

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

C07K 14/195



# [12] 发明专利申请公开说明书

C07K 16/12 C12N 15/31

C12Q 1/02 A61K 39/395

A61K 38/00 A61K 45/00

A61P 1/00 A61P 1/04

A61P 35/00 A61P 43/00

G01N 33/15 G01N 33/50

[21] 申请号 02824401.X

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1599750A

[22] 申请日 2002.12.5 [21] 申请号 02824401.X

[30] 优先权

[32] 2001.12.5 [33] JP [31] 371210/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/012752 2002.12.5

[87] 国际公布 WO2003/048199 日 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.7

[71] 申请人 大野博之

地址 日本千叶县

[72] 发明人 大野博之 税所宏光 丹沢秀树

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有限公司

代理人 南 霆

//C12P21/08

权利要求书 2 页 说明书 43 页 序列表 4 页  
附图 8 页

[54] 发明名称 细胞毒蛋白及该细胞毒蛋白的利用

[57] 摘要

本发明涉及一种新的由幽门螺旋杆菌生成的细胞毒蛋白质(M毒素、粘膜层破坏毒素)及该细胞毒蛋白的应用。本发明提供了由幽门螺旋杆菌产生的细胞毒蛋白(M毒素)、部分肽和含有该细胞毒蛋白的抗肿瘤试剂。该蛋白通过培养用含有编码该细胞毒蛋白的DNA的重组载体转化的转化体而获得。本发明进一步提供了该蛋白的应用。

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

1、一种细胞毒蛋白，含有与由序列 No.1 表示的氨基酸序列具有至少 70% 或更高一致性的蛋白质。

2、权利要求 1 所述的细胞毒蛋白的部分肽，其特征在于该蛋白质具有与由序列 No.1 表示的氨基酸序列相同的细胞毒活性。

5           3、权利要求 1 或权利要求 2 的细胞毒蛋白，其中该蛋白质由幽门螺旋杆菌生成。

4、权利要求 1 或权利要求 2 的细胞毒蛋白，其中该蛋白通过培养用重组载体转化的转化体而获得，该重组载体含有编码权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白的序列 No.2 的 DNA。

10           5、权利要求 4 的细胞毒蛋白，其中该转化体以保藏号 FERM BP-8218 被保藏于国家先进工业科技研究所 (IPOD)。

6、一种含有权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白的抗肿瘤试剂。

7、一种特异地对抗该细胞毒蛋白的单克隆抗体，该单克隆抗体通过用权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白免疫哺乳动物而获得。

15           8、如权利要求 7 的单克隆抗体，由保藏号为 FERM BP-8222 的杂交瘤细胞克隆生成。

9、如权利要求 7 的单克隆抗体，由保藏号为 FERM BP-8223 的杂交瘤细胞克隆生成。

20           10、如权利要求 7 的单克隆抗体，由保藏号为 FERM BP-8224 的杂交瘤细胞克隆生成。

11、特异地对抗该细胞毒蛋白的多克隆抗体，该多克隆抗体通过将权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白免疫哺乳动物而获得。

12、用于检测和诊断权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白的方法，其中权利要求 7~11 中任意一项所述的单克隆抗体或多克隆抗体被使用。

5 13、用于预防和治疗由权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白引发的胃癌、胃炎、胃溃疡的试剂，其中权利要求 7~11 中任意一项所述的单克隆抗体或多克隆抗体被使用。

14、用于筛选促进或抑制权利要求 1 或 2 的蛋白质的活性的化合物的方法，其中细胞增殖抑制活性、细胞毒活性或细胞死亡通过使用  
10 温血动物细胞的阴性或阳性对照组之间的比较而被判断。

15、用于筛选促进或抑制权利要求 1 或 2 的蛋白质的活性的化合物或其盐的试剂盒，其中包括权利要求 1 或 2 的蛋白质。

16、促进或抑制权利要求 1 或 2 的蛋白质的活性的化合物或其盐，其中该化合物通过权利要求 14 的筛选方法或使用权利要求 15 的筛选  
15 试剂盒而获得。

17、含有化合物或其盐的药物，其中该化合物具有抑制权利要求 1 或 2 的蛋白质的温血动物细胞的细胞毒活性的活性。

18、权利要求 17 的药物，该药物为用于预防或治疗胃炎、胃溃疡、胃癌及通过权利要求 14 的筛选方法或使用权利要求 15 的筛选试剂盒  
20 而显示为由 M 毒素所导致的疾病的试剂。

## 细胞毒蛋白及该细胞毒蛋白的利用

### 技术领域

本发明涉及一种新的由幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 生成的细胞毒蛋白 (M 毒素, 粘膜层破坏毒素) 及该细胞毒蛋白的用途。

### 5 背景技术

一直以来认为许多人由于幽门螺旋杆菌而患胃炎、胃溃疡和胃癌。然而在这些疾病最初时导致胃上皮细胞破坏和不可逆性细胞死亡的明确直接的细胞毒性因子一直未被确定。在胃中改变 pH 环境和免疫反应的因子、通过幽门螺旋杆菌粘附于胃上皮细胞的因子或细菌本身的运动特性一直被认为是发展为此类疾病的因素。然而, 引发胃炎、胃溃疡和胃癌的胃粘膜破坏是在那一个过程中被破坏的, 或者导致胃粘膜破坏的直接因素是什么至今都还不清楚。仅具有细胞毒性的空泡毒素被分离, 但是它具有弱细胞毒性和可逆细胞毒素活性。作为病原因子的关键性细胞毒因子, 一直在体内或体外没有被发现。

15 许多研究者推测, 如上所述, 处于体内胃环境中的幽门螺旋杆菌分泌胃粘膜细胞的直接细胞毒因子。考虑到疾病的重要性, 在 1996 年其基因的所有序列被证实。然而, 即使使用血清, 由于具有困难的培养条件和纯化条件的分离条件及不确定的毒素鉴定体系, 所以不可能分离和鉴定到推测的毒素。

20 本发明欲解决的问题

5 一个难题是找到造成由幽门螺旋杆菌感染而导致的胃炎、胃溃疡和胃癌的蛋白，建立该毒素蛋白的大规模生成方法，鉴定新的 M 毒素和建立诊断和筛选方法。使用这些方法，期望控制造成胃粘膜细胞的细胞毒因子的毒素，研制胃炎、胃溃疡、胃癌等的预防和治疗试剂及发现使用该毒素的方法。

### 发明内容

10 本发明的发明人精心研究以解决以上提到的问题，并且当与通常条件不同的在与胃中环境相似的无血清条件下培养幽门杆菌时发现了一种导致不可逆性细胞死亡的新毒素。已发现该毒素每单位具有 1000 ~ 100000 倍的上述空泡毒素的毒力，并且它可以导致不仅包括胃上皮细胞而且也包括免疫细胞的各种温血动物细胞的不可逆性细胞死亡。关于这些方面本发明的发明人已反复研究从而完成本发明。

15 即，本发明提供了以下内容。(1) 含有与序列 No.1 表示的氨基酸序列具有至少 70% 或更高一致性的蛋白的细胞毒蛋白。(2) 权利要求 1 中所述的细胞毒蛋白的部分肽，其特征在于该蛋白具有与序列 No.1 表示的氨基酸序列相同的细胞毒活性。(3) 权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白，其中该蛋白由幽门螺旋杆菌生成。(4) 权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白，其中该蛋白通过培养以重组载体转化了的转化体而被获得，该重组载体含有编码权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白的序列 No.2 的  
20 DNA。(5) 权利要求 4 的细胞毒蛋白，其中该转化体以 FERM BP-8218 的保藏号被保藏于国家先进工业科技研究所 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD))。(6) 含有权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白的抗肿瘤试剂。(7) 通过对哺乳动物免疫权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白而获得的该细胞毒蛋白的特异性单克隆抗体。

(8) 用保藏号为 No. FERM BP-8222 的杂交瘤细胞克隆生成的权利要求 7 的单克隆抗体。(9) 用保藏号为 No. FERM BP-8223 的杂交瘤细胞克隆生成的权利要求 7 的单克隆抗体。(10) 用保藏号为 No. FERM BP-8224 的杂交瘤细胞克隆生成的权利要求 7 的单克隆抗体。(11) 通过对哺乳动物免疫权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白而获得的该细胞毒蛋白的特异性多克隆抗体。(12) 用于检测和诊断权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白的方法, 其中权利要求 7~11 中任意一项描述的单克隆抗体或多克隆抗体被使用。(13) 用于预防和治疗由权利要求 1 或 2 的细胞毒蛋白引发的胃癌、胃炎和胃溃疡的试剂, 其中权利要求 7~11 中任意一项描述的单克隆抗体或多克隆抗体被使用。(14) 用于筛选促进或抑制权利要求 1 或 2 的蛋白的活性的化合物的方法, 其中细胞增殖抑制活性、细胞毒活性或细胞死亡通过使用温血动物细胞的阴性或阳性对照组之间的比较而被判断。(15) 用于筛选促进或抑制权利要求 1 或 2 的蛋白的活性的化合物或该化合物的盐的试剂盒, 其中包括权利要求 1 或 2 的蛋白。(16) 促进或抑制权利要求 1 或 2 的蛋白的活性的化合物或该化合物的盐, 其中该化合物通过权利要求 14 的筛选方法或使用权利要求 15 的用于筛选的试剂盒被获得。(17) 含有化合物或该化合物的盐的药物, 其中该化合物具有抑制具有权利要求 1 或 2 的蛋白质的温血动物细胞的细胞毒活性的活性。(18) 权利要求 17 的药物, 该药物为用于预防或治疗胃炎、胃溃疡、胃癌和通过权利要求 14 的筛选方法或使用权利要求 15 的筛选试剂盒检测出为由 M 毒素而导致的疾病的试剂。

#### 附图说明

图 1 显示实施例 1 中获得的样品的阴离子交换色谱。a 显示对于各组分 (fraction) 和洗脱蛋白质的吸光度的 M 毒素的活性。b 显示通过银染在 a 的色谱中的组分 16 ~ 组分 22 的 SDS-PAGE。c 显示通过电印迹转移到 PVDF 膜上的蛋白质毒素的带。d 和 e 分别显示暴露于对照提取物和包括浓度为 1nM 的提取物的细胞毒素后 24 小时的 HeLa 细胞的形态变化。刻度条, 50  $\mu$ m。

图 2 显示由实施例 3 获得的基因重组毒素引起的细胞形态变化。a 显示 6 小时后 HeLa 细胞的阴性对照。b 和 c 显示加入 5nM 重组 M 毒素 3 小时后和 6 小时后的 HeLa 细胞。d 显示 6 小时后阴性对照的 CRL7407(ATCC) 正常人胃细胞。e 和 f 显示加入 5nM 重组 M 毒素 3 小时后和 6 小时后的 CRL7407 细胞。

图 3 显示实施例 3 中几种癌细胞对 M 毒素的敏感性。该敏感性通过 WST 方法判定。X 轴显示培养基中 M 毒素的浓度, Y 轴直接显示 415nm 波长的吸光度或以阴性对照的吸光度为 100% 时的相对比率。HLF: 大鼠肝细胞瘤。colon 26: 小鼠结肠瘤。

图 4 为如图 3 中所示。T24: 人膀胱癌。OVK18: 人卵巢癌。KLM-1: 人胰腺癌。A-549: 人肺癌。Ca9-22: 人齿龈癌。CRL1500: 人乳腺癌。

图 5 显示实施例 8 中制备的单克隆抗体的蛋白质印迹实验。所有的杂交瘤细胞的培养上清液的稀释倍数为 20 倍。

图 6 显示实施例 9 中使用藻酸钙作为吸附剂的 M 毒素活性。阴性对照只含有 pH7.7 的 10mM Tris 缓冲液作为培养基, 而阳性对照含有培养基和 10mM M 毒素。X 轴显示通过藻酸钙柱的各组分的编号。各组分的平均浓度为 10nM。这些组分中的任意一个都表示至少 10 nM 或

更高。当红血球被破坏时，溶液中血红蛋白的浓度被提高。Y 轴显示 415nm 的吸光度。

在实施例 10 中，图 7 显示实施例 10 中通过活性炭的吸附而显示 M 毒素抑制活性的 HeLa 细胞的存活百分率。X 轴表示柱子的各洗脱组分编号。M 毒素的浓度平均为 10nM 且任意一个组分浓度至少为 10nM 或更高。Y 轴表示通过 WST 方法测得的各组分的毒性的值除以阳性对照所得的百分率。

图 8 如图 7 中所显示。它显示实施例 10 中在通过吸附显示 M 毒素抑制活性的 CM-纤维素和藻酸钙的 HeLa 细胞中的存活百分率。

## 10 具体实施方式

本发明的具有与序列 No.1 表示的氨基酸序列相同的氨基酸序列或基本相同的氨基酸序列的蛋白质可以是来源于幽门螺旋杆菌的菌株，如 NCTC 11637、NCTC 11916、DT 61A、NCTC 11639、R85-13 6P、R85-13-12F、R85-13-11P、T81213-NTB、J99、4、U2-1、85D08、MC903、MC123、Tx30a、26695、UA 1182 等的蛋白质，或者可以是合成蛋白质。

作为与序列 No.1 表示的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列，可以举出具有约 70% 或更高、优选约 80% 或更高、更优选约 90% 或更高、进一步更优选约 95% 或更高的同源性的氨基酸序列的例子。作为具有与序列 No.1 代表的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列的蛋白质，可以举出具有与具有序列 No.1 表示的氨基酸序列的蛋白质基本相同的氨基酸序列和基本相同的活性的蛋白质的例子。作为基本相同的活性的例子，细胞增殖抑制活性、细胞毒活性或导致细胞死亡的活性能够被

使用。基本相同意味着这些活性具有相同的性能，例如，在生理化学或药理学方面。因此，优选细胞毒素等的活性具有相同的性能，例如，约 0.1~100 倍，优选地约 0.5~10 倍，更优选地约 0.5~2 倍。这些活性的程度或蛋白质分子量的数量因子可以不同。细胞增殖抑制活性、细胞毒活性或导致细胞死亡的活性的活性可以通过众所周知的方法，例如，通过下述的筛选方法被判定。

作为本发明的蛋白质，以下蛋白可以被举例：在由序列 No.1 表示的氨基酸序列中删除 1~150 个（优选地 1~50 个）氨基酸的氨基酸序列；在由序列 No.1 表示的氨基酸序列中增加 1~100 个（优选地 1~30 个）氨基酸的氨基酸序列；在由序列 No.1 代表的氨基酸序列中插入 1~50 个（优选地 1~30 个）氨基酸的氨基酸序列；在由序列 No.1 表示的氨基酸序列中 1~50 个（优选地 1~30 个）氨基酸被其它氨基酸取代的氨基酸序列；或者含有这些氨基酸序列的组的蛋白质，被称作粘蛋白。

