



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105541978 B

(45)授权公告日 2019.12.13

(21)申请号 201510983178.7

(22)申请日 2011.09.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105541978 A

(43)申请公布日 2016.05.04

(30)优先权数据  
61/403,394 2010.09.15 US

(62)分案原申请数据  
201180053563.1 2011.09.15

(73)专利权人 兰德尔·J·米斯尼  
地址 美国加利福尼亚州  
专利权人 塔希尔·玛穆德

(72)发明人 兰德尔·J·米斯尼  
塔希尔·玛穆德

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李平 武晶晶

(51)Int.Cl.  
C07K 14/28(2006.01)  
C12N 15/31(2006.01)  
A61K 47/64(2017.01)

(56)对比文件  
CN 101522214 A, 2009.09.02,  
WO 2009149281 A1, 2009.12.10,  
Rene Jørgensen, et al., Cholix Toxin,  
a Novel ADP-ribosylating Factor from  
Vibrio cholera.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL  
CHEMISTRY》.2008,第283卷(第16期),第10671-  
10678页.

审查员 高赞

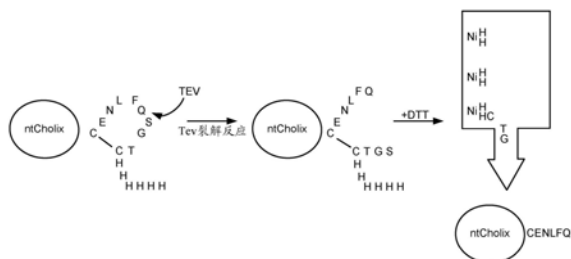
权利要求书1页 说明书15页 附图2页

### (54)发明名称

使用细菌毒素衍生的转运序列递送生物活性剂的系统和方法

### (57)摘要

本发明涉及使用细菌毒素衍生的转运序列递送生物活性剂的系统和方法。本发明提供了霍乱弧菌Cholix基因的一种无毒突变体形式(ntCholix)、一种在氨基酸A386处截短的Cholix变体(Cholix386)、以及其他不同的Cholix衍生的多肽序列用来增强生物活性药物、治疗剂的肠递送的用途。在此所述的这些系统和方法提供了以下项:在没有注射的情况下递送大分子剂量的能力;将负荷例如(但不限于)siRNA或反义分子递送至其中需要它们的活性的细胞内区室中的能力;以及使基于纳米颗粒和树枝状化合物的载体的穿过生物膜的递送,要不然该递送会由于大多数这种膜的屏障特性而将会受到阻碍。



1. 一种分离的递送构建体,所述分离的递送构建体用于以顶部至基侧表面的方向将治疗性负荷递送通过极化的上皮细胞的细胞单层,其中所述构建体包含由成熟Cholix毒素的氨基酸残基Val<sup>1</sup>-Ala<sup>386</sup>组成的无毒的Cholix毒素或在成熟Cholix毒素的残基Glu<sup>581</sup>处缺失的无毒的Cholix毒素;和与所述无毒的Cholix毒素偶联的治疗性负荷。
2. 根据权利要求1所述的分离的递送构建体,其中所述递送在没有注射的情况下进行。
3. 根据权利要求1或2中任一项所述的分离的递送构建体,进一步包括可裂解接头。
4. 根据权利要求1所述的分离的递送构建体,其中所述治疗性负荷选自下组,该组由以下各项组成:siRNA、PNA、miRNA、DNA、质粒以及反义分子。
5. 根据权利要求1所述的分离的递送构建体,其中所述治疗性负荷选自下组,该组由以下各项组成:大分子和小分子。
6. 根据权利要求1所述的分离的递送构建体,其中所述治疗性负荷为细胞因子。
7. 一种药物组合物,所述药物组合物用于以顶部至基侧表面的方向将治疗性负荷递送通过极化的上皮细胞的细胞单层,所述药物组合物包含药学有效量的根据权利要求1-6中任一项所述的分离的递送构建体和药学上可接受的载体。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,所述药物组合物用于口服给药、局部给药、肺部给药、鼻内给药、颊部给药、舌下给药或眼部给药。
9. 根据权利要求8所述的药物组合物,所述药物组合物用于口服给药。
10. 根据权利要求7所述的药物组合物,所述药物组合物被配制在胶囊中或被配制为片剂。
11. 根据权利要求7所述的药物组合物,包含1 $\mu$ g至1g的所述分离的递送构建体。
12. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述分离的递送构建体为从10 $\mu$ g至100mg。
13. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求1所述的递送构建体。
14. 一种表达载体,所述表达载体包含根据权利要求13所述的多核苷酸。
15. 一种分离的宿主细胞,所述分离的宿主细胞包含根据权利要求14所述的表达载体。

## 使用细菌毒素衍生的转运序列递送生物活性剂的系统和方法

[0001] 本申请是申请日为2011年9月15日,申请号为201180053563.1,发明名称为“使用细菌毒素衍生的转运序列递送生物活性剂的系统和方法”的申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请

[0003] 本申请要求2010年9月15日提交的美国临时申请号61/403,394的权益,通过引用以其全文结合在此。

### 技术领域

[0004] 本发明的领域部分涉及用于新颖的药物应用的策略。更确切地说,本发明涉及霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) Cholix基因的一种无毒突变体形式 (ntCholix)、一种在氨基酸 A<sup>386</sup>处截短的Cholix变体 (Cholix386)、以及其他不同的Cholix衍生的多肽序列用来增强生物活性治疗剂的肠递送的用途。重要的是,在此所述的这些系统和方法提供了以下项:在没有注射的情况下递送大分子剂量的能力;将负荷例如 (但不限于) siRNA或反义分子递送至其中需要它们的活性的细胞内区室中的能力;以及基于纳米颗粒和树枝状化合物的载体穿过生物膜的递送,要不然该递送会由于大多数这种膜的屏障特性而将会受到阻碍。

### 背景技术

[0005] 大多数当前批准的小分子药物是穿过小肠粘膜而被吸收的,以便提供到体循环的递送。事实上,小分子药物是基于它们穿过肠粘膜的稳定性和有效吸收而被选择。生物活性多肽 (指的是由氨基酸残基组成的聚合物,典型地定义为一种蛋白质或肽) 的相似的口服递送已经成为制药工业中的一个长期目标。因为胃肠 (GI) 道的目的是为了消化膳食蛋白质类和肽类,存在着很多物理学、生理学、以及生物学屏障,这些屏障限制了以一种类似于用小分子可完成的方式从肠摄取治疗性蛋白质和肽的可行性;马哈图 (Mahato, R.I.) 等人,《治疗性药物载体系统评论》(Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 20 (2-3): p.153-214 (2003))。

[0006] 已经鉴定了能够用来保护治疗性蛋白质和多肽通过胃的许多技术,允许它们到达小肠中的上皮细胞的吸收表面并且将它们与发挥破坏膳食蛋白质类和肽类的作用的胃肠环境分开。遗憾的是,然而由于在内腔表面的多肽的内涵体摄取之后通向破坏性溶酶体区室的细胞内运输,穿过这种简单的、单层细胞的有效转运仍然是一个实质性屏障;伍德利 (Woodley, J.F.), 《治疗性药物载体系统评论》(Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 11 (2-3): p.61-95 (1994))。的确,这种屏障的目的是为了抑制蛋白质类和肽类的摄取,直到这些大分子可以充分地降解以便通过氨基酸以及二肽或三肽转运蛋白而吸收。在此方面,已经检验了克服肠粘膜的物理学、生理学、以及生物学屏障的多种努力。

[0007] 有两种穿过构成肠粘膜细胞屏障的单层上皮的基本途径。确切地说,一旦穿过覆盖的粘液层,分子可以经由在内部运输细胞质内容物的、但不混合的一系列囊泡而在邻近的上皮细胞之间移动 (细胞旁途径) 或穿过细胞移动 (跨细胞途径); T. Jung等人,《欧洲制药学与生物制药学杂志》(Eur J Pharm Biopharm, 50:147-160 (2000))。换言之,在两种途

径中,转运蛋白质或肽治疗剂不进入细胞而是停留在细胞的细胞质之外的环境中。

[0008] 治疗性蛋白质和肽通过细胞旁路途经的随机移动的主要屏障是在这些细胞的顶颈部(apical neck)处的、称为紧密连接(TJ)的蛋白质复合物。虽然TJ结构的瞬时打开和关闭可以促进转运肽穿过肠上皮,这种途径具有以下关键局限性:例如,它对于在约5kDa以上的分子并非有效;它具有使物质从肠内腔非选择性地进入体内的潜力;并且它代表涉及肠上皮表面区域的的仅仅一小部分的途径。

