而减少与孔内包被抗原结合的抗体数量，因而会降低最终的信号。这种方法也适于检测未知标本中抗体，其中未标记抗体与抗原包被孔结合后就会减少可与标记抗体结合的抗原数量。

不管使用的是哪一种类型的 ELISA，它们都有某些共同的特征，比如包被、孵育和结合、洗涤以去除非特异结合、以及检测结合的免疫复合物。这些过程描述如下：

用抗原活抗体包被培养板的方法一般是将抗原活抗体溶液在培养板的孔内孵育，过夜或特定一段时间。然后洗涤培养板的孔以去除不完全吸附的物质。然后对于抗血清来说无抗原性的非特异蛋白包被孔内剩余的表面，这些非特异蛋白包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉溶液。这种包被是为了封闭固定表面的非特异吸附位点，从而降低减少由于抗血清非特异结合到表面而引起的背景干扰。

对于 ELISA 检测方法来说，最常用的是使用第二或第三抗体检测方式而不是直接标记第一抗体的检测方式。因此，将蛋白或抗体结合到培养板的孔内后，用非反应性材料包被以降低背景干扰，洗涤去除未结合材料，然后在能有效促进免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下固定材料的表面与生物样品接触。免疫复合物的检测需要有标记的第二结合配基或抗体的参与，第二结合配基或抗体也可以和标记的第

三抗体或第三结合配基结合。

“能有效促进免疫复合物形成的条件”意味着该条件优选包含用溶液如 BSA、牛 γ 球蛋白(BGG)或磷酸盐(PBS)/Tween 稀释抗原和/或抗体。这些添加的试剂有助于降低非特异的背景干扰。

“合适的”条件也指孵育的温度和时间要足以形成有效结合。孵育时间一般为约 1 到 2 个或 4 个小时，优选的温度为 25 到 27℃，或在 4℃条件下过夜。

孵育步骤结束后，接触表面要洗涤以便去除非复合的物质。洗涤过程通常用溶液如 PBS/Tween 或硼酸盐缓冲液。试验样品和包被材料结合成特异性的免疫复合物并经过洗涤后，即使是微量的免疫复合物也可以被检测到。

本发明提供的一种检测方法是第二或第三抗体连接有标记物以便检测。这种标记物可能是酶，该酶与适当的生色底物混和后会产生颜色。因此，可以在适于形成进一步免疫复合物的条件下将第一和第二免疫复合物与尿素酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶连接的抗体接触或孵育一段时间。(即室温下在含 PBS 的溶液如 PBS-Tween 中孵育 2 小时)。

与标记的抗体孵育结束后，接下来就需要洗涤以去除非结合的物质，标记的量通过与生色底物如尿素、溴甲酚红紫、ABTS、或过氧化氢孵育而确定，以过氧化氢为底物时酶标记物为过氧化物酶。通过可见光分光光度计测定的所产生颜色的深度来定量。

b. 免疫组织化学

本发明的抗体也可用于和新鲜冷冻的和/或甲醛固定的、石蜡包埋的组织切片结合作免疫组化分析(IHC)。例如，可用免疫组化方法评价本发明的某些特定免疫毒素。由这些特定标本制成的组织切片已被成功用于各种预后因子的 IHC 研究，这些方法都是本领域普通技术人员所熟知的(Brown 等，1990；Abbondanzo 等，1990；allred 等，1990)。

简言之，冰冻切片的制备过程如下：在室温下将 50ng 冰冻的磨碎组织放到盛有磷酸盐缓冲液(PBS)的小塑料管中从新水化；离心沉淀颗粒；用各种包被介质(OCT)重悬之；颠倒小塑料管然后离心使之沉淀；在-70℃异戊烷中快速冰冻；切开塑料小管取出冰冻的组织柱；将组织柱固定到冷冻切片机的夹盘上；切成 25-50 个切片。

固定切片也可以同样方法制备，包括在小塑料管中从新水化 50mg 样品；重悬于 10%的甲醛中固定 4 小时；洗涤/颠倒；重悬于 2.5%的暖琼脂中；在冰水中冷却以使琼脂固化；从小管中取出组织/琼脂块；用石蜡浸润和/或包埋组织/琼脂块；切成 50 片固定切片。

II. 核酸分子

A. 编码天然蛋白或修饰蛋白的多聚核苷酸

本发明涉及多聚核苷酸, 该多聚核苷酸可从细胞中提取, 使从总基因组 DNA 中分离出来, 能表达蛋白或多肽的全部或部分序列。编码天然蛋白的多聚核苷酸可以被改造成编码修饰蛋白的多聚核苷酸。另外, 多聚核苷酸也可以编码修饰蛋白, 或者可以编码一个多聚核苷酸用于制备含有修饰蛋白的融合蛋白。例如, 多聚核苷酸可以编码多个部分, 如共价连接到靶向性多肽即肿瘤抗原上的修饰 gelonin 多肽。需要说明的是一个多聚核苷酸分子可以编码 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个不同的多肽(全部或部分序列)。表 2 中列出的任一多肽、蛋白或肽都可以作为本发明的一部分通过重组的方法制备。而且, 表 2 中列出的任一蛋白化合物都可以和表 2 中的或本文描述的一个或多个其他多肽一起由同一个核酸分子编码从而产生出一个融合蛋白。重组蛋白可以从产生活性蛋白的细胞中纯化。因此, 本发明的实施方式包括用核酸编码 SEQ ID NO:1 的全部或部分序列。这种核酸包括 SEQ ID NO:2 的全部或部分序列, 该序列于编码 gelonin 多肽的 cDNA 序列一致(GenBank 编号为 L12243)。因此, 需要说明的是本文所讨论的关于核酸的任何方法和组合物都适用于 SEQ ID NO:2。

本文所使用的术语“DNA 片段”是指从特定物种的基因组总 DNA 中分离出的 DNA 分子。因而编码多肽的 DNA 片段是指从哺乳动物或人基因组总 DNA 中分离或纯化出的含有野生型多形性的或突变的多肽编码序列的 DNA 片段。一个多肽或多个多肽、小于一个多肽的 DNA 片段、以及重组载体如质粒、粘粒、噬菌体、病毒及其类似物质也包括在术语“DNA 片段”的范围之内。

本申请所用的术语“多聚核苷酸”是指从基因组总核酸中分离出来的核酸分子。因而, “编码天然多肽的多聚核苷酸”是指从哺乳动物或人基因组总 DNA 中分离或纯化出的含有野生型或多形性的多肽编码序列的 DNA 片段。因而本申请所指的 gelonin 多聚核苷酸编码的 gelonin、“天然 gelonin 多肽”或“修饰 gelonin 多肽”的功能或活性意味着这个多聚核苷酸编码一个具有如 RIP 一样的酶解活性的分子。

术语“cDNA”通常是指以信使 RNA(mRNA)为模板制备的 DNA。与基因组 DNA 或从基因组非处理或部分处理 RNA 模板得来的 DNA 相比, 利用 cDNA 有许多优势, 因为 cDNA 含有相应蛋白的编码序列。但在有些情况下优选全部或部分基因组序列, 例如为了达到最佳表达而需要非编码区时或非编码区如内含子是反义治疗的靶位时。

还需要注意的是一个给定物种的特定多肽可以由天然突变体编码, 该突变体的

序列虽然有稍许不同但编码同一个蛋白(见上面的表 1)。

同样,一个含有分离的或纯化的野生型、多形性或突变型多肽基因的多聚核苷酸是指一个含有野生型、多形性或突变型多肽编码序列的 DNA 片段,在某些情况下也可能含有来自于其他天然发生基因或蛋白编码序列的调节序列。从这个意义上说,单纯用一个术语“基因”是指功能蛋白、多肽或肽编码单位。正如本领域普通技术人员所理解的那样,这一功能性术语可以涵盖能表达或经改造可以表达蛋白、多肽、蛋白区、肽、融合蛋白以及突变体的 DNA 序列、cDNA 序列以及小的基因工程基因片段。编码天然多肽或修饰多肽的全部或部分序列的核酸含有连续的核酸序列,该核酸可以编码上述多肽的全部或部分序列,其长度如下:至少或最大约为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 或更多个核苷酸、核苷或碱基对。如此长度的连续残基可用于本文所描述或讨论的任一核酸序列,包括 SEQ ID Nos:2-10。

在某些特定实施方式中,本发明涉及分离的 DNA 片段及其重组载体,该载体插入了一个编码野生型、多形性或修饰的多肽或肽的 DNA 序列,在多肽或肽氨基酸序列内含有与天然多肽一致或基本一致的氨基酸序列。因此,分离的 DNA 片段或含 DNA 片段的载体可以编码具有天然 gelonin 多肽所具有的核糖体灭活活性和特异性的修饰 gelonin 多肽,但是其氨基酸序列有所不同。术语“重组的”可以与多肽或特异性多肽的名称联用,一般指经过体外操作的或其体外复制产物的核酸分子所编码的多肽。

在另外一个实施方式中,本发明涉及分离的 DNA 片段及其重组载体,该载体插入了一个编码多肽或肽的 DNA 序列,在多肽或肽氨基酸序列内含有与天然多肽一致或基本一致的氨基酸序列。

用于本发明的核酸片段,不论其本身所具有的编码序列的长度,都可以与其他核酸序列相连接,这些序列如启动子、多聚腺苷酸信号、附加的限制性酶切位点、

多克隆位点、其他编码片段以及类似序列，因此其总长度的变化是相当大的。因而需要说明的是任意长度的核酸片段都可以使用，但是总长度最好有所限制以便更容易制备并易于用到需要的重组 DNA 操作中去。

需要说明的是本发明的核酸构建物可以编码任意来源的全长多肽，也可以编码多肽的截短版本，如截短的 gelonin 多肽，这样编码区转录子代表了截短的版本。因而截短的转录子翻译出来的是截短的蛋白。另外，核酸序列也可以编码一个全长多肽序列加上一个异源的编码序列，例如为了使多肽更好地纯化、转运、分泌、翻译后修饰、或者为了提高其治疗价值如靶向性或效力。正如上面所讨论的，修饰多肽编码序列上也可以连接一个标记或其他异源多肽，其中“异源的”是指这个多肽与修饰蛋白不一样。

在一个非限定性实施例中，制备一种或多种核酸构建物，该构建物含有与特定基因序列如 gelonin 毒素一致或互补的连续核苷酸序列。核酸构建物至少含有 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 15,000, 20,000, 30,000, 50,000, 100,000, 250,000, 500,000, 750,000, 到 1,000,000 个核苷酸，也可以是更长的构建物，甚至大到包括一个染色体大小(包括所有中间长度和中间范围)，也包括本领域的普通技术人员所熟知的核酸构建物如酵母人工染色体。容易理解的是“中间长度”和“中间范围”是指包括所引用数值或所引用数值之间的任一长度或范围(即包括上述数值或上述数值之间的所有整数)。

用于本发明的 DNA 片段所具有的生物功能是与修饰蛋白和修饰肽如修饰 gelonin 毒素一样的。这种序列是密码子冗余和功能等效的结果，已知核酸序列及其编码蛋白在自然条件下也会发生。另外，功能等效蛋白或肽也可以通过重组 DNA 技术生成，其中蛋白结构的改变可以在考虑所改变氨基酸特性的基础上用基因工程方法达到。可以利用位点特异性突变技术引入人工设计的变化，如改变蛋白的抗原性、降低蛋白在宿受试者内的毒性、或者增加包括蛋白在内的治疗方案的效力。

1. 载体

天然蛋白和修饰蛋白可以由插入到载体内的核酸分子编码。所用的术语“载体”指载体核酸分子，一段核酸分子可以插入其中，并被导入到细胞中进行复制。如果说一个核酸序列是“外源性的”则是指该核酸分子对于其载体导入细胞来说是外来的，或者虽然该核酸分子与细胞内的一个序列同源，但是宿主细胞核酸序列内的这个位置上不存在这样一个序列。载体包括质粒、粘粒、病毒(细菌噬菌体、动物病

毒和植物病毒)、以及人工染色体(如酵母人工染色体)。本领域的普通技术人员应该很熟练地掌握利用标准重组技术构建载体的方法,这些方法在文献 Sambrook 等, 1989 和 ausubel 等, 1996 中由描述, 本文已纳入作为参考。除了能编码修饰多肽如修饰 gelonin 外, 载体还可以编码未修饰多肽序列如标记物或靶向分子。编码这种融合蛋白的可用载体包括 pIN 载体(Inouye 等, 1985)、编码组氨酸链的载体、以及 pGEX 载体, 其中 pGEX 载体用于生产谷胱甘肽 S 转移酶(GST)可溶性融合蛋白以利于进一步纯化和分离或剪切。靶向分子可以引导修饰多肽到特定器官、组织、细胞或肌体内的其他位置。

术语“表达载体”指含有一个核酸序列的载体, 该核酸序列至少能编码被转录基因产物的一部分。在有些载体中 RNA 分子被翻译成蛋白、多肽或肽。而在另一些载体中, 这些序列是不翻译的, 例如只是转录为反义核酸分子或核酶。表达载体还可以含有各种“控制序列”, 这是指这些序列是转录以及调控区相连的编码序列在特定宿受试者内翻译所必须的。除了控制转录和翻译的控制序列以外, 载体和表达载体还可能含有下面所描述的执行其他功能的核苷酸序列。

a. 启动子和增强子

“启动子”是一种控制序列, 位于核苷酸序列的起始区, 控制转录的效率。启动子还可能含有调节蛋白和调节分子如 RNA 多聚酶和其他转录因子结合的元件。短语“调控区的”、“调控区相连的”、“控制下的”和“转录调控下的”是指启动子位于一段核酸序列的正确功能位置和/或正确功能走向上, 该序列可以控制基因的转录起始和/或表达。启动子可以连接一个也可以不连接“增强子”, 增强子是一个顺式作用元件, 也可以控制核酸序列的转录活动。

启动子可以是一个与基因或序列天然相连的序列, 可以从位于编码片段和/或外显子上游的 5'非编码区序列中分离。这样的启动子被称作是“内源性的”。同样, 增强子也可以是一个与核酸序列天然相连的序列, 位于核酸序列的下游或上游。另外, 将核酸编码片段置于一个重组的或异源的启动子控制之下可以有某些优点, 所谓的重组或异源启动子是指该启动子与其天然核苷酸序列不同。重组或异源增强子也是指该增强子与其天然核苷酸序列不同。这种启动子或增强子可能是其他基因的启动子或增强子、从其他原核细胞、病毒或真核细胞中分离的启动子或增强子、或者非“天然发生的”启动子或增强子, 即含有不同转录调节区的不同元件和/或能改变表达的突变体。除了通过人工合成制备启动子和增强子的核苷酸序列, 还可以利用与本文所描述的组合物有关的重组克隆和/或核酸扩增技术如 PCR™ 制备(见美国专利 4, 683, 202、5, 928, 906 号, 本文已纳入作为参考)。另外需要说明的是无核

细胞器如线粒体、叶绿体及类似物质内的控制基因转录和/或表达的调控序列也可用于本发明。

可以想见的是使用启动子和/或增强子是十分重要的,因为它们可以有效促进基因片段在其所表达的细胞、细胞器以及有机体内的表达。分子生物学领域的普通技术人员都知道如何选择启动子、增强子和特定细胞类型以使蛋白更好表达,例如参见 Sambrook 等(1989), 本文已纳入作为参考。所使用的启动子可以是组成的、组织特异性的、可诱导的、和/或在适当条件下可诱导导入 DNA 片段的高水平表达,在大规模制备重组蛋白和/或肽时特别有利。启动子可以是异源的也可以是内源的。

表 5 列出了几个本发明所使用的调节基因表达的元件/启动子。这个表并没有把启动基因表达的所有可能的元件都包括在内,只是举了一些例子。表 6 举了一些可诱导元件,这些元件是核酸序列上的一些可被特异刺激信号激活的区。

表 5 启动子和/或增强子	
启动子/增强子	参考文献
免疫球蛋白重链	Banerji 等, 1983; Gilles 等, 1983; Grosschedl 等, 1985; Atchinson 等, 1986, 1987; Imler 等, 1987; Weinberger 等, 1984; Kiledjian 等, 1988; Porton 等, 1990
免疫球蛋白轻链	Queen 等, 1983; Picard 等, 1984
T 细胞受体	Luria 等, 1987; Winoto 等, 1989; Redondo 等, 1990
HLA DQ α 和 DQ β	Sullivan 等, 1987
β 干扰素	Goodbourn 等, 1986; Fujita 等, 1987; Goodbourn 等, 1988
白细胞介素-2	Greene 等, 1989
白细胞介素-2 受体	Greene 等, 1989; Lin 等, 1990
MHC II 类 5	Koch 等, 1989
MHC II 类 HLA-DR α	Sherman 等, 1989
β -肌动蛋白	Kawamoto 等, 1988; Ng 等, 1989
肌肉肌酸激酶(MCK)	Jaynes 等, 1988; Horlick 等, 1989; Johnson 等, 1989
前白蛋白(甲状腺运载蛋白)	Costa 等, 1988
弹性蛋白酶 I	Ornitz 等, 1987
金属硫蛋白(MTII)	Karin 等, 1987; Culotta 等, 1989

胶原酶	Pinkert 等, 1987; Angel 等, 1987
白蛋白	Pinkert 等, 1987; Tronche 等, 1989, 1990
α -胎球蛋白	Godbout 等, 1988; Campere 等, 1989
γ -珠蛋白	Bodine 等, 1987; Perez-Stable 等, 1990
β -珠蛋白	Trudel 等, 1987
c-fos	Cohen 等, 1987; Treisman 等, 1986; Deschamps 等, 1985
c-HA-ras	Trimble 和 Hozumi, 1987
胰岛素	Edlund 等, 1985
神经细胞黏附分子(NCAM)	Hirsh 等, 1990
α_1 -antitrypsin	Latimer 等, 1990
H2B (TH2B) 组蛋白	Hwang 等, 1990
鼠和/或 I 型胶原	Ripe 等, 1989
葡萄糖调节蛋白 (GRP94 和 GRP78)	Chang 等, 1989
大鼠生长激素	Larsen 等, 1986
人血清淀粉样蛋白 A (SAA)	Edbrooke 等, 1989
肌钙蛋白 I (TN I)	Yutzey 等, 1989
血小板衍生生长因子 (PDGF)	Pech 等, 1989
Duchenne 型肌营养不良	Klamut 等, 1990
SV40	Banerji 等, 1981; Moreau 等, 1981; Sleight 等, 1985; Firak 等, 1986; Herr 等, 1986; Imbra 等, 1986; Kadesch 等, 1986; Wang 等, 1986; Ondek 等, 1987; Kuhl 等, 1987; Schaffner 等, 1988;
多瘤	Swartzendruber 等, 1975; Vasseur 等, 1980; Katinka 等, 1980, 1981; Tyndell 等, 1981; Dandolo 等, 1983; de Villiers 等, 1984; Hen 等, 1986; Satake 等, 1988; Campbell 和/或 Villarreal, 1988
逆转录病毒	Kriegler 等, 1982, 1983; Levinson 等, 1982; Kriegler 等, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze 等, 1986; Miksicek 等, 1986; Celander 等, 1987; Thiesen 等, 1988; Celander 等, 1988; Choi 等, 1988; Reisman

	等, 1989
乳头状瘤病毒	Campo 等, 1983; Lusky 等, 1983; Spandidos 和/或 Wilkie, 1983; Spalholz 等, 1985; Lusky 等, 1986; Cripe 等, 1987; Gloss 等, 1987; Hirochika 等, 1987; Stephens 等, 1987
乙肝病毒	Bulla 等, 1986; Jameel 等, 1986; Shaul 等, 1987; Spandau 等, 1988; Vannice 等, 1988
人免疫缺陷病毒	Muesing 等, 1987; Hauber 等, 1988; Jakobovits 等, 1988; Feng 等, 1988; Takebe 等, 1988; Rosen 等, 1988; Berkhout 等, 1989; Laspia 等, 1989; Sharp 等, 1989; Braddock 等, 1989
巨细胞病毒 (CMV)	Weber 等, 1984; Boshart 等, 1985; Foecking 等, 1986
长臂猿白细胞病毒	Holbrook 等, 1987; Quinn 等, 1989

表 6 可诱导元件

元件	诱导物	参考文献
MT II	佛波酯 (TPA) 重金属	Palmiter 等, 1982; Haslinger 等, 1985; Searle 等, 1985; Stuart 等, 1985; Imagawa 等, 1987; Karin 等, 1987; Angel 等, 1987b; McNeall 等, 1989
MMTV (鼠乳腺癌病毒)	糖皮质激素	Huang 等, 1981; Lee 等, 1981; Majors 等, 1983; Chandler 等, 1983; Lee 等, 1984; Ponta 等, 1985; Sakai 等, 1988
β -干扰素	Poly(rI)x Poly(rc)	Tavernier 等, 1983
腺病毒 5 E2	E1A	Imperial 等, 1984
胶原酶	佛波酯 (TPA)	Angel 等, 1987a
基质降解因子	佛波酯 (TPA)	Angel 等, 1987b
SV40	佛波酯 (TPA)	Angel 等, 1987b
鼠 MX 基因	干扰素, 鸡的病毒性肺炎及脑脊髓炎病毒	Hug 等, 1988

GRP78 基因	A23187	Resendez 等, 1988
α_2 -巨球蛋白	IL-6	Kunz 等, 1989
波形纤维蛋白	血清	Rittling 等, 1989
MHC I 类基因 H-2 κ b	干扰素	Blonar 等, 1989
HSP70	E1A, SV40 大 T 抗原	Taylor 等, 1989, 1990a, 1990b
多育曲菌素	佛波酯-TPA	Mordacq 等, 1989
肿瘤坏死因子	PMA	Hensel 等, 1989
甲状腺刺激因子 α 基因	甲状腺激素	Chatterjee 等, 1989

组织特异性启动子或元件的鉴别及其活性特征分析都是本领域普通技术人员所熟知的。这些区的例子包括人 LIMK2 基因(Nomoto 等, 1999), 生长抑素受体 2 基因(Kraus 等, 1998), 鼠附睾维甲酸结合基因(Lareyre 等, 1999), 人 CD4(Zhao-Emonet 等, 1998), 鼠 $\alpha 2(XI)$ 胶原(Tsumaki 等, 1998), D1A 多巴胺受体基因(Lee 等, 1997), 胰岛素样生长因子 II(Wu 等, 1997), 人血小板内皮细胞黏附分子-1(Almendo 等, 1996)。

b. 起始信号和内部核糖体结合位点

编码序列的有效翻译也需要特异性起始信号的参与。这些信号包括 ATG 起始密码子或其相邻序列。外源性的翻译调控信号, 包括 ATG 起始密码子, 也需要提供。本领域的普通技术人员很容易确定并提供必须的信号。大家都知道起始密码子必须与编码序列处于同一个阅读框架内以保证整个插入序列的完整翻译。外源性的翻译调控信号和起始密码子可以是天然的, 也可以是合成的。包含合适的转录增强子元件可以增强表达的效率。

在本发明的某些实施方式中, 内部核糖体进入位点(IRES)元件被用于产生多基因或多顺反子信使 RNA。IRES 元件可以使核糖体绕过 5'甲基化帽子而直接在内部的位点开始翻译(pelletier 和 Sonenberg, 1988)。来自细小核糖核酸病毒家族(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的两个 IRES 元件(pelletier 和 Sonenberg, 1988)和来自哺乳动物信使 RNA 的一个 IRES 元件(Macejak 和 Sarnow, 1991)已被分离出来。IRES 元件可以连接到异源开放阅读框架上。多个开放阅读框架可以一起转录, 每一个都被 IRES 分开, 形成多顺反子信使 RNA。由于有 IRES, 每一个开放阅读框架都可以结合核糖体而得以有效翻译。利用单个启动子/增强子转录出一个信使 RNA 可以使多个基因得以表达(见美国转录 5, 925, 565 号和 5, 935, 819 号, 本文已纳入作为参考)。

c. 多克隆位点

载体可以含有多克隆位点(MCS)，这是一个含有多个限制性酶切位点的核酸序列，任何一个酶切位点都可以用标准基因重组技术将载体切开(见 Carbonilli 等, 1999, Levenson 等, 1998, 及 Cocea, 1997, 本文已纳入作为参考)。“限制性内切酶消化”是指用酶催化裂解核酸分子，该酶只在核酸分子上的特定位置发挥功能。这些酶中的许多都是商品化的。这种酶的使用方法是本领域普通技术人员所熟知的。载体常常被限制性内切酶在 MCS 内切开成线性或片段以使外源序列连接到载体上。“连接”是指两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程，两个片段可以彼此相邻也可以不相邻。限制性酶切和连接反应都是重组技术领域的普通技术人员所熟知的。

d. 剪切位点

大多数转录的真核 RNA 分子需要经过剪切以去除初级转录子上的内含子。含有真核基因组序列的载体需要供体和/或受体的剪切位点以保证翻译成蛋白的转录子得以加工。

e. 末端信号

本发明的载体或构建物一般至少含有一个末端信号。“末端信号”或“终止子”是一段 DNA 序列，可以使 RNA 多聚酶合成的 RNA 转录子特异性终止。因此，在某些实施方式中，需要考虑末端信号以使 RNA 转录子合成终止。要在体内达到预期的信使 RNA 水平就需要终止子。

在真核细胞体系中，终止子区域还含有特异性 DNA 序列以使新的转录子经位点特异性剪切后暴露出多聚腺苷酸位点。这个序列可以使特异的内源性多聚酶将一个约 200 腺苷酸残基片段(polyA)加到转录子的 3'末端。加上这种 polyA 尾巴的 RNA 分子更稳定并且翻译效率更高。因此在某些含有真核细胞的实施方式中，较佳的是含有 RNA 剪切信号的终止子，更佳的是含有多聚腺苷酸尾巴的终止子。终止子和/或多聚腺苷酸位点元件可以增加信使 RNA 水平和/或防止核糖体从一个阅读框架进入其他序列。

本发明所考虑使用的终止子包括本文所描述的或本领域普通技术人员所熟知的任何已知的转录终止子，其中包括而限于基因的终止序列如牛生长激素终止子，或者病毒终止子序列如 SV40 终止子。在某些实施方式中，终止信号可以缺少可转录或可翻译序列，如由于序列被截短的原因。

f. 多聚腺苷酸信号

基因表达，特别是真核细胞基因表达一般都含有一个多聚腺苷酸信号以产生正

确的多聚腺苷酸化的转录子。多聚腺苷酸信号的特性对于成功实现本发明并不是关键的，并且任何一个这种信号都可以使用。优选的实施方式包括 SV40 多聚腺苷酸信号和/或牛生长激素多聚腺苷酸信号，以方便在各种靶细胞内更好地发挥功能。多聚腺苷酸化可以增加转录子的稳定性，或者促进转录子的胞浆转运。

g. 复制起始区

为了使载体在宿主细胞内繁殖，需要一个或多个复制起始区(常被称作“ori”)，这是一个特异性核酸序列，复制从这里开始。另外如果宿主细胞是酵母也可以使用自主复制序列(ARS)。

h. 筛选标记

在本发明的某些实施方式中，含有本发明核酸构建物的细胞在体内或体外可以通过在表达载体上连接一个标记而被筛选出来。这种标记可以赋予细胞一种可筛选表型从而使含有表达载体的细胞容易被筛选出来。一般来说筛选标记是指可以赋予可筛选特性的序列。正筛选标记是指有这个标记就可以被筛选出来，而负筛选标记则是指存在这个标记的细胞不被筛选。正筛选标记的例子有药物耐药标记。

一般来说含有一个药物筛选标记有助于转化子的克隆形成及鉴定，例如对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、zeocin 以及组胺醇耐药的基因都可以作为筛选标记。筛选标记可以赋予转化子一定的表型从而使含有筛选标记的转化子可以被鉴别出来，另外还有一类可筛选标记如 GFP，其原理是比色分析，也可以考虑。另外，可筛选酶如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)也可以使用。本领域普通技术人员应该知道如何使用免疫性标记，这些标记一般要配合 FACS 分析。具体使用哪一种标记并不重要，只要标记能和编码基因产物的核酸一起表达就可以。可筛选标记的其他例子也是本领域普通技术人员所熟知的。

2. 宿主细胞

本文所用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以替换使用。所有这些术语也包括其传代细胞，即这些细胞所分裂产生的任何细胞及全部细胞。可以理解的是传代细胞可以是不一致的，这是由于细微的或随机的突变所造成的。对于表达一个异源核酸序列来说，“宿主细胞”是指原核细胞或真核细胞，包括任何可转化的有机体，这些有机体可以使载体在其内复制，和/或载体编码的异源基因在其内表达。宿主细胞可以并且已经用作载体的受体。宿主细胞“可转染”或“可转化”是指外源核酸如修饰蛋白编码序列可以被导入或引入宿主细胞中。可转化细胞包括原代细胞及其传代细胞。

宿主细胞可以来源于原核细胞，也可以来源于真核细胞，包括酵母细胞、昆虫

细胞和哺乳动物细胞,具体选择何种宿主细胞主要考虑所期望的结果是载体的复制还是部分或全部载体编码核酸的表达。许多细胞系及其培养物可作为宿主细胞,可以从美国典型培养物收集中心(ATCC)获得,这是一个专门保存活培养物和基因材料的机构(www.atcc.org)。根据载体的结构和所期望的结果,本领域的普通技术人员可以确定合适的宿主细胞。例如,质粒或粘粒可以被导入到原核细胞中而获得大量复制。用于载体复制和/或表达的细菌宿主细胞有 DH5 α , JM109 和 KC8, 另外还有许多商业化的细菌宿主细胞如 SURE® Competent Cells 和 SOLOPACK™ Gold Cells(STRARAGENE®, La Jolla)。另外,细菌细胞如大肠杆菌 LE392 也可作为噬菌体病毒的宿主细胞。合适作宿主细胞的酵母包括 *Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces pombe* 和 *Pichia pastoris*。

用于载体复制和/或表达的真核宿主细胞包括 Hela、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos 和 PC12。本领域的普通技术人员应该知道来源于各类细胞和有机体的宿主细胞都可以使用。同样,病毒载体可以与真核宿主细胞或原核宿主细胞联合使用,特别是用于载体复制和/或表达的宿主细胞。

有些载体含有调控序列从而使其在原核细胞和真核细胞中都能复制和/或表达。本领域普通技术人员应进一步了解培养上述所有宿主细胞的条件以使载体在细胞内得以保留和复制。还应了解大规模制备载体以及制备载体编码核酸及其表达的多肽、蛋白或肽的技术和条件。

