

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/48 C12N 9/22

A61P 35/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95196986.2

[45] 授权公告日 2002 年 12 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1095677C

[22] 申请日 1995. 12. 21 [21] 申请号 95196986.2

[30] 优先权

[32] 1994. 12. 23 [33] GB [31] 9426192.2

[32] 1995. 8. 16 [33] GB [31] 9516810.0

[86] 国际申请 PCT/GB95/02991 1995. 12. 21

[87] 国际公布 WO96/20011 英 1996. 7. 4

[85] 进入国家阶段日期 1997. 6. 23

[73] 专利权人 曾尼卡有限公司

地址 英国英格兰伦敦

[72] 发明人 C·J·泰勒森 H·J·伊格尔提

A·塔拉高纳·菲奥 B·R·拉宾

F·T·博伊尔 J·F·汉南

D·C·布雷基 P·R·马香

D·W·希顿 D·H·戴维斯

A·M·斯拉特 L·F·A·汉纳奎恩

[56] 参考文献

WO95/13095 1995. 5. 18 A61K38/43 A61K47/48

C12N1/19 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09

C12N15/52 C12N15/57 C12N15/63

<< 基因 >> 1992, 118 1992. 1. 1 Tarragona - FioL
等

审查员 张伟波

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 128 页 附图 27 页

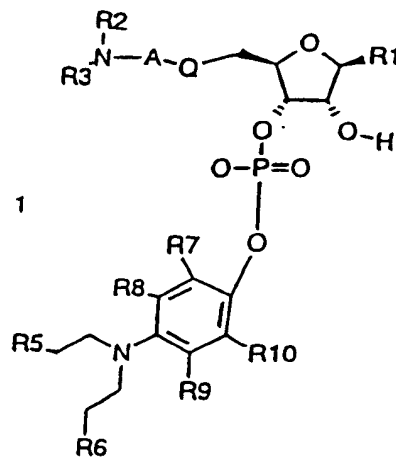
[54] 发明名称 化合物

[57] 摘要

改进的用于寻靶酶药物前体治疗,特别是抗体指导的酶药物前体治疗(ADEPT)的系统,其中所用的酶是宿主酶的突变形式,其中天然宿主酶如核酸核酸酶通过离子对的相互作用而识别其天然底物,而突变酶和互补药物前体可逆转(“逆转极性”)所述的相互作用。

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

1. 设计用于宿主中的匹配的两种组分系统，其中所述组分含有：
 (I) 第一组分是寻靶部分，它是能够与肿瘤相关抗原结合的抗体或其片段，寻靶部分与能够将药物前体转变成抗肿瘤药物的在 66 位含有 Glu 的人核糖核酸酶相连和；
 (ii) 第二组分是在所述酶影响下可转变成抗肿瘤药物的药物前体；
 其中：
 第一组分在宿主中基本上是非免疫原性的和；
 药物前体第二组分在天然未突变宿主酶的作用下在宿主体内不会显著地转变成抗肿瘤药物。
2. 根据权利要求 1 的系统，其中所述抗体片段是 $F(ab')_2$ 片段。
 3. 根据权利要求 1 中定义的第二组分，它是式 1 的氮芥核糖核苷酸



15

其中：

Q 是 O 或 NH；

A 是式 -X-Y 的基团，Y 与 Q 相邻，其中

Y 是 SO_2 ，CO 或单键，其前提如下：

20

当 Q 是氧时，Y 不是 SO_2 ；

X 是 $-(CH_2)_n-$ 其中 $n=1-4$ 在

任何碳原子上由 C_{1-4} 烷基可选地取代，

或当 Y 是 CO 且 $n=1$ 时，X 在碳上可选地由丙氨酸，缬氨酸，亮氨

酸, 异亮氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 色氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 半胱氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 赖氨酸, 精氨酸或组氨酸侧链取代;

R1 是尿嘧啶或胞嘧啶;

R² 和 R3 分别独立地是 H 或 C₁₋₄ 烷基;

5 R5 和 R6 分别独立地是 Cl, 甲磺酰基或甲苯磺酰基;

R7, R8, R9 和 R10 分别独立地是 H, C₁₋₄ 烷基, C₁₋₄ 烷氧基, F 或 Cl 或其盐。

4. 根据权利要求 3 的氮芥核糖核苷酸, 其中:

Q 是 NH;

10 X 是 -(CH₂)_n-, n=1-4;

Y 是 -(CO)-;

R1 是尿嘧啶或胞嘧啶;

R2 和 R3 是 H;

R5 和 R6 是 Cl; 和

15 R7, R8, R9 和 R10 是 H;

或其盐。

5. 权利要求 1 所定义的第二组分, 它是化合物 0-[(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(2-氨基乙酰氨基甲基)-5-(2, 4-二氧-1, 2, 3, 4-四氢嘧啶-1-基)-4-羟基-2, 3, 4, 5-四氢咪喃-3-基]0-[4-(双[2-氯乙基]氨基)苯氧基]磷酸氢酯或其盐。

20 6. 含有权利要求 1-2 任一定义的第一组分的药物组合物。

7. 含权利要求 1 或 3-5 任一定义的第二组分的药物组合物。

8. 根据权利要求 6-7 的药物组合物, 它是无菌的。

9. 权利要求 1-2 任一定义的第一组分。

25 10. 在 66 位包含 Glu 的人核糖核酸酶。

11. 选自编码下列物质之多核苷酸序列的多核苷酸序列:

权利要求 1-2 任一定义的第一组分; 和在 66 位包含 Glu 的人核糖核酸酶。

12. 含有权利要求 11 定义的多核苷酸的载体。

30 13. 含有权利要求 11 定义的多核苷酸的细胞。

化合物

5 本发明涉及使用宿主酶的非天然突变形式，特别是核糖核酸酶的突变形式的抗体指导的酶药物前体治疗（ADEPT）。

长期以来，药物选择性地寻靶以杀死患者体内的癌细胞都是医学研究的一个问题。ADEPT是克服所述问题的方法。ADEPT使用与酶结合的肿瘤选择性抗体。将结合物施用给患者（通常是静脉内），使其定位在肿瘤位点，然后从大循环中清除。随后，将药物前体施用于患者，所述药物前体
10 被所述酶（定位在肿瘤位点的）转变成可杀死肿瘤细胞的细胞毒药物。由于一分子酶可以催化产生许多细胞毒药物分子，所以就产生了放大作用。此外，通过酶促放大产生的细胞毒药物也可杀死不呈现抗体识别的抗原的肿瘤细胞（肿瘤通常表现出微异质性）。已知的系统使用原核细胞酶羧肽酶 G2（CPG2）作为酶组分（参见 WO 88/07378）。使用原核细胞酶的缺
15 陷在于正常肠菌丛可能含有能够引发非选择性细胞毒药物产生的原核细胞生物。

已知系统的另一问题是重复施用结合物会导致宿主免疫反应，从而使治疗效果减小。抗体组分通常是用已知技术可以人化以降低免疫原性的小鼠单克隆。这是因为酶组分不一定天然存在于人宿主循环中，而可以使药
20 物前体的成熟前形式转变成细胞毒药物，但不会观察到对肿瘤的选择性毒性。Akzo 在 WO90/02939 中建议施用人酶用于 ADEPT，可以由所选的通常不在循环中的人酶，如溶菌酶保持选择性。Akzo 已选用人溶菌酶作为其酶，而且因为底物需要的性质（作为内糖苷酶，它需要 N - 乙酰葡糖胺 β 1 - 4 链联的聚合物（- NAG 几丁质）进行裂解）它们被迫产生含所述官能
25 度的药物前体。为了防止细胞进入，它们还用牛磺酸残基制成了寡聚物 - 依赖于磺酸以防止细胞进入并因此细胞毒性低了 20 倍 - WO90/02939 图 13。

将哺乳动物酶如碱性磷酸酶（Senter et al. US4975278）或人酶如 β - 葡糖苷酸酶（Behringwerke DE 42336237）或溶菌酶（Akzo; WO
30 90/07929）用于 ADEPT 是有利的，因为所述酶与非哺乳动物酶相比已经降低或除去了免疫原性。施用哺乳动物或人源酶的缺点在于它在患者体内，是内源性的，因此它们可以将药物前体转变成药物，而不是由于施用

了抗体-酶结合物。用这种 ADEPT 方法,可能会导致毒性增加。在没有施用任何结合物的情况下,由于内源碱性磷酸酶的广泛分布,在小鼠 (Dolye .T.W.and Vyas.D.M.Cancer Treatment Reviews 17,127-131,1990) 和人 (Hande et al.,Clinical Pharmacology and Therapeutics 53, 233, 1993) 中,碱性磷酸酶的药物前体均能迅速地转变成药物,因此可以确定这对于该酶是一至关重要的问题。还尚未得到有关 β -葡糖苷酸酶或溶菌酶之药物前体的人数据。葡糖苷酸酶和溶菌酶存在于血浆和其它组织位点中。Akzo 报告在牛奶,眼泪,唾液,脾,白细胞和单核细胞中有溶菌酶。Behringwerke 在 DE4236237 中报告了激活的巨噬细胞,粒细胞和血小板分泌葡糖苷酸酶。由于这些细胞广泛分布在体内,所以可能会导致不期望的药物前体激活作用。的确, Behringwerke 已经表明,在小鼠中,施用阿霉素药物前体后,相对高水平的游离药物在这些细胞丰富的脾中积累(参见 DE4236237 中的表 3)。

在这种 ADPT 方法中使用人源酶的限制性在于只能使用细胞内分布广的酶,必须要将与其一起使用的药物前体不进入细胞以使毒性最小。这样严重限制了产生 ADEPT 系统的可选择数量。尽管是一种小酶,但溶菌酶对于 ADEPT 来说也有缺陷。溶菌酶不释放活性药物,但释放未知药物活性的衍生物。在 Akzo 所给的实例中,释放 Dox-(glcNac)₁ 或 Dox-(glcNac)₅ 而不是游离阿霉素。葡糖苷酸酶可以从葡糖苷酶药物前体中释放活性药物如阿霉素,并已经报告了抗肿瘤活性 (bosslet.K.et al.,Cancer Research 54,2151-59,1994)。然而,人葡糖苷酸酶是一种高分子量酶 (150 - 300KDa),因此可能会使所得的寻靶结合物很大。这可能引起浸润到组织,如肿瘤中,因为已经表明较小的蛋白质能更迅速地浸润到实体瘤中。另外,葡糖苷酸酶被糖基化,这种糖基化作用会使在 ADEPT 中所用的抗体-葡糖苷酸酶结合物受到迅速地血液清除。这种迅速的血液清除使得几乎没有结合物能够定位于肿瘤异种移植物高分子量和快速的血液清除率可能会导致在患者中的定位很差。因此葡糖苷酸酶不是 ADEPT 的理想酶。

本发明是基于可以工程化宿主酶(例如人源核糖核酸酶,在大循环中天然存在的一种酶)以便它可以识别由天然宿主酶不能明显识别的 ADEPT 治疗的药物前体。由于工程酶与天然宿主酶的氨基酸组成很相似,所以与细菌酶如 CPG2 相比,它的免疫原性显著降低。工程酶不是天然存在的,因此通过天然菌丛或人源酶引起的非选择性的药物前体激活就可以得到

降低。所述方法的其它优点是，适用于广泛的人源或哺乳动物酶，原因在于不受酶的天然分布及采用的进入细胞的药物前体的限制。

5 这些问题部分已经由于本发明最早优先权日之后公开的国际专利申请 WO 95/13095 (Wellcome Foundataion) 提出。该申请建议使用突变哺乳动物酶激活相应的天然酶不能激活的药物前体，但目前未公开所要求的发明。

令人很惊奇的是用相反电荷的残基取代带电残基，该残基位于或接近酶底物结合或催化位点，可以得到有完整催化中心的突变酶，所述突变酶不同于天然酶，仅在具有相关的互补的但有电荷相反的底物特异性需求。

10 此外，Wellcome 中公开的药物前体/药物（以氨甲喋呤和左旋溶肉瘤素为基础）主要是阻断活性运输机制以防止药物前体进入细胞。这样将药物前体/药物可能性的范围限制在具有所述的活性运输机制。相反，本文公开的反向极性方法可以选择药物前体的电荷特性（可以有或没有活性运输特性）以阻断药物前体进入细胞，因此本发明可以有更广泛的药物前体
15 /药物选择。

根据本发明的一个方面，提供了设计用于宿主中的匹配的两个组分，其中组分含有；

(I) 第一组分是能够与肿瘤相关抗原结合的寻靶部分，寻靶部分与能够将药物前体转变成抗肿瘤药物的突变酶相连和；

20 (ii) 第二组分是在所述酶影响下，可转变成抗肿瘤药物的药物前体；

其中：

突变酶是宿主酶的突变形式，其中天然宿主酶通过离子配对相互作用来识别其天然底物，而所述相互作用在突变酶和互补药物前体的设计中是
25 逆转的（“逆转极性”）；

第一组分在宿主中基本上是非免疫原性的和；

药物前体第二组分在宿主中通过未突变的宿主酶不能明显转变成抗肿瘤药物。

30 优选的上述系统是包含突变酶的第一组分，该突变酶基于来自于该系统试图应用的宿主的相同种的酶。

优选的上述系统是其中寻靶部分是抗体或其片段的系统。优选上述系统是其中抗体是 F(ab')₂ 片段的系统。

优选上述系统是其中突变酶是核糖核酸酶的系统。优选上述系统是其中突变酶是在66位含有负电荷氨基酸的人源核糖核酸酶。优选上述系统是其中核糖核酸酶66位负电荷氨基酸是Glu的系统。

上述系统的另一优选实施方案是其中突变酶是突变葡糖苷酸酶的系统。

根据本发明的另一方面，提供了提供了设计用于宿主中的匹配的两个组分系统，其中组分含有：

(I) 第一组分是能够与肿瘤相关抗原结合的寻靶部分，寻靶部分与能够将药物前体转变成抗肿瘤药物的突变酶相连和；

10 (ii) 第二组分是在所述酶影响下，可转变成抗肿瘤药物的药物前体；

其中：

突变酶是宿主酶的突变形式；

15 第一组分在宿主中基本上是非免疫原性的和；宿主中的天然未突变的宿主酶不能明显将药物前体转变成抗肿瘤药物。

术语“宿主中的天然未突变的宿主酶明显不能将药物前体转变成抗肿瘤药物”指在给宿主施用后，药物前体没有不适当的未寻靶毒性问题。

20 术语“基本上是非免疫原性的”指第一组分可以在不止一种情况下施用给宿主而不会引起如在人宿主中用例如与细菌酶相连的小鼠抗体所看到的显著的宿主免疫反应。

优选的突变酶是基于来自与所打算应用之宿主相同种的酶，但突变酶可以基于不同种的宿主酶，只要种之间的酶结构是足够保守的，从而不会产生不适当的免疫原性问题。

25 优选的寻靶部分是抗体，特别是抗体片段如 $F(ab')_2$ 。可以用已知方法，如利用异双功能试剂或通过基因融合或任何其它适宜的方法完成与酶的连接。抗体可以来自相同的宿主（如学小鼠中使用小鼠抗体）或可以操作抗体以便在所选的宿主中，作为外源物质而不会明显被识别（例如在人中使用嵌合的，CDR移植的或包被的小鼠抗体）。

30 在猴和患者临床前研究中已经表明，将啮齿类抗体的可变区移植到人源抗体的恒定区（嵌合抗体）或将啮齿类抗体的抗原结合环（CDR）加到人抗体（CDR移植）中可以大大降低啮齿类抗体的免疫原性。甚至CDR移植的抗体可以将一来自啮齿类抗体序列的大量（>50）氨基酸掺入到人

框架中。尽管如此，已经报道在猴和患者中大大降低了免疫原性。这样提供了迹象表明，突变宿主酶催化位点中很有限量的氨基酸可能会使酶的免疫原性最小，而且当然比非宿主酶的免疫原性更低。读者可以参考下列文献：A. Mountain and J. R. Akair. 生物技术和遗传工程综述，10，1 - 5 142，1992；G. Winter and W. J. Harris. 药物学中的趋势，14，139 - 143，1993；I. I. Singer 等，免疫学期刊，150，2844 - 57，1993；J. Hakimi 等，免疫学期刊，147，11352 - 59，1991 和 J. D. Isacs 等，The Lancet, 340, 748-752, 1992。恒定区可以是例如人 IgA, IgE, IgG 或 IgM 区。人 IgG2 和 3（特别是 IgG2）是优选的，但也可以使用 IgG1 10 和 4 同族型。也可以使用人抗体本身如在小鼠工程化中以产生人抗体而产生的。

突变宿主酶（通过任何适宜的方法，如化学或生物技术基因合成或靶突变）以使与天然宿主酶相比，酶活性位点和药物前体之间的相互作用方式改变。

15 优选酶突变是在其活性位点的极性改变以便它可以改变药物前体以具有互补极性；未突变的宿主酶不能明显转变药物前体。优选天然宿主酶通过离子配对相互作用识别其天然底物，在突变酶和互补药物前体的设计中，这种作用正好相反。优选酶是突变的核糖核酸酶，特别是有反向极性的人核糖核酸酶（参见图 12 - 15）。

20 在人核糖核酸酶的赖氨酸 66 电荷正电荷残基，它与该酶天然 RNA 底物上的负电荷磷酸基团相互作用。例如通过遗传工程（但化学合成也可以）改变该残基的极性以给出负电荷残基如谷氨酸。所得的“逆转极性”酶识别未突变天然宿主酶不能明显识别的本发明的药物前体。也考虑到在天然位点区对残基的其它改变以优化底物的结合和转变特征。核糖核酸酶的工程形式代表了本发明的另一方面。核糖核酸酶是一种有利的酶，由于其分子量低（约 13600Da；在施用后有良好的肿瘤穿透性）以及对热作用和蛋白水解有良好的稳定性。优选药物前体是图 11 中所示分子式 1 的氮芥-核糖核苷酸，其中：

- 30 Q 是 O 或 NH（特别是 NH）；
A 是式 - X - Y 的基团，其中
Y 是 SO₂，CO 或单键（优选 CO），条件是
当 Q 是氧时，Y 不是 SO₂；

X 是 $-(\text{CH}_2)_n$, 其中 $n=1-4$ (优选地, $n=1$ 除当 Y 是单键时, n 优选是 2)

可选的由碳原子 (任何手性原子上都可以是 R 和/或 S 构象) 上 C_{1-4} 烷基取代

5 或

当 Y 是 CO 和 $n=1$ 时, X 在碳上可选的有侧链 Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Try, Ser, Thr, Cys, Asp, Glu, Lys, Arg 或 His (在任何手性原子均可考虑, R 和/或 S 构象);

如图 11 所示, R1 是尿嘧啶或胞嘧啶;

10 R2 和 R3 分别独立的是 H 或 C_{1-4} 烷基 (优选甲基而且特别是 $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$);

R5 和 R6 分别独立的是 Cl, 甲磺酰基或甲苯磺酰基 (优选 $\text{R}_5 = \text{R}_6 = \text{Cl}$);

15 R7, R8, R9 和 R10 分别独立的是 H, C_{1-4} 烷基 (优选甲基), C_{1-4} 烷氧基 (优选甲氧基), F 或 Cl (优选 Cl), 而除 H 外的代表性基团的优选位置是 R8 和 R9, 但 $\text{R}_7 - \text{R}_8 = \text{R}_9 = \text{R}_{10} = \text{H}$ 是特别优选的。

在优选的实施方案中, 氮芥核糖核酸酶是其中:

Q 是 NH;

X 是 $-(\text{CH}_2)_n$, 其中 $n=1-4$;

20 Y-C(O)-;

R1 是尿嘧啶或胞嘧啶;

R2 和 R3 是 H;

R5 和 R6 是 Cl; 和

R7, R8, R9 和 R10 是 H;

25 或其盐。

下列具体的化合物是特别优选的:

在图 7 中所示的末端产物 $\text{O}-[(2\text{R}, 3\text{S}, 4\text{R}, 5\text{R})-2-(2\text{-氨基乙酰氨基甲基})-5-(2, 4\text{-二氧}-1, 2, 3, 4\text{-四氢嘧啶}-1\text{-基})-4\text{-羟基}-2, 3, 4, 5\text{-四氢咪喃}-3\text{-基}]\text{O}-[4\text{-}(\text{双}[2\text{-氯乙基}]\text{氨基})\text{苯氧基}]\text{磷酸氢酯}。$

30 另一优选化合物是图 7 中的末端产物胞嘧啶类似物。

在本说明书中, 普通术语“烷基”包括直链和支链烷基。但是, 对于特定的烷基如“丙基”仅指直链的情况, 而特定的支链烷基如“异丙基”

仅指支链的情况。类似的规则也适用于其它普通术语。

应当理解，到目前为止就一个或多个不对称的碳原子来说，确定的式1化合物可能以旋光活性或外消旋形式存在，本发明包括其定义的具有本发明突变酶底物特性的任何所述旋光活性或外消旋形式。

5 用本领域熟知的有机化学的标准技术，例如通过从光学活性起始材料合成或外消旋形式的拆开可以合成旋光活性形式。相似的，用标准实验室技术可以评估对突变酶的底物特性。

点突变的命名如下：天然氨基酸（用1个字母命名），位置，新氨基酸。例如“D253K”指在位置253的天冬氨酸（D）已经被变成赖氨酸
10 （K）。在平方框之间表示一个酶中的多个突变。

在本说明书中，术语CPB包括：

- (i) 有或没有“tags”（如c-myc）的酶的成熟，原和前原形式；
- (ii) 对在C-末端含Lys或Arg的肽底物有特异性的任何羧肽酶；
胰和血浆CPB酶（胰酶是优选的）；

15 除非特别说明或从本文中可以看出。

本发明的突变CPB是任何有本发明所需特性的上述CPB的突变体。下列胰HCPB是优选的：D253K，D253R和特别是[G251N，D253R]；其它CPB中的相应突变也是可行的。本发明的突变体CPB可以含有不明显改变
20 关键突变特性的其它“保守”突变（插入，取代和/或缺失）。为了所述目的，保守氨基酸取代是其天然发生的可能性比偶然发生取代的可能性大10倍的取代（如由Dayhoff等人，Atlas of Protein Sequence and Structure, 1971, p95-96和图9-10描述的计算方法）。

有关CPB的参考文献如下：Folk JE in The Enzymes Vol III, academic Press (1971), p57; Coll et al., (1991)EMBO Journal 10, 1-9; Eaton DL et
25 al., (1991)J Biol Chem 266, 21833-21838; Yamamoto K et al., (1992) J. Biol. Chem 267, 2575-2581; 美国专利 5364934 (Genentech) 和国际专利申请 WO 95/14096 (Eli Lilly)。

本发明的化合物可以与也在本发明范围内的各种无机和有机酸和碱形成盐。所述盐包括铵盐，碱金属盐，象钠和钾盐，碱土金属盐如钙和镁盐，
30 与有机碱形成的盐如二环己基铵盐，N-甲基-D-葡糖胺，与氨基酸如精氨酸，赖氨酸等形成的盐。可以制备与有机和无机酸形成的盐，如HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, 甲磺酸，苯甲磺酸，马来酸，富马酸和樟脑磺酸。

无毒性生理学可接受的盐是优选的，尽管其它盐也是有用的；如在分离或纯化的产物中。

5 通过常规方法如在盐不可溶的溶剂或介质中，或在然后真空除去的溶剂如水中通过将产物的游离酸或游离碱形式与一或多当量的适宜碱或酸反应或通过在适宜的离子交换树脂上将现有盐的阳离子换成另一种阳离子可以形成所述盐。可以在组合物如口服片剂，胶囊或酞剂直肠给药的栓剂，胃肠外或肌肉内给药的无菌溶液或悬浮液等中使用本发明的化合物。

10 可以将本发明的化合物按可提供最佳药效的剂量需要施用给患者（动物和人）。尽管剂量随疾病的性质和严重程度，患者的体重，患者的特殊饮食，同时施用的药物以及本领域专业人员可以了解的其它因素而不同，但剂量范围通常约为 1 - 4000mg/患者/天，可以单或多剂量施用。优选剂量范围是约 100 - 4000 mg/患者/天；更优选的是约 500 - 3000 mg/患者/天。

15 在癌症治疗中，本发明结合物和药物前体施用的最有效方式和剂量方案取决于许多因素，如疾病的严重程度，患者的健康，对治疗的反应和医生的判断。因此应确定个体患者结合物和药物前体的剂量。然而，结合物的有效剂量可能是在 20 - 200 mg/m² 范围内。药物前体的有效剂量取决于所用的特定药物和母体药物的毒性。由于药物前体的细胞毒性低于母体药物的，母体药物的 MTD（如果已知的话）可以作为起始点。对于母体药物临床数据得不到的酚介子基药物前体来说，治疗剂量范围不太肯定，需
20 要通过标准动物毒学研究，在患者中从低剂量开始，剂量逐步上升的研究来确定。但是，治疗剂量通常为 500 - 2000 mg/m²。

25 当然，可以以单位为基础，按需要调整这些剂量范围以便分成每天的剂量，如上所述，剂量可以随疾病的性质和严重程度，患者的体重，特定的饮食以及其它因素而不同。

通常可以将这些组合配制成下文讨论的药物组合物。

30 将 1 - 100mg 的化合物或式 1 化合物的化合物或其生理学可接受的盐于生理学可接受的载体，赋形剂，结合剂，防腐剂，稳定剂，调味剂等以称为接受的药物实施的单位剂量形式混合。这些组合物或制剂中活性物质的量是表明范围内的适宜剂量。

可以掺入到片剂，胶囊等中的佐剂的实例如下：结合剂如黄蓍胶，阿拉伯胶，玉米淀粉或明胶；赋形剂如微晶纤维素；崩解剂如玉米淀粉，预

胶化淀粉，藻酸等；润滑剂如硬脂酸镁；甜味剂如蔗糖，乳糖或糊精；调味剂如薄荷，冬青或樱桃油。当剂量单位是胶囊时，它可以含有除上述物质外，还有液体载体如脂肪油。各种其它材料可以作为包衣或修饰剂量单位的物理形式。例如可以用滑石，糖或两者同时包衣片剂。糖浆或酞剂可以含有活性化合物，蔗糖作为甜味剂，对羟基苯甲酸甲酯和丙酯作为防腐

5 剂，，着色剂和调味剂如樱桃或橙调味剂。

可以按常规药物学实践，通过将活性物质溶剂或悬浮在用于注射的载体如水，天然植物油如芝麻油，椰子油，花生油，棉籽油等或合成脂肪载体如油酸乙酯等中来配制注射用无菌组合物。按需要也可以掺入缓冲剂，

10 防腐剂，抗氧化剂等。

根据本发明的另一方面，提供了本文所定义的系统，用于控制宿主中肿瘤细胞生长的方法，所述方法包括给所述宿主施用有效量的第一组分，使第一组分基本上从大循环中清除，然后施用有效量的第二组分。优选静脉内施用所述组分。

15 本发明的另一方面提供了在宿主体内控制肿瘤细胞生长的方法，所述方法包括给所述宿主施用有效量的上述第一组分，使第一组分基本上从大循环中清除，然后施用有效量的上述第二组分。

本发明的另一方面提供了药物组合物，含有有效肿瘤定位量的本文所定义的第一组分和可药用载体或稀释剂。优选所述组合物适宜于静脉内施用。优选第一组分作为使用前用适宜稀释剂再建的干固体提供。

20

本发明的另一方面提供了药物组合物，含有有效抗肿瘤量的本文所定义的第二组分和可药用载体或稀释剂。优选所述组合物适宜于静脉内施用。优选第一组分作为使用前用适宜稀释剂再建的干固体提供。

本发明的另一方面提供了含有上述第一组分的药物组合物。

25 本发明的另一方面提供了含有上述第二组分的药物组合物。

优选的药物组合物是无菌的（用于静脉内施用）。

本发明的另一方面提供了上述第一组分。

本发明的另一方面提供了上述突变酶。

本发明的另一方面提供了质粒 pQR162。根据布达佩斯条约质粒 pQR162

30 于1994年8月16日保藏在 NCIMB Limited, 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, 苏格兰，保藏号为 NCIMB 40678。

根据布达佩斯条约，含 pCg330（也称为 pIC1698）的大肠杆菌 MSD1646

于1994年11月23日保藏在工业和海洋细菌国家收集中心(NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen 苏格兰, 英国 AB2 1RY,; 保藏号为 NICMB 40694。NICMB 40694 是本发明的另一方面。

根据布达佩斯条约, 抗体 A5B7 于1993年7月14日保藏在 ECACC, PHLS
5 Centre for Applied Microbiology & Research, Porton
Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG. UK., 保藏号为 93071411。优选 F(ab')₂ 形式的人化抗体。

将在 ADEPT 中有用的抗体描述如下。在 Haisma, H. J 等人, (Cancer
immunol. Immunother.), 34: 343-348 (1992) 中描述的抗体 BW431/26。在
10 欧洲专利 302473 中描述的抗体 16.88。在欧洲专利 392745 中描述的抗体
B72.3。在欧洲专利 382411 中描述的抗体 CEM231。抗体 HMFG - 1 和 HMFG
- 11 (Unipath Ltd. Basingstoke, Hants., 英国) 与在牛奶脂肪小球膜
上的粘蛋白样糖蛋白分子反应, 而且可用于寻靶乳腺和卵巢癌。抗体 SM3
(Chemicon International Ltd. 伦敦, 英国) 与粘蛋白的核心蛋白反应,
15 而且可用于寻靶乳腺和卵巢癌。抗体 85A12 (Unipath
Ltd. Basingstoke, Hants., 英国) 和 ICEA, (Pierce Chemical Company,
Chest, UK) 与肿瘤抗原 CEA 反应。抗体 PR4D₁ (Serotec, Oxford, UK)
与结肠癌相关抗原反应。抗体 E29 (Dako Ltd, High Wgcombe, 与上皮
膜抗原反应。抗体 C242 可从 CANAG Diagnostics, Gothenberg, 瑞典得到。
20 读者还可参考在国际专利申请 W095/13095 (Wellcome) 中第 208 页上的
表 3, 包括了各种抗体的资料。

通常在 ADEPT 中有用的抗体很难被它们所识别的肿瘤细胞内部化。这
使得靶向的药物前体 - 激活酶停留在细胞表面, 因此从循环中的药物前体
在肿瘤位点产生药物。可以用已知技术, 如 Jafrezou 等人, 在癌症研究
25 52: 1352 (1992) 和 Press 等人, 在癌症研究 48: 2249 (1988) 中
所列的技术检测抗体的内部化。

本发明的另一实用性是体外利用第一和第二组分进行诊断。例如通过
将诊断样品暴露于含有寻靶部分如能够与抗原结合的抗体的本发明的第
一组分, 可以检测特定的抗原。此后例如通过洗涤可以除去未结合的第一
30 组分, 然后, 通过其催化第二组分药物前体转变的能力可以确定结合的第
一组分的量。通过任何适宜的方法, 如 HPLC 可以确定药物前体转变的量。
读者可以参考 D. M. Kemeny 的 ELISA 操作指南, Pergamon Press 1991。

根据本发明的另一方面，提供了抗体 A5B7 的重组鼠 F(ab')₂ 片段，其中所述片段在铰链区的重链之间，含有 3 个链间二硫键。

根据本发明的另一方面，提供了抗体 A5B7 的重组鼠 F(ab')₂ 片段，所述片段含有分别为重链和轻链编码的 SEQ ID NO: 25 和 26 所列的序列。

5 Sutter 等人在基因 113 (1992) 223 - 230 中教导了需要在抗体的铰链区再导入半胱氨酸以便在重组生产中形成良好的二聚物。由于没有所有的抗体污染物，所以重组生产的片段不同于蛋白水解生产的物质。正如用 Pharmacia Biacore™ 装置确定的，重组生产的物质对于 CEA 抗原有较高的结合亲和性。

10 根据本发明的另一方面，提供了通过连接下列物质而制备本文所述的第一组分的方法：

能够与肿瘤相关抗原结合的靶向部分和

能够将药物前体转变成抗肿瘤药物的酶，其中所述酶是宿主酶的突变形式。可以用本领域已知的常规方法，如通过异双功能试剂，可以连接突
15 变酶和靶向部分，基因融合亦可考虑。

通过本领域已知的表达技术可以制备突变酶和靶向部分。一些表达系统包括用载体转化宿主细胞；所述系统是熟知的，如在大肠杆菌酵母和哺乳动物宿主中（参见酶学方法，185，Academic Press 1990）。其它表达系统如转基因非人哺乳动物也可行，其中将所需基因（优选是从载体中
20 切出的，但含有乳房启动子以便使表达的蛋白质进入所述动物的乳汁中）导入哺乳动物受精卵的前核中（通常是通过在前核中微注射两个核（通常是雄性核））此后植入抚育母亲。由抚育母亲生产的动物将携带并表达已经整合到染色体中的导入基因。通常通过常规育种，可以将整合基因传给予子代，因此使原种扩展。优选简单地从雌性转基因动物的乳汁中收集所表
25 达的蛋白质。读者可以参考下列文献：Simons et al., (1988). 生物/技术 6: 179 - 183; Wright 等人 (1991) 生物/技术 9: 830 - 834; US4873191 和 US5322775。在 Hogan 等人的“小鼠胚胎操作：实验室手册”，冷泉港实验室，1986 中描述了小鼠胚胎的操作。

在下列文献中也描述了转基因植物技术：Swain W.F. (1991)
30 TIBTECH9: 107 - 109; Ma J.K.C. 等人 (1994) 欧洲免疫学期刊 24: 131 - 138; Hiatt A 等人 (1992) FEBS Letters 307: 71 - 75; Hein M.B. 等人 (1991) 生物技术进展 7: 455 - 461; Duering K. (1990)

植物分子生物学 15: 281 - 294。

如果需要，可以用下列例如在“基因寻靶；一种实践方法”，IRL 出版社 1993 概述并描述的标准方法失活或修饰宿主基因。优选将靶基因（或其部分）克隆到有选择标记（如 Neo）的载体中，所述标记插入到所述基因中以破坏其功能。将所述载体线性化然后转化（通常通过电穿孔）到胚胎干细胞（ES）（如得自小鼠 129/01a 菌株的）中，然后在干细胞中进行同源重组。扩展含基因破坏的干细胞，然后注射到胚胎（如来自 C57BL/6J 小鼠）中，植入抚育母亲中进行发育。用毛色标记（coat colour marker）可以鉴定嵌合子代。通过交配有遗传标记的小鼠而将嵌合体进行育种以确定 ES 细胞对精系的贡献，所述遗传标记可以使 ES 衍生的和宿主胚胎衍生的配子之间产生区别。半数的 ES 细胞衍生的配子带有基因修饰。筛选子代（例如通过 Southern 印迹）以鉴定有基因破坏的子代（约占子代的 50%）。这些所选的子代是杂合体，因此可以与另一杂合体配种，此后选择纯合子代（约占子代的 25%）。可以将有基因 knockout 的转基因动物与用已知技术，如将 DNA 微注射到前核中，原生质融合（Jakobovits et al. (1993) 自然 362: 255 - 258）或脂介导的 ES 细胞的转染（Lamb et al., (1993) 天然遗传学 5: 22 - 29）（以产生带有内源基因 knockout 和外源基因置换之转基因动物）而生产的转基因动物杂交。

通过与含特定改变的靶基因序列转化，还可以进一步修饰含靶向基因破坏的 ES 细胞，可以优选将所述靶基因序列克隆到载体中，然后在转化前线性化。在同源重组后，将被改变的基因导入了基因组。随后用这些胚胎干细胞按上述产生转基因动物。

在本文中术语“宿主细胞”包括适用于表达技术的任何原核或真核细胞，例如细菌，酵母，植物细胞和非人哺乳动物受精卵，卵母细胞，胚细胞，胚胎干细胞和任何其它适用于转基因技术的细胞。如果本文这样允许，术语“宿主细胞”还包括从转化的非人哺乳动物受精卵，卵母细胞，胚细胞，胚胎干细胞和任何其它适用于转基因技术的细胞发育成的转基因植物或非人哺乳动物。

根据本发明的另一方面，提供了选自编码下列物质之多核苷酸序列的多核苷酸序列：

上述的任何第一组分；和
上述任何突变的酶。

根据本发明的另一方面，提供了含上述多核苷酸的载体。

根据本发明的另一方面，提供了含上述多核苷酸的细胞。

现在将用下列实施例说明本发明，其中：

图 1 描述质粒 pQR177 的构建。

- 5 图 2 描述牛核糖核酸酶的纯化。在银染色的 0.1%SDS-16%聚丙烯酰胺凝胶上评估重组 RNase 的纯度。泳道 A 和 G 是市售 RNase (M_r 13700)。泳道 C - E 含有在 isocratic 洗脱从大肠杆菌 [pQR163] 培养物中提取的外周胞质并用不同浓度的 IPTG (分别为 0.5, 2 和 0 mM) 诱导后得到的正电荷蛋白质。泳道 F 与泳道 3 - 5 一样，但培养物含大肠杆菌 [pKK223.3] 细胞
- 10 (对照)。泳道 B 在离子交换层析后纯化的重组 RNase。

图 3 描述了质粒 pATF4 的 PCR 策略。在 PCR 反应中所用的引物 3 - 6 (a) 掺入了牛信号序列加人胰核糖核酸酶基因 5' 六肽的编码序列，而 (b) HP - RNase 酶最后 7 个氨基酸的编码序列加终止密码子。引物 5 和 6 也掺入了 EcoRI 的限制位点。

- 15 图 4 描述了通过表达 R4A.K6A 人胰 RNase 的 PAGE 来评估纯度。泳道 A 和 F， 2 ug RNase；泳道 B 和 C，不同量的从含 pATF4 之 E. coli 细胞的外周胞质空间得到的正电荷蛋白质；泳道 D 和 E， 1 ug 和 500ng 纯化的 HP - RNase。

图 5 描述 pATFZ44 的重组环 PCR 生产。

- 20 图 6 描述比较药物前体和相应药物对 Lovo 细胞的毒性。

图 7 描述尿嘧啶基药物前体的合成图。

图 8 是寡核苷酸引物。

图 9 是尿嘧啶基药物前体类似物的合成图。

图 10 是胞嘧啶基药物前体类似物的合成图。

- 25 图 11 是化学分子式。

图 12 是核糖核酸酶 A - 底物复合物活性位点图，其中 B， R 和 P 分别是碱基，核糖和磷酸的结合亚位点。B₁ 是嘧啶特异性的，B₂ “偏好” 嘌呤。3' - 嘧啶单核苷酸于 B₁R₁P₁ 结合。5' - 嘌呤单核苷酸于 B₂R₂P₂ 结合。3' AMP 与 B₂R₂P₂ 结合。由所述酶水解的磷酸二酯键的磷酸基团于 P₁ 结合。

- 30 表明了在各位点中涉及的已知残基。

图 13 是在反向极性突变酶的活性位点中，药物前体的图，其中 * 表示反向极性残基 (天然核糖核酸酶中的 Lys66) 和；

X 是正电荷基团（通过反向极性残基相连）。

图 14 说明通过逆转极性突变酶裂解药物前体。

图 15 说明天然人 RNase 作用的机制。

图 16 描述 CpA&C>p RNase 底物的结构。

5 图 17 描述胞嘧啶基药物前体的合成图。

图 18 说明胰 HCPB 的克隆。

图 19 说明胰腺 HCPB 测序。

图 20 是载体 pICI1266。

图 21 是 pICI1266 表达载体基因克隆。

10 图 22 说明药物前体和相应药物的细胞毒性。

图 23 列出了生长培养基的组成。

图 24 是天然核糖核酸酶和核酸片段之间关键氨基酸的相互作用图。在位置 P₀ 的正电荷的 Lys66 与带负电荷的磷酸二酯键有离子相互作用，而在 P₁ 的残基在催化过程中是很重要的。

15 图 25 描述了氮芥药物前体和突变 RNase 之间的相互作用。为了避免受天然 RNase 的逆转，已经讲 6 位的氨基酸变成带负电荷的谷氨酸。该 Glu-66 与药物前体中带正电荷的“X”部分相互作用，因此完成了反向极性相互作用。设想在位置 R₂ 和 B₂ 的突变会增强与药物前体的相互作用。

20 图 26 在核糖 5' 带正电荷部分的两个可能的选自以便与 P₀ 的 Glu-66 发生相互作用。

图 27 - 33 说明化学合成方法。

缩写：

Ac 酰基

ADEPT 抗体指导的酶药物前体治疗

25 BOC 叔 - 丁氧基羰基

BP-RNase 牛胰核糖核酸酶

CPB 羧肽酶 B

DCCI 1, 3 - 二环己基碳化二亚胺

DMAP 4 - 二甲基氨基吡啶

30 DMF N, N - 二甲基甲酰胺

DMSO 二甲亚砜

Et 乙基

EDCI 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基-碳化二亚胺

HCPB 人 CPB

HOBt 1-羟基苯并三唑

HP-RNase 人胰核糖核酸酶

5 PCR 聚合酶链反应

TFA 三氟乙酸

THF 四氢呋喃

参考实施例 1

制备重组成熟牛胰核糖核酸酶

10 按 Tarragona-Fiol 等人在基因 (1992) 118: 239 - 245 中的描述, 从牛胰核糖核酸酶 (BP - RNase) 前体的编码序列制备重组牛胰核糖核酸酶。在 tac 启动子的控制下, 从 pQR163 中的两个顺反子表达片段表达所述蛋白质。含所述两个随份子片段的质粒称为 pQR162 (NCIMB 40678)。

参考实施例 2

15 制备 Arg4Ala, Lys6Ala 人胰核糖核酸酶

按 Tarragona-Fiol 等人在 Protein and Peptide Letters (1994) 1, 76-83 中的描述, 用 PCR 技术, 从人颊上皮细胞中提取的基因组 DNA 得到人胰核糖核酸酶 (HP - RNase) 的编码序列。有关 HP - RNase 的制备, 描述了在 E. coli 中工程 HP - RNase 的表达。为了指导
20 重组人胰酶在 E. coli 的周质空间表达, 将牛胰 RNase 信号与所述人基因的 5' 融合。表达重组酶的开始的努力并未成功。结果用定点诱变技术用遗传工程方法得到能够在 E. coli 中表达的 HP - RNase 基因。所得的工程酶表明与同源牛酶有相似的动力学特征。

(a) 克隆 Arg4Ala, Lys6Ala HP - RNase 的成熟编码序列

25 按 Maniatis 等人 (1982) 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室, (冷泉港实验室, 纽约) 中的描述完成限制酶消化, 去磷酸化, 连接, 转化以及小规模质粒 DNA 的纯化。用 Cyclone™ DNA 合成仪合成寡核苷酸。

用 PCR 技术, 从人颊上皮细胞中提取的基因组 DNA 得到人胰核糖核酸酶 (HP - RNase) 的成熟序列。简而言之, 通过在口中剧烈搅拌 10 ml 0.9%
30 的盐水 20 秒而得到上皮细胞。通过离心沉淀颊上皮细胞的悬浮液 (1.5 ml), 然后重悬在 100 ul 10 NaCl, 10 mM EDTA 中。进一步离心后, 将细胞沉淀重悬在 75 ul 20mM 的 NaOH 中, 然后在 100 °C 保温 30 分钟。沉淀

细胞碎片，将上清液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存。一份 ($2 - 3\text{ml}$) 通常在 PCR 保温中作为模板。在 PCR 保温中使用与成熟 HP - RNase 序列的 5' 和 3' 末端互补的两种引物 (SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6; 参见图 8, 引物 1&2) (各 5 pmol), 在 PCR 保温中还含有人基因组 DNA, 0.2 mM dNTPs, 5 StratageneTM 缓冲液 ($1\times$) [10X 缓冲液是 200mM Tris-HCl (pH8.2) 和 100 mM KCl, 60mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20mM MgCl_2 , 1% TritonTM X-100 和 100 ug/ml 无核酸酶 BSA] 和 2.5 单位的 pfu 聚合酶 (Stratagene)。用 30 个循环的在 $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒和在 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 分钟来完成 PCR 保温。分析所得的 PCR 产物, 然后用琼脂糖凝胶电泳分离。从琼脂糖凝胶中切出所需的 DNA 片段, 用离心装置 (Spin-XTM, Costar) 提取 DNA。为了为了指导完全的重组酶在 *E. coli* JM107 细胞的外周胞质空间中表达, 用 PCR 技术将牛胰 RNase 的信号序列与人基因的 5' 末端融合, 并将 HP - RNase 最后 7 个氨基酸的编码序列加终止密码子与 3' 末端连接。然后完成 PCR 保温, 其中以该 PCR 衍生的不含最后 7 个氨基酸之编码序列的 HP - 15 RNase 基因的成熟序列为模板, 一组不同浓度 (从内到最外的引物分别为 0.1 , 0.5 和 50 pmol) 重叠引物, 0.2 mM 核苷酸, Stratagene 缓冲液 ($1\times$, 见上文) 和 2.5 单位的 pfu 聚合酶 (Stratagene)。用与上述相同的条件完成保温。按上述处理 PCR 产物, 切下所需的片段, 然后从琼脂糖凝胶中提取。用 EcoRI 裂解该片段, 然后连接到预先消化并去磷酸化的 pUC18 20 中以便能够通过双脱氧进行双链 DNA 测序。然后将融合的基因连接到表达载体 pKK223.33 中; 见实施例 1。已经将牛信号序列掺入一编码开放阅读框架 5' 六肽的 DNA 序列。在启动子开始转录后, 用其破坏所产生的 mRNA 的二级结构。按上述完成重组酶的导入, 表达和纯化。分析用该方法得到的外周胞质蛋白质表明没有表现出重组 RNase 活性的产物。

25 在这些试验中没有表达人酶并不意外, 因为已经成功地用牛信号序列指导重组牛酶转移到外周胞质空间。比较天然人和牛酶的 N - 末端序列表明在 4 和 6 位上有不同, 其中在牛酶中的 Ala 残基在人对应物中分别被 Arg 和 Lys 所取代。已知在成熟序列中早期存在带正电荷的氨基酸可以终止转移信号以防止进一步转移。为了克服这个问题, 研究了一个对策用 30 Ala 残基取代在人酶 4 和 6 位上的 Arg 和 Lys。用 RCPCR (用于导入所需突变的引物是 SEQ ID NO: 11 - 14; 参见图 8 中的引物 E - H) 得到含所需取代的重组克隆 pATF3 (参见图 3)。在双链 DNA 测序中, 用该质粒

嵌合体作为模板以确定是否掺入了4和6位Ala残基的编码序列。用EcoRI切割,与pKK223.3连接产生用于表达工程人酶的嵌合表达载体pATF4(图3)。

(b) 从E.coli中表达并纯化重组Arg4Ala,Lys6Ala HP - Rnase

5 用pATF4转化大肠杆菌细胞并用IPTG诱导导致工程重组人酶的表达,用上述用于生产同源牛酶的方法从外周胞质中分离所述酶。从外周胞质中分离重组HP - Rnase,然后纯化至均一(见图4)。完成重组酶的N-末端测序,并表明已经正确裂解了牛信号序列。这也证明用Ala完成了Arg - 4和Lys - 6的取代。

