

# 以白细胞介素 15 拮抗剂为载体的融合毒素 IL15M-PE $\Delta$ 293 的研制 Development of a Fusion Toxin IL15M-PE $\Delta$ 293 Based on a Receptor-specific IL-15 Antagonist

牛云飞, 郑 颖, 毛晓华\*

NIU Yun-Fei, ZHENG Ying and MAO Xiao-Hua\*

发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 东南大学基础医学院发育生物学与遗传学系, 南京 210009

Key Laboratory of Developmental Genes and Human Diseases, Ministry of Education, Department of Developmental Biology and Genetics, School of Basic Medical Science, Southeast University, Nanjing 210009, China

**摘 要** IL-15 及 IL-15 受体(IL-15R)阳性细胞在成人 T 淋巴细胞性白血病(ATL)、多发性骨髓瘤及炎症性自身免疫性疾病病理过程中起着重要作用。为研制特异的可消除 IL-15 受体阳性异常细胞的新型导向药物,将人 IL-15 拮抗剂(IL-15M)基因片段与人工改造的绿脓杆菌外毒素(PE)变异体(PE $\Delta$ 293)基因按正确的阅读框架融合,定向克隆在 pET16b 表达载体 T7 启动子的下游,得到质粒 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293。从大肠杆菌相应重组菌株中通过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化出融合蛋白 IL15M-PE $\Delta$ 293。IL15M-PE $\Delta$ 293 对 IL-15R 阳性红白血病细胞系 K562 及其多药耐药细胞系 K562/AO<sub>2</sub> 均具有杀伤作用,对 IL-15R 阴性细胞系 Jurkat 则没有明显的杀伤作用,而且过量的重组 IL-15 可以完全阻断融合蛋白对 K562 的细胞毒效应,说明融合蛋白的细胞毒作用具有靶向性。这些结果提示本文构建的融合蛋白在与 IL-15/IL-15R 异常表达相关的疾病甚至耐药性肿瘤的治疗中具有潜在的应用价值。

**关键词** 白细胞介素 15, 绿脓杆菌外毒素, 融合蛋白

中图分类号 R392 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0042-05

**Abstract** IL-15 and IL-15 receptors(IL-15R) play a crucial role in the pathogenesis of adult T-cell leukemia(ATL), multiple myeloma and inflammatory autoimmune diseases. To develop a novel therapeutic agent capable of eliminating IL-15R-over-expressing abnormal cells, the gene coding for human IL-15 antagonist(IL-15M) was fused with a DNA fragment coding for the mutated form of *Pseudomonas* exotoxin, PE $\Delta$ 293. The resulting gene fusion was cloned into pET16b under the control of T7 promoter, giving rise to the expression plasmid pET-IL15M-PE $\Delta$ 293. Using Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography, IL15M-PE $\Delta$ 293 was purified from *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformed with pET-IL15M PE $\Delta$ 293. The fusion toxin showed cytotoxicity to IL-15R-bearing myelogenous leukemia cell line K562 and K562-derived multidrug resistant cell line K562/AO<sub>2</sub>. However, IL-15R negative cell line Jurkat was insensitive to IL15M-PE $\Delta$ 293. In addition, the toxic effect of IL15M-PE $\Delta$ 293 on K562 was completely blocked by excessive amount of recombinant human IL-15. These results demonstrated that the selective cytotoxicity of IL15M-PE $\Delta$ 293 correlated with the appropriate IL-15R expression on target cells. The present data suggest that the chimeric toxin constructed in this report may have therapeutic potential in the treatment of diseases associated with abnormal expression of IL-15/IL-15R, even in the treatment of chemotherapy refractory tumors.

**Key words** interleukin 15, *Pseudomonas* exotoxin, fusion protein

Received: July 5, 2004; Accepted: October 11, 2004.

This work was supported by Grant from the Science Foundation of Southeast University (No. 9223001160).

