[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192013.8

[51] Int. Cl[7]
C07K 16/00
C07K 16/46
C07K 19/00
A61K 48/00
A61K 51/00
A61P 35/00

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1200950C

[22] 申请日 1995.2.6 [21] 申请号 95192013.8
[30] 优先权
[32] 1994. 2. 7 [33] US [31] 08/192,655
[86] 国际申请 PCT/US1995/001161 1995.2.6
[87] 国际公布 WO1995/021195 英 1995.8.10
[85] 进入国家阶段日期 1996.9.9
[71] 专利权人 研究发展基金会
地址 美国内华达州
[72] 发明人 M·G·罗森布拉姆
N·J·多纳托
审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 白益华

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 11 页

[54] 发明名称 作为蛋白质或核酸的输送载体的免疫共轭物

[57] 摘要

本发明提供了一种非病毒载体，它包含细胞结合组分，该组分具有与生物素标记的成分共轭的生物素结合因子。 同时，还提供了一种将遗传物质导入特定细胞的方法，包括给人施用非病毒载体，其中所述的非病毒载体包含细胞结合组分，该组分具有与生物素标记的成分共轭的生物素结合因子。此外，还提供了一种向细胞送递细胞毒成份的方法，包括给人施用非病毒载体。

ISSN1008-4274

1. 一种免疫共轭物，通过亲和素－生物素相互作用而偶联并预形成，包含单克隆抗体，所述单克隆抗体与链霉亲和素或亲和素结合，所述链霉亲和素或亲和素与具有生物素标记的蛋白质或核酸共轭结合。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物，其中所述的单克隆抗体与选自以下的抗原特异性结合：表皮生长因子受体、c-erbB2 抗原、Lewis Y 抗原、运铁蛋白受体、MDR1、MDR3、胰岛素受体、CD45、CD33、GP240、GD2、GD3、成纤维细胞生长因子受体、血小板衍生生长因子受体。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物，其中所述的蛋白质选自白树毒素、蓖麻毒蛋白、皂草素、红豆毒蛋白、白喉毒素、假单孢菌外毒素、rayalase、超氧化物歧化酶、酪氨酸蛋白磷酸酶、蛋白磷酸酶 PP－1 或 PP－2、蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物，其特征在于，其中所述的核酸选自三股螺旋形成的寡聚核苷酸和反义寡聚核苷酸。

5. 一种将蛋白质或核酸导入细胞的方法，包括在体外将权利要求 1 所述免疫共轭物导入细胞。

作为蛋白质或核酸的输送载体的免疫共轭物

发明背景

发明领域

本发明主要涉及分子生物学和治疗学领域。具体地说，本发明涉及一种用于向细胞送递遗传信息的新的非病毒载体。

现有技术

目前，用于送递能够影响哺乳动物细胞分子特性的遗传物质的最常用机制是使用病毒，尤其是反转录病毒载体。但是，这种基因疗法或送递方式受到某些缺陷和潜在危险情况的影响。虽然反转录病毒已经比较常用，但现在正在对腺病毒进行研究，这两者都具有一定的潜力。不幸的是，病毒载体有许多缺点。首先，靶细胞如人细胞，必须能够通过表达一种特定的细胞表面成份与病毒相互作用，而这种特定成份在遗传信息送递的目标细胞或组织上可能不表达。其次，遗传物质必须在靶细胞如人细胞中整合和表达，这要求靶细胞正在活跃分裂，这种情况阻碍了送递系统的效率和均一性。即使整合成功，基因也可能不被宿主细胞内的机制所转录。第三，这种系统中允许的遗传信息大小是有限制的，必须进行极精确的设计以保证生物活性。第四，在基因疗法应用中必须使用复制缺陷型病毒以减少其与内源病毒重组成新的感染原的危险。复制缺陷型病毒可以减少但不能杜绝这种危险。第五，复制缺陷型病毒被设计成是非自动迁移的，所以需要重复注射来获取基因序列向全部细胞的成功送递。

现有技术的缺陷在于缺乏非病毒载体。本发明满足本领域长期以来的这一需求与愿望。

发明概述

本发明特别提供了一种新的非病毒系统，用于送递能够改变有害或非期望表型特征的遗传物质。

这样，在本发明的某实施例中提供了一种具有细胞结合组分的非病毒载体，该组分具有与生物素标记的成分共轭的生物素结合因子。

在本发明的另一实施例中提供了一种将遗传物质导入特定细胞的方法，它包括给人施用非病毒载体，其中所述的非病毒载体包含具有与生物素标记的成分共轭的生物素结合因子的细胞结合组分。

在本发明的另一实施例中，还提供了一种向细胞送递细胞毒成分的方法，包括给人施用非病毒载体。

通过以下为揭示本发明内容而给出的对本发明优选实施例的说明，将会发现本发明的其它内容、特点和优点。

附图简述

以下附图是为了说明本发明各方面的内容。为此目的，有些图是示意形式的，没有必要按比例绘制。

图 1 显示的是在 G－25 柱上从 A108/SPDP 中分离游离的 SPDP。

图 2 显示的是在 G－25 柱上从亲和素/2－IT 中分离游离的 2－IT。

图 3 显示的是在 S－200 柱(FPLC)上从 A108－亲和素共轭物中分离游离的亲和素。

图 4 显示的是在 Con－A 柱上从 A108－亲和素共轭物中分离游离的抗体。

图 5 显示的是显示 A108－亲和素共轭物纯化步骤的 7.5%SDS－PAGE 小凝胶。

图 6 显示的是生物素标记的白树毒素分析中的结合活性。

图 7 显示的是 G－75 柱上(FPLC)A108－亲和素白树毒素/生物素共轭物和游离的亲和素白树毒素与部分亲和素亚基分离的情况。

图 8 显示的是对生物素标记的白树毒素和对 A108－亲和素生物素标记的白树毒素共轭物的 Elisa 结合活性分析。

图 9 显示的是与 A108－亲和素生物素标记的白树毒素共轭物相比，A108－白树毒素共轭物对 A431 细胞的细胞毒性。

图 10 显示的是将细胞与定向针对 EGF 受体基因启动子序列的核苷酸序列(标记为反义 EGFr)培养的结果。

详细说明

本发明提供了一种非病毒载体，它包含细胞结合组分，该组份具有与生物素标记的成分共轭的生物素结合因子。

一般说来，本发明的生物素结合因子是可与生物素结合并易于被本领域一般技术人员识别的任何化学物质。较好的是，生物素结合因子选自亲和素，链霉亲和素或它们的类似物。

本发明的细胞结合因子可以是几种实施例中的一种。例如，细胞结合因子可以是单克隆抗体。用于本发明组合物和方法中的单克隆抗体与某抗原特异性地结合。与抗体结合的抗原的代表性实例有表皮生长因子受体、c－erbB2 抗原、

Lewis Y 抗原、运铁蛋白受体、MDR1、MDR3、胰岛素受体、CD45、CD33、GP240、GD2、GD3、成纤维细胞生长因子受体、血小板衍生生长因子受体。

或者，细胞结合因子是一种配体，与一种细胞表面受体特异性结合。结合细胞表面受体的配体的代表性实例有转化生长因子－α、heregulin、成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子受体。

一般来说，生物素标记的成分可以是能够适当地被生物素标记的任何化合物，而且是人们期望的特异性地导入细胞以产生特定生物学或药理学作用的化学物质。因此，生物素标记的成分可以是某种蛋白质或核酸。

用于本发明组合物和方法中的蛋白质的代表性实例有白树毒素、蓖麻毒蛋白、皂草素、红豆毒蛋白、白喉毒素、假单孢菌外毒素、rayalase、超氧化物歧化酶、酪氨酸蛋白磷酸酶、蛋白磷酸酶(PP－1 或 PP－2)、蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C。

核酸的代表性实例有三股螺旋寡聚核苷酸如三螺旋 EGF 受体寡聚核苷酸、反义寡聚核苷酸如 EGF 或 myc 的、部分基因序列如编码有几个结构域蛋白质(如 c－src 或 EGF 受体)的单个结构域的序列以及完整基因即取自反转录病毒基因组的一个整合单元。

本发明还提供了一种将遗传物质导入特定细胞的方法，包括给人施用非病毒载体，其中所述的非病毒载体包含细胞结合组分，该组份具有与生物素标记的成分共轭的生物素结合因子。

本发明还提供了一种向细胞送递细胞毒成分的方法，包括给人施用非病毒载体。

本发明涉及组合物和方法，它们允许不使用病毒感染或转染成份而将核酸导入特定的细胞集合。定向针对某种细胞表面成份的单克隆抗体被修饰并用于向胞内携带核酸，该核酸能够改变基因的表达、特异性地提高或降低靶细胞内被表达的蛋白质的水平。本发明可应用于人体的反义核酸技术中。用生物素结合成分与核酸序列修饰定向针对细胞表面成份的单克隆抗体，该核酸与基因组 DNA 或 mRNA 结合从而改变基因表达，并使用核酸序列的生物素标记的衍生物通过亲和素：生物素相互作用进行连接。通过抗体：抗原复合物的内化作用，活性核酸序列被同时内化，提高了这些序列在细胞内的浓度。本发明的用途在于：(1)利用不同于病毒载体相关机制的或不同于通过细胞膜的简单或帮助扩散的机制来提高基因表达调控的核酸序列的胞内浓度；(2)因为不需要以通过细胞膜的简单扩散作为这些序列进入细胞的机制，克服了小分子(即活性核酸序列(一20－聚体))的限制；(3)通过抗体：抗原相互作用而不是通过通用的送递或病毒

