



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101743250 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200880024766.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.01.29

C07K 14/145 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/85 (2006.01)

07360020.7 2007.05.15 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.01.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/051035 2008.01.29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/138649 EN 2008.11.20

(71) 申请人 特兰斯吉恩股份有限公司

地址 法国伊尔基希-格拉芬斯塔登

(72) 发明人 N·西尔韦斯特雷 E·雅各布斯

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

信号传导肽

(57) 摘要

本发明提供具有特殊序列的新肽和其作为信号肽或膜锚定肽的应用。本发明也涉及嵌合多肽，其包含一或多个这种肽和感兴趣的多肽，还涉及编码这种肽和嵌合多肽的核酸分子，载体，感染性病毒颗粒和宿主细胞。本发明也涉及药物组合物，其包含这种元件和药物可接受的载体。本发明也提供一种使用这种肽重组产生多肽的方法，特别是指导胞外或锚定在质膜表面的感兴趣多肽的表达的方法。

1. 选自如下一组中的肽,所述肽基本上由或由 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成。

2. 一种嵌合多肽,其包含感兴趣多肽和 (i) 或者基本上由或由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成的肽或者 (ii) 基本上由或由 SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列组成的肽或 (iii) 基本上由或由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成的肽和基本上由或由 SEQ ID NO :3,SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列组成的肽二者。

3. 权利要求 2 的嵌合多肽,其中所述基本上由或由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成的肽连接在所述嵌合多肽的氨基末端。

4. 权利要求 2(i) 或 3 的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽无其他信号传导肽。

5. 权利要求 2 或 3 的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含至少一个膜锚定肽。

6. 权利要求 5 的嵌合多肽,其中所述膜锚定肽连接到感兴趣多肽的羧基末端或 C 末端部分内。

7. 权利要求 2,3,5 和 6 任一项的嵌合多肽,其中所述信号肽由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成,且所述膜锚定肽由 SEQ ID NO :3 所示氨基酸序列组成。

8. 权利要求 2,3,5 和 6 任一项的嵌合多肽,其中所述信号肽由 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列组成,所述膜锚定肽由 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列组成。

9. 权利要求 2-8 任一项的嵌合多肽,其中感兴趣多肽与狂犬病病毒是异源的。

10. 权利要求 9 的嵌合多肽,其中所述感兴趣多肽选自免疫原性多肽和抗肿瘤多肽的组成的组中。

11. 权利要求 10 的嵌合多肽,其中所述免疫原性多肽是乳头瘤病毒多肽。

12. 分离的核酸分子,其包含至少编码权利要求 1 的肽或权利要求 2-11 任一项的嵌合多肽的核苷酸序列。

13. 分离的核酸分子,其包含 SEQ ID NO :11-28 任一所示的核苷酸序列中的至少一个。

14. 权利要求 13 的核酸分子,其中编码感兴趣多肽的核苷酸序列插入到 SEQ ID NO :23-28 的大约第 70 位到大约第 76 位之间。

15. 权利要求 12-14 任一项的核酸分子,其中所述核酸分子被置于恰当的调节元件的控制下以确保其在给定的宿主细胞或生物体内表达。

16. 用于表达一或多个权利要求 2-11 任一项的嵌合多肽的载体。

17. 权利要求 16 的载体,其包含一或多个权利要求 12-15 任一项的核酸分子。

18. 权利要求 17 的载体,其包含 2,3 或 4 个权利要求 12-15 任一项的核酸分子。

19. 权利要求 18 的载体,其中所述 2,3 或 4 个核酸分子彼此之间呈现少于 75% 的同源性百分比。

20. 权利要求 19 的载体,其包含 SEQ ID NO :24 的核苷酸序列以使得能够表达第一个感兴趣多肽到细胞膜并包含 SEQ ID NO :28 的核苷酸序列以使得能够表达第二个感兴趣多肽到细胞膜。

21. 权利要求 16-20 任一项的载体,其中所述载体是病毒或非病毒载体。

22. 权利要求 21 的载体,其中所述载体是腺病毒载体。

23. 权利要求 22 的载体,其中所述腺病毒载体是复制缺陷型的。

24. 权利要求 21 的载体,其中所述载体是痘病毒载体。

25. 权利要求 24 的载体,其中所述痘病毒载体获得自痘苗病毒,所述痘苗病毒选自由 Copenhagen 株, Wyeth 株, NYVAC 和高度减毒修饰的 Ankara (MVA) 株组成的组中。

26. 感染性病毒颗粒,其包含权利要求 12-15 任一项的核酸分子或权利要求 16-25 任一项的载体。

27. 一种宿主细胞,其包含权利要求 12-15 任一项的核酸分子或权利要求 16-25 任一项的载体或权利要求 26 的感染性病毒颗粒。

28. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求 2-11 任一项的嵌合多肽、权利要求 12-15 任一项的核酸分子或权利要求 16-25 任一项的载体或权利要求 26 的感染性病毒颗粒或权利要求 27 的宿主细胞或其任意组合和药物可接受的载体。

29. 权利要求 2-11 任一项的嵌合多肽、权利要求 12-15 任一项的核酸分子或权利要求 16-25 任一项的载体或权利要求 26 的感染性病毒颗粒或权利要求 27 的宿主细胞或其任意组合在制备用于治疗或预防疾病或病理性病症的药物中的应用。

30. 权利要求 29 的应用,其中所述疾病或病理性病症是传染病。

31. 基本上由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成的肽作为信号肽的应用。

32. 基本上由或由 SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列组成的肽作为膜锚定肽的应用。

33. 重组产生多肽的方法,其包含步骤 a) 将权利要求 16-25 任一项的载体或权利要求 26 的感染性病毒颗粒导入宿主细胞, b) 在允许感兴趣多肽表达的条件下培养所述转化的宿主细胞,和 c) 从培养物回收和任选纯化所述多肽。

34. 指导感兴趣多肽胞外表达的方法,其包含步骤 a) 通过将选自 SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 组成的组中的第一个核苷酸序列连接到编码所述多肽的第二个核苷酸序列而产生核酸分子,其中所述核酸分子编码嵌合多肽,所述嵌合多肽从 N 到 C 末端包含由所述第一个核苷酸序列编码的信号肽和所述感兴趣多肽 ;(b) 将所得核酸分子插入表达载体和 (c) 将所述表达载体导入宿主细胞或生物体。

35. 指导锚定在质膜表面的多肽表达的方法,其包含步骤 (a) 通过在选自 SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27 和 SEQ ID NO :28 组成的组中的第一个核苷酸序列的第 70 位核苷酸和第 76 位核苷酸之间的任意位置插入编码感兴趣多肽的第二个核苷酸序列而产生核酸分子,其中所述核酸分子编码嵌合多肽,所述嵌合多肽从 N 到 C 末端包含由所述第一个核苷酸序列编码的信号肽,由所述第二个核苷酸编码的感兴趣多肽和由所述第一个核苷酸序列编码的膜锚定肽 ;(c) 将所得核酸分子插入表达载体和 (c) 将所述表达载体导入宿主细胞或生物体。

信号传导肽

[0001] 本发明涉及用作信号肽和膜锚定肽的新肽。这些肽来源于多种狂犬病毒株的糖蛋白。本发明也提供编码这种肽的核酸分子和载体以及使用这种核酸分子和载体表达指定从宿主细胞分泌或锚定到细胞膜上的感兴趣多肽的方法。本发明也特别相关于在各种原核和真核体外系统或在动物或人生物体中用于治疗 and 预防目的的蛋白质表达领域。

[0002] 在过去二十年中,在生物技术产业内重组多肽的制备已经成为主要的挑战之一。几个质粒 DNA 和病毒载体已被制备和用于在培养的宿主细胞或活生物体内表达核苷酸序列,用于多种目的,包括接种疫苗,基因治疗,免疫疗法和在培养的细胞内制备重组多肽。

[0003] 重组转化的宿主细胞分泌多肽通常是具有优势的,因为从培养上清液比从破坏细胞释放细胞内蛋白质时产生的复杂的蛋白质混合物中回收重组多肽的纯化步骤容易。而且,分泌也减少胞内表达对宿主细胞或生物体可能具有的有害(例如毒性)作用。最终,通过分泌途径的易位也需要进行翻译后修饰和蛋白酶裂解,其在特定多肽的稳定性,折叠,免疫识别和生物学活性方面具有作用。

[0004] 通常,分泌的多肽表达为前体,其包括在 N 末端的信号肽。信号肽通常由 3 个明显区域组成: N 末端和阳性电荷区,中央疏水核心区 and 由信号肽酶识别的 C 末端裂解位点。信号肽确保多肽前体有效的易位穿过内质网(ER)膜。在提供成熟多肽(没有信号肽的多肽)的易位过程中信号肽被信号肽酶切掉。一旦多肽进入 ER,它被转运到高尔基体,和之后的分泌途径的大量路线之一,其依赖于多肽的性质和信号传导肽(signaling peptide)的存在。例如,多肽可分泌到外部培养基中,或运送到细胞区域如内体和溶酶体区域或锚定到细胞膜上。本领域已知大量翻译后修饰发生在 ER 和高尔基体,如多肽的糖基化,二硫键形成和蛋白酶解。不正确的翻译后修饰典型地导致在生产异质多肽产品中无活性多肽和无效的信号肽酶裂解,其不能使用,特别是用于人类使用。