[0009] 蛋白质或肽治疗剂经由跨细胞途径穿过细胞而随机迁移的主要屏障是缺乏囊泡运输,这种运输将这些囊泡的内容物递送至破坏性的(溶酶体的)路径中。当与细胞旁途径相比较时,通过囊泡跨细胞途径的移动可以接纳直径大至100nm的物质,基本上涉及整个上皮细胞表面,并且在通过使用用于囊泡进入的受体-配体互相作用的物质摄取中可以是高度选择性的。因此,对于蛋白质或肽治疗剂的上皮转运而言,如果可以避免破坏性的路径,则跨细胞途径是非常吸引人的。

[0010] 一些病原体已经解决了运输屏障问题,如通过分泌的多肽毒力因子(这些毒力因子起到促进和/或稳定宿主感染的作用)的有效转胞吞作用所证明的。外毒素表示一类由多种微生物释放的蛋白质,它作为有力的毒力因子起作用。外毒素在多细胞生物上发挥作用,具有充当在人类中的有力毒素的能力;罗斯扎克(Roszak,D.B.),以及科尔威尔(Colwell,R.R.),《微生物综述》(Microbiol Rev 51:365-379(1987))。这些蛋白质通常通过涉及选择性破坏蛋白质合成的机制而杀死或灭活宿主细胞。因此,仅需要少数分子来杀死细胞,与细菌外毒素是已知的最毒的毒剂中的一些的观察相一致。包括由来自白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)的白喉毒素(DT)、来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的外毒素A(PE)、以及来自霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的最近鉴定的称为Cholix的蛋白质组成的蛋白质家族的这些蛋白质的亚组经由延伸因子2(EF2)的ADP-核糖基化而起到使宿主细胞中毒的作用;耶茨(Yates,S.P.)等人,《生物化学科学动态》(Trends Biochem Sci,31:123-133(2006))。这些外毒素被合成为折叠成相异的结构域的氨基酸单链,这些结构域已经被鉴定为具有在靶向、进入宿主细胞、以及使宿主细胞中毒方面的特殊功能。

[0011] 最近已经描述了来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的外毒素A(PE)的生物学;Mrsny,R.J.,等人,《当代药物发现》(Drug Discov Today,7(4):p.247-58(2002))。PE是由613个氨基酸单链组成的,具有66828.11Da的理论分子量(MW)、5.28的等电点(PI),并且它功能性地折叠成三个离散结构域,表示为结构域I(Ala<sup>1</sup>-Glu<sup>252</sup>)、结构域II(Gly<sup>253</sup>-Asn<sup>364</sup>)、结构域III(Gly<sup>405</sup>-Lys<sup>613</sup>,它包含ADP核糖基转移酶活性位点),以及连接结构域II和结构域III的一个短的二硫键连接的环(该环称为Ib环)(Ala<sup>365</sup>-Gly<sup>404</sup>)。已经根据分辨率约1.5 Å的晶体衍射确定了这些结构域在pH 8.0时的结构;卫德肯(Wedekind,J.E.),等人,《分子生物学杂志》(J Mol Biol,314:823-837(2001))。结构域I(Ia+Ib)具有一个从13-股β-卷(13-stranded β-roll)形成的核心,结构域II是由六个α-螺旋组成的,并且结构域III具有复合的α/β-折叠结构。研究已经支持PE的模块性质允许不同的结构域功能的观点,这些不同的结构域功能如下:结构域I结合至宿主细胞受体,结构域II涉及膜转位,并且结构域III作为ADP核糖基转移酶起作用。显示PE可能是响应于环境线索和/或细胞信号由铜绿假单胞菌在紧密靠近上皮细胞顶面处分泌的;Deng,Q.和巴比耶利(J.T.Barbieri),《微

生物学年度评论》(Annu Rev Microbiol, 62:p.271-88 (2008))。一旦分泌,在PE的结构域I结合至膜蛋白 $\alpha 2$ -巨球蛋白(一种也称为低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)或CD91的蛋白质)之后发生进入细胞的内化;参见,例如菲茨杰拉德(FitzGerald, D.J.),等人,《细胞生物学杂志》(J Cell Biol, 129(6):p.1533-41 (1995));考那斯(Kounnas, M.Z.),等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem, 267(18):p.12420-3 (1992))。在内化之后,PE避免运输至溶酶体而是被有效地递送至细胞的基底面,在该基底面处PE以生物活性形式释放;Mrsny, R.J.,等人,《当代药物发现》(Drug Discov Today, 7(4):p.247-58 (2002))。一旦穿过上皮,PE通过进入粘膜下层空间之内的CD91阳性细胞(巨噬细胞和树突细胞)中而起到毒力因子的作用,在该粘膜下层空间内,PE进而与引起结构域III的细胞质递送的展开路径相交;参见,例如马图(Mattoo, S.)、李(Y.M.Lee)以及狄克逊(J.E.Dixon),《当代免疫学观点》(Curr Opin Immunol, 19(4):p.392-401 (2007));斯普纳(Spooner, R.A.),等人,《病毒学杂志》(Virol J, 3:p.26 (2006))。

[0012] 霍乱弧菌细菌因与它齐名的毒性剂霍乱毒素(CT)而最为熟知,霍乱毒素可以导致急性的危及生命的大量水样腹泻。CT是一种蛋白质复合物,该复合物是由用B亚基五聚体组织的单个A亚基组成,该B亚基五聚体结合至上皮顶面处的细胞表面G<sub>M1</sub>神经节苷脂结构上。CT是在用携带溶源性噬菌体变体(称为CTXf或CTX $\phi$ )的霍乱弧菌毒株进行水平基因转移之后由霍乱弧菌分泌的。然而最近的霍乱爆发已经表明某些血清型(non-O1, non-O139)的菌株不表达CT而是使用其他的毒力因子。non-O1、non-O139的环境与临床数据的详细分析表明一种与PE具有某种相似性的、新颖的假定的分泌外毒素的存在。

[0013] 约根森(Jorgensen, R.)等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem, 283(16):10671-10678 (2008))报道了霍乱弧菌的一些菌株事实上的确含有一种与PE具有相似性的、并且他们将其称作Cholix毒素(Cholix)的蛋白质毒素。与PE相比,Cholix具有稍微较大的理论分子量(70703.89Da)以及稍微更酸性的理论等电点(PI)(5.12)。634个氨基酸Cholix蛋白质的晶体结构已经被解析至约2 Å。发现该结构域结构以及组织有点类似于PE:结构域I(Val<sup>1</sup>-Lys<sup>265</sup>)、结构域II(Glu<sup>266</sup>-Ala<sup>386</sup>)、结构域III(Arg<sup>426</sup>-Lys<sup>634</sup>)、以及Ib环(Ala<sup>387</sup>-Asn<sup>425</sup>)。与PE相比的另外的结构相似性包括:用于细胞活化的弗林蛋白酶位点;可以将毒素传递到宿主细胞内质网的C末端KDEL序列;以及在结构域III之内的ADP核糖基转移酶活性位点。

[0014] 引人注目的是,通过氨基酸比对,PE和Cholix没有共享显著的遗传的和有限的相似性。对于PE样核苷酸序列,搜索霍乱弧菌的基因组,没有导致任何种类的匹配。仅在蛋白质序列水平存在PE样蛋白质可以由这种细菌产生的提示。即使这样,在PE与Cholix的氨基酸序列之间仅有32%同源性,其中相似性(42%同源性)集中在结构域III的ADP核糖基化元件中,并且对于两种蛋白质而言结构域I和II的大多数区段具有低水平的氨基酸同源性(约15%-25%)。而且,相对于PE,Cholix的这种总体安排甚至更引人注目,因为具有相似元件的这两种蛋白质是从两个不同的方向衍生的:铜绿假单胞菌是富含GC的细菌,而霍乱弧菌富含AT。从两个不同遗传方向进化取得几乎相同的结构但仅有32%氨基酸同源性的这两种毒素表明Cholix和PE的结构和功能的相似性可能是基于相似的生存压力而不是由于相似的遗传背景。对于这两种蛋白质而言,结构域I和II的非常低的氨基酸同源性着重于这两种

蛋白质的折叠结构的功能重要性而不是它们的氨基酸序列。

[0015] Cholix和PE的C末端部分显得以可比较的方式通过EF2的ADP核糖基化而在细胞中毒中起作用。其中通过接合至针对转铁蛋白受体的抗体而靶向于癌细胞的Cholix的后面一半(结构域I缺失)的最近研究表明:涉及EF2的ADP核糖基化的PE和Cholix的C末端部分确实在功能上是相似的;萨尔诺夫斯基(Sarnovsky, R.)等人,《癌症免疫学与免疫疗法》(Cancer Immunol Immunother 59:737-746 (2010))。虽然Cholix的这个远端部分与PE相比36%一致并且50%相似,但针对PE的这种相同远端部分具有中和免疫应答的、在动物中产生的多克隆抗血清连同来自患者的血清不能与Cholix的这种后面的部分发生交叉反应。同样,针对这种Cholix产生的抗血清不能与PE发生交叉反应。这些数据表明,尽管PE和Cholix两者都通过相似的机制而共有使细胞中毒的能力,并且这两种蛋白质共有共用的核心结构,但在它们的在这些蛋白质表面表达的元件方面有引人注目的差异。

