

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/62

C12N 15/63 C12N 5/10

A61K 48/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99808292.9

[43] 公开日 2001 年 8 月 15 日

[11] 公开号 CN 1308679A

[22] 申请日 1999.5.21 [21] 申请号 99808292.9

[30] 优先权

[32] 1998.5.21 [33] GB [31] 9810999.4

[86] 国际申请 PCT/GB99/01609 1999.5.21

[87] 国际公布 WO99/60135 英 1999.11.25

[85] 进入国家阶段日期 2001.1.5

[71] 申请人 癌症研究风险有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 J·A·盖肯 F·法赞尼

S·J·鲁塞尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事

务所

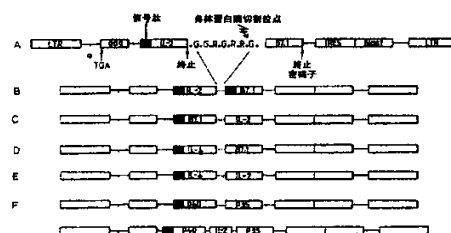
代理人 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图页数 9 页

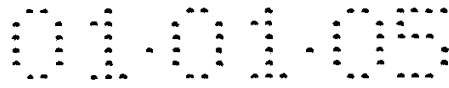
[54] 发明名称 以遍在的内切蛋白酶切割嵌合融合蛋白质生产多基因产物

[57] 摘要

本发明涉及与基因表达相关的材料和方法。尤其涉及以一单顺反子表达多基因产物。通过构建包含编码第一多肽(例如蛋白质亚基)的第一序列和编码第二多肽(例如另一蛋白质亚基)的第二序列的核酸构建体可实现本发明的目的,所述的第一和第二序列被编码内切蛋白酶切割位点的接头序列所分隔。一旦被表达成单个融合蛋白质,该蛋白质可以被切割并加工成其组分,即有生物学活性的第一和第二多肽。本发明在有关各亚基需要以等摩尔量表达的多亚基蛋白质(例如 IL-12)的表达中特别有用。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 一种用以表达两种或多种多肽的核酸构建体，其包含编码第一多肽的第一序列和编码第二多肽的第二序列，所述的第一和第二序列被编码内切蛋白酶切割位点的接头序列所分隔。

2. 根据权利要求1的核酸构建体，其更进一步包含位于编码内切蛋白酶切割位点的接头序列任何一侧的间隔序列。

3. 根据权利要求2的核酸构建体，其中间隔序列包含编码至少两个氨基酸的核酸。

4. 根据上述权利要求中任何一项的核酸构建体，其中接头序列包含编码 Arg. X. Y. Arg 的核酸序列，此处 X 是任何一种氨基酸残基，Y 是赖氨酸或精氨酸。

5. 根据权利要求4的核酸构建体，其中接头序列包含编码 Arg. Gly. Arg. Arg.， Arg. Pro. Lys. Arg.，或 Arg. Tyr. Arg. Arg 的核酸序列。

6. 根据上述权利要求中任一项的核酸构建体，其中接头序列包含 AGG-GGT-CGA-CGC， CGG-CCT-AAG-AGG，或 AGG-TAC-CGC -AGG。

7. 根据权利要求2-6中任一项的核酸构建体，其中接头序列和间隔序列编码 Gly. Gly. Arg. Gly. Arg. Arg. Gly. Gly.， Gly. Arg. Pro. Lys. Arg. Pro.，或 Gly. Gly. Arg. Tyr. Arg. Arg. Gly. Gly.

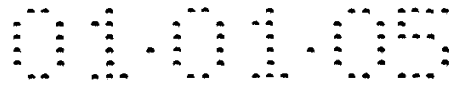
8. 一种载体，其中包含根据上述权利要求中任一项的核酸构建体。

9. 一种宿主细胞，其中包含根据权利要求8的载体或根据权利要求1-7中任一项的核酸构建体。

10. 在细胞中表达两种或多种多肽的方法，包括以下步骤：

a) 构建根据权利要求1-7中任一项的核酸构建体；

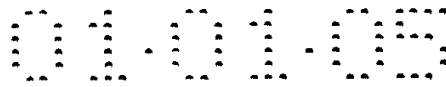
b) 以所述的核酸构建体转染所述细胞，使所述核酸构建体得以表达，从而生成包含由能够被细胞内的内切蛋白酶切割的内切蛋白酶切割位点连接的第一和第二多肽的融合蛋白质，进而产生单个具有生物学活性的第一和第二多肽。



11. 根据权利要求 10 的方法，其中核酸构建体是核酸载体的一部分。
12. 根据权利要求 11 的方法，其中载体是一种病毒载体。
13. 根据权利要求 12 的方法，其中病毒载体是一种逆转录病毒载体或一种基于腺病毒的载体。
14. 根据权利要求 12 或 13 的方法，其中病毒载体首先转染入病毒包装细胞系中以产生病毒，之后用该病毒转染或感染细胞。
15. 产生两种或多种多肽的方法，包括以下步骤：
 - a) 构建根据权利要求 1-7 中任一项的核酸构建体；
 - b) 以所述的核酸构建体转染细胞，使该核酸构建体得以表达，从而生成包含由能够被细胞内的内切蛋白酶切割的内切蛋白酶切割位点连接的第一和第二多肽的融合蛋白质，进而产生单个具有生物学活性的第一和第二多肽；和
 - c) 单独地或联合地从细胞中分离所述的两种或多种多肽。
16. 根据权利要求 15 的方法，其中第一和第二多肽是蛋白质的亚基。
17. 根据权利要求 16 的方法，其中第一和第二多肽是 IL-12 的亚基。
18. 根据权利要求 17 的方法，其中更进一步包括制备多肽用于工业、诊断或治疗用途的一个或多个附加步骤。
19. 生产细胞疫苗的方法，包括以下步骤：
 - a) 构建根据权利要求 1-7 中任一项的核酸构建体，其中第一和 / 或第二多肽能够刺激免疫应答；
 - b) 将所述核酸构建体插入核酸载体之中；
 - d) 用所述载体转化细胞，从而使第一和 / 或第二多肽被分泌或表达，并被展示在细胞表面上。
20. 根据权利要求 19 的方法，其中细胞是肿瘤细胞。
21. 根据权利要求 19 或 20 的方法，其中第一和第二多肽是 IL-12 的亚基。
22. 根据权利要求 1-7 中任一项的核酸构建体或根据权利要求 8 的载体，其用于人体或动物体的治疗方法中。
23. 根据权利要求 1-7 中任一项的核酸构建体或根据权利要求 8 的

载体在制备可用于基因治疗方法的药物中的用途。

24. 根据权利要求 19-21 中任一项的方法可以获得的细胞疫苗，其可用于接种人体或动物体。



说 明 书

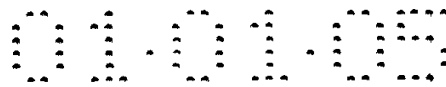
以遍在的内切蛋白酶切割嵌合融合蛋白质生产多基因产物

发明领域

本发明涉及与基因表达相关的材料和方法。尤其，但并非仅仅涉及以单顺反子表达多基因产物的方法，以及该方法在治疗学的应用和实施该方法的试剂盒。

发明背景

在许多基因治疗方案中，也包括肿瘤的免疫基因治疗非常需要多种外源基因的转移和表达。但是，基因转移过程的相对低效率，阻碍了使用多种载体进行多基因产物的转移和表达。通常，在单个载体中表达几种基因可通过在该载体中包含多个各自带有其独立的启动子和/或转录终止序列的表达盒来实现。这种策略的主要缺点是启动子间的相互干扰现象，这种干扰在逆转录病毒载体中尤为严重（Emerman 和 Temin, 1984 细胞 39, 449-467; Emerman 和 Temin, 1986 核酸研究, 14, 9381-9396; Vile 等, 1994 基因治疗, 1, 307-316）。作为一个可选择的策略，包含内部核糖体进入位点（IRES）的逆转录病毒的最近发展，已经能够表达多顺反子信使（Morgan 等, 1992 核酸研究, 20, 1293-1299; Zitvogel 等, 1994, 人类基因治疗, 5, 1493-1506）。但是，当它们只含一个核糖体进入位点时，这些载体才最为有效，因此，它们的适用性仅局限于两种基因的表达。多个核糖体进入位点元件的存在会导致载体的不稳定性，这可能由重组事件而引发。根据发明人的经验，即使在载体中两个核糖体进入位点序列来源于核苷酸序列同源性极小的不同病毒种类（如脊髓灰质炎病毒和脑心肌炎病毒 ECMV），这种重组事件也会发生。因而，这样的载体不适合用于转运和表达多基因产物。综上所述，本发明者意识到需要采取一种新策略从单顺反子表达多基因产物，这种单顺反子以单一融合蛋白质的方式编码多基因产物，这种融合蛋白质在合成后可以被切