感染来特异性地或选择性地送递目标序列，从而提高有效核酸序列的胞内浓度。

在本发明的一个实施例中，合成一段针对致癌蛋白质的反义 DNA，其横跨 mRNA 转译起始密码子的上游和下游的多个核苷酸(10)。然后，合成一段与以上合成的反义 DNA 的头 5 个核苷酸互补的 DNA。然后，将生物素一核苷酸成分掺入该序列中。将两链杂交，然后通过肿瘤定向的 MAb 亲和素/链霉亲和素使之送递入肿瘤。

以下实施例只是为了说明本发明的各种实施方法，并不以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1

抗体 A108 的修饰

A108 识别人表皮生长因子受体。在一支 12×75mm 玻璃试管中加入 10mg 溶于 2.2ml 磷酸盐缓冲液中的 A108。取 9.35μl 抗体和 2.5 倍摩尔数过量的 SPDP(3—(2—吡啶基二硫)丙酸 N—琥珀酰亚胺酯)缓慢加入试管，同时涡流搅拌，SPDP 取自 3mg/ml 的二甲基甲酰胺溶液。室温下培养 30 分钟，期间每 5 分钟涡流搅拌一次。

在 Sephadex G—25 柱(1.5×37cm)上利用凝胶过滤色谱去除未反应的过量 SPDP，柱预平衡在含 0.5mM EDTA 的 100mM 磷酸钠缓冲液(pH7.0)中。在缓冲液洗脱过程中，在 Gilson 组份收集器上收集每份 1ml 的洗脱液。在 96 孔微量滴定板(Falxon)上利用 Bradford 染料结合测定分析洗脱液中的蛋白质浓度。每孔含 120μl PBS、40μl 染料浓缩物和 40μl 样品。在 BioTek 微量滴定板自动读数仪上在 540nm 处读取吸光度。将第 30—38 份洗脱液混合并保存于 4℃。

图 1 显示 SPDP 通过共价偶联与抗 EGFr 抗体(A108)的加成。利用 SPDP，通过赖氨酸和 N 末端氨基酸修饰作用来修饰 A108。通过凝胶过滤将未反应物质与高分子量 A108 分离。图 1 显示了 SPDP—修饰的 A108 的洗脱情况。图 1 表示，在与 SPDP 共轭后回收到被修饰的 A108。

实施例 2

亲和素一蛋白的修饰

向溶于 2.5ml 双蒸水(ddH_2O)中的 10mg 亲和素中加入 300μl0.5mM TEA/HCl 和 28μl 0.1mM EDTA 储备液，将其稀释成含 60mM TEA/HCl(三乙胺，pH8.0)和 1mM EDTA。最终体积 2.8ml。然后加入 17μl2—亚氨基—thiolane(2—IT) TEA/HCl(pH8.0)使其终浓为 3mM。将样品在氮气流下 4℃孵育 90 分钟。用 G—25Sephadex 柱(1.5×38cm)(Pharmacia)凝胶过滤色谱去除未

反应的过量 2－IT，柱被预平衡在含 50mM NaCl 和 1mM EDTA 的 5mM 双 tris/乙酸缓冲液(pH5.8)中。利用 Bradford 染料结合测定确定洗脱组份中的蛋白质浓度。在 BioTek 微量滴定板自动读数仪上在 540nm 处读取吸光度。混合第 27—38 份(每份 1ml)。如图 2 所示，利用凝胶过滤回收修饰的带 2－亚氨基 thiolane 的亲和素。

实施例 3

抗体 A108 与亲和素的共轭

修饰的抗体和修饰的亲和素组份在氮气流下 4℃共孵育 20 小时(总体积为 15.5ml)。加入 0.1M 碘乙酰胺溶液(0.310ml)至终浓度 2mM 以封闭所有残留的游离巯基，然后在室温下继续孵育 1 小时。SPDP 修饰的 A108 和 2－亚氨基 thiolane 修饰的亲和素被共孵育，使得 A108 通过 SPDP：2－亚氨基 thiolane 的化学作用产生巯基连接而与亲和素共价结合。

通过凝胶过滤将由 A108－亲和素构成的免疫共轭物(在图 3 中以共轭物标出)与未反应的亲和素分离。洗脱组份 7 至 9 的蛋白质峰代表未修饰的 A108 和 A108－亲和素，它们被回收并进一步纯化。

实施例 4

共轭物的纯化

利用 Pharmacia FPLC Superdex S－200 柱(2.6×60cm)上的凝胶过滤从反应混合物中去除非共轭的亲和素，柱用 20mM Tris 和 150mm NaCl(pH7.4)预平衡。(图 3)

抗体－亲和素共轭物和游离的抗体组份(6－10)被混合并在 4℃对 PBS 透析过夜(Spectra/Par 分子多孔膜管#2，MWCO 12,000－14,000)。利用伴刀豆球蛋白 A(载体)琼脂糖结合亲合性从混合物中去除游离抗体。柱(1.5cm×7cm)用 PBS(20mM Na－K－磷酸盐，150mM NaCl，pH7.0)预平衡。样品上样后，用 40ml 含 1M NaCl(pH7.0)的 PBS 洗涤一次，用含 200mM 甲基－D－甘露糖的 PBS(pH7.0)洗脱共轭物(洗脱组份 34－38)(每份 2ml)。在 Varian 分光光度计上在 280nm 处测定洗脱组份中的蛋白质浓度。

通过与亲和素上糖基成分的结合，A108－亲和素由于留在植物凝集素伴刀豆蛋白 A(Con A)(可与存在于亲和素中的 α－甲基甘露糖苷结合)固定载体上而与 A108 分离。游离抗体没有 α－甲基甘露糖苷，所以从 Con A 柱中被洗去(在图 4 中表示为游离抗体)。用含有 α－甲基甘露糖苷的溶液洗脱，A108－亲和素(标记为共轭物)从 Con A-Sepharose 柱中被置换出来。由此步骤来回收共轭

物，其中不含未修饰的A108。

利用十二烷基磺酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)来鉴定A108－亲和素共轭物的纯度，该实验根据分子大小来分离蛋白质。进行一次7.5%的丙烯酰胺SDS－PAGE小凝胶电泳来检查共轭物纯化步骤。如图5所示，在聚丙烯酰胺凝胶中用考马斯亮蓝染色并脱色消除背景色后，可以看见并分辨出代表A108、亲和素或A108亲和素共轭物的蛋白质。加在泳道7中的样品(从Con A柱上洗脱)代表用于以后研究的纯免疫共轭物(A108－亲和素)。

可以利用只有在被内化进入细胞后才有毒性的生物素标记的蛋白(如植物蛋白、白树毒素)来表明A108－亲和素与生物素结合并被内化进入真核细胞的能力。用生物素化学修饰(利用白树毒素上的赖氨酸残基与NHS－生物素间的共价结合)纯化的白树毒素蛋白，并利用凝胶过滤与未结合的生物素分离。

实施例5

白树毒素的生物素标记

所用的生物素的形式是N－羟基琥珀酰亚胺酯长链(NHS－LC)生物素(Pierce Chemical Co.)。使用比白树毒素过量5倍摩尔的生物素(即0.1mg生物素对1mg白树毒素)。白树毒素储备液为2mg白树毒素溶于2ml 50mM碳酸氢盐缓冲液(pH8.5)中。取5mg生物素溶于500μl无水二甲基甲酰胺(DMF)中，立刻取20μl(2mg)该生物素溶液加入装在干净、干燥、13×100mm玻璃管中的白树毒素中。涡流搅拌样品，在冰上孵育2小时。2小时后，利用1.5cm×37cm G－25柱上的凝胶过滤色谱分离游离生物素，柱用PBS(pH7.0)平衡。将每份1ml组份收集在Gilson组份收集器中，用Bradford染料结合测定分析蛋白质浓度。将第21－27的组份混合。

为了证明生物素已掺入白树毒素，将生物素标记的白树毒素固定在带有定向针对白树毒素蛋白的抗体的聚苯乙烯载体上。将已知量非修饰的白树毒素或生物素标记的白树毒素在含抗白树毒素抗体的孔中孵育。漂洗并在孔中加入链霉亲和素来检测白树毒素结合的生物素的滞留，链霉亲和素与辣根过氧化物酶化学结合，当与无色的过氧化物酶底物(ABTS)一起培养时会变成绿色，可以用分光光度计在405nm波长检测。405nm处的吸光度正比于掺入白树毒素分子的生物素的量。如图6所示，随加入测定的生物素标记的白树毒素的增加，绿色加深，据此认为被生物素标记的白树毒素的确保留生物素。结果证明，生物素能够掺入白树毒素分子，并被与生物素具有亲合性的蛋白质识别。

