

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12Q 1/68

G01N 33/574 A61K 38/00

G01N 33/50 C07K 16/18

C07K 14/47



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816658.2

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1547617A

[22] 申请日 2002.6.19 [21] 申请号 02816658.2

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 25 [33] DK [31] PA200100992

[32] 2001. 7. 2 [33] US [31] 60/301,818

[86] 国际申请 PCT/IB2002/003534 2002.6.19

[87] 国际公布 WO2003/000928 英 2003.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.25

[71] 申请人 布阿德博公司

地址 丹麦哥本哈根

[72] 发明人 汉斯·S·波尔森 尼娜·佩德森

希拉·莫滕森 苏珊·B·索伦森

米凯尔·W·佩德森

亨里克·I·埃尔斯纳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 15 页 说明书 136 页 附图 18 页

[54] 发明名称 肿瘤学药物革新

[57] 摘要

本发明描述了鉴定以不同水平在癌细胞和非-恶性细胞的细胞表面表达的分子的方法，以及鉴定癌症特异性启动子的方法，单独或联合使用所述启动子可以传递和表达治疗基因以治疗癌症。本发明还描述了能靶向通过本发明方法鉴定的细胞表面分子的靶向复合物。在本发明的实施方案中，所述靶向复合物含有通过本发明方法鉴定的启动子。另外，本发明还描述了鉴定细胞表面分子的结合配对物的方法以及结合配对物本身。本发明还公开了使用靶向复合物的治疗方法以及靶向复合物用于制备药物的用途。另外，本发明还描述了细胞表面分子或其片断用于制备疫苗的用途。

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

1. 鉴定多种细胞表面分子的方法，所述分子在正常细胞和恶性细胞中的表达水平有所不同，所述方法包括以下步骤：

- 5           i)提供至少3个选自下列的恶性细胞系：CPH54A, CPH54B, GLC2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, 10 NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, 15 NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW1271; 和
- 20           ii)提供至少3份得自正常组织的总RNA样品，所述组织选自：肝脏、心脏、肾脏、肺、肾上腺、结肠、胰腺、小肠、脾脏、骨骼肌、气管、前列腺、胎盘、唾液腺、睾丸、白细胞、脑、脂肪组织、膀胱、乳腺、子宫颈、食管、喉、卵巢、直肠、皮肤、脊髓、胃、胸腺、甲状腺和子宫；和
- iii)比较根据i)的细胞系和根据ii)的组织样品的mRNA表达；和
- 25           iv)鉴定核酸序列，其中
- a)根据i)的一个或多个细胞系中表达的mRNA量与根据ii)的一个或多个组织中表达的mRNA量之间有差别；和/或
- b)根据i)的至少2个细胞系中表达的mRNA量基本上无差别；和/或
- c)根据ii)的至少2个组织样品中表达的mRNA量基本上无差别；和
- 30           v)在根据iv)的核酸序列中选择编码潜在细胞表面分子的核酸序列。
2. 根据权利要求1的方法，其中步骤i)包括提供至少5个恶性细胞系。

- 3.根据权利要求1的方法,其中步骤ii)包括得自肺、肝脏、心脏和肾脏的组织样品。
- 4.根据权利要求1的方法,其中步骤ii)包括提供至少5份总RNA样品。
- 5.根据权利要求1的方法,其中步骤iii)包括以下步骤:
- 5 i)从恶性细胞系中分离含有mRNA的RNA;和
- ii)由所述RNA制备cDNA群体,其中由分离自一个细胞系或一个组织样品的RNA制备一个cDNA群体;和
- iii)用可测标记物使每个cDNA群体被标记;和
- iv)提供固体支持物,其上已固定有已知核酸序列的阵列;和
- 10 v)在允许杂交的条件下使每个cDNA群体与固体支持物一起保温;和
- vi)检测固体支持物上的所述可测标记物。
- 6.根据权利要求5的方法,其中所述可测标记物是荧光标记。
- 7.根据权利要求5的方法,其中固体支持物是玻璃板。
- 8.根据权利要求5的方法,其中至少1000个已知核酸序列被固定在固体
- 15 支持物上。
- 9.根据权利要求1的方法,其中步骤iv),a)中的差异是至少2倍的mRNA表达。
- 10.根据权利要求1的方法,其中步骤iv),a)中的差异理论上是不受限制的倍数。
- 20 11.根据权利要求1的方法,其中步骤iv),b)包括至少3个恶性细胞系。
- 12.根据权利要求1的方法,其中步骤iv),c)包括至少3个RNA样品。
- 13.根据权利要求1的方法,其中可根据在通常可进入的数据库中可以得到信息选择编码步骤v)的潜在细胞表面分子的核酸序列,所述数据库选自PubMed(NCBI), Nucleotide(NCBI), Protein(NCBI), Structure(NCBI),
- 25 OMIM(NCBI)和LocusLink(NCBI)。
- 14.根据权利要求1的方法,其中根据与已知细胞表面分子的序列同源性选择编码步骤v)的潜在细胞表面分子的核酸序列,有至少20%的序列同一性。
- 15.根据权利要求1的方法,其中根据与已知细胞表面分子内所含结构
- 30 域的序列同源性来选择编码步骤v)的潜在细胞表面分子的核酸序列。

16. 根据权利要求1的方法，其中根据诸如潜在细胞表面分子含有选自疏水区域和潜在糖基化位点的结构域来选择编码步骤v)的潜在细胞表面分子的核酸序列。

17. 鉴定第一核酸序列的方法，所述核酸序列能介导与之可操作相连的第二核酸序列的表达，其中所述表达在正常细胞与恶性细胞中的水平有所不同，所述方法包括以下步骤：

i)提供至少3个选自下列的恶性细胞系：CPH54A, CPH54B, GLC2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW1271; 和

ii)提供至少3份得自正常组织样品的RNA样品，所述组织选自：肝脏、心脏、肾脏、肺、肾上腺、结肠、胰腺、小肠、脾脏、骨骼肌、气管、前列腺、胎盘、唾液腺、睾丸、白细胞、脑、脂肪组织、膀胱、乳腺、子宫、颈、食管、喉、卵巢、直肠、皮肤、脊髓、胃、胸腺、甲状腺和子宫；和

iii)比较根据i)的细胞系和根据ii)的组织样品的mRNA表达；和

iv)鉴定第二核酸序列，其中

a)根据i)的一个或多个细胞系中表达的mRNA量与根据ii)的一个或多个组织中表达的mRNA量之间有差别；和/或

b)根据i)的至少2个细胞系中表达的mRNA量基本上无差别；和/或

c)根据ii)的至少2个组织样品中表达的mRNA量基本上无差别；和

- v)鉴定与步骤iv)中鉴定的第二核苷酸序列可操作相连的第一核酸序列。
18. 根据权利要求17的方法，其中步骤i)包括提供至少5个恶性细胞系。
19. 根据权利要求17的方法，其中步骤ii)包括得自肺、肝脏、心脏和肾脏的组织样品。
20. 根据权利要求17的方法，其中步骤ii)包括提供至少5份总RNA样品。
21. 根据权利要求17的方法，其中步骤iii)包括以下步骤：
- i)从恶性细胞系中分离含有mRNA的RNA；和
- ii)由所述RNA制备cDNA群体，其中由分离自一个细胞系或一个组织样品的RNA制备一个cDNA群体；和
- iii)用可测标记物使每个cDNA群体被标记；和
- iv)提供固体支持物，其上已固定有已知核酸序列的阵列；和
- v)在允许杂交的条件下使每个cDNA群体与固体支持物一起保温；和
- vi)检测固体支持物上的所述可测标记物。
22. 根据权利要求21的方法，其中所述可测标记物是荧光标记。
23. 根据权利要求21的方法，其中固体支持物是玻璃板。
24. 根据权利要求21的方法，其中至少1000个不同的已知核酸序列被固定在固体支持物上。
25. 根据权利要求17的方法，其中步骤iv), a)中的差异是至少2倍的mRNA表达。
26. 根据权利要求17的方法，其中步骤iv), a)中的差异理论上是不受限制的倍数。
27. 根据权利要求17的方法，其中步骤iv), b)包括至少3种恶性细胞系。
28. 根据权利要求17的方法，其中步骤iv), c)包括至少3种RNA样品。
29. 根据权利要求17的方法，其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的至少15,000个碱基对。
30. 根据权利要求17的方法，其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的至少5,000个碱基对。

31. 根据权利要求17的方法,其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的多达5,000个碱基对。

5 32. 根据权利要求17的方法,其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的内含子序列。

33. 根据权利要求17的方法,其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子下游的内含子序列。

10 34. 根据权利要求17的方法,其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游或下游10,000个碱基对以外的增强子序列。

15 35. 根据权利要求17的方法,其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的多达5000个碱基对,从中缺失了至少10个内部碱基对。

36. 根据权利要求17的方法,其中与第二核酸序列可操作相连的任何第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的多达5000个碱基对,从中缺失了至少一个沉默子。

37. 靶向复合物,其含有:

20 i)能结合通过权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子的结合配对物,其中所述细胞表面分子选自GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, NCAM1, NPTXR, LRP8和CHRNA5; 和

ii)生物反应物质。

25 38. 根据权利要求37的靶向复合物,其中细胞表面分子含有GRIA2或基本上由GRIA2组成。

39. 根据权利要求37的靶向复合物,其中细胞表面分子含有GRM8或基本上由GRM8组成。

40. 根据权利要求37的靶向复合物,其中细胞表面分子含有ITGAV或基本上由ITGAV组成。

30 41. 根据权利要求37的靶向复合物,其中细胞表面分子含有ITGAE或基本上由ITGAE组成。

42. 根据权利要求37的靶向复合物, 其中结合配对物选自: L-谷氨酸, 红藻氨酸盐, 5-(溴甲基)-4-异噁唑丙酸, 谷氨酸类似物, 取代的喹喔啉2,3二酮, GYKI52466, 5-I-尿嘧啶丙氨酸, 5-F-尿嘧啶丙氨酸, AMPA ((RS)- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸)的激动剂和拮抗剂配体, NBQX, CNQX, 5 DNQX, GYKI 52466, 6-氯代犬尿喹啉酸, JSTX, L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, MAP4, (S)-3,4-DCPG, 玻连蛋白, cytactin, 纤连蛋白, 血纤蛋白原, 层粘连蛋白, MMP-2, 骨桥蛋白, 凝血酶原, 血小板反应蛋白, von Willebrandts因子, L1CAM的重组片段, 青霉素N, E-钙粘蛋白及其肽, 包括肽: NRDKETKV, NCAM1结构域IgI+II, NCAM1结构域IgIII及其肽, 肽C3: ASKKPKRNIKA, D3: AKKERQRKDTU, D4: ARALNWGAKP, 10 单克隆抗体123C3, NPTX1, NPTX2, 泰攀蛇毒素, TCBP49, Oxynor, ApoE2, ApoE3, ApoE4, 来自ApoE的肽(E<sub>141</sub>;-155; LRKLRKLLRDADDL及其串联序列E<sub>(141</sub>;-155)<sub>2</sub>; LRKLRKLLRDADDL-LRKLRKLLRDADDL), reelin, 烟碱, 乙酰胆碱,  $\alpha$ -银环蛇毒素, 氨甲酰胆碱以及抗所述任一种表面分子的15 特异性抗体。

43. 根据权利要求37的靶向复合物, 其中所述细胞表面分子能内化该靶向复合物。

44. 根据权利要求37的靶向复合物, 其中所述生物反应物质含有核酸。

45. 根据权利要求44的靶向复合物, 其中核酸含有与含表达信号的第一20 核酸序列可操作相连的第二核酸序列。

46. 靶向复合物, 其含有

i)能结合通过权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子的结合配对物, 其中所述细胞表面分子能内化该靶向复合物; 和

ii)含有核酸序列的生物反应物质, 所述核酸序列含有与含表达信号的第一25 核酸序列可操作相连的第二核酸序列, 其中通过根据权利要求17至36中任一项的方法鉴定出所述第一核酸序列。

47. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中细胞表面分子含有选自下列的细胞表面分子或基本上由它们组成: NCAM1, NPTXR, LRP8和CHRNA5。

48. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中细胞表面分子含有NCAM1或30 基本上由NCAM1组成。

49. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中细胞表面分子含有NPTXR或基本上由NPTXR组成。

50. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中细胞表面分子含有LRP8或基本上由LRP8组成。

5 51. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中细胞表面分子含有CHRNA5或基本上由CHRNA5组成。

52. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中结合配对物选自: NCAM1结构域IgI+II, NCAM1结构域IgIII及其肽, 肽C3: ASKKPKRNIKA, D3: AKKERQRKDTU, D4: ARALNWGAKP, 单克隆抗体123C3, NPTX1,  
10 NPTX2, 泰攀蛇毒素, TCBP49, Oxynor, ApoE2, ApoE3, ApoE4, 来自ApoE的肽(E141;-155; LRKLRKLLRDADDL及其串联序列E(141;-155)2; LRKLRKLLRDADDL-LRKLRKLLRDADDL), reelin, 烟碱, 乙酰胆碱,  $\alpha$ -银环蛇毒素, 卡巴胆碱和抗所述细胞表面分子的特异性抗体。

53. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中所述第一核酸序列含有表达信  
15 号, 该信号能介导所述第二核酸序列在恶性细胞中以相对于非-恶性细胞而言较高的水平表达。

54. 根据权利要求46的靶向复合物, 其中所述第一核酸序列含有表达信号, 所述信号能介导所述第二核酸序列在恶性细胞中以与非-恶性细胞而言较低的水平表达。

20 55. 根据权利要求46至47中任一项的靶向复合物, 其中所述第一核酸序列选自: pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273和pro362。

25 56. 根据权利要求46至47中任一项的靶向复合物, 其中所述第一核酸序列含有选自下列的核苷酸序列的片段: pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273和pro362。

30 57. 根据权利要求46至47中任一项的靶向复合物, 其中所述第一核酸序列含有一个以上选自下列的核苷酸序列的片段: pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273和pro362。

58. 根据权利要求46至47中任一项的靶向复合物,其中所述第一核酸序列含有pro221或其一个或多个片段。
59. 根据权利要求46至47中任一项的靶向复合物,其中所述第一核酸序列含有pro210或其一个或多个片段。
- 5 60. 根据权利要求46至47中任一项的靶向复合物,其中所述第一核酸序列含有pro71或其一个或多个片段。
61. 根据权利要求46的靶向复合物,其中所述第一核酸序列还含有与其非天然相关的核酸序列。
62. 根据权利要求61的靶向复合物,其中所述与其非天然相关的核酸序列是类固醇激素受体结合位点。
- 10 63. 根据权利要求44至46中任一项的靶向复合物,其中所述第二核酸序列编码治疗蛋白质。
64. 根据权利要求44至46中任一项的靶向复合物,其中所述第二核酸序列编码或含有反义RNA或反义RNA的一部分。
- 15 65. 根据权利要求44至46中任一项的靶向复合物,其中所述第二核酸序列编码或含有核酶。
66. 根据权利要求44至46中任一项的靶向复合物,其中所述反义RNA或所述核酶被靶向癌基因或原癌基因的RNA。
67. 根据权利要求66的靶向复合物,其中所述癌基因或原癌基因选自:  
20 Ras, Raf, Myc, Syn, Pim, BMI-1, FOP, Sis, KGF, Fms, Flg, Neu, Trk, Kit, Met, Src, Fyn, Mas, Fes/Fps, Tre, Mer, ABL, BCL3, int-2, Cym, Ets, Elk, RhoA, Ski, Wnt-5a, Spi-1, Rap2, p55和c-tyr。
68. 根据权利要求37至46中任一项的靶向复合物,其中复合物还含有保护性加帽,其中所述保护性加帽由与第一和/或第二核酸序列结合的核酸序列组成。
- 25 69. 根据权利要求68的靶向复合物,其中保护性加帽含有经修饰的核苷酸。
70. 根据权利要求37的靶向复合物,其中所述生物反应物质是毒素。
71. 根据权利要求70的靶向复合物,其中所述毒素选自蓖麻毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素、链脲菌素或霍乱毒素。
- 30

72. 根据权利要求37的靶向复合物,其中所述生物反应物质是细胞凋亡诱导剂。

73. 根据权利要求72的靶向复合物,其中所述细胞凋亡诱导剂选自视黄酸、A23187、冈田酸、嘌呤霉素、星形孢菌素、毒胡萝卜素、放线菌素D、  
5 喜树碱、放线菌酮、地塞米松、依托泊苷和糖皮质激素。

74. 根据权利要求37的靶向复合物,其中所述生物反应物质是放射性同位素。

75. 根据权利要求37的靶向复合物,其中所述生物反应物质含有细胞静止剂。

10 76. 根据权利要求37的靶向复合物,其中所述生物反应物质含有多肽或基本上由多肽组成。

77. 根据权利要求76的靶向复合物,其中所述多肽是治疗蛋白质。

78. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是肿瘤抑制因子。

15 79. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是细胞凋亡诱导剂。

80. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是可使细胞周期停滞的蛋白质。

20 81. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是能保护细胞免受毒性剂侵害的蛋白质。

82. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是能催化毒性物质合成的蛋白质。

83. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是p53。

25 84. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是选自下列的肿瘤抑制因子: p73、p16、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC、MCC、MSH2、PTCH、DPCH、TSC2、CDKN2A和ARF。

30 85. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其中所述治疗蛋白质是选自下列的细胞凋亡诱导剂: Fas/Apo1, TNF, TRAIL, TGF- $\beta$ , caspase, Bak, Bax, Bid, Bik和GZMB。

86. 根据权利要求63至77中任一项的靶向复合物,其含有一种以上编码一种或一种以上,如2,3,4种治疗蛋白质的第一核苷酸序列。

87. 根据权利要求37至86中任一项的靶向复合物,其中复合物还含有核靶向信号。

5 88. 根据权利要求87的靶向复合物,其中核靶向信号是寡肽。

89. 根据权利要求87的靶向复合物,其中核靶向信号是猴病毒40大肿瘤抗原的核定位信号。

90. 根据权利要求37至89中任一项的靶向复合物,其中复合物还含有内体裂解剂。

10 91. 根据权利要求90的靶向复合物,其中内体裂解剂选自聚乙烯亚胺(PEI),复制缺损病毒和病毒蛋白衣壳。

92. 根据权利要求37至89中任一项的靶向复合物,其中靶向复合物还含有氟喹。

15 93. 根据权利要求90的靶向复合物,其中内体裂解剂含有膜去稳定多肽。

94. 根据权利要求37至93中任一项的靶向复合物,其中结合配对物可通过与所述结合配对物共价结合的核酸结合剂与生物反应物质结合。

95. 根据权利要求94的靶向复合物,其中核酸结合剂选自聚-L-赖氨酸(PLL),精胺、亚精胺和组蛋白蛋白质。

20 96. 根据权利要求94的靶向复合物,其中核酸结合剂是含有15至1000个残基的PLL。

97. 根据权利要求37至93中任一项的靶向复合物,其中结合配对物通过一对特异性相互作用的组分间接与生物反应物质结合,其中一个组分与生物反应物质共价结合,另一个组分与结合配对物共价结合。

25 98. 根据权利要求97的靶向复合物,其中所述相互作用的组分是生物素和链霉亲和素。

99. 由根据权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子作为药物靶的用途,其中所述药物靶能与结合配对物结合,并将所述结合配对物内化至表达所述细胞表面分子的细胞中。

100. 根据权利要求99的用途，其中细胞表面分子选自NCAM1，NPTXR，LRP8，CHRNA5，*GRIA2*，*GRM8*，*ITGAV*，*ITGAE*，TNFRSF12，L1CAM，GPR49和TMEFF1。

101. 鉴定和/或制备特异性结合配对物的方法，其包括以下步骤：

5 i)提供通过根据权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子，其中细胞表面分子选自TNFRSF12，L1CAM，GPR49和TMEFF1；

ii)鉴定和/或制备能与所述细胞表面分子结合的结合配对物。

102. 根据权利要求101的方法，其中所述结合配对物可用于药物组合物中，以治疗前恶性和/或恶性疾病。

10 103. 根据权利要求101的方法，其中通过下述步骤制备所述结合配对物：

i)用所述细胞表面分子或其一部分免疫动物；和

ii)从所述动物中获得抗体；或

iii)从所述动物中获得产生抗体的细胞，并从所述细胞中获得抗体。

15 104. 根据权利要求101的方法，其中所述结合配对物选自表达多肽和/或寡肽的表达文库。

105. 根据权利要求101的方法，其中所述结合配对物选自表达多肽和/或寡肽的合成组合文库。

20 106. 根据权利要求101的方法，其中通过筛选抗体的噬菌体展示文库以鉴定所述结合配对物。

107. 根据权利要求101的方法，其中通过筛选人抗体的噬菌体展示文库以鉴定所述结合配对物。

108. 根据权利要求101的方法，其中所述结合配对物选自小化合物文库。

25 109. 通过根据权利要求101至108中任一项的方法鉴定的、分离和/或纯化的特异性结合配对物，该配对物能与细胞表面分子结合，所述细胞表面分子在恶性细胞和正常细胞中的表达水平有所不同。

110. 根据权利要求109的结合配对物，其中所述结合配对物含有多肽或基本上由多肽组成。

30 111. 根据权利要求109的结合配对物，其中所述结合配对物是抗体或抗体片段。

112. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是多克隆抗体或其片段。
113. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是单克隆抗体或其结合片段。
- 5 114. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是鼠单克隆抗体。
115. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是人源化抗体。
116. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是由噬菌体展示文库鉴定的人抗体。
- 10 117. 根据权利要求111至116中任一项的结合配对物,其中所述抗体可与细胞表面分子的胞外部分相互作用。
118. 根据权利要求111至116中任一项的结合配对物,其中所述抗体可与细胞表面分子胞外部分的翻译后修饰物相互作用。
- 15 119. 根据权利要求111至118中任一项的结合配对物,其中所述抗体能通过与所述细胞表面分子结合而被内化。
120. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是所述细胞表面分子的天然配体。
121. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是重组产生的、针对所述细胞表面分子的配体。
- 20 122. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是病毒蛋白质。
123. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是病毒衣壳蛋白。
- 25 124. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是重组产生的,并含有病毒衣壳蛋白序列。
125. 根据权利要求109的结合配对物,其中所述结合配对物是小化合物。
126. 根据权利要求37至98中任一项的靶向复合物,其中结合配对物是根据权利要求109至125中任一项的结合配对物。
- 30 127. 鉴定新药物靶的方法,其包括以下步骤:

i)提供根据权利要求109至125中任一项的结合配对物;

ii)鉴定能与所述结合配对物结合的潜在药物靶。

128. 根据权利要求127的方法,其中所述药物靶含有多肽,所述多肽是在恶性细胞和正常细胞中以不同水平表达的细胞表面分子。

5 129. 通过权利要求127至128中任一项的方法鉴定的药物靶。

130. 复合物,其含有根据权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子和根据权利要求37至98中任一项的靶向复合物。

131. 根据权利要求130的复合物,其中细胞表面分子选自: NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12,  
10 L1CAM, GPR49和TMEFF。

132. 根据权利要求109至125中任一项的结合配对物用于制备根据权利要求37至98中任一项的靶向复合物的用途。

133. 药物组合物,其含有根据权利要求37至98中任一项的靶向复合物以及药物可接受载体。

15 134. 给需要治疗的个体治疗前恶性和/或恶性疾病的方法,包括给所述个体施用药物有效量的根据权利要求37至98中任一项的靶向复合物。

135. 根据权利要求134的方法,其中所述治疗是改善性治疗。

136. 根据权利要求134的方法,其中所述治疗是治愈性治疗。

137. 根据权利要求134的方法,其中所述治疗是预防性治疗。

20 138. 根据权利要求134的方法,其中所述疾病是选自下列的癌症: 黑素瘤、脑瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、白血病、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。

139. 根据权利要求134的方法,其中所述疾病是选自小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)的肺癌。

25 140. 根据权利要求134的方法,其中所述疾病是小细胞肺癌。

141. 根据权利要求134的方法,其中所述疾病是乳腺癌。

142. 根据权利要求134的方法,其中所述临床疾病是选自下列的脑瘤: 成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经管细胞瘤、神经元瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、松果体肿瘤、生殖细胞肿瘤和神经鞘瘤。  
30

143. 根据权利要求134的方法,其中非肠道施用所述靶向复合物。

144. 根据权利要求134的方法, 其中静脉内注射所述靶向复合物。
145. 根据权利要求134的方法, 其中皮下注射所述靶向复合物。
146. 根据权利要求134的方法, 其中所述方法进一步包括一种或多种第二治疗。
- 5       147. 根据权利要求146的方法, 其中所述第二治疗选自手术治疗、化学治疗、放射治疗、细胞因子治疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和激光治疗。
148. 根据权利要求37至98中任一项的靶向复合物用于制备药物的用途, 所述药物可以治疗需要治疗的个体的前恶性和/或恶性疾病。
- 10       149. 根据权利要求148的用途, 其中所述治疗是改善性治疗。
150. 根据权利要求148的用途, 其中所述治疗是治愈性治疗。
151. 根据权利要求148的用途, 其中所述治疗是预防性治疗。
152. 根据权利要求148的用途, 其中所述疾病是选自下列的癌症: 黑素瘤、脑瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、
- 15       153. 根据权利要求148的用途, 其中所述疾病是选自小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)的肺癌。
154. 根据权利要求148的用途, 其中所述疾病是小细胞肺癌。
155. 根据权利要求148的用途, 其中所述疾病是乳腺癌。
- 20       156. 根据权利要求148的用途, 其中所述疾病是选自下列的脑瘤: 成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经管细胞瘤、神经元瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、松果体肿瘤、生殖细胞肿瘤和神经鞘瘤。
157. 根据权利要求148的用途, 其中所述药物适于非肠道施用。
- 25       158. 根据权利要求148的用途, 其中所述药物适于静脉内注射。
159. 根据权利要求148的用途, 其中所述药物适于皮下注射。
160. 药物有效量的、根据权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子用于制备疫苗的用途。
- 30       161. 药物有效量的、编码根据权利要求1至16中任一项的方法鉴定的细胞表面分子的核酸序列用于制备疫苗的用途。

162. 根据权利要求160和161中任一项的用途,其中细胞表面分子选自: NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

5 163. 根据权利要求160和161中任一项的用途,其中所述疫苗还含有与  
所述细胞表面分子共价连接的非-自身抗原。

164. 根据权利要求160和161中任一项的用途,其中所述疫苗还含有编  
码与核酸序列连接的非-自身抗原的第二核酸序列。

165. 根据权利要求160和161中任一项的用途,其中所述疫苗还含有一  
种以上的抗原。

10 166. 根据权利要求160和161中任一项的用途,其中所述疫苗还含有佐  
剂。

167. 根据权利要求160和161中任一项的用途,其中所述疫苗适于改善  
性和/或治愈性和/或预防性治疗前恶性和/或恶性疾病。

## 肿瘤学药物革新

### 5 发明领域

本发明涉及鉴定癌细胞的细胞表面分子的方法，还涉及鉴定癌症特异性启动子的方法，单独或联合使用所述启动子可以传递和表达治疗基因以治疗癌症。

### 发明背景

10 约一半的癌症患者在确诊时癌症已扩散。现有的癌症疗法仅能治愈这些患者中的5-7%。所以，非常需要更有效的药物，所述药物能单独或与现有疗法联合进行全身性给药。因此，利用基因治疗传递有效且特异性强的治疗癌细胞的方法是一种很有前途的策略。然而，迄今为止所用策略的成功率有限，需要进一步开发适当的传递系统。

### 15 传递载体

对基因治疗所用传递载体的选择是主要问题。已检测多种载体系统对基因转移的适应性，包括病毒载体，如逆转录病毒、腺病毒、腺-伴随病毒、慢病毒，以及非病毒载体，如与脂质体、阳离子脂质或聚阳离子混合。然而，所有这些载体都具有特别的优点和局限性。逆转录病毒需要有丝分裂以进行转导，但当其整合至基因组中能介导长期表达。腺病毒能转导分裂和非-分裂细胞，但当其保持为游离状态时，仅能进行瞬时转导。然而，腺病毒的免疫原性高，逆转录病毒能被人补体系统快速灭活。慢病毒不能诱导免疫应答，但由于它是免疫缺损病毒的成员，因此涉及特殊的安全问题。尽管病毒载体的制备较为困难和昂贵，所插入治疗基因的大小有限，而且还有很多安全性问题需要考虑，但迄今为止，所有方法中有75%以上使用了这些载体。因此，腺病毒载体所用的大多数方法是通过局部传递(注射至肿瘤中)施用治疗基因，以增加病毒的局部滴度并避免免疫原性反应，但甚至最高滴度的系统仍不足以治愈局部肿瘤。病毒载体系统的主要缺点是：其摄取是非特异性的，不能靶向癌细胞。然而，腺病毒因其传递效率而仍是优选的载体，因此，正在开发降低免疫应答和将病毒靶向特定细胞的方法。另一方面，脂质体和聚阳离子复合物的免疫原性较低，且易于制

备, 无需考虑病毒载体的安全性, 但是与病毒转导相比, 其转染效率要低得多, 而且还缺乏细胞特异性。然而, 聚阳离子能密集和中和所传递DNA的电荷, PEI复合物在血液系统中相对稳定(Goula等, 1998; 评述于Mountain, 2000)。

- 5 为了确保治疗的高特异性并限制治疗所带来的不良副作用, 重要的是要设计一种能将所需治疗基因有效、高特异性地靶向和传递至癌细胞的载体。然而, 如下文所述, 这包括装配多个组分载体。

### 受体靶向

- 可以使用能通过癌细胞表面的配体或抗体结合而内化的功能性受体或  
10 其它细胞表面分子使基因传递靶向细胞。利用与受体的配体偶联的DNA而进行的受体靶向基因传递提供了一种有前途的方法。靶向基因传递的主要优点是: 进行受体靶向无需病毒, 因此消除了现行基因治疗策略中存在的很多障碍。据报道, 对于多种不同的表面受体, 已成功使用受体靶向将基因传递至癌细胞, 所述受体包括表皮生长因子(Cristano and Roth, 1996,  
15 Frederiksen等, 2000), 叶酸(Gottschalk等, 1994), 运铁蛋白(Wagner等, 1990)的受体。特异性受体的高表达不总是受体介导的有效摄取的先决条件, 这一点已在表皮生长因子受体中得到阐明(Frederiksen等, 2000)。然而, 癌细胞表达的很多受体在某种程度上也能由正常细胞表达, 这意味着正常细胞经常也能被靶向。这一问题强调了对表达特异性或治疗基因特性的更加严格  
20 的要求。

### 分子偶联物

- 为了进行靶向基因治疗, 必须使被内化的配体和表达治疗基因的DNA物理结合以进行受体介导的摄取。有几种方法可用于通过使阳离子聚合物, 如聚-L-赖氨酸(Frederiksen等, 2000)或聚乙烯亚胺(PEI)(Kircheis等,  
25 1997)(polyplexes)与配体和DNA结合来制备靶向DNA分子偶联物的非病毒合成载体。已报道了多种分子偶联物的成功基因靶向。配体与聚阳离子共价相连, 或者生物素化的配体和聚赖氨酸经由链霉亲和素复合以与DNA形成缩合偶联物, 该偶联物可被配体的受体内化。这些系统优于病毒介导的转移的一个优点是对DNA的大小没有限制。另外, PEI复合物似乎能穿过肺  
30 中的毛细血管屏障, 使得该化合物成为一种能用于分子偶联物的试剂。

### 分子偶联物的内体释放

DNA/配体偶联物被受体胞吞之后，正常途径会导致DNA的降解和损失。因此，已证实分子偶联物中必须包括内体裂解剂。已证实：当将腺病毒、复制缺损的腺病毒和病毒衣壳包括在分子偶联物中时，它们对于内体裂解都很有效。然而，使用腺病毒作为载体所带来的非特异性摄取、安全性和免疫原性反应问题也都会在此系统中出现。已检测了在分子偶联物中包括其它融合肽后的胞质释放，所述融合肽含有例如流感病毒、毒素或合成肽的氨基酸序列。这些偶联物具有免疫原性较弱、花费较低的优点，但已证实它们的内体裂解效力比腺病毒差。然而，如果使用聚阳离子PEI形成分子偶联物，就不必包含内体裂解剂，因为PEI具有内在的内体-缓冲能力，能导致内体膨胀和破裂。

### 癌症特异性启动子

如果能使用可控制表达的肿瘤特异性启动子，即可使治疗基因靶向癌细胞的特异性增加(评述于Nettelbeck 等, 2000)。已使用了某些基因(例如端粒酶)的启动子，所述基因的表达特异于恶性表型，但未显示出组织特异性。另外还发现：能调节一般不在成人中表达的癌胚抗原，如癌胚抗原(CEA)的启动子在肿瘤细胞中也有活性。然而，已证实这些启动子的活性(与强的组成型病毒启动子相比)经常不能介导治疗基因的充分表达，因此，需使用肿瘤特异性基因来活化另一个控制治疗基因的较强启动子。癌胚启动子的另一个缺点是：这些启动子仅在肿瘤类型亚群中具有活性，具体取决于肿瘤的组织来源。或者，利用在癌细胞中过量表达的很多癌基因是转录因子这一事实来设计合成的启动子，所述启动子能介导由其各自的DNA识别序列起的高转录活性。

### 治疗基因

治疗基因的产物必须能有效诱导细胞死亡。癌症治疗所用的基因治疗策略已使用了很多种不同的方法。这些方法包括免疫基因治疗，如用细胞因子刺激免疫系统(增强针对肿瘤细胞的免疫应答)，选择性前体药物活化，自杀基因，恢复肿瘤抑制基因和抑制活化的癌基因(评述于Frederiksen等, 1999; Gunji等, 2000)。实际上，目前针对癌症的临床试验中使用的大多数治疗方法都涉及免疫疗法。然而，由于多种癌症的分子表型与癌基因和肿瘤抑制基因的异常表达或突变有关，这些基因显然是靶向的候选目标。已尝试使用能降低癌基因的表达或活性的治疗基因产物，如反义RNA或中和抗

体片段, 经证实它们能抑制增殖。然而, 灭活癌基因不必杀死细胞, 因此, 可能不适于短期治疗。目前较有前途的策略之一是: 重新导入肿瘤抑制基因, 因为大多数癌细胞表现出一种或多种这些基因的功能丧失。其中一个特别令人感兴趣的基因是编码p53的肿瘤抑制基因TP53, 该基因是转录因子, 能激活已知参与细胞周期停滞和细胞凋亡诱导的基因。已证实在体外和体内系统中重新导入野生型p53能显著减缓肿瘤细胞生长或诱导癌细胞的细胞凋亡(Roth等, 1996; Nielsen and Maneval, 1998)。

然而, 使细胞变得对其它无害药物敏感的基因产物也被广泛用于基因治疗试验。特别是, 已使用了单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)与核苷类似物药物9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤的组合物。然而, 通过酶将药物转变为有毒的核苷类似物仅会杀死正在分裂的细胞。然而, 所谓的“旁观者”效应可将有毒产物传递给周围的细胞, 使得该方法可潜在用于靶向效率低的系统。

#### 发明简述

因此, 本发明的第一个目的是提供鉴定多种细胞表面分子的方法, 所述分子在正常细胞和恶性细胞中的表达水平有所不同, 所述方法包括以下步骤:

i)提供至少3个选自下列的恶性细胞系: CPH54A, CPH54B, GLC2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196,

NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW1271;

ii)提供至少3份得自正常组织的总RNA样品,所述组织选自:肝脏、心脏、肾脏、肺、肾上腺、结肠、胰腺、小肠、脾脏、骨骼肌、气管、前列腺、胎盘、唾液腺、睾丸、白细胞、脑、脂肪组织、膀胱、乳腺、子宫颈、食管、喉、卵巢、直肠、皮肤、脊髓、胃、胸腺、甲状腺和子宫;

iii)比较根据步骤i)的细胞系和根据步骤ii)的组织样品的mRNA表达;

iv)鉴定核酸序列,其中

a)根据i)的一个或多个细胞系中表达的mRNA量与根据ii)的一个或多个组织中表达的mRNA量之间有差别;和/或

b)根据i)的至少2个细胞系中表达的mRNA量基本上无差别;和/或

c)根据ii)的至少2个组织样品中表达的mRNA量基本上无差别;和

v)在根据iv)的核酸序列中选择编码潜在细胞表面分子的核酸序列。

本发明的第二个目的是提供鉴定第一核酸序列的方法,所述核酸序列能介导与之可操作相连的第二核酸序列的表达,其中正常细胞与恶性细胞中的所述表达水平有所不同,所述方法包括以下步骤:

i)提供至少3个选自下列的恶性细胞系: CPH54A, CPH54B, GLC2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24, MAR 86MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446, SW1271;

- ii)提供至少3份得自正常组织样品的RNA样品, 所述组织选自: 肝脏、心脏、肾脏、肺、肾上腺、结肠、胰腺、小肠、脾脏、骨骼肌、气管、前列腺、胎盘、唾液腺、睾丸、白细胞、脑、脂肪组织、膀胱、乳腺、子宫颈、食管、喉、卵巢、直肠、皮肤、脊髓、胃、胸腺、甲状腺和子宫;
- 5      iii)比较根据i)的细胞系和根据ii)的组织样品的mRNA表达;
- iv)鉴定第二核酸序列, 其中
- a)根据i)的一个或多个细胞系中表达的mRNA量与根据ii)的一个或多个组织中表达的mRNA量之间有差别; 和/或
- b)根据i)的至少2个细胞系中表达的mRNA量基本上无差别; 和/或
- 10      c)根据ii)的至少2个组织样品中表达的mRNA量基本上无差别; 和
- v)鉴定与步骤iv)中鉴定的第二核苷酸序列可操作相连的第一核酸序列。

本发明的第三个目的是提供药物有效量的、本发明中鉴定的细胞表面分子用于制备疫苗的用途。另外, 本发明提供了药物有效量的、编码根据

15 本发明方法鉴定的细胞表面分子的核酸序列用于制备疫苗的用途。本发明还提供了药物有效量的细胞表面分子和/或编码所述细胞表面分子的核酸序列用于制备疫苗的用途, 其中所述细胞表面分子优选含有下述物质或基本上由下述物质组成, 或例如是GRIA2, 如LPR8, 例如是CHRNA5, 如TMEFF, 例如是NPTXR, 如运铁蛋白受体; 如II型膜蛋白克隆: 例如是HP10481; 如

20 II型膜蛋白克隆: 如HP10390; 例如是PG40; 如TRC8; 例如是TR2-11; 如OA3抗原表面决定簇; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6, 例如GPIIb; 如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位; 例如是整联蛋白 $\alpha$ -7; 如整联蛋白 $\alpha$ E前体; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B; 如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位; 例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位; 如整联蛋白 $\alpha$ -3链; 例如是RYK; 如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1; 例如是推定的跨膜GTP酶; 如膜

25 辅因子蛋白; 例如GLVR1; 例如是Mr110,000抗原, 例如是多配体聚糖-1; 如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质; 例如是LCA-同系物/LAR蛋白; 如M6抗原; 例如是Me491/CD63抗原; 如多跨越膜蛋白; 例如是DDR; 如自泌活动因子受体; 例如是胰岛素受体前体; 如IGF1R, 例如是胰岛素-样生长因子II受体; 如SAS; 例如是TAPA-1; 如MICB; 例如是MHC II类HLA-DR7-

30 相关糖蛋白 $\beta$ -链; 如HLA-DP; 例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖; 如CAR; 例如是MEA11; 如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链; 例如是多聚免疫球蛋白受体;

- 如 metabotropic 谷氨酸受体 4 型；例如是 metabotropic 谷氨酸受体 8；如 CLPTM1，例如是 MAGE-4b；如 MAGE5a；例如是 MAGE-3；例如 MAGE-1；例如是 MAGE6；如 MAGE-9；例如是 MAGE11；如 CD24；例如是 CD59；如 CD44；例如是低密度脂蛋白受体；如极低密度脂蛋白受体；例如是 N-CAM；
- 5 如核纤层蛋白 B 受体同系物 TM7SF2；例如是推定的 T1/ST2 受体结合蛋白前体；如 NTR2 受体；例如是 RAGE-4；如 HLA-G1；例如是 MOAT-C；如  $\alpha 2 \delta$  钙通道亚单位同种型 I；例如是 LFA-3；如 L1-CAM；例如是 AVPR2；如 C1 p115 C1；例如是 TE2；如 RbP；例如是 HCF1；如 IRAK；例如是 CD151；如表面抗原；例如是 MAG；如 GPR19；例如是 pcta-1；如 PRAME；例如是加压素
- 10 活化的钙质转移受体-样蛋白；如 5-羟色胺受体 5-HT4B；例如是 5-羟色胺 1D 受体(5-HT1D~)；如 CD9；例如是 LDL 受体成员 LR3；如 DR6；例如是肿瘤坏死因子受体；如 HG38；例如是尿激酶型纤溶酶受体；如 FGF 受体；例如是神经生长因子受体；如 胱氨酸/谷氨酸转运蛋白；例如是 CB1 大麻素 (cannabinoid) 受体 (CNR1)；如 PSG；例如是 PSG13'；如 CPE-受体；例如是
- 15 CRH2R；如 OCI5；例如是 TRAIL 受体 2；如 HNMP-1；例如是肾  $\alpha$ -2-肾上腺素能受体；如红细胞生成素受体；例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖 V1；例如是 mGluR1 $\beta$ ；如 CD97；例如是 L6；如 NY-ESO-1；例如是 T-细胞受体  $\alpha\delta$ ；如 ror1；例如是 ror2；如 SSTR2；例如是 VESPR；如 IgG Fc 受体；例如是谷氨酸受体亚单位 GluRC；如 HEK2；例如是 PVR；如 CEA；例如是 CC-趋化因子-
- 20 结合受体 JAB61；如 HER2；例如是 HER3；如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白 FLJ22357；例如是推定的 B-型内皮肤受体-样蛋白；如 GLVR2；例如是 P2X4 嘌呤受体 (purinoreceptor)；如 FPRL1；例如是心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide) 清除受体；例如是胃泌素/CCK-B 受体；如神经调节肽 B 受体；例如是 GFRA3；如 GRPR；例如是 CDH1；如 CDH2；例如是
- 25 TGFBR1；如 TGFBR2；例如是 TGFBR3；如表皮生长因子受体的前体。

本发明的第四个目的是提供根据本发明所述方法鉴定的细胞表面分子作为药物靶的用途，其中所述药物靶能结合结合配对物，并将所述结合配对物内化至表达所述细胞表面分子的细胞中。另外，本发明提供了细胞表面分子作为药物靶的用途，其中所述药物靶能结合结合配对物，并将所述

30 结合配对物内化至表达所述细胞表面分子的细胞中，所述细胞表面分子优选含有下述物质或基本上由下述物质组成，或例如是 GRIA2，如 LPR8，例

如是CHRNA5, 如TMEFF, 例如是NPTXR, 如运铁蛋白受体; 如II型膜蛋白克隆: 例如是HP10481; 如II型膜蛋白克隆: 如HP10390; 例如是PG40; 如TRC8; 例如是TR2-11; 如OA3抗原表面决定簇; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6, 例如GPIIb; 如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位; 例如是整联蛋白 $\alpha$ -7; 如整联蛋白 $\alpha$ E  
 5 前体; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B; 如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位; 例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位; 如整联蛋白 $\alpha$ -3链; 例如是RYK; 如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1; 例如是推定的跨膜GTP酶; 如膜辅因子蛋白; 例如GLVR1; 例如是Mr110,000抗原, 例如是多配体聚糖-1; 如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质; 例如是LCA-同系物/LAR蛋白; 如M6抗原; 例如是Me491/CD63抗原; 如多跨越膜  
 10 蛋白; 例如是DDR; 如自泌活动因子受体; 例如是胰岛素受体前体; 如IGF1R, 例如是胰岛素-样生长因子II受体; 如SAS; 例如是TAPA-1; 如MICB; 例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链; 如HLA-DP; 例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖; 如CAR; 例如是MEA11; 如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链; 例如是多聚免疫球蛋白受体; 如metabotropic谷氨酸受体4型; 例如是metabotropic谷氨酸受体8; 如CLPTM1, 例如是MAGE-4b; 如MAGE5a; 例如是MAGE-3;  
 15 例如MAGE-1; 例如是MAGE6; 如MAGE-9; 例如是MAGE11; 如CD24; 例如是CD59; 如CD44; 例如是低密度脂蛋白受体; 如极低密度脂蛋白受体; 例如是N-CAM; 如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2; 例如是推定的T1/ST2受体结合蛋白前体; 如NTR2受体; 例如是RAGE-4; 如HLA-G1; 例如是  
 20 MOAT-C; 如 $\alpha$ 2  $\delta$ 钙通道亚单位同种型I; 例如是LFA-3; 如L1-CAM; 例如是AVPR2; 如C1 p115 C1; 例如是TE2; 如RbP; 例如是HCF1; 如IRAK; 例如是CD151; 如表面抗原; 例如是MAG; 如GPR19; 例如是pcta-1; 如PRAME; 例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白; 如5-羟色胺受体5-HT4B; 例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~); 如CD9; 例如是LDL受体成员  
 25 LR3; 如DR6; 例如是肿瘤坏死因子受体; 如HG38; 例如是尿激酶型纤溶酶受体; 如FGF受体; 例如是神经生长因子受体; 如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白; 例如是CB1大麻素受体(CNR1); 如PSG; 例如是PSG13'; 如CPE-受体; 例如是CRH2R; 如OCI5; 例如是TRAIL受体2; 如HNMP-1; 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体; 如红细胞生成素受体; 例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能  
 30 聚糖V1; 例如是mGluR1 $\beta$ ; 如CD97; 例如是L6; 如NY-ESO-1; 例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ; 如ror1; 例如是ror2; 如SSTR2; 例如是VESPR; 如IgG Fc受

体；例如是谷氨酸受体亚单位GluRC；如HEK2；例如是PVR；如CEA；例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61；如HER2；例如是HER3；如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357；例如是推定的B-型内皮肤受体-样蛋白；如GLVR2；例如是P2X4嘌呤受体；如FPRL1；例如是心房利钠肽清除受体；例如是胃泌素/CCK-B受体；如神经调节肽B受体；例如是GFRA3；如GRPR；例如是CDH1；如CDH2；例如是TGFBFR1；如TGFBFR2；例如是TGFBFR3；如表皮生长因子受体的前体。

本发明的第五个目的是提供鉴定和/或制备特异性的结合配对物的方法，所述方法包括以下步骤：

- 10        i)提供通过本发明所述方法鉴定的细胞表面分子；  
           ii)鉴定和/或制备能与所述细胞表面分子结合的结合配对物。

本发明的另一个目的是提供鉴定和/或制备特异性的结合配对物的方法，所述方法包括以下步骤：

- 15        i)提供细胞表面分子，所述分子优选含有下述物质或基本上由下述物质组成，或例如是运铁蛋白受体；如II型膜蛋白克隆：例如是HP10481；如II型膜蛋白克隆：如HP10390；例如是PG40；如TRC8；例如是TR2-11；如OA3抗原表面决定簇；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6，例如GPIIb；如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位；例如是整联蛋白 $\alpha$ -7；如整联蛋白 $\alpha$ E前体；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B；如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位；例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位；如整联蛋白 $\alpha$ -3链；例如是  
 20        RYK；如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1；例如是推定的跨膜GTP酶；如膜辅因子蛋白；例如GLVR1；例如是Mr110,000抗原，例如是多配体聚糖-1；如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质；例如是LCA-同系物/LAR蛋白；如M6抗原；例如是Me491/CD63抗原；如多跨越膜蛋白；例如是DDR；如自泌活动因子受体；例如是胰岛素受体前体；如IGF1R，例如是胰岛素-样生长因子II受体；  
 25        如SAS；例如是TAPA-1；如MICB；例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链；如HLA-DP；例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖；如CAR；例如是MEA11；如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链；例如是多聚免疫球蛋白受体；如metabotropic谷氨酸受体4型；例如是metabotropic谷氨酸受体8；如CLPTM1，例如是MAGE-4b；如MAGE5a；例如是MAGE-3；例如MAGE-1；例如是MAGE6；  
 30        如MAGE-9；例如是MAGE11；如CD24；例如是CD59；如CD44；例如是低密度脂蛋白受体；如极低密度脂蛋白受体；例如是N-CAM；如核纤层蛋白

B受体同系物TM7SF2; 例如是推定的T1/ST2受体结合蛋白前体; 如NTR2受体; 例如是RAGE-4; 如HLA-G1; 例如是MOAT-C; 如 $\alpha$ 2  $\delta$ 钙通道亚单位同种型I; 例如是LFA-3; 如L1-CAM; 例如是AVPR2; 如C1 p115 C1; 例如是TE2; 如RbP; 例如是HCF1; 如IRAK; 例如是CD151; 如表面抗原; 例如是MAG; 如GPR19; 例如是pcta-1; 如PRAME; 例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白; 如5-羟色胺受体5-HT4B; 例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~); 如CD9; 例如是LDL受体成员LR3; 如DR6; 例如是肿瘤坏死因子受体; 如HG38; 例如是尿激酶型纤溶酶受体; 如FGF受体; 例如是神经生长因子受体; 如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白; 例如是CB1大麻素受体(CNR1); 如PSG; 例如是PSG13'; 如CPE-受体; 例如是CRH2R; 如OCI5; 例如是TRAIL受体2; 如HNMP-1; 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体; 如红细胞生成素受体; 例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1; 例如是mGluR1 $\beta$ ; 如CD97; 例如是L6; 如NY-ESO-1; 例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ; 如ror1; 例如是ror2; 如SSTR2; 例如是VESPR; 如IgG Fc受体; 例如是谷氨酸受体亚单位GluRC; 如HEK2; 例如是PVR; 如CEA; 例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61; 如HER2; 例如是HER3; 如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357; 例如是推定的B-型内皮肤受体-样蛋白; 如GLVR2; 例如是P2X4嘌呤受体; 如FPRL1; 例如是心房利钠肽清除受体; 例如是胃泌素/CCK-B受体; 如神经调节肽B受体; 例如是GFRA3; 如GRPR; 例如是CDH1; 如CDH2; 例如是TGFBR1; 如TGFBR2; 例如是TGFBR3; 如表皮生长因子受体的前体;

ii) 鉴定和/或制备能与所述细胞表面分子结合的结合配对物。

本发明的另一个目的是提供通过本发明所提供的方法鉴定出的、分离和/或纯化的特异性结合配对物, 该配对物能与细胞表面分子结合, 所述细胞表面分子在恶性细胞和正常细胞中的表达水平有所不同。本发明还提供了能与细胞表面分子结合的、分离和/或纯化的特异性结合配对物, 所述细胞表面分子优选含有下述物质或基本上由下述物质组成, 或例如是GRIA2, 如LPR8, 例如是CHRNA5, 如TMEFF, 例如是NPTXR, 如运铁蛋白受体; 如II型膜蛋白克隆: 例如是HP10481; 如II型膜蛋白克隆: 如HP10390; 例如是PG40; 如TRC8; 例如是TR2-11; 如OA3抗原表面决定簇; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6, 例如GPIIb; 如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位; 例如是整联蛋白 $\alpha$ -7; 如整联