割和加工成它的有生物学活性的组成成分。

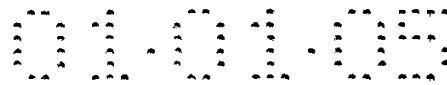
在真核细胞中许多基因产物（如激素原，神经肽前体等）最初是以前体分子的形式被合成，之后通过蛋白酶剪切进行翻译后的加工（有关综述见参考文献（Barr, 1991 DNA 细胞生物学, 10, 319-328; Steiner 等, 1992 生物和化学杂志, 267, 23435-23438））。通过与 Kex2, 即第一个在酵母中被证实的真核细胞加工性内切蛋白酶（Julius 等, 1984, 细胞, 37, 1075-1089; Mizuno 等, 1988, 生物化学生物物理学研究通讯, 156, 246-254）的同源性, 许多在胰岛、脑下垂体和其它神经内分泌细胞中表达的组织特异性内切蛋白酶（PC2, PC3, PC4, PACE4）已经被鉴定（Smeekens 和 Steiner, 1990, 生物化学杂志, 265, 2997-3000; Smeekens 等, 1991, 美国科学院进展, 88, 340-344; Nakayama 等, 1992, 生物化学杂志, 267, 5897-5900; Kiefer 等, 1991 DNA 细胞生物学, 10, 757-769）。相反, 定位于高尔基体的内切蛋白酶弗林蛋白酶（Shapiro 等, 1997, 组织化学与细胞化学杂志, 45, 3-12）在多种不同的组织中表达（Schalken 等, 1987, 临床研究, 80, 1545-1549），并且在真核生物种属间高度保守（Barr 等, 1991, 细胞, 66, 1-3）。弗林蛋白酶代表一类能够加工自组成型通路分泌的多种蛋白质前体的常见细胞内切蛋白酶。大多数激素原和神经内分泌前体在 Lys-Arg 或 Arg-Arg 二碱性氨基酸残基处被加工, 但是经不可调控或组成型通路分泌的蛋白前体具有更为复杂的弗林蛋白酶切割位点, 其共有序列为: Arg. X.Arg/Lys.Arg（Bresnahan 等, 1990, 细胞生物学杂志, 111, 2851-2859; Hosaka 等, 1991, 生物化学杂志, 266, 12127-12130）。弗林蛋白酶蛋白水解活性的直接证据是通过将弗林蛋白酶和 von Willebrand 因子前体（pro-vWF）的 cDNA 导入 COS 细胞的共转染实验中得到的。弗林蛋白酶的存在使得 pro-vWF 在它的天然加工位点: Arg-Ser-Lys-Arg 处完全成熟, 并且显示了 P4 位置的 Arg 的重要性（van de ven 等, 1990, 分子生物学通讯 (Mol. Biol. Rep.), 14, 265-275; Wise 等, 1990, 美国科学院进展, 87, 9378-9382）。许多研究表明将弗林蛋白酶的识别位点掺入重组蛋白质可使这些蛋白质从转导细胞中有效地被分泌。这些研究包括编码

IgG1 Fc 段肽的分泌，这是将该片段与降钙素前体氨基末端区域融合的结果 (Liu 等, 1993, 美国科学院进展, 90, 8957-8961)。同样, 将弗林蛋白酶识别位点掺入重组胰岛素原中可以使仅以组成型通路分泌的细胞分泌成熟有活性的人胰岛素 (Groskreutz 等, 1994, 生物化学杂志, 269, 6241-6245)。

在许多生物学应用中需要表达多基因产物。一些目前可利用的技术可以实现该目的, 但有局限性。这些技术包括用各作为独立调控表达单位编码单个或多个基因的载体顺次转移基因, 也可以选择地将核糖体进入位点序列置于不同编码序列之间, 以允许多顺反子转录产物的表达, 其中每个编码单位可以被翻译成相应的蛋白质产物。

然而, 这些方法中的每一种都有许多缺点。使用多种质粒是耗时, 低效率的, 且通常依赖于对每种编码基因进行不同筛选方法的可用性。多表达盒的掺入可导致启动子间的相互干扰, 其中载体中一个表达盒的表达会影响 (通常是抑制) 另一表达盒的表达 (Emerman 和 Temin, 1984, 细胞, 39, 449-467; Emerman 和 Temin, 1986, 核酸研究, 14, 9381-9396)。掺入单个核糖体进入位点可使两个基因有效地表达, 但为表达多于两个基因而掺入两个或更多的核糖体进入位点序列会导致载体的不稳定。此外, 这些方法中没有一种方法可保证编码基因的协调表达, 因此, 完全不适合于需要两种或多种基因产物以等摩尔比例 (即 1:1) 或以真正的其它特定摩尔比 (如 2: 1) 的表达。这一点在目的生物学活性是异质性亚基产物的基因转移研究中需着重考虑 (例如 IL-12 的 p40 亚基的表达在摩尔数上超过 p35 亚基会抑制 IL-12 的免疫刺激活性 (Chen 等, 1997, 免疫学杂志, 159, 351-359; Mattner 等, 1997, 传染病学与免疫学 (Infect. Immun.), 65, 4734-4737)。

此前两项研究应用了弗林蛋白酶切割位点, 但不是用来从单顺反子生产多种蛋白质, 而是为了将通常状况下的细胞内蛋白质分泌出来 (Liu 等, 1993, 美国科学院进展, 90, 8957-8961) 或产生仅被特定的细胞类型正常分泌的肽 (Methot 等, 1997, 生物化学杂志, 272, 12994-12999)。在如上所述的第一项研究中, 通过弗林蛋白酶切割位点将一种抗体的 Fc



段融合到降钙素前体的信号肽中，导致了Fc片段的分泌(Liu等, 1993, 美国科学院进展, 90, 8957-8961)。在第二项研究中, 经弗林蛋白酶识别位点将血管紧张素II融合到带信号肽的部分肾素原(prorenin)上, 可以使缺乏生产成熟肽所必需的完整修饰系统的细胞能够分泌血管紧张素II (Methot等, 1997, 生物化学杂志, 272, 12994-12999)。

发明概述

本发明者认为内切蛋白酶切割位点, 如弗林蛋白酶识别位点, 可以被用以通过内切蛋白酶解产生组分蛋白质而从嵌合融合蛋白质产生多基因产物, 其中每种组分单独地或相互间形成复合物或与其它细胞成分相联合而具有其特定的生物学活性。此外, 本发明者意识到这种技术可以用来表达两种或多种多肽(蛋白质), 这些多肽是嵌合融合蛋白质的组分, 它们或是等摩尔比, 或是由特定蛋白质或肽序列在融合蛋白质中的重复频率所确定的其它比例。而且, 掺入嵌合蛋白质中的内切蛋白酶解位点可以设计成遍在的内切蛋白酶(如弗林蛋白酶)的靶位点, 因而可以在许多不同种类的细胞中产生组分蛋白质。可选择地, 将切割位点设计成细胞特异性内切蛋白酶的靶位点, 从而在表达该内切蛋白酶的特定靶细胞中产生组分蛋白质。后者为组织特异性的蛋白质表达提供了一种新机制, 可以作为一种策略与以前描述过的实现组织特异性表达(即靶向性的递送和组织特异性的转录)的方法相联合或与其分开来使用。

此处作为例子, 本发明者以融合蛋白质的形式表达了IL-2和B7.1, IL-4和B7.1, IL-4和IL-2, IL-12(由两种亚基组成, p35和p40), 或IL-12和IL-2(由三种亚基组成, IL-12的p35和p40亚基加上IL-2), 在每一个例子中均以包含弗林蛋白酶靶序列的接头分隔。在这些例子中, 所使用的弗林蛋白酶切割位点分别为: B7.1/IL-2编码载体为Gly. Gly. Arg. Gly. Arg. Arg. Gly(图2A, B, 和C), IL-4编码载体为Gly. Gly. Arg. Tyr. Arg. Arg. Gly. Gly(图2D和E), 或IL-12编码载体为Gly. Arg. Pro. Lys. Arg. Pro(图2F和G)。这些序列包含弗林蛋白酶切割位点的共有序列(在这些例子中为: Arg. Gly. Arg. Arg或Arg. Pro. Lys. Arg)

和使该切割位点在空间上更易被接近的附加甘氨酸或脯氨酸残基。通常弗林蛋白酶的切割位点符合共有序列: Arg. X. Y. Arg, 其中 X 可以是任何氨基酸, 如甘氨酸, 赖氨酸, 缬氨酸, 酪氨酸, 谷氨酰胺或脯氨酸, 而 Y 优选赖氨酸或精氨酸。第三基因杀稻瘟素 S 脱氨酶经由脑心肌炎病毒核糖体进入位点序列的表达, 可允许分离成功转导的细胞, 各转导细胞中融合基因的组分表达为在适当亚细胞部位内的具有生物学活性的物质。以 CTLL 试验和 ELISA 证实了有生物学活性的人 IL-2 和 IL-4 的表达, 以人淋巴细胞的激活和 ELISA 证实了有生物学活性的 IL-12 的表达。用 B7.1 的单克隆抗体或其天然配基 CTLA4 以 FACS 试验, 以及由其共刺激 Jurkat T 细胞系产生 IL-2 的能力证实了有生物学活性的人 B7.1 的表达。

因此, 最基本的是, 本发明提供了以单顺反子产生多基因产物的方法和材料, 该顺反子以单个融合蛋白质的形式编码多种产物, 融合蛋白质在合成后可经过切割和加工生成其具有生物学活性的构成组分。

第一方面, 本发明提供了一种在靶细胞中以融合蛋白质的形式表达两种或多种多肽的核酸构建体, 所述核酸构建体包含编码第一多肽的第一序列和编码第二多肽的第二序列, 所述第一和第二序列被编码一种内切蛋白酶切割位点的接头序列分隔。