如上所述当氨基酸序列被插入、删除或取代时，插入、删除或取代的位置不是特别地受限制的。

根据通常实践，在本说明的蛋白中，左侧为 N 末端（氨基末端），右侧为 C 末端（羧基末端）。在含有具有序列 No.1 所表示氨基酸序列的蛋白质的本发明的蛋白质中，C 末端通常为羧基基团（-COOH）或羧化物（-COO-），但是它可以是酰胺基（-CONH<sub>2</sub>）或酯基团（-COOR），其中 R 为甲基、乙基、n-丙基、异丙基、n-丁基等 C<sub>1-6</sub> 烷基基团，环戊基、环己基等 C<sub>3-8</sub> 环烷基基团，苯基、 $\alpha$ -萘基等、苯甲基、苯乙基等 C<sub>6-12</sub> 芳香基基团，苯甲基、苯乙基等苯基-C<sub>1-2</sub> 烷基基团，或者  $\alpha$ -萘甲基等  $\alpha$ -萘基-C<sub>1-2</sub> 烷基基团的 C<sub>7-14</sub> 芳烷基基团。当本发明的蛋白质在除

了 C 末端的其它位置处具有羧基（或羧化物）时，则本发明的蛋白质中含有具有酰胺基的或酯化的基团的蛋白质。作为酯，上述的 C 末端的酯可以被使用。在本发明的蛋白质中，进一步含有 N 末端处的氨基酸残基（例如甲硫氨酸残基）的氨基被保护基团（如甲酰基、乙酰基或相似的 C<sub>1-6</sub> 烷酰基基团等 C<sub>1-6</sub> 酰基基团）保护的蛋白质；在体内通过切割而生成的 N 末端的谷氨酸残基被改变为吡咯谷氨酸基的蛋白质；分子中氨基酸侧链上的取代基（例如-OH、-SH、氨基、咪唑基团、吲哚基团、胍基等）被适当的保护基团（如甲酰基的 C<sub>1-6</sub> 烷酰基等的 C<sub>1-6</sub> 酰基基团等）保护的蛋白质；或结合有糖链的所谓糖蛋白的结合蛋白质等。

作为本发明的蛋白质的部分肽，可以是上述本发明的蛋白质的部分肽，优选地，该部分肽与本发明的蛋白质具有相似的活性（如细胞增殖抑制活性、细胞毒活性等）。作为例子，具有至少 20% 或更多，优选地 50% 或更多，更优选地 70% 或更多，进一步优选地 90% 或更多，最优选地 95% 或更多的本发明的氨基酸序列，和具有细胞增殖抑制活性、细胞毒活性或导致细胞死亡的活性的氨基酸序列的肽可以被使用。本发明的部分肽可以为以下肽：在氨基酸序列中 1~5 个（优选 1~3 个）氨基酸被删除；1~10 个（优选 1~5 个（更优选 1~3 个））氨基酸被添加到氨基酸序列上；1~5 个（优选 1~3 个）氨基酸被插入到氨基酸序列中；或者 1~5 个（优选 1~3 个）氨基酸被其它氨基酸取代。

尽管在如以上所示的本发明的蛋白质中，本发明的部分肽通常在 C 末端具有羧基（-COOH）或羧化物（-COO-），但是 C 末端可以是酰胺（-CONH<sub>2</sub>）或酯（COOR），其中 R 与上述意义相同。在本发明的部分肽中，进一步如以上本发明的蛋白质所示，含有 N 末端的氨基酸残

基（例如甲硫氨酸残基）的氨基被保护基团保护的肽；在体内通过切割而生成的 N 末端的谷氨酸残基被改变为吡咯谷氨酸基的蛋白质；分子中氨基酸侧链上的取代基被适当的保护基团保护的蛋白质；或结合有糖链的所谓糖蛋白的结合蛋白质等。本发明的部分肽可以被用作构建抗体的抗原，因此细胞增殖抑制活性、细胞毒活性等不是必需的。

作为本发明的蛋白质或部分肽的盐，生理上允许的酸（如无机酸或有机酸）或碱（如碱性金属盐）的盐可以被使用，并且优选生理上允许的酸性加成盐可以被使用。作为这种盐，有无机酸（如盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸），有机酸（如乙酸、甲酸、丙酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸）的盐。本发明的蛋白质和盐可以来自任意一种上述幽门螺旋杆菌株的蛋白质通过众所周知的方法，或通过培养含有编码后述蛋白质的 DNA 的转化体而被制备。该蛋白质和盐可以进一步根据后述用于合成肽的方法被制备。当从任意一种幽门螺旋杆菌株生成蛋白质时，细菌细胞内的蛋白质通过超声波破碎被离心分离，然后经硫酸铵沉淀等提取，得到的提取液通过如离子交换色谱和疏水性色谱的组合色谱被纯化和分离。

在本发明的蛋白质、部分肽、其盐或其氯化物的合成中，用于合成蛋白质的市售树脂可以被使用。作为用于此的树脂，以下树脂被举例：氯甲基树脂、羟甲基树脂、二苯甲基胺树脂、氨甲基树脂、4-苄氧基苄醇树脂、4-甲基二苯甲基胺树脂、PAM 树脂、4-羟甲基甲基苯基乙酰氨甲基树脂、聚丙烯酰胺树脂、4-(2',4'-二甲氧苯基羟甲基)苯氧树脂、4-(2',4'-二甲氧苯基-Fmoc 氨乙基)苯氧树脂。使用这些树脂， $\alpha$ -氨基和侧链的功能基团被适当地保护的氨基酸通过众所周知的

缩合方法在树脂上被缩合以符合期望的蛋白质序列。在反应最后，蛋白质从树脂上被切下并且多个保护基团被去除。然后，所要的蛋白质或其氯化物在高稀释溶液中通过用于形成内部二硫键的方法被获得。关于上述被保护的氨基酸的缩合，数种用于蛋白质合成的活性试剂可以被使用，并且特别地，碳化二亚胺可以被使用。作为碳化二亚胺，DCC, N, N'-二异丙基碳化二亚胺、N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺等可以被使用。在通过这些碳化二亚胺活化时，被保护的氨基酸可以用控制外消旋的加成剂（如 HOBt 或 HOObt）一起被直接加入到树脂中，或者它可以在前面被保护的氨基酸的活化之后作为对称酸酐或者、HOBt 酯或 HOObt 酯被加入到树脂中。

作为在被保护的氨基酸的活化或使用树脂的缩合中所用的溶剂，该溶剂可以选自蛋白质缩合反应可用的已知溶剂。作为此类溶剂，酰胺如 N, N-二甲基甲酰胺、N, N-二甲基乙酰胺和 N-甲基吡咯烷酮，卤化烃如二氯甲烷和氯仿，醇如三氟乙醇，亚砷如二甲基亚砷、吡啶，醚类如二恶烷和四氢呋喃，腈如乙腈、丙腈，酯如乙酸甲酯和乙酸乙酯，及其混合物可以被使用。反应温度适当地选自用于形成蛋白键的反应中可用的已知温度范围，并且通常，该温度适当地选自 -20°C ~ 50°C。活化的氨基酸衍生物通常以 1.5 ~ 4 倍的摩尔当量被使用。作为水合茚三酮反应的检测结果，当缩合不充分时，缩合反应可以在不去除保护基团的情况下被重复从而进行充分的缩合。当充分缩合通过反复反应不能被进行时，未反应的氨基酸用乙酸酐或乙酰咪唑乙酰化，因此后续反应没有影响。

作为起始材料的氨基的保护基团，例如，Z、Boc、t-戊氧羰基、异冰片氧基羰基、4-甲氧苄氧基羰基、Cl-Z、Br-Z、金刚烷氧基羰基、三

氟乙酰基、邻苯二甲酰基、甲酰基、2-硝基苯亚磺酰基、二苯基硫磷基、Fmoc 等可以被使用。羧基可以被保护，如，通过烷基酯化（如，甲基、乙基、丙基、丁基、t-丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基和 2-金刚烷基的直链、枝链或环链的烷酯化），芳烷酯化（如苯甲酯、4-硝基苯甲酯、4-甲氧基苯甲基酯、4-氯苯甲基酯、二苯甲基酯），苯甲酰甲基酯化，苄氧基羰基酰肼化，丁氧羰基酰肼化，三苯甲基酰肼化等被保护。丝氨酸的羟基基团可以被保护，如，通过酯化或醚化被保护。作为该酯化的适合的基团，例如，低级（C<sub>1-6</sub>）烷酰基如乙酰基，酰基基团如苯甲酰基团，或者由碳酸盐衍生的基团如苄氧羰基和乙氧羰基可以被使用。作为适合于醚化的基团，苯甲基基团、四氢吡喃基和 t-丁基可以被作为例子。作为酪氨酸的酚羟基的保护基团，如 Bzl、C<sub>12</sub>-Bzl、2-硝基苯甲基、Br-Z 和 t-丁基可以被使用。作为组氨酸的咪唑基的保护基，如 Tos、4-甲氧-2, 3, 6-三甲基苯磺酰基、DNP、苄氧甲基、Bum、Boc、Trt 和 Fmoc 可以被使用。

作为起始材料的被活化的羧基，如对应的酸酐、叠氮化物和活化的酯（醇（如五氯苯酚、2, 4, 5-三氯苯酚、2, 4-二硝基苯酚、氰甲基醇、对硝基苯酚、HONB、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基邻苯二甲酰亚胺和 HOBt）的酯）可被使用。作为起始材料的被活化的氨基，如对应的磷胺可以被使用。作为用于去除（消除）被保护的基团的方法，如在 Pd-黑或 Pd-炭的催化剂存在的条件下在氢气流中的催化还原；用无水氢氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟乙酸或它们的混合物进行的酸处理；用二异丙基乙胺、三乙胺、哌啶、哌嗪(piperadine)等进行碱处理；或者在液态氨中用钠还原，这些方法可以被使用。通过使用以上酸处理进行的消除反应通常在-20℃~40℃的温度下被进行。在酸处理

中，添加阳离子捕捉试剂如茴香醚、苯酚、硫茴香醚、间甲酚、对甲酚、二甲基硫、1,4-丁二硫醇或 1, 2-乙二硫醇是有效的。被用作组氨酸的咪唑保护基的 2, 4-二硝苯基通过硫代苯酚处理而被去除。被用作色氨酸的吲哚保护基的甲酰基在以上 1, 2-乙二硫醇、1, 4-丁二硫醇等存在下通过酸处理被去除，而且进一步它可以用稀释的氢氧化钠溶液、稀释的氨水等通过碱处理被去除。

不应该参与起始材料的反应的功能基团和被保护的基团的保护、被保护的基团的消除、参与反应的功能基团的活化等可以适当地选自众所周知的基团和方法。作为用于获得蛋白的酰胺的其它方法，如羧基端氨基酸的  $\alpha$ -羧基通过酰胺化被保护，在氨基端肽链（蛋白质）被延长以达到期望的链长度，肽链的 N 末端处的  $\alpha$ -氨基的保护基被去除的蛋白质和肽链的 C 末端处的羧基的保护基被去除的蛋白质被制备，然后如上所述两种肽在混合溶液中被缩合。该缩合反应的特殊之处如上所述。通过缩合而得的被保护的蛋白质被纯化，通过以上方法去除所有被保护的基团，并且粗蛋白被获得。该粗蛋白通过使用已知的纯化方法被纯化，再将主要片段冻干并获得所要的该蛋白的酰胺。为获得蛋白质的酯，如羧基末端的氨基酸的  $\alpha$ -羧基与所需醇缩合以得到氨基酸酯，该酯如蛋白质的酰胺中所示被处理，则所要的该蛋白质的酯可以被获得。

本发明的部分肽或盐可以通过用于合成肽的众所周知方法或使用适合的肽酶通过切割本发明的蛋白质而被生成。作为用于合成肽的方法，如固相合成方法或液相合成方法可以被使用。即，能够组成本发

明的部分肽的部分肽或氨基酸被与其余部分缩合，当产物具有被保护的基团时，该被保护的基团被去除，则所期望的肽可以被生成。

作为众知的缩合方法和被保护的基团的去除，如以下方法可以被作为例子。M.Bodanszky 和 M.A.Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966); Schroeder 和 Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965); Nobuo Izumiya et al., Fundament and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., (1975); Haruaki Yajima 和 Shunpei Sakakibara, Biochemical Experiment Lectures 1, Chemistry of Proteins IV, 205 (1977); Haruaki Yajima supervised, Continued Development of Medicines, Vol.14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten.

反应后，进一步本发明的部分肽可以通过常用纯化方法被纯化，如溶剂提取、蒸馏、柱层析、液相色谱、重结晶和它们的组合。当部分肽通过以上方法被获得时，它可以通过已知方法或相似的方法被生成为适当的盐。当该部分肽的盐被获得时，它可以通过已知方法或相似的方法被生成为释放化合物或其它盐。

作为编码本发明的蛋白质的 DNA，含有编码上述本发明的蛋白质的碱基序列的任何化合物可以被使用。进一步，基因组 DNA、基因组 DNA 文库、来自细胞和组织的上述 cDNA、来自细胞和组织的上述 cDNA 文库或者合成的 DNA 可以被使用。文库中使用的载体可以选自细菌噬菌体、质粒、粘粒、噬菌粒等的任意一种。使用由以上细胞或组织制备的总 RNA 或 mRNA 组分可以通过逆转录酶聚合酶链式反应（以下被称作 RT-PCR 方法）被直接扩增。作为编码本发明的蛋白质的 DNA，以下任何一种 DNAs 可以被作为例子：如含有序列 No.2 表示

的碱基序列的 DNA，或含有在高严格条件下与序列 No.2 表示的碱基序列杂交的碱基序列且编码具有与本发明的蛋白质基本相同活性（如细胞毒素活性）的蛋白质的 DNA。

进一步具体化，作为编码具有序列 No.1 表示的氨基酸序列的蛋白质的 DNA，具有序列 No.2 表示的碱基序列的 DNA 可以被使用。

作为编码本发明的部分肽的 DNA，任何一种含有以上编码本发明的部分肽的碱基序列的 DNAs 可以被使用。进一步，基因组 DNA、基因组 DNA 文库、来自细胞和组织的上述 cDNA、来自细胞和组织的上述 cDNA 文库或者合成 DNA 可以被使用。作为编码本发明的部分肽的 DNA，例如，任意一种以下 DNAs 可以被作为例子：如含有具有序列 No.2 表示的碱基序列的 DNA 的部分序列的 DNA，或者含有具有在高严格条件下与序列 No.2 表示的碱基序列杂交的碱基序列且编码具有与本发明的蛋白质基本相同活性（如细胞毒性）的蛋白质的 DNA 的部分序列的 DNA。