蛋白 $\alpha$ E前体；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B；如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位；例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位；如整联蛋白 $\alpha$ -3链；例如是RYK；如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1；例如是推定的跨膜GTP酶；如膜辅因子蛋白；例如GLVR1；例如是Mr110,000抗原，例如是多配体聚糖-1；如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质；

5 例如是LCA-同系物/LAR蛋白；如M6抗原；例如是Me491/CD63抗原；如多跨越膜蛋白；例如是DDR；如自泌活动因子受体；例如是胰岛素受体前体；如IGF1R，例如是胰岛素-样生长因子II受体；如SAS；例如是TAPA-1；如MICB；例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链；如HLA-DP；例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖；如CAR；例如是MEA11；如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$

10 链；例如是多聚免疫球蛋白受体；如metabotropic谷氨酸受体4型；例如是metabotropic谷氨酸受体8；如CLPTM1，例如是MAGE-4b；如MAGE5a；例如是MAGE-3；例如MAGE-1；例如是MAGE6；如MAGE-9；例如是MAGE11；如CD24；例如是CD59；如CD44；例如是低密度脂蛋白受体；如极低密度脂蛋白受体；例如是N-CAM；如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2；例如是

15 推定的T1/ST2受体结合蛋白前体；如NTR2受体；例如是RAGE-4；如HLA-G1；例如是MOAT-C；如 $\alpha$ 2  $\delta$ 钙通道亚单位同种型I；例如是LFA-3；如L1-CAM；例如是AVPR2；如C1 p115 C1；例如是TE2；如RbP；例如是HCF1；如IRAK；例如是CD151；如表面抗原；例如是MAG；如GPR19；例如是pcta-1；如PRAME；例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白；如

20 5-羟色胺受体5-HT4B；例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~)；如CD9；例如是LDL受体成员LR3；如DR6；例如是肿瘤坏死因子受体；如HG38；例如是尿激酶型纤溶酶受体；如FGF受体；例如是神经生长因子受体；如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白；例如是CB1大麻素受体(CNR1)；如PSG；例如是PSG13'；如CPE-受体；例如是CRH2R；如OCI5；例如是TRAIL受体2；如HNMP-1；

25 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体；如红细胞生成素受体；例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1；例如是mGluR1 $\beta$ ；如CD97；例如是L6；如NY-ESO-1；例如是T-细胞受体 $\alpha$  $\delta$ ；如ror1；例如是ror2；如SSTR2；例如是VESPR；如IgG Fc受体；例如是谷氨酸受体亚单位GluRC；如HEK2；例如是PVR；如CEA；例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61；如HER2；例如是HER3；如类

30 似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357；例如是推定的B-型内皮受体-样蛋白；如GLVR2；例如是P2X4嘌呤受体；如FPRL1；例如是

心房利钠肽清除受体；例如是胃泌素/CCK-B受体；如神经调节肽B受体；例如是GFRA3；如GRPR；例如是CDH1；如CDH2；例如是TGFBR1；如TGFBR2；例如是TGFBR3；如表皮生长因子受体的前体。

本发明的另一个目的是提供鉴定新药物靶的方法，所述方法包括以下  
5 步骤：

- i)提供如本发明所述的结合配对物；
- ii)鉴定能与所述结合配对物结合的潜在药物靶。

本发明的另一个目的是提供通过本发明所述的方法鉴定的药物靶。

另外，本发明的目的是提供靶向复合物，其含有：

- 10 i)如本发明所述的结合配对物；和
- ii)生物反应物质。

其中靶向复合物能结合根据本发明所述方法鉴定的细胞表面分子，并能被内化至携有所述细胞表面分子的细胞中。

本发明还提供了本发明所述的结合配对物用于制备本发明的靶向复  
15 合物的用途。

本发明的另一个目的是提供药物组合物，其含有本发明所述的靶向复合物以及药物可接受载体。

本发明的另一个目的是为需要治疗的个体提供治疗前恶性和/或恶性疾病的方法，所述方法包括给所述个体施用药物有效量的本发明所述的靶向  
20 复合物。

另外，本发明的目的是提供本发明所述的靶向复合物用于制备药物的用途，所述药物可用于为需要治疗的个体治疗前恶性和/或恶性疾病。

#### 附图说明

图1阐明了靶向基因治疗的原理。

25 图2阐明了通过芯片分析(CHIP Analysis)和RT-PCR测定的基因表达之间的比较结果。图中通过对甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)进行RT-PCR，显示出用于经RT-PCR证实芯片分析结果的cDNA定性试验。

图3阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的Pro221(IA-1)基因表达之间的比较结果。

30 图4阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的Pro30(KIA0042)基因表达之间的比较结果。

图5阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的Pro41(MAD2)基因表达之间的比较结果。

图6阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的Pro210(核纤层蛋白B1)基因表达之间的比较结果。

5 图7阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的Pro71(CDKN2A)基因表达之间的比较结果。

图8阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的细胞表面分子DR6基因表达之间的比较结果。

10 图9阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的细胞表面分子LRP8基因表达之间的比较结果。

图10阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的细胞表面分子NTPXR基因表达之间的比较结果。

图11阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的细胞表面分子NCAM1基因表达之间的比较结果。

15 图12A阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的细胞表面分子GluR2 (GRIA2)基因表达之间的比较结果。

图12B阐明了通过芯片分析和RT-PCR测定的细胞表面分子ITGAV基因表达之间的比较结果。

20 图13阐明了通过芯片分析和Western印迹测定的mGluR8基因表达之间的比较结果。

图14阐明了通过芯片分析和Western印迹分析测定的NPTXR基因表达之间的比较结果。

图15阐明了通过芯片分析和Western印迹分析测定的NCAM1基因表达之间的比较结果。

25 图16阐明了通过芯片分析和Western印迹分析测定的GluR2 (GRIA2)基因表达之间的比较结果。

图17阐明了通过芯片分析和Western印迹分析测定的ITGAE基因表达之间的比较结果。

### 发明详述

30 定义

结合配对物: 参见“细胞表面分子结合配对物”。

生物反应物质: 任何可直接或间接对靶细胞发挥生物学作用的物质。

Bp: 碱基对。

细胞表面分子: 与细胞表面天然结合分子。

细胞表面分子结合配对物: 任何可与细胞表面分子特异性结合分子。

- 5 本文中的术语“细胞表面分子结合配对物”和短语“结合配对物”可以互换使用，在本文中，这两个术语的意义相同。

增强子: 核酸序列，它可增强与之可操作相连的第二核酸序列的转录。

第一核酸序列: 核酸序列，它能介导与之可操作相连的第二核酸序列的表达。

- 10 正常细胞: 非-恶性来源的非-恶性细胞。

正常组织: 非-恶性组织。

启动子: 第一核酸序列，它能介导与之可操作相连的第二核酸序列的表达。

- 15 第二核酸序列: 当与第一核酸序列可操作相连时能被表达的核酸序列，如可由所述核酸序列转录的mRNA。

沉默子: 核酸序列，它能阻抑与之可操作相连的第二核酸序列的转录。

靶向复合物: 含有至少一种结合配对物和生物反应物质、且能被内化至细胞中的复合物。

### 具体实施方式

- 20 越来越明显的是：如果癌症的基因治疗欲成为癌症，特别是多处扩散的癌症的有效的、可供选择的或辅助的疗法，必须满足几个需求。这些需求包括例如：i)复合物的靶向必须有效，且是癌症特异性的；ii)治疗基因的表达必须有效，且是癌症特异性的；和iii)分子偶联物必须是非-免疫原性的，且在全身性给药后具有高稳定性，能跨越毛细血管屏障。

- 25 在一个优选实施方案中，本发明涉及新的高流通量筛选方法用于鉴定癌细胞特异性表达的基因的用途，以及所述方法用于治疗基因的双-靶向基因转移和表达以治疗癌症的用途。图1举例概述了双-靶向基因转移的原理。本发明的筛选方法能鉴定出癌细胞表达的新分子。

- 30 在一个实施方案中，使用所述方法鉴定小细胞肺癌(SCLC)细胞所表达的适当分子的基因表达。小细胞肺癌是高侵略性肿瘤，占有肺癌病例的约25%。在诊断时该病几乎总已经扩散。单独使用不同的化学治疗药物或

与放射疗法联合可以治疗SCLC。尽管人们积极尝试改善治疗，且大多数患者在治疗初期对治疗反应较好，但死亡率仍然很高。现有的癌症治疗仅能治愈这些患者中的5-7%，5-年存活率极低(5-15%)。因此，SCLC患者非常需要新疗法的出现。

5 已彻底鉴定出该疾病的分子表型，已发现在80%以上的SCLC肿瘤中，除了几种肿瘤抑制基因(如p53和Rb)的功能丧失外，还存在癌基因(特别是*myc*-家族)的异常表达。在得自SCLC肿瘤的大多数细胞系中也可发现这些表型(评述于Frederiksen等, 1999)，使得这些细胞系可用作体外检测潜在抗癌药物的实验工具。另外，可在裸鼠体内增殖这些细胞系，因此可以在活体内  
10 检验所开发的药物。因此，可将得自SCLC的细胞系用于初步筛选基因表达，以鉴定出SCLC细胞中的癌症特异性(或高表达的)表面分子和具有特异性转录活性的区域(启动子)。

为了鉴定出在多种SCLC中表达的基因，本发明优选使用由不同实验室建立的和得自不同患者的多种不同SCLC细胞系。另外，优选这些SCLC细  
15 胞系中的表达与多种正常组织中的表达差不多，优选其为来源于内胚层、外胚层和中胚层的不同组织的代表。

本发明中可以使用双相策略，然而，在本发明的某些实施方案中，也可以使用其它策略。本发明的双相策略可以是例如基因治疗药物，所述药物经过全身性给药，可通过与细胞表面有转运能力的功能性受体结合而有效靶向癌细胞，随后，通过在癌细胞中具有特别活性或高活性的启动子，  
20 在癌细胞中有效表达基因。

### 氨基酸和核酸

在说明书和权利要求书中，使用了天然氨基酸的单字母密码或三字母密码。其中未特别指出L或D型，应理解所述氨基酸具有天然的L型(参见Pure  
25 & Appl. Chem. Vol. 56(5) pp595-624(1984))或D型，使得所形成的肽可由L型、D型氨基酸或L型和D型的混合序列构成。

如未特别指明，应理解本发明多肽的C-末端氨基酸以游离羧酸的形式存在，这也可被特别指明为“-OH”。多肽的N-末端氨基酸含有游离的氨基-  
30 基团，这也可被特别指明为“-H”。

如未特别指明，氨基酸可选自任何氨基酸，天然或非天然皆可，如 $\alpha$ 氨基酸、 $\beta$ 氨基酸和/或 $\gamma$ 氨基酸。因此，氨基酸组包括但不限于Ala, Val, Leu, Ile,

Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Aib, Nal, Sar, Orn, 赖氨酸类似物DAP和DAPA。

本文中的术语“核酸”意味着包括DNA和RNA及其衍生物，如肽核酸(PNA)或锁定核酸(LNA)。

## 5 鉴定细胞表面分子和启动子的方法

用于鉴定细胞表面分子和/或第一核酸序列的方法优选包括比较恶性细胞系中的mRNA水平与正常组织中的mRNA水平，其中所述第一核酸序列能介导与之可操作相连的本发明第二核酸序列的表达。

优选本发明的恶性细胞系是哺乳动物细胞系，更优选为人细胞系。更  
10 优选细胞系得自小细胞肺癌(SCLC)。甚至更优选细胞系选自：CPH54A, CPH54B, GLC2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24 和 MAR 86MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735,  
15 NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711,  
20 NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-44和 SW1271。  
25 更优选细胞系选自CPH54A, CPH54B, GLC 2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24和MAR 86MI。

甚至更优选细胞系选自CPH54A, CPH54B, CHP136A, GLC 2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114,  
30 DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24和 MAR 86MI。

最优选细胞系选自 DMS53, DMS70, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, NCI417和NCI H69.

表1列出了本发明的优选细胞系以及它们的保藏号。

5 表1 小细胞肺癌细胞系的保藏登录号

SCLC 细胞系	培养物 保藏中心	(临时) 登录号	保藏人
CPH 54A	ECACC	01061905	ODIN Medical A/S
CPH 54B	ECACC	01061906	
GLC 2	ECACC	01061907	
GLC 3	ECACC	01061908	
GLC 14	ECACC	01061909	
GLC 16	ECACC	01061910	
GLC 19	ECACC	01061911	
GLC 26	ECACC	01061912	
GLC 28	ECACC	01061913	
DMS 406	ECACC	01061914	
DMS 456	ECACC	01061915	
MAR H 24	ECACC	01061916	
MAR 86 MI	ECACC	01061917	
DMS 53	ATTC	CRL-2062	
	ecacc	95062823	
DMS 79	ATTC	CRL-2049	
	ecacc	95062824	
DMS 92	ecacc	950662825	
DMS 114	ATTC	CRL-2066	
DMS 153	ATTC	CRL-2064	
	ecacc	95062827	
DMS 273	ecacc	95062830	
SHP-77	Ecacc	98110201	A.M. Koros
	ATTC	CRL-2195	

NCI-H2171	ATTC	CRL-5929	A.F.Gazdar; J.D. Minna
NCI-H2195		CRL-5931	
NCI N417		CRL-5809	
NCI-H2196		CRL-5932	
NCI-H2198		CRL-5933	
NCI-H2227		CRL-5934	
NCI-H2286		CRL-5938	
NCI-H2330		CRL-5940	
NCI-H735		CRL-5978	
NCI-H1339		CRL-5979	
NCI-H1963		CRL-5982	
NCI-H2107		CRL-5983	
NCI-H2108		CRL-5984	
NCI-H1304		CRL-5862	
NCI-H1341		CRL-5864	
NCI-H1417		CRL-5869	
NCI-H1436		CRL-5871	
NCI-H1522		CRL-5874	
NCI-H1618		CRL-5879	
NCI-H1672		CRL-5886	
NCI-H1694		CRL-5888	
NCI-H1836		CRL-5989	
NCI-H1870		CRL-5901	
NCI-H1876		CRL-5902	
NCI-H1882		CRL-5903	
NCI-H1926		CRL-5905	
NCI-H1930		CRL-5906	
NCI-H1994		CRL-5910	
NCI-H2029		CRL-5913	
NCI-H2059		CRL-5916	
NCI-H2066		CRL-5917	
NCI-H2081		CRL-5920	
NCI-H2141		CRL-5927	
NCI-H211	CRL-5824		
NCI-H220	CRL-5825		
NCI-H250	CRL-5828		

NCI-H524		CRL-5831	
NCI-H592		CRL-5832	
NCI-H711		CRL-5836	
NCI-H719		CRL-5837	
NCI-H740		CRL-5840	
NCI-H748		CRL-5841	
NCI-H774		CRL-5842	
NCI-H841		CRL-5845	
NCI-H847		CRL-5846	
NCI-H865		CRL-5849	
NCI-H1048		CRL-5853	
NCI-H1059		CRL-5854	
NCI-H1092		CRL-5855	
NCI-H1105		CRL-5856	
NCI-H1184		CRL-5858	
NCI-H1238		CRL-5859	
NCI-H1284		CRL-5861	
NCI-H1688		CCL-257	
NCI-H187		CRL-5804	
NCI-H378		CRL-5808	
NCI-H526		CRL-5811	
NCI-H660		CRL-5813	
NCI-H889		CRL-5817	
NCI-H60		CRL-5821	
NCI-H196		CRL-5823	
NCI-H446		HTB-171	
NCI-H209		HTB-172	
NCI-H146		HTB-173	
NCI-H82		HTB-175	
NCI-H460		HTB-177	
NCI-H345		HTB-180	
NCI-H510A		HTB-184	
NCI-128		HTB-120	A.F.Gazdar
NCI-446		HTB-171	
NCI H 69		HTB-119	
SW 1271		CRL-2177	W. McCombs

例如, 该方法包括至少4个, 如至少5个, 如至少6个, 如至少8个, 如至少10个, 如至少12个, 如至少14个, 如至少16个, 如至少18个, 如至少20个, 如至少21个, 如至少25个, 如至少30个, 如至少40个, 如至少50个, 如至少60个, 如至少70个, 如约79个选自下列的恶性细胞系: CPH54A, CPH54B, GLC2, GLC3, GLC14, GLC16, GLC19, GLC26, GLC28, DMS53, DMS79, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, DMS406, DMS456, NCI H69, NCI N417, MAR H24 和 MAR 86MI, SHP-77, NCI-H2171, NCI-H2195, NCI-H2196, NCI-H2198, NCI-H2227, NCI-H2286, NCI-H2330, NCI-H735, NCI-H1339, NCI-H1963, NCI-H2107, NCI-H2108, NCI-H1304, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H1522, NCI-H1618, NCI-H1672, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H1870, NCI-H1876, NCI-H1882, NCI-H1926, NCI-H1930, NCI-H1994, NCI-H2029, NCI-H2059, NCI-H2066, NCI-H2081, NCI-H2141, NCI-H211, NCI-H220, NCI-H250, NCI-H524, NCI-H592, NCI-H711, NCI-H719, NCI-H740, NCI-H748, NCI-H774, NCI-H841, NCI-H847, NCI-H865, NCI-H1048, NCI-H1059, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1184, NCI-H1238, NCI-H1284, NCI-H1688, NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H660, NCI-H889, NCI-H60, NCI-H196, NCI-H446, NCI-H209, NCI-H146, NCI-H82, NCI-H460, NCI-H345, NCI-H510A, NCI-128, NCI-446和 SW1271。

在本发明的一个优选实施方案中, 该方法包括下列所有细胞系: DMS53, DMS70, DMS92, DMS114, DMS153, DMS273, NCI 417和NCI H69。

可通过任何适当的方法培养细胞系, 例如可在本领域技术人员已知的适当条件下, 在体外细胞培养中培养细胞系。在本发明的一个实施方案中, 以异种移植的方式在动物体内培养一个或多个细胞系。动物可以是任何适当的动物, 优选为哺乳动物, 更优选为啮齿类动物, 最优选为小鼠。实施例1中给出了如何以异种移植的方式体内培养细胞系的例子。

本发明还包括: 相同细胞系可以在体外细胞培养中培养, 也可在体内培养。

一般说来, 体内培养条件, 即以异种移植的方式在动物中培养与天然肿瘤或癌症更加类似, 因此该条件通常优选在体内培养至少1个, 如至少2个, 如至少3个, 如至少4个, 如至少5个, 如至少6个, 如至少7个, 如至少

8个细胞系。更优选在体内培养1至79, 如2至70, 如3至60, 如4至50, 如5至40, 如6至30, 如7至20个细胞系。甚至更优选在体内培养约8个细胞系。

5 优选体内培养的细胞系选自表1所述的细胞系, 甚至更优选体内培养的细胞系选自 CPH54A, CHP136A, GLC3, GLC14, DMS273, NCI-H69, NCI-N417和MAR H24。

10 正常组织是非恶性组织。优选所述组织得自未患前恶性和/或恶性疾病的个体。更优选正常组织是哺乳动物组织, 甚至更优选组织是人组织。更优选组织选自: 肝脏、心脏、肾脏、肺、肾上腺、结肠、胰腺、小肠、脾脏、骨骼肌、气管、前列腺、胎盘、唾液腺、睾丸、白细胞、脑、脂肪组织、膀胱、乳腺、子宫颈、食管、喉、卵巢、直肠、皮肤、脊髓、胃、胸腺、甲状腺和子宫。甚至更优选组织选自脑、肾上腺、肺、肾脏、心脏、气管、前列腺、唾液腺、甲状腺、肝脏、胰腺、脾脏、小肠、骨骼肌、结肠、胃和睾丸。最优选组织选自肺、肝脏、心脏和肾脏。

15 优选该方法包括至少3个, 如至少4个, 如至少5个, 如至少6个, 如至少8个, 如至少10个总RNA样品。

该方法可以是本领域技术人员已知的、任何适于比较恶性细胞系中的mRNA水平与正常组织中的mRNA水平的方法。一般说来, 该方法包括纯化mRNA或总RNA。可根据本领域技术人员已知的任何标准方法, 如Sambrook等, 1989或下文实施例中所描述的方法进行RNA纯化。

20 可通过多种不同的技术比较RNA样品。本发明可以使用任何适当的技术。例如可通过示差展示或扣除杂交比较RNA样品。另外, 包括使经标记的RNA或cDNA库与已知核酸序列杂交的技术也适用于本发明。例如, 可先将已知核酸固定于固体支持物上, 然后再在例如膜(如硝酸纤维素膜)上进行杂交, 或者固体支持物也可以是塑料或玻璃。

25 可用任何直接或间接可测的标记, 例如酶、放射性同位素、生色团、荧光基团或重金属标记经标记的RNA或cDNA。另外, 标记可以是一对结合配对物的一部分, 其中第二部分是直接或间接可测的。为了检测间接可测的标记, 可以使用“夹心”系统, 如一对结合配对物的一部分由第二部分识别, 所述第二部分反过来由第一部分识别, 所述第一部分再由第二部分  
30 识别。在每一步中, 可以标记第一和/或第二部分。成对结合配对物的例子

是抗原/抗体或生物素/链霉亲和素。然而，本发明也可使用任何其它适当的成对结合配对物。

在本发明的一个实施方案中，所述方法包括以下步骤：

- i)从恶性细胞系中分离含有mRNA的RNA；
- 5 ii)由所述RNA制备cDNA群体，其中由分离自一个细胞系或一个组织样品的RNA制备一个cDNA群体；
- iii)用可测标记标记每个cDNA群体；
- iv)提供其上已固定有已知核酸序列阵列的固体支持物；
- v)在允许杂交的条件下保温每个cDNA群体与固体支持物；
- 10 vi)检测固体支持物上的所述可测标记。

优选所述可测标记是间接可测标记，更优选标记是一对结合配对物的一部分，其中第二部分是直接或间接可测的。最优选标记是生物素。可用经标记的链霉亲和素类物质，优选经荧光标记的链霉亲和素来检测生物素。更优选链霉亲和素进一步与经生物素标记的抗-链霉亲和素抗体结合，  
15 它反过来可被经标记的、优选经荧光标记的链霉亲和素检测。荧光标记可以是例如藻红蛋白或任何其它适当的荧光标记。

在一个优选实施方案中，固体支持物是玻璃板。优选在固体支持物上固定至少1000，如至少5000，如至少10,000，如至少50,000，如至少100,000，  
20 如至少150,000，如至少200,000，如约240,000个不同的已知核酸序列。这些核酸序列全部得自不同的基因。然而，更优选每个基因由1个以上，如2个以上，如4个以上，如7个以上，如10个以上，如15个以上，如20个以上，优选约20个不同的核酸序列来描述。

在本发明的一个实施方案中，可通过CHIPS分析或GeneChips分析来比较RNA样品。在本文中，术语CHIPS分析和GeneChips分析可以互换使用。  
25 实施例1中给出了如何进行CHIPS分析的例子。

根据几个标准选择适当的细胞表面分子。优选本发明方法所用的一个或多个细胞系中表达的mRNA量与本发明的一个或多个组织中表达的mRNA量之间有差别。优选mRNA表达相差至少1.1倍，如1.2倍，如1.5倍，  
30 如1.75倍，如2倍，如2.5倍，如至少3倍，如至少4倍，如至少5倍，如至少7.5倍，如至少10倍。在一个优选实施方案中，相差的倍数在理论上不受限制，如一个或多个细胞系中未表达出可测的mRNA，但一个或多个正常组织

中有可测的mRNA，或者在一个或多个正常组织中未表达出可测的mRNA，但在一个或多个细胞系中有可测的mRNA。

另外，优选本发明方法中使用的至少2个，如至少3个，如至少4个，如至少5个，如至少6个，如至少8个，如至少10个，如至少12个，如至少14个，  
5 如至少16个，如至少18个，如至少20个，如至少21个，如至少25个，如至少30个，如至少40个，如至少50个，如至少60个，如至少70个，如约79个恶性细胞系中表达的mRNA量基本上没有差别。

另外，优选本发明方法所用总RNA所来源的组织样品中，至少2个，如至少3个，如至少4个，如至少5个，如至少6个，如至少8个，如至少10个组织样品中表达的mRNA量基本上没有差别。  
10

从完全符合上述标准的核酸序列中选择编码潜在细胞表面分子的核酸序列。在一个特别优选的实施方案中，如实施例1所述鉴定潜在的细胞表面分子，并根据该实施例中所说的标准选择这些分子。

为了测定何种核酸序列编码潜在的细胞表面分子，可以使用不同的策略。例如，可根据在通常可进入的数据库中可以得到信息选择潜在的细胞表面分子。例如，所述数据库可选自PubMed(NCBI), Nucleotide(NCBI), Protein(NCBI), Structure(NCBI), OMIM(NCBI)和LocusLink(NCBI)。NCBI是国立生物技术信息中心的简称。另外，可根据潜在细胞表面分子的名称中一个或多个选定术语的存在来选择潜在的细胞表面分子。例如，所述术语  
15 可选自受体、膜、粘附、整联蛋白、表面、抗原、多配体聚糖、转运、通道、激素、结合、糖蛋白、基质、CAM、桥粒、间隙连接、 $\delta$ 、免疫球蛋白、MHC、CD、HSPG、CSPG、完整的和有凹槽的(notch)。  
20

或者，根据与已知细胞表面分子的序列同源性来选择编码潜在细胞表面分子的核酸序列。编码潜在细胞表面分子的核酸序列应该与编码已知细胞表面分子的核酸序列具有至少20%，如至少22.5%，如至少25%，如至少27.5%，如至少30%的序列同一性。  
25

也可以根据与已知细胞表面分子内所含结构域的序列同源性来选择编码潜在细胞表面分子的核酸序列。优选编码潜在细胞表面分子的核酸结构域和编码已知细胞表面分子结构域的核酸序列之间有至少20%，如至少22.5%  
30 %，如至少25%，如至少27.5%，如至少30%，如至少32.5%，如至少35%，

如至少37.5%，如至少40%，如至少42.5%，如至少45%，如至少47.5%，如至少50%的序列同一性。

也可根据潜在细胞表面分子含有经常与细胞表面结合的结构域来选择编码潜在细胞表面分子的核酸序列。所述结构域可以选自例如疏水区域和潜在的糖基化位点。

5 在本发明的一个实施方案中，通过芯片分析(CHIP Analysis)鉴定出候选细胞表面分子。然后根据几个标准选择适当的细胞表面分子。例如，可以包括经评价以绝对信号和平均差为例如>10，如>20，如>40，如>50存在(P)的细胞表面分子。另外，可以建立点系统以鉴定适当的细胞表面分子。例如，可以安排编码细胞表面分子的基因以评价多个点，例如一个点对应一个表达该基因的细胞系或组织。分别计算出正常组织和SCLC细胞系中各个基因的总评分。然后选择基因，经评价所述基因在至少3个，如4个，5个，6个，7个，8个，9个，10个，10个以上SCLC细胞系中存在。实施例1描述了选择细胞表面分子的优选方法。

15 本发明还提供了鉴定第一核酸序列的方法，所述核酸序列能介导与之可操作相连的第二核酸序列的表达。这些方法包括鉴定第二核酸序列，在恶性细胞和正常细胞中，所述第二核酸序列的表达水平有所不同。

因此，优选一个或多个细胞系中表达的第二核酸序列mRNA量与一个或多个组织中表达的第二核酸序列mRNA量之间有差别。更优选mRNA表达相差至少1.1倍，如1.2倍，1.5倍，1.75倍，2倍，2.5倍，如至少3倍，如至少4倍，如至少5倍，如至少7.5倍，如至少10倍。

20 在一个优选实施方案中，相差的倍数在理论上不受限制，如一个或多个细胞系中未表达出可测的第二核酸序列mRNA，但一个或多个正常组织中有可测的所述mRNA，或者在一个或多个正常组织中未表达出可测的第二核酸序列mRNA，但在一个或多个细胞系中有可测的所述mRNA。

另外，优选本发明方法中使用的至少2个，如至少3个，如至少4个，如至少5个，如至少6个，如至少8个，如至少10个，如至少12个，如至少14个，如至少16个，如至少18个，如至少20个，如至少21个，如至少25个，如至少30个，如至少40个，如至少50个，如至少60个，如至少70个，如约79个恶性细胞系中表达的第二核酸序列mRNA量基本上没有差别。

另外, 优选至少2个, 如至少3个, 如至少4个, 如至少5个, 如至少6个, 如至少8个, 如至少10个组织样品中表达的第二核酸序列mRNA量基本上没有差别。

5 在一个特别优选的实施方案中, 根据实施例1所述方法鉴定第二核酸序列。最优选将该实施例中所述的标准用于选择有用的第二核酸序列。

在本发明的一个实施方案中, 通过芯片分析鉴定出候选启动子。然后根据几个基于启动子所控制基因的表达水平的标准, 来选择适当的启动子。例如, 仅可包括经评价以绝对信号和平均差为 $>10$ , 如 $>20$ , 如 $>30$ , 如 $>40$ , 如 $>50$ (表达水平)存在(P)的基因。可以使用上文所述的点评价系统。例如,  
10 可选择经评价在至少3个, 如至少4个, 如至少5个, 如至少6个, 如至少7个, 如至少8个, 如至少9个, 如至少10个, 如至少11个, 如至少12个SCLC细胞系中存在的基因。如果一个或多个正常组织中存在基因评分, SCLC细胞系的平均差中间值应该优选为正常组织的平均差中间值的4倍或更高。优选对正常组织而言的表达平均差 $<50$ , 而对SCLC而言 $>100$ 的启动子。更优选对  
15 正常组织而言的表达平均差 $<50$ , 而对SCLC而言 $>200$ 的启动子。最优选对正常组织而言的表达平均差 $<50$ , 而对SCLC而言 $>400$ 的启动子。或者, 可以选择在SCLC中的表达平均差比正常组织中的高 $>8$ 倍的启动子。实施例1描述了选择细胞表面分子的优选方法。

一旦根据上述标准鉴定出第二核酸序列, 即可鉴定出与第二核苷酸序  
20 列可操作相连的第一核酸序列。可根据本领域技术人员已知的任何标准方法达到此目的。例如, 可以利用已知的人基因组序列。

### 细胞表面分子

本发明的细胞表面分子是任何与细胞表面天然结合的分。在其整个生命期内, 细胞表面分子不总是与细胞表面结合, 而仅在特定的时间与细胞表面结合。本发明范围内的细胞表面分子可以是任何与细胞表面结合的分  
25 子类型, 然而, 本发明的细胞表面分子优选含有多肽。

在本发明的一个实施方案中, 细胞表面分子不与细胞表面结合, 而是细胞内受体。细胞内受体包括例如核类固醇激素受体。

然而, 在本发明其它优选的实施方案中, 细胞表面分子包括例如经由  
30 跨膜结构域、膜锚着结构域或与膜结合的共价连接基团, 如亲脂基团直接与细胞表面结合的分。亲脂基团可以是例如糖基磷脂酰肌醇基团(GPI)。

然而，细胞表面分子也包括与细胞表面间接结合的分子，例如，能够与同细胞表面直接或间接结合的其他细胞表面分子结合的分子。

通常，细胞表面分子含有至少一个胞外结构域，然而，细胞表面分子也可含有一个以上的胞外结构域，如2、3、4、5、6、7、8、9、10、10个以上的胞外结构域。

细胞表面分子经常是糖基化的多肽。

在本发明的一个优选实施方案中，细胞表面分子能与特异性结合配对物结合，并能通过结合内化所述的特异性结合配对物，即在结合配对物与细胞表面分子结合之后，结合配对物被转移至表达细胞表面分子的细胞的内部。通常，通过受体介导的胞吞来内化结合配对物，但其它机理也是可以的，并且也落入本发明的范围。能内化结合配对物的细胞表面分子可用于例如放射-，毒素-或基因治疗或癌症疫苗。

在本发明的另一个优选实施方案中，细胞表面分子能在细胞表面与特异性结合配对物结合，但不能内化所述的特异性结合配对物。未被内化的细胞表面分子可用于例如放射-疗法和癌症疫苗。

表2列出了优选细胞表面分子的GenBank登录号和名称。

表2

登录号	细胞表面分子	基因名称	SEQ ID (cDNA/DNA)	SEQ ID (蛋白质)
M11507	运铁蛋白受体	人运铁蛋白受体mRNA, 完整编码序列	1	2
X01060	运铁蛋白受体	人运铁蛋白受体mRNA	3	4
AB015633	HP10481	人II型膜蛋白mRNA, 完整编码序列克隆: HP10481	5	6
M14219	PG40	人软骨素/硫酸皮肤素蛋白聚糖(PG40)核心蛋白mRNA, 完整编码序列	7	8
AF064801	TRC8	人多膜跨越受体TRC8(TRC8) mRNA, 完整编码序列	9	10
M29960	TR2-11	人类固醇受体(TR2-11) mRNA, 完整编码序列	11	12
X69398	OA3抗原表面决定簇	人OA3抗原表面决定簇mRNA	13	14
X53586	整联蛋白 $\alpha$ 6	人整联蛋白 $\alpha$ 6 mRNA	15	16
M34480	GPIIb	人血小板糖蛋白IIb(GPIIb) mRNA, 完整编码序列	17	18
M14648	玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位; 也被称为ITGAV	人细胞粘附蛋白(玻连蛋白)受体 $\alpha$ 亚单位; ITGAV mRNA, 完整编码序列	19	20
AF032108	整联蛋白 $\alpha$ -7	人整联蛋白 $\alpha$ -7 mRNA; 完整编码序列	21	22

M35011	整联蛋白β-5亚单位	人整联蛋白β-5亚单位mRNA, 完整编码序列	23	24
X53002		人整联蛋白β-5亚单位mRNA	25	26
L25851	整联蛋白αE前体; 也被称为ITGAE	人整联蛋白αE前体; ITGAE, mRNA, 完整编码序列	27	28
S66213	整联蛋白α6B	整联蛋白α6B[人, 部分mRNA, 528个核苷酸]	29	30
X06256	整联蛋白α5亚单位	人整联蛋白α5亚单位 mRNA	31	32
M59911	整联蛋白α-3链	人整联蛋白α-3链mRNA, 完整编码序列	33	34
S59184	RYK	RYK=与受体酪氨酸激酶有关[人, 肝癌, mRNA, 3068个核苷酸]	35	36
U50939	淀粉样前体蛋白-结合蛋白1	人淀粉样前体蛋白-结合蛋白1 mRNA, 完整编码序列	37	38
U95822	推定的跨膜GTP酶	人推定的跨膜GTP酶mRNA, 部分编码序列	39	40
X59408	膜辅因子蛋白	人膜辅因子蛋白基因	41	
L20859	GLVR1	人白血病病毒受体1(GLVR1) mRNA, 完整编码序列	42	43
D64154	Mr110,000抗原	人 Mr110,000抗原 mRNA, 完整编码序列	44	45
		间-α-胰蛋白酶抑制剂重链LIKE基因		47
Z48199	多配体蛋白聚糖-1	人多配体蛋白聚糖-1基因(外显子2-5)	48	49
Y18007	推定的有7个跨膜结构域的蛋白质	人推定的有7个跨膜结构域的蛋白质的mRNA	50	51
Y00815	LCA-同系物/LAR蛋白	人 LCA-同系物/LAR蛋白(与白细胞抗原相关)的mRNA	52	53
X64364	M6抗原	人M6抗原mRNA	54	55
X62654	Me491/CD63抗原	人 Me491/CD63抗原的基因	56	57
U94831	多跨越膜蛋白	人多跨越膜蛋白mRNA, 完整编码序列	58	59
U48705	DDR	人受体酪氨酸激酶DDR基因, 完整编码序列	60	61
M63175	自泌活动因子受体	人自泌活动因子受体mRNA	62	63
AB015631	II型膜蛋白克隆	人II型膜蛋白mRNA, 完整编码序列, 克隆: HP10390	64	65
Y00285	胰岛素-样生长因子II受体	人胰岛素-样生长因子II受体mRNA	66	67
U01160	SAS	人跨膜4超家族蛋白(SAS) mRNA, 完整编码序列	68	69
M33680	TAPA-1	人26-kDa细胞表面蛋白TAPA-1 mRNA, 完整编码序列	70	71
M16941	MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白β-链	人MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白β-链mRNA, 完整编码序列	72	73
J04599	骨小蛋白聚糖I	人编码骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖的hPGI mRNA,	74	75

	双糖链蛋白聚糖	完整编码序列		
Y07593	CAR	人46 kDa柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)蛋白mRNA	76	77
U73682	MEA11	人脑膜瘤-表达的抗原11(MEA11) mRNA, 部分编码序列	78	79
U19247	$\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链	人 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链基因, 外显子7和完整编码序列	80	81
X73079	多聚免疫球蛋白受体	人编码多聚免疫球蛋白受体	82	83
X80818	metabotropic 谷氨酸受体4型	人 metabotropic谷氨酸受体4型mRNA	84	85
AF037339	CLPTM1	人唇腭裂跨膜蛋白1(CLPTM1) mRNA, 完整编码序列	86	87
U10689	MAGE5a	人 MAGE-5a抗原(MAGE5a)基因, 完整编码序列	88	89
U03735	MAGE-3	人 MAGE-3抗原(MAGE-3)基因, 完整编码序列	90	91
M77481	MAGE-1	人 抗原(MAGE-1)基因, 完整编码序列	92	93
U10691	MAGE6	人 MAGE-6抗原(MAGE6)基因, 完整编码序列	94	95
L33930	CD24	人CD24信号转导蛋白mRNA, 完整编码序列和3'区域	96	97
M84349	CD59	人跨膜蛋白(CD59)基因, 外显子4	98	99
L00352	低密度脂蛋白受体	人低密度脂蛋白受体基因, 外显子18	100	101
AF023676	核纤层蛋白B受体同系物 TM7SF2	人核纤层蛋白B受体同系物 TM7SF2 (TM7SF2) mRNA, 完整编码序列	102	103
U41804	T1/ST2受体结合蛋白前体	人推定的T1/ST2受体结合蛋白前体mRNA, 完整编码序列	104	105
Y10148	NTR2受体	人NTR2受体mRNA	106	107
U46194	RAGE-4	人肾细胞癌抗原RAGE-4 mRNA, 完整的推定编码序列	108	109
M90683	HLA-G1	人淋巴细胞抗原(HLA-G1) mRNA, 完整编码序列	110	111
AF104942	MOAT-C	人ABC转运蛋白MOAT-C(MOAT-C) mRNA, 完整编码序列	112	113
AF042792	$\alpha 2 \delta$ 钙通道亚单位同种型I	人 $\alpha 2 \delta$ 钙通道亚单位同种型I mRNA, 完整编码序列	114	115
Y00636	LFA-3	人淋巴细胞功能相关抗原-3(LFA-3) mRNA	116	117
X59847	L1-CAM	人神经细胞粘附分子L1(HSNCAML1) mRNA	118	119
XM010168	AVPR2	精氨酸-加压素受体(AVPR2)		120
	C1 p115 C1	C1 p115		121
	TE2	ARD1 N-乙酰转移酶相关蛋白		122
	RbP	肾素结合蛋白		123
	HCF-1	宿主细胞因子1		124
	IRAK	白介素-1-受体相关激酶		125
D29963	CD151	人CD151 mRNA, 完整编码序列	126	127
M60922	表面抗原	人表面抗原mRNA, 完整编码序列	128	129
M29273	MAG	人髓鞘-相关糖蛋白(MAG) mRNA, 完整编码序列	130	131
U64871	GPR19	人推定的G蛋白-结合受体(GPR19)基因, 完整编码序列	132	133

L78132	Pcta-1	人前列腺癌肿瘤抗原(pcta-1) mRNA, 完整编码序列	134	135
U65011	PRAME	人优先表达的黑素瘤抗原(PRAME) mRNA, 完整编码序列	136	137
X81882	加压素活化的钙质转移受体-样蛋白	人加压素活化的钙质转移受体-样蛋白mRNA	138	139
U65416	MICB	人MHC I类分子(MICB)基因, 完整编码序列	140	141
Y12505	5-羟色胺受体5-HT4B	人5-羟色胺受体5-HT4B mRNA, 剪接变体	142	143
M38690	CD9	人CD9抗原mRNA, 完整编码序列	144	145
AF077820	LDL受体成员LR3	人LDL受体成员LR3 mRNA, 完整编码序列	146	147
U10688	MAGE-4b	人MAGE-4b抗原(MAGE4b)基因, 完整编码序列	148	149
AF068868	DR6	人TNFR-相关死亡受体-6(DR6) mRNA, 完整编码序列	150	151
D16532	极低密度脂蛋白受体	人极低密度脂蛋白受体基因, 外显子19	152	153
M81590	5-羟色胺1D受体(5-HT1D~)	人5-羟色胺1D受体(5-HT1D~) mRNA, 完整编码序列	154	155
M58286	肿瘤坏死因子受体	人肿瘤坏死因子受体mRNA, 完整编码序列	156	157
AF062006	HG38	人孤独G蛋白-结合受体HG38 mRNA, 完整编码序列	158	159
U09937	尿激酶型纤溶酶受体	人尿激酶型纤溶酶受体, 外显子7	160	161
M22092	N-CAM; 也称为NCAM1	人神经细胞粘附分子(N-CAM)基因, 外显子SEC和部分编码序列	162	163
M34641	FGF受体	人成纤维细胞生长因子(FGF)受体-1 mRNA, 完整编码序列	164	165
M14764	神经生长因子受体	人神经生长因子受体mRNA, 完整编码序列	166	167
U10694	MAGE-9	人MAGE-9抗原(MAGE9)基因, 完整编码序列	168	169
AB026891	胱氨酸/谷氨酸转运蛋白	人胱氨酸/谷氨酸转运蛋白mRNA, 完整编码序列	170	171
U73304	CB1大麻素受体(CNR1)	人CB1大麻素受体(CNR1)基因, 完整编码序列	172	173
M69245	PSG	人妊娠-特异性 $\beta$ -1糖蛋白(PSG) mRNA, 完整编码序列	174	175
AB000712	CPE受体	人CPE-受体的hCPE-R mRNA, 完整编码序列	176	177
AF011406	CRH2R	人促肾上腺皮质激素释放激素受体2型 $\beta$ 同种型(CRH2R) mRNA, 完整编码序列	178	179
U50410	OC15	人硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(OC15) mRNA, 完整编码序列	180	181
AF016266	TRAIL受体2	人TRAIL受体2 mRNA, 完整编码序列	182	183
U87947	HNMP-1	人造血神经膜蛋白(HNMP-1) mRNA, 完整编码序列	184	185
J03853	肾 $\alpha$ -2-肾上腺素	人肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体mRNA, 完整编码序列	186	187

	能受体			
U10686	MAGE11	人MAGE-11抗原(MAGE11)基因, 完整编码序列	188	189
U25988	PSG13'	人妊娠-特异性糖蛋白13(PSG13') mRNA, 完整编码序列	190	191
M60459	红细胞生成素受体	人红细胞生成素受体mRNA, 完整编码序列	192	193
X15998	硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1	人硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1剪接变体mRNA; 前体肽	194	195
U31216	mGlu1 $\beta$	人 metabotropic谷氨酸受体1 $\beta$ (mGluR1 $\beta$ ) mRNA, 完整编码序列	196	197
X94630	CD97	人CD97基因外显子1(和连接的编码序列)	198	199
M90657	L6	人肿瘤抗原(L6) mRNA, 完整编码序列	200	201
U87459	NY-ESO-1	人自身免疫原性癌症/睾丸抗原 NY-ESO-1 mRNA, 完整编码序列	202	203
S71824	N-CAM; 也称为 NCAM1	N-CAM=145kda神经细胞粘附分子[人, 小细胞肺癌细胞系 OS2-R, mRNA, 2960个核苷酸]	204	205
AE000659	T-细胞受体 $\alpha\delta$	人T-细胞受体 $\alpha\delta$ 基因座, 完整核苷酸序列的碱基250472至501670	206	207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222
M97639	Ror2	人跨膜受体(ror2) mRNA, 完整编码序列	223	224
M81830	SSTR2	人促生长素抑制素受体同种型2(SSTR2)基因, 完整编码序列	225	226
AF030339	VESPR	人病毒semaphorin蛋白受体(VESPR) mRNA, 完整编码序列	227	228
X02160	胰岛素受体前体	人胰岛素受体前体mRNA	229	230
U12255	IgG Fc受体	人IgG Fc受体hFcRn mRNA, 完整编码序列	231	232
X82068	谷氨酸受体亚单位GluRC	人谷氨酸受体亚单位GluRC mRNA	233	234
X75208	HEK2	人蛋白质酪氨酸激酶受体HEK2 mRNA	235	236
X64116	PVR	人脊髓灰质炎病毒受体的PVR基因(外显子1)	237	

		脊髓灰质炎病毒受体 $\gamma$		238
		脊髓灰质炎病毒受体 $\beta$		239
		脊髓灰质炎病毒受体 $\alpha$		240
M29540	CEA	人癌胚抗原mRNA(CEA), 完整编码序列	241	242
U94888	CC-趋化因子-结合受体JAB61	人 CC-趋化因子-结合受体JAB61 mRNA, 完整编码序列	243	244
M97675	Ror1	人跨膜受体(ror1) mRNA, 完整编码序列	245	246
M12036	HER2	人酪氨酸激酶-型受体(HER2)基因, 部分编码序列	247	248
U87460	推定的B-型内皮肽受体-样蛋白	人推定的B-型内皮肽受体-样蛋白mRNA, 完整编码序列	249	250
L20852	GLVR2	人白血病病毒受体2(GLVR2) mRNA, 完整编码序列	251	252
L05424		人细胞表面糖蛋白CD44(CD44)基因, 长尾同种型的3'末端	253	254
M59040	CD44	人细胞粘附分子(CD44) mRNA, 完整编码序列	255	256
U83993	P2X4嘌呤受体	人P2X4嘌呤受体 mRNA, 完整编码序列	257	258
XM_015664	类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的FLJ22357	人类类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357(FLJ22357) mRNA	261	262
NM_022450		人类类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357(FLJ22357) mRNA	259	260
M84562	FPRL1	人甲酰基肽受体-样受体(FPRL1) mRNA, 完整编码序列	263	264
M34309	HER3	人表皮生长因子受体(HER3) mRNA, 完整编码序列	265	266
M83664	HLA-DP	人MHC II类淋巴细胞抗原(HLA-DP) $\beta$ 链mRNA, 完整编码序列	267	268
AF025998	心房利钠肽清除受体	人心房利钠肽清除受体(ANPRC) mRNA, 完整编码序列	269	270
XM_006034	胃泌素/CCK-B受体	人缩胆囊肽B受体(CCKBR), mRNA	271	272
M73482	神经调节肽B受体	人神经调节肽B受体(NMB-R) mRNA, 完整编码序列	273	274
NM_001496	GFRA3	人GDNF家族受体 $\alpha$ 3(GFRA3), mRNA	275	276
XM_010317	GRPR	人胃泌素-释放肽受体(GRPR), mRNA	277	278
U92459	Metabotropic 谷氨酸受体8; 也称GRM8或GluR8	人metabotropic谷氨酸受体8(GluR8) mRNA, 完整编码序列; GRM8	279	280
XM_007840	CDH1	人钙粘蛋白1, 1型, E-钙粘蛋白(上皮)(CDH1), mRNA	281	282
XM_016157	CDH2	人钙粘蛋白2, 1型, N-钙粘蛋白(神经元)(CDH2), mRNA	283	284
XM_005591	TGFBR1	人转化生长因子, $\beta$ 受体I(II型活化素A受体-样激酶, 53kD)(TGFBR1), mRNA	285	286
XM_003094	TGFBR2	人转化生长因子, $\beta$ 受体II(70-80kD)(TGFBR2), mRNA	287	288
XM_001924	TGFBR3	人转化生长因子, $\beta$ 受体III( $\beta$ 聚糖, 300kD)(TGFBR3),	289	290

		mRNA		
NM_000875	IGF1R	人胰岛素-样生长因子1受体(IGF1R), mRNA	291	292
X00588	表皮生长因子受体前体	人表皮生长因子受体前体mRNA	293	294
Z75190	LRP8	人载脂蛋白E受体2(APOER2), 也称为LRP8; mRNA	295	296
U62434	CHRNA5	烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha$ 5亚单位(CHRNA5); mRNA	297	298
U19878	TMEFF1	具有EGF-样和两个follastatin-样结构域1的跨膜蛋白(TMEFF1); mRNA	299	300
L20814	GRIA2; 也称为GluR2	人谷氨酸受体2(HBGR2); 也称为GluR2或GRIA2; 完整编码序列	301	302
AL008583	NPTXR	神经元正五聚蛋白受体(NPTXR); DNA序列	303	304

甚至更优选本发明的细胞表面分子是属于下列组之一的受体:

受体酪氨酸激酶成员

整联蛋白家族成员

5 免疫球蛋白超家族粘附分子成员

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族成员

硫酸软骨素蛋白聚糖家族成员

MAGE家族成员

RAGE家族成员

10 低密度脂蛋白受体家族成员

钙粘蛋白粘附分子成员

metabotropic谷氨酸受体成员

类固醇激素家族成员

7跨膜受体家族成员

15 心房利钠肽清除受体

GFRA3

运铁蛋白受体

丝氨酸/苏氨酸激酶受体成员

20 本发明更优选的细胞表面分子是选自NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1的细胞表面分子。

在本发明的一个优选实施方案中，细胞表面分子能通过结合内化特异性结合配对物(参见上文)。本发明优选的、能内化结合配对物的细胞表面分子选自NCAM1, NPTXR, LRP8和CHRNA5。

在本发明的另一个优选实施方案中，细胞表面分子不能内化其特异性结合配对物。本发明优选的、不能内化结合配对物的细胞表面分子可选自GRIA2, GRM8, ITGAV和ITGAE。