实施例6

生物素标记的白树毒素的活性

将 0.583mg/ml 鼠的抗白树毒素单克隆抗体储备液(10Ci)(10μl)稀释在 12ml 涂布缓冲液(50mM $NHCO_3$(碳酸氢钠,pH9.6),1μg/ml)中。用多道移液器,将Falcon96 孔微量滴定板上的每孔用 50μl(50ng/格)涂布。覆盖样品并冷冻过夜。约 12 小时后,样品用 PBS－0.05%Tween20 漂洗三次,并用 5%溶于 PBS 的牛血清白蛋白在室温下封闭 1.5 小时。然后用 PBS 和 0.05%Tween20 漂洗三次。

制备浓度为 2mg/ml 的白树毒素 PBS 溶液。接着,再制备生物素标记的白树毒素的 PBS 溶液,浓度也是 2mg/ml。在试验板上加 100μl BSA 在 PBS 中的 1mg/ml 溶液,第一列留空。该列的一半按 200μl/格加白树毒素储备液,另一半按 200μl/格加生物素标记的储备液。利用多道移液器,从此首列吸取 100 μl 与第二列中的 100 μl BSA－ PBS 混合。沿试验板从左至右重复这一步骤,由此连续稀释蛋白质。将试验板覆盖后在室温下孵育 1.5 小时。试验板上的每孔用 PBS －0.05%Tween20 漂洗三次。然后加入 100μl 按 1:6000 稀释在 1mg/ml BSA－PBS 中的亲和素辣根过氧化物酶(Boehinger-Mannbeim)。将试验板在室温下孵育 1.5 小时,再用 PBS－0.05% Tween 20 漂洗三次。最后,加入 100μlABTS(2,2^1 氨基－二(3－乙基苯噻唑啉－6－磺酸))氢过氧化物。试验板在 BioTek 实验室微量滴定板自动读数仪上在 405nm 处读数。(图 6B)

实施例 7

生物素标记的白树毒素与 A108－亲和素的共轭

使用比 A10－亲和素过量 5 摩尔的生物素标记的白树毒素。取 1ml(250μg) A108－亲和素与 175μl(175μg)生物素标记的白树毒素混合。涡流搅拌样品并在室温下孵育 1 小时。

为了从混合物中去除未共轭的白树毒素,将混合物上样在 Pharmacia FPLC G－75(1.6×60cm) 凝胶过滤柱上,柱被预平衡在含 0.5M NaCl 的 20mM Tris 中(pH7.4)。收集每份 1ml 组份,在 Varian 分光光度计上在 208nm 处读数。图 7 中显示出了代表标记为共轭物的 A108－亲和素生物素标记的白树毒素的洗脱峰,其中不含未结合的白树毒素和游离亲和素亚基。

利用上述用于鉴定生物素标记的白树毒素的 Elisa 测定鉴定 A108－亲和素与生物素标记的白树毒素的共轭物。如图 8 所示,当测定中测到生物素标记的白树毒素或生物素标记的白树毒素:亲和素－A108 时,都可能通过绿色的形成检测到含有生物素。这样,共轭物中实际上包含了生物素标记的白树毒素。

实施例 8

A108—亲和素/生物素标记的白树毒素对 a431 细胞的细胞毒性

将 A431 细胞在生长培养基(MEM—极限必需培养基)中稀释成 3×10^4 细胞/ml,培养基中含非必需氨基酸,含 100mM 谷氨酰胺、50μl 庆大霉素(Tri—Bio Laboratories)、5%胎牛血清和 5%小牛血清。在 96 孔微量滴定板(Falcon)的每孔中加 100μl 该溶液,在 5%CO_2 培养箱中 37℃培养过夜。第二天,制备生长培养基中含 2μg/ml A 108—白树毒素共轭物的溶液(通过相同于制备 A108—亲和素的化学反应,SPDP 修饰的 A108 与 2—IT 修饰的白树毒素共价连接而成的直接共轭物),用 0.22 微米 Acrodisc(Gilman)注射器过滤器过滤除菌,连续稀释在 10 支 15ml 离心试管(Corning)中。以同样的方法制备 A108—亲和素:生物素标记的白树毒素,每种稀释液取 100μl 加在试验板上的三孔中。由于试验板上已经加有 100μl 培养基,所以每种共轭物的终浓度为 1μg/ml。作为对照,以同样方法制备两种共轭物但各加入 100 倍摩尔过量(100μg/ml)的抗体 A108。细胞培养 3 天,然后用结晶紫在 20%甲醇中形成的 0.5%溶液染色,用蒸馏水漂洗,加入 150μl Sorenson's 缓冲液从细胞中抽提出染料。在微量滴定板自动读数仪上在 540 处读数。图 9 显示了共轭物将白树毒素向细胞内转移的能力,在细胞中它可诱导细胞毒性。将共轭物与能在细胞表面表达 EGF 受体的细胞(A431)一起培养。共轭物的内化作用允许白树毒素的胞内作用即细胞毒性的产生。如图 9 所示,当共轭物与这些细胞一起培养时,纳摩尔浓度(mM)(1×10^{-6})就可杀死 A431 细胞,这表明 A108—亲和素允许生物素标记的白树毒素进入 A431 细胞(空心圆)。当细胞与大量过量(与免疫共轭物浓度相比)的游离 A108 抗体共培养时,A108—亲和素:生物素标记的白树毒素进入 A431 细胞的能力被抑制。游离的 A108 与所有可及的细胞表面 EGF 受体结合,由此抑制免疫共轭物与 EGF 受体的结合并将白树毒素导入 A431 细胞内。如图 9 所示,当 A108 比免疫共轭物浓度过量 100 倍时(实心圆),A431 细胞能够存活,这表明免疫共轭物进入并杀死细胞的唯一途径是通过它与 EGF 受体结合并被内化的能力。A108—白树毒素直接共价共轭物也可以通过将白树毒素导入 A431 细胞内而有效地将其杀死(空心三角)。在直接共价共轭物中加有过量 100 倍摩尔的游离 A108 也可以保护细胞免受白树毒素的细胞毒性,这表明 A108—白树毒素是靠其与 EGF 受体作用并被内化的能力来进入细胞的。这样,如果利用能够识别细胞表面某抗原的抗体来携带,抗体在与抗原(在此是 EGF 受体)结合后被内化,利用亲和素:生物素相互作用就可以将某种分子导入细胞内部。

实施例 9

核酸序列三股螺旋体对 EGF 受体蛋白表达的作用

本发明证明了三股螺旋形成的寡聚核苷酸或核酸序列抑制 EGF 受体蛋白在完整细胞中表达的能力。将 A431 细胞与 40μM EGF 受体基因核酸序列(#5 EGFr)一起培养 72 小时,该序列能够与 EGF 受体基因启动子区或一段无义调控序列结合(含有相同的核酸但序列是随机的)。

通过加热至 95℃2 至 5 分钟,在培养基中制备#5 EGFr 和调控核酸序列。从含有 2×10^5 个 A431 细胞的细胞培养皿中去除生长培养基。将#5EGFr 在 2ml 培养基中稀释成终浓度为 40μM,将其加入一培养皿中。将调控序列在 2ml 培养基中稀释成终浓度为 40μM,将其加入另一 A431 细胞培养皿中。第三个培养皿中只加 2ml 培养基。培养 72 小时。用冰冷的 PBS 洗涤每个培养皿三次,由此收获细胞。为了溶解细胞并抽提蛋白质,加入 1ml RIPA 缓冲液,用细胞刮片刮下细胞并转移到离心试管中。每支试管用 Kontes 细胞破裂器超声处理,在 Sorvall 超速离心机上在 4℃,100,000×g 离心 1 小时。离心后,取出上清液,利用 BCA 蛋白质分析(Pierce)测定蛋白质含量。

用 A108 抗体和不溶性抗体结合试剂 pansorbin 免疫沉淀这些抽提物中的 EGF 受体。含 200μg 蛋白质的上清液与 2.5μg A108 抗体在 4℃培养 2 小时。每份样品中加 50μl Pansorbin,涡流搅拌并在 4℃培养 30 分钟。洗涤与 A108—Pansorbin 结合的受体以去除其它蛋白质。在 Sorvall 微型离心机上以 12,000rpm 转速离心 1 分钟(4℃)后,倾析出上清液。沉淀的洗涤是三次用含 0.1% Triton 的 PBS 重悬并离心,并且在每次重悬后离心重新沉淀。最后一次洗涤并离心后,将上清液倒去。

将免疫沉淀与放射性(^{32}P)标记的 ATP 共培养来检测其中的 EGF 受体。将沉淀重悬在 25μl 含 0.4mM 钒酸钠的 20mM Hepes 缓冲液中(pH7.4)。接着,加入含^{32}P 标记的 ATP(10Ci)和 12mM $MnCl_2$ 的 20mM Hepes 缓冲液。样品在室温下孵育 5 分钟。由于 EGF 受体具有将^{32}P 从 ATP 转移至其自身的酶活性,所以转移到 EGF 受体的^{32}P 的量就成为各份裂解物的免疫沉淀中 EGF 受体含量的尺度。利用 SDS—PAGE 将 EGF 受体与游离的^{32}P 标记的 ATP 分离,使用购得的 X 光片,通过聚丙烯酰胺凝胶的自显影术测定 EGF 受体的放射性,由此可以比较 EGF 受体上的放射性量。