10 用CpA和C>p底物完成动力学表征(图6)。将动力学参数Km,kcat和kcat/Km与市售和重组牛胰RNase得到的值在相同的检测条件下进行比较(见表)。数据表明工程HP - 酶的动力学特性于同源牛对应物没有显著差异。

CpA为底物,在pH7.0不同酶的动力学参数

15		kcat/Km (mM ⁻¹ /s ⁻¹)
	重组HP - RNaseR4A: K6A	1700 (480)
	重组BP - Rnase	2800 (370)
	BP - RNase	2300 (600)

C>p底物,在pH7.0不同酶的动力学参数

20		kcat/Km (mM ⁻¹ /s ⁻¹)
	重组HP - RNaseR4A: K6A	4.2 (0.8)
	重组BP - Rnase	3.9 (0.9)
	BP - RNase	2.3 (0.5)

(n)表明标准误差。

25

参考实施例3

合成并分离鼠A5B7 - 牛胰核糖核酸酶结合物

能够与肿瘤相关抗原结合的特定抗体是小鼠单克隆抗体A5B7。抗体A5B7与人癌胚胎抗原(CEA)结合而且特别适用于寻靶直肠癌。A5B7是从DAKO Ltd.,16 Manor Coutyard, Hughenden Avenue, High Wycombe. Bucks HP 13 5RE, England, United Kingdom得到的。通过常规方法,如Mariani.M等人(1991)分子免疫学28: 69 - 77中描述的

30

F(ab')₂ 片段从全 IgG 抗体制备抗体片段。通常抗体（或抗体片段）-酶结合物应至少是二价的，即至少能够与 2 个肿瘤相关抗原（可以是相同或不同的）结合。用已知方法，如在 EP239400 中描述的“CDR 移植”或按 US4816567 中描述的通过将完整的可变区移植到人恒定区上可以将抗体分子人化。人化的抗体可用于降低抗体（或抗体片段）的免疫原性。在 PCT W092/01059 中已经公开了人化的抗体 A5B7。

将生产单克隆抗体 A5B7 的杂交瘤保藏在欧洲的动物细胞培养物收集中心，Division of Biologics, PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, 英国。保藏日期为 1993 年 7 月 14 日，保藏号为 93071411。可以从保藏的杂交瘤，用本领域移植的标准技术，如 Fenge C, Fraune E & Schuegerl K 在“Production of biologicals from Animal Cells in Culture”（Spier RE., Griffiths JR & Meignier B, 编）Butterworth-Heinemann, 1991, 262-265 and Anderson BL & Gruenberg ML 在“commercial Production of Monoclonal Antibodies”（Seaver S. ed）, Marcel Dekker, 1987, 175-195 中描述的，得到抗体 A5B7。要通过限制稀释不时地再克隆细胞以便保持良好的抗体生产水平。

用于衍生鼠 A5B7 的连接物是 SATATM（S-乙酰基硫羟乙酸 N-羧琥珀酰亚胺酯），Sigma（产品号 A9043）。

用于牛胰核糖核酸酶（BP - RNase）的连接物是 SMPB（4-(对-马来酰亚胺苯基)丁酸 N-羧琥珀酰亚胺酯），Sigma（产品号 M6139）。

以 10 mg/ml 的浓度将 SATA（Sigma）溶解在 DMSO（Fisons）中。向 50 mg 以 5.4 mg/ml 在 100 mM 磷酸盐/100mMEDTA, pH7.2（缓冲液 A）中的 A5B7 溶液加入 309 ug (30.9 ul) SATA 溶液（表示比 A5B7 有 4 摩尔过量），混合，然后使其在室温保持 40 分钟。使所得的溶液通过 SephadexTMG25 柱（Pharmacia）（210ml 2.6 × 38 cm）以在室温除去过量的试剂得到终浓度为 2.09 mg/ml 的衍生的 A5B7（总体积为 23.5 ml）。将 SATA 衍生的 A5B7 与 1.0 ml 10 % v/v 500mM 羟胺 HCl/500 mM 磷酸钠/30mMEDTA pH8.0 混合以使衍生的 A5B7 去乙酰基，反应在室温进行 40 分钟。用 UV 在 280 nm 的吸收值确定蛋白质浓度， $e=1.4$ （或用 Bradford Protein 检测）。用 Ellmans -SH 检测确定连接物的负载，发现为 1.2 连接物/mol A5B7。

将 BP - RNase (Sigma) 重悬在 6.0ml 100mM 磷酸钠/100mM NaCl pH7.2 (缓冲液 B) 中以得到 8.33 mg/ml 的浓度。

以 10mg/ml 的浓度, 将 SMPB (Sigma) 溶解在 DMSO 中。将 50mg BP - RNase 溶液与 6500 mg (650ml) SMPB 溶液 (表示比 BP - RNase 5 摩尔过
5 量) 混合, 然后在室温放置 120 分钟。通过凝胶渗透层析 (Sephadex G25 210ml 2.6 x 30cm) 除去过量的试剂。用 UVA280 确定衍生的蛋白质浓度, $e=0.6$ 。通过将已知量的 2 - 巯基乙醇加到马来酰亚胺衍生的 BP - RNase 中, 然后, 检测未反应的 SH 基团, 通过反向 Ellmans 试验确定连接物的量。

10 通过加入等量的去乙酰基化衍生的 A5B7 和衍生的 BP - RNase 来进行结合反应, 用去离子水稀释以使浓度达到 1.0 mg/ml, 在氮气下混合。使反应室温进行 20 小时, 然后通过加入 1 mg/ml 含水甘油来终止。

通过透析, 将粗结合物缓冲交换到 50 mM 磷酸盐 pH8.0 (缓冲液 C) 中, 然后将所得的溶液用于缓冲液 C 平衡的 Q Sepharose™ (Pharmacia) 柱
15 (30ml 1.6 x 15cm)。用缓冲液 C 洗涤该柱以除去过量 A5B7 和 BRNase, 然后以 1ml/分的流速, 用 0.5 M NaCl 洗涤液洗脱结合物。

用 SDS - PAGE 确定所得结合物的纯度, 共含 5.75g 结合物, 用激光密度测定法, 确定组成为 88.4% 的结合物和 11.6% 的游离衍生 A5B7。

20 参考实施例 4

合成并分离鼠 A5B7 F(ab')₂ - 牛胰核糖核酸酶结合物

用于 A5B7 F(ab')₂ 衍生的连接物是 SATA™ (S-乙酰基硫羟乙酸 N - 羧琥珀酰亚胺酯), Sigma (产品号 A9043)。

用于牛胰核糖核酸酶 (BP - RNase) 的连接物是 SMPB (4-(对 - 马来酰亚胺苯基)丁酸 N - 羧琥珀酰亚胺酯), Sigma (产品号 M6139)。
25

以 10 mg/ml 的浓度将 SATA (Sigma) 溶解在 DMSO (Fisons) 中。向以 2.14 mg/ml 在 100 mM 磷酸盐/100mMEDTA, pH7.2 (缓冲液 A) 中的 18.20 mg F(ab')₂ 片段溶液加入 167ug (16.7 ul) SATA 溶液 (表示比 A5B7 F(ab')₂ 有 4 摩尔过量), 混合, 然后使其在室温保持 40 分钟。使所得的
30 溶液经 Amicon YM10™ (100,000 MW 截断) 浓缩至 2.0 ml (9mg/ml), 然后通过 Sephadex™G25 柱 (Pharmacia) (50ml 1.6 x 16 cm) 以在室温除去过量的试剂得到终浓度为 1.04 mg/ml 的衍生的 A5B7 F(ab')₂ (总体积为

10 ml)。将 SATA 衍生的 A5B7 F(ab')₂ 与 1.0 ml 10% v/v 500mM 羟胺 HCl/500 mM 磷酸钠/30mMEDTA pH8.0 混合以使衍生的 A5B7 F(ab')₂ 去乙酰基, 反应在室温进行 40 分钟。用 UV 在 280 nm 的吸收值确定蛋白质浓度, $e=1.4$ (或用 Bradford Protein 检测)。用 Ellmans -SH 检测确定连接

5 物的负载, 发现为 1.2 连接物/mol A5B7。

将 BP - RNase (Sigma) 重悬在 2.0 ml 100mM 磷酸钠/100mM NaCl pH7.2 (缓冲液 B) 中以得到 7.50 mg/ml 的浓度。

以 10mg/ml 的浓度, 将 SMPB (Sigma) 溶解在 DMSO 中。将 15 mg BP - RNase 溶液与 1949mg (1.95ml) SMPB 溶液 (表示比 BP - RNase 5 摩尔过

10 量) 混合, 然后在室温放置 120 分钟。通过凝胶渗透层析 (Sephadex G25 210ml 2.6 x 30cm) 除去过量的试剂。用 UVA280 确定衍生的蛋白质浓度, $e=0.6$ 。通过将已知量的 2 - 巯基乙醇加到马来酰亚胺衍生的 BP - RNase 中, 然后, 检测未反应的 SH 基团, 通过反向 Ellmans 试验确定连接物的量。

15 通过加入等量的去乙酰基化衍生的 A5B7 F(ab')₂ 来进行结合反应, 用去离子水稀释和衍生的 A5B7 F(ab')₂ 以使浓度达到 1.0 mg/ml, 在氮气下混合。使反应室温进行 20 小时, 然后通过加入 1 mg/ml 含水甘油来终止。

通过透析, 将粗结合物缓冲交换到 50 mM 磷酸盐 pH8.0 (缓冲液 C) 中, 然后将所得的溶液用于缓冲液 C 平衡的 Q Sepharose™ (Pharmacia) 柱

20 (30ml 1.6 x 15cm)。用缓冲液 C 洗涤该柱以除去过量 A5B7 F(ab')₂, 然后用盐梯度 (在 20 个柱体积内 0 - 0.1 M) 以 1ml/分的流速液洗脱结合物和剩余的 BP - RNase。通过将含结合物的收集的部分用于 S200™ GP C 柱 (Pharmacia) (60ml 1.6 x 30cm), 然后在 PBS 中以 1ml/分的流速跑而从残留的酶中分离结合物。

25 用 SDS - PAGE 确定所得结合物的纯度, 共含 0.70mg 结合物, 用激光密度测定法, 确定组成为 95.5% 的结合物和 4.5% 的游离衍生 A5B7 F(ab')₂。

按参考实施例 5 中的描述, 或用下列方法制备鼠 A5B7 F(ab')₂

用含 1 30KDa 膜的 Amicon™ CH₂spiral cartridge 装置, 通过对 7 体积

30 0.1M 磷酸钠, 3mMEDTA (pH6.4), 透析, 制备用于消化的 A5B7 抗体, 在参考实施例 3 中所述的。将回收的物质 (用 ABS@280 评估的 3682mg) 是 0.22 uM 过滤的, 并于 4 °C 贮存直到使用。将晶体木瓜酶悬浮液 (10 mg/ml,

9ml; Boehringer Mannheim, 产品编号 1080140) 与含 100 mL - 半胱氨酸的 0.1M 磷酸钠, 3 mM EDTA (pH6.4) 混合, 然后在 37 °C 放置 30 分钟。用 0.1M 磷酸钠, 3 mM EDTA (pH6.4) 以 3 ml/分的流速通过大小排阻层析 (Pharmacia G25M™, 柱大小为直径 2.6 cm, 长为 30 cm, 总体积约 160 ml) 5 除去过量的半胱氨酸。收集分离的部分 (1 分钟), 用 OD280 检测, 用简单的 DTNB 点试验在收集还原的木瓜酶池前确保清除游离的半胱氨酸。确定还原木瓜酶合并液的浓度 (用 OD280 评估 $E = 2.5$) 为 1.65 mg/ml, 体积为 32.8ml, 总蛋白质为 54mg。在 37 °C, 用 1/60 的还原木瓜酶与 A5B7 完成消化, 使用所有的木瓜酶和 655 ml 的抗体 (在开始消化前加热到 37 10 °C), 而且评估蛋白质的浓度为 4.9 mg/ml。在 20 小时后, 在 50 % 乙醇中用 0.1 x 总反应体积的 100mM N-乙基马来酰亚胺猝冷反应。从 Fc 和痕量未消化的抗体中, 用 400 ml 经 25 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠 (pH7.33) 平衡的 (直到 pG 和导电率与平衡缓冲液 (在 15°C 19.7 mS) 的相匹配) Protein A Sepharose FF™ (Pharmacia) 柱 (体积为 5 cm × 20cm) 纯化 15 F(ab')₂。用柱缓冲液以 1: 1 稀释粗消化物, 然后分成 2 份 (660ml 和 840ml), 各以 6.5 ml/分 (0.33 ml/cm²/分的线性流速) 负载到蛋白质 A 柱上。收集 10 ml 馏分。负载后, 用平衡缓冲液洗涤该柱, 直到吸收值 @280 nm 接近基线。开始的洗涤液由 50 mM 醋酸钠 (pH 4.5) 组成, 然后由 50 mM 醋酸钠 (pH 4.0) 扩展, 然后是 50 mM 柠檬酸 (pH 3.0), 20 接着是 50 mM 柠檬酸 (pH 2.8) 洗涤。在洗涤过程中测量 OD280 值, 然后用正磷酸氢二钠溶液 (0.4M) 在 30 分钟内中和合并液。用 SDS-PAGE (Pharmacia Excel™ 凝胶, 考马斯蓝染色的) 分析合并液样品。用 pH 4.0 缓冲液洗脱 F(ab')₂, 用最低 pH 洗涤液洗脱未消化的 A5B7。将 F(ab')₂ 收集的样品透析到 100 mM 磷酸钠, 100 mM 氯化钠, 1mM EDTA (pH7.2)。 25 (Amicon™ CH2 30KDa 膜, 7 体积透析), 得到 845mg F(ab')₂ (@2mg/ml)。

参考实施例 5

在骨髓瘤细胞中制备重组鼠 A5B7 F(ab')₂

本实施例描述从 A5B7 杂交瘤制备 cDNA, 用 PCR 分离特异性 Fd 和 L, 确定这些片段的完整 DNA 序列, 然后在骨髓瘤细胞中共表达以得到重组 30 F(ab')₂ 片段, 培养骨髓瘤细胞并纯化重组 F(ab')₂ 蛋白质。

在文献中描述了数种遗传工程方法在骨髓瘤细胞中生产抗体的方法, 包括 Neuberger 等人 (1984) 自然 312, 604 - 608, Williams and

Neuberger(1986)基因 43, 319 - 324, Wright and Shin(1991)方法 2, 125 - 135, Traunecker (1991)生物技术趋势 9, 109 - 113 和 Bebbington 等人 (1992) Bio/technology 10, 169 - 175。为了方便, 本实施例基本上使用 Bebbington 等人以谷氨酰胺合成酶 (GS) 基因为选
5 择性标记的方法。

a) 从杂交瘤细胞制备 mRNA

有数种方法可以从真核细胞中分离 polyA+mRNA (Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis T., 分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室出版, 第 2 版, 1989, 第 8 章 p3, 下文称为 Maniatis)。一种所述方法
10 是由 Pharmacia 以试剂盒形式提供的, 是依赖于溶解相对少量的细胞 (10⁷ 或更少的), 然后使 polyA+mRNA 与 oligo dT 柱结合。通过在升高的温度在高盐溶液中洗脱 mRNA 前, 用低盐浓度洗涤除去不想要的细胞组分。用 Quickprep™ mRNA 试剂盒 (Pharmacia Biotechnology Ltd.) 从
15 10⁷ A5B7 杂交瘤细胞制备 mRNA。通过用 Uvikon 930 分光光度计 (Kontron™ Instruments) 从 300 - 220 扫描样品, 并用 260 nm 的 40ug/ml/ 单位 OD 为因子来评估 mRNA 的浓度。将 mRNA 以 2.5 ug 的等份沉淀在乙醇中贮存。

b) cDNA 合成

用于 cDNA 合成的方法 是基于 Gubler 和 Hofman 的, 它们依赖于从引
20 发的 mRNA 反转录, 然后用 RNase H 处理以使用 DNA 聚合酶引发并合成第二条链。用于合成 cDNA 的其它方法在 Maniatis (第 8 章) 中有综述。

在含 2.5 u 胎盘 RNase 抑制剂 (Life Technologies Ltd.) 的 10ul 溶液中用 oligo dT (12 - 18 单体混合物, Pharmacia Biotechnology Ltd., 0.5ug) 引发 5 ug 的 mRNA, 所述溶液是通过用无 RNase 水在 70 °C
25 保温然后在冰上冷却而制备的。通过加入 4ul 5xH-RT 缓冲液 (250mM Tris, pH8.3, 200mM KCl, 30mM MgCl₂ 和 0.5mg/ml BSA), 2ul 0.1MDTT (二硫苏糖醇), 1ul dNTP 混合物 (20mM 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP), 4 ul Superscript™ Reverse 转录酶 (Life Technologies Ltd.), 然后在
30 42 °C 保温 1 小时来完成第一条 cDNA 链的合成。对于第二条链反应, 加入 1.5ul dNTP (如上述), 92.5 ul 无 RNase 水, 30ul 5x 反应缓冲液 (125mM Tris, pH7.5, 500mM KCl, 25mM MgCl₂, 50mM (NH₄)₂SO₄ 就 0.5mg/ml β-NAD), 1ul T4DNA 连接酶 (10u, Life Technologies Ltd.), 4 ul DNA 聚合酶

I (40u, Life Technologies Ltd.) 和 1 ulRNAse (2.7u, Life Technologies Ltd.), 然后在 16 °C 再继续保温 2 小时。为了确保制备平整末端的 cDNA, 在加入 2ulT4DNA 聚合酶 (10u, Life Technologies Ltd.) 后, 在 16 °C 最终保温 5 分钟。通过在 70 °C 保温 10 分钟而停止酶活性。

5 c) 用 PCR 分离抗体基因片段

用 cDNA 为模板分离 A5B7 Fd 和 L 链片段。Fd 片段终止于铰链区序列 (C - 末端苏氨酸), 下文称为蛋白水解型 Fd。在本实施例中蛋白水解 Fd 指重组 Fd 等价于在参考实施例 4 中描述的蛋白水解产生的 Fd。

10 来自第一链 cDNA 反应或第二链反应后的材料适用于用作模板。可以使用来自完成反应的纯的材料或用双蒸水稀释 (达 1 : 100) 使用。在 Fd 和 L 链片段的生产中使用寡核苷酸 (SEQ ID NO: 17 - 24)。对于各抗体片段, 5' 区的寡核苷酸 (Fd 的 SEQ ID NO: 17 和 L 链的 SEQ ID NO: 18) 编码使翻译起始最大化的限制酶位点 (Fd 的 HindIII 和 L 链的
15 EcoRI) 共有序列 Kozak 序列 (GCCGCCACC) 和部分天然鼠信号序列。蛋白水解型 Fd 片段的 3' 区寡核苷酸 (SEQ ID NO: 19) 与抗体铰链区的 3' 末端互补, 编码突变以在铰链区后导入串联翻译终止密码子 (TAG 和 TAA), 而且在该序列外含有 EcoRI 限制酶位点。L 链的 3' 区通过与编码区末端互补的寡核苷酸 (SEQ ID NO: 20) 来确定, 导入另一翻译终止
20 密码子 (TAA) 和 EcoRI 限制位点。除部分重叠的碱基对外, 用各片段的互补寡核苷酸 (Fd 的 SEQ ID NO: 21 和 22, L 链的 SEQ ID NO: 23 和 24) 在各 DNA 中导入沉默突变以便从 Fd 片段的 CH1 除去 BamHI 并从 L 链除去 VL 而不会改变编码氨基酸序列。将各 5' 和 3' 寡核苷酸与适宜的诱变寡核苷酸一起适宜以在各抗体链产生 2 个突变片段。纯化后, 将 2 片段等
25 比例混合, 作为使用相关的 5' 和 3' 区寡核苷酸的第二 PCR 反应的模板。这些反应的产物是不含 BamHI 的全长 Fd 和 L 链片段。

通常, 将 5ul cDNA 加到含 10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mMKCl, 0.1%明胶, 1.5 mM MgCl₂, 各 1.25mM 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP, 各 1uM 的适宜寡聚碱基对, 和 2.5u TaqDNA 聚合酶 (Amplitaq, Perkin-Elmer Cetus) 的
30 100ul 反应中。用 100ul 矿物油覆盖各反应, 然后在 94 °C 保温 1.5 分钟, 在 50 或 55 °C 保温 1.0 分钟并在 72 °C 保温 2.0 分钟进行 25 个循环, 加在 72 °C 保温 10 分钟。同时进行没有 DNA 的对照反应。

通过将各 5ul 的样品在 0.8%琼脂糖 (Sigma Chemical Company Ltd) 上跑胶, 然后用 1ug/ml 溴化乙锭 (BDH 实验室提供) 溶液染色并用 UV 透射器 (fransilluminator) 肉眼观察 DNA 来分析 PCR 反应物。在有 A5B7cDNA 存在的所有 PCR 中均可见到适宜大小的带, 表明成功地扩增了 Fd 和 L 链。在对照反应中没有 DNA 带, 表明所用的试剂不含有污染的 DNA。

用 Centricon 100™ 微浓缩仪 (Amicon Ltd) 纯化各 PCR 产物。将各反应物加到浓缩仪中, 通过加入双蒸馏水使体积增加到 2ml。然后以 500xg 离心 (带有 H1000B 的 Sorval RT6000B™ 半敞开的离心机) 所述单位 5 分钟, 去掉“流出物”。将残留物再稀释到 2ml, 然后再进行单位离心。将该过程再重复第 3 次。该过程使得从扩增的 DNA 中除去过量的寡核苷酸缓冲组分。在随后的 PCR 反应中直接使用这些纯化的 DNA。等比例混合适宜的片段对, 在有相应 5' 和 3' 寡核苷酸的第二 PCR 中使用各等份。

d) 将 PCR 产生的片段亚克隆到 pBluescript™

第二 PCR 反应的产物有约 775 bp 和 730 bp 的带, 分别与全长 Fd 和 L 链相符。同样按上述用 Centricon 100™ 微浓缩仪纯化这些产物。然后用含 50ul 3M 乙酸钠, 500ul 蒸馏水和 1 ml 无水乙醇的 1.5 ml 溶液沉淀各 DNA 产物。在以 11600xg 离心 10 分钟 (MSE MicroCentarr™) 前将溶液在冰上至少保温 10 分钟。除去上清液, 用 1 ml 70% 乙醇 (v/v 在蒸馏水中) 洗涤沉淀, 再离心 5 分钟。除去上清液, 在真空下干燥 DNA 沉淀。将各 DNA 沉淀重悬在蒸馏水中。然后在 200ul 含 20mM Tris - 乙酸盐, pH7.9, 10mM 乙酸镁, 50mM 乙酸钾, 1mM 二硫苏糖醇 (DTT) 和各 25u HindIII 和 EcoRI (Promega Corporation) 的反应液中用 EcoRI 和 HindIII 消化 FdPCR 产物。在含 90 mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM 氯化镁, 50mM 氯化钠和 10u EcoRI 的 30ul 反应液中消化 L 链产物。将消化产物在 37 °C 保温 1 小时。

然后在 0.75% Seaplaque™ GTG 琼脂糖凝胶 (FMC Bioproducts Ltd) 上电泳纯化消化的片段, 然后从凝胶上切下适宜的带。通过在 65 °C 保温 2 分钟再溶解琼脂糖凝胶片, 用蒸馏水稀释到 450 ul 的终体积, 加入 50ul 3M 乙酸钠。用等体积的液化酚萃取该溶液, 用 Tris 缓冲液 pH7.6 平衡 (Fisons Scientific Equipment), 以 11600xg 离心 2 分钟 (MSE MicroCentarr™) 以分离水相和酚相。然后再用酚: 氯仿混合物 (50 : 50 v:v) 再萃取水相, 按上述, 在用乙醇沉淀前再用氯仿萃取。将各纯

化的沉淀重悬在 10 ul 的蒸馏水中，在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳观察 1 ul 样品以评估数量和浓度。

用 pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems) 开始 Fd 和 L 量 cDNA。该噬菌粒有单一的 EcoRI 和 HindIII 克隆位点。氨苄青霉素抗性基因，和
5 分离双或单链 DNA 的 ColEI 和 f1 复制起点。用 30u EcoRI (Promega Corporation) 在 100ul 含 90 mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl 的反应液中或用 EcoRI 和 HindIII 在 100ul 含 20 mM Tris - 乙酸盐, pH7.9, 10 mM 乙酸镁, 50 mM 乙酸钾, 1 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 和各
10 25u 的 EcoRI 和 HindIII (Promega Corporation) 反应液中于 37 °C 将 5ug pBluescript™ KS - DNA 消化 1 小时。将 2ul 的牛肠碱性磷酸酶 (2 ubohringer Mannheim) 加到 EcoRI 消化的质粒中以除去 5'磷酸基, 然后在 37 °C 继续再保温 30 分钟。通过在 70 °C 保温 10 分钟而破坏磷酸酶活性。按上述从 SeaPlaque GTG 琼脂糖凝胶中纯化 EcoRI - HindIII 切割的质粒。

15 在含 30 mM Tris-HCl, pH7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP 和 1.5 u T4 DNA 连接酶 (Promega Corporation) 的 10 ul 溶液中, 于 16 °C 将 25 - 50ng 消化的 Fd 或 L 链 PCR 产物与 EcoRI - HindIII 或 EcoRI/CIP 分别处理的 pBluescript 连接 2.5 小时。使用用细胞提供的方法, 用 1 ul 的各反应液转化 20 ul 的感受态 E. coli DH5 α 细胞 (Life Technologies
20 Ltd.)。将转化的作保铺在 L - 琼脂加 100 ug/ml 氨苄青霉素, 1 mM IPTG 和 0.2% X-gal 的平板上, 在 37 °C 保温过夜。基于含亲本质粒细胞产生蓝色而在上述培养基中产生白色菌落的事实为基础, 筛选含克隆插入片段的克隆。

e) cDNA 克隆的 DNA 序列分析

25 从琼脂平板中检出通过颜色筛选而鉴定的潜在 Fd 和 L 链 cDNA 克隆, 然后用于大规模的质粒 DNA 的制备。用各克隆接种在 500ML 中的 200ML 的 L 肉汤和 100 ug/ml 氨苄青霉素, 将培养物保温在 37 °C 振荡过夜, 生长后在 4 °C 用 Sorvall RC5C 离心机和 GS3 旋转器以 5000xg 离心 10 分钟沉淀各培养物中的细胞。将各培养物的细胞沉淀重悬在 20ML 的 TE 缓冲液
30 中, 然后在 4 °C oak-ridge 管用 Sorvall RC5C 离心机和 GS3 旋转器以 2000xg 再离心 10 分钟。将各洗涤的细胞沉淀重悬在 3ML 冰冷 25 % 蔗糖, mM Tris pH8.0 中, 然后放在冰中。加入新鲜的溶菌酶溶液 (10mg/ml,

1.0ml) , 通过旋转试管混合内含物, 然后在冰上继续保温 5 分钟。加入
乙二胺四乙酸钠 (EDTA) 溶液 (0.5mm, 1.0ML PH8.5) , 缓慢混合内
含物。最后加入 5.0ML 冰 Triton X™ 溶液 (0.1% Triton100 , 62.5mM
EDTA , 50mM Tris, pH8.0) , 缓慢混合内含物, 在冰上再保温 10 分钟,
5 在 4 °C 橡树边用 Sorvall RC5C 离心机和 SS - 34 旋转器以 39000xg 再离
心 30 分钟沉淀细胞碎片。将含质粒 DNA 的上清液加入到 16g 氯化铯
(Bohringer Mannheim) 和 150ul 溴化乙锭溶液 (10g/ml) 中, 然后加
入 TE 缓冲液使体积增加到 18.5 ml 。将该溶液转移到 18.5ml crimp
top, 聚丙烯离心试管 (Sorvall Instruments) 中。密封该试管, 然后
10 用 Sorvall TV865B (titanium , vertical) 旋转器和 OTD65B 离心机于
18 °C 以 180000xg 离心。

离心后, 在形成的 CsCl.EtBR 密度梯度中, 质粒 DNA 为不同的橙色带。
用皮下针管刺透试管壁, 从梯度中去除质粒 DNA。用 TE 缓冲液将从梯度
中去除的样品稀释 3 - 4 倍, 然后加入等体积的异丙醇沉淀 DNA, 并在冰
15 上保温 10 分钟。在 4 °C 用 Sorvall RC5C 离心机和 SS - 34 旋转器以 17000xg
离心沉淀沉淀的 DNA。然后除去上清液。用 70 % 乙醇 (v/v) 洗涤所得的沉
淀, 然后再离心 5 分钟。然后在真空下干燥沉淀, 再悬在 1.8ml TE 缓冲液
和 200ul 3M 乙酸钠中, 然后以 17000xg 离心 2 分钟用等体积酚萃取以分
离相。在于 - 20 °C 加入等体积乙醇沉淀 DNA 前并在冰上保温 10 分钟, 用
20 等体积氯仿再萃取水相。按上述沉淀纯化的 DNA, 用 5ml 70%乙醇洗涤,
真空干燥沉淀。将干燥的沉淀重悬在 500 ul 蒸馏水中, 用 50ug/ml/OD260
的消光系数, UV 分光光度计从 300 - 220nm 扫描稀释的样品, 以确定 DNA
浓度。许多专利试剂盒, 如 Qiagen™ (Hybaid Ltd) 可用于质粒 DNA 的纯化。

然后用所述纯化的质粒 DNA 进行 DNA 序列分析。使用专利测序试剂盒
25 如由美国生物化学公司提供的 Sequenase™ 和方法的
Sanger (Pro. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1977, p5463) 的双脱氧链终止法可以
分析双链 DNA 的 DNA 序列。

将 Fd 和 L 链 cDNA 克隆质粒 DNA 等份样品 (2 - 4ug) 用于 DNA 序列
分析。开始通过在室温, 与终体积为 100ul 的 0.2 mNaOH, 0.2mM EDTA 保
30 温 10 分钟而使各样品变性。然后通过加入 10 ul 3M 乙酸钠 (pH5.0) 和
275ul 乙醇, 然后在冰上保温 10 分钟来沉淀变性的 DNA。按上述有关质
粒 DNA 的描述回收沉淀的 DNA。通过在 10ul Sequenase™ 反应缓冲液 (10mM

Tris, pH7.5, 25 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) 中与 0.5 pmol 的适宜引物在 65 °C 保温 2 分钟, 然后逐渐降到 30 °C 以下而引发变性的 DNA 进行测序, 所述缓冲液含 10 % 二甲亚砜 (DMSO)。然后根据加到标记和终止混合物中的 10 % DMSO 的方法, 将这些引发的模板用于测序反应。

- 5 在 6 % 聚丙烯酰胺: 8M 尿凝胶上高分辨率电泳后, 通过放射自显影分析测序反应 (Sanger and Coulson, 1978, FEBS lett. 87, p107)。

下面给出克隆 cDNA 的完整 Fd 和 L 链序列 (蛋白水解型 Fd 链的 SEQ ID NO: 25 和 L 链的 SEQ ID NO: 26)。含蛋白水解型 Fd 的质粒称为 pAF1, 含 L 链的质粒称为 pAF3。还确定在用于除去 BamHI 位点的各片段存在沉默突变。DNA 序列表明, 与公开的恒定区 DNA 序列数据 (在
10 Kabat, E. A., Wu, T. T., Bilofsky, H. Reid-Milner, M., Perry, H., 1987 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fourth Edition. Public Health Service N. I. H. Washington DC)。

f) 亚克隆到骨髓瘤表达载体中

- 15 为了得到能够在骨髓瘤细胞中共表达 Fd 和 L 链的载体, 适宜 GS - System™ 系统 (Colltech Biologics) (WO 87/04462, WO 89/01036, WO 86/05807 和 WO 89/10404)。

该方法需要将 Fd 链克隆到 pEE6 [pEE6.hCMV - (Stephens and Cockett (1989) Nucleic Acids Research 17, 7110-其中已经将 hCMV 启动子上游的 HindIII 位点变成 BglIII 位点) 的衍生物] HindIII-EcoRI 区, 将 L 链克隆到 pEE12 [该载体与 Bebbington et al., (1992) Bio/Technology, 10, 169-175 中描述的 pSV2.GS 相似, 有许多最初存在于 pSV2.GS 中的限制位点, 通过定点诱变来除去以在多接头区提供特有的位点] 中。结果, 将 pEE6 的 BglIII-BamHI Fd 表达盒插入到 pEE12
20 的 BamHI 区。另外, 可以将含 Fd 表达盒的 BglIII-SalI 片段插入到含 L 链之 pEE12 质粒的 BamHI-SalI 区。

为了构建各个载体 (在 pEE6 中的蛋白水解 Fd 和在 pEE12 中的 L 链), 按上述用 EcoRI 和 HindIII 消化质粒 pAF1 和 pEE6, 用 EcoRI 消化 pAF3 和 pEE12。然后从 Seaplaque™ GTG 琼脂糖中分离适宜的载体和来自各消化
30 产物的插入片段, 连接在一起, 按前述用于转化感受态 DH5 α 细胞。将转化细胞铺在 L 琼脂加 100ug/ml 氨苄青霉素上。用 PCR 方法从转化体中筛选菌落。将菌落转移到 200ul 蒸馏水中, 然后旋转混合。然后将悬浮细胞

加热到 100 °C 1 分钟，然后在 PCR 反应中使用上清液前，以 11600xg 离心 2 分钟。在各 PCR 反应中，将引发的 CMV 启动子内的寡核苷酸 (SEQ ID NO: 27) 与互补于 Fd3' 区 (SEQ ID NO: 19) 或 L 链 3' 区 (SEQ ID NO: 20) 的寡核苷酸一起使用为宜。在各种情况下，只有其中抗体片段基因以表达方向插入到 CMV 启动子下游的克隆才产生约 2.0kbp 的特异性 PCR 产物。取 20ul 的 PCR 反应物，其中含有各 20pmol 的各种寡核苷酸 (SEQ ID NO: 27 与 SEQ ID NO: 19 或 20)，10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 0.1% 明胶，1.5mM MgCl₂, 各 1.25 mM 的 dATPdCTP, dGTP 和 dTTP 和 0.5u TaqDNA 聚合酶 (Amplitaq™, Perkin-Elmer Cetus)。用 20 ul 矿物油覆盖各反应，然后在 94 °C 保温 1.5 分钟，50 °C 1.0 分钟，72 °C 2.0 分钟共 25 个循环，加上在 72 °C 再保温 10 分钟。同时进行用含亲本质粒和不含 DNA 的对照反应。用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应，通过 2.0kbp PCR 产物的存在来鉴定潜在的克隆。将这些可能的克隆用于大规模制备质粒 DNA，通过限制酶 EcoRI-HindIII 或 EcoRI 消化来表征，然后按上述通过 DNA 序列分析确定插入序列。将分离物命名为 pAF4 (在 pEE6 中的蛋白水解型 Fd) 和 pAF6 (在 pEE12 中的 L 链)。

为了得到共表达载体，用在含 50mM Tris-HCl, pH7.9, 10mM 氯化镁，150mM 氯化钠和 1mM DTT 溶液中的各 30u 的 BglIII (Pharmacia) 和 BamHI (New England Biolabs)，在 37 °C 将 5-7.5ug 的 Fd 质粒 pAF4 消化 1 小时。通过琼脂糖凝胶电泳确定消化。在 37 °C，用上述溶液中的 25 单位的 BamHI (New England Biolabs) 通过保温 1 小时消化 5ug 的 L 链质粒 pAF6。然后通过加入 2 单位的 CIP 将 DNA 去磷酸化，在 37 °C 保温 40 分钟，接着用 10ul Strataclean™ 树脂 (Stratagene Ltd.) 抽提三次。从 SeaPlaque™ GTG 琼脂糖凝胶纯化 Fd 表达盒片段和主要 pAF6 质粒带，适宜地组合连接在一起，然后按前述用连接产物转化感受态 DH5 α 细胞。

g) 鉴定共表达载体

在 50 批中一式两份从上述转化中检出 100 个菌落，放到铺了 L - 琼脂加 100ug/ml 氨基青霉素平板的 9cm 硝酸纤维素片 (schlercher and Schull) 上。将第三组没有滤纸的平板划痕以形成筛选菌落的原种。37 °C 保温过夜，取出硝酸纤维素片，然后按 Grunstein and Hogness (Maniatis, 第 1 章, 102 页) 的方法处理以在原位溶解细菌。将滤纸覆盖在浸于不同试剂的 3MM 纸 (whatman) 上，-10 % SDS 2 分钟，3MNaOH, 1M

NaCl 5 分钟以及 1M Tris, pH6.8 2x2 分钟。将含溶解细胞的滤纸转移到用 20 学 SSC (3M NaCl, 0.3 M 柠檬酸钠) 润湿的 3MM 纸, 然后通过暴露于设定选择性交联 (120000u Joules) 的 Spectrolinker™ XL (Spectronics Corporation) 中的 UV 光而使 DNA 与滤纸交联。在检测(见下文) 前将滤纸空气干燥。将原种平板于 4 °C 贮存直到使用。

用 Fd 和 L 链特异性的寡核苷酸 (分别为 SEQ ID NO: 22 和 24) 产生含 - Fd 和 L 链克隆特异性的杂交探针。可以通过 T4 多核苷酸激酶的作用, 加入来自 γ ³²P ATP 的放射性 5' 磷酸基团, 从合成的核苷酸形成杂交探针。将 20 pmol 的寡核苷酸加到含 100mM Tris pH7.5, 10mM MgCl₂, 0.1 mM 亚精胺, 20mM DTT, 7.5 uM ATP, 0.5uM γ ³²P ATP 和 2.5 单位 T4 多核苷酸激酶 (Pharmacia Biotechnology Ltd.) 的 20ul 反应物中。在 37 °C 将反应物保温 30 分钟, 在杂交前于 70 °C 保温 10 分钟。在 Maniatis (第 11 章) 中提供了用于从寡核苷酸产生杂交探针的方法。将 10ul 的放射性标记的寡核苷酸加到然后用作探针溶液的 10ml 6x SSC (1 M NaCl, 0.1M 柠檬酸钠), 0.1% SDS (十二烷基磺酸钠) 和 0.25% Marvel™ (脂肪还原的干燥奶粉) 中。

在使用旋转玻璃试管的 Techne HB-1 杂交箱中, 一式两份分别在 90ml 6xSSC, 0.1% SDS, 0.25% Marvel™ 中于 65 °C, 将处理的含所选克隆的滤纸 (见上述) 预杂交 3 小时。然后在相同的装置中, 将每个两份组在 10ml 探针溶液 (一组用 VH 探针, 另一组用 VL) 在 65 °C 过夜检测。保温后, 在相同的装置中, 将各组滤纸分别按下列进行洗涤, 65 °C 100ml 6xSSC, 0.1% SDS 15 分钟, 65 °C 100ml 3xSSC, 0.1% SDS 30 分钟, 以及 65 °C 100ml 1xSSC, 0.1% SDS 30 分钟。将洗涤的滤纸空气干燥, 在 -70 °C, 用 Hyperfilm™ MP (Amersham International) 与钨酸盐增强屏放射自显影。用柯达自动胶片处理器将胶片显影后, 通过两种探针的杂交来鉴定潜在的 F(ab')₂ 表达克隆。与 Fd 和 L 链特异性探针杂交的克隆频率很低 (约 2%)。从原种平板中检出潜在的共表达克隆, 然后用于大规模制备质粒 DNA。通过 EcoRI 和 HindIII 的限制消化分析来确定各表达盒的方向。鉴定只含有串联方向 (而不是收缩的) 之 L 和 Fd 表达盒的克隆。得到共表达载体 pAF8 (在 pEE12 中的蛋白水解 Fd 和 L)。

h) 转染骨髓瘤细胞

现有数种方法可以将 DNA 导入到真核细胞中 (Bebbington, C., 1991,

方法, 2卷, 136 - 145)。最近通常使用电穿孔来代替磷酸钙 - DNA 共沉淀法。由于没有任何内源分泌的抗体蛋白质, 所以 NS0 骨髓瘤细胞 (酶学方法, 1981, 73B, 3 - 46, ECACC cat no. 85110503) 是这项工作适宜的宿主细胞。在转染 Fd 和 L 链后, 预期在无谷氨酰胺培养基中产生的菌落比例, 共表达质粒将表达功能 A5B7 抗体片段。

在转染前, 在 37 °C 将 40ug 的 pAF8 质粒 DNA 通过用 200 单位 Sa1I (New England Biolabs) 在 400ul 反应液中消化 1.75 小时而线性化, 所述反应液含有 10mM Tris-HCl, pH7.9, 10mM 氯化镁, 150mM 氯化钠, 1mM DTT 和 100ug/ml 酰化 BSA。消化后, 用乙醇沉淀各 DNA, 然后重悬在 50ul 的蒸馏水中。

于 37 °C 5 % CO₂ 中, 在含 50ml 非选择性生长培养基 (Dubecco's 改性 Eagle 培养基, Lefe Technologies Ltd. 加来自认可源的 10 % 胎牛血清) 的 160cm² 组织培养烧瓶 (Nunc 或 Costar) 中, 使 NS0 细胞生长接近汇合。转染前, 通过将烧瓶对手或工作台轻敲来重悬 NS0 细胞, 然后转移到 50ml 的锥形离心试管 (Falcon) 中。取一份样品 (40ug), 用设置在 10 - 20um 间的 Coulter 计数器评估细胞浓度。以 500xg 离心 5 分钟 (Sorval RT6000C benchtop 离心) 而沉淀细胞, 用 45ml 冰冷磷酸缓冲盐 (PBS) 洗涤, 然后再离心。将洗涤的细胞重悬在冰冷 PBS 中, 达到每 ml 1.3×10^7 细胞并在冰上贮存。将各 50ul Sa1I 消化的质粒 DNA 于 800ul (10^7) NS0 细胞中 0.4 cm 径长的电穿孔小瓶中混合, 避免小泡, 然后在冰上将小瓶保温 5 分钟。用一组织将小瓶擦干, 放在 Gene Pulse™ 电穿孔仪 (Bio-Rad Laboratories Ltd) 上, 根据制造商的说明, 以 3u, 1500v 进行连续 2 个脉冲。电穿孔后, 在与 30ml 预热的非选择性培养基混合前, 将小瓶再放在冰上。将约 20ml 的该细胞悬浮液以每孔 50ul 分散到 4x 平底 96 孔组织培养板 (Nunc) 中。用 30ml 非选择性培养基再稀释另 10ml, 并铺在 5x96 孔平板中。再用 (10 - 40ml) 非选择性培养基稀释已稀释过的悬浮液并铺在 5x96 孔平板中。然后在 37 °C 将细胞于 5 % CO₂ 中保温过夜。将无谷氨酰胺选择性培养基 (150ul Bebbington et al., (1992) Bio/Technology 10, 169-175) 加到 96 孔平板的各孔中, 然后将平板放回到保温箱中以逐渐消耗谷氨酰胺, 直到用肉眼可观察到菌落。

I) 扩大细胞系

从每孔有一个菌落的 96 孔平板中筛选菌落。通过吸起和放下而重悬细胞，并将 100ul 转移到 24 孔平板的孔中，向每孔加入 1 ml 的选择性培养基。再将 100ul 选择性培养基加回到已取出菌落以提供细胞系后备源的 96 孔平板的孔中。在 37 °C，5 % CO₂ 中保温 24 孔平板直到约 50 % 的细胞生长汇合。在该阶段，取出 100ul 的培养上清液，用 ELISA 试验检测抗 CEA 结合活性（见下文）。再通过吸起和放下扩大有结合活性的细胞系，并转移 1ml 至 25cm² 组织培养烧瓶中。再将 1ml 的选择培养基加到各烧瓶中，将烧瓶倾斜保温以使细胞向烧瓶底部浓度。保温数天后，将 3ml 的选择培养基加到各烧瓶中，然后水平保温，直到细胞达到 50 - 75 % 的汇合。

10 在该阶段，从细胞中除去培养基，然后用 5ml 选择培养基仔细洗涤细胞，再将培养基除去，并用另 5ml 选择培养基代替。将烧瓶放回到保温箱中保温 24 小时。然后敲击烧瓶以收集细胞，用在 10 - 20um 检测范围的 Coulter 计数器或使用苔盼蓝溶液（Life Technologies）染色，然后在显微镜下计数活细胞（未染色的）来计数细胞密度。离心（~ 300xg 5 分钟）沉淀

15 细胞，取出上清液并于 4 °C 贮存以用于分析抗体片段的表达（见下文）。用 50 % 透析胎牛血清培养基，40 % 无谷氨酰胺 DMEM 和 10 % DMSO 重悬细胞，达到每 ml 1 - 2 × 10⁶ 细胞的浓度。将 1ml 一份的细胞转移到螺旋帽的低温试管（Nunc）中，于 - 70 °C 冷冻过夜，然后转移到液氮中长期贮存。

20 Western 印迹分析

按如下完成 Western 印迹分析。

将各上清液样品等份（15ul）与含有或不含有还原剂的等体积的样品缓冲液（62.5mM Tris，pH6.8，1% SDS，10%蔗糖和 0.05%溴酚蓝）混合。

25 在 8 - 18 % 丙烯酰胺梯度凝胶（Excel™ Produkter AB）按制造商说明电泳前，在 100 °C 将样品保温 15 分钟。电泳后，用 Novablot™ 装置（LKB Produkter AB），按制造商提供的方法将分离的蛋白质转移到 Hybond C-Super™ 膜（Amersham International）上。印迹后，将膜空气干燥。

30 用抗鼠 F(ab')₂ 抗体 - 过氧化物酶结合物（ICN Biomedicals，产品号 67 - 430 - 1）检测抗体片段的的存在。尽管产生的是抗鼠 F(ab')₂ 的一级抗体，但已经表明主要与 κ L 链结合。用 ECL 检测系统（Amersham International），按照提供的方法观察鼠 A5B7 抗体片段的的存在。这表明在细胞上清液中约 90 % 的材料是 F(ab')₂ 蛋白质。

k) ELISA 分析

标准 ELISA 检测方法参见生物化学和分子生物学实验室技术 (“ Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology ” ,) Burdon .R.H. and van Kippenberg,P.H.,编, 15 卷, 5 酶免疫检测实践和理论 (“ Practice and Theory of Enzyme Immunoassays ” .) Tijssen.P.1985,Elsevier Science Publishers B.V.. 另一资料来源是抗体 - 实验室操作 (“ Antibodies-A Laboratory Manual ”) Harlow.E. and Lane D.P.1988,由冷泉港实验室出版。用细胞上清液 (见上文) 按下列方法检测抗 CEA 结合物质:

10 1) 抗 CEA ELISA

1 制备包被缓冲液 (碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液 1 胶囊 - SigmaC-3041-在 100ml 双蒸馏水中) 。

2 将 5ul CEA 原种溶液 (0.2 mg/ml, DALO) 加到各 96 孔平板的 10ml 包被缓冲液中。

15 3 将 100ul 稀释的 CEA 加到 Nunc “ Maxisorp™ ” 微滴定板的各孔中。

4 4 °C 将平板保温过夜 (或室温 2 小时) 。

5 各用磷酸缓冲盐 + 0.01% 叠氮化钠 (PBSA) 将平板洗涤 4 次 5 分钟。

20 6 用在 PBSA 中每孔 150ul 的 1 % BSA (Sigma A-7888) 阻断平板 (banging 干燥后) 。在室温保温 2 小时。

7 各用 PBSA 洗涤平板 4 次 5 分钟。

8 按适宜量负载样品 (培养上清液) 和标准物 (双倍稀释的蛋白水解 A5B7F(ab')₂) 。用生长培养基 (或 PBS) 稀释样品。PBSA + 1 % BSA 25 和稀释物作为空白。

9 4 °C 保温过夜。

10 各用 PBSA + 0.5% 吐温 20 将平板洗涤 6 次 5 分钟。

11 制备二级抗体溶液 (抗 - 小鼠 IgGF(ab')₂ , 来自山羊过氧化物酶结 合物 - ICN 67 - 430 - 1 - 在 40 ml PBSA + 1 % BSA + 0.5% 吐温 20 中

30 20ul) , 每孔加入 100ul 。

12 在室温保温 2 小时。

13 各用 PBSA + 0.5% 吐温 20 将平板洗涤 6 次 5 分钟。

14 通过将磷酸盐 - 柠檬酸过硼酸盐缓冲液 (Sigma P-4922) 溶解中 100ml 双蒸馏水中来制备显色溶液。每 100ml 缓冲液加入 30mg o-苯二胺二氢氯化物 (OPD, Sigma P-8287)。每孔加 100ul。

15 在黑暗中室温保温 15 分钟。

5 16 通过每孔加入 50ul 2M 硫酸停止反应。

17 用平板阅读器读出 490nm 的 OD。

m) 计算特定的生产率 (SPR)

用 Softmax 数据处理包确定各样品中抗 CEA 结合活性的量。参考表明大部分的抗体 L 链 (>90%) 是作为 F(ab')₂ 而存在的 Western 印迹分析数据, 从该图可以近似地得出细胞上清液中所存在的 A5B7 F(ab')₂ 片段量的图。然后用该图以 ug/10⁶/24 小时计算特定的生产率, 用 ug/10⁶/24 按照生产率将细胞系分成等级。通常分离的最好细胞系的 SPR 为 4ug-10 ug/10⁶/24 小时。

纯化重组 A5B7 F(ab')₂

15 用 r-蛋白质 A 500mg 盒, 如由 NyGene 制造的, 从骨髓瘤培养基上清液中纯化重组 A5B7 F(ab')₂ 物质。首先用 100mM 柠檬酸 pH8.2 柠檬酸盐缓冲液洗涤所述盒, 然后用 150mM 氯化钠 10mM 磷酸钠 pH7.4 平衡直到洗涤 pH 与平衡缓冲液的 pH 相配。均用 Millipore 滤器预过滤这两种缓冲液。

同样预过滤含重组 A5B7 F(ab')₂ 的 (1.8 升), 然后用平衡缓冲液以 1: 20 1 稀释。将稀释的培养基负载到蛋白质 A 盒上, 收集所有未结合的洗涤液。负载后, 用平衡缓冲液将盒彻底洗涤直到在 280nm 的吸收值回到基线。

将缓冲液换成 100mM 乙酸钠 pH4.0, 同样预过滤。将该洗脱缓冲液收集为 45ml 分馏份。在 280nm 的吸收值回到基线后, 将缓冲液换成 100mM 柠檬酸 pH2.8, 以便洗涤柱。确定馏份 280nm 的光密度, 将含显著吸收值的 25 的那些滴定到 pH7.0, 然后用 SDS PAGE 分析。

基本上按 Bebbington 等人 (1992) 在 Bio/Technology 10, 169 - 175 中的描述滴定在上述纯化中所用的骨髓瘤细胞上清液。GS 培养基 (目录号 51435) 和补充培养基 (目录号 586729 从 JRH Biosciences (JRH Biosciences Europe, Hophurst Lane, Crawley Down, W. Sussex, U. K., 30 RH10 4FF) 得到。在发酵过程结束时, 使上清液通过 0.45 m 滤器过滤以除去任何颗粒物, 于 4 °C 贮存直到纯化, 通常不超过 24 小时。

参考实施例 6

合成尿嘧啶基的药物前体类似物（参见图9中的流程图）

将化合物7（5mg）溶解在0.5 ml 盐酸（0.1N）中以得到所需的终产物（化合物9）。25 °C 黑暗中半小时后，将原种溶液保持在冰上，然后用含有突变RNase的试验缓冲液稀释样品份。

5 按如下从尿苷制备化合物（7）：

2'3'-O-甲氧基亚乙基尿苷（化合物1）

20 °C 将尿苷（5mg），对甲苯磺酸单水合物（1g）和三甲基正乙酸（15ml）一起搅拌16小时。用甲醇甲醇钠使反应混合物呈弱碱性，然后浓缩成胶。氯仿/甲醇混合物作为洗脱剂，并开始以96：4（体积），然后以92：8的比例在硅胶（Merck 9385）上进行柱层析来纯化所需的产物。

NMR (DMSO_d6) : (δ) 11.38 (s,1H); 7.75 (d,1H); 5.95(d) and 5.80(d, total 1H); 5.62(d,1H); 4.70-5.10(m,3H); 4.18(q) and 4.04(q, total 1H); 3.60(m,2H); 3.15(s) and 3.28(s, total 3H); 1.57(s) and 1.49 (s, total 3H).