\* Corresponding author. Tel: 86-25-83272474; E-mail: xmao@seu.edu.cn

东南大学科技基金资助(No. 9223001160)。

人白细胞介素 15(IL-15)及其受体(IL-15R)在多种疾病的发生和发展中具有重要作用。富含 IL-15R 的活化 T 细胞异常是一些炎症性自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、结节病、慢性炎性肠病、多发性硬化以及移植后的排斥反应等的重要致病机制,同时炎症性自身免疫性疾病往往伴有 IL-15 异常表达,而且其表达要先于其它细胞因子,因此 IL-15 及其受体表达异常是这类疾病最重要的因素<sup>[1,2]</sup>。另外,成人 T 淋巴细胞白血病(ATL)、多发性骨髓瘤等恶性肿瘤的肿瘤细胞表面也有 IL-15R $\alpha$  的组成性表达,而且这些恶性细胞自分泌 IL-15 又进一步促进肿瘤的增殖<sup>[3,4]</sup>。因此杀伤 IL-15R 阳性的病变细胞或阻断 IL-15 信号转导通路、抑制异常细胞增殖是治疗这类疾病的方法之一。IL-15 成熟肽含 114 个氨基酸残基(AA),生物学功能类似 IL-2。IL-15 受体(IL-15R)包括三种亚基成分,分别为 IL-15R 特有的  $\alpha$  亚基以及与 IL-2R 共有的  $\beta$ 、 $\gamma$  亚基。IL-15 与受体的结合由  $\alpha$  亚基介导,IL-15 与  $\beta\gamma$  受体亚基的相互作用则是启动信号转导、发挥生物学功能所必需的<sup>[1]</sup>。IL-15 的 N-端  $\alpha$  螺旋区特别是第 8 位的 Asp 是 IL-15 与受体  $\beta$  亚基关键的结合位点。

成熟的绿脓杆菌外毒素(PE)有 613 个 AA,包括 I、II、III 三个结构域<sup>[5]</sup>,其中结构域 I 又被分为 I<sub>a</sub> 和 I<sub>b</sub>。结构域 I<sub>a</sub>(AA1-252)负责细胞识别;结构域 II(AA253-364)负责 PE 的跨膜转运;结构域 III(AA405-613)灭活真核细胞的延伸因子 2(eEF-2),阻断真核细胞的蛋白质合成使细胞死亡。结构域 I<sub>b</sub>(AA365-404)的功能目前并不清楚。

前期工作中本室对人 IL-15 进行分子改造,删除了 N-端前 8 个氨基酸残基,由此获得的突变体 IL-15M 可以阻断与受体  $\beta$  亚基的结合从而消除 IL-15 所固有的信号转导和促细胞增殖作用,但 IL-15M 仍可以通过特异性的  $\alpha$  亚基与  $\alpha\beta\gamma$  受体复合物结合<sup>[6]</sup>,因此,IL-15M 可视为受体特异性的 IL-15 拮抗剂。本文以 IL-15M 为载体,新构建的一种绿脓杆菌外毒素(PE)突变体 PE $\Delta$ 293 为弹头,研制对 IL-15R 高表达的异常细胞具有杀伤作用的分子导向药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 生化试剂

Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析介质购自 Qiagen 公司。重组人白介素 15(rhIL-15)由本实验室在大肠杆菌中表达后制备保存。

### 1.2 质粒、菌种和细胞

*E. coli* BL21(DE3)pLysS 购自 Novagen 公司。质粒 pUC9Nde I-IL-15M 含 hIL-15 突变体 IL-15M 的基因序列,该序列侧翼分别有 Nde I 和 EcoR I 识别位点,本室保存。质粒 pET16b 购自 Novagen 公司。质粒 pLN11 含 PE 基因序列,中国医学科学院聂凌虎博士惠赠。人红白血病细胞系 K562、急性 T 细胞性白血病细胞系 Jurkat 购自中科院上海细胞所,K562 多药耐药衍生株 K562/AO<sub>2</sub> 本校陈宝安教授惠赠。RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司。