本发明的一个特别优选的细胞表面分子是NCAM1(NCAM, 神经细胞粘附分子, N-CAM, CD56)。NCAM1在大多数SCLC中被高表达。通过例如芯片分析, RT-PCR和Western印迹已证实NCAM1的表达(见实施例1, 图11和图15)。NCAM1能内化结合配对物。下文将描述能与NCAM1结合的结合配对物。已证实NCAM1能被内化至星形细胞(Minana等,2001), 并能很有效地内化由抗-NCAM1抗体-A蛋白-链霉亲和素-生物素- $\beta$ -半乳糖苷酶组成的很大的分子复合物(Yu等, 2000)。

本发明另一个优选细胞表面分子是NPTXR(神经元正五聚蛋白(pentraxin)受体, NPR)。大多数SCLC都表达NPTXR。已通过例如芯片分析, RT-PCR和Western印迹证实NPTXR的表达(见实施例1, 图10和图14)。NPTXR是高内化受体。下文将描述能与NPTXR结合的结合配对物。

本发明另一个优选细胞表面分子是LRP8(低密度脂蛋白受体相关蛋白, 载脂蛋白E受体2)。所有被检测的SCLC中都表达LRP8。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明LRP8的表达(见实施例1和图9)。LRP8是高内化受体。下文将描述能与LRP8结合的结合配对物。

本发明另一个优选细胞表面分子是CHRNA5(烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha$ 5亚单位)。下文将描述能与CHRNA5结合的结合配对物。

另一个可用于本发明的细胞表面分子是L1CAM(神经细胞粘附分子L1)。已知L1能内化结合配对物。下文将描述能与L1CAM结合的结合配对物。

本发明另一个优选细胞表面分子是TNFRSF12(DR6, 肿瘤坏死因子受体超家族成员21)。大多数SCLC中都表达TNFRSF12。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明TNFRSF12的表达(见实施例1和图8)。TNFRSF12所属家族的其他成员能内化结合配对物。

本发明特别优选的细胞表面分子是GRIA2(离子化谷氨酸受体2, GLUR2, GLURB, HBGR2, AMPA2)。所有被检测的SCLC和脑中表达GRIA2。

GRIA2是脑外部的高特异性SCLC受体。已通过例如芯片分析，RT-PCR和Western印迹阐明GRIA2的表达(见实施例1，图12A和图16)。

5 本发明另一个优选的细胞表面分子是GRM8(metabotropic谷氨酸8受体，GLUR8，mGlu8，GPRC1H)。GRM8在除脑以外的SCLC中高度特异性表达，并在大多数SCLC中表达。已通过例如芯片分析，RT-PCR和Western印迹阐明GRM8的表达(见实施例1和图13)。下文将描述能与GRM8结合的结合配对物。

10 本发明另一个优选的细胞表面分子是ITGAV(整联蛋白亚单位 $\alpha_v$ ，玻连蛋白受体，CD51)。SCLC高表达ITGAV。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明表达(见实施例1和图12B)。

本发明另一个优选的细胞表面分子是ITGAE(整联蛋白 $\alpha_E$ 亚单位-前体，人粘膜淋巴细胞-1'抗原，CD103)。所有被检测的SCLC都表达ITGAE，SCLC高特异性表达ITGAE。已通过例如芯片分析和Western印迹阐明表达(见实施例1和图17)。

15 本发明另一个优选的细胞表面分子是GPR49(孤独G蛋白-结合受体67，GPR67，HG38)。

本发明另一个优选的细胞表面分子是TMEFF1(具有EGF-样和2个follastatin-样结构域的跨膜蛋白)。

20 然而，本发明还涉及含有片段的细胞表面分子，所述片段由表2所示核苷酸序列的片段编码。在一个优选实施方案中，本发明涉及由这些序列的剪接变体编码的细胞表面分子，所述序列由相同基因编码。表2所示细胞表面分子的剪接变体可编码与所述细胞表面分子共享片段的多肽序列；然而，剪接变体可利用可选择的阅读框，使得尽管两个剪接变体的产物由享有共同片段的核苷酸序列编码，但多肽序列却不相关。

25 另外，本发明涉及编码表2所示细胞表面分子的核苷酸序列的片段。特别是，本发明的结合配对物(见下文)仅与本发明细胞表面分子的一个或多个片段结合，但优选不与细胞表面分子的所有片段结合。因此，可以使用细胞表面分子的片段来鉴定潜在的结合配对物(见下文)。

30 例如，所述片段含有5'方向上的一半序列或3'方向上的一半序列。另外，片段可含有5'方向上的一半序列的片段或3'方向上的一半序列的片段。优选所述片段短于5000bp，如短于4000bp，如短于3000bp，如短于2500bp，如

短于2000bp, 如短于1750bp, 如短于1500bp, 如短于1250bp, 如短于1000bp, 如短于900bp, 如短于800bp, 如短于700bp, 如短于600bp, 如短于500bp, 如短于400bp, 如短于300bp, 如短于200bp, 如短于100bp, 如短于75bp, 如短于50bp, 如短于40bp, 如短于30bp, 如短于25bp, 如短于20bp, 如短于18bp。

所述片段可以是内部片段, 或可含有5'或3'末端。

在本发明的一个优选实施方案中, 片段含有多个预定长度的构件 (building block), 其中构件被连接起来, 使得片段与天然基因序列, 优选为表2所示序列的一部分相同。因此, 片段可含有多个预定长度和预定起点的构件。

所述构件是核酸序列, 它们具有预定的长度和起点, 使得第一个构件在核酸序列中的给定位置起始, 随后的构件在前一个构件起始位置之后的位置处起始。

优选构件衍生自下述任一个序列: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, 29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:170,

SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:206, 5 SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:267, SEQ ID 10 NO:269, SEQ ID NO:271, SEQ ID NO:273, SEQ ID NO:275, SEQ ID NO:277, SEQ ID NO:279, SEQ ID NO:281, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:287, SEQ ID NO:289, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:295, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:299, SEQ ID NO:301和 SEQ ID NO:303。

15 优选每个构件短于1000bp, 如短于900bp, 如短于800bp, 如短于700bp, 如短于600bp, 如短于500bp, 如短于400bp, 如短于300bp, 如短于200bp, 如短于100bp, 如短于75bp, 如短于50bp, 如短于40bp, 如短于30bp, 如短于25bp, 如短于20bp, 如短于18bp。在一个实施方案中, 构件约为18bp。

20 构件可起始于第1位, 如第2位, 第3位, 第4位, 第5位, 第6位, 第7位, 第8位, 第9位, 第10位, 第11位, 第12位, 第13位, 第14位, 第15位, 第16位, 第17位, 第18位, 第19位, 第20位, 如第20至100位中的任一位置, 如表2所示任一序列中的第100位。

优选片段含有多个构件, 如2个, 3个, 4个, 5个, 5至10个, 10至20个, 20至30个, 30至40个, 40至50个, 50至75个, 75至100个, 100以上构件。

在一个实施方案中, 片段含有100个碱基对长, 且在第1位起始的构件。

25 另外, 本发明细胞表面分子的片段可以是嵌合片段, 该嵌合片段含有一个以上彼此不结合的根据表2所示序列的片段。所述嵌合片段可含有得自相同细胞表面分子的片段, 或者它们可含有得自一个以上本发明细胞表面分子的片段。

30 另外, 本发明涉及根据表2的细胞表面分子多肽序列的片段。特别是, 本发明的结合配对物(见下文)仅与本发明细胞表面分子的一个或多个片段

结合，但优选不与细胞表面分子的所有片段结合。因此，可以使用细胞表面分子的片段来鉴定潜在的结合配对物(见下文)。

多肽序列的片段可短于3000个氨基酸，如短于2500个氨基酸，如短于2000个氨基酸，如短于1750个氨基酸，如短于1500个氨基酸，如短于1250  
5 个氨基酸，如短于1000个氨基酸，如短于900个氨基酸，如短于800个氨基酸，如短于700个氨基酸，如短于600个氨基酸，如短于500个氨基酸，如短于400个氨基酸，如短于300个氨基酸，如短于200个氨基酸，如短于100个氨基酸，如短于75个氨基酸，如短于50个氨基酸，如短于40个氨基酸，如短于30个氨基酸，如短于25个氨基酸，如短于20个氨基酸，如短于15个氨  
10 基酸，如短于10个氨基酸。

优选片段是下述多肽序列的片段：SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34,  
15 SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ  
20 ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123,  
25 SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:163, SEQ ID  
30 NO:165, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:181, SEQ ID

NO:183, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:191,  
SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:199, SEQ ID  
NO:201, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208,  
SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID  
5 NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215, SEQ ID NO:216, SEQ ID NO:217,  
SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID  
NO:222, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230,  
SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:238, SEQ ID  
NO:240, SEQ ID NO:242和SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:248,  
10 SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:256, SEQ ID  
NO:258, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:266,  
SEQ ID NO:268, SEQ ID NO:270, SEQ ID NO:272, SEQ ID NO:274, SEQ ID  
NO:276, SEQ ID NO:278, SEQ ID NO:280, SEQ ID NO:282, SEQ ID NO:284,  
SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:288, SEQ ID NO:290, SEQ ID NO:292, SEQ ID  
15 NO:294, SEQ ID NO:296, SEQ ID NO:298, SEQ ID NO:300, SEQ ID NO:302  
和SEQ ID NO:304。另外,本发明细胞表面分子内也可包含多肽序列片段的功能同系物,或者细胞表面分子可由多肽序列片段的功能同系物组成。下文将定义功能同系物。

本发明特别优选的细胞表面分子片段是含有一个或多个细胞表面分子  
20 胞外结构域的片段。另外,含有胞外结构域的一部分的片段也是本发明范围内的优选片段。最优选本发明细胞表面分子的片段是含有一个或多个胞外结构域,且能内化对所述片段具有亲和性的结合配对物的片段。

在一个实施方案中,片段含有胞外结构域或其片段或其衍生物,其中  
所述胞外结构域选自由下述核苷酸序列编码的多肽序列:SEQ ID NO:3的核  
25 苷酸1014至2450,SEQ ID NO:15的核苷酸216至3179,SEQ ID NO:31的核  
苷酸147至2999,SEQ ID NO:52的核苷酸419至4120,SEQ ID NO:66的核苷  
酸268至7059,SEQ ID NO:82的核苷酸235至2094,SEQ ID NO:104的核苷  
酸160至663,SEQ ID NO:204的核苷酸301至2250,SEQ ID NO:229的核苷  
酸130至2880,SEQ ID NO:281的核苷酸569至2152,SEQ ID NO:283的核苷  
30 酸585至1901,SEQ ID NO:291的核苷酸121至2836和SEQ ID NO:293的核苷  
酸259至2127。

上文所述的细胞表面分子和细胞表面分子片段可进一步含有翻译后修饰。翻译后修饰的例子是磷酸化、糖基化、乙酰化、甲基化、硫酸酯化、多聚唾液酸化、法尼基化、豆蔻酰化或棕榈基化。

5 本发明还包括表2所述细胞表面分子的功能同系物。表2也列出了编码  
本发明优选细胞表面分子的多肽序列的SEQ ID NO。本发明细胞表面分子的功能同系物是能与本发明的结合配对物结合，且优选能内化所述结合配对物的细胞表面分子。

### 启动子

10 本发明范围内的启动子是第一核酸序列，它能介导与之可操作相连的  
第二核酸序列的表达。所述第一核酸序列一般位于被转录核酸序列的染色体上游。

在一个实施方案中，与第二核酸序列可操作相连的第一核酸序列优选含有至少15,000个碱基对，所述碱基对在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游。然而，与第二核酸序列可操作相连的所述第一核酸  
15 序列也可含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的  
至少12,500，如至少10,000，如至少8,000，如至少6,000，如至少5,000，如  
至少4,000，如至少3,000，如至少2,500，如至少2,000，如至少1,500，如至  
少1,000，如至少500，如至少400，如至少300，如至少200，如至少150，如  
至少100，如至少50，如至少25，如至少10个碱基对，或者含有任何所述序  
20 列的能介导基因表达的片段。

另外，在另一个实施方案中，与第二核酸序列可操作相连的第一核酸  
序列优选含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的  
高达10个，如高达100个，如高达500个，如高达1000个，如高达2500个，  
如高达5000个碱基对，或其能介导基因表达的片段。

25 在本发明的范围内，与第二核酸序列可操作相连的第一核酸序列可含  
有一个或多个在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的  
内含子序列或其片段。另外，与第二核酸序列可操作相连的第一核酸序列  
可含有一个或多个在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子下  
游的内含子序列或其片段。

与第二核酸序列可操作相连的第一核酸序列可进一步含有增强子序列，所述序列在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游或下游15,000个碱基对以外的位置。

上述与第二核酸序列可操作相连的第一核酸序列也可含有核酸缺失和/或添加。缺失和/或添加可以发生在核酸序列内部或末端。

因此，从含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的例如高达1000，如高达2500，如高达5000，如高达7500，如高达10,000，如高达15,000，如高达20,000个碱基对的第一核酸序列中，可缺失至少10个内部碱基对(bp)，如至少25个内部bp，如至少50个内部bp，如至少100个内部bp，如200个内部bp，如至少300个内部bp，如至少400个内部bp，如至少500个内部bp，如至少750个内部bp，如至少1000个内部bp，如至少1250，如至少1500，如至少1750，如至少2000，如至少2500，如至少3000，如至少3500，如至少4000，如至少4500个内部碱基对。

特定的核酸序列比其它核酸序列更适于缺失。例如，可以缺失抑制表达的序列或不会改变与之可操作相连的第二核酸序列表达的序列。因此，本发明还包括缺失了至少一个沉默子的、与第二核酸序列可操作相连的第一核酸序列，所述第一核酸序列含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的高达1000，如高达2500，如高达5000，如高达7500，如高达10,000，如高达15,000，如高达20,000个碱基对。

第一核酸序列也可以含有一个以上的缺失，如2个，3个，4个，5个，5个以上的缺失。

另外，从含有在染色体上位于所述第二核酸序列的翻译起始密码子上游的例如高达20,000，如高达15,000，如高达10,000，如高达7500，如高达5000，如高达2500，如高达1000个碱基对的第一核酸序列中，可在任一末端缺失至少10，如至少25，如至少50，如至少100，如200，如至少300，如至少400，如至少500，如至少750，如至少1000，如至少1250，如至少1500，如至少1750，如至少2000，如至少2500，如至少3000，如至少3500，如至少4000，如至少4500个碱基对。

也可在末端或内部添加核酸序列。第一核酸序列可含有一个以上的添加，例如2个，如3个，4个，5个，5个以上的添加。可以添加至少10，如至少25，如至少50，如至少100，如200，如至少300，如至少400，如至少500，

如至少750, 如至少1000, 如至少1250, 如至少1500, 如至少1750, 如至少2000, 如至少2500, 如至少3000, 如至少3500, 如至少4000, 如至少4500, 如4500个以上的碱基对。

例如, 可以添加能改变第一核酸序列功能的核酸序列。例如, 可以添加能被特定转录因子识别的核酸序列。例如, 能被核类固醇激素受体识别的核酸序列。

表3和4给出了优选的第一核酸序列的例子。本发明还包括这些核酸序列的如下文所述的功能同系物以及如上文所述的缺失和/或添加突变体。

表3 以2001年5月10日版Blast数据库中登录号表示的第一核酸序列

10

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs>)

编号	登录号	染色体	区域	碱基
pro4	J05614	20	<u>NT_011387.3</u> -	4.073.925-4.125.777
pro12	AF059531	11	<u>NT_009107.3</u> +	16.582.000-16.639.000
pro17	AA913812	1	<u>NT_004705.3</u> +	145.236.000-145.282.000
pro18	W25866	1	<u>NT_004705.3</u> +	145.240.856-145.281.103
pro28	W74442	15	<u>NT_010356.3</u> -	87.186.215-87.226.899
pro37	U63743	1	<u>NT_004808.3</u> -	73.601.528-73.642.295

pro49	AA203476	4	<u>NT 006291.3</u> +	46.964.650-47.005.368
		8	<u>NT 008166.3</u> +	66.825.152-66.865.799
pro53	M15205	17	<u>NT 024874.3</u> ?	78.209.000-78.266.000
pro55	Z95118	6	NT_007577	
pro62	AL050306	X	<u>NT 011553</u>	
		11	<u>NT 025842</u>	
pro73	U18271	12	<u>NT 009681.3</u> +	103.894.000-103.940.000
pro74	U03735	X	<u>NT 011534.1</u> +	138.253.000-138.770.000
pro76	U89387	2	<u>NT 005409.3</u> -	130.026.000-130.083.000
pro77	U10689	X	<u>NT 011726.3</u> ?	137.038.000-137.108.000
pro83	AI553745	5	<u>NT 023270.3</u> -	177.081.000-177.128.000
pro86	L18877	X	<u>NT 011534.1</u> +	138.233.000-138.771.000
pro87	U10691	X	<u>NT 011534.1</u> +	138.233.000-138.770.000
pro89	L18920	X	<u>NT 011534.1</u> +	138.233.000-138.770.000
pro91	N23137	12	<u>NT 009464.3</u> +	132.284.168-132.324.678
pro93	W28479	13	<u>NT 024495.3</u> +	87.871.068-87.891.259
pro97	AF053305	6	<u>NT 007592.3</u> +	37.167.152-37.207.246
		12	<u>NT 009782.3</u> +	53.429.369-53.469.399
pro103	U77949	17	<u>NT 024901.3</u> -	40.905.000-40.968.000
pro112	AL021546	12	<u>NT 009775</u>	

pro120	M31315	5	NT 023188.3 ?	176.642.000-176.692.000
pro121	D26488	1	NT 004680.3 +	214.431.387-214.471.483
pro122	AL021366	6	NT 007592.3 +	31.000.000-38.000.000
pro123	N58115	2	NT 005343.3 -	184.162.000-184.223.000
pro129	AL031427	1	NT 004424	
pro139	Y13115	8	NT 008176.3 -	39.029.000-39.073.000
pro142	AA151922	17	NT 010711.3 -	73.365.739-73.406.421
pro153	U07563	9	NT 008338	
pro154	W26762	1	NT 019273.3 -	115.514.000-115.557.000
pro156	AI950382	17	NT 010641.3 +	77.160.000-77.208.000
pro161	M21259	1	NT 004662.3 +	175.106.661-175.147.391
pro163	U75285	17	NT 024874	
pro166	AA926957	5	NT 016864.3 +	52.120.104-52.140.918
		17	NT 010692.3 +	1.029.000-1.077.000
pro171	M90354	13	NT 024495.3 +	89.323.836-89.365.575
pro172	AA143321	18	NT 010934.3 -	35.186.000-35.241.000
pro176	AA181196	13	NT 009799.3 +	49.703.000-49.752.000
pro178	AB002359	15	NT 010364.3 -	19.619.949-19.660.316
pro183	U13695	2	NT 022197.3 -	197.599.000-197.820.000

pro184	U65011	22	<u>NT 011520.5</u> +	18.956.000-19.011.000
pro194	AF091754	1	<u>NT 004734.3</u> +	233.039.886-233.081.072
pro198	AL049842	13	<u>NT 009910</u>	
pro202	AA810792	12	<u>NT 009464.3</u> +	132.288.241-132.328.844
pro210	L37747	5	<u>NT 023326.1</u> -	122.981.845-123.022.988
pro212	Z36714	2	<u>NT 005370.3</u> -	212.774.647-212.814.782
pro216	X06745	X	<u>NT 011821.1</u> ?	21.110.482-21.151.898
pro225	T75292	4	<u>NT 006088.3</u> +	82.210.258-82.250.894
pro228	U38979	1	<u>NT 021930.3</u> +	97.904.873-97.945.550
pro229	AL031778	6	<u>NT 016968</u>	
pro230	AA044787	5	<u>NT 006964.3</u> -	154.054.000-154.122.000
pro232	M77481	X	<u>NT 011534.1</u> +	138.236.000-138.766.000
pro234	AL021397	1	<u>NT 004668</u>	
pro239	AA595596	1	<u>NT 004668</u>	
pro240	W25874	4	<u>NT 006088.3</u> +	82.210.000-82.256.000
pro241	AC004774	7	<u>NT 007816</u>	
Pro245	AF006010	8	<u>NT 007978.3</u> -	104.966.000-105.280.000

pro254	AA733050	1	NT 004662.3 +	175.107.000-175.116.000
pro260	AF094481	3	NT 005791.3 -	84.866.000-84.938.000
pro268	L16991	5	NT 023126.3 -	20.814.448-20.854.499
pro273	AC004770	11	NT 004686: 11q12	64224936-64225035
pro280	AI985964	21	NT 011514.4 -	43.166.000-43.211.000
pro284	AA926959	5	NT 006687.3 -	48.821.840-48.862.512
pro292	U28386	4	NT 006109.2 -	: 89.638.000-89.682.000
pro299	AI087268	6	NT 007193.3 +	38.723.000-38.783.000
pro302	AF014837	14	NT 019583.3 +	18.376.000-18.432.000
pro303	AI570572	22	NT 011520.5 +	33.485.000-33.531.000
pro304	L17131	2	NT 005428.3 -	76.252.000-76.295.000
pro306	AI740522	6	NT 007234.3 -	128.840.581-128.881.528
pro328	M15796	X	NT 011568.3 -	33.655.000-33.706.000
		20	NT 011387.3 -	4.068.000-4.115.000
pro329	D00596	18	NT 011005.3 +	849.000.000-872.000.000
pro331	W27939	12	NT 009785.3 ?	49.701.000-49.745.000
pro338	AA768912	10	NT 008609.3 -	26.001.705-26.042.334
pro341	AA877215	1	NT 019273.3 -	114.182.965-114.223.575

5

10

		13	NT 009952.3 +	98.753.071-98.793.770
pro344	X16277	2	NT 005380.3 +	10.809.000-10.860.000
pro347	AI032612	1	NT 019269.3 -	41.189.000-41.265.000
pro348	AI032612	12	NT 024394.3 -	101.992.000-102.107.000
pro352	AI525633	12	NT 009785.3 ?	49.699.479-49.740.007
pro358	N95406	7	NT 007816.3 ?	96.997.000-97.064.000
pro361	AA255502	6	NT 007592.3 +	28.000.000-32.000.000

15

表4 以2000年12月12日组装的人类基因组浏览器中的登录号表示的第一核酸序列

20

编号	登录号	染色体	带	碱基
pro1	M87338	7	7q11.22	67380990-67396543
pro2	U73379	20	20q13.11	46319851-46338917
pro3	X05360	10	10q21.2	64194062-64211044
pro5	M25753	5	5q23.2	137604120-137622654
		5	5q22.2	121662724-121679510
		5	5q13.1	73649568-73666303
pro6	M74558	1	1p33	52577823-52592535
pro7	D38073	6	6p12.2	56968405-56986831
pro8	AF015254	17	17p12	9089031-9106502
pro9	J03626	3	3q21.2	135784683-135799798
pro10	U74612	12	12p13.33	3074066-3089514
pro13	D63880	12	12p13.31	6903002-6917288
pro14	D14657	15	15q22.2	60215632-60231472
pro15	AB024704	20	20q11.21	31872458-31887490

pro16	AI375913 (J04088)	17	17q21.2	42673095-42689004
pro19	U37428	10	10q23.33	99600001-99623479
pro20	AF098162	12	12q13.3	58470993-58506578
pro21	X74330	12	12q13.3	58801599-58817157
pro22	L47276	17	17q21.2	42703746-42719695
pro23	L25876	14	14q22.2	50958791-50974988
pro24	U65410	4	4q26	126153161-126168416
pro25	X13293	20	20q12	44147604-44164046
pro26	X51688	4	4q26	128042847-128058218
pro27	AL080146	15	15q22.1	55104198-55120101
pro29	D88357	10	10q21.2	64199199-64214445
pro30	D26361	1	1q32.1	224035414-224051265
pro31	D14678	6	6p21.31	36374334-36389597
pro32	AF011468	20	20q13.2	36644429-36659811
				58763968-58779170
pro34	AB019987	3	3q25.33	175620714-175635845
pro36	AF053306	15	15q15.1	35625667-35641196
pro38	AF032862	5	5q34	178469476-178486752
pro39	U01038	16	16p21.1	28930379-28945875
pro40	D13633	14	14q22.3	29043898-29059035
				51960394-51975921
pro41	AJ000186	4	4q26	126153146-126168525
pro42	D26018	11	11q13.4	79445361-79460511
pro43	X02308	18	18p11.32	931580-947280
pro44	AF016371	1	1p34.1	47366616-47382271
pro45	U05340	1	1p34.1	48138801-48153800
pro46	D80008	20	20p11.21	27258467-27274295
pro47	AB000449	14	14q32.2	96123633-96139456
pro48	AF017790	18	18p11.32	2615001-2630207
pro50	X51688	4	4q26	128041767-128057590
pro51	AF081280	10	10q24.32	109292185-109308954
pro52	M86699	6	6q14.1	85882001-85897200
pro54	X74794	8	8q11.22	50261007-50276309
pro56	AB006624	12	12q13.3	59174501-59189500
pro57	L38933	17	17q21.2	45056497-45072182
pro58	AB018334	5	5p13.2	40319301-40338000
pro59	AF091433	8	8q22.1	98382913-98396920
pro60	Z29066	1	1q32.3	237405001-237420000
pro61	D79988	12	12q24.31	133269001-133284000
				133230501-133245500

pro63	AL050151	8	8q24.3	143930884-143952036
pro64	D79997	9	9p13.2	39124660-39148000
pro65	L07541	13	13q13.1	32415001-32433000
pro66	U37139	1	1p31.3	71792205-71807237
pro67	Y00272	10	10q21.2	64194599-64211207
pro68	D90070	18	18q21.32	62061499-62077998
pro69	U14518	2	2p23.3	26821351-26836883
pro70	X87843	14	14q23.1	57525402-57541401
pro71	U26727	9	9p21.3	23824001-23840000
pro72	X52142	1	1q42.12	251569001-251584900
pro75	L48692	2	2p13.3	69512098-69527598
pro78	L31801	1	1p13.2	124826201-124843002
				124490069-124506743
pro79	U15552	1	1p22.1	105019659-105034740
pro80	AF039652	17	17p11.2	20094899-20110488
pro81	U79266	11	11q13.2	67334001-67349000
pro82	X92106	17	17q11.2	31700001-31715000
pro84	L07540	12	12q24.23	126266001-126283000
pro85	U76638	2	2q35	219994976-220010675
pro88	L34600	2	2p16.1	56591445-56606916
pro90	D83781	11	11p11.2	48298842-48316506
pro92	X59618	X	Xp11.3	41625001-41640000
pro94	U73704	1	1p22.1	102963001-102978500
pro95	D50923	1	1q42.13	256927030-256942117
pro96	M85085	X	Xq22.1	100331001-100346000
pro98	AF025840	14	14q21.3	46340081-46355371
pro99	AF029670	17	17q23.2	63449001-63464000
pro100	AF070559	13	13q33.1	106141001-106156500
pro101	S78085	6	6q27	180902275-180917523
pro104	U39817	15	15q26.1	87983001-87998000
pro105	L23959	13	13q34	116658001-116673000
pro106	X77743	2	2q24.1	160044918-160062017
pro107	U10564	11	11p15.3	9127192-9142201
pro108	AB028069	7	7q21.12	88435001-88450000
pro109	AF053977	5	5q31.1	150402501-150422204
pro110	U09087	12	12q23.1	104568858-104585221
pro111	AF073362	11	11q21	101407914-101423315
pro113	L49054	3	3q25.32	173904528-173934748
pro114	X04327	7	7q33	139307570-139325937
pro115	AF074723	14	14q24.2	68654211-68669417
pro116	AF091092	1	1p32.3	58583305-58598434

pro117	AF058918	19	19q13.43	70037301-70052300
pro118	AF025441	15	15q15.1	36875108-36890661
pro119	AJ006591	4	4q31.1	148771298-148786657
pro124	L36529	18	18p11.32	254219-270019
pro125	X65550	10	10q26.2	138240294-138255077
pro126	M34065	5	5q31.2	150756331-150771379
pro127	L02547	20	20q13.2	58756755-58772000
pro128	U00238	4	4q12	59266501-59283500
pro130	L42450	2	2q31.1	176199115-176214588
pro131	X98253	X	Xq24	122031634-122047863
pro133	U58970	20	20q12	45447501-45463000
pro134	AF077953	18	18q21.1	47833501-47849000
pro135	J00140	5	5q14.1	86483185-86498573
		18	18q11.2	25676581-25692180
pro136	M74093	19	19q12	34192227-34207465
pro137	AF029669	17	17q23.1	63211106-63252789
pro138	AL050019	1	1p36.33	52302-67336
pro140	M68520	12	12q13.2	57983277-57998212
pro141	Y13467	17	17q12	41583543-41598142
pro143	U64805	17	17q21.31	45619001-45639000
pro144	U78082	14	14q24.2	68653184-68668183
pro145	Y15164	X	Xp22.22	13061501-13076500
pro146	AF008442	6	6p21.1	47871392-47886807
pro147	X16901	13	13q14.13	43972520-43990027
pro148	U06632	17	17q23.1	61863000-61878839
pro149	D26069	3	3q29	215253329-215270320
pro150	AF027150	14	14q21.1	35344279-35359894
pro152	D13413	3	3q29	211580067-211591811
pro155	L20320	5	5q13.1	73642669-73657817
pro157	AJ223728	22	22q11.21	16393966-16409005
pro158	AB023215	14	14q24.3	74118287-74135032
pro159	D32002	9	9q22.33	98867915-98884079
pro160	Y18046	6	6q27	177044740-177060727
pro162	U27459	2	2q33.2	206003518-206019965
pro164	D86322	4	4q31.1	147998675-148013849
pro165	Z46376	2	2p12	75788712-75806284
pro167	AF003540	11	11p15.5	2576355-2591604
pro168	D38553	2	2q11.1	94745291-94760990
pro169	M60725	17	17q23.2	64866487-64881241
pro173	L34673	3	3q24	162499055-162515000
pro174	U93867	1	1q21.1	162966980-162983139

pro175	U44754	14	14q23.1	58567756-58582473
pro177	AL050405	X	Xq26.1	132444071-132459420
pro179	U18937	5	5q31.3	153395323-153411137
pro180	X76388	4	4q31.21	152639006-152654005
pro181	AF038662	3	3q13.32	129394716-129409918
pro182	AF042169	10	10q22.1	74034210-74049959
pro185	U07804	20	20q12	41507121-41523513
pro187	M97388	1	1p22.1	104042438-104058335
pro189	L35546	1	1p22.1	104986774-105006727
pro191	AB007962	1	1q21.3	170103257-170119230
pro193	AF006259	12	12p13.22	4781441-4796771
pro195	X78627	2	2q14.3	123494635-123511228
pro196	M62810	10	10q21.1	61677452-61693234
pro197	AL080116	6	6q15	94998657-95013656
pro199	U79256	10	10q24.1	104501013-104516982
pro201	AL080088	16	16p13.2	11860550-11875029
pro203	M27878	12	12q24.33	144471103-144484312
pro204	AF091090	1	1p22.2	99597586-99612101
pro205	AF067656	10	10q21.1	59448924-59463923
pro206	U03911	2	2p16.3	48415852-48431851
pro207	U61145	7	7q36.1	155082360-155098279
pro208	D78335	1	1q23.3	187227102-187243552
pro209	U30872	1	1q41	240503771-240519770
pro211	U97188	7	7p15.3	23230613-23248257
		6	6q27	176760451-176776177
pro213	D38550	6	6p22.3	22232782-22247803
pro215	X15331	X	Xq22.3	108009046-108024961
pro217	D87448	3	3q22.1	146018136-146033999
pro219	U31556	8	8q21.3	88467142-88482808
pro220	X66113	1	1p36.22	11562849-11578096
pro221	M93119	20	20p11.23	21882614-21898000
pro222	AB020670	18	18q23	83636442-83651891
pro223	AF000430	12	12p11.21	33646020-33661381
pro224	U73960	7	7p21.3	11968001-11983000
pro226	X76029	4	4q12	58426181-58442374
pro227	AF063020	9	9p22.3	16919890-16934979
pro231	AJ132440	1	1q32.1	226438005-226453537
pro233	AB024401	13	13q34	113595323-113611692
pro235	AL049266	2	2q32.1	190196543-190212071
pro236	AB014550	18	18p11.32	2784040-2799481
pro237	X78932	7	7q11.21	64013301-64028356

pro238	U22377	1	1p34.2	44683920-44699429
pro242	L16782	10	10q23.31	96533196-96548690
pro243	AJ001810	16	16q12.2	63707495-63722576
pro244	U16028	2	2q31.1	178830447-178845919
pro246	L08424	12	12q23.2	109949544-109964900
pro247	U07559	5	5q11.2	53964473-53980257
pro248	Y10043	X	Xq28	155144719-155160264
pro249	S74445	15	15q24.2	74840231-74855495
pro250	U25165	3	3q26.33	196934501-196950372
pro251	U63336	6	6p21.33	33662019-33677856
pro253	U13022	7	7q35	149686107-149702331
pro255	AB019494	5	5p13.2	39907204-39922203
pro256	L07919	2	2q31.1	175756788-175772636
pro257	AB029006	2	2p22.3	32520144-32540169
pro258	AB028995	17	17q23.2	63475124-63497063
pro259	U62325	2	2q35	223126524-223141423
pro262	X54942	9	9q22.1	87899001-87915976
pro263	U10860	4	4p16.1	9058241-9073583
pro264	M87339	3	3q27.3	204899461-204915188
pro267	X59543	11	11p15.5	3340168-3358000
pro269	M76180	7	7p12.2	51709937-51727010
pro270	M92299	17	17q21.32	52711008-52726713
pro271	AB028021	20	20p11.21	25363017-25378980
pro272	Y16752	6	6p22.2	27692102-27707775
pro275	U96131	5	5p15.33	1133261-1148076
pro277	X84194	14	14q24.3	73530456-73545798
pro278	D82345	X	Xq22.1	102209954-102227610
pro279	L36818	11	11q13.4	76825241-76843255
pro282	V00568	8	8q24.13	130952716-130971510
pro283	U87459	X	Xq28	157900553-157917852
pro285	X16396	2	2p12	74933738-74953722
pro286	AF007140	19	19p13.2	10684785-10702574
pro287	AF053641	20	20q13.13	50999953-51020590
pro289	X55110	11	11p11.2	47010261-47026357
pro290	U84573	3	3q24	159499984-159525599
		X	Xq26.2	137568108-137581997
pro291	M97856	1	1p34.1	50925640-50946744
pro293	AB011173	1	1p36.12	25196653-25221848
pro294	U34994	3	3p24.3	25352447-25367957
pro295	Y18004	X	Xp22.13	18909706-18961865
pro296	D78611	7	7q32.2	133415266-133433462

pro297	D55716	7	7q22.1	101656642-101674644
pro298	L19183	17	17q11.2	29841430-29862449
pro300	X00737	14	14q11.2	16658977-16678611
pro301	X14850	9	9q21.12	73041595-73057571
pro305	M63180	5	5p13.3	32613067-32631841
pro307	AB014458	1	1p31.3	70502659-70519495
pro308	L07493	7	7p22.1	6711371-6728698
pro309	AF041474	3	3q26.33	198844404-198867622
pro310	Y18418	3	3q21.3	139858490-139872261
pro311	M94362	NA_random		1360953-1386439
pro312	U50939	16	16q22.1	75154638-75172659
pro313	D64110	21	21q11.2	15926421-15943327
pro315	M91670	17	17p11.2	17349263-17365467
		10	10p11.21	38991035-39007459
pro316	X64229	6	6p22.3	19889797-19909681
pro317	X53793	4	4q12	59189280-59209671
pro318	AL080119	1	1p31.2	76612579-76631294
pro319	D28423	6	6p21.31	40691099-40706383
pro320	U35451	17	17q21.32	52107808-52124651
pro321	U94319	9	9p22.3	16952805-16970295
pro322	M30938	2	2q35	221329992-221351121
pro323	AF047473	10	10q26.12	132970590-132988540
pro324	L33930	6	6q21	114313634-114328131
pro326	X62534	4	4q34.1	182348719-182364558
pro327	D84557	2	2q22.1	138697866-138715350
pro330	D21063	3	3q21.3	139528312-139551423
pro332	U90426	19	19p13.13	15547854-15568398
pro333	D00762	14	14q23.1	55012125-55034336
pro334	U72066	18	18q11.2	22625608-22643453
pro335	M86737	11	11q12.1	57630355-57653499
pro336	D13627	21	21q21.3	27298411-27317280
pro337	X01060	3	3q29	216708325-216729920
pro339	AF039022	20	20q11.22	34329184-34345180
pro340	L27706	7	7p11.2	57350245-57365971
pro346	AF035316	6	6p25.2	3491115-3506631
pro349	U25182	X	Xp22.12	22338422-22357291
pro353	X74262	1	1p35.1	35716074-35777340
pro354	J02645	14	14q23.3	64971951-64997045
pro355	M37583	4	4q24	104191912-104207386
pro356	U37689	3	3q27.2	202022093-202041189
pro359	U09510	7	7p14.3	30543349-30559412

Pro362	X04741	4	4p4	39926899-39927127
--------	--------	---	-----	-------------------

优选第一核酸序列选自： pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8,  
 pro9, pro10, pro12, pro13, pro14, pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20,  
 5 pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26, pro27, pro28, pro29, pro30, pro31,  
 pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40, pro41, pro42, pro43, pro44,  
 pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52, pro53, pro54, pro55,  
 pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64, pro65, pro66,  
 pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76, pro77,  
 10 pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88,  
 pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99,  
 pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109,  
 pro110, pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119,  
 pro120, pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128,  
 15 pro129, pro130, pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138,  
 pro139, pro140, pro141, pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147,  
 pro148, pro149, pro150, pro152, pro153, pro154, pro155, pro156, pro157,  
 pro158, pro159, pro160, pro161, pro162, pro163, pro164, pro165, pro166,  
 pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173, pro174, pro175, pro176,  
 20 pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183, pro184, pro185,  
 pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197, pro198,  
 pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro208,  
 pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro215, pro216, pro217, pro219,  
 pro220, pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro226, pro227, pro228,  
 25 pro229, pro230, pro231, pro232, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237,  
 pro238, pro239, pro240, pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246,  
 pro247, pro248, pro249, pro250, pro251, pro253, pro254, pro255, pro256,  
 pro257, pro258, pro259, pro260, pro262, pro263, pro264, pro267, pro268,  
 pro269, pro270, pro271, pro272, pro273, pro275, pro277, pro278, pro279,  
 30 pro280, pro282, pro283, pro284, pro285, pro286, pro287, pro289, pro290,  
 pro291, pro292, pro293, pro294, pro295, pro296, pro297, pro298, pro299,

pro300, pro301, pro302, pro303, pro304, pro305, pro306, pro307, pro308, pro309, pro310, pro311, pro312, pro313, pro315, pro316, pro317, pro318, pro319, pro320, pro321, pro322, pro323, pro324, pro326, pro327, pro328, pro329, pro330, pro331, pro332, pro333, pro334, pro335, pro336, pro337, 5 pro338, pro339, pro340, pro341, pro344, pro346, pro347, pro348, pro349, pro352, pro353, pro354, pro355, pro356, pro358, pro359和pro361。

更优选第一核酸序列选自：pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13, pro14, pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26, pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, 10 pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40, pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52, pro53, pro54, pro56, pro58, pro59, pro62, pro64, pro65, pro66, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro77, pro78, pro81, pro82, pro85, pro86, pro87, pro89, pro90, pro92, pro98, pro103, pro105, pro108, pro120, pro125, pro128, pro130, pro133, 15 pro135, pro136, pro137, pro157, pro184, pro205, pro206, pro207, pro209, pro210, pro211, pro212, pro216, pro217, pro219, pro221, pro227, pro231, pro233, pro241, pro246, pro248, pro249, pro253和pro256。

更优选第一核酸序列选自：pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro14, pro15, pro16, pro22, pro23, pro24, pro26, pro27, pro29, pro34, pro37, 20 pro38, pro39, pro40, pro45, pro46, pro48, pro49, pro50, pro52, pro59, pro69, pro71, pro74, pro77, pro86, pro87, pro89, pro184, pro205, pro206, pro207, pro209, pro210, pro211, pro221, pro241, pro246, pro248和pro256。

甚至更优选第一核酸序列选自：pro2, pro4, pro8, pro14, pro15, pro16, pro22, pro49, pro74, pro86, pro87, pro89, pro205, pro221, pro246。

25 最优选第一核酸序列选自：pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, pro139, pro207, pro81, pro273和pro362。

在另一个优选实施方案中，第一核酸序列选自：pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13, pro14, pro15, pro16, pro17, 30 pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26, pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40, pro41,

pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52, pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64, pro65, pro66, pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76, pro77, pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, 5 pro86, pro87, pro88, pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99, pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109, pro110, pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119, pro120, pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128, pro129, pro130, pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, 10 pro137, pro138, pro139, pro140, pro141, pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147, pro148, pro149, pro150, pro152, pro153, pro154, pro155, pro156, pro157, pro158, pro159, pro160, pro161, pro162, pro163, pro164, pro165, pro166, pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173, pro174, pro175, pro176, pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183, 15 pro184, pro185, pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197, pro198, pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro216, pro217, pro219, pro220, pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro227, pro228, pro229, pro230, pro231, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237, pro238, pro239, 20 pro240, pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246, pro248, pro249, pro250, pro251, pro253, pro254, pro255, pro256, pro257, pro258, pro259, pro260, pro269, pro278, pro282, pro283, pro284, pro285, pro297, pro315, pro326, pro327, pro328和pro329。

在本发明的一个特别优选的实施方案中，第一核酸序列是pro221或其 25 片段或其功能同系物。Pro221是编码胰岛瘤-相关抗原IA-1，INSM1基因的启动子。胰岛瘤-相关抗原mRNA以很高水平被所有经检测的SCLC表达，在脑和肾上腺中仅以很低的水平被表达。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明表达(见实施例1和图3)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro210或其片段 30 或其功能同系物。Pro210是编码核纤层蛋白B，LMNB1基因的启动子。LMNB1 mRNA以很高水平被所有经检测的SCLC表达，在脾脏、结肠和肺中

仅以很低的水平被表达。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明LMNB1的表达(见实施例1和图6)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro71或其片段或其功能同系物。Pro71是编码p16INK4/MTS1，MTS1，细胞周期蛋白-依赖性  
5 激酶抑制剂2A，CDKN2A基因的启动子。p16INK4/MTS1 mRNA以很高水平被大多数SCLC表达，在正常组织中仅以很低的水平被表达，或根本不表达。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明LMNB1的表达(见实施例1和图7)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro41或其片段或其功能同系物。Pro41是编码人MAD2L1，有丝分裂停滞缺损的酵母同系物-  
10 样1基因的启动子。MAD2L1 mRNA以很高水平被SCLC表达，以高水平被睾丸表达，但在其它正常组织中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明MAD2L1的表达(见实施例1和图5)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro30或其片段或其功能同系物。Pro30是人KIAA0042基因的启动子。KIAA0042 RNA以很高  
15 水平被大多数SCLC和正常组织表达，但在睾丸中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析和RT-PCR阐明KIAA0042的表达(见实施例1和图4)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro2或其片段或其功能同系物。Pro2是编码人细胞周期蛋白-选择性遍在蛋白载体蛋白  
20 UBE2C的人基因的启动子。UBE2C mRNA以很高水平被大多数SCLC和正常组织表达，但在脾脏和睾丸中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析阐明UBE2C的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro209或其片段或其功能同系物。Pro209是编码核分裂激素，CENPF，着丝粒蛋白F的人基  
25 因的启动子。CENPF mRNA以高水平被大多数SCLC和正常组织表达，但在睾丸中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析阐明CENPF的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro14或其片段或其功能同系物。Pro14是人KIAA0101基因的启动子。KIAA0101 RNA以高水  
30 平被大多数SCLC和正常组织表达，但在7个组织中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析阐明KIAA0101的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro4或其片段或其功能同系物。Pro4是编码细胞周期蛋白基因，增殖细胞核抗原(PCNA)的人基因的启动子。PCNA mRNA以高水平被大多数SCLC和正常组织表达，但在结肠、脾脏和睾丸中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析阐明  
5 PCNA的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro8或其片段或其功能同系物。Pro8是编码丝氨酸/苏氨酸激酶，STK-1，STK12，fms-相关酪氨酸激酶3的人基因的启动子。STK-1 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，但在结肠、脾脏和睾丸中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析  
10 阐明STK-1的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro246或其片段或其功能同系物。Pro246是编码Achaete scute同源蛋白，ASH1，ASCL1的人基因的启动子。ASH1 mRNA以高水平被很多SCLC和正常组织表达，但在脑中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析阐明ASH1的表达(见实施例  
15 1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro16或其片段或其功能同系物。Pro16是编码DNA拓扑异构酶II $\alpha$ (170kD)，TOP2A的人基因的启动子。TOP2A mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，但在9个组织中仅以低水平被表达，在睾丸中被高水平表达。已通过例如芯片分析阐明  
20 TOP2A的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro27或其片段或其功能同系物。Pro27是编码细胞周期蛋白B2，CCNB2的人基因的启动子。细胞周期蛋白B2 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，但在脾脏和气管中仅以低水平被表达，在睾丸中被高水平表达。已通过例如芯片分析阐明  
25 细胞周期蛋白B2的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro5或其片段或其功能同系物。Pro5是编码细胞周期蛋白B1，CCNB1的人基因的启动子。细胞周期蛋白B1 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，但在结肠、脾脏和气管中仅以低水平被表达，在睾丸中被高水平表达。已通过例如芯片分  
30 析阐明细胞周期蛋白B1的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro49或其片段或其功能同系物。Pro49是编码脑垂体肿瘤-转化1，PTTG1的人基因的启动子。PTTG1 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，但在甲状腺、脾脏和气管中仅以低水平被表达，在睾丸中被高水平表达。已通过例如芯片分析阐明  
5 PTTG1的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro19或其片段或其功能同系物。Pro19是编码驱动蛋白-样纺锤体蛋白HKSP，KNLS1的人基因的启动子。KNLS1 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，但在结肠、小肠和睾丸中仅以低水平被表达。已通过例如芯片分析阐明KNLS1的表达  
10 (见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro140或其片段或其功能同系物。Pro140是编码cdc2-相关蛋白激酶，CDK2的人基因的启动子。CDK2 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，以高水平被脾脏表达。已通过例如芯片分析阐明CDK2的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro139或其片段或其功能同系物。Pro139是编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶SAK的人基因的启动子。SAK mRNA以高水平被大多数SCLC和正常组织表达，并以高水平被  
15 睾丸表达。已通过例如芯片分析阐明SAK的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro207或其片段或其功能同系物。Pro207是编码zeste同系物2的增强子(EZH2)的人基因的启动子。EZH2 mRNA以高水平被SCLC和正常组织表达，并以高水平被睾丸  
20 表达。已通过例如芯片分析阐明EZH2的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro81或其片段或其功能同系物。Pro81是人HSU79266基因的启动子。HSU79266 RNA以高水  
25 平被大多数SCLC和正常组织表达，并可被睾丸和脾脏表达。已通过例如芯片分析阐明HSU79266的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro273或其片段或其功能同系物。Pro273是编码Rad2，瓣状结构-特异性内切核酸酶1，FEN1  
30 的人基因的启动子。Rad2 mRNA以高水平被大多数SCLC和正常组织表达，但在12个组织中以低水平表达。已通过例如芯片分析阐明Rad2的表达(见实施例1)。

在本发明的另一个优选实施方案中，第一核酸序列是pro362或其片段或其功能同系物。Pro362是编码蛋白质基因产物PGP，遍在蛋白羧基末端酯酶L1，遍在蛋白巯基酯酶的人基因的启动子。PGP mRNA以高水平被大多数SCLC和正常组织表达，在肾脏中以低水平表达，在脑中以高水平表达。

5 已通过例如芯片分析阐明PGP的表达(见实施例1)。

### 功能同系物

本发明多肽的功能同系物欲包括任何功能相同的多肽序列。例如，细胞表面分子的功能同系物是与细胞表面结合分子，它能与结合配对物结合，优选能内化结合配对物。结合配对物的功能同系物是能与细胞表面分子结合，且优选能被内化至表达细胞表面分子的细胞中的分子。

本发明的功能同系物包括多肽，其具有的氨基酸序列至少与上文所述的预定多肽序列共享一些同源性。例如，所述多肽与本文所述的任何预定多肽序列的同源性至少约为40%，如至少约为50%，如至少约为60%，如至少约为70%，如至少约为75%，如至少约为80%，如至少约为85%，如至少约为90%，如至少约为92%，如至少约为94%，如至少约为95%，如至少约为96%，如至少约为97%，如至少约为98%，如至少约为99%。

可使用众所周知的算法，例如BLOSUM30，BLOSUM40，BLOSUM45，BLOSUM50，BLOSUM55，BLOSUM60，BLOSUM62，BLOSUM65，BLOSUM70，BLOSUM75，BLOSUM80，BLOSUM85和BLOSUM90中的任一种，来计算氨基酸序列之间的同源性。

功能同系物可含有用一个氨基酸对任何其它氨基酸进行至少一次取代而获得的氨基酸序列。例如所述取代可以是保守的氨基酸取代，或者是非保守的取代。

保守的氨基酸取代是用预定氨基酸组内的一个氨基酸取代相同组内的另一个氨基酸，其中预定组内的氨基酸表现出类似的或基本上类似的特性。在本文所用术语“保守氨基酸取代”的意思中，具有下列特征的氨基酸组内的一个氨基酸可被另一个氨基酸取代：

- i) 极性侧链(Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr和Cys)
- ii) 非-极性侧链(Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro和Met)
- iii) 脂肪族侧链(Gly, Ala, Val, Leu, Ile)
- iv) 环侧链(Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

v)芳香族侧链(Phe, Tyr, Trp)

vi)酸性侧链(Asp, Glu)

vii)碱性侧链(Lys, Arg, His)

viii)酰胺侧链(Asn, Gln)