[0016] 由于使用PE的先前研究已经在体外和体内证明了这种毒素易于转运穿过上皮细胞的极化单层而没有毒性作用;Mrsny, R.J., 等人,《当代药物发现》(Drug Discov Today, 7 (4): p. 247-58 (2002)), 诸位发明人已经开始研究,以进一步评估Cholix的特性和生物学,同时特别集中在Cholix的近端部分的功能方面;确切地说,结构域I和II促进转运穿过肠上皮单层的用途。由于结构域I和IIa显得是用于上皮转胞吞作用所需要的PE的唯一必需元件,特别重要的是检验Cholix中的这些相同的结构域。如前所述,在将被认为是结构域I和IIa的一部分的大多数区域上仅有约15%-25%氨基酸同源性。诸位发明人通过以下一系列的研究来检验这些结构域:在将Cholix施用至上皮表面后体内监测其生物学分布;体外评定Cholix穿过极化上皮细胞单层的跨细胞转运特征;并且将生物活性负荷进行递送,在Cholix蛋白C末端处该负荷基因整合到该Cholix蛋白中。通过将Cholix的前两个结构域(氨基酸1-386)与绿色荧光蛋白(GFP)进行基因融合、或者通过将这些表达的结构域化学连接至100nm直径的乳胶珠而产生的初步数据证明:附接至100nm的乳胶珠上的Cholix在体外和体内被观察到穿过肠上皮单层而转运。在转胞吞过程期间和之后保留其荧光性质的GFP负荷还支持这样的论点:Cholix采用非破坏性的(或特许的)运输路径通过极化的上皮细胞。这个结果良好地预示它的(重复的)作为递送生物活性负荷穿过身体上皮屏障(例如在呼吸道和胃肠道中的那些)的工具的应用。

[0017] 根据初步研究同样重要地注意的是这样的观察,该观察表明在PE与Cholix之间的细胞受体相互作用的明显差异。如前所述,在PE的结构域I结合至膜蛋白 $\alpha 2$ -巨球蛋白(一种也称为低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)或CD91的蛋白质)之后PE进入上皮细胞。虽然对于Cholix的表面受体的确切身份还未确立,初步研究表明Cholix不会使一些表达CD91的细胞系中毒,但是使确实表达CD91的一些细胞系中毒。当前不清楚的是,除了CD91,哪些其他受体可能涉及PE的上皮转胞吞作用。虽然如此,Cholix和PE显得具有不同的细胞受体相互作用,证明了这样的明显差异,这些差异足以表明对于口服生物制剂和生物活性剂的细胞内递送两者而言非常不同的和不曾预料的应用。

#### [0018] 发明概述

[0019] 本发明是基于Cholix的膜运输特性以及Cholix有效地转运穿过气道和肠的极化上皮细胞的证明,表明了Cholix衍生的多肽序列(包括蛋白质的近端元件)可以用于蛋白质和纳米颗粒的有效转胞吞作用,代表了用于新颖药物施用的一种策略。

[0020] 这样,本发明的一方面是提供分离的递送构建体(例如基因融合体或化学构建体),这种递送构建体包含转运蛋白结构域(例如,Cholix衍生的多肽序列)以及负荷。转运结构域以及负荷两者可以按变化的化学计量比和空间组织而表达/连接。不同的负荷还可以在相同的构建体上表达/连接。在优选实施例中,这样的负荷可以包括以下各项中的一项或任何项:蛋白质、肽、小分子、siRNA、PNA、miRNA、DNA、质粒、以及反义分子。

[0021] 本发明的另一个方面是在没有注射的情况下提供递送负荷(例如大分子)的能力。

[0022] 本发明的另一个方面是提供将负荷(例如但不限于大分子、小分子、siRNA、PNA、miRNA、DNA、质粒以及反义分子)递送至需要它们的活性的细胞内区室中的能力。

[0023] 本发明的另一方面是提供:经由基于纳米颗粒和/或树枝状化合物的载体的递送将负荷转运穿过生物膜。

[0024] 考虑用于本发明的给药/递送的方法包括,例如口服给药、肺部给药、鼻内给药、颊部给药、舌下给药、眼部给药(包括但不限于递送至玻璃体、角膜、结膜、巩膜、以及眼前房和后房)、局部施用、注射(有针或无针)、静脉输注、微针施用、经由药物储库(drug depot)制剂的给药、经由鞘内施用的给药、经由腹膜内施用的给药、经由关节内施用的给药、细胞内递送、跨血脑屏障的递送、跨视网膜屏障的递送、用于局部递送和作用的给药、和/或用于全身递送的递送。

[0025] 在又另一方面,本发明提供了药物组合物,该组合物包含递送构建体以及药学上可接受的载体。

[0026] 本发明还提供了以下公开内容:

[0027] 项目1.一种分离的递送构建体,该构建体包括转运蛋白结构域和负荷,所述构建体能够将所述负荷递送至靶向的细胞内区室中。

[0028] 项目2.一种分离的递送构建体,该构建体包括转运蛋白结构域和大分子,所述构建体能够在没有注射的情况下将所述大分子递送至受试者的生物区室中。

[0029] 项目3.根据项目1或2中任一项所述的构建体,进一步包括可裂解接头。

[0030] 项目4.根据项目1或2中任一项所述的构建体,其中所述转运蛋白结构域包括Cholix衍生的多肽序列。

[0031] 项目5.根据项目1所述的构建体,其中所述负荷选自下组,该组由以下各项组成:大分子、小分子、siRNA、PNA、miRNA、DNA、质粒以及反义分子。

[0032] 项目6.如项目1所述的构建体用于将负荷递送至靶向的细胞内区室中的用途。

[0033] 项目7.如项目1所述的融合体或构建体用于将负荷经由基于纳米颗粒和树枝状化合物的载体而穿过生物膜的递送的用途。

[0034] 项目8.如项目6所述的基于纳米颗粒和树枝状化合物的载体用于穿过生物膜递送负荷的用途,这些载体是用转运蛋白结构域修饰的,具有或不具有接头。

[0035] 项目9.一种药物组合物,包括根据项目1-5中任一项所述的递送构建体和药学上可接受的载体。

[0036] 项目10.一种编码递送构建体的多核苷酸,所述递送构建体包括转运蛋白结构域和负荷,所述构建体能够将所述负荷递送至靶向的细胞内区室中。

[0037] 项目11.一种表达载体,包含如项目10所述的多核苷酸。

[0038] 项目12.一种分离的宿主细胞,包含如项目11所述的表达载体。

## 附图说明

[0039] 图1描绘了用于ntCholix的C末端修饰以促进与负荷融合的策略的概述,在这种情况下,该负荷是Alexa488荧光染料。

[0040] 图2描绘了 **ntCholix-Alexa488®** 体外穿过极化的肠上皮细胞的转运。Caco-2细胞单层暴露于测试物质中持续4小时。通过对存在于样品中的荧光的标准曲线分析来确定被转运的物质的百分比,并且将其表示为平均数(N=4)。BSA-Alexa488用作对照。

## 具体实施方式

[0041] 如本领域技术人员将理解的,以上说明详细描述了本发明的某些优选实施例,并且因此仅仅是代表性的而并不描绘本发明的实际范围。还应当理解的是,在此所使用的术语用于以下目的:仅仅描述具体实施例并且不是旨在限制由所附权利要求书所限定的本发明的范围。

[0042] 除非另有定义,在此使用的所有技术和科学术语具有由本发明所属的本领域技术人员所通常理解的含义。如在此使用的,以下术语具有归于它们的含义,除非另外说明。

[0043] 作为本发明的基础的研究涉及Cholix衍生的多肽序列作为转运蛋白结构域的用途,该转运蛋白结构域被用来制备分离的递送构建体以增强生物活性治疗剂的肠递送。重要的是,在此所述的这些系统和方法提供了以下各项:在没有注射的情况下递送大分子剂量的能力;将“负荷”递送至其中需要它们的活性的细胞内区室中的能力;以及基于纳米颗粒和树枝状化合物的载体穿过生物膜的递送,要不然该递送会由于大多数这种膜的屏障特性而将会受到阻碍。

[0044] 成熟Cholix毒素(“Cholix”)是一种由霍乱弧菌分泌的极其活化的单体蛋白质(分子量70kD),并且该蛋白质是由三个显著的球形结构域(Ia、II、以及III)、以及一个连接结构域II和III的小的亚结构域(Ib)组成。成熟Cholix的氨基酸序列由约根森(Jorgensen, R.)等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem, 283(16):10671-10678(2008))以及在此引证的参考文献提供。在本发明的分离的递送构建体的制备中使用的Cholix衍生的多肽序列将衍生自报道的成熟Cholix的具有634个氨基酸的蛋白质序列。