作为完美地编码本发明的蛋白质或部分肽（下文在编码这些蛋白质等的 DNA 的克隆和表达的描述中，逐个情况下，这些蛋白质等被简写为本发明的蛋白质）的 DNA 的克隆方法，使用具有本发明的蛋白质的部分碱基序列的合成 DNA 引物，通过已知的 PCR 方法该 DNA 被扩增，或者在适当载体中的组合 DNA 通过与 DNA 片断或编码部分或全部本发明的蛋白质区域的合成 DNA 杂交被筛选出。杂交方法可以通过如 Molecular Cloning, 2<sup>nd</sup>, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press (1989) 中的描述被进行。当市售文库被使用时，可以通过附带的说明中描述的方法进行杂交。在 DNA 碱基序列的改变中，使用已知的

试剂盒如 Mutan™-G (由 Takara Shuzou Co.生产)、Mutan™-K (由 Takara Shuzou Co.生成)等, 缺口双链方法, Kunkel 方法, 众所周知的方法或相似的方法可以被进行。编码被克隆的蛋白质的 DNA 可以被直接使用, 或根据需要用限制酶消化, 或通过添加连接子被使用。该 DNA 可以在 5'末端侧具有作为翻译起始密码子的 ATG、GTG 或 TTG, 在 3'末端侧具有作为翻译终止密码子的 TAA、TGA 或 TAG。翻译起始密码子和翻译终止密码子可以通过使用合适的合成 DNA 连接物而被添加。本发明的蛋白质的表达载体可以被制备, 如通过方法 (i) 将目的 DNA 从编码本发明的蛋白质的 DNA 上切割下来, 和 (ii) 将 DNA 片段连接到适当表达载体中启动子的下游。

作为载体, 来自大肠杆菌 (*Echerichia coli*) (如 pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 或 pET30)的质粒, 来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (如 pUB110, pTP5 或 pC194)的质粒, 质粒(如 pSH19, pSH15), 来自酵母的噬菌体, 噬菌体如  $\lambda$  噬菌体, 动物病毒如逆转录病毒, 牛痘病毒, 杆状病毒等, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV 或 pcDNA1/Neo 可以被使用。作为本发明使用的启动子, 适用于基因表达使用的宿主的任何启动子都可以被使用。例如, 当动物细胞被用作宿主时, SR $\alpha$  启动子, SV40 初期启动子, HIV-LTR 启动子, CMV 启动子或者 HSV-TK 启动子可以被作为例子。在这些启动子中, CMV (细胞巨化病毒) 启动子、SR $\alpha$  启动子可以被优选使用。当宿主是大肠杆菌科菌时, trp 启动子、lac 启动子、recA 启动子、 $\lambda$  PL 启动子、lpp 启动子或 T7 启动子被优选。当宿主细胞是芽孢杆菌科的菌时, SPO1 启动子、SPO2 启动子或 penP 启动子被优选。当宿主是酵母时, PHO5 启动子、PGK 启动

子、GAP 启动子或 ADH 启动子被优选。当宿主是昆虫细胞时，多角体蛋白启动子、P10 启动子等被优选。

5 作为除了以上载体外的表达载体，如果需要，含有增强子、选择标记、SV40 复制起始位点（下文偶尔简写为 SV40ori）等的载体可以被使用。作为选择标记，如二氢叶酸还原酶（下文偶尔简写为 dhfr）基因（氨甲蝶呤（MTX）抗性）、氨苄青霉素抗性基因（下文偶尔简写为 Ampr）、新霉素抗性基因（下文偶尔简写为 Neor）、G418 抗性和卡那霉素抗性基因可以被作为例子。特别地，当 dhfr 基因通过使用 dhfr 基因缺陷的中国仓鼠细胞而被用作选择标记时，转化细胞可以通过不含有胸腺嘧啶的培养基被选择出。如果需要，进一步，适合宿主的信号序列被添加到本发明的蛋白质的 N 末端侧。当宿主细胞是大肠杆菌科的菌时，PhoA 信号序列、OmpA 信号序列等可以被使用。当宿主细胞是芽孢杆菌科的菌时， $\alpha$ -淀粉酶信号序列、枯草杆菌蛋白酶信号序列等可以被使用。当宿主是酵母时，MF $\alpha$  信号序列、SUC2 信号序列、SUC2 信号序列等可以被使用。当宿主是动物细胞时，胰岛素信号序列、 $\alpha$ -干扰素信号序列、抗体分子信号序列等可以被使用。使用含有编码如此构成的本发明的蛋白质的 DNA 的载体，转化体可以被制备。

10

15

20 作为宿主，如大肠杆菌属、芽孢杆菌属、酵母、昆虫细胞、昆虫、动物细胞等可以被使用。作为大肠杆菌属的具体例子，如 *Escherichia coli* K12, DH1, DH5  $\alpha$ （Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.60, 160(1968)），JM103（Nucleic Acids Research, Vol.9, 309(1981)），JA221（Journal of Molecular Biology, Vol.120, 517(1978)），HB101（Journal of Molecular Biology, Vol.41, 459(1969)），C600（Genetics, Vol.39, 440(1954)）等可以

被使用。作为芽孢杆菌属,如枯草芽孢杆菌 MI114 (Gene, Vol.24, 255(1983), 207-21 (Journal of Biochemistry, Vol.95, 87(1984))等可以被使用。作为酵母,如啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12, 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913、NCYC2036、巴氏毕赤酵母 KM71 等可以被使用。

作为昆虫细胞,如当病毒为 AcNPV 时,草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞; Sf 细胞、来自粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的中肠的 MG1 细胞、来自粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 卵的 High Five TM 细胞、来自甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 的细胞、来自 *Estigmena acrea* 的细胞等可以被使用。当病毒是 BmNPV 时,家蚕 (*Bombyx mori*) N 细胞; BmN 细胞等可以被使用。作为 Sf 细胞,如 Sf9 细胞(ATCC CRL1711)、Sf21 细胞(Vaughn, J.L. et al., *In Vivo*, 13, 213-217(1977))等可以被使用。作为昆虫,如家蚕的幼虫可以被使用(Maeda et al, *Nature*, Vol. 315, 592(1985))。作为动物细胞,如猴细胞 COS-7、Vero、中国仓鼠细胞 CHO (下文简写为 CHO 细胞)、dhfr 基因缺陷的中国仓鼠细胞 CHO (下文简写为 CHO(dhfr-) 细胞)、小鼠 L cells、小鼠 AtT-20、小鼠骨髓瘤细胞、大鼠 GH3 细胞、人 FL 细胞等可以被使用。此外,许多种正常人类细胞,如肝细胞、脾细胞、神经细胞、神经胶质细胞、脾  $\beta$  细胞、骨髓细胞、肾小球膜细胞、郎格罕氏 (Langerhans) 细胞、表皮细胞、上皮细胞、内皮细胞、纤维原细胞、纤维细胞、肌细胞、脂肪细胞、免疫细胞 (如巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱细胞、嗜曙红细胞、单核细胞)、巨核细胞、滑液细胞、软骨细胞、骨细胞、造骨细胞、破骨细胞、乳腺细胞、

肝细胞、间质细胞、或这些细胞的前体细胞、干细胞或癌细胞可以被使用。对于大肠杆菌属的转化，如可以通过 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.69, 2110(1972), Gene, Vol. 17, 107(1982)等方法进行。

对于芽孢杆菌属的转化，如可以通过 Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111(1979)等方法进行。对于酵母的转化，如可以通过 Methods in Enzymology, Vol. 194, 182 - 187(1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.75, 1929(1978)等方法进行。对于昆虫细胞或昆虫的转化，如可以通过 Bio/Technology, 6, 47-55(1988)等方法进行。

对于动物细胞的转化，如可以通过 Cell Engineering, separate volume 8, New Cell engineering Experiment protocol, 263-267(1995), published by Shujunsha、和 Virology, Vol. 52, 456 (1973) 中描述的方法进行。使用以上方法，用含有编码蛋白质的 DNA 的表达载体转化的转化体可以被获得。当以大肠杆菌属或芽孢杆菌属为宿主的转化体被培养时，液体培养基作为用于培养的培养基是合适的。在培养基中，含有转化体生长所必须的碳源、氮源、无机物等。作为碳源，如葡萄糖、糊精、可溶性淀粉、蔗糖等可以被作为例子。作为氮源，例如，如铵盐、硝酸盐、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、肉汁、豆饼、马铃薯提取物等的无机和有机物质可以被使用。作为无机物，如氯化钙、磷酸二氢钠和氯化镁可以被作为例子。酵母提取物、维生素类、生长促进物质等可以被添加。培养基优选使用 pH 约 5~8。

作为培养大肠杆菌属的培养基，如含有葡萄糖和酪蛋白氨基酸的 M9 培养基( Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433,

Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) 优选使用。如果需要, 为了使启动子有效的起作用, 例如, 如 3- $\beta$ -吲哚基丙烯酸的试剂可以被添加。当宿主是大肠杆菌属时, 通常在温度约为 15~43°C 下培养约 3~24 小时, 如果需要, 可以加以通气及搅拌。当宿主是芽孢杆菌科菌  
5 时, 通常在约 30~40°C 下培养约 6~24 小时, 如果需要, 可以加以通气及搅拌。

当宿主为酵母的转化体被培养时, 作为培养基, 如 Burkholder 最低培养基 (Bostian, K.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, 4505(1980)) 或含有 0.5% 酪蛋白氨基酸的 SD 培养基 (Bitter, G. A. et al.,  
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.81, 5330(1984)) 可以被作为例子。约 pH5~8 的培养基被优选使用。通常在约 20~35°C 下培养约 24~72 小时, 如果需要, 可以加以通气及搅拌。当宿主为昆虫细胞或昆虫的转化体被培养时, 作为培养基, Grace 氏昆虫培养基 (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) 可以通过适当地添加被固定化的 10% 牛血清等添加物  
15 而被使用。培养基优选使用约 pH6.2~5.4。通常在约 27°C 下培养约 3~5 天, 如果需要, 可以加以通气及搅拌。当宿主为动物细胞的转化体被培养时, 作为培养基, 如含有 5~20% 小牛血清的 MEM 培养基 (Science, Vol.122, 501(1952)), DMEM 培养基 (Virology, Vol.8, 396(1959)), RPMI 1640 培养基 (The Journal of the American Medical Association, Vol.199, 519(1967)), 199 培养基 (Proceeding of the Society for the Biological  
20 Medicine, Vol.73,1(1950)) 等可以被使用。培养基优选使用约 pH6~8。通常在约 30~40°C 下培养约 15~60 小时, 如果需要, 可以加以通气及搅拌。如以上所述, 可以从转化体的细胞生成本发明的蛋白质。

对于本发明的蛋白质的分离和纯化，如以下方法可以被适当地使用。当本发明的蛋白质在培养后从培养的菌体或细胞中提取时，菌体或细胞通过众所周知的方法收集、然后悬浮于适当的缓冲液中，然后通过超声波、溶菌酶和/或冻融等方法破碎。然后，通过离心或过滤获得该蛋白的粗提取液。缓冲液中可以含有蛋白质变性剂如尿素或盐酸胍，或表面活性剂如 tritonX-100TM。当蛋白质在液体培养基液体中被分泌时，培养完成后，通过众所周知的方法使菌体或细胞与上清液分离，然后收集上清液。如此获得的培养上清液或提取液中含有的蛋白质可以通过众所周知的分离和纯化方法的组合被纯化。这些众所周知的分离和纯化方法为通过溶剂沉淀方法使用盐析技术或溶解度的方法、透析方法、使用分子量差异的方法如超滤和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳等、使用电荷差异的方法如离子交换色谱、使用疏水性差异的方法如疏水色谱、使用特异性亲和力的亲和层析、使用疏水性差异的方法如反相高速液相色谱、使用等电点差异的方法如等电点电泳。

当获得游离体形式的前述蛋白时，该蛋白可以通过众所周知的方法或类似方法被转变为盐。另一方面，当获得盐形式的蛋白质时，该蛋白质可以通过众所周知方法或类似方法被转变为游离形式或其它盐。在纯化该蛋白之前或之后由重组子生成的蛋白质可以进一步与适当的蛋白质修饰酶反应以任意地修饰或部分地去除多肽。作为蛋白质修饰酶，如胰蛋白酶、糜蛋白酶、精氨酸基内肽酶、蛋白激酶、糖苷酶等可以被使用。如此获得的本发明的蛋白质或其盐的活性可以通过使用标记配体的结合试验(bond experiment)和使用特异性抗体的酶免疫试验等被测定。

只要抗体可以识别蛋白质、部分肽和盐，则用于本发明的蛋白质、部分肽或盐的该抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。用于本发明的蛋白质、部分肽或盐的抗体（在以下抗体的描述中，这些蛋白质等可以被简写为本发明的蛋白质）可以通过以该蛋白质作为抗原和通过众所周知的抗体或抗血清的制备方法而被制备。

#### [单克隆抗体的制备]

(a) 产生单克隆抗体的细胞的制备：本发明的蛋白质以蛋白质本身或载体或稀释剂在通过给药可产生抗体的位置被给予温血动物。在给药过程中，为了提高抗体生成的效率，完全 Freund 氏佐药或不完全 Freund 氏佐药可以被给予。这种给药通常每 2~6 周进行一次，共计 2~10 次。温血动物为，如猴、兔、狗、豚鼠、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、鸡等，优选小鼠和大鼠。在生产单克隆抗体的细胞的制备中，被抗原免疫的温血动物，例如小鼠被使用。从小鼠中选出可识别抗体价的个体，在最终免疫的 2~5 天后采集脾或淋巴，然后脾或淋巴中含有的产生单克隆抗体的细胞与同种或不同种动物的骨髓瘤细胞融合以制备用于产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。抗血清中的抗体价可以通过，例如该抗血清与后述标记蛋白质反应，并且测定与抗体结合的标记试剂的活性的方法被确定。融合操作可以通过已知方法如 Kohler 和 Milstein (Nature, 256, 495 (1975)) 的方法被进行。作为融合促进试剂，如聚乙二醇 (PEG)、Sendai 病毒等，优选地 PEG 可以被使用。

作为骨髓瘤，如温血动物的骨髓瘤细胞如 NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 和 AP-1，优选地 P3U1 可以被作为例子。抗体产生细胞(脾细胞)的数目与骨髓瘤细胞的数目的优选比率约为 1:1 ~ 20:1。PEG(优选