5 ix)羟基侧链(Ser, Thr)

x)含硫侧链(Cys, Met), 和

xi)为一氨基-二羧酸或一氨基-一羧基-一酰胺羧酸的氨基酸(Asp, Glu, Asn, Gln)。

非保守取代可以是任何其它取代。导致功能同系物形成的非保守取代  
10 可以是例如: i)疏水性有实质性差别, 如用疏水残基(Val, Ile, Leu, Phe或Met)  
取代亲水残基, 如Arg, Lys, Trp或Asn, 或用亲水残基, 如Thr, Ser, His, Gln,  
Asn, Lys, Asp, Glu或Trp取代疏水残基; 和/或ii)对多肽主链方向的作用有实  
质性差别, 如用另一个残基取代Pro或Gly, 或反之; 和/或iii)电荷有实质性  
差别, 例如用带负电的残基, 如Glu或Asp取代带正电的残基, 如Lys, His或  
15 Arg(以及反之); 和/或iv)空间体积有实质性差别, 例如用体积大的残基, 如  
His, Trp, Phe或Tyr取代具有小侧链的残基, 如Ala, Gly或Ser(以及反之)。

本发明的功能同系物可含有一个以上所述取代, 例如2个氨基酸取代,  
如3或4个氨基酸取代, 如5或6个氨基酸取代, 如7或8个氨基酸取代, 如10  
至15个氨基酸取代, 如15至25个氨基酸取代, 如25至30个氨基酸取代, 如  
20 30至40个氨基酸取代, 如40至50个氨基酸取代, 如50至75个氨基酸取代,  
如75至100个氨基酸取代, 如100个以上的氨基酸取代。

添加或缺失氨基酸可以是添加或缺失2至5个氨基酸, 如5至10个氨基  
酸, 如10至20个氨基酸, 如20至50个氨基酸。然而, 本发明还包括添加或  
缺失50个以上的氨基酸, 例如添加50至200个氨基酸。

25 在一个实施方案中, 包括其任何变体和功能同系物的本发明多肽含有5  
个以上氨基酸残基, 如10个以上氨基酸残基, 如20个以上氨基酸残基, 如  
25个以上氨基酸残基, 如50个以上氨基酸残基, 如75个以上氨基酸残基,  
如100个以上氨基酸残基, 如150个以上氨基酸残基, 如200个以上氨基酸残  
基。

30 当确定根据本文所用定义的功能同系物时, 可考虑其它因素。例如,  
功能同系物应能与特异性针对本发明多肽的抗血清结合。

在另一个实施方案中，本发明涉及含有取代氨基酸的功能等同物，所述氨基酸具有的亲水指数为它所取代的氨基酸值的 $\pm 2.5$ ，如 $\pm 2.3$ ，如 $\pm 2.1$ ，如 $\pm 2.0$ ，如 $\pm 1.8$ ，如 $\pm 1.6$ ，如 $\pm 1.5$ ，如 $\pm 1.4$ ，如 $\pm 1.3$ ，如 $\pm 1.2$ ，如 $\pm 1.1$ ，如 $\pm 1.0$ ，如 $\pm 0.9$ ，如 $\pm 0.8$ ，如 $\pm 0.7$ ，如 $\pm 0.6$ ，如 $\pm 0.5$ ，如 $\pm 0.4$ ，如 $\pm 0.3$ ，如 $\pm 0.25$ ，如 $\pm 0.2$ 。

亲/疏水氨基酸指数对赋予蛋白质以活性生物学功能的重要性是本领域技术人员众所周知的(Kyte & Doolittle, 1982和Hopp, 美国专利4554101, 皆列入本文作为参考)。

本文所用的氨基酸亲/疏水指数值为：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)(Kyte & Doolittle, 1982)。

氨基酸亲/疏水值为：精氨酸(+3.0)；赖氨酸(+3.0)；天冬氨酸(+3.0 $\pm$ .1)；谷氨酸(+3.0 $\pm$ .1)；丝氨酸(+0.3)；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 $\pm$ .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)(美国专利4,554,101)。

因此，在一个实施方案中，可根据氨基酸的疏水和亲水值以及氨基酸侧链取代基的相对相似性，包括电荷、大小等来进行氨基酸取代。考虑到上述多个不同特征的氨基酸取代的例子是本领域技术人员众所周知的，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。

除了本文所述的多肽化合物以外，也可配制空间结构类似的化合物以模拟肽结构的关键部分，也可以按照与本发明肽相同的方式使用所述化合物。通过本领域技术人员熟知的模型建立和化学设计技术即可完成此目的。例如，可利用酯化和其它烷基化来修饰例如二-精氨酸肽主链的氨基末端以模拟四肽结构。应懂得所有这些空间结构类似的构建体都落入本发明的范围之内。

本发明的范围内还包括N-末端被烷基化和C-末端被酯化的肽。功能等同物还包括糖基化的和共价或聚集的偶联物，包括二聚体或不相关的化学组成成分。通过利用本领域已知的技术连接官能团与片段中的基团，包括位于N-和C-末端中的任一端或两端的基团，可以制备所述功能等同物。

5 因此，功能等同物可含有与脂肪族或酰基酯或羧基末端的酰胺，烷基胺或含有羧基侧链的残基偶联的片段，例如与天冬氨酸残基上的烷基胺的偶联物；含羟基残基的O-酰基衍生物和氨基末端氨基酸或含氨基残基的N-酰基衍生物，例如与Met-Leu-Phe的偶联物。酰基衍生物选自烷基-组成成分的基团(包括C3至C10常见烷基)，从而形成多种烷酰基，以及碳环或杂环化  
10 合物，从而形成多种芳酰基。活性基团优选为本来已知可用于通过活性侧链基团使蛋白质与不溶性基质交联的双功能化合物。

本发明范围内的核酸序列同系物是核酸序列，其

i)编码具有类似生物学功能的RNA和/或蛋白质；或

ii)能发挥类似的生物学作用；

15 且所述核酸序列

a)至少50%相同，如至少60%相同，如至少70%相同，如至少75%相同，如至少80%相同，如至少85%相同，如至少90%相同，如至少95%相同；

b)或能在严紧条件下与所述核酸序列的互补链杂交。

本上下文中的类似生物学作用是例如：核酸序列能以类似于其功能同  
20 系物的方式影响与之可操作相连的第二核酸序列的转录。

本文所用的严紧条件应表示如Southern E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517中描述的Southern印迹和杂交通常使用的严紧度。为了达到此目的，常规操作包括预杂交和杂交步骤。如Sambrook等, 1989, "Molecular Cloning/A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor(列入本文作为参考)所述，  
25 该步骤一般使用含有6×SSPE, 5% Denhardt's, 0.5% SDS, 50% 甲酰胺, 100μg/ml变性的鲑睾丸DNA的溶液进行(42℃保温18小时)，接着用2×SSC和0.5% SDS洗涤(室温和37℃)，并用0.1×SSC和0.5% SDS洗涤(68℃保温30分钟)。

核酸序列的同系物还包括含有添加和/或缺失的核酸序列。所述添加和/  
30 或缺失可以是内部的或位于末端。添加和/或缺失可以是1-5个核苷酸，如5

至10个核苷酸，如10至50个核苷酸，如50至100个核苷酸，如至少100个核苷酸。

### 疫苗

在本发明的一个实施方案中，细胞表面分子可用于制备疫苗。优选所述疫苗能产生抗细胞表面分子的免疫应答。所述免疫应答优选导致特异性杀死表达所述细胞表面分子的细胞。最优选表达细胞表面分子的细胞是恶性细胞，例如疫苗导致特异性杀死恶性细胞。

因此，疫苗优选适用于改善和/或治疗和/或预防性治疗前恶性和/或恶性疾病。因此，应该优选给患有前恶性和/或恶性疾病，优选为癌症的个体施用疫苗。个体可以是任何动物，然而，优选个体为人类。

可以使用细胞表面分子或其片段或其衍生物，以及编码细胞表面分子或其片段或其衍生物的核酸。疫苗所使用的优选细胞表面分子是相对于正常组织而言，在体内恶性细胞和/或恶性细胞系中以较高水平表达的细胞表面分子。例如，可根据上文所述的方法鉴定细胞表面分子。然而，也可以使用其它适当的细胞表面分子。

优选细胞表面分子含有下述物质或基本上由下述物质组成，或例如是GRIA2，如LPR8，例如是CHRNA5，如TMEFF，例如是NPTXR，如运铁蛋白受体；如II型膜蛋白克隆：例如是HP10481；如II型膜蛋白克隆：如HP10390；例如是PG40；如TRC8；例如是TR2-11；如OA3抗原表面决定簇；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6，例如GPIIb；如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位；例如是整联蛋白 $\alpha$ -7；如整联蛋白 $\alpha$ E前体；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B；如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位；例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位；如整联蛋白 $\alpha$ -3链；例如是RYK；如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1；例如是推定的跨膜GTP酶；如膜辅因子蛋白；例如GLVR1；例如是Mr110,000抗原，例如是多配体聚糖-1；如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质；例如是LCA-同系物/LAR蛋白；如M6抗原；例如是Me491/CD63抗原；如多跨越膜蛋白；例如是DDR；如自泌活动因子受体；例如是胰岛素受体前体；如IGF1R，例如是胰岛素-样生长因子II受体；如SAS；例如是TAPA-1；如MICB；例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链；如HLA-DP；例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖；如CAR；例如是MEA11；如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链；例如是多聚免疫球蛋白受体；如metabotropic谷氨酸受体4型；例如是metabotropic谷氨酸受体8；如CLPTM1，例如是MAGE-4b；如MAGE5a；例

如是MAGE-3; 例如MAGE-1; 例如是MAGE6; 如MAGE-9; 例如是MAGE11;  
 如CD24; 例如是CD59; 如CD44; 例如是低密度脂蛋白受体; 如极低密度  
 脂蛋白受体; 例如是N-CAM; 如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2; 例如是  
 推定的T1/ST2受体结合蛋白前体; 如NTR2受体; 例如是RAGE-4; 如  
 5 HLA-G1; 例如是MOAT-C; 如 $\alpha 2 \delta$ 钙通道亚单位同种型I; 例如是LFA-3;  
 如L1-CAM; 例如是AVPR2; 如C1 p115 C1; 例如是TE2; 如RbP; 例如是  
 HCF1; 如IRAK; 例如是CD151; 如表面抗原; 例如是MAG; 如GPR19;  
 例如是pcta-1; 如PRAME; 例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白; 如  
 5-羟色胺受体5-HT4B; 例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~); 如CD9; 例如是  
 10 LDL受体成员LR3; 如DR6; 例如是肿瘤坏死因子受体; 如HG38; 例如是  
 尿激酶型纤溶酶受体; 如FGF受体; 例如是神经生长因子受体; 如胱氨酸/  
 谷氨酸转运蛋白; 例如是CB1大麻素受体(CNR1); 如PSG; 例如是PSG13';  
 如CPE-受体; 例如是CRH2R; 如OCI5; 例如是TRAIL受体2; 如HNMP-1;  
 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体; 如红细胞生成素受体; 例如是硫酸软骨素蛋  
 15 白聚糖多能聚糖V1; 例如是mGluR1 $\beta$ ; 如CD97; 例如是L6; 如NY-ESO-1;  
 例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ; 如ror1; 例如是ror2; 如SSTR2; 例如是VESPR; 如  
 IgG Fc受体; 例如是谷氨酸受体亚单位GluRC; 如HEK2; 例如是PVR; 如  
 CEA; 例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61; 如HER2; 例如是HER3; 如类  
 似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357; 例如是推定的B-型  
 20 内皮肤受体-样蛋白; 如GLVR2; 例如是P2X4嘌呤受体; 如FPRL1; 例如是  
 心房利钠肽清除受体; 例如是胃泌素/CCK-B受体; 如神经调节肽B受体;  
 例如是GFRA3; 如GRPR; 例如是CDH1; 如CDH2; 例如是TGFBR1; 如  
 TGFBR2; 例如是TGFBR3; 如表皮生长因子受体的前体。

更优选细胞表面分子选自NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2,  
 25 GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

在一个优选实施方案中, 疫苗还含有与所述细胞表面分子共价连接的  
 非-自身抗原。或者, 当使用编码细胞表面分子的核酸序列时, 疫苗可含有  
 与该核酸序列连接的、编码非-自身抗原的第二核酸序列。

可用于本发明的非-自身抗原的例子是T-细胞表位, 优选为多肽或肽。

30 疫苗也可以含有一种以上的抗原, 如2种, 3种, 4种, 5种, 5种以上不  
 同的抗原。抗原可以是自身抗原或非-自身抗原。

本发明的疫苗可进一步含有佐剂和/或载体。载体或佐剂可以是本领域已知的任何载体或佐剂，包括其功能等同物。当在类似的条件下使用时，功能等同的载体能以基本上相同的空间构象呈递相同的抗原。当在类似的条件下使用时，功能等同的佐剂能使组合物的效力有类似的增加。

5 优选所述组合物含有有效的无毒佐剂作为一组优选佐剂，所述佐剂可增强和/或调制免疫原决定簇，包括抗原决定簇，包括半抗原决定簇的免疫原性。另外，优选所述佐剂能引发较早的、更有效的、或时间更长的免疫应答。在抗原供给有限或抗原制备花费较大时，所述佐剂也是有用的。

10 可根据其来源将与本发明有关的佐剂分组，它可以是矿物质、细菌、植物、合成的或宿主产物。根据此分类的第一组是矿物佐剂，如铝化合物。被铝盐沉淀的抗原，或混合或吸附于所施用的铝化合物的抗原被广泛用于在动物和人中增强免疫应答。已阐明在免疫7天后，兔的局部淋巴结中仍有铝颗粒，这一类佐剂的另一个显著功能是：将抗原导向淋巴结自身含T细胞的区域。已证实佐剂效力与引流淋巴结的暗示有关。尽管很多研究已证实：  
15 与铝盐一起施用的抗原能导致体液免疫增加，但通过延迟型超敏反应测定，细胞介导的免疫仅略有增加。据报道氢氧化铝可以活化补体途径。该机制在局部炎症反应以及免疫球蛋白产生和B细胞记忆方面起作用。另外，氢氧化铝可保护抗原，使其免被分解代谢。主要由于其极佳的安全性记录，铝化合物是目前唯一用于人的佐剂。

20 另一大组佐剂是来源于细菌的佐剂。可以纯化和合成来源于细菌的佐剂(如胞壁酰二肽，脂质A)，已克隆出宿主介质(白细胞介素1和2)。最近十年来，在化学纯化以下几种细菌来源的活性组分佐剂方面取得了显著进步：百日咳杆菌、结核分枝杆菌、脂多糖、弗氏完全佐剂(FCA)和弗氏不完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)和Merck佐剂65(Merck and Company,  
25 Inc., Rahway, N. J.)。本发明的其它适当佐剂是例如：Titermax Classical佐剂(SIGMA -ALDRICH)、ISCOMS、Quil A、ALUN(参见美国专利58767和5554372)、脂质A衍生物、霍乱毒素衍生物、HSP衍生物、LPS衍生物、合成肽基质、GMDP等，以及与免疫刺激剂混合(美国专利5876735)。

30 百日咳杆菌能通过对T-淋巴细胞群体发挥作用来调制细胞-介导的免疫力，因此，在本发明的上下文中，它是一种令人感兴趣的佐剂。对于脂多

糖和弗氏完全佐剂而言，已鉴定和合成出佐剂的活性组成成分，可借此研究结构-功能之间的关系。本发明的免疫原性组合物中也包括这些组成成分。

已发现脂多糖及其多种衍生物(包括脂质A)与脂质体或其它脂质乳剂混合，成为强有力的佐剂。仍不能确定是否可制备出一般可用于人的、毒性足够低的衍生物。大多数实验室研究的标准是弗氏完全佐剂。

为了保护抗原使其免遭分解代谢，可以在疫苗制剂中添加矿物油。

在本发明的免疫原性组合物中，可将多种其它类型的物质用作佐剂。它们包括如皂苷等植物产物，如壳多糖等动物产物和多种合成化合物。

也可通过其打算采用的作用机制对本发明的佐剂进行分类。这种类型的分类必须有点随意，因为大多数佐剂似乎通过一种以上的机制在起作用。佐剂可通过抗原定位和传递，或通过对于构成免疫系统的细胞，如巨噬细胞和淋巴细胞直接起作用来发挥作用。本发明的佐剂增强免疫应答所用的其它机制是通过产生抗原仓库(depot)。这似乎对铝化合物、油乳剂、脂质体和合成聚合物的佐剂活性有贡献。脂多糖和胞壁酰二肽的佐剂活性似乎主要是通过激活巨噬细胞来介导的，而百日咳杆菌对巨噬细胞和淋巴细胞都有影响。美国专利5554372举例描述了当掺入本发明的免疫原性组合物中时可发挥作用的其它佐剂。

在一个优选实施方案中，本发明的佐剂选自铝化合物、弗氏不完全佐剂、Titermax经典佐剂和油乳剂。

本发明还提供了一个实施方案，其中免疫原性组合物进一步含有载体。载体可独立于佐剂存在。偶联和/或共-免疫抗原和载体的目的是例如：增加抗原的分子量以增加抗原的活性或免疫原性，赋予抗原稳定性，增加决定簇的生物活性，或增加其血清半寿期。载体蛋白可以是任何常规的载体，包括任何适用于呈递抗原的蛋白质。常规的载体蛋白包括但不限于匙孔藻血蓝蛋白，血清蛋白，如运铁蛋白，牛血清白蛋白或人血清白蛋白，卵白蛋白，免疫球蛋白或激素，如胰岛素。

尽管本发明的疫苗可以使用本领域技术人员已知的任何适当药物载体，但药物载体的类型将根据给药模式和是否需要持续释放给药而改变。对于非肠道给药，如皮下注射而言，药物载体可以含有例如水、盐水、乙醇、脂肪、蜡或缓冲液。生物可降解的微球体(如polylactic galactide)也可用作本发明药物组合物的药物载体。

在本发明的一个实施方案中，疫苗包括使用树突状细胞。所述实施方案优选含有下述步骤：

i)提供树突状细胞；和

5 ii)将编码本发明的细胞表面分子、且与介导其表达的第二核酸序列可操作相连的核酸序列转移至树突状细胞，或将细胞表面分子或其片段转移至树突状细胞；和

iii)在树突状细胞的细胞表面展示所述细胞表面分子或其片段；和

iv)将所述树突状细胞转移至待治疗的个体。

10 优选树突状细胞是得自待治疗个体的细胞，然而，树突状细胞也可以得自另一个个体。当树突状细胞得自另一个个体时，优选细胞得自与待治疗的个体相同的物种。例如，如果待治疗的个体是人，优选树突状细胞也得自人。

优选以片段的形式在细胞表面展示细胞表面分子，对MHC分子而言，所述片段为肽片段。

## 15 药物靶

也可将细胞表面分子用作药物靶，所述细胞表面分子能与结合配对物结合，并将所述结合配对物内化至表达所述细胞表面分子的细胞中。优选所述细胞表面分子以不同的水平在恶性细胞系和正常组织中表达。更优选根据本发明所述方法鉴定细胞表面分子。

20 更优选细胞表面分子含有下述物质或基本上由下述物质组成，或例如是GRIA2，如LPR8，例如是CHRNA5，如TMEFF，例如是NPTXR，如运铁蛋白受体；如II型膜蛋白克隆：例如是HP10481；如II型膜蛋白克隆：如HP10390；例如是PG40；如TRC8；例如是TR2-11；如OA3抗原表面决定簇；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6，例如GPIIb；如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位；例如是整联蛋白 $\alpha$ -7；如整联蛋白 $\alpha$ E前体；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B；如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位；例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位；如整联蛋白 $\alpha$ -3链；例如是RYK；如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1；例如是推定的跨膜GTP酶；如膜辅因子蛋白；例如GLVR1；例如是Mr110,000抗原，例如是多配体聚糖-1；如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质；例如是LCA-同系物/LAR蛋白；如M6抗原；例如是Me491/CD63抗  
25 原；如多跨越膜蛋白；例如是DDR；如自泌活动因子受体；例如是胰岛素受体前体；如IGF1R，例如是胰岛素-样生长因子II受体；如SAS；例如是  
30

TAPA-1; 如MICB; 例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链; 如HLA-DP; 例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖; 如CAR; 例如是MEA11; 如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链; 例如是多聚免疫球蛋白受体; 如metabotropic谷氨酸受体4型; 例如是metabotropic谷氨酸受体8; 如CLPTM1, 例如是MAGE-4b; 如

5 MAGE5a; 例如是MAGE-3; 例如MAGE-1; 例如是MAGE6; 如MAGE-9; 例如是MAGE11; 如CD24; 例如是CD59; 如CD44; 例如是低密度脂蛋白受体; 如极低密度脂蛋白受体; 例如是N-CAM; 如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2; 例如是推定的T1/ST2受体结合蛋白前体; 如NTR2受体; 例如是RAGE-4; 如HLA-G1; 例如是MOAT-C; 如 $\alpha$ 2  $\delta$ 钙通道亚单位同种型I;

10 例如是LFA-3; 如L1-CAM; 例如是AVPR2; 如C1 p115 C1; 例如是TE2; 如RbP; 例如是HCF1; 如IRAK; 例如是CD151; 如表面抗原; 例如是MAG; 如GPR19; 例如是pcta-1; 如PRAME; 例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白; 如5-羟色胺受体5-HT4B; 例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~); 如CD9; 例如是LDL受体成员LR3; 如DR6; 例如是肿瘤坏死因子受体; 如HG38;

15 例如是尿激酶型纤溶酶受体; 如FGF受体; 例如是神经生长因子受体; 如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白; 例如是CB1大麻素受体(CNR1); 如PSG; 例如是PSG13'; 如CPE-受体; 例如是CRH2R; 如OCI5; 例如是TRAIL受体2; 如HNMP-1; 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体; 如红细胞生成素受体; 例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1; 例如是mGluR1 $\beta$ ; 如CD97; 例如是L6; 如

20 NY-ESO-1; 例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ; 如ror1; 例如是ror2; 如SSTR2; 例如是VESPR; 如IgG Fc受体; 例如是谷氨酸受体亚单位GluRC; 如HEK2; 例如是PVR; 如CEA; 例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61; 如HER2; 例如是HER3; 如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357; 例如是推定的B-型内皮受体-样蛋白; 如GLVR2; 例如是P2X4嘌呤受体; 如

25 FPRL1; 例如是心房利钠肽清除受体; 例如是胃泌素/CCK-B受体; 如神经调节肽B受体; 例如是GFRA3; 如GRPR; 例如是CDH1; 如CDH2; 例如是TGFB1; 如TGFB2; 例如是TGFB3; 如表皮生长因子受体的前体。

更优选细胞表面分子选自NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

本发明范围内的药物靶是分子，它可用作诱饵以鉴定与药物靶结合分子，因此是潜在的候选药物。当相应配制时，所述药物可特别用于治疗前恶性和/或恶性疾病。

5 本发明还涉及鉴定新药物靶的方法，所述药物靶可与本发明的结合配对物相互作用(见下文)。

优选所述新药物靶含有多肽，该多肽是以不同水平在恶性细胞和正常细胞中表达的细胞表面分子。

另外，本发明还涉及通过上述方法鉴定的新药物靶。

#### 鉴定结合配对物的方法

10 本发明还提供了鉴定特异性结合配对物的方法。另外，本发明提供了制备特异性结合配对物的方法。

可通过多种不同的方法鉴定/制备特异性结合配对物。根据特定的实施方案，本发明可以使用本领域技术人员已知的任何适当方法。

15 在本发明的一个实施方案中，通过制备特异性抗体的标准方法来制备结合配对物。例如，所述方法包括下述步骤：

i)用所述细胞表面分子或所述细胞表面分子的片段免疫动物；和

ii)从所述动物中获得抗体；或

iii)从所述动物中获得产生抗体的细胞，并从所述细胞中获得抗体。

20 被免疫的动物可以是任何动物，优选为哺乳动物，更优选动物选自兔、小鼠、大鼠、驴、山羊和绵羊。

抗体优选得自免疫动物的血清。可通过任何标准方法，例如通过亲和层析纯化抗体。如此获得的抗体优选为多克隆抗体。

25 产生抗体的细胞优选得自免疫动物的脾脏，优选细胞是B-细胞。从动物中纯化出产生抗体的细胞之后，可使该细胞与其它细胞融合以获得无限增殖化细胞。可在体外培养细胞，通过任何标准方法，如亲和层析或A蛋白或G蛋白层析，从组织培养上清液中回收抗体。这些抗体通常是单克隆抗体。

随后，可通过本领域技术人员已知的任何适当方法使抗体人源化。

然而，也可通过其它方法制备或鉴定抗体。例如，可从包括人的任何适当动物中纯化天然抗体。抗体也可得自表达文库(见下文)。

30 在本发明的另一个实施方案中，结合配对物由多肽组成，或含有多肽，通过筛选表达文库可鉴定所述多肽。本发明可以使用任何适当的表达文库。

文库可包含在任何适当的宿主细胞中，例如，宿主细胞可以是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。文库可含有编码得自任何物种，例如病毒、细菌、酵母、真菌、植物或动物的多肽和/或寡肽的核酸序列。动物可以是任何动物，优选为哺乳动物，更优选为人。文库也可含有编码合成和非天然多肽和/或寡肽的核酸序列。核酸序列可包含在任何适当的载体中，所述载体如质粒、病毒、病毒衍生的载体、噬菌体、人工染色体或粘粒。

例如，结合配对物可选自表达多肽和/或寡肽的表达文库。它们也可选自表达多肽和/或寡肽的合成组合文库。

10 通过筛选抗体的噬菌体展示文库，可进一步鉴定结合配对物。优选噬菌体展示文库是人抗体文库。

在另一个实施方案中，结合配对物选自小化合物文库。所述文库可含有任何数目的、可通过多种不同反应制备的不同化合物。适当的文库，例如组合文库是本领域技术人员已知的。

15 一旦鉴定/制备出可与细胞表面分子或细胞表面分子的片段结合的特异性结合配对物，应优选检测该结合配对物被内化的能力。根据结合配对物的性质，可以使用多种适当的方法进行所述检测。

例如，可使结合配对物与表达能同结合配对物结合的细胞表面分子或其片段的细胞一起保温。保温之后，可检测细胞内部结合配对物的存在和/或缺乏。例如，可利用结合配对物可能已被直接或间接可测的标记物标记来进行检测。或者，使用可与结合配对物特异性相互作用的第一类物质来测定结合配对物的存在。所述物质可被直接或间接标记，或者可使用第二类物质检测第一类物质，所述第二类物质可与第一类物质特异性相互作用，并且可被标记。可以使用能与第二类物质相互作用的第三类物质，能与第三类物质相互作用的第四类物质，依此类推。

### 结合配对物

本发明的特异性结合配对物能与至少一种细胞表面分子相互作用。然而，特异性结合配对物能与一种以上不同的细胞表面分子结合。

30 在本发明的一个实施方案中，结合配对物优选为在与细胞表面分子结合之后，能被内化至表达细胞表面分子的细胞中的结合配对物。

可通过上文所述的任何方法鉴定本发明的结合配对物。然而，也可以通过本领域技术人员已知的任何其它方法来鉴定结合配对物。

优选本发明的结合配对物能与一种或多种细胞表面分子结合，所述分子选自属于下列组之一的受体：

- 5 受体酪氨酸激酶成员
- 整联蛋白家族成员
- 免疫球蛋白超家族粘附分子成员
- 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族成员
- 硫酸软骨素蛋白聚糖家族成员
- 10 MAGE家族成员
- RAGE家族成员
- 低密度脂蛋白受体家族成员
- 钙粘蛋白粘附分子成员
- metabotropic谷氨酸受体成员
- 15 类固醇激素家族成员
- 7跨膜受体家族成员
- 心房利钠肽清除受体
- GFRA3
- 运铁蛋白受体
- 20 丝氨酸/苏氨酸激酶受体成员

更优选本发明的结合配对物能与一种或多种选自下列的细胞表面分子结合：NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

更优选结合配对物可与细胞表面分子的一个或多个片段结合。上文列出了细胞表面分子的优选片段。最优选细胞表面分子的片段得自细胞表面分子的胞外部分。

优选将本发明的结合配对物用于药物组合物以治疗前恶性和/或恶性疾病。

在本发明的一个实施方案中，结合配对物含有多肽或寡肽，或基本上由多肽或寡肽组成。本发明的多肽和/或寡肽可以是天然的，或者是合成的多肽。

在一个优选实施方案中，结合配对物是抗体或抗体的片段。抗体可以是多克隆抗体或其结合片段，或者是单克隆抗体或其结合片段。

5 抗体可以得自动物，优选得自哺乳动物，更优选得自选自大鼠、兔、小鼠、人、驴、山羊和绵羊等哺乳动物。在一个实施方案中，结合配对物是得自小鼠或大鼠的单克隆抗体，例如结合配对物是鼠单克隆抗体。

然而，抗体也可以是组合抗体，例如抗体的一部分可得自一个物种，其它部分可得自另一个物种。另外，抗体可以是非天然产生的合成抗体。

为了多个目的，优选抗体是人源化抗体。特别是，如果结合配对物应被用于治疗人的前恶性和/或恶性疾病，则需要抗体是人源化抗体。

10 抗体也可以是人抗体。人抗体可以是天然产生的人抗体，或者是从噬菌体展示文库中鉴定出的抗体。另外，抗体可以是还含有人抗体部分的组合抗体，例如从组合文库中鉴定出的抗体。所述抗体无需进一步人源化。

15 抗体优选与细胞表面分子的胞外部分(见下文)相互作用。抗体也可与细胞表面分子胞外部分的翻译后修饰产物结合。或者，抗体可与上文所述的细胞表面分子的任何片段相互作用。

最优选抗体能通过与所述细胞表面分子结合而被内化。很多种与细胞表面分子结合的抗体不能通过结合而被内化至表达细胞表面分子的细胞中。本发明范围内的优选抗体是在结合之后能被内化至表达细胞表面分子的细胞中的抗体。

20 在本发明的另一个实施方案中，结合配对物是所述细胞表面分子的天然配体。天然配体是化合物，它在天然条件下可与细胞表面分子结合。天然配体可以选自例如多肽、寡肽、激素、脂质、糖类、氨基酸、神经递质、核苷酸、核苷以及它们的组合。

25 激素可以是例如类固醇激素。类固醇激素可选自雄激素、雌激素、孕激素和肾上腺皮质激素。

雄激素可以选自例如睾酮、双氢睾酮、雄烯二醇、雄烯二酮、脱氢表雄酮(DHEA)、脱氢表雄酮硫酸酯(DHEA-S)及其衍生物。

雌激素可以选自例如estrion、雌二醇、雌三醇及其衍生物。

30 可通过适用于本实施方案之配体的任何常规技术，从包括人的动物中纯化天然配体。然而，也可通过本领域技术人员已知的任何方法，在体外产生天然配体。

在本发明的一个实施方案中，结合配对物是重组产生的、所述细胞表面分子的配体。如果配体是多肽或寡肽，通过用编码配体的核酸序列转化适当宿主，如细菌、酵母、原生动物、哺乳动物等动物、植物、动物细胞或植物细胞即可产生配体，所述核酸序列与介导该核酸序列在特定宿主中  
5 转录和/或翻译的核酸序列可操作相连。根据任何常规技术可进行转化。随后，可根据任何常规方法纯化配体。

在另一个实施方案中，结合配对物是病毒蛋白质，或者含有病毒蛋白质或其片段。多种病毒蛋白质能与细胞表面分子结合。所述结合经常导致病毒颗粒的内化，因此，病毒蛋白质是本发明的适当的结合配对物。

10 优选病毒蛋白质是病毒衣壳蛋白，更优选病毒衣壳蛋白能被内化至表达细胞表面分子的细胞中。

病毒蛋白质可得自任何病毒，优选为能感染天然表达细胞表面分子的细胞的病毒。病毒可以选自例如腺病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒和慢病毒家族的成员。

15 结合配对物可以重组产生(见上文)，并含有病毒衣壳蛋白序列。优选病毒衣壳蛋白序列是能与细胞表面分子结合并导致内化的病毒蛋白质的序列。

在本发明的另一个实施方案中，结合配对物是小化合物。所述小化合物通常是合成产生的。可通过本领域技术人员已知的任何方法或方法的组  
20 合来制备所述化合物。

优选的小化合物可与上文所述的细胞表面分子和/或细胞表面分子片段相互作用。更优选小化合物能被内化至表达所述细胞表面分子的细胞中。

在一个实施方案中，结合配对物可以是选自下列的多肽：EGF，TGF- $\alpha$ ，TGF- $\beta$ ，双调蛋白，HB-EGF，epiregulin， $\beta$ -动物纤维素，IGF-1，IGF-2，  
25 胶原，纤连蛋白，玻连蛋白，层粘连蛋白，淀粉样 $\beta$ -蛋白前体， $\gamma$ 干扰素，运铁蛋白，自泌活动因子，L1，NCAM，钙粘蛋白，铃蟾肽，神经调节肽B，TNF，红细胞生成素，白介素和缩胆囊肽B。另外，结合配对物可以是例如选自大麻素，乙酰胆碱，多巴胺，皮质去甲肾上腺素(norepinephrine)，5-羟色胺和GABA的有机化合物。另外，结合配对物可以是例如选自甲酰基肽和心  
30 房利钠肽的寡肽。另外，结合配对物可以是例如氨基酸，结合配对物可以是任何氨基酸，优选氨基酸选自谷氨酸，甘氨酸和组胺。另外，结合配对

物可以是例如选自ATP和GTP的核苷酸。另外，结合配对物可以是激素，如雌激素，脂质或糖类。

另外，本发明的结合配对物可选自：EGF，TGF- $\alpha$ ，遗传调节蛋白(heregulin)，胰岛素，IGF-1，PDGF，CSF-1，SCF，Flt-3L，VEGF，FGFs1-9，  
5 NGF，BDNF，NT-3，NT-4，HGF，MSP，Gas6，血管生成素-1，ephrinA1-5，ephrinB1-3，GDNF，PEPHC1，TGF- $\beta$ ，血管紧张肽，凝血酶，腺嘌呤核苷，肾上腺素，5-羟色胺， $\delta$ 啡肽，多巴胺，PTH，促胰液素，VIP，PACAP，胰高血糖素，CRF，铃蟾肽，缓激肽，NPY，谷氨酸，Ca<sup>2+</sup>，GABA，趋化因子和阿片样物质。

10 更优选结合配对物选自L-谷氨酸，红藻氨酸盐(kainite)，5-(溴甲基)-4-异噁唑丙酸()，谷氨酸类似物，取代的喹啉2,3二酮，GYKI52466，5-I-尿嘧啶丙氨酸(Willardine)，5-F-尿嘧啶丙氨酸，AMPA ((RS)- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸)的激动剂和拮抗剂配体，NBQX，CNQX，DNQX，GYKI  
15 52466，6-氯代犬尿喹啉酸，JSTX，L-APA，L-SOP，ACPT，(R,S)-PPG，CPPG，MAP4，(S)-3,4-DCPG，玻连蛋白，cytactin，纤连蛋白，血纤蛋白原，层粘连蛋白，MMP-2，骨桥蛋白，凝血酶原，血小板反应蛋白，von Willebrandts因子，L1CAM的重组片段，青霉素N(salmosin)，E-钙粘蛋白及其肽，包括肽：NRDKETKV，NCAM1结构域IgI+II，NCAM1结构域IgIII及其肽，肽C3：ASKKPKRNIKA(SEQ ID NO:305)，D3：AKKERQRKD TU(SEQ  
20 ID NO:306)，D4：ARALNWGAKP(SEQ ID NO:307)，单克隆抗体123C3，NPTX1，NPTX2，泰攀蛇毒素，TCBP49，Oxynor，ApoE2，ApoE3，ApoE4，ApoE的肽(E<sub>(141;-155)</sub>)<sub>2</sub>；LRKLRKRLLRDADDL (SEQ ID NO:308)及其串联序列E<sub>(141;-155)</sub>)<sub>2</sub>；LRKLRKRLLRDADDL- LRKLRKRLLRDADDL (SEQ ID NO:308 串联序列))，reelin，烟碱，乙酰胆碱， $\alpha$ -银环蛇毒素和卡巴胆碱(carbachol)。

25 应根据本发明具体实施方案中使用的细胞表面分子选择本发明的结合配对物。

因此，在细胞表面分子能内化结合配对物或靶向复合物的本发明实施方案中，优选结合配对物选自NCAM1结构域IgI+II，NCAM1结构域IgIII及其肽，肽C3：ASKKPKRNIKA (SEQ ID NO:305)，D3：AKKERQRKDTU(SEQ  
30 ID NO:306)，D4：ARALNWGAKP(SEQ ID NO:307)，单克隆抗体123C3，NPTX1，NPTX2，泰攀蛇毒素，TCBP49，Oxynor，ApoE2，ApoE3，ApoE4，

ApoE的肽(E<sub>(141;-155)2</sub>; LRKLRKLLRDADDL(SEQ ID NO:308)及其串联序列 E<sub>(141;-155)2</sub>; LRKLRKLLRDADDL- LRKLRKLLRDADDL(SEQ ID NO:308 串联序列)), reelin, 烟碱, 乙酰胆碱,  $\alpha$ -银环蛇毒素, 卡巴胆碱和抗所述细胞表面分子的特异性内化抗体。

5 在细胞表面分子不能内化结合配对物或靶向复合物的本发明实施方案中, 优选结合配对物选自L-谷氨酸, 红藻氨酸盐, 5-(溴甲基)-4-异噁唑丙酸(), 谷氨酸类似物, 取代的喹喔啉2,3二酮, GYKI52466, 5-I-尿嘧啶丙氨酸, 5-F-尿嘧啶丙氨酸, AMPA ((RS)- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸)的激动剂和拮抗剂配体, NBQX, CNQX, DNQX, GYKI 52466, 6-氯代犬尿喹啉酸, JSTX, L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, MAP4, (S)-3,4-DCPG, 10 玻连蛋白, cytactin, 纤连蛋白, 血纤蛋白原, 层粘连蛋白, MMP-2, 骨桥蛋白, 凝血酶原, 血小板反应蛋白, von Willebrandts因子, L1CAM的重组片段, 青霉素N, E-钙粘蛋白及其肽, 包括肽: NRDKETKV(SEQ ID NO:309)和抗所述细胞表面分子的特异性抗体。

15 在本发明特别优选的一个实施方案中, 细胞表面分子是NCAM1。当细胞表面分子是NCAM1时, 优选结合配对物选自NCAM1的第一和第二免疫球蛋白结构域(Ig)(Kiselyov等, 1997), NCAM1的第三Ig结构域, 粘附分子L1和蛋白聚糖。另外, 优选结合配对物选自能与NCAM结合的合成结合配对物, 包括例如从组合肽文库中鉴定出的多种肽(11个氨基酸) (R $\phi$ nn等, 1999), 包 20 括例如C3: ASKKPKRNIKA (SEQ ID NO:305), D3: AKKERQRKDTU (SEQ ID NO:306)和D4: ARALNWGAKP(SEQ ID NO:307)(R $\phi$ nn等, 1999)。另外, 优选结合配对物选自抗NCAM1的抗体, 优选为抗NCAM1的单克隆抗体, 例如导致内化的抗体(123C3)。

在本发明的另一个优选实施方案中, 细胞表面分子是NPTXR。当细胞 25 表面分子是NPTXR时, 优选结合配对物选自神经元正五聚蛋白 1(NP1, NPTX1)和神经元正五聚蛋白 2(NP2, NPTX2)(Kirkpatrick等, 2000; Dodds等, 1997)。另外, 优选结合配对物选自蛇毒液泰攀蛇毒素和泰攀蛇毒素相关的钙-结合蛋白49(TCBP49)以及泰攀蛇毒素类似物Oxynor。另外, 优选结合配对物选自抗NPTXR抗体, 优选为抗NPTXR的单克隆抗体。

30 在本发明的另一个优选实施方案中, 细胞表面分子是LRP8。当细胞表面分子是LRP8时, 优选结合配对物选自ApoE2, ApoE3, ApoE4和reelin。

另外，优选结合配对物选自多种重组的ApoE同种型，其中的一些可以购买得到。然而，天然ApoE同种型能与几种受体结合。另外，优选结合配对物选自ApoE的肽，例如(E<sub>(141;-155)</sub>)<sub>2</sub>；LRKLRKLLRDADDL(SEQ ID NO:308)及其串联序列E<sub>(141;-155)</sub><sub>2</sub>；LRKLRKLLRDADDL-LRKLRKLLRDADDL)，  
5 已证实这两种肽可抑制受体功能(Riddel等, 1999)。另外，优选结合配对物选自抗LRP8抗体，优选为抗LRP8的单克隆抗体。

在本发明的另一个优选实施方案中，细胞表面分子是CHRNA5。当细胞表面分子是CHRNA5时，优选结合配对物选自烟碱，乙酰胆碱和毒素 $\alpha$ -银环蛇毒素。另外，结合配对物可选自CHRNA5的合成激动剂，例如卡巴  
10 胆碱。另外，优选结合配对物选自抗CHRNA5抗体，优选为抗CHRNA5的单克隆抗体。

在本发明的另一个优选实施方案中，细胞表面分子是L1CAM。当细胞表面分子是L1CAM时，结合配对物含有例如整联蛋白家族的粘附分子或其片段。已知L1CAM可通过RGD序列结合整联蛋白家族的几种粘附分子，通  
15 过寡甘露糖苷糖类结合免疫球蛋白家族的几种粘附分子。另外，优选结合配对物选自抗L1CAM抗体，优选为抗L1CAM的单克隆抗体。

在本发明的另一个优选实施方案中，细胞表面分子是TNFRSF12。当细胞表面分子是TNFRSF12时，结合配对物是例如抗TNFRSF12抗体，优选为抗TNFRSF12的单克隆抗体，例如抗TNFRSF12胞外结构域的单克隆抗体。  
20

在本发明的一个特别优选的实施方案中，细胞表面分子是GRIA2。当细胞表面分子是GRIA2时，优选结合配对物选自L-谷氨酸和红藻氨酸盐。另外，优选结合配对物选自GRIA2的合成配体，例如AMPA ((RS)- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸)受体的激动剂和拮抗剂配体。AMPA受体配体一般是谷氨酸类似物或取代的喹啉2,3二酮。拮抗剂被分为竞争和调制位点拮  
25 抗剂(评述于(Brauner-Osborne等, 2000; Madsen等, 2001))。另外，已证实一种AMPA拮抗剂GYKI52466可抑制表达GRIA2受体之细胞上的肿瘤细胞生长(Cavalheiro and Olney, 2001)。由于配体的受体结合涉及到配体主要部分的结合，因此，仅可在很少的几个位点处进行取代(如卤素)。已证实AMPA的溴取代形式(ABPA)可用作AMPA受体的强激动剂(Krogsgaard-Larsen等, 1985)。  
30 激动剂也可以是卤素化形式的激动剂，例如willardiine及其具有不同AMPA受体亲和性的类似物(Jane. D, 2001)。它们中有很多表现出比AMPA本身高很

多倍的对AMPA受体的亲和性。willardiine及6-azowillardiine卤素化类似物的合成详细描述于Jane等,1997。5-I-尿嘧啶丙氨酸和5-F-尿嘧啶丙氨酸可以商购,它们皆为<sup>3</sup>H-型。另外,结合配对物可选自小分子拮抗剂,如可商购的NBQX, CNQX, DNQX, GYKI 52466和6-氯代犬尿喹啉酸,以及与蜘蛛毒素JSTX-3有关的AMPA受体通道的较大聚胺拮抗剂(Yoneda等,2001)。另外,5 优选结合配对物选自抗GRIA2抗体,优选为抗GRIA2单克隆抗体。

在本发明的另一个优选实施方案中,细胞表面分子是GRM8。当细胞表面分子是GRM8时,优选结合配对物为L-谷氨酸。另外,优选结合配对物选自激动剂和拮抗剂,例如可商购的L-APA, L-SOP, ACPT, (R,S)-PPG, CPPG, 10 MAP4, (S)-3,4-DCPG和MSOP及其<sup>3</sup>H标记形式。其中一个激动剂(R,S)-PPG对GRM8的偏好性为25倍(Gasparini等,1999),激动剂(S)-3,4-DCPG对GRM8的选择性为100倍以上(Bruno等,2001; Thomas等,2001; Turner and Salt,1999)。另外,优选结合配对物选自抗GRM8抗体,优选为抗GRM8单克隆抗体。

15 在本发明的另一个优选实施方案中,细胞表面分子是ITGAV。当细胞表面分子是ITGAV时,优选结合配对物选自玻连蛋白, cytactin, 纤连蛋白, 血纤蛋白原, 层粘连蛋白, MMP-2, 骨桥蛋白, 凝血酶原, 血小板反应蛋白, von Willebrandts因子和 $\alpha v \beta 3$ 。已证实 $\alpha v \beta 3$ 可通过 $\alpha v$ 亚单位结合神经细胞粘附分子L1的重组片段(Montgomery等,1996)。如玻连蛋白的天然配体也是多种其它的、遍在表达的整联蛋白的配体,因此不适于特异性靶向。另20 外,优选结合配对物选自disintegrin和ADAM,例如青霉素N或contortrostatin。Disintegrin和ADAM(一种Disintegrin和一种金属蛋白酶)是多种得自蛇毒液的蛋白质,它们以不同的特异性与不同的整联蛋白结合(Evans,2001; Huang,1998)。已鉴定出几种特异于 $\alpha v \beta 3$ 和 $\alpha v \beta 5$ 的disintegrin,包括重组产生的青25 霉素N(Kang等,1999)和contortrostatin(Mercer等,1998)。另外,优选结合配对物选自身为 $\alpha v \beta 3$ 结合的拮抗剂的小环形肽和非-肽化合物(Boger等,2001; Hartman and Duggan,2000; Kerr等,2000; Batt等,2000)。另外,优选结合配对物选自抗ITGAV抗体,优选为抗ITGAV单克隆抗体。

30 在本发明的另一个优选实施方案中,细胞表面分子是ITGAE。当细胞表面分子是ITGAE时,优选结合配对物是细胞粘附分子E-钙粘蛋白或其片段。E-钙粘蛋白上针对 $\alpha E \beta 7$ 的异嗜性结合位点与E-钙粘蛋白同另一种E-钙

粘蛋白的同嗜性结合位点有所不同(Karecla等, 1996; Taraszka等, 2000)。优选片段含有得自E-钙粘蛋白第一结构域的短肽序列(氨基酸27-34: NRDKETKV(SEQ ID NO:309)), 或甚至更优选所述片段由所述短肽序列组成, 所述短肽序列能干扰 $\alpha$ E $\beta$ 7与E-钙粘蛋白的结合。另外, 结合配对物可  
5 选自特异性的 $\alpha$ E $\beta$ 7特异性肽(Brenner and Cepek, 2001)。另外, 优选结合配对物选自抗ITGAE抗体, 优选为抗ITGAE单克隆抗体, 如可用作拮抗剂的 $\alpha$ E特异性抗体。

### 复合物

在一个实施方案中, 本发明涉及含有细胞表面分子和结合配对物的复  
10 合物。优选细胞表面分子是通过本发明所述方法鉴定出的细胞表面分子。优选细胞表面分子含有下述物质或基本上由下述物质组成, 或例如是GRIA2, 如LPR8, 例如是CHRNA5, 如TMEFF, 例如是NPTXR, 如运铁蛋白受体; 如II型膜蛋白克隆: 例如是HP10481; 如II型膜蛋白克隆: 如HP10390; 例如是PG40; 如TRC8; 例如是TR2-11; 如OA3抗原表面决定簇; 例如是整  
15 联蛋白 $\alpha$ 6, 例如GPIIb; 如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位; 例如是整联蛋白 $\alpha$ -7; 如整联蛋白 $\alpha$ E前体; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B; 如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位; 例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位; 如整联蛋白 $\alpha$ -3链; 例如是RYK; 如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1; 例如是推定的跨膜GTP酶; 如膜辅因子蛋白; 例如GLVR1; 例如是Mr110,000抗原, 例如是多配体聚糖-1; 如推定的有7个跨膜结构域的蛋白  
20 质; 例如是LCA-同系物/LAR蛋白; 如M6抗原; 例如是Me491/CD63抗原; 如多跨越膜蛋白; 例如是DDR; 如自泌活动因子受体; 例如是胰岛素受体前体; 如IGF1R, 例如是胰岛素-样生长因子II受体; 如SAS; 例如是TAPA-1; 如MICB; 例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链; 如HLA-DP; 例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖; 如CAR; 例如是MEA11; 如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$   
25 链; 例如是多聚免疫球蛋白受体; 如metabotropic谷氨酸受体4型; 例如是metabotropic谷氨酸受体8; 如CLPTM1, 例如是MAGE-4b; 如MAGE5a; 例如是MAGE-3; 例如MAGE-1; 例如是MAGE6; 如MAGE-9; 例如是MAGE11; 如CD24; 例如是CD59; 如CD44; 例如是低密度脂蛋白受体; 如极低密度脂蛋白受体; 例如是N-CAM; 如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2; 例如是  
30 推定的T1/ST2受体结合蛋白前体; 如NTR2受体; 例如是RAGE-4; 如HLA-G1; 例如是MOAT-C; 如 $\alpha$ 2  $\delta$ 钙通道亚单位同种型I; 例如是LFA-3;

如L1-CAM; 例如是AVPR2; 如C1 p115 C1; 例如是TE2; 如RbP; 例如是HCF1; 如IRAK; 例如是CD151; 如表面抗原; 例如是MAG; 如GPR19; 例如是pcta-1; 如PRAME; 例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白; 如5-羟色胺受体5-HT4B; 例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~); 如CD9; 例如是LDL受体成员LR3; 如DR6; 例如是肿瘤坏死因子受体; 如HG38; 例如是尿激酶型纤溶酶受体; 如FGF受体; 例如是神经生长因子受体; 如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白; 例如是CB1大麻素受体(CNR1); 如PSG; 例如是PSG13'; 如CPE-受体; 例如是CRH2R; 如OCI5; 例如是TRAIL受体2; 如HNMP-1; 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体; 如红细胞生成素受体; 例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1; 例如是mGluR1 $\beta$ ; 如CD97; 例如是L6; 如NY-ESO-1; 例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ; 如ror1; 例如是ror2; 如SSTR2; 例如是VESPR; 如IgG Fc受体; 例如是谷氨酸受体亚单位GluRC; 如HEK2; 例如是PVR; 如CEA; 例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61; 如HER2; 例如是HER3; 如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357; 例如是推定的B-型内皮受体-样蛋白; 如GLVR2; 例如是P2X4嘌呤受体; 如FPRL1; 例如是心房利钠肽清除受体; 例如是胃泌素/CCK-B受体; 如神经调节肽B受体; 例如是GFRA3; 如GRPR; 例如是CDH1; 如CDH2; 例如是TGFBR1; 如TGFBR2; 例如是TGFBR3; 如表皮生长因子受体的前体。