[0045] 因此,本发明的递送构建体包括一个转运蛋白结构域。如在此使用的“转运蛋白结构域”是指能够执行某些功能(例如,细胞识别(即,包含一个受体结合结构域)以及转胞吞作用(即,包含一个转胞吞结构域))的结构域。通常,在本发明的递送构建体的制备中使用的转运蛋白结构域是Cholix衍生的多肽序列,这些多肽序列具有相应于Cholix的功能结构域(例如Ia和II)的结构域。

[0046] 除了相应于Cholix功能结构域的分子部分外,本发明的递送构建体可以进一步包括一种用于递送至受试者的生物区室的大分子。在某些实施例中,该大分子是选自下组,该组由以下各项组成:核酸、肽、多肽、蛋白质、多糖、以及脂质。在另外的实施例中,多肽是选自下组,该组由以下各项组成:多肽激素、细胞因子、趋化因子、生长因子、以及凝血因子,它们通常通过注射而被给予至受试者。所有这些大分子的序列对于本领域的技术人员是熟知的,并且这些大分子到递送构建体的附着完全处于使用标准技术的本领域的技术人员的技能之内。

[0047] 大分子可以被引入到不破坏细胞结合或转胞吞活性的递送构建体的任何部分中。



大分子经由可裂解接头而连接至递送载体的剩余部分。“接头”是指共价地亦或通过离子、范德华力或氢键将两个另外的分子连接的分子,例如在5'端与一个互补序列杂交并且在3'端与另一个互补序列杂交的一种核酸分子,由此将两个非互补序列连接。“可裂解接头”是指这样一种接头,该接头可以被降解或以其他方式切断以将两个由可裂解接头连接的组分分开。可裂解接头通常是通过酶裂解的,这些酶典型地为肽酶、蛋白酶、核酸酶、脂肪酶,等等。在穿过极化上皮膜的递送构建体的转胞吞作用之后,可裂解接头也可以通过环境线索(例如像,在温度、pH、盐浓度、等等方面的改变)而被裂解(当在环境方面有这样一种改变时)。

[0048] 在某些实施例中,递送构建体进一步包括第二大分子以及第二可裂解接头,该第二大分子选自下组,该组由以下各项组成:核酸、肽、多肽、蛋白质、脂质、以及小有机分子,其中在所述第二可裂解接头处的裂解将所述第二大分子从所述构建体的剩余部分分开。在某些实施例中,该第一大分子是第一多肽并且所述第二大分子是第二多肽。在某些实施例中,该第一多肽与第二多肽结合以形成一种多聚体。在某些实施例中,该多聚体是一种二聚体、四聚体、或八聚体。在另外的实施例中,该二聚体是一种抗体。

[0049] 在某些实施例中,可以将该大分子选择为不可被存在于上皮细胞的基侧膜处的酶裂解。例如,在这些实例中所述的测定可以用于常规地测试这样一种裂解酶是否能够将有待递送的大分子裂解。如果是这样的话,常规地可以改变该大分子以消除由该裂解酶识别的不想要的氨基酸序列。然后可以使用本领域中的常规方法来测试该改变的大分子以确保它保留了活性。

[0050] 在某些实施例中,该第一和/或第二可裂解接头是可由一种这样的酶裂解的,该酶在极化上皮细胞的基侧面上与它在极化上皮细胞的顶面上相比展现出更高的活性。在某些实施例中,该第一和/或第二可裂解接头是可由一种这样的酶裂解的,该酶在血浆中与它在极化上皮细胞的顶面上相比展现出更高的活性。

[0051] 在某些实施例中,在用于递送的肽、多肽、或蛋白质大分子的情况下,可以基于序列来选择该可裂解接头,以避免使用包括存在于有待递送的大分子中的序列的可裂解接头。例如,如果该大分子包括AAL,可以选择该可裂解接头以便被一种不识别这个序列的酶裂解。

[0052] 除了相应于Cholix功能结构域的分子的部分之外,本发明的递送构建体可以进一步包含用于递送至其中需要它们的活性的细胞内区室中的“负荷”。如在此使用的“负荷”包括但不限于:大分子、小分子、siRNA、PNA、miRNA、DNA、质粒以及反义分子。可以根据本发明递送的负荷的其他实例包括但不限于:抗肿瘤化合物,例如亚硝基脲类,如卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链佐星(streptozotocin);甲基胍类,例如丙卡巴肼、达卡巴嗪;固醇类激素类,例如糖皮质激素类、雌激素类、黄体激素类、雄激素类、四氢脱氧皮质酮(tetrahydrodesoxycorticosterone);免疫活性化合物,例如免疫抑制剂,例如乙胺嘧啶、甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim)、青霉胺、环孢霉素、硫唑嘌呤;以及免疫刺激剂,例如左旋咪唑、二乙基二硫代氨基甲酸酯、脑啡肽类、内啡肽类;抗微生物化合物,例如抗生素类,如 $\beta$ -内酰胺、青霉素、头孢菌素类、碳青霉烯类(carbapenems)以及单酰胺环类、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、大观霉素;抗疟药、杀阿米巴药;抗原生动物药(antiprotazoals);抗真菌剂,例如两性霉素B;抗病毒药,例如阿昔洛韦、碘苷、利巴韦林、

曲氟尿苷、阿糖腺苷(vidarabine)、更昔洛韦;杀寄生虫药;抗蠕虫药(antihelmintics);放射治疗剂;胃肠药;血液化合物;免疫球蛋白类;凝血蛋白,例如抗血友病因子、因子IX复合物;抗凝血剂,例如双香豆素、肝素Na;血浆纤维溶素抑制剂(fibrinolytic inhibitor),例如氨甲环酸;心血管药物;外周抗肾上腺能药物;中枢作用性抗高血压药,例如甲基多巴、盐酸甲基多巴;抗高血压性直接血管舒张药(antihypertensive direct vasodilator),例如二氮嗪、盐酸肼苯哒嗪(hydralazine HCl);影响肾素-血管紧张素系统的药物;周围血管扩张药,例如酚妥拉明;抗心绞痛药;强心苷类;变力扩血管药(inodilator),例如氨力农、米力农、依诺昔酮、非诺唑酮、伊马唑旦、疏马唑;抗心律失常药;钙进入阻滞剂;影响血脂的药物,例如雷尼替丁、波生坦、曲格列酮;呼吸系统药物;拟交感神经药(sympathomimetic drugs),例如沙丁胺醇、甲磺酸比托特罗、盐酸多巴酚丁胺(dobutamine HCl)、盐酸多巴胺(dopamine HCl)、麻黄碱(ephedrine So)、肾上腺素、盐酸芬氟拉明(fenfluramine HCl)、盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol HCl)、盐酸甲氧明(methoxamine HCl)、重酒石酸去甲肾上腺素、盐酸去氧肾上腺素(phenylephrine HCl)、盐酸利托君(ritodrine HCl);拟胆碱药,例如氯化乙酰胆碱(acetylcholine Cl);抗胆碱酯酶,例如氯化腾喜龙(edrophonium Cl);胆碱酯酶再激活剂;肾上腺素能阻断剂,例如盐酸醋丁洛尔(acebutolol HCl)、阿替洛尔、盐酸艾司洛尔(esmolol HCl)、盐酸拉贝洛尔(labetalol HCl)、美托洛尔、纳多洛尔、甲磺酸酚妥拉明、盐酸心得安(propranolol HCl);抗毒蕈碱药物,例如甲溴辛托品、硫酸阿托品(atropine SO.sub.4)、溴奎环二苯酯(clinidium Br)、格隆溴铵、异丙托溴铵(ipratropium Br)、氢溴酸东莨菪碱(scopolamine HBr);神经肌肉阻断药;去极化药物,例如苯磺酸阿曲库铵、己苄溴铵(hexafluorenum Br)、碘二甲箭毒、氯化琥珀胆碱(succinylcholine Cl)、氯化筒箭毒碱(tubocurarine Cl)、维库溴铵(vecuronium Br);中枢作用肌松弛剂,例如巴氯芬;神经递质和神经递质药,例如乙酰胆碱、腺苷、三磷酸腺苷;氨基酸神经递质类,例如兴奋性氨基酸类、GABA、甘氨酸;生物胺神经递质类,例如多巴胺、肾上腺素、组胺、去甲肾上腺素、奥克巴胺、5-羟色胺、酪胺;神经肽类、一氧化氮、K<sup>+</sup>通道毒素;抗帕金森病药物,例如盐酸金刚烷胺(amantadine HCl)、甲磺酸苯扎托品、卡比多巴;利尿药,例如双氯非那胺、醋甲唑胺、苄氟噻嗪、泊利噻嗪;抗偏头痛药,例如甲磺酸卡前列素氨丁三醇(carboprost tromethamine mesylate)、马来酸美西麦角。本发明的递送构建体的转运蛋白结构域通常包括一个受体结合结构域。该受体结合结构域可以是对于本领域的技术人员已知的而不受限制的、结合至存在于上皮细胞顶膜上的细胞表面受体的任何受体结合结构域。优选地,该受体结合结构域特异性地结合至细胞表面受体。该受体结合结构域应当以充分的亲和力结合至细胞表面受体,以允许递送构建体的内吞。