PEG1000~PEG6000)以约 10~80% 的浓度被加入, 在 20~40℃, 优选地在 30~37℃ 温度下孵育 1~10 分钟, 细胞融合被有效地进行。在生成单克隆抗体的杂交瘤细胞的筛选中, 多种方法被使用, 如包括以下过程的方法: 将杂交瘤细胞培养物的上清液加入到直接或通过载体吸附蛋白质抗原的固相(如微板)中, 然后用放射性物质或酶(当细胞融合使用的细胞是小鼠时, 抗-鼠免疫球蛋白被使用)或蛋白 A 标记的抗免疫球蛋白抗体被加入以检测与固相结合的单克隆抗体; 及包括以下过程的方法: 杂交瘤细胞培养物的上清液被加入到吸收抗-免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相中, 标记了放射性物质或酶的蛋白质被加入, 然后与固相结合的单克隆抗体被检测。单克隆抗体的选择可以通过已知的方法或其类似的方法被进行。通常地, 可以通过 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶)被添加的用于动物细胞的培养基进行。作为用于选择和繁殖的培养基, 杂交瘤细胞可以被繁殖的任何培养基可以被使用。如, 含有 1~20%, 优选 10~20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 含有 1~10% 小牛血清的 GIT 培养基(由 Wako Junyaku Kougyou Co. 制备) 或用于杂交瘤细胞培养的不含血清的培养基 (SFM-101, Nissui Seiyaku Co.) 可以被使用。培养温度通常为 20~40℃, 优选约 37℃。培养时间通常为 5 天~3 周, 优选 1 周~2 周。该培养通常可以在 5% 二氧化碳中进行。杂交瘤细胞培养物的上清液的抗体价可以通过如在用于测定血清中抗体价的以上所述方法中所示被测定。

(b) 单克隆抗体的纯化: 单克隆抗体的分离和纯化可以通过已知方法被进行, 如用于免疫球蛋白的分离和纯化的方法(如盐析方法、醇沉方法、等电点沉淀方法、电泳方法、使用离子交换剂(如 DEAE)的吸附和解吸附方法、超离心方法、凝胶过滤方法、或用活性吸附剂

如抗原结合的固相或蛋白 A 或蛋白 G 的仅收集抗体的特异性纯化方法，然后结合物被释放以获得抗体)。

### [多克隆抗体的制备]

本发明的多克隆抗体可以通过已知方法或其类似方法被制备。作为例子，使用免疫抗原（蛋白抗原）本身或免疫抗原和载体蛋白的复合体通过如用于制备单克隆抗体的上述方法中相同的方法免疫温血动物，含有本发明的蛋白质的抗体的材料被收集，然后该抗体被分离和纯化。至于免疫温血动物的免疫抗原和载体蛋白的复合体，如果对于通过与载体交联而被免疫的半抗原抗体能够被有效地产生，则载体蛋白的种类和载体与半抗原的混合比率并不重要。如牛血清白蛋白、牛环状球蛋白、血蓝蛋白等可以以约 0.1~20，优选地 1~5 份比 1 份半抗原的重量比率被用于与半抗原结合。在半抗原与载体的结合过程中，多种缩合试剂如含有戊二醛、碳二亚胺、顺丁烯二酰亚胺活性酯、硫醇基团和二硫代吡啶基的活性酯试剂可以被使用。缩合的产物直接与载体或与稀释剂一起被给予到温血动物的能够产生抗体的部分。为了提高在给药过程中抗体产生的能力，完全 Freund 氏佐剂或不完全 Freund 氏佐剂可以被给予。给药通常每 2~6 周进行一次，共进行约 3~10 次。多克隆抗体可以从血液、腹水，优选从通过以上方法免疫的温血动物的血液中收集。抗血清中的多克隆抗体价通过在以上血清中抗体价的测定中所述相同的方法被测定。多克隆抗体的分离和纯化可以通过与以上单克隆抗体分离和纯化中相同的免疫球蛋白的分离和纯化的方法而被进行。

含有本发明的蛋白质或部分肽的治疗试剂和本发明的蛋白质等具有癌细胞毒活性，因而该试剂可以被用于提取疾病组织（提取包括全部和部分，优选部分提取），及特别地用于治疗固定癌(fixed cancer)的试剂。当本发明的蛋白质等被用作以上治疗和预防试剂时，该试剂  
5 在其被纯化达到至少 90%，优选 95%或更高，更优选 98%或更高，进一步优选 99%或更高后被使用。

本发明的蛋白质等的癌细胞增殖的抑制活性可以通过已知方法被测定，或者细胞毒活性或导致细胞死亡的活性通过已知的方法或类似方法被测定，优选使用下述试验中所述方法而被测定。作为测试化合物，如肽、蛋白质、非肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取  
10 物、植物提取物、动物组织提取物和血浆可以被作为用于此的例子。这些化合物可以是新化合物或已知的化合物。

通过本发明的筛选方法或筛选试剂盒获得的化合物或盐选自以上测试化合物，如肽、蛋白质、非肽化合物、合成化合物、发酵产物、  
15 细胞提取物、植物提取物、动物组织提取物和血浆。这些化合物具有抑制本发明的蛋白质等的细胞毒性的活性，或抑制本发明的蛋白质等的癌细胞增殖的活性。作为化合物的盐，与本发明的蛋白质的盐类似的盐可以被使用。

当通过使用筛选方法或用于筛选的试剂盒而获得的化合物被用作  
20 以上治疗试剂时，这些化合物可以通过常用方法被使用。例如，这些化合物被用作片剂、胶囊、酞剂、微胶囊、无菌溶液、悬浮液等。如此获得的药物制剂是安全的且具有低毒性，例如它们可以被给药于人或温血动物（如小鼠、大鼠、兔、山羊、猪、牛、马、鸟、猫、狗、

猴等)。该化合物及其盐的剂量根据作用、疾病、剂量方案等而变化。一般地，对于成人(以60kg体重被估计)，每天约0.1~100mg的化合物，优选约1.0~50mg，更优选约1.0~20mg的化合物可以被给药。在非消化道给药过程中，通常对于成人(以60kg体重被估计)按照目的、疾病等变化的化合物的合适静脉注射剂量为每天约0.01~30mg，更优选为约0.1~20mg，进一步优选约为0.1~10mg。对于其它动物，对于60kg估计重量的剂量可以被使用。

用于疾病的药物的候选化合物的筛选：由于本发明的蛋白质等具有细胞毒活性，所以促进本发明的蛋白质等的功能(如细胞毒活性)的化合物或盐，例如，可以被用作治疗癌症的试剂。另一方面，抑制本发明的蛋白质等的功能的盐，例如，可以被用于治疗和预防胃炎和胃溃疡的试剂。据此，本发明的蛋白质等被有效地被用于筛选促进或抑制本发明的蛋白质等的功能的化合物或盐的试剂。

即，本发明提供了(1)一种筛选方法，其特征在于本发明的蛋白质或部分肽或盐被使用，及该方法筛选促进本发明的蛋白质或部分肽或盐的功能(如细胞毒活性)的化合物，或该方法筛选抑制本发明的蛋白质或部分肽或盐的功能(如细胞毒活性)的化合物。下文中该促进功能的化合物可以简称为“促进剂”，该抑制功能的化合物被简称为“抑制剂”。

此外，本发明提供(2)用于筛选促进剂或抑制剂的试剂盒，其特征在于含有本发明的蛋白质或部分肽或盐。下文中以上试剂盒可以简称为“本发明的用于筛选的试剂盒”。

在具体实施中，例如，在以上（1）中，提供了促进剂或抑制剂的筛选方法，其特征在于进行情况（i）和情况（ii）之间的比较。情况（i）是本发明的蛋白质或部分肽或盐与细胞接触，其中该细胞为含有来自以上温血动物（优选人）的组织的血细胞的正常细胞或上述癌细胞。

5 情况（ii）是本发明的蛋白质或部分肽或盐与细胞接触，其中该细胞为含有来自以上温血动物（优选人）的组织的血细胞的正常细胞或上述癌细胞。

在具体实施中，进一步，在以上（2）中，提供了用于筛选促进剂或抑制剂的试剂盒，其特征在于该试剂盒含有本发明的蛋白质或部分肽或盐，及为含有来自以上温血动物（优选人）的组织的血细胞的正常细胞或者上述癌细胞等。

进一步，具体地，在筛选方法中，情况（i）和情况（ii）的特征在于本发明的蛋白质等的细胞毒活性被测定并被比较。

本发明的蛋白质等的细胞毒活性、细胞繁殖抑制活性及导致细胞死亡的活性可以通过已知方法或其类似方法被测定。然而，更具体地，使用已建立的细胞系等，进一步，含有测试化合物的培养基，培养基不含有该测试化合物的阴性对照，及培养基含有 M 毒素的阳性对照，这三种或两种被使用。在满足统计学意义的条件下比较细胞数目时，细胞毒活性或细胞增殖活性的抑制活性，或具有细胞毒活性或细胞增殖活性的抑制活性的特定样品通过活性的存在或缺乏或者增加和降低而被检测。该检测方法中使用的细胞是，例如，含有来自以上温血动物（优选人）的组织的血细胞的正常细胞，或几种温血动物的上述癌细胞（如子宫内膜癌、子宫腺肌瘤、乳腺癌、胃癌、肝癌、脾癌、胆

囊癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、成神经细胞瘤、膀胱癌、恶性黑素瘤、舌癌、齿龈癌、小鼠纤维原细胞、非洲绿猴肾细胞、大鼠肝癌等)。

5 作为测试化合物，例如，肽、蛋白质、非肽性化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取物、植物提取物、动物组织提取物等可以作为此的例子。这些化合物可以是新化合物或已知的化合物。对于进行以上筛选方法，本发明的蛋白质等被悬浮于适合于筛选的缓冲液中，并且本发明的蛋白质等的样品被制备。作为缓冲液，不抑制本发明的蛋白质等与测试化合物的反应的 pH 约 4~10 (优选 pH 约 6~8) 的磷酸缓冲液、三-盐酸缓冲液等可以被使用。

10

作为具体的筛选方法，在筛选检查之后，①用于在显微镜下直接观察细胞变化及用血球计数计等计数细胞的方法，②捕获通过细胞死亡而从细胞中被释放的钾、血红蛋白等的变化的方法，③用于在反应后使用四唑盐等测定残余细胞的方法，④用放射性标记的物质测定残余活细胞的方法，⑤通过诱导细胞凋亡 (cell apoptosis) 确认细胞死亡的方法等可以用作此的例子。例如，作为增加本发明的蛋白质等的细胞毒活性的化合物，其中细胞毒活性在以上情况 (ii) 下比在以上情况 (i) 下被增加了约 20% 或更高，更优选 30% 或更高，进一步优选 50% 或更高的测试化合物可以被选择。另一方面，作为抑制本发明的蛋白质等的细胞毒活性的化合物，其中细胞毒活性在以上情况 (ii) 下比在以上情况 (i) 下被抑制约 20% 或更高，更优选 30% 或更高，进步优选 50% 或更高的测试化合物可以被选择。这些可以被作为用于高通量筛选的方法而被进行。以下，作为方法②的用于通过溶血反应测定血

15

20

红蛋白的方法,和作为方法③的 WST 方法分别被使用。在这些方法中,活性炭、CM 纤维素和藻酸钙被选作显示抗-M 毒素活性的吸附剂。

5 进一步可能用动物模型检验和比较含有这些阴离子对照、阳性对照和测试化合物的溶液以确认抗-M 毒性物质的动物水平的效果。在这些情况中,许多种类的温血动物可以被使用。特别地,小鼠、大鼠、狗和猴可以被使用。作为感染模型,蒙古沙鼠、小鼠和猴可以被有效地使用。

当通过本发明的筛选方法或用于筛选的试剂盒而获得的化合物被用作以上治疗和预防试剂时,这些化合物可以通过常用方法被使用。10 例如,使用与本发明的蛋白质的药物制剂相同的方法,这些化合物可以被用作片剂、胶囊、酏剂、微胶囊、无菌溶液、悬浮液等。由于如此获得的制剂是安全的且具有低毒性,例如,因而它们可以被给药于人或温血动物(如小鼠、大鼠、兔、山羊、猪、牛、马、鸟、猫、狗、猴等)。这些化合物或其盐的剂量可以按照作用、疾病、剂量方案等而15 改变。当该化合物在去除疾病组织后作为组织再生试剂被用于增加本发明的蛋白质等的功能时,通常地,对于成人(按 60kg 体重估计)每天约 0.1~100mg 的化合物,优选 1.0~50mg,更优选约 1.0~20mg 的该化合物可以被口服给药。对于其它动物,对于以 60kg 被估计的体重的剂量可以被使用。

20 本发明的蛋白质或部分肽或盐的定量:

用于本发明的蛋白质等的抗体(下文偶尔被简写为本发明的抗体)可以特异地识别本发明的蛋白质等,因而这些抗体可以被用于测试液

体中本发明的蛋白质等的定量，特别地，被用于通过夹层免疫技术的定量。即，本发明提供了 (i) 用于定量测试液体中本发明的蛋白质等的方法，其特征在于本发明的抗体与测试液体和本发明的蛋白质等竞争性反应，与抗体结合的被标记的本发明的蛋白质等的比率被测定，  
5 及 (ii) 用于定量测试液体中本发明的蛋白质等的方法，其特征在于测试液体和固定化在载体上的抗体和本发明的其它被标记的抗体在同时或持续地反应，且然后在不溶性的载体上的标记试剂的活性被测定。在以上定量方法 (ii) 中，优选地，一种抗体为识别本发明的蛋白质等的 N 末端的抗体，另一种抗体是与本发明的蛋白质等的 C 末端反应的  
10 抗体。

此外，使用本发明的蛋白质等的单克隆抗体（下文偶尔简写为本发明的单克隆抗体），本发明的蛋白质等的定量可以被进行，并且进一步，检测可以通过使用组织染色被进行。用于这些目的，抗体分子本身可以被使用，或者抗体分子的 F(ab')<sub>2</sub>、Fab' 或 Fab 片断可以被  
15 使用。使用本发明的抗体定量本发明的蛋白质等不应该受到限制。例如，化学地或物理地测定测试液体中对应抗原的量（如蛋白质的量）的抗体、抗原或抗体-抗原复合体的量，所得量使用通过含有已知量的抗原的标准液体形成的标准曲线而被测定。作为例子，比浊法、竞争法、免疫计法及夹层法被优选使用。考虑到敏感性和特异性，下述夹层方法被优选。作为使用被标记物质的测定方法中所用的标记试剂，  
20 如，放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质等可以被作为关于此的例子。作为放射性同位素，例如，[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C] 可以被使用。作为酶，稳定和高活性的同位素，例如 β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶等可以被使用。

作为荧光物质，例如，荧光胺、荧光素异硫氰酸酯等可以被使用。作为发光物质，例如，氨基苯二酰一胍、氨基苯二酰一胍衍生物、荧光素、光泽精等可以被使用。此外，对于抗体或抗原与标记试剂的结合，生物素-抗生物素蛋白类型可以被使用。