内切蛋白酶切割位点可以是内切蛋白酶识别的任何氨基酸序列。内切蛋白酶的例子包括 PC2, PC3, PC4, PACE4 和 Kex2。优选地, 内切蛋白酶为弗林蛋白酶, 它识别具有氨基酸序列为 Arg. X. Y. Arg 的切割位点, 其中 X 是任何氨基酸残基, Y 优选赖氨酸或精氨酸。熟练的技术人员完全有能力提供所需求的具有其它亚细胞定位的其它内切蛋白酶识别和 / 或靶向的切割位点。

为了使内切蛋白酶切割位点在空间上与内切蛋白酶更易接近, 优选接头序列更进一步包含间隔序列。这种间隔序列可以简单地是一个或更多个位于编码内切蛋白酶切割位点的核苷酸任一侧的适宜附加密码子 (如甘氨酸编码密码子)。切割位点可以由能够编码适合内切蛋白酶切割的氨基酸序列的任何 DNA 序列编码, 优选侧翼有较少数目 (2, 3,

4 等) 适宜的附加氨基酸, 从而使切割位点更易接近内切蛋白酶。假如切割位点是弗林蛋白酶的切割位点, 它可以是由任何适合弗林蛋白酶切割的 DNA 序列编码 (如上所描述的 Arg. X. Y. Arg)。作为例子, 接头序列可以是 AGG-GGT-CGA-CGC。切割位点每侧侧翼可以有编码甘氨酸残基的密码子作为间隔序列, 如编码 Gly. Gly. Arg. Gly. Arg. Arg. Gly. Gly 的 GGC-GGC-AGG-GGT-CGA-CGC-GGC-GGC。该接头序列也可能包括由纯粹和应用化学国际联合会规定的共有序列 MGN-NNN (除 TRR 外)-AAR-MGN 或 MGN-NNN (除 TRR 外) MGN-MGN (Biochemical Nomenclature and Related Documents, 第二版, Portland 出版, 1992, 122 - 126)。

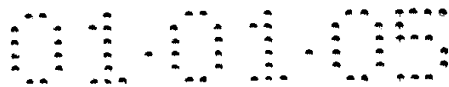
该核酸构建体可以是 DNA, cDNA, RNA, 线状或环状, 单链或双链, 其中两种或两种以上多肽以单顺反子转录物形式编码。优选地, 该构建体可构成一种可用于转染或感染宿主细胞的载体的部分, 包含该核酸构建体的载体和宿主细胞构成本发明的另一个方面。

第二方面, 本发明提供了一种在靶细胞中表达两种或两种以上多肽的方法, 所述方法包含以下步骤:

- a) 构建以上定义的核酸构建体; 和
- b) 用所述核酸构建体转染靶细胞, 从而使该核酸构建体表达产生含有由内切蛋白酶切割位点连接的第一和第二多肽的融合蛋白, 所述的内切蛋白酶切割位点可以被靶细胞内的内切蛋白酶切割生成单独的具有生物学活性的第一和第二多肽。

优选地, 所述核酸构建体是核酸载体, 尤其是病毒载体, 如逆转录病毒载体的一部分。这种逆转录病毒载体可转染到逆转录病毒包装细胞系中, 这种细胞可以用来感染靶细胞。

本发明的构建体和方法可作为研究工具用于研究在靶细胞内两种或多种多肽的表达和活性。这可以用于生产多亚基蛋白质或蛋白质复合物, 将它们从靶细胞中分离后可用于工业, 诊断或治疗。此外, 所述靶细胞本身也可用于这些目的, 包括用编码嵌合蛋白质的可表达一种或多种具有生物学活性的产物 (如包含两种不同亚基的 IL-12) 的



载体转染而生产细胞疫苗(如肿瘤细胞疫苗)。该方法还可用于在不能正常表达这些蛋白质的细胞内异位表达多蛋白质。该方法的主要优点在于能够以特定摩尔比例产生两种或多种蛋白质。这一点对于要求每种亚基以等摩尔量表达的多亚基蛋白质(如 IL-12)尤其有用。的确,以不同的摩尔量表达的亚基可产生与蛋白质组合相关的拮抗效应。

此处提供的技术更进一步的应用为,掺入的内切蛋白酶识别和/或切割位点可用于包括组织特异性内切蛋白酶在内的内切蛋白酶切割,因而为单一蛋白质或由多组分组成的嵌合蛋白质的组织特异性加工提供了一种新机制(而非靶向递送或组织特异性转录),这些蛋白质可能在内切蛋白酶剪切之前没有活性,因蛋白酶剪切的结果使其激活,从而组织特异性表达由嵌合蛋白质各组分编码的生物学活性,或由它们协同作用编码的生物学活性,或它们与细胞内其它组分编码的生物学活性。

可选择地,根据本发明的技术能够用于疾病治疗,其中细胞类型可被靶向而产生两种或多种多肽。这种治疗可包括基因治疗,用于治疗不能合成有活性的多肽或不能合成正常水平的多肽或两种情况兼有的病人,从而达到由野生型多肽,即所编码的多肽本身或其进一步修饰的产物提供的效应。对此将在下面作更详细的描述。

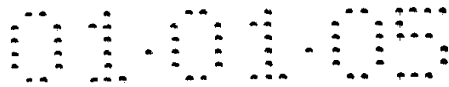
附图简述

现在仅通过实施例并参考附图说明本发明的各方面和实施方案。更进一步的方面和实施方案对于那些本领域熟练的技术人员是显而易见的。所有在本文中提到的资料此处引入作为参考。

图 1 表示分泌的组成型通路和推测的弗林蛋白酶对嵌合蛋白质作用方式的图解概述。

图 2 表示包含 IL-2, IL-4, IL-12 p35, IL-12 p40 和 B7.1 不同组合的“融合基因”构建体的 7 种逆转录病毒载体的图解说明。

图 3 表示利用 CTLA4-Ig 和 FITC-Ig 以流式细胞术检测被 pWZLB7/IL2M, pWZLIL4/B7M 和 pWZLIL2B7M 感染的 AM12 细胞表面表达



B7.1 的情况。

图 4 表示以 pWZLIL2/ B7M 转导的 GP+envAM12 和 GP+E86 细胞上清中 TCGF (T 细胞生长因子) 活性的抗体封闭实验。1: 4 稀释的上清中加入 1 μ g/ml 不相关抗体(UPC10)或中和性抗 IL-2(5334.2)抗体。— 测量掺入的 ³H 胸腺嘧啶并与未加抗体的相同稀释度上清比较。

图 5A 表示 CTLL 细胞对 pWZLIL4/B7M 转导的 AM12 细胞培养上清中存在的细胞因子的增殖反应。

图 5B 表示存在或缺乏 1 μ g/ml 中和性 IL-2 和/或 IL-4 抗体时所检测的 CTLL 细胞对 pWZLIL4/IL2M 转导的 AM12 细胞培养上清中存在的细胞因子的增殖反应。结果以脉冲 4 小时后所掺入的 ³H 胸腺嘧啶的 cpm 表示。

图 6 表示以 pWZLIL2B7M 载体转导的 GP+E86 和 GP+envAm12 包装细胞为刺激细胞的 Jurkat 共刺激试验。条形表示在 Jurkat 细胞存在下, 存在或缺乏所示抗体 (1 μ g/ml) 条件下对 PHA-P 和 GP+E86 或 GP+envAM12 包装细胞为刺激细胞产生反应所生成的 IL-12, 缩写: AM12=GP+envAM12。

图 7 即表 1 是以 ELISA 或 CTLL 试验定量测定的转导细胞的细胞因子产生, 以测定生物学活性。

图 8 即表 2 是以流式细胞术检测的在 NIH/3T3, 32Dp210, K562 和 OIB 细胞表面上 B7 和 IL-2 的表达。

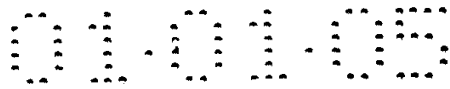
图 9 即表 3 是在人肿瘤细胞内 IL-2 和 B7.1 的表达图解说明。

图 10 即表 4 是在融合基因载体转导的 Cos7 细胞内细胞因子 (IL-2 和 IL-12) 的生物学活性的图解说明。

发明详述

本发明的核酸构建体可以分离物、分离和/或纯化形式提供。该核酸可以是全部或部分合成的, 可以包含基因组 DNA, cDNA 或 RNA。

该核酸构建体可包含许多编码多肽的序列, 各序列由编码组织特异性的或遍在的内切蛋白酶切割位点的接头序列所分隔, 本领域的技



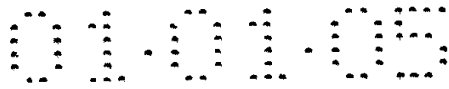
术人员应用此处的信息和参考资料以及本领域公知的技术（如参考 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, “分子克隆实验指南, 冷泉港实验室出版, 1989, 和 Ausubel 等, 简明分子生物学方法, John Wiley 和 Sons 1992）可以容易地制备这种核酸构建体。这些技术包括（i）应用聚合酶链式反应（PCR）扩增此类核酸样品, 如来源于基因组的材料, （ii）化学合成, 或（iii）制备 cDNA 序列。可以对核酸序列进行修饰, 如应用诱点突变, 以表达被修饰的多肽或利用用来表达构建体的靶细胞的偏好性密码子。