### 1.3 引物设计

P<sub>1</sub> 为 PE 结构域 II 上游引物,序列为 5'-CTGAATTCGGCGGCAGCCTGCCCCGC-,上游含 EcoR I 识别位点;P<sub>2</sub> 为 PE 氨基酸残基 349 处引物,序列为 5'-CTTCTAGAGCGCTCGCTCTCGGCGGC-,上游含 Xba I 识别位点;P<sub>3</sub> 为 PE 氨基酸残基 391 处引物,序列为 5'-CTTCTAGAGAGCGCAACTATCCCCTG-,上游含 Xba I 的识别切割序列;P<sub>4</sub> 为 PE 氨基酸残基 613 处引物,序列为 5'-CTCAAGCTTAGATCTTCACTTCAG-GTCCTCGCGCGG-,上游含 Hind III 和 Bgl II 的识别位点以及终止密码子。

### 1.4 DNA 操作

DNA 的提取、酶切、电泳、回收和纯化均按本室常规方法进行,DNA 序列分析由大连宝生物工程公司完成。

### 1.5 PCR 反应

反应体系中添加 0.01% 的 BSA 和 10% 的 DMSO,pLN11 质粒为模板,其余按常规操作。

### 1.6 融合蛋白的表达、纯化

表达质粒 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293 转入大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS,在 M<sub>0</sub>CAA 培养基(0.2% casamino acid, 1 × M9 盐液, 0.4% 葡萄糖, 0.81 mol/L MgSO<sub>4</sub>, 2 × 10<sup>-4</sup> % Vitamin B<sub>1</sub>, 80 μg/mL 氨苄青霉素)中 37℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达 0.6,用 1 mmol/L IPTG 诱导 1 h 后收获细菌。重悬菌体于适量的 Buffer A(100 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/L Tris, 8 mmol/L Urea, 0.1 % Triton X-100, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L Imidazole, pH8.0),超声至菌液澄清,离心(10000g, 30 min, 15℃)。上清中加入 Ni<sup>2+</sup>-NTA 匀浆,室温下平缓摇动 3 h 后上柱,收集流出液。依次用 Buffer B(40 mmol/L Imidazole, 余同 Buffer A)、Buffer C(60 mmol/L Imidazole, 余同 Buffer A)和 Buffer D(200 mmol/L Imidazole, 余同 Buffer A)洗脱,分部收集。根据 SDS-PAGE 结果合并峰值管,调

整蛋白质浓度至 500 $\mu$ g/mL,加入 DTT 至终浓度 10mmol/L,室温放置 2h 使二硫键充分还原。将蛋白液 10 倍稀释于复性液 (100mmol/L Tris-Cl, 5mmol/L EDTA, 4mmol/L GSSG, 10% 甘油), 15 $^{\circ}$ C 复性 20h。复性后离心 (10000g, 10min, 4 $^{\circ}$ C), 保留上清。上清对 10mmol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.6) 低温透析 24h, Centricon 超滤浓缩, -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 融合蛋白体外活性测定

细胞均培养于 RPMI1640 培养基 (含 10% 胎牛血清, 氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL, 链霉素 100u/mL, 其中 K562/AO<sub>2</sub> 的培养基中尚要添加阿霉素 1mg/L)。K562 和 K562/AO<sub>2</sub> 每孔 3 万个接种于 96 孔板, Jurkat 每孔 6 万个, 分别加入不同浓度的融合蛋白, 每个浓度设 8 个复孔, 同时设空白对照 (不含样品), 37 $^{\circ}$ C 培养 18h 后 MTT 法测定对靶细胞的杀伤活性。测细胞存活率时去除 8 个复孔中 A<sub>570</sub> 最小的 2 个值和最大的 2 个值, 再计算其余 4 孔均数。细胞存活率 = 实验孔 A<sub>570</sub> 均数 / 空白孔 A<sub>570</sub> 均数  $\times$  100%。选择 K562 为靶细胞进行受体竞争性实验, 各孔先加入 10 $\mu$ g/mL 的重组人白介素 15 (rhIL-15), 再给予不同浓度的融合蛋白, 余操作同前。