更优选细胞表面分子选自:

- 20 受体酪氨酸激酶成员  
 整联蛋白家族成员  
 免疫球蛋白超家族粘附分子成员  
 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族成员  
 硫酸软骨素蛋白聚糖家族成员
- 25 MAGE家族成员  
 RAGE家族成员  
 低密度脂蛋白受体家族成员  
 钙粘蛋白粘附分子成员  
 metabotropic谷氨酸受体成员
- 30 类固醇激素家族成员  
 7跨膜受体家族成员

心房利钠肽清除受体

GFRA3

运铁蛋白受体

丝氨酸/苏氨酸激酶受体成员

- 5 更优选细胞表面分子选自NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

### 靶向复合物

本发明提供了靶向复合物，其含有结合配对物和生物反应物质。结合配对物应能与上文所述的一种或多种细胞表面分子或其片段结合。

- 10 在本发明的一个优选实施方案中，能与靶向复合物的结合配对物结合的细胞表面分子能内化靶向复合物。然而，在本发明的另一个优选实施方案中，细胞表面分子不能内化靶向复合物，而仅能与靶向复合物结合。

- 更优选细胞表面分子含有下述物质或基本上由下述物质组成，或例如是运铁蛋白受体；如II型膜蛋白克隆：例如是HP10481；如II型膜蛋白克隆：如HP10390；例如是PG40；如TRC8；例如是TR2-11；如OA3抗原表面决定簇；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6，例如GPIIb；如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位；例如是整联蛋白 $\alpha$ -7；如整联蛋白 $\alpha$ E前体；例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B；如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位；例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位；如整联蛋白 $\alpha$ -3链；例如是RYK；如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1；例如是推定的跨膜GTP酶；如膜辅因子蛋白；例如
- 20 GLVR1；例如是Mr110,000抗原，例如是多配体聚糖-1；如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质；例如是LCA-同系物/LAR蛋白；如M6抗原；例如是Me491/CD63抗原；如多跨越膜蛋白；例如是DDR；如自泌活动因子受体；例如是胰岛素受体前体；如IGF1R，例如是胰岛素-样生长因子II受体；如SAS；例如是TAPA-1；如MICB；例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -
- 25 链；如HLA-DP；例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖；如CAR；例如是MEA11；如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链；例如是多聚免疫球蛋白受体；如metabotropic谷氨酸受体4型；例如是metabotropic谷氨酸受体8；如CLPTM1，例如是MAGE-4b；如MAGE5a；例如是MAGE-3；例如MAGE-1；例如是MAGE6；如MAGE-9；例如是MAGE11；如CD24；例如是CD59；如CD44；例如是低
- 30 密度脂蛋白受体；如极低密度脂蛋白受体；例如是N-CAM；如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2；例如是推定的T1/ST2受体结合蛋白前体；如NTR2

受体；例如是RAGE-4；如HLA-G1；例如是MOAT-C；如 $\alpha 2 \delta$ 钙通道亚单位同种型I；例如是LFA-3；如L1-CAM；例如是AVPR2；如C1 p115 C1；例如是TE2；如RbP；例如是HCF1；如IRAK；例如是CD151；如表面抗原；例如是MAG；如GPR19；例如是pcta-1；如PRAME；例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白；如5-羟色胺受体5-HT4B；例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D~)；如CD9；例如是LDL受体成员LR3；如DR6；例如是肿瘤坏死因子受体；如HG38；例如是尿激酶型纤溶酶受体；如FGF受体；例如是神经生长因子受体；如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白；例如是CB1大麻素受体(CNR1)；如PSG；例如是PSG13'；如CPE-受体；例如是CRH2R；如OCI5；

10 例如是TRAIL受体2；如HNMP-1；例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体；如红细胞生成素受体；例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1；例如是mGluR1 $\beta$ ；如CD97；例如是L6；如NY-ESO-1；例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ；如ror1；例如是ror2；如SSTR2；例如是VESPR；如IgG Fc受体；例如是谷氨酸受体亚单位GluRC；如HEK2；例如是PVR；如CEA；例如是CC-趋化因子-结合受体

15 JAB61；如HER2；例如是HER3；如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357；例如是推定的B-型内皮肤受体-样蛋白；如GLVR2；例如是P2X4嘌呤受体；如FPRL1；例如是心房利钠肽清除受体；例如是胃泌素/CCK-B受体；如神经调节肽B受体；例如是GFRA3；如GRPR；例如是CDH1；如CDH2；例如是TGFR1；如TGFR2；例如是TGFR3；如表皮

20 生长因子受体的前体，更优选细胞表面分子选自属于下列组之一的受体：

受体酪氨酸激酶成员

整联蛋白家族成员

免疫球蛋白超家族粘附分子成员

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族成员

25 硫酸软骨素蛋白聚糖家族成员

MAGE家族成员

RAGE家族成员

低密度脂蛋白受体家族成员

钙粘蛋白粘附分子成员

30 metabotropic谷氨酸受体成员

类固醇激素家族成员

7跨膜受体家族成员

心房利钠肽清除受体

GFRA3

运铁蛋白受体

5 丝氨酸/苏氨酸激酶受体成员

甚至更优选细胞表面分子选自NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

10 本发明的生物反应物质可以是任何能直接或间接对靶细胞发挥生物学作用,并能内化靶向构建体的物质,其中靶细胞是任何表达细胞表面分子的细胞。本发明的生物学作用可选自例如细胞周期停滞,保护细胞以对抗毒素和细胞死亡。

生物反应物质可以是任何化合物,例如可以是核酸序列,多肽,寡肽,毒素,小化合物或放射性同位素。

15 在一个优选实施方案中,生物反应物质是核酸序列。优选核酸序列含有与含表达信号的第一核酸序列可操作相连的第二核酸序列。

20 在一个优选实施方案中,第二核酸序列编码治疗蛋白质(见下文)。编码治疗蛋白质的核酸序列可含有互补的DNA(cDNA)。本文所用术语“cDNA”欲指使用信使RNA(mRNA)作为模板制备的DNA。使用cDNA,而不是基因组DNA或由基因组DNA聚合得到的DNA或未-加工或部分-加工的RNA模板的优点是:cDNA不含任何非-编码的内含子序列,但含有相应蛋白质的不间断的编码区。然而,有时常会优选完整或部分基因组序列,例如当需要非-编码区才能进行最适表达时。

25 在另一个实施方案中,第二核酸序列编码反义RNA或反义RNA的一部分。或者,第二核酸序列可含有反义RNA或反义RNA的一部分,或者基本上由反义RNA或反义RNA的一部分组成。

在本发明的上下文中,术语“反义RNA”欲包括由基因的非-编码DNA链转录的RNA序列,或能在严紧条件下与mRNA或其片段杂交的RNA序列。

30 优选本发明上下文中的反义RNA是蛋白质编码基因的反义RNA,所述蛋白质能促进细胞存活,细胞生长和/或细胞移动。更优选反义RNA是癌基因或生长因子的反义RNA。

在另一个实施方案中，第二核酸序列编码或含有核酶。本发明上下文中的核酶是含有酶活性的分子，其含有至少一种RNA。优选本发明的核酶被靶向癌基因或原癌基因或生长因子的RNA。

因此，在本发明的优选实施方案中，反义RNA或核酶被靶向癌基因或原癌基因或生长因子的RNA。生长因子的例子如下文所述。

癌基因是一类多种多样的基因，其产物可导致癌症的发生和/或发展。原癌基因在某种情况下，或在突变之后，会导致癌症的发生和/或发展。癌基因或原癌基因可选自例如Ras, Raf, Myc, Syn, Pim, BMI-1, FOP, Sis, KGF, Fms, Flg, Neu, Trk, Kit, Met, Src, Fyn, Mas, Fes/Fps, Tre, Mer, ABL, BCL3, int-2, Cym, Ets, Elk, RhoA, Ski, Wnt-5a, Spi-1, Rap2, p55和c-tyr。以上仅是举例，而并未穷举可用于本发明的癌基因和原癌基因。

第二核酸序列也可编码肿瘤抑制基因，所述基因可被导入表达细胞表面分子的细胞，以校正细胞内所述肿瘤抑制基因的任何内源性突变。肿瘤抑制基因可以是任何肿瘤抑制基因，例如下文所述的任何肿瘤抑制基因。

本发明的第一核酸序列优选含有表达信号。所述表达信号应优选影响与之可操作相连的第二核酸序列的转录。优选本发明的第一核酸序列影响转录，例如它们能在特定情况下增强转录。

在本发明的一个实施方案中，第一核酸序列含有表达信号，该信号能介导第二核酸序列在恶性细胞中以相对于非-恶性细胞而言较低的水平表达。在另一个实施方案中，第一核酸序列含有表达信号，所述信号能介导第二核酸序列在恶性细胞中以与非-恶性细胞差不多相同的水平表达。

然而，在本发明的优选实施方案中，第一核酸序列介导第二核酸序列在恶性细胞中以相对于非-恶性细胞而言较高的水平表达。特别是第一核酸序列可选自根据上文所述方法鉴定出的第一核酸序列。

优选第一核酸序列选自：pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12, pro13, pro14, pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23, pro24, pro25, pro26, pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36, pro37, pro38, pro39, pro40, pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47, pro48, pro49, pro50, pro51, pro52, pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58, pro59, pro60, pro61, pro62, pro63, pro64, pro65, pro66, pro67, pro68, pro69, pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76, pro77,

pro78, pro79, pro80, pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88,  
pro89, pro90, pro91, pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99,  
pro100, pro101, pro103, pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109,  
pro110, pro111, pro112, pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119,  
5 pro120, pro121, pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128,  
pro129, pro130, pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138,  
pro139, pro140, pro141, pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147,  
pro148, pro149, pro150, pro152, pro153, pro154, pro155, pro156, pro157,  
pro158, pro159, pro160, pro161, pro162, pro163, pro164, pro165, pro166,  
10 pro167, pro168, pro169, pro171, pro172, pro173, pro174, pro175, pro176,  
pro177, pro178, pro179, pro180, pro181, pro182, pro183, pro184, pro185,  
pro187, pro189, pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197, pro198,  
pro199, pro201, pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro208,  
pro209, pro210, pro211, pro212, pro213, pro215, pro216, pro217, pro219,  
15 pro220, pro221, pro222, pro223, pro224, pro225, pro226, pro227, pro228,  
pro229, pro230, pro231, pro232, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237,  
pro238, pro239, pro240, pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246,  
pro247, pro248, pro249, pro250, pro251, pro253, pro254, pro255, pro256,  
pro257, pro258, pro259, pro260, pro262, pro263, pro264, pro267, pro268,  
20 pro269, pro270, pro271, pro272, pro273, pro275, pro277, pro278, pro279,  
pro280, pro282, pro283, pro284, pro285, pro286, pro287, pro289, pro290,  
pro291, pro292, pro293, pro294, pro295, pro296, pro297, pro298, pro299,  
pro300, pro301, pro302, pro303, pro304, pro305, pro306, pro307, pro308,  
pro309, pro310, pro311, pro312, pro313, pro315, pro316, pro317, pro318,  
25 pro319, pro320, pro321, pro322, pro323, pro324, pro326, pro327, pro328,  
pro329, pro330, pro331, pro332, pro333, pro334, pro335, pro336, pro337,  
pro338, pro339, pro340, pro341, pro344, pro346, pro347, pro348, pro349,  
pro352, pro353, pro354, pro355, pro356, pro358, pro359和pro361。

第一核酸序列可进一步含有选自下列的核酸序列片段和/或基本上由所  
30 述片段组成: pro1, pro2, pro3, pro4, pro5, pro6, pro7, pro8, pro9, pro10, pro12,  
pro13, pro14, pro15, pro16, pro17, pro18, pro19, pro20, pro21, pro22, pro23,

pro24, pro25, pro26, pro27, pro28, pro29, pro30, pro31, pro32, pro34, pro36,  
pro37, pro38, pro39, pro40, pro41, pro42, pro43, pro44, pro45, pro46, pro47,  
pro48, pro49, pro50, pro51, pro52, pro53, pro54, pro55, pro56, pro57, pro58,  
5 pro70, pro71, pro72, pro73, pro74, pro75, pro76, pro77, pro78, pro79, pro80,  
pro81, pro82, pro83, pro84, pro85, pro86, pro87, pro88, pro89, pro90, pro91,  
pro92, pro93, pro94, pro95, pro96, pro97, pro98, pro99, pro100, pro101, pro103,  
pro104, pro105, pro106, pro107, pro108, pro109, pro110, pro111, pro112,  
pro113, pro114, pro115, pro116, pro117, pro118, pro119, pro120, pro121,  
10 pro122, pro123, pro124, pro125, pro126, pro127, pro128, pro129, pro130,  
pro131, pro133, pro134, pro135, pro136, pro137, pro138, pro139, pro140,  
pro141, pro142, pro143, pro144, pro145, pro146, pro147, pro148, pro149,  
pro150, pro152, pro153, pro154, pro155, pro156, pro157, pro158, pro159,  
pro160, pro161, pro162, pro163, pro164, pro165, pro166, pro167, pro168,  
15 pro169, pro171, pro172, pro173, pro174, pro175, pro176, pro177, pro178,  
pro179, pro180, pro181, pro182, pro183, pro184, pro185, pro187, pro189,  
pro191, pro193, pro194, pro195, pro196, pro197, pro198, pro199, pro201,  
pro202, pro203, pro204, pro205, pro206, pro207, pro208, pro209, pro210,  
pro211, pro212, pro213, pro215, pro216, pro217, pro219, pro220, pro221,  
20 pro222, pro223, pro224, pro225, pro226, pro227, pro228, pro229, pro230,  
pro231, pro232, pro233, pro234, pro235, pro236, pro237, pro238, pro239,  
pro240, pro241, pro242, pro243, pro244, pro245, pro246, pro247, pro248,  
pro249, pro250, pro251, pro253, pro254, pro255, pro256, pro257, pro258,  
pro259, pro260, pro262, pro263, pro264, pro267, pro268, pro269, pro270,  
25 pro271, pro272, pro273, pro275, pro277, pro278, pro279, pro280, pro282,  
pro283, pro284, pro285, pro286, pro287, pro289, pro290, pro291, pro292,  
pro293, pro294, pro295, pro296, pro297, pro298, pro299, pro300, pro301,  
pro302, pro303, pro304, pro305, pro306, pro307, pro308, pro309, pro310,  
pro311, pro312, pro313, pro315, pro316, pro317, pro318, pro319, pro320,  
30 pro321, pro322, pro323, pro324, pro326, pro327, pro328, pro329, pro330,  
pro331, pro332, pro333, pro334, pro335, pro336, pro337, pro338, pro339,

pro340, pro341, pro344, pro346, pro347, pro348, pro349, pro352, pro353, pro354, pro355, pro356, pro358, pro359和pro361。

甚至更优选第一核酸序列选自pro221, pro210, pro71, pro41, pro30, pro2, pro209, pro14, pro4, pro8, pro246, pro16, pro27, pro5, pro49, pro19, pro140, 5 pro139, pro207, pro81, pro273和pro362及其片段。

第一核酸序列还含有一个以上选自上述组的核苷酸序列片段。

本发明还包括：第一核酸序列进一步含有与其非天然相连的核酸序列。与其非天然相连的核酸序列可以是例如转录因子结合位点，优选为一个或多个类固醇激素受体结合位点。

10 在本发明的优选实施方案中，第一核酸序列可以是任何如上所述的第一核酸序列。

在某些实施方案中，核酸序列稳定整合至细胞的基因组中。可通过同源重组在关联的位置和方向上进行整合(基因置换)，或者也可以在随机的非-特异性位置进行整合(基因增大)。在其它实施方案中，核酸序列作为独立的附加型DNA区段在细胞中稳定维持。所述核酸区段或“附加体”编码的序列足以允许独立于宿主细胞周期或与所述周期同步进行维持和复制。

除了结合配对物和生物反应物质以外，靶向复合物还含有其它组分。其它组分可以是例如保护性成分。

20 当生物反应物质是核酸时，靶向复合物还可含有保护性加帽，其中所述保护性加帽由与第一和/或第二核酸序列结合的核酸序列组成。具有保护特性的核酸序列可含有例如经修饰的核苷酸。例如，经修饰的核苷酸可以被一个或多个氨基酸，胺基或生物素基团修饰。

25 在本发明的一个实施方案中，生物反应物质是毒素。毒素是任何对表达细胞表面分子的细胞有毒的物质。例如，毒素可选自蓖麻毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素、链脲菌素或霍乱毒素。然而，所列出的毒素是不完全的，本发明所用毒素不限于此。

在本发明的另一个实施方案中，生物反应物质是细胞凋亡诱导物。在本发明的意义上，细胞凋亡诱导物就是任何能直接或间接诱导表达细胞表面分子的细胞发生凋亡的化合物。

30 细胞凋亡诱导物可以是多肽(见下文)，或者可以是任何其它类型的化合物。例如，细胞凋亡诱导物可选自视黄酸、A23187、冈田酸、嘌呤霉素、

星形孢菌素、毒胡萝卜素、放线菌素D、喜树碱、放线菌酮、地塞米松、依托泊苷(etoposide)和糖皮质激素。然而,本发明还包括任何其它的细胞凋亡诱导物。

在本发明的另一个实施方案中,生物反应物质是放射性同位素。放射性同位素可选自(125)I、(131)I、(123)I、(111)In、(205)Bi、(206)Bi、(213)Bi、(186)Re、(188)Re、(225)Ac、<sup>99m</sup>Tc、(68)Ga、(62)Cu、(90)Y、(64)Cu、(211)At、(212)Bi、(177)Lu、(153)Sm和(157)Gd。在一个实施方案中,放射性活性物质可与另一种物质共价连接,例如,放射性物质可与结合配对物共价连接。

在本发明的另一个实施方案中,生物反应物质是细胞静止剂。细胞静止剂可以是例如能用于化学疗法的药物。下文将提及适用于化学疗法的药物。

本发明的生物反应物质可以是激素的拮抗剂,优选为选自雌激素、雄激素、孕酮、LH和RH的激素的拮抗剂。

雄激素可选自例如睾酮、双氢睾酮、雄烯二醇、雄烯二酮、脱氢表雄酮(DHEA)、脱氢表雄酮硫酸酯(DHEA-S)及其衍生物。

雌激素可以选自例如estrion、雌二醇、雌三醇及其衍生物。

或者,生物反应物质可以是aromatase抑制剂。

在本发明的一个优选实施方案中,生物反应物质含有多肽或基本上由多肽组成。特别是,所述多肽可以是治疗蛋白质。

术语“治疗蛋白质”欲指任何为了细胞的潜在利益而导入细胞或含有所述细胞的生物体的多肽。治疗蛋白质可属于多个不同的类别。例如,治疗蛋白质可以是肿瘤抑制因子、毒性物质或细胞凋亡诱导物。本发明的治疗蛋白质可以是对细胞周期停滞起作用的蛋白质。

在癌症治疗形式中,特别有用的基因是肿瘤抑制基因。在将正常细胞转化为致瘤性细胞的过程中,据认为肿瘤抑制基因的突变起着重要作用。肿瘤抑制基因的一个最重要的功能是减弱细胞分裂和介导突变细胞的细胞凋亡。肿瘤抑制基因是高效的,以致于需要突变肿瘤抑制基因的两个等位基因才能消除其功能。因此,将功能性肿瘤抑制基因导入具有突变表型的癌细胞经常足以诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。p53、p73和p16是肺癌中经常突变的肿瘤抑制基因。使用治疗基因-传递载体将这些基因的野生型形式导入癌细胞以诱导细胞凋亡是一种可以使用的、选择性杀死癌细胞的方法。

有多种肿瘤抑制基因是本领域技术人员众所周知的，优选的例子包括p53、p73、p16、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC和MCC。所列的例子并未穷举本领域已知的多种肿瘤抑制基因，而只是更常用的肿瘤抑制基因的例子。

5 优选治疗蛋白质是选自下列的肿瘤抑制基因：p73、p16、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-II、BRCA1、VHL、FCC、MCC、MSH2、PTCH、DPCH、TSC2、CDKN2A和ARF。更优选治疗蛋白质是p53。

癌症疗法的重要终点是杀死或清除癌细胞。诱发此事件的常用方法之一是将野生型p53导入具有突变p53的癌细胞中，导致细胞周期停滞并诱导  
10 细胞凋亡。使用p53作为治疗基因取决于癌细胞中内源性p53的状况。野生型过表达经常是有效的，然而，p53和细胞周期调节基因，如p16同时过表达可增强效果。其它细胞周期调节基因，如p15，p17，p18或p19与p53或p53家族的其它基因，如p73联合使用也是有效的。与化学治疗药物或电离辐射的联合疗法也可以显著增加对p53基因疗法的治疗反应。

15 Bcl-2家族蛋白质是细胞死亡的重要调节剂。它们由两个对立的组分(前细胞凋亡与抗细胞凋亡成员)构成。所有bcl-2家族成员共享4个高度保守的结构域，BH1，BH2，BH3和BH4中的一个或多个。Bcl-2家族成员包括但不限于A1，mcl-1，bcl-2，bcl-w，bcl-x，bax，bad和bak。A1，bcl-2，mcl-1，bcl-w和bcl-xl(长型bcl-x)基因编码胞内膜蛋白，已证实所述蛋白可阻断或延迟细胞  
20 凋亡。已证实这些基因的过表达可赋予细胞对细胞凋亡的抗性，包括对化学疗法诱导的细胞凋亡的抗性。在治疗中可以使用抗这些基因的反义寡核苷酸或核酶以及它们的蛋白质以诱导细胞凋亡。

相反，目前已知bax，bad，bak和bcl-xs(短型bcl-x)可通过抑制抗细胞凋亡bcl-2家族成员的保护作用来促进细胞死亡。在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡的  
25 方法可以是导入和过表达这些基因。

Caspase(半胱氨酸-天冬氨酸-蛋白酶)是一类对细胞凋亡程序至关重要的蛋白质。这些蛋白酶主要负责降解正经受细胞凋亡的细胞中出现的导致细胞形态改变的细胞蛋白质。Caspase以无活性的酶原形式存在，通过蛋白酶裂解可活化所述酶原。已鉴定出至少12种人caspase。Caspase8，9和3位于  
30 细胞凋亡途径的关键性连接处。Caspase8和caspase9通过蛋白酶裂解激活

caspase3, caspase3再去裂解极其重要的细胞蛋白质或其它caspase。预期导入和过表达这些caspase中的一种会导致癌细胞的细胞凋亡。

优选治疗蛋白质是细胞凋亡诱导物, 所述诱导物选自Fas/Apo1, TNF, TRAIL, TGF- $\beta$ , caspase, Bak, Bax, Bid, Bik和GZMB。

5 本发明的生物反应物质还可以是能与致癌蛋白质或和癌症形成有关的其它蛋白质结合的抗体。上文列出了致癌蛋白质。

癌细胞经常产生生长因子和生长因子受体以维持自泌或旁泌环, 所述环可介导免疫系统的增殖、血管生成和逃避。因此, 生物反应物质可以是抗体, 例如胞内单链抗体, 所述抗体能抑制一种或多种选自TGF- $\beta$ , VEGF, 10 IGF的生长因子和如EGFR的生长因子受体。

另外, 治疗蛋白质可以是能保护细胞免受毒性剂侵害的蛋白质, 或是能催化毒性物质合成的蛋白质。

已开发出不同的系统, 其中导入了能介导原药转变为细胞毒性化合物的蛋白质。单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因将特异性的前毒性核苷类似物, 如无环鸟苷和9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤转变为强效DNA合成抑制剂。能表达HSV-tk的细胞对药物变得十分敏感, 而不表达HSV-tk的细胞相对不敏感。不仅在HSV-tk转导细胞中, 在周围的细胞中也能观察到原药转变效应。这种效应被称为旁观者效应, 它对治疗有好处, 因为它无需用HSV-tk基因转导100%的肿瘤细胞。

20 另一种药物敏感性治疗蛋白质是胞嘧啶脱氨酶(CD)。CD蛋白催化原药5-氟胞嘧啶(5FC)转变为5-氟尿嘧啶(5FU); 在CD-阳性肿瘤细胞中, 用5FC处理CD转导细胞导致5FC转变为抗肿瘤药物5FU。

治疗蛋白质还可以是导入后能干扰癌基因表达, 因此可抑制肿瘤细胞生长的毒性蛋白质, 如细胞因子。

25 本发明的靶向复合物可含有一种以上不同的生物反应物质, 如2种、3种、4种、5种、5种以上不同的生物反应物质。例如, 靶向复合物可含有一种以上编码一种或一种以上治疗蛋白质的第一核苷酸序列, 例如2种、3种、4种、5种、5种以上编码一种和/或多种治疗蛋白质的第一核苷酸序列。

30 在本发明的一些实施方案中, 靶向复合物还含有核靶向信号。核靶向信号介导到达核内的转运。某些生物反应物质必须进入核内才具有活性,

因此，它们与核定位信号结合较为有利。例如，DNA序列必须进入核内才能被转录。

本发明的核靶向信号可以是任何能定位于核的核靶向信号。核靶向信号可以是例如寡肽，优选核靶向信号选自具有下列序列的寡肽：

5

RRMKWKK PDX (SEQ ID 310)  
 RVHPYQR QKI (SEQ ID NO 311)  
 KRPACTLKPECVQQLLVCSQEAKK HCDA (SEQ ID NO 312)  
 PKKKRKV (SEQ ID NO 313) (SV40 LrgT)  
 GKKRKA (SEQ ID NO 314) (H2B)  
 KAKRQR (SEQ ID NO 315) (v-Rel)  
 RGRRRRQR (SEQ ID NO 316)  
 RKRRR (SEQ ID NO 317)  
 PPVKRERTS (SEQ ID NO 318) (RanBP3)  
 PYLNKRKGKP (SEQ ID NO 319) (Pho4p)  
 CYGSKNTGAKKRKIDDA (SEQ ID NO 320) (DNAhelicaseQ1)  
 KKKKRKREK (SEQ ID NO 321) (LEF-1)  
 KKKRRSREK (SEQ ID NO 322) (TCF-1)  
 Krx{7,9}PQPKKKP (SEQ ID NO 323) (p53)  
 KVTKRKHDNEGSGSKRPK (SEQ ID NO 324)(Hum-Ku70)  
 RLKCLKCSKx{19}KTKR (SEQ ID NO 325) (GAL4)  
 RKRIREDRKx{18}RKRKR TCPTP (SEQ ID NO 326)  
 RRERx{4}RPRKIPR (SEQ ID NO 327) (BDV-P)  
 KKKKKEEEGEGKKK (SEQ ID NO 328) (act/inh betaA)  
 PRPRKIPR (SEQ ID NO 329) (BDV-P)  
 PPRIYPQLPSAPT (SEQ ID NO 330) (BDV-P)

KDCVINKHHRNRCQYCRLQR (SEQ ID NO 331) (TR2)  
Krx{9}KTKK (SEQ ID NO 332)(THOV NP)  
APKRKSGVSKC (SEQ ID NO 333) (PolyomaVP1)  
RKKRRQRRR (SEQ ID NO 334) (HIV-1 Tat)  
RQARRNRRRRWR (SEQ ID NO 335) (HIV-1 Rev)  
MPKTRRRPRRSQRKRPT (SEQ ID NO 336) (Rex)  
KRPMNAFIVWSRDQRRK (SEQ ID NO 337) (SRY)  
PRRRK (SEQ ID NO 338) (SRY)  
KRPMNAFMVWAQAARRK (SEQ ID NO 339) (SOX9)  
PRRRK (SEQ ID NO 338) (SOX9)  
[KAR]TPIQKHWRPTVLTEGPPVKIRIETGEWE[K]A (SEQ ID NO 340)  
PPRKKRTVV (SEQ ID NO 341)  
YKRPCKRSFIRFI (SEQ ID NO 342)  
LKDVRKRKLGPGH (SEQ ID NO 343)  
KRPRP (SEQ ID NO 344)  
RKRKK (SEQ ID NO 345)  
RRSMKRK hVDR (SEQ ID NO 346)  
PAKRARRGYK (SEQ ID NO 347)  
RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO 348)  
RRERNKMAAAKCRNRRR (SEQ ID NO 349)  
KRMRNRIAASKCRKRKL (SEQ ID NO 350)  
KKSkkGRQEALERLKA (SEQ ID NO 351)  
RKEWLTNFMEDRRQRKL (SEQ ID NO 352)  
KKQTTLAFKPIKKGKKR (SEQ ID NO 353)  
RKRKKMPASQRSKRRKT (SEQ ID NO 354)  
RAIKRRPGLDFDDDGEGNSKFLR (SEQ ID NO 355)  
SxGTKRSYxxM (SEQ ID NO 356)  
TKRSxxxM (SEQ ID NO 357)  
RIRKKLR (SEQ ID NO 358)  
KRAAEDDEDVDTKKQK (SEQ ID NO 359)  
GRKRKKRT (SEQ ID NO 360)

KKKQKK (SEQ ID NO 361)  
REKKEKEQKEKCA (SEQ ID NO 362)  
LEKKVKKKFDWCA (SEQ ID NO 363)  
TEKK[QG]KSILYDCA (SEQ ID NO 364)  
SDKKVRSRLIECA (SEQ ID NO 365)  
LKRKLQR (SEQ ID NO 366)  
RRKGKEK (SEQ ID NO 367)  
CKRKTNNADRRKA (SEQ ID NO 368)  
VNEAFETLKRC (SEQ ID NO 369)  
MPTEERVKRKESNRESARRSRYSRKAHLK (SEQ ID NO 370)  
KVNSRKRRKEVPGPNGATEED (SEQ ID NO 371)  
PRRGPR HCV (SEQ ID NO 372)  
PRGRRQPIPKARQP (SEQ ID NO 373)  
KRSAEGGNPPKPLKCLR (SEQ ID NO 374)  
KRKx{1}KKKSKK (SEQ ID NO 375)  
EYLSRKGLLEL (SEQ ID NO 376)  
PKRPRDRHDGELGGRKRARG (SEQ ID NO 377)  
KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO 378)  
KRKKEMANKSAPEAKKKK (SEQ ID NO 379)  
RKRAFHGDDPFGEGPPDKK (SEQ ID NO 380)  
GGGx{3}KNRRx{6}RGGRN (SEQ ID NO 381)  
YNNQSSNFGPMKGGN (SEQ ID NO 382)  
PAAKRVKLD (SEQ ID NO 383)  
KRPAEDMEEEQAFKRSR SxGTKRSYxxM (SEQ ID NO 384)  
MNKIPIKDLLNPG (SEQ ID NO 385)  
PKKARED (SEQ ID NO 386)  
VSRKRPR (SEQ ID NO 387)  
APTKRKGS (SEQ ID NO 388)  
PNKKKRK (SEQ ID NO 389)  
EEDGPQKKRRL (SEQ ID NO 390)  
PLLKIKQ (SEQ ID NO 391)

PPQKKIKS (SEQ ID NO 392)  
 PQPKKKP (SEQ ID NO 393)  
 SKRVAKRKL (SEQ ID NO 394)  
 IKYFKKFPKD (SEQ ID NO 395)  
 5 KTRKHRG (SEQ ID NO 396)  
 KHRKHPG (SEQ ID NO 397)  
 PQSRKKLR (SEQ ID NO 398)  
 HRKYEAPRH<sub>x</sub>{6}PRKR (SEQ ID NO 399)  
 KKEKKKSKK (SEQ ID NO 400)

10 其中括号内的内容表示寡肽所源自的蛋白质的名称，其中 “[KR]” 表示 “K或R”，即在该位置有效的任何两个氨基酸，“x”表示“任何氨基酸”，“x<sub>{9}</sub>”表示“9倍的x”，“x<sub>{7,9}</sub>”表示“至少7倍，至多9倍的x”。氨基酸以其单字母代码表示。

另外，本发明的核定位信号也可以是上述序列的突变体，如其中的1个，  
 15 2个，3个，4个，5个，6个，7个，8个，9个，10个氨基酸被任何一种其它氨基酸取代的突变体，优选突变是保守的氨基酸取代(见上文)。本发明的核定位信号是缺失了例如1个，2个，3个，4个，5个，6个，7个，8个，9个，10个氨基酸的突变体。

更优选核靶向信号是猴病毒40大肿瘤抗原的核定位信号。

20 在本发明的某些实施方案中，靶向复合物还含有内体裂解剂。靶向复合物经常通过已知为受体介导的胞吞的过程被摄入表达细胞表面分子的细胞内，因此，靶向复合物被包含在内体中进入细胞，而靶向复合物却需要躲避内体以避免被降解。因此，靶向复合物经常含有内体裂解剂。

25 很多病毒有办法躲避内体，因此，减毒病毒或病毒的一部分可以是有用的内体裂解剂。优选内体裂解剂选自聚乙烯亚胺(PEI)，复制缺损病毒和病毒蛋白衣壳。更优选内体裂解剂含有膜去稳定多肽。

在本发明的一个实施方案中，靶向复合物还含有氯喹。氯喹可起到保护作用，以对抗内体降解，因此，在本发明的一些实施方案中，必须存在氯喹。

在本发明的优选实施方案中，生物反应物质与结合配对物直接或间接互相结合。如果生物反应物质是核酸序列，结合配对物可通过例如与所述结合配对物共价结合的核酸结合剂与生物反应物质结合。

核酸结合剂包括蛋白质、多肽、肽、抗体、核苷酸、糖类、脂肪酸、  
5 有机或无机化合物及其组合。

核酸结合剂可以通过化学或物理力或这两者的合力结合单链或双链DNA以及单链或双链RNA。核酸结合剂可以(i)仅对核酸本身有亲和性，(ii)对核酸和另一种分子都有亲和性，从而在两者之间形成桥连，或(iii)通过与另一种对核酸有亲和性的分子的亲和性而对核酸具有间接亲和性。

10 根据本发明，核酸结合剂与结合配对物的偶联必须以不会干扰结合配对物与细胞表面分子结合的方式发生。优选还能够保持经由受体-介导的胞吞的靶向复合物内化过程。在甚至更优选的实施方案中，这种识别和内化以适合表达内源性靶核酸或适合与所述靶核酸相互作用的形式将核酸序列传递至靶细胞中。

15 在一个实施方案中，核酸结合剂以嵌入的方式将其自身插入双链核酸的碱基对之间，或结合于双链核酸的次要或主要的沟中。

这种结合可以是序列-特异性的，或者与序列完全无关。在其它实施方案中，核酸可以与其它具有化学或光化学反应基团的分子交联。

20 在本发明的另一个实施方案中，核酸结合剂使核酸与另一种分子共价连接。在一个实施方案中，核酸结合剂是一种偶联剂，例如碳二亚胺。然而，核酸的共价偶联可改变其特异性，阻碍适当的基因表达或靶核酸识别。另外，核酸与结合配对物的共价偶联需要线性或单链核酸。最终，核酸是带负电的分子，这意味着它们会被细胞表面排斥，使得经由内体裂解途径的转移变得困难。因此，有效传递与结合配对物直接结合的核酸必需限制  
25 大小和类型。

核酸结合剂的例子是类似于WO96/30536中描述的DNA-结合剂的聚阳离子试剂，该试剂依靠的是静电-起决定作用的结合，所述结合涉及阳离子基团和核酸上带负电的磷酸之间的序列-中性相互作用。

30 聚阳离子试剂与DNA牢固结合，导致形成复曲面复合物，其中核酸分子的负电被完全中和。通过正常的受体-介导的胞吞可以内化这种可溶性的复曲面复合物。

可以使用任何类型的核酸，从单链mRNA到双链环形质粒皆可。

另外，可以使用任意大小的核酸，只要它可以提供负电与聚阳离子试剂结合即可。在某些实施方案中，这些聚阳离子组成成分可包括天然的多胺，例如精胺和/或亚精胺。在优选实施方案中，聚阳离子试剂可以是人工制备的试剂，如聚赖氨酸或聚乙烯亚胺。

本发明为了适当发挥作用，需要满足与核酸结合剂有关的某些标准。首先，被传递至细胞中的核酸必须与核酸结合剂结合，而不会以任何方式丧失其完整性。

第二，由配体、核酸结合剂和核酸组成的复合物必须为可溶性的，从而使复合物在体外和体内更容易进入细胞。第三，一旦复合物被内化至宿主细胞中，核酸必须能接近其靶序列而不会被降解。

核酸结合剂可包括如下试剂：碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基，3(2-吡啶基二硫代)丙酸酯、琥珀酰亚胺基，4(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、二异氰酸酯、戊二醛、苯重氮酸和六亚甲基二胺。上文列出的结合剂并未穷举本领域已知的多种偶联剂，而只是例举了可以使用的更常用的连接剂。

优选核酸结合剂选自聚-L-赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺和组蛋白蛋白质。

当核酸结合剂是PLL时，PLL可以含有15至1000、如50至750、100至500、200至400个残基。

在本发明的一个实施方案中，结合配对物通过一对特异性相互作用的组分间接与生物反应物质结合，其中一个组分与生物反应物质共价结合，另一个组分与结合配对物共价结合。

所述的一对特异性相互作用的组分的一个例子是生物素和链霉亲和素，然而，也可以使用其它对相互作用的组分。

#### 含有细胞表面分子和靶向复合物的复合物

本发明的一个目的是提供含有细胞表面分子、结合配对物和生物反应物质的复合物。上文给出了细胞表面分子、结合配对物和生物反应物质的例子。

优选复合物含有根据本发明的任何方法鉴定出的细胞表面分子和如上文所述的靶向复合物。

或者，复合物可含有如上文所述的细胞表面分子和靶向复合物，其中所述细胞表面分子优选含有下述物质或基本上由下述物质组成，或例如是

GRIA2, 如LPR8, 例如是CHRNA5, 如TMEFF, 例如是NPTXR, 如运铁蛋白受体; 如II型膜蛋白克隆: 例如是HP10481; 如II型膜蛋白克隆: 如HP10390; 例如是PG40; 如TRC8; 例如是TR2-11; 如OA3抗原表面决定簇; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6, 例如GPIIb; 如玻连蛋白受体 $\alpha$ 亚单位; 例如是整联蛋白 $\alpha$ -7; 如

5 整联蛋白 $\alpha$ E前体; 例如是整联蛋白 $\alpha$ 6B; 如整联蛋白 $\alpha$ 5亚单位; 例如是整联蛋白 $\beta$ -5亚单位; 如整联蛋白 $\alpha$ -3链; 例如是RYK; 如淀粉样前体蛋白-结合蛋白1; 例如是推定的跨膜GTP酶; 如膜辅因子蛋白; 例如GLVR1; 例如是Mr110,000抗原, 例如是多配体聚糖-1; 如推定的有7个跨膜结构域的蛋白质; 例如是LCA-同系物/LAR蛋白; 如M6抗原; 例如是Me491/CD63抗原; 如多

10 跨越膜蛋白; 例如是DDR; 如自泌活动因子受体; 例如是胰岛素受体前体; 如IGF1R, 例如是胰岛素-样生长因子II受体; 如SAS; 例如是TAPA-1; 如MICB; 例如是MHC II类HLA-DR7-相关糖蛋白 $\beta$ -链; 如HLA-DP; 例如是骨小蛋白聚糖I双糖链蛋白聚糖; 如CAR; 例如是MEA11; 如 $\gamma$ -干扰素受体 $\alpha$ 链; 例如是多聚免疫球蛋白受体; 如metabotropic谷氨酸受体4型; 例如是

15 metabotropic谷氨酸受体8; 如CLPTM1, 例如是MAGE-4b; 如MAGE5a; 例如是MAGE-3; 例如MAGE-1; 例如是MAGE6; 如MAGE-9; 例如是MAGE11; 如CD24; 例如是CD59; 如CD44; 例如是低密度脂蛋白受体; 如极低密度脂蛋白受体; 例如是N-CAM; 如核纤层蛋白B受体同系物TM7SF2; 例如是推定的T1/ST2受体结合蛋白前体; 如NTR2受体; 例如是RAGE-4; 如

20 HLA-G1; 例如是MOAT-C; 如 $\alpha$ 2 $\delta$ 钙通道亚单位同种型I; 例如是LFA-3; 如L1-CAM; 例如是AVPR2; 如C1 p115 C1; 例如是TE2; 如RbP; 例如是HCF1; 如IRAK; 例如是CD151; 如表面抗原; 例如是MAG; 如GPR19; 例如是pcta-1; 如PRAME; 例如是加压素活化的钙质转移受体-样蛋白; 如5-羟色胺受体5-HT4B; 例如是5-羟色胺1D受体(5-HT1D<sub>L</sub>); 如CD9; 例如是

25 LDL受体成员LR3; 如DR6; 例如是肿瘤坏死因子受体; 如HG38; 例如是尿激酶型纤溶酶受体; 如FGF受体; 例如是神经生长因子受体; 如胱氨酸/谷氨酸转运蛋白; 例如是CB1大麻素受体(CNR1); 如PSG; 例如是PSG13'; 如CPE-受体; 例如是CRH2R; 如OCI5; 例如是TRAIL受体2; 如HNMP-1; 例如是肾 $\alpha$ -2-肾上腺素能受体; 如红细胞生成素受体; 例如是硫酸软骨素蛋白聚糖多能聚糖V1; 例如是mGluR1 $\beta$ ; 如CD97; 例如是L6; 如NY-ESO-1; 例如是T-细胞受体 $\alpha\delta$ ; 如ror1; 例如是ror2; 如SSTR2; 例如是VESPR; 如IgG

30

Fc受体；例如是谷氨酸受体亚单位GluRC；如HEK2；例如是PVR；如CEA；例如是CC-趋化因子-结合受体JAB61；如HER2；例如是HER3；如类似于表皮生长因子受体-相关蛋白的假拟蛋白FLJ22357；例如是推定的B-型内皮肤受体-样蛋白；如GLVR2；例如是P2X4嘌呤受体；如FPRL1；例如是心房利钠肽清除受体；例如是胃泌素/CCK-B受体；如神经调节肽B受体；例如是GFRA3；如GRPR；例如是CDH1；如CDH2；例如是TGFB1；如TGFB2；例如是TGFB3；如表皮生长因子受体的前体。

更优选细胞表面分子选自NCAM1, NPTXR, LRP8, CHRNA5, GRIA2, GRM8, ITGAV, ITGAE, TNFRSF12, L1CAM, GPR49和TMEFF1。

## 10 疾病(conditions)

前恶性和/或恶性疾病可以是例如癌症或可发展为癌症的疾病。本发明范围内的术语癌症覆盖了恶性和良性肿瘤以及白血病。

癌症可以是例如腺瘤、癌或肉瘤。癌症可选自例如黑素瘤、脑瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、白血病、结肠癌、直肠癌、睾丸癌、肾癌、肝癌、唇癌、舌癌、胃癌、皮肤癌、肉瘤、间皮瘤、膀胱癌、骨瘤、恶性胸膜渗漏、腹水、脑膜癌病、头颈癌和内分泌器官的癌症，如甲状腺、脑垂体和肾上腺癌。

肺癌可以是例如选自小细胞肺癌(SCLC)和非-小细胞肺癌(NSCLC)的癌症。优选前恶性和/或恶性疾病是小细胞肺癌。

20 在一个优选实施方案中，前恶性和/或恶性疾病是乳腺癌。

在另一个优选实施方案中，前恶性和/或恶性疾病是脑瘤。脑瘤可选自例如成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经管细胞瘤、神经元瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤(craniopharyngioma)、松果体肿瘤、生殖细胞肿瘤和神经鞘瘤。

## 25 给药和药物组合物

接受治疗的个体可以是任何动物，然而，优选个体是人。

本发明的治疗可以是改善性治疗，可以是治愈性治疗和/或预防性治疗。

30 本发明药物传递的主要途径是静脉内，口服和皮下，下文将要描述这些途径。也可以使用其它能将药物有效传递至靶位点或将药物有效导入血流的给药方法，如局部传递。也可以通过吸入，即鼻内吸入和经口吸入施用化合物。

可施用本发明的药物制品的粘膜可以是欲施用生物活性物质的哺乳动物的任何粘膜，例如鼻、阴道、眼、口腔、生殖道、肺、胃肠道或直肠。

5 本发明的化合物优选被非肠道给药，即通过静脉内、肌内、皮下、鼻内、直肠内、阴道内或腹膜内给药。一般优选非肠道给药的皮下和肌内形式。通过常规技术即可制备适当的给药剂量形式。

优选非肠道施用本发明的靶向复合物，更优选通过静脉内注射和/或皮下注射施用靶向复合物。

本发明的化合物可与至少一种其它化合物一起被施用。可以以独立的制剂，或单位剂量形式的混合制剂同时施用化合物，或依次施用化合物。

10 剂量要求将随着所用的特定药物组合物、给药途径和欲治疗的特定个体的不同而改变。理想状态下，本发明方法治疗的个体将以最大耐受剂量接受药物有效量的化合物，所述剂量一般不高于产生药物抗性前所需的剂量。

15 根据欲治疗疾病的特性和程度、给药的形式，途径和位点、以及接受治疗的特定患者可以确定靶向复合物的个体剂量，通过常规技术可确定最适剂量。本领域技术人员也应懂得：本领域技术人员使用常规的疗程确定试验即可确定最佳疗程，即在限定的天数内每天施用的化合物或其药物可接受盐的剂量次数。

20 本文所用术语“单位剂量形式”指的是适于用作人和动物个体的单一剂量的物理分离单位，每个单位含有预定量的、单独或与其它试剂混合的化合物，其含量足以产生与药物可接受的稀释剂或载体相关的所需效果。有关本发明单位剂量形式的特别说明取决于所用的一种或多种特定化合物和欲达到的效果，以及宿主中与每种化合物有关的药物动力学。给药剂量应为“有效量”或在各个患者中获得“有效水平”所需的量。

25 由于“有效水平”被用作给药剂量的优选终点，实际的剂量和安排将根据个体间在药物动力学、药物分布和代谢方面的差异而改变。“有效水平”可被定义为例如对应于本发明的一种或多种化合物的浓度的个体所需血液或组织水平。

30 可通过常规技术，如Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, E.W.Martin编, Mack Publishing Company, 第19版, Easton, Pa所述的技

术制备含有本发明化合物的药物组合物。组合物可以是常规形式，例如胶囊、片剂、烟雾剂、溶液、悬浮剂或局部应用剂。

本发明化合物的药物可接受盐也落入本发明的范围之内。可以标准方式制备药物可接受盐。如果母体化合物是碱，可在适当溶剂中用过量的有机或无机酸处理该化合物。如果母体化合物是酸，可在适当溶剂中用无机或有机碱处理该化合物。

可以通过口服、直肠或非肠道(包括皮下)途径，以碱金属或其碱土金属盐的形式同时或与药物可接受载体或稀释剂一起，特别优选以其药物组合物的形式施用有效量的本发明的化合物。

10 用于本发明药物组合物的药物可接受的酸加成盐的例子包括衍生自无机酸和有机酸的盐，所述无机酸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸，所述有机酸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、马来酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡糖酸、琥珀酸、p-甲苯磺酸和芳基磺酸。

15 尽管待施用的本发明化合物或其盐可以是粗(raw)化合物，但优选以药物制剂的形式给药。因此，本发明还提供了药用的药物制剂，其含有本发明的化合物或其如本文所定义的药物可接受的盐，以及药物可接受载体。

20 可以多种口服给药的剂量形式配制本发明的化合物。药物组合物和剂量形式可含有本发明的化合物或其药物可接受盐或其晶体形式作为活性成分。药物可接受载体可以是固体或液体。固体形式的制品包括粉末、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和分散颗粒。固体载体可以是一种或多种也可用作稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、结合剂、防腐剂、润湿剂、片剂崩解剂或胶囊包裹材料的物质。

25 优选组合物含有一种或多种占重量0.5%至75%的本发明化合物，其余部分由适当的药物赋形剂组成。对于口服给药而言，所述赋形剂包括药物级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

30 在粉末中，载体是被细分的固体，所述载体与被细分的活性成分混合。在片剂中，活性成分以适当比例与具有必需的结合能力的载体混合，并被压制成所需的形状和大小。粉末和片剂优选含有1%至约70%活性化合物。适当的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、龙须胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。术

语“制品”欲包括含包裹材料作为载体的活性化合物制品，所述包裹材料可提供胶囊，其中含或不含载体的活性成分被与之相关的载体包围。类似地，还包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉末、胶囊、丸剂、扁囊剂和锭剂可以是适于口服的固体形式。

- 5 本发明的滴剂可含有无菌或非-无菌含水或油溶液或悬浮液，通过将活性成分溶解于适当水溶液中即可制备所述滴剂，所述水溶液中任选包括杀细菌和/或杀真菌药剂和/或任何其它适当的防腐剂，并任选包括表面活性剂。然后通过过滤澄清所得溶液，转移至适当容器中密封，通过高压灭菌或在98-100℃维持半小时以进行消毒。或者，通过过滤对溶液进行消毒，并
- 10 在无菌状态下将溶液转移至容器中。适于包含在滴剂中的杀细菌和杀真菌剂的例子是硝酸苯汞或乙酸苯汞(0.002%)，苯扎氯铵(0.01%)和醋酸氯己定(chlorhexidine acetate, 0.01%)。油性溶液制品的适当溶剂包括甘油、稀释乙醇和丙二醇。

- 本发明还包括固体形式的制品，在使用前将其转变为液体形式的制品
- 15 供口服。所述液体形式包括溶液、悬浮液和乳剂。除了活性成分外，这些制品可含有着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲液、人工和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂等。

- 其它适于口服的形式包括液体形式的制品，其包括乳剂、糖浆、酏剂、水溶液、含水悬浮液、牙膏、凝胶牙粉、咀嚼树胶，还包括在使用前转变为液体形式制品的固体形式的制品。可以在含水丙二醇溶液中制备乳剂，或者乳剂可含有乳化剂，如卵磷脂、山梨聚糖一油酸或金合欢。通过将活性成分溶解于水中并添加适当的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂即可制备水溶液。通过将细分的活性成分分散于含粘性物质的水中即可制备含水悬浮液，所述粘性物质如天然或合成的树胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和其它众所周知的悬浮剂。液体形式的制品包括溶液、悬浮液
- 20 和乳剂，除了活性成分外，所述制品还含有着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲液、人工和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂等。