为实现核酸构建体的表达, 可将序列插入到带有有效连接在核酸上的控制序列的载体中以调控其表达。可以选择或构建合适的载体, 使其包含合适的调控序列, 包括启动子序列、终止子片段、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其它适当的序列。载体可以是质粒, 病毒例如噬菌体或噬粒, 合适即可。更进一步的细节见, 如分子克隆实验指南, 第二版, Sambrook 等, 1989, 冷泉港实验室出版。许多已知的操作核酸的技术和方法, 如核酸构建体的制备、诱变、序列分析、将 DNA 引入细胞和基因表达, 以及蛋白质分析, 在当代分子生物学手册, Ausubel 等, John Wiley 和 Sons, 1992 中有详细的描述。

通过将载体转化到其中载体有功能的靶细胞中（经转染或感染）, 培养靶细胞使核酸构建体表达产物融合蛋白质得以表达, 并在细胞内通过切割融合蛋白质从而产生所述两种或多种多肽, 可使靶细胞表达两种或多种多肽。

本发明允许在细胞内对多肽进行加工, 从而使其正常的生物学活性得以保留或受到修饰。优选地, 在该两种或多种多肽中至少有一种能被细胞以生物学活性形式分泌。

为本领域所熟知, 原核和真核细胞都可用于此目的, 如大肠杆菌的菌株, 酵母和真核细胞, 例如 COS 或 CHO 细胞。然而, 根据本发明, 靶细胞可以是不表达某些多肽或者另一些多肽的表达会引起其它生物学过程的细胞。此外, 可以选择靶细胞从而使所表达的两种或多种多肽中的一种可以被分泌到周围组织中。这一点可能有更多的分子生物



学方面的应用，如肿瘤的免疫基因治疗。尽管本发明可适用于任何细胞类型，建议使用的细胞系包括多种类型和起源的成纤维细胞、上皮细胞、肌细胞、神经元、实质细胞、内分泌和骨髓来源的细胞。

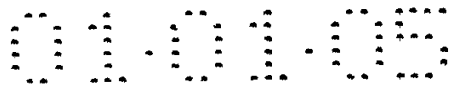
基于靶细胞的不同，编码内切蛋白酶切割位点的接头序列可能必须被修饰以保证切割位点能够被该靶细胞类型内常见的内切蛋白酶识别。本领域的技术人员能够通过应用此处包含的信息和参考资料以及共知的一般性知识做到这一点。优选的内切蛋白酶为在多种组织中广泛表达并且在真核生物种属间高度保守的弗林蛋白酶。但是，用组织特异性内切蛋白酶切割位点而不是弗林蛋白酶切割位点将会提供更高程度的特异性，从而在特定的组织中产生所需的生物学活性组分。这样将引入更高的靶向性水平（不仅仅局限于组织特异性递送和转录），并为细胞毒化合物和/或药物转换酶基因的递送提供了另外的方法。

用于基因治疗的核酸构建体可以在体内或体外引入靶细胞，对此将在下面讨论。

核酸构建体编码的多肽可以是多肽或基因的活性部分、片段或衍生物。多肽或基因的“活性部分”是指比所述全长野生型多肽短的肽，但是其保留了多肽的基本生物学活性。应基于多肽的功能和特定的靶细胞来选择多肽，例如可以选择在靶细胞中不能正常表达的多肽或能够从靶细胞分泌到周围组织中的多肽。例如该核酸构建体可以编码细胞毒性化合物或药物转换酶。多肽必需的基本生物学活性可以通过多肽的常规测试，如与其它结合蛋白质如抗体间的相互作用来确定。

本领域的技术人员熟知其它的测定生物学活性的方法。这些方法的例子包括：将底物转化成产物（如酶）；生成产物（如激素）和直接或通过它们的生物学活性（如刺激反应细胞的生长）测定产物；与蛋白质或其它靶如 DNA 或 RNA 序列的结合或其它相互作用（例如 DNA 结合蛋白质）；特定 RNA 或蛋白质生成的水平改变（转录因子）；由产物水平降低而引起的比色改变（酶）；蛋白质自身，其结合配体或其活性的其它产物的染色。

编码两种或多种具有真正生物学活性多肽的本发明核酸构建体，可



以用在基因治疗方法之中，以治疗不能合成有活性多肽或不能在特定的细胞或组织中合成或不能以需求量，或合适的摩尔比例合成该多肽的患者，从而提供由野生型，修饰后的或新多肽呈现出的效应，或能够使靶细胞产生和/或分泌多肽至周围介质之中。

在现有技术中已经用载体如病毒载体将基因引入许多不同的靶细胞。通常，将载体暴露于靶细胞，从而使足够比率的细胞发生转染进而提供由目的多肽表达所产生的有益的治疗或预防效果。被转染的核酸在细胞内可能以附加体，或以自主复制的多核苷酸，或通过掺入细胞例如肿瘤细胞的细胞核或线粒体基因组中，瞬时或永久存在，这样提供瞬时或长期持久的效果。在瞬时表达或瞬时效果的情况下，可以周期性地重复这种治疗。

多种载体，包括病毒载体和质粒载体为本领域所熟知，见 US 专利号：5, 252, 479 和 W093/07282。特别是许多病毒已被用作基因转移的载体，包括乳多空病毒，如 SV40，痘苗病毒，疱疹病毒包括单纯疱疹病毒和 EB 病毒以及逆转录病毒。现有技术中许多基因治疗方案已使用了缺陷的鼠逆转录病毒。

除使用病毒载体外，其他向细胞内引入核酸的公知方法包括电穿孔法；磷酸钙共沉淀法；机械方法如显微注射，脂质体介导的转移，高速发射器介导的转移和直接的 DNA 摄取以及受体介导的 DNA 转移，或甚至原生质体或细胞融合介导的转移等。

如上所述，应用编码该两种或多种多肽或其有活性的部分，或无活性的前体蛋白质或前体蛋白质原的核酸进行基因治疗的目的是在野生型多肽缺如或仅以低水平存在的细胞中增加该核酸表达产物的量。可选择地，该目的可以是修饰靶细胞，使之能够产生该细胞中通常不能产生的特殊多肽。这种治疗可能在例如癌性细胞的治疗方面有效，或在已知缺乏特殊多肽的个体的预防性治疗方面有效。该治疗也可能包含预防性的或治疗性的接种（如用如此修饰的肿瘤细胞疫苗），或者表达活性药物转化酶或经这种蛋白水解加工后可以被激活的无活性药物转化酶。

因此，本发明提供了用于上述医学治疗中的构建体和构建体在制备

肿瘤细胞治疗药剂方面的应用。

方法和材料:

融合载体的克隆

构建了两种 hIL2/hB 7.1 融合载体, 其中一个包含全长 hIL-2 和 hB7.1 cDNA, 第二种载体包含全长 hIL-2 和仅编码 hB7.1 成熟产物的 cDNA。在这两种载体中, IL-2 和 B7.1 编码序列都被弗林蛋白酶切割位点隔开, 两侧侧翼有额外二个甘氨酸残基以使切割位点在空间上更易接近。该序列 (GGC-GGC-AGG-GGT-**CGA**-CGC-GGC-GGC) 含 Sal I 识别位点 (以黑体表示) 并编码 Gly. Gly. Arg. Gly. Arg. Arg. Gly. Gly. 利用适宜的 PCR 引物可扩增大量的 IL-2 和 B7.1 cDNA 片段, 分别测定其序列, 以确定无突变存在。利用 pUC 来源的质粒骨架, 将这些片段连接起来以构建包含莫洛尼鼠类白血病病毒 (MoMLV) 长末端重复序列 (LTR) 和通过弗林蛋白酶位点与全长的 hB7.1 (核苷酸 318-1184) 或成熟 B7.1 (核苷酸 396-1184) 相融合的全长 hIL-2 (核苷酸 48-507) 如图 2 所描述的逆转录病毒载体。应用本领域技术人员熟知的相似策略构建图 2C 至 2G 描述的其他载体。

融合基因逆转录病毒载体的生成:

将生成的质粒转染入亲嗜性逆转录病毒包装细胞系 (GP+E-86) 内, 以 4-8 μ g/ml 杀稻瘟菌素 S 筛选后的细胞培养上清液感染双嗜性包装细胞系 (GP+envAM12)。单个 GP+envAM12 细胞克隆的培养上清基本按以前描述的方法 (Gäken 等, 1997) 感染不同的靶细胞。

分析细胞因子的产生和 B7.1 的表达

细胞因子的产生: 利用抗体 JES6-1A12 和 11B11 分别捕获和探测 IL-2, 或用 JES6-5H4 和 BVD6-24G2 (PharMingen San Diego CA) 分别捕获和探测 IL-4, 以 ELISA 测量 IL-2 和 IL-4 的水平。这些细胞因子的生物学分析基于 CTLL 细胞的 H³-胸腺嘧啶掺入试验。在 1 μ g/ml 不相关抗体 (净化的 UPC10 克隆的腹水, 小鼠 IgG2a) 或抗 IL-2 (纯化的, 5334.2 克隆, 小鼠 IgG2a, R & D Systems) 或 IL-4 (11B11) 的中和性抗体存