2 结 果

2.1 PE 突变体 (PE $\Delta$ 293) 基因的构建

本研究利用 PCR 方法改造 PE 基因, 删去结构域 I<sub>a</sub>、结构域 II 下游一部分和结构域 I<sub>b</sub> 的大部分, 即删去 AA 1 - 252 和 AA 350 - 390。引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 扩增出 307bp 的 PEUP 基因片段, 该片段覆盖结构域 II 氨基端 97 个 AA; 引物 P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 扩增出 695bp 的 PEDOWN 基因片段, 该片段覆盖结构域 I<sub>b</sub> 的羧基端 (AA 391 - 404) 和整个结构域 III (图 1)。PCR 结果见图 2。PEUP 基因经 *EcoR* I / *Xba* I 双切后克隆至 pUC18, 生成质粒 pUC18-PEUP; PEDOWN 基因经 *Xba* I

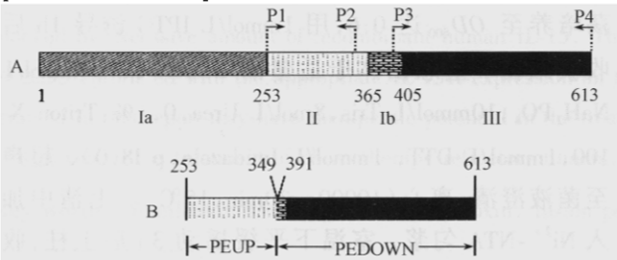


图 1 PE 与 PE 突变体 (PE $\Delta$ 293) 示意图

Fig. 1 Schematic representation of PE and a PE mutant PE $\Delta$ 293  
A: PE; B: PE $\Delta$ 293.

/ *Hind* III 双切后克隆至 pUC18, 生成质粒 pUC18-PEDOWN。然后将质粒 pUC18-PEDOWN 中 PEDOWN 片段定向克隆至 pUC18-PEUP 的相应位点, 构建成为质粒 pUC18-PE $\Delta$ 293。

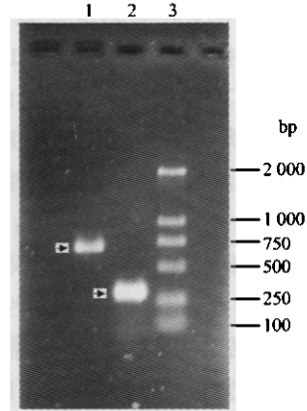


图 2 PCR 扩增 PEUP 和 PEDOWN 基因片段

Fig. 2 Amplification of PEUP and PEDOWN DNA fragment by PCR  
1: PEDOWN; 2: PEUP; 3: DNA Marker (bp).

2.2 表达质粒 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293 的构建

将 pUC9 *Nde* I - IL15M 用 *Nde* I / *EcoR* I 双酶切, 分离纯化出 0.3kb 的 IL-15M 的 DNA 片段; 再将 pUC18-PE $\Delta$ 293 用 *EcoR* I / *Bgl* II 双酶切, 分离纯化出 1kb 的 PE $\Delta$ 293 的 DNA 片段。将 IL-15M 的 DNA 片段与 PE $\Delta$ 293 的 DNA 片段及 *Nde* I / *Bam* H I 双酶切的线性化载体 pET16b 共连接 (*Bgl* II 和 *Bam* H I 为同尾酶), 建成重组质粒 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293 (图 3)。图 4 是重组的表达质粒进行酶切鉴定结果, *Nde* I 单切后 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293 比空载体 pET16b 多出约 1.3kb, 与插入片段的大小相符。序列分析显示融合基因与载体上聚组氨酸标签的编码序列在同一阅读框架。

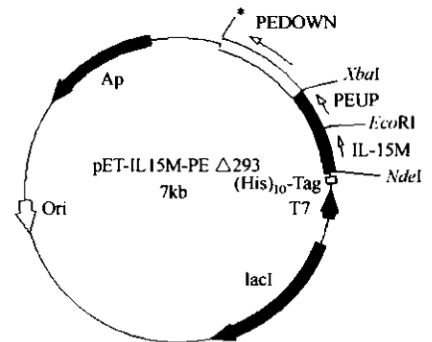


图 3 表达质粒 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293 限制性图谱

Fig. 3 Restriction map of pET-IL15M-PE $\Delta$ 293

\* Indicates compatible cohesive ends created by *Bgl* II and *Bam* H I.