在样品中加入 15μl 5x—Laemli 样品缓冲液,样品加热至 95℃5 分钟,然后上样在 7.5%聚丙烯酰胺凝胶上。蛋白质被以 14mA 电流电泳过夜。从电泳槽中

取出凝胶变板 40%的甲醇、10%乙酸、50%ddH$_2$O 中固定 1 小时。凝胶在 Bio Rad583 凝胶干燥器上在 80℃干燥 2 小时。

如在图 10 中所见，将细胞与定向针对 EGF 受体基因启动子序列的核酸(标记为反义 EGFr)共培养，与随机的核酸序列(标记为无义 EGFr)或只加缓冲液比较，使 A431 细胞中 EGF 受体的水平降低 5 倍(标记为对照)。所以，将细胞与高浓度的、能与 EGF 受体基因的启动子区相互作用的三股螺旋形成的核酸共培养，会抑制完整的 A431 细胞中 EGF 受体的表达。

实施例 10

A108:核酸序列通过亲和素:生物素连接被导入 A431 细胞。为了证明核酸序列是定向针对 EGF 受体基因的启动子序列，利用 A108 抗体将其掺入 A431 细胞，制备和纯化 A108—亲和素化学连接共轭物。合成核酸序列，但以一个生物素标记的核苷酸取代序列中某一位置的正常核苷酸(最好在序列的末尾或开头)。将这些序列与 A108—亲和素一起孵育，以形成含 A108—亲和素:生物素—核酸序列的复合物。纯化这些杂交分子以去除游离的核酸序列，测定与 A108—亲和素结合的核酸量，并与 A431 细胞一起培养。如果抑制基因表达的核酸序列进入了正确的 A431 细胞胞内区域，这应该可由生物化学方法测定。核酸序列干扰 EGFr 受体表达的特异性的测定是通过测试反义 EGFr 或无义 EGFr 与 A108—亲和素形成的免疫共轭物和如前文实施例 9 中所述测定 EGF 受体的磷酸化。另外，在含 A431 细胞的培养混合物中加大量摩尔数过量的游离 A108 来测试核酸序列通过形成 A108:EGF 受体复合物来进入细胞的能力。在游离 A108 存在下。抗体:核酸构成的杂交分子的抑制作用被抑制，这证明核酸是随抗体通过与一可内化的细胞表面抗原(如 EGF 受体)结合而内化进入细胞的。

实施例 11

较大的生物素标记的核酸被用于证明它们进入细胞是否是通过 A108—亲和素作用机制的介导。将改变 EGF 受体水平所必需的通过 A108—亲和素作用机制向细胞提呈的核酸序列的浓度与溶液中游离的正常核酸序列相比较。利用不表达该抗原(如 EGF 受体)的细胞来检测 A108—亲和素将活性核酸序列导向特异性抗原表达细胞的能力。在表达该抗原的动物生殖细胞中检测这些核酸向特异性细胞送递的能力。测定 EGF 受体受抑制的情况。使用反义或无义核酸序列与 A108—亲和素的复合物(加入不表达特异性抗原的细胞)作为该送递系统特异性和其胞内生物化学特异性的尺度。

实施例 12

乳腺癌表达抗原 HER2/Neu(如 TAb250)的单克隆抗体如使用 A108 抗体的实施例 1—4 所述与亲和素化学共轭。合成抗原 c—myc 的反义核酸序列(5'—AACGTTGAGGGGCAT—3'),用生物素标记的腺嘌呤核苷酸取代末端 5' 位的腺苷。将生物素标记的腺嘌呤核酸序列与 TAb—250—亲和素一起孵育,纯化由 TAb—250:反义 c—myc 构成的抗体—核酸复合物。将这些复合物与表达 HER2/Heu 的乳腺肿瘤细胞(如 BT—474 细胞)或该抗原阴性的细胞(如 BT—20 细胞)一起培养。利用对提取自原细胞裂解物的 c—myc 蛋白的 Western 印迹分析,测定反义核酸对 c—myc 的抑制。HER2/Neu 阳性细胞中的 c—myc 表达将被改变,但阴性细胞中的不变。另外,如果大量过量(100 倍)的非修饰的 TAb—250 能在抗原阳性细胞中抑制抗体—核酸复合物对 c—myc 的抑制作用,说明抑制作用具有特异性。通过改变生物素标记的核苷酸在序列中的位置,或通过增加与 c—myc mRNA 互补并跨越其上的转译起始位点或第一剪接点的序列的大小来改变生物素标记的核酸序列。测试各种修饰情况,获取可向表达 HER2/Neu 抗原的乳腺癌细胞送递的,抑制 c—myc 表达的最特异、最敏感的反义序列。

实施例 13

单克隆抗体 A108 如实施例 1—4 所述与亲和素化学共轭。化学合成与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)mRNA 转译起始位点互补的反义寡聚核苷酸(5'—GGCTGCCATGGTCCC—3'),用生物素标记的鸟嘌呤取代 5' 端的非修饰核苷酸。将这些序列与 A108—亲和素一起孵育,以形成抗体:核酸复合物,并从未复合的核酸中纯化出来。这些复合物与人神经胶质瘤细胞(SNB—19)一起培养,这些细胞表达 EGF 受体并且严格依赖于细胞自身的 bFGF 合成来促进自身的生长。与这些共轭物一起培养后,测定 SNB 细胞的生长情况,以确定靶细胞中 FGF 表达受阻对生长的抑制程度。如前所述,由过量 A108 与 A108:核酸复合物共培养来评价特异性,并证明反义序列通过抗原内化作用进入细胞的机制。

实施例 14

与几种人癌细胞上的 Lewis Y 抗原特异性结合的单克隆抗体 BR96 如前所述与亲和素化学共轭。化学合成与 c—Ha—ras 5' 侧翼 mRNA 序列互补的反义寡聚核苷酸(5'—CAGCTGCAACCCAGC—3'),用生物素标记的胞嘧啶核苷酸取代 5' 位的非修饰胞嘧啶。通过与 T24 膀胱癌细胞一起培养来形成 BR96—反义 ras 寡聚核苷酸,该细胞表达 Lewis Y 抗原,同时具有 c—Ha—ras 致癌基因。抗体:核酸复合物与 T24 细胞一起培养后,利用 Western 印迹检测 ras 癌基因的

产物 p21。同时检测细胞的生长情况。由此表明由 ras 癌基因通过 Lewis Y 抗原的内化作用向细胞内送递反义分子产生的中和作用。

实施例 15

如前所述合成 A108—亲和素化学共轭物，并用于内化合成的双链 RNA 分子，该分子对特定的癌细胞具有细胞毒性。化学合成肌苷聚合物(PI)(40 聚体)并与聚胞嘧啶(PC)(39 聚体)杂交，后者的一个终端胞嘧啶以生物素衍生。该双链 RNA 分子与 A108—亲和素共培养，纯化出 A108—变和素：生物素—PC:PI 复合物并加入 ME—180 颈癌细胞的生长培养基中，该细胞表达 EGF 受体并具有对 PI:PC(dsRNA)的细胞毒性敏感性。通过在与该结构物培养后检测细胞的存活率来测定 dsRNA 通过 EGF 受体的内化作用向细胞内的送递。由与该共轭物共培养诱导的细胞毒性将表明，核酸可以利用非病毒载体向特定细胞送递。

本说明中提及的所有专利和公开文献都反映了本发明相关领域中熟练技术人员的研究水平。所有的专利和公开文献都作相同程度的引用参考，好比具体、单独表明每篇文献在此引用作为参考。

本领域熟练技术人员很容易理解，本发明很适于实施本发明提及的目的，并获得提及的结果和优点，包括隐含的那些。给出的实施例，连同在此所述的方法、过程、处理方法、分子和具体的化合物代表了优选实施方法，是示范性的，并不是为了限定本发明的范围。本领域熟练技术人员将能够发现其中可能的改变和其它用途，这些都包含在本发明的精神之内，正如权利要求的范围所限定的。