在条件下实施该分析。

hB7.1 表达: 利用反受体 CTLA4 或 FITC 偶联的小鼠单克隆抗体 (BB1 克隆, IgM, PharMingen) 以流式细胞术检测 B7.1 的表达。从 CTLA4Ig 生产细胞 J558L (由 Christian Döhning 博士惠赠, Basel 免疫学研究所, Basel, 瑞士 (Döhning 等 1994)) 组织培养上清液中分离 CTLA4, 并与 FITC 偶联的羊抗人 IgG (Sigma) 一起使用。以 CD28 介导的 T 细胞共刺激试验确定 hB7.1 的生物学活性。在抗-CD25 单克隆抗体 (33B.1 克隆大鼠 IgG2a, Immunotech) 存在或不存在的条件下, 将 hB7.1 表达细胞与已在 2-4 μ g/ml PHA-P 存在的条件下接受 T 细胞受体 / CD3 复合体激活的 Jurkat T-细胞共培养后, 按如上所述的 ELISA 法确定 IL-2 的生成。

结果

载体构建

人 IL-2 / B7.1. 构建克隆了 IL-2 和 B7.1 编码序列, 并在这两种 cDNA 之间插入了弗林蛋白酶识别位点的两种逆转录病毒载体 (图 2), 该载体包含可调控单顺反子信使 RNA 转录的莫洛尼鼠类白血病病毒 (MoMLV) 长末端重复序列 (LTR)。这两种载体中, IL-2 编码序列后是不带信号肽的成熟 B7.1 的编码序列 (pWZLIL2 / B7M, 见图 2a), 或包含信号肽的 B7.1 全长编码序列 (pWZLIL2 / B7F, 见图 2b)。IL-2 / B7.1 序列后接脑心肌炎病毒 (ECMV) 内部核糖体进入位点 (IRES), 它可使得 blast 基因翻译从而赋予对杀稻瘟菌素 S 的抗性。在这两种载体中, IL-2 信号肽负责引导嵌合 IL-2 / B7.1 蛋白质转运到内质网 (ER)。由这些载体编码的嵌合蛋白质应该被转运到高尔基体并通过 B7.1 跨膜结构域将蛋白质锚定在膜上。这样可使弗林蛋白酶在高尔基体内切割该嵌合蛋白质, 从而产生细胞膜结合的 B7.1 和分泌的 IL-2。

在对照载体 pWZLB7 / IL2M (图. 2C) 中, IL-2 和 B7.1 cDNA 的相对位置被颠倒。在该载体中以 B7.1 的信号肽代替 IL-2 的信号肽用来将融合蛋白转运入内质网中。在此构型下, B7.1 跨膜结构域的存在阻止了融合蛋白质的羧基端部分 (包含 B7.1 胞质区、弗林蛋白酶切割位点和成熟

的 IL-2) 进入内质网腔内。因此, 由于弗林蛋白酶的识别位点在高尔基体的外面, 不能发生弗林蛋白酶位点的切割。

编码 IL-4 / IL-2 和 IL-4 / B7.1 的载体

为检查本策略的普遍适用性, 应用相同的方法构建其它的融合蛋白质。载体 pWZLIL4 / B7M 编码在 B7.1 和 IL-4 之间包含弗蛋白酶位点的嵌合 IL-4 / B7.1 蛋白质 (图 2d)。载体 pWZLIL4 / IL2M 编码由弗林蛋白酶切割位点分隔的嵌合 IL-4 / IL-2 蛋白质 (图 2e)。这些载体应该编码分泌的细胞因子和膜锚着 B7.1。

将所描述的每种质粒导入逆转录病毒包装细胞中, 接着用 blast 抗性筛选, 分离兼嗜性和亲嗜性逆转录病毒生产细胞系。用这些载体转导靶细胞并分析所编码的融合基因的表达和功能活性。

编码 IL-12 (p40 和 p35) 和 IL-2 / IL-12 的载体

构建另外两种载体 (见图 2F 和 2G)。载体 F 包含 cDNA 间带弗林蛋白酶识别位点的 IL-12 p40 和 p35 亚基的 cDNA。载体 G 是一种具有两个 IL-12 cDNA (p35 和 p40) 和 IL-2 编码序列的三重载体 (triple vector), 三个编码序列被两个弗林蛋白酶位点所隔开。

在载体 F 和 G 中唯一的信号肽存在于 p40 片段之中。去除 p35 和 IL-2 的信号肽以克服嵌合融合蛋白质中多信号肽的存在而可能引发的干扰。

弗林蛋白酶识别序列的存在能够使嵌合融合蛋白被切割成其构成产物。

通过 ELISA 测量发现, 表达含有弗林蛋白酶识别序列的构建体的细胞明显生产细胞因子 (图 7, 表 1)。当弗林蛋白酶靶序列位于 IL4 和 IL-2 之间时, 这两种细胞因子均被分泌到培养基之中。同样, 以 FACS 分析表明, 编码带有分隔性弗林蛋白酶位点的嵌合 IL-2 / B7.1 或 IL-4 / B7.1 的载体之中, B 7.1 有细胞表面表达 (图 3)。但是, 一小部分嵌合蛋白质没有被切割。通过检测细胞表面的细胞因子 (图 8, 表 2) 和利用 IL-2 抗体捕获和用 IL-4 抗体检测或反之 (没有提供数据) 的试验中嵌合 IL-2 / IL-4 的 ELISA 检测中, 可证实这一点。后面的实验表明未切割产物的水平依赖于细胞类型, 可能反映了细胞内源性弗林蛋白酶的表达水平。

有趣地是，如果 B7.1 部分和 IL-2 均包含信号肽，则细胞因子的释放量相当少（差别大于 80 倍）（表 1）。这种细胞因子生成减少的确切机制还不清楚，但可能是由于融合蛋白质插入内质网或随后在高尔基体内弗林蛋白酶的切割受到干扰而引起。自这些载体感染的细胞生成膜锚着型 B7.1 和分泌型的细胞因子依赖于弗林蛋白酶切割位点的存在。在缺乏弗林蛋白酶位点的条件下，则没有细胞因子被分泌到培养基中（数据未显示）。同样，如果弗林蛋白酶切割位点被置于能够阻止它进入内质网腔内的构象之中，阻断它靠近高尔基体中的弗林蛋白酶，则没有细胞因子的释放。这在转导了 B7.1 分子（表 1）胞质区连有弗蛋白酶识别位点的 pWZLB7 / IL2M（见图 2C）的细胞中可明确证明。在该构型中，弗林蛋白酶的切割位点留在胞质中，不进入内质网腔，从而无法接近高尔基体内的弗林蛋白酶。但以 FACS 分析（图 3）明确地显示了 B7 在细胞表面的表达。

融合基因产物的生物学活性

pWZLIL2 / B7M 和 pWZLIL2 / B7F 感染细胞系的上清液的 CTLL 增殖试验为确定分泌的细胞因子的生物学活性，检测了它们促进细胞因子依赖性 CTLL 细胞的增殖效应（³H-胸腺嘧啶掺入）。以 pWZLB7 / IL2M 载体转导的细胞产生的 T 细胞生长因子（TCGF）显著地多于以 pWZLB7 / IL2F 转导的细胞。这与基于 EILSA 的细胞因子水平检测结果相一致，（见表 1）。

为确定包装细胞培养上清液之中的 IL-2 诱导 CTLL 细胞的增殖，进行了抗体封闭实验。中和性 IL-2 抗体能够阻断上清液对 CTLL 的促增殖，但不相关抗体阻断效率甚低（图 4）。

同样，在 CTLL 细胞（图 5）上检测 pWZLIL4 / B7M 或 pWZLIL4 / IL2M 转导的细胞产生的 IL-2 和 IL-4 的生物学活性（图 5）。这些细胞对 IL-2 反应性显著高于对 IL-4 的反应性，因此，添加中和性 IL-4 抗体对 CTLL 细胞的增殖影响很小。但在中和性 IL-2 抗体存在的条件下，加入 IL-4 抗体能够减少胸腺嘧啶的掺入，表明这些细胞产生的 IL-2 和 IL-4 有生物学活性。

以 pWZLIL2/B7M 转导的 GP+E86 和 GP+envAm12 包装细胞为刺激细胞的 Jurkat 共刺激试验

为确定转导细胞表面表达的 B7.1 分子是有生物学活性的，进行 Jurkat 共刺激试验。Jurkat 细胞与 pWZLIL2/B7M 转导细胞及 PHA-P 的共培养增加了培养上清液中 IL-2 的水平（图 6）。如 IL-2 生成所测定的这种 Jurkat 细胞的激活是 B7.1 依赖性的，不能被通过抑制 IL-2 受体（CD25）阻断。因此，pWZLIL2/B7M 转导细胞表达有生物学活性的 B7.1 分子，其能够共刺激激活 PHA-P 处理后的 Jurkat 细胞。

IL-12 的生物学活性：含 IL-12 的载体转导的 Cos7 细胞上清的 T 细胞激活

载体 F（见图 2F）转导的细胞内 IL-12 的生物学活性，以及载体 G 转导的细胞内 IL-12 和 IL-2 的生物学活性按如下方法来确定。

通过诱导激活的人 T 细胞的生长来确定 IL-12 的生物学活性。这种生长作用通过测量细胞 DNA 之中放射性胸腺嘧啶的掺入来确定。按 Coligan 等人，免疫学现代方法，6.16 章，“IL-12 的淋巴母细胞增殖试验”进行检测。以如上所述的标准的 CTLL 试验确定 IL-2 的生物学活性。表 4 表示分泌到以载体 F 和 G 转导的细胞培养基之中的有生物学活性的 IL-12 和 IL-2 水平。