5            抗原或抗体的固相化可以通过通常被用于蛋白质或酶的固相化的物理吸附或化学结合而被进行。作为载体，不溶性多糖如琼脂糖、右旋糖苷和纤维素，合成树脂如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺和硅树脂或玻璃可以被作为用于此的例子。在夹层方法中，测试液体与被固定化的本发明的单克隆抗体反应（初级反应），然后与其它被标记的本发明的单克隆抗体反应（次级反应），之后被固定化的载体上的标记试剂的活性  
10           被测定以测定测试液体中本发明的蛋白质的量。该初级反应和次级反应可以被改变。此外这些反应可以同时或通过交错起始时间而进行。该标记试剂和固相化方法可以与这些反应同样被处理。在通过使用夹层方法的免疫试验中，用作固相用抗体或标记用抗体的抗体不必要为  
15           同一种类。两种或多种抗体的混合物可以被用于提高测定灵敏度。在通过使用本发明的夹层法测定本发明的蛋白质等的测定方法中，用于初级反应和次级反应的单克隆抗体优选具有不同的与本发明的蛋白质等结合的部分。即，关于初级反应和次级反应所用的抗体，如当次级反应所用的抗体识别本发明的蛋白质等的 C 末端时，该用于初级反应的  
20           抗体优选识别除了 C 末端以外的部分，如 N 末端。

            本发明的单克隆抗体可以被用于除了夹层方法以外的测定体系如竞争方法，或免疫计方法或比浊法。在竞争法中，测试液体中的抗原和被标记的抗原竞争地同抗体反应，然后未反应的被标记的抗体（F）

和与抗体结合的被标记的抗原 (B) 被分离 (B/F 分离), B 或 F 被标记的量被测定, 然后抗原的量被定量。在反应方法中, 可溶解的抗体被用作抗体。在 B/F 分离中, 聚乙二醇或用于以上抗体的第二抗体被使用的液相方法, 固相抗体被用作第一抗体或可溶性抗体被用作第一抗体, 并且固相抗体被用作第二抗体的固相方法被用作关于此的例子。在免疫计方法中, 测试液体中的抗原和固相抗原与确定量的被标记的抗体竞争性地反应, 然后固相和液相被分离。此外, 测试液体中的抗原和过量的被标记抗体反应, 固相抗体被加入固相中以结合未反应的被标记的抗体到固相上, 然后固相和液相被分离。连续地, 两相中任意一相的被标记的量被测定, 并且测试液体中抗原量被测定。在比浊法中, 在凝胶中或在溶液中作为抗原-抗体反应结果而形成的不溶性沉淀的量被测定。当测试液体中抗原的量极少并且只有少量沉淀获得时, 使用激光散射的激光比浊法等被优选使用。

当这些免疫学测定方法被用于本发明的测定方法中时, 特定条件和操作的建立是不必要的。各方法中的常用条件和操作方法加上本领域的通常技术想法, 本发明的蛋白质等的测定体系就可以被建立。关于这些常用技术方法的细节, 常用书、专业书可以被参考。例如 Kan Irie 编辑的 Radioimmuno Assay, Kodan-sha (1974), Kan Irie 编辑的 Radioimmuno Assay, continued, Kodan-sha (1979), Eiji Ishikawa 等编辑的 Immunoenzymometric Assay, Igaku Shoin (1978), Eiji Ishikawa 等编辑的 Immunoenzymometric Assay 第二版, Igaku Shoin (1982), Eiji Ishikawa 等编辑的 Immunoenzymometric Assay 第三版, Igaku Shoin (1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol.70, Immunochemical Techniques (Part A): *ibid.*, Vol.73, Immunochemical Techniques (Part B), *ibid.*, Vol.74,

Immunochemical Techniques (Part C), *ibid.*, Vol.84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), *ibid.*, Vol.92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), *ibid.*, Vol.121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)), 全部由 Academic Press Co. 出版, 可以被参考。如上所述, 通过使用本发明的抗体, 本发明的蛋白质等可以被灵敏地定量。此外, 通过使用本发明的抗体来定量本发明的蛋白质等的浓度, 当本发明的蛋白质等的浓度在感染幽门螺旋杆菌的患者身上被检测出增加时, 则该患者患有疾病, 如胃炎、胃溃疡、胃癌、瓣膜疾病、糖尿病、各种癌症(如子宫内膜癌、子宫腺肌瘤、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、脾癌、胆囊癌、肾癌、成神经细胞瘤、膀胱癌、恶性黑素瘤等)。此外, 可能诊断出以后病变的可能性高。本发明的抗体可以被用于测试液体如体液或组织中本发明的蛋白质等的检测。该抗体被用于形成纯化本发明的蛋白质等所用的抗体柱、检测在纯化时各组分中本发明的蛋白质等、及分析测试细胞中本发明的蛋白质等的行为。

含有本发明的抗体、具有中和本发明的蛋白质等的活性的作用的本发明的抗体(中和抗体)的药物可以作为用于治疗 and 预防疾病, 如胃炎、胃溃疡、胃癌、瓣膜疾病、糖尿病、各种癌症(如子宫内膜癌、子宫腺肌瘤、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、成神经细胞瘤、膀胱癌、恶性黑素瘤等)的药物。对抗本发明的蛋白质等的本发明的人源化抗体可以被用作治疗和预防疾病如胃炎、胃溃疡、胃癌、瓣膜疾病、糖尿病、各种癌症(如子宫内膜癌、子宫腺肌瘤、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、成神经细胞瘤、膀胱癌、恶性黑素

瘤等)的药物。该人源化抗体可以参考如 Nat Biotechnol, 14, 845-851 (1996), Nat Genet. 15, 146-156 (1997)和 PNAS, 97(2), 722-727 (2000)所述方法被制备。以下,本发明的这些中和抗体和人源化抗体被简写为本发明的抗体。

5           以上含有本发明的抗体的治疗和预防试剂可以被以该试剂本来的液体形式或以适当剂型的药物组合物被口服或非消化道给药于人或哺乳动物(如小鼠、兔、山羊、猪、牛、猫、狗、猴等)。该试剂的剂量根据目的、疾病、病情、剂量方案等而改变。当该试剂被用于治疗或预防子宫内膜肿瘤时,本发明的抗体的剂量通常为 0.01~20mg/kg 体重,优选 0.1~10mg/kg 体重,更优选 0.1~5mg/kg 体重,每天约 1~5  
10 次,优选每天约 1~3 次。通过静脉注射给予该试剂是方便的。其它非消化道或口服给药的剂量也可以根据以上剂量。当病情非常严重时,给药剂量可按照病情增加。本发明的抗体可以以它本身的形式或以适当的药物组合物被给药。给药所用药物组合物含有用于以上抗体或盐  
15 的药物学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。此组合物可以被制成适合于口服或注射给药的剂型。即,例如,作为用于口服给药的组合物,剂型为固体或液体,具体地为片剂(包括糖衣片和膜衣片)、丸剂、粒剂、粉剂、胶囊剂(包括软胶囊)、糖浆剂、乳剂、混悬剂等。此种组合物通过已知的方法被制备,并且该组合物可以含有通常所用的载体、  
20 稀释剂或赋形剂。例如,作为用于片剂的载体和赋形剂,乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁等可以被使用。

序列表的下述序列号显示如下序列。

序列 No.1: 显示来自幽门杆菌 60190 的氨基酸序列(M毒素)。

序列 No.2: 显示编码本发明的具有序列 No.1 表示的氨基酸序列的来自幽门螺旋杆菌 60190 的蛋白质 (M 毒素) 的 DNA 碱基序列。

序列 No.3: 显示实施例 3 所用引物 (合成的) DNA 的碱基序列。

序列 No.4: 显示实施例 3 所用引物 (合成的) DNA 的碱基序列。

5            下述实施例 3 中所得转化体、大肠杆菌 M 毒素 / pET30EK/LIC/DH5  $\alpha$  已经于 2002 年 10 月 17 日以保藏号 FERM BP-8218 被保藏于国家先进工业科技研究所 (IPOD)。此外, 在下述实施例 4 中所得的杂交瘤克隆 No.4 已经于 2002 年 10 月 23 日作为 BALB- c / P 3 U 1/004-1 G 9 以保藏号 FERM BP-8222 被保藏于国家先进工业科技研究所 (IPOD)。进一  
10           步, 杂交瘤克隆 No.101 于 2002 年 10 月 23 日作为 BALB- c / P 3 U 1/101-1 C 10 以保藏号 FERM BP-8223 被保藏于国家先进工业科技研究所 (IPOD)。杂交瘤克隆 No.116 于 2002 年 10 月 23 日作为 BALB- c / P 3 U 1/116-5D7 以保藏号 FERM BP-8224 被保藏于国家先进工业科技研究所 (IPOD)。

## 15            实施例

根据以下实施例本发明将被更清楚地被理解。然而, 这些实施例被用于说明本发明而不被解释用于限制本发明的范围。使用 E.coli 的基因操作根据分子克隆 (Molecular Cloning) 所描述的方法。

### 实施例 1:

20           用于从幽门螺旋杆菌纯化和提取本发明的毒素的方法

幽门螺旋杆菌可以通过已经被确立的分离株（例如从美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection)）获得或者通过培养从临床测试样品分离的菌株而被获得。在本实施例中，幽门螺旋杆菌60190的分离株被使用。使用5%牛血清（由Sigma Co.生产）被加入到脑心浸液 (Brain Heart Infusion)琼脂培养基中(由Difco Co.制备)的琼脂培养基，该分离株在37°C和90%或更高的湿度下在微氧条件(CO<sub>2</sub> 5~10%)下次培养2~5代约1~2周。在显微镜下确认这些细胞没有死或处于胶体形式而是令人满意地生长。将细胞转移到不含有血清而含有5%2,6-二-O-甲基-β-环糊精的脑心浸液琼脂培养基(由Difco Co.生产)平皿中。在确认培养和生长条件与以上所述条件相同后，这些细胞被转移到含有以逐渐阶梯式下降，即浓度为2%、1%和0.5%的2,6-二-O-甲基-β-环糊精的培养基中。

在含有0.5%2,6-二-O-甲基-β-环糊精的脑心浸液液体培养基中，细胞在37°C温度在微氧条件下被培养约16小时，同时以旋转混合器以100~120rpm搅动。通过10000×g离心20分钟收集小球状细菌细胞。将收集到的细胞悬浮于pH为7.7的10mM Tris-HCl缓冲液中（下文简称为缓冲液A，因为目标蛋白的pH为pI 6.08，所以pH至少为6.1或更高）并且经声波处理。在-80°C下贮存过夜，然后细胞再被声波处理并且100000×g离心60分钟。被分离的三层中仅最上层被提取。

提取液用70%硫酸铵溶液粗纯化。所得提取物通过使用具有相对较大颗粒直径的颗粒的阴离子交换树脂(Amersham Pharmacia Biotech AB的DEAE Sephacel)的离子交换色谱被纯化。缓冲液A被用作平衡缓冲液，缓冲液A和0.3M NaCl盐溶液的混合物被用作洗脱液。

使用缓冲液 A 和洗脱液，细胞通过浓度梯度被提取。适当量的各组分被逐滴加到植有 HeLa 细胞的小孔中，并且各小孔中细胞的存活率被评定。该评定通过使用细胞计数试剂盒（DOJIN 实验室）的 WST 试验进行。与对照比较，显示显著低存活率的组分和具有蛋白质的相对一致增加曲线的组分随同电泳结果一起被评定以作为用于下一纯化过程的样品组分。

具有与下一次的分离体系不同的分离体系的疏水性层析（Amersham Pharmacia Biotech AB 的 Phenyl Sepharose CL-4B）被选用。在 10mM 磷酸缓冲液中含有 1M 硫酸铵的平衡缓冲液被使用。在 10mM 磷酸缓冲液中含有 40% 乙二醇的洗脱缓冲液被使用。在细胞通过浓度梯度提取之后，各样品通过与以上所述相同的方法被评定。

通过以上过程所提取的样品通过使用具有相对较小颗粒直径的颗粒的阴离子交换层析（Amersham Pharmacia Biotech AB 的 RESOURCE Q）被再提取。缓冲液 A 被用作平衡缓冲液，缓冲液 A 和 1M NaCl 盐溶液的混合物被用作洗脱缓冲液。使用该层析，分子量约为 41000 的单一带蛋白质被最终获得。这些层析的种类和顺序可以被改变而且可以被进一步添加。

在所得信号带经考马斯亮兰（Coomassie Brilliant Blue）染色后，所得信号带通过印迹设备被转录到硝酸纤维素膜或聚偏二氟乙烯膜上，并且通过氨基酸测序仪分析。结果是如上所述，注册数据库（幽门螺旋杆菌 22695）中的基因位点 HP1037 的 N 末端氨基酸序列匹配 95%（20 个碱基中 19 个碱基匹配）。（图 1）

## 实施例 2:

### 通过基因技术生产方法的氨基酸序列和 DNA 序列

在本实施例中，幽门螺旋杆菌 60190 的分离株被使用。如以上所述，不同株的幽门螺旋杆菌 22695 的所有基因分析已经被进行。同源  
5 基因位点可以通过检索 TIGR(The Institute for Genomic Research)数据库可以被预测。发现幽门螺旋杆菌 22695 的基因位点 HP1037 编码同源蛋白。

从这些结果中，本发明的蛋白质的克隆被进行。即，幽门螺旋杆菌 60190 被用作模板，首先，多组基于上游的基因位点 HP1037 和基因  
10 位点 HP1036 和下游的基因位点 HP1038 的适当引物被方便地形成（在 5'位点和 3'位点）以进行测序。具有校正功能的 DNA 聚合酶被使用。各引物组被组成因而含有足够的共有引物部分，并且从 5'位点和 3'位点的多个测序被进行。所得 DNA 序列如序列表的序列 No.2 所示。氨基酸序列在序列 No.1 中被显示。

## 15 实施例 3

### 通过基因重组的毒性蛋白的表达试验

*E. coli* 在表达试验中被使用。用于表达的载体 pET-30EK/LIC (由 Novagen Co.生产)和 *E.coli* BL21 (DE3)被使用。正义引物为在实施例 2 克隆的来自幽门螺旋杆菌 60190 的毒性蛋白的编码正义链的 5'位点插  
20 入 GACGACGACAAG 的序列 No.3。反义引物为在 5'位点处插入 GAGGAGAAGCCCGGTTA 的序列 No.4。插入基因通过使用以上引物

的 PCR 方法被形成。被插入的基因在 25mM dATP 和 100mM DTT 存在时用 T4 DNA 聚合酶制备以符合载体的 LIC 位点，并且在 25mM EDTA 存在下加热。形成的重组子再被测序以确认所得序列与序列 No.1 相同。所得重组子被进一步转化到用于表达的 *E.coli* BL21 (DE3) 中，并且再在含有 30  $\mu$ g/ml 的卡那霉素的 LB 培养基中培养。