15

5'-叠氮基-5'-脱氧-2'3'-O-甲氧基亚乙基尿苷（化合物2）

0 °C，向干吡啶（80ml）中2'3'-O-甲氧基亚乙基尿苷（7.0g, 23.3mmol）的溶液中加入甲磺酰氯（1.9 ml, 24mmol）。在4 °C 搅拌16小时后，真空蒸发掉溶剂，用水洗去溶解在氯仿中的残留物。分离有机层，干燥并浓缩以得到粗甲磺酰化物（mesylate）。

20 将粗反应产物溶解在干二甲甲酰胺（100ml）中，加入叠氮化钠（3.25 g 50mmol）。将混合物在85 °C 搅拌7小时，然后真空蒸发掉溶剂以得到溶解在氯仿中的胶然后用碳酸氢钠溶液洗涤。分离氯仿提取物，在无水硫酸钠上干燥，并浓缩以得到粗5'-叠氮基产物。用粗叠氮中间产物作为

25 下一步的起始物质。

3'-O（和2'-O）-乙酰基-5'-叠氮基-5'-脱氧尿苷（化合物3）

15 将粗叠氮化物（化合物2，上述）溶解在乙酸（70%）（100ml）中，15分钟后，减压除去溶剂。将残留物重复溶解在纯乙醇中，并浓缩以除去最后的痕量乙酸。该过程得到为2'和3'-区异构体（regioisomer）

30 混合物的所需产物的粗样品。

在DMSO_d6中，2'乙酰氧基与3'乙酰氧基的比例为2：1的NMR：

(δ) 11.40 (s,1H); 7.70(d,1H);

5.60-5.95(m,3H); 5.22(t,0.33H); 5.03(dd, 0.66H); 4.41 (q,0.66H); 4.24(q,0.33H); 4.14

(q,0.66H); 3.94(m,0.33H); 3.62(m,2H); 2.08(s,0.66H); 2.06(s,0.33H).

5

3'-O (和 2'-O) -乙酰基-5'-叠氮基-5'-脱氧-2'-O (和 3'-O) -四氢吡喃尿苷

10 将来自前述反应的粗乙酸盐溶解在干二氯甲烷 (80ml) 中。将而氢吡喃 (6ml) 加对甲苯磺酸单水合物 (500mg) 加到反应烧瓶中。将混合物在 25 °C 搅拌 3 小时, 此后 tlc 表明已经消耗了起始物质。用二氯甲烷稀释反应混合物, 用碳酸氢钠溶液洗涤, 在加压蒸发前干燥有机层。用氯仿/甲烷为洗脱剂 (先是 97: 3 体积, 然后 95: 5) 在硅胶柱上纯化粗产物 (2'和 3'-区异构体的混合物)。

5'-氨基-5'-脱氧-2'-O (和 3'-O) -四氢吡喃尿苷 (化合物 4)

15 将来自前述反应的叠氮化物中间产物溶解四氢吡喃 (100ml) 中并加入三苯膦 (6.5g 25mmol), 然后加入水 (0.45ml)。在 25 °C 搅拌 16 小时后, 加入浓缩氨, 然后反应再继续 24 小时。将反应化合物浓缩干并用柱层析 (先用氯仿/甲烷 9: 1, 然后氯仿/甲烷 1: 1) 纯化以得到为 2'和 3'-区异构体混合物的所需产物。

20 5'- (N-苄氧基羰基甘氨酸) 氨基-5'-脱氧-2'-O (和 3'-O) -四氢吡喃尿苷 (化合物 5)

25 向在无水四氢吡喃中的 5'-氨基-5'-脱氧-2'-O (和 3'-O) -四氢吡喃尿苷 (3g) 溶液中加入 N-苄氧基羰基甘氨酸对硝基苯酯 (3.1g, 9.2mmol)。将溶液在 25 °C 搅拌 16 小时, 浓缩成胶, 然后以氯仿/甲醇 (96:6) 为洗脱剂在硅胶上用柱层析纯化。得到为区异构体化合物的所需产物 (3.6g, 75%产率)。

在 DMSO-d₆ 中的 NMR : (δ) 11.36 (s,1H); 8.02(b,1H); 7.70(two d,1H); 7.32(m,6H); 5.90(d) and 5.70(d, total 1H); 5.64 (d, 1H); 5.444(d) and 5.20(d,total 1H); 5.02(s,2H); 4.75(m,1H); 3.20-4.25 (m, 9H); 1.35-1.80 (m, 6H).

30

质谱 (FAB), m/e 519 (M+H⁺). C₂₄H₃₀N₄O₉ 需要 M + 518。

上述产物的 3'-O (和 2'-O) 亚磷酰胺衍生物

向在干燥二氯甲烷 (30ml) 中的来自上述反应产物 (1.9g 3.67mmol) 和二异丙基乙胺 (1.5ml) 的溶液中加入 N,N - 二异丙基甲基 phosphonamidic 氯化物。在 25 °C 搅拌 5 小时后, 用氯仿稀释反应物, 然后用碳酸氢钠水溶液洗涤。分离氯仿抽提物, 干燥并浓缩成胶。用下列洗脱剂 (氯仿/三乙胺 98: 2, 然后氯仿/三乙胺/甲醇 96: 2: 2) 用柱层析纯化粗混合物以得到含中间产物的所需磷 (1.9g)。

全保护的磷酸盐中间产物 (化合物 6)

来自上述反应的亚磷酰胺和在干燥乙腈 (40ml) 中的 4 - 二丙基氨基酚 (0.7g, 3.6mmol) 溶液中加入四唑 (0.5g, 7.2mmol)。在 25 °C 黑暗中搅拌 16 小时后, 加入叔丁基氢过氧化物 (70%, 0.4 ml)。15 分钟后, 浓缩反应混合物, 溶解在氯仿中, 然后用碳酸氢钠水溶液洗涤。分离氯仿层, 干燥然后浓缩成胶。用乙酸乙酯, 然后用乙酸乙酯/甲醇 (93: 7 体积) 在硅胶上经柱层析纯化。蒸发适宜的馏份得到为 2'和 3' - 区异构体混合物的产物 (1.5g)。

DMSO-d₆ 中的 NMR:

(δ) 11.43 (s, 1H); 8.10(b, 1H); 7.75(m, 1H); 7.45(m, 1H); 7.35(s, 5H); 7.00(m, 2H); 6.60(m, 2H); 5.90(m, 1H); 5.69 (m, 1H); 5.17(m) and 4.97(m, total 1H); 5.02 (s, 2H); 4.69(bs) and 4.57(bs, total 1H); 4.53(m) and 4.23 (m, total 1H); 4.08(m, 1H); 3.15-3.85 (m, 13H); 1.35-1.75 (m, 10H); 0.88 (t, 6H)。

质谱 (FAB) .m/e. 787 (M+) 和 788 (M + + H)。C₃₇H₅₀N₅O₁₂P 需要 M + 787。

25 THP 保护的 药物前体类似物 (化合物 7)

在加入 20 % 钨碳 (150mg) 前, 将来自前反应的全保护的中间产物 (1mmol) 溶解在乙醇 (20ml) 环己烷 (10ml)。将混合物回流 1 小时, 然后在减压浓缩前过滤。用氯仿/甲烷 (9: 1) 为洗脱剂, 在硅胶上用柱层析纯化所得的胶以得到游离甘氨酸衍生物。

30 接着将甲基保护的磷酸盐 (1mmol) 溶解在叔丁胺 (30ml) 中。将反应混合物回流 16 小时, 浓缩, 然后用氯仿/甲烷 (9: 1) 然后用氯仿/甲烷 (7: 3) 为洗脱剂, 在硅胶上用柱层析纯化以得到为 2'&3' 区异构

体混合物的 THP 保护的 药物前体类似物。

用高盐液相色谱分离 2'和 3' 区异构体

在 Partisil ODS-2 柱通过 HPLC, 用 60: 40 甲醇/甲酸胺 (0.1M) 经 isocratic 洗脱完成分离。收集适宜的馏份, 然后冷冻干燥以得到所需的 3'连接的中间产物 (7); 参见图 9 中的结构。

DMSO-d₆ 中的 NMR :

(δ) 8.85 (s,1H): 8.25 (s,1H): 7.75 (d,1H); 6.95 (d,2H): 6.5 (d,2H); 5.85 (d,1H): 5.6 (d,1H): 4.5 (m, 2H): 4.3 (m,1H): 4.07 (m,1H); 3.2-3.6 (m,6H): 3.1 (m, 4H); 1.2-1.6 (m, 10H): 0.8 (m,6H).

10

参考实施例 7

合成胞苷药物前体类似物 (见图 10 的流程图)

胞苷药物前体类似物 (化合物 13) 的制备与参考实施例 6 中所述的尿苷化合物的制备类似。沿用参考实施例 6 中的方法, 除用化合物 12 (图 10) 代替化合物 7 (图 9) 外。

标准方法: 真空浓缩反应混合物, 溶解在 CHCl₃ 中, 用 NaHCO₃ 洗涤, 在 NaSO₄ 上干燥, 过滤并浓缩。用表明的溶剂混合物经闪烁柱层析纯化。

按如下制备化合物 12 (参见图 10)

按照 D. P. L. Green, T Ravindranathan, C B Reese and R Saffhill, Tetrahedron 26, 1031 (1970) 制备 N⁴-苄基-2'3'-O-甲氧基亚乙基胞苷 (化合物 1)。按如下制备 N⁴-苄基-5'-O-2'3'-O-甲氧基亚乙基胞苷 (化合物 2)。

于 0 °C 向在吡啶 (100ml) 中的 N⁴-苄基-2'3'-O-甲氧基亚乙基胞苷 (9.85g 25.0mmol) 的搅拌溶液中加入甲磺酰氯 (1.9ml, 25mmol)。在 25 °C 搅拌 16 小时后, 在真空下浓缩溶液, 再溶解在氯仿中然后用碳酸氢钠水溶液洗涤有机层, 从而加工反应混合物。分离氯仿层, 在硫酸钠上干燥, 然后浓度得到产物。

按如下制备 3'-O-乙酰基 5'-叠氮基-N⁴-苄基-5'脱氧胞苷 (与 2'-O-乙酰基异构体的混合物) (化合物 3)。

将粗 甲磺酰化物 (化合物 2) 溶解在无水 DMF (100ml) 中加入叠氮化物 (3.25g, 50mM), 将反应混合物在 80 °C 搅拌 7 小时。通过浓缩溶剂, 再溶解在氯仿中, 然后用碳酸氢钠溶液洗涤氯仿抽提物来完成反应。

将浓缩干燥氯仿层得到的残留物溶解在 120ml 70%HOAc 中。15 分钟后，真空去除溶剂，用柱层析（95：5 氯仿/甲醇，然后 92：8 氯仿/甲醇）纯化粗产物。所需产物的产率为 6g。

按如下制备 3'-O-乙酰基 5'-叠氮基-N⁴-苄基-2'-O-四氢吡喃基-5'-脱氧胞苷(与 3'-O-四氢吡喃基异构体的混合物)(化合物 4)。

将来自上述实施例的化合物 3 (6g) 溶解在二氯甲烷 (100ml) 和二氢吡喃 (4ml) 中。加入 0.5g 对甲苯磺酸单水合物后，将混合物在 25 °C 搅拌 16 小时。完成与上述相似的过程，得到用 98：2 氯仿/甲醇洗脱的经柱层析纯化的粗产物，以得到所需的产物。

10 按如下制备 5'-叠氮基-5'-脱氧-2'-O-四氢吡喃胞苷(与 3'-O-四氢吡喃基异构体的混合物)(化合物 5)。

将乙酸盐(化合物 4, 9.0g 不纯的)溶解在甲醇 (60ml) 中，加入甲氧化钠 (3.5g)。在 25 °C 搅拌 1 小时后，浓缩反应混合物，用闪烁柱层析纯化。产率 3.7g。

15 注意：在该阶段(以及接下来的大部分步骤中)可以用层析分离 2'和 3'异构体。

按如下制备 5'-叠氮基-N⁴-苄氧羰基-5'-脱氧-2'-O-四氢吡喃胞苷(与 3'-O-四氢吡喃基异构体的混合物)(化合物 6)。

20 将胞苷混合物(化合物 5, 3.7g)溶解在无水吡啶 (80ml) 中，加入催化量的二甲基氨基-吡啶 (DMAP) 和 2ml Z-Cl。25 °C 搅拌 16 小时后，完成反应，在硅胶上，(CHCl₃/MeOH, 95：5) 为洗脱剂，用柱层析纯化产物。得到 2.3g 的产物。

按如下制备 5'-(N-苄氧羰基)氨基-5'-脱氧-2'-O-四氢吡喃胞苷(与 3'-O-四氢吡喃基异构体的混合物)(化合物 7)。

25 将在 THF (30ml) 中的叠氮化物(化合物 6, 3.06g)于三苯膦 (1.7g) 在 50 °C 一起搅拌 24 小时。加入水 (5ml)，在 50 °C 再继续搅拌 1 小时。浓缩反应混合物，用(先 CHCl₃/MeOH 9：1，然后 1：1，最后 100 % MeOH) 在硅胶柱上纯化，得到 0.9g 产物。

30 按如下制备 N⁴-苄氧羰基-5'-(N-苄氧羰基甘氨酸)氨基-5'-脱氧-2'-O-四氢吡喃胞苷(与 3'-O-四氢吡喃基异构体的混合物)(化合物 8)。

将胺(化合物 7.09g)溶解在无水二氯甲烷 (30ml) 中，加入对硝基

苯 - N - 羧苄氧基 - 甘氨酸盐 (700mg) 中。在 25 °C 搅拌 16 小时后, 浓缩反应混合物, 用 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 97 : 3, 然后 95 : 5) 的柱层析纯化, 得到 1g 所需物质。

按如下制备 N4 - 苄氧基羰基 - 5' - N (苄氧基羰基甘氨酸) 氨基 - 5' 脱氧 - 2' - O 四氢吡喃胞苷基 - 3' - (N, N - 二异丙基甲基) 亚磷酰胺, (与 3' 异构体的混合物) (化合物 9) 。

将醇 (化合物 8, 1g) 溶解在无水二氯甲烷 (30ml) 中, 加入 $\text{EtN}(\text{iPr})_2$ (1.7ml), 然后加入 $\text{Cl-P}(\text{OMe})\text{N}(\text{iPr})_2$ (34ml)。在 25 °C 搅拌 6 小时后, 在硅胶上用 ($\text{CHCl}_3/\text{Et}_3\text{N}$ 98 : 2, 然后 $\text{CHCl}_3/\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$ 97 : 2 : 1) 柱层析纯化完成的混合物。得到 1.1g 产物。

按如下制备 (甲基) (4 - N, N - 二丙基氨基苯基) [N4 - 苄氧基羰基 - 5' (N - 苄氧基羰基甘氨酸) 氨基 - 5' - 脱氧 - 2' - O - 四氢吡喃胞苷基 - 3'] - 磷酸盐 (与 3' 异构体的混合物) (化合物 10) 。

将亚磷酰胺 (化合物 9, 1.1g) 溶解在无水乙腈 (30ml) 中, 加入 4 - N, N - 二丙基氨基酚 (200mg), 加入四唑 (420mg)。在 25 °C 搅拌 16 小时后, 加入 70 % 叔 - 丁基氢过氧化物 (0.3ml)。15 分钟后, 反应混合物完成反应, 用 EtOAc , 然后用 EtOAc/MeOH 97 : 3 洗脱, 在硅胶柱层析上纯化粗产物, 得到 0.85g 产物。

按如下制备 (甲基) (4 - N, N - 二丙基氨基苯基) (5' - 脱氧 - 5 - 甘氨酸氨基胞苷基 - 3') - 磷酸盐 (与 3' 异构体的混合物) (化合物 11) 。

将顺 - 羧苄氧基保护的化合物 (化合物 10, 0.85g) 溶解在乙醇 (30ml) 和环己烷 (15ml) 中。加入 $\text{Pd-C}20\%$ (400mg), 将搅拌的混合物加热回流 4 小时。过滤后, 浓缩溶液在硅胶上用: 首先 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95 : 5, 然后 5 : 1, 最后 100 % MeOH 洗脱, 经柱层析纯化。得到 100mg 产物。

按如下制备 (4 - N, N - 二丙基氨基苯基) (5' - 脱氧 - 5 - 甘氨酸氨基 - 2' - O - 四氢吡喃胞苷基 - 3') - 磷酸氢盐 (化合物 12) 。

将磷酸盐 (化合物 11, 100mg) 溶解在叔 - 丁胺 (25ml) 中, 然后加热回流 8 小时。浓缩后, 用 HPLC 纯化产物 (Magnum 20 反相柱, 洗脱剂 $\text{MeOH}/0.1\text{M}$ 甲酸胺, 比率为 60 : 40) 。

NMR (DMS-d_6) :

NMR (DMSO_{d6}): (δ) 9.1 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.6 (d, 1H), 7.2 (m, 3H), 6.95 (d, 2H), 6.45 (d, 2H), 5.8 (d, 1H), 5.72 (d, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.1 (m, 1H), 3.8 (t, 1H), 3.7-3.15 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.35-3.5 (m, 1H), 3.0 (m, 4H), 1.8-1.2 (m, 10H), 0.8 (m, 6H).

质谱 FAB MS [MH⁺] 639

参考实施例 8

将 A5B7F(ab')₂-BP-RNase 结合物定位于 LoVo 肿瘤异种移植

10 按参考实施例 4 中所述制备的鼠 A5B7F(ab')₂-BP-RNase 结合物用 IODOGENTM 试剂 (Pierce and Warriner (UK) Ltd. Chester England), 按照制造商说明的方法, 经无载体 ¹²⁵I 放射碘化。用 Lindmo 等人, J. Immunol. Meth, 72, 77-89 1984 中的方法, 通过与 LoVo 肿瘤细胞的结合来确定放射碘化后, >50% 免疫活性的体外保留。将含 10uCi ¹²⁵I 的约 10ug
15 结合物静脉内注射到带建立的 LoVo 肿瘤异种移植物的无毛无胸腺小鼠 (nu/nu; Al[k[outbred]) (预先皮下注射 7 天 1 × 10⁷ LoVo 肿瘤细胞。注射结合物后, 在此后的不同时间杀死小鼠, 取出肿瘤, 血液样品和其它组织, 称重, 用 γ 计数器技术。结合物在肿瘤和组织中的分布如下。

A5B7F(ab')₂-BP-RNase 的肿瘤和组织定位

20	组织	4 小时	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时
	肿瘤	2.54	3.27	1.00	0.66	0.41
	血液	6.38	1.06	0.25	0.12	0.06
	肝	1.81	0.62	0.12	0.07	0.06
	肾	2.76	0.55	0.23	0.18	0.11
25	肺	2.85	0.28	0.15	0.09	0.08

单位 = % 注射剂量/g 组织; 结果是来自 3 个小鼠的平均值。

30 结果清除地表明 A5B7F(ab')₂-BP-RNase 结合物特异性地定位于 LoVo 异种移植。在 24 小时以上, 与保护血液的任何其它组织相比, 在肿瘤中的结合物/g 组织都更多。肿瘤中结合物的水平与用 A5B7F(ab')₂-CPG2 结合物 (Blakey 等人, Br. J. Cancer. 69 补充 XX1, p14, 1994) 达到的相似。已经表明用该 CPG2 结合物的水平足以与氮芥药物前体结合以便导致肿瘤退化, 而且延长了在 LoVo 异种移植模型中的生长延迟 (Blakey

等人, Br. J. Cancer. 69 补充 XX1, p14, 1994; Blakey 等人, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 35p507, 1994)。

参考实施例 9

5 合成马尿酸 - L - 谷氨酸 (见图 28)

马尿酸 - L - 谷氨酸二苄酯 (化合物 3) (2.06 g, 4.2×10^{-3} moles) 和 30% 钨碳 (50% 半体) (0.77 g) 于 THF 中于氢气气氛中搅拌 1.5 小时。用 Cel. 4e™ 过滤混合物, 将滤液蒸发。用乙醚研制得到白色晶体 1.02g (78%) 终产物。熔点 169 - 171 °C。20D = -2.5°

10 NMR DMSO d6 12.3. 2H (broad); 8.7. 1H (t); 8.2. 1H (t); 7.9. 2H (m); 7.5. 3H (m); 4.3. 1H (m); 3.9. 2H (m); 2.3. 2H (t); 1.9. 2H (m)

按如下制备起始物质化合物 3。向在 DMF (35ml) 中的马尿酸 (0.90g, 5×10^{-3} mol) 和 L - 谷氨酸二苄基酯 (2.50g, 5×10^{-3} mol) 溶液
15 中加入 1 - 羟基苯并三唑 (0.73g, 5.5×10^{-3} mol), 三乙胺 (1.05g, 9.7×10^{-3} mol) 和 1 (3 - 二甲基 - 氨基丙基) 3 - 乙基碳化二亚胺 HCl 盐 (1.05g, 5.5×10^{-3} mol)。在室温将混合物搅拌过夜, 倒到水 (400ml) 中, 用乙酸乙酯 (100ml) 抽提两次。用饱和碳酸氢钠溶液, 水, 2N HCl 和水洗涤混合的抽提物。在 MgSO₄ 上干燥有机相, 蒸发达到为黄色油的起
20 始物质, 2.96g (84%)。

NMR DMSO d6 8.7. 1H (t); 8.4. 1H (d); 7.9. 2H (m); 7.5. 3H (m); 7.35. 10H (m); 5.15. 2H (s); 5.05. 2H (s); 4.4. 1H (m); 3.9. 2H (t); 2.0. 4H (m)

参考实施例 10

25 合成马尿酸 - L - 天冬氨酸

氢气中搅拌在 THF 中的马尿酸 - L - 谷氨酸二苄基酯 (1.28g, 2.7×10^{-3} mol) 和 30% Pd/碳 (50% 湿度) (0.51g) 3 小时。通过 Celite™ 过滤混合物, 然后将过滤物蒸发干燥。与二乙基醚研制得到所需的终产物, 为灰白色晶体固体 0.62g (78%)。熔点 200 - 202 °C。20D = + 7.9°。

30 NMR DMSO d6 12.5. 2H (broad); 8.7. 1H (t); 8.2. 1H (d); 7.7. 2H (m); 7.5. 3H (m); 4.6. 1H (m); 3.9. 2H (d); 2.7. 2H (m)

按如下合成起始物质。向在 DMF (35ml) 中的马尿酸 (0.90g, 5×10^{-3} mol) 和 L - 天冬氨酸二苄基酯 (2.31g, 5×10^{-3} mol) 溶液中加入 1 - 羟基苯并三唑 (0.73g, 5.5×10^{-3} mol), 三乙胺 (1.05g, 9.7×10^{-3} mol) 和 1 (3 - 二甲基 - 氨基丙基) 3 - 乙基碳化二亚胺 HCl 盐 (1.05g, 5.5×10^{-3} mol) 。在室温将混合物搅拌 4 小时, 倒到水 (450ml) 中, 用乙酸乙酯 (100ml) 抽提两次。用饱和碳酸氢钠溶液, 水, 2N HCl 和水洗涤混合的抽提物。在 $MgSO_4$ 上干燥有机相, 蒸发得到为黄色油的起始物质, 1.90g (80%)。

10 NMR DMSO d6 8.7. 1H, (t); 8.45. 1H, (d); 7.9, 2H (m); 7.5. 3H (m); 7.3. 10H (m); 5.15. 2H (s); 5.05. 2H (s); 4.8. 1H (m); 3.9. 2H (m); 2.9. 2H (m)

参考实施例 11

重组 HCPB 对 Hipp-Arg 的酶活性

15 用分光光度检测法检测纯化人 CPB (按参考实施例 20 中所述生产的) 将马尿酸 - L - 精氨酸 (Hipp-Arg) 转变成马尿酸的能力。

用浓度为 0.75-0.125 mM 的 Hipp-Arg 和酶浓度为 1 μ g/ml 的 CPB, 在 254nm 通过 Hipp-Arg 转变成马尿酸的起始速率来确定天然 HCPB 的 K_m 和 k_{cat} 。37 °C, 用 Perkin Elmer λ 2 分光光度计, 使用 1 cm 径长小瓶用 1.0 的总体积在 0.25 mM Tris HCl 缓冲液, pH7.5 中完成测量。用 20 ENZFOTTER™ 软件程序 (Biosoft™, Perkin Elmer) 计算 K_m 和 V_{max} 值。用 V_{max} 除以反应混合物中的酶浓度来计算 K_{cat} 。

人 CPB 抗 Hipp-Arg 的结果是:

$$K_m = 0.18 \text{ mM}$$

$$K_{cat} = 65 \text{ s}^{-1}$$

25 结果表明重组 HCPB 有酶活性而且可以裂解 Hipp-Arg 中的酰胺键释放马尿酸。

参考实施例 12

合成精氨酸氮芥药物前体 (见图 27)

30 (2S), 2-(3-(4-[双-(2-氯乙基)-氨基]-苯氧基羰基)-丙酰基-氨基)-5-胍基-戊酸 (化合物 5c, 图 27)

在 Paar 装置中, 以 80psi 将在含 10 % Pd/C (200mg) 的乙酸乙酯

/MeOH (1/1; V/V) 中的 (2S), 2-(3-(4-[双-(2-氯乙基)-氨基]-苯氧基羰基)-丙酰基-氨基)-5-(2-硝基)-胍基-戊酸苄酯(化合物 4c, 图 27) (275 mg; 0.44mmol) 氢化 6 小时。过滤后, 蒸发有机层。用 CH₂Cl₂/二乙酯将所得的油再结晶以得到为白色固体的所需化合物 5c (180mg), 产率 84%。

5

¹HNMR (CD₃OD): 1.55-1.7 (m, 3H); 1.8-1.9 (m, 1H); 2.6-2.7 (m, 2H); 2.75-2.85 (m, 1H); 2.9-2.95 (m, 1H); 3.1-3.2 (m, 2H); 3.6-3.7 (m, 4H); 3.7-3.8 (m, 4H); 4.3 (dd, 1H); 6.75 (dd, 2H); 6.95 (dd, 2H).

MS (ESI): 512 - 514 (MNa) +

10

Ana1 (C₂₀H₂₉N₅O₄Cl₂1.5H₂O)

计算值 C: 47.91 H: 6.43 N: 13.97

实测值 C: 47.7 H: 6.21 N: 14.26

按如下制备起始物质化合物 4c。向在 CHCl₃ (10ml) 中的 (2S), 2-氨基-5-(2-硝基)-胍基-戊酸苄酯 (化合物 2c) (654mg; 1mmol) 溶液加入二氢吡喃 2, 5-二酮 (化合物 1) (120mg; 2mmol), 然后逐滴加入三乙胺 (202mg; 2mmol)。在室温搅拌 2 小时后, 蒸发溶剂, 将粗残留物溶解在水中。用 2NHCl 将 pH 调整到 2.5。用乙酸乙酯抽提水层。用盐水洗涤有机层, 干燥 (MgSO₄), 蒸发以得到 (2S), 2-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-(2-硝基)-胍基-戊酸苄酯 (化合物 3c)。用二乙醚研制所得的固体, 过滤掉: 280mg (68%)。

15

¹HNMR (CD₃OD): 1.52-1.68 (m, 2H); 1.7-1.8 (m, 1H); 1.85-1.95 (m, 1H); 2.45-2.7 (m, 4H);

3.15-3.3 (m, 2H); 4.5 (m, 1H); 5.15 (dd, 2H); 7.25-7.4 (m, 5H)

MS (ESI): 432 (MNa) +

25

向在 CHCl₃ (5 ml) 中的化合物 3c (204mg; 0.5mmol) 悬浮液中加入 4-[双(2-氯乙基)氨基]-酚 (化合物 6), EDCI (19mg; 0.5mmol), 然后加入 DMAP (18mg; 0.75mmol)。在室温搅拌 6 小时, 蒸发溶剂。在乙酸乙酯和水之间分离残留物, 然后用 2NHCl 将水相酸化到 pH=3。用乙酸乙酯抽提后, 用盐水洗涤有机层, 干燥 (MgSO₄), 蒸发。用 CH₂Cl₂/MeOH (95/5; V/V) 为洗脱剂用闪层析纯化残留物以得到为白色泡沫的所需起始物质 (281mg), 产率 90%。

30

4c: ¹H NMR (CD₃OD): 1.55-1.7 (m, 2H); 1.7-1.8 (m, 1H); 1.85-1.95 (m, 1H); 2.55-2.75 (m, 2H); 2.8-2.9 (m, 2H); 3.15-3.25 (m, 2H); 3.6-3.7 (m, 4H); 3.7-3.8 (m, 4H); 4.5 (dd, 1H); 5.15 (dd, 2H); 6.7 (d, 2H); 6.95 (d, 2H); 7.32 (m, 5H)

5

MS (ESI): 647 - 649 [MNa]⁺

参考实施例 13

合成琥珀酸单 - (4-[N, N-双(2-氯乙基)-氨基]-苯基) 酯 (本文也称为中间产物)

10 搅拌下, 向在 CHCl₃ (10ml) 中的琥珀酸酐 (225mg; 2.25mmol) 悬浮液中加入 4-[N, N-顺(2-氯乙基)-氨基] 酚 (化合物 6, 图 27, 203 mg; 0.75mmol), 然后加入三乙胺 (75mg, 0.75 mmol)。搅拌化合物过夜, 蒸发溶剂。将粗残留物溶解在 EtOAc/Et₂O/H₂O 中, 搅拌下, 将 pH 调到
15 3。用水, 盐水洗涤有机层, 干燥 (MgSO₄), 蒸发。从 Et₂O/环己烷中结晶所得的油, 过滤出白色固体, 真空下干燥以得到所需的终产物 (210mg; 产率 83%)。熔点 98 - 100 °C。

MS (ESI): 356 - 358 [MNa]⁺

20

¹H NMR (CDCl₃): 2.8 (dd, 2H); 2.9 (dd, 2H); 3.65 (dd, 4H); 3.75 (dd, 4H); 6.65 (d, 2H); 7.0 (d, 2H)

分析 (C₁₄H₁₇Cl₂O₄N_{0.2}H₂O):

计算值: % C: 49.78 H: 5.19 N: 4.15

实测值: % C: 49.9 H: 5.3 N: 4.2

25

参考实施例 14

克隆人胰羧肽酶 B (HCPB)

按 Maniatis 等人 (1989) 分子克隆, 实验室操作手册: 第 2 版, ; 冷泉港实验室, 冷泉港纽约所述, 或按特定产物的制造商提供的方法说明
30 完成标准分子生物学技术, 如限制酶消化, 连接, 激酶反应, 去磷酸化, 聚合酶链反应 (PCR), 细菌转化, 凝胶电泳, 缓冲液制备和 DNA 产生, 纯化和分离。在大多数情况下, 从 New England Biolabs 或其它供应商处

购买酶, 可以使用等价的过程。用 Applied Biosystems 380A DNA 合成仪, 按照 Applied Biosystems Inc. 提供的方法, 从 5'二甲氧基三甲苯游基饱和的核苷-2-氰乙基-N, N'-二异丙基-亚磷酰胺和与在 0.2 umol 规模上控制孔玻璃支持物相连的被保护的核苷制备寡核苷酸序列。

5 用 PCR 技术, 从克隆在 λ gt10 载体 (Clontech. Human 胰 5'STRETCH cDNA. HL1163a) 中的人胰 cDNA 文库得到编码人胰羧肽酶 B 的序列, 然后克隆到质粒载体 (Stratagene)。

通常, 将一份 cDNA 文库样品 (滴度 $>10^8$ pfu/ml, 5ul) 与 100 pmol 的两种寡核苷酸引物 BPT1 和 BPB1 (SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 47), 10 终浓度为 200uM 的 dNTP, Taq 聚合酶反应缓冲液以及终体积为 100ul 的 2.5 U Taq 聚合酶混合。在加入 Taq 酶前, 将混合物加热到 94 °C 10 分钟, 用 30 个循环的 94 °C 1.5 分钟, 50 °C 2 分钟, 和 72 °C 2 分钟, 然后在反应结束时再在 72 °C 保温 9.9 分钟来完成 PCR 保温。

设计这两种寡核苷酸引物, 以使 PCR 从 BPT1 基因 (SEQ ID NO: 46) 15 的 5' (在前序列起始和原序列起始之间) 延伸, 然后 BPB1 基因 (SEQ ID NO: 47) 的 3' 末端 PCR 延伸回来, 如图 18 所示。还设计 BPT1 和 BPB1 分别将特有的限制位点 SacI 和 XhoI 导入到 PCR 产物中。

用琼脂糖凝胶电泳分析一份 PCR 产物 DNA 的正确大小 (约 1250bp), 发现明显含有正确大小的带。纯化来自反应混合物的其它产物, 用 20 Centricon™100 微浓缩柱 (Amicon) 从过量试剂中分离, 然后用乙醇/乙酸钠沉淀分离 DNA, 离心, 真空干燥然后再悬浮在蒸馏水中。用限制酶 SacI 和 XhoI 限制消化分离的 DNA, 纯化正确大小的带 (约 1250 个碱基对), 然后切下并用 glass-milk (Geneclean™, Stratec Scientific, 或其它相似的产物) 从琼脂糖凝胶电泳中分离。

25 用 SacI 酶限制消化 pBluescript™ II KS+ 双链 DNA (Stratagene), 用牛肠碱性磷酸酶处理, 使产物去磷酸化以除去 5' 磷酸基团, 减少转化后的再连接和载体背景。用 glass-milk 从酶反应污染物中纯化 DNA 产物, 然后用 XhoI 酶限制消化。通过切下和玻璃奶 (Geneclean™, Stratec Scientific, 或其它相似的产物) 用琼脂糖凝胶电泳纯化并分离正确大小 30 的 DNA (约 2850 个碱基对)。

通过与已知标准比较, 用琼脂糖凝胶电泳检测限制并纯化的 DNA 样品的纯度和浓度。从这些估计中制备连接混合物以便在存在 T4DNA 连接酶,

1mM ATP 和酶缓冲液的情况下, 以载体与插入片段的摩尔比为约 1: 2.5 (1 pBluescript™ II KS+: 2.5 HCPB PCR 产物), DNA 终浓度为约 2.5 ng/ul 将 HCPB 基因克隆到载体中。

5 连接反应后, 用 DNA 混合物转化 E. coli 菌株 DH5 α (Gibco-BRL, 最大效力的感受态细胞)。将细胞铺在含有用 100ug/ml 氨苄青霉素筛选质粒的 L - 琼脂营养培养基上, 在 37 °C 保温过夜。通过增加鉴定含带有所需插入片的菌落。

10 检出约 200 个菌落, 一式两份铺在无菌硝酸纤维素滤纸 (Schleicher and Shull) 上, 在含用 100ug/ml 氨苄青霉素筛选质粒载体的 L - 琼脂营养培养基上预湿, 在 37 °C 保温过夜。将一式两份平板于 4 °C 贮存, 作为菌落的活细胞源, 处理其它平板变性, 将来自个体菌落的 DNA 固定到硝酸纤维素上。从琼脂平板中取出硝酸纤维素滤纸, 连续放在以如下方式浸渍的 Whatman™ 滤纸上:

- 1 10 % SDS 2 分钟
- 15 2 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl 7 分钟
- 3 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl 4 分钟
- 4 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl 2 分钟
- 5 0.5M, Tris pH7.4, 1.5 M NaCl 2 分钟
- 6 (标准盐柠檬酸盐) 2 分钟

20 然后将滤纸放在浸在 10xSSC 中的 Whatman™ 滤纸上, 通过紫外光处理, 将变性的 DNA 与硝酸纤维素交联 (Spectrolinker™ XL-1500 UV 交联器)。然后在室温使滤纸空气干燥, 在 6xSSC 溶液中于 60 °C 预杂交 1 小时, 同时缓慢搅拌 (例如用 Techne HB-1D 杂交仪)。预杂交阻断在滤纸上的非特异性 DNA 结合位点。

25 为了确定哪些菌落含有所需的 DNA 插入片段, 将与硝酸纤维素滤纸交联的 DNA 与用从胰 cDNA 文库的 HCPB PCR 产物 (见上述) 制备的放射性标记的 ³²P - DNA 探针杂交。用在 50ul 总体积中的 T7 DNA 聚合酶, 经 50uCi ³²P-dCTP (~ 3000Ci/mmol) 标记约 50ng 的 DNA (Pharmacia T7 Quickprime 试剂盒), 使反应在 37 °C 进行 15 分钟。然后将标记的探针加热到 95 °C 2
30 分钟以使双链 DNA 变性, 随即加到 60 °C 的 6xSSC 中, 用该溶液代替在滤纸上的预杂交溶液。在 60 °C 再继续搅拌保温约 3 小时。此后, 倒掉杂交溶液, 在 60 °C 用 2xSSC 洗涤滤纸, 每次 15 分钟。然后缓慢印干滤纸, 用

黏附胶片 (Saran™ wrap 或相似的) 覆盖, 在室温下透过 X - 线胶片 (例如柯达 Xomat™ -AR5) 暴露过夜。胶片显色后, 鉴定含所需插入片段的菌落是在 X - 线胶片下, 有最强暴露 (最暗的点) 的那些。从中选出 12 个菌落用于进一步筛选。从两份滤纸中检出这些菌落划痕, 然后在含 5 100ug/ml 氨苄青霉素的 L - 肉汤营养培养基中生长。

用引物 BPT1 和 BPB1 (SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 47), 用内引物 BPT1 (SEQ ID NO: 48) 和 BPB1 引发, 经 PCR 检测所选分离物有正确大小的插入片段。设计 BPT2 在原序列的末端, 成熟基因开始前引发并导入 XbaI 位点。为了进行 PCR 筛选, 检出所选的分离物菌落, 然后分散在 200ul 蒸馏水中, 在密封的 Eppendorf™ 试管中在 100 °C 加热 10 分钟。在微离心管中, 将悬浮液离心 10 分钟以沉淀细胞碎片, 然后在 PCR 中用 1ul 的上清液作为 DNA 模板。通常, 将 1ul 的上清液与 20 pmol 的两种寡核苷酸引物 BPT1 和 BPB1, 或 BPT2 和 BPB1, 终浓度为 200 uM 的 dNTP, Taq 聚合酶缓冲液, 0.5U 在 20ul 终体积中的 Taq 聚合酶混合。用 25 个循环的 94 °C 1.5 分钟, 50 °C 2 分钟, 72 °C 2 分钟, 然后再在反应结束时 72 °C 9.9 分钟来完成 PCR 反应。10 15

用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物是否有正确大小的 DNA (来自引物 BPT1 到 BPB1 的约 1250 个碱基对, 来自引物 BPT2 到 BPB1 的约 900 个碱基对, 见图 18)。12 个克隆中的 10 个含有带正确大小的 PCR DNA 产物。取 10 个克隆中的 6 个制备质粒 DNA (用 Qiagen Maxi™ 试剂盒, 来自 100ml 在 37 °C 含 100ug/ml 氨苄青霉素的 L - 肉汤的过夜培养物)。然后有 USB Sequenase™ DNA 测序试剂盒, 其中有 T7 DNA 聚合酶, 测定 PCR 产物插入片段上的这些质粒 DNA 制品的序列。用不同的寡核苷酸引物, 已知为 676, 336, 337, 679, 677, 1280, 1279 和 1281 (SEQ ID NO: 48 - 55) 20 测定每个克隆的序列。在图 19 中表明了 HCPB 序列中测序引物的位置, 336, 1279, 676, 1280, 677 和 1281 是“前向的”, 而 337 和 679 是“后向的”。

在并包括 SacI 和 XhoI 限制位点之间, 发现 6 个克隆中的 5 个有相同的序列 (SEQ ID NO: 56) 碱基对, 用该序列进行进一步的试验。在 SEQ ID NO: 57 中列出了 DNA 序列翻译成的其多肽序列, 从成熟蛋白质序列开始标 1。氨基酸 - 95 表明是推测的原酶序列。只有部分酶分泌前导序列 (前序列) 位于克隆的 PCR 成熟的 DNA 中。多肽序列表明在 253 位有一 30

天冬氨酸残基, 当将整个序列与其它哺乳动物羧肽酶 A 和 B 序列相比时, 表明是 B 型特异性 (参见由 Catusus L. 等人标的氨基酸 255, 生物化学期刊 287, 299 - 303, 1992 和讨论)。然而, 克隆序列的 135 位的半胱氨酸残基在其它公开的人胰羧肽酶 B 序列 (如由 Yamamoto 等人, 在生物化学期刊 (Journal of Biological Chemistry, 267, 2575-2581, 1992) 中公开的) 中未观察到, 当与其它哺乳动物胰羧肽酶 B 的氨基酸序列相比时, Yamamoto 表明在其序列中, 表明的 244 位, 有一缺口。图 19 所示也表明在酶识别位点中是天冬氨酸残基的近似位点, 在成熟酶的 135 位的半胱氨酸也是近似位点。

10 将其中一个克隆于 1995 年 11 月 23 日保藏在工业与海洋细菌的国家收集中心 (the National Collectin of Industrial and Marine Bacteria Limited (23 St. Machar Drive , Aberdeen AB21RY. Scotland)), 保藏号为 NCIMB 40694。将来自该克隆的质粒称为 pICI1698。