[0005] 另一方面,先前已显示通过以锚定在不同亚细胞区域的细胞膜上或细胞表面的形式呈递可增强免疫原性多肽的免疫原性活性(Andrew et al,1990, J. Virol. 64, 4776-4783),很可能通过改良的 I 类 MHC I 和 / 或 II 类 MHC 介导的到宿主免疫系统的呈递而进行。例如, Ji 等. (1999, Human Gene Ther. 10 :2727-2740) 报道靶定人乳头瘤病毒(HPV)-16 到内体 / 溶酶体室增强它的抗肿瘤活性和允许在表达宿主生物体中增加肿瘤细胞特异性 CD4+ 辅助 T 细胞和 CD8+ 细胞毒 T 淋巴细胞的产生。W099/03885 揭示质膜上靶定 HPV-16 E6 和 E7 多肽允许改善它们的免疫原性潜力和因此它们在宿主生物体中的疗效。在细胞表面的膜结合蛋白质的转运和锚定涉及信号肽和膜锚定肽。

[0006] 虽然,本领域中可获得大量这样的信号传导肽,那些从狂犬病糖蛋白获得的蛋白质证明特别是在痘病毒介导的表达中是有效的。因此,提供额外的信号传导序列是有用的,以确保通过细胞分泌途径和 / 或信号肽酶裂解和 / 或转运和锚定到大量宿主细胞和生物体的细胞膜的有效易位。

[0007] 另外,编码狂犬病糖蛋白衍生的本发明目的信号传导肽的核酸序列已被工程化以减少相互之间的同源性百分比小于 75%,因此允许它们用于多基因表达载体,其表达的多肽从宿主细胞分泌或锚定到细胞膜上例如质膜以便于呈递在细胞表面。但是,非常有限

数量的有效的信号传导肽、显著的信号和膜锚定肽限制了从一个单载体表达的核酸序列的数量。当然,本领域已知,使用相同信号传导肽指导转运和膜锚定由多基因表达载体编码的多肽的每一个可能导致这些同源序列之间的重组事件和包含于它们之中的核苷酸的丢失 (Matzke, M., Matzke, A. J. M., Scheid, O. M. In Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants; Paszkowski, J. Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1994; pp 271-300)。这个不稳定性问题可导致载体原液不可用,特别是对于人的临床实验。

[0008] 如上所述,在本领域中需要为重组生产分泌的或膜锚定的多肽提供可选择的信号传导肽,特别是在真核宿主细胞和生物体中。本发明为此需要提供了获得自不同狂犬病病毒株糖蛋白质的新的肽作为信号肽和膜锚定肽。这种肽已证明在指导在真核细胞中表达自痘病毒载体的感兴趣多肽的分泌和膜锚定是高效的。此外,本发明也提供编码这种肽的核酸分子,其序列已被工程化以使其相互之间呈现小于 75% 的同源性百分比。使用这种工程化的核酸分子提供表达自单一载体的多个感兴趣多肽的分泌和膜锚定(当同源序列存在于这样的载体构建体中时)显著减少自然发生的同源重组事件的可能性。因此,本发明在重组技术领域建立了一个重要工具,特别是在多基因表达载体用于分泌和膜呈递多种多肽中,特别是在真核宿主细胞中。

[0009] 通过权利要求书中定义的实施方案解决了这个技术问题。

[0010] 本发明其他和进一步的方面,特征和优点将通过以下本发明的优选实施方案的描述而变得明显。这些实施方案仅是揭示目的。

[0011] 因此,在第一个方面,本发明提供了一个肽,其选自基本上由或由 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成的肽组成的组中。

[0012] 如本文全文所用,除非另外指出,术语“一个”用于表示“至少一个”、“至少第一个”、“一或多个”或“多个”参考的化合物或步骤。

[0013] 如本文所用,术语“和 / 或”包括“和”、“或”和“所述术语连接的元件的所有或任何其他组合”的意思。

[0014] 如本文所用,术语“大约”或“近似”表示给出值或范围的 20% 以内,优选 10% 以内,和更优选 5% 以内。

[0015] 如本文所用,当用于定义产品、组合物和方法时,术语“包含”应表示所述产品、组合物和方法包括提及的成分或步骤,但不排除其他的。“基本上由……组成”是指排除任何实质意义的其他成分或步骤。因此,基本上由所述成分组成的组合物将不排除微量污染物和药物可接受的载体。“由……组成”表示排除痕量元素以上的其他成分或步骤。例如,肽“由氨基酸序列组成”是所述肽除了所述氨基酸序列之外不包任意氨基酸。肽“主要由氨基酸序列组成”是这个氨基酸序列与仅仅少数额外氨基酸残基(典型从大约 1 到大约 10 个左右的额外残基)共存。肽“包含”氨基酸序列是所述氨基酸序列是所述肽的最终氨基酸序列的至少一部分。这样的肽可具有多达几百个额外氨基酸残基。这样的额外氨基酸残基在肽运输,促进多肽生成或纯化;延长半衰期等方面发挥作用。这同样可用于核苷酸序列。

[0016] 在此使用的术语“氨基酸”指天然 L- 氨基酸,即 20 个遗传编码的氨基酸丙氨酸(Ala 或 A),缬氨酸(Val 或 V),亮氨酸(Leu 或 L),异亮氨酸(Ile 或 I),脯氨酸(Pro 或 P),甲硫氨酸(Met 或 M),苯丙氨酸(Phe 或 F),色氨酸(Trp 或 W),甘氨酸(Gly 或 G),丝氨酸

(Ser 或 S), 苏氨酸 (Thr 或 T), 半胱氨酸 (Cys 或 C), 酪氨酸 (Tyr 或 Y), 天冬酰胺 (Asn 或 N), 谷氨酰胺 (Gln 或 Q), 天冬氨酸 (Asp 或 D), 谷氨酸 (Glu 或 E), 赖氨酸 (Lys 或 K), 精氨酸 (Arg 或 R) 和组氨酸 (His 或 H) 以及其天然衍生物, 如 beta- 丙氨酸, 鸟氨酸, 或甲硫氨酸亚砷或例如通过附加甲基, 甲酰基, 乙酰基, 糖基, 磷酰基等修饰一或多个 alpha- 氨基, alpha- 羧基或侧链的氨基酸。

[0017] 在此使用的术语“多肽”, “肽”和“蛋白质”可互换表示氨基酸残基聚合物, 其包含通过肽键结合的 9 或更多个氨基酸。聚合物可以是线性的, 分枝的或环形的。通常, 如果氨基酸聚合物长 (例如超过 80 个氨基酸残基), 优选地称为多肽或蛋白质。其结果是, “肽”指长度大约 9 到大约 80 个氨基酸的片段, 最佳地大约 10 到大约 75 个氨基酸的片段, 优选地大约 20 到大约 70 个氨基酸的片段, 和更优选地大约 23 到大约 66 个氨基酸的片段。肽可包含一个选择的天然蛋白质的区域, 如涉及多肽定位 (例如定位多肽到特殊的细胞区域或膜) 的。术语“多肽 / 肽”的定义包含天然的和修饰的多肽 / 肽。

[0018] 在此使用的术语“天然”指得自天然来源的材料 (例如分离的, 纯化的), 与实验室中人工修饰或改变的材料相区别。例如, 天然多肽 / 肽是由存在于野生型生物体或细胞基因组中的基因编码。相反, 修饰的多肽 / 肽是由在实验室中已被修饰的核酸分子编码以不同于天然多肽 / 肽, 例如通过插入, 缺失或取代一或多个氨基酸或这些可能性的任何组合。当考虑几个修饰时, 它们可涉及保守残基和 / 或非连续残基。

[0019] “信号传导肽”是一种肽, 其使得能够在给定宿主细胞或生物体内特异性定位包含该肽的多肽。信号传导肽的实例包括信号肽和膜锚定肽。

[0020] 在此使用的“信号肽”或“信号序列”指一个氨基酸序列, 其能够起始其可操纵连接的多肽通过至宿主细胞的内质网 (ER)。通常, 信号肽被内肽酶切割 (例如特异性 ER 定位的信号肽酶) 以释放 (成熟) 多肽。典型地, 信号肽的长度范围从大约 10 到大约 40 个氨基酸, 有利地大约 15 到大约 30 个氨基酸和优选大约 18 到大约 25 个氨基酸, 特别优选包括 Met 起始物残基的大约 23 个氨基酸。

[0021] 在此使用的“膜锚定肽”指自然界中疏水的氨基酸序列, 其能够将其可操纵连接的多肽锚定到细胞膜上, 和特别是质膜上。典型地, 膜锚定肽的长度范围从大约 20 到大约 85 个氨基酸, 有利地大约 25 到大约 75 个氨基酸和优选大约 30 到大约 70 个氨基酸, 特别优选大约 66 个氨基酸。优选其含中央高度疏水结构域, 其能够跨越细胞膜的脂双层一或多次或与膜的外表面相互作用。

[0022] 在此使用的“嵌合”多肽指单条多肽链, 其在天然序列内的不同位置包含多肽 / 肽。构成所述嵌合多肽的不同多肽 / 肽通常存在于自然界的分离的蛋白质中, 在嵌合多肽中被连接在一起; 或它们可存在于自然界中相同的蛋白质, 但是在嵌合多肽中具有不同排列。例如, 嵌合多肽可由获得自不同来源地信号肽和感兴趣多肽构成。另一个嵌合多肽可由信号肽, 感兴趣多肽和膜锚定肽构成, 其中感兴趣多肽获得自不同于信号肽和 / 或膜锚定肽的来源。

[0023] 术语“可操纵连接”指至少 2 个成分的并列, 其中描述的组分处于允许它们以预期的方式发挥功能的关系。例如如果启动子起始并使得能够核苷酸序列转录以允许在宿主细胞或生物体内表达, 则所述启动子是可操纵连接到所述核苷酸序列。信号肽是可操纵连接到多肽上的, 如果其起始和使得能够使其易位通过 ER 和被切割以释放所述多肽。膜锚定肽

是可操纵连接到多肽上的,如果其能够使其锚定到细胞膜,特别是质膜上。

[0024] 如本文所用,“载体”可以是在宿主细胞或生物体中能够运输和表达核酸分子的任意物质。载体可以是染色体外(例如附加体)或整合(整合入宿主染色体)的、自主复制或不是、多或低拷贝、双链或单链、裸露或复合其他分子的(例如载体复合脂质或聚合物以形成特定结构如脂质体、脂复合物(lipoplexes)或纳米微粒,包装于病毒壳体的载体,和固定在固相颗粒上的载体等)。