37°C 以 250rpm 震荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.4。异丙基- $\beta$ -硫代半乳糖苷被加入使其最终浓度为 1mM，并且混合物再进一步震荡 2 小时。由于融合蛋白形成包涵体，离心收集 *E. coli*，蛋白的包涵体使用 BugBuster 试剂和 Benzonase 核酶（都是从 Novagen Co. 获得）被获得。该蛋白质通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳方法被分离，并且通过银染相应的单一带被确认。蛋白质被再折叠并且通过使用 HeLa 细胞和其它温血动物细胞用 WST 试剂 (Dojin Chemical Laboratories Ltd. 的细胞计数试剂盒) 与对照比较。结果是存活的显著差异被评定，并且发现该表达蛋白具有与纯化蛋白相等的活性。发现该表达蛋白对正常人胃细胞具有与宫颈癌细胞的 HeLa 细胞同样的活性（图 2）。也发现不仅对于其它人组织，而且对于哺乳动物细胞该蛋白质都具有广泛的活性（图 3，图 4）。

#### 实施例 4

##### 单克隆抗-M 毒抗体的形成：

240  $\mu$ g 已经被重折叠的表达 M 毒素在 BALB/C 小鼠的若干位置处被进行 2 次皮下注射。最后一次免疫 4 天后，切下小鼠的脾并且用不锈钢网压挤过滤，然后悬浮于 Eagle 氏改良最小必须培养基上 (MEM)

以获得脾细胞的悬浮溶液。作为用于细胞融合的细胞，来自 BALB/C 小鼠的杂交瘤细胞 P3-X63. Ag 8. U1 (P3U1) 被用作用于细胞融合的细胞。〔Current topics in microbiology and immunology, 81, 1(1978)〕。该细胞融合根据最初的方法进行〔Nature, 256, 495 (1975)〕。即，脾细胞和 P3U1 分别用不含有血清的 MEM 洗 3 次且脾细胞和 P3U1 的数目以 6.6: 1 的比率被混合。细胞通过  $750 \times g$  离心 15 分钟被沉淀。去除所有上清液，松散该沉淀，0.3ml 45% 聚乙二醇 (PEG) 6000 (由 Wako Junyaku Co. 制备) 被加入，将混合物于  $37^{\circ}\text{C}$  的水浴锅中放置 7 分钟以进行融合。融合后，限量的 MEM 被加到细胞中，且总量为 15ml 的 MEM 被加入。混合物以  $750 \times g$  离心 15 分子，然后去除上清液。细胞沉淀在含有 10% 小牛血清的 GIT 培养基 (由 Wako Junyaku Co. 生产) (GIT-10% FCS) 中被悬浮以使每毫升含有  $2 \times 10^5$  的 P3U1，以每孔 1ml 的量接种入 24-孔多孔盘 (由 Iwaki Co. 生产) 中，共种入 168 个孔中。接种后，细胞在  $37^{\circ}\text{C}$  下于含 5% 二氧化碳的培养箱中孵育。24 小时后，含有 HAT (次黄嘌呤  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ，氨基蝶呤  $4 \times 10^{-7}\text{M}$  和胸腺嘧啶  $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$ ) 的 GIT-10% FCS 培养基 (HAT 培养基) 以每孔中 1ml 的量被加入以开始 HAT 选择性培养。4 天和 7 天后，1ml 的旧液体被舍弃，然后通过加入 1ml HAT 培养基 HAT 选择性培养被继续。在细胞融合 9 天后，发现杂交瘤细胞的增殖，然后收集上清液。通过以下方法测定上清液的抗体价。即， $100\mu\text{l}$  培养上清液和  $100\mu\text{l}$  用缓冲液 C 稀释 200 倍的 HRP-标记的 M 毒素被加入到结合抗-鼠免疫球蛋白抗体的微板的各小孔中，然后在  $4^{\circ}\text{C}$  下反应过夜。在该板用 PBS 洗过后，为了制作结合抗-鼠免疫球蛋白抗体的微板，首先，将 pH 为 9.6 且含有  $100\mu\text{g/ml}$  羊抗鼠免疫球蛋白 (IgG 片断，由 DAKO Co. 生产) 的 0.1M 碳酸缓冲液用移液管以每板  $100\mu\text{l}$  的量滴加到 96 孔微板中，然后在 4

℃下放置 24 小时。然后，用磷酸缓冲盐水 (PBS, pH7.4) 清洗该板，25 % Brock Ace (商标，由 Yukijirushi Milk Products Co.生产) 和 pH 为 7.2 且含有 0.1 % NaN<sub>3</sub> 的 PBS 各 300μl 被滴加以封闭小孔的过量结合部分，并且在 4℃ 下处理至少 24 小时。对于结合抗鼠免疫球蛋白抗体的

5 以上微板的各孔，100μl 用缓冲液 EC[0.02M pH7.0 且含有 0.2 % BSA, 0.4 M NaCl, 0.4 % Brock Ace, 0.05 % CHAPS (3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基-胺基]-1-丙磺酸), 2mM EDTA 和 0.1 % NaN<sub>3</sub> 的磷酸缓冲液]稀释的鼠抗血清被加入，且在 4℃ 下反应 16 小时。然后，用 pH 为 7.4 的 PBS 洗该板，并且 100μl HRP 标记的重折叠毒素蛋白被加入并在室温下反

10 应 7 小时。以上重折叠毒素蛋白在以上实施例 3 中通过用缓冲液 C [pH7.0 且含有 1 % BSA, 0.4 M NaCl 和 2mM EDTA 的 0.02M 磷酸缓冲液]稀释 100 倍而制备。用 pH 为 7.4 的 PBS 洗该板，100μl TMB 微孔过氧化物酶取代系统 (TMB microwell peroxidase substitute system)(KIRKEGAARD & PERRY LAB., 由 Funakoshi Yakuhin 提供)被

15 加入，并在室温下反应 10 分钟以测定固相上的酶活性。通过添加 100μl 1M 磷酸终止反应，用读板仪(MTP-120, 由 Corona Co.生产)测定 450nm 处的吸光度。根据这些方法，固相上的酶活性被测定。结果是从 123 个孔中选出 18 个发现抗体价的孔，且杂交瘤细胞被冷冻并被保存。

No.4、No.53、No.61、No.76、No.101 和 No.116 这 6 个孔的杂交瘤细胞通过稀释方法被克隆。在克隆时，BALB/C 小鼠的胸腺细胞作为饲喂

20 细胞以每孔  $5 \times 10^5$  个被加入。克隆后，上清液的抗体价使用相同方法被测定。阳性克隆是 No.4、No.101 和 No.116。这些克隆被作为表达 M 毒素的抗体生成杂交瘤细胞。

### 实施例 5

### 单克隆抗体的种及亚种的确定

通过实施例 4 所描述的方法，抗兔 IgG-结合微板被形成。即，pH 为 9.6 且含有 100 $\mu$ g/ml 羊抗兔免疫球蛋白（IgG 片断，由 DAKO Co. 生产）的 0.1M 碳酸盐缓冲溶液用移液管以每孔 100 $\mu$ l 的量滴加到 96 孔微板中，然后 4 $^{\circ}$ C 下放置 24 小时。用磷酸缓冲盐水（PBS，pH7.4）冲洗该板，25% Block Ace（商标，由 Yukijirushi Milk Products Co. 生产）和 pH 为 7.2 且含有 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 PBS 各 300 $\mu$ l 被滴加以封闭小孔的过量结合部分，并且在 4 $^{\circ}$ C 下处理至少 24 小时。向抗兔 IgG 抗体结合微板中加入 50 $\mu$ l 缓冲液 EC 和 100 $\mu$ l 由 Bio-Rad 实验室生产的同型分型试剂盒（iso-type typingkit）中含有的亚型特异性抗体被加入并在 4 $^{\circ}$ C 下反应 1 天。用 pH 为 7.4 的 PBS 洗过该板后，以上所述的杂交瘤细胞的培养上清液被加入，并且在 4 $^{\circ}$ C 下反应 1 天。用 pH 为 7.4 的 PBS 冲洗该板，100 $\mu$ l 在以上实施例 3 中通过用缓冲液 C [pH7.0 且含有 1% BSA, 0.4 M NaCl 和 2mM EDTA 的 0.02M 磷酸缓冲液] 稀释 100 倍而制备的 HRP 标记的重折叠毒素蛋白被加入，而且室温下反应 6 小时。用 pH 为 7.4 的 PBS 洗板，然后固相上的酶活性通过实施例 4 中所述方法被测定。结果是，由这些杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的亚种为 No.4（IgG1）、No.101（IgG2b）和 No.116（IgG2a）。

### 实施例 6

用于制备杂交瘤细胞的小鼠腹水的方法：

No.4、No.101 和 No.116 杂交瘤细胞为小鼠腹水。0.5ml 矿物油被事先非肠道给予小鼠。以上杂交瘤细胞以  $1 \sim 3 \times 10^6$  细胞/小鼠的量被

非肠道给予小鼠 (BALB/C, 雌性), 6~20 天后收集含有抗体的腹水。用蛋白 A 柱从所得的腹水中纯化单克隆抗体。即, 约 25ml 的腹水用相同体积的结合缓冲液(3.5M NaCl, 含有 0.05% NaN<sub>3</sub> 的 1.5M 甘氨酸, pH9.0)稀释, 然后该溶液被沉淀于用结合缓冲液事先平衡过的重组蛋白-A-琼脂糖(agalose) (Repligen Co.) 柱上, 特异性抗体用洗脱缓冲液 (pH3.0 且含有 0.05% NaN<sub>3</sub> 的 0.1M 柠檬酸缓冲液)洗脱。洗脱液体用 pH7.4 的 PBS 于 4°C 下透析 2 天, 然后用 0.22 μm 的过滤器(由 Millipore Co.生产)过滤除菌, 然后在-80°C 保藏。

#### 实施例 7

#### 10 多克隆抗体 M 毒素的制备

4.1mg 本发明的细胞毒蛋白 M 毒素与 Freund 氏完全佐剂混合, 然后将混合物对兔进行皮下免疫。一周后, 同样量的 M 毒素与 Freund 氏不完全佐剂混合, 然后将混合物进一步对兔进行皮下免疫。免疫后, 采集的血液被离心并去除血球成分, 这样抗-血清被获得。

#### 15 实施例 8

通过蛋白质印迹法分析 M 毒素:

含有 2-巯基乙醇的 SDS-样品缓冲液被加入到实施例 3 所得的上清液中, 将混合物用肽-PAGE (TEFCO) 进行电泳, 然后电转移到 PVDF 膜 (Amersham) 上。实施例 4 和实施例 6 所得的各抗体 (2 μg/ml) 被用作初级抗体。HRP(辣根过氧化物酶)标记的抗兔和抗鼠 IgG 抗体 (稀释 2000 倍; Dako) 被用作次级抗体。用 ECL Western 杂交检测系统

(Amersham) 进行着色。结果是，确认各初级抗体识别表达蛋白质(图 5)。

### 实施例 9

活性炭(0.2~0.1mm 直径)、CM 纤维素和藻酸钙各 0.5ml 被填充到 3 个柱子中。用 pH7.7 的 10mM Tris 缓冲液平衡后，0.5ml 400nM 具有已重折叠活性的 M 毒素被加入到各柱中，将这些柱子塞紧并在 25℃ 下放置 60 分钟。其间，单独的 Tris 缓冲液和含有相同 M 毒素的 Tris 缓冲液在相同条件下被放置。然后将所有的柱子打开，分离出各 100 μl 柱子滴下的液体，进一步，各 0.5ml Tris 缓冲液被加到各柱子中，并且各 100 μl 滴液被收集。正常成人的全血以 800 × g 离心 10 分钟收集，并且如此离心 2~3 次，直至上清液变得澄清。10 μl 沉淀所得红血球被加入到 990 μl 10mM Tris 缓冲液中以用作阳性对照。同样地，10 μl 沉淀所得红血球被加入到 0.9% 盐 10mM Tris 缓冲液以被用作阴性对照。从以上柱子中收集样品。红血球以每 100 体积样品中 1 体积红血球的比例被加入到样品中。对照和样品通过用多道读板仪(BioRad) 测量 415nm 处吸光度而比较洗脱下的血红蛋白的相对浓度(图 6)。

### 实施例 10

暴露于实施例 9 各柱子的组分的 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)的比例和存活率通过使用四唑盐的 WST 方法被测定。HeLa 细胞以每孔 10000 个细胞的比率于 96 孔板培中养 24 小时。仅含有培养液体的阴性对照、各样品液体和 20nM 毒素蛋白的阳性对照被分别加入各孔中，然后于 37℃ 培养 12 小时。使用细胞计数试剂盒(DOJIN

LABORATORIES Ltd. Co. ), 通过 WST 方法检测的细胞存活比率以 415nm 波长的吸光度被测定。

### 工业应用

- 本发明的蛋白质和部分肽等可以被用作, 例如, 癌症的治疗试剂。
- 5 本发明的抗体可以被用于鉴定从检测患者采集的血液、组织、尿样和粪便中的本发明的蛋白质, 并确认幽门螺旋杆菌的感染。本发明的抗体被进一步用于本发明的蛋白质的定量。本发明的蛋白质可以被用作增加或抑制本发明的蛋白质的活性的化合物的筛选试剂。

<110> 大野博之(OHNO, Hiroyuki)  
 <120> 细胞毒蛋白及该细胞毒蛋白的利用  
 <150>2001-371210  
 5 <151>2001-12-05  
 <160> 4  
 <210> 1  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 10 <213> 幽门螺旋杆菌  
 <400> 1Met Lys Gly Leu Glu Arg Glu Ser His Phe Thr Leu Asp Glu Asn Ala  
           1                  5                  10                  15  
 Met Phe Phe Glu Cys Ala Tyr Ser Cys Asp Asn Ala Leu Phe Leu Gln  
                           20                  25                  30  
 15 Leu Glu Asp Arg Ser Phe Phe Ile Thr Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Glu  
                           35                  40                  45  
 Ala Lys Glu Ser Ile Gln Pro Lys Asn Gly Val Leu Ala Glu Val Ile  
                           50                  55                  60  
 Glu Ser Ser Asp Leu Val Gln Ser Thr Ile Asp Leu Ile Ala Lys His  
 20 65                  70                  75                  80  
 Ser Val Lys Lys Leu Phe Phe Asp Pro Asn Gln Val Asn Leu Gln Thr  
                           85                  90                  95  
 Tyr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Ile Gly Asn Lys Val Ile Leu Glu Gly  
                           100                  105                  110