3. 表达系统

现有的许多表达系统都含有上述组合物的全部或至少一部分。原核和/或真核表达系统都可用于本发明以制备核酸序列及其编码的多肽、蛋白和肽。许多这样的表达系统已经是商业化的并且被广泛应用。

昆虫细胞/杆状病毒系统可以使异源核酸片段达到高水平的蛋白表达,该系统在美国专利 5,871,986 和 4,879,236 好中有描述,本文已纳入作为参考。这个系统可以买到,如 INVITROGEN®的 MAXBAC®2.0 以及 CLONTECH®的 BACPACK™ 杆状病毒表达系统。

除了本发明所描述的表达系统外,其他的表达系统包括 STRATAGENE's COMPLETE CONTROL™ 的可诱导哺乳动物表达系统,该系统内含有一个合成的蜕化素可诱导受体,或者该公司的 pET 表达系统,这是一个大肠杆菌表达系统。另外的可诱导表达系统有 INVITROGEN®的 T-REX™(四环素调节表达)系统,这是一个含有全长 CMV 启动子的哺乳动物表达系统。INVITROGEN®还有一个酵母表达系统叫 *Pichia methanolica* 表达系统,这个系统可以使重组蛋白在 methylotrophic 酵母

Pichia methanolica 内高效表达。本领域的普通技术人员还应该知道如何使一个载体如表达构建物产生核酸序列或其编码的多肽、蛋白或肽。

4. 病毒载体

有许多方法可以将表达载体导入到细胞内。在本发明的某些特定实施方式中，表达载体含有一个病毒序列或病毒基因组来源的人工载体。某些病毒能够通过受体介导的内吞作用进入细胞并整合到宿主基因组中，从而使病毒基因得以稳定而高效表达，因此病毒载体是将外源基因导入到哺乳动物细胞内的较佳候选者(Ridgeway, 1988; Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Temin, 1986)。首先被用作基因载体的病毒是 DNA 病毒，包括乳头多瘤空泡病毒(类人猿病毒、牛乳头状病毒和多瘤病毒)(Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)和腺病毒(Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)。但是这些病毒载体携带外源 DNA 序列的能力相对较低并且宿主谱也较窄。而且这些病毒在感染宿主细胞后可能成为潜在的致癌基因以及具有细胞病理效应，因此引起了对它们安全性的关注。这类病毒载体最大只能插入 8kb 的外源基因但是很容易感染各种细胞系和试验动物(Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Temin, 1986)。

逆转录病毒是一类单链 RNA 病毒，其共同的特征是在感染细胞内将自己的 RNA 转变成双链 DNA；也可以用作载体。其他病毒也可以用于制备本发明的表达构建物。病毒如牛痘病毒(Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Coupar 等, 1988)、腺相关病毒(AAV)(Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Hermonat 和 Muzycska, 1984)和疱疹病毒来源的载体也可用于本发明中。对于哺乳动物细胞来说这些载体提供了几个有吸引力的特征(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Coupar 等, 1988; Horwich 等, 1990)。

B. 核酸检测

本文所描述的核酸序列除了用于表达人工毒素和修饰蛋白、多肽和/或肽之外还有许多用途。例如，在包括核酸杂交的实施方式中可用作探针或引物。编码修饰蛋白或人工毒素的核酸的检测也包含在本发明中。

1. 杂交

用 13 到 100 个核苷酸长度的探针或引物进行杂交可以形成稳定而特异的双螺旋分子，优选 17 到 100 个核苷酸长度，在本发明的某些方面甚至可以达到 1-2kb 或更长。一般优选含有大于 20 个碱基长度的连续互补序列的分子以增加杂交分子的稳定性和/或特异性。一般来说较佳的是设计含有一个或多个 20-30bp 互补序列的分子进行杂交，如果需要也可以更长。这种片段易于制备，例如可以用化学方法直

接合成，或者通过将一段序列插入到重组载体中扩增探针或引物。

因此，本发明的核酸序列可用于与互补的DNA和/或RNA形成特异的双螺旋分子，或者作为引物从标本中扩增DNA或RNA。根据用途的不同可以使用各种杂交条件以达到特异性探针不同程度的结合或引物与靶序列的结合。

如果要达到高特异性，就要选择相对严格的杂交条件。例如相对较低的盐浓度和较高的温度，比如约0.02M-0.10M的NaCl，温度为约50-70℃。如此严格的条件就很少出现探针或引物与模板或靶序列之间的错配，因此特别适于分离特异性基因或检测特异性mRNA转录子。一般优选通过增加加入的甲酰胺的量来使反应条件更严格。

对于某些特定的用途，例如位点特异性突变，优选较低严格性的反应条件。在此条件下即使两条链的序列并不是严格互补也可以形成杂交分子，但是会在一个或多个位置上出现错配。可以通过增加盐浓度和/或提高反应温度来降低反应条件的严格程度。例如中度严格的条件可能是约0.1M-0.25M的NaCl，温度为约37-55℃，较低严格程度的条件是约0.15M-0.9M的NaCl，温度为约20-55℃。杂交条件根据所期望的结果很容易调整。

在另外一些实施方式中，杂交在以下条件下完成：50mM Tris-HCl (pH 8.3)，75mM KCl，3mM MgCl₂、1.0mM 二硫苏糖醇，温度为约20-37℃。其他杂交条件可能包括约10mM Tris-HCl (pH 8.3)，50mM KCl，1.5mM MgCl₂，温度为约42-72℃。

在某些实施方式中，较佳的是利用本发明的核酸序列和合适的确认杂交的方式如标记物。各种合适的指示剂都是本领域所熟知的，包括荧光、放射性的、酶的、或其他配基如亲和素/生物素，都可以被检测到。在优选实施方式中，可以使用荧光标记物或酶标记物如尿素酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶代替放射性的或其他易对环境造成污染的标记物。对于酶标记物来说，通过生色指示底物可以提供一种可见的或可用分光光度计检测的检测方式来确定与标本中互补核酸分子形成了特异性杂交产物。

总之，本文所描述的探针或引物可以作为试剂用于液体杂交如PCRTM以检测相应基因的表达，也可以用于某些固相杂交的实施方式中。在固相杂交实施方式中，被检测的DNA(或RNA)被吸附或固定在特定的基质或表面上，然后将这种固定的单链核酸与特定的探针在预设的条件下杂交。杂交条件的选择要依据特定的环境(如G+C含量，靶核酸类型，核酸的来源，探针的大小等)。根据特定用途如何选择最佳的杂交条件是本领域普通技术人员所熟知的。杂交分子洗涤以去掉非特异结合的探针分子后就可以通过检测结合的标记物的量来确定杂交的结果。有代表性的固相

杂交方法见美国专利 5,843,663、5,900,481 和 5,919,626 号。可用于实施本发明的其他杂交方法见美国专利 5,849,481、5,849,486 和 5,851,772 号。本方法的相关文献以及说明书中本部分的其他文献都已纳入本文作为参考。

2. 核酸的扩增

用作模板进行扩增的核酸分子可以根据标准方法(Sambrook 等, 1989)从细胞组织或其他标本中分离。在某些实施方式中,分析可以直接在完整细胞、组织匀浆物或生物液体标本上进行而不需要提取模板核酸。模板核酸可以是基因组 DNA,提取的或完整细胞的 RNA。如果用 RNA 就需要先将 RNA 转录成互补的 DNA。

本文所用的术语“引物”包括能够以模板依赖的方式引导初始核酸分子合成的任何核酸。一般的引物都是含有 10 到 20 或 30 个碱基对的寡核苷酸,但是也可以更长。引物可以是双链的也可以是单链的,但是优选单链形式。

可与 SEQ ID NO:1 或其他 SEQ ID NO 核酸特异性杂交的引物对在适宜的条件下与模板核酸反应。根据杂交目的的不同选择不同的杂交条件,选择较严格的杂交条件是为了只允许完全互补的序列与引物杂交。而在另外一些实施方式中,杂交在较低严格性的条件下进行,从而使那些含有一个或多个与引物序列不匹配碱基的核酸分子得以扩增。杂交后将模板-引物复合物与一种或多种酶混和以促进模板依赖的核酸合成。经过多轮扩增,也就是所说的“循环”,就可以得到足量的扩增产物。

扩增产物可以被检测或定量。对于某些杂交可用可见方式检测。另外也可以通过化学发光、放射性闪烁扫描掺入的放射标记或荧光标记、甚至通过电脉冲和/或热脉冲信号检测系统(Sffymax technology; Bellus, 1994)间接确定扩增产物的量。

有许多模板依赖的方法可被用于扩增给定模板标本中的寡核苷酸序列。一个最常用的扩增方法使多聚酶链式反应(指“PCRTM”),详细描述见美国专利 4,683,195, 4,683,202 和 4,800,159 号以及 Innis 等, 1988, 本文都已完整纳入作为参考。

反转录 PCRTM 扩增方法可以确定所扩增的 mRNA 的量。将 RNA 反转录成 cDNA 的方法是本领域所熟知的(见, Sambrook 等, 1989)。另外反转录的方法使用热稳定性的 DNA 多聚酶。这些方法描述于 WO 90/07461。多聚酶链式反应的方法是本领域所熟知的。其中有代表性的 RT-PCR 方法描述于美国专利 5,882,864 号。

其他的扩增方法有连接酶链式反应(“LCR”), 见欧洲专利申请 320308 号, 本文已完整纳入作为参考。美国专利 4,883,750 号描述了一个与 LCR 相似的方法, 该方法是将探针对与靶序列结合。美国专利 5,912,148 号所描述的基于 PCRTM 和寡核苷酸连接酶分析(OLA)的方法也可用于扩增。

还有一些扩增本发明所用靶核酸序列的方法是描述在美国专利 5,843,650,

5,846,709, 5,846,783, 5,849,546, 5,849,497, 5,849,547, 5,858,652, 5,886,366, 5,916,776, 5,922,574, 5,928,905, 5,928,906, 5,932,451, 5,935,825, 5,939,291, 5,942,391 号, 英国专利申请 2 202 328 号以及 PCT 申请 PCT/US89/01025 号, 本文已完整纳入作为参考。

PCT 申请 PCT/US87/00880 号所描述的 Qbeta 复制酶也可用于本发明的扩增方法。该方法中, 在 RNA 多聚酶存在的条件下将含有与靶序列互补区的 RNA 复制序列加入到标本中, 多聚酶就会拷贝复制序列, 然后就可以检测复制的序列。

一种等温扩增方法也可用于扩增本发明的核酸分子, 该方法中的限制性内切酶和连接酶用于扩增在一条链上含有核苷酸 5'-[α -硫代]-三磷酸限制性酶切位点的靶分子(Walker 等, 1992)。美国专利 5,916,779 号描述的链替换扩增(SDA)是另一种等温扩增核酸的方法, 该方法需要进行多轮链替换和合成, 即缺刻翻译。

其他的核酸扩增方法有以转录为基础的扩增系统(TAS), 包括基于核酸序列的扩增(NASBA)和 3SR(Kwoh 等, 1989; PCT 专利申请 WO 88/10315 号, 本文已纳入作为参考)。欧洲专利申请 329 822 号描述了一种核酸扩增方法包括循环合成单链 RNA(“ssRNA”)、ssDNA 和双链 DNA(“dsDNA”), 该方法也可用于本发明。

PCT 专利申请 WO 89/06700 号(本文已完整纳入作为参考)描述了一种核酸序列扩增方法, 该方法是通过将启动子区/引物序列与单链靶 DNA(“ssDNA”)杂交然后转录出大量的 RNA 拷贝。这种方法不是循环性的, 即合成出的 RNA 转录子不能作为新的模板。其他的扩增方法包括“RACE”和“单面 PCR”(Frohman, 1990; Ohara 等, 1989)。

3. 核酸的检测

扩增以后就需要将扩增产物与模板和/或剩余引物分离。在一个实施方式中, 扩增产物用标准方法通过琼脂糖、琼脂糖-丙稀酰胺或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(Sambrook 等, 1989)。分离开的扩增产物可以从凝胶中切下并洗脱出来进行下一步的操作。例如利用低熔点琼脂糖凝胶, 切下的条带通过加热可以去除琼脂糖, 然后可以提取出核酸。

核酸的分离也可以用本领域所熟知的层析技术进行。有许多种层析技术都可用于实现本发明, 其中包括吸附层析、分配层析、离子交换层析、羟磷灰石层析、分子排阻层析、反相层析、柱层析、纸层析、薄层层析、气相色谱以及 HPLC。

在某些实施方式中, 扩增产物是可见的。典型的观察方法是用溴化乙啶将凝胶染色然后在紫外灯下观察显色的条带。另外, 如果扩增产物中含有放射性或荧光标记的核苷酸, 分离的扩增产物就可以使 X 射线胶片曝光或者可以在适当的激发波长

下被看到。

在一个实施方式中，分离出扩增产物后将标记的核酸探针与扩增的标记序列结合。优选的探针是连接发色基团的，但是也可以用放射性标记。在另一个实施方式中，探针与结合伴侣如抗体、生物素或其他携带可检测基团的结合伴侣相连。

在某些特定实施方式中，检测是通过 DNA 印迹法与标记探针杂交。DNA 印迹法技术是本领域普通技术人员所熟知的(见 Sambrook 等, 1989)。上述方法的一个例子描述在美国专利 5,279,721 中，本文已纳入作为参考，该转录描述了核酸电泳及转移的装置和方法。该装置不需要在外部操作凝胶就可以进行电泳和杂交，因此很适于执行本发明的方法。

核酸检测的其他方法也可用于实现本发明，这些方法描述于美国专利 5,840,873, 5,843,651, 5,846,708, 5,846,717, 5,846,726, 5,846,729, 5,849,487, 5,853,990, 5,853,992, 5,853,993, 5,856,092, 5,861,244, 5,863,732, 5,863,753, 5,866,331, 5,905,024, 5,910,407, 5,912,124, 5,912,145, 5,919,630, 5,925,517, 5,928,862, 5,928,869, 5,929,227, 5,932,413, 和 5,935,791。本文已全部纳入作为参考。

4. 其他分析

其他基因筛选方法也可用于本发明的范围内，例如，检测基因组 DNA、cDNA 和/或 RNA 标本中的基因突变。用于检测点突变的方法包括变性梯度凝胶电泳(“DGGE”)、限制性片段长度多态性分析(“RFLP”)、化学或酶裂解方法、PCR™ 扩增的靶区直接测序(见上)、单链构象多态性(“SSCP”)和本领域熟知的其他方法。

一种筛选点突变的方法是基于 Rnase 裂解 RNA/DNA 或 RNA/RNA 异源双螺旋中错配的碱基对。本文所用的术语“错配”是指双链 RNA/RNA、RNA/DNA 或 DNA/DNA 分子中的具有一个或多个未配对或错误配对核苷酸的区域。因此这一定义包括那些由于插入/缺失突变以及单个或多个碱基点突变造成的错配。

美国专利 4,946,773 号描述了一种 Rnase A 错配裂解分析方法，该方法是经过退火使单链 DNA 或 RNA 检测样品与 RNA 探针结合，然后用 Rnase A 处理所形成的核酸双螺旋。经电泳后 Rnase A 处理单链产物根据大小不同而分开，然后通过同样处理的对照双螺旋核酸相比较可以检测出错配的碱基。在对照双螺旋核酸中无法看到的含有较小片段的样品(裂解产物)为阳性。

其他研究人员设计了用 RNase I 检测错配的方法，该方法见于 Promega Biotech 公司的文献中。Promega 公司推出了一种含有 RNase I 的试剂盒，该酶可以裂解已知的四个错配中的三个。其他人用 MutS 蛋白或其他 DNA 修复酶来检测单个碱基的

错配。

另外,检测缺失、插入或替代突变的方法也可用于实现本发明,见美国专利 5,849,483, 5,851,770, 5,866,337, 5,925,525 和 5,928,870 号,本文都已完整纳入作为参考。

C. 基因转导方法

合适的核酸转移方法可以使本发明的组合物得以表达,这些方法包括任何将核酸(即 DNA,包括病毒或非病毒载体)导入到细胞器、细胞、组织或有机体中去的方法,如本文所描述的或本领域普通技术人员所熟知的。这种方法包括而不限于:直接导入 DNA 如通过注射(美国专利 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 和 5,580,859, 本文都已纳入作为参考),其中包括微注射(Harlan 和 Weintraub, 1985; 美国专利 5,384,253 号, 本文已纳入作为参考);点穿孔(美国专利 5,384,253 号, 本文已纳入作为参考);钙磷酸盐沉淀(Graham 和 Van Der Eb, 1973; Chen 和 Okayama, 1987; Rippe 等, 1990);用 DEAE-葡聚糖然后用聚乙烯甘油(Gopal, 1985);直接声波负荷(Fechheimer 等, 1987);脂质体介导的转染(Nicolau 和 Sene, 1982; Fraley 等, 1979; Nicolau 等, 1987; Wong 等, 1980; Kaneda 等, 1989; Kato 等, 1991);微发射轰击(PCT 专利申请 WO 94/09699 和 95/06128 号;美国专利 5,610,042, 5,322,783, 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 和 5,538,880, 本文都已纳入作为参考);碳化硅纤维搅拌(Kaeppler 等, 1990; 美国专利 5,302,523 和 5,464,765 号, 本文都已纳入作为参考);土壤杆菌介导的转化(美国专利 5,591,616 和 5,563,055 号, 本文都已纳入作为参考);PEG 介导的原生质体转化(Omirulלה 等, 1993; 美国专利 4,684,611 和 4,952,500 号, 本文都已纳入作为参考);干燥/抑制介导的 DNA 摄取(Potrykus 等, 1985)。通过上述的方法,细胞器、细胞、组织或有机体可以被稳定或瞬时转化。

III. 核糖体灭活蛋白

核糖体抑制毒素(RITs)是真核细胞蛋白合成强力抑制剂。一旦细胞内这些蛋白上的酶催化区可以作为细胞毒性的 n-糖苷酶催化灭活核糖体。这种灭活是通过裂解 28srRNA 4324 位置上的腺嘌呤的 n 糖苷键来实现的,通过破坏延长因子的结合位点来达到核糖体的不可逆灭活。RITs 起初是从细菌中分离的,但在高等植物中最常见。在植物中有两种类型的 RITs: I 型毒素是单链多肽,具有核糖体抑制活性;II 型毒素的 A 链与 I 型蛋白一样,并且通过二硫键与 B 链相连, B 链具有细胞结合活性。I 型 RITs 的例子有 gelonin, dodecandrin, tricosanthin, tricokirin, bryodin, 紫茉莉抗病毒蛋白, 大麦核糖体灭活蛋白(BRIP), 商陆抗病毒蛋白,

saporins, luffins 和 momordins。II 型毒素包括蓖麻毒蛋白和相思豆毒蛋白。毒素可以和本文所描述的任一多肽结合或作为融合蛋白表达。另外,本发明的修饰蛋白还可以和小分子如化疗药或靶向药物连接。

A. 免疫毒素

本发明的毒素特别适于用作细胞毒治疗药物的组分。这些细胞毒药物可以用于体内以选择性的清除特定类型的细胞,其中第二组分所具有的特异性结合能力可以引导毒素到达这些特定细胞内。本发明的修饰毒素可以和单克隆抗体包括嵌合的或 CDR 嫁接的抗体、抗体区/片段(即 Fab, Fab', F(ab') sub. 2, 单链抗体, Fv 或单个可变区)结合形成细胞毒药物。含有毒素的免疫结合物被称为免疫毒素。免疫毒素也可以由融合蛋白而不是免疫结合物组成。

连接含有用基因工程技术添加自由半胱氨酸残基的单克隆抗体的修饰毒素也包括在本发明的范围之内。本发明中 Fab' 和 F(ab') sub. 2 的例子见 PCT 申请 WO 89/00999 号中的描述, 本文已纳入作为参考。

另外, 修饰毒素也可以连接或融合人源化的或人工的抗体。这种人源化的抗体可从鼠抗体可变区开始构建。

1. 抗体区

来自各种免疫球蛋白家族的区都包括在本发明的范围之内。来自特异性抗体的两个可变区都包括在本发明中, 其中包括补体决定区(CDRs), 还有抗体中和区, 其中包括那些可结合效应分子的区如 Fc 区。抗体的抗原特异性编码区如 IgGs、IgMs 或 IgAs 的可变区可以结合另外的分子如与抗体中和区或一种上述的治疗化合物结合的毒素。

在另外一个实施方式中, 一个基因可以含有一个单链抗体。制备单链抗体的方法是本领域普通技术人员所熟知的。熟练技术人员可以参考美国专利 5, 359, 046 号(本文已纳入作为参考)使用这些方法。单链抗体的制备是通过将重链和轻链的可变区用一个短肽接头融合而成的, 因此在这种单链分子上的抗原结合位点是从新形成的。

通过一个含有 15 到 25 个氨基酸的肽或接头将一个可变区的 C 端与另一个可变区的 N 端连接在一起就形成了一个单链抗体可变区(scFvs), 这种连接不会明显影响抗体的抗原结合或结合特异性(Bedzyk 等, 1990; Chaudhary 等, 1990)。这些 Fvs 缺乏天然抗体所具有的重链和轻链的恒定区(Fc)。含有单链抗体的免疫毒素在美国专利 6, 099, 842 号中有描述, 本文特地纳入作为参考。

针对各种分子如癌基因、肿瘤相关抗原、细胞因子、生长因子、激素、酶、转

录因子或受体的抗体都是本发明的考虑范围。其他要考虑的还有抗血清、血管生成因子(VEGF/VPF; β FGF; α FGF;及其他)、凝集因子、以及血管生成所必须的内皮细胞抗原(即 V3 整合素)。特别是生长因子如转化生长因子、成纤维细胞生长因子和血小板衍生生长因子(PDGF)及其家族成员。

本发明还包括一些靶向性组合物, 这些组合物或者含有抗原特异性序列而针对特异性病原, 或者可以识别细胞表面的标记物而针对特定细胞类型。这种细胞表面标记物的例子有肿瘤相关抗原或细胞类型特异性标记物如 CD4 或 CD8。

本发明的抗体可以作为免疫毒素的一部分而靶向任何一种抗原。抗原可以是某种有机体、某种类型的细胞或某种疾病或病原特异性的。典型的这种抗原包括细胞表面蛋白如肿瘤相关抗原、病毒蛋白、微生物蛋白、翻译后修饰物或碳水化合物、以及受体。普通的肿瘤标记物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿系肿瘤相关抗原、胚胎抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis 抗原、MucA、MucB、PLAP, 雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B 和 p155。其他可以作为靶位的抗原包括 EGF 和 VEGF 的受体、TIE-1 和 TIE-2、CD-33、CD38、CD-20、CD-52、GP-240、Lym-1、MMO-2 和 MMP-9。

利用介导蛋白-蛋白相互作用, 其中包括配基-受体相互作用的蛋白质区域也是本发明所关注的。这个区域可以作为蛋白-蛋白相互作用的抑制剂或竞争物, 或者作为一个特异性靶向基序。因此, 本发明包括利用靶向序列引导毒素或其他治疗或诊断多肽到达身体的特定部位、器官、组织或细胞。一旦本发明的化合物通过其靶向基序到达特定区域, 毒素或其他多肽就可以发挥其功能。

靶向序列可以利用蛋白-蛋白相互作用的优势。其中包括蛋白之间的相互作用, 如受体和配基; 受体和受体; 多聚复合物; 转录因子; 激酶及其下游的靶标; 酶和底物等。例如配基结合区可以介导配基与其同源受体之间的蛋白: 蛋白相互作用。因此这一区域可以用作抑制内源性配基结合或与内源性配基竞争, 或者用于靶向较特异的细胞, 这些细胞表达能识别配基结合区的受体, 该结合区是人工连接到治疗多肽上的, 如 gelonin 毒素。

配基结合区的例子包括配基如 VEGF/VPF; β FGF; α FGF; 黏附因子以及血管生成所必须的内皮细胞抗原(即 V3 整合素); 生长因子如转化生长因子、成纤维细胞生长因子、集落刺激因子、Kit 配基(KL)、flk-2/flt-3 和血小板衍生生长因子(PDGF)及其家族成员; 能结合细胞表面受体如 MHC 分子的配基。

研究最多的配基是 asialoorosomucoid(ASOR)(Wu 和 Wu, 1987)和转铁蛋白(Wagner 等, 1990)。最近一个合成的新糖蛋白已被用作基因转移载体, 该蛋白和

ASOR 识别同一个受体(Ferkol 等, 1993; Perales 等, 1994), 表皮生长因子(EGF) 也被用于将基因转移到鳞癌细胞中(Myers, EPO 0273085)。

在另一个实施方式中, Nicolau 等人(1987)将乳糖-神经酰胺, 一种含半乳糖末端的 asialganglioside, 掺入到脂质体中, 观察到可以增加肝细胞对胰岛素基因的摄取。另外, 人前列腺特异性抗原也可以作为受体介导基因转移到前列腺组织中。

在其他的实施方式中, 凝集素分子也可用于引导化合物到达在其表面表达特定碳水化合物的细胞内。

1. 细胞因子

本发明涉及的另一类化合物可以人工连接到治疗多肽如毒素上, 其中包括白细胞介素和细胞因子, 如白细胞介素 1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、 β -干扰素、 α -干扰素、 γ -干扰素、血管他丁、血小板反应素、内皮他丁、METH-1、METH-2, Flk2/Flt3 配基、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、以及肿瘤坏死因子(TNF)。

2. 生长因子

在本发明的另外一些实施方式中, 生长因子或配基也可以和治疗药物组成复合物。其中包括 VEGF/VPF、FGF、TGF β 、与 TIE 结合的配基、肿瘤相关纤维连接蛋白同功酶、扩散因子、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板因子(PF4)、PDGF、Kit 配基(KL)、集落刺激因子(CSFs)、LIF 和 TIMP。

3. 细胞增殖诱导子

可以与本发明的修饰蛋白如修饰 gelonin 毒素结合的另一组蛋白质包括能诱导细胞增殖的蛋白质。在一些实施方式中, 毒素被人工连接到一种能灭活细胞增殖诱导子的核酶上, 而在另外一些实施方式中, 毒素被连接到诱导子上。另外, 毒素也可以连接到能识别细胞增殖诱导子的抗体上。

所有这些蛋白有一个共性就是其调节细胞增殖的能力。例如, 一种形式的 PDGF 是 sis 癌基因, 也是一种分泌型的生长因子。癌基因很少来自于编码生长因子的基因。但是在本发明中 sis 是唯一已知的天然癌基因性生长因子。在本发明的另一个实施方式中, 针对特定细胞增殖诱导子的反义 mRNA 被用于抑制该细胞增殖诱导子的表达。

蛋白质 FMS、ErbA、ErbB 和 neu 是生长因子受体。这些受体发生突变会导致其调节功能的丧失。例如, Neu 受体蛋白跨膜区的一个点突变会导致形成 neu 癌基因。ErbA 癌基因来源于甲状腺激素的胞内受体。经修饰的癌基因型 ErbA 受体被认为可以与内源性的甲状腺激素受体竞争而引起生长失控。

最大的一族癌基因是信号转导蛋白(即 Src, Abl 和 Ras)。蛋白 Src 是一种胞浆蛋白酪氨酸激酶, 在某些情况下通过 527 位的酪氨酸残基发生突变而使其从原癌基因转变为癌基因。与此相对应的是, GTP 酶蛋白 ras 通过其 12 位上的缬氨酸突变成甘氨酸而使其从原癌基因转变为癌基因, 其 ras GTP 酶活性降低。

蛋白质 Jun、Fos 和 Myc 作为转录因子直接在核内发挥功能。

4. 细胞增殖抑制因子

肿瘤抑制因子可以抑制细胞过度增殖。这些基因的灭活会使其抑制活性丧失, 从而导致其无法调节细胞增殖。需要说明的是毒素可以连接到能识别突变的或野生型的肿瘤抑制因子上。下面描述的是肿瘤抑制基因 p53、p16 和 C-CAM。

在许多经化学致癌、紫外照射以及几种病毒转化过的细胞中有高水平的突变 p53 基因表达。在各种人类肿瘤中 p53 基因是很常见的突变灭活靶位, 文献中把它列为人类肿瘤中最常发生突变的基因。在人 NSCLC(Hollstein 等, 1991)以及很多其他肿瘤中的突变率超过 50%。

P53 基因编码一个含 393 个氨基酸的磷酸蛋白, 可以与宿主蛋白如大 T 抗原和 E1B 形成复合物。这个蛋白在正常组织和细胞中也存在, 但与转化细胞或肿瘤组织相比其表达量很小。

在许多种类的细胞中野生型 p53 基因被认为是重要的生长调节基因。P53 基因常常发生错义突变, 这是其转化为癌基因所必须的。点突变造成的单个遗传性改变就形成了致癌基因 p53。但是与其他癌基因不同的是, 已知在至少 30 个不同的密码子上都会发生 p53 的点突变, 常常生成显性等位基因而造成细胞表型的漂移, 却不会出现纯合性的下降。另外, 许多这样的显性负等位基因能被有机体内耐受并且可以在种系内传代。各种等位基因突变表现为从微小的功能障碍到强渗透性的显性负等位基因(Weinberg, 1991)。

另外一种细胞增殖抑制因子是 p16。真核细胞周期的过渡主要依靠周期素依赖性蛋白激酶即 CDK's 的激发。一种 CDK, 周期素依赖性蛋白激酶 4(CDK4)调节细胞通过 G1 期。这个酶的活性在 G1 晚期可能使 Rb 磷酸化。CDK4 的活性由活化亚单位, D 型周期素和抑制亚单位控制, 抑制亚单位 p16^{INK4} 的生化特征已经被确定, 作为一个蛋白它可以特异性地结合并抑制 CDK4, 因此可以调节 Rb 的磷酸化(Serrano 等, 1993; Serrano 等, 1995)。

p16^{INK4} 属于一类新发现的 CDK 抑制蛋白, 这一类蛋白还包括 p16^B、p19、p21^{waf1} 和 p27^{KIP1}。p16^{INK4} 基因位于染色体 9p21 位置, 该位点在许多类型的肿瘤中出现缺失。人类肿瘤细胞系中常常发生 p16^{INK4} 基因的纯合缺失或突变。这些都表明 p16^{INK4}