2.3 融合毒素的表达、纯化

将 pET-IL15M-PE $\Delta$ 293 转入大肠杆菌 BL21

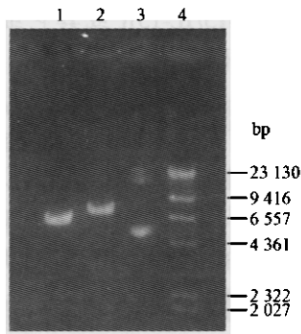


图 4 重组质粒 pET-IL15M-PEΔ293 的限制性分析

Fig.4 Restriction analysis of plasmid pET-IL15M-PEΔ293  
1: pET16b/*Nde* I; 2: pET-IL15M-PEΔ293/*Nde* I; 3: pET-IL15M-PEΔ293; 4: λDNA/*Hind* III markers(bp).

(DE3)pLysS, IPTG 诱导 1h 后取样进行 SDS-PAGE 分析。由于 IL15M-PEΔ293 氨基端带有来自载体的 20 AA(组氨酸标签及因子 Xa 识别序列), 加上 3 个内切酶(*Nde* I, *Eco*R I, *Xba* I)编码序列, 表达出的融合蛋白共 452 个 AA。图 5 显示重组菌株经诱导后出现约 50kD 的特异性蛋白带, 与预计分子量一致。由于表达产物的氨基端带有组氨酸标签, 故用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化融合蛋白。在变性条件下, 菌体裂解后的上清与 Ni<sup>2+</sup>-NTA 结合, 先经低浓度咪唑流洗, 再经 200mmol/L 咪唑(D 缓冲液)洗脱可以得到电泳纯的目的蛋白, 参见图 6。目的蛋白复性后用于生物活性的测试。

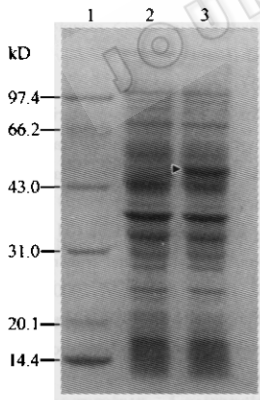


图 5 携带质粒 pET-IL15M-PEΔ293 的大肠杆菌菌体总蛋白 SDS-PAGE 蛋白分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of total cell lysate of *E. coli* transformed with pET-IL15M-PEΔ293  
1: Protein markers; 2: pET-IL15M-PEΔ293/*E. coli* lysate without IPTG induction; 3: pET-IL15M-PEΔ293/*E. coli* lysate after IPTG induction for 1 h.

2.4 IL15M-PEΔ293 的细胞毒性作用

K562 是人红白血病细胞株, 其细胞表面表达较为丰富的 IL15R<sub>α</sub> 及 IL2R<sub>βγ</sub>, 而急性 T 细胞性白血病细胞 Jurkat 不表达 IL-15R<sub>α</sub> [6]。MTT 法测定结果显

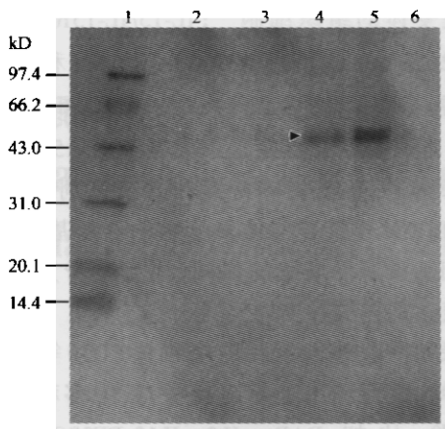


图 6 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化 IL15M-PEΔ293

Fig.6 Purification of IL15M-PEΔ293 by Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography

1: protein markers; 2: wash with buffer B; 3: wash with buffer C; 4, 5, 6: different fractions eluted with buffer D.