靶细胞的转化

为观察 B7.1 和 IL-2 在不同的细胞中的表达，感染一组组织培养细胞并检测其 B7.1 和 IL-2 的表达。以 pWZLIL2/B7M 融合载体感染下列细胞系，并评估 B7.1 的细胞表面表达和分泌到培养基中的 IL-2：NIH/3T3 小鼠成纤维细胞，32Dp210 鼠髓细胞，K562 人类红白血病细胞和 OIB 人卵巢腺癌细胞。为确定未切割融合产物的存在，也以 FACS 试验分析 IL-2 在细胞表面的存在（见表 2）。IL-2-B7.1 载体也用来转染另外三种细胞系，即 A 4 3 1 人子宫内膜肿瘤细胞系和两个人卵巢细胞系 SKOV-3 和

OVCA-432。总共检测了 40 个克隆，所有细胞的 B7.1 表面表达和分泌到上清中的 IL-2 均为阳性（见表 3）。

以电穿孔法转导 COS7 细胞（见 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, 分子克隆实验指南，冷泉港实验室出版，1989）。

讨论

此处描述的载体系统利用了弗林蛋白酶识别位点的存在从一个顺反子表达分泌型和膜结合型的有生物学活性的蛋白质。如上描述，这种载体可以是质粒或者基于 RNA 或 DNA 病毒的载体。

应用内切蛋白酶切割位点能够实现单顺反子转录物的表达，该单顺反子转录物翻译成嵌合性融合产物，再被内切蛋白酶切割产生其组成成份。因此，蛋白质产物的摩尔比例由它们在载体之中的出现频率决定。如果载体包含一个 IL-2 和一个 IL-4 编码序列，则这两种细胞因子将以等摩尔比例表达；如果包含 2 个 IL-2 和 1 个 IL-4 编码序列，则这两种细胞因子将以相应的 2:1 的摩尔比表达。此外，包含不同的基因组合的 7 种构建体都能够表达有生物学活性的蛋白质这一事实表明这种策略具有广泛适用性。

不同细胞系中 IL-2 产生水平的差异很可能反映了弗林蛋白酶水平的差异和/或基因表达所涉及的不同过程的效率差异，和/或表达产物的稳定性差异。NIH/3T3 细胞的 IL-2 产生水平显著低于 32Dp210、K562 和 OIB 细胞中所观察到的 IL-2 水平。这与这些 NIH/3T3 细胞表面上 FACS 可检测到的高水平的 IL-2 相一致。细胞表面上 IL-2 的存在不是缘于 IL-2 非特异性的结合在细胞上，因为当 IL-2 生产细胞与 IL-2 非生产细胞混合后，用 FACS 试验可检测到两种不同的细胞群（结果未提供）。因此，细胞表面上的 IL-2 可能仍与 B7 融合，提示这些细胞内内源性弗林蛋白酶未能有效地加工嵌合蛋白质。在 COS 细胞之中也观察到这种减低水平的或低效率的弗林蛋白酶介导的加工。这些细胞仅生产小部分的 von Willebrand 因子原（Wise 等，1990，美国科学院研究进展，87，9378-9382）和大鼠胰岛素原 I（Smeekens 等，1992，美国科学院研究进展，89，

8822-8826), 而这两种蛋白质都可被弗林蛋白酶正常地加工成其有生物学活性的产物。以编码弗林蛋白酶的载体共转染 COS 细胞可以使两种系统中蛋白质的分泌增加 (Wise 等, 1990, 美国科学院研究进展, 87, 9378-9382; Smeekens 等, 1992, 美国科学院研究进展, 89, 8822-8826)。因此, 在内源性弗林蛋白酶水平低的细胞之中, 引入弗林蛋白酶表达载体可能会提高弗林蛋白酶的水平, 这样可增加对插入弗林蛋白酶切割位点的嵌合蛋白质的切割。此外, 改变弗林蛋白酶切割位点本身也能够提高切割效率。在中国仓鼠卵巢细胞中, 氨基酸序列 Arg-X-Lys-Arg 可使 50% 的蛋白质前体被切割, 而序列为 Arg-X-Arg-Arg 仅使 30% 的蛋白质前体被切割 (Watanabe 等, 1992, 生物化学杂志, 267, 8270-8274)。最后, 使用组织特异性的内切蛋白酶切割位点, 而不是广泛表达的弗林蛋白酶, 将引入更高水平的特异性, 从而在特定的组织中生产有生物学活性的目的组分。这样将达到更高水平的靶向性 (不仅仅是组织特异性送递和转录), 可能是许多应用中特别具吸引力的策略, 这些应用包括: 以细胞或组织特异性的方式对先天的或其它方式的组织或器官特异性遗传病进行基因治疗, 或送递有细胞毒性的, 抑制细胞的或促分化的蛋白质或多肽, 或具有将药物前体转化成有活性药物的催化活性的蛋白质 (药物转化酶)。利用这种组织特异性内切蛋白酶识别位点以实现组织特异性加工和激活原本无活性的嵌合蛋白质是本发明的另外一个优点。

除描述过的在质粒和逆转录病毒为基础的载体中融合基因的活性, 本发明者也获得了腺病毒载体中有活性的证据。将 B7. 1/IL-2 表达盒克隆入腺病毒载体 (E1 缺失的 Ad5 载体)。用该载体感染一个已建立的细胞系 (HeLa) 和自三个 AML 病人分离得到的原代急性髓系白血病细胞 (AML)。对每一种细胞群体的测试结果表明有高水平的 B7. 1 细胞表面表达, 感染细胞的培养上清液中分泌的 IL-2 的量超过 $20\text{ng}/10^6$ 细胞/24 小时。