15 参考实施例 15

在 *E. coli* 中表达成熟 HCPB-(His)₆-c-Myc

为了在 *. coli* 中表达成熟 HCPB, 将来自 pICI1698 的成熟基因转移到可以控制蛋白质产物分泌到细菌胞质中的质粒载体中。已经将在细菌宿主 MSD522 适用于控制表达的该分泌载体, 称为 pICI266 于 1993 年 10 月 11 日保藏在工业与海洋细菌的国家收集中心 (Aberdeen AB21RY. Scotland), 保藏号为 NCIMB 40589。图 20 是 pICI266 的质粒图谱。该质粒有四环素抗性基因 (Tet^h Tet^R), 并导入用于插入基因表达的 AraB 操作子和启动子序列, 用于表达控制的 AraC 基因。启动子后为使在其后的多肽序列进入胞质的 PelB 翻译前导序列。基因克隆位点有数个特有的限制位点, 其后为噬菌体 T4 转录终止序列。图 21 说明了该区的 DNA 序列和基因克隆的特征。

为了将成熟 HCPB 克隆到 pICI266 中, 决定用 PCR 产生 HCPB DNA 并在成熟基因的开始对密码子作些改变以导入 *E. coli* 优选密码子。另外, 为了有助于检测并纯化表达构建体, 将称为 (His)₆-c-myc 的 C - 末端肽 tag 加到酶中。tag 由 6 个组氨酸, 一个三肽接头 (EPE) 和来自抗体 9E10 (由 Evan 等人, 分子细胞生物学 5, 129 - 136, 1985 公开, 并可以从 Cambridge Research Biochemicals 和其它抗体供应商处得到) 识别的

c-myc 的肽序列组成。通过加入一天冬氨酸得到 C - 末端。6 个组氨酸残基使得可以在金属螯合柱（例如 Qiagen 的 Ni-NTA 琼脂糖）上纯化表达的蛋白质。此外，还用 PCR 引物在基因的 5' (FspI) 和 3' (EcoRI) 导入特有的限制位点以便有利于将 PCR 产物导入到表达载体中。两个引物的序列，称为 FSPTS1 和 6HIS9E10R1S1 列在 SEQ ID NO: 58 和 59 中。为了得到用于克隆到 pICI266 中的修饰的基因，在操作约 5ng pICI1698 DNA，终浓度为 200 μ M dNTP，Taq 聚合酶反应缓冲液，和终体积为 100 μ l 2.5U Taq 聚合酶的情况下，用 100 pmol 的引物 FSPTS1 和 6HIS9E10R1S1 完成 PCR。在加入 Taq 酶前，将混合物在 94 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟，用 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 1.5 分钟，50 $^{\circ}$ C 2 分钟，72 $^{\circ}$ C 2 分钟，然后在反应结束时，再在 72 $^{\circ}$ C 保温 9.9 分钟来完成 PCR。用琼脂糖凝胶电泳分析一份 PCR 产物是否有正确大小的 DNA（约 1000 个碱基对），发现明显含有一正确大小的带。用 CentriconTM 100 微离心柱（Amicon），然后通过乙醇/乙酸钠沉淀，离心，真空改造并再悬于蒸馏水中二重过量试剂中纯化并分离反应混合物中剩余的产物。用酶 FspI 和 EcoRI 限制消化分离的 DNA，通过切下和 glass-milk（GenecleanTM, Stratec Scieticific 或其它相似的产品）从琼脂糖凝胶电泳中纯化分离正确大小的带（约 1000 个碱基对）。

用 KpnI 酶限制消化用标准 DNA 技术（Qiagen 质粒试剂盒或相似的产品）制备的 pICI266，要非常仔细以确保完全消化。然后通过 65 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟，再在冰上冷却而使酶失活。操作 dNTP 的条件下，胺供应商（New England BioLabs）的说明通过加入 T4 DNA 聚合酶并在 16 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟来酶促消化 KpnI 成熟的 3' 悬垂端。通过在 70 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟使酶失活而停止反应。用 glass-milk 从酶反应污染物中纯化 DNA 产物，一份用琼脂糖凝胶电泳检测产率，剩余的用 EcoRI 酶限制消化。仔细地进行以确保完全限制消化。通过切下和 glass-milk（GenecleanTM, Stratec Scieticific 或其它相似的产品）从琼脂糖凝胶电泳中纯化分离正确大小的带（约 5600 个碱基对）。

通过与已知标准比较，用琼脂糖凝胶电泳检测限制和纯化 DNA 样品的纯度和浓度估计值。在存在 T4 DNA 连接酶，1mM ATP 和酶缓冲液的条件 30 下，以载体与插入片段的摩尔比为约 1: 2.5（1 pICI266: 2.5 HCPB PCR 产物），DNA 终浓度为约 2.5 ng/ μ l，使用适用于连接平整末端 DNA（KpnI 处理的 FspI 到 T4 DNA 聚合酶）从这些估计中制备连接混合物以便将

HCPB 基因克隆到载体中。

连接反应后，用 DNA 混合物转化 *E. coli* 菌株 DH5 α (Gibco-BRL, 最大效力的感受态细胞)。将细胞铺在含有用 10ug/ml 四环素筛选质粒的 L - 琼脂营养培养基上，在 37 $^{\circ}$ C 保温过夜。通过增加鉴定含带有所需插入片的菌落。

5 检出约 350 个菌落，一式两份铺在无菌硝酸纤维素滤纸 (Schleicher and Shull) 上，在含用 10ug/ml 四环素筛选质粒载体的 L - 琼脂营养培养基上预湿，在 37 $^{\circ}$ C 保温过夜。将一式两份平板于 4 $^{\circ}$ C 贮存，作为菌落的活细胞源，处理其它平板变性，将来自个体菌落的 DNA 固定到硝酸纤维素上。从琼脂平板中取出硝酸纤维素滤纸，连续放在以如下方式浸渍的 WhatmanTM 滤纸上：

- 1 10 % SDS 2 分钟
- 2 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl 7 分钟
- 3 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl 4 分钟
- 15 4 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl 2 分钟
- 5 0.5M, Tris pH7.4, 1.5 M NaCl 2 分钟
- 6 (标准盐柠檬酸盐) 2 分钟

然后将滤纸放在浸在 10xSSC 中的 WhatmanTM 滤纸上，通过紫外光处理，将变性的 DNA 与硝酸纤维素交联 (SpectrolinkerTM XL-1500 UV 交联器)。然后在室温使滤纸空气干燥，在 6xSSC 溶液中于 60 $^{\circ}$ C 预杂交 1 小时，同时缓慢搅拌 (例如用 Techne HB-1D 杂交仪)。预杂交阻断在滤纸上的非特异性 DNA 结合位点。

为了确定哪些菌落含有所需的 DNA 插入片段，将与硝酸纤维素滤纸交联的 DNA 与用从胰 cDNA 文库的 HCPB PCR 产物 (见上述) 制备的放射性标记的 ³²P - DNA 探针杂交。用在 50ul 总体积中的 T7 DNA 聚合酶，经 50uCi ³²P-dCTP (~ 3000Ci/mmol) 标记约 50ng 的 DNA (Pharmacia T7 Quickprime 试剂盒)，使反应在 37 $^{\circ}$ C 进行 15 分钟。然后将标记的探针加热到 95 $^{\circ}$ C 2 分钟以使双链 DNA 变性，随即加到 60 $^{\circ}$ C 的 6xSSC 中，用该溶液代替在滤纸上的预杂交溶液。在 60 $^{\circ}$ C 再继续搅拌保温约 3 小时。此后，倒掉杂交溶液，在 60 $^{\circ}$ C 用 2xSSC 洗涤滤纸，每次 15 分钟。然后缓慢印干滤纸，用黏附胶片 (SaranTM wrap 或相似的) 覆盖，在室温下透过 X - 线胶片 (例如柯达 XomatTM -AR5) 暴露过夜。胶片显色后，鉴定含所需插入片段的

菌落是在 X - 线胶片下, 有最强暴露 (最暗的点) 的那些。在这一系列的试验中约 50 % 的菌落有阳性最近。从中选出 12 个菌落用于进一步筛选。从两份滤纸中检出这些菌落划痕, 然后在含 10ug/ml 氨四环素的 L - 肉汤营养培养基中生长。

5 用引物 FSPTS1 和 6HIS9E10R1BS1 (SEQ ID NO: 58 和 SEQ ID NO: 59), 用内引物 BPB2 (SEQ ID NO: 51) 和 FSPTS1 引发, 经 PCR 检测所选分离物有正确大小的插入片段。设计 BPT2 在成熟基因内引发并产生约 430 个碱基对的片段。

10 为了进行 PCR 筛选, 检出所选的分离物菌落, 然后分散在 200ul 蒸馏水中, 在密封的 Eppendorf™ 试管中在 100 °C 加热 10 分钟。在微离心管中, 将悬浮液离心 10 分钟以沉淀细胞碎片, 然后在 PCR 中用 1ul 的上清液作为 DNA 模板。通常, 将 1ul 的上清液与 20 pmol 的两种寡核苷酸引物 FSPTS1 和 6HIS9E10R1BS1, 或 FSPTS1 和 BPB2, 终浓度为 200 uM 的 dNTP, Taq 聚合酶缓冲液, 0.5U 在 20ul 终体积中的 Taq 聚合酶混合。用 25 个循环
15 的 94 °C 1.5 分钟, 50 °C 2 分钟, 72 °C 2 分钟, 然后再在反应结束时 72 °C 9.9 分钟来完成 PCR 反应。

用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物是否有正确大小的 DNA (来自引物 FSPTS1 和 6HIS9E10R1BS1 的约 1000 个碱基对, 来自引物 FSPTS1 和 BPB2 的约 430 个碱基对,)。所有 12 个克隆均含有带正确大小的 PCR DNA 产
20 物。取 6 个克隆制备质粒 DNA (用 Qiagen Maxi™ 试剂盒, 来自 100ml 在 37 °C 含 10ug/ml 四环素的 L - 肉汤的过夜培养物)。然后有 USB Sequenase™ DNA 测序试剂盒, 其中有 T7 DNA 聚合酶, 测定 PCR 产物插入片段上的这些质粒 DNA 制品的序列。另外, 用自动 DNA 测序仪 (使用 ABI 测序装置) 测定 DNA 序列。用不同的寡核苷酸引物。用已知为 1504, 1590 和 1731
25 的三个引物检测表达载体和插入基因之间的克隆连接 (SEQ ID NO: 60, 61 和 62) 并给出插入基因开始末端的序列资料。用其它引物, 包已知为 679, 677, 1802 和 1280 (SEQ ID NO: 51, 52, 63 和 53) 确定插入基因序列剩余部分的序列。含修饰成熟 HCPB 的质粒称为 pICI712。确定克隆基因的序列, 有氨基酸翻译的, 从 Pe1B 序列的开始
30 到 (His)₆-c-myc tag 的结束列在 SEQ ID NO: 64 中, 从 Pe1B 第一个密码子开始标 1。

为了得到控制表达的修饰的 HCPB, 用氯化钙转化方法, 将 pICI712 质

粒 DNA 转化到感受态 *E. coli* 表达菌株中。在这些菌株中包括能够以阿糖为主要碳源生长的那些，并且是染色体缺失阿糖(Ara)操作子。优选的菌株是 MSD213 (Casadaban 等人, 分子生物学期刊, v138, 179-208, 1980), 有部分基因型, F-Ara Δ (Ara-Leu) Δ LacX74 GalV GalK
5 StrR。另一优选菌株是 MSD525 (菌株 MC106), 基因型为 AraS139 Δ , (Ara-Leu)7697 Δ Lac74GalU HsdR RpsL。可以从 The *E. coli* Genetic Stock Centre .Department of Biology ,Yale University, CT, USA 得到
10 基因型相似, 适用于从 pICI266 中的 AraB 启动子控制表达基因的 *E. coli* 菌株。37 $^{\circ}$ C, 在含 10 μ g/ml 四环素的 L - 琼脂营养培养基中过夜筛选转化体。从转化平板中检出单个菌落, 划线纯化, 保持在含 10 μ g/ml 四环素的 L - 琼脂营养培养基中, 然后在含 10 μ g/ml 四环素的 L - 琼脂营养培养基中生长。

用相同的方法处理所有 pICI712 转化的表达菌株以检测克隆 HCPB 基因的表达。

15 1 用单个菌落接种在 25 ml Universal 容器中的含 10 μ g/ml 四环素的 L - 琼脂营养培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 保温过夜, 同时振荡。

2 用 0.75ml (1% v/v) 的过夜培养物接种在 250 ml 锥形烧瓶中 75ml 预加热到 37 $^{\circ}$ C, 含 10 μ g/ml 四环素的 L - 琼脂营养培养基。在 37 $^{\circ}$ C 继续保温振荡, 通过在 540nm 的吸收值检测生长情况。在培养物的指数生长期
20 诱导克隆蛋白质的表达, 在 540 nm 的 OD 为 0.4-0.6, 从接种逐渐取 90 - 150 分钟。

3 当细胞达到所需的光密度时, 通过将烧瓶在室温放 30 分钟而使培养物冷却到约 30 $^{\circ}$ C。然后加入阿糖达到 1% (v/v) 的终浓度, 在 30 $^{\circ}$ C 继续保温振荡 4 - 6 小时。

25 4 保温后, 进行最后的光密度测量, 离心收集细胞。用最后的 OD 值计算蛋白质聚丙烯酰胺凝胶 (Laemmli) 负载缓冲液的体积, 所述缓冲液用于重悬细胞沉淀。OD 小于 1 时, 每 0.10D 单位为 10 μ l 体积, OD 大于 1 时, 每 0.10D 单位为 15 μ l 体积。Laemmli 负载缓冲液由 0.125 M Tris-HCl pH6.8 组成, 含 2% SDS, 2% β 巯基乙醇, 10% 甘油和 0.1% 溴酚蓝。

30 5 重悬后, 通过在 100 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟而使样品变性, 然后离心从上清液中分离粘细胞碎片。将表达样品 (通常 20 μ l 的上清液) 负载到用于电泳分离蛋白质的 17% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上。通常制备双份凝胶以便一

个用于总蛋白质染色（用考马斯蓝或相似的染料和标准条件），另一个可以处理后用 Western 分析确定特定产物。

为了进行 Western 分析，用半干电泳印迹装置（Bio-rad 或相似的）将跑凝胶中的蛋白质转移到尼龙膜（例如 Problot™, Applied Biosystems）。在处理前或处理期间必须非常小心以确保膜保持润湿。蛋白质从凝胶上转移后，在室温，用在磷酸合成盐（PBS）中的 5%低脂奶粉（Marvel™ 或相似物）溶液缓慢搅拌 5 小时阻断进一步的结合。将膜在室温洗涤 3 次，每次用含 0.05%吐温 20 的 PBS，每次 5 分钟同时搅拌。室温将洗涤膜与用含吐温 20 和 0.5%低脂奶粉的 PBS 适宜稀释（通常 1 在 10000 腹水中或 1 在杂交瘤培养上清液中）的一级抗体，单克隆 9E10 小鼠抗-c-myc 肽（见上述）保温过夜，同时搅拌。将膜在室温洗涤 3 次，每次用含 0.05%吐温 20 的 PBS，每次 5 分钟同时搅拌。室温将洗涤膜与用含吐温 20 和 0.5%低脂奶粉的 PBS 适宜稀释（通常 1: 10000）的二级抗体，辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG（通常在山羊中产生的，如来自 Sigma 的 A4416）保温至少 3 小时，同时搅拌。将膜在室温洗涤 3 次，每次用含 0.05%吐温 20 的 PBS，每次至少 10 分钟同时搅拌。然后用 Amersham ECL™ Western 检测试剂盒方法处理膜，在第一瞬间靠 Amersham Hyperfilm™ 暴露 30 秒，然后再暴露适宜的时间以达到表达蛋白质带的清晰图象。可以使用另一种检测过氧化物酶表达之蛋白质的相似的敏感方法。

用考马斯蓝染色凝胶确定在 E. coli 菌株 MSD213 和 MSD525 中，很好表达了在 pICI226 (pICI712) 中克隆标志的 HCPB，与单独的载体（pICI226）克隆比较时，在约 35000 道尔顿另有一强蛋白质带，而且用 Western 分析检测 c-myc-肽标志表明有一相同大小的带有强信号。

参考实施例 16

在 E. coli 中表达成熟 HCPB

在 E. coli 中克隆和表达成熟 HCPB 的方法于参考实施例 15 中所描述的方法很相似。再用 pICI226 为克隆载体，但此时成熟 HCPB 基因 PCR 的起始物质是质粒 pICI1712，在该表达载体中的标志基因。使用与参考实施例 15 相似的条件，但用 pICI1712 DNA 代替 pICI1698 的，在 PCR 反应中用两种寡核苷酸，称为 2264 和 2265（SEQ ID NO: 65 和 66）。首先，

设计在 pICI1712 上引发的顶链，寡核苷酸 2264，并在 Pe1B 前导序列包括 NcoI 限制酶，然后持续到插入的成熟 HCPB 基因的开始（SEQ ID NO：64 中的 DNA 碱基 36 - 66）。设计第二条链，底链，寡核苷酸 2265，以在成熟 HCPB 基因末端，(His)₆-c-myc tag 序列前（与 SEQ ID NO：64 中的 DNA 碱基 965 - 987 互补）引发，并在基因末端导入终止翻译密码子（与 TAA TAA 互补），然后是 EcoRI（GAATTC）限制酶位点并补平碱基。该寡核苷酸引发回到 PCR 中的基因以分离成熟基因序列。

用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物样品份是否是正确大小的 DNA（约 970 个碱基对）。用与参考实施例 15 相似的方法纯化反应混合物中剩余的产物。用酶 NcoI 和 EcoRI 限制消化分离的 DNA，用预参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的带（约 940 个碱基对）。

用 NcoI 和 EcoRI 限制消化按照与参考实施例 15 相似的方法制备的 pICI266 双链 DNA，要非常仔细以确保完全消化。用参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的 DNA。

通过与已知标准相比，用琼脂糖凝胶电泳检测限制并纯化的 DNA 样品的纯度和浓度估算值。用预参考实施例 15 相似的方法，从这些估算值制备连接混合物以便将 HCPB 基因克隆到 pICI266 载体中。

用参考实施例 15 相似的方法，连接反应后，用 DNA 混合物转化 E. coli DH5 α ，检出菌落并通过最近检测。

用参考实施例 15 相似的方法，取 6 个克隆制备质粒 DNA，然后在 PCR 产物区上测序。用称为 1504，1802，679，1280，677 和 1731（SEQ ID NO：60，63，51，53，52 和 62）的 6 个不同的寡核苷酸引物测定克隆的序列。从测序结果中，筛选含带有所需成熟 HCPB 基因序列之质粒的克隆，称为 pICI1736。

确定克隆基因的序列，有氨基酸翻译的，从 Pe1B 序列的开始到 EcoRI 限制位点列在 SEQ ID NO：67 中，DNA 从 Pe1B 第一个密码子开始标 1，肽从成熟 HCPB 开始标 1。

为了控制成熟 HCPB 的表达，用与参考实施例 15 相似的方法，用氯化钙转化将 pICI1736 质粒 DNA 转化到感受态 E. coli 表达菌株中。用与参考实施例 15 相似的方法检测所有 pICI1736 转化的表达菌株以检测克隆 HCPB 基因的表达。但在这种情况下，在 Western 分析中不能使用 c-myc 肽标志特异性的 9E10 单克隆抗体，因为成熟 HCPB 没有 C - 末端标志。因

此, 一级抗体是抗牛羧肽酶。在兔中产生的(来自 Biogenesis), 已经表明与纯化人胰羧肽酶 B 发生交联反应。二级抗体是用辣根过氧化物酶标记并在山羊中产生的抗-兔 IgG 抗体(Sigma 或相似物)。

用考马斯蓝染色凝胶确定在 E. coli 菌株 MSD213 和 MSD525 中, 很好表达了在 pICI226(pICI712) 中克隆标志的 HCPB, 与单独的载体(pICI226) 克隆比较时, 在约 34000 道尔顿另有一强蛋白质带, 而且用 Western 分析检测 c-myc-肽标志表明有一相同大小的带有强信号。

参考实施例 17

10 在 COS 细胞中表达成熟 HCPB

从 pICI1698 (参考实施例 14) 用 PCR 得到编码 preHCPB 的基因在含 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mMKCl, 1.5mM MgCl₂, 各 0.125 mM 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dGGP 以及 2.5 U Taq DNA 聚合酶 (Amplitaq, Perkin-Elmer Cetus) 的缓冲液中, 用模板 pICI1698 (10ug) 和寡核苷酸 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 (各 100 pmol) 完成 PCR。用矿物油 (100ul) 覆盖反应, 并在 94 °C 1 分钟, 53 °C 1 分钟, 72 °C 2.5 分钟, 经 25 个循环, 加上再在 72 °C 保温 10 分钟。通过在 1% 琼脂糖 (I 型琼脂糖, Sigma A-6013) 凝胶上电泳, 然后从凝胶上切下带, 用 Geneclean™ (Geneclean II 试剂盒, Stratech Scientific Ltd. 或 Bio 101 Inc.) 分离 DNA 来分离 985bp 的 PCR 产物。Geneclean 试剂盒含 1) 6M 碘化钠 2) 浓缩的氯化钠溶液, 用于制备氯化钠/乙醇/水洗涤液的 Tris 和 EDTA; 3) Glassmilk™ - 一含 1.25ml 用水特定配制的硅胶悬浮液的小瓶。

25 这是以 Vogelstein and Gillespie (公开于 Proceedings of the National Academy of Sciences USA (1979) Vol. 76. p615 中) 的方法为基础的 DNA 纯化技术。可以使用在“分子克隆-实验室操作手册”(第 2 版, Sambrook, Fritsch and maniatitis (冷泉港实验室, 1989)) 中描述的其它任何方法。总之, Geneclean 方法如下。向 1 体积的胶薄片中加入 3 体积来自试剂盒的碘化钠溶液。通过在 55 °C 将混合物加热 10 分钟融解琼脂糖, 然后加入 Glassmilk (5-10ul), 充分混合并在室温放置 10 分钟。离心掉 Glassmilk, 用试剂盒中的 NEW WASH (500 ul) 洗涤 3 次。在空气中干燥从 Glassmilk 上除去洗涤缓冲液。通过将保温干燥的 Glassmilk

与水(5-10ul)在 55 °C 保温 5 - 10 分钟来洗脱 DNA。离心回收含洗脱 DNA 的含水上清液。可以重复洗脱步骤并收集上清液。

在含 100mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM 氯化镁, 50mM NaCl 0.025% triton X-100 和各 25 u 的 HindIII 和 EcoRI (New England Biolabs) 的 100ul 反应液中, 用 EcoRI 和 HindIII 在 37 °C 将 preHCPB 消化 1 小时。用琼脂糖凝胶电泳和 GeneClean 按上述用于未切割片段和克隆到 pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems) 的方法纯化消化的片段。

在上述 100ul 反应液中, 用 EcoRI 和 HindIII 完全消化 pBluescript™ KS + DNA (5 ug)。将牛肠碱性磷酸酶 (1 ul; New England Biolabs. 10u/ul) 加到交换的质粒中以除去 5' 磷酸基团, 然后孜孜 37 °C 再继续保温 30 分钟。通过在 70 °C 保温 10 分钟来破坏磷酸酶活性。按上述从琼脂糖凝胶中纯化 EcoRI - HindIII 切割的质粒。将消化的 preHCPB 基因 (50 ng) 与上述切割的质粒 DNA 在 20ul 含 30mM Tris-HCl (pH7.8), 10mM MgCl₂, 10mM DTT 1mM ATP, 50ug/ml BSA 和 400u T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs Inc.) 的溶液中于 25 °C 保温 4 小时。用备有所述细胞的装置, 用 1ul 反应液转化 20ul 的感受态 E. coli DH5 α 细胞 (最大效力的 DH5 α 感受态细胞, Life Technologies Ltd.)。将转化的细胞铺在 L - 琼脂加 100 ug/ml 氨苄青霉素上。用 PCR 鉴定潜在的 preHCPB 克隆。使各克隆按上述进行 PCR 以制备 preHCPB 基因, 除在进行 25 个循环的 PCR 前在 94 °C (热开始法) 将含细胞的混合物保温 5 分钟并用寡核苷酸 SEQ ID NO: 36 和 37 代替 SEQ ID NO: 34 和 35 外。在 1 % 琼脂糖凝胶上电泳分析 PCR 反应样品 (10 ul)。通过存在 1.2 kb 的 PCR 产物来鉴定含 preHCPB 基因的克隆。用生产 1.2 kb 的克隆大规模制备质粒 DNA, 然后通过 DNA 序列分析确定插入片段的序列。含 pBluescript™ 中 preHCPB 基因的质粒称为 pMF15。

为了得到能够在真核细胞中表达 HCPB 的载体, 使用 GS - System™ (Celltech Biologics) (WO 87/04462, WO 89/01036 , WO 86/05807, 和 WO 89/10404)。该方法要求将 preHCPB 基因克隆到载体 pEE12 [该载体与 Bebbington 等人 (1992) Bio/Technology 10, 169-175 中描述的 pSV2. GS 相似, 通过定点诱变除去了原存在于 pSV2. GS 中的数个限制位点以便在多接头区提供单一的位点] 中。为了构建表达载体, 按上述用 EcoRI 和 HindIII 消化质粒 pEE12 和 pMF15。从 1 % 琼脂糖凝胶中分

离来自各消化产物指南个的适宜载体（来自 pEE12）h 插入片段（来自 pMF15），然后连接在一起，用于转化感受态的 DH5 α 细胞。将转化的细胞铺在 L - 琼脂加 100 ug/ml 氨苄青霉素上。按上述，用 PCR 筛选菌落，使用在 CMV 启动子（SEQ ID NO: 38）和 HCPB 基因（SEQ ID NO: 39）内引发的寡核苷酸。用产生 1.365kb PCR 产物的克隆大规模制备质粒 DNA，用 DNA 序列分析确定插入片段的序列。含 pEE12 中 preHCPB 序列的质粒称为 pMF48。

按上述制备第二个真核表达质粒，含 preproHCPB 的前原序列的 pEE12。在开始 PCR 中使用寡核苷酸 SEQ ID NO: 40 和 41 以便从 pMF18（在参考实施例 19 中描述的）中分离前原序列的基因。在这种情况下，用热开始方法，通过首先将不含 Taq DNA 聚合酶的混合物在 94 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟来完成 PCR。然后加入 Taq DNA 聚合酶（2.5u），按上述继续 PCR，完成 25 个循环。将 360bp 的片段克隆到 pBluescript 中以定点 pMF66，随后克隆到 pEE12 中（通过 PCR，用 SEQ ID NO: 41 和 41 筛选）以定点 pMF67。

为了在真核细胞中表达，将含有能够表达前 HCPB 和前原序列之基因的载体共转染到 COS - 7 细胞中。COS 细胞是非洲绿猴肾细胞系，CV - 1，用源缺陷型 SV40 病毒转化的，而且已经广泛地用于短期瞬时表达各种蛋白质，因为它们能够复制很多拷贝的含 SV40 复制源的环状质粒。有两种可广泛得到的 COS 细胞克隆，COS - 1 和 COS - 7。由 Bebbington 在 Methods: A Companion to Methods in Enzymology (1991) 2, p.141 中描述了转染 COS 细胞的基本方法。为了表达 HCPB，通过已知的脂染（liporection）-阳离子脂介导的多核苷酸传递方法 [Felgner et al., in Methods: A Companion to Methods in Enzymology (1993) 5, 67-75]，用质粒载体 pMF48 和 pMF67（各 4 ug）转染在 2 ml Dulbecco's 改性 Eagle's 培养基（DMEM）中的 6 孔培养平板，所述 DMEM 含有 10% 热失活的胎牛血清（FCS）。将细胞在 CO₂ 保温箱中于 37 $^{\circ}$ C 保温 20 小时。将在无血清培养基（200 ul; OPTI-MEM 减少的血清培养基; GibcoBRL 目录号 31985）中的质粒 DNA 混合物缓慢与 LIPOFECTIN 试剂（12 ul; GibcoBRL 目录号 18292-011）混合，然后在室温保温 15 分钟。用无血清培养基（2ml; OPTI-MEM）洗涤细胞。将无血清培养基（600 ul; OPTI-MEM）加到 DNA/LIPOFECTIN 中，将混合物覆盖到在 CO₂ 保温箱中于 37 $^{\circ}$ C 6 小时的

细胞上。用正常含 10 % FCS 的 DEMEM 代替含 DNA 的培养基，按前述将细胞保温 72 小时。按参考实施例 11 中的描述分析细胞上清液对 Hipp-Arg 的 HCPB 活性（5 小时检测）。已经用 LIPOFECTIN 试剂处理的，不含质粒 DNA 的 COS 细胞上清液水解 1.2% 的底物，而用表达前 HCPB 和前原序列的混合物转染的 COS 细胞上清液水解 61 % 的 Hipp-Arg 底物。仅用前 HCPB 质粒转染的 COS 细胞以用于已经只用 LIPOFECTIN 试剂处理之 COS 细胞的水平水解 Hipp-Arg。

LIPOFECTIN 试剂是在膜过滤水中的 1: 1 (w/w) 阳离子脂 N-[(1 - 2, 3-二油基氧)丙基]-n, n, n 三甲基氯化胺 (DOTMA) 和油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。它自发与 DNA 结合以形成脂 - DNA 复合物 - 参见 Felgner 等人, 在 Proc. Acad. Sci. 美国 (1987) 84, 7431 中的描述。

参考实施例 18

在 E. coli 中表达原 HCPB

在 E. coli 中克隆并表达原 HCPB 的方法与参考实施例 15 中描述的方法很相似。再用 pICI266 作为克隆载体，原 HCPB 基因 PCR 的起始材料是 pICI1698 (在参考实施例 14 中描述)。用与参考实施例 15 相似的条件，在 PCR 反应中用两种寡核苷酸，已知为 2310 和 2265 (SEQ ID NO: 68 和 66) (代替引物 FSPT1 和 6HIS9E10R1BS1)。

设计第一条链，顶链寡核苷酸，2310，以在 pICI1698 上引发，并在 Pe1B 前导序列 (SEQ ID NO: 64 中的 DNA 碱基 51 - 66) 和插入的原 HCPB 基因起始 (SEQ ID NO: 40 - 57) 之间加入 NcoI 限制酶位点。设计第二条链，底链，寡核苷酸 2265 以在成熟 HCPB 基因的末端，(His)₆-c-myc tag 序列开始前 (与 SEQ ID NO: 64 中的 DNA 碱基 965 - 987 互补) 引发，并在 EcoRI (GAATTC) 限制酶位点之后的该基因末端导入翻译终止密码子 (与 TAA TAA 互补)，然后为并补平碱基。该寡核苷酸引回到 PCR 中的基因以分离原基因序列。

琼脂糖电泳分析 PCR 产物是否有正确大小的 DNA (约 1240 个碱基对)，发现明显含一正确大小的带。用与参考实施例 15 相似的方法从反应混合物中纯化剩余的产物。用 NcoI 和 EcoRI 消化分离的 DNA，用与参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的带 (约 1210 个碱基对)。

用 NcoI 和 EcoRI 消化用与参考实施例 15 相似的方法制备的 pICI266

双链 DNA，要非常仔细以确保完全消化。用与参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的带（约 5600 个碱基对）。

琼脂糖凝胶电泳，与已知标准比较检测限制并纯化的 DNA 样品的纯度和浓度估计值。用与参考实施例 15 相似的方法，从这些估计中，制备连接混合物以便将原 - HCPB 基因克隆到 pICI266 中。

用与参考实施例 15 相似的方法，连接反应后，用 DNA 混合物转化 E. coli 菌株 DH5 α ，检出菌落并杂交检测。

用与参考实施例 15 相似的方法，用引物 2310 和 2265，通过 PCR 检测 4 个阳性杂交分离物的插入片段的大小是否正确以及用一对内引物 1279（SEQ ID NO: 54）和 679（SEQ ID NO: 51）的引发情况。用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物的 DNA 的大小是否正确（从引物 2310 到 2265 约 1200 个碱基对，从引物 1279 到 679 约 580 个碱基对）。所有克隆都有正确大小的 PCR DNA 产物。

用与参考实施例 15 相似的方法，取所有四个克隆制备质粒 DNA，然后在 PCR 产物区上进行测序。用已知为 1504，1802，679，1281，1590 和 1592（SEQ ID NO: 60，63，51，55，69 和 70）的 6 个不同寡核苷酸引物测序。从测序结果中筛选含有所需原 - HCPB 基因序列之质粒的克隆，并称为 pICI1738。

pICI1738 中克隆的原 - HCPB 基因的确切序列（有氨基酸翻译），从 PeI B 序列开始到 EcoRI 限制位点示于 SEQ ID NO: 71，DNA 的编号从 PeI B 的第一个密码子开始，肽的编号从成熟 HCPB 开始。

为了控制表达原 - HCPB，用与参考实施例 15 相似的方法，将 pICI1738 质粒 DNA 用氯化钙转化方法转化到感受态 E. coli 表达菌株中。用与参考实施例 15 相似的方法检测所有 pICI1738 转化的表达菌株以检测克隆 HCPB 基因的表达情况。然而，在这种情况下，在 Western 印迹中不能使用 c-myc 肽标志特异性的 9E10 单克隆抗体，引物原 - HCPB 没有 C - 末端标志。因此，一级抗体是在兔中产生的抗牛羧肽酶 A（来自 Biogenesis），以前已经表明该抗体与纯化的和胰羧肽酶 B 有交叉反应。二级抗体是用辣根过氧化物酶标记的并在山羊中产生的抗兔 IgG 抗体（Sigma A0545 或相似物）。

用考马斯染色凝胶从 E. coli 中确定 pICI266 中克隆的原 - HCPB（pICI1738）的表达，当与仅含载体（pICI266）的克隆（该克隆产生

标志的 HCPB(参考实施例 15)) 相比, 表明有另一约 40000 道尔顿的蛋白质带。用抗牛羧肽酶 A, 通过 Western 分析检测得到相同大小的带。

参考实施例 19

5 在 COS 细胞中表达原 HCPB

用模板 pIC11698 和寡核苷酸 SEQ ID NO: 34 和 40, 按参考实施例 17 中的描述, 通过 PCR 制备前原 HCPB 的基因以得到 1270bp 的 PCR 产物。用 EcoRI 和 HindIII 消化所述基因, 然后按参考实施例 17 中的描述, 先克隆到在 DH5 α 中的 pBluescript KS+ (以得到 pMF18), 然后克隆到
10 pEE12。按参考实施例 17 的描述, 用 LIPOFECTIN 试剂将质粒 pEE12 转染到 COS - 7 细胞中, 按参考实施例 11 中的描述检测细胞上清液 (250ul) 对 Hipp-Arg 的 HCPB 活性 (5 小时检测), 然后在 50 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl 中用胰蛋白酶 (700 ug/ml) 于 4 $^{\circ}$ C 激活 1 小时。在这些条件下, 完全水解 Hipp-Arg 底物, 而已经只用 LIPOFECTIN
15 试剂处理的 COS 细胞上清液 (不含质粒 DNA), 当用胰蛋白酶激活时, 水解 30 % 的 Hipp-Arg 底物。

参考实施例 20

纯化天然 HCPB

20 已经确定了用于经两种途径开始纯化天然和不同突变体酶的系统。首先描述优选途径。

从 -70 $^{\circ}$ C 的贮存中, 取含重组酶的重组 E. coli 细胞膏并使其融解。细胞膏的重量以克计, 加入缓冲液 A (200mM Tris(羟甲基)氨基甲烷盐酸 (TRIS-HCl)), 20 % 蔗糖 (C₁₂H₂₂O₁₁), pH8.0 至等于细胞膏开始重的体
25 积来重悬细胞膏。在加入等体积蒸馏水前, 将细胞悬浮液在室温保温 20 分钟, 同时偶尔缓慢混合, 然后彻底混合。将细胞悬浮液在室温再保温 20 分钟, 同时偶尔缓慢混合。4 $^{\circ}$ C, 通过以 98000 x g 离心 90 分钟来澄清所得的粗等渗休克物 (shockate), 此后从沉淀的不溶馏份中倒掉上清液。将脱氧核糖核酸酶加到上清液中达到 0.1mg/ml 的终浓度。将混合物在室温保温, 同时连续振荡, 直到粘度降低足以将其负载到羧肽酶抑制剂 CNBr 激活的琼脂糖亲和柱上, 所述亲和柱是根据 PharmaciaCNBr 激活的琼脂糖 4B 所带的说明而制备的, 羧肽酶抑制剂来自马铃薯茎 (c-

0279, Sigma)。将上清液的 pH 调到 8.0, 然后负载到用 10mM TRIS-HCl, 50mM 氯化钠, pH8.0 预平衡的亲和柱上。负载上清液后, 洗涤柱, 直到流出物的吸收值回到基线, 然后用洗脱缓冲液 (100mM 碳酸钠, 50mM 氯化钠, pH11.4) 从柱上洗脱结合的物质。将洗脱的馏份于 -20 °C 冷冻, 而用抗 c-myc 标志抗体 (9E10), 然后是暴露于 4-氯-萘酚和过氧化氢有颜色反应的抗-小鼠-辣根过氧化物酶结合物 (a-9044, Sigma), 通过 Western 印迹分析, 确定含重组羧肽酶的那些馏份。

收集含重组羧肽酶 B 的馏份, 浓缩, 将 pH 调到 7.5, 然后猝冷并于 -20 °C 贮存。如果需要, 可以用已知方法, 如离子交换和凝胶渗透层析进一步纯化收集的样品。

第二种途径包括用胞质休克溶解 E. coli 细胞, 如在优选途径中所用的。

取含重组酶的重组 E. coli 细胞膏, 重悬在溶解缓冲液 (50mM TRIS-HCl, 15%蔗糖 pH8.0) 中。将溶菌酶加到 1mg/ml 的浓度, 同时加入十二烷基磺酸锂 (LDS) (每 25ml 悬浮液 80ul 的 25% 溶液)。将悬浮液在冰上保温 30 分钟, 同时偶尔振荡, 然后加入脱氧核糖核酸酶达到 1mg/ml 的浓度, 再将悬浮液在冰上保温 30 分钟, 同时偶尔振荡。

随后将悬浮液分成 200ml 体积, 声处理以便在冲击之间以 30 秒的间隔, 经 10 × 30 秒个冲击完全破碎细胞。将声处理的细胞于 4 °C, 通过以 98000 × g 离心 90 分钟, 此后从沉淀的不溶馏份中倒掉上清液。将脱氧核糖核酸酶加到上清液中达到 0.1mg/ml 的终浓度。将混合物在室温保温, 同时连续振荡, 直到粘度降低足以将其负载到羧肽酶抑制剂 CNBr 激活的琼脂糖亲和柱上, 所述亲和柱是根据 Pharmacia CNBr 激活的琼脂糖 4B 所带的说明而制备的, 羧肽酶抑制剂来自马铃薯茎 (c-0279, Sigma)。

将上清液的 pH 调到 8.0, 然后负载到用 10mM TRIS-HCl, 50mM 氯化钠, pH8.0 预平衡的亲和柱上。负载上清液后, 洗涤柱, 直到流出物的吸收值回到基线, 然后用洗脱缓冲液 (100mM 碳酸钠, 50mM 氯化钠, pH11.4) 从柱上洗脱结合的物质。将洗脱的馏份于 -20 °C 冷冻, 而用抗 c-myc 标志抗体 (9E10), 然后是暴露于 4-氯-萘酚和过氧化氢有颜色反应的抗-小鼠-辣根过氧化物酶结合物 (a-9044, Sigma), 确定含重组羧肽酶的那些馏份。收集含重组羧肽酶 B 的馏份, 浓缩, 将 pH 调到 7.5, 然后猝冷并于 -20 °C 贮存。如果需要, 可以用已知方法, 如离子交换和

凝胶渗透层析进一步纯化收集的样品。通过 SDS - PAGE 和考马斯染色的硝酸纤维素印迹分析的来自两种途径的收集物的样品在重组羧肽酶 B 的正确分子量处有考马斯染色的带。用 Edman 降解技术, 通过自动蛋白质/肽测序仪, 测序的这些带与纯化的特定重组羧肽酶 B 有阳性匹配。

5

参考实施例 21

在 COS 细胞中表达鼠 A5B7F(ab')₂ 融合蛋白

本实施例描述从 A5B7 杂交瘤中制备 cDNA, 用 PCR 分离特异性 Fd 和轻链, 确定这些片段的完整 DNA 序列, 随后制备 Fd - HCPB 融合基因和在真核细胞中能够生产轻链和 Fd - HCPB 融合蛋白的共表达载体, 用来自 HCPB 的前原序列, 通过共转染在 COS 细胞中共表达 F(ab')₂ - HCPB。

重复参考实施例 15 中的制备方法到 (e) 项。

f) 制备 Fd - HCPB 融合 DNA 序列

通过 PCR 将编码 Fd 序列 C - 末端区的基因 (SEQ ID NO: 25 (位置 15 497)) 与 HCPB 相连。在该过程中导入 8 个氨基酸接头序列 (VPEVSSVF) 的 DNA。按参考实施例 17 中的描述, 用寡核苷酸 SEQ ID NO: 42 和 43, 使质粒 pAF1 (参考实施例 5 中描述的) 经 PCR 达到 338bp 的产物。相似的, 用寡核苷酸 SEQ ID NO: 44 和 34, 使质粒 pAF1 (参考实施例 5 中描述的) 经 PCR 得到 998bp 的产物。按参考实施例 17 中的描述, 经琼脂糖凝胶电泳和 GeneClean™ 分离这两种产物, 然后在第二热起始 PCR 中使用 (在 50 ul 总体积中各 0.2 ng), 所述 PCR 为 94 °C 1 分钟, 63 °C 4 分钟, 然后 94 °C 2 分钟, 共 10 个循环。将空白寡核苷酸 (SEQ ID NO: 42 和 34; 各 10 pM) 加到 50ul 含 Amplitaq (2.5u) 的缓冲液中。于 94 °C 加热 3 分钟后, 使混合物经在 94 °C 1.5 分钟, 55 °C 2 分钟, 72 °C 2 分钟, 共 25 个循环, 然后再在 72 °C 10 分钟。所述产物是在 1336bp 的带, 按前述分离, 然后用 EcoRI 和 hindIII 切割并克隆到在 DH5 α (用寡核苷酸 SEQ ID NO: 36 和 37, 通过 PCR 筛选的克隆) 内的 pBluescript™ 中得到 pMF35。为了制备完整的 Fd - HCPB 融合序列, 在含 50mM 乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐 (pH7.9), 10mM MgCl₂, 1mMDTT, EcoRI (40u) 和 NcoI (20u) 的缓冲液 (100ul) 中用 NcoI 和 EcoRI (各 10 ug) 切割质粒 pAF1 和 pMF35。按参考实施例 17 中的描述分离来自 pAF1 的载体片段 (3.4 kb), 用牛肠碱性磷酸酶消化, 然后于来自 pMF35 的纯化的 1.2 kb 片段相连。

30

将所得的载体克隆在 DH5 α (用 1922bp 插入片段的寡核苷酸 SEQ ID NO: 36 和 37, 通过 PCR 筛选的) 中, 称为 pMF39. 将来自 pMF39 的 EcoRI-HindIII 片段克隆到 DH5 α (用 2200bp 插入片段的寡核苷酸 SEQ ID NO: 38 和 39, 通过 PCR 筛选的) 内的 pEE6 [这是 pEE6.hCMV 的衍生物 - Stephens and Cockett (1989) Nucleic Acids Research 17, 7110-其中已经将 hCMV 启动子上游的 HindIII 位点转变成 BglIII 位点] 中以得到 pMF43.