示, 当 IL15M-PEΔ293 浓度超过 10ng/mL 后对 K562 表现出剂量依赖性的细胞毒作用, 而对 IL-15R<sub>α</sub> 阴性的 Jurkat 无明显的杀伤作用, 说明融合蛋白特异性杀伤 IL-15R 阳性的细胞。选择 K562 为靶细胞进行竞争性实验, 如图 7 所示, 10μg/mL 的 rhIL-15 完全逆转了融合蛋白细胞毒性, 以摩尔浓度计, rhIL-15 (10μg/mL) 是 IL15M-PEΔ293 (1000ng/mL) 的近 40 倍。融合蛋白对 IL-15R 阳性细胞的杀伤作用被过量 rhIL-15 所拮抗, 进一步证明这种细胞毒性作用是通过靶细胞表面的 IL-15R 介导的。更有意义的是样品对多药耐药细胞 K562/AO<sub>2</sub> 也表现出了良好的杀伤活性。

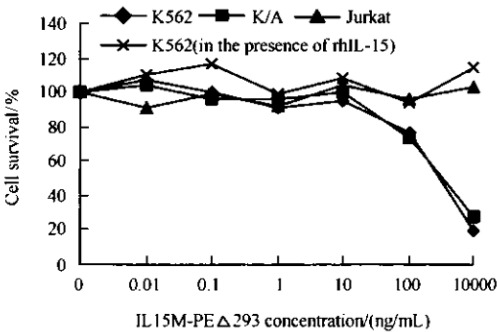


图 7 IL15M-PEΔ293 对不同细胞的杀伤活性图谱

Fig.7 Cytotoxicities of IL15M-PEΔ293 to different cell lines

3 讨论

IL-2 是一种常用的导向药物载体, 但是本研究选取 IL-15 为载体, 因为 IL-15 的副作用特别是血管渗出综合征低于 IL-2 [8]; IL-15 血浆清除率快于 IL-2, 较少引发非特异性毒性 [9]; IL-15 较 IL-2 更易分布于

含相应受体的组织细胞<sup>[9]</sup>; IL-15/IL-15R<sub>α</sub>的亲合力是 IL-2/IL-2R<sub>α</sub>亲合力的 1000 倍<sup>[11]</sup>, 有利于减少剂量, 增强导向药物的特异性, 减轻载体和弹头的毒副作用。本研究没有直接采用完整的 IL-15 作为载体, 而是采用了 IL-15 受体特异性的拮抗剂(IL-15M)是因为 IL-15M 不能与受体复合物的 β 亚基相互作用, 对靶细胞没有促增殖的作用, 而且本身又可以拮抗异常表达的内源性 IL-15。

绿脓杆菌外毒素和白喉毒素(DT)等的变异体作为弹头广泛应用于导向药物, 其中多种已进入临床试验, 比如 DAB<sub>389</sub> IL2, IL13-PE38QQR, B3-Lys PE38, B3(dsFv)-PE38<sup>[10,11]</sup>。这些导向药物的载体和弹头设计和作用各具特点, 特别是 IL-2 和 DT 构建的重组毒素 DAB<sub>389</sub> IL2 已由 FDA 批准成为治疗 T 细胞淋巴瘤的药物。本研究将 PE 进行改造得到突变体 PEΔ293 作为弹头。删除结构域 I, 消除了 PE 的非特异性杀伤作用; 删除结构域 II 下游一部分和结构域 I<sub>α</sub> 的大部分(AA350-390), 可以尽量缩小融合毒素的分子量, 但是并不影响 PE 的跨膜转运和细胞毒性<sup>[12]</sup>, 特别是 Taupiac 等发现 PE 结构域 II 最后一个 α 螺旋缺失后 PE 变异体跨膜转运及细胞毒性作用反而增强<sup>[13]</sup>。