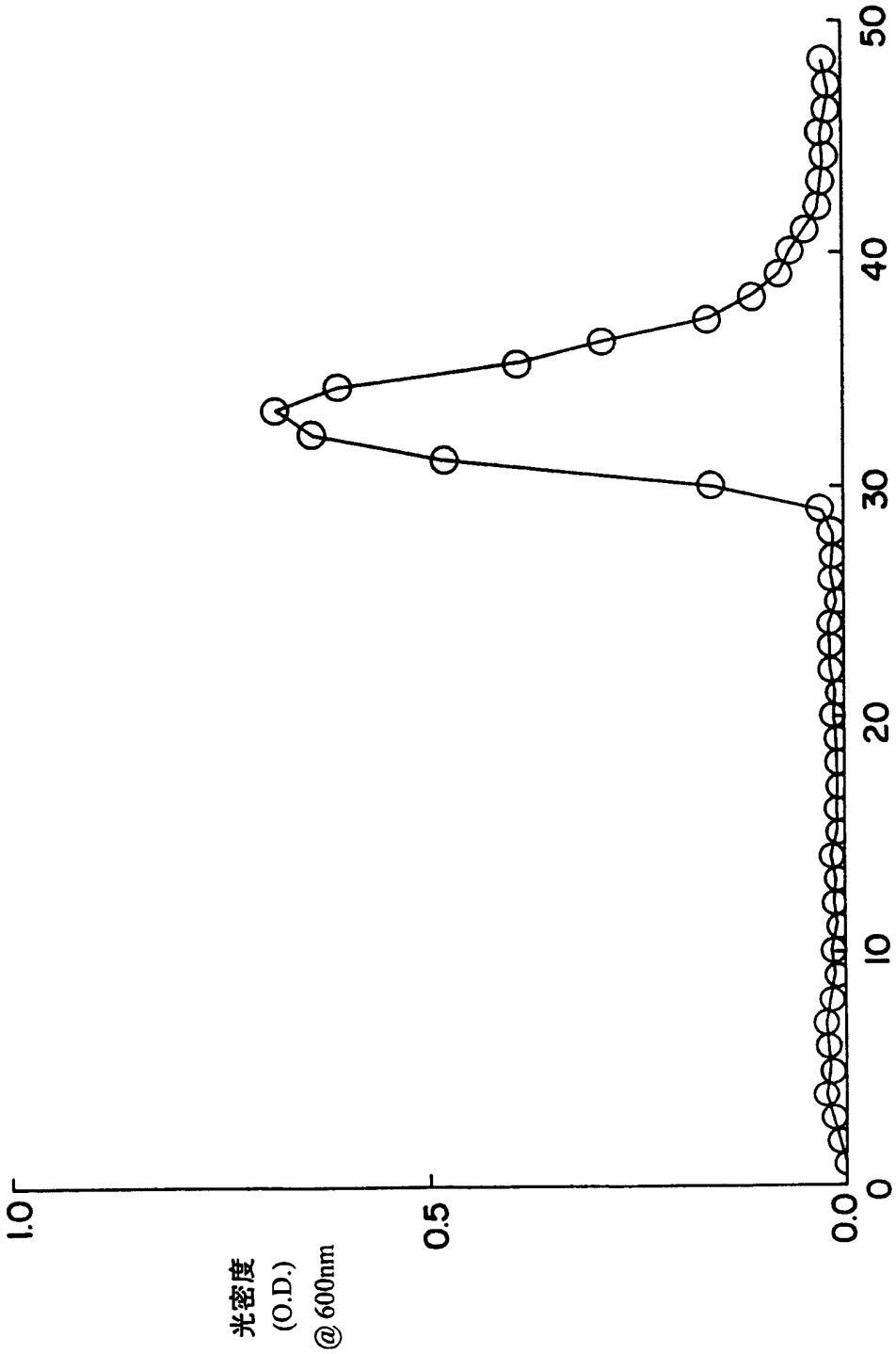

图 1

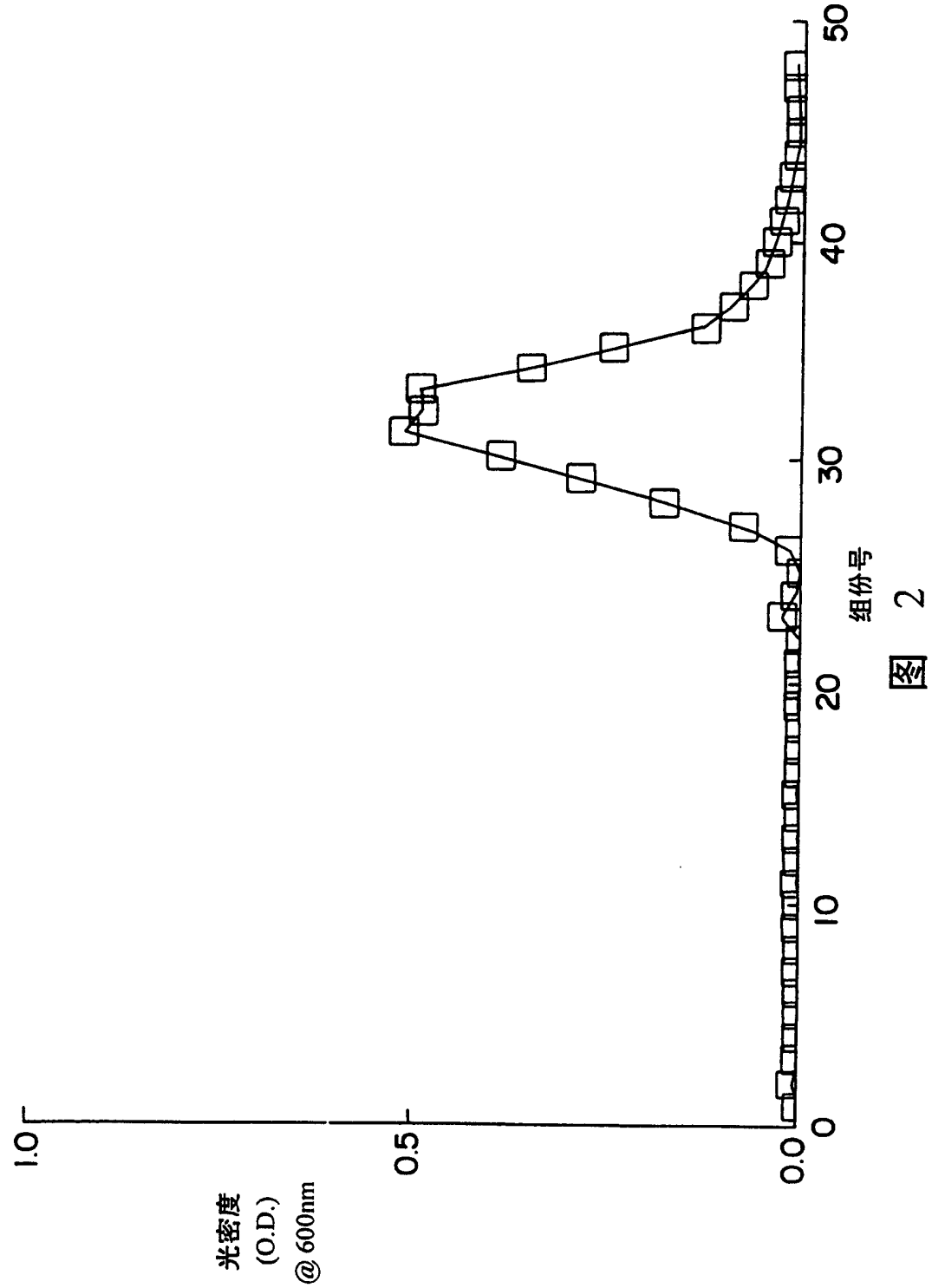

图 2

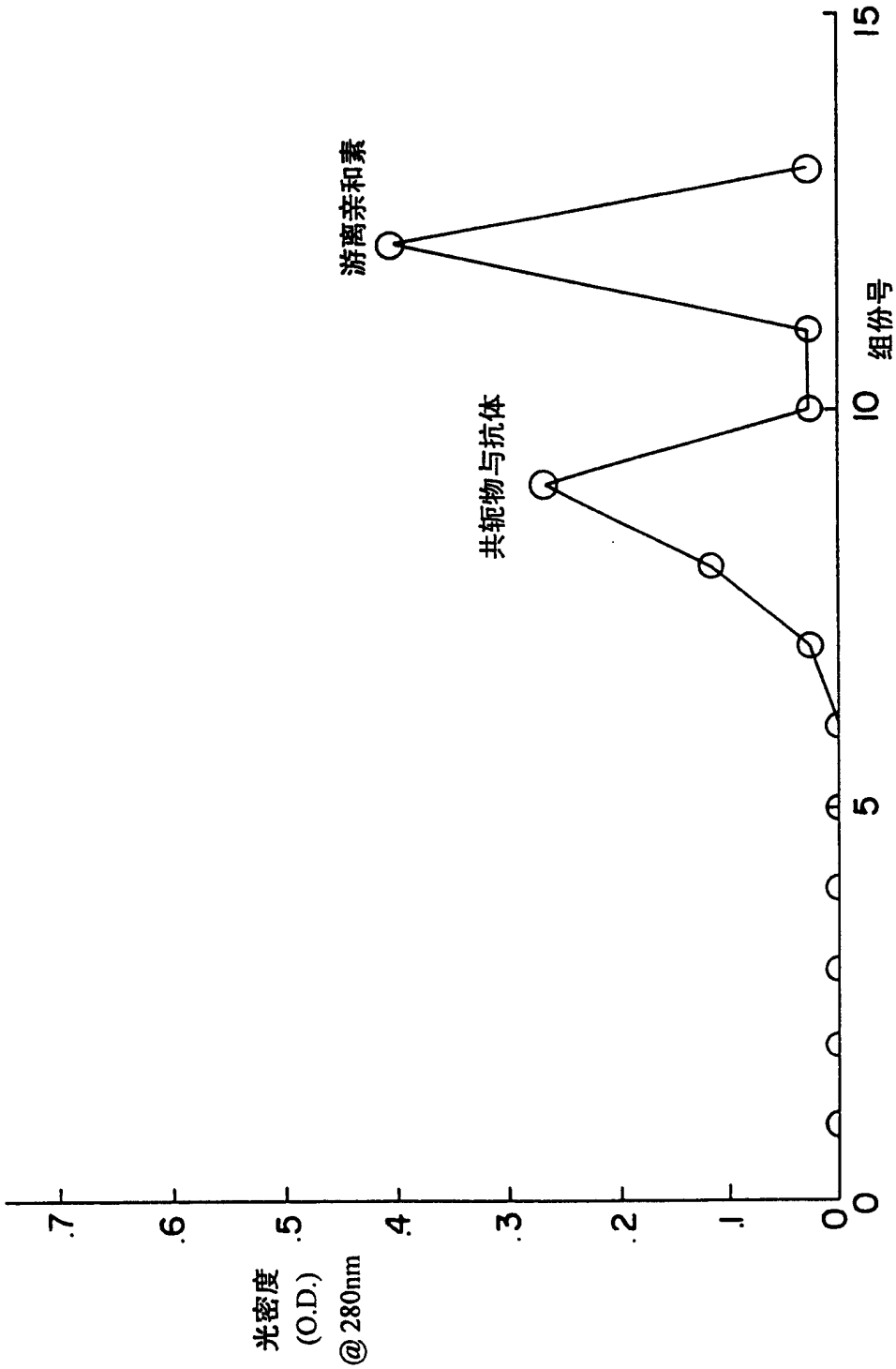

图 3