基因是一个肿瘤抑制基因。但是这一观点最近受到挑战,研究发现在最初未经培养的肿瘤中 p16^{INK4} 基因突变的几率比培养的肿瘤细胞系中的突变几率低很多(Caldas 等, 1994; Cheng 等, 1994; Hussussian 等, 1994; Kamb 等, 1994; Kamb 等, 1994; Mori 等, 1994; Okamoto 等, 1994; Nobori 等, 1995; Orlow 等, 1994; Arap 等, 1995)。通过转染质粒表达载体恢复野生型 p16^{INK4} 基因的功能可以降低某些人肿瘤细胞系的克隆形成能力(Okamoto, 1994; Arap, 1995)。

可以用于本发明中的其他基因包括 Rb、APC、mda-7、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16 融合子、p21/p27 融合子、抗血栓基因(即 COX-1,TFPI)、PGS、Dp、E2F、*ras*、*myc*、*neu*、*raf*、*erb*、*fms*、*trk*、*gsp*、*hst*、*abl*、E1A、p300、参与血管形成的基因(即 VEGF, FGF, 血小板凝血酶敏感蛋白, BAI-1, GDAIF, 及其受体)以及 MCC。

5. 程序性细胞死亡调节因子

调亡或程序性细胞死亡是正常胚胎发育、维持成年组织的内环境稳定以及抑制肿瘤发生的必需过程(Kerr 等, 1972)。Bcl-2 蛋白家族和 ICE 样蛋白酶已被证实是其他系统中细胞调亡的重要调节因子和效应因子。已经发现 Bcl-2 蛋白与滤泡淋巴瘤相关, 在控制调亡和增加受各种调亡刺激的细胞的存活率方面发挥主要作用(Bakhshi 等, 1985; Cleary 和 Sklar, 1985; Cleary 等, 1986; Tsujimoto 等, 1985; Tsujimoto 和 Croce, 1986)。进化保守的 Bcl-1 蛋白现在被认为是相关蛋白家族的一个成员, 这一家族被分类为细胞死亡激动剂或细胞死亡拮抗剂。

Apo2 配基(Apo2L, 也叫 TRAIL)是肿瘤坏死因子家族的一个成员。TRAIL 可以使许多类型的肿瘤细胞快速调亡, 但对正常细胞没有毒性。各种组织内都有 TRAIL 的 mRNA。大多数正常细胞对 TRAIL 的细胞毒活性耐受, 说明正常细胞内存在一种机制可以保护细胞对抗 TRAIL 诱导的调亡。首先发现的一个 TRAIL 受体叫死亡受体 4(DR4), 该受体含有一个胞浆“死亡区”。DR4 可以传递 TRAIL 携带的信号。还有一些受体被确定可以和 TRAIL 结合, 其中一个受体叫 DR5, 含有胞浆死亡区并能象 DR4 一样传递调亡信号。在许多正常组织和肿瘤细胞系中都有 DR4 和 DR5 mRNA 的表达。最近发现诱饵受体如 DcR1 和 DcR2 可以阻止 TRAIL 通过 DR4 和 DR5 诱导调亡。因此这些诱饵受体代表了一种新型的调节细胞对直接作用于细胞表面的前调亡细胞因子的敏感性的作用机制。这些抑制受体在正常组织内优先表达说明 TRAIL 可以作为一种抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞调亡而对正常细胞不发生作用(Marsters 等, 1999)。

在此发现以后又观察到 Bcl-2 可以抑制各种刺激激发的细胞死亡。而且现在发现明显存在一个 Bcl-2 细胞死亡调节蛋白家族,该家族具有相同的结构和序列同源性。这一家族的成员中有的与 Bcl-2 的功能相同(即 Bcl_{XL}、Bcl_w、Bcl_s、Mcl-1、Al、Bfl-1),有的则对抗 Bcl-2 的功能促进细胞死亡(即 Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri)。需要说明的是,这些多肽中的任意一个,包括 TRAIL 和其他诱导或促进凋亡的多肽,都可以连接一个毒素,或者在毒素上连接一个能识别这些多肽的抗体。

IV. 修饰蛋白和人工毒素的制备方法

本发明包括确定一个蛋白质上抗原区的方法、确定低抗原性区的方法、制备低抗原性而具有和天然蛋白相同活性的蛋白的方法、以及分析和确定抗原性和活性的方法。

A. 抗原区

在上述部分已经概括地讨论了抗体和抗体检测方法。术语“抗原区”是指能被抗体或 T 细胞受体特异识别的蛋白上的一部分。术语“较低抗原性”是指蛋白或蛋白的一部分激发较低程度的抗体反应,或者只有少数抗体(多克隆)能识别或其结合的抗体下降。

抗原性与特定有机体有关。在本发明的多个实施方式中,有机体指人,但是抗原性也可指其他有机体如其他哺乳动物-猴、大猩猩、牛、兔、小鼠、绵羊、猫、狗、猪、山羊等,也可以是鸟类或其他任何可以激发免疫反应的有机体。

在本发明的某些实施方式中,多克隆血清用于上述的免疫检测方法以确定特定蛋白上的抗原区。多克隆血清可以从各种来源收集,包括怀疑从事接触特定蛋白职业的工作人员;被怀疑或诊断为具有某种状态或疾病的病人,这种状态或疾病伴随或有特定蛋白或有机体的抗体存在;患有不再治疗的某种状态或疾病的病人,这种状态或疾病伴随或有特定蛋白或有机体的抗体存在;以及随机受试者。

B. 数据库

在本发明的某些实施方式中,特定蛋白上的理论抗原区确定后就要运用蛋白质数据库。然后将这个区与含有有机体来源蛋白序列的数据库比较以便找到对该区有较低免疫反应的序列。现在已有许多商业的或公共的数据库,如 GenBank、GenPept、SwissProt、PIR、PRF、PDB,所有这些数据库都可以从国家生物技术信息网站中心获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

C. 去除和/或替代抗原区

抗原区一旦被确定就可以被去除制备一个截短的蛋白。另外,该区也可以用被

认为抗原性较低的区替代。

为了去除抗原区，可以用蛋白酶裂解多肽，或者改造编码多肽的多聚核苷酸以去除抗原区。可以用常规的重组 DNA 技术将抗原区从多聚核苷酸上去掉，如用限制性酶或 DNA 酶。

抗原区也可以被替代氨基酸替换。“替代”是指特定位置的氨基酸可以用不同的氨基酸残基或修饰的氨基酸替换。有许多方式可以完成这种替换。如首先去掉抗原区，然后将替代区插入到多聚核苷酸或多肽中。利用重组 DNA 技术可以将特定编码区插入到多聚核苷酸序列中。另外也可以用位点同源性突变技术突变抗原区，这也是本领域普通技术人员所熟知的。

需要说明的是抗原区任何一侧的氨基酸都可以被去掉或替换以获得修饰蛋白或改善蛋白的某些特征，如降低其抗原性、增加蛋白的稳定性、增加蛋白的活性、降低蛋白的活性等。而且抗原区和抗原区两侧的多个氨基酸可以被同时替换或去掉。因此能被去掉或替换的氨基酸数目为正好或至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 720, 740, 760, 780, 800, 820, 840, 860, 880, 900, 920, 940, 960, 980, 1000, 或更多个。

确定修饰蛋白抗原性或活性的分析方法在本文中也有描述，如免疫检测方法部分，这些方法都是本领域普通技术人员所熟知的。蛋白不同合适的分析方法也不同。酶催化分析适于评价酶的活性。本领域的技术人员应该能够评价与天然蛋白相关的修饰蛋白的活性。如上所述，修饰蛋白可以附着(结合或融合)在另一个多肽、肽或蛋白上。本领域的技术人员根据多肽组分的活性应该能够评价本发明的任何一种经修饰的结合或融合蛋白。

V. 联合治疗

为了增加本发明的任一治疗组合物的效率，需要将这些组合物与能有效治疗特

定疾病或病情的其他药物联合使用。需要说明的是可以治疗的病情或疾病的范围很宽，如微生物引起的疾病，AIDS，自身免疫病，过度增生性疾病如癌症、淋巴瘤、关节炎，心血管疾病、病原性疾病，以及糖尿病。AIDS、肿瘤及其他过度增生性疾病的治疗是特别要考虑的。所使用的联合治疗方案如下，其中含有修饰蛋白的组合物是“A”，另一种药物是“B”。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

A. 过度增生性疾病的治疗

过度增生性疾病包括肿瘤，治疗肿瘤的方案有多种，如抗肿瘤药物或手术。“抗肿瘤”药物是指能够对肌体的肿瘤产生负性效应的药物，例如通过杀伤肿瘤细胞，包括诱导肿瘤细胞凋亡、降低肿瘤细胞的生长速度、降低转移的几率或转移癌的数量、使肿瘤缩小、抑制肿瘤生长、减少肿瘤或癌细胞的血供、增强抗癌细胞或肿瘤的免疫反应、阻止或抑制肿瘤的恶性度增加、或者延长癌症患者的生存期。

抗肿瘤药物包括生物药(生物治疗)、化疗药和放疗药。比较常用的是这些药物联合使用并以有效剂量杀伤肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞的增殖。这一过程包括使细胞与表达构建物和药物或多种因子同时接触。这可以通过使细胞与单个组合物或药用制剂接触，该组合物或制剂中含有两种药物，或者使细胞与两种不同组合物或药用制剂同时接触，其中一种组合物含有表达构建物，另一种组合物含有第二药物。

肿瘤细胞对化疗药或放疗药耐受是临床肿瘤学遇到的主要问题。当前肿瘤研究的一个目标是找到结合基因治疗提高化疗或放疗效果的途径。例如单纯疱疹-胸腺激酶(HS-tK)基因通过逆转录病毒载体转移到脑肿瘤中时可以成功诱导肿瘤对抗病毒药物 9-1;3-二羟-2-丙氧甲基鸟嘌呤变为敏感(Culver 等, 1992)。对于本发明来说需要考虑的是修饰蛋白治疗方法同样也可以与化疗、放疗、免疫治疗或其他生物干预措施联合使用，另外还有其他的前凋亡调节药或细胞周期调节药。

另外，在其他药物治疗前或治疗后数分钟到数周内可以进行基因治疗或修饰蛋白治疗。在本发明的实施方式中，其他药物和表达构建物分别给予细胞，其间隔时间一般不超过每一药物的有效作用时间，这样药物和表达构建物还能够对细胞产生联合效应。这种治疗方式中，细胞与两种药物接触的时间约间隔 12-24 小时以内，优选 6-12 小时之内。在某些情况下，两种治疗的间隔时间可能到数天(2, 3, 4, 5, 6, 或 7 天)至数周(2, 3, 4, 5, 6, 7 或 8 周)。

本发明的治疗性表达构建物的给药途径按照一般的化疗药给药途径，只是要考

虑载体的毒性。如果需要治疗周期可以重复。还要说明的是各种标准治疗措施,包括手术,也可以与本文所描述的过度增生性细胞治疗措施联合使用。

a. 化疗

癌症治疗措施也包括各种联合化学治疗和放射治疗的措施。例如联合化疗药包括顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、左旋苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥、二甲磺酸丁酯、亚硝脲、放线菌素、正定霉素、阿霉素、博来霉素、plicomycin、丝裂霉素、依托泊甙(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合药、紫杉醇、gemcitabien、navelbine、farnesyl 蛋白转移酶抑制剂、transplatinum、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱和氨甲蝶呤、temazolomide(DITC 水溶液),或者上述药物的类似物或衍生物。化疗结合生物资料就是大家都知道的生物化疗。

在本发明的某些实施方式中,化疗药被人工连接到修饰蛋白如毒素分子上。

b. 放疗

广泛使用的引起 DNA 损伤的其他因素包括大家都知道的 γ 射线、X 射线、和/或直接将放射性同位素运送到肿瘤细胞。其他形式的 DNA 损伤因子还有微波和紫外线辐射。最可能的是所有这些因子都可以对 DNA、DNA 前体、DNA 的复制和修复以及染色体的装配和维持造成广泛的损伤。X 射线的照射剂量范围从每日 50-200 伦琴持续较长时间(3 到 4 周),到单次剂量 2000-6000 伦琴。放射性同位素的使用剂量范围很宽,要根据同位素的半衰期、辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的摄取量而定。

本文中所用的术语“接触”和“暴露于”用到细胞上时是指将治疗构建物和化疗药或放疗药运送到靶细胞的过程或直接与靶细胞并列放置的过程。为了达到杀伤细胞或抑制细胞的目的,两种药物都以有效剂量运送到细胞从而杀伤细胞或阻止细胞分裂。

c. 免疫治疗

一般来说免疫治疗依赖免疫效应细胞和效应分子靶向到达并杀伤癌细胞。免疫效应物可以是具有肿瘤细胞表面某些标记物特异性的抗体。抗体单独就可以作为治疗效应分子,也可以通过其他细胞来达到杀伤靶细胞的目的。如上述关于权利要求的组合物的讨论,抗体也可以连接到药物或毒素分子上(化疗药、放射性核酸、蓖麻毒蛋白 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等)仅仅作为靶向分子。另外,效应细胞也可以是淋巴细胞,淋巴细胞上携带能直接或间接与肿瘤细胞靶位相互作用的表面分子。各种效应细胞都可以诱导细胞毒 T 细胞和 NK 细胞。联合使用各种治疗措施如直接细胞毒活性和免疫活化对癌症的治疗有益,因此可以考虑将免疫治疗措施与本

发明的其他治疗化合物联合使用。例如，两种不同的免疫毒素可以同时给予一个病人，或者免疫毒素与其他治疗化合物联合使用治疗疾病如治疗肿瘤。

对于免疫治疗来说，肿瘤细胞必须携带能作为靶点并且在大多数其他类型的细胞中不存在的标记物。肿瘤中有许多标记物，其中任何一个都可以作为本发明的靶点。免疫治疗的另外一个方式是 pro-apoptotic 效应结合免疫刺激效应。但是替代免疫刺激分子也可以存在，包括细胞因子如 IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN，化学因子如 MIP-1、MCP-1、IL-8，以及生长因子如 FLT3 配基。免疫刺激分子作为一个蛋白或与直接抗肿瘤的免疫毒素结合用作基因转移都可以增加其抗肿瘤效应。

如上所讨论的，当前正在研究或正在使用的免疫治疗措施有免疫佐剂(如 mycobactrium boovis, Plasmodium falciparum, 二硝基氯苯和芳香族化合物)(美国专利 5,801,005 号；美国专利 5,739,169 号；Hui 和 Hashimoto, 1998；Christodoulides 等, 1998)，细胞因子治疗(如干扰素 α 、 β 和 γ ，IL-1，GM-CSF 和 TNF)(Bukowski 等, 1998；Davidson 等, 1998；Hellstrand 等, 1998)，基因治疗(如 TNF，IL-1，IL-2，p53)(Qin 等, 1998；Austin-Ward 和 Villaseca, 1998；美国专利 5,830,88 和 5,846,945 号)以及单克隆抗体(如抗神经节苷脂 GM2 抗体，抗 HER-2 抗体，抗 p185 抗体)(Pirtras 等, 1998；Hanibuchi 等, 1998；美国专利 5,824,311 号)。Herceptin(trastuzumab)是一种封闭 HER2-neu 受体的嵌合(鼠-人)单克隆抗体。该抗体具有抗肿瘤活性，已被证实可用于治疗恶性肿瘤(Dillman, 1999)。

i. 被动免疫治疗

现有的癌症被动免疫治疗方法有很多种。如下列所示：单独抗体注射；抗体联合毒素或化疗药物注射；抗体结合同位素注射；抗独特型抗体注射；以及从骨髓中净化肿瘤细胞。

优选人单克隆抗体进行被动免疫治疗，因为该抗体在病人体内的毒副作用较少或没有。但是由于其来源缺乏而使其应用受到限制，到目前为止只能注射到病变部位。神经节苷脂的人单克隆抗体已用于注射到有复发皮肤黑色素瘤病人的病变部位(Irie 和 Morton, 1986)。每天或每周病变部位注射抗体后 10 个病人中有 6 个病人的肿瘤生长受到抑制。在另一个试验中，通过在病变部位注射两种人单克隆抗体获得了适度的成功(Irie 等, 1989)。

较好的方法是注射针对两种不同抗原的多种单克隆抗体，或具有多种抗原特异性的抗体。治疗方案也可以包括注射淋巴因子或其他免疫增强剂，如 Bajorin 等人的描述(1988)。人单克隆抗体的制备方法在说明书的其他部分有详细描述。

ii.主动免疫治疗

主动免疫治疗注射的是抗原性肽、多肽或蛋白，或者自体的或同种异体的肿瘤细胞组分或者叫“疫苗”，通常情况下都要辅以细菌佐剂(Ravindranath 和 Morton, 1991; Morton 和 Ravindranath, 1996; Morton 等, 1992; Mitchell 等, 1990; Mitchell 等, 1993)。在黑色素瘤的免疫治疗中，产生高滴度 IgM 抗体的病人的生存状态要好于无或低滴度 IgM 的病人(Morton 等, 1992)。通常 IgM 抗体都是一过性抗体，但抗神经节甘脂的抗体和抗碳水化合物的抗体是例外。

iii.获得性免疫治疗

在获得性免疫治疗中，从病人的血液中分离淋巴细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞，在体外用淋巴因子如 IL-2 活化或转导肿瘤坏死基因，然后回输到病人体内(Rosenberg 等, 1988; 1989)。为了达到这一目的，将免疫有效量的活化淋巴细胞联合本文所描述的含佐剂的抗原肽组合物输注给动物或病人。最佳的活化淋巴细胞是来自于病人自身的细胞，这些细胞预先从病人的血液或肿瘤标本中分离出来并再体外活化(或“扩增”)。这种免疫治疗措施已使几例黑色素瘤病人和肾癌病人的肿瘤受到抑制，但是响应者的百分数要少于未有反应的百分数。

d. 基因治疗

在另外一个实施方式中，辅助治疗措施是基因治疗，其中在给予修饰蛋白或编码修饰蛋白的多聚核苷酸之前、之后或同时给予治疗性多聚核苷酸。另外也可以用编码两种不同治疗性多肽的单一载体。本发明所涵盖蛋白质的种类很多，其中有些在上面已经描述过。例如，基因治疗可用于向癌细胞提供野生型的肿瘤抑制基因。

e. 手术治疗

大约 60% 的癌症患者要做某种手术，其中包括预防性手术、为诊断或分期而进行的手术、治疗性手术以及缓解性手术。治疗性手术是一种可以结合其他治疗措施的肿瘤治疗措施，如本发明的治疗措施、化疗、放疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或其他治疗措施。

治疗性手术包括切除，就是将全部或部分癌组织去掉、切去和/或毁坏。肿瘤切除是指物理去除至少一部分肿瘤。除了切除肿瘤以外，手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术、以及显微外科手术(Mohs'手术)。需要进一步说明的是本发明也可和切除浅表癌、癌前组织或附带量的正常组织结合使用。

癌细胞、组织或肿瘤被切除以后会在体内的该位置上形成腔隙。因此可以通过灌注、直接注射或局部使用附加抗肿瘤药物进行治疗。这种治疗方案可以重复进行，如每 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 天，或者每 1, 2, 3, 4 或 5 周，或者每 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 或 12 个月进行一次。治疗剂量也可以变化。

f. 其他药物

需要说明的是其他药物也可以和本发明的组合物联合使用以增强治疗效果。这些药物包括免疫调节剂、上调细胞表面受体和 GAP 连接的药物、细胞生长抑制剂和分化剂、细胞黏附抑制剂、增加过度增殖细胞对凋亡诱导物敏感性的药物、或其他生物药物。免疫调节剂包括肿瘤坏死因子；干扰素 α 、 β 、 γ ；IL-2 及其他细胞因子；F42K 及其他细胞因子类似物；或 MIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES 及其他化学因子。需要进一步说明的是，细胞表面受体或其配基如 Fas/Fas 配基、DR4 或 DR5/TRAIL(Apo-2 配基)的表达上调可以通过对过度增殖细胞的自分泌或旁分泌效应而赋予本发明的化合物以抗肿瘤的能力。GAP 连接数目的增加而导致的细胞内信号增强可以对邻近的过度增殖细胞产生抗过度增殖效应。在另外一些实施方式中，细胞生长抑制剂和分化剂可以和本发明的组合物联合使用以增强抗过度增殖效应。细胞黏附抑制剂也可以增强本发明组合物的治疗效果。细胞黏附抑制剂的例子有病灶黏附激酶(FAKs)抑制剂和洛伐他丁。需要进一步说明的是增加过度增殖细胞对凋亡敏感性的其他药物如抗体 c225 也可以和本发明的组合物联合使用以增强治疗效果。

在通过引入细胞毒化疗药物进行癌症治疗的研究方面已取得了许多进展。但是化疗的一个结果就是具有耐药表型细胞的出现及多药耐药的发生。耐药的发生依然是肿瘤治疗的一大障碍，因而急需寻找其他治疗措施如基因治疗。

许多研究者的试验结果表明对 TRAIL 耐药的肿瘤细胞可以用亚毒性浓度的药物/细胞因子致敏，致敏的肿瘤细胞可以被 TRAIL 显著杀伤(Bonavida 等, 1999; Bonavida 等, 2000; Gliniak 等, 1999; Keane 等, 1999)。而且 TRAIL 与化疗药如 CPT-11 或阿霉素联合使用也可以增强其抗肿瘤活性，增加其诱导凋亡的效果。这些效应中的某些效应是通过上调 TRAIL 或其同源受体而介导的，其他的效应则不是通过这种机制。

与化疗、放疗或生物治疗联合应用的其他治疗措施包括温热疗法，该疗法是将病人的组织置于高温下(可高达 106°F)。外部或内部加热装置可用于局部、区域或全身的温热疗法。局部温热疗法是加热一个小的区域如肿瘤部位。从外部加热可以使用置于体外的能产生靶向肿瘤的高频微波装置。内部加热可以通过一个无菌探针，如加热的细金属丝或装满热水的中空管、植入的微波天线、或射频电极。

病人的器官或肢体可以被加热进行区域治疗，用能产生高能量的装置如磁铁就可以实现。另外，可以将病人的血液抽出加热后回输到需要进行内部加热的部位。

某些肿瘤已经扩散到全身的病人可以进行全身加热。热水套、热石蜡、感应线圈和加热室都可用于全身加热。

激素治疗也可与本发明的治疗措施或上面所描述的其他肿瘤治疗措施联合使用。激素可用于治疗某些特定的癌症如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌或头颈癌以降低某种激素如睾酮或雌激素的水平或阻断其效应。这种治疗措施通常和至少一种其他治疗措施联合使用作为备选治疗方案或降低肿瘤转移的风险。

B. 病毒致病机理

本发明的组合物和方法显然与病毒性疾病的治疗或诊断有关。例如，本发明可用于由 HIV 感染而引起的 AIDS。因此本发明可与传统的治疗措施相结合。这些治疗措施描述如下：

1. AZT

大家所熟知的 AIDS 的传统治疗药物是 zovidovudine (Burroughs Wellcome 有 AZT™)。这是一类核苷类似物，是一种二聚脱氧核苷酸，可以通过抑制 HIV 的逆转录酶二阻断 HIV 的复制。如 Burger 等人的描述，抗 AIDS 药物 zovidovudine (也称作齐多夫定)也可在一定的范围内应用，大多数情况下是与利福平联合应用。

本文所描述的组合物和方法与其他治疗措施联合应用时特别有效，如 AZT 和/或抑制病毒复制的蛋白酶抑制剂，这些药物可以使白细胞维持在一个较理想的水平上。这就为病人争取到了抗病毒治疗所需的时间。

2. HAART

新的药物联合治疗方案在治疗 HIV 感染的病人中获得了有希望的结果。用高效抗 HIV 药物进行联合治疗被称作“高活性抗逆转录病毒治疗”(HAART)，这种治疗方案可以改善所有四期 HIV 病人的临床症状、延长生存期、提高生活质量。HAART 包括蛋白酶抑制剂(印地那韦、那非那韦、利托那韦、利托那韦/沙喹那韦、沙喹那韦)和两种核苷类似物(AZT/ddI, d4T/ddI, AZT/ddC, AZT/3TC, 或 d4T/3TC)。

V. 药学上可接受的组合物和给要途径

本发明涉及编码修饰蛋白(包括融合蛋白)的核酸分子及可与其他蛋白化合物或小分子结合的修饰蛋白。在某些实施方式中，给予试验对象以药学上可接受的组合物。本发明的不同方面都包括给予有效剂量的水性组合物。在本发明的另一些实施方式中特别将修饰 gelonin 作为免疫毒素给予。这种组合物一般溶解或分散于药用载体或水性介质中。另外，根据所治疗的疾病或病情将这种化合物与其他治疗措施联合应用。AIDS 的治疗包括给予 HAART 或 AZT，或者二者联合使用，而癌症的治疗包括手术或化疗、放疗、免疫治疗或激素治疗。

A. 给药途径

本领域的技术人员应该熟知如何在体内和体外应用基因转移措施。对于病毒载体来说一般需要制备病毒载体库。根据病毒的种类及滴度的不同,可以将1到100, 10到50, 100-1000, 或者高达 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 或 1×10^{12} 感染性病毒颗粒给予病人。通过比较相对摄取效率可以推断出脂质体或其他非病毒制剂的给药剂量。以药学上可接受的组合物形式存在的制剂讨论如下:

术语“药用的”是指将分子或组合物以适当方式给予动物或人时不会产生相反的、过敏性的或其他意外的反应。本文所用的术语“药用载体”包括任何及所有的溶剂、分散介质、包被物、抗菌或抗真菌药、等渗的吸收延迟药物、以及类似物质。这些介质或药物用作药理活性物质的方法是本领域所熟知的。除了那些与活性组分不相容的传统介质或药物以外,其他的都可以用在治疗组合物中。附加的活性组分如其他抗癌药物也可以包括在组合物中。

除了可以将化合物制备成胃肠道外途径如静脉或肌肉注射给药的制剂以外,其他的药学上可接受的组合物形式还包括口服的片剂或其他固体物;控释胶囊;以及现在所使用的其他形式如乳膏、洗液、漱口液、吸入剂及类似物质。

本发明的活性化合物可以制备成胃肠道外途径给药的制剂,如通过静脉、肌肉、胸内、皮下、甚至腹膜内注射给药的制剂。根据本文所描述的本领域的技术人员应该能够知道如何制备含有化合物或能增加MHC I类分子表达的化合物的水性组合物。一般来说,这种组合物都是制备成可注射的溶液或悬液;在注射前通过加入液体可制备成溶液或悬液的固体;以及可乳化形式。

用混以适当比例表面活性剂如羟丙纤维素的水可以将活性化合物制备成自由碱溶液或药用盐溶液。也可以用甘油、液体聚乙烯甘油或二者混合物以及油将活性化合物制备成分散液。在普通储存和使用条件下需要在制备物中加入防腐剂以防止微生物的生长。

适于注射用的药用制剂包括无菌水溶液或分散液;用香油、花生油或水性丙稀甘油制成的制剂;以及可以即时制备成无菌注射液或分散液的灭菌粉末。所有的制剂必须是无菌的并且在一定程度上保持液态以便易于注射。在制备和储存条件下应该是稳定的,并且应该经防腐处理以避免微生物如细菌和真菌的污染。

活性化合物液可以制备成溶于中性溶液或盐溶液中的组合物。药用盐溶液包括加酸的盐溶液(与蛋白上的自由氨基结合),其中所用的酸为无机酸如盐酸、磷酸,或者是有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、mandelic等。与自由羧基结合的盐可以是来

自于无机碱的盐，如钠盐、钾盐、氨盐、钙盐，或者来自于有机碱的盐如异丙胺、三甲胺、组胺、普鲁卡因等。

载体可以是溶剂或含有水、乙醇、多元醇(如甘油、丙稀甘油、液体聚丙稀甘油等)、上述物质的适当混合物以及植物油的分散介质。另外还需要加入包被剂如卵磷脂以维持适当的流动性，加入表面活性剂以维持在分散液中颗粒直径。阻止微生物污染的方法是通过加入各种抗细菌或抗真菌药物如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下优选加入等渗试剂如糖或氯化钠。延迟可注射组合物的吸收可通过在组合物中加入吸收延迟剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。

灭菌注射液的制备是通过将溶于适当溶剂中的一定量的活性化合物与上面所列举的各种其他组分混和，如果需要的话则经过过滤灭菌。一般来说，分散液的制备是通过将各种灭菌活性组分加入到含有基本分散物和上面所列举的各种其他组分的无菌载体中。能制成无菌注射液的粉末制备方法优选真空干燥和冷冻干燥技术，通过这两种技术可以制备成活性成分的粉末，然后可以加入来自于上述过滤除菌溶液的组分。

在某些情况下，本发明的治疗制剂也可以制备成适于局部使用的形式，如乳膏和洗液。这种制剂用于治疗皮肤相关疾病如各种肉瘤。

本发明的治疗化合物可以通过任何一种常用途径给药，只要能使其达到靶组织。如果本发明作为病毒载体的形式使用，主要要考虑的使载体携带的异源序列所期望的定位。给药途径包括口服、鼻腔给药、口腔给药、直肠给要、阴道给要或局部给药。例如，局部给要特别适于治疗黑色素瘤或 AIDS 相关的皮肤症状，或者用病毒载体携带的异源基因治疗皮肤病症。另外也可通过 orthotopic、真皮内注射、肌肉注射、腹膜内注射或静脉注射给药。这些组合物通常以药学上可接受的组合物的形式给药，其中药学上可接受的组合物含有生理相容性载体、缓冲液或其他赋形剂。如果要治疗肺部症状就要考虑向肺内喷气雾剂，气雾剂的体积约在 0.01-0.05ml 之间。同样，治疗结肠相关疾病的优选方式是通过灌肠给药。灌肠剂的体积约在 1-100ml 之间。直接进行肿瘤内注射也是一种优选的给要方式，持续的瘤内灌注是一种较特异的实施方式。

在某些特定实施方式中，期望持续给予病人治疗组合物。静脉或动脉途径给药可以通过滴注系统实施。局部给药可以反复实施局部涂抹。在各种给药途径中，缓释制剂可用于在治疗期内提供有限而持续量的治疗药物。对于内部给药来说，持续灌注携带目的异源核酸片段区的病毒载体是优选的。这种给药方式可以通过在某些病例术后插入导管持续给予治疗药物。给药的持续时间由临床医师根据病人的病情