[0053] 在某些实施例中,该受体结合结构域可以包括肽、多肽、蛋白质、脂质、碳水化合物、或小有机分子、或其组合。这些结合至存在于上皮细胞顶膜上的细胞表面受体的分子中的每一种的实例对于本领域的技术人员是熟知的。适合的肽或多肽包括但不限于:细菌毒素受体结合结构域,例如来自PE、霍乱毒素、Cholix毒素、肉毒毒素、白喉毒素、志贺毒素、志贺样毒素、等等的受体结合结构域;抗体(包括单克隆、多克隆、以及单链抗体)或其衍生物,生长因子(例如EGF、IGF-I、IGF-II、IGF-III,等等);细胞因子,例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-6,等等;趋化因子,例如MIP-1a、MIP-1b、MCAF、IL-8,等等;以及其他配体,例如CD4、来自免疫球蛋白超家族的细胞粘附分子、整合素、对于IgA受体特异的配体,等等。技术人员可以基于

受体结合结构域结合至其上的受体的表达模式来选择适当的受体结合结构域。

[0054] 可以通过本领域的技术人员已知的对于附接这样的分子有用的任何方法或手段(不受限制)将该受体结合结构域附接至递送构建体的剩余部分。在某些实施例中,该受体结合结构域与递送构建体的剩余部分一起表达为一种融合蛋白。当受体结合结构域和构建体的剩余部分从肽或多肽形成时,这样的实施例是特别有用的。

[0055] 本发明的递送构建体的转运蛋白结构域进一步包括一个转胞吞结构域。该转胞吞结构域可以是对于本领域的技术人员已知的、引起嵌合蛋白转胞吞作用的任何转胞吞结构域,其中这些嵌合蛋白已经结合至存在于上皮细胞顶膜上的细胞表面受体。在优选实施例中,该转胞吞结构域是Cholix的结构域II。

[0056] 不旨在限制于任何特定的理论或作用机制,该转胞吞结构域被认为允许在构建体结合至存在于极化上皮细胞顶面上的受体之后,递送构建体通过极化上皮细胞而运输。这样的通过极化上皮细胞的运输在此被称为“转胞吞”(“transcytosis”)。这种运输允许递送构建体从极化上皮细胞的基侧膜释放。

[0057] 为了目的在于细胞内活性的负荷的递送,递送构建体包括将负荷运输到细胞中的胞吞结构域,并且还可以包括可裂解接头。这包括使用基于纳米颗粒和/或树枝状化合物的载体的负荷的细胞内递送,这些载体通过用内吞结构域的一个或多个拷贝(使用或不使用接头)修饰载体表面而靶向到细胞表面受体。

[0058] 不旨在限制于任何特定的理论或作用机制,该内吞结构域被认为允许在构建体结合至存在于细胞表面上的受体之后,该递送构建体运输进入细胞中。这样的进入细胞中的运输在此被称为“内吞”(“endocytosis”)。这种运输允许递送构建体释放到相关细胞内区室中,包括(但不限于)细胞核以及核膜、核糖体囊泡、内质网、线粒体、高尔基体、以及胞质溶胶。

[0059] 在本发明的某些实施例中,将在这些细胞的基侧面处出现的在生物学过程中起作用的蛋白酶和肽酶的鉴定进行评估。这些蛋白酶和肽酶将被分为可以根据它们的底物而定义的几种类别:1)从上皮基底侧表面分泌的、并且对于它们的激活需要修整的前激素原(pre-pro-hormone)和酶类,2)它们的活性通过裂解事件被中和以便调节它们的活性的活性激素或酶,以及3)它们在基底侧表面处的作用通过酶法修饰而发生改变的系统性酶或生长因子。分为这些不同类别的一些潜在活性的、并且对于载体-接头-负荷构建体的基底侧裂解可能有用的实例包括已经在本领域中描述的S9B脯氨酰寡肽酶亚家族的成员,例如,FAP和DDP IV。

[0060] 本发明的核酸序列和多核苷酸可以通过任何适合的方法(包括,例如适当序列的克隆)、或者通过直接化学合成来制备,直接化学合成通过例如以下方法来完成:纳朗(Narang),等人,《酶学方法》(Meth.Enzymol.,68:90-99(1979))的磷酸三酯法;布朗(Brown),等人,《酶学方法》(Meth.Enzymol.,68:109-151(1979))的磷酸二酯法;比尤凯格(Beaucage)等人,《四面体通讯》(Tetra.Lett.,22:1859-1862(1981))的二乙基亚磷酰胺法;由鲍克格(Beaucage)和卡拉瑟斯(Caruthers),《四面体通讯》(Tetra.Letts.,22(20):1859-1862(1981))描述的固相亚磷酰胺三酯法,例如使用如在尼达姆-范德华特(Needham-VanDevanter)等人,《核酸研究》(Nucl.Acids Res.12:6159-6168(1984))中描述的自动合成仪;以及美国专利号4,458,066的固相支持法。化学合成产生了单链寡核苷酸。这可以使

用该单链作为模板、通过与互补序列杂交或通过用DNA聚合酶聚合而被转化为双链DNA。技术人员将认识到的是,虽然DNA的化学合成限制于大约100个碱基的序列,但可以通过连接较短的序列而获得较长的序列。

[0061] 在一个优选实施例中,本发明的核酸序列是通过克隆技术制备的。适当的克隆和测序技术的实例、以及通过许多克隆练习足以指导技术人员的说明发现于萨姆布鲁克(Sambrook)等人,《分子克隆:实验室手册》(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL(第二版),1-3卷,冷泉港实验室(1989))、伯格(Berger)和基梅尔(Kimmel)编,《分子克隆技术指南》(GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES,学术出版社公司,圣地亚哥,加利福尼亚州(1987))、或奥苏贝尔(Ausubel)等人编,《最新分子生物学实验方法汇编》(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,格林出版和韦利国际科学(Greene Publishing and Wiley-Interscience),纽约(NY)(1987))中。来自生物试剂和实验设备的制造商的产品信息也提供了有用的信息。这样的制造商包括西格玛(SIGMA)化学公司(圣路易斯,密苏里州)、R&D系统(明尼阿波利斯,明尼苏达州)、法玛西亚(Pharmacia)LKB生物技术(皮斯卡塔韦,新泽西州)、克隆技术实验室公司(CLONTECH Laboratories,Inc.)(帕洛阿尔托,加利福尼亚州)、化学基因公司(Chem Genes Corp.)、奥德里奇化学公司(Aldrich Chemical Company)(密尔沃基,威斯康星州)、Glen研究公司(Glen Research,Inc.),GIBCO BRL生命技术公司(GIBCO BRL Life Technologies,Inc.)(盖瑟斯堡,马里兰州),Fluka Chemica-Biochemika Analytika(Fluka Chemie AG,布克斯(Buchs),瑞士)、Invitrogen(圣地亚哥,加利福尼亚州)、以及应用生物系统(Applied Biosystems)(福斯特市,加利福尼亚州)、以及本领域技术人员已知的许多其他商业来源。

[0062] 适合用于复制并且用于支持蛋白质的重组表达的细胞在本领域是熟知的。在适当情况下,可以将这样的细胞用特定的表达载体转染或转导,并且可以使大量的含有载体的细胞生长,以便用于接种大规模发酵罐,从而获得足够量的用于临床应用的蛋白质。这样的细胞可以包括原核微生物,例如大肠杆菌(E.coli);不同的真核细胞,例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),NS0,292;酵母;昆虫细胞;以及转基因动物和转基因植物,等等。在这些系统中表达外源基因的标准技术在本领域是已知的。

[0063] 本发明的药物组合物包括本发明的基因融合体或化学构建体以及药学上可接受的载体。如在此使用的,“药学上可接受的载体”表示生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂,等等。药学上可接受的载体的一些实例是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇,等等,连同它们的组合。在许多情况下,可取的是在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。药学上可接受的物质的另外的实例是增加抗体的保质期或有效性的湿润剂或较小量的辅助物质(例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂)。除了与本发明的递送构建体不相容的如任何常规赋形剂、载体(carrier)或载体(vehicle)的范围之外,将考虑它在本发明的药物制剂中的使用。

[0064] 在某些实施例中,活性化合物的药物组合物可以使用一种保护该组合物(例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂、以及微囊化递送系统)免于快速释放的载体来制备。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯以及聚乳酸。用于制备这样的制剂的许多方法被授予专利或通常是本领域的技术人员已知的。参见例如持续和控制释放药物递送系统(Sustained and Controlled Release Drug

Delivery Systems), (罗宾逊(J.R.Robinson) 编著, 马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.), 纽约(New York), 1978)。