本研究构建并在大肠杆菌表达、纯化了 IL15M-PEΔ293。MTT 法测定结果表明, 融合蛋白浓度超过 10 ng/mL 后仅仅对 IL-15R<sub>α</sub> 阳性 K562 表现出剂量依赖性细胞毒作用, 而对 IL-15R<sub>α</sub> 阴性的 Jurkat 无明显的杀伤作用, 所以 IL15M-PEΔ293 对 IL-15R 阳性细胞具有选择性杀伤活性。10 μg/mL 的 rhIL-15 可以竞争性地抑制融合蛋白 IL15M-PEΔ293 的细胞毒性, 进一步明确了 IL15M-PEΔ293 靶向于 IL-15R。另外融合蛋白 IL15M-PEΔ293 对 K562 衍生的典型耐药株 K562/AO<sub>2</sub> 也具有显著的细胞毒作用。融合蛋白 IL15M-PEΔ293 在体外能特异地杀伤 IL-15R<sub>α</sub> 阳性细胞 K562 和 K562/AO<sub>2</sub>, 提示该蛋白在 IL-15/IL-15R 相关的炎症性自身免疫性疾病、成人 T 淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤甚至多药耐药性肿瘤的治疗中具有潜在的应用价值。要说明的是, 由于 IL-15 对 IL-15R 阳性的肿瘤细胞或活化 T 细胞的激动作用是 ATL、多发性骨髓瘤及炎症性自身免疫性疾病发生发展的重要因素, 而融合蛋白中的载体 IL-15M 可以在受体水平竞争性拮抗机体内源性 IL-15, 因此杀伤异常靶细胞和拮抗内源性 IL-15 的双重效应使 IL15M-PEΔ293 对这一类疾病更具有潜在的治疗价

值。目前, 基于 IL-15/IL-15R 或其它细胞因子与受体基因工程产品的研制通常仅具有一种治疗效应, 如构建白喉毒素与 IL-15 的融合蛋白直接杀伤 IL-15R 阳性细胞, 用可溶性 IL-15R<sub>α</sub> 亚基或不具激动作用的受体拮抗型 IL-15 突变体抑制 IL-15 在疾病发生发展中的作用<sup>[14]</sup>。我们将进一步研究融合蛋白对小鼠移植性肿瘤的药理作用, 以明确它们在动物体内的治疗效果。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin-15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 2001, **97**(1): 14-32
- [2] McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD *et al*. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-α production in rheumatoid arthritis. *Nature Medicine*, 1997, **3**(2): 189-195
- [3] Azimi N, Brown K, Bamford RN *et al*. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-κB site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(5): 2452-2457
- [4] Tindhofer I, Marschitz I, Henn T *et al*. Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood*, 2000, **95**(2): 610-618
- [5] Pastan I, Chaudhary V, FitzGerald DJ. Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annual Review of Biochemistry*, 1992, **61**: 331-354
- [6] Pettit DK, Bonnett TP, Eisenman J *et al*. Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(4): 2312-2318
- [7] Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M *et al*. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(50): 29862-29869
- [8] Katsanis E, Xu Z, Panoskaltsis-Mortari A *et al*. IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice. *Transplantation*, 1996, **62**(6): 872-875
- [9] Kobayashi H, Carraquillo JA, Paik CH *et al*. Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukins 2 and 15. *Cancer Research*, 2000, **60**(13): 3577-3583
- [10] Husain SR, Puri RK. Interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignant glioma therapy: from bench to bedside. *Journal of Neuro-oncology*, 2003, **65**(1): 37-48
- [11] Pastan I. Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A: a short history. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2003, **52**(5): 338-341
- [12] Siegall CB, Ogata M, Pastan I *et al*. Analysis of sequences in domain II of *Pseudomonas* exotoxin A which mediate translocation. *Biochemistry*, 1991, **30**(29): 7154-7159
- [13] Taupiac MP, Bebién M, Alami M *et al*. A deletion within the translocation domain of *Pseudomonas* exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly. *Molecular Microbiology*, 1999, **31**(5): 1385-1393
- [14] Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annual Review of Immunology*, 1999, **17**: 19-49