及特定形势而选择,但是一般为约 1-2 小时,到约 2-6 小时,约 6-10 小时,约 10-24 小时,约 1-2 天,约 1-2 周或更长。一般来说,通过持续灌注所给予的治疗药物量与单次或多次注射所给予的药量相同,但根据给药的持续时间不同可作调整。但是一般认为通过灌注给予的药量要稍高。

水性溶液如果通过胃肠道外途径给要一般应该需要将溶液用合适的缓冲液缓冲,首先用足量的盐水或葡萄糖溶液稀释以达到等渗。这些特殊的水溶液特别适于静脉注射、肌肉注射、皮下注射以及腹膜内注射。本发明的技术人员可以通过本文的描述而了解所使用的水性介质。例如,一个单位的药物可以溶解到 1 毫升 NaCl 等渗溶液中,或者加到 1000mL 皮下输液溶液中或者注射到适当部位(见, Remington's Pharmaceutical Science, 1990)。根据病人的状况可以对给药剂量进行调整。在任何情况下都应该由负责注射的人确定每个个体的合适剂量。

根据治疗目的而确定治疗组合物的有效剂量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适于给治疗对象使用的物理离散单位,含有预先确定量治疗组合物的一个单位药物所产生的治疗效果与给药途径及治疗方案有关。根据治疗数目和单位剂量确定的给药量依赖于所预期的保护效果。

治疗组合物的准确剂量也依赖医生的判断,每一个体都是不同的。影响使用剂量的因素包括病人的物理及临床状况,给药途径,治疗目的(缓解症状或是治愈)以及特定治疗药物的效力、稳定性及毒性。

制备成制剂以后,组合物溶液的给药途径要与其剂量形式相适应,以此剂量治疗应该是有效的。各种剂量形式的制剂都很容易给药,如上述的注射溶液,但是药物释放胶囊等也可使用。

本文所使用的术语“体外”给药是指给动物来源的细胞以药物,包括而不限于培养的细胞。术语“体外注射”是指经体外操作的细胞,然后将细胞回输给活体动物。术语“体内注射”包括在动物体内细胞上的各种操作。

在本发明的某些方面,组合物可以通过体外或体内给药。在某些体外实施方式中,编码修饰蛋白的表达载体可以被转导到宿主细胞中,转导的细胞用于体外分析或回输到体内。

美国专利 4,690,915 和 5,199,942 号描述了通过体外操作的血单个核细胞核骨髓细胞用于治疗的方法。

体内给予组合物也是本发明所涉及的范围。体内给药的例子包括而不限于:通过一个插入到胆囊的小泡导管给予胆囊上皮细胞以本发明的转导组合物(Bass, 1995)和通过一个插入门静脉的导管给予肝细胞以适量的本发明的转导组合物

(Bao, 1996)。另外的例子还包括将转导组合物直接注射到肿瘤内, 以及通过鼻内或气管内滴注(Dong, 1996)转导组合物到肺细胞。

本发明可以通过下列途径给药: 静脉、真皮下、动脉、腹膜内、病变部位内、颅内、关节内、胸膜内、气管内、鼻内、intravitreally、阴道内、直肠内、局部的、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下、泡囊内、粘膜、心包内、口服、局部、区域和/或气雾剂、注射、输注、持续输注、局部灌注直接或通过导管或腔隙洗浴靶细胞。

B. 脂质组合物

在某些实施方式中, 本发明涉及含有一种或多种脂质的新型组合物, 该脂质与本发明权利要求所述的多聚核苷酸或多肽相连。脂质的特征在于不溶于水但可用有机溶剂抽提。本文所描述的化合物可以被本领域的技术人员理解为脂质, 这些化合物包括在本发明的组合物和方法中。

脂质可以是天然产生的也可以是人工合成的(即人工设计和制备的)。但是脂质通常是一种生物物质。生物脂质是本领域所熟知的, 包括天然脂肪、磷脂、磷脂酰甘油、类固醇、萜烯、lysolipids、鞘糖脂、糖脂、sulphatides、与脂肪酸相连的醚和酯类脂质和多聚脂质、以及上述物质的结合物。

1. 脂质种类

天然脂肪含有甘油和脂肪酸。典型的甘油是一种三碳乙醇。脂肪酸是一种含有碳链的分子, 在其链末端连接有酸性基团(即羧酸)。脂肪酸可以具有任意长度的碳链, 但是优选的碳链长度为约 2, 约 3, 约 4, 约 5, 约 6, 约 7, 约 8, 约 9, 约 10, 约 11, 约 12, 约 13, 约 14, 约 15, 约 16, 约 17, 约 18, 约 19, 约 20, 约 21, 约 22, 约 23, 约 24, 约 25, 约 26, 约 27, 约 28, 约 29, 到约 30 或更多个碳原子, 以及上述范围内的任意长度。优选的长度范围为脂肪酸的主链部分含有约 14 到约 24 个碳原子, 在某些实施方式中, 特别优选约 16 到约 18 个碳原子。在某些实施方式中, 脂肪酸的碳链可以由奇数碳原子组成, 但在另外一些实施方式中 优选偶数碳原子。碳链上只含有单键的脂肪酸被称为是饱和的, 而碳链上含有至少一个双键的脂肪酸被称为是不饱和的。

特异脂肪酸包括而不限于: 亚油酸、油酸、软脂酸、顺-9, 12-十八碳-二烯酸、硬脂酸、月桂酸、肉豆蔻酸、花生酸、软脂烯酸、花生四烯酸、蓖麻油酸、tuberculo-steric acid、乳杆菌酸。一个或多个脂肪酸的酸性基团共价结合到甘油的一个或多个羟基上。因此, 单酸甘油酯由一个甘油和一个脂肪酸组成, 甘油二酯由两个甘油和两个脂肪酸组成, 甘油三酯由三个甘油和三个脂肪酸组成。

磷脂一般含有甘油或鞘氨醇、产生两性化合物的磷酸基团以及一个或多个脂肪酸。磷脂的种类包括磷脂酰甘油, 其中磷酸基团连接到甘油二酯和鞘氨醇磷脂(即鞘磷脂)上的甘油的第一个碳原子上, 其中磷酸基团被酯化成鞘氨醇氨基乙醇。鞘磷脂的另外一个例子是硫脑脂, 含有一个硫酸基团可以使分子两性。当然, 磷脂也可以含有其他化学基团, 如连接到磷酸基团上的乙醇。这种乙醇基团包括丝氨酸、乙醇胺、胆碱、甘油和肌醇。因此, 特异性的磷脂酰甘油包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油或磷脂酰肌醇。其他的磷脂包括磷脂酸或磷酸联乙酯。一方面, 磷脂酰胆碱含有二油酰磷脂酰胆碱(a. k. a. 心磷脂)、卵磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、单肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、单棕榈酰磷脂酰胆碱、单硬脂酰磷脂酰胆碱、单油酰磷脂酰胆碱、二丁酰磷脂酰胆碱、二戊酰磷脂酰胆碱、二己酰磷脂酰胆碱、二庚酰磷脂酰胆碱、二辛酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱。

糖脂与鞘磷脂相似, 但是是通过一个糖基而不是磷酸基团连接到鞘氨醇的第一个羟基上。有一类糖脂叫脑苷脂, 含有一个连接到鞘氨醇第一个羟基上的糖基(即葡萄糖或半乳糖)。另外一种糖脂是神经节苷脂(即 monosialoganglioside, GM1), 含有连接到鞘氨醇第一个羟基上的约 2、约 3、约 4、约 5、约 6、到约 7 个或更多个糖基, 这些糖基可以位于支链上。在另外的实施方式中, 糖脂是神经酰胺(即乳糖基酰基鞘氨醇)。

类固醇是一种四元环的菲衍生物。类固醇通常具有调节细胞、组织和有机体的功能, 包括激素及与黄体激素(黄体酮)、糖皮质激素(皮质醇)、盐皮质激素(醛固酮)、雄激素(睾酮)及雌激素(雌酮)家族相关的化合物。胆固醇是另一类类固醇, 一般发挥结构功能而不是调节功能。维生素 D 是另一类固醇, 参与小肠的钙吸收调节。

萜烯是一种含有一个或多个五碳异戊二烯基团的脂质。萜烯具有多种生物学功能, 萜烯包括维生素 A、辅酶 Q 和类胡萝卜素(即番茄红素和 β 胡萝卜素)。

2. 带电荷的和中性的脂质组合物

在某些实施方式中, 组合物的脂质成分是不带电荷的或基本不带电荷的。在一个实施方式中, 组合物的脂质成分为一种或多种中性脂质。在另一方面, 组合物的脂质成分基本不含有阴离子和阳离子脂质, 如某些磷脂和胆固醇。在某些方面, 不带电荷或基本不带电荷的脂质组合物中的脂质成分为约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或约 100% 的不带电荷、基本不带电荷的脂质和/或含有等量正电荷和负电荷的脂质混合物。

在另外一个方面, 脂质组合物可以是带电荷的。例如带电荷的磷脂用于制备本

发明的脂质组合物就带有净正电荷或净负电荷。在一个非限定性实施例中，磷酸联乙酯被用于赋予脂质组合物负电荷，而硬脂胺被用于赋予脂质组合物正电荷。

3. 脂质制备

脂质可以从天然资源中获取，也可以从市场上买到，还可以通过化学方法合成，这是本领域普通技术人员所熟知的。例如磷脂可以从天然资源中获得，如蛋或大豆卵磷脂、脑磷脂酸、脑或植物磷脂酰肌醇、心肌磷脂以及植物或细菌的磷脂酰肌醇。在另外的实施例中，使用于本发明的脂质是从市场上买到的，例如 Sigma Chemical Co. 的二肉豆蔻基磷脂酰胆碱("DMPC"); K & K Laboratories (Plainview, NY) 的磷脂酸; Calbiochem-Behring 的胆固醇; Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) 的二肉豆蔻基磷脂酰甘油("DMPG")和其他脂质。

在某些实施方式中，保存在氯仿或氯仿/甲醇中的脂质溶液可以存放在约-20℃。氯仿是优选的唯一溶剂，因为氯仿比甲醇更容易蒸发。

4. 脂质组合物的结构

和脂质相关的化合物可以分散在含脂质的溶液中，溶解于脂质中，以脂质乳化，与脂质混和，与脂质结合，与脂质共价结合，悬浮于脂质中或以其他方式与脂质相联系。本发明的脂质或脂质相关组合物不限于任何一种特定结构。例如，它们可以简单的散布于溶液中，可能形成聚集物，但没有均一的大小和形状。在另外的实施例中，它们可以以双层结构、微胶粒或“倒塌”结构存在。在另外的非限制性实施例中，也可以是 lipofectamine(Gibco BRL) 或 Superfect (Qiagen) 复合物。

在某些实施方式中，脂质组合物含有的特定脂质、脂类或非脂质组分如药物、蛋白、糖、核酸或本文描述的其他材料的量为约 1%，约 2%，约 3%，约 4%，约 5%，约 6%，约 7%，约 8%，约 9%，约 10%，约 11%，约 12%，约 13%，约 14%，约 15%，约 16%，约 17%，约 18%，约 19%，约 20%，约 21%，约 22%，约 23%，约 24%，约 25%，约 26%，约 27%，约 28%，约 29%，约 30%，约 31%，约 32%，约 33%，约 34%，约 35%，约 36%，约 37%，约 38%，约 39%，约 40%，约 41%，约 42%，约 43%，约 44%，约 45%，约 46%，约 47%，约 48%，约 49%，约 50%，约 51%，约 52%，约 53%，约 54%，约 55%，约 56%，约 57%，约 58%，约 59%，约 60%，约 61%，约 62%，约 63%，约 64%，约 65%，约 66%，约 67%，约 68%，约 69%，约 70%，约 71%，约 72%，约 73%，约 74%，约 75%，约 76%，约 77%，约 78%，约 79%，约 80%，约 81%，约 82%，约 83%，约 84%，约 85%，约 86%，约 87%，约 88%，约 89%，约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 100%，

或 其中任意范围, 这是本领域技术人员所熟知的。在一个非限定性实施例中, 脂质组合物含有约 10% 到约 20%的中性脂质、约 33%到约 34% 脑苷脂和约 1%的胆固醇。在另一个非限定性实施例中, 脂质体含有约 4% 到 约 12% 的萜烯萜, 其中约 1%的微胶粒是特异性的番茄红素, 和约 10%到约 35%的卵磷脂, 以及约 1%的药物。因此本发明的脂质组合物可以含有任何脂质、脂类或其他组分, 这些组分可以任意组合, 百分比也可以包括各种范围。

a. 乳化剂

脂质可以包含在乳化液中。脂质乳化液是由两种或多种正常情况下互不相溶的脂质混和而成的永久异源脂质混合物, 通过机械搅拌或加入小量的乳化剂而形成。制备脂质乳化液和添加附加成分的方法是本领域所熟知的(即《现代药理学》, 1990, 本文已纳入作为参考)。

例如, 将一种或几种脂质加入到甲醇、氯仿或任何其他合适的有机溶剂中, 手动搅拌或机械搅拌, 然后将溶剂从混合物中蒸发掉剩下脂质。将脂质从新悬浮于水性介质如磷酸盐缓冲液中就得到了乳化液。为了使乳化脂质的大小更具有均一性, 可以用常规超声技术进行超声处理, 然后通过微液化(例如用 Microfluidizer, Newton, Mass.) 进一步乳化混合物, 和/或用挤出仪(Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada)高压(如 600psi)挤出。

b. 微胶粒

脂质可以包含在微胶粒中。微胶粒是一簇或一团脂质化合物, 通常以脂单层的形式存在, 可以通过本领域普通技术人员所熟知的任何微胶粒制备方法制备(如 Canfield 等, 1990; EI-Gorab 等, 1973; Colloidal Surfactant, 1963; 和 Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems, 1975, 本文都已纳入作为参考)。例如, 典型的制备方法是将一种或几种脂质加入到有机溶剂中制成悬液, 蒸发掉溶剂后将脂质从悬于水性介质中, 超声处理然后离心。

5. 脂质体

在特定实施方式中, 脂质构成脂质体。“脂质体”是一个类别术语, 包括各种通过包裹脂双层或聚集物而形成的单层或多层脂质载体。脂质体的典型特征是具有双层膜的泡状结构, 一般含有磷脂及由水溶性组合物组成的内容物。

多层脂质体具有多层脂质, 各层之间被水溶性介质分开。将含有磷脂的脂质悬浮于过量的水溶液中自然就会形成多层脂质体。在形成闭合结构之前脂质组分会经过自身重排, 在脂双层之间包裹水和溶解的溶质(Ghosh 和 Bachhawat, 1991)。亲脂性分子或含有亲脂性区的分子也可以溶于脂双层中, 或与脂双层相连。

在某些特殊的例子中,脂质和/或修饰蛋白或编码修饰蛋白的多聚核苷酸可以被包裹在脂质体的水溶性内核中、散布于脂质体的脂双层内、通过一个能连接脂质体和组合物的分子附着在脂质体上、陷入脂质体内、与脂质体形成复合物等。

a. 脂质体制备

用于本发明的脂质体可以通过不同的方法制备,这些方法都是本领域普通技术人员所熟知的。

例如,磷脂(avanti polar lipids, Alabaster, AL)如中性磷脂二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)溶于叔丁醇。然后将脂质与多聚核苷酸或多肽、和/或其他组分混和。将 Tween 20 加入到脂质混合物中, Tween 20 约占组合物重量的 5%。将过量的叔丁醇加入上述混合物,其中叔丁醇的体积至少要占到 95%。混合物旋转搅拌、在干冰/丙酮浴中冷冻使之冻干过夜。冻干的制备物促存在-20℃中可以保存 3 个月。利用 Tween20 包裹化合物所得到的颗粒平均直径约为 0.7-1.0 μm。

另外,脂质体还可以通过在装有溶剂的容器如玻璃梨型烧瓶中混和脂质而制备。容器的体积至少要有预悬浮的脂质体体积的 10 倍。利用旋转蒸发器在负压、约 40℃条件下将溶剂去除。根据脂质体体积的不同,一般在约 5 分钟到 2 小时内可将溶剂去除。组合物可在真空干燥器内进一步干燥。干燥的脂质一般在约 1 周后废弃因为脂质体随时间而逐渐变质。

干燥的脂质可溶于约 25-50mM 磷脂无菌无热源水溶液中水化,不断振荡知道所有的脂质都从新悬浮起来。然后将水性脂质体分成小份,每份装入一小玻璃瓶中,真空下冻干密封。

在另外一种方法中,脂质体可以根据其他已知的实验方法制备(见 Bangham 等, 1965; Gregoriadis, 1979; Deamer 和 Uster 1983, Szoka 和 Papahadjopoulos, 1978; 本文已将其相关部分纳入作为参考)。这些方法的区别在于其不同的包裹水性材料的能力以及水-脂比例。

按照上述方法制备的干燥的或冻干的脂质体可以在抑制性肽溶液中脱水和重建,并以合适的溶剂如 DPBS 稀释到适当浓度。然后将混合物在振荡混和器中剧烈振荡。未被包裹的附加材料如试剂,包括而限于激素、药物、核酸构建物以及类似物质可以通过 $29,000 \times g$ 离心并洗涤脂质体颗粒去除。经过洗涤的脂质体重悬于合适浓度的磷脂溶液中,总的浓度约为 50-200mM。被包裹的附加材料或活性试剂的量可以用标准方法确定。确定了包裹在脂质体中的附加材料或活性试剂的量以后,就可以将脂质体稀释到适当浓度并促存在 4℃备用。含有脂质体的药学上可接受的组合物通常含有无菌的药用载体或稀释剂,如水或盐溶液。

由于制备方法的不同,脂质体的大小差别也很大。本发明的脂质体可以有各种尺寸。在某些实施方式中,脂质体很小,即外径小于约100nm,90nm,80nm,70nm,60nm,或小于50nm。要制备这种脂质体,本文所描述的任何一种方法或本领域普通技术人员所熟知的任何方法都可以使用。其他制备脂质体的非限定性例子见以下文献的描述:美国专利4,728,578,4,727,575,4,737,323,4,533,254,4,162,282,4,310,505和4,921,578号;国际申请PCT/US85/01161和PCT/US89/05040号;英国专利申请GB2193095A号;Mayer等,1986;Hope等,1985;Mayhew等,1987;Mayhew等,1984;Cheng等,1987;以及《脂质体技术》(Liposome Technology),1984,本文都已纳入作为参考)。

悬浮于水溶液中的脂质体一般呈球形,具有一层或多层同心状的脂双层分子。每一层由一层平行排列的分子组成,由通用结构式XY代表,其中X是亲水性部分,Y是亲脂性部分。在水性悬液中,由于每一层都呈同心状排列,因此亲水性部分趋向于与水相接触,而亲脂性区域趋向于自身相连。例如,当脂质体内外都有水相时,脂质分子形成双层,其排列方式是已知的薄层,XY-YX。当多个脂质分子的亲水部分和亲脂部分互相接触时易形成脂质聚集物。聚集物的尺寸和形状由于多种不同变量如溶剂的性质和溶液中其他化合物的存在而不同。

脂质制剂的制备通常通过声处理或一系列的脂质体混合物的挤出来完成,主要过程如下:(I)反相蒸发(II)脱水-从新水化(III)去污剂透析(IV)薄膜水合。一方面,某些实施方式中制备脂质体的方法是通过热声处理,经过递减孔径的膜或滤器依次挤压,最后形成小而稳定脂质体结构形式。这一制备过程制备的脂质体/治疗化合物或脂质体具有合适而均一的尺寸,其结构稳定并且具有最大活性。这种技术是本领域普通技术人员所熟知的(见Martin,1990)。

制备出来后脂质结构就可用于包裹毒性的(即化疗药)或在循环中不稳定的(如核酸)的化合物。脂质体包裹可以使这些化合物的毒性降低,在血液中的半衰期延长(Gabizon等,1990)。

许多疾病治疗措施用到脂质以转移基因从而改善常规治疗措施或建立新的治疗方法,特别过度增生性疾病的治疗。脂质体制剂的优势在于其可以提高体内基因转移的效率(Templeton等,1997)和用这些方法制备的脂质体。其他制备脂质制剂进行核酸转移的方法也有描述(WO 99/18933)。

另外一种脂质体制剂是一种双亲性的载体,叫溶剂稀释微载体(SDMC),可以将特定分子整合到脂质载体的脂双层中(美国专利5,879,703号)。SDMC可用于转移脂多糖、多肽、核酸以及类似物质。当然,其他任何制备脂质体的方法都可以被本

领域的技术人员使用以获得预期的本发明的脂质体制剂。

b. 脂质体靶点

与脂质体有关的本发明的组合物可以改善其生物分布和其他特征。例如，脂质体介导的核酸转移和外源 DNA 体外表达都已非常成熟(Nicolau 和 Sene, 1982; Fraley 等, 1979; Nicolau 等, 1987)。在培养的鸡胚胎、Hela 细胞和肝细胞中进行脂质体介导的基因转移和外源 DNA 表达已被证明是可行的(Wong 等, 1980)。经静脉注射在大鼠中进行脂质体介导的基因转移也已成功实现(Nicolau 等, 1987)。

需要说明的是脂质体组合物可以含有附加材料以便运送到组织中。例如，在本发明的某些实施方式中，脂质或脂质体可以与红细胞凝集病毒(HVJ)相连。这种方法已被证实可以促进脂质体与细胞膜融合因此可以促使脂质体包裹的 DNA 进入细胞内(Kaneda 等, 1989)。在另外一个实施例中，脂质或脂质体可以与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)形成复合物或结合在一起(Kato 等, 1991)。还有一个实施方式是将脂质与 HVJ 和 HMG-1 相连。

可以通过添加配基达到靶向转运的目的，这种添加不会降低脂质体大量转运本发明的化合物的能力。需要说明的是这种方法可以使其转移到特定细胞、组织和器官。配基转运系统的靶向特异性是基于不同类型的细胞上都有该配基受体的分布。靶向配基既可以非共价也可以共价连接到脂质复合物上，也可以用各种方法连接到脂质体上。

将配基交联到脂质体上(如上所述)的典型方法见美国专利 5,603,872 和 5,401,511 号的描述，本文已特地完整纳入作为参考)。各种配基都可以通过氨基交联共价结合到脂质体表面。脂质体，特别是含有磷脂酰乙醇胺(PE)的多层小泡(MLV)或单层小泡如微乳化脂质体(MEL)和大单层脂质体(LUVET)已用已有方法制备出来。脂质体内含有 PE 可以在脂质体表面提供一种活性功能残基—伯胺以利于交联。配基如表皮生长因子(EGF)已成功连接到 PE-脂质体上。配基共价结合在脂质体表面的离散位点上。位点的数量和表面密度受脂质体制备和脂质体类型的控制。脂质体表面也有非共价结合位点。为了制备配基和脂质体的共价结合物，已经研究了交联剂的效率和生物相容性。交联剂包括戊二醛(GAD)、双功能环氧乙烷(OXR)、乙烯甘油二环氧丙醚(EGDE)和水溶性的碳化二亚胺，优选 1-乙基-3-(3-二甲基丙氨基)碳化二亚胺(EDC)。通过交联复合化学，可以制备出能识别底物和脂质体的氨基交联物。

i. 靶向配基

靶向配基既可以锚定于复合物的亲脂性部分也可以附着在复合物亲水性部分的

末端活性基团上。靶向配基通过一个连接到亲水性多聚物末端的活性基团上的连接物附着在脂质体上。优选的活性基团包括氨基、羧基、酰肼基和巯醇基。靶向配基和亲水性多聚物的耦合可以用本领域普通技术人员所熟知的标准有机化学方法完成。在某些特定实施方式中，靶向配基的总浓度为约 0.01mol 到 10%mol。

靶向配基可以是任何具有靶向区域特征性组分特异性的任何配基。优选的靶向配基包括蛋白如多克隆或单克隆抗体、抗体片段或嵌合抗体、酶、或激素、或糖如单糖、寡糖或多糖(见 Heath 等, 1986)。例如, disialoganglioside GD2 是一种肿瘤抗原, 该抗原已被证实来源于神经外胚层肿瘤如神经母细胞瘤、黑色素瘤、小细胞肺癌、神经胶质瘤和某些肉瘤(Cheresh 等, 1986, Schulz 等, 1984)。含有抗 disialoganglioside GD2 单克隆抗体的脂质体已被用于帮助脂质体靶向表达该肿瘤抗原的细胞(Montaldo 等, 1999; Pagnan 等, 1999)。在例外一个非限定性例子中, 乳腺癌和妇科肿瘤抗原特异性的抗体被描述在美国专利 5, 939, 277 号中, 本文已纳入作为参考。还有一个非限定性例子是前列腺癌抗原特异性的抗体被描述在美国专利 6, 107, 090 号中, 本文已纳入作为参考。因此, 本文所描述的或本领域普通技术人员所熟知的抗体可以结合本发明的组合物和方法用于引导脂质体靶向到达特定组织或细胞。在本发明的某些实施方式中, 所用的靶向配基可与整合素、蛋白多糖、糖蛋白、受体或运输蛋白作用。适宜的配基包括任何具有靶器官细胞特异性的配基, 或者靶器官结构特异性的配基, 这些靶器官由于局部出现病理状态如肿瘤而暴露于血液循环中。

在本发明的某些实施方式中, 为了增加向细胞的转运、增加向靶细胞的转运或限制向非靶细胞的转运, 将抗体或环肽靶向序列(配基)与脂质复合物相连。这种方法是本领域所熟知的。例如, 脂质体已被进一步描述可以特异性地靶向哺乳动物中枢神经系统的细胞(美国专利 5, 786, 214 号, 本文已纳入作为参考)。脂质体基本由

N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、胆固醇和油酸组成, 其中神经胶质特异性的单克隆抗体与脂质体相连。需要说明的是单克隆抗体或抗体片段可用于靶向转移到动物的特定细胞、组织或器官, 如脑、心、肺、肝等。

另外, 化合物也可以通过受体介导的转移和/或含有脂质或脂质体的靶向载体转运到靶细胞。这是利用发生在靶细胞上的受体介导的内吞作用选择性摄取大分子。由于各种受体在细胞上的分布具有细胞类型特异性, 因此这种转运方法为本发明添加了另一种程度的特异性。

因此在本发明的某些方面, 可以根据特异性表达于靶细胞群上的受体来选择配基。本发明化合物的细胞特异性转运系统和/或靶向载体可以含有与脂质体结合的

特异性结合配基。被转运的化合物被包裹在脂质体中，特异性结合配基被功能性地掺入到脂质体膜上。因而脂质体可以特异性地结合靶细胞的受体并把脂质体内容物转运到细胞。这种系统已被证实是具有功能的，例如，含有表皮生长因子(EGF)的系统被用于将核酸通过受体介导的方式转运到 EGF 受体表达上调的细胞。

在某些实施方式中，受体介导的转运系统和/或靶向载体含有细胞受体特异性配基和结合药物。其他的一些含有细胞受体特异性配基，被转运的修饰蛋白或编码修饰蛋白的多聚核苷酸被人工附着在配基上。例如，几种配基已被用于受体介导的基因转移(Wu 和 Wu, 1987; Wagner 等, 1990; Perales 等, 1994; Myers, EP0 0273085)，上述文献确立了该技术的可操作性。在另外一个实施例，描述了转运到另外一种哺乳动物细胞的特异性方法(Wu 和 Wu, 1993, 本文已纳入作为参考)。

还有一种实施方式的特异性结合配基含有一种或多种可直接与细胞特异性结合的脂质或糖蛋白。例如，乳糖基神经酰胺是一种含有半乳糖末端的 asialoganglioside，被掺入到脂质体中，发现可以增加肝细胞对胰岛素的摄取(Nicilau 等, 1987)。Asialoglycoprotein、asialofetuin 含有末端半乳糖残基，也被证实可以引导脂质体靶向到达肝脏(Spanjer 和 Scherphof, 1983; Hara 等, 1996)。连接到多肽主链上的甘露糖基、岩藻糖基或 N 乙酰基葡萄糖胺与 manose 受体可以高亲和力结合(美国专利 5, 432, 260 号，本文特地完整纳入作为参考)。需要说明的是本发明的细胞或组织特异性转化构建物也可以以同样的方式被特异性地转运到靶细胞或靶组织。

在另外一个实施例中，乳糖基神经酰胺和针对 LDL 受体相关蛋白的肽如载脂蛋白 E3(“Apo E”)被用于将脂质体靶向转运到肝脏(Spanjer 和 Scherphof, 1983; WO 98/0748)。

叶酸盐和叶酸盐受体也被证实可用作细胞靶向物(美国专利 5, 871, 727 号)。在这个实施例中，维生素叶酸盐被连接到复合物上。叶酸盐受体与其配基具有高亲和力并在几种肿瘤细胞系表面过量表达，其中包括肺、乳腺和脑肿瘤。抗叶酸物质如氨甲蝶呤也可用作靶向配基。运铁蛋白转运系统的靶位是多种表达运铁蛋白受体的可复制细胞(Gilliland 等, 1980)。

c. 脂质体/核酸结合物

需要说明的是脂质体组合物含有细胞或组织特异性核酸时，这一技术就可适用于本发明。在某些实施方式中，脂质非病毒制剂提供了一种病毒基因治疗的替代方法。尽管许多细胞培养试验证实脂质非病毒基因转移、通过脂质制剂进行系统基因转移有许多限制。脂质非病毒基因转移的主要限制在于组成非病毒转移载体的阳离

子脂质有毒性。脂质体的体内毒性可以部分解释体外和体内基因转移结果的差异。造成这种矛盾数据的其他因素是在血清蛋白存在和不存在时脂质体的稳定性是不同的。脂质体与血清蛋白之间的相互作用严重影响脂质体的稳定性(Yang 和 Huang, 1997)。阳离子脂质体可以吸附和结合带负电荷的血清蛋白。被血清蛋白包被的脂质体要么被溶解要么被巨噬细胞吞噬,因而脂质体被从循环中清除。现在的脂质体体内转移方法用雾化、皮下注射、真皮内注射、瘤内注射或颅内注射以避免脂质体在循环中出现与阳离子相关的毒性和稳定性的问题。脂质体和血浆蛋白的相互作用是引起体外(Felgner 等, 1987)和体外(Zhu 等, 1993; Philip 等, 1993; Solodin 等, 1995; Liu 等, 1995; Thierry 等, 1995; Tsukamoto 等, 1995; Aksentijevich 等, 1996)基因转移差异的主要原因。