为了制备共表达载体, 在含在含 50mM 乙酸钾, 20mM Tris-乙酸盐 (pH7.9), 10mM MgCl₂, 1mM DTT 和 BSA (100ug/ml) 的缓冲液 (100ul) 中, 用 BglIII (20u) 和 SalI (40U) 切割 pMF43, 用琼脂糖凝胶定义分离 4348bp 片段, 按前述, 用 Geneclean™ 纯化。相似的, 用 BamHI (40u) 和 SalI (40u) 切割 pAF6 (在参考实施例 5 中描述的), 分离 7.8 kb 的载体片段, 与 pMF43 的 BglIII - SalI 片段相连, 然后克隆到 DH5 α 中。用 2 组寡核苷酸 (SEQ ID NO: 18 和 45, 以及 SEQ ID NO: 17 和 39), 通过 PCR 筛选菌落。通过 DNA 测序表征分别为 360bp 和 1.3kb 的产生 PCR 产物的克隆。将含有正确序列的克隆称为 pMF53 - 在 DH5 α 中的轻链/Fd - HCPB 共表达载体。

g) 在 COS 细胞中表达 A5B7F(ab')₂-HCPB

用 pMF53 代替 pMF48, 重复参考实施例 17 中描述的用于用编码前原序列的质粒 (pMF67) 共转染 COS - 7 细胞的方法。按参考实施例 11 和 17 中的描述检测 COS 细胞上清液的 HCPB 活性。已经用 LIPOFECTIN 试剂处理的, 但不含质粒 DNA 的 COS 细胞上清液水 1.2% 的底物, 而用表达轻链/Fd - HCPB 和前原序列的质粒混合物转染的 COS 细胞上清液水解 34 % 的 Hipp-Arg 底物。仅用 pMF53 质粒转染的 COS 细胞以已经用 LIPOFECTIN 试剂处理的 COS 细胞水解底物的水平水解 Hipp-Arg。通过 Western 分析 (见下文 h), 可见到约 80kDa 和 160kDa 的带, 分别相当于 F(ab')₂, 和 F(ab')₂ - HCPB₂。在 CEA ELISA 检测 (见下文 i 和 j) 中, 根据 j 中所给的方法, 用细胞上清液 (见上文) 检测是否操作 CEA 结合的物质。

h) Western 印迹分析

按下文所述完成 Western 印迹分析。

将各上清液样品 (20ul) 与等体积含有和不含有还原剂的样品缓冲液 (62.5mM Tris, pH6.8, 1% SDS, 10% 蔗糖和 0.05% 溴酚蓝) 混合。65 °C 将样品保温 10 分钟, 然后按照制造商的说明, 在 Multiphor™ II 装置 (LKB

Produkt AB) 中的 8 - 18 % 丙烯酰胺梯度凝胶 (Excel™ 凝胶系统, Pharmacia Biotechnology 产品) 上电泳。电泳后, 用 Novablot™ 装置 (LKB Produkt AB) 按制造商提供的方法, 将分离的蛋白质转移到 Hybond™ C-Super 膜 (Amersham International) 上。印迹后, 空气干燥膜。

- 5 用抗鼠 F(ab')₂ 抗体 - 过氧化物酶结合物 (INC Biomedicals, 产品号 67 - 430 - 1) 检测抗体片段的存在。用 ECL™ 检测系统 (Amersham International), 按照提供的方法肉眼观察鼠 A5B7 抗体片段的存在。

i) ELISA 分析

在生物化学和分子生物学实验室技术 (“ Laboratory Techniques in
10 Biochemistry and Molecular Biology ” eds . Burdon . R. H. and Van
Kippenberg, P. H. volume 15), 酶免疫检测实践和理论 (“ Practice and
Theory of Enzyme Immunoassays ”, Tijssen, P. 1985, Elsevier Science
Publishers B. V.) 中有 ELISA 的标准方法。另一资料来源是抗体 - 实验
室手册 (“ Antibody-A Laboratory Manual ”, Harlow. E. and lane
15 D. P. 1988, 冷泉港实验室公开的) 。

j) 抗 - CEA ELISA

1 制备包被缓冲液 (1 个碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液胶囊 - sigma C-3041 - 在 100ml 双蒸馏水中) 。

2 将 5 ul CEA 贮存液 (1mg/ml, Doko) 加到各 96 孔平板的 10ml 包
20 被缓冲液中。

3 将 100ul 稀释的 CEA 加到微滴定板的各孔的 Nunc “ Maxisorp™ ”
- 50ng/孔/100ul 。

4 将平板在 42 保温过夜 (或室温保温 2 小时) 。

5 用磷酸盐合成盐 - 0.01% 叠氮化钠 (PBSA) - 0.05% 吐温 20 洗涤
25 平板 4 次, 每次 5 分钟。

6 用以每孔 200ul 含 0.05% 吐温 20 的 PBSA 中的 1 % BSA (sigma
A-7888) 阻断平板。室温保温 2 小时。

7 用含 0.05% 吐温 20 的 PBSA 洗涤平板 4 次, 每次 5 分钟。

8 负载适宜量的样品 (培养上清液) 和标准 (双倍稀释的蛋白水解
30 A5B7F(ab')₂)。用生长培养基 (或 PBS) 稀释样品。包括 PBSA + 1 % BSA
和稀释剂为空白。

9 在室温保温 3 小时。

- 10 用含 0.05%吐温 20 的 PBSA 洗涤平板 6 次，每次 5 分钟。
- 11 从山羊，过氧化物酶结合的 - ICN 67 - 430 - 1 制备二级抗体溶液（抗 - 小鼠 IgG F(ab')₂-在 40mlPBSA + 1 % BSA + 0.5%吐温 20 中 20ul) 然后每孔加 100ul 。
- 5 12 室温保温 1 小时。
- 13 用 PBSA + 0.05%吐温 20 洗涤平板 6 次，每次 5 分钟。
- 14 通过将 1 个胶囊的磷酸盐 - 柠檬酸过硼酸盐缓冲液 (Sigma P-4922) 中制备显色溶液。每 100ml 缓冲液加入 30mg o-苯二胺二氯化物 (OPD, Sigma P-8287) 。每孔加 150ul 。
- 10 15 室温黑暗保温 15 分钟。
- 16 通过每孔加入 50ul 2M 硫酸来停止反应。
- 17 用平板阅读器读 490nm 的 OD 。

实施例 1

- 15 制备牛 Lys66Glu 胰核糖核酸酶
- (a) 经重组环聚合酶链反应 (RCPCR) 构建 66 位密码子 (Lys->G/u) 含取代的 RNase 基因序列。
- 在 PCR 反应中，用含牛胰 RNase 前编码序列的质粒 (pQR162: NCIMB No 40678 并由 Tarragona -Foil et al., Gene(1992) 描述) 作为模板。在
- 20 Cyclone™ DNA 合成仪 (milligen/Millipore) 上，用氰乙基亚磷酰胺，通过亚磷酸 - 三酯方法合成用于 PCR 的引物。设计引物以便当在 PCR 中使用它们时，在结合，变性并再退火后，除源平整末端产物外，还与组合单元，粘性，单链末端形成双链 DNA 后，产生的产物是双链，线性 DNA 分子。这些膜退火形成重组 DNA 环。然后将这些分子准备用于转化到感受态
- 25 E. coli 细胞中。
- 使两个 PCR 反应，一个用寡核苷酸 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 (见图 8 中的引物 A&B) ，另一用寡核苷酸 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 (见图 8 中的引物 C&D) ，在 Techne PHC-1 热循环仪中，于 92 °C 1.5 分钟，55 °C 1.5 分钟，75 °C 6 分钟经 25 - 30 个循环，最后在 75 °C 再
- 30 保温 10 分钟。所述反应在 50ul 的总体积中含 pQR162 为模板 (10 ng) ，50pmol/ 引物，5ul 10 x 缓冲液 [200mM Tris-Hcl (pH8.2), 100mM KCl, 60mM (NH₄)₂SO₄, 20mMMgCl₂, 1%Triton X-100100ug/ml 无核酸酶 BSA]

和 2.5U pfu 聚合酶 (*Pyrococcus furiosus* 的热温度聚合酶, Stratagene), 用相同体积的石蜡油覆盖以防止蒸发。

在 1 % 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物。从凝胶上取出从各 PCR 反应产生的 DNA 片段 (约 3.1 kb), 离心 (Spin-X™, Costar) 从琼脂糖中分离 DNA 。用乙醇沉淀两种提取的 DNA 片段, 重悬在 20 ul 水中。将各样品 (10ul) 混合在含 10 mM Tris/Hcl pH8.8, 10mM NaCl 和 1mM Na₂EDTA 50ul 体积中。92 °C 将混合的 DNA 片段变性 5 分钟, 然后于 55 - 57 °C 再退火 2 小时。用因此形成的重组环转化感受态细胞。

完成分离质粒的小制备 (mini-preps) [Maniatis 等人 (1982) 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约], 并作为用双脱氧链终止法 [Sanger 等人 (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 74, 5463 - 5467] 进行双链 DNA 测序的膜。含改变的编码序列而没有任何错掺入的质粒称为 pQR176。在 20ul 总体积的含 20U EcoRI 和反应缓冲液中消化所述质粒。按上述从琼脂糖凝胶中得到含有改变的编码序列的 DNA 片段, 与前述消化并去磷酸化的 pKK223.3 [Pharmacia Biotech: 该载体含 tac 启动子, 由 lac 阻遏物调节并通过加入异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷 (IPTG) 而诱导] 在 20ul 含 20U T4 DNA 连接酶和反应缓冲液中相连。用连接的产物转化一份 *E. coli* 感受态细胞。限制酶分析从不同重组菌落中得到的质粒, 以根据 tac 启动子确定插入片段的大小和方向。将正确的构建体命名为 pQR177 (图 1)。

(b) 生产并纯化 Lys66Glu 牛胰 RNase

生产并纯化工程序列的策略沿用用于在 *E. coli* 中表达牛胰核糖核酸酶而研制的方法 (Tarragona-Foil et al. Gene 1992)。该系统利用牛胰核糖核酸酶的天然信号序列以指导核糖核酸酶或其工程突变体生产到 *E. coli* 的外周胞质中。外周胞质的氧化环境有利于蛋白质的正确折叠, 从而表达有完整活性的重组 RNase。重组或工程突变体的高净正电荷有利于从内源外周胞质蛋白质中迅速纯化。突变体蛋白质的表达以及随后纯化至均一发生在接种培养基的 48 小时内。

质粒 pQR177 含两个核糖体结合位点 (RBS), 一个由载体的 tac 启动子通过, 另一个为了翻译第二个顺反子, 而被包含在第一顺反子的编码序列内。IPTG 诱导含 pQR177 的大肠杆菌后, 产生的 mRNA 是双顺反子的,

而且从 tac 启动子开始。第一顺反子编码 6 个氨基酸的肽 (Met-Phe-Leu-Glu-asp-Asp)。第一顺反子的终止密码子和第二顺反子的起始密码子重叠以便核糖体继续翻译 mRNA 并产生前 RNase。合成的 RNase 前体形式被转移到外周胞质, N 末端测序表明正确裂解了信号序列。外周胞质的氧化环境可以正确地折叠 RNase 以形成回收全活性酶而证明的天然酶。

28 °C, 在 5 升含 100ug Ap/ml 的培养基中生长大肠杆菌 [pQR177] 8 小时。当细胞处于指数生长期时, 加入 IPTG 达到 0.5 mM 的终浓度, 然后使细胞继续于 28 °C 生长过夜, 同时振荡。用改进的原生质球/渗透休克法释放外周胞质中的蛋白质。10 °C 以 8300 xg (平均) 离心 10 分钟重叠来自过夜培养物 (5 升) 的细胞。将细胞沉淀重悬在 60 ml 200mM Tris-HCl pH7.5/20% (w/v) 蔗糖 (无 RNase) / 1 mM Na₂EDTA 中。将悬浮液在室温放置 30 分钟。通过加入等体积的无菌水并彻底混合而达到渗透休克。将混合物在室温再放 30 分钟。10 °C 以 100000 xg (平均) 离心 90 分钟彻底原生质球。

用阳离子交换层析 (S-SepharoseTMEF) 从物质提取物中得到所有带正电荷的蛋白质。缓冲液 A 是 50mM MES, pH6.5, 缓冲液 B 是 50mM MES, 1M NaCl, pH6.5。用阳离子交换层析 (Mono-STM, Pharmacia-LKB) 在 17.6 mM NaCl/分的梯度上从带正电荷蛋白质池中纯化重组 RNase。用 PAGE - SDS 电泳评估重组 RNase 的纯度, 银染色清除地表明技术的这种组合可以纯化将蛋白质纯化到均一 (见图 2)。根据水解胞苷酰 (cytidylyl) - 3, 5 - 腺苷 (CpA) 和胞苷 - 2', 3' - 环单磷酸盐 (C>p) 估算重组酶的 RNase 活性, 表明与市售酶有相同的比活性 (见表)。测量在 278nm 的 OD (OD₂₇₈ = 1mg/ml 的 RNase) 来确定蛋白质浓度。通过在 286nm 吸收值随时间的增加 (C>p 水解) 来进行动力学测量 [Witzel and Barnard (1962) 生物化学生物物理研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 7, 295-299]。用起始速度和底物浓度值通过以 Wilkinson (1961) Biochem. J. 80, 324-332 中描述的分析为基础的计算方法确定参数 K_m 和 k_{cat} 以及其标准误差。用学生 t - 试验估计用不同核糖核酸酶得到的这些参数之间的差异。在 0.1 cm 径长 (Hellma) 的小容器中, 于 250ul 的总体积内室温测量 C>p 水解率。反应物在 0.1M (1, 3-顺 [三 (羟基甲基) - 甲基氨基] 丙烷) pH7.0, 50mM NaCl (I = 0.1) 中含不同浓度的 C>p, 并通过加入所述酶而启动 (见表)。数据表明工程 Lys66Glu Rnase 酶的动力学特性与市售牛酶没

有显著差异。
表

		kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)
1)		
5	BP - Rnase	3.4 (0.9)
	Lys66Glu Rnase	4.7 (0.1)

实施例 2

制备 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu 人胰核糖核酸酶

10 质粒 pATF3 (参考实施例 2 中描述的, 含 Arg4Ala, Lys6Ala HP - RNase 基因) 在含引物 SEQ ID NO: 15 和 16 (各 5pmol), 核苷酸 (0.2mM), PCR 缓冲液和 2.5 单位 pfu 聚合酶的 PC 人中作为模板 (2ng)。于 92℃ 先变性 5 分钟后, 完成 30 个循环的变性 (92℃, 1 分钟), 退火 (55℃, 1 分钟) 和延伸 (75℃, 1 分钟)。按实施例 1
15 中所述凝胶提取 PCR 片段, 然后 37℃ 用 EcoRI 消化 1 小时。酶失活后, 将 EcoRI 片段连接到 EcoRI 消化并去磷酸化的 pUC18 中。所得质粒称为 pATFZ1。用质粒 pATFZ1 确定突变 HP - RNase 基因的 DNA 序列。

为了产生 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66GluHP - RNase, 用 pATFZ1 在按实施例 1 所述的 RCPCR 反应中作为模板, 但使用寡核苷酸引物 SEQ
20 ID NO: 30 - 33 分别代替 SEQ ID NO: 1 - 4。所得质粒称为 pATFZ3。通过用 EcoRI 和 NcoI (各 10 - 15 单位) 消化而从 pATFZ3 中切出 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66GluHP - RNase 的基因, 然后与预先消化 (EcoRI 和 NcoI) 并去磷酸化的 pICI266 (NCIMB) 相连。按实施例 1 中所述完成连接, 表达和纯化, 除按上述用 NcoI 和 EcoRI 双消化从
25 pATFZ3 切出所述片段外, 然后与预先取磷酸化并消化 (用 EcoRI 和 NcoI) 的 pICI266 相连, 用 1% 阿糖 (代替 IPTG) 完成诱导。所得的构建体称为 pATFZ44 (见图 5)。突变酶的表达与纯化按实施例 1 所述进行, 但用 1% 阿糖代替 IPTG 完成诱导。

30 实施例 3

制备 O-[(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(2-氨基乙酰氨基甲基)-5-(2, 4-二氧-1, 2, 3, 4-四氢嘧啶-1-基)-4-羟基-2, 3, 4, 5-四氢咪喃-3-基]O-[4-(双[2-氯乙基]氨基)苯氧基]磷酸氢酯 (是图 7 中所示的终产物)。

将化合物 4 (图 7; 31mg, 0.034mM) 溶解在于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的 0.01M HCl 中, 加入在碳催化剂上的 30% 钨 (60mg) 作为二甲基甲酰胺中的悬浮液。在氢气下, 将混合物搅拌 2 小时 45 分钟。通过 Celite™ 过滤后, 蒸发过滤物以在 <30 °C 干燥。将粗产物悬浮在干二氯甲烷中, 然后将混合物离心。去掉上清液二氯甲烷层。重复该过程, 干燥最后的固体残留物以得到所需产物 9.4mg (化合物 5, 图 7)。

NMR 数据 DMSO d6, d4 Acetic (δ) 3.3 (1H, m); 3.5 (3H, m); 3.62 (8H, s); 4.05 (1H, m); 4.25 (1H, m); 4.53 (1H, m); 5.62 (1H, d); 5.72 (1H, d); 6.63 (2H, d); 7.05 (2H, d); 7.63 (1H, d).

10

按如下方法制备化合物 4。

2'-O-苄基-5'-溴-5'-脱氧尿苷 (化合物 1, 图 7)

20 °C, 氩气下, 向 2'-O-苄基尿苷 [Wagner et al., (1974), J. Org. Chem. 39, 24-30] (334 mg 1mM) 四溴化碳 (500mg) 和 DMF (4ml) 的混合物中在 5 分钟内, 加入在 DMF (2ml) 中的三苯膦溶液 (340mg)。20 °C 将混合物搅拌 2 小时, 倒到水 (60ml) 中, 用乙酸乙酯抽提两次。用水洗涤混合的有机提取物, 干燥并蒸发成油。在 20g Merck 硅凝胶 (Art. 9385) 上将该油色谱分析。用甲苯中的 5% 甲醇洗脱得到 2'-O-苄基-5'-溴-5'-脱氧尿苷 (160 mg, 40%)。

20

NMR (DMSO d6) δ 11.4 (s1H); 7.6 (d1H); 7.3 (m5H); 5.95 (d1H); 5.6 (dd1H); 4.6 (q2H); 4.0-4.2 (m3H); 3.6-3.8 (m2H)

5'-叠氮基-2'-O-苄基-5'-脱氧尿苷 (化合物 2, 图 7)

将 2'-O-苄基-5'-溴-5'-脱氧尿苷 (4.3g) 溶解在 DMF (86 ml) 中, 加入叠氮化钠 (7g)。搅拌混合物, 然后在 60 °C 加热 45 分钟。冷却并倒掉未反应的叠氮化钠后, 蒸发 DMF 至干燥。将残留物溶解在乙酸乙酯中, 用水洗涤两次, 干燥并蒸发至干。在 20g Merck 硅凝胶 (Art. 9385) 上色谱分析残留物。用甲苯中的 5% 甲醇洗脱得到 1.5g 纯 5'-叠氮基-2'-O-苄基-5'-脱氧尿苷。

30

NMR (DMSO d6) δ 11.4 (s1H); 7.6 (d1H); 7.3 (m5H); 5.9 (d1H); 5.6 (d1H); 5.4 (d1H); 4.65 (q2H); 3.9-4.2 (m3H); 3.6 (d2H).

2-0-苄基-5'-羧基苯氧基甘氨酸氨基-5'-脱氧尿苷 (化合物 3, 图 7)

向 5'-叠氮基-2'-0-苄基-5'-脱氧尿苷 (1.5g), 四氢呋喃 (25ml) 和苯氧基羧基甘氨酸 N-羟基琥珀酰酯 (1.3g) 的混合物中加入碳 (50% 的湿度) 上的 10% 铂 (1.5g)。氢气下搅拌混合物 4 小时。通过 Celite™ 5 过滤后, 蒸发过滤物至干燥。将残留物溶解在乙酸乙酯中并用 5% 柠檬酸水溶液 (x2) 洗涤, 碳酸氢钠溶液 (x2) 干燥然后蒸发至干。用 1: 1 醚/乙酸乙酯研制残留物以得到固体 (960mg) (42%)。

NMR (DMSO d6) δ 11.3 (s1H); 8.0 (t1H); 7.6 (d1H); 7.4 (m10H); 5.9 (d1H); 5.6 (d1H);
5.4 (d1H); 5.0 (s2H); 4.6 (q, 2H); 4.0 (m2H); 3.9 (m1H); 3.6 (d2H); 3.5 (m2H)

10

制备化合物 4 (图 7)

a) 将苯氧基二氯磷 [Scott et al., (1990), J. Org. Chem., 55, 4904-4911] (135 mg, 0.64 mM) 溶解在干二氯甲烷 (4.0 ml) 中, 将溶液冷却到 -20 °C, 加入溶解在干二氯甲烷 (2.0 ml) 中的二异丙胺 (0.091 ml, 0.64 mM) 和二异丙基乙胺 (0.1 ml, 0.64 mM)。将溶液在 -20 °C 搅拌 45 分钟, 然后 15 室温在 30 分钟内热, 然后室温再搅拌 30 分钟。将该溶液逐滴加到 2-0-苄基-5'-羧基苯氧基甘氨酸氨基-5'-脱氧尿苷 (280 mg, 0.53 mM) 溶液和在二氯甲烷 (3.0 ml) 中的二异丙基乙胺 (0.336, 2.14 mM) 中, 冷却到 0 °C。0 °C 搅拌所述溶液 10 分钟, 室温搅拌 2 小时。用二氯甲烷稀释反应混合物, 20 用饱和碳酸氢钠 (x2) 洗涤, 干燥并蒸发成油。用甲苯 (2x) 共沸所述油用于下步反应。

b) 将上步粗产物溶解在二氯甲烷 (2.5 ml) 中, 加入在干二氯甲烷中的 4-N,N-双(2-氯乙基)氨基酚 (125 mg, 0.534 mM)。然后加入在干乙腈 (3.2 ml) 中的 0.46M 四唑溶液, 将溶液在室温搅拌 2 小时, 此后, 加入 70% 叔-丁基过氧化氢水溶液 (0.11 ml, 0.801 mM), 然后将溶液在室温再搅拌 1 25 小时。用二氯甲烷稀释反应混合物, 用饱和碳酸氢钠 (1x) 洗涤, 亚硫酸氢钠 (1x) 稀释, 饱和氯化钠饱和 (1x), 干燥并蒸发至干。在 Merck 硅凝胶 (ART 9385) 上色谱分析粗产物, 用 2% 在二氯甲烷中的甲醇, 然后用 3.5% 在二氯甲烷中的甲醇洗脱, 得到纯产物 118 mg。

30

NMR 数据, DMSOd₆ (δ) Mixture of diastereoisomers 3.37 1H (m); 3.42 2H (d); 3.67 8H (d);
4.12 1H (m); 4.33 1H (m); 4.56 2H (m); 5.0 2H (s); 5.14 3H (m); 5.59 1H (d); 5.91 1H (d);
6.64 2H (dd); 7.05 2H (t); 7.28 15H (m); 7.45 1H (t); 7.62 1H (dd); 8.13 1H (brs); 11.35 1H
(s).

5

实施例 4

合成并分离鼠 A5B7F(ab')₂-Lys66Glu 牛胰核糖核酸酶结合物

重复参考实施例 4 中的方法, 但用 Lys66Glu 牛胰核糖核酸酶 (实施例 1 中所述的) 代替牛胰核糖核酸酶。

10

实施例 5

合成并分离鼠 A5B7F(ab')₂-Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu 人胰核糖核酸酶结合物

重复参考实施例 4 中所述的方法, 但用 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu 人胰核糖核酸酶 (实施例 2 中所述的) 代替牛胰核糖核酸酶。

15

实施例 6

合成并分离人化 A5B7F(ab')₂-Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu 人胰核糖核酸酶结合物

重复实施例 5 中所述的方法, 但用人化 A5B7F(ab')₂ 代替鼠 A5B7F(ab')₂。

20

按如下制备人化 A5B7F(ab')₂。接着参考实施例 5 中所述方法的步骤 f), 但 Fd 和轻链的鼠序列 (分别为 SEQ ID NO: 25 和 26) 分别用 SEQ ID NO: 28 和 29 所示的人化序列代替。

25

可以用各种方法, 包括 Edwards (1987) Am .Biotech .Lab .5, 38-44, Jayaraman 等, (1991) Proc .Natl .Acad .Sci .USA88 , 4084-4088, Foguet 和 Lubbert (1992) Biotechnique 13 , 674-674 和 Pierce (1994) Biotechniques 16, 708 描述的方法制备 SEQ ID NO: 28 和 29 所示的人化序列。

30

实施例 7

实施例 3 的尿嘧啶基药物前体, 相应药物和药物前体加突变酶

Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu 人胰 - RNase (HP-RNase) 的体外细胞毒性。

用下列方法说明 RNase 药物前体和相应药物对肿瘤细胞的不同细胞毒性。37 °C, 在 96 孔 (2500 个细胞/孔) 微滴定板中, 将 LoVo 结肠直肠肿瘤细胞与 $5 \times 10^{-1} - 5 \times 10^{-8}$ M 的终浓度范围内的药物前体或药物保温 1 小时。然后洗涤细胞, 37 °C 再保温 3 天。然后将 TCA 加到孔中, 洗涤除去死细胞后, 按 P. Skehan 等人在 J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107 (1990) 中的描述, 通过加入 SRB 评估粘附与平板上的细胞蛋白质量。用抑制细胞 50 % 生长所需的浓度评估所述化合物的效力。

用药物处理 LoVo 细胞后, 发现 IC₅₀ 为约 1 uM。相反, 药物前体的细胞毒性低很多, IC₅₀ 约为 30uM (图 6)。因此, 与通过用突变 RNase 裂解而产生的药物相比, RNase 药物前体对肿瘤细胞的细胞毒性约低 30 倍。

如果将游离 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP-RNase (10ug 酶) 或 A5B7F(ab')₂-Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP-RNase 结合物 (10ug 酶) 加到含药物前体的检测孔中, 可以发现细胞毒性可以与活性药物的相比, 说明突变酶转变了药物前体, 从而释放出更有效的药物。

这些研究说明突变人 RNase 的结合物有将相对无活性药物前体转变成在 ADEPT 系统中能够杀死肿瘤细胞的有效细胞毒性药物。

20 实施例 8

在异种移植小鼠中 RNase 药物前体和抗体 - 突变 RNase 结合物的抗肿瘤活性

在下列模型中说明 RNase 药物前体和 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP-RNase 结合物 (或 Lys66Glu 牛胰 RNase) 的抗肿瘤效力。将 LoVo 肿瘤细胞 (10^7) 皮下注射到无胸腺裸鼠中。当肿瘤直径达 4-5mm 时, 以 10 - 100mg/kg 的剂量静脉内施用所述结合物。结合物定位与肿瘤后, 经一适宜的时间间隔以使残留结合物从血液和正常组织中清除 (1 - 4 天), 然后静脉内或腹膜内以 100 - 1000mg/kg 的剂量将药物前体施用于小鼠。结合物与药物前体的结合会使肿瘤的生长显著慢于未处理的对照肿瘤或仅用相同剂量结合物或药物前体处理的肿瘤。这些研究表明 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP-RNase 结合物与药物前体结合有抗肿瘤活性。

实施例 9

患者中的临床剂量

本发明结合物和药物前体在癌症治疗中的最有效给药模式和剂量方案取决于许多因素，如疾病的严重程度，患者的健康状况以及对质粒的反应和治疗医生的判断。因此，应滴定每个患者的结合物和药物前体剂量。然而，结合物的有效剂量可能在 20 - 约 200mg/m² 的范围内。药物前体的有效剂量取决于所用的特定药物和母体药物的毒性。由于药物前体的细胞毒性比母体药物的低，如果已知的话，母体药物的 MTD 提供一开始点。对于酚氮芥基的药物前体，若没有亲本药物的临床数据，则治疗剂量范围不太确定并需要通过标准动物毒性学研究和从低剂量开始，患者中剂量逐渐提高的研究来确定。但是，治疗剂量可以在 500 - 2000 mg/m² 的范围内。

实施例 10

实施例 3 尿嘧啶基药物前体 (RNase 药物前体) 对天然和突变 Lys66Glu 牛胰 RNase 的酶动力学

用分光光度计 (Perkin Elmer Lambda2) 从 200 - 350nm 扫描 RNase 前后和相应酚氮芥的吸光度，选择的波长是药物前体和药物之间吸光度差别最大的，(由于磷酸键的切除) 所述吸收值为 256nm。在一定的药物前体浓度 (0.2-2 mM) 和 RNase 酶浓度 (5-80 ug/ml) 范围内，在该波长，通过测量药物前体转变成药物的起始速率确定 km 和 Vmax。37 °C，在 0.1cm 径长 (Hellma) 的小瓶中的 0.025M TrisOHCl 加 0.01%Brij-35 缓冲液，pH7.5 中，总体积 250ul，完成测量。用 Vmax 除以反应混合物中的 RNase 量来计算 Kcat。通过确定在 284nm 吸收值的变化，并使用 C>p0.5 - 6mM 和 RNase 酶为 5 - 35ug/ml 的浓度来测量两种酶对标准底物胞苷 2'3'环单磷酸盐 (C>p) 的酶活性。结果如下。

用牛天然和突变 Lys66Glu RNase，RNase 药物前体和 C>p 的 Kcat/Km 酶动力学

底物	BP - Rnase (kcat/Km mM ⁻¹ s ⁻¹)	Lys66Glu BP - Rnase
RNase 药物前体 (实施例 3)	0.37	18

C>p 3.0 3.0

结果表明天然和突变牛 RNase 以相似的速度转变标准底物 (C>p) 。相反, 突变 RNase 对药物前体的水解比天然酶的要快得多。因此, 在 RNase 中导入突变 Lys66Glu 不会损害牛酶裂解磷酸键的能力, 但会产生特异性裂解 RNase 药物前体 (实施例 3) 以释放活性药物的酶。

实施例 11

实施例 3 尿嘧啶基药物前体 (RNase 药物前体) 对天然和 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu 人胰 RNase 的酶动力学

按实施例 10 中所述, 用天然 HP - RNase 和 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP - RNase 测量酶动力学, 除所用的缓冲液是 0.1M1, 3-双[三(羟基甲基)-甲基氨基]-丙烷, pH7.0, 50mM NaCl。结果如下。

用天然 HP - RNase 和 Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP - RNase, RNase 药物前体的 Kcat/Km 酶动力学和 C>p

底物	HP - Rnase	Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu HP - Rnase
RNase 药物前体 (实施例 3)	0.2	3.6
C>p	1.2	1.2

单位 = kcat/Km mM⁻¹s⁻¹

结果表明天然和突变人酶以相似的速度转变标准底物。相反, 突变人 RNase 对 V 药物前体的水解比天然酶的要快得多。因此, 在 RNase 中导入突变 Lys66Glu 不会损害人酶裂解磷酸键的能力, 但会产生特异性裂解 RNase 药物前体 (实施例 3) 以释放活性药物的酶。

实施例 12

合成胞苷基药物前体 (见图 17)

按实施例 3 中所述的方法, 但用化合物 6 (图 17) 代替化合物 4 (图 7)。根据用于制备化合物 4 (图 7) 的方法制备化合物 6 (图 17), 但用 N⁴ - 苄氧基羰基-2'-O-苄基胞苷代替 2'-O-苄基尿苷。按照参考实施

例 7 中用于制备化合物 6 的方法, 从 2'-O-苄基胞苷 (Christensen 和 Broom(1972), J. Org. Chem, 37, 3398-3401) 制备 N⁴-苄氧基羰基-2'-O-苄基胞苷 (化合物 2, 图 17)。

5 实施例 13

牛 Lys66Glu 胰 RNase 分别对参考实施例 6 和 7 中尿苷和胞苷基药物前体类似物的酶活性

用与实施例 10 中所述相似的方法完成试验, 但在 25 °C 完成检测。结果如下。

10 用牛天然和突变体 Lys 66 Glu RNase 的 RNase 药物前体类似物的 Kcat/Km 酶动力学和 C>p

	底物	BP - Rnase (kcat/Km mM ⁻¹ s ⁻¹)	Lys66Glu BP - Rnase
15	RNase 药物前体类似物 1 (参考实施例 6)	(0.2)	25 (6)
	RNase 药物前体类似物 (参考实施例 7)	5.5 (0.3)	109 (11)
	C>p	3.0	3.0

20

结果表明天然和突变牛 RNase 以相似的速度转变标准底物 (C>p) 。相反, 突变 RNase 对药物前体类似物的水解比天然酶的要快得多。因此, 在 RNase 中导入突变 Lys66Glu 不会损害牛酶裂解磷酸键的能力, 但会产生特异性裂解 RNase 药物前体类似物 (参考实施例 6&7) 以释放含有适宜
25 药物前体的活性药物的酶。

实施例 14

含本发明药物前体化合物的典型药物组合物

A: 每胶囊含 50mg 活性成分的干填充胶囊

30	成分	每胶囊量 (mg)
	化合物	50
	乳糖	149

硬脂酸镁	1
胶囊 (大小 1)	200

5 将化合物粉碎成 60 号粉末，然后使乳糖和硬脂酸镁通过 60 号印迹布，然后放到粉末上。将合并的成分混合约 10 分钟，然后填充到 1 号干明胶胶囊中。

B: 片剂

典型片剂含有化合物 (25mg)，预胶化淀粉 USP (82mg)，微晶纤维素 (82mg) 和硬脂酸镁 (1 mg)。

10 C: 栓剂

直肠给药的典型栓剂可含有化合物 (0.08-1.0mg)，乙二胺四乙酸二钠钙 (0.25-0.5 mg)，和聚乙二醇 (775-1600mg)。其它栓剂制剂可以通过代替，如丁基化羟甲苯 (0.04-0.08mg) 代替乙二胺四乙酸二钠钙，氢化植物油 (675-1400mg) 如 Soppocire L, Wecobee FS, Wecobee M, Witepsols., 等，
15 代替聚乙二醇。

D: 注射

典型的可注射制剂含有化合物 (10mg) 苜基醇 (0.01ml) 和用于注射用的水 (1.0 ml)。

20 实施例 15

在 *E. coli* 中克隆并表达 D253K HCPB-(His)₆-c-Myc

在 *E. coli* 中克隆并表达 D253K HCPB 的方法与参考实施例 15 中描述的方法很相似。仍用 pICI266 作为克隆载体，原 - HCPB 基因 PCR 的起始材料是质粒 pICI1698 (在参考实施例 14 中所述的)。但是，在这种情况下，
25 在该基因的 PCR 扩增过程中，用定点诱变以在突变基因中改变 253 位的氨基酸密码子，从天冬氨酸变成赖氨酸 (GAC 到 AAA)，D253K 改变。用与参考实施例 15 所述相似的方法制备两种 PCR 引物。在第一个反应中，引物是 FSPTS1 (SEQ ID NO: 58) 和 1398 (SEQ ID NO: 72)。两个反应的起始 DNA 均是 pICI1698。设计引物 1398 和 1397 (SEQ ID NO: 72
30 和 73) 一般在 253 位氨基酸周围退火，在 DNA 序列中导入 GAC 到 AAA 的改变。在参考实施例 15 中描述了其它两种引物，FSPTS1 和 6HIS9E10R1BS1 (SEQ ID NO: 58 和 59)。分析两个 PCR 反应氧 DNA 的正确大小 (约

750 和 250 个碱基对), 用琼脂糖凝胶电泳评估浓度, 发现明显含有正确到小的带。然后存在终浓度为 200 μ M dNTP, Taq 聚合酶反应缓冲液, 终体积为 80 μ l 的 2U Taq 聚合酶的条件下, 用各约 4 ng 的第一组的两个 PCR 产物进行另一 PCR。将混合物在 94 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 然后加入 Taq 酶, 用
5 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 63 $^{\circ}$ C 4 分钟, 10 个循环完成 PCR 反应。完成这些循环后, 通过加入各 120pmol 的末端引物 FSPTS1 和 6HIS9E10R1BS1 (SEQ ID NO: 58 和 59), 另外的 dNTP (约额外的 100 μ M), Taq 聚合酶反应混合物, 和 4U Taq 聚合酶而使反应混合物增加到 120 μ l。将混合物在 94 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 然后加入 Taq 酶, 94 $^{\circ}$ C, 1.5 分钟, 50 $^{\circ}$ C 2 分钟, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟,
10 30 个循环, 然后在反应结束时再在 72 $^{\circ}$ C 保温 9.9 分钟完成 PCR 反应。

用琼脂糖凝胶电泳分析一份 PCR 产物 DNA 的正确大小 (约 1000 个碱基对), 发现明显含有正确大小的带。用与参考实施例 15 相似的方法纯化反应混合物中的剩余产物。用 FspI 和 EcoRI 限制消化分离的 DNA, 用与参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的带 (约 1000 个碱基对)。

15 用 KpnI 酶限制消化用与参考实施例 15 相似的制备的 pICI266 双链 DNA, 用 T4 DNA 聚合酶补平, 要很仔细以确保完全消化。用限制酶 EcoRI 消化纯化的 DNA。用与参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的 DNA (约 5600 个碱基对)。

通过与标准比较, 用琼脂糖凝胶电泳检测限制并纯化的 DNA 样品的纯
20 度和浓度。用与参考实施例 15 相似的方法, 从这些估计值制备连接混合物以便将 HCPB 基因克隆到 pICI266 中。

连接反应后, 用与参考实施例 15 相似的方法, 用 DNA 混合物转化 E. coli 菌株 DH5 α , 检出菌落并用杂交检测。

用与参考实施例 15 相似的方法, 用引物 FSPTS1 和 6HIS9E10R1BS1
25 (SEQ ID NO: 58 和 59) 并用内引物 FSPTS1 (SEQ ID NO: 58) 和 679 (SEQ ID NO: 51) 引物, 通过 PCR 检测 6 个阳性杂交分离物。用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物是否有正确大小的 DNA (从引物 FSPTS1 到 6HIS9E10R1BS1 约 1000 个碱基对, 从 FSPTS1 到 679 约 430 个碱基对)。所有克隆均有正确大小的 PCR DNA 产物。

30 用与参考实施例 15 相似的方法, 取所有 6 个克隆制备质粒 DNA, 两个在 PC 产物区测序。用 8 个不同的寡核苷酸, 已知为 1281, 677, 1504, 679, 1802, 1590, 1280 和 1731 (SEQ ID NO: 55, 52, 60, 51,

63, 61, 53 和 62) 测定克隆序列。从测序结果中, 筛选含所需 D253K - HCPB 基因的克隆, 称为 pICI1713。

确定的在 pICI1713 中克隆的 D253K - HCPB 基因的序列, 有氨基酸翻译, 从 Pe1B 序列的开始到 EcoRI 限制位点示于 SEQ ID NO: 74, DNA 从 Pe1B 的第一个密码子开始编 1, 肽从成熟 HCPB 开始编 1。

为了控制表达 D253K - HCPB, 用与参考实施例 15 相似的方法, 用氯化钙转化方法, 将 pICI1713 质粒 DNA 转化到感受态 E. coli 表达菌株中。用与参考实施例 15 相似的方法处理所有 pICI1713 转化的表达菌株以检测克隆 D253K - HCPB 基因的表达情况。在这种情况下, 用与参考实施例 15 相似的方法, 在 Western 分析中用 C-myc 肽标志特异性的 9E10 单克隆抗体, D253K - HCPB 有 C - 末端 (His)₆-c-myc 标志。

用考马斯染色的凝胶, 从 E. coli 中说明在 pICI266 (pICI1713) 中, 克隆标志的 D253K - HCPB 的表达情况, 表明与仅用载体 (pICI266) 的克隆和删除标志 HCPB 的克隆 (参考实施例 15) 相比, 在约 35000 道尔顿有一强蛋白质带。用 Western 分析检测 c-myc 标志, 相同大小的带有强信号。

实施例 16

在 E. coli 中克隆并表达 D253R HCPB - (His)₆-c-Myc

在 E. coli 中克隆并表达 D253R HCPB 的方法与参考实施例 16 中所述的方法很相似。仍用 pICI266 作为克隆载体, 原 - HCPB 基因 PCR 的起始材料是质粒 pICI1712 (在参考实施例 15 中所述的)。但是, 在这种情况下, 在该基因的 PCR 扩增过程中, 用定点诱变以在突变基因中改变 253 位的氨基酸密码子, 从天冬氨酸变成赖氨酸 (GAC 到 CGC), D253R 改变。用与参考实施例 15 和 16 所述相似的方法制备两种 PCR 引物。在第一个反应中, 引物是 22641 (SEQ ID NO: 65) 和 2058 (SEQ ID NO: 75)。第二个反应引物是 6HIS9E10R1BS1 (SEQ ID NO: 59) 和 2054 (SEQ ID NO: 76)。两个反应的起始 DNA 均是 pICI1712。

设计引物 2058 和 2054 (SEQ ID NO: 75 和 76) 一般在 253 位氨基酸周围退火, 在 DNA 序列中导入 GAC 到 CGC 的改变, 在两个 PCR 产物的末端成熟互补序列。在参考实施例 15 和 16 中描述了其它两种引物, 2264 和 6HIS9E10R1BS1 (SEQ ID NO: 65 和 59)。分析两个 PCR 反应氧 DNA 的正确大小 (约 750 和 250 个碱基对), 用琼脂糖凝胶电泳评估浓度, 发

现明显含有正确到小的带。然后存在终浓度为 200uM dNTP, Taq 聚合酶反应缓冲液, 终体积为 80ul 的 2U Taq 聚合酶的条件下, 用各约 4 ng 的第一组的两个 PCR 产物进行另一 PCR。将混合物在 94 °C 加热 10 分钟, 然后加入 Taq 酶, 用 94 °C 1 分钟, 63 °C 4 分钟, 10 个循环完成 PCR 反应。

- 5 完成这些循环后, 通过加入各 120pmol 的末端引物 2264 和 6HIS9E10R1BS1 (SEQ ID NO: 65 和 59), 另外的 dNTP (约额外的 100 uM), Taq 聚合酶反应混合物, 和 4U Taq 聚合酶而使反应混合物增加到 120ul。将混合物在 94 °C 加热 10 分钟, 然后加入 Taq 酶, 94 °C, 1.5 分钟, 50 °C 2 分钟, 72 °C 2 分钟, 30 个循环, 然后在反应结束时再在 72 °C 保温 9.9
10 分钟完成 PCR 反应。

用琼脂糖凝胶电泳分析一份 PCR 产物 DNA 的正确大小 (约 1000 个碱基对), 发现明显含有正确大小的带。用与参考实施例 15 相似的方法纯化反应混合物中的剩余产物。用 FspI 和 EcoRI 限制消化分离的 DNA, 用与参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的带 (约 1000 个碱基对)。

- 15 用 NcoI 和 EcoRI 酶限制消化用与参考实施例 15 相似的制备的 pICI266 双链 DNA, 要很仔细以确保完全消化。用与参考实施例 15 相似的方法纯化正确大小的 DNA (约 5600 个碱基对)。

- 通过与标准比较, 用琼脂糖凝胶电泳检测限制并纯化的 DNA 样品的纯度和浓度。用与参考实施例 15 相似的方法, 从这些估计值制备连接混合物以便将 HCPB 基因克隆到 pICI266 中。
20

连接反应后, 用与参考实施例 15 相似的方法, 用 DNA 混合物转化 E. coli 菌株 DH5 α , 检出菌落并用杂交检测。

- 用与参考实施例 15 相似的方法, 取所有 3 个克隆制备质粒 DNA, 两个在 PC 产物区测序。用 8 个不同的寡核苷酸, 已知为 1281, 677, 1504, 25 679, 1802, 1590, 1280 和 1592 (SEQ ID NO: 55, 52, 60, 51, 63, 61, 53 和 70) 测定克隆序列。从测序结果中, 筛选含所需 D253K - HCPB 基因的克隆, 称为 pICI1746。

- 确定的在 pICI1746 中克隆的 D253R - HCPB 基因的序列, 有氨基酸翻译, 从 Pe1B 序列的开始到 EcoRI 限制位点示于 SEQ ID NO: 77, DNA 从 Pe1B 的第一个密码子开始编 1, 肽从成熟 HCPB 开始编码为 1。
30

为了控制表达 D253R - HCPB, 用与参考实施例 15 相似的方法, 用氯化钙转化方法, 将 pICI1746 质粒 DNA 转化到感受态 E. coli 表达菌株中。

用与参考实施例 15 相似的方法处理所有 pICI1746 转化的表达菌株以检测克隆 D253R - HCPB 基因的表达情况。在这种情况下, 用与参考实施例 15 相似的方法, 在 Western 分析中用 C-myc 肽标志特异性的 9E10 单克隆抗体, D253R - HCPB 有 C - 末端 (His)₆-c-myc 标志。

- 5 用考马斯染色的凝胶, 从 *E. coli* 中说明在 pICI266 (pICI1713) 中, 克隆标志的 D253K - HCPB 的表达情况, 表明与仅用载体 (pICI266) 的克隆和删除标志 HCPB 的克隆 (参考实施例 15) 相比, 在约 35000 道尔顿有一强蛋白质带。用 Western 分析检测 c-myc 标志, 相同大小的带有强信号。用与下列实施例 17 相似的方法纯化。

10

实施例 17

从 *E. coli* 中纯化突变体 D253K HCPB-(His)₆-c-Myc 蛋白质

- 首先描述用于细胞膏中羧肽酶 B 类似物 D253K 的 20 升发酵方法。用质粒 pZen1713 (pICI1713, 将上述实施例 15) 转化 *E. coli* 菌株 MSD 1924, - 80 °C 甘油冷冻贮存所得的菌株 MSD2230 (MSD 1924 pZen1713)。

- 将 MSD2230 划线到含 L - 四环素 (10mgml⁻¹) 培养基的琼脂平板上以在 37 °C 过夜生长后, 分离单个菌落。从 L - 四环素 (10mgml⁻¹) 琼脂表面取出 6 个 MSD2230, 再悬浮在 10 ml L - 四环素 (10mgml⁻¹) 肉汤中, 将 100ul 该培养物立即分别接种到 6 个 250ml 含 75 ml L - 四环素 (10mgml⁻¹) 肉汤的 erlenmeyer 烧瓶中。 37 °C 在往复振荡仪上 (300rpm) 生长 15 - 16 小时后, 收集烧瓶内含物, 然后用于接种含 15 升图 23 所述生长培养基的单个发酵罐 (U30D , B. Braun, Melsungen, Germany)。

- 37 °C, pH6.7 完成发酵, 通过加入 6M 氢氧化钠或 2M 硫酸而自动将 pH 控制在 6.7。溶解氧张力 (DOT) 定点是 50 % 空气饱和, 而且通过在 200 - 1000rpm 之间自动调整发酵罐搅拌器速度来保持。将流向发酵罐的气流速度保持了每分 20 个标准升, 用 Tylan 质量流控制器, 相当于每分 1.3 容量体积 (vvm)。接种 4.5 小时后, 以 190 - 210mlh⁻¹ 的速率将酵母提取物溶液 (225gl⁻¹) 补到发酵罐中, 补加 28.5 小时。开始用酵母提取物供料 1.5 小时后, 将发酵温度定点降到 25 °C。保持该温度, 约 1 小时后, 一个注料量在加入 50 % 阿糖以使在发酵罐容积中的终浓度为 0.5%, 从而诱导羧肽酶类似物 D253K 的表达。诱导 1 - 2 小时后, 将甘油 (714gl⁻¹) 和硫

酸胺 (143g l^{-1}) 的混合物以 $45 - 55\text{ml h}^{-1}$ 的速率补料到发酵罐中直到收集。在这些条件下继续发酵直到接种发酵罐后约 75 小时, 通过将发酵罐中的内含物转移到 1 升离心瓶中来收集培养物。通过用 Sorvall RC-3B 离心机 ($7000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 分钟) 离心将耗尽的培养基与细菌细胞分开。该过程通常
5 得到约 20g l^{-1} 的干重。

按如下纯化细胞膏。从 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的贮存物中取含重组酶 D253K HCPB 的重组 *E. coli* 细胞并使其融化。称量细胞膏的重量, 发现为 309 克。通过加入缓冲液 A [200mM Tris (羟基甲基) 氨基甲烷氯化物 (TRIS-HCl), 20% 蔗糖, $\text{pH}8.0$], 得到 320ml 的重悬体积, 从而重悬浮所述膏。室温将细胞
10 悬浮液保温 20 分钟, 同时偶尔缓慢混合, 然后加入等体积蒸馏水并彻底混合。将细胞悬浮液在室温再保温 20 分钟, 同时偶尔缓慢混合。

$4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以 $98000\times g$ 离心 90 分钟澄清所得的粗等渗休克物, 此后从沉淀的不可溶馏份中倒出上清液, 得到 240ml 的澄清体积。将脱氧核糖核酸酶 (24mg) 溶解在蒸馏水 (5ml) 中, 并加到上清液中。将混合物在室温保温 30
15 分钟同时时常振荡, 以降低上清液的粘度, 使其足以负载到羧肽酶抑制剂 CNBr 激活的 SepharoseTM 亲和柱上, 所述柱按照 Pharmacia 的 CNBr 激活的 SepharoseTM4B 的说明来制备, 羧肽酶抑制剂来自马铃薯茎 (c-0279, Sigma)。用 10mM TRIS-HCl, 500mM 氯化钠, $\text{pH}8.0$ (缓冲液 B), 1: 1 稀释上清液, 调整到 $\text{pH}8.0$, 负载, 过夜, 以 0.5ml/分 负载到羧肽
20 酶抑制剂亲和柱上。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用缓冲液 B 预平衡所述柱。负载上清液后, 洗涤所述柱直到用洗脱缓冲液 (100mM 碳酸钠, 500mM 氯化钠, $\text{pH}11.4$) 从柱上洗脱结合的物质前, 流出物的吸收值回到基线, 以 1ml 收集馏份。将洗脱物放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻, 此后取样以确定含重组羧肽酶的那些。使用抗-c-myc
25 标志抗体 (9E10), 然后用暴露于 4-氯-萘和过氧化氢有颜色反应的抗-小鼠-辣根过氧化物酶结合物 (a-9044, Sigma), 通过 Western 印迹分析完成检测。

确定馏份 11 - 44 含重组羧肽酶 B。集中这些馏份, 将 pH 调到 7.5, 然后用 Millipore Centifugal UltrafreeTM-20 (10000 分子量截断) 浓缩, 然后快速冷冻并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存。在此, 详细的纯化方法在 0.95ml 体积中
30 得到 4.7mg 的 D253K 突变羧肽酶, 纯度为 80%。

合成天冬氨酸酚氨芥药物前体 (化合物 5a, 图 27) (2S), 2-3-{4-[双-(2-氯乙基)-氨基)-苯氧基羰基]-丙酰-氨基)-琥珀酸

使用与参考实施例 12 类似的方法。

5 将 (2S), 2-3-{4-[双-(2-氯乙基)-氨基)-苯氧基羰基]-丙酰-氨基)-琥珀酸二苄基酯 (4a) 以 80psi 氢化 2 小时得到所需的末端产物 5a (产率 80%)。

5a: ¹HNMR (CD₃OD): 2.65-2.75 (t, 2H); 2.8-2.9 (m, 4H); 3.7-3.75 (m, 4H); 3.8-3.85 (m, 4H); 4.75 (t, 1H); 6.7-6.8 (m, 2H); 7.0-7.1 (m, 2H).