- 可配制本发明的化合物供非肠道给药(例如通过注射，如丸剂注射或连续灌注)，可以在添加有防腐剂的安瓿、预先-充满的注射器、小体积灌注液或多-剂量容器中以单位剂量形式提供所述化合物。例如，组合物可在油性或含水载体中采取悬浮液、溶液或乳剂的形式，例如溶于含水聚乙二醇
- 30

的溶液形式。油性或不含水的载体、稀释剂或溶剂的例子包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯),并且可含有配制剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂或悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是通过在无菌状态下分离无菌固体或通过冻干溶液而获得的粉末形式,使用前再用适当载体,如无菌、无热原的水将所述粉末重建为溶液。

可用于非肠道制剂的油包括:石油、动物油、植物油或合成的油。可用于这种制剂的油的具体例子包括花生、大豆、芝麻、棉籽、玉米、橄榄、矿脂和矿物油。可用于非肠道制剂的适当脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和异丙基肉豆蔻酸酯是适当脂肪酸酯的例子。

可用于非肠道制剂的适当皂类包括脂肪碱金属、铵和三乙醇胺盐,适当的去污剂包括:(a)阳离子去污剂,如二甲基二烷基铵卤化物和烷基吡啶季铵卤化物;(b)阴离子去污剂,如烷基、芳基和烯属磺酸酯,烷基、烯烃、醚和甘油一硫酸酯盐以及磺基丁二酸酯;(c)非离子型去污剂,如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇酰胺和聚氧乙烯聚丙烯共聚物;(d)兼性去污剂,如烷基- $\beta$ -氨基丙酸酯和2-烷基-咪唑啉季铵盐;和(e)它们的混合物。

非肠道制剂溶液中一般含有占重量约0.5%至约25%的活性成分。可以使用防腐剂和缓冲液。为了使注射位点的发炎现象最小化或消除发炎现象,所述组合物可含有一种或多种亲水-亲脂平衡(HLB)值约为12至17的非离子型表面活性剂。所述制剂中的表面活性剂量一般约占重量的5%至15%。适当表面活性剂包括聚乙烯山梨聚糖脂肪酸酯,如山梨聚糖一油酸以及环氧乙烷与疏水基通过氧化丙烯与丙二醇缩合形成的高分子量加合物。可以在单位-剂量或多-剂量密封的容器(如安瓿和小管)中提供非肠道制剂,也可以在冻干条件下储存所述制剂,使用前仅需要加入无菌的液体赋形剂,如水来配制注射液。临时注射溶液和悬浮液可制备自上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂。

也可以局部施用本发明的化合物。局部给药的区域包括皮肤表面以及阴道、直肠、鼻腔、口腔和喉的粘膜组织。经由皮肤和粘膜局部给药的组合物应该不产生发炎的迹象,如肿胀或发红。

局部组合物可包括适于局部给药的药物可接受载体。因此,组合物可采取例如下述形式:悬浮液、溶液、软膏、洗液、性润滑剂、乳剂、泡沫

剂、烟雾剂、喷涂剂、栓剂、植入剂、吸入剂、片剂、胶囊、干粉、糖浆、药膏或锭剂。制备所述组合物的方法是制药业众所周知的。

5 可将本发明的化合物配制成软膏、乳剂或洗液，或配制成经皮的膏药供表皮局部给药。本发明的乳剂、软膏或膏药是供外部使用的半固体状活性成分制剂。通过借助于适当的机器，将经细分或粉末形式的活性成分单独、或在含有水或非水液体的溶液或悬浮液中与油脂或非-油脂基混合，即可制备上述制剂。油脂或非油脂基可含有烃，如硬、软或液体石蜡，甘油，蜂蜡，金属皂；胶水；源自天然的油，如杏仁、玉米、花生、蓖麻或橄榄油；羊毛脂或其衍生物或脂肪酸，如硬脂酸或油酸以及醇，如丙二醇或大粒凝胶。制剂中可掺入任何适当的表面活性剂，如阴离子、阳离子或非离子型表面活性剂，如山梨聚糖酯或其聚氧乙烯衍生物。制剂中还可包含悬浮剂，如天然树脂、纤维素衍生物或无机物，如siliceous硅石和其它成分，如羊毛脂。

15 本发明的洗液包括适用于皮肤或眼睛的洗液。眼洗液可含有无菌水溶液，其任选含有杀菌剂，通过类似于制备滴剂的方法可以制备眼洗液。用于皮肤的洗液或涂抹剂可包括促进皮肤干燥和使皮肤变凉的药剂，如乙醇或丙酮，和/或水份增加剂，如甘油或如海狸油或花生油的油类。

20 本文所述的药物活性化合物可以经皮给药。经皮给药一般包括经药物的经皮通道将药剂传递至患者的全身循环。皮肤位点包括经皮给药的解剖学区域，包括前臂、腹部、胸部、背部、臀部、乳突区等。

通过将活性化合物源暴露于患者皮肤达一段时间即可完成经皮传递。经皮膏药有附加的优点，即能为身体提供药剂-化学修饰剂复合物的受控传递。参见 *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft and Guy(编), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson and Lee(编), Marcel Dekker, Inc., (1987); 和 *Transdermal Delivery of Drugs, Vols.1-3*, Kydonieus and Berner(编), CRC Press, (1987)。通过将药物活性化合物溶解、分散或要不然掺入适当的介质，如弹性体基质材料中，即可制备所述剂量形式。也可使用吸收增强剂来增加化合物穿过皮肤的流动性。通过提供速率-控制膜或将化合物分散于聚合物基质或凝胶中，即可控制所述流动的速率。

可将本发明的化合物配制成栓剂来进行给药。首先融化低熔点蜡，如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物，接着通过例如搅拌均匀分散活性成分。然后将熔化的均匀混合物倒入合适大小的模具中，使其冷却并固化。

可将活性化合物配制成栓剂，所述栓剂含有例如分散在聚乙二醇  
5 (PEG)(如PEG1000[96%]和PEG4000[4%])载体中的约0.5%至约50%的本发明化合物。

可将本发明的化合物配制成阴道给药的制剂。除了活性成分外，还含有上述载体的阴道药栓、棉塞、乳剂、凝胶、膏药、泡沫剂或喷涂剂是本领域已知的适当制剂。

10 必要时，可用适于活性成分的缓释或控释给药的肠涂层制备制剂。

药物组合物通常含有载体。说明性的固体载体包括乳糖、石膏粉、蔗糖、滑石、明胶、琼脂、果胶、金合欢、硬脂酸镁、硬脂酸等。固体载体可包括一种或多种也可用作调味剂、润滑剂、增溶剂、悬浮剂、填充剂、  
15 滑动剂、压缩助剂、结合剂或片剂-崩解剂的物质；载体也可以是胶囊包裹材料。在粉末中，载体是被细分的固体，所述载体与被细分的活性成分混合。在片剂中，活性成分以适当比例与具有必需的压缩特性的载体混合，并被压制成所需形状和大小。粉末和片剂优选含有高达99%的活性成分。适当的固体载体包括例如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮  
20 (polyvinyl-pyrrolidone)，低熔点蜡和离子交换树脂。

液体载体实例包括糖浆、花生油、橄榄油、水等。液体载体被用于制备溶液、悬浮液、乳剂、糖浆、酏剂和加压组合物。活性成分可溶解或悬浮于药物可接受的液体载体，如水、有机溶剂、两者的混合物或药物可接受的油或脂肪。液体载体可含有其它适当的药物添加剂，如增溶剂、乳化  
25 剂、缓冲液、防腐剂、甜味剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂或渗透-调节剂。口服和非肠道给药的液体载体的适当例子包括水(部分含有上述添加剂，如纤维素衍生物，优选为羧甲基纤维素钠溶液)，醇(包括一元醇和多元醇，如二醇)及其衍生物，以及油(如经分级分离的椰子油和花生油)。为了进行非肠道给药，载体也可以是油性酯，如油酸  
30 乙酯和异丙基肉豆蔻酸酯。无菌的液体载体可用于无菌液体形式的组合物供非肠道给药。加压组合物所用的液体载体可以是卤化烃或其它药物可接

受的推进剂。肌内、腹膜内或皮下注射可以利用例如无菌溶液或悬浮液形式的液体药物组合物。也可以静脉内施用无菌溶液。也可以口服液体或固体组合物形式的化合物。

- 5 载体或赋形剂可包括本领域众所周知的延时物质，如硬脂酸甘油酯或甘油二硬脂酸酯与蜡，乙基纤维素，羟丙基甲基纤维素，甲基异丁烯酸酯等。当配制成口服给药的制剂时，据认为含0.01%吐温80的PHOSAL PG-50(含1,2-丙二醇的磷脂浓缩物，A. Natterman & Cie, GmbH)可提供其它化合物的可接受口服制剂，它适用于本发明多种化合物的制剂。

### 联合疗法

- 10 本发明的靶向复合物可与一种或多种第二疗法，例如目前用于治疗癌症的疗法联合使用。

例如，所述第二疗法可选自手术疗法、化学疗法、放射疗法、细胞因子疗法、激素疗法、基因治疗、免疫疗法和激光疗法。

- 15 化学疗法包括施用化学治疗剂，如细胞静止剂。本发明的细胞静止剂可选自例如carboplatin、顺式铂氨、环磷酰胺、异环磷酰胺、六甲密胺、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷(VP-16)、表鬼白毒噻吩糖苷(VM-26)、长春花新碱、长春地辛、taxans、irinotecan、酪氨酸激酶抑制剂、嘧啶亚硝脒、环己亚硝脒、BCNU、法尼基转移酶抑制剂、抗血管生成化合物、抗转移化合物、5-氟尿嘧啶±甲酰四氢叶酸、拓扑异构酶抑制剂I和II以及Temozolamide。

- 20 另外，化学疗法可包括例如施用抗-雌激素、抗-孕激素、抗-雄激素、LH-RH拮抗剂或aromatase抑制剂。

### 实施例

以下是本发明实施方案的实施例，不应将其看成是对本发明的限制。

#### 实施例1

- 25 培养小细胞肺癌(SCLC)细胞系：

使用下列小细胞肺癌细胞系进行分析：

细胞系	细胞系建立于	生长： A=贴壁 S=悬浮	生长培养基
CPH54A	丹麦哥本哈根大学 (Engelholm等, 1986)	A	MEM(EAGLE)+10% FCS
CPH54B		A	MEM(EAGLE)+10% FCS
	荷兰Groningen肺癌中心,		

GLC2	(de Leij等, 1986; Berendsen等, 1988; Bulte 等, 1993)	A(S)	RPMI+10% FCS
GLC3		S(A)	RPMI+10% FCS
GLC14		S	RPMI+10% FCS
GLC16		S	RPMI+10% FCS
GLC19		S	RPMI+10% FCS
GLC26		S	RPMI+10% FCS
GLC28		S	RPMI+10% FCS
DMS53	美国Dartmouth医学院, NH (Pettengill等, 1980)	A	Waymouth+10% FCS
DMS79		S	RPMI+10% FCS
DMS92		A(S)	Waymouth+10% FCS
DMS114		A	Waymouth+10% FCS
DMS153		A	Waymouth+10% FCS
DMS273		A	Waymouth+10% FCS
DMS406		A(S)	Waymouth+10% FCS
DMS456		A(S)	Waymouth+10% FCS
NCI H69	美国国立癌症研究所, MD (Carney等, 1985)	S	RPMI+10% FCS
NCI N417		S	RPMI+10% FCS
MAR H24	德国菲利普大学, Marburg (Bepler等, 1987)	S	RPMI+10% FCS
MAR 86 MI		S	RPMI+10% FCS

在37℃、含5% CO<sub>2</sub>的潮湿气氛中，在不含抗生素的培养基内维持所有细胞，每周传代2次。所有培养基和血清都得自Life Technologies。

## 5 异种移植

将 $0.5-1.2 \times 10^7$ 个细胞接种于12-13周龄Balb/c裸鼠肋腹两侧的皮下。当异种移植的肿瘤中有一个的最大直径达1cm时，处死小鼠，收集这些肿瘤。除去坏死的组织。通过接种2mm肿瘤块，仅在裸鼠中增殖细胞系CPH 136A。立即处理分离RNA所用的肿瘤，或者将其储存于RNA later(Ambion)中放置24小时，然后储存于-70℃并按下述方法进行加工。立即按下文所述加工裂解用的肿瘤以进行Western印迹分析。

### 正常组织的RNA

从Clontech(胎脑、脑、肺、肾脏、心脏、气管、肾上腺、前列腺、唾液腺、甲状腺)或Ambion(肺、肝脏、脑、胰腺、脾脏、小肠、骨骼肌、结肠、胃、睾丸)获得正常人组织的总RNA。仅对一种样品分析平行双份(Clontech和Ambion的肺RNA),对一种样品分析平行三份(Clontech的2个不同批次样品以及Ambion的一个批次样品的脑RNA)。胎脑是胚胎神经内分泌组织的参照。

### 10 从细胞系中分离RNA

(通过胰蛋白酶消化贴壁细胞)收集半-铺满培养物的细胞,使用RNeasy试剂盒(Qiagen),根据厂商说明分离约 $10^7$ 个细胞的总RNA。在TRIzol (Life Technologies)中匀浆异种移植的(新鲜的或储存于RNA later之后的)肿瘤,并根据厂商说明纯化RNA。使用RNeasy试剂盒(Qiagen)进一步纯化TRIzol分离的RNA。

通过260nm下的光吸收值( $A_{260}$ )估计RNA的浓度。通过测定 $A_{260/280}$ 的比例为1.9或更高,并通过经甲醛(变性)凝胶分析估计28S rRNA与18S rRNA的比例约为2,可以证实RNA的完整性。

### 20 制备cDNA

70 °C 变性10分钟之后,使溶于10 $\mu$ l H<sub>2</sub>O的10 $\mu$ g总RNA与100pmol T7-(dT)<sub>24</sub>引物(经HPLC纯化的5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG(T)<sub>24</sub>(SEQ ID NO: 401),得自GENSET)杂交。使用得自Gibco BRL, Life Technologies的试剂进行下述反应。于42 °C,使用400 U Super-Script RnaseH<sup>-</sup> Reverse Transcriptase试剂盒,在20 $\mu$ l含第一链缓冲液(50mM Tris-HCl(pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 10mM DTT, 0.5mM每种dNTP的反应中,进行第一链合成达1小时。通过于16 °C保温2小时,在150 $\mu$ l含0.26mM dNTP, 0.07U/ $\mu$ l大肠杆菌DNA连接酶, 0.27U/ $\mu$ l大肠杆菌DNA聚合酶, 0.013U/ $\mu$ l大肠杆菌Rnase H的第二链缓冲液(20mM Tris-Cl(pH 6.9), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0.15mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)中进行第二链合成。通过加入0.07U/ $\mu$ l T4 DNA聚合酶并于16 °C保温5分钟以填平DNA末端。通过

加入EDTA至终浓度为33 $\mu$ M以终止反应。通过用1倍体积的预先用10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA饱和的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取, 接着用含2.5M NH<sub>4</sub>Ac的63%乙醇进行沉淀, 同时添加2 $\mu$ l Pellet Paint (Novagen)以肉眼观察沉淀物, 即可纯化出cDNA。用80%乙醇连续冲洗沉淀物2次, 风干沉淀物, 将其溶解于12 $\mu$ l水中。通过琼脂糖凝胶电泳分析等分试样以确保cDNA长度范围为0.1->10kb。

### 制备经生物素标记的cRNA(IVT-cRNA)

用得自Enzo Diagnostics, NY, USA的BioArray<sup>TM</sup>, High Yield<sup>TM</sup> RNA转录标记试剂盒, 根据厂商说明, 在40 $\mu$ l反应中, 使用6 $\mu$ l cDNA(估计约含有1 $\mu$ g cDNA)进行使用生物素标记的核糖核苷酸, 用T7 RNA聚合酶进行的能产生生物素标记的cRNA(互补RNA)的体外转录。使用RNeasy 自旋柱试剂盒(Qiagen), 根据厂商特别说明的RNA清除法, 纯化经生物素标记的cRNA。通过变性的琼脂糖凝胶电泳分析IVT-cRNA等分试样以确保全长转录物(.1->10kb)。通过260nm下的光吸收值估计cRNA的浓度, 校正所述浓度以提供最初用于cDNA反应的总RNA。得率为每个反应25-100 $\mu$ g。

### IVT-cRNA的片段化

通过于94 $^{\circ}$ C, 在20 $\mu$ l含有0.04M Tris-乙酸(pH 8.1), 0.03M MgAc, 0.1M KAc的反应中保温35分钟, 使22 $\mu$ g IVT-cRNA片段化。通过琼脂糖凝胶电泳分析片段化IVT-cRNA的等分试样以确保获得大小为30-200个碱基的片段。

### 与Affymetrix GeneChip<sup>TM</sup>杂交并分析数据(芯片分析)

在400 $\mu$ l含有0.1M MES, 0.75, [Na<sup>+</sup>], 0.1mg/ml鲑精DNA, 0.1mg/ml乙酰基化BSA, 0.05nM 生物素化对照寡B2(5'-GTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGA(SEQ ID NO:402)和供掺加用的对照生物素标记的IVT-cRNA的体积中, 含有20 $\mu$ g片段化IVT-cRNA的杂交混合物制备自质粒pGlks-bioB(150pM), pGlks-bioC(500pM), pGlks-bioD(2.5nM)和pGlks-cre(10nM)(美国组织培养物保藏中心)。对照寡核苷酸和对照cRNA得自Affymetrix。使100 $\mu$ l与Affymetrix test2芯片杂交, 接着用链霉亲和素-藻红蛋白偶联物染色, 并用生物素化的抗-链霉亲和素山羊抗体标记, 最后用链霉亲和素-藻红蛋白偶联物

染色(根据厂商的方法Mini-euk1), 或使300 $\mu$ l与Affymetrix U95A基因芯片杂交, 并根据厂商的方法EukGE-WS2, 在Affymetrix Fluidics站进行染色, 并在聚焦激光扫描仪(Hewlett Packard GeneArray Scanner G2500A)上, 在560nm处进行扫描。首先使用4.0版本的Affymetrix Microarray Suite<sup>TM</sup>加工数字化图像数据, 以评价RNA和杂交的质量, 并使用Affymetrix Data Mining Tool (2.0版本)加工所述图像数据以选择候选基因。预先使用第5版本的Affymetrix Microarray Suite<sup>TM</sup>分析数据(见结果)以选择表面分子。仅分析下述数据, 其中对照寡核苷酸BioB, BioC, BioD和Cre皆按所描述的方法进行检测; 成比例的噪声(Q)低于10; 相对于甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和 $\beta$ -肌动蛋白的3'末端而言, 5'末端mRNA水平检测的比例低于2; 按所描述的方法鉴定所有探针套中的至少40%。为了在样品之间进行比较, 将总强度设置为100。

### RT-PCR

对选定基因进行半-定量RT-PCR以证实芯片分析。将按上文所述制备的cDNA作为独立的制品用于RT-PCR, 而不是用于芯片分析。在25 $\mu$ l含有200nM引物(DNA Technology A/S), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM每种dNTP, 0.1U/ $\mu$ l Platinum Taq Polymerase (Life Technologies)的、由酶提供的缓冲液中, 以0.008% 甲酚红和12% 蔗糖为上样缓冲液, 使用得自350ng总RNA的cDNA进行PCR反应。

所有反应为: 94 $^{\circ}$ C 2分钟1轮循环; 94 $^{\circ}$ C, 30秒, 退火温度如每个引物套所示, 30秒, 72 $^{\circ}$ C, 30秒25轮循环, 最后在72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。仅使用25轮循环使得反应为半定量。

所用引物套为:

*甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)*

512bp跨越GenBank登录号NM\_002046bp.608-1119的 PCR产物,

有义: 5'-TCCATGCCATCACTGCCACCCA (SEQ ID NO: 403)

反义: 5'-TCTTGTGCTCTTGCTGGGGCTG (SEQ ID NO: 404)

退火温度: 56 $^{\circ}$ C,

进行了1轮RT-PCR反应。

30

*Pro30(KIAA0042)*

432bp跨越GenBank登录号D26361 bp.5181-5612的PCR产物,  
有义: 5'-GTTTTGAATCTGAAGAAAGCCC (SEQ ID NO: 405)  
反义: 5'-TCAAACCTCCTGACCTTGTGATCT (SEQ ID NO: 406)  
退火温度: 49℃,

5 进行了2轮独立的RT-PCR反应。

*Pro41 (MAD2)*

525bp跨越GenBank登录号AJ000186 bp. 643-1167的PCR产物,  
有义: 5'-GTAAATAGCATGGTGGCCTACA (SEQ ID NO: 407)  
反义: 5'-GGTCCAAAGGAGCTATACAGCA (SEQ ID NO: 408)  
退火温度: 45℃,

10 进行了2轮独立的RT-PCR反应。

*Pro 221 (胰岛瘤-相关抗原, IA-1)*

532 bp跨越GenBank登录号M93119 bp. 1549-2080的PCR产物,  
有义: 5'-GTGTTCCCCTGCAAGTACTGCC (SEQ ID NO: 409)  
反义: 5'-CAGAGATTGGTAGGCGAGGCGA (SEQ ID NO: 410)  
退火温度: 52℃,

15 进行了2轮独立的RT-PCR反应。

20

*Pro 210 (核纤层蛋白B1)*

439 bp跨越GenBank登录号L37747 bp. 424-862的PCR产物,  
有义: 5'-ACTGTGTACTGTTCGGAAGGG (SEQ ID NO: 411)  
反义: 5'-TAGAGAAACCCTTCCCTCCC (SEQ ID NO: 412)

25 退火温度: 46℃,  
仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

*Pro71 (p16INK4/MTS 1, CDKN2A)*

437 bp跨越GenBank登录号U26727 bp. 176-612的PCR产物,  
有义: 5'-TGAGGAGCCAGCGTCTAGGG (SEQ ID NO: 413)  
反义: 5'-GTGGCCCTGTAGGACCTTCG (SEQ ID NO: 414)

30

退火温度: 57℃,

仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

*DR6 (TNFRS12, 肿瘤坏死因子受体超家族成员21)*

5 559 bp跨越GenBank登录号AF068868 bp. 1081-1639的PCR产物,

有义: 5'-GTGCTTGTGGTGATTGTGGTGTG(SEQ ID NO: 415)

反义: 5'-TGTTCTTGTCCTGTGGGGAAGG (SEQ ID NO: 416)

退火温度: 56℃,

进行了2轮独立的RT-PCR反应。

10

*NCAM1 (神经细胞粘附分子)*

456 bp跨越GenBank登录号HSU63041 bp 2045-2500的PCR产物,

有义: 5'-TATGAGGTCTACGTGGTGGC(SEQ ID NO: 417)

反义: 5'-CTCCTGGCACTCTGGCTTTG (SEQ ID NO: 418)

15

退火温度: 53℃,

仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

*NPTXR (神经元正五聚蛋白受体)*

482 bp跨越GenBank登录号HS327J16 bp.46012-46493的PCR产物,

20

有义: 5'-CACACGCACACATGTTGCAGC(SEQ ID NO: 419)

反义: 5'-GCTCTGAGAGGCCAAAGCC (SEQ ID NO: 420)

退火温度: 55℃,

仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

25

*GLUR2 (离子化谷氨酸受体2; GRIA2)*

522 bp跨越GenBank登录号L20814 bp. 2449-2970的PCR产物,

有义: 5'-AGGAACCCCAGTAAATCTTGCAG (SEQ ID NO: 421)

反义: 5'-TCAGTCACACTGACATTCATTCCC(SEQ ID NO: 422)

退火温度: 51℃,

30

仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

*ITGAV* (整联蛋白 $\alpha V$ 亚单位)

533 bp跨越GenBank登录号M14648 bp.3867-4399的PCR产物,

有义: 5'-AATTTTAGGTCAAATCCTTCAAGCCAAC (SEQ ID NO: 423)

反义: 5'-TGACAGCCGAGACTGATTTTACACATTA (SEQ ID NO: 424)

5 退火温度: 50℃,

仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

*LRP8* (载脂蛋白E受体2)

459 bp跨越GenBank登录号HSZ75190 bp.2016-2474的PCR产物,

10 有义: 5'-GCTCCATATAGGGAGAAGCTGCTCAG (SEQ ID NO: 425)

反义: 5'-CCCCAGCAACCAAACATCTTCT (SEQ ID NO: 426)

退火温度: 50℃,

仅进行了1轮RT-PCR反应, 未对睾丸进行RT-PCR。

15 Western印迹蛋白质样品

从细胞系和异种移植的肿瘤中提取全细胞裂解物, 以证实选定基因的蛋白质表达。通过用橡胶刮棒刮擦(对贴壁细胞而言), 并用冰冷的20mM Tris-Cl pH7.5洗涤, 由半-铺满的细胞系培养物制备裂解物。在含有按1:100

20 稀释的Protease Inhibitor Cocktail Set II和III(Calbiochem)的冰冷的20mM Tris-Cl pH7.5, 2% TritonX-100中裂解细胞沉淀物。旋涡振荡后, 于4℃, 以15,000×g离心5分钟以澄清裂解液。收集肿瘤后, 立即制备异种移植肿瘤的裂解物, 按类似的方法处理成年大鼠脑的裂解物。给肿瘤称重, 在5倍体积(w/w)含有按1:100稀释的Protease Inhibitor Cocktail Set II和III(Calbiochem)

25 的冰冷的20mM Tris-Cl pH7.5, 2% TritonX-100中, 使用Heindolph DIAX 900匀浆器使肿瘤成为匀浆物, 于4℃, 以15,000×g离心5分钟以澄清裂解液。按照厂商推荐的方法, 使用BCA Protein Assay (Pierce)测定裂解液的蛋白质浓度。

30 在一些western印迹中, 将商购的Jurkat(Santa Cruz)和A431(Neomarkers)细胞裂解液用作阳性对照。

### SDS-PAGE和印迹

在含有还原剂的LDS样品缓冲液(Nu-PAGE)中,将5-15 $\mu$ g裂解物上样于每个泳道,在3-8% Tris Acetate SDS凝胶上进行分离,在Tris Acetate SDS迁移缓冲液(NuPAGE)中,150V电泳1小时,转移至浸于Transfer Buffer(NuPAGE)的PVDF LC 2002 (Novex)膜。蛋白质大小标记是ProSieve有色蛋白质标记。5 为了用抗-NCAM1抗体进行探测,于37 $^{\circ}$ C用40ng/ $\mu$ l重组EndoN-HIS (E. Bock惠赠)预处理裂解物5分钟以消除聚唾液酸化(polysialylation)。

室温下,用含有5%低脂奶的洗涤缓冲液(10mM Tris-Cl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1%吐温20)封闭膜60分钟(对于抗整联蛋白 $\alpha$ E抗体(CD103)而言),对于ITGAE而言,全部保温和洗涤程序都使用Tris-Cl缓冲液pH 10.2。在如下所述的封闭缓冲液中,使印迹与第一抗体和第二抗体保温,按照厂商的推荐,通过ECL(Amersham)或使用NBT/BCIP片剂(Roche)的碱性磷酸酶肉眼观察结合的抗体。10

#### 15 *NCAM1 (神经细胞粘附分子)*

第一抗体:按1:100稀释的小鼠单克隆抗-NCAM1克隆123C3 (Santa Cruz)。4 $^{\circ}$ C保温16小时。第二抗体:按1:500稀释的与碱性磷酸酶偶联的兔抗-小鼠Ig(DAKO)。室温下保温1小时。通过碱性磷酸酶显色。

#### 20 *GluR2 (离子化谷氨酸受体2)*

第一抗体:按1:500稀释的小鼠单克隆抗-GluR2和4(克隆3A11)(Pharminogen)。4 $^{\circ}$ C保温16小时。第二抗体:按1:500稀释的与碱性磷酸酶偶联的兔抗-小鼠Ig(DAKO)。室温下保温1小时。通过碱性磷酸酶显色。

#### 25 *GRM8 (GluR8 (metabotropic谷氨酸受体8))*

第一抗体:按1:500稀释的兔多克隆抗-mGluR8 (Upstate Biotechnology, TriChem)。4 $^{\circ}$ C保温16小时。第二抗体:按1:1000稀释的辣根过氧化物酶猪抗兔Ig(DAKO)。室温下保温1小时。通过ECL显色。

#### 30 *NPTXR(神经元正五聚蛋白受体)*

第一抗体：按1:500稀释的山羊多克隆抗NPTXR(C-17)(Santa Cruz)。4℃保温16小时。第二抗体：按1:1000稀释的辣根过氧化物酶兔抗山羊Ig(DAKO)。室温下保温1小时。通过ECL显色。

#### 5 ITGAE (整联蛋白 $\alpha$ E亚单位)

第一抗体：按1:1000稀释的山羊多克隆抗整联蛋白 $\alpha$ E(N-19)(Santa Cruz)。4℃保温16小时。第二抗体：按1:500稀释的碱性磷酸酶兔抗山羊Ig(sc-2771)(Santa Cruz)。室温下保温1小时。通过碱性磷酸酶显色。

#### 10 所得芯片分析数据的群(cluster)分析

为了阐明所分析的正常组织和小细胞肺癌细胞系之间表达模式的差异，我们利用了SOM (自-组织图谱)和等级群集(hierarchical clustering)的特性。连续使用这些特性，从而在表达模式相似性的基础上对基因进行分组。分析所使用的基因是平均差大于50的基因，经评价，所述基因存在于任何一个样品中。

#### SOM

SOM(自-组织图谱)是一种群分析方法，它在某种程度上与k-中值群有关。SOM算法背后的基本原理是：在重复输入数据的过程中，最初被随机初始化的神经元加权矢量能表示大量初始测量矢量(Toronen等, 1999)。计算中使用了下述参数：**基因**：Xdim: 1, Ydim: 10, 重复：100000, **样品**：Xdim: 1, Ydim: 10, 重复：20000。

#### 等级群集

等级群集背后的基本概念是：将一套项目(基因或数组)装配成树形，如果项目彼此非常相似，则通过很短的分支将它们连接起来，随着相似性的降低，分支逐渐变长。将SOM群集的输出文件夹用于等级群集，这意味着通过SOM群集发出的命令被用于指导等级树中结点的反弹(Eisen等, 1998)。计算时使用了下述参数：**基因**：群: Yes, 计算加权: Yes, 相似性矩阵: 对射变换不在一点, **样品**：群: Yes, 计算加权: Yes, 相似性矩阵: 对射变换不在一点。随后进行Average Linkage群分析。

### 群集分析的结果

- X-轴(样品)群集(图2)如预期的那样显示出群集在一起的SCLC细胞系, Mar86MI和 CPH54A离得最远。CPH54A和B群集得非常近(B是A的克隆变体), GLC14, GLC16和GLC19(得自相同患者)也是如此。在正常组织中, 得自Ambion的肺RNA和得自CLONTECH的肺RNA的表达群集得很近, 得自CLONTECH的2个不同批次的脑RNA与得自Ambion的脑RNA的表达也群集得很近。类似地, 胎脑与成熟脑RNA的表达也群集得很近, 在所有正常组织中, 胎脑与SCLC细胞系最近。这证实了SCLC细胞系为神经-内分泌来源。
- Y-轴(基因)的群集清楚显示了4个非常不同的在SCLC细胞系中高表达的基因群。最小的含有19个基因, 第二和第三个各含有65个基因, 第四个和最大的基因群含有268个基因。

### 候选启动子(第一核酸序列)的选择标准

- 根据启动子所控制的基因的表达水平来选择候选启动子。对所有21个SCLC细胞系而不是异种移植物, 并对7个正常组织(脑、肾上腺、肺、肾脏、心脏、前列腺、胰腺)进行选择。

- 根据几个标准进行选择。仅包括经评价以绝对信号和平均差 $>50$ (表达水平)存在(P)的基因。在Microsoft Excel 2000中进一步处理这些输出数据。
- 选择经评价在21个SCLC细胞系中的至少11个中存在的基因, 如果经评价, 基因存在于一个或多个正常组织中, SCLC细胞系的平均差中间值必须为正常组织平均差中间值的4倍或4倍以上。使用得自更多个正常组织的RNA进行第二次筛选之后, 选定的候选启动子也要满足与上述相同的标准, 如果它们不满足上述要求, 则需放弃。

25

### 通过RT-PCR证实芯片分析

- 通过半-定量RT-PCR分析选定的基因以证实通过芯片分析鉴定的表达。使用GADPH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)的引物检测cDNA的质量(图2)。所有cDNA样品都明确显示出供进一步分析用的cDNA的质量良好。
- 用Pro221(IA-1, 胰岛瘤相关抗原1)的引物进行的RT-PCR(图3)显示出: 在正常组织中, 肾上腺, 脑和胎脑在芯片和RT-PCR分析中都呈弱阳性。4

个SCLC细胞系或异种移植物在两种分析中都为阴性。所有其它样品为弱至很强的阳性。RT-PCR和芯片分析的相关性很好。

用Pro30(KIA0042)的引物进行的RT-PCR(图4)显示出：在正常组织中，睾丸在芯片和RT-PCR分析中都呈阳性。其它正常组织在两种分析方法中为低或阴性。所有SCLC细胞和异种移植物在芯片和RT-PCR分析中都为阳性。有几个样品在芯片和RT-PCR中的相对量不相关(如在一个分析中高，而在另一个分析中低)。

用Pro41(MAD2)的引物进行的RT-PCR(图5)显示出：通过芯片分析和RT-PCR测定的大多数正常组织中的低表达和睾丸中的高表达。芯片和RT-PCR分析都显示出所有SCLC细胞系和异种移植物的极高表达。

用Pro210(核纤层蛋白B1)的引物进行的RT-PCR(图6)显示出：正常组织的极低表达或不表达(两种分析中结肠都为阳性)。芯片分析显示出所有SCLC和异种移植物的极高表达，RT-PCR表明：除了2个外，其它都为强阳性。任意选择RT-PCR值以匹配芯片信号。

用Pro71(CDKN2A)的引物进行的RT-PCR(图7)显示出：正常组织的极低表达或不表达，除4个外，所有SCLC的高表达。除了一个样品在RT-PCR中为阴性，在芯片分析中为阳性外，RT-PCR和芯片数据的相关性很好。

### 通过RT-PCR证实芯片分析的结论

芯片数据和RT-PCR数据的相关性很好。半-定量RT-PCR反应证实了通过芯片分析观察到的大多数正常组织中的低表达至不表达。SCLC细胞系和异种移植物中，以及所有或大多数细胞系中选定基因的表达很高。因此，使用芯片分析鉴定高表达和特异性表达的启动子是可取的方法。

### 通过芯片分析鉴定的候选细胞表面分子的选择标准

根据几个标准选择第一代候选细胞表面分子。对所有21个SCLC细胞系而不是异种移植物，并对7个正常组织(脑、肾上腺、肺、肾脏、心脏、前列腺、胰腺)进行选择。仅包括经评价以绝对信号和平均差 $>50$ (表达水平)存在(P)的基因。在Microsoft Excel 2000中进一步处理这些输出数据。对每个细胞系或组织而言，一个基因被记为1分。分别对正常组织和SCLC细胞系求出每个基因的总分。选择经评价在21个SCLC细胞系中的至少5个中存在的基

因。如果基因名称中出现下述的一个词语，就在这些和选定的候选基因中进行检索：“受体、膜、粘附、整联蛋白、表面、抗原、多配体聚糖、转运、通道、激素、结合、糖蛋白、基质、CAM、桥粒、间隙连接、 $\delta$ 、免疫球蛋白、MHC、CD、(HSPG、CSPG、完整的和具缺刻的)”。根据数据库检索(NCBI: Nucleotide, Protein, Nucleotide, OMIM, PubMed, LocusLink)结果阐明蛋白质的功能和细胞定位。然后根据这些信息，着重看功能、细胞定位和表达评价(即SCLC的“表达评分”高于正常组织)，籍此选择最佳的候选基因。另外，根据特定的组织评价不同正常组织中的表达，从而估计出理论上的副作用。使用第5版本的Affymetrix Microarray Suite<sup>TM</sup>，对得自21个SCLC细胞系、8个以异种移植物形式生长的细胞系和17个正常组织(脑、肺、肾脏、心脏、气管、肾上腺、前列腺、唾液腺、甲状腺、肝脏、胰腺、脾脏、小肠、骨骼肌、结肠、胃、睾丸)的RNA进行第二次选择。仅包括经评价以绝对信号和信号>20存在(P)于至少6个SCLC细胞系或异种移植物中的表达基因。如上所述进行进一步选择。

15

#### 通过RT-PCR证实芯片分析

通过半-定量RT-PCR分析选定基因以证实通过芯片分析鉴定的表达。用DR6(TNFR相关死亡受体6)的引物进行的RT-PCR(图8)显示出大多数正常组织中的中度表达，以及除了一个外，所有SCLC细胞系或异种移植物中的中度表达至高表达。芯片分析显示出2个正常组织中的高表达，和8个SCLC细胞系或异种移植物中的高表达。芯片分析的所有阳性结果在RT-PCR中也为阳性。

用LRP8(载脂蛋白E受体2)的引物进行的RT-PCR(图9)显示出：6个正常组织中的低表达以及所有SCLC细胞系和异种移植物中的高表达在RT-PCR中皆为阳性。芯片分析的所有阳性结果在RT-PCR中也为阳性。任意选择RT-PCR值以匹配芯片信号。

用NTPXR(神经元正五聚蛋白受体)的引物进行的RT-PCR(图10)显示出：芯片分析的所有阳性结果在RT-PCR中也为阳性。RT-PCR测定出有更多的组织和SCLC具有阳性表达，但SCLC中的表达平均较高。两个SCLC样品为阴性。任意选择RT-PCR值以匹配芯片信号。

用NCAM1(神经细胞粘附分子)的引物进行的RT-PCR(图11)显示出: 芯片分析的所有阳性结果在RT-PCR中也为阳性。仅在RT-PCR中, 几个组织和除一个以外的所有SCLC为阳性。在RT-PCR和芯片分析中, 一个SCLC细胞系皆为阴性。任意选择RT-PCR值以匹配芯片信号。

- 5 用GluR2(离子化谷氨酸受体2)的引物进行的RT-PCR(图12A)显示出: 芯片分析的所有阳性结果在RT-PCR中也为阳性。两种分析都显示出脑中很高的表达, RT-PCR显示出肾上腺中的低表达。在RT-PCR和芯片分析中, 4个SCLC细胞系皆为阴性。任意选择RT-PCR值以匹配芯片信号。

- 10 用ITGAV(整联蛋白 $\alpha v$ 亚单位)的引物进行的RT-PCR(图12B)显示出: 5个样品在芯片分析中为阳性, 但在RT-PCR中为阴性。除此之外, 芯片分析和RT-PCR分析之间有良好的相关性。高表达出现在SCLC中, 也出现在很多组织中。

任意选择RT-PCR值以匹配芯片信号。

#### 15 通过RT-PCR证实表面分子表达的芯片分析的结论

除了ITGAV外, 通过芯片分析鉴定为表达的所有基因在RT-PCR分析中也被证实为表达。当通过RT-PCR进行测定时, 更多的样品为阳性。SCLC细胞系和异种移植物中, 以及很多细胞系中选定基因的表达高。因此, 使用芯片分析鉴定SCLC表达的表面分子的mRNA是可取的方法。

20

#### 通过Western印迹证实芯片分析

- 通过使用特异性抗体的Western印迹分析选定基因产物的表达, 以与通过芯片分析鉴定的mRNA的表达进行比较。仅对SCLC细胞系和异种移植物进行Western印迹分析。使用抗mGluR8 (metabotropic谷氨酸受体8)抗体的Western印迹分析(图13)显示出所有SCLC细胞系和异种移植物中的mGluR8蛋白表达, 而芯片分析仅检测到8个样品中的表达。Western印迹的强度与芯片值不相关, 但清楚地显示出mGluR8的表达。将大鼠脑匀浆物用作阳性对照。

- 30 使用抗NPTXR(神经元正五聚蛋白受体)抗体的Western印迹分析(图14)显示出所有SCLC样品中的蛋白质表达, 而芯片分析已鉴定出所述表达。除了GLC 28外, 所有样品为弱至强阳性。DMS153具有显著的高分子量带, 此

带也存在于大鼠脑中，它可能是未经加工的或二聚体化的受体。蛋白质的量不与芯片数据直接相关，但清楚显示出大多数SCLC中的表达。将大鼠脑匀浆物用作阳性对照。

5 使用抗NCAM1(神经细胞粘附分子)抗体的Western印迹分析(图15)显示出：所有SCLC细胞系和除一个以外的所有异种移植物中，两个NCAM1同种型的表达，而芯片分析仅鉴定出14个样品中的表达。芯片分析中的所有阳性样品在Western印迹中也为阳性。

在芯片分析和Western印迹中，相对量之间没有明显的相关性。

10 使用抗GluR2(离子化谷氨酸受体2)抗体的Western印迹分析(图16)显示出9个样品中的表达。6个样品在芯片分析中为阳性，但在Western印迹中为阴性。然而，抗体的敏感性不高。其它阳性样品与芯片分析的相关性较好。

15 使用抗ITGAE(整联蛋白 $\alpha$ E亚单位)抗体的Western印迹分析(图17)显示出大多数SCLC样品中的表达。1个样品在芯片分析中为阳性，但在Western印迹中为阴性。对很多样品而言，芯片分析和Western印迹之间表达的相对强度不相关。将A431细胞裂解物用作阳性对照。

### Western印迹证实表面分子的芯片分析的结论

20 对选定的表面分子而言，通过芯片分析鉴定为表达的所有基因在Western印迹中也被证实为表达，这表明芯片分析测定的基因表达在蛋白质合成中有所反映。对于几个基因而言，Western印迹相对于芯片分析而言能在更多样品中鉴定出表达。因此，芯片分析是可用于鉴定SCLC表达的表面分子的方法。

### 实施例2

#### 25 通过RT-PCR鉴定SCLC细胞系表达的表面分子

30 通过RT-PCR方法鉴定其它表达的细胞表面分子。使用Quick-Prep®mRNA纯化试剂盒(Pharmacia)，根据厂商说明，从上文列出的所有21个细胞系中制备mRNA。29个不同组织的mRNA或总RNA得自CLONTECH。RNA得自下列组织：全脑、脊髓、小肠、肾脏、心脏、肺、睾丸、视网膜、膀胱、胃、子宫、肝脏、脾脏、白细胞、脂肪细胞、脑垂

体、卵巢、乳腺、前列腺、气管、胸腺、肾上腺、结肠、胰腺、唾液腺、骨髓、甲状腺、淋巴结和骨骼肌。

使用RT-PCR用的第一链cDNA合成试剂盒(Boehringer Mannheim), 根据厂商说明, 使用寡-(dT)<sub>15</sub>引物进行单链cDNA合成。

- 5 随后, 在10mM Tris-Cl(pH 8.3), 50mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8mM dNTP, 0.4μM 引物和 0.12U/μl Thermoprime 加 DNA 聚合酶 (Advanced Biotechnologies)中, 以cDNA为模板进行PCR, 95℃ 30秒, 62℃ 30秒和72℃ 1分钟扩增35或40个循环。对所有cDNA进行使用GADPH引物的对照反应。通过琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。下文列出的是所分析的基因产物, 引物序列, 它们在GenBank数据库中的核苷酸序列中的位置, 相应基因 mRNA为阳性的细胞系或组织的百分比。

分子	GenBank 登录号	引物序列	位置	阳性 RT-PCR	
				正常组 织	SCLC系 组织
心房利钠肽清除受体	AF025998	5'-AGCGGAACTGCTACT TCA CC(SEQ ID 427)	629-648	95.5 %	95.5 %
		5'-TAGTCTCCACTGGTC ATGCC(SEQ ID 428)	851-832		
胃泌素/CCK-B受体	XM_0060 34	5'-GTGCGAATGTTGCTG GTGATCG(SEQ ID 429)	994-1015	100 % <sup>#</sup>	100 %
		5'-ACGGTGCATGAAGCA GTAGACC(SEQ ID 430)	1185-1164		
神经调节肽B受体	M73482	5'-AGATGGAAACACGGA AACGCCTGG(SEQ ID 431)	909-932	96.5 %	95.2 %
		5'-GGCTGTTGAAGGCTG TTGAAATGCCTCCTGAA GC(SEQ ID 432)	1151-1128		
得自胶质细胞系的神经营养因子α受体	NM_0014 96	5'-TCTGCTTCTCCGACCC GCTT(SEQ ID 433)	761-780	96.5 %	95.2 %
		5'-TAGCTGCAATGGCCT CCG TG(SEQ ID 434)	1042-1023		
铃蟾肽受体	XM_0103	5'-CATGCTCCACTTTGTC	1289-1310	100 % <sup>#</sup>	100 %

(GRPR)	17	ACCAGC(SEQ ID 435)			
		5'-GAGGTCATGCAGGTT GTACTCC(SEQ ID 436)	1477-1456		
metabotropic谷 氨酸受体8	U92459	5'-CCAGAGCTAAGTGAT AACACCAGG(SEQ ID 437)	598-621	21.1 %	95.2 %
		5'-TTCACGTGGGATTTTC TGTGACTG(SEQ ID 438)	801-825		

# 对7个正常组织的RNA进行分析

RT-PCR实验数据清楚地暗示：metabotropic谷氨酸受体8是候选受体，因为它在95.2%的SCLC细胞系中被表达，而仅在21.1%的正常组织中表达。

5 其它受体也是候选的，因为它们95%以上的细胞系中表达。通过快速RT-PCR或Northern印迹定量RNA表达的相对水平将进一步鉴定适当的受体。

### 实施例3

#### 通过Western印迹鉴定的由SCLC细胞系表达的表面分子

10 来自与上述相同的实验组的19个受试SCLC细胞系中有18个能表达表面分子：神经细胞粘附分子(NCAM1)和钙粘蛋白(Rygaard等, 1992)。利用多克隆抗体对体外增殖和作为异种移植物在裸鼠中增殖的细胞系的蛋白质提取物进行Western印迹，以测定SCLC细胞系中的表达。通过免疫组化法在全

15 部20个经手术切除的SCLC肿瘤中检测到NCAM1，这表明SCLC细胞在体内表达NCAM1(Kibbelaar等, 1991)。在胚胎发育过程中，NCAM1被广泛表达，但在成年时，NCAM1却被大幅度下调(评述于Gegelashvili and Bock, 1996)，因此，在SCLC患者的正常组织中低水平地表达。已阐明NCAM1的表达部分受胞吞作用调节(Minana等, 2001)，通过抗体结合可使NCAM1内化

20 (Michalides等, 1994)。已发现在正常(Kamei等, 1999; Le等, 1999)和病理条件下(评述于Parkes and Hart, 2000)，钙粘蛋白可被胞吞。因此，这些分子是基因转移用表面受体的潜在候选分子。

### 实施例4

#### 通过其它方法鉴定的由SCLC细胞系表达的表面分子

已证实很多SCLC细胞系可表达几种其它的细胞表面受体,因此,它们也是基因转移用表面受体的潜在候选分子。

通过化学交联阐明了上述实验组的几个细胞系中的高亲和性转化生长因子- $\beta$ 受体(TGF- $\beta$ R)的表达(Damstrup等,1993)。通过Northern印迹分析,在全部9个SCLC中发现了TGF- $\beta$  RI mRNA的存在,在9个SCLC细胞系中的6个中发现了TGF- $\beta$  RII mRNA的存在,在全部9个SCLC中发现了TGF- $\beta$  RIII( $\beta$ 聚糖) mRNA的存在(Norgaard等,1996)。配体与这些受体的结合导致受体内化(Anders等,1997, Dore等,2001)。

通过RT-PCR测定出胰岛素-样生长因子受体(IGF-R) mRNA的存在,发现它存在于全部14个被检查的SCLC细胞系中(Quinn等,1996)。Northern印迹、竞争性结合试验和化学交联阐明了全部11个SCLC细胞系中IGF-R1(Rotsch等,1992)和IGF-RII(Schardt等,1993)的存在。已知这两种受体在与配体结合之后都能内化(Dore等,1997)。

在多个癌症细胞系和肿瘤上观察到表皮生长因子受体(EGF-R)和多种同系物、变体或突变体(*v-erb-B*, HER2/neu (*c-erb-2*), ErbB3, ErbB4和EGF-R vIII)的表达,在与配体结合之后,几种形式发生内化(评述于Wells,1999; Huang and Harari,1999)。通过Northern印迹分析,上述实验组中21个SCLC细胞系中有11个能表达EGF-R。通过放射性受体和亲和标记分析,在10个细胞系中证实了表达(Damstrup等,1992)。实际上,已在几个SCLC细胞系中阐明EGF-R可介导靶向基因传递(Cristano and Roth,1996, Frederiksen等,2000)。

### 实施例5

#### 比较SCLC细胞系与其它类型的正常人组织和其它肿瘤细胞系的基因表达

为了进一步比较SCLC细胞系和正常组织间的基因表达分布图,得自正常组织和白细胞的总RNA得自商业来源(CLONTECH, Stratagene, Ambion或ResGen)。按上述方法制备经生物素标记的cRNA。

重要的是确定:相对于正常组织而言,基因在SCLC细胞中高表达是癌症细胞的一个普通现象,还是SCLC所特有的现象。因此,需从其它类型人癌症的细胞系(如可商购的、得自乳腺癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌

(NCLC)、结肠癌、成神经细胞瘤的细胞系)中分离总RNA,并按上文所述进行分析。

### 比较SCLC细胞系的体外基因表达与SCLC细胞的体内基因表达

#### 分析体内增殖的SCLC细胞系的基因表达

- 5 根据Rygaard等,1992的方法,在BALB/c裸鼠的两肋以异种移植物的方式体内增殖选定的细胞系。当一个肿瘤的大小达1cm×1cm时,处死小鼠,取出肿瘤。为了从肿瘤中分离总RNA,将肿瘤储存于RNA later™(Ambion)中放置24-48小时,然后从储存溶液中取出,储存于-70℃直至制备RNA。通过
- 10 根据厂商说明用Trizol (Life Technologies)提取,从肿瘤中制备总RNA。根据厂商所述的RNA清除法,在Rneasy柱(Qiagen)上进一步纯化总RNA。按上述分析分离的总RNA,制备cDNA和经生物素标记的cRNA,并用Affymetrix芯片分析基因表达。通过在冰上,在5倍体积(w/v)添加有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(得自Calbiochem的Protease Inhibitor Cocktail Set III和Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II)的20mM Tris-Cl(pH7.5),2% TritonX-100中用特氟龙研杵匀
- 15 浆新鲜取出的肿瘤,随后通过高速离心(13,000×g)进行清除,即可制备Western印迹分析所用的蛋白质提取物。