将病毒颗粒靶向转移到缺乏单个细胞特异性标记的细胞内的典型方法已被描述(美国专利 5,849,718)。在此方法中,比如抗体 A 是肿瘤特异性的,但是对正常的心、肺组织也有特异性,抗体 B 是肿瘤特异性的,但是对正常的肝细胞也有特异性。如果单独使用抗体 A 或抗体 B 转运抗增殖核酸到肿瘤细胞就可能正常的心和肺或肝细胞造成损伤。但是可以将抗体 A 和抗体 B 结合使用以改善细胞靶向性。其中,抗体 A 连接一个编码抗增殖核酸的基因,通过受体介导的摄取系统被转运到肿瘤细胞中,同时也被转运到心和肺组织中。但是基因在这些细胞内不会转录因为缺乏必须的转录因子。抗体 B 连接一个编码转录因子的通用活性基因,该转录因子可以使抗增殖核酸转录,然后被转移到肿瘤和肝细胞中。这样心和肺细胞中只有灭活的抗增殖核酸,由于其不能被转录因此不会产生毒性。在肝细胞中,编码转录因子的基因被转移和转录,但是由于没有抗增殖核酸基因存在因此也不会产生毒性。而在肿瘤细胞中,两个基因都被转移因此转录因子可以使抗增殖核酸转录而产生肿瘤特异性的毒性效应。

另外一些用于基因转移治疗过度增殖性疾病的靶向配基可以转移基因,这些基因的产物在靶向系统中的毒性比非靶向系统要大。这种基因的例子包括前凋亡基因如 Bax 和 Bak,来源于病毒和其他病原体的基因如腺病毒 E4 或 f4、大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶即所谓的“自杀基因”,该基因可以将前药 6-甲基嘌呤脱氧核苷转化成毒性嘌呤 6-甲基嘌呤。用前药治疗的其他自杀基因有大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因和 HSV 胸腺嘧啶激酶基因。

还有一种可能就是利用非靶向性的或靶向性的脂质复合物在体内产生重组或修饰蛋白。例如,两个或多个质粒可用于引导逆转录病毒序列加上治疗基因进入过度增殖的细胞内。一个质粒来源的逆转录病毒蛋白可以包装第二携带基因的治疗质

粒。因此转导的细胞成为携带治疗基因的非复制逆转录病毒的产生位点。这些逆转录病毒进而可以感染邻近的细胞。治疗基因的启动子可以是也可以不是可诱导的或组织特异性的。

同样，被转移的核酸可以代表一个有复制能力或条件复制能力病毒基因组，如缺乏全部或部分腺病毒 E1a 或 E2b 区，或者含有一个或多个转录自 E1a 和/或 E2b 区的组织特异性或可诱导启动子的腺病毒基因组。这种有复制能力或条件复制能力的核酸可以含有或不含有附加的治疗基因如肿瘤抑制基因或抗癌基因。

d. 脂质给药途径

给予病人的脂质组合物(即脂质体-修饰蛋白或编码修饰蛋白的多聚核苷酸)的实际剂量要根据病人的物理的或生理状况决定，如体重、病情严重程度、病人的特发症以及给要途径。考虑到这些因素，给予特定病人的脂质组合物的量和/或疗程就很容易确定。

V. 实施例

下面的实施例用于证明本发明的特定实施方式。本领域的普通技术人员通过实施例中描述的技术按照发明者披露的方法可以很好地实现本发明，并且可以考虑不同的实现模式。但是，根据本发明的精神本领域的技术人员可以对某些特定实施方式加以改进在不脱离本发明的精神和范围的情况下也能得到相似的或同样的结果。

实施例 1：序列缺失研究

编码重组 gelonin (SEQ ID NO:2) 的核苷酸序列用作模板制备这些毒素。rGel 的序列分析和结构模型显示分子折叠成折叠片、 β 盘绕和发卡环。根据这些研究结果，氨基酸 200—277 (C 末端) 折叠成结合袋，类似于 RTA 的 B 链入坞口。由于 rGel 没有 B 链，从理论上分析这种“入坞口”可能是毒素的退化部分，对维持这个蛋白的生物学活性来说并不是必须的。

从 C 末端和 N 末端序列缺失突变编码 rGel 的 cDNA 分子见图 3A 和 3B 以及表 7，所得到的分子命名为 CFR1901-CFR1905。在预试验中，经过兔网织红细胞裂解分析 (RRLA) 证实构建物 CFR1904、1905、2001、2007 和 2024 有可检测活性。这些构建物的活性比 CFR1888 地 10^5 - 10^3 倍，CFR1888 被认为是具有活性的毒素分子 (Munishkin 等, 1995)。

CFR1901

为了构建缺失 1-46 氨基酸残基的 CFR1901，将 $1\mu\text{g}$ 纯化的含 CFR1888 cDNA 的 pX2 载体用 50 单位的限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sma* I (Boeringer-Mannheim) 消化。5' *Nco* I 位点上的突出部分用 1 个单位的绿豆核酸酶 (New England Biolabs) 钝化 30

℃孵育 0.5 小时。用 Qiagen PCR 纯化试剂盒去除绿豆核酸酶。所得到的 DNA 通过与 3'钝化的 Sma I 位点连接而环化。

CFR1902

用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Cla* I 消化 CFR1888。末端补平以维持正确的阅读框架，在从新连接前用 Klenow 酶(New England Biolabs)处理 3'突出端以使其钝化。

为了表达蛋白，50ng 质粒 DNA 转化 50 μ l BL21(DE3)pLysS competent 大肠杆菌宿主细胞(Novagen,Inc)。挑取单个克隆，接种到 100ml 含 200 μ g/ml 氨苄青霉素的 Luria Broth 中，37℃振摇使其生长直到 OD₆₀₀达到 0.6-0.8。然后加入终浓度为 0.1mM 的 IPTG(Boeringer-Mannheim)诱导重组蛋白的表达。培养物在离心收获之前再于 37℃孵育 2 小时。

表 7

名称	设计号	描述和/或氨基酸缺失	氨基酸替代/添加	其他功能
1888	CFR1888	无	C 末端 KDPE 转变成 KDEL	无
KS	CFR1901	CFR1888 缺失 AA1-46	无	无
KC	CFR1902	CFR1888 缺失 AA1-67	无	无
KB	CFR1903	CFR1888 缺失 AA198-251	AA25 前添 LAAA	无
SB	CFR1904	CFR1888 缺失 AA1-46 和 198-251	AA252 前添 LAAA	无
CB	CFR1905	CFR1888 缺失 AA1-67 和 198-251	AA253 前添 LAAA	无
3825	CFR2018	CFR1888 缺失 AA104-111	AA43=K, C; AA164 后添加 L	无
	CFR2018	CFR1888AA252-257 被替代	VDKDPKA	无
N10	CFR2001	CFR2018 缺失 AA1-9	无	无
N43	CFR2007	CFR2018 缺失 AA43-70	无	无
N87	CFR2015	CFR2018 缺失 AA87-107	无	无
N4389	CFR2024	CFR2018 缺失 AA43-70 和 89-109	无	无
N100130	CFR2005	CFR2018 缺失 AA100-109 和 130-155	无	无
C211	CFR2004	CFR2018 缺失 AA194-223 和 235-252	无	无
3825-Y1	CFR2019	CFR2018 缺失 AA202-252	FQMVITIDQLKPKIALLKFKVK	无
3825-Y2	CFR2020	CFR2018 的 AA28-43 被替代	NQWDOTQHGVLELRQQ	无
3825-Y3	CFR2021	CFR2018 的 AA73-89 被替代	IYIGTQERNEKLFYR	无
3825-Y4	CFR2022	CFR2018 的 AA187-196 被替代	EENETTCYMG	无
4389-Y1	CFR2025	CFR2024 的 AA153-203 被替代	FQMVITIDQLKPKIALLKFKVK	无

4389-Y2	CFR2026	CFR2024 的 AA28-42 被替代	NQWDOTQHGVELRQQ	无
4389-Y3	CFR2027	CFR2024 的 AA45-60 被替代	IYIMGTQERNEKLFYR	无
4389-Y4	CFR2028	CFR2024 的 AA138-147 被替代	EENETTCYMG	无
3825-Y1.2	CFR2029	CFR2019 的 AA28-43 被替代	NQWDGTQHGVELRQQ	无
3825-Y1.3	CFR2030	CFR2019 的 AA73-89 被替代	IYIMGTQERNEKLFYR	无
3825-Y1.4	CFR2031	CFR2019 的 AA187-196 被替代	EENETTCYMG	无
3825-Y2.3	CFR2032	CFR2020 的 AA73-89 被替代	IYIMGTQERNEKLFYR	无
3825-Y2.4	CFR2033	CFR2020 的 AA187-196 被替代	EENETTCYMG	无
3825-Y2.3.4	CFR2034	CFR2032 的 AA187-196 被替代	EENETTCYMG	无
3825-Y1.2.3.4	CFR2035	CFR2034 的 AA202-251 被替代	FQMVTTIDQLKPKIALLKFKV	无
4389-Y1.2	CFR2036	CFR2025 的 AA28-42 被替代	NQWDGTQHGVELRQQ	无
4389-Y1.3	CFR2037	CFR2025 的 AA45-60 被替代	IYIMGTQERNEKLFYR	无
4389-Y1.4	CFR2038	CFR2025 的 AA138-147 被替代	EENETTCYMG	无
4389-Y2.3	CFR2039	CFR2026 的 AA45-60 被替代	IYIMGTQERNEKLFYR	无
4389-Y2.4	CFR2040	CFR2026 的 AA138-147 被替代	EENETTCYMG	无
4389-Y2.3.4	CFR2041	CFR2039 的 AA138-147 被替代	EENETTCYMG	无
4389-Y1.2.3.4	CFR2042	CFR2041 的 AA153-203 被替代	FQMVTTIDQLKPKIALLKFKV	无
CB-Y1K	CFR2143	CFR1905 的 AA131-137 被替代	ISLENKWGKLFQMVTTIDQLKPKIALLKFKV	无
SB-Y1K	CFR2144	CFR1904 的 AA152-158 被替代	ISLENKWGKLFQMVTTIDQLKPKIALLKFKV	无
3825-Y1K	CFR2145	CFR2019 的 C 末端添加 AA	DEL	无
4389-Y1K	CFR2146	CFR2025 的 C 末端添加 AA	DEL	无

GrB-CB-Y1K	CFR2247	CFR2143 连接粒酶 B	G4S 接头	人源粒酶 B
GrB-SB-Y1K	CFR2248	CFR2144 连接粒酶 B	G4S 接头	人源粒酶 B
GrB-3825-Y1K	CFR2249	CFR2145 连接粒酶 B	G4S 接头	人源粒酶 B
GrB-4389-Y1K	CFR2250	CFR2146 连接粒酶 B	G4S 接头	人源粒酶 B
Bax-CB-Y1K	CFR2351	CFR2143 连接 Bax-Alpha	045 接头	人 Bax (全长)
Bax-SB-Y1K	CFR2352	CFR2144 连接 Bax-Alpha	045 接头	人 Bax (全长)
Bax-3825-Y1K	CFR2353	CFR2145 连接 Bax-Alpha	045 接头	人 Bax (全长)
Bax-4389-Y1K	CFR2354	CFR2146 连接 Bax-Alpha	045 接头	人 Bax (全长)
Bax (3..6)-CB-Y1K	CFR2455	CFR2143 连接 Bax (片段)	045 接头	人 Bax (3, 4, 5, 6 ☒)
Bax (3..6)-SB-Y1K	CFR2456	CFR2144 连接 Bax (片段)	045 接头	人 Bax (3, 4, 5, 6 ☒)
Bax (3..6)-3825-Y1K	CFR2457		CFR2145 连接 Bax (片段)	045 接头 人 Bax (
Bax (3..6)-4389-Y1K	CFR2458		CFR2146 连接 Bax (片段)	045 接头 人 Bax (

实施例 2：线性肽抗原区绘图

rGel 分子的抗原区再以前的文献中没有被描述过。rGel 分子的抗原区取决于分子的碳水化合物或肽序列。细菌中制备的重组 rGel 没有糖基化，因此针对 rGel 的抗体应该识别分子上的肽区。

为了确定 rGel 分子的抗原区，首先从接触重组 gelonin 的实验室工作人员的血清中分离人多克隆抗体。然后将血清加入到用 rGel 包被的 96 孔 ELISA 板中，加入抗人抗体以确定人抗 gelonin 抗体的存在。结果表明三个工作人员中有两个人的血清中抗体滴度明显高于对照人血清(图 1)。然后抽取 20ml 这两个人的血清用含 rGel 的 Affi-gel 亲和树脂进行亲和层析就可以得到多克隆人抗 gelonin 抗体。

跨越全长 rGel 分子的 10 个肽合成出来后包被 96 孔板。将人抗 gelonin 抗体加入到 96 孔板中，反应一段时间后用 ELISA 检测吸附到肽包被孔中的结合人抗体。如图 2 所示，与 23—53(区 1)、72—89(区 2)、181—198(区 3)和 223—252(区 4)肽反应的多克隆抗体被得到。去掉这些可被人多克隆抗体特异性识别的抗原区就可以设计出人工毒素 CFR-1001-2024。

实施例 3：以人源序列替代抗原区序列

利用有关抗原区的信息设计人/植物嵌合分子，这些抗原区是用上述的人抗 gelonin 抗体而确定出的四个 gelonin 分子上的特异性抗原区(氨基酸 205—257、23—42、71—88 和 189—204)。用 GenQuest/BLAST 数据库进一步分析这些序列确定与已知人源蛋白的同源性。本试验中还需要考虑的不仅是确定“人”同源序列，而且要确定这个序列再人工毒素分子上的排列位置以使所得到的杂交分子保持其酶解(n-糖苷)功能。

根据数据库搜索结果确定插入到人工毒素中的 4 个候选序列，这是进行氨基酸改变的基础(表 8)。区 1 的人同源序列与人 KELL 蛋白的同源性高达 40%，KELL 蛋白是一种具有锌指结合区的血型蛋白。令人感兴趣的是，天然 gelonin 的早期研究结果表明 gelonin 分子可以与锌指区结合(Sperti 等，1986)，但是本试验却无法证实这一点。对区 4(氨基酸 189—204)的分析结果表明该区与人 CFAH 蛋白的同源性达到 40%。区 2(氨基酸 23—42)的同源性检索结果表明该区与人 UTR0 蛋白的同源性达到 44%，UTR0 蛋白在细胞骨架锚定到细胞浆膜的过程中发挥作用。

表 8:人同种替代

<u>Y1 (205-257)</u> (源序列) (人源化序列)	GKLSFQIRTSGANGMFSEAVELERANGKYYVTAVDQVKPKIALLLKFLEKDPE GKL-FQMVT-----IDQLKPKIALLLKFVK----
<u>Y2 (23-42)</u> (源序列) (人源化序列)	ELRVKLKPEGNSHGIPLLRKK ELRVKNQWDGTQHGVEL-RQQ
<u>V3 (71-S8)</u> (源序列) (人源化序列)	SVYVVGYQVRNRSYFFKD SIYIMGIGERNEKLFYR-
<u>Y4 (1S9-204)</u> (源序列) (人源化序列)	QRIRPANNTISLENKW QRIREENETTCYMGKW

抗原位点被修饰和缺失的人工毒素被进一步在区3修饰以使之与人 KELL 蛋白的同源性达到 100%。人工毒素分子上 KELL 序列两侧的氨基酸也要作调整以便更接近全长 KELL 蛋白的序列排列顺序。替代区 3 的最终序列见表 8。表 9 所显示的是含有人同源序列的全长蛋白的 Gen Bank 序列同源性检索结果。

我们的试验结果清楚地表明用重组 gelonin 作为初始模板可以设计、构建和检测独特的缺失突变。

表 9: 潜在替代肽分析以鉴定 gelonin 抗原性序列 Y-1, Y-2, Y-3 和 Y-4

Y-1 替代		询问= VELERANGKKYVTAVDQVKPK	
蛋白质#	描述	一致性 (%)	序列
P33186 RPIG_GELMU	Gelonium Multiflorum	100	VELERANGKKYVTAVDQVKPK
P23339 RIPS_PHYAM	Phytolacca Americana	47	LELKNADGTKWIVLRVDEIKP
Q03464 RIPA_PHYAM	Phytolacca Americana	47	LELKNANGSKWIVLRVDDIEP
P10297 RIPC_PHYAM	Phytolacca Americana	47	LELYDASGAKWIVLRVDEIKP
P10978 POLX_TOBAC	Nicotiana Tabacum	40	MEIESMGKNKYFVTFIDDSRK
Q05234 VG27_BPML5	Mycobacteriophage L5	50	VELEGVNGERFNLTTGDQ
P23276 KELL_HUMAN	Homo Sapiens	40	LEQRRAGQKLFQMTIDQLK
P21278 GB11_MOUSE	Mus Musculus	38	EFQLSDSAKYLLTDVDRI
Y2 替代		询问= LRVKLKPEGNSHGIPLLRKK	
蛋白质#	描述	一致性 (%)	序列
P33186 RPIG_GELMU	Gelonium Multiflorum	100	LRVKLKPEGNSHGIPLLRKK
P24475 RIP3_GELMU	Gelonium Multiflorum	89	LRVKTKEGNSHGIPSLRK
P09053 AVTA_ECOLI	Escherichia Coli	60	LKLDALGNQHGIPLV
Q06194 FA8_MOUSE	Mus Musculus	47	LSLRPHGNSHSIGANEK
P39138 ARG1_BACSU	Bacillus Subtilis	50	LETSPSGNIHGMPL
P10305 ENPP_BPT3	Bacteriophage T3	61	LRVRVKPTGTSEG
P43254 C0P1_ARATH	Arabidopsis Thaliana	50	KVEGKAQGSSEGLP
P46939 UTRO_HUMAN	Homo Sapiens	44	RVKNQWDGTQHGVLRQQ
Y3 替代		询问=SVYVVGYQVRNRSYFFKD	
蛋白质#	描述	一致性 (%)	序列
P33186 RPIG_GELMU	Gelonium Multiflorum	100	SVYVVGYQVRNRSYFFKD
P29339 RIP2_MOMBA	Momordica Balsamina	61	NVYVVAYRTRDVSFFKE
Q00465 RIPA_LUFCY	Luffa Cylindrica	50	NVYIMGYLVNSTSYFFNE
P24478 RIPS_TRIKI	Trichosanthes Kirilowii	50	NVYVMGYRAGDTSYFFNE
P02879 RIC1_RICCO	Ricinus Communis	56	NAYVVGYRAGNSAYFF
P28590 ABR3_ABRPR	Abrus Precatorius	44	NAYVWAYRAGSQSYFLRD
P23368 MAOM_HUMAN	Homo Sapiens	37	IYIMGIQERNEKLFYR

P36758	VL2_HP34	Human Papillomavirus	44	SLVVIPRKRKRSYFFAD
Q05143	COX1_PROWI	Prototheca Wickerhamii	50	MYVVGLEDIDTRAYF
Y4 替代 蛋白质#			询问= FQQRIRPANNTISLENKW 一致性(%)	序列
P33186	RIPG_GELMU	Gelonium Multiflorum	100	FQQRIRPANNTISLENKW
P37874	YGXB_BACSU	Bacillus Subtilis	41	GQEKIPPAHSSVCLLDKW
P34652	CALX_CAEEL	Caenorhabditis Elegans	31	KGKWIPPKISNPAPFKGW
P34110	VP35_YEAST	Saccharomyces Cerevisiae	39	LQQFIPLVESVIVLSLKW
Q07009	CAN2_RAT	Rattus Norvegicus	33	KLIRIRNPWGQVEWTGKW
P37329	MODA_ECOLI	Escherichia Coli	50	QIEAGAPADLFISADQKW
P14336	POLG_TBEVM	Tick-borne Encephalitis Vires	83	VREDVVCYGGAWSLEEKW
P08603	CFAH_HUMAN	Homo Sapiens	40	GGFRISEENETTCYMGKW
P17632	MBHL_RHOGE	Rhodocyclus Gelatinosus	29	LVANIRAGDTATANVEKW

实施例 4: 人工 gelonin 毒素

下面的部分描述了用上述实施例的方法构建的 gelonin 毒素。

缺失毒素

CFR1888

从原始重组 gelonin 模板开始, 原始的 KDPE 的 C 末端经修饰后成为 KDEL 以促进蛋白进入细胞内核糖体区。

CFR1901-1905 (见表 7 和图 3A)

以 CFR1888 为模板, 在其 N 末端和/或 C 末端进行一系列缺失突变以确定分子上的哪些区被删除后不会影响分子的生物学活性。如图 3A 所示, 单个缺失突变 1901, 1902 和 1903 都没有活性, 但是当单个突变结合时 (CFR1904 和 CFR1905) 其生物学活性得以恢复 (图 3A)。

CFR2018

以 CFR1888 为模板, 如表 7 所示对其进行进一步修饰制备稍微小一些的分子并且在其 C 末端加上丙氨酸以增加其在细菌宿受试者内制备时的稳定性。

毒素的抗原性研究

利用 gelonin 分子上排列的线性肽绘出分子上的抗原区图谱。如图 1 所示, 通过人多克隆抗 gelonin 抗血清可以在分子上找到 4 个不同的抗原区。区 1 位于氨基酸 2055-257, 区 2 由氨基酸 23-42 组成, 区 3 含有氨基酸 71-88, 区 4 含有氨基酸 89-204。

CFR2001-2024

如图 3B 所示, 基于已发现的抗原区制备了 6 个缺失突变子。其中三个蛋白有生物学活性, 另外三个无活性。

CFR2019-2042

通过替代试验获得了人/植物嵌合分子。4 个抗原区提交到 GenBank 进行序列分析。通过 Swissprot 蛋白序列搜索寻找与上述 4 个抗原区有同源性的同源序列。

人同源序列

区 1 (氨基酸 205-257) 与人血型蛋白 KELL (P23276) 序列进行比较。发现与此蛋白上的一个序列具有 40% 的一致性和 65% 的阳性率。

区 2 (氨基酸 23-42) 与人 UTRO 蛋白 (P46939) 的序列一致性为 44%。

区 3 (氨基酸 71-88) 与人 MAOM 蛋白 (P23368) 的序列一致性为 37%, 阳性率为 68%。

区 4 (氨基酸 189-204) 与人 CFAH 蛋白 (P08063) 的序列一致性为 40%。

根据这些数据(表 8)制备出 4 个抗原区相应的人嵌合序列。这些序列代表了以人非抗原性序列代替植物蛋白的抗原区。

CFR2019-2024

以 CFR2019 和 CFR2024 为模板开始,合成一系列新设计的蛋白,命名为 CFR2019-2042(表 7)。用人嵌合同源序列替代这些蛋白上的区 1, 2, 3, 或 4。在含 50Kda 标记物的细菌中表达这些人工设计的毒素(CFR2018, 2019, 2024 和 2025),然后纯化。利用标记物的多克隆抗血清进行 Western 分析。

2019, 2024 和 2025 分子与起始模板 2018 蛋白相比其分子变小。Western 分析结果也显示每个毒素分子在 SDS-PAGE 上的平均迁移率都是相同的,说明这些分子与抗标记物抗体的反应活性大致相同。利用抗天然 CFR1888 分子的抗体为探针从新进行 Western 杂交,结果显示这种抗体与 2018 蛋白具有较好的反应性,而与 2019 和 2025 人工毒素基本不反应,与 2024 人工毒素只有较弱的反应。这些结果说明通过特异性的缺失(CFR2024)、抗原区替代(CFR2019)或抗原区的缺失与替代相结合(CFR2025)可以设计出新的毒素分子,这些分子基本不被亲本分子的抗体所识别,因此其抗原性减弱。

CFR2143-2146

这一系列的杂交分子被设计成具有蛋白 CFR1888 和 CFR2018 的最佳功能活性。

CFR2247-2458

设计出一系列既有 I 型毒素的 n 糖苷功能又有人选择性前调亡分子如 BAX 和粒酶 B 活性的分子。分析这些分子的 gelonin 组分功能活性及 BAX 和粒酶 B 活性。也可以检测其抑制无细胞蛋白合成的能力。

对这一系列分子的评价首先是检测 BAX 在细胞内的表达情况。可以用 BAX 抗体如通用抗 Bax6A7 抗体通过免疫分析如免疫沉淀或 Western 杂交进行。确定了 Bax 的表达情况后检测细胞的存活能力。存活能力的测定方法有很多,其中包括利用萤火虫荧光素酶构建物。萤火虫荧光素酶构建物是一种携带萤火虫荧光素酶(Luc)结构基因的哺乳动物表达载体(pGL3),将该载体与编码 BAX 和 BAX 融合蛋白的质粒一起导入到哺乳动物细胞系。利用 20ml 细胞提取物通过液闪计数测定荧光素酶的活性。通过比较试验组构建物与特异对照质粒的荧光素酶相对活性就可以知道细胞的存活能力。

粒酶 B 可以将 L-谷酰基-2-萘胺(Bachem, Philadelphia, PA)水解成 2-萘胺,因此通过测定 2-萘胺的荧光强度就可以知道含有全部或部分粒酶 B 多肽的杂交分子的荧光素酶活性。酰胺酶的活性测定方法如下:将 1.00mM 的 L-谷酰基-2-萘胺

溶解到缓冲液 A (0.3M NaCl 0.1M HEPES, 用 1M NaOH, 1mm Na₂EDTA 0.05M(v/v) Triton x-100 将 pH 调整到 7.0) 中, 21℃条件下用 Perkin-Elmer 650-10M 荧光分光光度计测量 340nm 激发荧光强度和 415nm 的发射荧光强度(各有 5nm 的带宽变化)。将一小管酶溶液加入到底物溶液中, 测定 10—40 分钟内发射荧光强度的变化。另外, 也可以 BAADT(N-a-t-butoxycarbonyl-L-alanyl-L-alanyl-L-aspartyl-thiobenzyl ester)为底物通过连续比色测定粒酶 B 的活性。为了检测每一组分, 将 1-50 μl 加入到缓冲液 A 中, 缓冲液 A 含有 1 M (v/v) 10mM BAADT/(CH₃)₂50 和 1 M (v/v) 11 mM dithiobis (2-硝基苯酸) (Sigma), 在 21℃条件下用 Thermomax plate reader (Molecular Devices Inc., Palo Alto, CA)测定 405nm 处的吸光度增加值。吸光度增加值可以转换成酶活性。

实施例 4: 实施例 5 的材料和方法

材料

从表达鼠抗体的杂交瘤细胞中提取杂交瘤 RNA, 用 Novagen (Madison, WI) 和 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) 的试剂盒从 RNA 中扩增编码抗体 ZME-018 的 cDNA。PCR 试剂来自于 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA), 分子生物学酶购自 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) 或 New England Biolabs (Beverly, MA)。细菌菌株和 pEt 细菌表达质粒来自于 Novagen (Madison, WI), 生长培养基购自 Difco Laboratories (Detroit, MI)。其他所有化合物和试剂购自 Fisher Scientific 或 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。金属亲和树脂 (Talon) 来自于 Clontech Laboratories (Palo Alto, CA)。其他色谱树脂和材料购自 Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)。组织培养试剂来自于 GIBCO BRL (Gaithersburg, MD)。

抗体 ZME-018 VH 区和 VL 区的克隆

表达 ZME-018 (IgG2A) 抗体的鼠杂交瘤 FMT 112 P2 的 mRNA 用 Invitrogen Fast Track kit 提取, 然后用在特定条件下 Invitrogen Copy Kit 转录成 cDNA。抗体轻链和重链可变区的扩增是用 Novagen Ig-Prime kit 进行, 所用引物为鼠 Ig 引物对。轻链 PCR 扩增条件如下: 30 个循环, 94℃×1 分钟、60℃×1 分钟、72℃×1 分钟, 最后 72℃孵育 5 分钟。重链的反应条件与轻链相似, 除了其退火温度为 50℃而不是 60℃。用这种方法扩增的 DNA 克隆到 Invitrogen T/A 克隆载体 pCRII 中, 不需进一步纯化就可以转化大肠杆菌 XL1-Blue, 然后通过蓝-白斑筛选。阳性克隆(分别从重链和轻链文库中挑选 5 个克隆)用 T7 和 SP6 启动子引物测序, 然后比较抗体区与其他免疫球蛋白的同源性。

构建编码单链抗体 scfvMEL 和免疫毒素 scfvMEL/rGel 的基因

一种两步的剪接-重叠延伸 PCR 方法用于构建单链抗体 ZME-018，以轻链和肿瘤 DNA 克隆为模板。轻链的扩增引物为 A (5'-GCTGCCCAACCAGCCATGGCGGACATTGTGATG-3') 和 C (5'-GCCGGAGCCTGGCTTGC(A/C)GCTOCCGCTGGTGGAGCCTITGATC(A/T)CCAG-3')，重链的扩增引物为 B (5'-AAGCCAGGCTCCGGCGAAGGCAGCACCAAAGGCGAAGTGAAGGTT-3') 和 D (5'-GCCACCGCCACCAC TAGTTGAGGAGACTGT-3')。每组 PCR 的条件为：30 个循环，94℃变性 1 分钟，50℃退火 1 分钟，72℃延伸 1 分钟，最后 72℃孵育 5 分钟。从每一反应液中取 1/10 体积混和直接用在第二步 PCR 中，引物只有引物 A 和 Y 引物 D，反应条件同上。终产物用 Geneclean II (Bio 101, Vista, CA) 纯化后以限制性内切酶 Nco I 和 Spe I 消化，然后克隆到 T7 来源的质粒 pET-22b 中。通过重叠接合延伸 PCR 将编码 scfvMEL 和重组 gelonin 的基因融合在一起，以抗体 DNA 和 gelonin DNA 为模板，引物为 NbsphZME (5'-GGGCGGTGGCTCCGTCATGACGGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATrC-3')，NTXOM (5'-GGTGGCGGTGGCTCCGGTCTAGACACCGTGACG-3')，和 XOMBAC (5'-AAGGCTCGTGTGACCTCGAGTCATTAAGCTTTAGGATCTTTATC-3') (图 4)。PCR 产物经过如上述的纯化和消化后克隆到载体 pET-32a 中。经过测序证明正确的克隆转化购自 Novogen 的大肠杆菌细胞株 AD494(DE3) pLys S 中表达融合毒素。