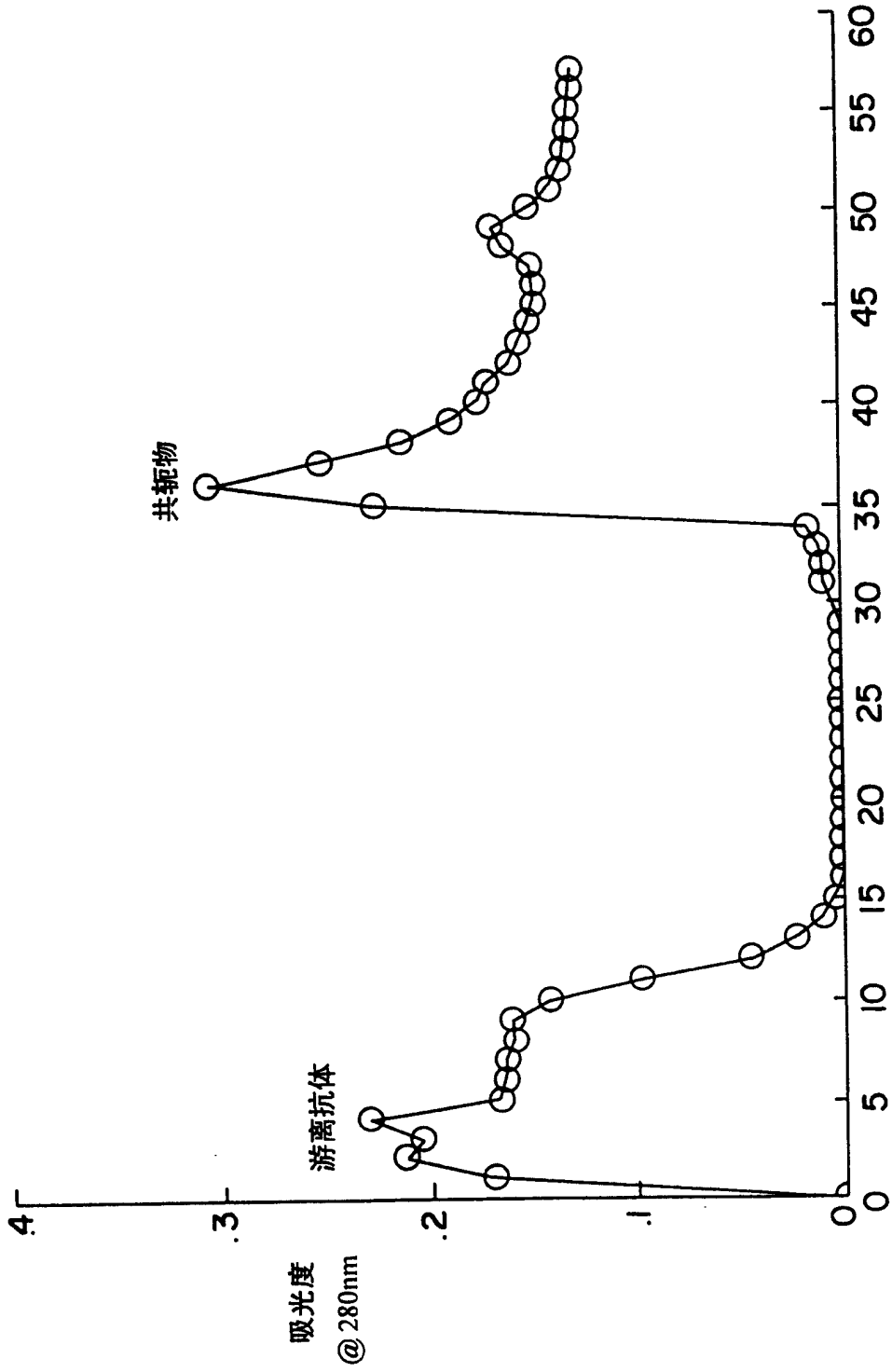

图 4

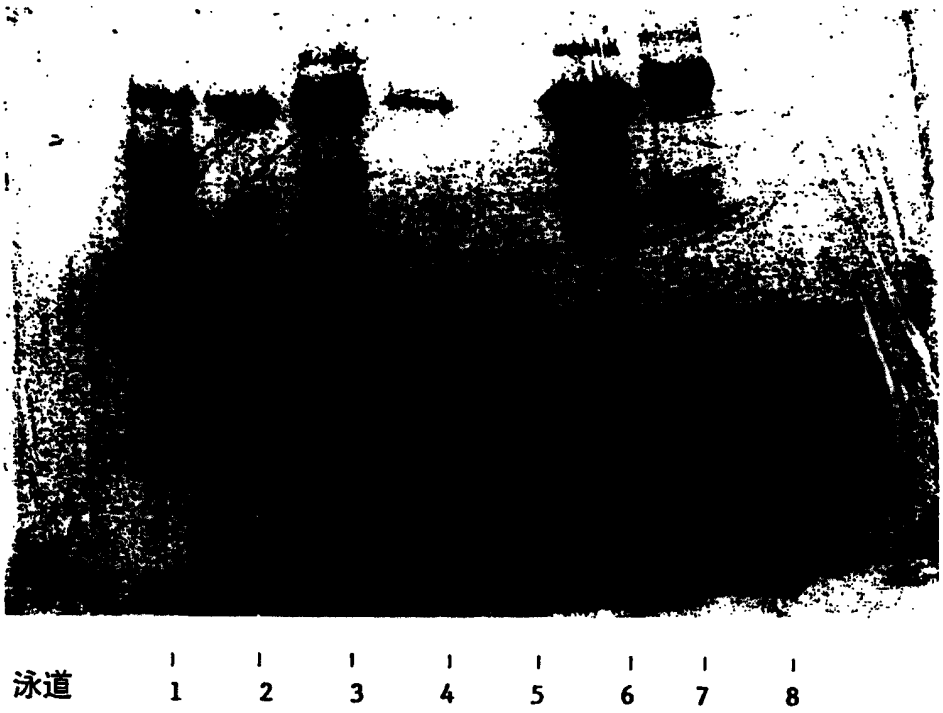

图 5

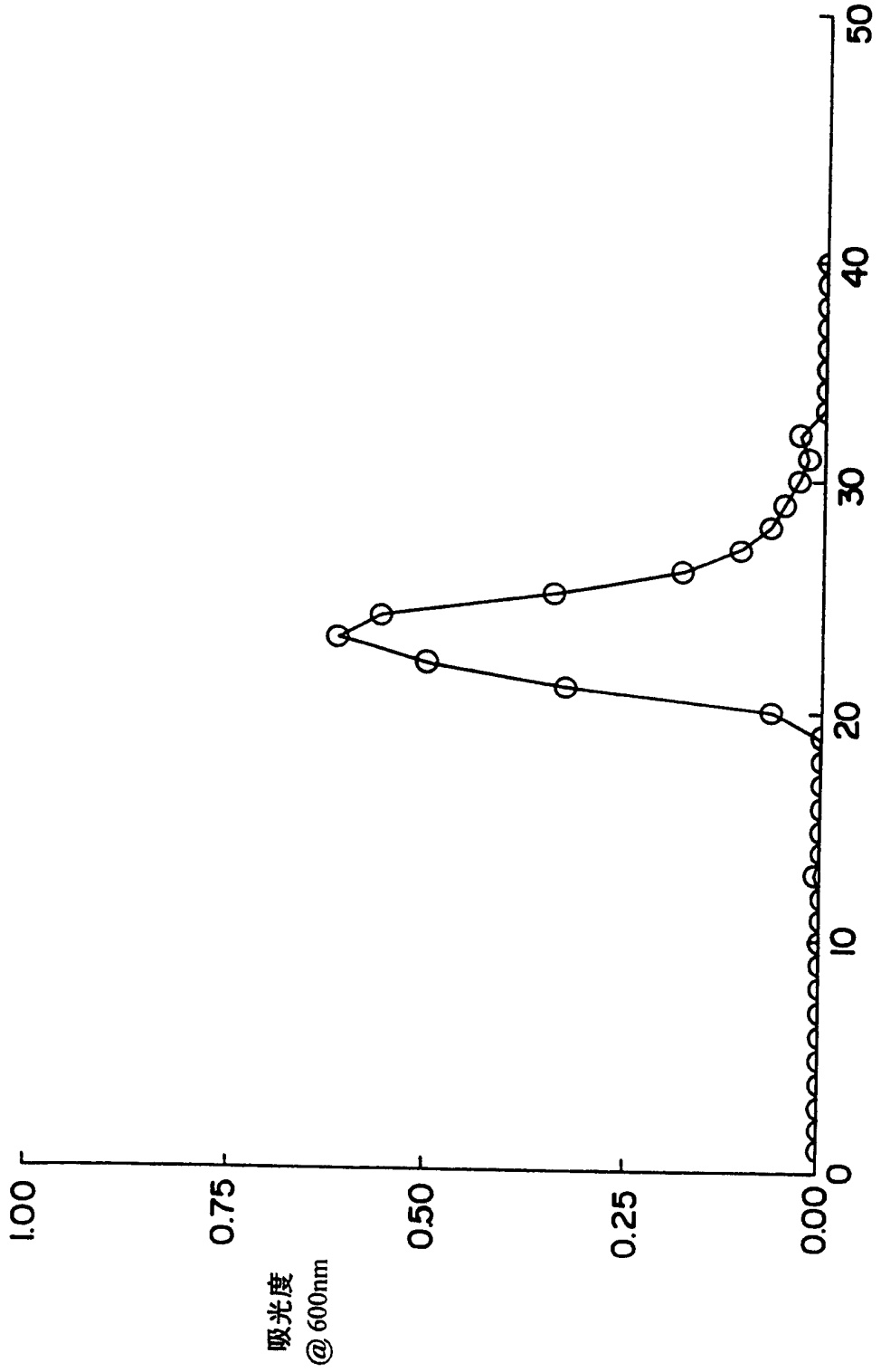

图 6A