[0025] 术语“核酸”,“核酸分子”,“多核苷酸”和“核苷酸序列”在本文可以互换使用,定义任意长度的多聚脱氧核糖核苷酸(DNA)或多聚核糖核苷酸(RNA)分子的聚合物或其任意组合。该定义包含单链或双链、线性或环形、天然产生的或合成的多核苷酸。而且,这样的多核苷酸可包含非天然产生的核苷酸(例如如美国 5,525,711,美国 4,711,955 或 EPA 302 175 中描述的甲基化核苷酸和核苷酸类似物)和化学修饰(例如见 WO 92/03568 ;US 5,118,672)以增加核酸的体内稳定性,增强其运输,或减少来自宿主对象的清除率。如果存在,可在聚合之前或之后进行修饰。

[0026] 在此使用的术语“序列同源性”(或序列相同性)通常表示为百分比,表示彼此保留给定程度相同性的核苷酸序列。考虑到需要引入以最佳化排列的缺口(gap)数量和每个缺口的长度,2个核苷酸序列之间的百分比同源性是序列共享的相同位置数量的函数。在本领域可获得不同的计算机程序和数学算法确定核苷酸序列之间的百分比同源性例,例如 GCG Wisconsin 包和 the Basic Local alignment Search Tool (BLAST) 程序,其在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 可公开获得并在出版物中描述(例如 Altschul 等,1990, J. Mol. Biol. 215,403-410)。

[0027] 在此使用的术语“宿主细胞”定义任何细胞,其可是或已经是本发明载体的受体和这种细胞的子代。这个术语将被广泛理解以至于包含分离的细胞,一组细胞和特定的细胞组织,例如组织或器官中的。这种细胞可以是原代的,转化的或培养细胞。

[0028] 在此使用的术语“生物体”指脊椎动物,特别是许多的哺乳动物和尤其是家畜,农场动物,运动动物(sport animal)和包括人类的灵长类动物。

[0029] 在一个实施方案中,本发明提供新的分离的肽,其呈现如上所定义的信号肽的功能性特性,其基本上由或由 SEQ ID NO :1 (MVPQVLLFVPLLGFPLCFGKFPI) 或 SEQ ID NO :2 (MVPQALLLVPLLGFSLCFGKFPI) 所示的氨基酸序列组成。

[0030] 更特别地,SEQ ID NO :1 所示的信号肽来源于 UniProt 数据库中登录号 M38452 所示的狂犬病毒 ERA 株糖蛋白前体 N 末端存在的信号肽。通常,天然的 ERA 株信号肽由 SEQ ID NO :6 (MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPI) 的氨基酸序列组成并在 2 个位置不同于 SEQ ID NO :1 的信号肽,分别在位置 5,其中天然肽中存在 Ala 残基相对于本发明信号肽的 Val 残基,和在位置 13,其中天然肽中存在 Val 残基相对于本发明信号肽的甘氨酸。

[0031] SEQ ID NO :2 所示的信号肽来源于 UniProt 数据库中登录号 ay009097 所示的狂犬病毒 PG 株糖蛋白前体 N 末端存在的信号肽。通常,天然的 PG 株信号肽由 SEQ ID NO :7 (MVPLALLLVPLLGFSLCFGKFPI) 的氨基酸序列组成并在位置 4 不同于 SEQ ID NO :2 的信号肽,其中天然肽中存在 Leu 残基相对于本发明信号肽的 Gln 残基。

[0032] 如果需要,本发明的肽可被修饰,条件是修饰不改变信号肽活性。例如,可缺失起始物 Met 残基(如果被表达的多肽含有它)。

[0033] 本发明也提供了基本上由或由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列组成的肽作为信号肽的应用。本发明的肽可以单独地使用,组合任意额外信号肽,特别是本文所述的膜锚定肽以起始或能够进行适当的转运和锚定感兴趣多肽到细胞膜上。

[0034] 本发明也提供了新的分离的肽,其呈现以上定义的膜锚定肽的功能性性质,其基本上由或由 SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成。

[0035] YVLLSAGTLIALMLIIFLITCCKRVDRPESTQRLRGTGRNVSVTSQSGKFISSWESHKSGGETRL (SEQ ID NO :3) ;

[0036] YVLLSAGTLIALMLIIFLMTCCRKVDREPESTQRLRGTGRNVSVTSQSGKFISSWESHKSGGETRL (SEQ ID NO :4) ;

[0037] YVLIIAGVLIAMILTIFLMTCCGRGNRPKSTQHSLGGIGRKVSATSQSGKVISSWESHKSGGETRL (SEQ ID NO :5) 。

[0038] 更特别地, SEQ ID NO :3 所示的膜锚定肽来源于 UniProt 数据库中登录 ay009097 揭示的狂犬病毒 PG 株糖蛋白 C 末端存在的膜锚定肽。通常,天然的 PG 株膜锚定肽由 SEQ ID NO :8 (YVLLSAGTLIALMLIIFLITCCKRVDRPESTQRLRGTGRNVSVTSQSGKFIHWSWESYKSGGETGL) 的氨基酸序列组成并在 3 个位置不同于 SEQ ID NO :3 的膜锚定肽。

[0039] SEQ ID NO :4 所示的膜锚定肽来源于 UniProt 数据库中登录号 S72465 揭示的狂犬病毒 Nishigahara 株糖蛋白 C 末端存在的膜锚定肽。通常,天然的 Nishigahara 株膜锚定肽由 SEQ ID NO :9 (YVLLSAGTLIALMLIIFLMTCCRKVDREPESTQRLRGTGRNVSVTSQSGKFIPSWESYKSGGETGL) 的氨基酸序列组成和在 3 个位置不同于 SEQ ID NO :4 的膜锚定肽。

[0040] SEQ ID NO :5 所示的膜锚定肽来源于 UniProt 数据库中登录号 u11751 揭示的狂犬病毒北极狐 (artic fox) 株糖蛋白 C 末端存在的膜锚定肽。通常,天然的北极狐株膜锚定肽由 SEQ ID NO :10 (YVLIIAGVLIAMILTIFLMTCCGRGNRPKSTQHSLGGIGRKVSATSQSGKVISSWESYKSGGETRL) 的氨基酸序列组成和在位置 58 不同于 SEQ ID NO :5 的膜锚定肽,其中在天然肽中存在 Tyr 残基相对于在本发明膜锚定肽的 His 残基。

[0041] 如果需要,本发明的肽可被修饰,条件是修饰不改变膜锚定肽活性。

[0042] 本发明也提供了基本上由或由 SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列组成的肽作为膜锚定肽的应用。本发明的肽可以单独使用,组合一或多个本文所述的信号传导肽、优选信号肽以能够锚定感兴趣多肽到细胞膜上。优选地,本发明的肽允许感兴趣多肽锚定到质膜上以便它可以与其他细胞表面或存在于细胞外介质的其他分子相互作用。

[0043] 本发明也提供了嵌合多肽,其包含感兴趣多肽和 (i) 本发明的肽,其基本上由或由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列组成或 (ii) 本发明的肽,其基本上由或由 SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成或 (iii) 本发明的基本上由或由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成的肽和基本上由或由 SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列组成的肽二者。

[0044] 可以通过化学合成或遗传方式即通过框内融合编码构成嵌合多肽的每个不同的多肽/肽的核苷酸序列产生嵌合多肽。“框内融合”,其表示融合的核苷酸序列的表达产生其中没有任何翻译终止子的单多肽链。融合可以是直接(例如编码每个多肽/肽的密码子是连续的,中间没有任何外部密码子)或通过接头(在构成嵌合多肽的 2 个多肽/肽的连接

处)。接头的存在可促进嵌合多肽的正确形成,折叠和/或功能或通过导入一或多个适当的限制性位点促进克隆步骤。通常,接头是 2 到 30 个氨基酸长和由氨基酸残基如甘氨酸,丝氨酸,苏氨酸,天冬酰胺,丙氨酸和/或脯氨酸组成。适合的肽接头的有代表性的实例包括 "Ser-Gly-Ser", "Gly-Ser-Gly", "Ser-Gly", "Gly-Ser" 和其核苷酸序列编码一或多个限制性位点的接头,特别适于插入多肽编码核苷酸序列(例如 "Gly-Ser" 接头,其核苷酸序列 "GGATCC" 编码 BamHI 限制性位点)。

[0045] 在一个优选的实施方案中,基本上由或由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2(信号肽)的氨基酸序列组成的本发明的肽连接在嵌合多肽的氨基末端,即在感兴趣多肽的第一个残基之前的位置(起始物 Met 残基包含于本发明信号肽中)。

[0046] 在本实施方案的一个方面,本发明的嵌合多肽没有其他信号传导肽,以使得感兴趣多肽从宿主细胞分泌进外部介质(例如培养基)。

[0047] 在本实施方案的另一个且优选的方面,本发明的嵌合多肽包含至少一个额外的信号传导肽,特别是膜锚定肽以能够锚定感兴趣多肽到细胞膜上,特别是质膜上,导致其在细胞表面呈递。优选地,膜锚定肽连接到感兴趣多肽的羧基末端或 C 末端部分内。羧基末端指多肽最后的氨基酸残基(残基由 STOP 密码子之前的密码子编码),而 C 末端部分指包含于多肽的最后的第 3 个的部分(假定多肽被分成 3 个部分,N 末端,中央和 C 末端部分,每个大约占全部多肽的三分之一)。优选地,C 末端部分包含在最后 100 个残基内,更优选地是给定多肽羧基末端之前的最后 50 个残基内。在本发明中适合使用的膜锚定肽可以获得或分离自与细胞膜天然结合的任何细胞或病毒蛋白质或多肽。在本领域技术人员可公开获得的文献中大量描述了这样的膜结合蛋白(见例如 Branden and Tooze,1991,in Introduction to Protein Structure p.202-214,NY Garland)。可以更特别地引用狂犬病糖蛋白,HIV 病毒包膜糖蛋白和麻疹病毒 F 蛋白。