---

Val Pro Ser Tyr His Arg Gln Lys Arg Ile Ile Lys Asn Asn His Glu  
115 120 125

Ile Gln Leu Leu Lys Lys Ser Gln Ala Leu Asn Val Glu Ala Phe Glu  
130 135 140

5 Asn Phe Ala Glu Tyr Val Lys Lys Ile Phe Asp Glu Lys Glu Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Glu Arg Tyr Leu Gln His Lys Val Lys Asp Phe Leu Thr Lys Glu  
165 170 175

Gly Val Tyr Asp Leu Ser Phe Glu Pro Ile Leu Ala Leu Asn Ala Asn  
10 180 185 190

Ala Ser Lys Pro His Ala Leu Pro Ser Ala Lys Asp Phe Leu Lys Ala  
195 200 205

Glu His Ser Ile Leu Leu Asp Met Gly Ile Lys Tyr Glu Arg Tyr Cys  
210 215 220

15 Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ala Phe Phe Asp Pro Lys Asp Phe Val Phe  
225 230 235 240

Lys Arg Glu Gln Ser Phe Lys Asp Lys Glu Ser Gln Lys Ile Tyr Asp  
245 250 255

Ile Val Lys Glu Ala Gln Glu Lys Ala Ile Ser Gly Ile Arg Ala Gly  
20 260 265 270

Met Thr Gly Lys Glu Ala Asp Ser Leu Ala Arg Gly Val Ile Ser Asp  
275 280 285

Tyr Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe Thr His Ser Thr Gly His Gly Ile Gly  
290 295 300

25 Leu Asp Ile His Glu Leu Pro Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Glu Thr Ile Leu

	305	310	315	320	
	Glu Glu Gly Met Val Phe Ser Val Glu Pro Gly Ile Tyr Ile Pro Gly				
	325	330	335		
	Phe Phe Gly Val Arg Ile Glu Asp Leu Val Val Ile Lys Asn Ser Arg				
5	340	345	350		
	Ala Glu Leu Leu				
	355				
	<210> 2				
	<211> 1071				
10	<212> DNA				
	<213> 幽门螺旋杆菌 ( <i>Helicobacter pylori</i> )				
	<400> 2				
	atgaaaggat tagaaagaga atcgcatc acgcttgatg aaaacgcgat gtttttgag	60			
	tgigcttata gttgcgataa tgctttgttt tgcaattag aggatcgctc gtttttatac	120			
15	actgattctc gctacactca agaagctaaa gaaagcattc agcctaataaa tggcgtttta	180			
	gcggaagtga tagaatccag cgatttagtc caaagcacga ttgattgat cgcaaaacac	240			
	tcggttaaaa agctcttttt tgatcccaat caagtgaatt tgcaaaccta caagcgtttg	300			
	gattcggcga ttgggaataa ggttatttta gagggcgtgc ctagtacca ccgcaaaaa	360			
	cgcatcatta aaaacaatca tgagatccaa ctctcaaaa aatctcaagc gttgaatgtt	420			
20	gaagcttttg aaaattttgc cgagtatgtg aaaaagattt ttgatgaaaa agagtccttg	480			
	agcgagcggg atttgcagca taaggtaag gactttttga ctaaagaggg ggtttatgat	540			
	ctgagctttg agcctatttt agccttgaat gcgaacgcga gcaaacccca tgctttgcct	600			
	agtgcgaagg atttttaaa agcggagcat agcattcttt tgatatggg gatcaatac	660			
	gaacgtatt gctcggatag gactcgcacg gcttttttg accctaaaga tttgtcttc	720			
25	aaaagagagc agagttcaa ggataaagag agtcaaaaaga tttatgacat tgtgaaagaa	780			
	gcgcaagaaa aggctattc aggtattaga gcgggcatga ccgtaaaga agcggacagc	840			
	ttggctaggg gagtgattag cgattatggt tatgggcaat attcactca cagcactgga	900			
	catggcattg gcttagacat tcatgagctt ccttatattt catcgcgcag tgaaccatt	960			
	ttagaagagg gcatggtgtt ttctgtagag cctgggattt atatccctgg attttttggg	1020			

---

	gtgcgcatg aagattagt ggtgatcaaa aattctaggg ctgagcttt g	1071
	<210> 3	
	<211> 32	
5	<212> DNA	
	<213> 螺旋杆菌 (licobacter pylori)	
	<400> 3	
	gacgacgaca agatgaaagg attagaaaga ga	32
10	<210> 4	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 幽门螺旋杆菌	
	<400> 4	
15	gaggagaagc cggttacaa aagctcagcc ctagaat	37

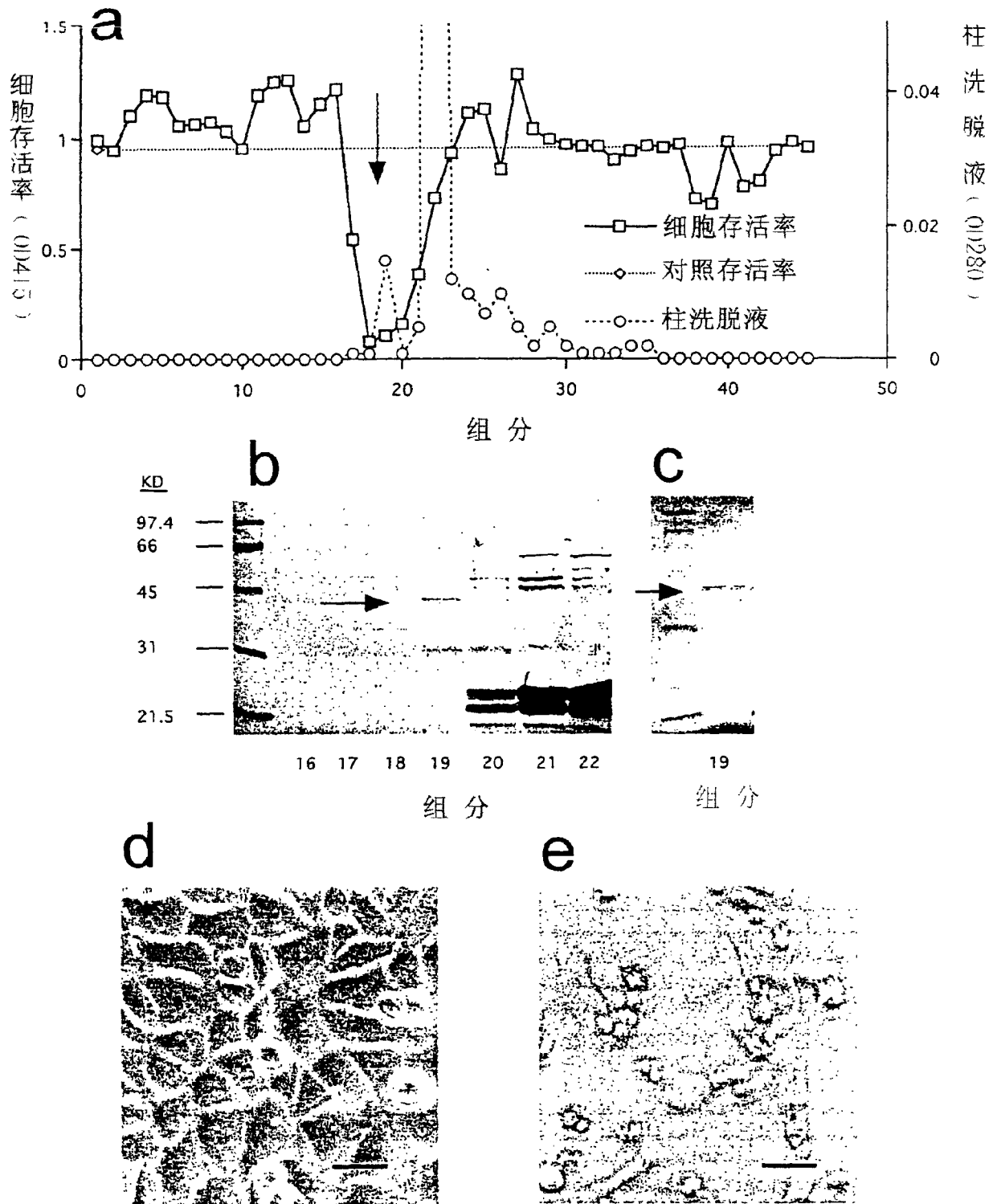


图 1

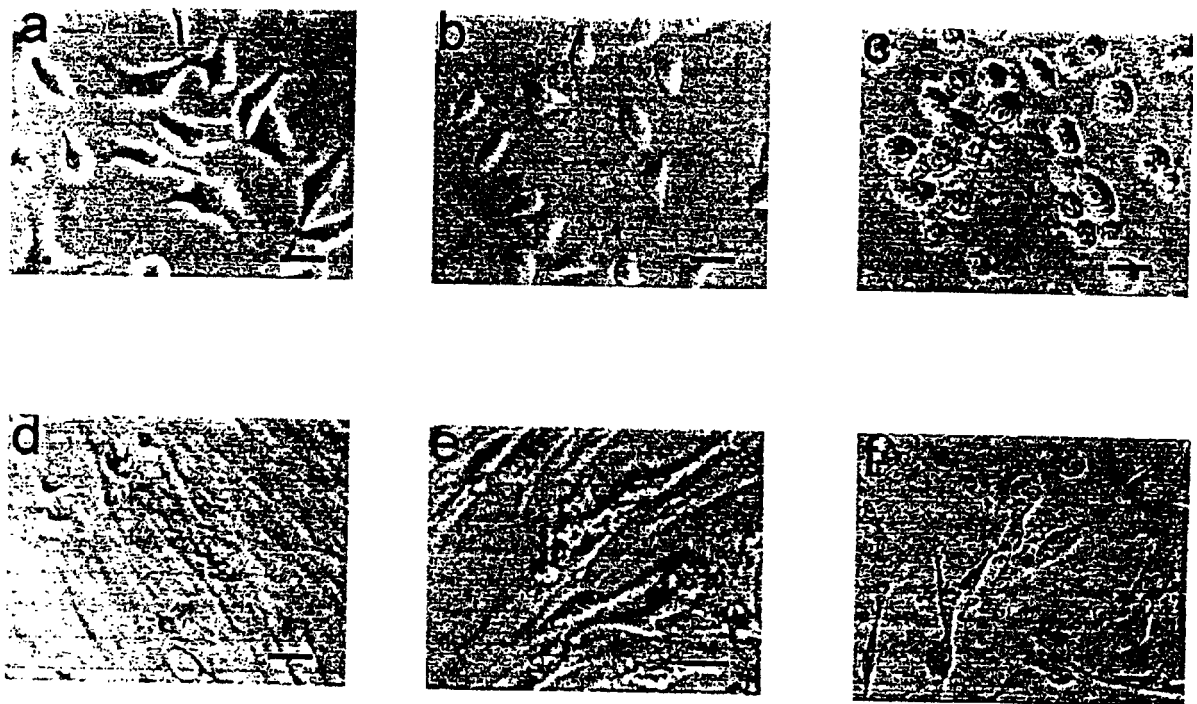


图 2

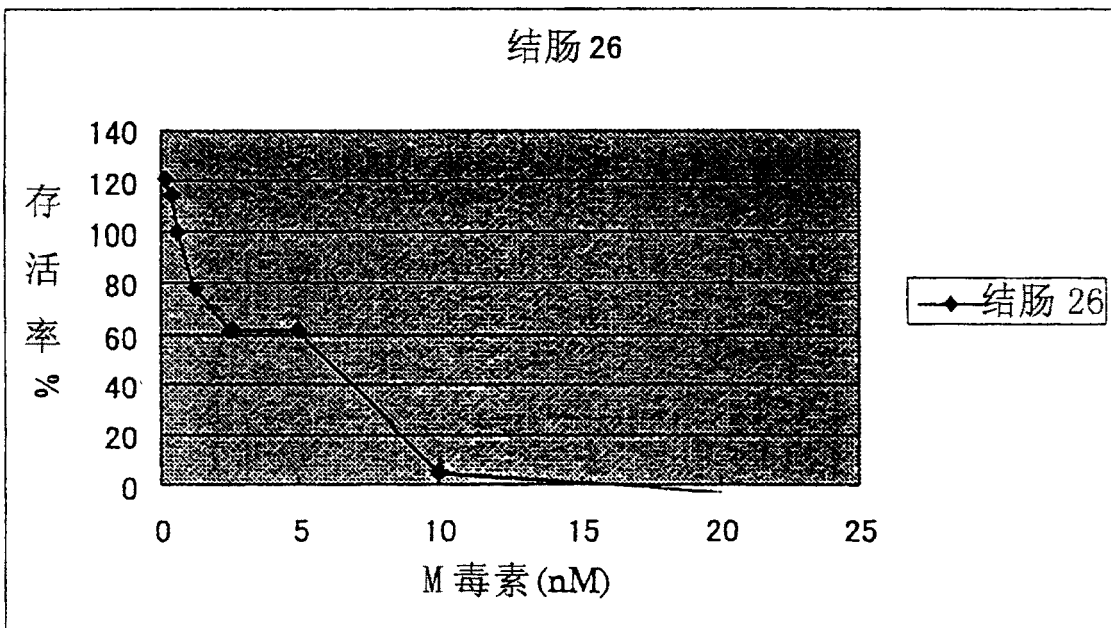
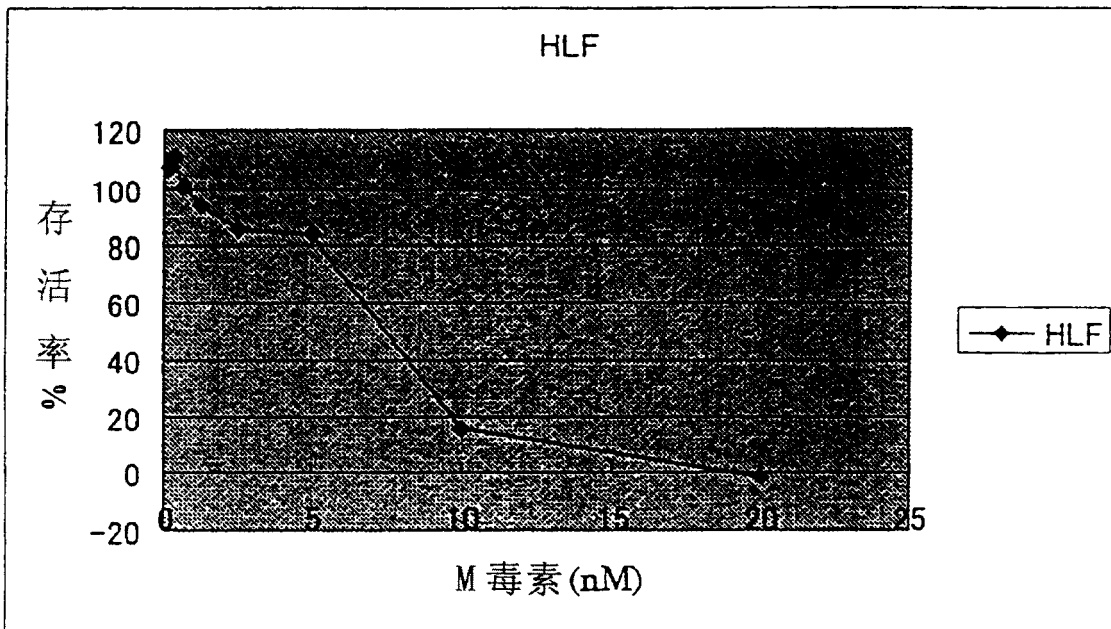