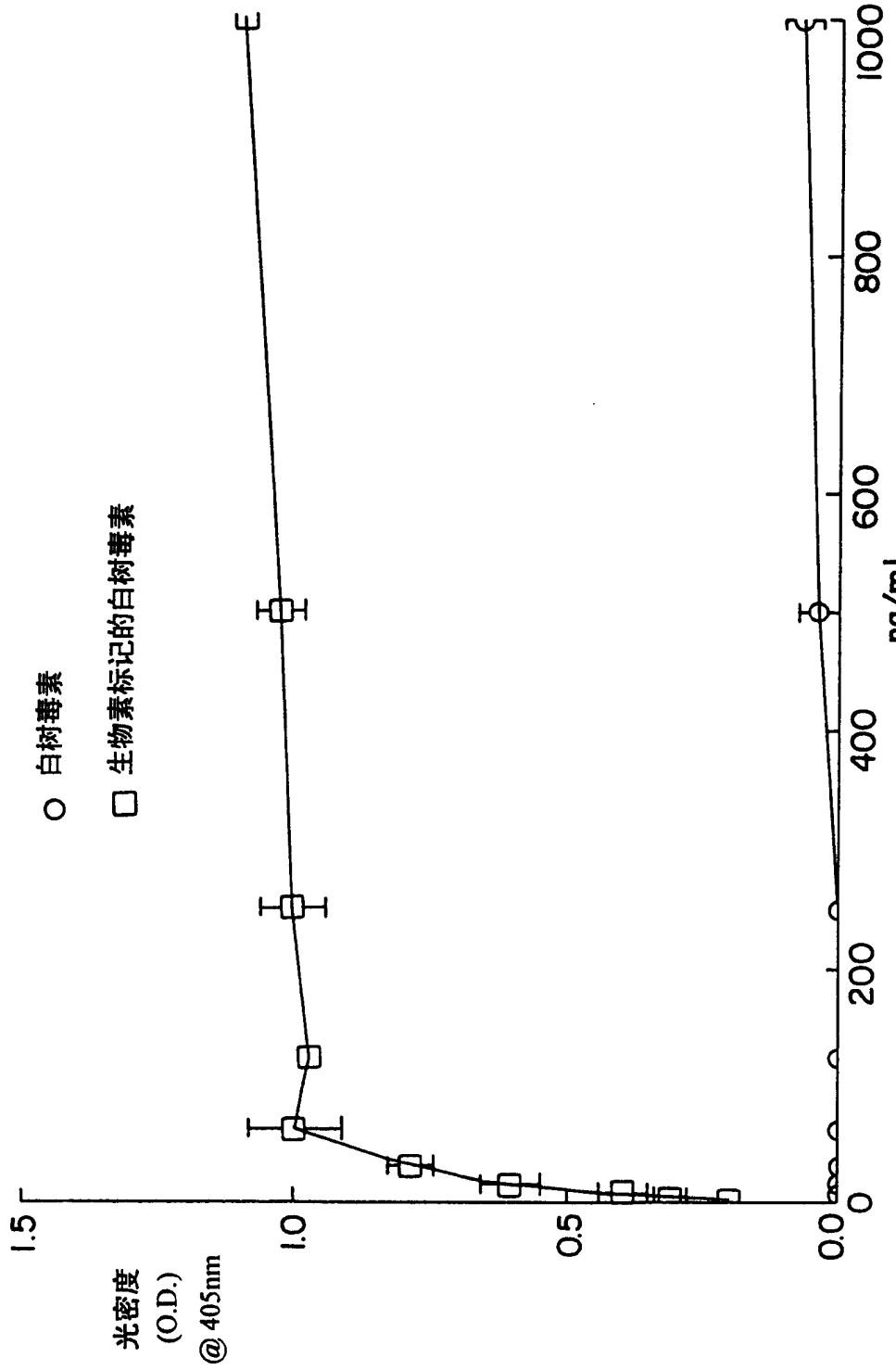
○ 白树毒素
□ 生物素标记的白树毒素
光密度
(O.D.)
@ 405nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0
200
400
600
800
1000
ng/ml