[0065] 在某些实施例中, 本发明的递送构建体可以经口给予, 例如用惰性稀释剂或可同化的可食用载体。还可以将该化合物(以及其他成分, 如果希望的话) 封闭在一种硬或软壳胶囊中、压制成片剂、或直接掺入到受试者的膳食中。对于经口的治疗性给药, 可以将递送构建体与赋形剂结合, 并且以可摄取的片剂、口含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆、薄片(wafer), 等等形式使用。为了通过非肠胃外给药来给予本发明的化合物, 可能必要的是将该化合物用一种材料包被, 或者将该化合物与该材料共同给予, 以预防其失活。

[0066] 通常, 将药学有效量的本发明的递送构建体给予受试者。本领域的技术人员可以容易地确定递送构建体的剂量是否足以递送有效量的大分子, 如下文所述。在某些实施例中, 给予在大约1.  $\mu$ g与大约1g之间的递送构建体。在其他实施例中, 给予在大约10.  $\mu$ g与大约500mg之间的递送构建体。仍然在其他实施例中, 给予在大约10.  $\mu$ g与大约100mg之间的递送构建体。仍然在其他实施例中, 给予在大约10.  $\mu$ g与大约1000.  $\mu$ g之间的递送构建体。仍然在其他实施例中, 给予在大约10.  $\mu$ g与大约250.  $\mu$ g之间的递送构建体。仍然在其他实施例中, 给予在大约10.  $\mu$ g与大约100.  $\mu$ g之间的递送构建体。优选地, 给予在大约10.  $\mu$ g与大约50.  $\mu$ g之间的递送构建体。

[0067] 本发明的递送构建体为大分子到受试者的局部或系统递送提供了一些胜过常规技术的优势。在这些优势中, 首要的是在不使用针来刺破受试者皮肤的情况下递送大分子的能力。许多受试者需要重复的、常规剂量的大分子。例如, 糖尿病患者必须每天注射胰岛素几次来控制血糖浓度。如果大分子的递送可以不用注射而完成, 这样的受试者的生活质量会通过避免与此相关联的疼痛或潜在的并发症而大大改善。

[0068] 此外, 递送构建体的许多实施例可以在重组系统中构建和表达。重组技术允许人们制作具有用于引入任何适合大分子的插入位点的递送构建体。这样的插入位点允许技术人员快速并容易地生产用于递送新的大分子的递送构建体, 这样做的需求会增加。

[0069] 另外, 用接头(该接头被存在于上皮细胞基侧膜处的酶裂解) 使大分子连接至递送构建体的剩余部分允许在转胞吞穿过上皮膜后不久, 大分子从递送构建体释出(liberate) 并且从递送构建体的剩余部分释放。这种释出降低了诱导针对该大分子的免疫应答的可能性。它还允许该大分子与它的游离于递送构建体的剩余部分之外的目标相互作用。

[0070] 本发明的递送构建体的其他优势对于本领域的技术人员而言将是明显的。

#### [0071] 实例1

[0072] 制备了编码成熟霍乱弧菌Cholix的质粒构建体, 并且使用该质粒构建体在如前所述的大肠杆菌(E. coli) 表达系统中表达成熟Cholix蛋白; 参见, 例如约根森(Jorgensen, R.) 等人, 《生物化学杂志》(J Biol Chem, 283(16):10671-10678(2008))。通过在氨基酸位置581处的谷氨酸的基因缺失( $\Delta$ E581), 还制备了Cholix基因的无毒突变体形式(在下文中称为“ntCholix”), 该基因缺失类似于在PE蛋白质中的缺失( $\Delta$ E553) (在不显著改变其构型的情况下使得它是无毒的); 基利恩(Killeen, K.P. 和科利尔(Collier, R.J.), 《生物化学与生物物理学报》(Biochim Biophys Acta, 1138:162-166(1992))。在用适当的质粒通过热击来转化(在42°C, 1分钟)之后, 使用大肠杆菌DH5 $\alpha$ 细胞(Invitrogen, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 实现蛋白质表达。将在含抗生素的培养基上选择的转化细胞分离, 并且使其在LB

(Luria-Bertani) 肉汤 (Difco) 中生长。通过添加1mM的异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 来诱导蛋白质表达。在IPTG诱导后两小时,通过在4℃在5,000xg离心持续10分钟来收获细胞。在细胞溶解后将包涵体进行分离,并且将蛋白质溶解于加有65mM二硫苏糖醇的6M盐酸胍和2mM EDTA (pH 8.0) 中。在重折叠和纯化之后,将蛋白质在-80℃以约5ml/ml储存在缺乏Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS (pH 7.4) 中。基于尺寸排阻色谱法,证实这些研究中使用的蛋白质具有>90%的纯度。

[0073] 然后将ntCholix形式在其C末端进行修饰以允许经由位于该蛋白质的C末端附近的游离巯基残基的直接化学偶联。用于C末端修饰的策略描绘于图1中。C末端修饰包括半胱氨酸约束的环 (该环包含对于来自烟草蚀纹病毒 (TEV) 的高选择性蛋白酶的共有裂解序列 (ENLFQS))、一个第二半胱氨酸、以及一个六组氨酸 (His<sub>6</sub>) 标签。包括第二Cys,以便形成最后用于偶联的具有该Cys的二硫桥。将His<sub>6</sub>序列添加到蛋白质中简化了纯化,并且TEV裂解序列提供了在温和的还原反应之后选择性地除去末端Cys残基的机制。在ntCholix构建体表达和分离之后,TEV裂解以及及与0.1mM二硫苏糖醇的温和还原反应允许经由基于马来酰亚胺的反应 (作为负荷附接的通用机制) 的负荷 (Alexa Fluor® 488荧光染料) 的直接化学偶联。生成的构建体在此称为ntCholix-Alexa488。在TEV蛋白酶裂解、还原、以及负荷通过马来酰亚胺反应与游离巯基偶联之后,通过一个第二Ni<sup>2+</sup>柱色谱步骤来完成游离的C末端序列的去除。

#### [0074] 实例2

[0075] 使用Caco-2单层体外评定ntCholix-Alexa488的跨上皮转运。首先,如先前所述使Caco-2细胞 (传代数25-35) 生长直到出现铺满的单层;鲁巴斯 (Rubas, W.) 等人,《药物研究》(Pharm Res, 10:113-118 (1993))。简言之,将细胞维持在37℃、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度的气氛中的DMEM/高生长培养基中,该培养基富含2mM L-谷氨酰胺、10%胎牛血清、以及100个单位的青霉素/链霉素。将细胞在75cm<sup>2</sup>烧瓶中每周以1:3的分流比进行传代,并且以63,000个细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种在预先润湿的和胶原包被的可渗透 (0.4μm孔径) 聚碳酸酯 (Transwell™) 过滤器支持物 (来自Corning Costar, 坎布里奇, 马萨诸塞州) 上。每隔一天替换生长培养基。通过使用伏特欧姆计 (volt-ohm-meter, 世界精密仪器公司 (World Precision Instruments), 萨拉索塔, 佛罗里达州) 确定的显著的跨上皮电阻 (TEER) 来确定铺满的单层,这些铺满的单层在接种后20-26天使用。

[0076] 还制备了两种另外的材料以用作对照,从而评定Cholix的体外转运。作为对于过滤器损失的内部对照,从商业来源 (西格玛) 获得了以四甲基罗丹明异硫氰酸酯 (TRITC) 标记的70Kda的葡聚糖 (dextran)。作为非特异性染料介导的转运的对照,我们将游离胺的一些在牛血清白蛋白的表面上与Alexa488羧基琥珀酰亚胺酯 (A488-CASE; Invitrogen) 进行反应。该偶联反应以10:1的A488-CASE:BSA摩尔比在室温下在中性pH进行4小时,在该点处添加过量的甘氨酸来淬灭该反应。生成的纯化产物包含约3个Alexa488分子 (每一BSA分子)。以四甲基罗丹明异硫氰酸酯 (TRITC) 标记的70Kda的葡聚糖 (dextran) (西格玛) 用作过滤器损失的内部对照。使用BMG labtech FLUOstar Omega仪器进行荧光测量,该仪器设置为针对TRITC-葡聚糖 (Dextran) 的在540nm激发和在610nm发射 (最佳Ex=547并且Em=572)、以及针对Alexa488蛋白的在480nm激发和在520nm发射 (最佳Ex=496并且Em=519)。