[0048] 优选地,包含于本发明嵌合多肽中的膜锚定肽是基本上由或由 SEQ ID NO:3,4 或 5 任一所示的氨基酸序列组成的本发明的膜锚定肽。更优选地,本发明的嵌合多肽包括由 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列组成的信号肽和由 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列组成的膜锚定肽。或者,本发明的嵌合多肽包括由 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列组成的信号肽和由 SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列组成的膜锚定肽。

[0049] 在此描述的信号肽和膜锚定肽来源于狂犬病糖蛋白,包含于本发明嵌合多肽中的感兴趣多肽优选与狂犬病病毒异源。在此使用的“与狂犬病病毒异源”的多肽指不与野生型狂犬病病毒天然相关或由野生型狂犬病病毒基因组编码的多肽。

[0050] 适合的感兴趣多肽包括例如具有商业或研究价值的多肽以及能够在呈现或倾向于呈现疾病或紊乱的宿主生物体中提供治疗或保护活性的多肽。例如,感兴趣多肽可选自以下一组中:激素,细胞因子,免疫原,受体,伴侣分子,免疫球蛋白,酶,生长因子,荧光蛋白如 GFP,转运蛋白如黄素氧还蛋白,珠蛋白,和金属硫蛋白,毒素,自杀基因产物,结构蛋白,和抑制剂如蛋白酶抑制剂。在本发明中,感兴趣多肽优选选自以下一组中:免疫原性多肽和抗肿瘤多肽。

[0051] “免疫原性”多肽指能够在其表达的宿主生物体中诱导,刺激,发展或加强免疫系统的多肽。这样的免疫反应可以是体液或细胞或同时是体液和细胞免疫反应。体液反应引起抗研究多肽的抗体产生,而细胞反应引起 T 辅助细胞和/或 CTL 反应和/或刺激细胞因

子产生。典型地,通过大量本领域标准的测定(可获得的评价免疫反应的起始和激活的技术的一般描述见例如最新版 Coligan 等,Current Protocols in Immunology;ed J Wiley & Sons Inc,National Institute of Health)可以在体内或体外评价多肽的免疫原性性质。例如,检测可以是比色法,荧光法或放射性的和适合的技术包括 ELISA, Western 印迹,放射免疫测定和免疫沉淀测定。通过测量由包括来源于 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的激活的效应细胞分泌的细胞因子谱(例如通过 ELISpot 量化产生 IFN γ 的细胞)、通过确定免疫效应细胞的活化状态(例如通过经典的 [³H] 胸苷吸收的 T 细胞增殖测定)、通过在敏化事物中测定抗原特异性 T 淋巴细胞(例如在细胞毒性测定中肽特异性裂解)可进行细胞免疫的测定。通过 ELISpot,基于四聚体的分析技术或其他标准技术分析 T 细胞介导的免疫,在适合的动物模型中也可以评价多肽的免疫原性性质。适合的免疫原性多肽可获得自乙型肝炎病毒(HBV)(例如,在 EP 414 374;EP 304578 或 EP 198 474 中描述的 S, preS2 或 preS1-多肽);丙型肝炎病毒(HCV)(例如,核心 C,包膜糖蛋白 E1,E2,非结构多肽 NS2,NS3,NS4 或 NS5 或其任意组合);人类免疫缺陷病毒(HIV)(例如 gp120 或 gp160),和乳头瘤病毒。

[0052] 包含在本发明嵌合多肽中的乳头瘤病毒免疫原性多肽可以是早期,晚期或其任意组合。早期乳头瘤病毒多肽包括 E1,E2,E4,E5,E6 和 E7,而晚期多肽可以是 L1 或 L2。其优选获得自选自 HPV-16, HPV-18, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-70 和 HPV-85 组的乳头瘤病毒。文献中已描述并可在专门的数据库中获得大量乳头瘤病毒基因组的核苷酸序列和编码多肽的氨基酸序列。通常,HPV-16 基因组在 Genbank 中以登录号 NC_01526 和 K02718 描述;HPV-18 以 NC_001357 和 X05015 描述;HPV-31 以 J04353 描述;HPV-33 以 M12732 描述;HPV-35 以 NC_001529 描述;HPV-39 以 NC_001535 描述;HPV-45 以 X74479 描述;HPV-51 以 NC_001533 描述;HPV-52 以 NC_001592 描述;HPV-56 以 X74483 描述;HPV-58 以 D90400 描述;HPV-59 以 NC_001635 描述;HPV-68 以 X67160 和 M73258 描述;HPV-70 以 U21941 描述;和 HPV-85 以 AF131950 描述。但是,本发明不限于这些示例的序列。事实上,在不同乳头瘤病毒分离株之间观察到的天然突遗传变体包括在本发明的范围内,也包含如文献中描述的本领域技术人员可获得的非天然修饰(见例如 Yasugi 等,1997, J. Virol 71,5942-51 描述了修饰的 E1 多肽;Sakai 等.,1996, J. Virol. 70,1602-1611 描述了修饰的 E2 多肽和 W099/03885 描述了修饰的 E6 和 E7 多肽,适用于本发明)。

[0053] “抗肿瘤”多肽指能够提供肿瘤细胞扩增抑制或净减少的多肽。通过在适当的动物模型中或处理的对象中在一段时间中实际肿瘤大小的减少可确定多肽的抗肿瘤性质。可使用多种方法评价肿瘤大小,包括辐射方法(例如,单光子或正电子发射断层扫描,通常见“Nuclear Medicine in Clinical Oncology,” Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, New York, 1986),方法使用常规成像试剂(例如镓-67 柠檬酸盐),免疫学方法(例如放射性标记的针对特异肿瘤抗原的单克隆抗体)以及超声方法(见“Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors”, Kossoff and Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, New York, 1984)。或者,可以基于肿瘤标记物存在的减少确定多肽的抗肿瘤性质。实例包括 PSA 检测前列腺癌和 CEA 检测结肠直肠癌和某些乳腺癌。进一步,在适合的动物模型中例如使用注射典型的人癌细胞系的小鼠可确定多肽的抗肿瘤性质。可触摸的肿瘤发育之后,小鼠注射本发明载体,然后监测降低的肿瘤生长率和增加的存活。另外,大量的体外方法可用于

预测体内肿瘤抑制。适合的抗肿瘤多肽包括肿瘤相关抗原 (TAA) 例如 MUC-1 (W092/07000 ; Acres et al., 2005, Exp. Rev. Vaccines 4(4)), BRCA-1, BRCA-2 (Palma et al., 2006, Critical Reviews in Oncology/haematology 27, 1-23), 癌胚抗原 CEA (Conroy et al., 1995, Gene Ther ; 2, 59-65), MAGE (W099/40188 ; DePlaen et al., 1994, Immunogenetics 40, 360-369), MART-1, gp 100 (Bakker et al., 1994, J. Exp. Med. 179, 1005-9), PRAME, BAGE, Lage (也已知为 NY Eos1) SAGE, HAGE (W099/53061), GAGE (Robbins and Kawakami, 1996. Current Opinions in Immunol. 8, 628-36) 和前列腺特异性抗原 (PSA) (Ferguson, et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 3114-9 ; W098/12302, W098/20117 和 W000/04149) 以及来自具有肿瘤诱导潜能的病毒的病毒多肽。

[0054] 本发明也提供了分离的核酸分子, 包含、基本上由或由编码本发明肽或本发明嵌合多肽的至少一个核苷酸序列或组成。

[0055] 在一个优选的实施方案中, 本发明提供了分离的核酸分子, 其包含 SEQ ID NO : 11-28 中任一所示的至少一个核苷酸序列。

[0056] 更特别地, SEQ ID NO : 11, SEQ ID NO : 14 和 SEQ ID NO : 15 的核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO : 1 的氨基酸序列的信号肽, SEQ ID NO : 12 的核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列的信号肽, SEQ ID NO : 13 的核苷酸序列编码存在于 Nishigahara 株狂犬病糖蛋白的信号肽 (UniProt 登录号 S72465 中揭示) 和 SEQ ID NO : 16 的核苷酸序列编码存在于 ERA 株狂犬病糖蛋白的信号肽 (UniProt 登录号 M38452 中揭示)。

[0057] SEQ ID NO : 17 和 SEQ ID NO : 22 所示核苷酸序列编码存在于 PG 株狂犬病糖蛋白中的天然膜锚定肽 (UniProt 登录号 ay009097 中揭示) ; SEQ ID NO : 18 所示核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO : 3 氨基酸序列的膜锚定肽 ; SEQ ID NO : 19 所示核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO : 4 氨基酸序列的膜锚定肽 ; SEQ ID NO : 20 和 21 所示核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO : 5 的氨基酸序列的膜锚定肽。

[0058] SEQ ID NO : 23 (M38452, v1) 的核苷酸序列包含通过 BamHI 接头连接到 SEQ ID NO : 17 的核苷酸序列的 SEQ ID NO : 11 所示的核苷酸序列 ; SEQ ID NO : 24 的核苷酸序列包含通过 BamHI 接头连接到 SEQ ID NO : 18 的核苷酸序列的 SEQ ID NO : 12 所示的核苷酸序列 ; SEQ ID NO : 25 的核苷酸序列包含通过 BamHI 接头连接到 SEQ ID NO : 19 的核苷酸序列的 SEQ ID NO : 13 所示的核苷酸序列 ; SEQ ID NO : 26 的核苷酸序列包含通过 BamHI 接头连接到 SEQ ID NO : 20 的核苷酸序列的 SEQ ID NO : 14 所示的核苷酸序列 ; SEQ ID NO : 27 的核苷酸序列包含通过 BamHI 接头连接到 SEQ ID NO : 21 的核苷酸序列的 SEQ ID NO : 15 所示的核苷酸序列 ; 和 SEQ ID NO : 28 的核苷酸序列包含通过 BamHI 接头连接到 SEQ ID NO : 22 的核苷酸序列的 SEQ ID NO : 16 所示的核苷酸序列。