图 3

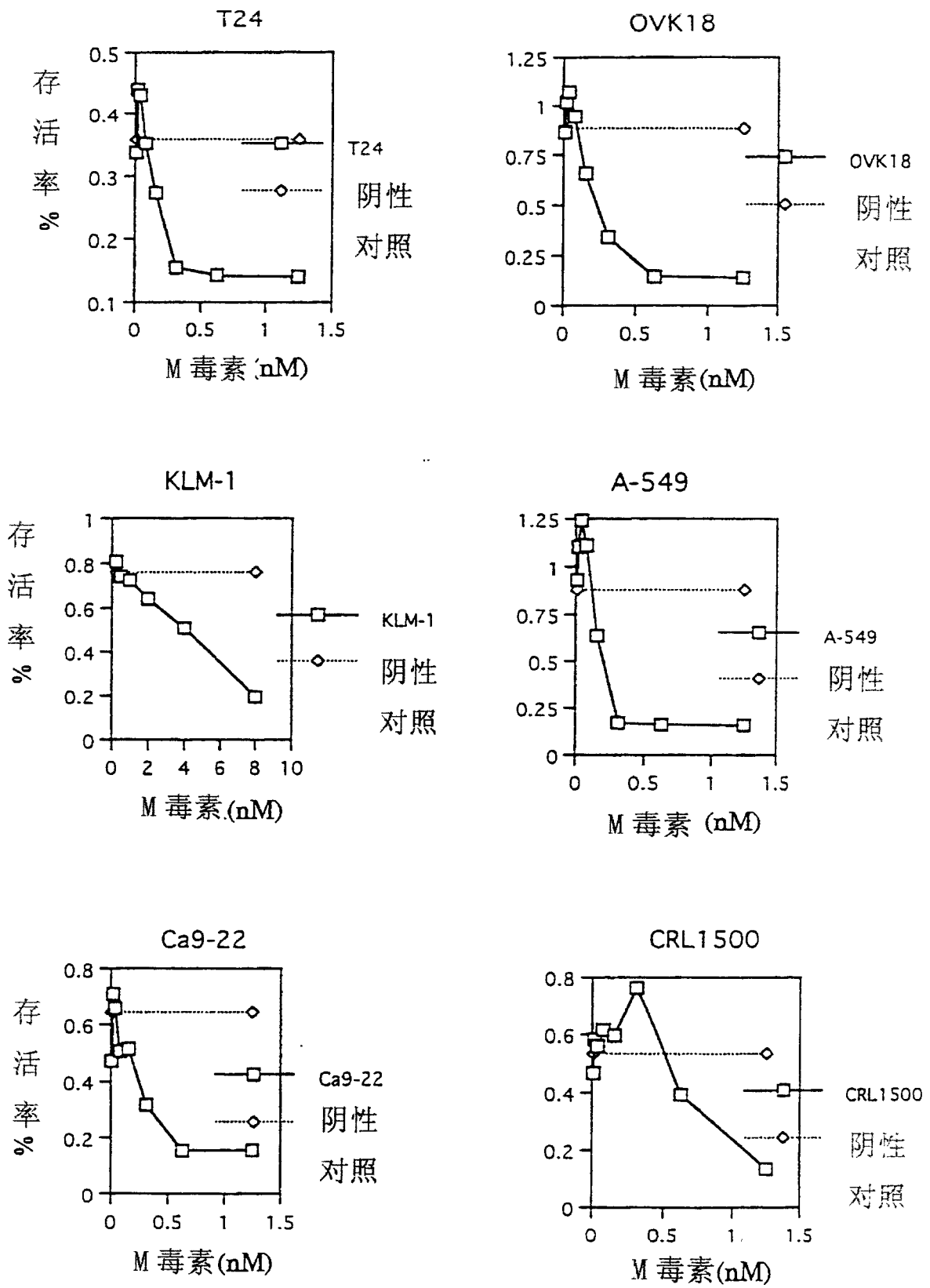


图 4

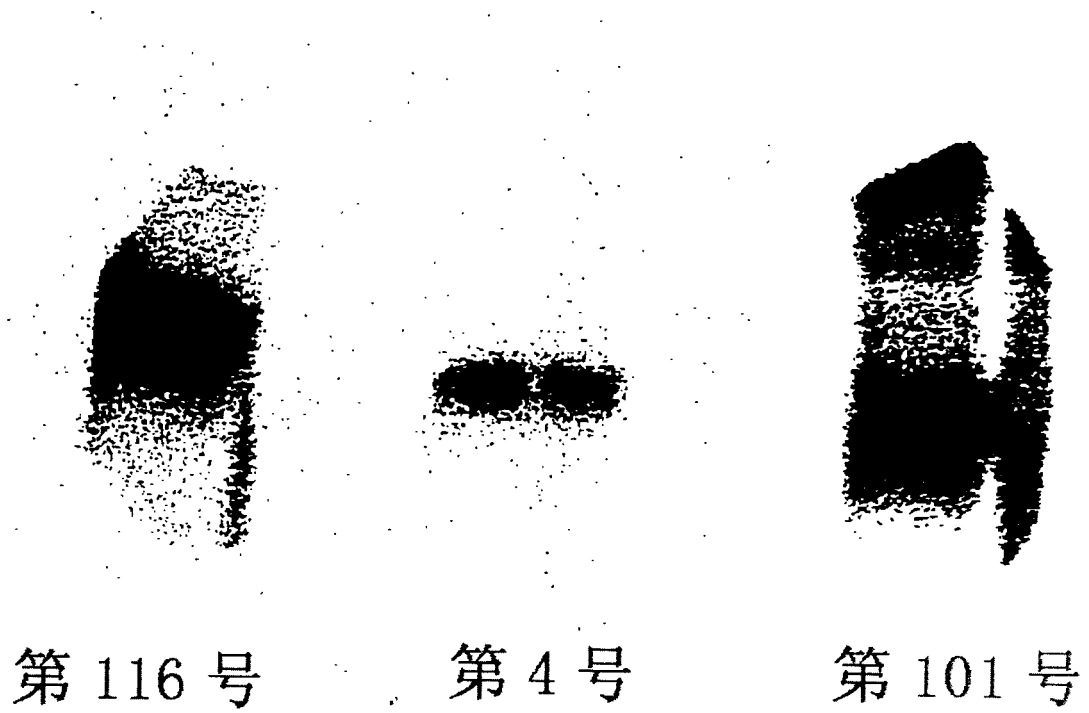


图 5

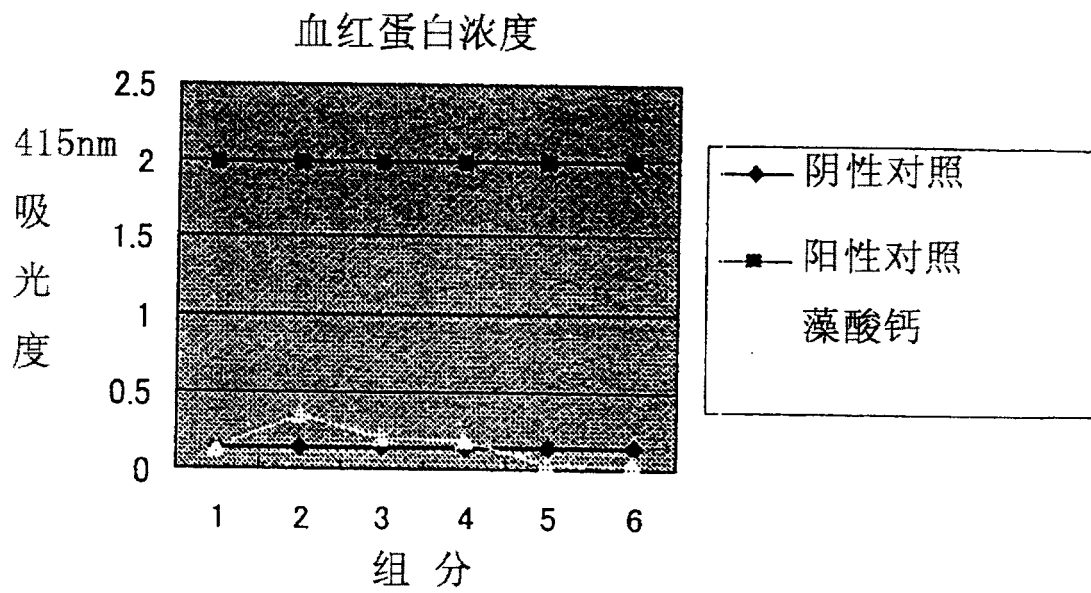


图 6

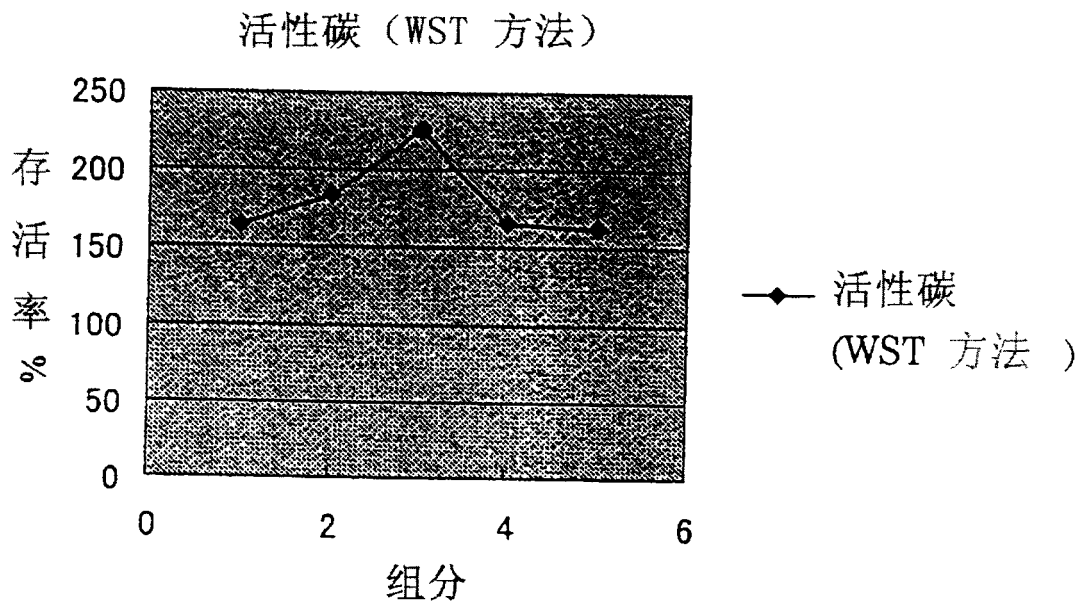


图 7

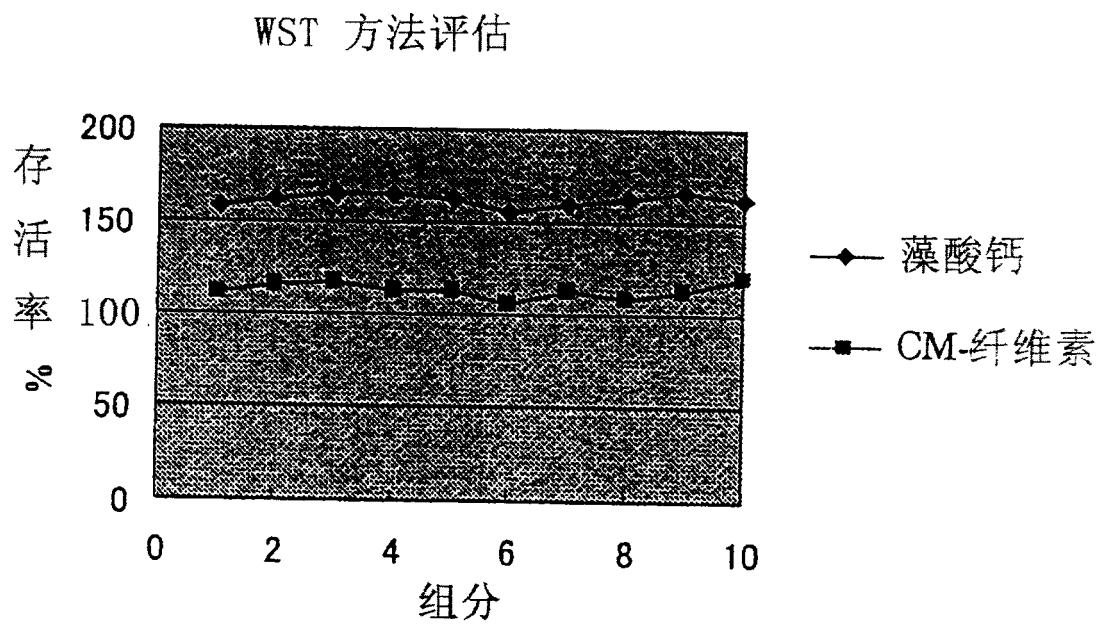


图 8

专利名称(译)	细胞毒蛋白及该细胞毒蛋白的利用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1599750A</a>	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN02824401.X	申请日	2002-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	小野裕之		
申请(专利权)人(译)	大野博之		
当前申请(专利权)人(译)	大野博之		
[标]发明人	大野博之 税所宏光 丹沢秀树		
发明人	大野博之 税所宏光 丹沢秀树		
IPC分类号	C07K14/52 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/195 C07K14/205 C07K16/12 C12N5/12 C12N15/31 C12P21/00 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/50		
CPC分类号	G01N2333/205 C07K16/121 C07K14/205 A61K38/164 Y10S435/81 C12P21/02 A61P1/00 A61P1/04		
优先权	2001371210 2001-12-05 JP		
其他公开文献	CN1599750B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种新的由幽门螺旋杆菌生成的细胞毒蛋白质(M毒素、粘膜层破坏毒素)及该细胞毒蛋白的应用。本发明提供了由幽门螺旋杆菌产生的细胞毒蛋白(M毒素)、部分肽和含有该细胞毒蛋白的抗肿瘤试剂。该蛋白通过培养用含有编码该细胞毒蛋白的DNA的重组载体转化的转化体而获得。本发明进一步提供了该蛋白的应用。