#### 分析小细胞肺癌患者活检样品的基因表达

- 将被诊断为小细胞肺癌的患者的活检样品(得自Herlev医院)储存于RNA later™(Ambion)中放置24-72小时,然后从储存溶液中取出,储存于-70
- 20 ℃。有经验的病理学家将肿瘤切成小块,按上述从肿瘤中分离RNA。集中几个肿瘤的RNA。所得总RNA的量应不足以直接制备经生物素标记的cDNA,按Ohyama等,2000所述修改标记方法,以包括2个进一步的扩增步骤。

### 实施例6

#### 鉴定细胞表面分子的实验方法

- 25 通过基因芯片分析、Northern印迹、RT-PCR或Western印迹鉴定SCLC细胞表达的候选细胞表面分子(受体)。通过RT-PCR和/或通过测序(在GATC Biotech AG, Germany)测定SCLC细胞表达的特定剪接形式。必须通过其它方法证实仅在mRNA水平上鉴定的分子的蛋白质表达和亚细胞定位。如果可以获得商购抗体,可使用厂商推荐的方法进行Western印迹鉴定(按上述使用由
- 30 体外和体内增殖的上述实验组的SCLC细胞系制备的蛋白质提取物)和SCLC细胞系的免疫染色。

对于具有已知配体(可商购或按下文所述重组制备)的分子而言,另外,或者可通过结合或交联研究完成上述目的。也可以使用经标记的配体(如放射性-、生物素-或荧光标记的配体)来测定受体的亲和性、每个细胞受体分子的数目及其内化配体的能力。

- 5 对于不具有已知配体的细胞表面分子而言,必须测定表面分子的表达和配体的鉴定。由于编码细胞表面分子的mRNA能容易地得自SCLC细胞系,可通过标准的RT-PCR法将编码胞外部分的cDNA克隆至表达载体中,以表达出重组蛋白质用于免疫。优选在细菌系统(如Qiagen pQE载体)中,以与适当标记(如6×HIS)融合的形式进行表达,从而能容易地纯化出重组蛋白质。在哥本哈根大学Panum研究所的实验药理学系进行免疫,以使兔产生多克隆抗体。在哥本哈根血清研究所产生小鼠单克隆杂交瘤。使用重组产生的蛋白质作为固定抗原(在微滴孔内或膜上),筛选经免疫动物的血清和杂交瘤的条件培养基的抗原结合。另外,当由哺乳动物细胞表达表面分子时,必须测定抗体对表面分子的特异性。通过使用RT-PCR将编码全长分子的cDNA克隆
- 10 至真核表达载体(如Invitrogen的pcDNA3.1或CLONETCH的pCMV-Tag)即可完成此目的。瞬时转染不能内源性表达所述分子的细胞系之后,使用间接免疫荧光染色即可测定抗体的特异性。

- 20 当鉴定出适当的抗体或血清时,通过对体外和体内生长的SCLC细胞系以及SCLC活检样品进行免疫染色,分析蛋白质的表达以证实体外和体内表达。使用在载玻片上点有200个不同组织样品的人组织列阵(GenRes的VastArray)评价正常组织中的表达。

或者,可利用分离自噬菌体展示文库的人单链抗体(见下文)。

### 实施例7

#### 鉴定细胞表面分子的配体并测定其内化能力的实验方法

- 25 可能的话,以经放射性-、生物素-或荧光标记的形式获得可商购的已知配体。为了分析候选表面分子整联蛋白,首先必须测定在细胞系中发现的特定整联蛋白 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚单位组合以鉴定出胞外基质配体。由于很多抗特定整联蛋白组合的抗体可以商购,因此通过免疫染色即可完成此目的。

- 30 如果配体可以商购,但不是以经标记的形式存在,可用 $^{125}\text{I}$ (如使用氰胺-T法)或用荧光染料或生物素(如使用Molecular Probes的FluoReporter试剂盒)标记配体。进行结合试验以测定配体与表面分子结合的特异性和能力。在

剥离外部结合的配体(例如通过酸或蛋白酶处理),测定经放射性-标记的配体的内化放射活性;用酶或经荧光标记的链霉亲和素染色经生物素标记的配体,或直接通过显微镜评价经荧光标记的配体之后,使用经标记的配体即可监测37°C时表面分子的内化能力(0-4°C保温以用作对照)。

- 5 如果配体已知,但不能商购,可使用RT-PCR将编码配体的基因克隆至表达载体,或由适当的组织或细胞系获得cDNA文库,或者(当可以获得时)从商业来源获得克隆(Invitrogen的GeneStorm®克隆或CLONTECH的GeneConnection™)重组配体中应包括适当的标记(如6<sub>x</sub>HIS)以易于纯化。优选细菌表达系统。重组表达也可以将配体表达成与EGFP的融合蛋白,以便于分析结合和内化。或者,可以使用抗标记的抗体来分析结合和内化。然而,配体与其受体的结合必需翻译后修饰,如糖基化或硫酸化(sulfatation),可在酵母系统(巴斯德毕赤氏酵母)、昆虫系统(杆状病毒)或哺乳动物细胞(如HEK293, COS-7或CHO)中表达成分泌蛋白。

- 15 如果细胞表面分子的配体是未知的,基于受体基因组序列或氨基酸序列的同源性研究可鉴定出特定受体所属的受体超家族。然后可使用上述方法检测一组特异于此超家族的配体。或者,使用细菌肽表达文库(如Invitrogen的FliTrx随机肽展示文库)进行的筛选可鉴定出一个或多个肽配体。随后,可克隆这些肽配体以进行重组表达,或者商购得到这些肽配体。为了进行筛选,最好使用不表达候选表面分子的细胞系以筛选非特异性结合,而使用被表面分子的表达质粒转染的相同细胞系来鉴定特异性的肽配体。

- 20 如果已产生抗细胞表面分子的小鼠单克隆抗体,另一种可选择的方法是通过用经荧光标记的抗-小鼠抗体检测胞吞抗体,来筛选这些抗体内化的能力。还检测了克隆自产生抗体的杂交瘤的重组表达的单链抗体。为了进行临床试验,必须通过例如Losman等,1999所述的方法,使这些抗体人源化。如果不能获得内化的单克隆抗体,可以使用表达人单链抗体片段的噬菌体文库来分离内化抗体。通过与不含所述细胞表面分子的细胞系保温,以去除噬菌体展示抗体的非特异性结合,用表达分子(如上所述)的转染细胞系进行选择,可以鉴定出特异性的内化抗体,随后由胞吞后细胞所摄入的噬粒DNA克隆所述抗体(Nielsen and Marks, 2000; Heitner等, 2001)(与丹麦皇家药学院的J, Engberg教授合作)。

## 实施例8

### 鉴定表达治疗基因用的启动子

通过基因芯片(GeneChip)分析发现某基因在SCLC细胞系和异种移植  
物中高表达,但在正常组织中低表达或不表达,该基因的启动子区域是靶  
5 向基因治疗中控制和介导治疗基因表达的潜在候选启动子。首先,通过使用  
几种覆盖整个分子的不同引物套或探针,对基因芯片分析所用的RNA(得  
自SCLC细胞和正常组织)进行RT-PCR或Northern印迹,证实经基因芯片分析  
测定的候选启动子所介导的表达,从而确保启动子的癌细胞特异性(因为在  
正常组织中由相同启动子表达的另一种剪接变体不能被Affymetrix芯片识  
10 别)。由于启动子的活性和特异性可由很大一部分DNA编码,因此必需限定  
足以在SCLC细胞中进行特异性表达和高表达的启动子区域,以限制编码治  
疗基因的DNA的大小,从而增强表面分子的传递。我们将其限定为15kb,  
这处于PCR克隆所允许的大小范围之内。起初,使用能以基因组DNA为模  
板延伸大PCR产物的热稳定性聚合酶(如Stratagene的Herculase)进行PCR,以  
15 克隆出位于候选基因编码区上游的约15kb区域,所述区域包括编码mRNA 5'  
非翻译部分的区域。由HUGO数据库中的基因组序列设计PCR所用的引物,  
所述引物被设计成含有稀有的限制性位点以通过限制性裂解进行克隆,或  
者含有loxP位点以通过加入Cre重组酶直接克隆,而无需进行限制性裂解。  
检测启动子区域所用的载体被构建成为含有得自CLONTECH的无启动子基  
20 因,所述基因编码增强的绿色荧光蛋白(EGFP),所述基因的前面是多克隆  
位点中的稀有限制性位点(如得自CLONTECH的pd2EGFP-1)和/或loxP位点。  
(例如,使用Life Technologies的Lipfectamine Plus™)转染至SCLC细胞系之  
后,使用荧光显微镜以半定量的方式,或使用荧光计(如Wallac的Victor 1420)  
定量地估计启动子的活性。将少量编码受CMV启动子控制的红色荧光蛋白  
25 的质粒(如CLONTECH的pDsRed2-N1)用作转染效力的对照。

将在上述试验中有活性的启动子亚克隆为较小的片段(通过按上文所  
述进行PCR或通过标准的限制性酶消化),并按上述检测启动子活性。通过  
重新克隆至编码萤火虫萤光素酶的无启动子载体,定量测定启动子及其亚  
克隆的相对活性,用编码表达自SV40启动子的*renilla*萤光素酶的质粒共-转  
30 染以用作转染对照。使用Promega的Dual-Luciferase® Reporter Assay System,  
用发光计(EG&G的Lumat LB9507)定量测定瞬时转染细胞的提取物中两种

质粒的转录。按照类似的方法,检测不同SCLC特异性强启动子的活性部分嵌合体的最佳表达和调节。或者,可插入其它基因的增强子序列(如病毒增强子)。为了确保在多个构建过程中不丢失选定启动子区域相对于正常组织而言对SCLC细胞的特异性,还需通过转染至得自正常组织不同来源的商购细胞系中,以对所述启动子区域进行检测。如果需要较高的特异性,可在此系统中额外掺入对p53基因有突变的癌细胞的特异性。通过将loxP位点插入与治疗基因启动子相邻的位置,并插入编码Cre重组酶的基因,使其处于p53活化启动子的控制之下,表达wt p53的正常细胞将表达Cre重组酶,所述酶能切除治疗基因的启动子,因此所述酶不能表达。

10 如果肿瘤特异性启动子的转录活性不足以获得足够高水平的编码治疗基因的转录物,可以利用特异性启动子来活化第二个组织-非特异性的高活性启动子,如CMV。该系统的一个例子是:由特异性启动子编码Cre重组酶,所述启动子在肿瘤组织中表达之后能通过重组除去侧翼于loxP序列的沉默元件来活化CMV启动子(Kijama等,1999)。

15 另外,需测定内源性转录增强子(如类固醇激素受体结合区域和受体)的存在。在添加类固醇激素(如视黄酸、雌激素、孕酮或糖皮质激素)之后,按上文所述,通过用控制EGFP或萤光素酶表达的启动子转染对其进行分析。如果存在,它们将有机会通过佐以激素来增强治疗基因的表达。或者,如果相应受体由SCLC细胞表达,可将这些序列插入启动子以增强转录活性。

## 20 实施例9

### DNA与配体复合的最优化

25 为了进行特异性内化,必需在编码控制治疗基因表达的组织特异性启动子的DNA与配体之间形成复合物。试验了几种不同的可能性。经由链霉亲和素与经生物素标记的聚-阳离子聚-L-赖氨酸(PLL)结合的经生物素标记的配体会与带负电的DNA复合,从而形成可被配体内化的、紧密的配体/DNA polyplex(Frederiksen等,2000)。按Cristiano等,1996或Wagner等,1990所述进行配体和不同大小的聚-L-赖氨酸的生物素化。

30 或者,可使用商购的支化阳离子聚合物聚乙烯亚胺(PEI)来形成配体/DNA复合物。PEI/DNA复合物本身的基因转移活性较低。然而,通过使配体与PEI共价交联,可以大大提高活性和特异性(Kircheis等,1997)。另一个

可能性是按上文对PLL所描述的那样,检测与经生物素标记的配体和链霉亲和素混合的经生物素标记的PEI。

相对于使用PLL而言,该系统的另一个优点是不必在复合物中包含内体裂解剂(见下文)。

5 如果配体是重组产生的,也可以试验不同的方法。通过在重组配体中包括可与含有治疗基因的DNA中编码的特定DNA序列强结合的肽序列,可以获得DNA/配体复合物,然后通过PLL使所述复合物被中和,并且变得密集。按照此方法,使用DNA检测与配体形成重组融合物的酵母转录激活物GAL4的DNA结合结构域,其中在DNA中掺入GAL4识别序列的串联重复。

10 最初使用编码受CMV启动子控制的EGFP的DNA检测上述复合物,所述DNA与已知能结合可内化细胞表面受体的配体复合。给表达和不表达配体的受体的细胞施用之后,通过荧光显微镜肉眼评价和/或通过荧光计定量测定上述复合物的效力和特异性。

### 实施例10

#### 15 复合物的内体裂解的最优化

为了避免被胞吞的复合物的溶酶体降解,必需使复合物中包含内体裂解剂以将DNA释放至胞质中,或者包含如氯喹的试剂,这种试剂能提高内体pH,从而抑制溶酶体降解(评述于Guy等,1995)。已证实当复制缺损的腺病毒与配体/DNA polyplex直接偶联时,是一种有效的内体裂解剂(Yoshimura等,1993)。然而,使用缺损腺病毒或病毒衣壳的缺点是不必要的免疫应答、经由病毒受体非特异性摄入复合物,安全性预警、制备困难和稳定性差。因此,为了避免这些缺点以及为了降低复合物的尺寸,将试验较小的,优选为非病毒的内体裂解剂。已发现流感病毒血凝素HA-2 N-末端融合肽(Wagner等,1992)、N-末端鼻病毒肽、假单胞菌外毒素A转运结构域(Fominaya and Wels, 1996)和合成肽(Gottschalk等,1996)能介导内体裂解或内体逃逸。当通过

25 通过与链霉亲和素偶联的经生物素标记的聚-L-赖氨酸(PLL)产生时,经生物素标记的内体裂解肽可包括在配体/DNA复合物中。或者,当重组产生配体时,可在配体的N-或C-末端部分包括肽序列。使用编码受CMV启动子控制的报道基因(EGFP或萤光素酶)的DNA检测这些肽(单独加入或掺入重组配体中)

30 的效力,其中所述DNA与已知能内化的配体复合,通过评价报道基因

的表达来监测内体裂解。如果配体/DNA复合物由PEI装配,该试剂可独立介导内体膨胀,随后裂解并释放出复合物(Boussif等,1995)。

### 实施例11

#### 治疗基因的保护和核靶向方法的最优化

- 5 为了增强内体释放的编码治疗基因的DNA对核的转运,需将DNA与编码核靶向序列(NLS-核定位序列)的肽共价连接。通过用限制性酶切除治疗基因以及启动子,并通过与寡核苷酸杂交和与寡核苷酸连接,可保护DNA末端使其免受外切核酸酶的消化,所述寡核苷酸能在双链DNA末端产生保护性的茎-环帽。通过在寡核苷酸中包含氨基-修饰的核苷酸,该残基可用于与
- 10 编码核定位信号的C-末端酰胺化肽共价交联(Zanta等,1999)(所述肽可商购自例如Genosys, TX, USA)。上文提及了多种潜在有效的序列。最初,使用具有CMV启动子的、编码EGFP的DNA片段检测通过使猴病毒40大肿瘤抗原的NLS肽与DNA偶联而导致的表达增强作用,通过瞬时转染SCLC细胞系分析表达。检测其它蛋白质(见上文)中其它编码NLS的肽,以测定最有效的核
- 15 转运。

### 实施例12

#### 选择治疗基因的实验方法

- 潜在的治疗基因选自:细胞凋亡诱导基因产物、有毒基因产物、导入对无害药物的敏感性的基因产物、癌基因的反义RNA、靶向癌基因的核酶
- 20 或编码抗癌基因抗体的基因。编码基因产物以表达蛋白质或反义RNA的cDNA可通过RT-PCR克隆获得,对cDNA文库进行PCR获得或得自商业来源。为了评价治疗基因促进细胞死亡的效力,将这些基因插入载体,使其处于CMV启动子的控制之下,(例如使用LipofectaminePlus, Life Technologies)瞬时转染(使用表达EGFP的共-转染质粒以鉴定转染细胞)上述实验组中的
- 25 SCLC细胞系之后,检测表达效果。对于细胞凋亡诱导基因而言,通过特异性染色监测转染细胞的表达效果(例如使用Molecular Probes的Vybrant 细胞凋亡检测试剂盒)。另外,通过使用荧光“活染色”监测转染细胞的细胞死亡(例如Molecular Probes的LIVE/DEAD 生存力/细胞毒性试剂盒)。随后,将从上述实验中选择的
- 30 治疗基因重新克隆,以在一个或多个SCLC特异性启动子的控制下表达,按上述通过转染分析表达效力。

### 实施例13

### 体内转导实验

一旦选定潜在的表面分子及其配体，并开发出DNA/配体复合法，该方法包括内体裂解剂和基因的核靶向，通过给在裸鼠中增殖的、上文所列选定细胞系的SCLC肿瘤异种移植物施用复合物，在体内检测传递系统的特异性和效力。通过在尾静脉中静脉内注射，给经肿瘤异种移植的小鼠施用在适当药物制剂中含有具有CMV启动子的报道基因(如 $\beta$ -半乳糖苷酶或EGFP)的复合物。24, 48或72小时之后，处死小鼠，切除肺、肝脏、心脏、脑、脾脏、肾脏和骨骼肌的肿瘤和组织，染色或分析报道基因的产物(如 $\beta$ -半乳糖苷酶)。

### 10 使用治疗基因的体内转导实验

为了检测DNA/配体体内传递治疗基因的能力，按上述进行使用通过体外实验选定的治疗基因和通过体内实验选定的DNA/配体复合物的转导实验。如果治疗基因编码胸苷激酶，需同时施用核苷酸类似物(如9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤)。通过大小测定、活检样品细胞的流式细胞术监测肿瘤的发展，处死小鼠之后，分析肿瘤的细胞凋亡和坏死。

## 参考文献

- Anders RA, Arline SL, Dore JJ, Leof EB.  
Distinct endocytic responses of heteromeric and homomeric transforming growth factor beta receptors.  
5 Mol Biol Cell. 1997 Nov; 8 (11): 2133-43.
- Batt DG, Petraitis J J, Houghton G C, Modi D P, Cain G A, Corjay M H, Mousa S A, Bouchard P J, Forsythe M S, Harlow P P, Barbera F A, Spitz S M, Wexler R R and Jadhav P K (2000) Disubstituted Indazoles As Potent Antagonists of the Integrin Alpha (v) Beta (3). J Med  
10 Chem 43 :pp 41-58.
- : Bepler G, Jaques G, Neumann K, Aumuller G, Gropp C, Havemann K.  
Establishment, growth properties, and morphological characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines.  
15 J Cancer Res Clin Oncol. 1987 ;113 (1) : 31-40.
- Berendsen HH, deLeij L, de Vries EG, Mesander G, Mulder NH, de Jong B, Buys CH, Postmus PE, Poppema S, Sluiter HJ, et al.  
Characterization of three small cell lung cancer cell lines established from one patient during longitudinal follow-up.  
20 Cancer Res. 1988 Dec 1; 48 (23): 6891-9.
- Boger DL, Goldberg J, Silletti S, Kessler T and Cheresh D A (2001) Identification of a Novel Class of Small-Molecule Antiangiogenic Agents Through the Screening of Combinatorial Libraries Which Function by Inhibiting the Binding and Localization of Proteinase MMP2 to Integrin Alpha (V) Beta (3). J Am Chem Soc 123: pp 1280-1288.  
25
- Brenner, M. B. and Cepek, K. L. Methods and compositions for modulating heterotypic Ecadherin interactions with T lymphocytes. [专利号: US6300080]. 2001.  
30
- Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor P J and Nicoletti F (2001) Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes As Targets for Neuroprotective Drugs. J Cereb Blood Flow Metab 21: pp 1013-1033.
- 35 Brauner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen E O, Madsen U and Krosgaard-Larsen P (2000) Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. J Med Chem 43: pp 2609-2645.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Meranv MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP.  
A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.  
40 Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1 ; 92 (16): 7297-301.
- Brenner, M. B. and Cepek, K. L. Methods and compositions for modulating heterotypic Ecadherin interactions with T lymphocytes. [专利号: US6300080]. 2001.
- 45 Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor P J and Nicoletti F (2001) Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes As Targets for Neuroprotective Drugs. J Cereb Blood Flow Metab 21: pp 1013-1033.
- Brauner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen EO, Madsen U and Krosgaard-Larsen P (2000) Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. J Med Chem 43: pp 2609-2645.  
50
- : Bulte JW, Go KG, Zuiderveen F, The TH, de Leij L.

- Intracerebral and subcutaneous xenografts of human SCLC in the nude rat: comparison of monoclonal antibody localization and tumor infiltrating lymphocytes.  
J Neurooncol.1993Apr ;16 (1) : 11-8.
- 5 : Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Maranoos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD.  
Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features.  
Cancer Res. 1985 Jun; 45 (6):2913-23.
- 10 Cavalheiro EA and Olney J W (2001) Glutamate Antagonists: Deadly Liaisons With Cancer.  
ProcNatl Acad Sci U S A 98: pp 5947-5948.
- Chen CY, Chans YN, Rvan P, Linscott M. McGarrity GJ, Chiana YL.  
Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir mediated cytotoxicity and the "bystander effect".  
15 Hum Gene Ther. 1995 Nov; 6 (11): 1467-76.
- : Chomczvnski P, Sacchi N.  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction.  
20 Anal Biochem.1987 Apr ;162 (1) : 156-9.
- Cristiano RJ, Roth JA.  
Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor.  
25 Cancer Gene Ther. 1996 Jan-Feb; 3(1) :4-10.
- : Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulsen HS.  
Expression of the epidermal growth factor receptor in human small cell lung cancer cell lines.  
Cancer Res. 1992 Jun 1 ; 52 (11): 3089-93.  
30
- : Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Skovgaard Poulsen H.  
Expression of transforming growth factor beta (TGF beta) receptors and expression of TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3 in human small cell lung cancer cell lines.  
Br J Cancer. 1993 May; 67 (5): 1015-21.  
35
- : de Leijl, Postmus PE, Buys CH, Elema JD, Ramaekers F, Poppema S, Brouwer M, van der Veen AY, Mesander G, The TH.  
Characterization of three new variant type cell lines derived from small cell carcinoma of the lung.  
Cancer Res. 1985 Dec; 45 (12 Pt 1): 6024-33.  
40
- Dodds DC, Omeis I A, Cushman S J, Helms J A and Perin M S (1997) Neuronal Pentraxin Receptor, a Novel Putative Integral Membrane Pentraxin That Interacts With Neuronal Pentraxin 1 and 2 and Taipoxin-Associated Calcium-Binding Protein 49. J Biol Chem 272: pp21488-21494.
- 45 Dore S, Kar S, Quirion R.  
Presence and differential internalization of two distinct insulin-like growth factor receptors in rat hippocampal neurons.  
Neuroscience. 1997 May; 78 (2): 373-83.
- 50 : Dore JJ Jr, Yao D, Edens M, Garamszegi N, Sholl EL, Leaf EB.  
Mechanisms of Transforming Growth Factor-beta Receptor Endocytosis and Intracellular Sorting Differ between Fibroblasts and Epithelial Cells.  
MolBiol Cell. 2001 Mar; 12 (3): 675-84.

- :Engelholm SA, Spanq-Thomsen M, Vindelov LL, Brunner N, Nielsen MH, Hirsch F, Nielsen A, Hansen HH.  
Comparison of characteristics of human small cell carcinoma of the lung in patients, in vitro and transplanted into nude mice.  
5 Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]. 1986 Sep; 94 (5): 325-36.
- Evans JP (2001) Fertilin Beta and Other ADAMs As Integrin Ligands: Insights into Cell Adhesion and Fertilization. *Bioessays* 23: pp 628-639.
- 10 Foley AG, Hartz B P, Gallagher H C, Ronn L C, Berezin V, Bock E and Regan C M (2000) A Synthetic Peptide Ligand of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)191 Domain Prevents NCAM Internalization and Disrupts Passive Avoidance Learning. *JNeurochem* 74: pp 26072613.
- : Fominava J, Wels W.  
15 Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system.  
*J Biol Chem.* 1996 May3 ; 271 (18): 10560-8.
- Frederiksen KS, Petri A, Abrahamsen N, Poulsen HS.  
20 Gene therapy for lung cancer.  
*Lung Cancer.* 1999 Mar; 23 (3): 191-207. Review.
- Frederiksen KS, Abrahamsen N, Cristiano RJ, Damstrup L, Poulsen HS.  
25 Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor.  
*Cancer Gene Ther.* 2000 Feb ; 7 (2): 262-8
- Gegelashvili, G. and Bock, E. (1996),  
30 Cell recognition molecules of the immunoglobulin superfamily in the nervous system.,  
*Biomembranes*, vol 3,33-75.
- Gottschalk S, Cristiano RJ, Smith LC, Woo SL.  
35 Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells : lysosomal disruption results in enhanced gene expression.  
*Gene Ther.* 1994 May; 1 (3):185-91.
- Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, Smith LC.  
40 A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells.  
*Gene Ther.* 1996 May; 3 (5): 48-57.
- Goula D, Benoist C, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA.  
Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung.  
*Gene Ther.* 1998 Sep ; 5 (9): 1291-5.
- 45 Gunji Y, Ochiai T, Shimada H, Matsubara H.  
Gene therapy for cancer.  
*Surg Today.* 2000 ; 30 (11): 967-73. Review.
- Guv J, Drabek D, Antoniou M.  
50 Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy.  
*Mol Biotechnol.* 1995 Jun; 3 (3): 237-48. Review.
- Hartman GD and Duggan M E (2000) Alpha (v) Beta (3) Integrin Antagonists As Inhibitors of Bone Resorption. *Expert Opin Investig Drugs* 9: pp 1281-1291.

- Heitner T, Moor A, Garrison JL, Marks C, Hasan T, Marks JD.  
Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library.  
5 J Immunol Methods. 2001 Feb 1; 248 (1-2): 17-30.
- Huang SM, Harari PM.  
Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results.  
10 Invest New Drugs. 1999; 17 (3):259-69 Review
- Huang TF (1998) What Have Snakes Taught Us About Integrins ? Cell Mol Life Sci 54 : pp 527-540.
- Jane DE, Hoo K, Kamboj R, Deverill M, Bleakman D and Mandelzys A (1997) Synthesis of  
15 Willardiine and 6-Azawillardiine Analogs : Pharmacological Characterization on Cloned Homomeric Human AMPA and Kainate Receptor Subtypes. J Med Chem 40: pp 3645-3650.
- Jane. D. AMPA/Kainate receptors. WWW. 2001.  
<http://www.bris.ac.uk/svnaptic/info/pharmacology/AMPA.html>  
20
- :Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokovama S, Peng YF, Nakano K, Takaishi K, Takai Y.  
Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins.  
Oncogene. 1999 Nov 18; 18 (48): 6776-84.  
25
- Kang IC, Lee Y D and Kim D S (1999) A Novel Disintegrin Salmosin Inhibits Tumor Angiogenesis. Cancer Res 59: pp 3754-3760.
- Karecla PI, Green S J, Bowden SJ ; Coadwell J and Kilshaw P J (1996) Identification of a  
30 Binding Site for Integrin AlphaEbeta7 in the N-Terminal Domain of E-Cadherin. J Biol Chem 271: pp 30909-30915.
- Kaufmann, O., Georgi, T., and Dietel, M. Utility of 123C3 monoclonal antibody against CD56 (NCAM) for the diagnosis of small cell carcinomas on paraffin sections. Hum. Pathol. 28 [12], 1373-1378. 1997.  
35
- Kerr JS, Slee A M and Mousa S A (2000) Small Molecule Alpha (v) Integrin Antagonists: Novel Anticancer Agents. Expert Opin Investig Drugs 9: pp 1271-1279.
- Kibbelaar, R. E., Moolenaar, K. E., Michalides, R. J., Van Bodegom, P.C., Vanderschueren,  
40 R. G., Wagenaar, S. S., Dingemans, K. P., Bitter-Suermann, D., Dalesio, O., van Zandwijk, N. ; and. Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma. Eur. J. Cancer 27[4], 431-435. 1991.
- Kiiima T, Osaki T, Nishino K, Kumaqai T, Funakoshi T, Goto H, Tachibana I, Tanio Y, Kishi moto T.  
45 Application of the Cre recombinase/loxP system further enhances antitumour effects in cell type-specific gene therapy against carcinoembryonic antigen-producing cancer. Cancer Res. 1999 Oct 1; 59 (19): 4906-11.
- Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Feizmann T, Buchberger M, Wagner E.  
50 Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. Gene Ther. 1997 May; 4 (5): 409-18.
- Kirkpatrick LL, Matzuk M M, Dodds D C and Perin M S (2000) Biochemical Interactions of the Neuronal Pentraxins. Neuronal Pentraxin (NP) Receptor Binds to Taipoxin and Taipoxin

Associated Calcium-Binding Protein 49 Via NP1 and NP2. *J Biol Chem* 275: pp 1778 17792.

- 5 Kiselyov VV, Berezin V, Maar T E, Soroka V, Edvardsen K, Schousboe A and Bock E (1997)  
The First Immunoglobulin-Like Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Domain Is Involved in  
Double-Reciprocal Interaction With the Second Immunoglobulin-Like NCAM Domain and in Heparin  
Binding. *J Biol Chem* 272: pp 10125-10134.

- 10 Krogsgaard-Larsen, P., Brehm, Brehm, L., Johansen, J. S., Vinzents, P., Lauridsen, J., and Curtis,  
D. R. Synthesis and structure-activity studies on excitatory amino acids structurally related to ibotenic acid. *J*  
*Med Chem.* 28 [5], 673-679.1985.

Le TL, Yap AS, Stow JL.

- 15 Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics.  
*J Cell Biol.* 1999 Jul 12; 146(1) : 219-32

: Losman MJ, Qu Z, Krishna IS, Wang J, Hansen HJ, Goldenberg DM, Leuna SO.

- 20 Generation and monitoring of cell lines producing humanized antibodies.  
*Clin Cancer Res.* 1999 Oct; 5 (10 Suppl) :3101s-3105s.

- 20 Madsen U, Stensbol T B and Krogsgaard-Larsen P (2001) Inhibitors of AMPA and Kainate  
Receptors. *Curr Med Chem* 8: pp 1291-1301.

- 25 Mercer B, Markland F and Minkin C (1998) Contortrostatin, a Homodimeric Snake Venom  
Disintegrin, Is a Potent Inhibitor of Osteoclast Attachment. *J Bone Miner Res* 13: pp 4094-14.

- 25 Michalides R, Kwa B, Springall D, van Zandwijk N, Koopman J, Hilkens J and Mooi W (1994)  
NCAM and Lung Cancer. *Int J Cancer Suppl* 8 : pp34-37.

- 30 Minana R, Duran J M, Tomas M, Renau-Piqueras J and Guerri C (2001) Neural Cell Adhesion Molecule Is  
Endocytosed Via a Clathrin-Dependent Pathway. *Eur J Neurosci* 13 : pp 749-756.

- 35 Montgomery AM, Becker J C, Siu C H, Lemmon V P, Cheresch D A, Pancook J D, Zhao X and Reisfeld R  
A (1996) Human Neural Cell Adhesion Molecule L1 and Rat Homologue  
NILE Are Ligands for Integrin Alpha v Beta 3. *J Cell Biol* 132 : pp 475-485.

Mountain A.

- 40 Gene therapy: the first decade.  
*Trends Biotechnol.* 2000 Mar; 18 (3): 119-28. Review.

Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R.

- 40 Gene therapy: designer promoters for tumour targeting.  
*Trends Genet.* 2000 Apr; 16 (4): 174-81. Review

Nielsen LL, Maneval DC.

- 45 P53 tumor suppressor gene therapy for cancer.  
*Cancer Gene Ther.* 1998 Jan-Feb ; 5(1) : 52-63. Review

Nielsen UB, Marks JD.

- 50 Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display libraries.  
*Pharm. Sci. Technol. Today.* 2000 Aug; 3 (8): 282-291.

: Norqaard P, Spang-Thomsen M, Poulsen HS.

- Expression and autoregulation of transforming growth factor beta receptor mRNA in small cell lung cancer  
cell lines.

- Br J Cancer. 1996 May; 73 (9): 1037-43.
- 5 : Ohyama H, Zhang X, Kohno Y, Alevizos I, Posner M, Wong DT, Todd R.  
Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization. Biotechniques. 2000 Sep ; 29 (3): 530-6.
- : Parkes RJ, Hart SL.  
Adhesion molecules and gene transfer. Adv Drug Deliv Rev. 2000 Nov 15; 44 (2-3): 135-52. Review:
- 10 Pettenaill OS, Sorenson GD, Wurster-Hill DH, Curphey TJ, Noll WW, Cate CC, Maurer LH.  
Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small-cell carcinoma of the lung. Cancer. 1980 Mar 1 ; 45 (5): 906-18.
- 15 : Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos M, Grimlev C, Battev J, Mulshine JL, Cuttitta F.  
Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. J Biol Chem. 1996 May 10; 271 (19): 11477-83.
- 20 Riddell DR, Vinogradov D V, Stannard A K, Chadwick N and Owen J S (1999) Identification and Characterization of LRP8 (ApoER2) in Human Blood Platelets. J Lipid Res 40: pp 1925-1930.
- 25 Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephen LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyav T, Cai D.  
Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. Nat Med. 1996 Sep; 2 (9):985-91.
- 30 : Rotsch M, Maasberg M, Erbil C, Jaques G, Worsch U, Havemann K.  
Characterization of insulin-like growth factor I receptors and growth effects in human lung cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol. 1992 ; 118 (7): 502-8.
- 35 : Rvaard K, Moller C, Bock E, Spang-Thomsen M.  
Expression of cadherin and NCAM in human small cell lung cancer cell lines and xenografts. Br J Cancer. 1992 Apr; 65 (4): 573-7.
- 40 Ronn LC, Olsen M, Ostergaard S, Kiselyov V, Berezin V, Mortensen M T, Lerche M H, Jensen P H, Soroka V, Saffell J L, Doherty P, Poulsen F M, Bock E, Holm A and Saffells J L (1999) Identification of a Neuritic Ligand of the Neural Cell Adhesion Molecule Using a Combinatorial Library of Synthetic Peptides. Nat Biotechnol 17 : pp 1000-1005.
- 45 : Schardt C, Rotsch M, Erbil C, Goke R, Richter G, Havemann K.  
Characterization of insulin-like growth factor 11 receptors in human small cell lung cancer cell lines. Exp Cell Res. 1993 Jan; 204(1) : 22-9.
- 50 Taraszka KS, Higgins J M, Tan K, Mandelbrot D A, Wang J H and Brenner M B (2000) Molecular Basis for Leukocyte Integrin Alpha (E) Beta (7) Adhesion to Epithelial (E)-Cadherin. J Exp Med 191 : pp 1555-1567.
- Thomas NK, Wright R A, Howson P A, Kingston A E, Schoepp D D and Jane D E (2001) (S)3,4-DCPG, a Potent and Selective mGlu8a Receptor Agonist, Activates Metabotropic Glutamate Receptors on Primary Afferent Terminals in the Neonatal Rat Spinal Cord. Neuropharmacology 40 : pp 311-318.

Turner JP and Salt TE (1999) GroupIII Metabotropic Glutamate Receptors Control Corticothalami Synaptic Transmission in the Rat Thalamus in Vitro. J Physiol 519 Pt 2: pp 481491.

- 5 Yoshimura K, Rosenfeld MA, Seth P, Crystal RG.  
Adenovirus-mediated augmentation of cell transfection with unmodified plasmid vectors.  
J Biol Chem. 1993 Feb 5; 268 (4): 2300-3.
- 10 Wagner E, Zenke M, Cotton M, Beua H, Birnstiel ML.  
Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells.  
Proc Natl Acad Sci US A. 1990 May; 87 (9): 3410-4.
- 15 Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML.  
Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by  
transferrin-polylysine-DNA complexes : toward a synthetic virus-like gene transfer vehicle.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1; 89 (17): 7934-8.
- 20 Wells A.  
EGF receptor.  
Int J Biochem Cell Biol. 1999 Jun; 31 (6): 637-43. Review
- 25 Yoneda Y, Kawajiri S, Sugimura M, Osanai K, Kito F, Ota E and Mimura T (2001) Synthesis of  
Diaminobutane Derivatives As Potent Ca (2+)-Permeable AMPA Receptor Antagonists.  
Bioorg Med Chem Lett 11: pp 2663-2666.
- 30 Yu A, Choi J, Ohno K, Levin B, Rom W N and Meruelo D (2000) Specific Cell Targeting for  
Delivery of Toxins into Small-Cell Lung Cancer Using a Streptavidin Fusion Protein Complex. DNA Cell  
Biol 19 : pp 383-388.
- 30 Zanta MA, Belquise-Valladier P, Behr JP.  
Gene delivery : a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5 ; 96(1) : 91-6.

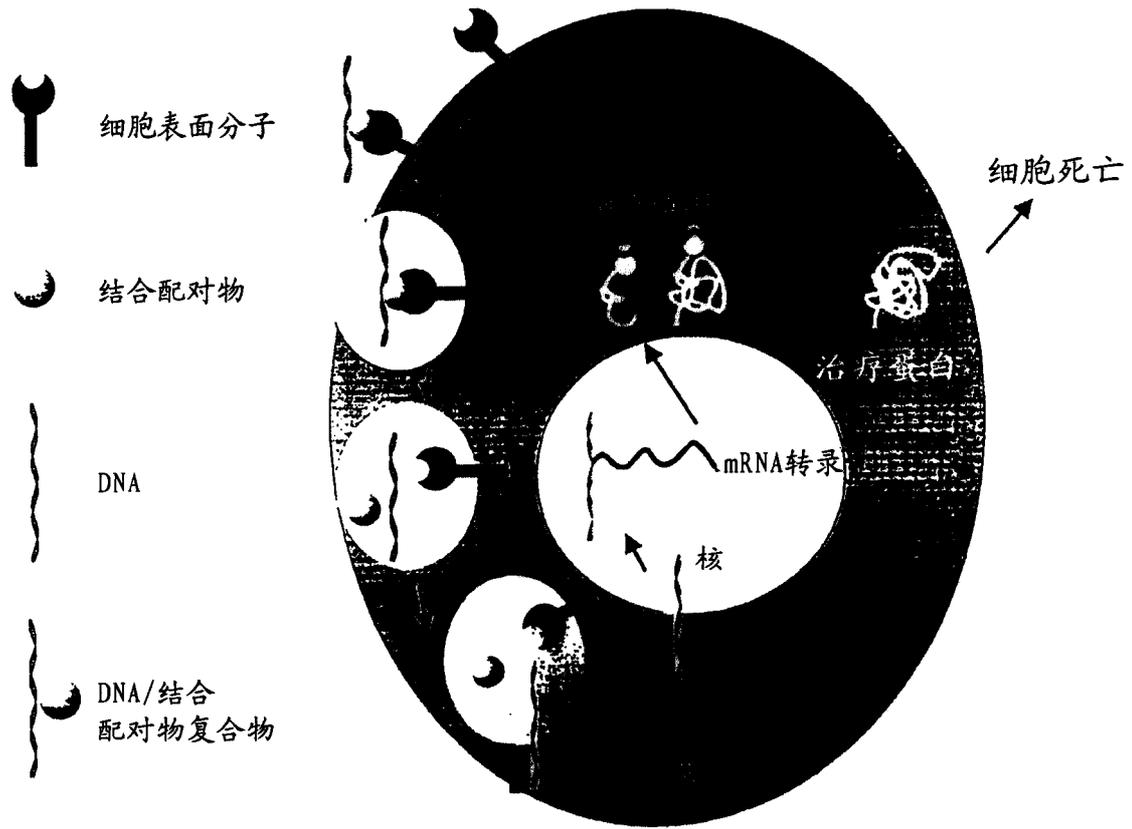


图 1

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)

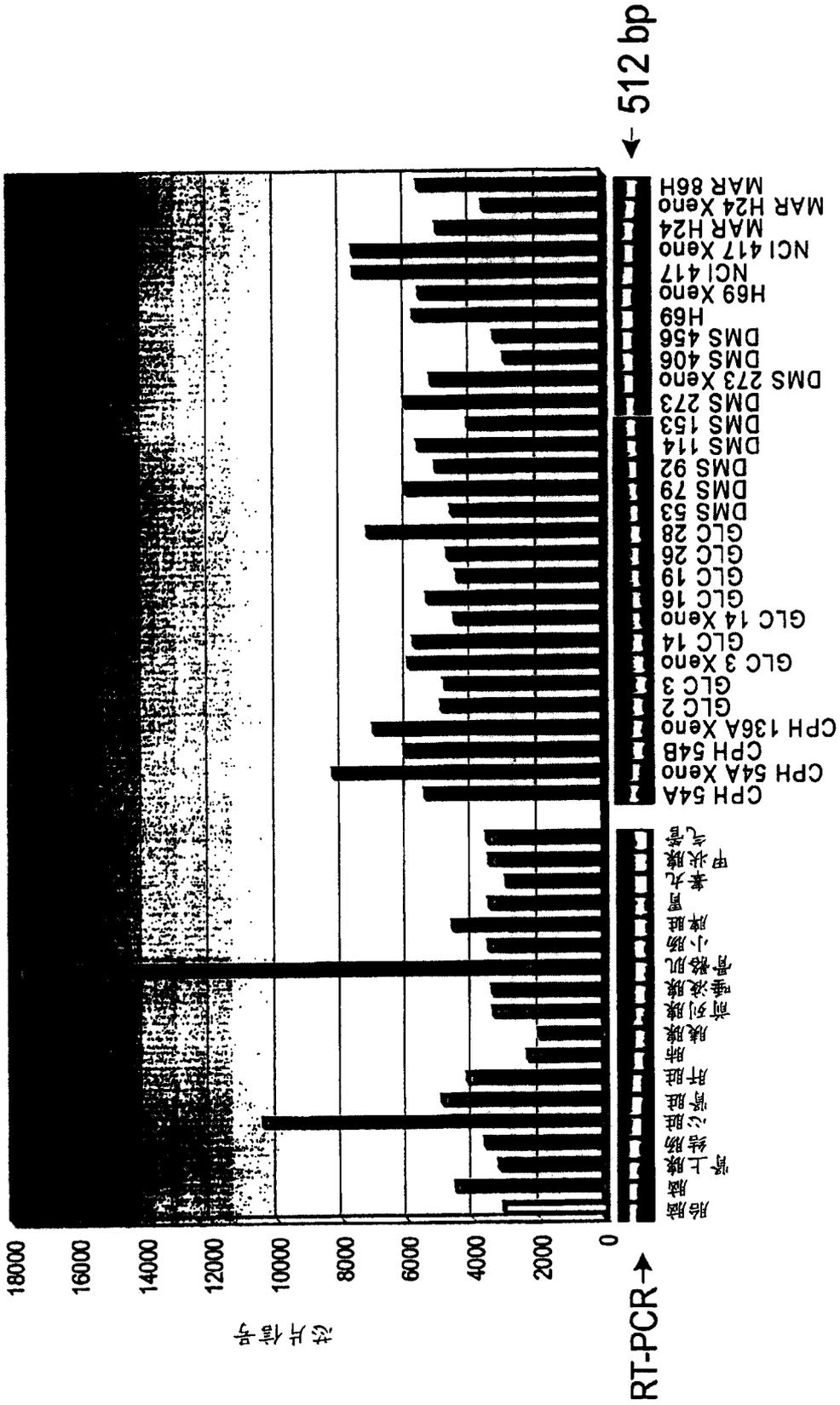


图 2

# Pro 221 胰岛瘤-相关抗原, IA-1

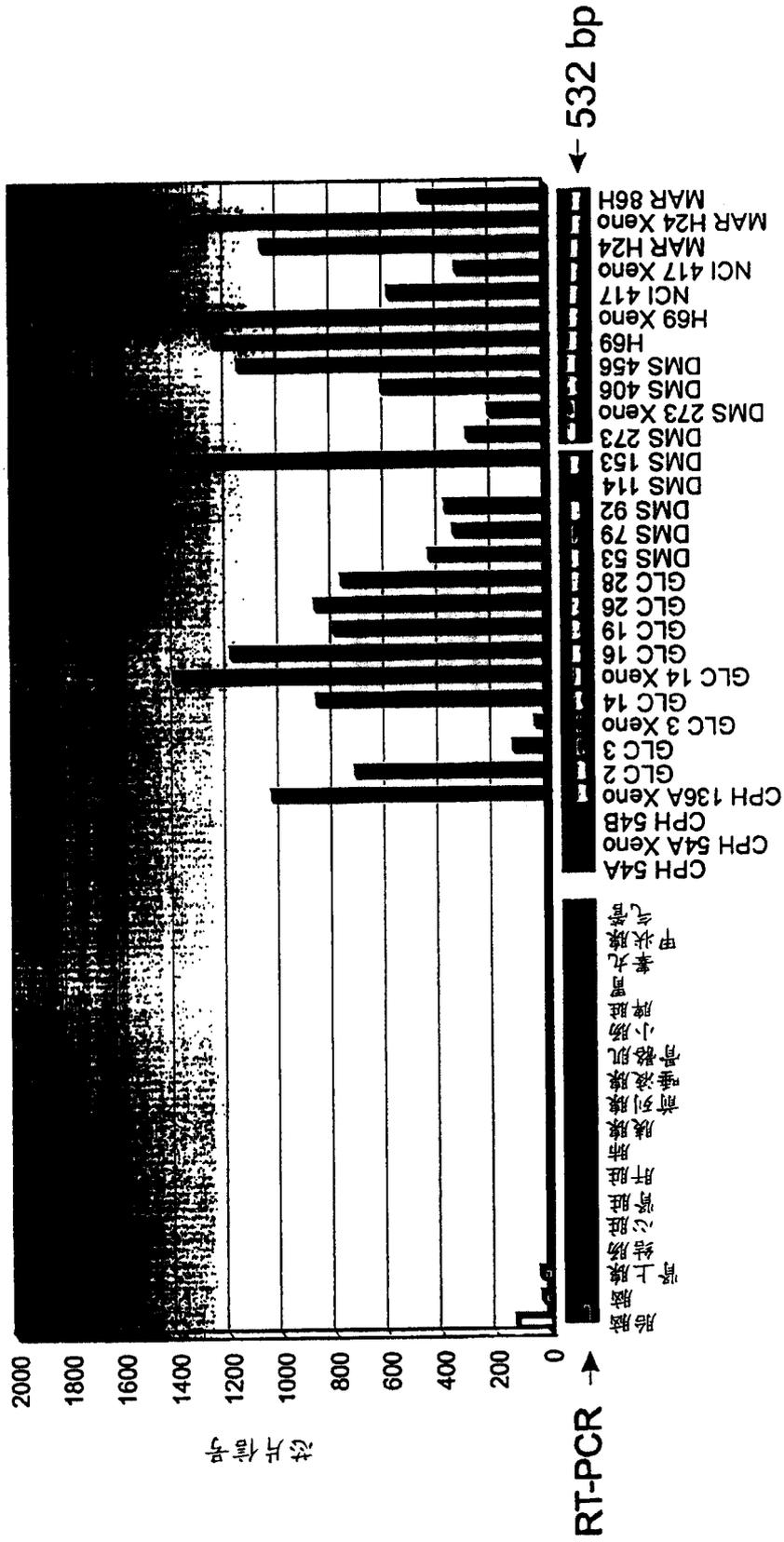


图 3

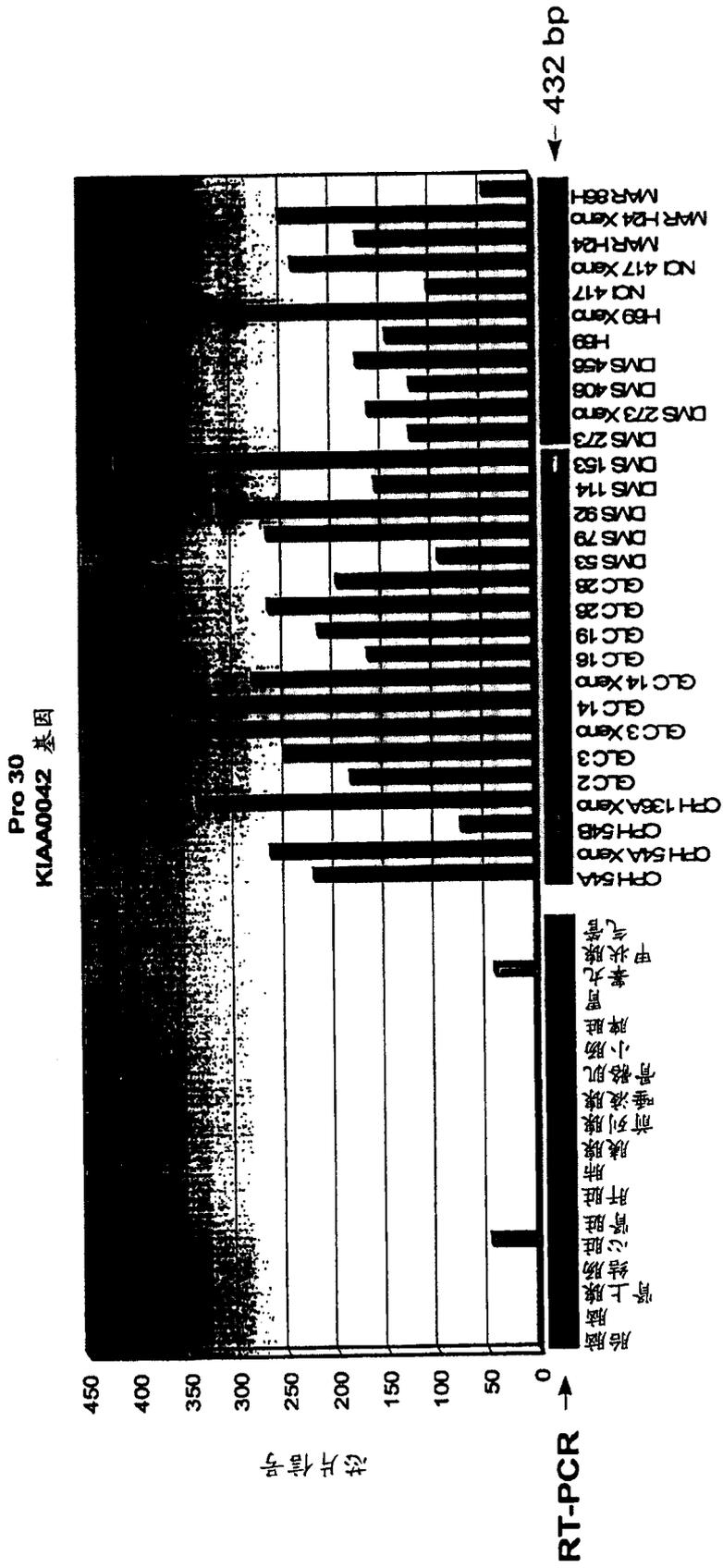
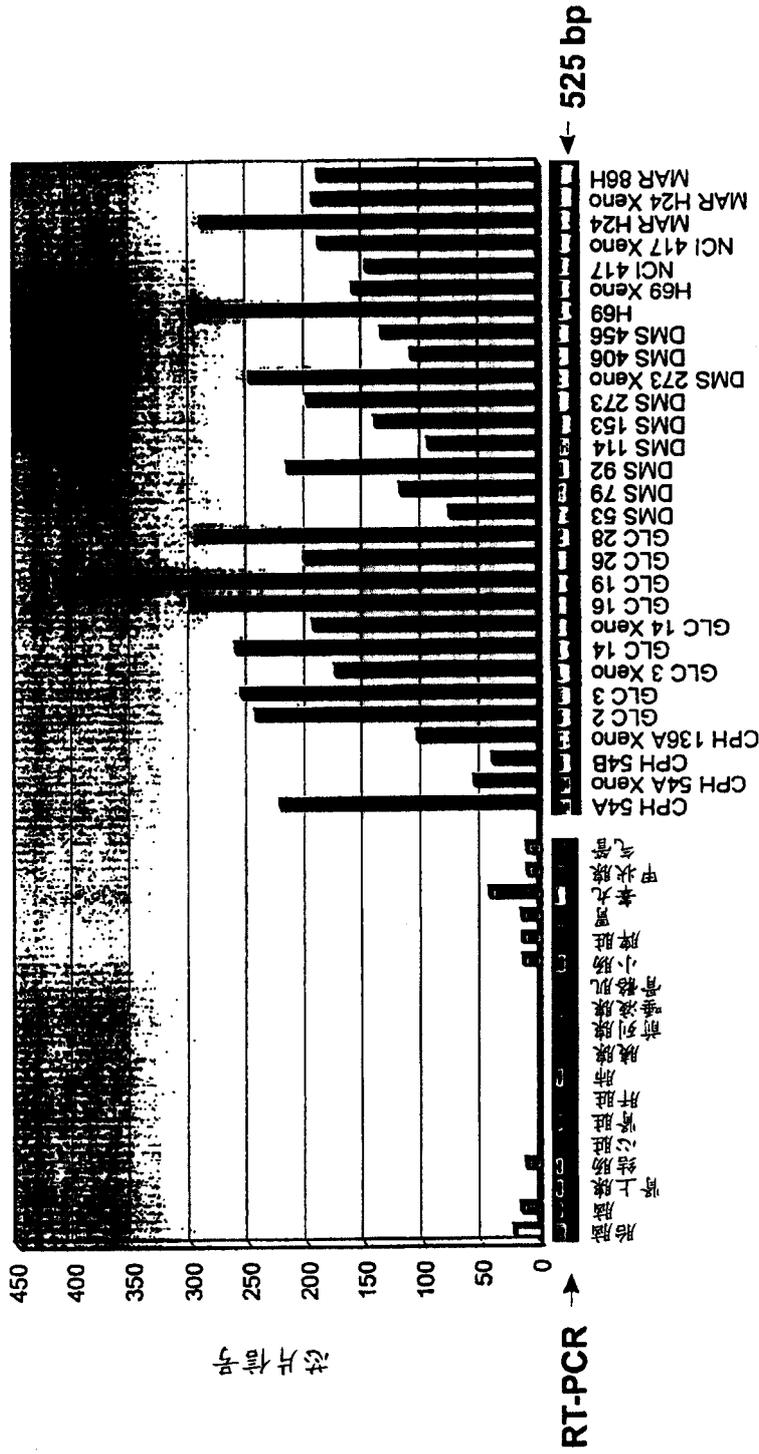