[0059] 而且, 已工程化 SEQ ID NO : 23-28 的核苷酸序列以减少彼此之间的同源性百分比少于 75%, 如所附实施例部分所述, 因此在多基因表达载体中允许联合使用至少两种这种序列以能够分泌和 / 或膜锚定多个感兴趣多肽。当多个多肽需要从一个单载体表达和分泌和 / 或转运到细胞膜上时, 联合使用本发明的核苷酸序列具有优势。当同源序列存在于同一载体上时, 使用本发明的核苷酸序列允许减少可能发生的同源性重组事件的风险。本领域已知天然的狂犬病信号传导序列与它们之间呈现高度的同源性, 这种同源性阻碍它们的联合使用, 其可负面影响载体稳定性和导致不适合人类使用的载体原液。

[0060] 通过修饰密码子使用模式,典型地实现本发明的 2 个核酸分子之间的同源性百分比的减少。作为起点,可以使用修饰之前核酸分子之间的序列排列以揭示其同源性部分。遗传密码的简并用于减少这种同源性部分中的同源性百分比到少于 75%。但是甲硫氨酸和色氨酸残基每个由唯一的核酸三联体编码(即密码子),不同的密码子可用于编码 18 个其他氨基酸(遗传密码的简并)。通过使用其他密码子替代一或多个“天然”密码子典型地进行密码子使用模式的修饰。例如,使用编码 Arg 的 CGC 密码子替代编码 Arg 的 AGA 密码子将在密码子的 3 个位置中的 2 个上减少同源性。不需要简并所有天然密码子,因为部分替代可充分减少同源性。

[0061] 而且,本领域技术人员可进一步修饰揭示的核苷酸序列。例如,编码存在于信号肽 N 末端的起始物 Met 残基的第一个密码子和 / 或编码存在于膜锚定肽 C 末端的 TGA STOP 密码子的最后密码子可被缺失,如果感兴趣多肽被装备这样的调节密码子。而且,也可能将存在于信号和膜锚定序列连接处的 BamHI 接头用另一个含限制性位点更适合克隆多肽编码核苷酸序列的接头取代。

[0062] 在一个优选的实施方案中,编码感兴趣多肽的核苷酸序列包含在本发明的核酸分子内的编码信号肽的核苷酸序列(SEQ ID NO:11-16 中定义)和编码膜锚定肽的核苷酸序列(SEQ ID NO:17-22 中定义)之间的连接处。更优选地,它在 SEQ ID NO:23-28 的 BamHI 接头内大约位置 70 和大约位置 76 之间插入。

[0063] 在另一个优选的实施方案中,本发明的核酸分子被置于恰当的调节元件的控制下以确保其在给定的宿主细胞或生物体中表达。如本文所用,术语“调节序列”指任意序列,其允许、有助于或调节核酸分子在给定的宿主细胞中的表达,包括复制,重复,转录,剪接,翻译,稳定性和 / 或转运核酸或其任意衍生物(例如 mRNA)进入宿主细胞。这样的调节序列在本领域已知(见例如 Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego)。本领域技术人员将意识到调节序列的选择可依赖于因素如载体类型,宿主细胞,所需表达水平等。

[0064] 启动子是特别重要的,本发明包括使用在许多类型宿主细胞中指导核酸分子的表达的组成型启动子和仅在某些宿主细胞中(例如组织特异性调节序列)或在应答特异性事件或外源因子(例如温度,营养添加剂,激素或其他配体)时指导表达的那些。在真核系统中适合组成型表达的启动子包括病毒启动子如 SV40 启动子,巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子或增强子(Boshart et al., 1985, Cell 41, 521-530),腺病毒早期和晚期启动子,单纯疱疹病毒(HSV)-1 的胸苷激酶(TK)启动子和逆转录病毒长末端重复序列(例如 MoMuLV 和 Rous 肉瘤病毒(RSV)LTR)以及细胞启动子如甘油磷酸激酶(PGK)启动子(Hitzeman et al., 1983, Science 219, 620-625; Adra et al., 1987, Gene 60, 65-74)。用于驱动痘病毒载体中的核酸分子表达的适合的启动子包括痘苗病毒的 7.5K, H5R, TK, p28, p11 或 K1L 启动子。或者,可使用合成启动子如 Chakrabarti 等(1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond et al. (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) 和 Kumar 和 Boyle (1990, Virology 179, 151-158) 描述的那些以及早期和晚期痘病毒启动子之间的嵌合启动子。

[0065] 可诱导启动子由外源提供的化合物调节,包括但不限于锌诱导型金属硫蛋白(MT)启动子(Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848),地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子, T7 聚合酶启动子系统(WO 98/10088),蜕皮激素昆

虫启动子 (No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351), 四环素阻抑启动子 (Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551), 四环素诱导型启动子 (Kim et al., 1995, J. Virol. 69, 2565-2573), RU486 诱导型启动子 (Wang et al., 1997, Nat. Biotech. 15, 239-243 and Wang et al., 1997, Gene Ther. 4, 432-441), 雷帕霉素诱导型启动子 (Magari et al., 1997, J. Clin. Invest. 100, 2865-2872) 和来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的 lac, TRP, 和 TAC 启动子。

[0066] 本发明使用的调节序列也可以是组织特异性的以驱动核酸分子在期望治疗益处的特异性组织中表达。合适的启动子可得自优先在肿瘤细胞中表达的基因。例如通过展示和比较基因组杂交可鉴定这种基因 (见例如 US5, 759, 776 和 5, 776, 683)。

[0067] 本领域技术人员将意识到控制核酸分子表达的调节元件还可包含额外元件用于正确起始, 调节和 / 或终止转录 (例如 polyA 转录终止序列), mRNA 转运 (例如核定位信号序列), 加工 (例如剪接信号), 稳定性 (例如内含子和非编码 5' 和 3' 序列) 和翻译 (例如三联前导序列, 核糖体结合位点, Shine-Dalgarno 序列等) 进宿主细胞或生物体。

[0068] 本发明也提供用于表达一或多个本发明嵌合多肽的载体。有利地, 本发明载体包含一或多个在此描述的核酸分子, 优选 2, 3 或甚至 4 个核酸分子。期望地, 每个插入本发明载体的核酸分子至少在信号肽, 膜锚定肽和 / 或其编码的感兴趣多肽上不同。优选地, 本发明的载体包含 2, 3, 4 或甚至更多的编码信号肽和膜锚定肽的核苷酸序列, 其彼此之间呈现的同源性百分比少于 75% (例如选自 SEQ ID NO: 23-28 组成的组中)。更优选地, 本发明载体包含 SEQ ID NO: 24 的核苷酸序列以能够表达第一个感兴趣多肽到细胞膜和包含 SEQ ID NO: 28 的核苷酸序列以能够表达第二个感兴趣多肽到细胞膜上。

[0069] 多种载体系统可用于表达本发明的嵌合多肽, 包括适于原核细胞 (例如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)) 的噬菌体、质粒或粘粒; 适于酵母宿主细胞 (例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*)、巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*)) 的酵母表达载体; 适于昆虫宿主细胞 (例如 SF9 细胞) 的病毒表达载体 (例如杆状病毒); 适于植物细胞的病毒表达载体 (例如花椰菜花叶病毒 CaMV; 烟草花叶病毒 TMV) 或适于植物细胞的质粒载体 (例如 Ti 质粒); 或适于高等真核宿主细胞或生物体的质粒或病毒载体。

[0070] 适合在原核系统中使用的载体包括但不限于 pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201), pTrc (Amann et al., 1988, Gene 69, 301-315); pET 11d (Studier et al., 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, 60-89); pIN (Inouye et al., 1985, Nucleic Acids Res. 13, 3101-3109); Van Heeke et al., 1989, J. Biol. Chem. 264, 5503-5509) 和 pGEX 载体, 其中本发明的核酸分子可以与谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 的融合形式表达。

[0071] 适合在酵母 (例如酿酒酵母) 中表达的载体包括但不限于 pYepSec1 (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6, 229-234), pMFa (Kujan et al., 1982, Cell 30, 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987; Gene 54, 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) 和 pTEF-MF (Dualsystems Biotech Productcode: P03303)。

[0072] 适合在真核宿主细胞或生物体中表达的载体可以是病毒或非病毒的 (例如质

粒 DNA)。适合的质粒载体包括但不限于 pREP4, pCEP4(Invitrogene), pCI(Promega), pCDM8(Seed, 1987, Nature 329, 840) 和 pMT2PC(Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6, 187-195), pVAX 和 pgWiz(GeneTherapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746)。在此使用的“病毒载体”具有本领域已知的意义。其指任意的包含至少一个病毒来源元件的载体, 包括完全的病毒基因组, 其部分或以下描述的修饰的病毒基因组以及其产生的病毒颗粒(例如病毒载体包装进病毒壳体以产生感染性病毒颗粒)。本发明的病毒载体可以是复制型或可以是遗传缺陷的以便是复制缺陷的或复制受损的。在此使用的术语“复制型”包含选择性复制和条件性复制病毒载体, 其被工程化以更好地复制或可选择地在特异宿主细胞(例如肿瘤细胞)中复制。病毒载体可以得自大量不同的病毒, 特别是得自选自逆转录病毒, 腺病毒, 腺相关病毒(AAV), 痘病毒, 疱疹病毒, 麻疹病毒和泡沫病毒一组中的病毒。