图 6B

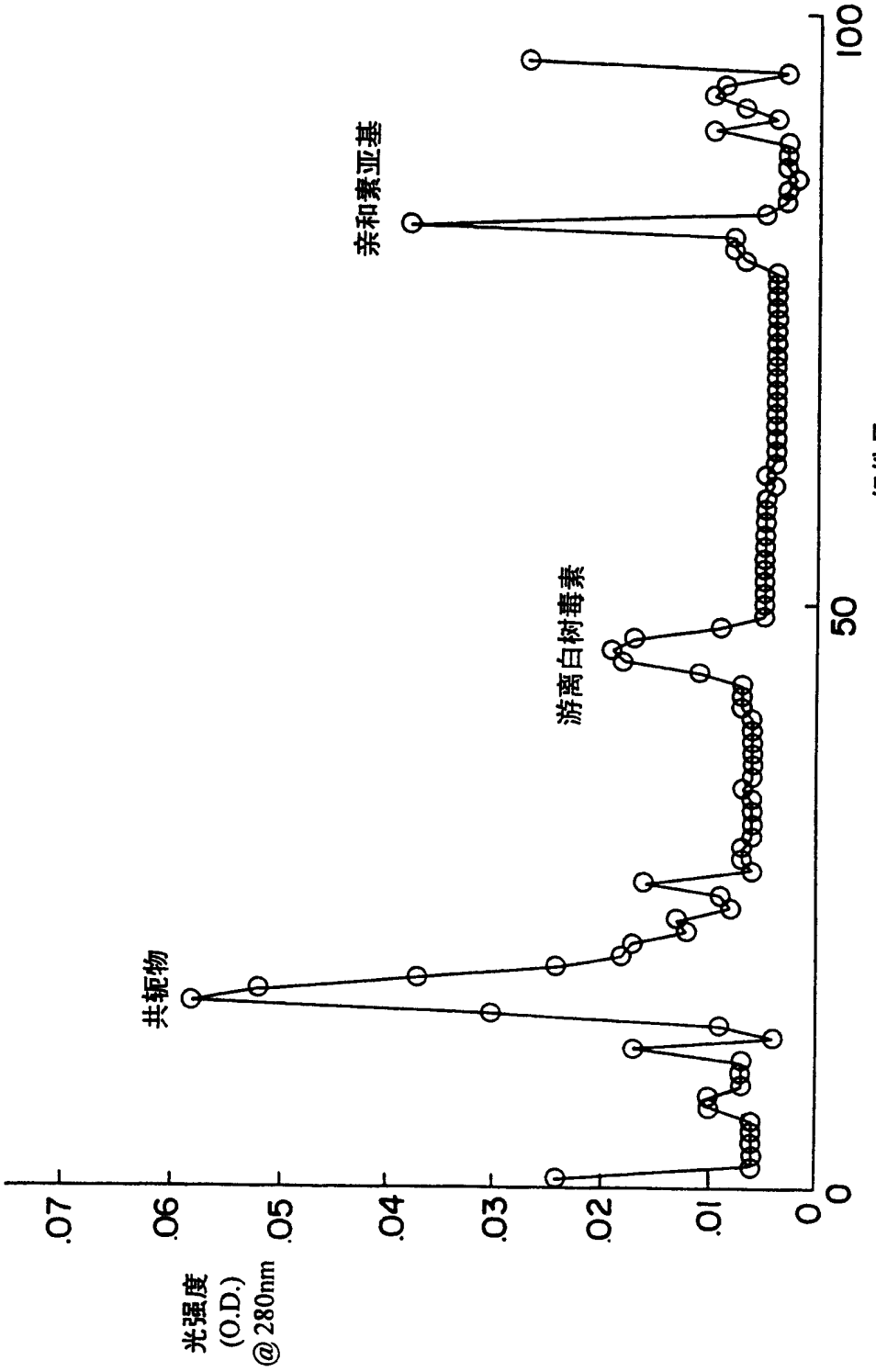

图 7

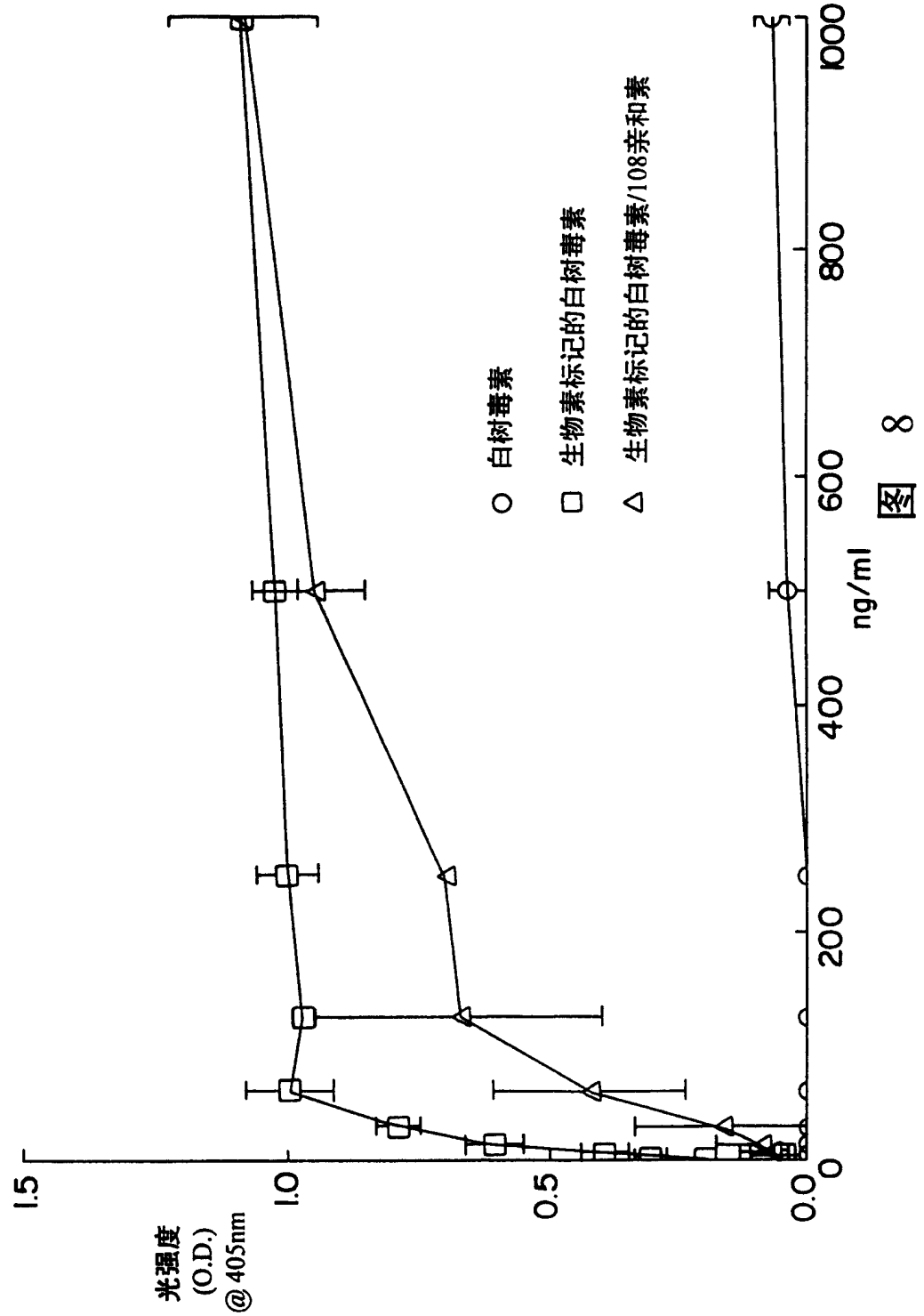
光强度
(O.D.)
@ 405nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0
200
400
600
800
1000
ng/ml
○ 白树毒素
□ 生物素标记的白树毒素
△ 生物素标记的白树毒素/108亲和素

图 8

图 9

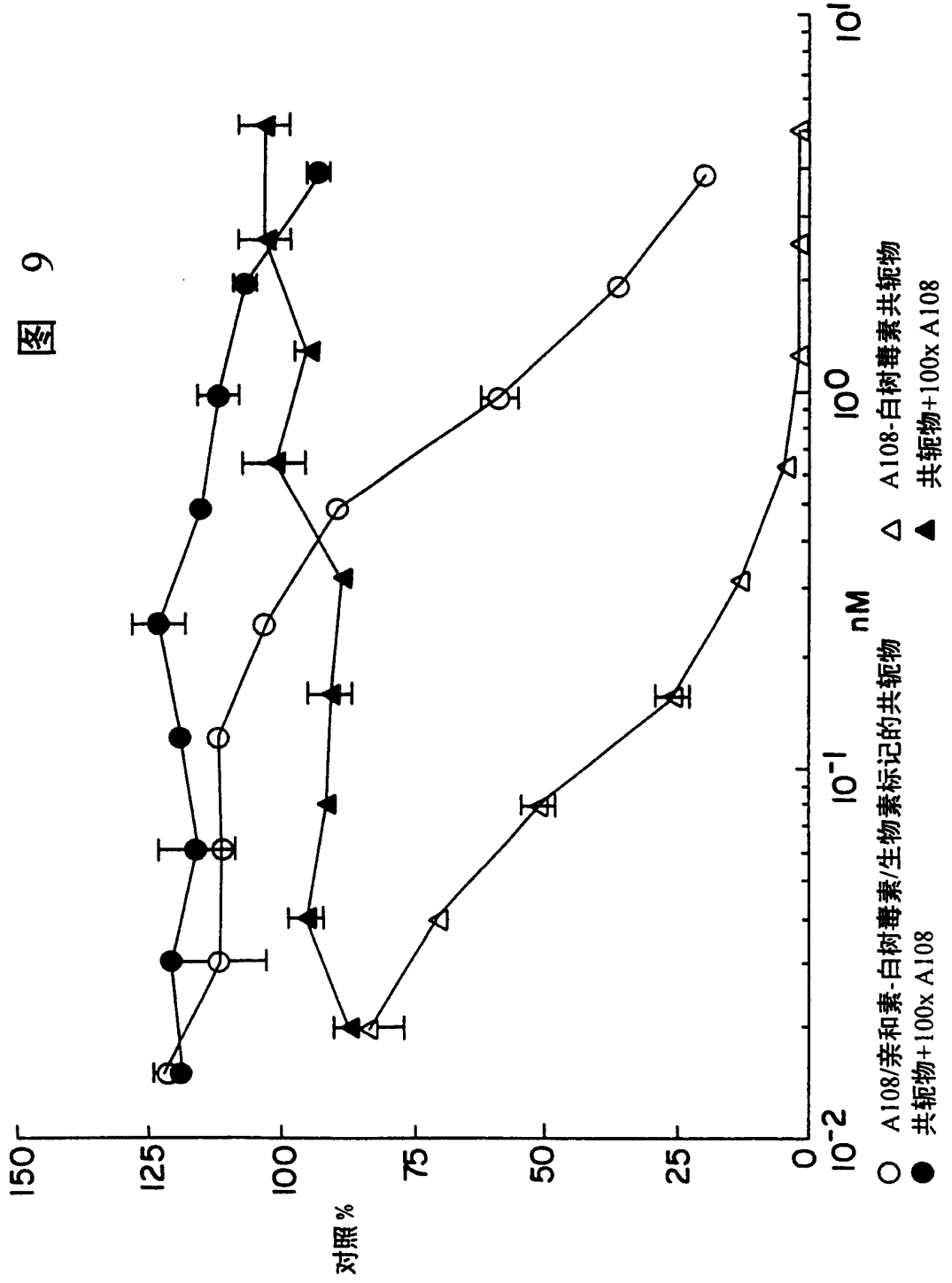
150
125
100
75
50
25
0
对照 %
10^{-2}
10^{-1}
nM
10^{0}
10^{1}
○ A108/亲和素-白树毒素/生物素标记的共轭物
● 共轭物+100x A108
△ A108-白树毒素共轭物
▲ 共轭物+100x A108



图 10