说明书附图

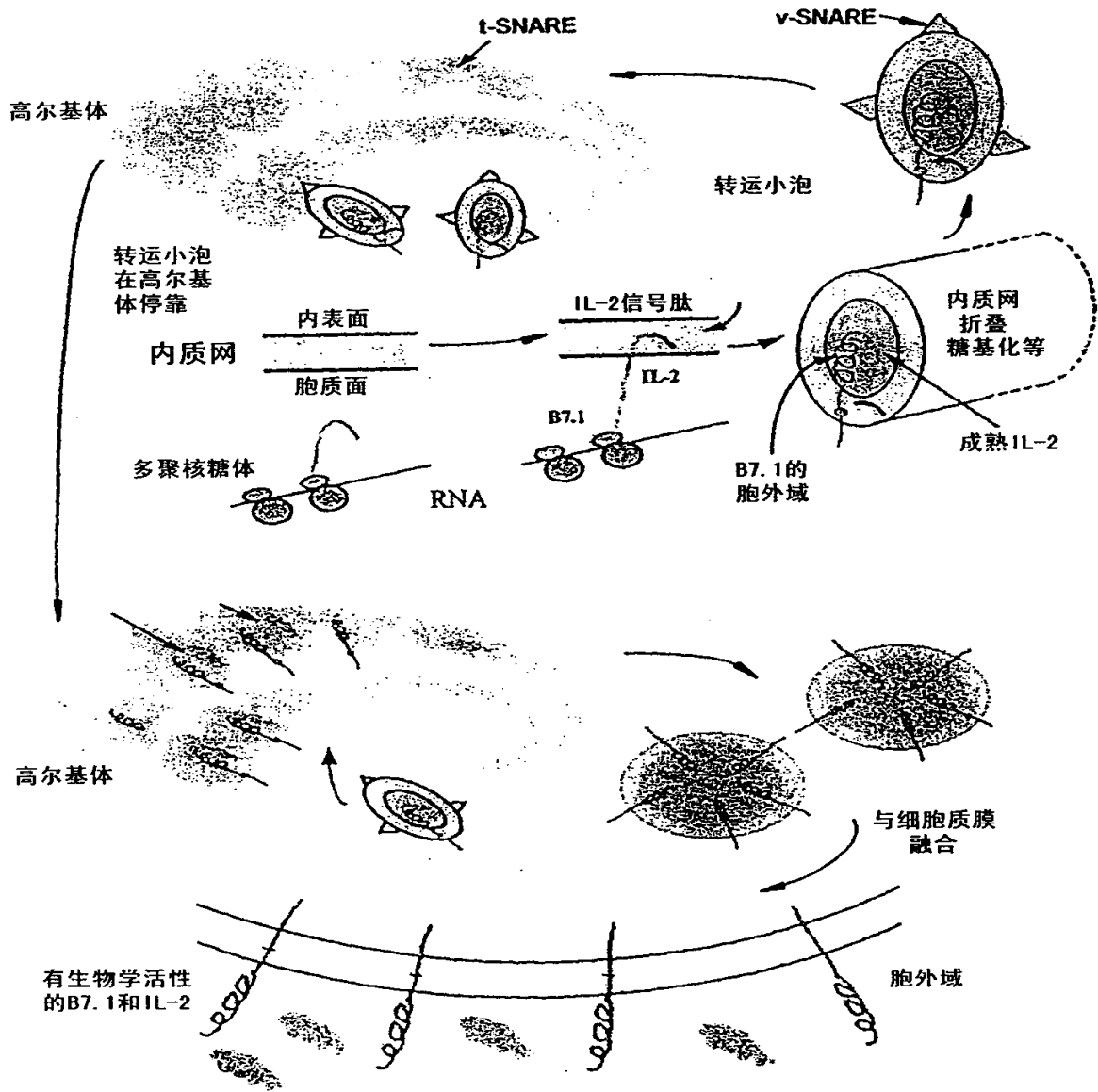


图 1

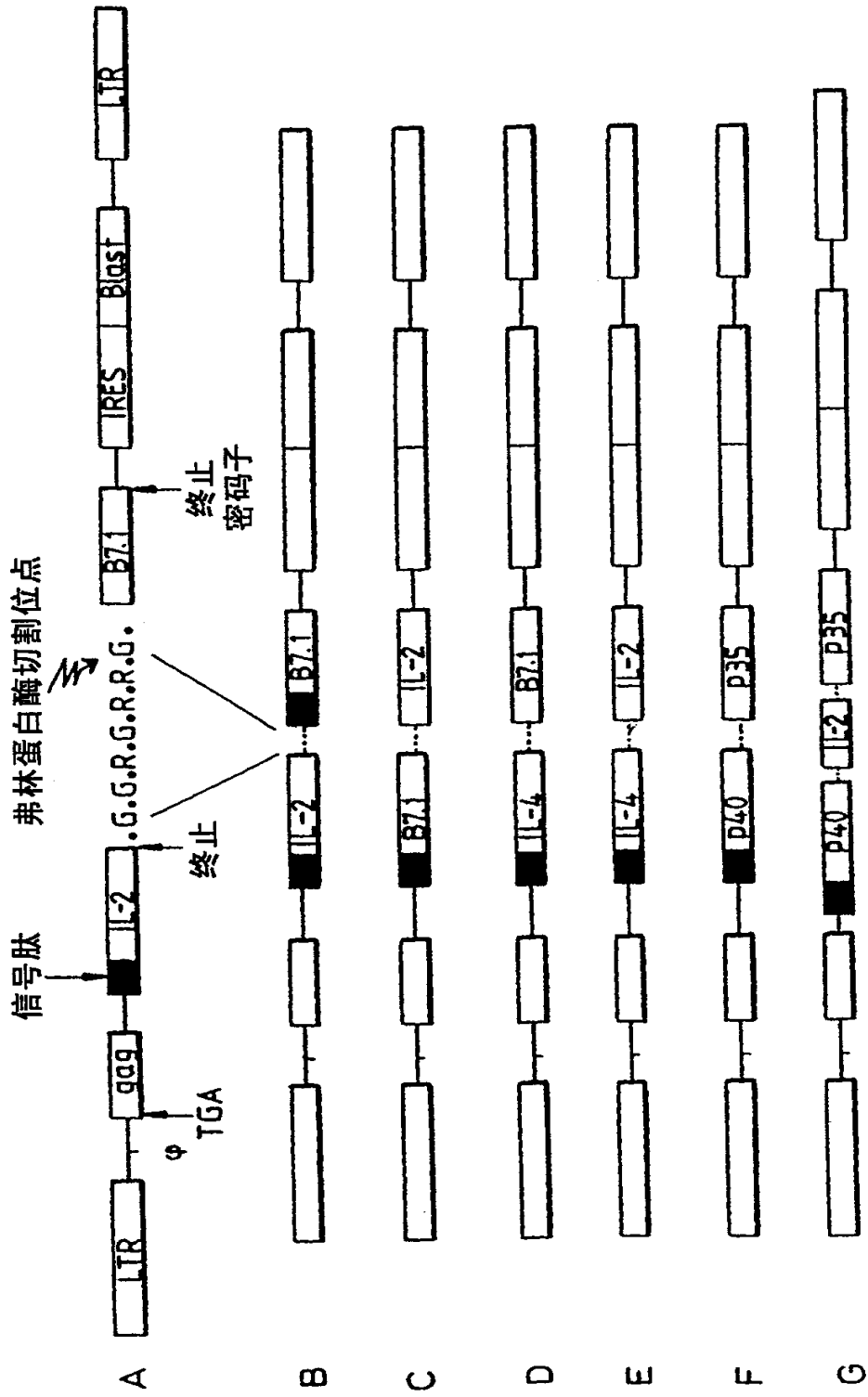


图 2

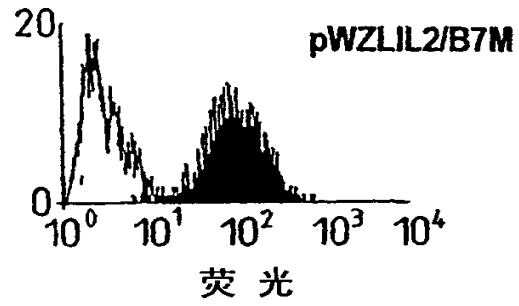
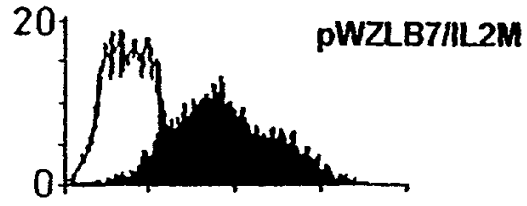