[0073] 在一个实施方案中, 本发明的载体是腺病毒载体(综述见“Adenoviral vectors for gene therapy”, 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press)。其可能来源于任何人类或动物腺病毒。在本发明中可使用任何的血清型和亚群。可引用更独特的亚群 A(例如血清型 12, 18, 和 31), 亚群 B(例如血清型 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 和 35), 亚群 C(例如血清型 1, 2, 5, 和 6), 亚群 D(例如血清型 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 和 42-47), 亚群 E(血清型 4), 亚群 F(血清型 40 和 41)。特别优选地是人腺病毒 2(Ad2), 5(Ad5), 6(Ad6), 11(Ad11), 24(Ad24) 和 35(Ad35)。这种腺病毒可获得自在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, Md.) 并已有大量出版物主题描述它们的序列, 构成和生产方法, 允许本领域技术人员应用它们(见例如 US 6, 133, 028; US 6, 110, 735; W002/40665; W000/50573; EP 1016711; Vogels et al., 2003, J. Virol. 77, 8263-8271)。

[0074] 本发明的腺载体可以是复制型的。本领域技术人员很容易获得大量复制型腺病毒载体的实例(见例如 Hernandez-Alcoceba et al., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis et al., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727; W000/24408; US5, 998, 205, W099/25860, US5, 698, 443, W000/46355, W000/15820 和 W001/36650)。

[0075] 或者, 本发明的腺病毒载体可以是复制缺陷型的(见例如 W094/28152)。优选的复制缺陷型腺病毒载体是 E1 缺陷的(例如 US 6, 136, 594 和 US6, 013, 638), 带有从大约 459 位置延伸到 3328 位置或从大约 459 位置延伸到 3510 位置(参考在 GeneBank 登录号 M 73260 揭示的人腺病毒类型 5 的序列和 Chroboczek et al., 1992, Virol. 186, 280-285 中)的 E1 缺失。通过缺失腺病毒基因组的额外部分(例如 Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032 描述的在非必需 E3 区或其他必需 E2, E4 区)还可改善克隆容量和安全性。

[0076] 本发明的核酸分子可以插入腺病毒载体的任何位置, 如 Chartier 等(1996, J. Virol. 70, 4805-4810) 描述和以相对于插入区天然转录方向的正义和 / 或反义方向放置。例如, 其可插入替代 E1 区或可选择地替代 E3 区。

[0077] 在另一个实施方案中, 本发明的载体是痘病毒载体(见例如 Cox et al. in “Viruses in Human Gene Therapy” Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press)。其可得自任何痘病毒科成员, 特别是金丝雀痘病毒(例如 W095/27780 描述的 ALVAC), 禽痘病毒(例如 Paoletti et al., 1995, Dev. Biol. Stand. 84, 159-163 描述的 TROVAC)

或痘苗病毒,优选后者。适合的痘苗病毒可选自 Copenhagen 株 (Goebel et al.,1990, Virol.179,247-266 and 517-563;Johnson et al.,1993, Virol.196,381-401), Wyeth 株, NYVAC(见 W092/15672 和 Tartaglia et al.,1992, Virology 188,217-232) 和高减毒修饰的 Ankara(MVA) 株 (Mayr et al.,1975, Infection 3,6-16) 组成的组中。这种载体和生产方法在大量本领域技术人员可获得的文件中描述(例如 Paul et al.,2002, Cancer geneTher.9,470-477;Piccini et al.,1987, Methods of Enzymology 153,545-563;US 4,769,330;US 4,772,848;US 4,603,112;US 5,100,587 和 US 5,179,993)。本发明的核酸分子优选插入痘病毒基因组的非必需基因座以便于重组痘病毒保持活性和感染性。非必需区是非编码基因间区域或任意基因,其失活或缺失不显著削弱病毒生长,复制或感染。可以预计插入必需病毒基因座,条件是在生产病毒颗粒过程中反式补充缺陷的功能,例如通过使用辅助细胞系,其携带相应于痘病毒基因组缺失的序列的互补序列。

[0078] 当使用 Copenhagen 痘苗病毒时,核酸分子优选插入胸苷激酶基因(tk) (Hruby et al.,1983, Proc.Natl.Acad.Sci USA 80,3411-3415;Weir et al.,1983, J.Virol.46, 530-537)。但是,其它插入位点也是恰当的,例如在血凝素基因内 (Guo et al.,1989, J.Virol.63,4189-4198),在 K1L 基因座内,在 u 基因 (Zhou et al.,1990, J.Gen.Virol.71, 2185-2190) 或痘苗病毒基因组的左末端,其中在文献中已报道了大量自发或工程化的缺失 (Altenburger et al.,1989, ArchivesVirology.105,15-27;Moss et al.1981, J.Virol.40,387-395;Panicali et al.,1981, J.Virol.37,1000-1010;Perkus et al, 1989, J.Virol.63,3829-3836;Perkus et al,1990, Virol.179,276-286;Perkus et al, 1991, Virol.180,406-410)。

[0079] 当使用 MVA 时,核酸分子可插入出现在 MVA 基因组中的已鉴定的缺失 I 到 VII 的任意一个 (Antoine et al.,1998,Virology 244,365-396) 以及 D4R 基因座中,但是插入缺失 II 和 / 或 III 是优选的 (Meyer et al.,1991, J.Gen.Virol.72,1031-1038;Sutter et al.,1994, Vaccine 12,1032-1040)。

[0080] 当使用禽痘病毒时,虽然可考虑在胸苷激酶基因内插入,核酸分子优选导入位于 ORF 7 和 9 之间的基因间区域(见例如 EP 314 569 和 US5,180,675)。

[0081] 而且,本发明载体也可以包含一或多个额外元件,其能够在给定的宿主细胞或生物体内维持,增殖或表达核酸分子。这种额外元件包括但不限于标记物基因以促进重组宿主细胞的鉴定和分离(例如通过细胞营养缺陷型的互补或抗生素抗性),稳定元件(例如 Summers and Sherratt,1984,Cell 36,1097-1103 和 US 5,198,343 描述的 DAP 系统),和整合元件(例如 LTR 病毒序列和转座子)。

[0082] 本发明也提供了包含上述核酸分子或载体的感染性病毒颗粒。在此将不详细描述已知用于生产感染性病毒颗粒的多种方法。典型地,这种病毒颗粒通过包括如下步骤的过程生产:(a) 将病毒载体导入适合的细胞系,(b) 在适合的条件下培养细胞系以允许生产所述感染性病毒颗粒,从所述细胞系的培养物回收生产的感染性病毒颗粒,和任选纯化所述回收的感染性病毒颗粒。

[0083] 当病毒载体是缺陷型的时候,通常在反式补充非功能性病毒基因的互补细胞系中生产感染性颗粒。例如,互补 E1 缺失的腺病毒载体的适合细胞系包括 293 细胞 (Graham et al.,1997, J.Gen.Virol.36,59-72), PER-C6 细胞 (Fallaux et al.,1998, Human Gene

Ther. 9, 1909-1917) 和 HER96 细胞。适合增殖痘病毒载体的细胞是禽类细胞, 最优选自受精卵获得的鸡胚制备的原代鸡胚成纤维细胞 (CEF)。生产者细胞可以在常规发酵生物反应器, 培养瓶和 Petri 平板中、在适合温度下、pH 和氧含量条件下培养。感染性病毒颗粒可以从培养上清液或裂解后的细胞中回收。依据标准技术进一步纯化 (如 W096/27677, W098/00524, W098/22588, W098/26048, W000/40702, EP1016700 和 W000/50573 所述的色谱, 超速离心) 它们。

[0084] 本发明也包含病毒载体, 其被修饰以允许优先靶定到特定的宿主细胞。被靶定的载体的典型特征是它们的表面存在能够识别和结合细胞和表面暴露成分如细胞特异性标记物 (例如 HPV 感染的细胞)、组织特异性标记物或肿瘤特异性标记物的配体。配体可被遗传插入存在于载体表面的多肽 (例如 W094/10323 和 W002/96939 中描述的腺病毒纤维, 五邻体, pIX 或 EP 1146 125 描述的痘苗 p14 基因产物)。

[0085] 本发明也涉及包含上述核酸分子、载体或感染性病毒颗粒的宿主细胞。

[0086] 本发明的宿主细胞包括原核细胞 (例如大肠杆菌, 芽孢杆菌, 李斯特菌), 低等真核细胞如酵母 (例如酿酒酵母, 粟酒裂殖酵母, 巴斯德毕赤氏酵母), 和其它真核细胞如昆虫细胞, 植物和高等真核细胞, 特别优选哺乳动物细胞 (例如人或非人细胞)。适合的宿主细胞的典型实例包括但不限于 BHK (幼仓鼠肾) 细胞, MDCK 细胞 (Madin-Darby 犬肾细胞系), CRFK 细胞 (Crandell 猫肾细胞系), CV-1 细胞 (非洲猴肾细胞系), COS (例如 COS-7) 细胞, 中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 小鼠 NIH/3T3 细胞, HeLa 细胞和 Vero 细胞。术语“宿主细胞”还涵盖能够互补如上所述的本发明的复制缺陷型载体 (例如腺病毒载体) 的至少一种缺陷的功能的互补细胞。

[0087] 在分离的宿主细胞中导入核酸分子、载体或感染性颗粒的方法是本领域常规的, 包括例如显微注射 (Capechi et al., 1980, Cell 22, 479-488), CaPO_4 介导的转染 (Chen and Okayama, 1987, Mol Cell Biol. 7, 2745-2752), DEAE-葡聚糖介导的转染, 电穿孔 (Chu et al., 1987, Nucleic Acid Res. 15, 1311-1326), lipofection/脂质体融合 (Feigner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417), 颗粒轰击 (Yang et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9568-9572), 基因枪, 转导, 病毒感染以及通过多种手段直接施用给宿主生物体。