蛋白在大肠杆菌中的表达

为表达免疫毒素，将细菌接种到含有高强度抗生素选择性 (200 μg/ml 氨苄青霉素，70 μg/ml 氯霉素和 15 μg/ml 卡那霉素) 生长培养基中 37℃培养，直到细菌生长到对数生长早期 ($A_{600}=0.4-0.8$)。然后将培养物用含同样浓度抗生素的新鲜 2xYT 培养基稀释 1 倍，然后加入 0.1mM IPTG 在 23℃孵育 16-23 小时使靶蛋白表达。所得到的细菌诱导培养物离心后储存在 -80℃以便进行下一步的纯化。

免疫毒素/蛋白质纯化

从表达免疫毒素 scFvZME-Gel 的培养物中离心得到的冷冻细菌沉淀物在室温下解冻后加入 pH 8.0 的 10mM Tris-HCl 在 4℃裂解 30 分钟。然后将细菌裂解物用细胞裂解仪超声破碎三次，每次 10 秒，再用 14,000rpm 于 4℃离心 30 分钟。将上清液转移出来置于冰上，细胞沉淀重复进行超声破碎。然后将两次破碎后离心的上清液混和，用 SS-34 转子在 4℃超速离心 40,000rpm 45 分钟。含有可溶性蛋白的样品过滤 (0.22 μm 孔径的滤膜)，用 1M Tris-HCl (pH 8.0) 将 Tris-HCl 的浓度调整到 40 mM，然后在室温下加入到用同样缓冲液预平衡的 Talon 金属亲和层析柱中。上样以后用 3 倍柱体积的上样缓冲液洗脱，再用 5 倍柱体积的 40 mM Tris-HCl (pH

8.0)、500 mM NaCl 和 5 mM 咪唑洗脱,然后用 5 倍柱体积的 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)、500 mM NaCl 和 100-200mM 咪唑将结合到柱子上的蛋白洗脱下来。混和含有免疫毒素的组分,定量后根据 Novagen (Madison, WI) 建立的方法用肠激酶将 6xHis 切掉,然后透析到 20mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM NaCl 溶液中。

ELISA 和 Western 分析

ELISA 的所有孵育步骤都是在室温下孵育 1 小时,除非特殊说明,在两次孵育期间用 ELISA 洗涤缓冲液(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20)。96 孔板的孔用 50,000 个 gp240 抗原阳性 A375M 黑色素瘤细胞包被并干燥。然后从新水化并用溶于洗涤缓冲液中的 3% BSA 封闭。96 孔板中加入纯化的免疫毒素样品、兔抗 gelonin 多克隆抗体(浓度为 100ng/ml,溶于稀释缓冲液【含 1mg/ml BSA 的 ELISA 洗涤缓冲液】中)和过氧化物酶连接的羊抗兔 IgG 抗体(Sigma,用稀释缓冲液稀释到 1:5,000)孵育。用洗涤缓冲液洗涤每一孔,然后用溶于 0.1 M 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.2)中的 ABTS (2,2'-azino-bis [3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid])染色 30 分钟,在 405nm 处测吸光度。

除非特殊说明,Western 杂交的所有孵育步骤都是在室温下孵育 1 小时。主要步骤为:蛋白通过 SDS-PAGE 分离,然后在转移缓冲液(25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 190 mM 甘油, 20% (v/v) HPLC 级甲醇)中 4℃过夜转移到硝酸纤维素膜上,所用电压为 40v。滤膜用溶于 Western 封闭缓冲液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl)中的 5%BSA 封闭,然后与兔抗 gelonin 多克隆抗体(浓度为 100 ng/mL,溶于 Western 洗涤缓冲液 TBS, pH 7.6, 0.5% Tween-20 中)和过氧化物酶连接的羊抗兔 IgG 抗体(Sigma,用洗涤缓冲液稀释到 1:10,000)连续反应。用 Amersham ECL 检测系统检测所产生的信号。

网织红细胞裂解体外翻译分析

给予各种剂量的免疫毒素后, gelonin 可以诱导抑制放射性标记(³H)的亮氨酸掺入蛋白质中,根据厂家(Promega)的说明书和文献的描述(Press 等, 1986)利用无细胞蛋白合成系统测定亮氨酸掺入的抑制率。

免疫荧光染色分析

抗原阳性细胞(A375 黑色素瘤细胞)加入到多聚赖氨酸包被的 16 孔槽状载波片(Nunc)上,每个槽加入 10⁴ 个细胞, 5%CO₂ 中 37℃孵育过夜。在不同时间点上用 50 μg/ml 的 scfvMEL/rGel 融合构建物处理。然后细胞用 PBS 洗涤,结合到细胞表面的蛋白质通过在甘氨酸缓冲液(500 mM NaCl, 0.1 M 甘氨酸, pH 2.5)中孵育 10 分钟被剥离,用 0.5 M Tris, pH 7.4 中和 5 分钟,用 PBS 简单洗涤,然后用 3.7

%的甲醛(Sigma)在室温下固定 15 分钟,再用 PBS 简单漂洗。然后将细胞放入到含有 0.2 % Triton X-100m 的 PBS 中渗透 10 分钟,用 PBS 洗涤三次,再用含 3%BSA 的 PBS 在室温下孵育 1 小时。用 PBS 简单洗涤后,细胞与兔抗 scfvMEL 抗体或兔抗 rGel 多克隆抗体孵育,抗体用含 0.1% Tween-20 和 0.2 % BSA 的 PBS 稀释到 1: 500,室温下孵育 1 小时。然后用含 0.1% Tween-20 的 PBS (PBST)洗涤三次,每次 10 分钟,用含 3%BSA 的 PBS 在室温下封闭 1 小时,再加入 1:100 稀释的异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗兔 IgG 抗体(Sigma)。对照组细胞只与(FITC)标记的抗兔二抗(1:100)孵育。用 PBST 洗涤三次后再用 PBS 洗涤 10 分钟,然后在计数液中计数。载玻片放到荧光显微镜下观察,每一照片至少含有 10 个视野,放大倍数为 400 倍。

体外细胞毒试验

样品的分析采用标准 72 小时细胞增殖试验,所用细胞为对数生长期的抗原阳性 A375M 和抗原阴性 Me-180 或 SK-OV-3 单层细胞(5,000/孔),染色方法为以前文献所描述的结晶紫染色方法(Ogishikawa 等, 1992)。

体内细胞毒试验

4-6 周龄的去胸腺小鼠(裸鼠)分组,每组 5 只放在一个笼子内。在其右腹部皮下注射对数生长期的人黑色素瘤细胞 A-375(5×10^6 个细胞/小鼠),使肿瘤在小鼠体内生长。肿瘤长到可测量的大小($\sim 30-50 \text{ mm}^2$)时,用生理盐水(对照组)或各种浓度的 scfvMel/rGel 融合毒素处理(尾静脉注射),连续注射 4 天。再观察动物并测量肿瘤 30 天。

实施例 5

单链重组抗黑色素瘤抗体融合到 gelonin 上

设计 seFvMEL/rGel 融合蛋白

以 ZME-018 抗体的可变区基因和 gelonin 基因(Rosenblum 等, 1999)为模板构建抗黑色素瘤免疫毒素基因。第一步,在一个方向上装配免疫毒素,然后检测其对抗原阳性黑色素瘤细胞 A375M 的结合能力和细胞毒性。利用 PCR 方法将编码抗体和 gelonin 片段的基因连接起来构建一个按抗体-毒素顺序排列的融合体。免疫毒素基因也可以在 C 末端添加一个六聚组氨酸标记,利用 Novagen T-7 来源的表达载体 pET-32b 在大肠杆菌 AD494(DE3)中表达。

图 4 显示的是表达的免疫毒素的方向和蛋白质连接区氨基酸接头的序列。抗体的构建是将轻链可变区(V_L)的 N 末端通过一个 18 氨基酸的易弯曲肽接头(Alfthan 等, 1995)连接到重链可变区(V_H)的 C 末端。Gelonin (CYR2015) (在本实施例中指 rGel)放置在 V_H 的下游通过另一个接头相连。我们选择这种结构的理由在于该结构

不会影响抗体结合位点的弯曲性。位于融合蛋白 N 末端的毒素需要一个较长的肽来为两个蛋白区提供最佳的空间定向, 这种变体正在构建中。最终融合基因的 DNA 序列分析确定了终产物的序列, 并且表明利用 PCR 方法不会引入错误的碱基。另外, 序列分析结果也表明靶基因正确地插入到 pET-32b 载体的阅读框架中。

在无细胞蛋白合成系统中重组融合毒素具有与不含抗体的重组 gelonin 相同的蛋白合成抑制活性, 说明 gelonin 活性位点裂隙中没有明显的硬脂酸堆积, 这在于我们所设计的分子中抗体片段的近似性。另外, 在这个融合构建物中没有蛋白裂解位点, 文献资料也表明 gelonin 不需要从构建物上裂解下来就可以维持其生物学活性。这与蓖麻毒蛋白 A 链(RTA)形成强烈对比, RTA 需要从蛋白质载体上裂解下来才能恢复其生物活性(Kim 等, 1988; O' Hare 等, 1990)。这是一个意外的惊喜, 因为 gelonin 和 RTA 具有相同的作用机制(Stirpe 等, 1992), 并且具有 30% 的序列同源性(Rosenblum 等, 1999)。

融合蛋白的表达和纯化

含有融合基因的质粒载体 pET-32b 转导到大肠杆菌 AD494 (DE3) pLysS 中, 通过加入 IPTG 诱导靶蛋白的表达。如考马斯染色凝胶所显示的预期分子量(68 kDa)的蛋白被诱导出来。这个蛋白用 IMAC 树脂纯化, 用重组肠激酶(EK)剪切而洗脱下来得到最终的融合蛋白, 其在凝胶上的条带大小为 56 kDa。融合体也可以用抗 gelonin 抗体和抗单链抗体通过 Western 杂交分析。迁移到 56 kDa 处的 sfvMEL/rGel 融合构建物与两个抗体都可以结合, 因此说明融合构建物中存在免疫反应性抗体和毒素成分。从诱导的细菌培养物中分离的可溶性 sfvMEL/rGel 免疫毒素的估计产率大约为 700 μ g/L; 但是最终纯化出的融合毒素的产率大约为 200 μ g/L。产率降低的主要原因在于 IMAC 无法完全捕获上样液中所有的可溶性靶蛋白。更换结合缓冲液和条件以及其他品牌的 IMAC 捕获树脂也无法改善这些结果。

免疫毒素的 ELISA 结合

为了确定纯化的融合蛋白是否保留了抗原结合活性, 我们用竞争性 ELISA 结合分析比较纯化的融合蛋白和完整的 IgG ZME-018-gelonin 化学结合物及 IgG ZME-018 与抗原的结合能力, 以抗原阳性的人黑色素瘤细胞为抗原来源。结果发现 scfvMEL/rGel 融合构建物具有与化学结合物相同的结合活性。结果表明融合蛋白与靶细胞黑色素瘤细胞 A375M 具有特异而显著的 ELISA 结合活性, 而与 SK-OV-3 或 ME-180 细胞的结合活性只是背景水平。

SfvMEL 融合毒素的无细胞蛋白合成抑制活性

毒素插入到融合构建物中后其生物学活性被严重 compromised。为了检测融合

构建物中 rGel 组分的 n-糖苷酶活性, 将融合构建物加入到体外蛋白反应系统中, 所用的方法是 ^3H -亮氨酸掺入到分离的兔网织红细胞内。融合构建物和原始 rGel 的抑制曲线是相同的, 两个分子的 IC_{50} 也基本相同 (分别为 100 pM 和 104 pM)。

免疫荧光染色检测 scFvMEL/rGel 的结合与内化作用

经 scFvMEL/rGel 处理的 A375-M 在处理不同时间点进行免疫荧光染色。被细胞内化的构建物用兔抗-rGel 或兔抗-scFvMEL 抗体及随后的 FITC 标记的抗兔 IgG 抗体检测。经融合蛋白处理后可以在细胞质内观察到 scFvMEL/rGel 融合蛋白上的 rGel 区, 并且 rGel 的量随时间而增加。在细胞质内也可以观察到 scFvMEL 区。这说明融合构建物与细胞接触后能与细胞有效结合并且 rGel 毒素可以进入细胞内。

免疫毒素的体外细胞毒活性

检测纯化的 sfvMEL/rGel 融合蛋白和原始的 ZME/rGel 化学构建物对抗原阳性细胞系 (A375M) 及抗原阴性细胞系 (SK-OV-3) 的特异性细胞毒效应。如图 7 所示, 两个分子的 IC_{50} 都是约为 10nM, 而 rGel 毒素的 IC_{50} 要高出约 200 倍 (约为 2000nM)。免疫毒素对抗原阴性细胞系 (SK-OV-3) 的细胞毒效应与单独的 gelonin 相同。如预期的一样, 联合给予 ZME 抗体和 sfvMEL/rGel 免疫毒素 (图 8) 后剂量-效应曲线出现适度的偏移, 说明融合构建物细胞毒性的发挥依赖表面抗原的识别。

异种移植模型中 sfvMEL/rGel 的抗肿瘤活性

携带已生长良好的 A-375 黑色素瘤异种移植物的老鼠用盐水 (对照组)、2 mg/kg 或 20mg/kg 的 sfvMEL/rGel 处理 4 天。如图 9 所示, 在 28 天的试验期内对照组肿瘤从 30mm² 增长到 150 mm² (500%增长率)。与此相对应的是, 2 mg/kg sfvMEL/rGel 处理的老鼠肿瘤只有轻微的增长, 大约增加到 60mm² (100%增长率)。20 mg/kg 融合毒素处理组老鼠的肿瘤在处理大小下降了 50%, 然后缓慢恢复, 到 28 天时恢复到原来的大小 (肿瘤总体没有增长)。这两种剂量的免疫毒素对老鼠没有明显的毒副作用, 说明本试验中还没有达到最大耐受剂量 (MTD)。

实施例 6: 体外细胞毒性试验

细胞培养方法

人黑色素瘤细胞 A375M 的培养介质为最低基础培养基添加 10% 热灭活胎牛血清、100 μM 非必须氨基酸、2mM L-谷氨酰胺、1mM 丙酮酸盐、维生素和抗生素。培养细胞通过常规筛选发现无支原体感染。

细胞增殖试验

细胞系接种到完全培养基中, 在 37℃、5%CO₂ 的湿润空气培养箱中培养。为了评价重组毒素和免疫毒素对细胞增殖作用的影响, 将培养的细胞洗涤、用依地酸分

离、重悬于完全培养基中，细胞浓度为 25×10^3 个/ml。将细胞悬液加入到 96 孔培养板中，每孔 200 μ l，然后使细胞黏附到孔壁上，得到稀疏接种细胞群。24 小时后，用含不同浓度免疫毒素或 gelonin 的培养基替换完全培养基。细胞培养 72 小时后通过结晶紫染色分析细胞的相对增殖率。

结晶紫染色

细胞用含钙和镁的 PBS 洗涤三次后用含 0.5%(w/v)结晶紫的 20% 甲醇固定和染色。结合的染料在室温下用 150 μ l Sørensen's 柠檬酸缓冲液(0.1M 柠檬酸钠，pH4.2-50%(v/v)乙醇)洗脱 1 小时。用 Bio-Tek microplate reader 测量 600nm 吸光度值。相对细胞增值率(RCP)计算公式如下：

$$RCP = \frac{\text{平均吸光度(药物处理组)}}{\text{平均吸光度(无药物处理组)}} \times 100\%$$

【公式 1】

纯化的 scfvMEL-CFR2018、scfvMEL-CFR2025 和 CFR2018 对细胞增殖的影响用标准 72 小时细胞增殖试验分析，所用的细胞为对数生长期抗原阳性单层细胞 A375M(5000/孔)，染色用结晶紫，方法如上所述。

结果

图 10 所显示的是每一种重组分子对上述经 72 小时培养的 A-375 人黑色素瘤细胞系的细胞毒性。如图所示，融合构建物 scfvMEL-CFR2018 和 scfvMEL-CFR2025 都能抑制黑色素瘤细胞的生长。达到对照组抑制率 50%所需要的每一种药物的浓度(I. C.₅₀)都是 100nM。而单纯毒素(CFR2018)的细胞生长抑制浓度超过 800nM，与抗体融合构建物相比几乎高出 8 倍。融合到 scfvMEL 抗体上使 CFR2018 毒素具有了肿瘤细胞靶向性，这种靶向作用可以使毒素的细胞毒性增加 8 倍。另外，与 CFR2018 毒素相比，人工毒素 CFR2025 和 CFR2018 与抗体载体一起转移到肿瘤细胞内时具有相同的细胞毒性。

本文所描述的所有组合物和方法按照本说明书都可以适度实施。在本发明的组合物和方法以实施方式的形式被描述时，本领域的技术人员在不脱离本发明的概念和范围的情况下可以对这些组合物和方法、方法的步骤及步骤的顺序进行适当修改。特别要说明的是，可以用那些化学和生理相近的试剂代替本发明的试剂，也可以得到同样的结果。在本发明权利要求所定义的精神、范围和概念内，所有的这些代替和修改都是本领域技术人员所熟知的。

参考文献

下面的参考文献在一定程度上为本发明提供了可模仿的试验过程或作为本说明书的详细补充，已特地纳入本文作为参考。

EPA No. 320 308

EPA No. 329 822

EPO 0273085

GB Application No. 2, 202, 328

GB Application No. 2193095

PCT/US85/01161

PCT/US87/00880

PCT/US89/01025

PCT/US89/05040

U. S. Patent 3, 817, 837

U. S. Patent 3, 850, 752

U. S. Patent 3, 939, 350

U. S. Patent 3, 996, 345

U. S. Patent 4, 162, 282

U. S. Patent 4, 196, 265

U. S. Patent 4, 275, 149

U. S. Patent 4, 277, 437

U. S. Patent 4, 310, 505

U. S. Patent 4, 366, 241

U. S. Patent 4, 472, 509

U. S. Patent 4, 472, 509

U. S. Patent 4, 533, 254

U. S. Patent 4, 554, 101

U. S. Patent 4, 683, 195

U. S. Patent 4, 683, 202

U. S. Patent 4, 684, 611

U. S. Patent 4, 690, 915

U. S. Patent 4, 728, 575

U. S. Patent 4, 728, 578

U. S. Patent 4, 737, 323
U. S. Patent 4, 800, 159
U. S. Patent 4, 879, 236
U. S. Patent 4, 883, 750
U. S. Patent 4, 921, 706
U. S. Patent 4, 938, 948
U. S. Patent 4, 938, 948
U. S. Patent 4, 946, 773
U. S. Patent 4, 952, 500
U. S. Patent 5, 021, 236
U. S. Patent 5, 196, 066
U. S. Patent 5, 199, 942
U. S. Patent 5, 279, 721
U. S. Patent 5, 302, 523
U. S. Patent 5, 322, 783
U. S. Patent 5, 359, 046
U. S. Patent 5, 384, 253
U. S. Patent 5, 401, 511
U. S. Patent 5, 401, 511
U. S. Patent 5, 432, 260
U. S. Patent 5, 464, 765
U. S. Patent 5, 538, 877
U. S. Patent 5, 538, 880
U. S. Patent 5, 550, 318
U. S. Patent 5, 563, 055
U. S. Patent 5, 580, 859
U. S. Patent 5, 589, 466
U. S. Patent 5, 591, 616
U. S. Patent 5, 603, 872
U. S. Patent 5, 603, 872
U. S. Patent 5, 610, 042
U. S. Patent 5, 656, 610

U. S. Patent 5, 693, 762
U. S. Patent 5, 702, 932
U. S. Patent 5, 736, 524
U. S. Patent 5, 780, 448
U. S. Patent 5, 786, 214
U. S. Patent 5, 789, 215
U. S. Patent 5, 801, 005
U. S. Patent 5, 824, 311
U. S. Patent 5, 830, 880
U. S. Patent 5, 840, 873
U. S. Patent 5, 843, 640
U. S. Patent 5, 843, 650
U. S. Patent 5, 843, 651
U. S. Patent 5, 843, 663
U. S. Patent 5, 846, 708
U. S. Patent 5, 846, 709
U. S. Patent 5, 846, 717
U. S. Patent 5, 846, 726
U. S. Patent 5, 846, 729
U. S. Patent 5, 846, 783
U. S. Patent 5, 846, 945
U. S. Patent 5, 849, 481
U. S. Patent 5, 849, 483
U. S. Patent 5, 849, 486
U. S. Patent 5, 849, 487
U. S. Patent 5, 849, 497
U. S. Patent 5, 849, 546
U. S. Patent 5, 849, 547
U. S. Patent 5, 849, 718
U. S. Patent 5, 851, 770
U. S. Patent 5, 851, 772
U. S. Patent 5, 853, 990

U. S. Patent 5, 853, 992
U. S. Patent 5, 853, 993
U. S. Patent 5, 856, 092
U. S. Patent 5, 858, 652
U. S. Patent 5, 861, 155
U. S. Patent 5, 861, 244
U. S. Patent 5, 863, 732
U. S. Patent 5, 863, 753
U. S. Patent 5, 866, 331
U. S. Patent 5, 866, 337
U. S. Patent 5, 866, 366
U. S. Patent 5, 871, 727
U. S. Patent 5, 871, 986
U. S. Patent 5, 879, 703
U. S. Patent 5, 882, 864
U. S. Patent 5, 889, 155
U. S. Patent 5, 900, 481
U. S. Patent 5, 905, 024
U. S. Patent 5, 910, 407
U. S. Patent 5, 912, 124
U. S. Patent 5, 912, 145
U. S. Patent 5, 912, 148
U. S. Patent 5, 916, 776
U. S. Patent 5, 916, 779
U. S. Patent 5, 919, 626
U. S. Patent 5, 919, 630
U. S. Patent 5, 922, 574
U. S. Patent 5, 925, 517
U. S. Patent 5, 925, 525
U. S. Patent 5, 925, 565
U. S. Patent 5, 928, 862
U. S. Patent 5, 928, 869

U. S. Patent 5, 928, 870
U. S. Patent 5, 928, 905
U. S. Patent 5, 928, 906
U. S. Patent 5, 929, 227
U. S. Patent 5, 932, 413
U. S. Patent 5, 932, 451
U. S. Patent 5, 935, 791
U. S. Patent 5, 935, 819
U. S. Patent 5, 935, 825
U. S. Patent 5, 939, 277
U. S. Patent 5, 939, 291
U. S. Patent 5, 942, 391
U. S. Patent 5, 945, 100
U. S. Patent 5, 981, 274
U. S. Patent 5, 994, 624
U. S. Patent 6, 020, 192
U. S. Patent 6, 054, 297
U. S. Patent 6, 099, 842
U. S. Patent 6, 107, 090
WO 88/10315
WO 89/00999
WO 89/06700
WO 90/07641
WO 94/09699
WO 95/06128
WO 98/0748
WO 99/18933

Abbondanzo 等, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(#151), 1990.

Adams 等, *Cancer Res* 1993;53:4026-34, 1993.

Aksentijevich, 等, *Hum. Gene Ther.*, 7:1111-22, 1996.

Alfthan, 等, *Protein Engineering* 1995;8:725-31, 1995.

- Allred 等, *Breast Cancer Res. Treat*, 16:182(#149), 1990.
- Almendo 等, *J Immunol.*, 157:5411-5421, 1996.
- Angel 等, *Cell*, 49:729, 1987b.
- Angel 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
- Arap 等, *Cancer Res.*, 55:1351-1354, 1995
- Atchison 和 Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
- Atchison 和 Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
- Atherton 等, *Biol. of Reproduction*, 32:155-171, 1985.
- Austin-Ward, Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998.
- Ausubel, ed., *Current protocols in molecular biology*, New York, John Wiley & Sons, 1996.
- Baichwal 和 Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.
- Bajorin 等, *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 7:A967, 1988.
- Baker, G. 等 (eds.), *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1990.
- Bakhshi 等, *Cell*, 41(3):899-906, 1985
- Banerji et al., *Cell*, 27:299, 1981.
- Banerji 等, *Cell*, 35:729, 1983.
- Bangham, 等, *J. Mol Biol*, 13:238-252, 1965.
- Bao 等, *Hum. Gene Ther.*, 7(3):355-65, 1996.
- Barrio 等, *Hybridoma* 1998;17:355-64, ! 998.
- Bass 等, *Cancer Gene Ther.*, 2(2):97-104, 1995.
- Bedzyk 等, *J. Biol. Chem.*, 265:18615-20, 1990.
- Bellus, *J. Macromol. Sci. PureAppl. Chem*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berberian 等, *Science*, 261:1588-1591, 1993.
- Berkhout 等, *Cell*, 59:273, 1989.
- Berkower I., *Current Opinion in Biotechnology* 1996;7:622-28, 1996.
- Bird 等, *Science* 1988;242:423-26, 1988.
- Blanar et al., *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
- Bodine 和 Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Bonavida 等, *Int J Oncol*, 15:793-802, 1999.

- Bonavida 等, *Proc Nat'l Acad Sci USA*. 97:1754-9, 2000.
- Boshart et al., *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze 等, *EMBO J.*, 5:1615, 1986.
- Bourrie 等, *Eur. J., Biochem* 1986;155:1-10, 1986.
- Boyle 等, *Journal of Immunotherapy with Emphasis* 1995;18:221-30, 1995.
- Braddock 等, *Cell*, 58:269, 1989.
- Brown 等 *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:192(#191), 1990.
- Bukowski 等, *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.
- Bulla 和 Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Burger 等, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:1426-31, 1993.
- Caldas 等, *Nat. Genet.*, 8:27-32, 1994.
- Campbell 和 Villarreal, *Mol Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campere 和 Tilgman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo 等, *Nature*, 303:77, 1983.
- Canfield 等, *Methods in Enzymology*, 189, 418-422, 1990.
- Capaldi 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Carbonelli 等 *FEMS Microbiol Lett.* 177(1): 75-82, 1999.
- Celander 和 Haaeltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander 等, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Chandler 等, *Cell*, 33:489, 1983.
- Chandler 等, *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(8):3596-3601, 1997.
- Chang 等, *Mol Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chatterjee 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:9114, 1989.
- Chaudhary 等, *Proc Natl. Acad. Sci USA.*, 87:9491-4, 1990.
- Chen 和 Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Cheng 等, *Cancer Res.*, 54:554-555, 1994.
- Cheng, 等, *Investigative Radiology*, vol. 22, pp. 47-55, 1987.
- Cheresh 等, *Cancer Res.*, 46:5112-8, 1986.
- Choi 等, *Cell*, 53:519, 1988.
- Christodoulides 等, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary 和 Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-43, 1985.
- Cleary 等, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-20, 1986.

- Cleary 等, *Trends Microbiol.*, 4:131-136, 1994.
- Cocrea, *Biotechniques*. 23(5):814-816, 1997.
- Cohen 等, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Costa 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Coupar et al., *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cripe 等, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta 和 Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Culver 等, *Science*, 256:1550-1552, 1992.
- Dandolo 等, *J. Virology*, 47:55, 1983.
- Davidson 等, *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- De Villiers 等, *Nature*, 312:242, 1984.
- Deamer 和 P. Uster, *Liposomes* (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 52, 1983.
- Dejager 等, *J. Clin. Invest.*, 92:894-902, 1993
- Deschamps 等, *Science*, 230:1174, 1985.
- Dholakia 等, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Dillman *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14:5-10, 1999.
- Dong 等, *Hum. Gene Ther.*, 7(3):319-31, 1996.
- Doolittle 等, *Methods Mol. Biol.*, 109:215-37, 1999.
- Edbrooke 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edlund et al., *Science*, 230:912, 1985.
- El-Gorab 等, *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, 306, 58-66, 1973.
- Fechheimer 等, *Proc Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Felgner 等, *Proc Nat'l. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7, 1987.
- Fendler 等, *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975.
- Feng 和 Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Ferkol 等, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Firak 和 Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Foecking 和 Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-5, 1986.
- Fraley 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.

- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N. Y., 1990.
- Fujita et al., *Cell*, 49:357, 1987.
- Fulton 等, *Cancer Res* 1988;48:2618-25, 1988.
- Gabizon 等, *Cancer Res.*, 50(19):6371-8, 1990.
- Geiser 等, *Cancer Res* 1999;59:905-10, 1999.
- Ghosh 和 Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, (Wu G, Wu C ed.), New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Gilles 等, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gilliland 等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 77:4539-43, 1980.
- Gliniak 等, *Cancer Res.* 59:6153-8, 1999.
- Gloss 等, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Godbout 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Goodbourn 和 Maniatis, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn 等, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham 和 Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973
- Greene 等, *Immunology Today*, 10:272, 1989.
- Gregoriadis, ed., *Drug Carriers In Biology And Medicine*, pp. 287-341, 1979.
- Gregoriadis, G., ed., *Liposome Technology*, vol. I, pp. 30-35, 51-65 and 79-107 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1984.
- Grosschedl 和 Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Gulbis 等, *Hum. Pathol.*, 24:1271-85, 1993.
- Hanibuchi 等, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-5, 1998.
- Hara 等, *Biochim. Biophys. Acta*, 1278:51-8, 1996
- Harland 和 Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Harlow 和 Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Ha. slinger 和 Karin, *Proc Nat'l Acad. Sci. USA.*, 82:8572, 1985.
- Hauber 和 Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Heath 等, *Chem Phys. Lipids*, 40:347, 1986.

- Hechushtan, 等, *EMBO Jour.*, 18:. 2330-2341, 1999.
- Hellstrand 等, *Acta Oncol.*, 37(4):347-53, 1998.
- Hen 等, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel 等, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermonat 和 Muzyczka, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Herr 和 Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hirochika 等, *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Hirsch 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990
- Holbrook 等, *Virology*, 157:211, 1987.
- Hollstein 等, *Science* 253:49-53, 1991.
- Hope 等, *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 55-65, 1985.
- Horlick 和 Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Horwich 等 *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Huang 等, *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug 等, *Mol Cell Biol*, 8:3065, 1988.
- Hui 和 Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Hussussian 等, *Nature Genetics*, 15-21, 1994.
- Hwang 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa 等, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra 和 Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale 和 Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Innis 等, *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(24):9436-9440, 1988.
- Inouye 等, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie & Morton, *Proc Nat'l. Acad Sci. USA* 83:8694-8698, 1986
- Irie 等, "Melanoma gangliosides and human monoclonal antibody," In: *Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy*, Metzgar & Mitchell (eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 115-126, 1989.
- Jakobovits 等, *Mol Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel 和 Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson 等, *J. Virol.*, 67:438-445, 1993.