[0077] 使用极化的Caco-2细胞单层,在顶部 (Ap) 到基侧 (B1) 以及B1到Ap的方向上体外测

量跨上皮转运通量率,从而分别描述粘膜到浆膜以及浆膜到粘膜的通量事件。就在转运研究开始之前,测量了每个滤器的跨上皮电阻 (TEER);具有 $<200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 的TEER读数的单层排除在本研究之外。将Ap和B1介质从包含的单层中去除,并且将这些表面用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤一次。然后使一组单层接受100 $\mu\text{L}$  PBS的Ap (供体) 施用,该PBS含有10 $\mu\text{g}$  ntCholix-A488和10 $\mu\text{g}$  TRITC-葡聚糖或10 $\mu\text{g}$  BSA-A488和10 $\mu\text{g}$  TRITC-葡聚糖。然后使受体 (B1) 区室接收500 $\mu\text{L}$  PBS,以设置用于转运研究的 $T_0$ 。在37 $^\circ\text{C}$ 孵育4小时之后将供体和受体区室两者进行取样,以分别确定转运穿过单层的物质的量以及保留在顶面的量。

[0078] 在暴露4小时之后,我们观察到添加到这些单层顶面上的约5%的物质被转运 (参见图2)。在基底区室中显示75kDa TRITC-葡聚糖的任何滤器被排除在分析之外。经过相同的4小时时期后,BSA-Alexa488的对照蛋白在基底区室中没有显示任何显著的水平 (参见图2)。转运平均值对于Cholix是 $5.025\% \pm 1.13\%$ 并且对于BSA是 $0.56 \pm 0.33$  ( $N=4$ )。这些数据确立了:遗传上去毒形式的Cholix可以有效地转运体外穿过人肠癌细胞系Caco-2的极化单层。

### [0079] 实例3

[0080] 还制备的并且在大肠杆菌中表达的是Cholix在氨基酸A<sup>386</sup>处截短的变体 (Cholix<sup>386</sup>)、以及在Cholix<sup>386</sup>的C末端与绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因连接物 (Cholix<sup>386</sup>GFP)。在用适当的质粒通过热击转化 (在42 $^\circ\text{C}$ , 1分钟) 后,使用大肠杆菌DH5 $\alpha$ 细胞 (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 实现蛋白质表达。将在含有抗生素的培养基上选择的转化细胞分离,并且使其在LB (Luria-Bertani) 肉汤 (Difco) 中生长。通过添加1mM的异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 来诱导蛋白质表达。在IPTG诱导后两小时,通过在4 $^\circ\text{C}$ 在5,000xg离心持续10分钟来收获细胞。在细胞溶解后将包涵体分离,并且将蛋白质溶解于加有65mM二硫苏糖醇的6M盐酸胍和2mM EDTA (pH 8.0) 中。在重折叠和纯化之后,将蛋白质在-80 $^\circ\text{C}$ 以约5ml/ml储存在缺乏Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS (pH 7.4) 中。通过与这种荧光蛋白相关联的荧光标记的获得和保留来监测Cholix<sup>386</sup>GFP重折叠;桑普尔 (Sample) 等人,《化学会综述》(Chem Soc Rev, 38 (10): p.2852-64 (2009))。绿色荧光蛋白 (GFP) 购自Upstate (夏洛茨维尔, 弗吉尼亚州)。基于尺寸排阻色谱法,证实在这类研究中使用的所有蛋白质具有>90%的纯度。

[0081] 含有共价结合的红色荧光染料 (具有468nm/508nm的激发/发射特性) 的、并且具有醛表面官能团的聚苯乙烯珠 (10nm直径) (XPR-582) 是从杜克科学公司 (Duke Scientific) (帕洛阿尔托, 加利福尼亚州) 获得的。将一百微升的XPR-582珠 (2%固体) 与大约2.5nmol GFP或Cholix<sup>386</sup>GFP混合于200 $\mu\text{l}$ 的终体积的中性 (pH 7.0) 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。在室温下在温和摇动2小时之后,添加20 $\mu\text{l}$ 在PBS中的2mg/ml牛血清白蛋白 (BSA; 西格玛, 圣路易斯, 密苏里州) 的溶液。然后,将制剂通过用PBS的三个稀释循环来进行透析并且使用来自密理博公司 (Millipore) (贝德福德, 马萨诸塞州) 的100,000截留分子量的Microcon过滤器装置进行浓缩。包被珠的最终制剂为1%固体。

### [0082] 实例4

[0083] 将A549 (ATCC CCL-185<sup>TM</sup>)、L929 (ATCC CRL-2148<sup>TM</sup>)、以及Caco-2 (ATCC HTB-37<sup>TM</sup>) 细胞维持在37 $^\circ\text{C}$ 的完全培养基中 (在5%CO<sub>2</sub>中), 该完全培养基为:添加有10%胎牛血清、2.5mM谷氨酰胺、100U青霉素/ml、以及100 $\mu\text{g}$ 链霉素/ml的杜氏 (Dulbecco's) 改良伊格尔 (Eagle's) 培养基F12 (DMEM F12) (Gibco BRL, 格兰德艾兰, 纽约)。每2天至3天用这种培养



基(指定的完全培养基)饲养细胞,并且每5天至7天传代一次。为了分析,将细胞接种到24-或96孔板中并且使其生长至铺满。

[0084] 使Caco-2细胞在胶原包被的0.4- $\mu\text{m}$ 孔径的聚碳酸酯膜transwell支持物(Corning-Costar,坎布里奇,马萨诸塞州)上生长为铺满的单层,并且在达到如使用chopstick Millicell-ERS®电压计(密理博(Millipore))所测量的 $>250\ \Omega \cdot \text{cm}^2$ 的跨上皮电阻(TEER)18天-25天之后使用。通过测量在37℃施用20 $\mu\text{g}$ 4小时之后被转运蛋白质的量来确定Cholix或Cholix<sup>386</sup>GFP的顶部(Apical)到基侧(A→B)以及基侧到顶部(B→A)的穿过这些单层的转运。使用TEER测量以及10kDa荧光葡聚糖的范围(使用HPLC尺寸排阻方案来测量)来证实在研究过程期间的单层屏障特性。通过在基于细胞的细胞毒性测定中收集的培养基的滴定来确定Cholix转运的程度。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)来测量转运的Cholix<sup>386</sup>GFP,该酶联免疫吸附试验使用用于捕获的抗-GFP抗体以及针对Cholix的多克隆血清用于检测。

[0085] 如通过ELISA形式分析所评定的,对于Cholix、ntCholix以及Cholix<sup>386</sup>GFP而言,体外穿过极化的Caco-2细胞单层的转运率是可比较的。在Cholix的情况下,在对极化的Caco-2细胞针对细胞凋亡的TUNEL检测或乳酸脱氢酶(LDH)释放进行检验时,这些细胞没有被该蛋白质毒化。重要的是,发现Cholix和基于Cholix的蛋白质嵌合体有效地从Caco-2单层的顶面转运到基侧表面,而不是从基侧到顶部的方向。这些转运率和方向性与对于之前以这种相同的形式测试的PE所观察到的转运率和方向性是可比较的。另外,我们观察到体外兔抗-Cholix抗血清的添加不能阻断Cholix或Cholix相关蛋白穿过Caco-2单层的有效转运。

[0086] 使用共聚焦荧光显微镜来检验Cholix<sup>386</sup>GFP转胞吞体外穿过Caco-2单层的性质。时程研究显示Cholix<sup>386</sup>GFP在它的顶部施用5分钟之内进入上皮细胞中,并且在15分钟之内转运通过细胞到达细胞的基侧区域。在暴露于顶部的Cholix<sup>386</sup>GFP持续15分钟、随后将过量的Cholix<sup>386</sup>GFP从顶室中除去的样品中,观察到GFP荧光在细胞的基侧表面的方向继续(而不是在背对着顶面的方向)。通过在这个时程中测量在顶部和基侧区室中的Cholix<sup>386</sup>GFP含量,证实了Cholix<sup>386</sup>GFP的这种单向运动。与转运研究一致,将Cholix<sup>386</sup>GFP施用在Caco-2单层的基侧表面处并没有显示出进入细胞中的任何显著荧光。转运的Cholix、ntCholix以及Cholix<sup>386</sup>GFP的蛋白质印迹(Western blot)分析表明这些蛋白质被转运而没有重大改变。

[0087] 体外研究还显示,化学偶联至Cholix<sup>386</sup>GFP的100nm直径的荧光乳胶珠在顶部施用之后有效地转运穿过Caco-2单层。具有100nm直径的乳胶珠选择提供了这样一种物质,该物质能够容易地装配在从网格蛋白被膜小窝(clatherin-coated pit)衍生的125nm直径的内涵体(endosome)的内腔内。因此,这些研究表明Cholix<sup>386</sup>GFP-乳胶珠通过这样一种机制移动穿过极化的Caco-2细胞,该机制与内涵体在顶端细胞表面处的摄取继之为基于内涵体的细胞内运输一致。将偶联Cholix<sup>386</sup>GFP的100nm直径的荧光乳胶珠用抗-Cholix抗血清进行预孵育并未改变这些乳胶珠的转运。化学偶联至100nm直径的荧光乳胶珠的相似量的GFP并没有促进这些颗粒体外转运穿过Caco-2单层。共聚焦荧光显微镜研究与对于用Cholix<sup>386</sup>GFP与GFP包被的转胞吞乳胶珠中所观察到的差异相一致。