[0088] 通过重组手段, 宿主细胞可用于生产本发明核酸分子、载体或感染性颗粒编码的感兴趣多肽。本领域已知这种技术 (见例如 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-2002; 和最新版 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0089] 在本发明的另一个实施方案中, 上述嵌合多肽, 核酸分子, 载体, 感染性病毒颗粒或宿主细胞 (在此也表示为“活性物质”) 或其任意组合包含在组合物中。有利地, 所述组合物是药物组合物, 其包含治疗有效量的活性物质和药物可接受的载体。在此所使用的“治疗有效量”是在宿主生物体内足以缓和一或多个通常与希望治疗或预防的疾病或病症相关的症状的剂量。当考虑到预防使用时, 这个术语表示足以在宿主生物体内防止或延迟疾病或病症建立的剂量。例如, 治疗有效量可以是在被治疗的生物体内足以诱导或增强免疫反应的量, 或足以减轻, 改善, 稳定, 反转, 减慢或延迟疾病进程 (例如减少大小或衰退损害或肿瘤, 逆转病毒感染)。

[0090] 如在此所用,“药物可接受的载体”包括任何和所有的载体,溶剂,稀释剂,赋形剂,佐剂,分散介质,包被剂,抗菌剂和抗真菌剂,和吸收延迟剂等等,与药物施用相容。期望地,本发明的组合物包含一或多个在使用的剂量和浓度无毒性的载体和/或稀释剂。这样的载体和/或稀释剂优选选自那些通常用于配制单位剂量或多剂量形式的组合物以全身或粘膜施用。适合的载体可以是溶剂,分散介质,含有例如水,乙醇,多羟基化合物(例如甘油,丙二醇,液体聚乙二醇等),植物油或其恰当的混合物。优选地,稀释剂是等渗的、低渗的或弱高渗的并具有相对低的离子强度。适合的稀释剂的典型实例包括无菌水,生理盐水(例如氯化钠),Ringer's 溶液,葡萄糖,海藻糖或蔗糖溶液,Hank's 溶液和其他含水生理平衡的盐溶液(见例如最新版 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilking)。本发明组合物的 pH 是被恰当地调节和缓冲以适用于人类和动物,优选在生理或微碱性 pH(大约 pH7.5 到大约 pH9 之间,特别优选 pH8-8.5)。适合的缓冲液包括磷酸缓冲液(例如 PBS),重碳酸盐缓冲液和/或 Tris 缓冲液。特别优选的组合物(特别地当活性物质是腺病毒载体时)是以 1M 蔗糖,150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 54mg/l Tween 80, 10mM Tris pH 8.5 配制的。另一个优选的组合物以 10mg/ml 甘露醇, 1mg/ml HAS, 20mM Tris, pH 7.2 和 150mM NaCl 配制。这样的配制物特别适于保存本发明组合物的稳定性超过至少 2 个月,无论是在冷冻(例如 -70°C, -40°C, -20°C)或冷藏(例如 4°C)温度下。

[0091] 组合物也可以含有一或多个药物可接受的赋形剂以提供期望的药物或药代性质,包括例如更改或维持配制物的 pH、渗透压、粘性、清晰度、颜色、无菌度、稳定性、溶解速度,更改或维持释放或吸收进入人或动物。

[0092] 另外,本发明组合物可包含一或多个适于人体全身或粘膜施用的佐剂。“佐剂”,其表示具有增强对特定抗原的免疫反应的能力的化合物。佐剂可以是在抗原部位或其附近输送。典型地通过针对抗原的抗体滴度的显著增加(通常超过 10 倍)来显示体液免疫的增强。例如通过阳性皮肤测验,细胞毒性 T 细胞测定, ELISPOT 测定 IFN γ 或 IL-2 测量细胞免疫的增强。优选地,本发明使用的佐剂能够刺激对活性物质的免疫,特别通过 toll 样受体 (TLR) 如 TLR-7、TLR-8 和 TLR-9 进行。有用佐剂的代表性实例包括但不限于明矾,矿物油乳剂如 Freund's 完全和不完全佐剂 (IFA),脂多糖或其衍生物 (Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-19),皂苷如 QS21 (Sumino et al., 1998, J. Virol. 72, 4931-9; WO 98/56415),咪唑啉化合物如咪唑啉莫特 (imiquimod) (Suader, 2000, J. Am Acad Dermatol. 43, S6-S11), 1H-咪唑 (4,5-c) 喹啉 -4-胺 (1H-imidazo(4,5-c)quinolon-4-amine) 衍生物 (AldaraTM) 和相关化合物 (Smorlesi, 2005, Gene Ther. 12, 1324-32),胞嘧啶 - 磷酸盐 - 鸟嘌呤寡脱氧核苷酸如 CpG (Chu et al., 1997, J. Exp. Med. 186:1623; Tritel et al., 2003, J. Immunol. 171: 2358-2547) 和阳离子肽如 IC-31 (Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci 822, 263-70)。

[0093] 本发明的组合物可以是多种形式,例如固体(例如干粉或冻干形式)或液体(例如含水)。活性物质的固体组合物加上任意额外的所需成分可得自其先前过滤灭菌的溶液,真空干燥和冻干。如果需要,其可以被保存于无菌安瓿瓶中准备通过在使用前添加适合的载体重构 (reconstitution)。

[0094] 本发明的嵌合多肽,核酸分子,载体,感染性颗粒或组合物可通过多种施用模式施用,包括全身,局部和粘膜施用。通过任何方式,例如皮下,皮内,肌内,静脉内,腹膜内,血管内,动脉内注射进行全身施用。使用常规注射器和针头或本领域可获得的任何其他设备进行注射。经口,鼻,气管内,肺内,阴道内或直肠内途径进行粘膜施用。使用透皮方式(例如贴片等)进行局部施用。肌内或皮下施用特别优选病毒载体和感染性颗粒作为活性物质。

[0095] 恰当的剂量可依赖于如特定活性物质的药代特征,患者年龄,健康和体重,要治疗的病症,症状的性质和程度,合并治疗的种类,治疗频率,需要预防或治疗和/或所需效果等已知因素而改变。剂量的计算也依赖于选择的特别施用途径。进一步由从业者依据相关情况对需要确定恰当的治疗剂量常规进行计算的改进。通常,腺病毒颗粒的适合剂量从大约 10^5 到大约 10^{13} iu(感染单位),期望从大约 10^7 到大约 10^{12} iu 和优选从大约 10^8 到大约 10^{11} iu。痘苗病毒颗粒的适合剂量从大约 10^4 到大约 10^{10} pfu(噬斑形成颗粒),期望从大约 10^5 到大约 10^9 pfu 和优选从大约 10^6 到大约 5×10^8 pfu。载体质粒可以 $10 \mu\text{g}$ 到 20mg 之间的剂量施用,优选 $100 \mu\text{g}$ 和 2mg 之间和嵌合多肽的剂量在 $0.5 \mu\text{g}$ 到 5g 之间,优选在 $5 \mu\text{g}$ 和 500mg 之间。

[0096] 而且,可以单剂量或可选择地依据几小时、几天和/或几周的标准方案、剂量和方案以多剂量进行施用。而且,可以经推注或连续灌注进行施用。例如,可以以周间隔进行 3 次连续施用,随后至少在第一系列之后的 4 到 6 个月以内进行至少一次施用。通常,使用 MVA 载体作为治疗剂,优选施用途径是用 10^6 到 5×10^8 pfu 之间剂量的 MVA 颗粒经皮下进行。

[0097] 本发明的嵌合多肽,核酸分子,载体,感染性颗粒,宿主细胞或组合物可以用于治疗或预防多种疾病和病理病症包括遗传疾病,先天疾病和后天疾病的方法中。本发明也涉及本发明嵌合多肽,载体,感染性颗粒,宿主细胞或组合物用于制备治疗或预防这种疾病的药物的应用。其特别适合治疗或预防传染病(例如病毒和/或细菌感染),癌症和免疫缺陷疾病。术语“癌症”包含任意癌性病症,其源于非所需的细胞增殖包括扩散或定位的肿瘤,转移,癌息肉和癌前病变(例如瘤形成)。本发明预期的癌症包括但不限于成胶质细胞瘤,肉瘤,黑色素瘤,肥大细胞瘤,癌以及乳腺癌,前列腺癌,睾丸癌,卵巢癌,子宫内膜癌,宫颈癌(特别是与乳头瘤病毒相关的那些),肺癌(例如包括大细胞肺癌,小细胞肺癌,鳞状细胞肺癌和腺癌),肾癌,膀胱癌,肝癌,结肠癌,肛门癌,胰腺癌,胃癌,胃肠癌,口腔癌,喉癌,脑和 CNS 癌,皮肤癌(例如黑素瘤和非黑素瘤),血癌(淋巴瘤,白血病,特别地若它们已经发展为实体),骨癌,成视网膜细胞瘤和甲状腺癌。传染病包含那些由任意病原微生物如病毒导致的疾病。本发明预期的传染病包括与肝炎病毒(例如甲肝,乙肝或丙肝病毒)感染相关的疾病。本发明预期的其他传染病包括那些与乳头瘤病毒(例如 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-45, HPV-52) 相关的疾病,这样的疾病包括持续感染,癌前病变(例如低、中或高等级宫颈上皮内瘤形成)和癌变(例如宫颈癌)。

[0098] 本发明也提供用于重组产生多肽的方法,其包含步骤 a) 将本发明的载体或感染性病毒颗粒导入宿主细胞, b) 在允许表达感兴趣多肽的条件下培养所述转化的宿主细胞,和 c) 从培养物回收和任选纯化所述多肽。

[0099] 在一个实施方案中,依据本发明方法生产多肽以分泌到细胞外培养基中。优选地,所述多肽包括在带有在此描述的信号肽的嵌合多肽内,其中所述信号肽从所述嵌合多肽切