- Johnson 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Kadesch 和 Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaeppler 等, *Plant Cell Reports* 9: 415-418, 1990.
- Kamb 等, *Nature Genetics*, 8:22-26, 1994.
- Kamb 等, *Science*, 267:436-440, 1994.
- Kaneda 等, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kang 等, *Science*, 240:1034-1036, 1988.
- Kantor 等, *Hybridoma* 1982;1:473-82, 1982.
- Karin 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka et al., *Cell*, 20:393, 1980.
- Katinka 等, *Nature*, 290:720, 1981.
- Karo 等, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- Keane 等, *Cancer Res.* 59:734-41, 1999.
- Kerr 等, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-57, 1972.
- Khatoon 等, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989
- Kiledjian 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kim 等, *Gene* 1988;68:315-21.
- King 等, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kipriyanov 等, *Molecular Immunology* 1994;31:1047-58, 1994
- Klamut 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Koch 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kohler 等, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 52:104-16, 1989.
- Koizumi et al., *Japanese J of Cancer Res* 1988;79:973-81, 1988.
- Kraus 等 *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kreier 等, 'Infection, Resistance and Immunity,' Harper 和 Row, New York, 1991.
- Kriegler 和 Botchan, In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Y. Gluzman, ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler 和 Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler 等, *Cell*, 38:483, 1984~
- Kriegler et al., *Cell*, 53:45, 1988.
- Kriegler 等, In: *Cancer Cells 2/OncoGenes and Viral Genes*. Van de Woude 等 eds,

- Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
- Kriegler 等, In: *Gene Expression*, D. Hamer and M. Rosenberg, eds., New York: Alan R. Liss, 1983.
- Kuhl 等, *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kurtz 等, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kurucz 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3830-34, 1993
- Kwoh 等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.
- Kyte 和 Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1): 105-132, 1982.
- Lareyre 等, *J Biol Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspias 等, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lee 等, *J Auton Nerv Syst.* 74(2-3):86-90, 1997.
- Lee 等, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee 等, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Lefranc 等, *Biochimie* 1990;72:639-51, 1990.
- Lenert 等, *Science*, 248:1639-1643, 1990.
- Levenson 等, *Hum Gene Ther.* 20;9(8): 1233-1236, 1998
- Levinson 等, *Nature*, 295:79, 1982.
- Lin 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Liu 等, *J. Biol. Chem.*; 270:24864-70, 1995.
- Luria 等, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky 和 Botchan, *Proc Nat'l Aca Sci. USA.* 83:3609, 1986.
- Lusky 等, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak 和 Samow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Macey 等, *Am J of Physiologic Imaging* 1988;3:1-6, 1988.
- Majors 和 Varmus, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 80:5866, 1983
- Marsters 等, *Recent Prog Horm Res* 54:225-34, 1999.
- Martin 等, *Nature*, 345(6277):739-743, 1990.
- Mayer 等, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol 858, pp. 161-168, 1986.
- Mayhew 等, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 775, pp. 169-174, 1984
- Mayhew 等, *Methods in Enzymology*, vol. 149, pp. 64-77, 1987.

- McCartney 等, *Protein Engineering* 1995;8:301-14, 1995.
- McNeall 等, *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek 等, *Cell*, 46:203, 1986.
- Mitchell 等, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- Mitchell 等, *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-859, 1990.
- Mittelman 等, *Clin Cancer Res* 1995;1:705-13, 1995.
- Montaldo, 等, *Int. J. Cancer*, 81:262-7, 1999.
- Mordacq 和 Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau 等, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Morgan 等, *Hybridoma* 1981 ;1:2%36, 1981.
- Moil etd., *Cancer Res.*, 54:3396-3397, 1994.
- Morton 和 Ravindranath, M. H. Current concepts concerning melanoma vaccines. In *Tumor Immunology*, Dalglish AG (ed.), London: Cambridge University Press, 1-55, 1996.
- Morton 等, *Ann. Surg.* 216: 463-482, 1992.
- Muesing 等, *Cell*, 48:691, 1987.
- Mujoo 等, *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1995;40:339-45, 1995.
- Munishkin 等, *J Biol. Chem.*, 270:30581-30587, 1995.
- Nakamura 等, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- Ng 等, *Nuc Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolas 和 Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988.
- Nicolau 和 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau 等, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nishikawa 等, *Cancer Res* 1992;52:4758-65, 1992.
- Nobri 等, *Nature*, 368:753-756, 1995.
- Nomoto 等, *Gene*, 236(2):259-271, 1999.
- Ohara 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 5673-5677, 1989.
- O'Hare 等, *FEBS Lett* 1990;273:200-04, 1990.
- Okamoto 等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 91:11045-11049, 1994.
- Omirulleh 等, *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.

- Ondek et al., *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Orlow 等, *Cancer Res.*, 54:2848-2851, 1994.
- Ornitz 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- O' Shannessy 等, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Owens 和 Haley, *J. Biol. Chem.*, 259:14843-14848, 1987.
- Owens 等, *Journal of Immunological Methods* 1994;168:149-165, 1994.
- Pagnan 等, *Int J. Cancer*, 81:268-74, 1999.
- Palmiter 等, *Nature*, 300:611, 1982.
- Panchagnula 等, *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics* 1997;22: 7-19, 1997
- Panchal RG., *Biochemical Pharmacology* 1998;55:247-252, 1998.
- Pech 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- Pelletier 和 Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.
- Perales 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable 和 Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10: I 116, 1990.
- Philip 等, *J. Biol. Chem.*, 268:16087-90, 1993.
- Picard 和 Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pietras 等; *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Pinker 等, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Pirker et al., *J Immunol* 1993;150:3054-61, 1993.
- Poe, 等, *J. Biol. Chem.*, 266: 98-103, 1991.
- Ponta 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 82:1020, 1985
- Porton 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potrykus 等, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Potter 和 Haley, *Meth. in Enzymol.*, 91,613-633, 1983.
- Press 等, *Cellular Immunology* 1986;102:10-20, 1986.
- Pullyblank 等, *British Journal of Surgery* 1997;84:1511-17, 1997
- Qin 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 95(24):1411-6, 1998.
- Queen 和 Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Ravindranath 和 Morton, *Intern Rev. Immunol.* 7: 303-329, 1991.
- Redondo 等, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman 和 Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.

- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Resendez Jr. 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Ridgeway, in: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL., Denhardt DT, ed., Stoneham Butterworth, pp.467-492, 1988.
- Ripe 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe 等, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling 等, *Nucl. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Roselli 等, *In Vivo* 1993;7:615-21, 1993.
- Rosen 等, *Cell*, 41:813, 1988.
- Rosenberg 等, *Ann. Surg.*, 210:474, 1989.
- Rosenberg 等, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Rosenblum 等, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1999;44:343-48, 1999
- Rosenblum 等, *Clin Cancer Res* 1999;5:865-74, 1999.
- Rosenblum 等, *Journal of Interferon & Cytokine Research* 1995;15: 547-55, 1995.
- Rosenblum 等, *Molecular Biotherapy* 1991;3:6-13, 1991.
- Rowlinson-Busza 等, *Current Opinion in Oncology* 1992;4:1142-48, 1992.
- Sakai 等 *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook 等, In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Sandhu 等, *Crit Rev Biotechnol* 1992;12:437-62, 1992.
- Sasso 等, *J. Immunol.*, 142:2778-2783, 1989.
- Satake 等, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner 等, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Schulz 等, *Cancer Res.* 44:5914-5920, 1984.
- Searle 等, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Serrano 等, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano 等, *Science*, 267:249-252, 1995.
- Sharp 和 Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul 和 Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.

- Sherman 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Shinoda, K. 等, *Colloidal Surfactant*, Academic Press, especially "The Formation of MiCelles", Ch. 1, 1-96, 1963.
- Shorki 等, *J. Immunol.*, 146:936-940, 1991.
- Silvermann 等, *J. Clin. Invest.*, 96:417-426, 1995.
- Sleigh 和 Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Solodin 等, *Biochemistry*, 34:13537-44, 1995.
- SpaLholz 等, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau 和 Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos 和 Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Spanjer 和 Scherphof; *Biochim. Biophys. Acta*, 734:40-7, 1983
- Sperti 等, *Ital. J. Biochem.*, 35:266-71, 1986.
- Stephens 和 Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stirpe 等, *A Journal of Biological Chemistry* 1992;255:6947-53, 1992.
- Stuart 等, *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan 和 Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber 和 Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Szoka 等, *Proc Natl. Acad. Sci.*, 1978, 75:4194-4198.
- Takebe 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier 等, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor 和 Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a
- Taylor 和 Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor 等, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Templeton 等, *Nat Biotechnol.*, 15(7):647-52, 1997.
- Thierry 等, *Proc Nat'l. Acad. Sci., USA*, 92:9742-6, 1995.
- Thiesen 等, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Treisman, *Cell*, 46:567-74, 1986.
- Trimble 和 Hozumi, *FEBS Lett.*, 219:70.4, 1987.
- Tronche 等, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Tronche 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4759, 1989.

- Trudel 和 Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- Tsujimoto 和 Croce, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-8, 1986.
- Tsujimoto 等, *Science*, 228(4706): 1440-3, 1985.
- Tsukamoto 等, *Nat. Genet.*, 9:243-8, 1995.
- Tsumaki 等, *J Biol Chem.* 273(36):22861-22864, 1998.
- Tyndall 等, *Nucl. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Vannice 和 Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Vasseur 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 77:1068, 1980.
- Wagner 等, *Science*, 260:1510-1513, 1990.
- Wahl 等, *Cancer* 1994;73:989-92, 1994.
- Walker 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
- Wang 和 Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Watt 等, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 83(2): 3166-3170, 1986.
- Weber 等, *Cell*, 36:983, 1984.
- Weinberg, *Science*, 254:1138-1145, 1991.
- Weinberger 等 *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
- Wels 等, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 1992;43: 1-7, 1992.
- Williams 等, *Cancer Res* 1990;50:974s-79s, 1990.
- Wilson 等, *Int J Cancer* 1981;28:293-30, 1981.
- Winoto 和 Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
- Wolff 等, *Ther Immunol* 1995;2:137-45, 1995.
- Wong 等, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wool 等, *Biochem Cell Biol.*, 73(11-12):933-47, 1995
- Worn 等, *Biochemistry* 1998;22:13120-127, 1998.
- Wu 和 Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu 和 Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233(i):221-6, 1997.
- Xu 等, *Leukemia* 1996;10:321-26, 1996.
- Yang 和 Huang, *Gene Therapy*, 4 (9):950-960, 1997.
- Yutzey 等 *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.
- Zhao-Emonet 等, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1442(2-3): 109-19, 1998
- Zhu 等, *Science*, 261:209-11, 1993.

<110> M.G. 罗森布拉姆 (ROSENBLUM, Michael, G.)

L. 陈. (CHEUNG, Lawrence)

<120> 修饰蛋白、人L毒素及其制备方法

<130> CLFR:007US

<140> 未知

<141> 2002-02-12

<150> 60/268,402

<151> 2001-02-12

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 316

<212> PRT

<213> Gelonium multiflorum

<400> 1

Met Lys Gly Asn Met Lys Val Tyr Trp Ile Lys Ile Ala Val Ala Thr
1 5 10 15

Trp Phe Cys Cys Thr Thr Ile Val Leu Gly Ser Thr Ala Arg Ile Phe
20 25 30

Ser Leu Pro Thr Asn Asp Glu Glu Glu Thr Ser Lys Thr Leu Gly Leu
35 40 45

Asp Thr Val Ser Phe Ser Thr Lys Gly Ala Thr Tyr Ile Thr Tyr Val
50 55 60

Asn Phe Leu Asn Glu Leu Arg Val Lys Leu Lys Pro Glu Gly Asn Ser
65 70 75 80

His Gly Ile Pro Leu Leu Arg Lys Lys Cys Asp Asp Pro Gly Lys Cys
85 90 95

Phe Val Leu Val Ala Leu Ser Asn Asp Asn Gly Gln Leu Ala Glu Ile
100 105 110

Ala Ile Asp Val Thr Ser Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Val Arg Asn
115 120 125

Arg Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Gly Leu
130 135 140

Phe Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu Gly Ile

165					170					175					
Glu	Pro	Leu	Arg	Ile	Gly	Ile	Lys	Lys	Leu	Asp	Glu	Asn	Ala	Ile	Asp
			180					185					190		
Asn	Tyr	Lys	Pro	Thr	Glu	Ile	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Ile	Gln
			195				200					205			
Met	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Arg	Phe	Thr	Phe	Ile	Glu	Asn	Gln	Ile	Arg
			210				215					220			
Asn	Asn	Phe	Gln	Gln	Arg	Ile	Arg	Pro	Ala	Asn	Asn	Thr	Ile	Ser	Leu
			225				230					235			240
Glu	Asn	Lys	Trp	Gly	Lys	Leu	Ser	Phe	Gln	Ile	Arg	Thr	Ser	Gly	Ala
				245					250					255	
Asn	Gly	Met	Phe	Ser	Glu	Ala	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Ala	Asn	Gly	Lys
			260					265					270		
Lys	Tyr	Tyr	Val	Thr	Ala	Val	Asp	Gln	Val	Lys	Pro	Lys	Ile	Ala	Leu
			275				280					285			
Leu	Lys	Phe	Val	Asp	Lys	Asp	Pro	Lys	Thr	Ser	Leu	Ala	Ala	Glu	Leu
			290				295					300			
Ile	Ile	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ser	Leu	Val	Gly	Phe	Asp				
			305				310				315				

<210> 2

<211> 1176

<212> DNA

<213> 多花白树属 (*Gelonium Multiflorum*)

<400> 2

```

cagcttctca cttgttttggg ataatgaaag ggaacatgaa ggtgtacttg attagattg 60
ctgtggcgac atggttttgc tgcactacta ttgtacttgg atcaacggcg aggattttct 120
ctcttccac aaatgatgaa gaagaaacca gtaagacgct tggcctggac accgtgagct 180
ttagcactaa aggtgccact tatattacct acgtgaattt cttgaatgag ctacgagtta 240
aattgaaacc cgaaggtaac agccatggaa tcccatgtgct gcgcaaaaaa tgtgatgatc 300
ctggaaagtg ttctgttttg gtagcgcttt caaatgacaa tggacagttg gcggaaatag 360
ctatagatgt tacaagtgtt tatgtgtgtg gctatcaagt aagaaacaga tcttacttct 420
ttaaagatgc tccagatgct gcttacgaag gcctcttcaa aaacacaatt aaaacaagac 480
ttcatttttg cggcagctat ccctcgctgg aaggtgagaa ggcatataga gagacaacag 540
acttgggcat tgaaccatta aggattggca tcaagaaact tgatgaaaat gcgatagaca 600
attataaacc aacggagata gctagttctc tattgtgtgt tattcaaatg gtgtctgaag 660
cagctcgatt cacctttatt gagaaccaa ttagaaataa ctttcaacag agaattcgcc 720
cggcgaataa tacaatcagc cttgagaata aatggggtaa actctcgttc cagatccgga 780
catcaggtgc aaatggaatg ttttcggagg cagttgaatt ggaacgtgca aatggcaaaa 840
aatactatgt caccgcagtt gatcaagtaa aaccctaaat agcactcttg aagttcgctc 900
ataaagatcc taaaacgagc cttgctgctg aattgataat ccagaactat gagtcattag 960
tggtctttga ttagtacaac ttattgtgct ttttatatat tatagatatg atgccgggcc 1020
atgtattggc ctctgtagct taaataaagg catcgaatat tagcctcggg ggtgtatcta 1080
tcattgctgt ttgtaaaact gccaatgttt atgttatcaa acagaaattg gcatgaagtt 1140
tctgtacaag tgttcaataa actgggctat acatgc 1176

```

<210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 智人 (*Homo sapiens*)
 <400> 3
 gctgcccaac cagccatggc ggacattgtg atg 33

<210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 智人 (*Homo sapiens*)
 <400> 4
 gccggagcct ggcttgcacg ctgccgctgg tggagccttt gatcatccag 50

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 智人 (*Homo sapiens*)
 <400> 5
 aagccaggct ccggcgaagg cagcaccaaa ggccaagtga aggtt 45

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人 (*Homo sapiens*)
 <400> 6
 gccaccgccca ccactagttg aggagactgt 30

<210> 7
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物
 <400> 7
 ggcggtggct ccgtcatgac ggacattgtg atgaccagc ctcaaaaatt c 51

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 8
 ggtggcgggtg gctccgggtct agacaccgtg acg 33

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 9
 aaggctcgtg tcgacctoga gtcattaagc tttaggatct ttatc 45

<210> 10
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1521)

<400> 10
 atg acg gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca 48
 Met Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
 1 5 10 15

gta gga gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg gat 96
 Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp
 20 25 30

act aat gta gcc tgg tat caa caa aaa cca ggg caa tct cct gaa cca 144
 Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Pro
 35 40 45

ctg ctt ttc tcg gca tcc tac cgt tac act gga gtc cct gat cgc ttc 192
 Leu Leu Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg 240
 Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
 65 70 75 80

cag tct gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat 288
 Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
 85 90 95

cct ctg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gag atc aaa ggc tcc acc 336

Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr		
			100					105					110				
agc	ggc	agc	ggt	aag	cca	ggc	tcc	ggc	gaa	ggc	agc	acc	aaa	ggc	gaa	384	
Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Glu		
		115					120					125					
gtg	aag	ggt	gag	gag	tct	gga	gga	ggc	ttg	gtg	caa	cct	gga	gga	tcc	432	
Val	Lys	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser		
	130						135				140						
atg	aaa	ctc	tcc	tgt	gtt	gtc	tct	gga	ttc	act	ttc	ggt	aat	tac	tgg	480	
Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Gly	Asn	Tyr	Trp		
	145					150				155					160		
atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	tct	cca	gag	aag	ggg	ctt	gag	tgg	att	gca	528	
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala		
				165					170						175		
gaa	att	aga	ttg	aaa	tcc	aat	aat	ttt	gca	aga	tat	tat	gcg	gag	tct	576	
Glu	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser	Asn	Asn	Phe	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser		
			180						185					190			
gtg	aaa	ggg	agg	ttc	acc	atc	tca	aga	gat	gat	tcc	aaa	agt	agt	gtc	624	
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Val		
		195					200					205					
tac	ctg	caa	atg	atc	aac	cta	aga	gct	gaa	gat	act	ggc	att	tat	tac	672	
Tyr	Leu	Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	Tyr		
	210					215					220						
tgt	acc	agt	tat	ggt	aac	tac	gtt	ggg	cac	tat	ttt	gac	cac	tgg	ggc	720	
Cys	Thr	Ser	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Val	Gly	His	Tyr	Phe	Asp	His	Trp	Gly		
	225					230				235					240		
caa	ggc	acc	act	ctc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc	ggt	ggc	ggt	ggc	tcc	768	
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
				245					250					255			
ggt	cta	gac	acc	gtg	agc	ttt	agc	act	aaa	ggt	gcc	act	tat	att	acc	816	
Gly	Leu	Asp	Thr	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Lys	Gly	Ala	Thr	Tyr	Ile	Thr		
			260					265					270				
tac	gtg	aat	ttc	ttg	aat	gag	cta	cga	gtt	aaa	ttg	aaa	ccc	gaa	ggt	864	
Tyr	Val	Asn	Phe	Leu	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly		
		275					280					285					
aac	agc	cat	gga	atc	cca	ttg	ctg	cgc	aaa	aaa	tgt	gat	gat	cct	gga	912	
Asn	Ser	His	Gly	Ile	Pro	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys	Cys	Asp	Asp	Pro	Gly		
		290					295				300						
aag	tgt	ttc	gtt	ttg	gta	gcg	ctt	tca	aat	gac	aat	gga	cag	ttg	gcg	960	
Lys	Cys	Phe	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Gly	Gln	Leu	Ala		
	305					310				315					320		
gaa	ata	gct	ata	gat	gtt	aca	agt	gtt	tat	gtg	gtg	ggc	tat	caa	gta	1008	
Glu	Ile	Ala	Ile	Asp	Val	Thr	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Tyr	Gln	Val		

325	330	335	
aga aac aga tct tac ttc ttt aaa gat gct cca gat gct gct tac gaa			1056
Arg Asn Arg Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Ala Tyr Glu			
340	345	350	
ggc ctc ttc aaa aac aca att aaa aca aga ctt cat ttt ggc ggc agc			1104
Gly Leu Phe Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser			
355	360	365	
tat ccc tcg ctg gaa ggt gag aag gca tat aga gag aca aca gac ttg			1152
Tyr Pro Ser Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu			
370	375	380	
ggc att gaa cca tta agg att ggc atc aag aaa ctt gat gaa aat gcg			1200
Gly Ile Glu Pro Leu Arg Ile Gly Ile Lys Lys Leu Asp Glu Asn Ala			
385	390	395	400
ata gac aat tat aaa cca acg gag ata gct agt tct cta ttg gtt gtt			1248
Ile Asp Asn Tyr Lys Pro Thr Glu Ile Ala Ser Ser Leu Leu Val Val			
405	410	415	
att caa atg gtg tct gaa gca gct cga ttc acc ttt att gag aac caa			1296
Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Thr Phe Ile Glu Asn Gln			
420	425	430	
att aga aat aac ttt caa cag aga att cgc ccg gcg aat aat aca atc			1344
Ile Arg Asn Asn Phe Gln Gln Arg Ile Arg Pro Ala Asn Asn Thr Ile			
435	440	445	
agc ctt gag aat aaa tgg ggt aaa ctc tcg ttc cag atc cgg aca tca			1392
Ser Leu Glu Asn Lys Trp Gly Lys Leu Ser Phe Gln Ile Arg Thr Ser			
450	455	460	
ggt gca aat gga atg ttt tcg gag gca gtt gaa ttg gaa cgt gca aat			1440
Gly Ala Asn Gly Met Phe Ser Glu Ala Val Glu Leu Glu Arg Ala Asn			
465	470	475	480
ggc aaa aaa tac tat gtc acc gca gtt gat caa gta aaa ccc aaa ata			1488
Gly Lys Lys Tyr Tyr Val Thr Ala Val Asp Gln Val Lys Pro Lys Ile			
485	490	495	
gca ctc ttg aag ttc gtc gat aaa gat cct aaa taatga			1527
Ala Leu Leu Lys Phe Val Asp Lys Asp Pro Lys			
500	505		

<210> 11

<211> 507

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列的描述、合成的

<400> 11

Met	Thr	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser
1				5					10					15	

```

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp
      20              25              30

Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Pro
      35              40              45

Leu Leu Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
      65              70              75              80

Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
      85              90              95

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr
      100             105             110

Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu
      115             120             125

Val Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
      130             135             140

Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Tyr Trp
      145             150             155             160

Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
      165             170             175

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Phe Ala Arg Tyr Tyr Ala Glu Ser
      180             185             190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val
      195             200             205

Tyr Leu Gln Met Ile Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr
      210             215             220

Cys Thr Ser Tyr Gly Asn Tyr Val Gly His Tyr Phe Asp His Trp Gly
      225             230             235             240

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      245             250             255

Gly Leu Asp Thr Val Ser Phe Ser Thr Lys Gly Ala Thr Tyr Ile Thr
      260             265             270

Tyr Val Asn Phe Leu Asn Glu Leu Arg Val Lys Leu Lys Pro Glu Gly
      275             280             285

Asn Ser His Gly Ile Pro Leu Leu Arg Lys Lys Cys Asp Asp Pro Gly
      290             295             300

Lys Cys Phe Val Leu Val Ala Leu Ser Asn Asp Asn Gly Gln Leu Ala
      305             310             315             320

```

Glu Ile Ala Ile Asp Val Thr Ser Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Val
 325 330 335

Arg Asn Arg Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Ala Tyr Glu
 340 345 350

Gly Leu Phe Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser
 355 360 365

Tyr Pro Ser Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu
 370 375 380

Gly Ile Glu Pro Leu Arg Ile Gly Ile Lys Lys Leu Asp Glu Asn Ala
 385 390 395 400

Ile Asp Asn Tyr Lys Pro Thr Glu Ile Ala Ser Ser Leu Leu Val Val
 405 410 415

Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Thr Phe Ile Glu Asn Gln
 420 425 430