图 3

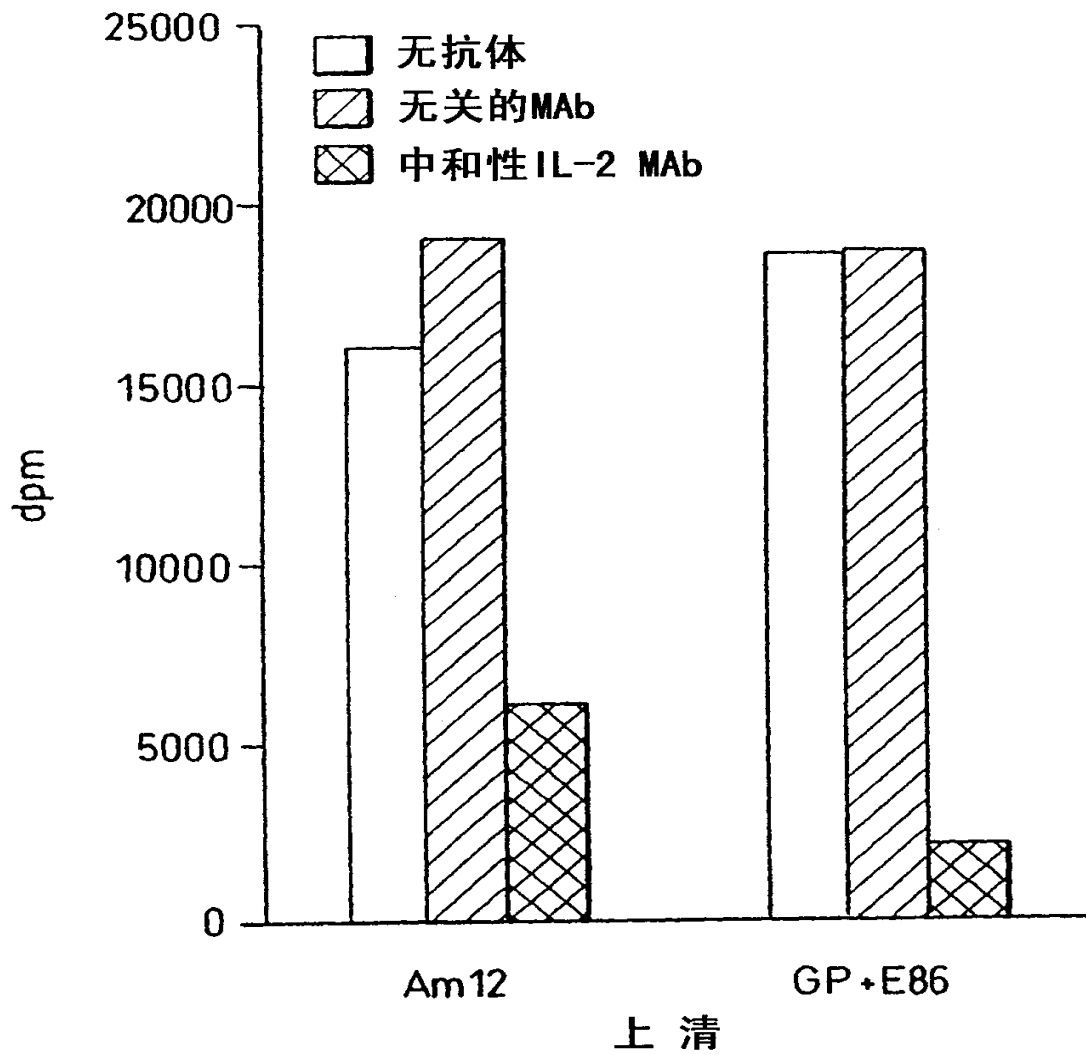


图 4

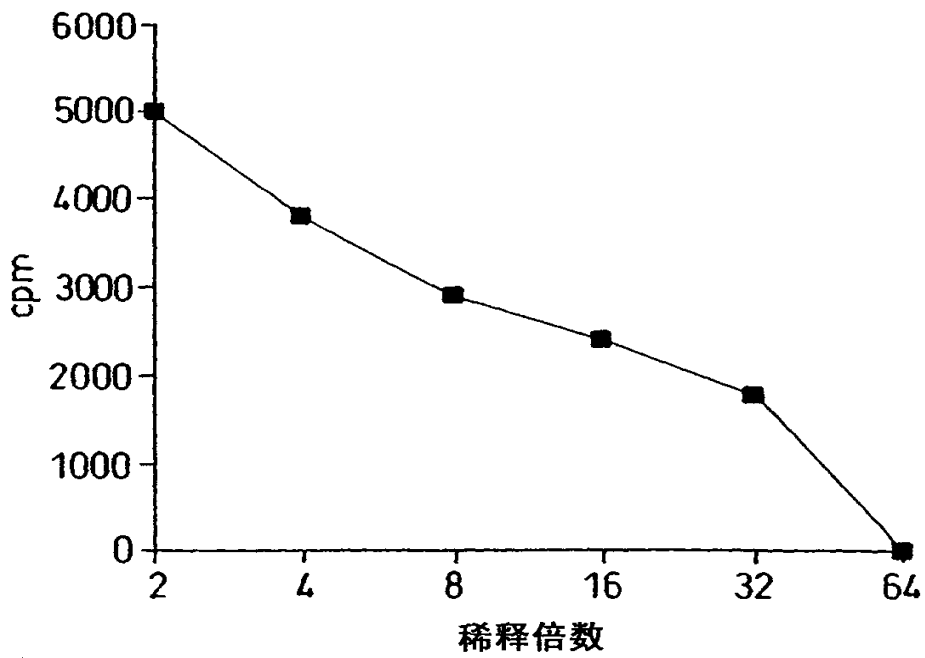


图 5A

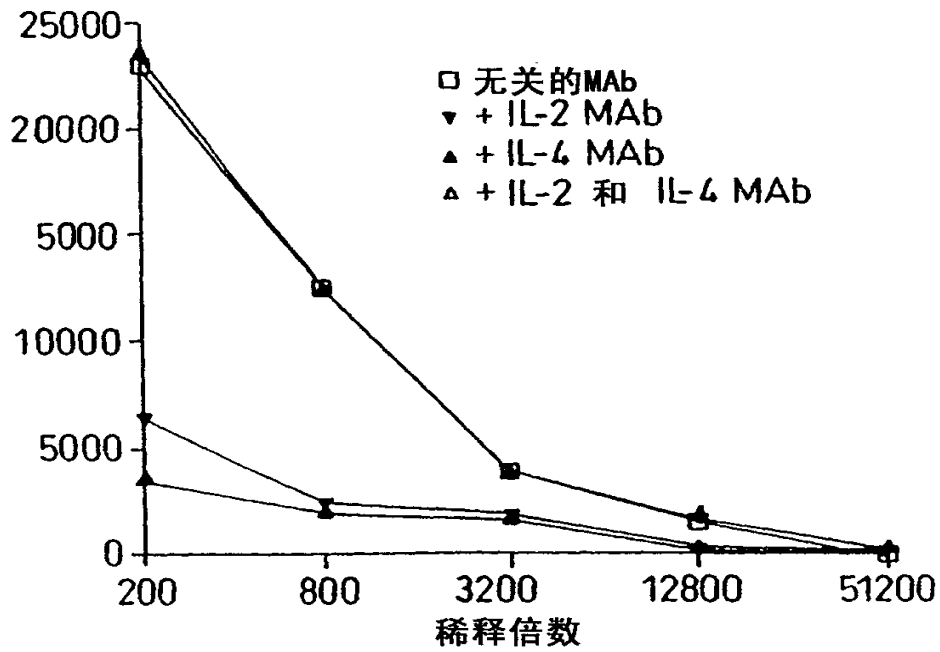


图 5B

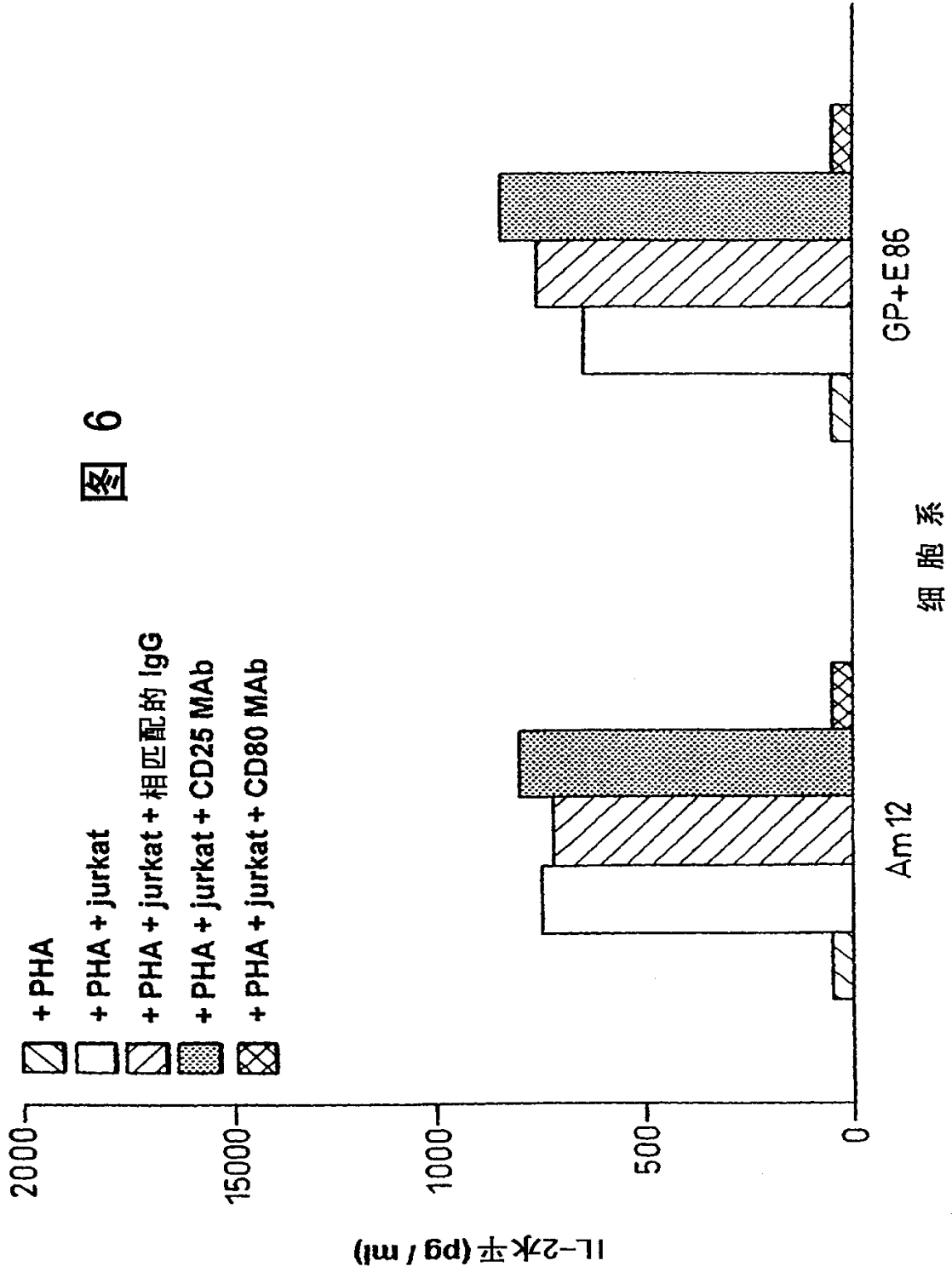


图 6

表 1

细胞系	构建体	IL-2 (ng/10 ⁶ 细胞 /24hr)	IL-2 (I U/10 ⁶ 细胞 /24 hr)	IL-4 (ng/10 ⁶ 细胞 /24hr)
GP+E86	-	<0.01	<0.1	ND
"	pWZLIL2/B7F	0.8	112	ND
"	pWZLIL2/B7M	66	1018	ND
GP+envAM12	-	<0.01	<0.1	<0.01
"	pWZLIL2/B7F	0.4	52	ND
"	pWZLIL2/B7M	75	822	ND
"	pWZLB7/IL2M	<0.01	ND	ND
"	pWZLIL4/B7M	ND	ND	2.6
"	pWZLIL4/IL2M	44	ND	111

图 7

表 2

细胞系	检测克隆数	阳性克隆数	IL - 2 (ng/10 ⁶ /24hr) 范围	IL - 2 (MFI) 范围	B 7.1 (MFI) 范围
NIH/3T3 对照	1	0	<0.01	10	5
NIH/3T3 pWZLIL2/B7M	19	14	0.02-0.63	9-91	10-165
32Dp210 对照	1	0	0.19	11	4
32Dp210 pWZLIL2/B7M	28	28	0.94-8.13	71-137	44-116
K562 对照	1	0	<0.01	4	8
K562 pWZLIL2/B7M	33	32	9.33-85.22	208-238	52-219
O1B 对照	1	0	0.02	3	3
O1B pWZLIL2/B7M	7	7	11.92-33.82	87-138	139-201

图 8

图 9

表 3

细胞系	联合表达 B7.1和IL-2 检测的克隆数 /阳性克隆数	分泌IL-2 (ng/10 ⁶ 细胞/24 hrs)	B7.1表面表达 (高于背景的平均荧光 强度增加倍数)
A431	14/14	范围: 15 - 42 平均值: 30	范围: 35 - 529 平均值: 203
SKOV-3	9/9	范围: 15 - 44 平均值: 28	范围: 11 - 102 平均值: 60
OVCA-432	17/17	范围: 43 - 60 平均值: 52	范围: 26 - 60 平均值: 39

图 10

表 4

载体	IL-12 (IU/10 ⁶ 细胞/24hr)	IL-12 (IU/10 ⁶ 细胞/24hr)
F	pWZLLIL12	>1800
G	pWZLLIL12/IL2	>240
		>900