除,并且从培养基中回收所述多肽。

[0100] 在另一个实施方案中,依据本发明方法生产多肽以锚定到细胞膜上,特别优选附着在质膜的外表面。优选地,所述多肽以这样的方式锚定,即其可与其他细胞表面或存在于胞外培养基中的其他分子相互作用。优选地,所述多肽包括在带有在此描述信号肽和膜肽的嵌合多肽内,其中信号肽从嵌合多肽切除并且从培养的细胞中回收所述多肽。

[0101] 本发明也提供了指导感兴趣多肽在细胞外表达的方法,其包含步骤 (a) 通过将选自 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16 组成的组中的第一个核苷酸序列连接到编码所述多肽的第二个核苷酸序列上来产生核酸分子,其中所述核酸分子编码嵌合多肽,其从 N 到 C 端包含由所述第一个核苷酸序列编码的信号肽和所述感兴趣多肽;(b) 将所得的核酸分子插入表达载体和 (c) 将所述表达载体导入宿主细胞或生物体。如前所讨论,分泌过程中信号肽从嵌合多肽切割,然后感兴趣多肽释放到胞外。使用本领域常规技术其可以从培养基中回收和纯任选化。

[0102] 本发明也提供了指导锚定在质膜表面的多肽的表达的方法,其包括步骤 (a) 通过在选自 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 组成的组中的第一个核苷酸序列中在所述第一个核苷酸序列第 70 位的核苷酸和第 76 位的核苷酸之间的任意位置插入编码感兴趣多肽的第二个核苷酸序列而产生核酸分子,其中所述核酸分子编码嵌合多肽,其从 N 到 C 端包含由所述第一个核苷酸序列编码的信号肽,由所述第二个核酸编码的感兴趣多肽和由所述第一个核苷酸序列编码的膜锚定肽;(b) 将所得的核酸分子插入表达载体和 (c) 将所述表达载体导入宿主细胞或生物体。如上所讨论,所述信号肽从所述嵌合多肽上切割,带有膜锚定肽的多肽以这样的方式存在于表达宿主细胞的表面,即其可与其他细胞表面或存在于胞外介质中的其他分子相互作用。

[0103] 使用本领域已知的常规方法例如 Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), Ausubel et al. (1994, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y.) 和 Herdewijn (2004, Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology), Humana Press, Totowa, New Jersey) 等描述的方法可产生在此描述的本发明的核酸,载体和多肽(例如分离的、纯化的和合成的)。

[0104] 本发明以举例性的方式进行描述,可以理解已使用的术语应是说明的而不是限制的。显然,根据所述教导,可以对本发明进行许多修饰和变化。因此可以理解在所附的权利要求书的范围内,本发明可以与在此特别描述的方式不同的方式实施。

[0105] 所有上述提及的专利公开,出版物和数据库条目以每个这种单独的专利、出版物或条目特异和单独表明并入参考相同的程度以其全文特别并入本文参考。

[0106] 以下实施例用来说明本发明

实施例

[0107] 依据最新版 Sambrook 等 (A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY) 描述的常规基因工程和分子克隆技术或当使用商品化试剂盒时依据厂商建议进行以下描述的构建。本领域技术人员已熟知 PCR 扩增技术

(见例如 PCR protocols-A guide to methods and applications, 1990, published by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press)。携带氨苄青霉素抗性基因的重组质粒在补加 100 μ g/ml 抗生素的琼脂或液体培养基中的大肠杆菌 C600 (Stratagene), BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) 和 NM522 内复制。依据以上引用的文献和 Mackett 等 (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) 和 Mackett 等 (1984, J. Virol. 49, 857-864) 描述的本领域的常规技术进行重组痘苗病毒的构建。大肠杆菌的选择基因 gpt (黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶) (Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) 用于促进重组痘苗病毒的选择。

[0108] 实施例 1: 鉴定和评价新的信号传导序列

[0109] 已示出通过将重组蛋白质重新定向到质膜表面改善了重组 MVA 表达的抗原的呈递。在质膜上呈递需要将感兴趣基因克隆在编码信号肽和膜锚定肽的序列之间。这样的信号传导肽典型地存在于膜结合蛋白质中如多种病毒株的狂犬病糖蛋白并已被广泛用于在细胞表面表达感兴趣多肽 (见 W099/03885)。更特别地, 描述了 4 个不同的狂犬病病毒株并且编码的糖蛋白的氨基酸序列可在特殊的数据库获得, 例如在 NCBI 上的 Uniprot 中的登录号分别是 M38452 (ERA 株)、ay009097 (PG 株)、S72465 (Nishigahara 株) 和 u11751 (北极狐株)。但是, 当超过 2 个重组多肽需要定位到质膜表面时, 获得自这些可获得的狂犬病株的糖蛋白质的信号传导肽在多基因表达载体中的联合使用是不恰当的。由于其在核苷酸水平的高度同源性, 可能发生同源重组事件, 其可负面影响载体稳定性和载体原液不适于人类使用。

[0110] 本发明允许解决潜在的同源重组这个问题和提供来源于狂犬病糖蛋白的新的信号传导肽和编码这种肽的已被工程化以彼此呈现小于 75% 同源性的“简并的”核苷酸序列。这些序列通过修饰密码子使用模式而简并以降低 DNA 同源性, 因此限制了载体生产步骤中的重组风险。

[0111] 编码信号肽和膜锚定肽的 6 个新核苷酸序列被工程化, 其分别命名为 M38452, v1 (SEQ ID NO: 23), ay009097, v1 (SEQ ID NO: 24), S72465, v1 (SEQ ID NO: 25), u11751, v1 (SEQ ID NO: 26), u11751, v2 (SEQ ID NO: 27) 和 M38452, v2-ay009097v2 (SEQ ID NO: 28)。表 1 显示编码信号肽的本发明核苷酸序列呈现的同源性百分比, 表 2 说明编码膜锚定肽的本发明核苷酸序列呈现的同源性百分比。

[0112] a) 编码这些新信号传导序列的核苷酸序列的产生

[0113] 经组装重叠寡核苷酸产生核苷酸序列。更特别地, 每种情况中, 2 个寡核苷酸用于产生编码信号肽的序列和 4 个寡核苷酸用于产生编码膜锚定序列。然后, 每对合成序列插入 PBS 衍生的载体, 以提供 pTG15833 (S72465, v1), pTG15834 (u11751, v1), pTG15835 (M38452, v1), pTG15943 (ay009097, v1), pTG15944 (M38452, v2-ay009097, v2) 和 pTG15945 (u11751, v2)。

[0114] b) 评价新信号传导序列

[0115] 非致癌 HPV-16E7 蛋白 (如 W099/03885 描述缺失氨基酸残基 21 到 26 (Δ DLYCYE)) 用作模型蛋白质来评价由每 6 个序列的每一个编码的信号肽和膜锚定肽表达锚定到质膜的给定多肽的能力。编码 HPV-16E7 变体的核苷酸序列被克隆在每个上述质粒的信号肽编码序列和膜锚定肽序列之间的 BamHI 位点。在每种情况中, 表达置于痘苗病毒 p7.5K 启动

子控制下 (Cochran et al, 1985. J. Virol. 54, 30-37)。然后, 在瞬时转染原代鸡胚成纤维细胞 (CEF) 之后分析 E7 的表达和定位。使用 Lipofectine (Invitrogen) 用 $1 \mu\text{g}$ 质粒 DNA 转染以 1pfu/ 细胞的 MOI 用 MVATGN33.1 预先感染的 106 细胞。转染后 24 小时, 通过 Western 印迹分析 E7 表达水平。

[0116] 结果显示除了 pTG15833 显示更低表达水平 (序列 S72465v1 对应 SEQID NO:25), 在其他的每个检测质粒中 E7 的表达水平近似。值得注意的是, 所述表达水平与在获得自参考狂犬病毒株 ERA (M38452) 糖蛋白质的信号肽和膜锚定肽的控制下用表达 E7 的对照质粒观测到的水平是相同数量级的。

[0117] 通过免疫荧光分析细胞定位。使用 1pfu/ 细胞的 MOI 的 MVATG33.1 感染 7.5×10^4 BHK21 细胞, 然后使用 Lipofectin (Invitrogen) 用 $0.125 \mu\text{g}$ 质粒 DNA 转染。24 小时后, 使用兔多克隆抗 E7 抗体进行免疫荧光。正如所预料, 在质膜表面检测 E7 蛋白质的所有信号传导序列。

[0118] 总之, 新的信号传导序列可用于在宿主细胞表面表达一或多个锚定在质膜上的感兴趣多肽。

[0119] 表 1: 在此揭示的信号肽编码序列之间的 DNA 同源性百分比。

[0120]	M38452	M38452, v1	ay009097, v1	S72465, v1
u11751, v1	u11751, v2			
[0121]	M38452, v1	71.0		
[0122]	ay009097, v1	71.0	71.0	
[0123]	S72465, v1	66.7	66.7	68.1
[0124]	rvu11751, v1	69.6	75.4	68.1
[0125]	rvu11751, v2	68.1	71.0	73.9
				72.0
				71.0
[0126]	M38452, v2-	71.0	68.1	66.7
				65.2
				72.5
				71.0
[0127]	ay009097v2			

[0128] 表 2: 在此揭示的膜锚定肽编码序列之间的 DNA 同源性百分比。

[0129]	M38452	M38452, v1	ay009097, v1	S72465, v1
u11751, v1	u11751, v2			
[0130]	M38452, v1	66.5		
[0131]	ay009097, v1	63.8	62.9	
[0132]	S72465, v1	67.1	62.0	66.2
[0133]	rvu11751, v1	62.4	62.4	62.4
[0134]	rvu11751, v2	60.1	62.4	59.6
				65.2
				67.6
[0135]	M38452, v2-	59.6	56.3	64.8
				71.3
				63.8
				60.5
[0136]	ay009097v2			