Ile Arg Asn Asn Phe Gln Gln Arg Ile Arg Pro Ala Asn Asn Thr Ile
 435 440 445

Ser Leu Glu Asn Lys Trp Gly Lys Leu Ser Phe Gln Ile Arg Thr Ser
 450 455 460

Gly Ala Asn Gly Met Phe Ser Glu Ala Val Glu Leu Glu Arg Ala Asn
 465 470 475 480

Gly Lys Lys Tyr Tyr Val Thr Ala Val Asp Gln Val Lys Pro Lys Ile
 485 490 495

Ala Leu Leu Lys Phe Val Asp Lys Asp Pro Lys
 500 505

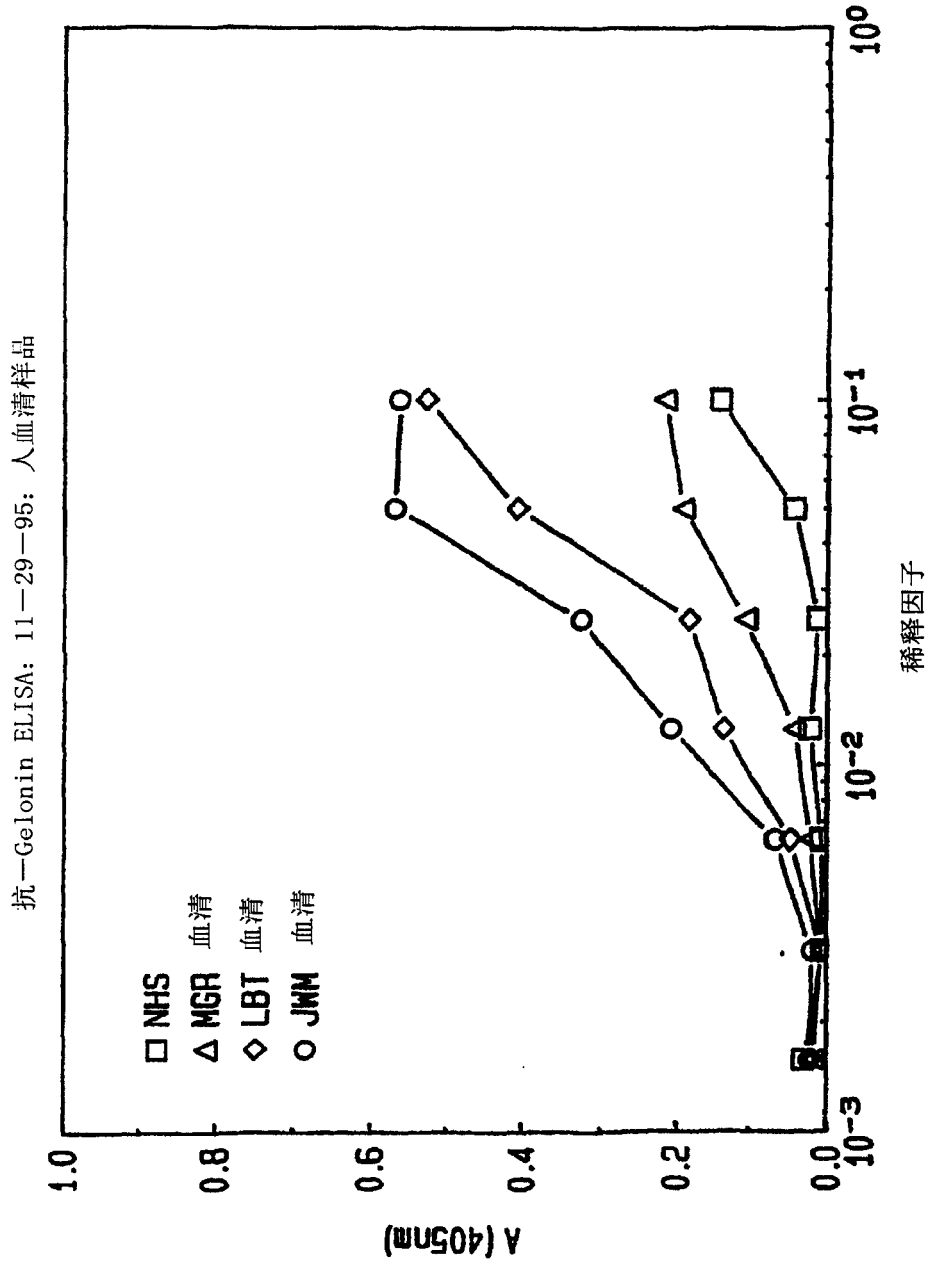


图 1

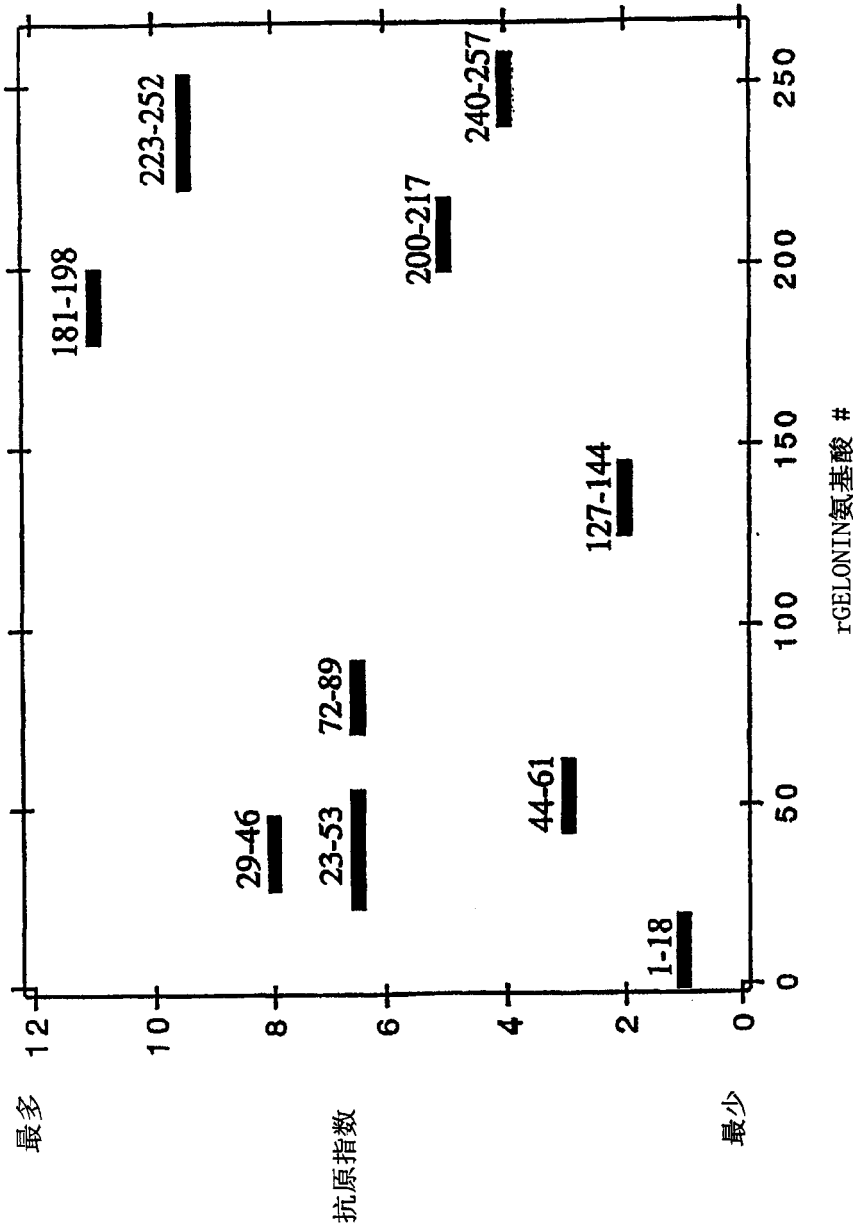
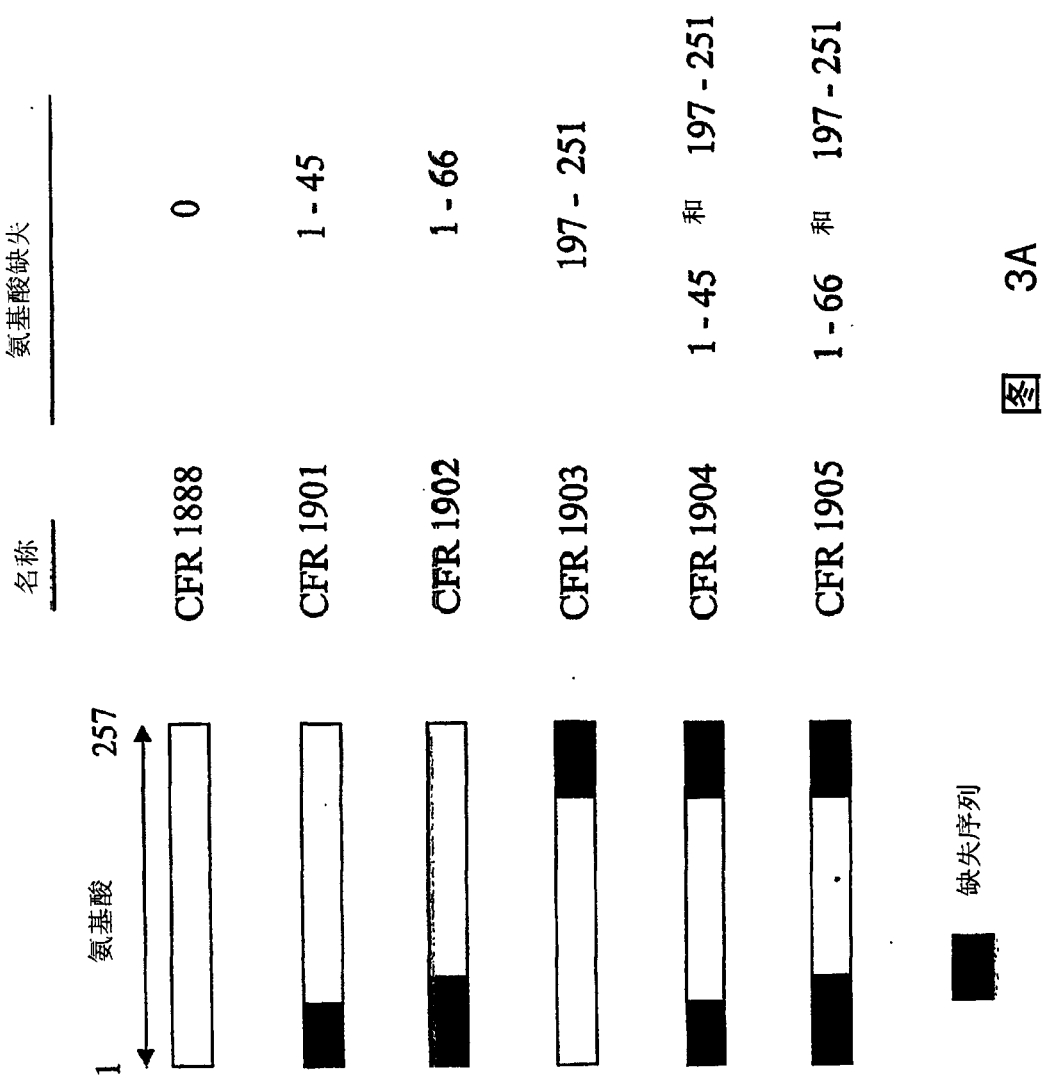
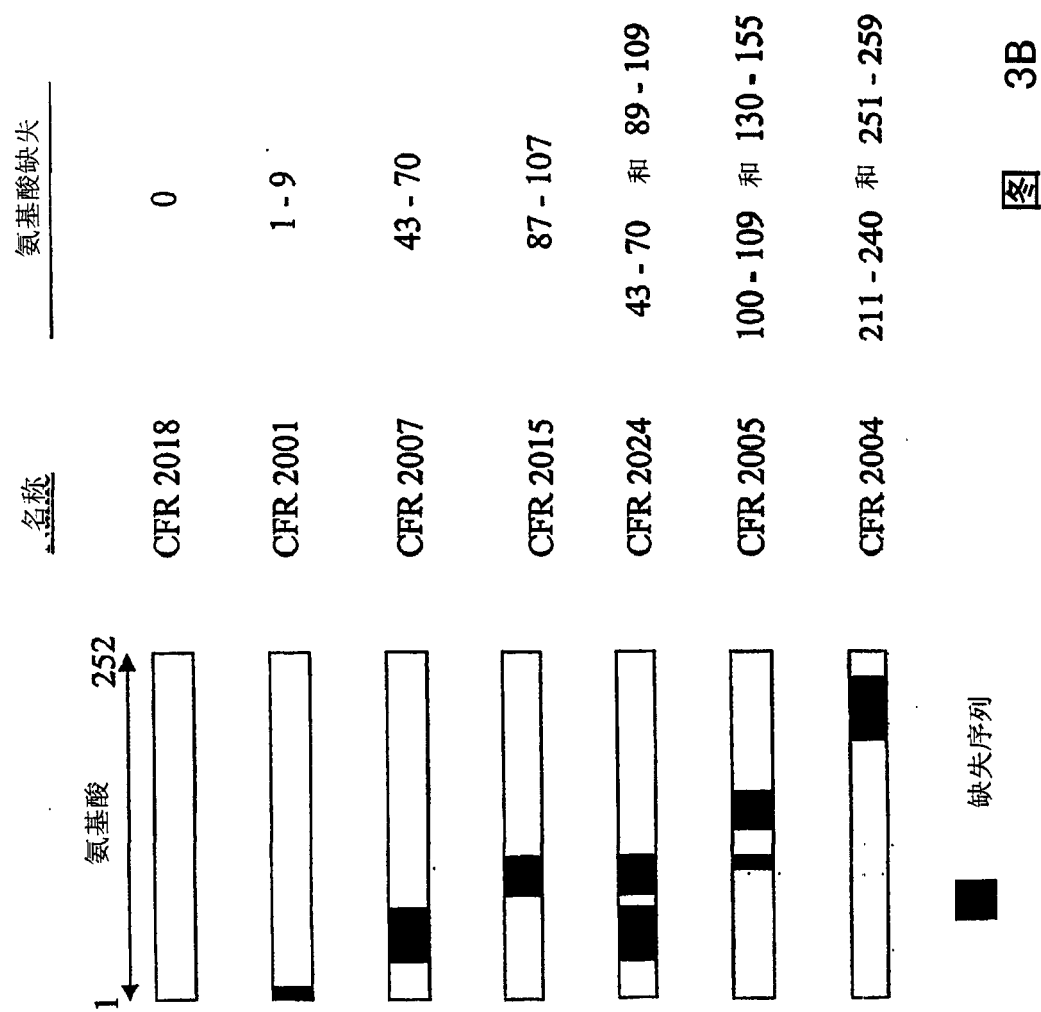
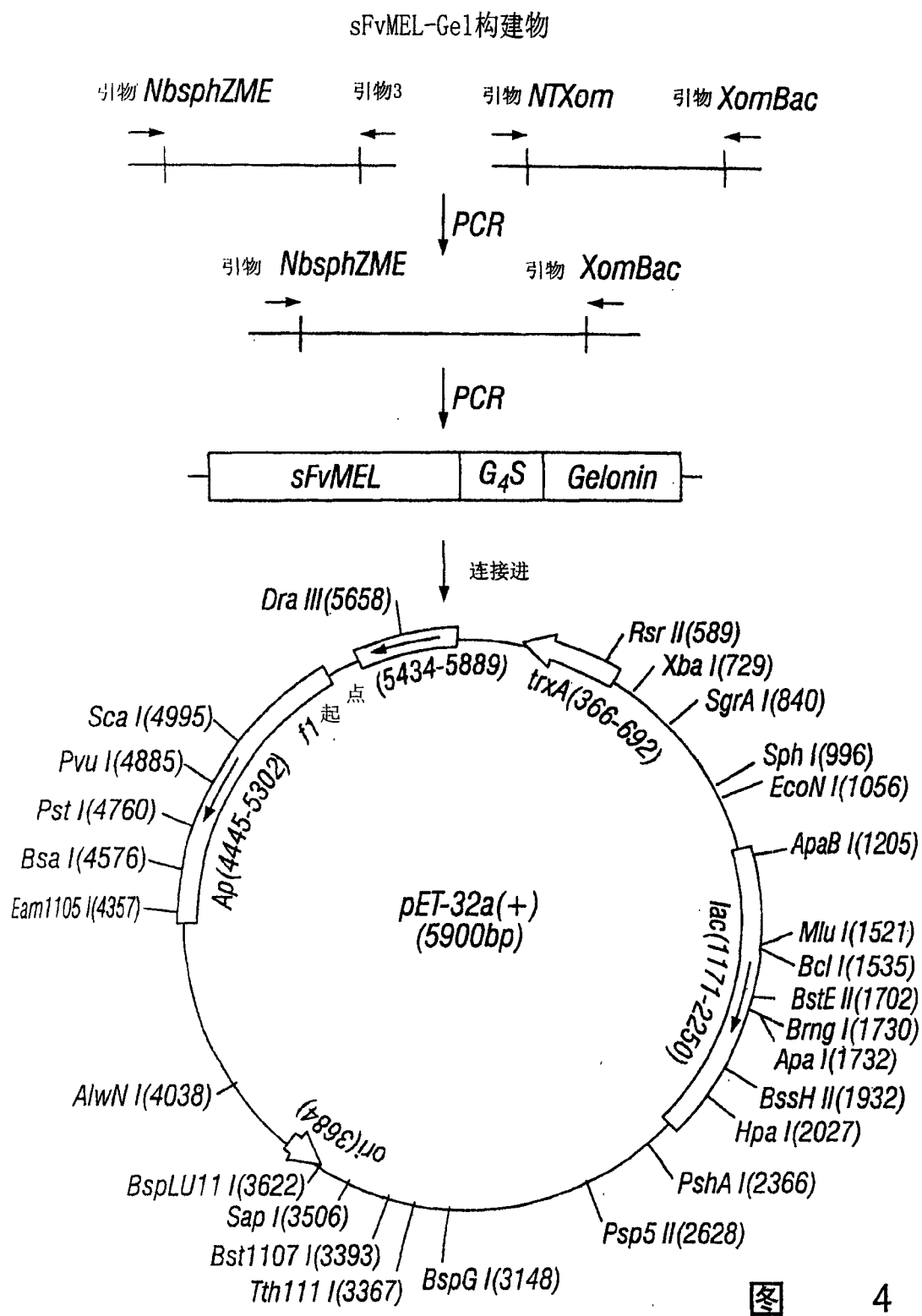


图 2







SCFV-MEL→
 ATG ACG GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA 18
 LCDR1
 GAG AGG GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GAT ACT AAT GTA GCC 36
 TGG TAT CAA CAA AAA CCA GGG CAA TCT CCT GAA CCA CTG CTT TTC TCG GCA TCC 54
 LCDR2
 TAC CGT TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT 72
 TTC ACT CTC ACC ATC AGC AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT 90
 LCDR3
 CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CTG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG ATC 108
 218接头
 AAA GGC TCC ACC AGC GGC AGC GGT AAG CCA GGC TCC GGC GAA GGC AGC ACC AAA 126
 GGC GAA GTG AAG GTT GAG GAG TCT GGA GGA GGC TTG GTG CAA CCT GGA GGA TCC 144
 HCDR1
 ATG AAA CTC TCC TGT GTT GTC TCT GGA TTC ACT TTC GGT AAT TAC TGG ATG AAC 162
 TGG GTC CGC CAG TCT CCA GAG AAG GGG CTT GAG TGG ATT GCA GAA ATT AGA TTG 180
 HCDR2
 AAA TCC AAT AAT TTT GCA AGA TAT TAT GCG GAG TCT GTG AAA GGG AGG TTC ACC 198
 ATC TCA AGA GAT GAT TCC AAA AGT AGT GTC TAC CTG CAA ATG ATC AAC CTA AGA 216
 HCDR3
 GCT GAA GAT ACT GGC ATT TAT TAC TGT ACC AGT TAT GGT AAC TAC GTT GGG CAC 234
 TAT TTT GAC CAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACC GTC TCC TCA GCT AGC GGT 252
 G₄S 接头 Galonin→
 GGC GGT GGC TCC GGT CTA GAC ACC GTG AGC TTT AGC ACT AAA GGT GCC ACT TAT 270
 ATT ACC TAC GTG AAT TTC TTG AAT GAG CTA CGA GTT AAA TTG AAA CCC GAA GGT 288
 AAC AGC CAT GGA ATC CCA TTG CTG CGC AAA AAA TGT GAT GAT CCT GGA AAG TGT 306
 TTC GTT TTG GTA GCG CTT TCA AAT GAC AAT GGA CAG TTG GCG GAA ATA GCT ATA 324
 GAT GTT ACA AGT GTT TAT GTG GTG GGC TAT CAA GTA AGA AAC AGA TCT TAC TTC 342
 TTT AAA GAT GCT CCA GAT GCT GCT TAC GAA GGC CTC TTC AAA AAC ACA ATT AAA 360
 ACA AGA CTT CAT TTT GGC GGC AGC TAT CCC TCG CTG GAA GGT GAG AAG GCA TAT 378
 AGA GAG ACA ACA GAC TTG GGC ATT GAA CCA TTA AGG ATT GGC ATC AAG AAA CTT 396
 GAT GAA AAT GCG ATA GAC AAT TAT AAA CCA ACG GAG ATA GCT AGT TCT CTA TTG 414
 GTT GTT ATT CAA ATG GTG TCT GAA GCA GCT CGA TTC ACC TTT ATT GAG AAC CAA 432
 ATT AGA AAT AAC TTT CAA CAG AGA ATT CGC CCG GCG AAT AAT ACA ATC AGC CTT 450
 GAG AAT AAA TGG GGT AAA CTC TCG TTC CAG ATC CGG ACA TCA GGT GCA AAT GGA 468
 ATG TTT TCG GAG GCA GTT GAA TTG GAA CGT GCA AAT GGC AAA AAA TAC TAT GTC 486
 ACC GCA GTT GAT CAA GTA AAA CCC AAA ATA GCA CTC TTG AAG TTC GTC GAT AAA 504
 终止 * *
 GAT CCT AAA TAA TGA 507

图

5

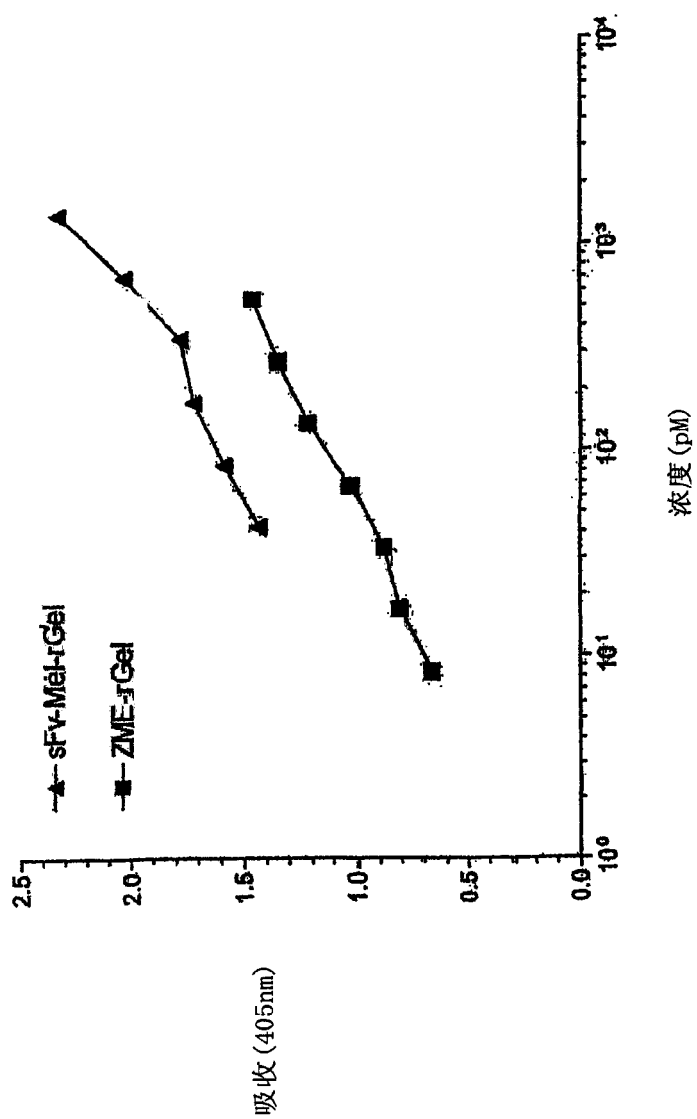


图 6

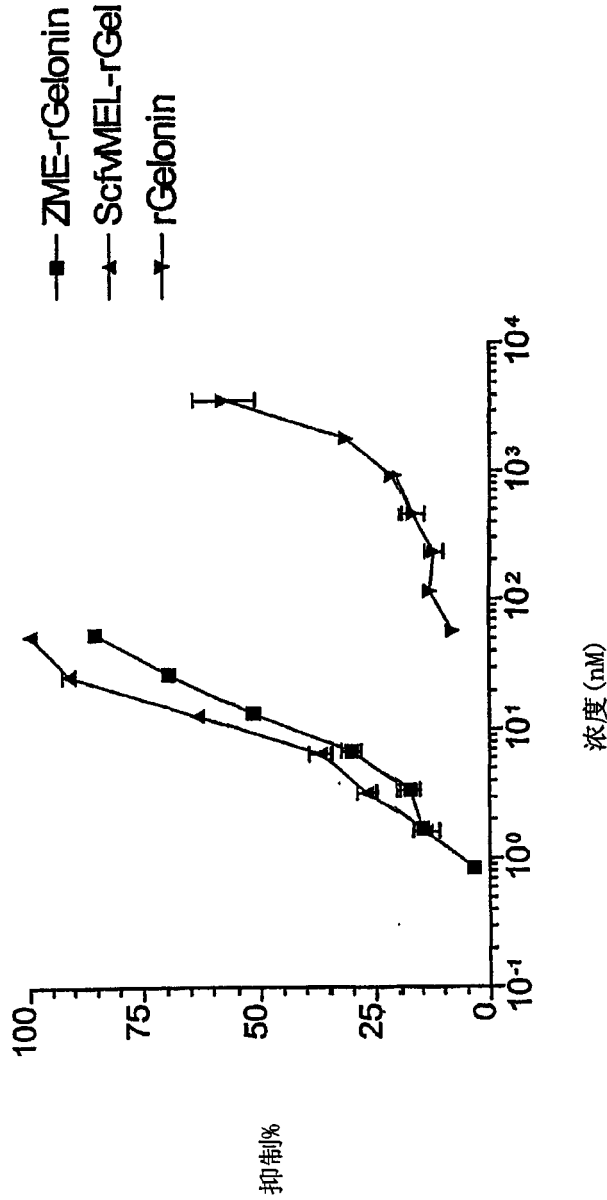


图 7

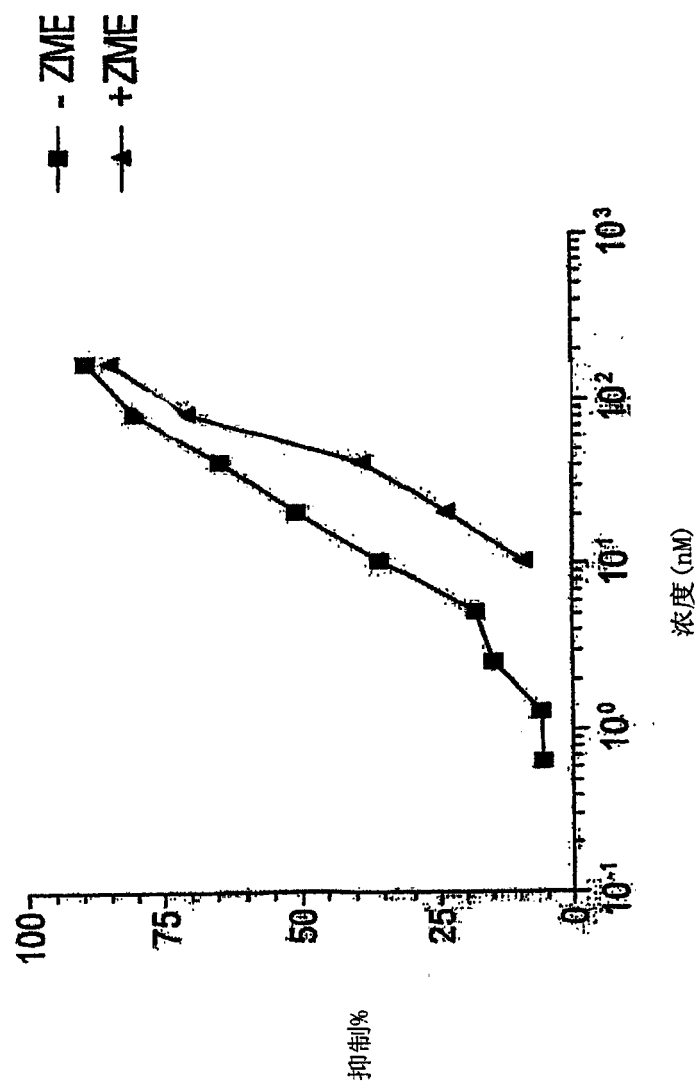


图 8

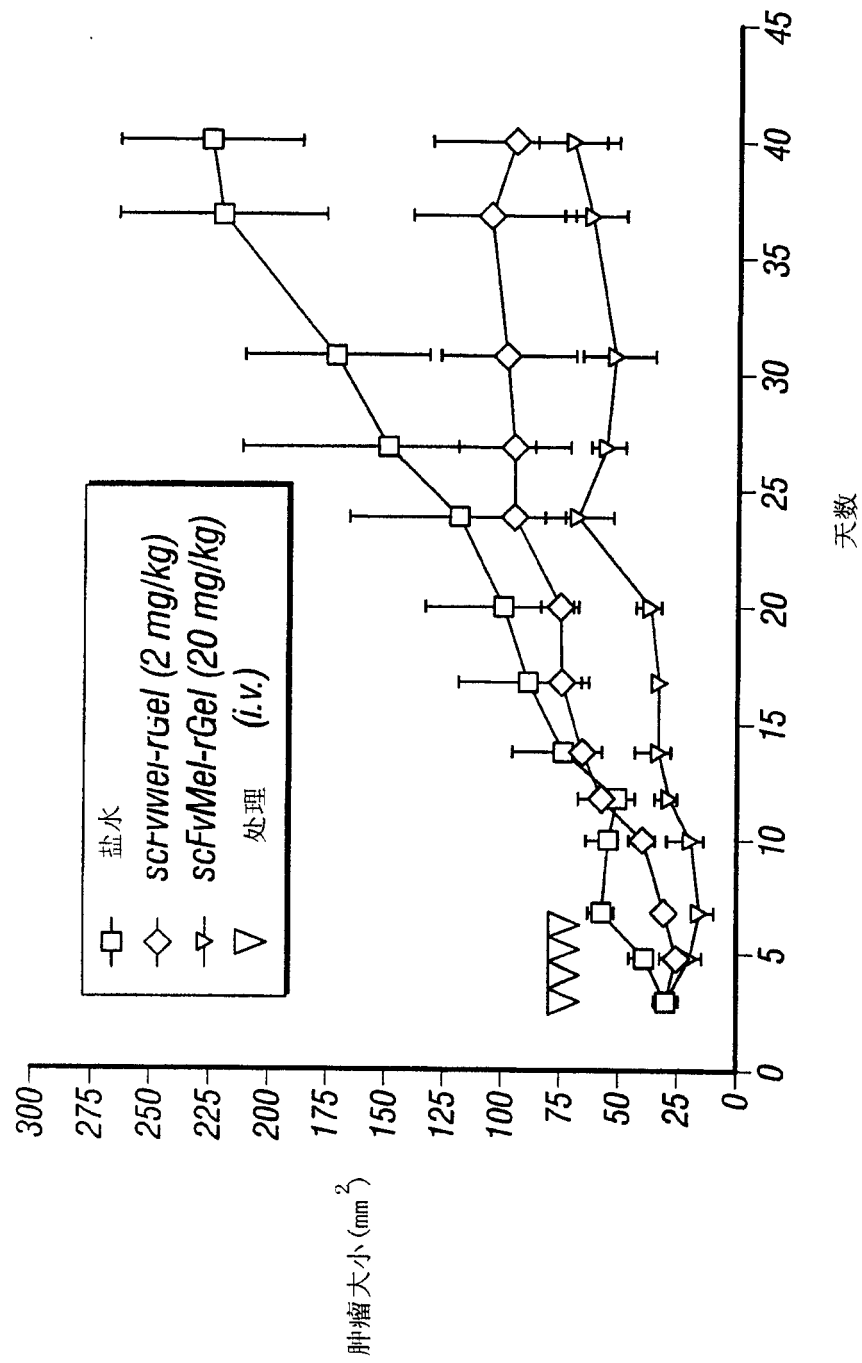


图 9

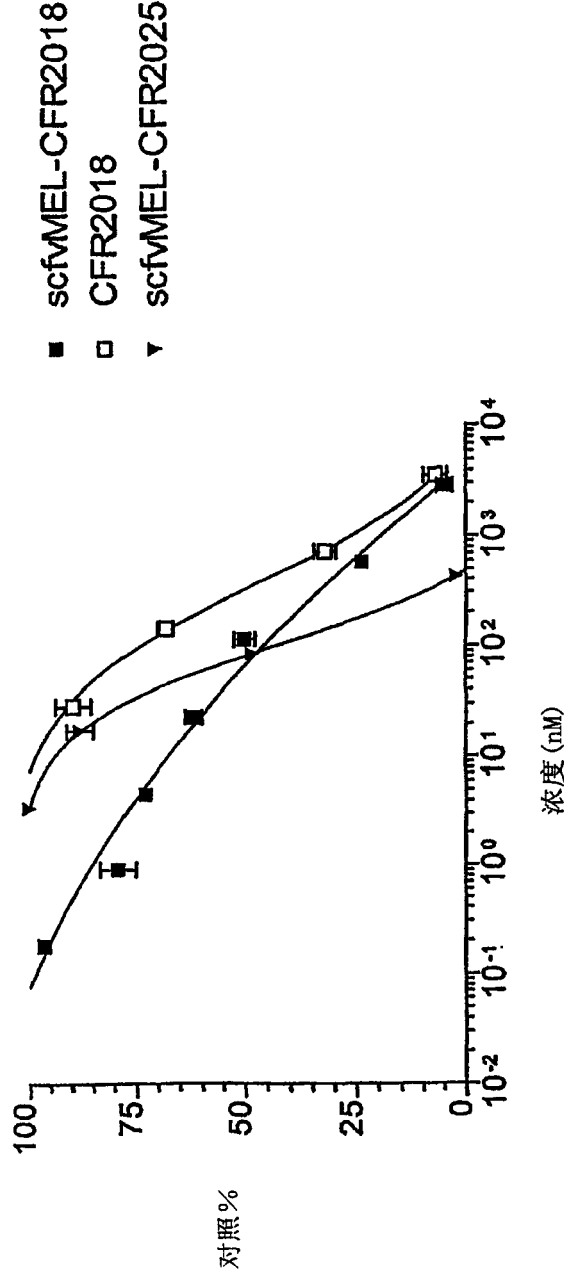


图 10

专利名称(译)	修饰蛋白、人工毒素及其制备方法		
公开(公告)号	CN1512888A	公开(公告)日	2004-07-14
申请号	CN02808173.0	申请日	2002-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
当前申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
[标]发明人	MG罗森布拉姆 L·陈		
发明人	M·G·罗森布拉姆 L·陈		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/16 A61P1/18 A61P5/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07K14/415 C07K14/435 C07K16/30 C07K16/40 C07K19/00 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/29 C12P21/00 A61K35/78 A61K38/16 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/64		
CPC分类号	C07K2317/34 A61K38/00 C07K16/30 C07K14/415 C07K2317/622 A61K2039/505 C07K2319/00 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/16 A61P1/18 A61P5/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/268402 2001-02-12 US		
其他公开文献	CN100413885C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在保持蛋白化合物生物学活性的同时降低其抗原性的方法，本发明还涉及具有较低抗原性同时又具有生物学活性的蛋白组合物。这些方法及组合物有益于需要这种化合物和组合物的个体。本发明还涉及经剪切的和/或具有较低抗原性的修饰毒素化合物。这种人工毒素具有治疗、诊断和预防作用，特别是可以作为免疫毒素。本发明还提供了利用这些免疫毒素治疗肿瘤的方法。