图 4

Pro 41  
MAD2, 有丝分裂停滞缺损, 酵母同系物-样1



5

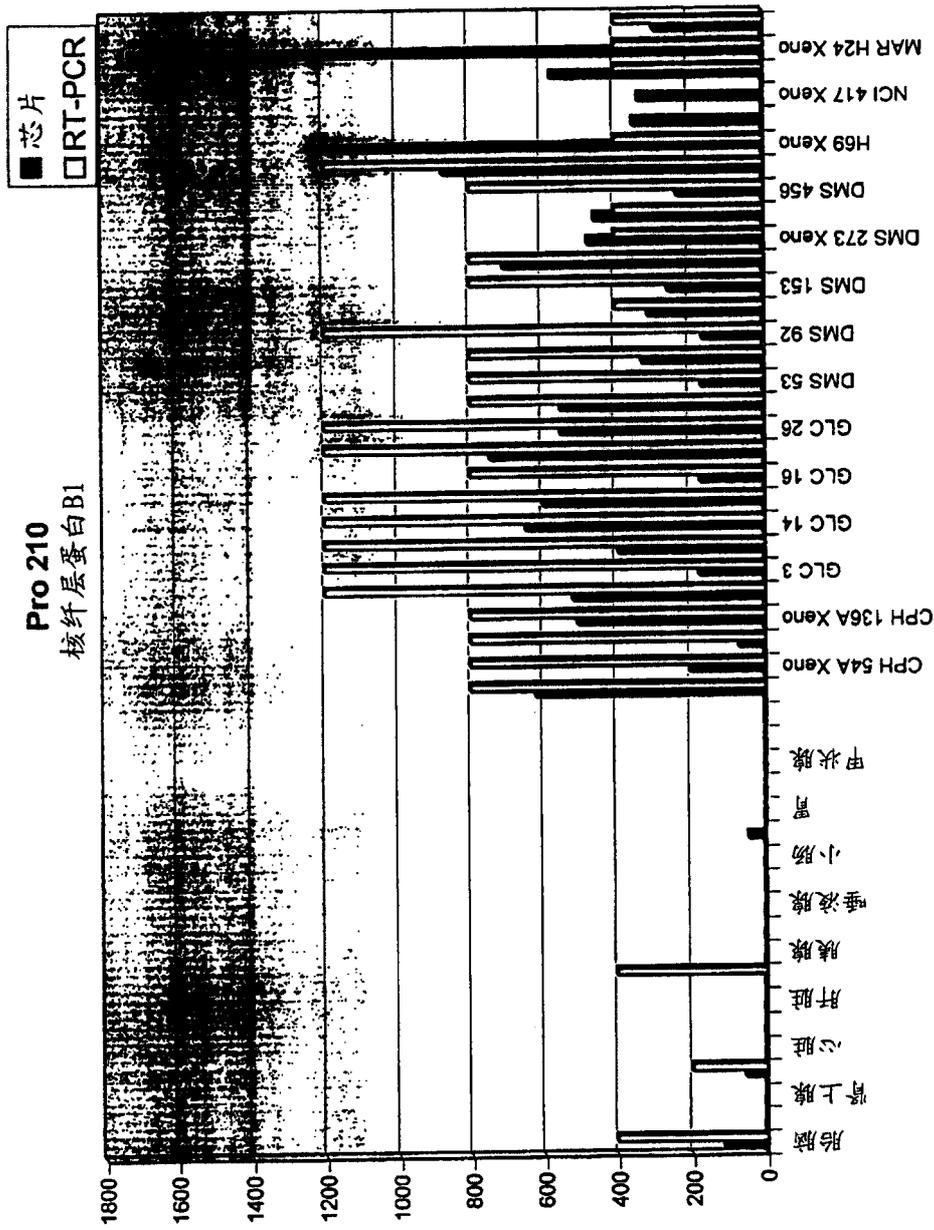


图 6

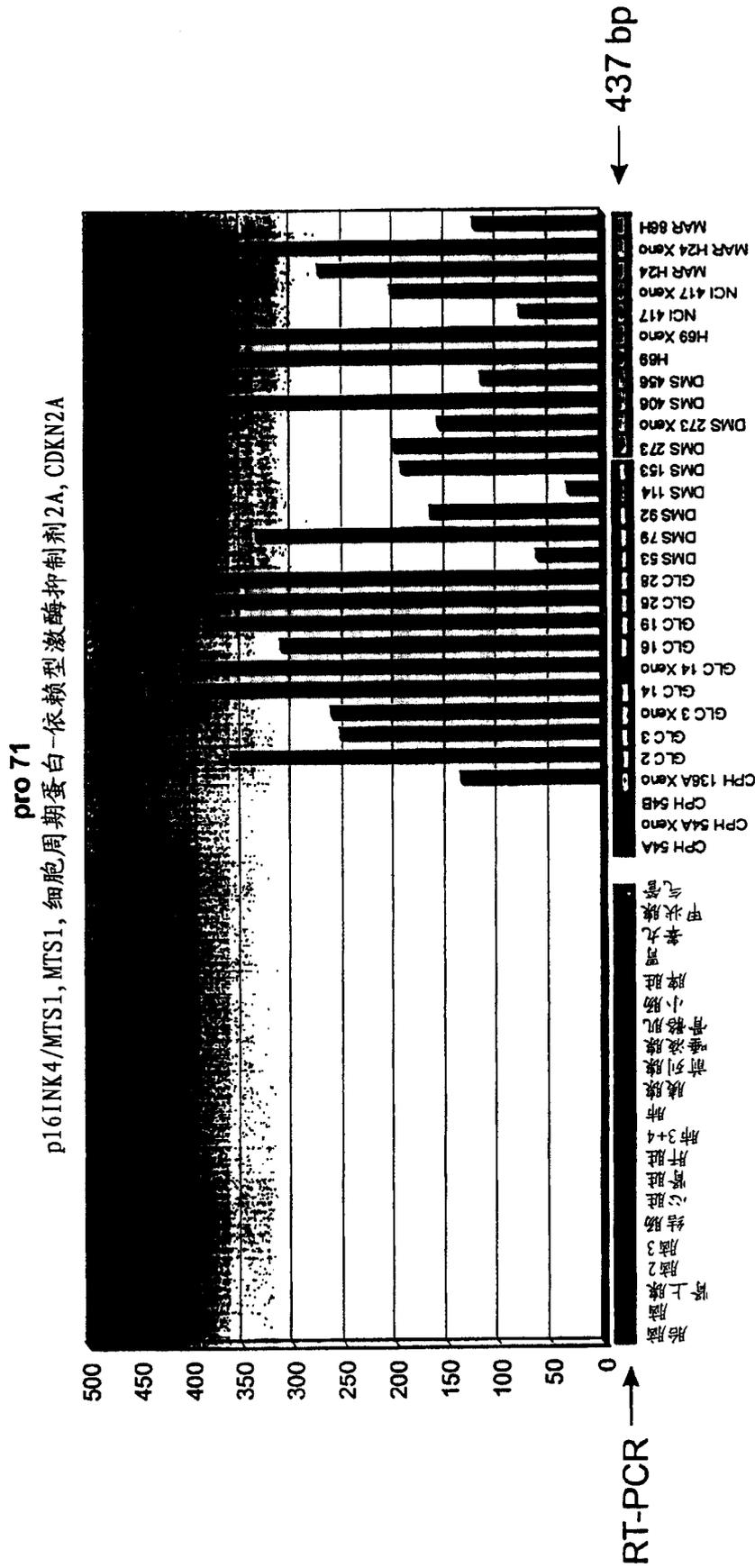
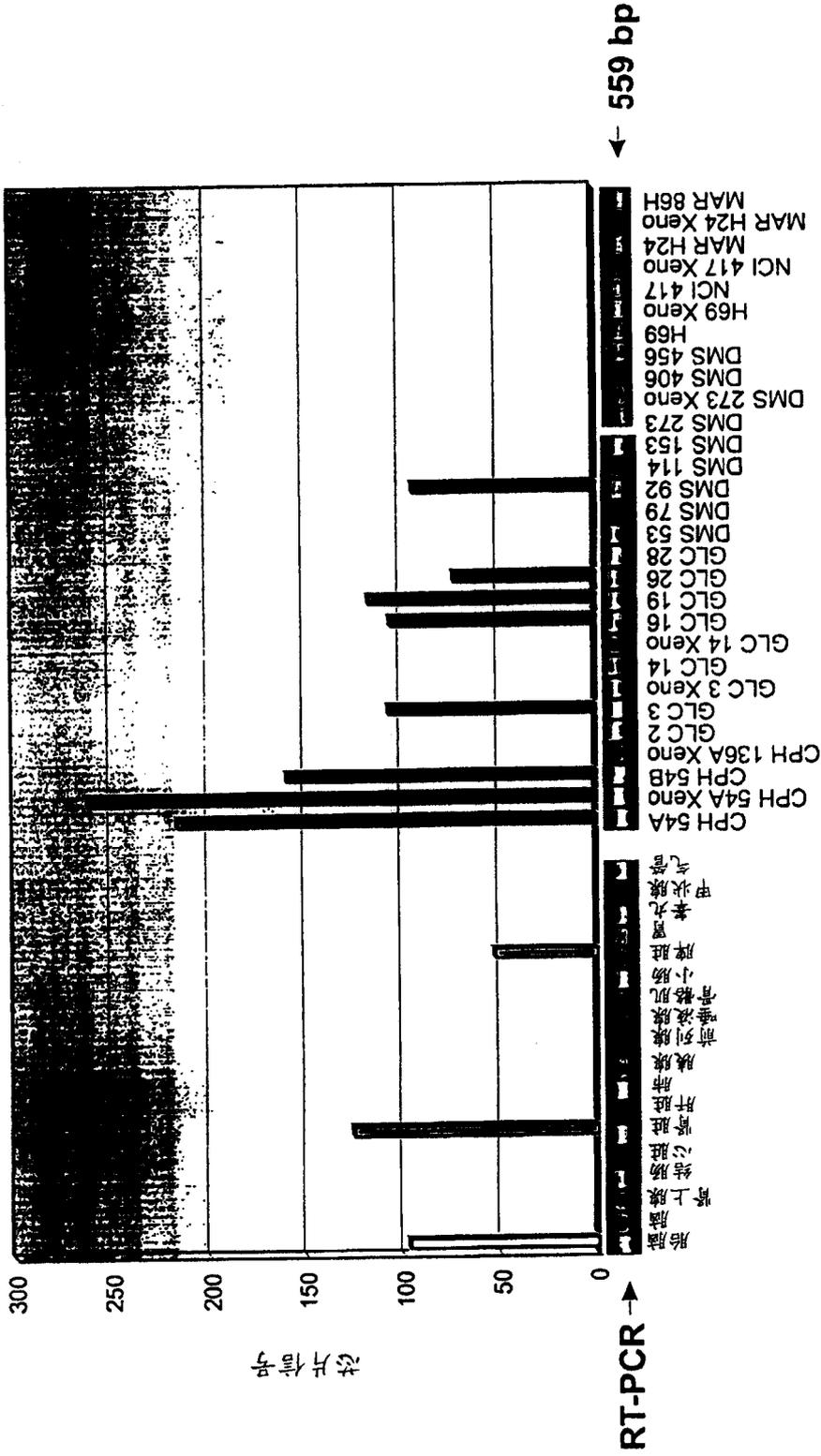


图 7

DR6, TNFR相关死亡受体-6



8

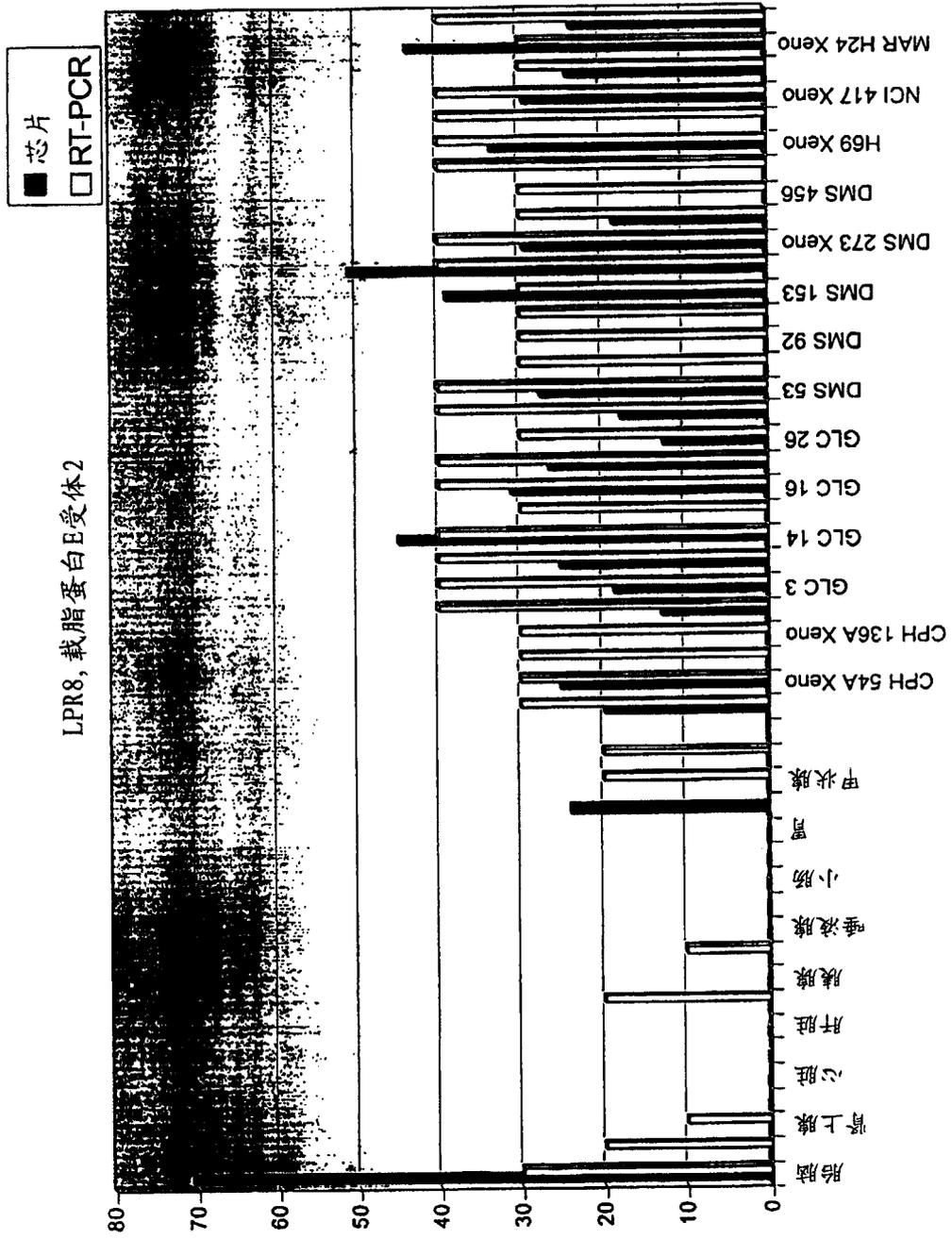


图 6

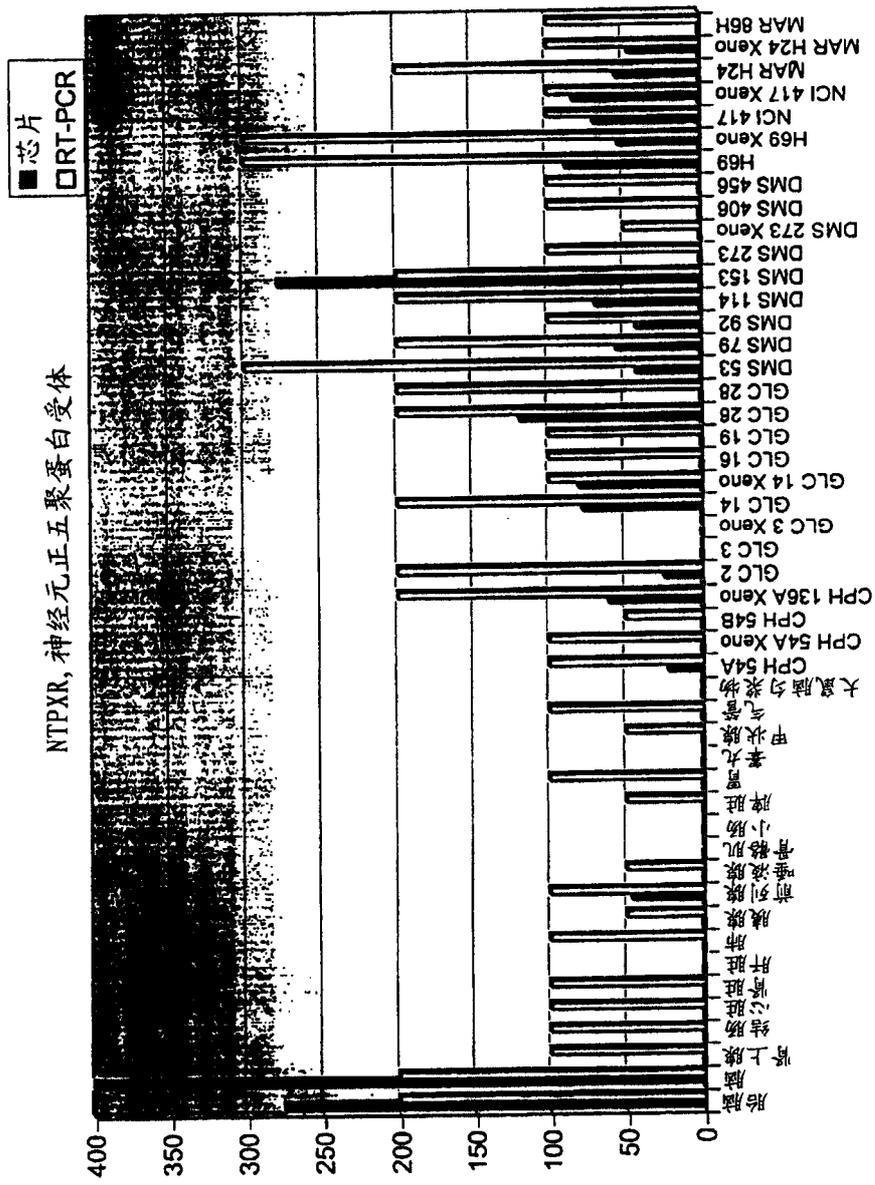


图 10

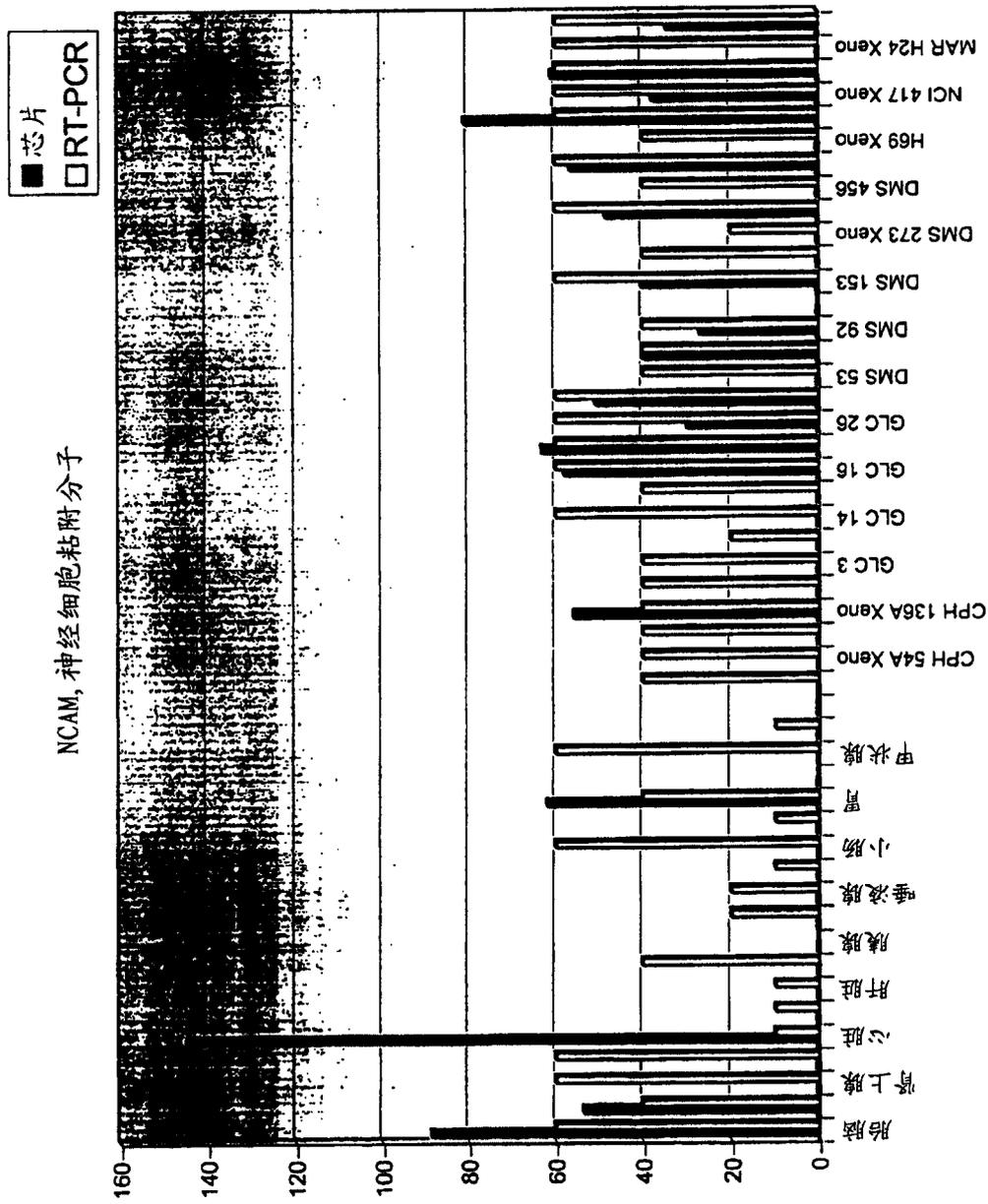


图 11

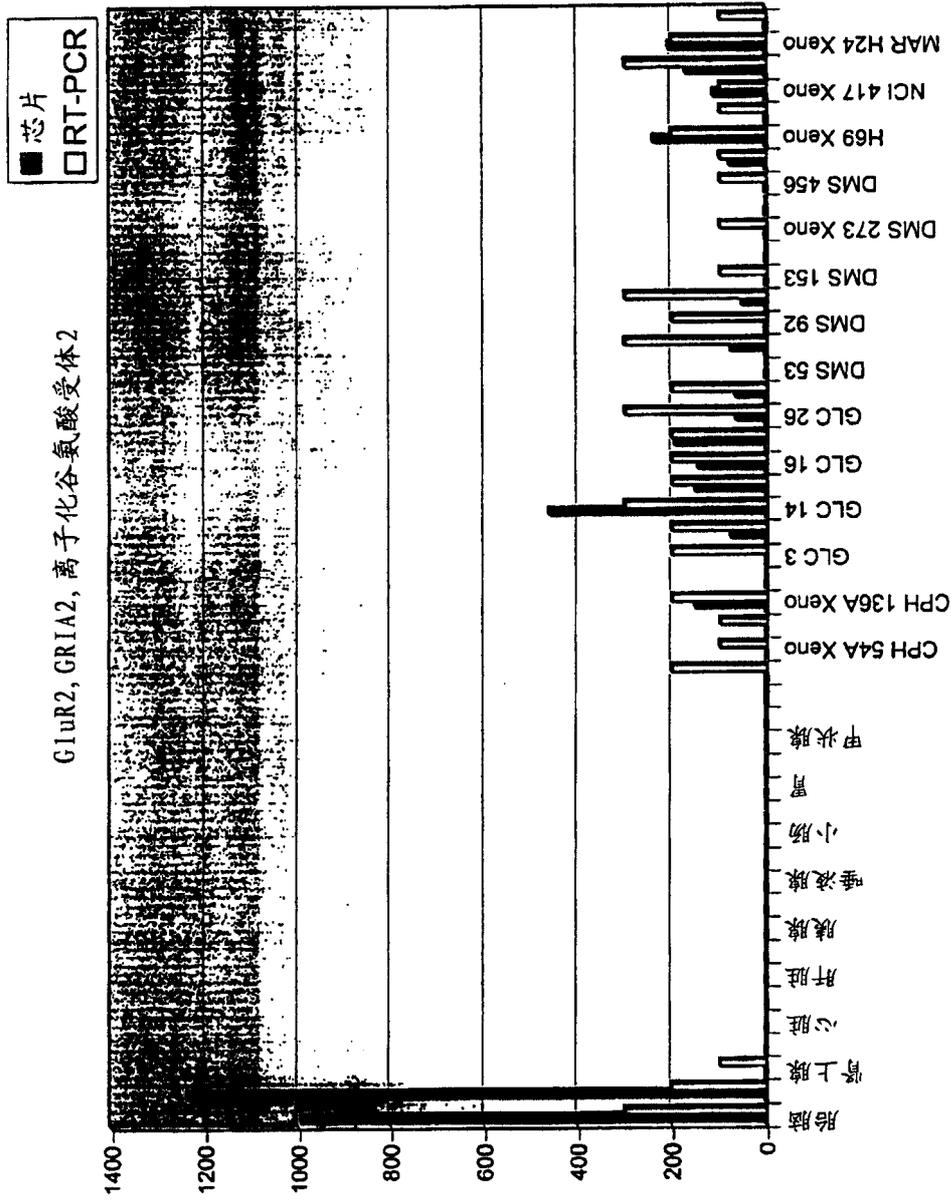


图 12A

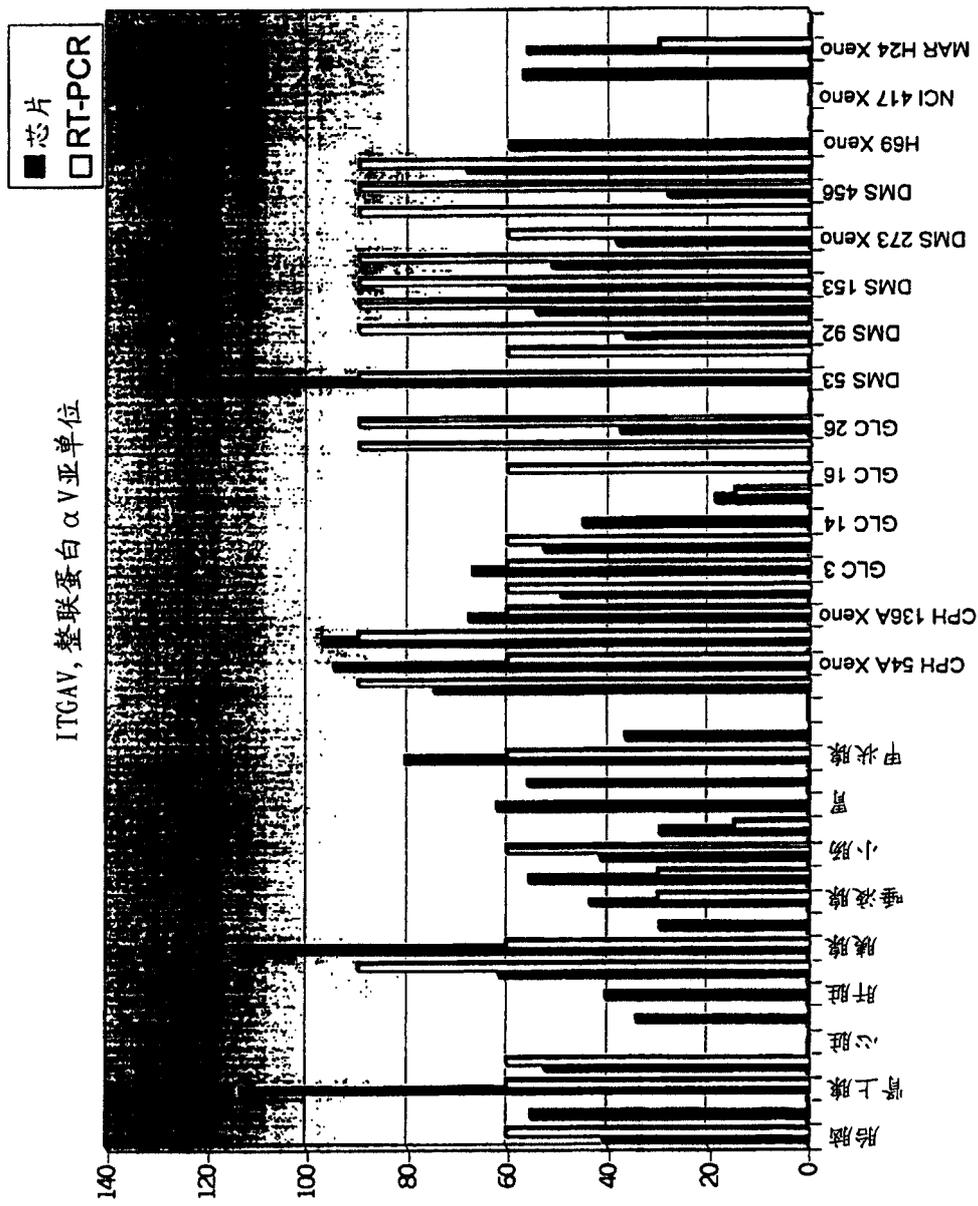


图 12B



神经元正五聚蛋白受体 (NPTXR)

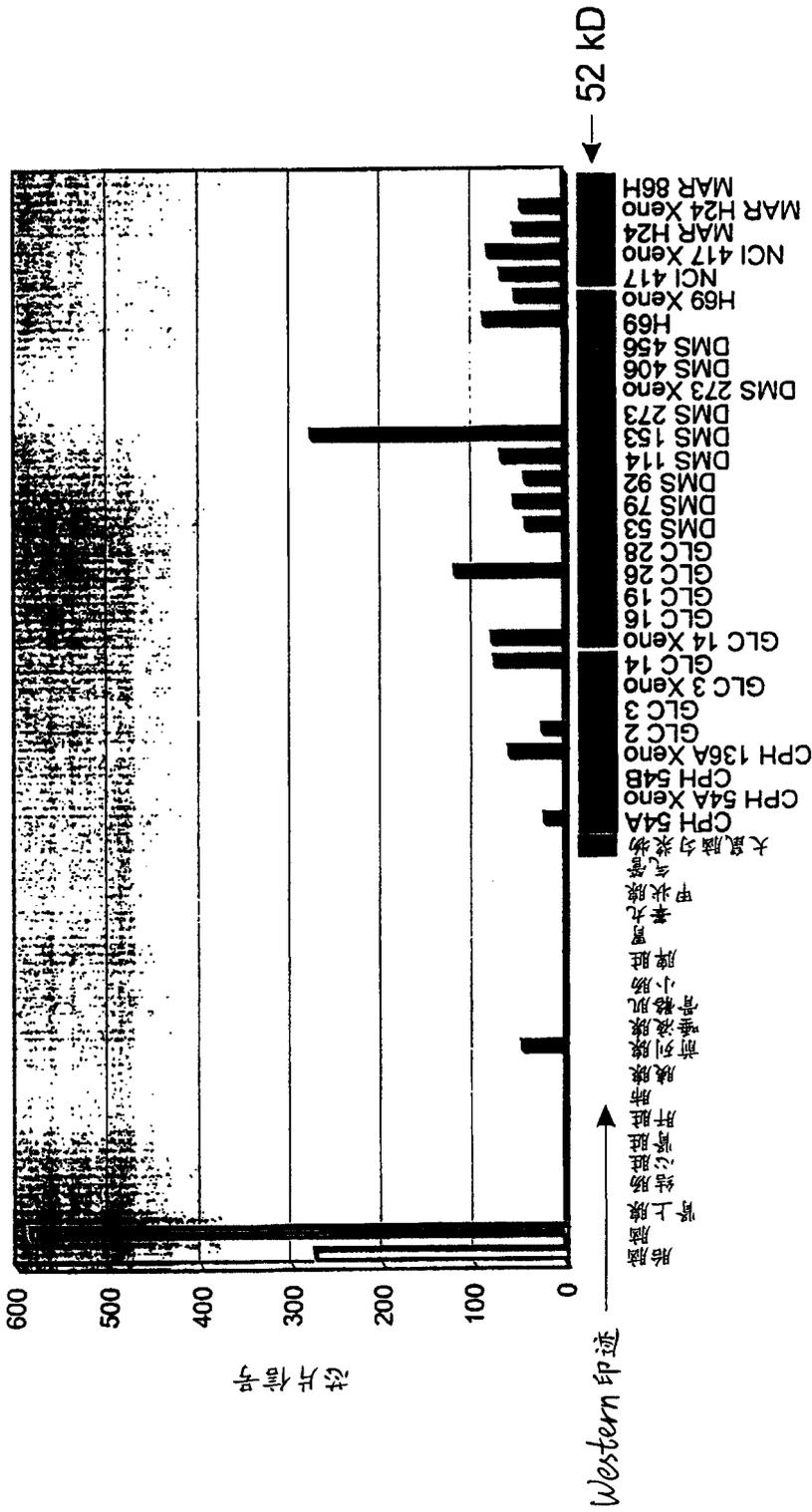


图 14

NCAM, 神经细胞粘附分子

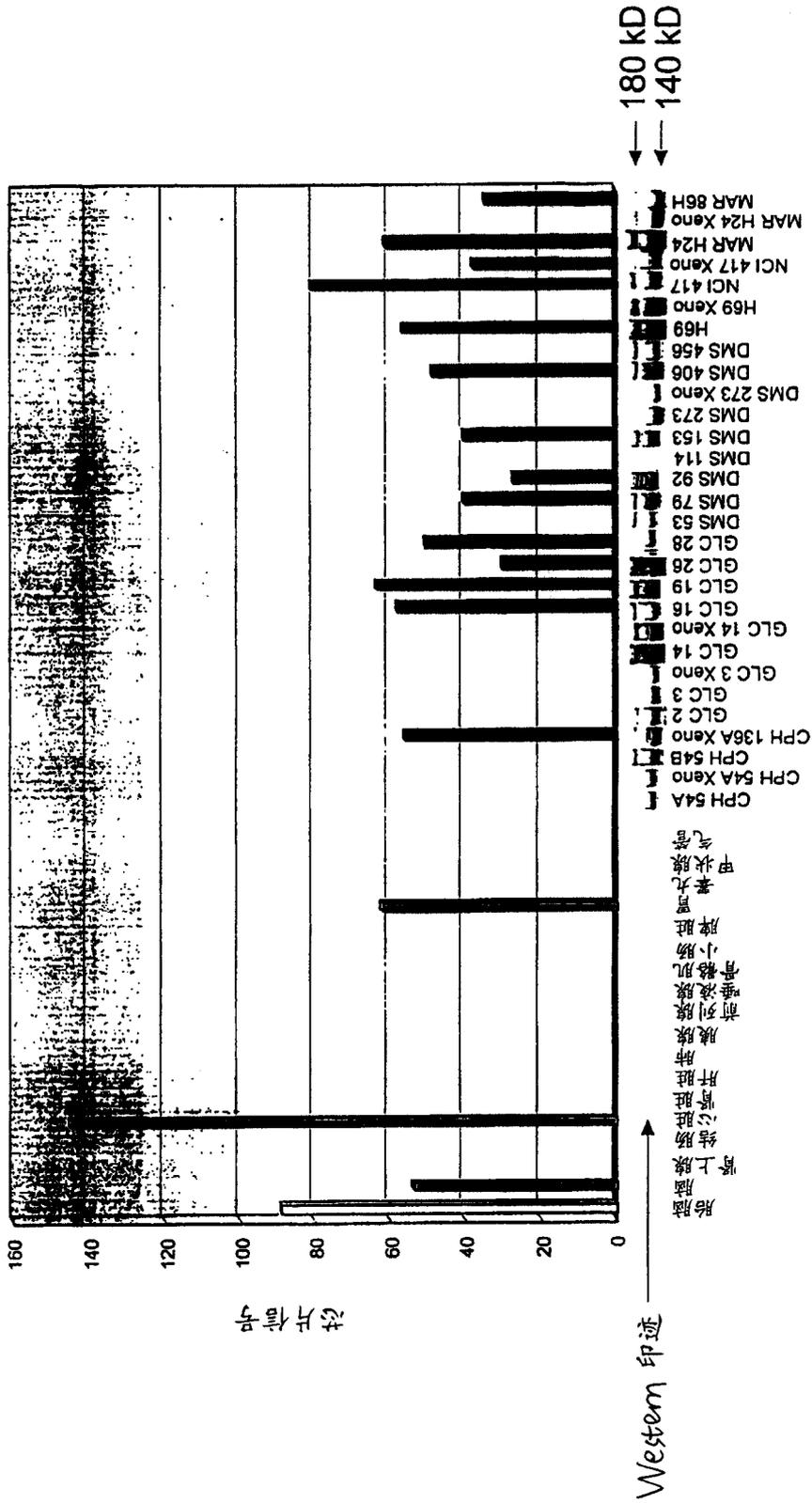


图 15

Glur2, GRIA2, 离子化谷氨酸受体2, HBGR2

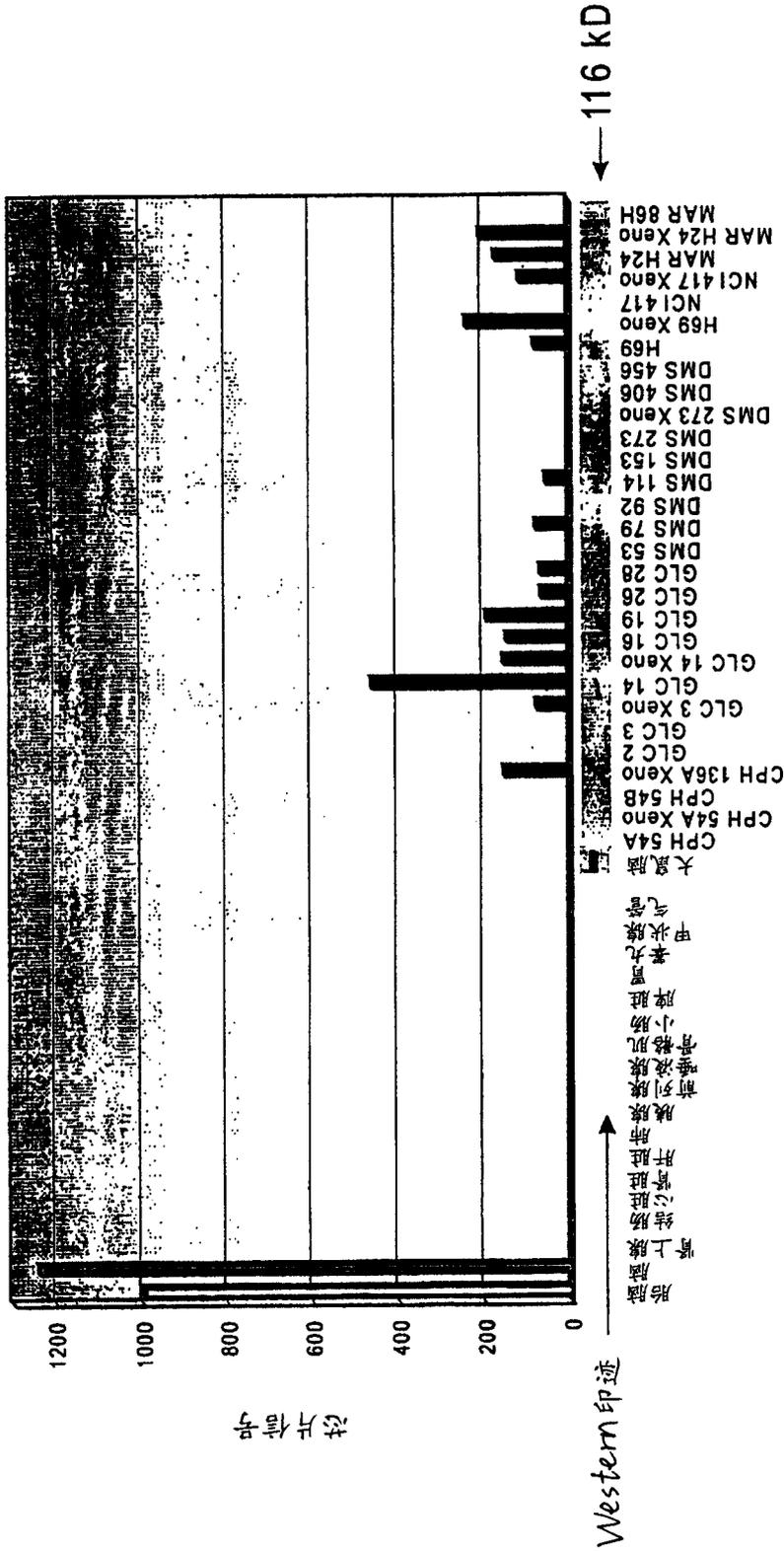


图 16

ITGAE, CD103, 整联蛋白  $\alpha$  E亚单位

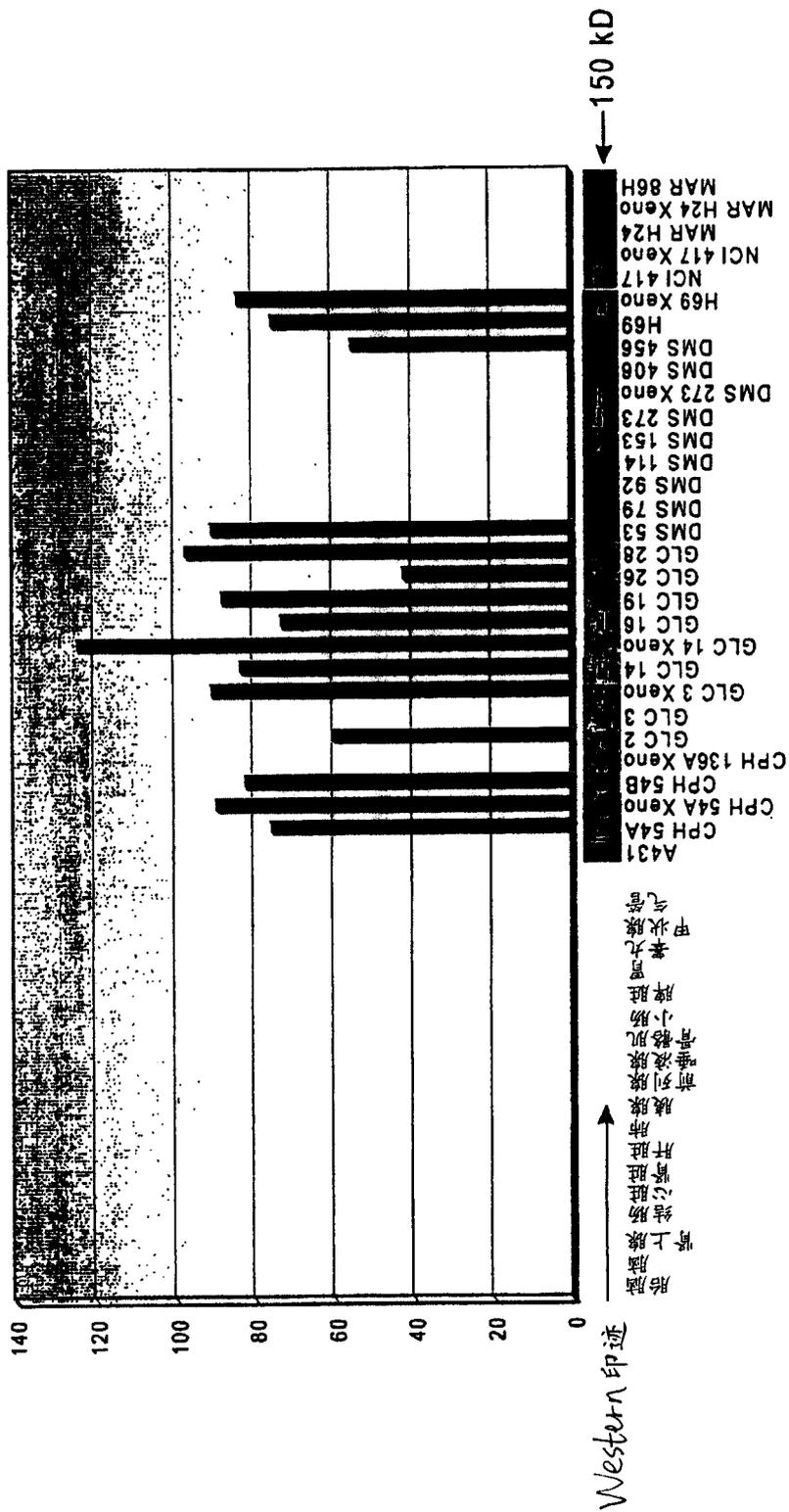


图 17

专利名称(译)	肿瘤学药物革新		
公开(公告)号	<a href="#">CN1547617A</a>	公开(公告)日	2004-11-17
申请号	CN02816658.2	申请日	2002-06-19
发明人	汉斯·S·波尔森 尼娜·佩德森 希拉·莫滕森 苏珊·B·索伦森 米凯尔·W·佩德森 亨里克·I·埃尔斯纳		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/705 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 C07K16/18 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/5011 C12Q1/6886 C12Q1/6809 C12N15/1034 G01N2500/20 A61K38/00 G01N33/57492 C12Q1/6897 A61K39/00 A61P35/00 A61P35/02 C12Q2527/125		
优先权	200100992 2001-06-25 DK 60/301818 2001-07-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明描述了鉴定以不同水平在癌细胞和非 - 恶性细胞的细胞表面表达的分子的方法，以及鉴定癌症特异性启动子的方法，单独或联合使用所述启动子可以传递和表达治疗基因以治疗癌症。本发明还描述了能靶向通过本发明方法鉴定的细胞表面分子的靶向复合物。在本发明的实施方案中，所述靶向复合物含有通过本发明方法鉴定的启动子。另外，本发明还描述了鉴定细胞表面分子的结合配对物的方法以及结合配对物本身。本发明还公开了使用靶向复合物的治疗方法以及靶向复合物用于制备药物的用途。另外，本发明还描述了细胞表面分子或其片段用于制备疫苗的用途。