[0088] 这样的结果不曾预料的:Cholix类似于PE能够转运穿过极化的上皮屏障。虽然如通过结晶学分析所表明它们的结构是相似的,它们的表面氨基酸组成是显著不同的;确实,基于氨基酸相似性的比对方法不会容易地将这两种蛋白质进行匹配。这是重要的,因为推



定病原体衍生的蛋白质(例如这两种毒力因子)的与宿主受体相互作用的能力涉及表面表达的氨基酸组分。由于两种蛋白质(具有它们的基本上不同的氨基酸序列)都有效地转运穿过极化上皮,很有可能的是一些其他机制形成了用于这种转运能力的那种基础。我们的论点是:由PE和Cholix共有的结构关系形成了它们的有效转胞吞作用的固有能力的基。虽然PE和Cholix蛋白质两者都将具有结合至顶面受体从而获得进入内涵体区室的能力,但更有可能的是:这种相互作用以及用于在这些蛋白质的细胞内运输中所涉及的其它受体的潜力将会基于在蛋白质表面上的构象结构而不是特殊氨基酸。

[0089] 根据本披露,可以在不使用过度实验的情况下,进行和执行在此披露以及要求保护的所有物品和方法。虽然本发明的物品和方法已经以优选实施例的方式进行了描述,对于本领域的技术人员将清楚的是,可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下将变更应用于这些物品和方法。所有这样的对于本领域的技术人员而言明显的变更和等效物,无论现存的还是后来开发的,都被认为是在如由所附权利要求书限定的本发明的精神和范围之内。在本说明书中提及的所有专利、专利申请、以及出版物指示了本发明所涉及的本领域的普通技术人员的水平。出于所有的目的,将所有专利、专利申请以及出版物通过引用以其全文结合在此,并且其达到的程度如同每个单独的出版物具体地或单独地指明的出于任何以及所有目的通过引用以其全文结合。适当地,在此说明性地描述的本发明可以在不存在没有确切地在此披露的任何一种或多种要素下实施。因此,例如,在此的每种情况下,术语“包括”、“基本上由...组成”、以及“由...组成”中的任何一个可以用其他两个术语的任一个替换。已经采用的术语和表述被用作说明的术语并且没有限制性,并且并非旨在使用这样的术语和表述而将本发明显示或描述的特征的任何等效物或其一部分排除在外,但是将认识到的是在要求的本发明的范围之内的不同的修改是有可能的。因此,应当理解的是,虽然已经通过优选实施例和任选的特征确切地披露了本发明,在此披露的概念的修改和变更可以由本领域的技术人员采用,并且这样的修改和变更被认为是在由所附权利要求书限定的本发明的范围之内。

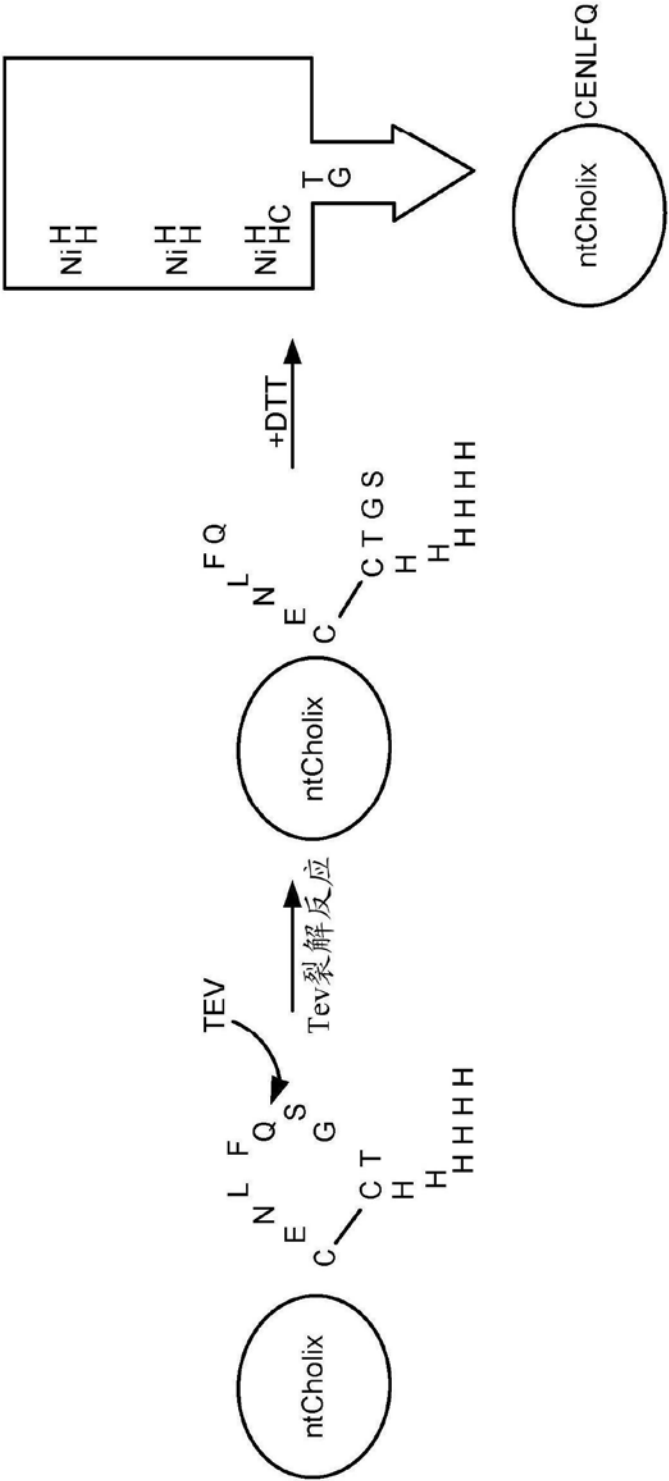


图1

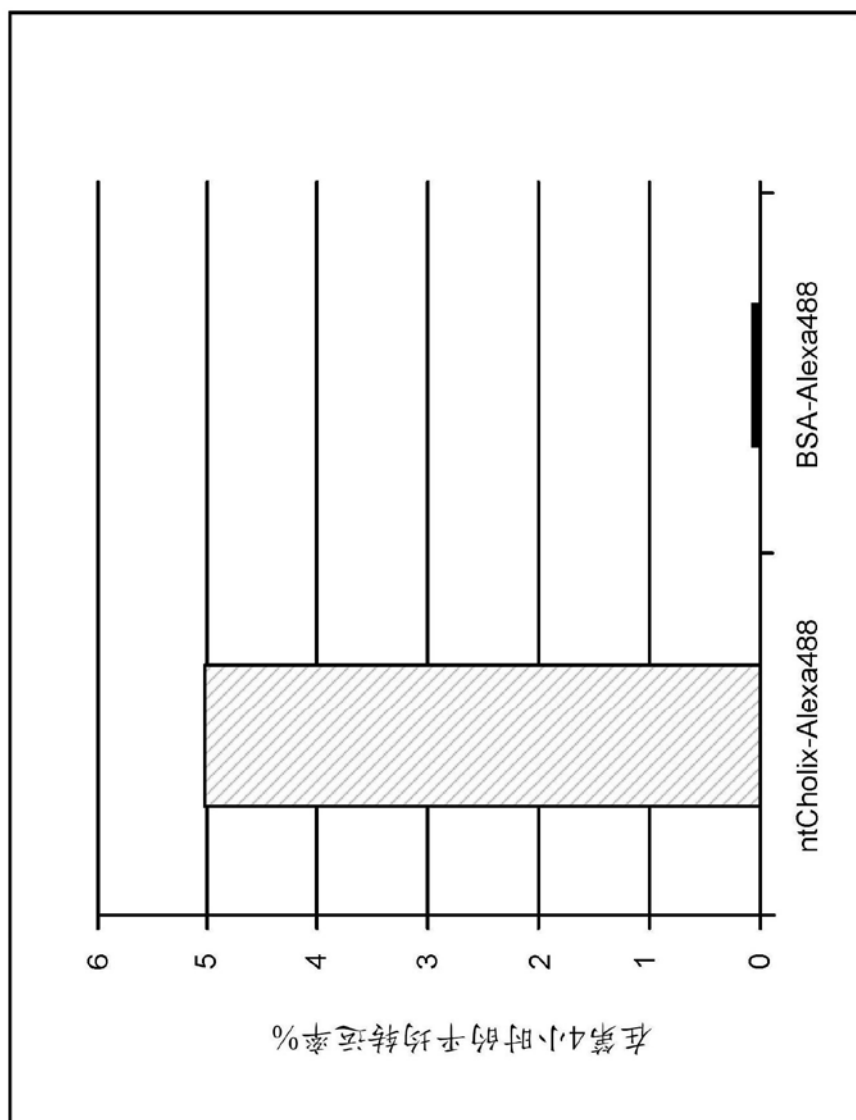


图2