10 MS (ESI): 471-473 (MNa)⁺

分析: (C₁₈H₂₂N₂O₇Cl₂ 1.4 H₂O)

计算值 %C: 45.56 H: 5.27 N: 5.90

实测值 %C: 45.79 H: 5.60 N: 5.91

按如下制备起始材料化合物 4a。

15 将 (2S), 2-氨基-琥珀酸二苄基酯 (化合物 2a) 与化合物 1 反应以便在用乙醚/己烷再结晶后得到 (2S), 2-(3-羧基丙酰氨基)-琥珀酸二苄基酯 (化合物 3a) (产率: 80%)。

3a: ¹HNMR (CDCl₃): 2.42-2.6 (m, 2H); 2.6-2.75 (m, 2H); 2.85 (dd, 2H); 3.1 (dd, 1H); 4.9 (dd, 1H); 5.05 (dd, 2H); 5.15 (s, 2H); 6.7 (d, 1H); 7.25-7.5 (m, 10 H).

20

MS (ESI): 436 [MNa]⁺

分析: (C₂₂H₂₃NO₇ 0.4H₂O):

计算值 % C: 62.82 H: 5.70 N: 3.33

发现值 % C: 63.2 H: 5.75 N: 2.9

25 反应化合物 3a 以得到所需的起始物质 4a (产率 78%), 室温保持搅拌 3 小时, 用二乙基醚/乙基 (70/30 v/v 为洗脱剂) 通过快速层析纯化。

4a: ¹HNMR (CDCl₃): 2.55-2.65 (m, 2H); 2.8-2.9 (m, 2H); 2.9 (dd, 1H); 3.1 (dd, 1H); 3.6 (dd, 4H); 3.7 (dd, 4H); 4.9 (dd, 1H); 5.05 (dd, 2H); 5.15 (s, 2H); 6.58 (d, 1H); 6.65 (d, 2H); 6.95 (d, 2H); 7.25-7.4 (m, 10 H).

30

MS (ESI): 651-653 (MNa)⁺

实施例 19

合成谷氨酸酚氨芥药物前体 (5b, 图 27) (2S), 2-(3-{4-[双-(2-氯乙基)-氨基)-苯氧基羰基]-丙酰-氨基)-戊二烯酸

5 使用与参考实施例 12 类似的方法。

将 (2S), 2-3-{4-[双-(2-氯乙基)-氨基)-苯氧基羰基]-丙酰-氨基)-戊二烯酸二苄基酯 (4b) 以 60psi 氢化 3 小时得到所需的末端产物 5b (产率 93%)。

10 5b: ¹HNMR (CD₃OD): 1.9-2.0 (m, 1H); 2.1-2.2 (m, 1H); 2.35-2.45 (m, 2H); 2.55-2.7 (m, 2H); 2.8-2.9 (m, 2H); 3.65-3.7 (m, 4H); 3.72-3.8 (m, 4H); 4.4-4.5 (m, 1H); 6.75 (d, 2H); 6.95 (d, 2H).

MS (ESI): 485-487 (MNa)⁺

按如下制备起始材料化合物 4b。

15 将 (2S), 2-氨基-戊二烯酸二苄基酯 (2b) 反应以便得到 (2S), 2-(3-羧基丙酰氨基)-戊二烯酸二苄基酯 (化合物 3b) (产率: 定量的)。

3b: ¹HNMR (CDCl₃): 2.0-2.1 (m, 1H); 2.2-2.3 (m, 1H); 2.3-2.5 (m, 4H); 2.6-2.7 (m, 2H); 4.65 (dd, 1H); 5.05 (s, 2H); 5.15 (s, 2H); 6.5 (d, 1H); 7.3-7.4 (m, 10 H).

20 MS (ESI): 450 [MNa]⁺

反应化合物 3b 以得到所需的起始物质 4b (产率 82%)。

4b: ¹HNMR (CDCl₃): 1.95-2.05 (m, 1H); 2.2-2.3 (m, 1H); 2.3-2.5 (m, 2H); 2.6 (dt, 2H); 2.8-3.0 (m, 2H); 3.6 (dd, 4H); 3.7 (dd, 4H); 4.7 (dd, 1H); 5.1 (s, 2H); 5.2 (s, 2H); 6.3 (d, 1H); 6.6 (d, 2H); 6.95 (d, 2H); 7.3-7.4 (m, 10 H).

25 MS (ESI): 665-667 (MNa)⁺

实施例 20

检测突变人 CPB 和天然人 CPB 对 Hipp-Asp 和 Hipp-Glu 药物前体类似物的活性

30 用基于 HPLC 检测方法检测按参考实施例 20 所述制备的纯化人 CPB (D253K 和 D253R: 实施例 15 - 17) 突变体和天然 CPB 将马尿酸-L-天冬氨酸 (Hipp-Asp - 参考实施例 10), 马尿酸-L-谷氨酸 (Hipp-Glu

- 参考实施例 9) 或马尿酸 - L -

精氨酸 (Sigma Chemical Company - 目录号 H6625) 转变成马尿酸的能力。

5 反应混合物 (250 μ l) 在 0.025M Tris-HCl, pH7.5 中含有 4 μ g 人 CPB (天然或突变体) 和 0.5mM Hipp-Asp 或 Hipp-Glu。37 $^{\circ}$ C 将样品保温 5 小时。通过加入 250 μ l 80% 甲醇, 20 % 蒸馏水, 0.2% 三氟乙酸终止反应, 用 HPLC 确定产生的马尿酸量。

10 用 Hewlett Packard 1090 (有二极排列) HPLC 系统完成 HPLC 分析。将样品 (50 μ l) 注射到 Hichrom Hi-RPB 柱 (25cm) 上, 用 40 % 甲醇, 60 % 蒸馏水, 0.1 % 三氟乙酸以 1ml/分的硫酸分离。从用马尿酸 (Sigma-H6375) 已知量而作的校对曲线确定产生的产物 (马尿酸) 量。结果列于表中, 并表示为 37 $^{\circ}$ C, 5 小时内, 用 4 μ g 酶转变底物的百分比。

用突变体和天然人 CPB 转变 Hipp-Asp 和 Hipp-Glu

15	Hipp-Asp	Hipp-Glu	Hipp-Arg
	(转变成马尿酸的 %)		
天然 CPB	0	0	100
D253K 突变体 CPB	78	91	<2
D253R 突变体 CPB	72	52	3

20

数据表明在人 CPB 的 253 位导入赖氨酸或精氨酸代替天然酶中的天冬氨酸可以改变酶的底物特异性, 以便所述酶能够转变 Hipp-Asp 或 Hipp-Glu。相反, 天然酶不能将这些化合物转变成马尿酸, 但可将 Hipp-Arg 转变成马尿酸。最好的活性是用 D253K 和 Hipp-Glu 底物。

25

实施例 21

用 Hipp-Asp 和 Hipp-Glu 确定 D253K 突变 HCPB 的 K_m 和 k_{cat}

30 检测按照实施例 17 所述产生的纯化 D253K HCPB 对 Hipp-Asp (参考实施例 10) 和 Hipp-Glu (参考实施例 9) 的作用以确定对这些底物的 K_m 和 k_{cat} 。用 0.025M Tris-HCl 缓冲液, pH7.5 稀释 Hipp-Asp 和 Hipp-Glu, 使其分别为 0.25-0.8 mM 和 0.25-5.0mM。用 1M NaOH 将必需底物样品的 pH 调到 7.5。

将 D253K HCPB (Hipp-Asp 用 4ug/ml 和 Hipp-Glu 用 0.5 ug/ml) 加到这些底物 (500ul 反应体积) 中以起始反应。将样品在 37 °C 保温 5 小时。通过加入 500ul 含 0.2%TFA 的甲醇/蒸馏水 (80/20) 终止反应。按实施例 20 所述用 HPLC 确定产生的马尿酸量。

- 5 用 ENAFITTER 软件程序 (biosoft, Perkin Elmer) 计算 K_m 和 k_{cat} 。用 V_{max} 除以反应混合物中的酶浓度计算 k_{cat} (HCPB 的分子量为 34KDa)。结果列出表中。

用 D253K 突变 HCPB, Hipp-Asp 和 Hipp-Glu 的 K_m 和 k_{cat}

10	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
	Hipp-Asp	2.7	0.26
	Hipp-Glu	5.3	3.8

- 15 数据表明用赖氨酸取代在人 CPB253 位的天冬氨酸可以得到能够将 Hipp-Asp 和 Hipp-Glu 转变成马尿酸的酶, 所述酶有显著的酶动力学。与 Hipp-Asp 底物相比, 用 Hipp-Glu, k_{cat}/K_m 约大 7 倍。

实施例 22

- 20 检测突变 HCPB 和天然 HCPB 对谷氨酸药物前体的活性

检测分别按照实施例 17 和参考实施例 20 产生的纯化 D253K HCPB 和天然 HCPB 从谷氨酸药物前体 (实施例 18) 酶促裂解成谷氨酸的能力。裂解释放自我非酶促断裂释放活性酚氮芥药物的中间产物 (参考实施例 13)。用 HPLC 基础的检测方法测量谷氨酸药物前体向中间产物的转变。

- 25 用 0.025M Tris-HCl 缓冲液, pH7.5 将药物前体稀释到 0.25-5.0mM。用 1M NaOH 将必需底物样品的 pH 调到 7.5。将终浓度均为 0.25 mg/ml 的 D253K 突变 HCPB 或天然 HCPB 加到这些底物(在 37 °C 预热 2 分钟的 250 ul 反应体积) 以起始反应。将样品 37 °C 保温 4 分钟。通过加入 250 ul 98.8%MeCN, 0.2%TFA 终止反应, 然后将样品放在冰上。用 HPLC 确定产生的中间产物量。

按照实施例 20 所述完成 HPLC 分离, 除使用含 0.1%TFA 的 MeCN/蒸馏水 (55/45 V/V) 来分离药物前体 (滞留时间 4.9 分钟) 和中间产物 (滞

留时间 8.4 分钟)。用已知量的中间产物而作的校对曲线确定产生的中间产物量。

表中列出了在两份样品中用天然和突变 (D253K) HCPB 以 5.0mM 和 0.25mM 药物前体形成的中间产物量。

5 用天然和突变 HCPB 将药物前体转变成中间产物

药物前体浓度 (mM)	中间产物浓度 (mM)	
	天然 HCPB	突变 HCPB
5.0	0, 0	0.023, 0.022
0.25	0, 0	0.005, 0.005

10 用实施例 21 中叙述的 ENZFITTER™ 软件从底物浓度产生的中间产物量计算突变人酶 (D253K) 和药物前体的 K_m , V_{max} 和 k_{cat} 。

D253K 突变 HCPB 的结果是:

$$K_m = 1.25\text{mM}$$

$$V_{max} = 1.17 \times 10^{-4} \text{ mMsec}^{-1}$$

15 $k_{cat} = 0.016\text{sec}^{-1}$

数据表明在人 CPB 的 253 位导入赖氨酸或精氨酸代替天然酶中的天冬氨酸可以改变酶的底物特异性, 以便所述酶能够将谷氨酸药物前体转变成其自我断裂的中间产物。相反, 天然酶不能将药物前体转变成中间产物。由于药物前体是相对非细胞毒性的 (实施例 23), 而且可以非酶促断裂中间产物以释放杀死肿瘤细胞的游离酚氮芥药物 (实施例 23), 这些结果表明, CPB 活性残基的突变可以产生人突变酶, 所述酶可以将相对非细胞毒性的药物前体转变成能够杀死肿瘤细胞的有效细胞毒性药物。

实施例 23

25 谷氨酸药物前体酚氮芥药物在 LoVo 人结肠直肠肿瘤细胞的细胞毒性

用下列方法说明谷氨酸药物前体相应酚氮芥药物对肿瘤细胞的不同细胞毒性。

30 37 °C, 在 96 孔 (2500 个细胞/孔) 微滴定板中, 将 LoVo 人结肠直肠肿瘤细胞与 $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 终浓度的药物前体和药物一起保温 1 小时。洗涤细胞, 然后 37 °C 再保温 3 天。将 TCA 加到孔中, 洗涤后去除死细胞, 按 P. Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107 (1990) 所述, 通过加入 SRB 染料估算粘附到平板上的细胞蛋白质量。用抑制 50 %

(IC50) 细胞生长所需的浓度估算化合物的效力。

用酚氮芥药物处理 LoVo 细胞后, 发现 IC50 为约 1 μ M。相反, 谷氨酸药物前体的细胞毒性更低, IC50 约为 50 μ M (图 22)。因此, 突变 CPB 谷氨酸药物前体的细胞毒性比酚氮芥药物的约低 50 倍。

- 5 如果将按照实施例 17 所述产生的 100 μ g 突变 HCPB (D253K) 加到含谷氨酸药物前体的检测孔中, 可以发现细胞毒性可以与活性药物的相比, 因此表明用突变酶转变药物前体可以释放更有效的药物。将 100 μ g 天然人 CPB 加到各孔中没有显著增强谷氨酸药物前体的细胞毒性。这些研究表明突变人 CPB 酶 (D253K) 有选择性地相对无活性药物前体转变成能够杀死肿瘤细胞的有效细胞毒性药物的潜力。
- 10

实施例 24

制备人化 A5B7 F(ab')₂-D253K HCPB 融合蛋白

- 重复参考实施例 21 中所述的方法, 但用人化 A5B7 代替鼠 A5B7 轻链和 Fd 序列, 用 D253K 序列代替 HCPB 序列。按照参考实施例 21 所述, 用 HCPB 前原序列, 通过共转染在 COS 细胞中表达融合蛋白。基本上按照参考实施例 21 所述, 通过瞬时转染将质粒载体(各 750 μ g) 导入到 COS - 7 细胞 (11) 中来大规模表达融合蛋白。通过使含融合蛋白的上清液通过固定的蛋白质 A, 然后用高 pH 缓冲液洗脱结合的融合蛋白或者流过使含融合蛋白的上清液流过固定的羧肽酶抑制剂, 然后使用用于纯化重组羧肽酶的常规纯化方法, 并用含实施例 12 中酶的相同的高 pH 溶液洗脱来纯化产物。这两种方法均还可包括用凝胶渗透层析, 离子交换层析, 疏水相互作用层析, 单独或结合使用来进一步纯化所述融合蛋白。
- 15
- 20

- 重复参考实施例 21 中所述的方法, 但分别用示于 SEQ ID NO: 28 和 29 的人化序列分别代替示于 SEQ ID NO: 25 和 26 的鼠 Fd 和轻链序列。用 D253K 序列 (实施例 15 中所述的, 但没有 (His)₆-c-Myc 标志) 代替参考实施例 21 中的 HCPB 序列。用 pICI1713 (实施例 15 中所述的) 代替参考实施例 21 中的 PCR 模板 (pICI1698)。
- 25

- 用各种方法, 包括 Edwards (1987) Am, Biotech. Lab. 5, 38-44, Jayaraman et al, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4084-4088, Foguet and Lubbert (1992) Biotechniques 13, 674-675 and Pierce (1994) Biotechniques 16, 708 所述的那些制备示于 SEQ ID NO:
- 30

28 和 29 的人化序列。

实施例 25

振荡烧瓶发酵制备 D253K HCPB

- 5 用质粒 pICI1713 (参见实施例 15) 转化 E. coli 菌株 MSD 213 将所得菌株 MSD 213pZen 1713 作为甘油贮存液于 - 80 °C 贮存。将一份 MSD 213pZen 1713 划线到 L - 四环素的琼脂平板上以便在 37 °C 过夜生长后分开单个菌落。取出 MSD 213pZen 1713 的单个菌落, 接种到含 75ml L - 四环素肉汤的 250 ml Erlenmeyer 烧瓶中。37 °C, 在往复振荡仪上生长 16
- 10 小时后, 用烧瓶内含物接种 9 个 OD550 = 0.1 的含 600ml L - 四环素肉汤的 2L Erlenmeyer 烧瓶, 20 °C 烧瓶在往复振荡仪上保温直到生长后 OD550 = 0.5, 用培养物的光密度测量估算。此时, 将通过将 L - 阿糖加到培养物中, 达到 0.01% 的终浓度来诱导异源蛋白质生产, 然后在 20 °C 按上述再保温 42 小时。用 Sorvall RC-3B 离心机 (7000 xg, 4 °C, 30 分钟) 通
- 15 过离心将消耗的培养基与细菌细胞分开, 然后将细胞膏于 - 70 °C 贮存。

实施例 26

在自体骨髓移植中使用 ADEPT

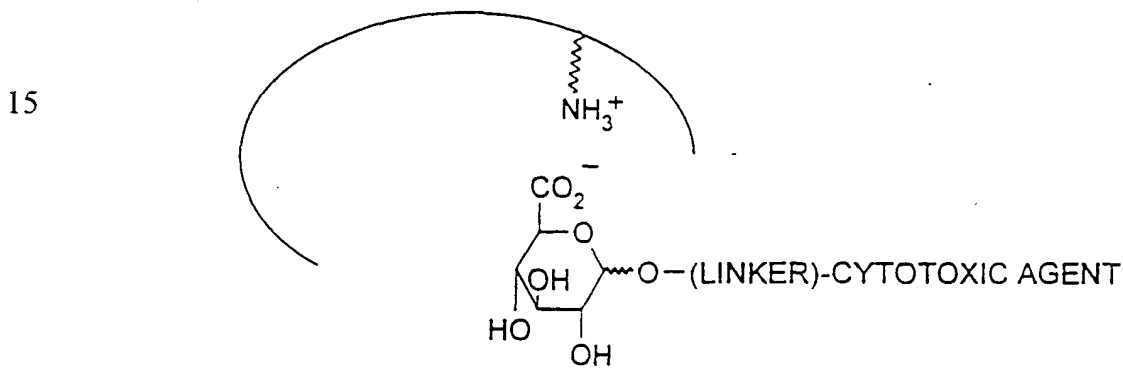
- 自体骨髓移植包括在该患者进行强化疗之前取出患者自己的骨髓。在
- 20 完成治疗后, 将骨髓放回到患者体内。在某些癌症如中, 例如白血病和 B - 和 T 细胞谱系的淋巴瘤以及乳腺, 肺和结肠癌中, 恶性细胞侵入骨髓而且应在再植入骨髓以便有利于存活之前将其除去。以前已经用抗体 - 毒素结合物消除用于自体骨髓的这些肿瘤细胞 (Blakey, D. C. et al., Prog. Allergy vol 45, 50, 1988)。

- 25 特别是如果用 short-lived 反应性氮芥烷基化试剂作为药物组分, 就可以将 ADEPT 用于这些目的。因此可以将含肿瘤细胞的自体骨髓与适宜的抗体 - 酶结合物一起保温。结合物与肿瘤细胞选择性地结合后, 可以洗掉残留的结合物。然后加入药物前体, 在邻近阳性肿瘤细胞处产生药物以选择性地杀死肿瘤细胞。可以通过优化稀释骨髓以确保肿瘤细胞上的药物产
- 30 生位点与骨髓细胞之间有足够的距离, 以便由于化学降解, 使药物在到达骨髓细胞前失活, 从而保护正常骨髓细胞。也可以通过加入作为反应性氮芥药物的亲核物质的蛋白质来使对正常骨髓的损害最小。

实施例 27

将突变葡糖醛酸酶用于反极性 ADEPT

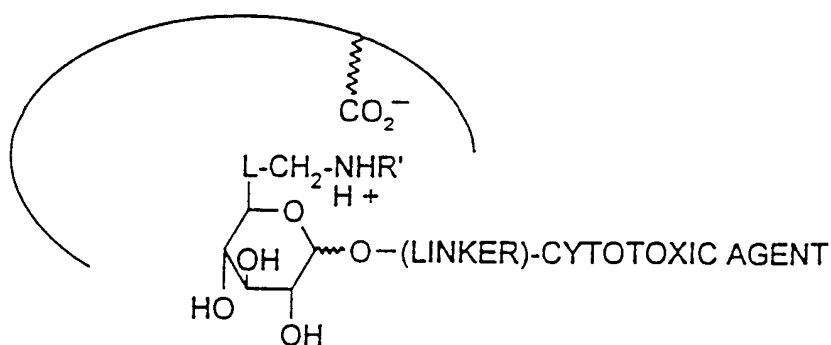
人葡糖醛酸酶是另一种酶，可以用“反极性”概念产生尿苷裂解药物前体释放活性药物的特异性人酶。Bosslet 等人 (Cancer Res. 54, 2151, 1994) 已经描述了天然人葡糖醛酸酶的阿霉素-葡糖醛酸酶药物前体，而且描述了释放一系列药物的一系列不同药物前体的合成方法 (Bosslet 在专利申请 AU - 50225/93)。在没有抗体-葡糖醛酸酶结合物的条件下，存在于血液和组织中的内源天然葡糖醛酸酶有能力将这些药物前体转变成活性药物，并因此降低了方法的特异性。Cheng 和 Touster (J. B. B. 247, 2650, 1972) 报道了在葡糖醛酸酶的活性位点有带正电荷的氨基酸，它们与葡糖醛酸化物环上的带负电荷的羧基反应。



接头可以是葡糖醛酸化和细胞毒性药物之间的直链或自我 imolating 接头，例如可以是由 Bosslet 等人 (Cancer Res. 54, 2151, 1994 和专利 AU - A - 50225/93) 描述的类型。如果用带正电荷的 R 基团取代葡糖醛酸化物环上的带负电荷的羧基，例如 $R = L-CH_2-NH_2$ 或 $L-CH_2-NHR'$ (其中 $R' = C_{1-4}$ 烷基， $L = [CH_2]_{0-3}$ 或其它适宜的接头，那么，带正电荷药物前体就不再是天然葡糖醛酸酶的底物。然后如果将葡糖醛酸酶活性位点中带正电荷的参见转变成带负电荷的氨基酸，如谷氨酸天冬氨酸，那么，该突变葡糖醛酸酶将以类似于 RNase 和 CPB 实施例中的方法，选择性地转变带正电荷的药物前体。因此，可以将反极性概念延伸到人葡糖醛酸酶和带正电荷的葡糖醛酸酶基药物前体。

30

5



序列表

10 SEQ ID NO: 1 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

15 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

GGTCTGCCCA TTCTCGCAGG CAACATTTTT

SEQ ID NO: 2 的资料:

20 (I) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

TGCTACCAGA GCTACTCCAC CATGAGCATC

SEQ ID NO: 3 的资料:

(I) 序列特征:

30 (A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

AATGTTGCCT GCGAGAATGG GCAGACCAAT

5 SEQ ID NO: 4 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

CTGGGAGCAC ACGGCCTGGA CATCAGCCA

SEQ ID NO: 5 的资料:

15 (I) 序列特征:

(A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

CGCGCGAATT CGGGTCCAGC CTTCCCTGGG C

SEQ ID NO: 6 的资料:

(I) 序列特征:

25 (A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

30

GGCCCGAATT CCATCAAAGT GGACTGGCAC A

SEQ ID NO: 7 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 45 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 5 (D) 拓扑结构: 线性
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

CGCTGTTGGT CCTGGTGCTG CTGCTGGTGC GGGTCCAGCC TTCCC

SEQ ID NO: 8 的资料:

- 10 (I) 序列特征:
 (A) 长度: 45 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性
 15 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

TGATGGCTCT GAAGTCCCTG GTCCTGTTGT CGCTGTTGGT CCTGG

SEQ ID NO: 9 的资料:

- 20 (I) 序列特征:
 (A) 长度: 46 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

25 GCGCGAATTC ATGTTCTTGG AGGATGATTG ATGGCTCTGA AGTCCC

SEQ ID NO: 10 的资料:

- 30 (I) 序列特征:
 (A) 长度: 48 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

CGCGGAATTC CTAGGTAGAG TCTTCAACAG AAGCATCAAA GTGGACTG

SEQ ID NO: 11 的资料:

5 (I) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

AAGGAATCCG CTGCCGCTAA ATTCCAGCGG CAG

SEQ ID NO: 12 的资料:

(I) 序列特征:

15 (A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

20

GGAAGGCTGG ACCCGCACCA GCAGCAGCAC

SEQ ID NO: 13 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

25 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

CTGGAATTTA GCGGCAGCGG ATTCCTTGCC CAG

30

SEQ ID NO: 14 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14:

CATATGGACT CAGACAGTTC CCCCAGCAGC

SEQ ID NO: 15 的资料:

(I) 序列特征:

10 (A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15:

15

GTGTGAATTC CCATGGCGAA GGAATCCGCT GCCGCTAAA

SEQ ID NO: 16 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 34 个碱基对

20 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16:

25

GTGTGAATTC CTAGGTAGAG TCTTCAACAG AAGC

SEQ ID NO: 17 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 50 个碱基对

(B) 类型: 核酸

30 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

ATATAAAGCT TGCCGCCACC ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT

SEQ ID NO: 18 的资料:

(I) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 48 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18:

10

ATCGAATTCG CCGCCACCAT GGATTTTCAA GTGCAGATTT TCAGCTTC

SEQ ID NO: 19 的资料:

(I) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 45 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

20

TGAGAATTCT TACTATGTAC ATATGCAAGG CTTACAACCA CAATC

SEQ ID NO: 20 的资料:

(I) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 35 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

GCGCCGAATT CTTATTAACA CTCATTCCTG TTGAA

30

SEQ ID NO: 21 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21:

5

GACCTGGAAC TCTGGATCTC TGTCCAGCGG

SEQ ID NO: 22 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 30 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22:

10

AGGTGTGCAC ACCGCTGGAC AGAGATCCAG

15

SEQ ID NO: 23 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 30 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23:

20

TGGTACCAGC AGAAGCCAGG TTCCTCCCCC

25 SEQ ID NO: 24 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 30 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24:

30

GGATTGGGG GAGGAACCTG GCTTCTGCTG

SEQ ID NO: 25 的资料:

(I) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 777 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25:

10

AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAG TTG TGG CTG AAC TGG ATT TTC CTT GTA 48
 Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val
 1 5 10

ACA CTT TTA AAT GGT ATC CAG TGT GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA 96
 Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly
 15 20 25

15

GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACT 144
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr
 30 35 40

TCT GGG TTC ACC TTC ACT GAT TAC TAC ATG AAC TGG GTC CGC CAG CCT 192
 Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro
 45 50 55

20

CCA GGA AAG GCA CTT GAG TGG TTG GGT TTT ATT GGA AAC AAA GCT AAT 240
 Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn
 60 65 70 75

GGT TAC ACA ACA GAG TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC 288
 Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 80 85 90

TCC AGA GAC AAA TCC CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG 336
 Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu
 95 100 105

25

AGA GCT GAG GAC AGT GCC ACT TAT TAC TGT ACA AGA GAT AGG GGG CTA 384
 Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu
 110 115 120

CGG TTC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC 432
 Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135

30

TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT 480
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser
 140 145 150 155

	GCT GCC CAA ACT AAC TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC	528
	Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly	
	160 165 170	
5	TAT TTC CCT GAG CCA GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCT CTG TCC	576
	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser	
	175 180 185	
	AGC GGT GTG CAC ACC TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT	624
	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr	
	190 195 200	
10	CTG AGC AGC TCA GTG ACT GTC CCC TCC AGC ACC TGG CCC AGC GAG ACC	672
	Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr	
	205 210 215	
	GTC ACC TGC AAC GTT GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG	720
	Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys	
	220 225 230 235	
	AAA ATT GTG CCC AGG GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA TAG	768
	Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr End	
15	240 245 250	
	TAA GAA TTC	777
	End	

SEQ ID NO: 26 的资料:

(I) 序列特征:

- 20 (A) 长度: 732 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 26:

25	GAA TTC GCC GCC ACC ATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG	48
	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu	
	1 5 10	
	CTA ATC AGT GCT TCA GTC ATA ATG TCC AGA GGA CAA ACT GTT CTC TCC	96
	Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Thr Val Leu Ser	
	15 20 25	
30	CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG	144
	Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met	
	30 35 40	

ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA ACT TAC ATT CAC TGG TAC CAG CAG	192
Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln	
45 50 55	
AAG CCA GGT TCC TCC CCC AAA TCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG	240
Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu	
60 65 70 75	
GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT	288
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser	
80 85 90	
TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT	336
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr	
95 100 105	
TAC TGC CAA CAT TGG AGT AGT AAA CCA CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC	384
Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr	
110 115 120	
AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC	432
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe	
125 130 135	
CCA CCA TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC	480
Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys	
140 145 150 155	
TTC TTG AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT	528
Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile	
160 165 170	
GAT GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG	576
Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln	
175 180 185	
GAC AGC AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC	624
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr	
190 195 200	
AAG GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC	672
Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His	
205 210 215	
AAG ACA TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT	720
Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys	
220 225 230 235	
TAA TAA GAA TTC	732
End End	

SEQ ID NO: 27 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 5 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 27:

TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC

10 SEQ ID NO: 28 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 777 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 15 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28:

AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAG TTG TGG CTG AAC TGG ATT TTC CTT GTA 48
 Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val
 1 5 10

20 ACA CTT TTA AAT GGT ATC CAG TGT GAG GTG CAG CTG CTG GAG TCT GGA 96
 Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly
 15 20 25

GGA GGA CTG GTG CAG CCT GGA GGA TCT CTG AGA CTG TCT TGT GCA ACA 144
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr
 30 35 40

25 TCT GGA TTC ACC TTC ACA GAC TAC TAC ATG AAT TGG GTG AGA CAG GCA 192
 Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
 45 50 55

CCT GGA AAG GGA CTC GAG TGG CTG GGC TTC ATC GGA AAT AAG GCA AAT 240
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn
 60 65 70 75

30 GGA TAC ACA ACA GAG TAC TCT GCA TCT GTG AAG GGA AGA TTC ACA ATT 288
 Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 80 85 90

TCC AGA GAC AAG AGC AAG TCC ACA CTG TAC CTG CAG ATG AAT ACA CTG 336
 Ser Arg Asp Lys Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu
 95 100 105

5	CAG GCA GAG GAC TCT GCA ATT TAC TAC TGT ACA AGA GAC AGA GGA CTG 384 Gln Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu 110 115 120
	AGA TTC TAC TTC GAC TAC TGG GGA CAG GGA ACA CTG GTG ACA GTG TCT 432 Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 125 130 135
10	TCT GCT AGC ACC AAG GGA CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCC CCC TGC TCC 480 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser 140 145 150 155
	AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC 528 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 160 165 170
	TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCT CTG ACC 576 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 175 180 185
15	AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC 624 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 190 195 200
	TCC CTC AGC AGC GTC GTG ACG GTG CCC TCC AGC AAC TTC GGC ACC CAG 672 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln 205 210 215
20	ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC 720 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 220 225 230 235
	AAG ACA GTT GAG CGC AAA TGT TGT GTC GAG TGC CCA CCG TGC CCG TAA 768 Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro End 240 245 250
25	TAG GAA TTC 777 End

SEQ ID NO: 29 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 732 个碱基对

(B) 类型: 核酸

30 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

GAA	TTC	GCC	GCC	ACC	ATG	GAT	TTT	CAA	GTG	CAG	ATT	TTC	AGC	TTC	CTG	48
					Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	
					1				5					10		
CTA	ATC	AGT	GCT	TCA	GTC	ATA	ATG	TCC	AGA	GGA	CAG	ACT	GTA	CTC	ACT	96
Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Val	Ile	Met	Ser	Arg	Gly	Gln	Thr	Val	Leu	Thr	
			15					20					25			
CAG	AGT	CCA	AGT	AGT	CTC	AGT	GTA	AGT	GTA	GGT	GAT	AGG	GTA	ACT	ATG	144
Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	
		30					35					40				
ACT	TGT	AGG	GCC	AGT	AGT	AGT	GTA	ACT	TAT	ATC	CAT	TGG	TAT	CAG	CAG	192
Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	
	45					50					55					
AAA	CCA	GGT	CTC	GCC	CCA	AAA	AGT	TGG	ATC	TAT	GCC	ACT	AGT	AAC	CTC	240
Lys	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Lys	Ser	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	
60					65				70					75		
GCC	AGT	GGT	GTA	CCA	TCT	AGA	TTC	AGT	GGT	AGC	GGT	AGT	GGT	ACT	GAT	288
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
				80					85					90		
TAT	ACT	CTC	ACT	ATC	AGT	AGT	CTC	CAG	CCA	GAA	GAT	ATC	GCC	ACT	TAC	336
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	
			95					100					105			
TAT	TGC	CAG	CAT	TGG	AGT	AGT	AAA	CCA	CCA	ACT	TTC	GGT	CAG	GGT	ACT	384
Tyr	Cys	Gln	His	Trp	Ser	Ser	Lys	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
		110					115					120				
AAA	GTA	GAA	GTA	AAA	CGT	ACT	GTG	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	432
Lys	Val	Glu	Val	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	
	125					130					135					
CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	480
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	
140					145					150					155	
CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	528
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	
				160					165					170		
GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	576
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	
			175					180						185		

	GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC	624
	Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser	
	190 195 200	
5	AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT	672
	Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His	
	205 210 215	
	CAG GGC CTG AGT TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT	720
	Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
	220 225 230 235	
10	TAA TAG GAA TTC	732
	End End	

SEQ ID NO: 30 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
- 15 (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

20 AAGGTCACCT GCGAAAACGG GCAGGGCAAC

SEQ ID NO: 31 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 25 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- 25 (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

30 CTGGAAACAG ACATTCTGGA CATCT

SEQ ID NO: 32 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 32:

5

GCCCTGCCCG TTTTCGCAGG TGACCTTTTC

SEQ ID NO: 33 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 26 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 33:

10

TGCTACAAGA GCAACTCCAG CATGCA

15

SEQ ID NO: 34 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 41 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 34:

20

CTCTAGGAAT TCTTATTAGT ACAGGTGTTT CAGGACGTAG C

25 SEQ ID NO: 35 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 108 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 35:

30

CCCAAGCTTG CCGCCACCAT GTTGGCAGTC TTGGTTCTGG TGACTGTGGC CCTGGCATCT
GCTGCAACAG GACACAGTTA TGAGAAGTAC AACCAAGTGGG AAACGATA

5 SEQ ID NO: 36 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 16 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 36:

AACAGCTATG ACCATG

SEQ ID NO: 37 的资料:

15 (I) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 37:

GTAAAACGAC GGCCAGT

SEQ ID NO: 38 的资料:

25 (I) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 38:

TCGCTATTAC CATGGTGATG CCGTTTTGGC

SEQ ID NO: 39 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 23 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- 5 (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 39:

CAGACTCTGC AGCAGGTCCA CAG

10 SEQ ID NO: 40 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 54 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- 15 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 40:

CCCAAGCTTG CCGCCACCAT GTTGGCACTC TTGGTTCTGG TGACTGTGGC CCTG

SEQ ID NO: 41 的资料:

20 (I) 序列特征:

- (A) 长度: 39 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 41:

CTCATAACTG AATTCTTATT AACGAACCCG GCTATCAAA

SEQ ID NO: 42 的资料:

(I) 序列特征:

- 30 (A) 长度: 34 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 42:

GGATCTGCTG CCCAAGCTTA CTCCATGGTG ACCC

5 SEQ ID NO: 43 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 80 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 43:

CTTCTCATAA CTGTGTCCTG TTGCGAACAC GCTGCTCACC TCGGGCACTG TACATATGCA
AGGCTTACAA CCACAATCCC

15 SEQ ID NO: 44 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 78 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

20 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 44:

GGTTGTAAGC CTTGCATATG TACAGTGCCC GAGGTGAGCA GCGTGTTCCG AACAGGACAC
AGTTATGAGA AGTACAAC

25 SEQ ID NO: 45 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 27 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

30 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 45:

CCGTTTGATC TCGAGCTTGG TGCCTCC

SEQ ID NO: 46 的资料:

(I) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 20 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 46:

10

GTTGGAGCTC TTGGTTCTGG

SEQ ID NO: 47 的资料:

(I) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 22 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 47:

20

CAAGGCCTCG AGCTTTCTCA AC

SEQ ID NO: 48 的资料:

(I) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 21 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 48:

30

GTTTGATTCT AGAGTTCGTG C

SEQ ID NO: 49 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 22 个碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 49:

5

TTGTAAAACG ACGGCCAGTG AG

SEQ ID NO: 50 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 24 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 50:

10

GAAACAGCTA TGACCATGAT TACG

15

SEQ ID NO: 51 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 23 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 51:

20

CAGACTCTGC AGCAGGTCCA CAG

25

SEQ ID NO: 52 的资料:

- (I) 序列特征:
 - (A) 长度: 19 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 52:

30

GGACCTGCTG CAGAGTCTG

SEQ ID NO: 53 的资料:

- 5 (I) 序列特征:
- (A) 长度: 21 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
- 10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 53:

GCCTGTGCTC AATATTGATG G

SEQ ID NO: 54 的资料:

- (I) 序列特征:
- 15 (A) 长度: 23 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 54:

20 CCGTGTTAAA GCAGAAGATA CTG

SEQ ID NO: 55 的资料:

- (I) 序列特征:
- 25 (A) 长度: 23 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 55:

30 GCTACTGTGA AAGAACTTGC CTC

SEQ ID NO: 56 的资料:

- (I) 序列特征:

- (A) 长度: 1263 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 56:

10 GAGCTCTTGG TTCTGGTGAC TGTGGCCCTG GCATCTGCTC ATCATGGTGG TGAGCACTTT 60
 GAAGGCGAGA AGGTGTTCCG TGTTAACGTT GAAGATGAAA ATCACATTAA CATAATCCGC 120
 GAGTTGGCCA GCACGACCCA GATTGACTTC TGGGAAGCCAG ATTCTGTAC ACAAATCAAA 180
 CCTCACAGTA CAGTTGACTT CCGTGTTAAA GCAGAAGATA CTGTCACTGT GGAGAATGTT 240
 CTAAGCAGA ATGAACTACA ATACAAGGTA CTGATAAGCA ACCTGAGAAA TGTGGTGGAG 300
 GCTCAGTTTG ATAGCCGGGT TCGTGCAACA GGACACAGTT ATGAGAAGTA CAACAAGTGG 360
 GAAACGATAG AGGCTTGAC TCAACAAGTC GCCACTGAGA ATCCAGCCCT CATCTCTCGC 420
 AGTGTATATCG GAACCACATT TGAGGGACGC GCTATTTACC TCCTGAAGGT TGGCAAAGCT 480
 GGACAAAATA AGCCTGCCAT TTTTCATGGAC TGTGGTTTCC ATGCCAGAGA GTGGATTTCT 540
 CCTGCATTCT GCCAGTGGTT TGTAAGAGAG GCTGTTTCGTA CCTATGGACG TGAGATCCAA 600
 GTGACAGAGC TTCTCGACAA GTTAGACTTT TATGTCCTGC CTGTGCTCAA TATTGATGGC 660
 TACATCTACA CCTGGACCAA GAGCCGATTT TGGAGAAAGA CTCGCTCCAC CCATACTGGA 720
 TCTAGCTGCA TTGGCACAGA CCCC AACAGA AATTTTGATG CTGGTTGGTG TGAAATTGGA 780
 GCCTCTCGAA ACCCTGTGA TGAAACTTAC TGTGGACCTG CCGCAGAGTC TGAAAAGGAG 840
 ACCAAGGCC TGGCTGATTT CATCCGCAAC AA ACTCTCTT CCATCAAGGC ATATCTGACA 900
 ATCCACTCGT ACTCCAAAT GATGATCTAC CCTTACTCAT ATGCTTACAA ACTCGGTGAG 960
 15 AACAAATGCTG AGTTGAATGC CCTGGCTAAA GCTACTGTGA AAGA ACTTGC CTCACTGCAC 1020
 GGCACCAAGT ACACATATGG CCCGGGAGCT ACAACAATCT ATCCTGTCTG TGGGGGCTCT 1080
 GACGACTGGG CTTATGACCA AGGAATCAGA TATTCCTTCA CCTTTGAACT TCGAGATACA 1140
 GGCAGATATG GCTTTCTCCT TCCAGAAATCC CAGATCCGGG CTACCTGCGA GGAGACCTTC 1200
 CTGGCAATCA AGTATGTTGC CAGCTACGTC CTGGAACACC TGTACTAGTT GAGAAAGCTC 1260
 GAG 1263

SEQ ID NO: 57 的资料:

20 (I) 序列特征:

- (A) 长度: 415 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 57:

30 Glu Leu Leu Val Leu Val Thr Val Ala Leu Ala Ser Ala His His Gly
 -105 -100 -95
 Gly Glu His Phe Glu Gly Glu Lys Val Phe Arg Val Asn Val Glu Asp
 -90 -85 -80
 Glu Asn His Ile Asn Ile Ile Arg Glu Leu Ala Ser Thr Thr Gln Ile
 -75 -70 -65
 Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Val Thr Gln Ile Lys Pro His Ser Thr
 -60 -55 -50 -45
 Val Asp Phe Arg Val Lys Ala Glu Asp Thr Val Thr Val Glu Asn Val
 -40 -35 -30

Leu Lys Gln Asn Glu Leu Gln Tyr Lys Val Leu Ile Ser Asn Leu Arg
 -25 -20 -15
 Asn Val Val Glu Ala Gln Phe Asp Ser Arg Val Arg Ala Thr Gly His
 -10 -5 1
 Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln
 5 10 15 20
 Gln Val Ala Thr Glu Asn Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly
 25 30 35
 Thr Thr Phe Glu Gly Arg Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala
 40 45 50
 Gly Gln Asn Lys Pro Ala Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg
 55 60 65
 Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val
 70 75 80
 Arg Thr Tyr Gly Arg Glu Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu
 85 90 95 100
 Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr
 105 110 115
 Trp Thr Lys Ser Arg Phe Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly
 120 125 130
 Ser Ser Cys Ile Gly Thr Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp
 135 140 145
 Cys Glu Ile Gly Ala Ser Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly
 150 155 160
 Pro Ala Ala Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile
 165 170 175 180
 Arg Asn Lys Leu Ser Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr
 185 190 195
 Ser Gln Met Met Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu
 200 205 210
 Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu
 215 220 225
 Ala Ser Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr
 230 235 240

Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly
245 250 255 260

Ile Arg Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly
265 270 275

5 Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe
280 285 290

Leu Ala Ile Lys Tyr Val Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr End
295 300 305 307

SEQ ID NO: 58 的资料:

(I) 序列特征:

- 10 (A) 长度: 35 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 58:

15 GCCGGGTTTG CGCAACTGGT CACTCTTACG AGAAG

SEQ ID NO: 59 的资料:

(I) 序列特征:

- 20 (A) 长度: 88 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 59:

25 CCGGAATTCT TATTAGTTCA GGTCTCCTC AGAGATCAGC TTCTGCTCCT CGAACTCATG 60
GTGGTGATGG TGGTGGTACA GGTGTTCC 88

SEQ ID NO: 60 的资料:

(I) 序列特征:

- 30 (A) 长度: 22 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 60:

TTAGCGGATC CTGCCTGACG GT

SEQ ID NO: 61 的资料:

(I) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 23 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 61:

10

GGCTGGATTC TCAGTGGCGA CTT

SEQ ID NO: 62 的资料:

(I) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 20 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 62:

20

ACCTCTAGGG TCCCCAATTA

SEQ ID NO: 63 的资料:

(I) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 23 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 63:

CAAGTCGCCA CTGAGAATCC AGC

30 SEQ ID NO: 64 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 1053 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 64:

5 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 -20 -15 -10

 GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
 -5 -1 5 10

 AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
 Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
 15 20 25

 CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
 Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
 30 35 40

 GCT ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC 240
 Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala
 45 50 55

15 ATT TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA 288
 Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala
 60 65 70

 TTC TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG 336
 Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu
 75 80 85 90

 ATC CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT 384
 Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro
 95 100 105

 GTG CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT 432
 Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe
 110 115 120

 TGG AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA 480
 Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr
 125 130 135

 GAC CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT 528
 Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser
 140 145 150

 CGA AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA 576
 Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu
 155 160 165 170

30 AAG GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC 624
 Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser
 175 180 185

5 ATC AAG GCA TAT CTG ACA ATC CAC TCG TAC TCC CAA ATG ATG ATC TAC 672
Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr
190 195 200

CCT TAC TCA TAT GCT TAC AAA CTC GGT GAG AAC AAT GCT GAG TTG AAT 720
Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn
205 210 215

10 GCC CTG GCT AAA GCT ACT GTG AAA GAA CTT GCC TCA CTG CAC GGC ACC 768
Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr
220 225 230

AAG TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG 816
Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly
235 240 245 250

GGC TCT GAC GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC 864
Gly Ser Asp Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr
15 255 260 265

TTT GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC 912
Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser
270 275 280

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
285 290 295

20 GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC CAC CAC CAT CAC CAC CAT GAG 1008
Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr His His His His His His Glu
300 305 310

TTC GAG GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAG GAC CTG AAC TAA TAA 1053
Phe Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn End End
315 320 325 327

25

SEQ ID NO: 65 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

30 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 65:

GTTATTACTC GCTGCCCAAC CAGCCATGGC G

SEQ ID NO: 66 的资料:

(I) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 41 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 66:

10

CTCTAGGAAT TCTTATTAGT ACAGGTGTTC CAGGACGTAG C

SEQ ID NO: 67 的资料:

(I) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 999 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 67:

20 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 -20 -15 -10

GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
 -5 1 5 10

AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
 Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
 15 20 25

25 CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
 Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
 30 35 40

GCT ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC 240
 Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala
 45 50 55

30 ATT TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA 288
 Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala
 60 65 70

TTC TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG 336
 Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu
 75 80 85 90

ATC CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT 384
 Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro
 95 100 105

GTG CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT 432
 Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe
 110 115 120

TGG AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA 480
 Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr
 125 130 135

GAC CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT 528
 Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser
 140 145 150

CGA AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA 576
 Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu
 155 160 165 170

AAG GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC 624
 Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser
 175 180 185

ATC AAG GCA TAT CTG ACA ATC CAC TCG TAC TCC CAA ATG ATG ATC TAC 672
 Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr
 190 195 200

CCT TAC TCA TAT GCT TAC AAA CTC GGT GAG AAC AAT GCT GAG TTG AAT 720
 Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn
 205 210 215

GCC CTG GCT AAA GCT ACT GTG AAA GAA CTT GCC TCA CTG CAC GGC ACC 768
 Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr
 220 225 230

AAG TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG 816
 Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly
 235 240 245 250

GGC TCT GAC GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC 864
 Gly Ser Asp Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr
 255 260 265

TTT GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC 912
 Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser
 270 275 280

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
285 290 295

5 GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC TAA TAA GAATTC 999
Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr End End
300 305 307

SEQ ID NO: 68 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 34 个碱基对
- 10 (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 68:

CCAACCAGCC ATGGCGCATC ATGGTGGTGA GCAC

15

SEQ ID NO: 69 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 23 个碱基对
- 20 (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 69:

GGCTGGATTC TCAGTGGCGA CTT

25 SEQ ID NO: 70 的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 21 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- 30 (D) 拓扑结构: 线性
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 70:

GGAGAAAGCC ATATCTGCCT G

SEQ ID NO: 71 的资料:

5 (I) 序列特征:

(A) 长度: 1284 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 71:

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 -117 -115 -110 -105

GCC CAA CCA GCC ATG GCG CAT CAT GGT GGT GAG CAC TTT GAA GGC GAG 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala His His Gly Gly Glu His Phe Glu Gly Glu
 -100 -95 -90

15

AAG GTG TTC CGT GTT AAC GTT GAA GAT GAA AAT CAC ATT AAC ATA ATC 144
 Lys Val Phe Arg Val Asn Val Glu Asp Glu Asn His Ile Asn Ile Ile
 -85 -80 -75 -70

CGC GAG TTG GCC AGC ACG ACC CAG ATT GAC TTC TGG AAG CCA GAT TCT 192
 Arg Glu Leu Ala Ser Thr Thr Gln Ile Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser
 -65 -60 -55

20

GTC ACA CAA ATC AAA CCT CAC AGT ACA GTT GAC TTC CGT GTT AAA GCA 240
 Val Thr Gln Ile Lys Pro His Ser Thr Val Asp Phe Arg Val Lys Ala
 -50 -45 -40

GAA GAT ACT GTC ACT GTG GAG AAT GTT CTA AAG CAG AAT GAA CTA CAA 288
 Glu Asp Thr Val Thr Val Glu Asn Val Leu Lys Gln Asn Glu Leu Gln
 -35 -30 -25

25

TAC AAG GTA CTG ATA AGC AAC CTG AGA AAT GTG GTG GAG GCT CAG TTT 336
 Tyr Lys Val Leu Ile Ser Asn Leu Arg Asn Val Val Glu Ala Gln Phe
 -20 -15 -10

GAT AGC CGG GTT CGT GCA ACA GGA CAC AGT TAT GAG AAG TAC AAC AAG 384
 Asp Ser Arg Val Arg Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Lys
 -5 1 5 10

TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT CCA 432
 Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn Pro
 15 20 25

30

GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC GCT 480
 Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg Ala
 30 35 40

ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC ATT	528
Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala Ile	
45 50 55	
TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA TTC	576
Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe	
60 65 70 75	
TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG ATC	624
Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu Ile	
80 85 90	
CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT GTG	672
Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val	
95 100 105	
CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT TGG	720
Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe Trp	
110 115 120	
AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA GAC	768
Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr Asp	
125 130 135	
CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT CGA	816
Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser Arg	
140 145 150 155	
AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA AAG	864
Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu Lys	
160 165 170	
GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC ATC	912
Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser Ile	
175 180 185	
AAG GCA TAT CTG ACA ATC CAC TCG TAC TCC CAA ATG ATG ATC TAC CCT	960
Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr Pro	
190 195 200	
TAC TCA TAT GCT TAC AAA CTC GGT GAG AAC AAT GCT GAG TTG AAT GCC	1008
Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala	
205 210 215	
CTG GCT AAA GCT ACT GTG AAA GAA CTT GCC TCA CTG CAC GGC ACC AAG	1056
Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr Lys	
220 225 230 235	

TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG GGC 1104
 Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly
 240 245 250

TCT GAC GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC TTT 1152
 Ser Asp Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr Phe
 255 260 265

5

GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC CAG 1200
 Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln
 270 275 280

ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT GCC 1248
 Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val Ala
 285 290 300

10

AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC TAA TAA GAATTC 1284
 Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr End End
 305 310 312

SEQ ID NO: 72 的资料:

(I) 序列特征:

- 15
- (A) 长度: 25 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 72:

20

GGTCATAAGC CCAGTCTTTA GAGCC

SEQ ID NO: 73 的资料:

(I) 序列特征:

- 25
- (A) 长度: 27 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 73:

30

CCTGCTGCTG GGGGCTCTAA AGACTGG

SEQ ID NO: 74 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 1059 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 74:

	ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
	-20 -15 -10
10	GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
	Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
	-5 1 5 10
	AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
	Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
	15 20 25
	CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
	Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
	30 35 40
15	GCT ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC 240
	Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala
	45 50 55
	ATT TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA 288
	Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala
	60 65 70
20	TTC TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG 336
	Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu
	75 80 85 90
	ATC CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT 384
	Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro
	95 100 105
	GTG CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT 432
	Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe
25	110 115 120
	TGG AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA 480
	Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr
	125 130 135

30

GAC CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT 528
 Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser
 140 145 150

CGA AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA 576
 Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu
 155 160 165 170

AAG GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC 624
 Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser
 175 180 185

ATC AAG GCA TAT CTG ACA ATC CAC TCG TAC TCC CAA ATG ATG ATC TAC 672
 Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr
 190 195 200

CCT TAC TCA TAT GCT TAC AAA CTC GGT GAG AAC AAT GCT GAG TTG AAT 720
 Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn
 205 210 215

GCC CTG GCT AAA GCT ACT GTG AAA GAA CTT GCC TCA CTG CAC GGC ACC 768
 Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr
 220 225 230

AAG TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG 816
 Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly
 235 240 245 250

GGC TCT AAA GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC 864
 Gly Ser Lys Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr
 255 260 265

TTT GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC 912
 Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser
 270 275 280

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
 Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
 285 290 295

GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC CAC CAC CAT CAC CAC CAT GAG 1008
 Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr His His His His His His Glu
 300 305 310

TTC GAG GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAG GAC CTG AAC TAA TAA GAA 1056
 Phe Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn End End
 315 320 325 327

TTC 1059

SEQ ID NO: 75 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 25 个碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 75:

GGTCATAAGC CAGTCGCGA GAGCC

10 SEQ ID NO: 76 的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 27 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

15 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 76:

CCTGCTGCTG GGGGCTCTCG CGACTGG

SEQ ID NO: 77 的资料:

20 (I) 序列特征:

(A) 长度: 1059 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 77:

ATG	AAA	TAC	CTA	TTG	CCT	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA	CTC	GCT	48
Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	
		-20					-15					-10				

GCC	CAA	CCA	GCC	ATG	GCG	GCA	ACT	GGT	CAC	TCT	TAC	GAG	AAG	TAC	AAC	96
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Ala	Thr	Gly	His	Ser	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Asn	
	-5					1				5					10	

AAG	TGG	GAA	ACG	ATA	GAG	GCT	TGG	ACT	CAA	CAA	GTC	GCC	ACT	GAG	AAT	144
Lys	Trp	Glu	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Gln	Gln	Val	Ala	Thr	Glu	Asn	
			15					20						25		

CCA	GCC	CTC	ATC	TCT	CGC	AGT	GTT	ATC	GGA	ACC	ACA	TTT	GAG	GGA	CGC	192
Pro	Ala	Leu	Ile	Ser	Arg	Ser	Val	Ile	Gly	Thr	Thr	Phe	Glu	Gly	Arg	
			30					35						40		

GCT	ATT	TAC	CTC	CTG	AAG	GTT	GGC	AAA	GCT	GGA	CAA	AAT	AAG	CCT	GCC	240
Ala	Ile	Tyr	Leu	Leu	Lys	Val	Gly	Lys	Ala	Gly	Gln	Asn	Lys	Pro	Ala	
	45						50					55				
ATT	TTC	ATG	GAC	TGT	GGT	TTC	CAT	GCC	AGA	GAG	TGG	ATT	TCT	CCT	GCA	288
Ile	Phe	Met	Asp	Cys	Gly	Phe	His	Ala	Arg	Glu	Trp	Ile	Ser	Pro	Ala	
	60					65				70						
TTC	TGC	CAG	TGG	TTT	GTA	AGA	GAG	GCT	GTT	CGT	ACC	TAT	GGA	CGT	GAG	336
Phe	Cys	Gln	Trp	Phe	Val	Arg	Glu	Ala	Val	Arg	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	
	75				80					85					90	
ATC	CAA	GTG	ACA	GAG	CTT	CTC	GAC	AAG	TTA	GAC	TTT	TAT	GTC	CTG	CCT	384
Ile	Gln	Val	Thr	Glu	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Asp	Phe	Tyr	Val	Leu	Pro	
				95					100						105	
GTG	CTC	AAT	ATT	GAT	GGC	TAC	ATC	TAC	ACC	TGG	ACC	AAG	AGC	CGA	TTT	432
Val	Leu	Asn	Ile	Asp	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Trp	Thr	Lys	Ser	Arg	Phe	
			110					115							120	
TGG	AGA	AAG	ACT	CGC	TCC	ACC	CAT	ACT	GGA	TCT	AGC	TGC	ATT	GGC	ACA	480
Trp	Arg	Lys	Thr	Arg	Ser	Thr	His	Thr	Gly	Ser	Ser	Cys	Ile	Gly	Thr	
		125						130							135	
GAC	CCC	AAC	AGA	AAT	TTT	GAT	GCT	GGT	TGG	TGT	GAA	ATT	GGA	GCC	TCT	528
Asp	Pro	Asn	Arg	Asn	Phe	Asp	Ala	Gly	Trp	Cys	Glu	Ile	Gly	Ala	Ser	
	140					145					150					
CGA	AAC	CCC	TGT	GAT	GAA	ACT	TAC	TGT	GGA	CCT	GCC	GCA	GAG	TCT	GAA	576
Arg	Asn	Pro	Cys	Asp	Glu	Thr	Tyr	Cys	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Ser	Glu	
	155				160					165					170	
AAG	GAG	ACC	AAG	GCC	CTG	GCT	GAT	TTC	ATC	CGC	AAC	AAA	CTC	TCT	TCC	624
Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Asp	Phe	Ile	Arg	Asn	Lys	Leu	Ser	Ser	
				175					180						185	
ATC	AAG	GCA	TAT	CTG	ACA	ATC	CAC	TCG	TAC	TCC	CAA	ATG	ATG	ATC	TAC	672
Ile	Lys	Ala	Tyr	Leu	Thr	Ile	His	Ser	Tyr	Ser	Gln	Met	Met	Ile	Tyr	
			190					195						200		
CCT	TAC	TCA	TAT	GCT	TAC	AAA	CTC	GGT	GAG	AAC	AAT	GCT	GAG	TTG	AAT	720
Pro	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Leu	Gly	Glu	Asn	Asn	Ala	Glu	Leu	Asn	
		205					210								215	
GCC	CTG	GCT	AAA	GCT	ACT	GTG	AAA	GAA	CTT	GCC	TCA	CTG	CAC	GGC	ACC	768
Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Ala	Ser	Leu	His	Gly	Thr	
	220					225					230					

```

AAG TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG 816
Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly
235                240                245                250

GGC TCT CGC GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC 864
Gly Ser Arg Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr
                255                260                265

TTT GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC 912
Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser
                270                275                280

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
                285                290                300

GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC CAC CAC CAT CAC CAC CAT GAG 1008
Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr His His His His His His Glu
                305                310                315

TTC GAG GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAG GAC CTG AAC TAA TAA GAA 1056
Phe Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn End End
320                325                330                332

TTC 1059

```

序列表注:

在本说明书中,说明书中的序列号与直接包括在说明书中的序列表(不是用 Patentin 软件制作的)中的一致。还需提供 Patentin 制作的序列表,这在本申请申请时已经完成,而且其内容具体引入本文作为参考。

- 5 由于当核酸序列含编码区 (CDS)时, Patentin 软件产生额外序列(只含氨基酸序列),这在 Patentin 和非 Patentin 产生的 SEQ ID NOS 编号之间产生了矛盾。用 Patentin 产生的序列表提交的表格列出了 2 组 SEQ ID NOS 的比较。

- 10 读者还应注意在目前 Patentin 软件版本 1.30 中的下列“bug”。在含 CDS 的序列中,有时氨基酸的序列编号从较早的 CDS 延伸(而不是从起始开始)。所述 bug 影响 Patentin 产生的序列表中 SEQ ID NO: 27, 30 和 32 的编号。

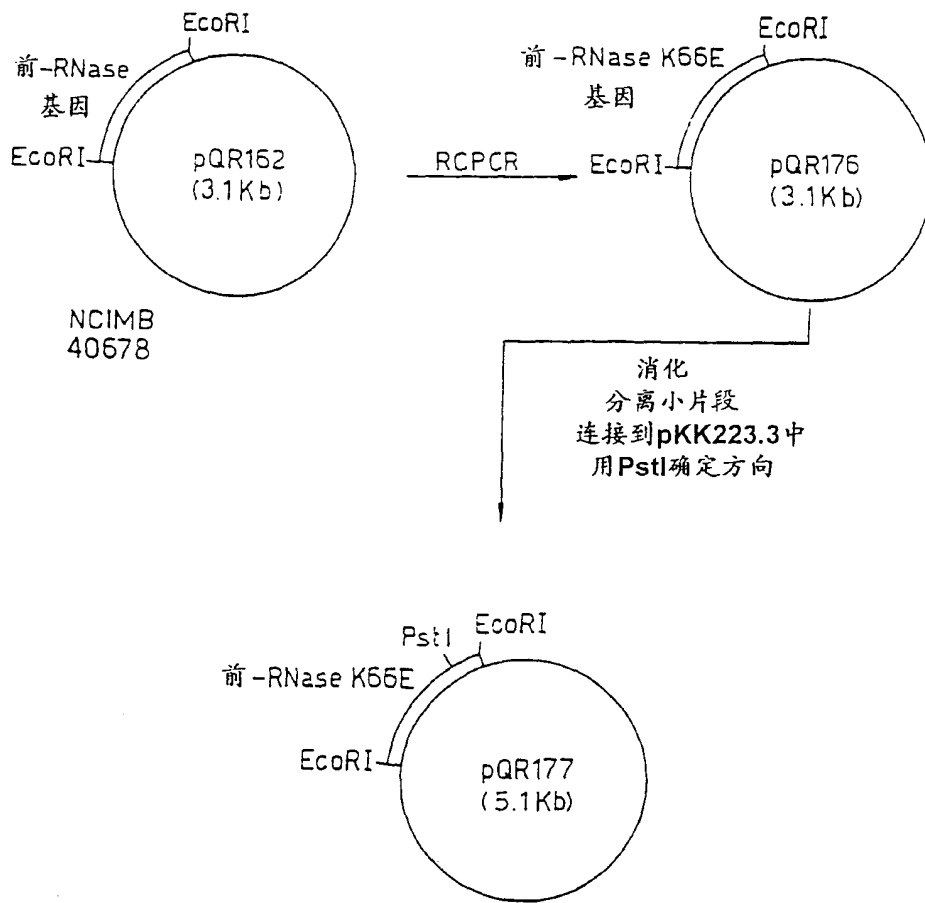


图 1

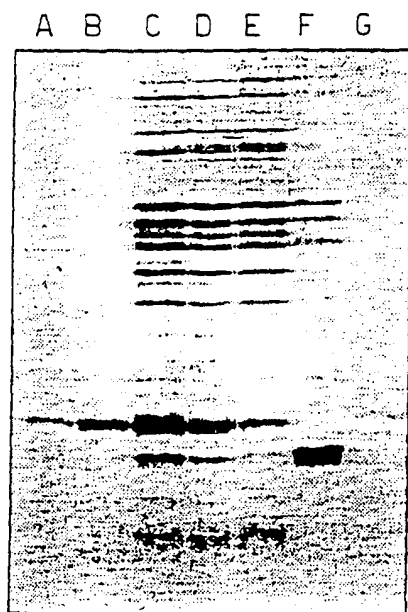
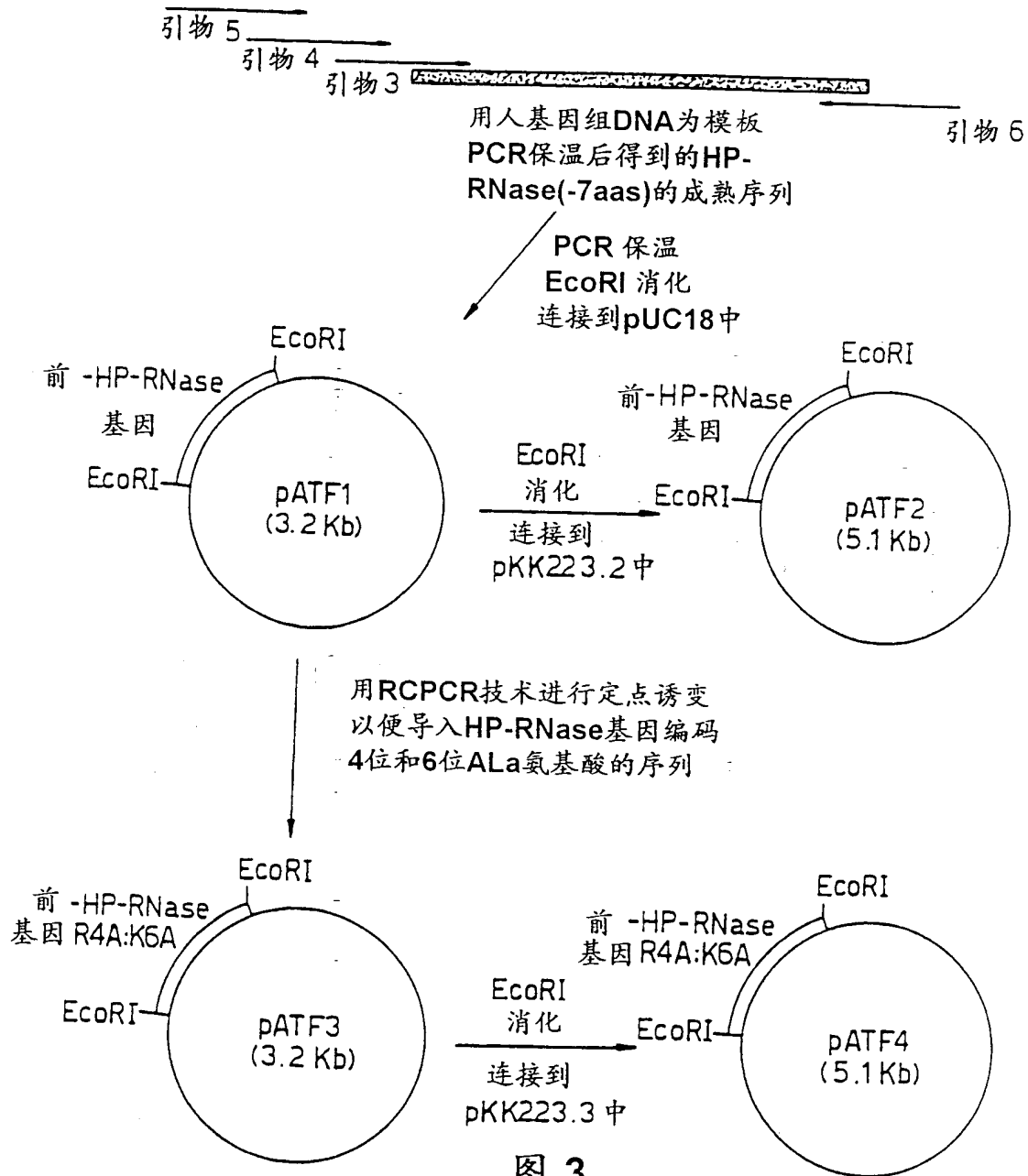


图 2



图 4



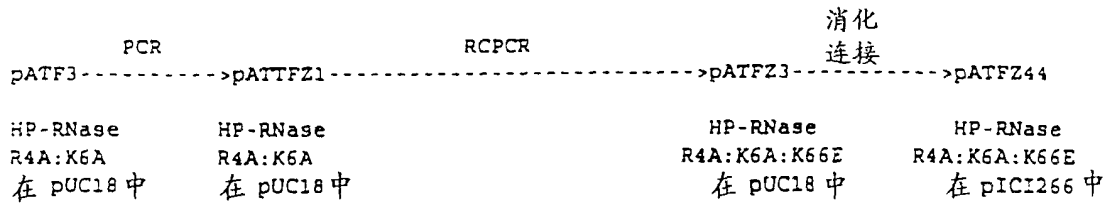


图 5

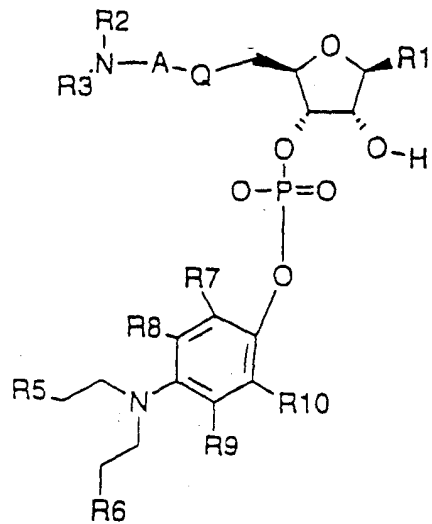
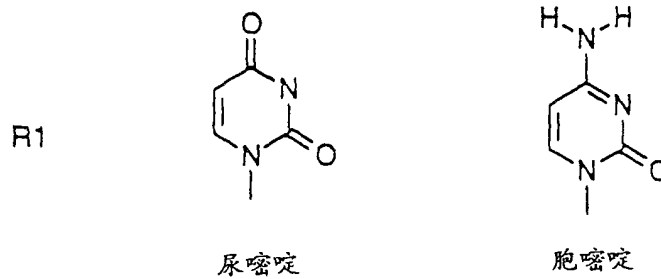


图 11



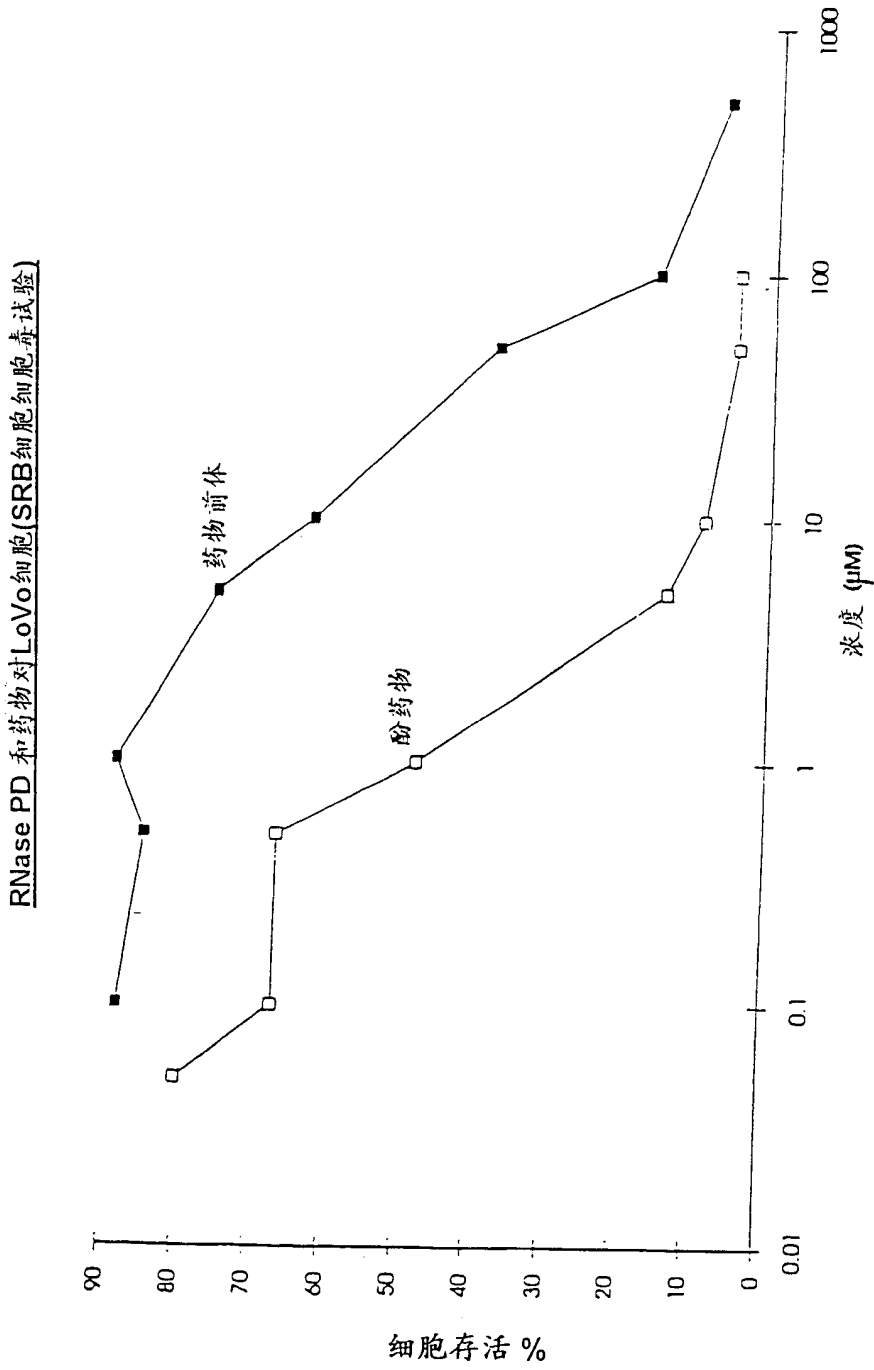


图 6

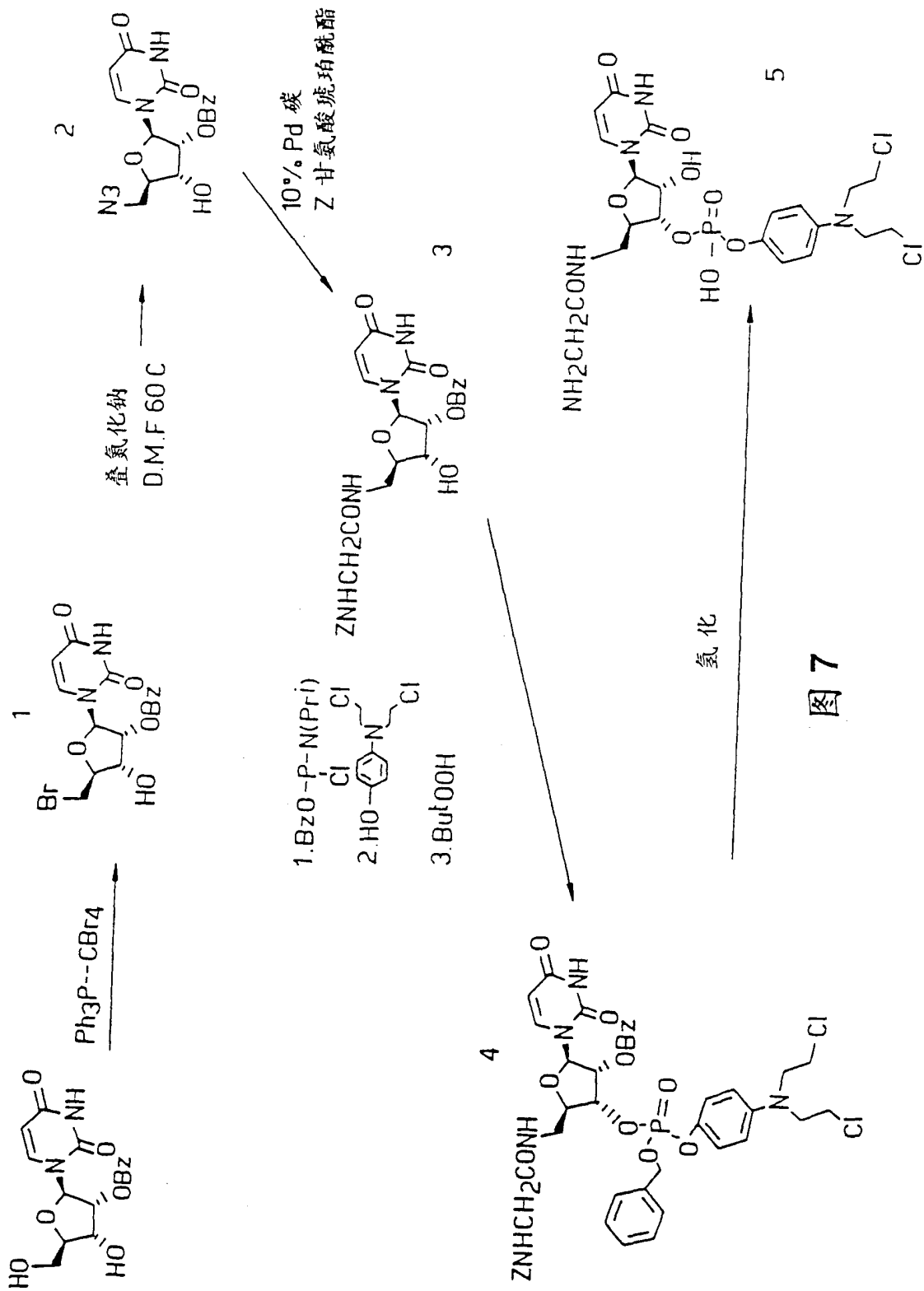


图 7

在RCPCR所用的引物以在RNase中导入突变K66E

引物 A: 5'-GGT CTG CCC ATT **CTC** GCA GGC AAC ATT TTT-3'

引物 B: 5'-TGC TAC CAG AGC TAC TCC ACC ATG AGC ATC-3'

引物 C: 5'-AAT GTT GCC TGC **GAG** AAT GGG CAG ACC AAT-3'

引物 D: 5'-CTG GGA GCA CAC GGC CTG GAC ATC AGC CA-3'

黑体核苷表示突变的位置

用于分离HP-RNase基因并用于构建在E.coli中可表达的嵌合基因的引物

引物 1: 5'-CGC GCG AAT TCG GGT CCA GCC TTC CCT GGG C-3'

引物 2: 5'-GGC CGG AAT TCC ATC AAA GTG GAC TGG CAC A-3'

引物 3: 5'-CGC TGT TGG TCC TGG TGC TGC TGC TGG TGC GGG TCC AGC CTT CCC-3'

引物 4: 5'-TGATGG CTC TGA AGT CCC TGG TCC TGT TGT CGC TGT TGG TCC TGG-3'

引物 5: 5'-GCG CGA ATT CAT GTT CTT GGA GGA TGA TTG ATG GCT CTG AAG TCC C-3'

引物 6: 5'-CGC GGA ATT CCT AGG TAG AGT CTT CAA CAG AAG CAT CAA AGT GGA CTG-3'

在RCPCR中用于在HP-RNase中导入R4A:K6A突变的引物

引物 E: 5'-AAG GAA TCC **GCT** GCC **GCT** AAA TTC CAG CGG CAG-3'

引物 F: 5'-GGA AGG CTG GAC CCG CAC CAG CAG CAG CAC-3'

引物 G: 5'-CTG GAA TTT **AGC** GGC **AGC** GGA TTC CTT GCC CAG-3'

引物 H: 5'-CAT ATG GAC TCA GAC AGT TCC CCC AGC AGC-3'

黑体核苷酸表示突变的位置

图 8

合成尿苷基的药物原类似物

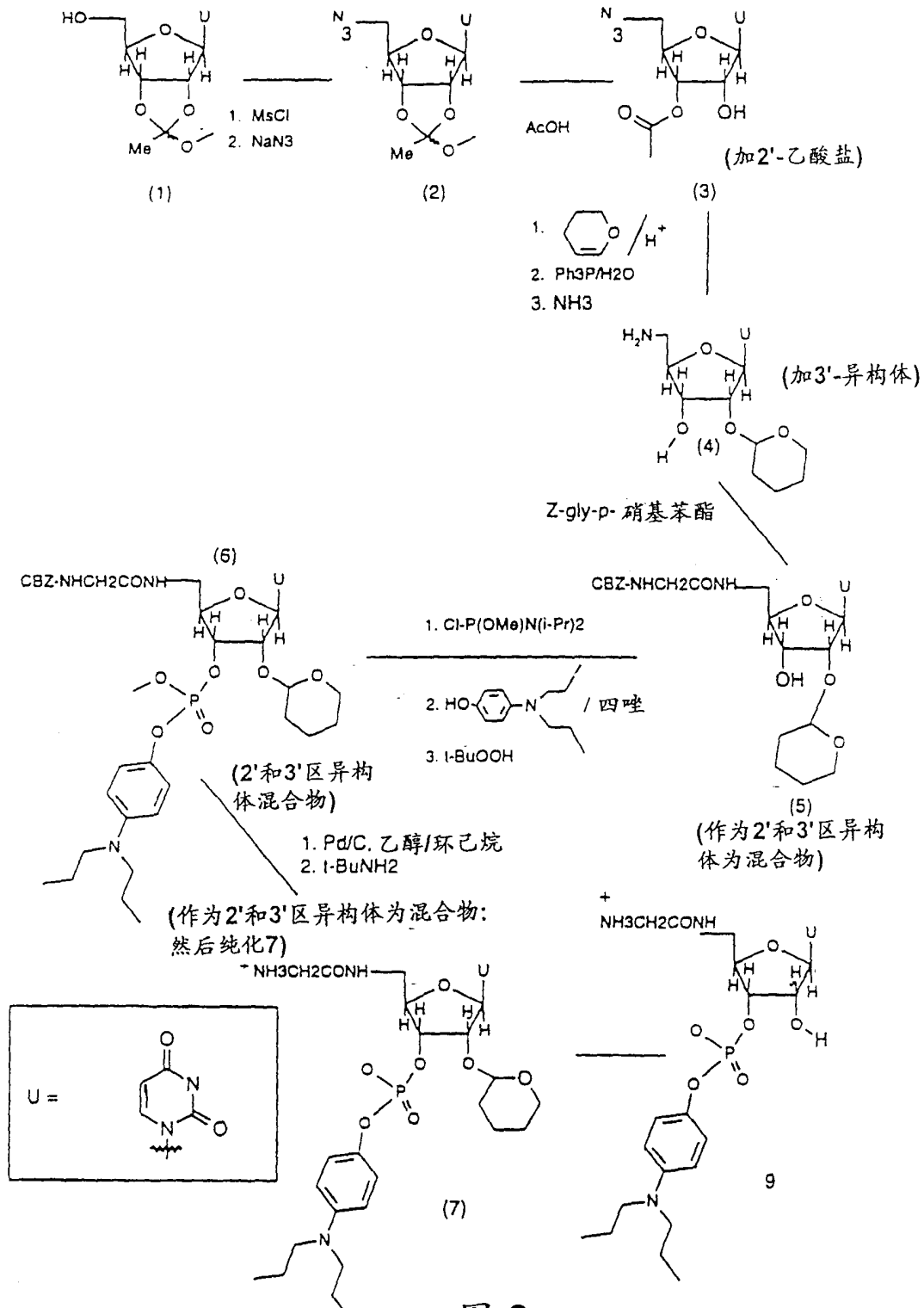


图 9

合成胞苷基的药物原类似物

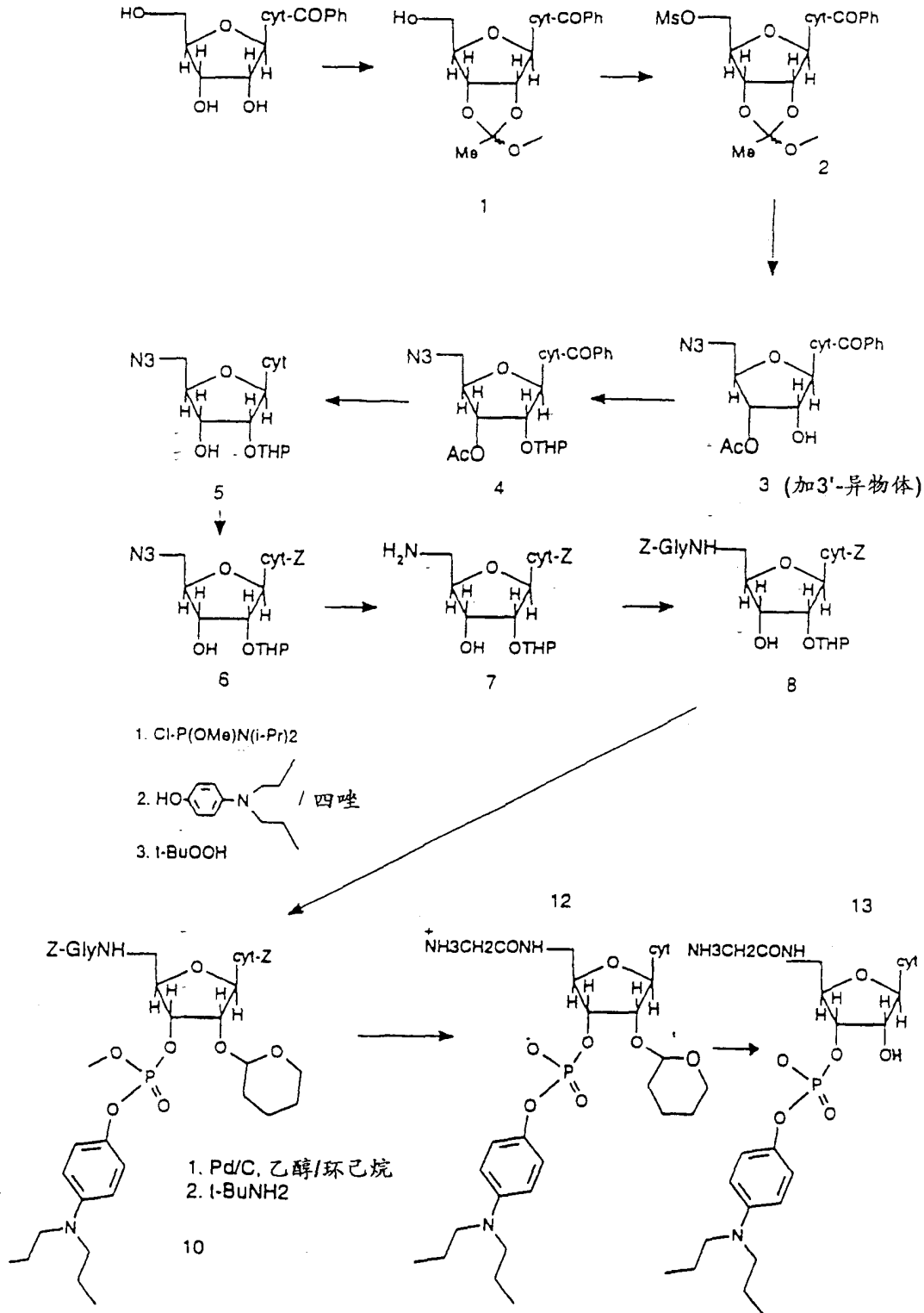


图 10

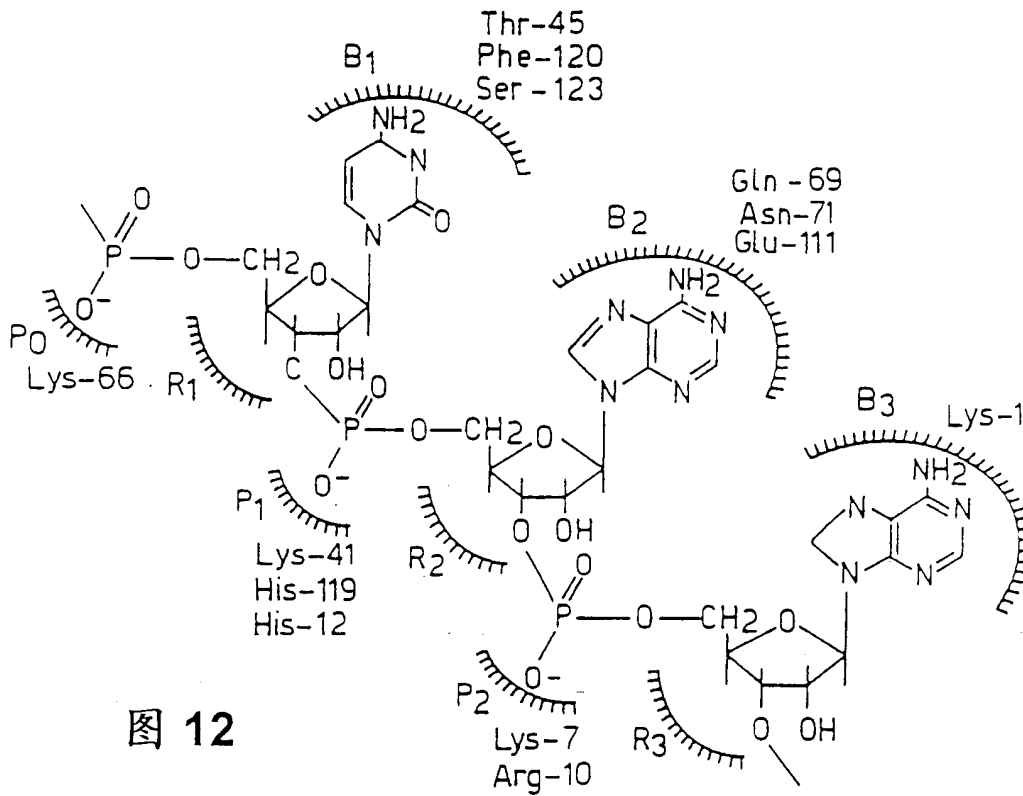


图 12

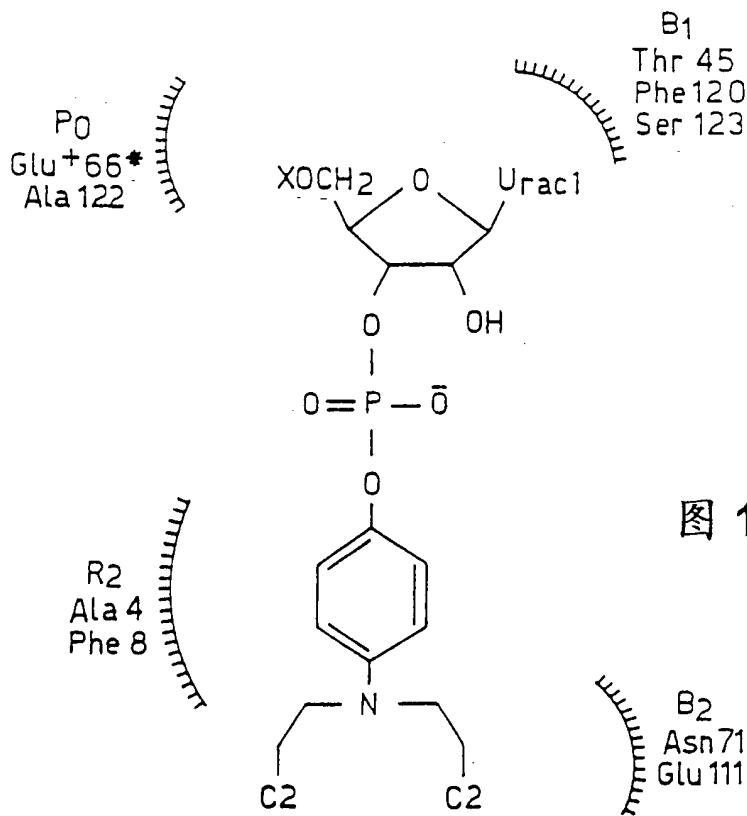
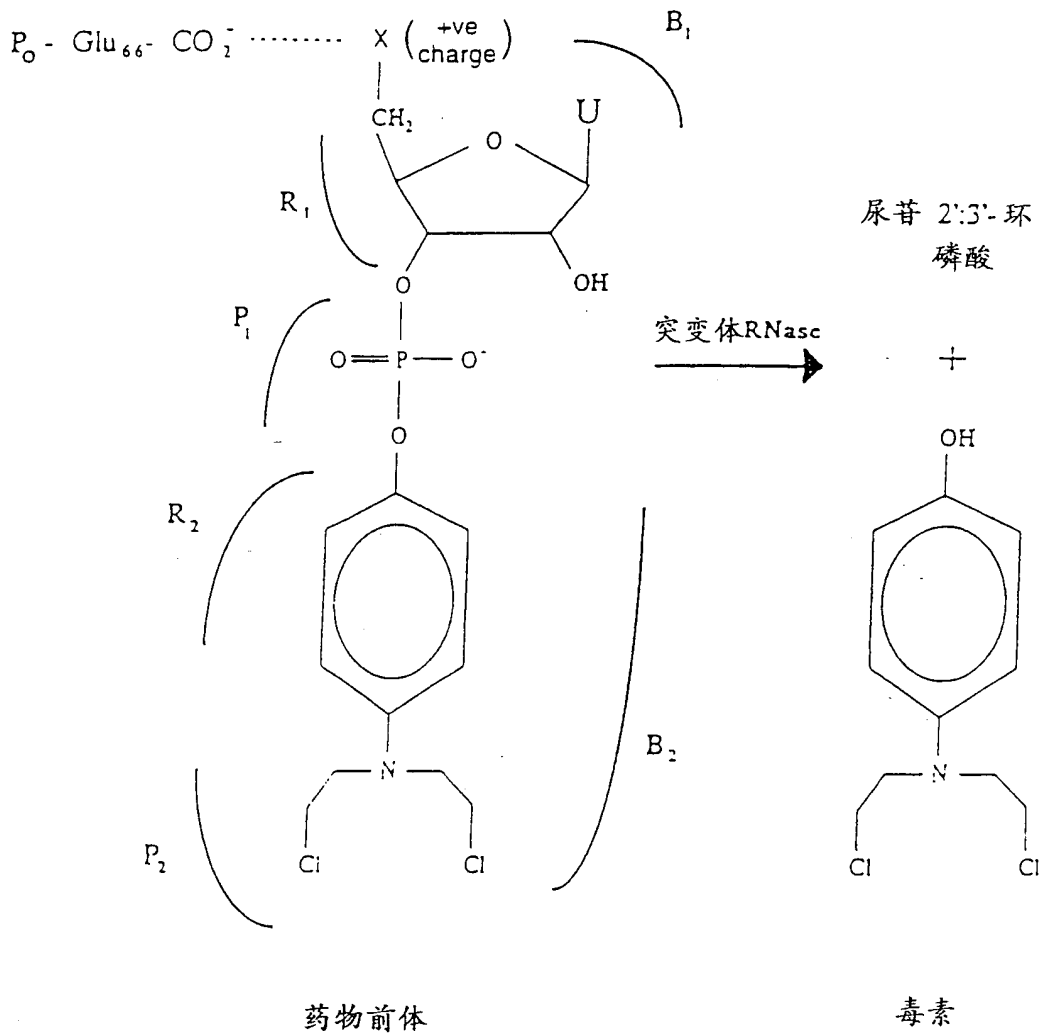


图 13



药物前体与突变体RNase K66E 使用的实例

图 14

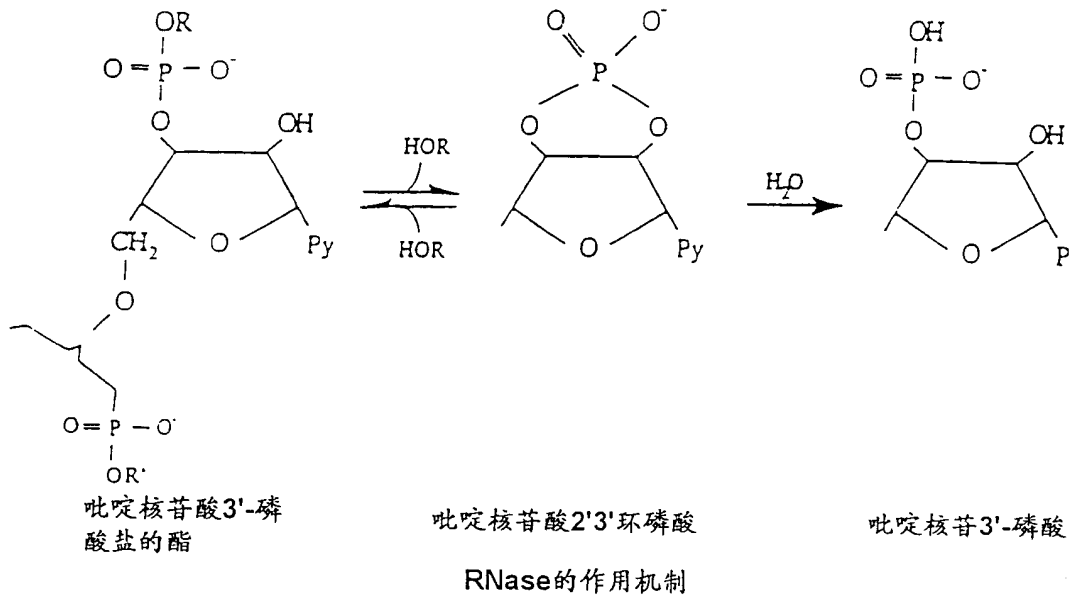


图15

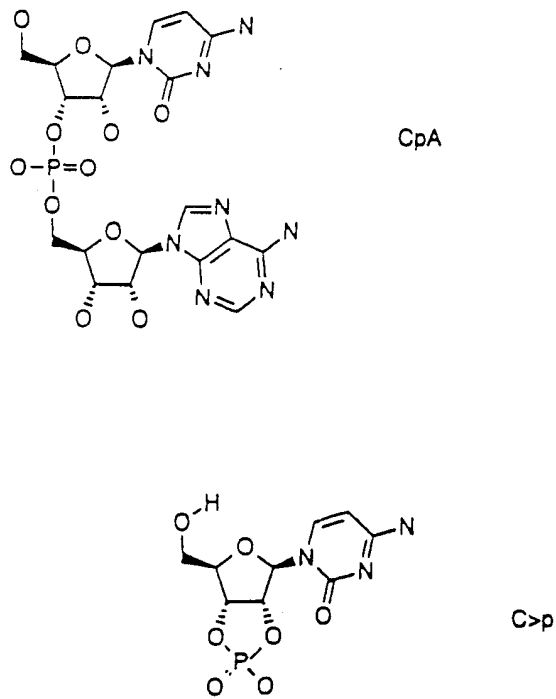


图16

Christensen, L. F. and Broom, A. D.
 J. Org. Chem. (1972) 37 3398-401

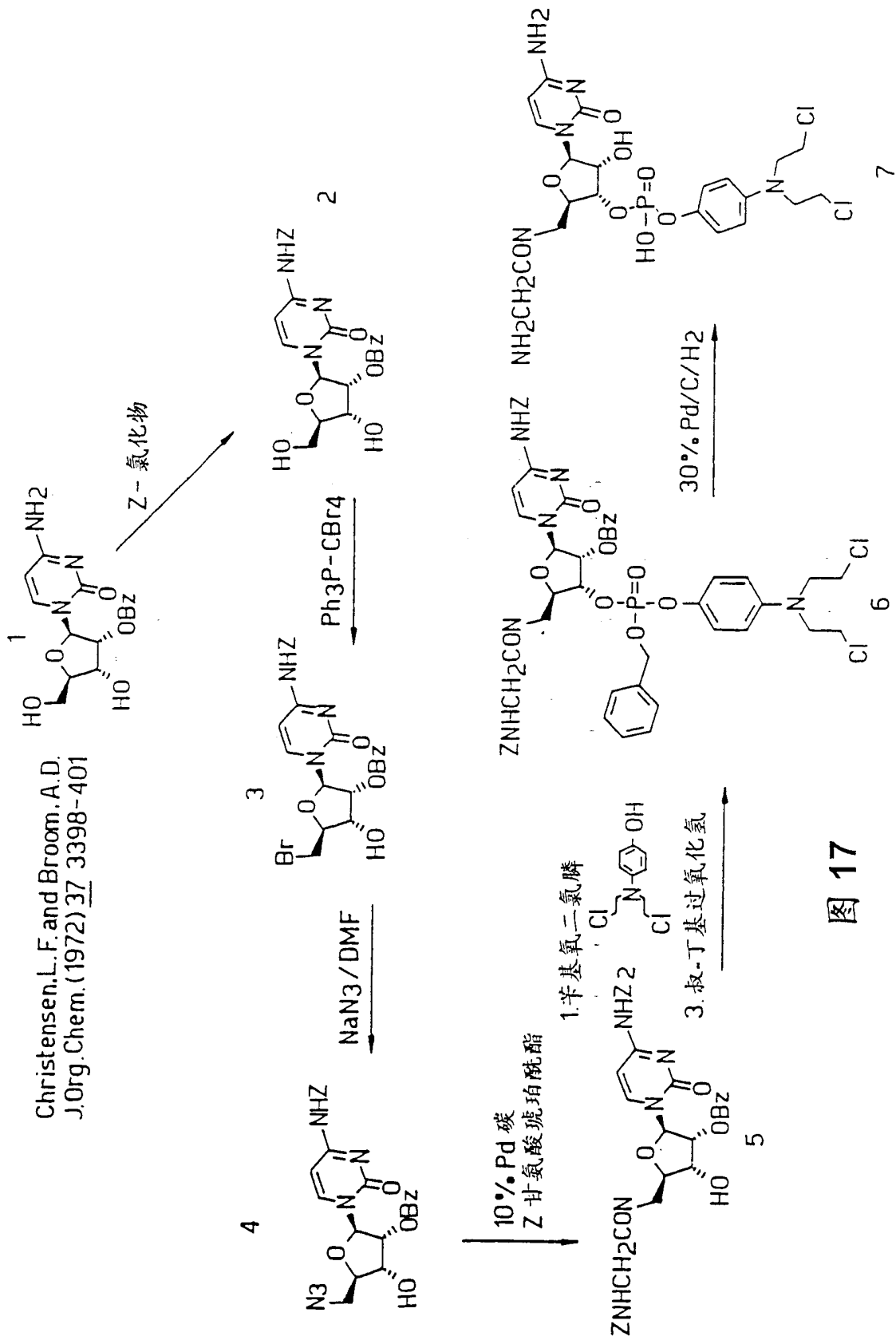


图 17

人胰羧肽酶B

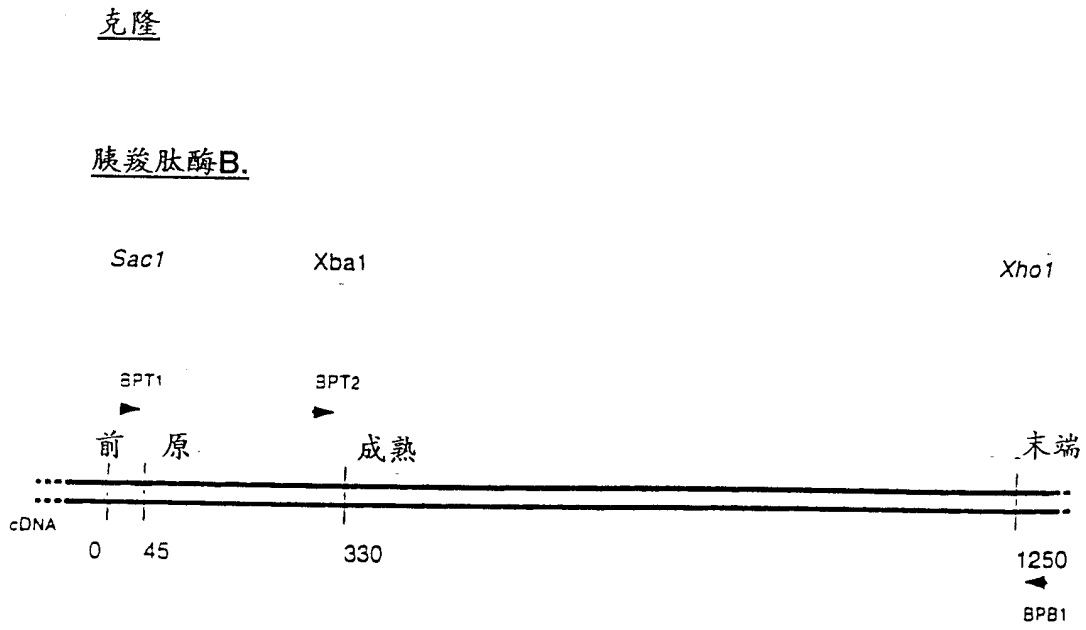
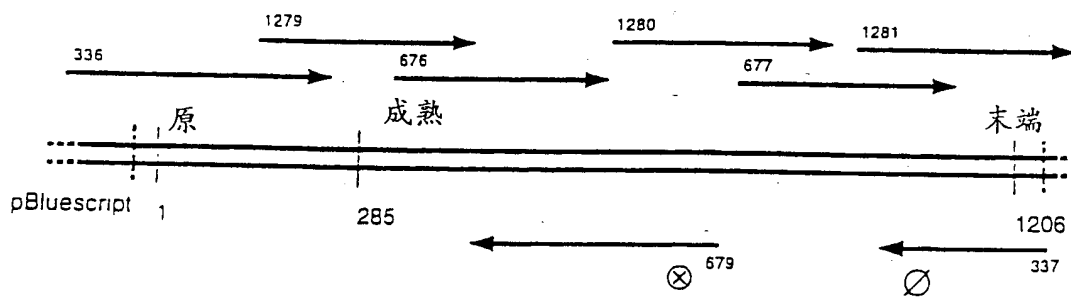


图18

人胰凝乳蛋白酶B

测序



所有6个克隆有相同的序列而且均有:

⊘ 在酶识别位点,即凝乳蛋白酶B有天冬氨酸

当与公开序列比较时:

⊗ TGC密码子插入片数,将多肽...GSSIG...变成...GSSGIG...

图 19

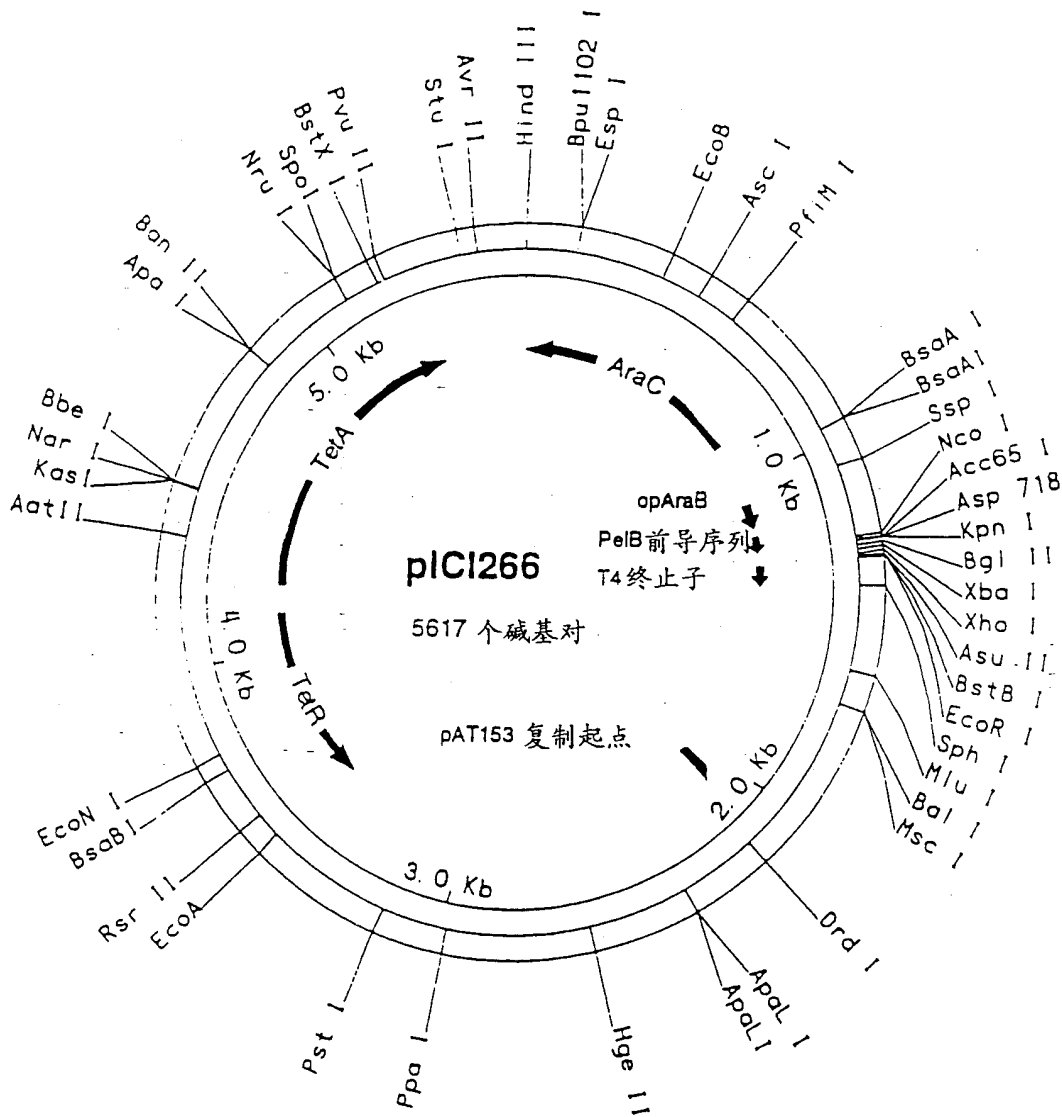


图 20

pIC1266 表达载体 - 基因克隆

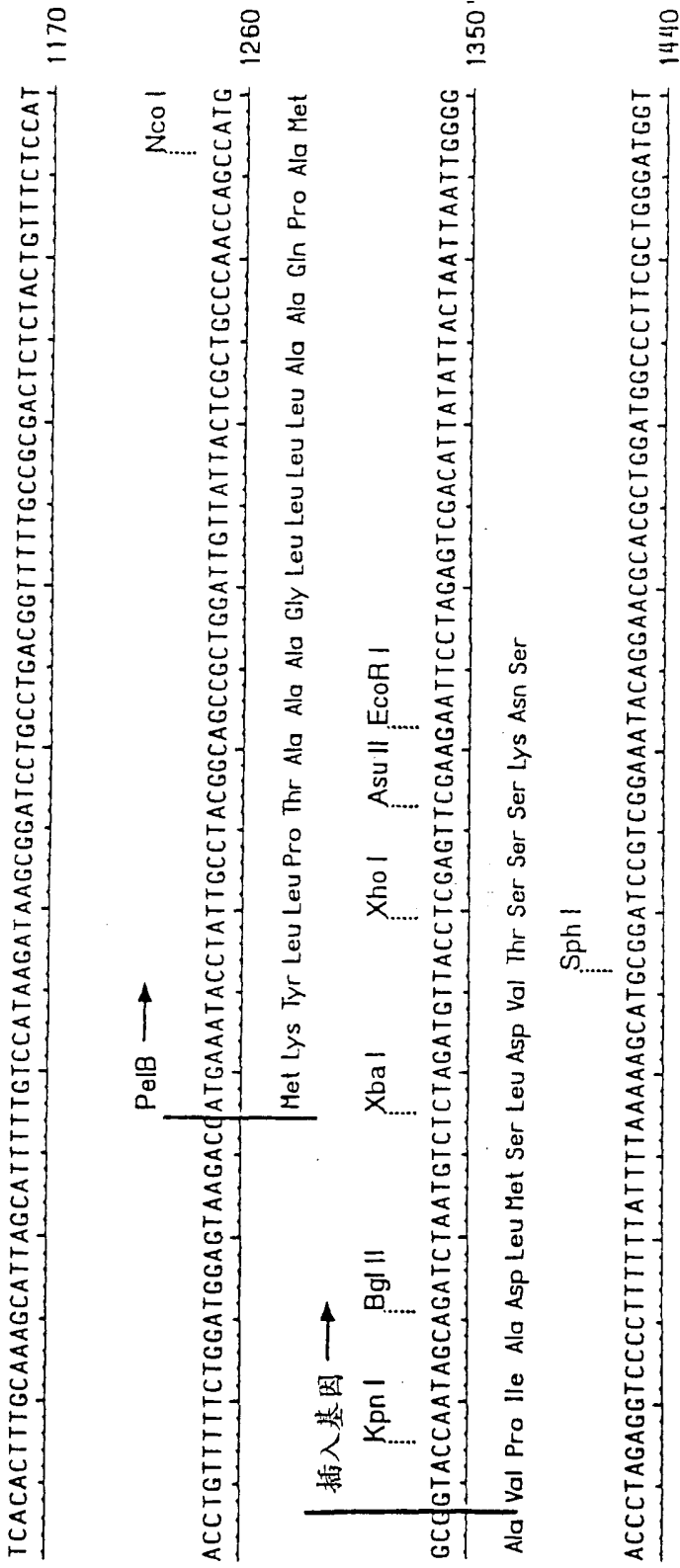


图 21

谷氨酸药物前体和酚氨芥药物在LoVo人结肠直肠肿瘤细胞中的细胞毒性

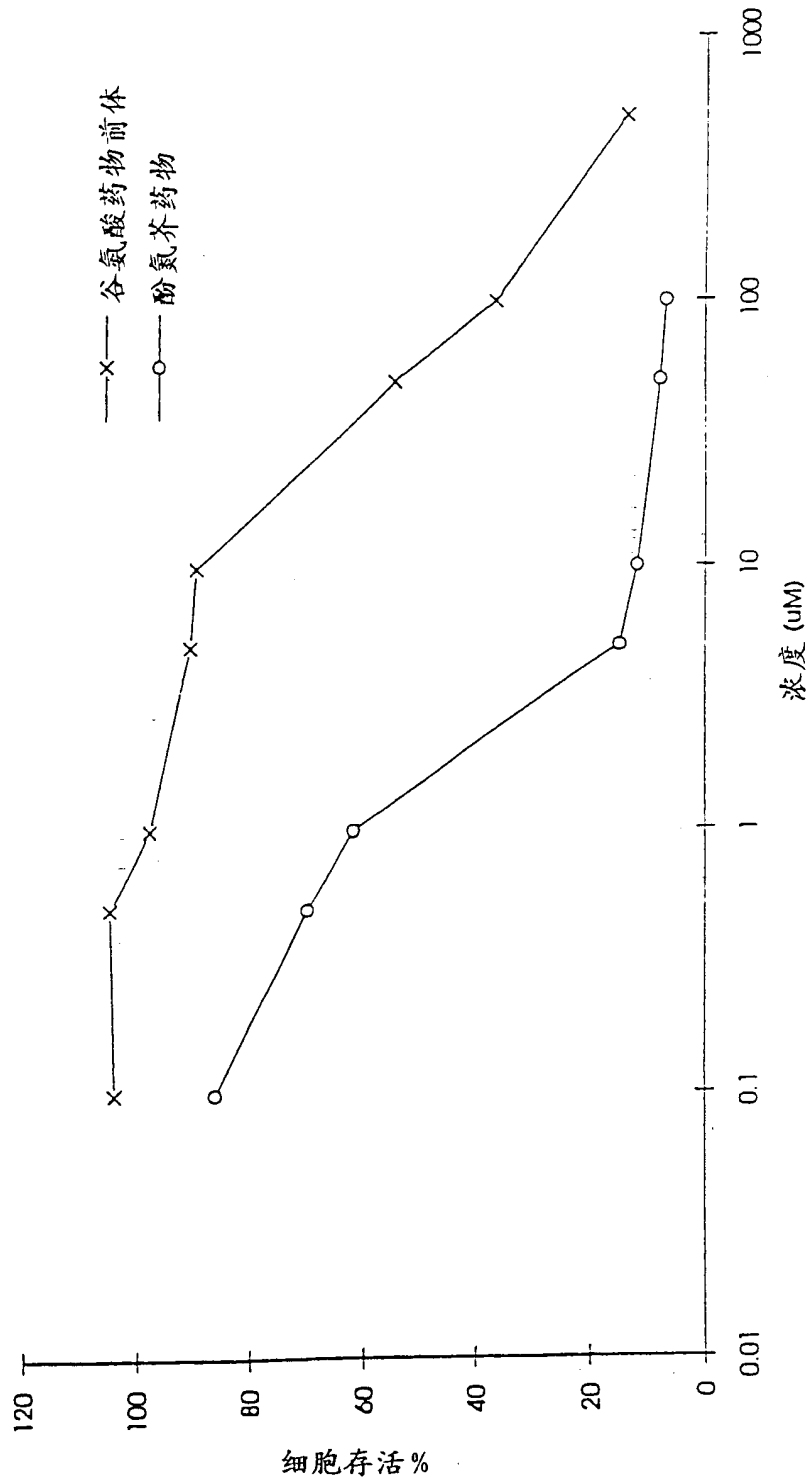


图 22

生长培养基

组分	浓度 $g\cdot l^{-1}$ 去离子水
正磷酸二氢钾	3.0
正磷酸氢二钠	6.0
氯化钠	0.5
酪氨酸水解产物	2.0
硫酸铵	10.0
甘油	35.0
酵母提取物	20.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.03
硫胺素	0.008
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04
柠檬酸	0.02
微量元素溶液(TES)*	$0.5\ ml\cdot l^{-1}$
四环素盐酸	0.01

*微量元素溶液 (TES)

组分	mg/10ml去离子水
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	2.0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.8
硫酸钾铬 12水合物	0.2
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2
硼酸	0.1
碘化钾	2.0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	2.0
硫酸镍6水合物	0.09
钼酸钠2水合物	0.4
$ZnSO_4 \cdot 6H_2O$	0.4

图 23

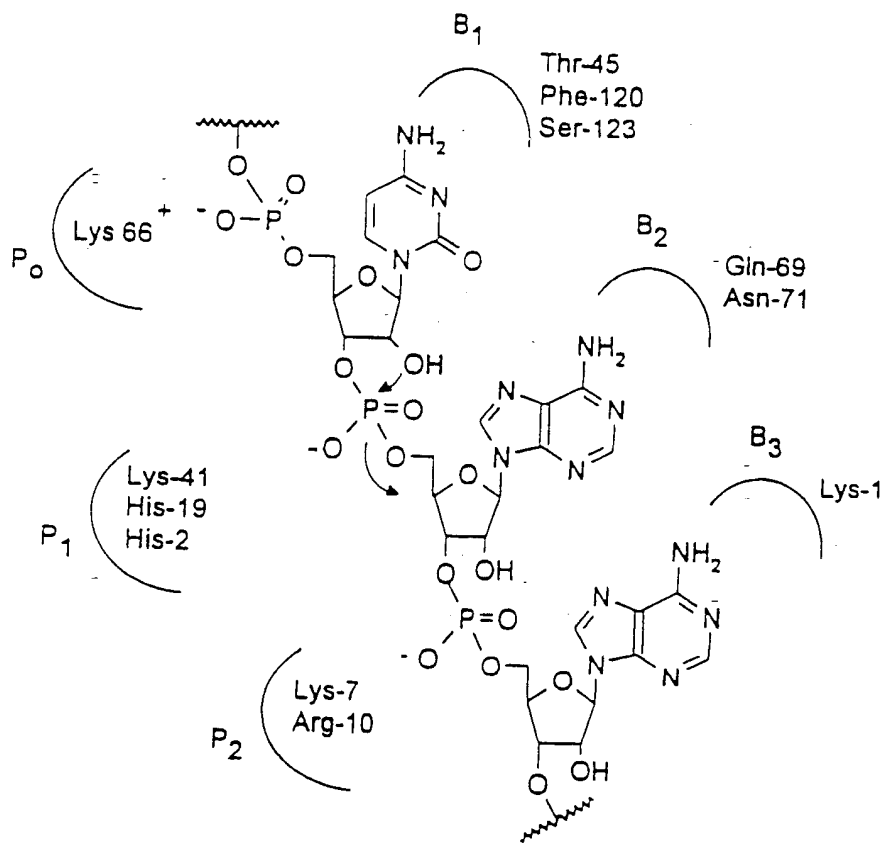


图 24

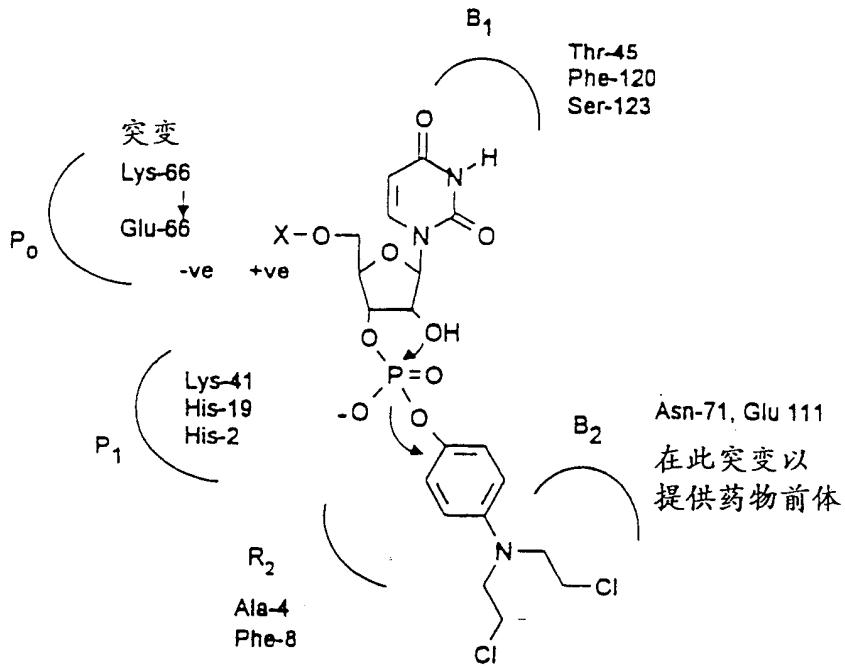


图 25

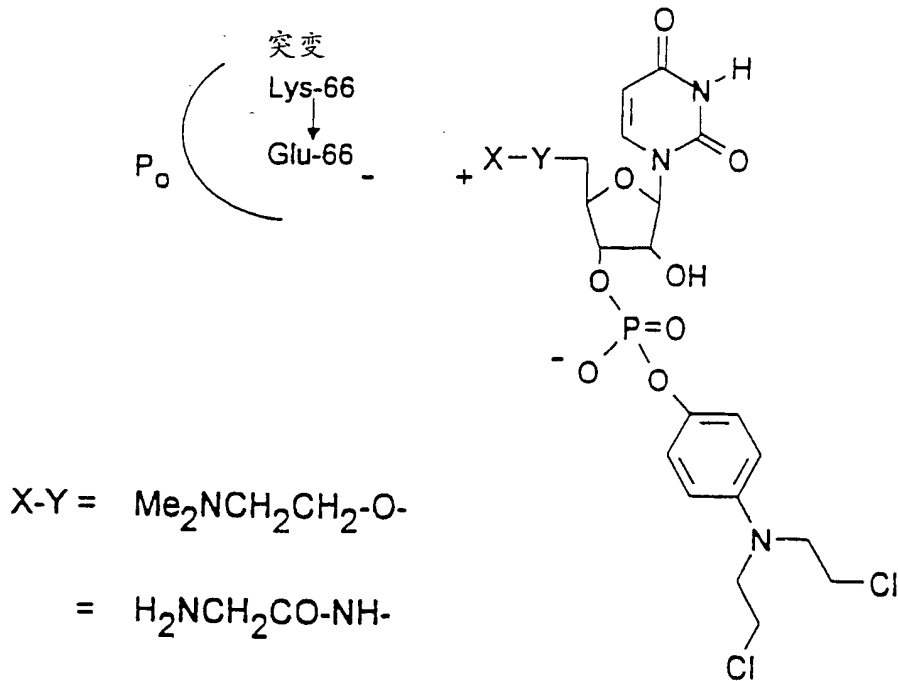
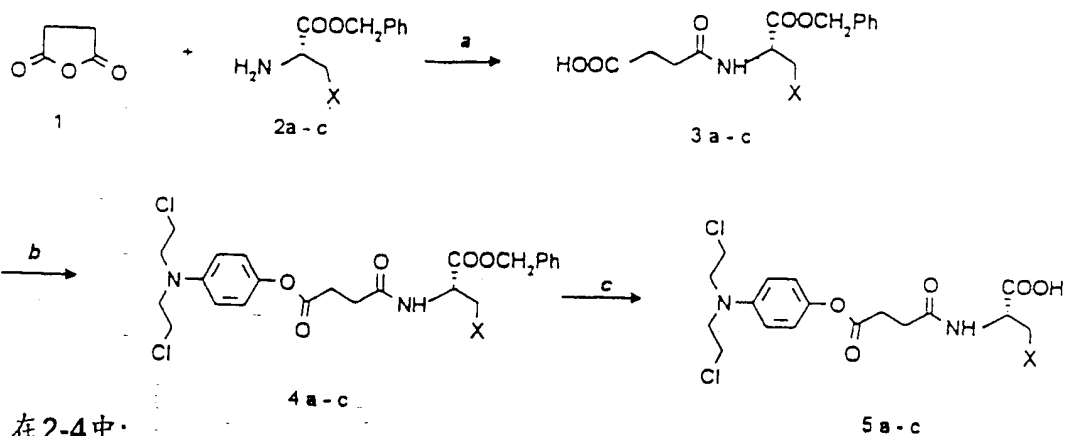


图 26



在2-4中:

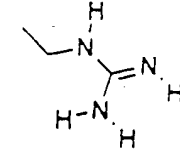
a X = COOCH₂Ph

b X = CH₂COOCH₂Ph

c X = (CH₂)₂NH-C(=N)-NO₂
 |
 NH₂

在5a中, X = COOH

在5b中, X = CH₂COOH

在5c中, X = 

a) CHCl₃, Et₃N b) 6, CHCl₃, EDCI, DMAP c) Pd/C H₂, AcOEt, MeOH

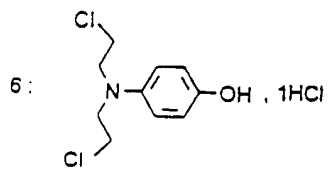


图 27

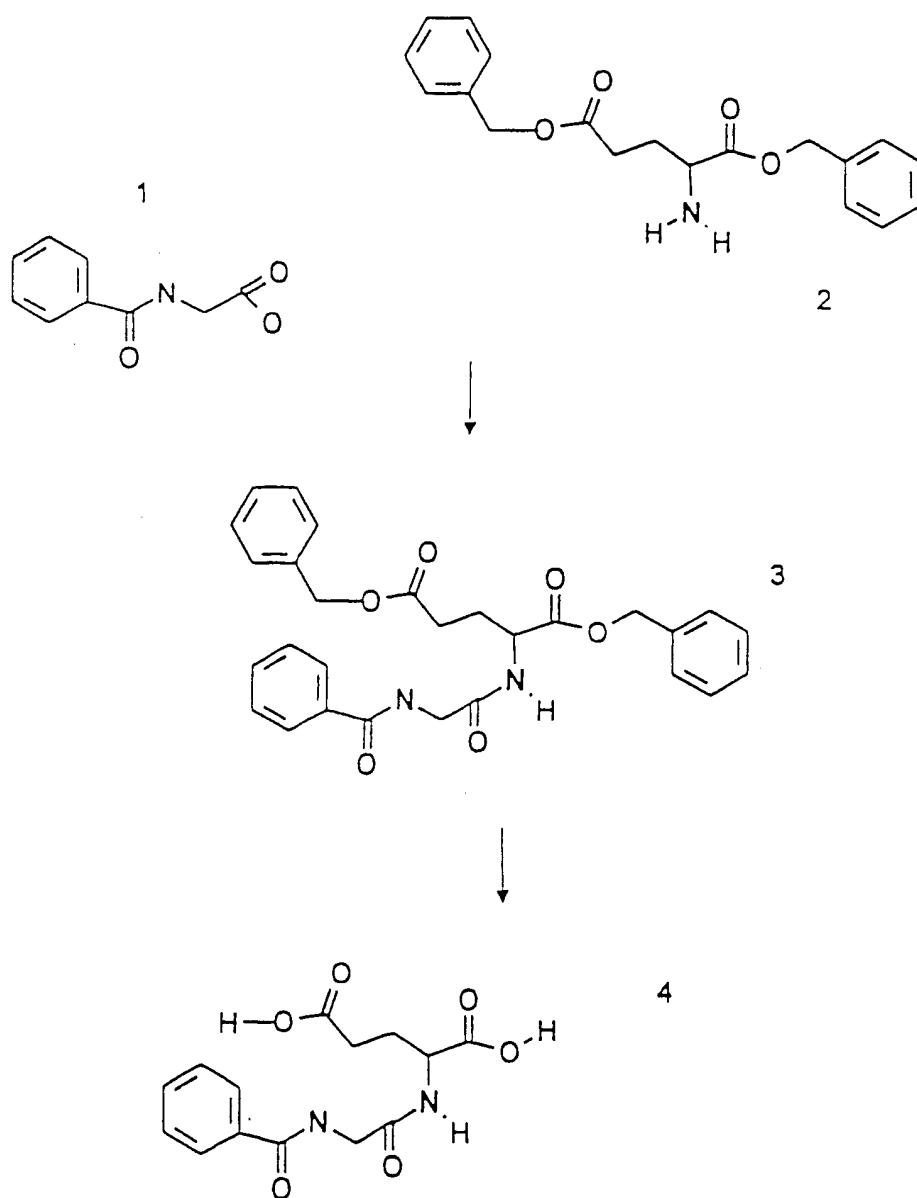


图 28

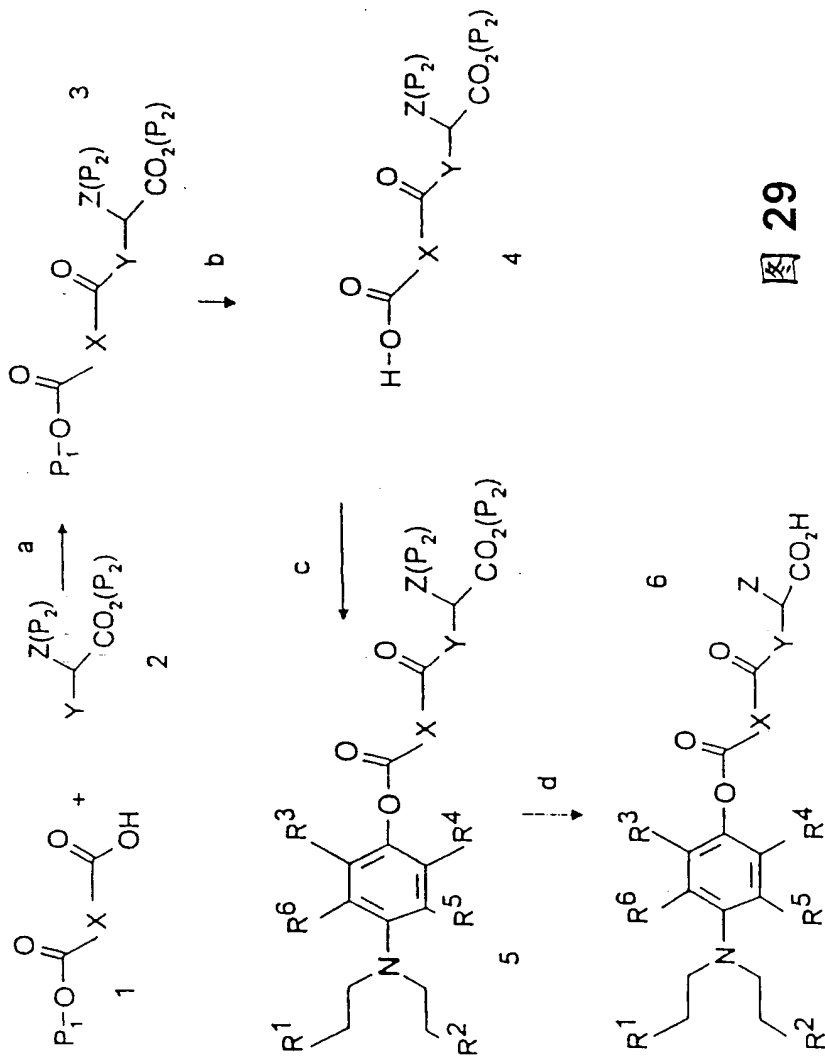


图 29

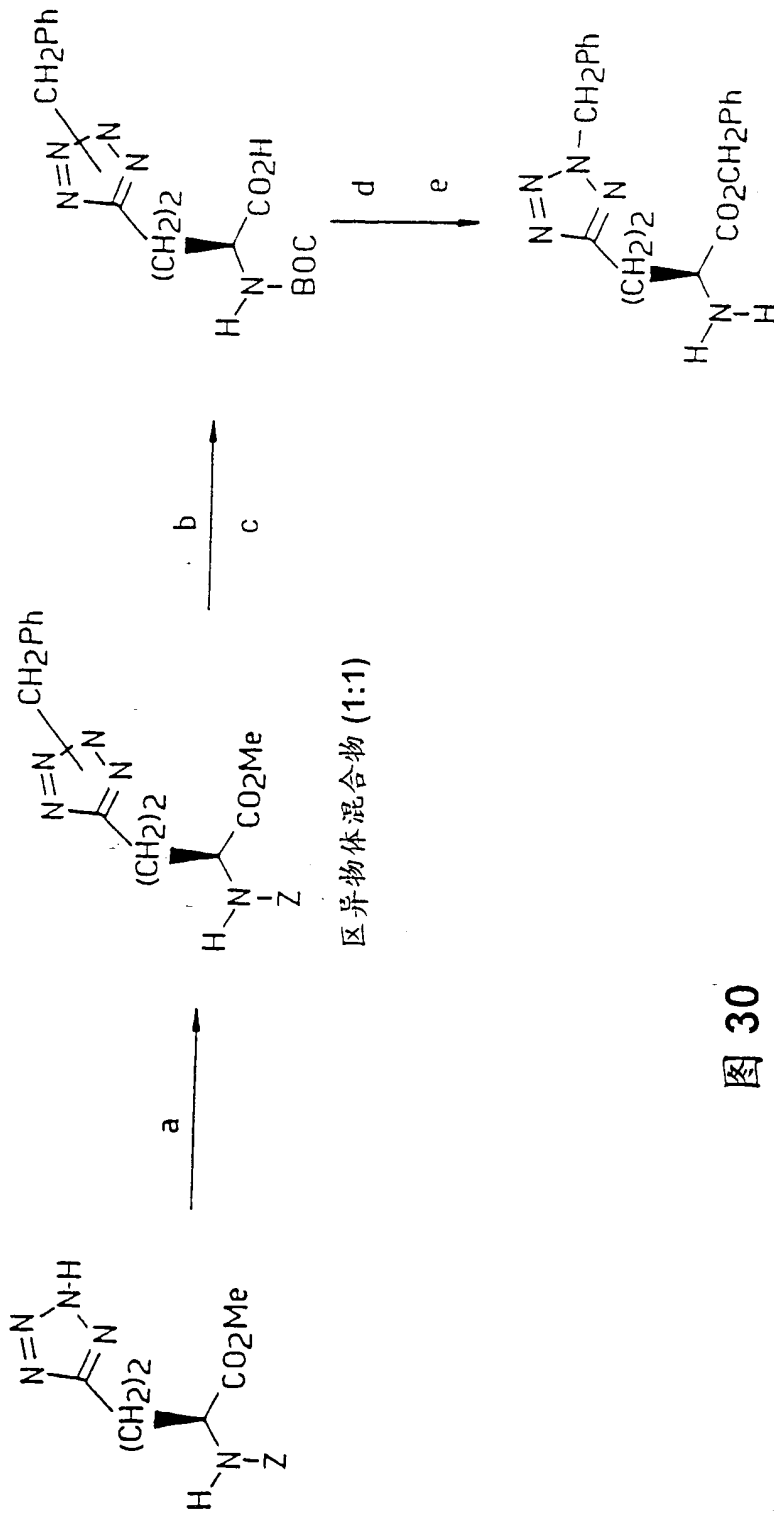
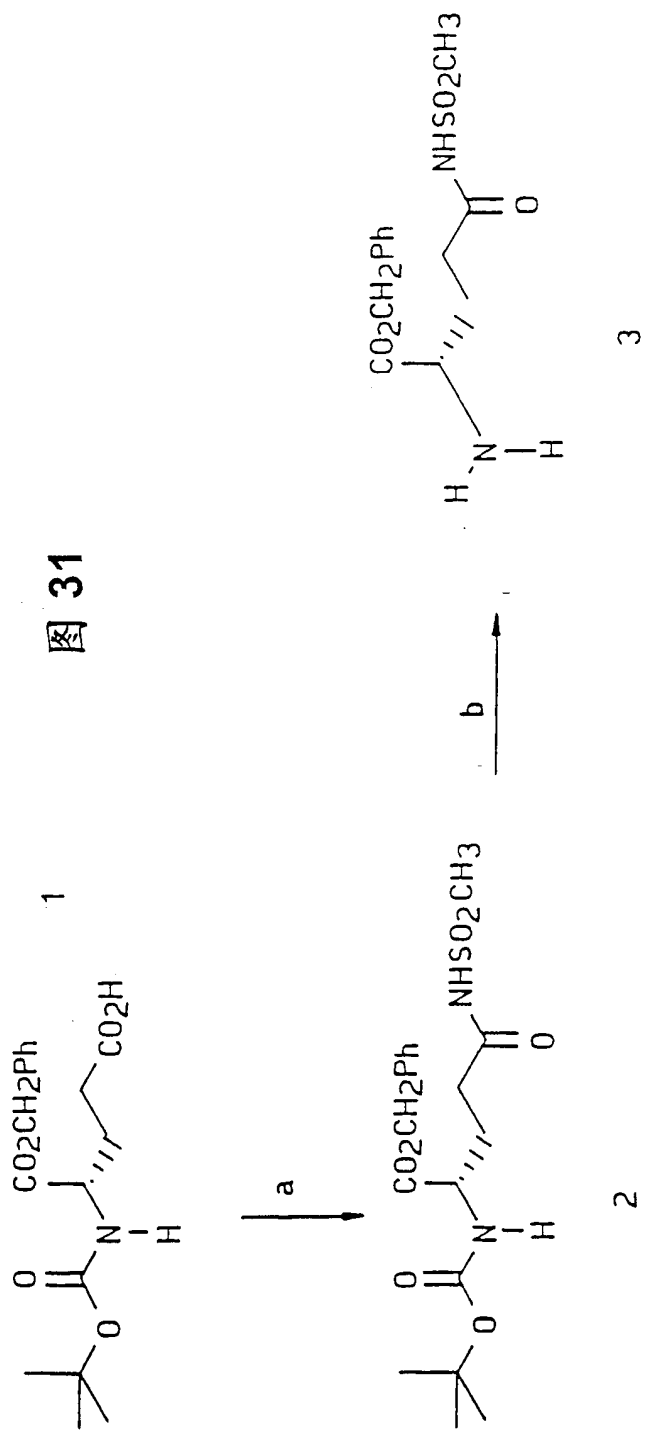


图 30



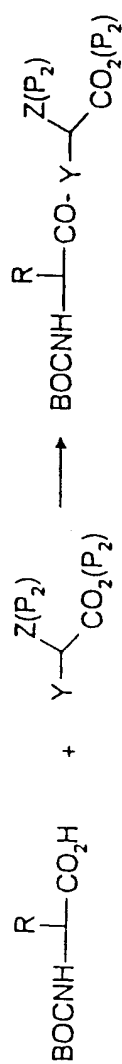
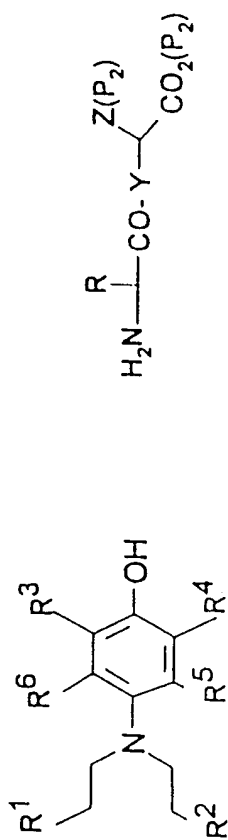


图 32



a

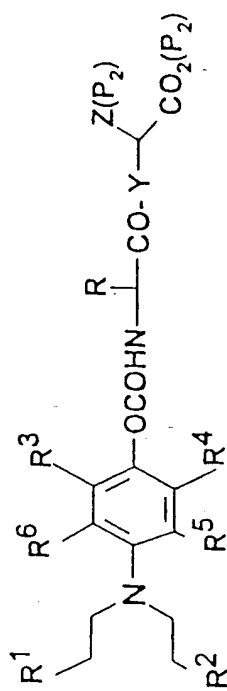


图 33