

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 03806956.3

[51] Int. Cl.

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C08G 69/26 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 101044154A

[22] 申请日 2003.2.14 [21] 申请号 03806956.3

[30] 优先权

[32] 2002.2.14 [33] US [31] 60/357,740

[86] 国际申请 PCT/US2003/004482 2003.2.14

[87] 国际公布 WO2003/068934 英 2003.8.21

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.24

[71] 申请人 威廉·J·鲁特

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 威廉·J·鲁特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 9 页 说明书 55 页 序列表 2 页
附图 1 页

[54] 发明名称

治疗宿主中切割的嵌合分子

[57] 摘要

本发明涉及含有以非天然发生形式连接在一起的组分分子的嵌合分子，其中的连接子含有至少一个酶切位点，该酶切位点构建来由治疗宿主中的酶切割。本发明还涉及含有该嵌合分子的组合物和试剂盒，在生产宿主中制备该嵌合分子的方法，使用本发明的嵌合分子来诊断、预防、治疗和滋养有这种需要的宿主的方法。

1. 运输多个组分分子到多细胞宿主的方法，该方法包括步骤：

(a) 提供含有嵌合分子的组合物；和

(b) 将该嵌合分子给予宿主以产生治疗宿主，

其中该嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子，其中的连接子含有酶切位点且其中至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接，从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点；

其中该切割位点构建为由宿主酶体内切割且在生产宿主中对切割不敏感；

其中，在切割位点切割嵌合分子后，至少一个组分分子被功能活化；和

其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述切割位点构建为由宿主胃肠道中的酶体内切割。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述酶是肠激酶、基质金属蛋白酶或组织型纤溶酶原激活物。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中在酶切割位点切割嵌合分子后，至少两个组分分子被功能活化。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中在嵌合分子切割前，至少一个组分分子被功能活化。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述组分分子是非抑制性分子。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述组分分子是非细胞毒性分子。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第一组分分子和第二组分分子相同。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述嵌合分子具有结构式： $A(x_i B_i)^n$ ，其中 A 代表第一组分分子，x 代表连接子，B 代表第二组分分子，i 和 n 分别是正整数。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述结构式选自：

(a) $A(x_1 B_1)$ ；

(b) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)$ ，其中 x_1 和 x_2 可以相同或不同， B_1 和 B_2 可以相同或不同；

(c) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)$ ，其中 x_1 、 x_2 和 x_3 分别可以相同或不同， B_1 、 B_2 和 B_3 分别可以相同或不同；

(d) $A(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)(x_4B_4)$, 其中 x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 分别可以相同或不同, B_1 、 B_2 、 B_3 和 B_4 分别可以相同或不同; 和

(e) $A(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)(x_4B_4)(x_5B_5)$, 其中 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 和 x_5 分别可以相同或不同, B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 和 B_5 分别可以相同或不同。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述第一组分分子是肽或蛋白或其活性片段, 且至少一个第二组分分子选自肽、蛋白质、核酸、糖类、合成的聚合物、植物产物、真菌产物、小分子药物、可探测分子、半抗原、配体、抗感染物及其类似物和片段。

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子是多蛋白。

13. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述嵌合分子是多蛋白。

14. 如权利要求 10 所述的方法, 其中所述嵌合分子是多蛋白。

15. 如权利要求 10 所述的方法, 其中的 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 和 x_5 相同。

16. 如权利要求 10 所述的方法, 其中的 B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 和 B_5 相同。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自抗原、可溶性受体、生长因子、细胞因子、淋巴因子、趋化因子、酶、抗感染物、前药、毒素及其活性片段。

18. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自可溶性 p75TNF α 受体 Fc 融合体、人生长激素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- α 2b、聚乙二醇化(PEG)干扰素- α 、PEG-asparagase、PEG-adamase、抗-C017-1A、水蛭素、组织型纤溶酶原激活物、促红细胞生成素、人 DNA 酶、IL-2、凝血因子 IX、IL-11、TNK 酶、活化的蛋白 C、PDGF、凝血因子 VIIa、胰岛素、干扰素 α -N3、干扰素 γ 1b、干扰素 α 共有序列、血小板活化因子乙酰水解酶及其活性片段。

19. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第一组分分子是肽、蛋白或其活性片段, 第二组分分子是化学化合物。

20. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第一组分分子是抗体。

21. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第一组分分子是抗体或其活性片段, 且第二组分分子不是抗体。

22. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第二组分分子是抗体或其活性片段, 且第一组分分子不是抗体。

23. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第一和第二组分分子分别是抗体或其活性片段。

24. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自抗微生物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

25. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子是防卫肽、溶菌酶或乳铁蛋白。

26. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自人或非人动物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

27. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自植物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

28. 如权利要求 9 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自微生物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

29. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自鱼的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

30. 如权利要求 9 所述的方法, 其中至少两个组分分子选自肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

31. 如权利要求 1 所述的方法, 其中肽或蛋白质选自 IGF-I、EGF、PDGF、ITF、KGF、乳铁蛋白质、溶菌酶、血纤蛋白原、 α_1 -抗胰蛋白酶、促红细胞生成素、hGH、tPA、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、共有序列干扰素、胰岛素、人绒毛膜促性腺素、白喉蛋白和抗嗜血因子。

32. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子是激素。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其中所述激素选自睾酮、雌激素和孕酮。

34. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少一个组分分子选自紫衫醇或其类似物或衍生物、基质金属蛋白酶抑制剂和抗感染物。

35. 如权利要求 1 所述的方法, 其中至少两个组分分子选自乳铁蛋白/乳铁蛋白质、乳铁蛋白/溶菌酶、溶菌酶/溶菌酶、乳铁蛋白/EGF、EGF/EFG、乳铁蛋白/ITF、ITF/ITF、ITF/EFG、EGF/KGF、KGF/KGF、ITF/KGF、KGF/PDGF、PDGF/PDGF、 α_1 -抗胰蛋白酶/MMP 抑制剂、雌激素/孕酮、抗体/抗体、ITF/ITF 及其类似物、变体或衍生物。

36. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子的给药在治疗宿主中达到诊断、预防、治疗、抗感染或滋养的生物效果。

37. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子还含有至少一种其它多肽片段, 其中该多肽在生产宿主中高度表达。

38. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞外, 而不是细胞表面体内切割。

39. 如权利要求 38 所述的方法, 其中第一和第二组分分子都不是干扰素- β 。

40. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞表面体内切割。

41. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述第一组分分子不是抗体或抗体片段。

42. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为由内源治疗宿主酶切割。

43. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为由选自下列的内源宿主酶切割: 凝血因子、ADAMTS 4 和 5、Aggrecanases 1 和 2、凝血酶、纤溶酶、补体因子、gastricin、颗粒蛋白酶、基质金属蛋白酶、膜型基质金属蛋白酶、II 型跨膜丝氨酸蛋白酶、ADAM、中性溶酶、组织型纤溶酶原激活物和胰冬酶。

44. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为由治疗宿主中的酶在细胞内体内切割, 且第一和第二组分分子的组合不是蛋白转导区和细胞毒性区的组合。

45. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为由治疗宿主中的酶在细胞内体内切割, 且该切割位点不是病毒病原体活化的切割位点。

46. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述切割位点构建为由治疗宿主中的酶在细胞内体内切割, 且第二组分不是细胞毒性分子。

47. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子还含有引导序列以指导该嵌合分子在生产宿主中分泌, 或指导该嵌合分子在生产宿主中储存。

48. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子含有靶分子以指导该嵌合分子到治疗宿主的一部位发生作用。

49. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子含有纯化部分, 该部分便于该嵌合分子从生产宿主中产生后的体外纯化。

50. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述连接子含有两切割位点和这两个连接位点间的间隔子。

51. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子是可食用产品的组分。

52. 如权利要求 51 所述的方法, 其中所述可食用产品选自牛奶、植物、种子、微生物细胞及其衍生物和提取物。

53. 如权利要求 51 所述的方法, 其中所述可食用产品是谷物。

54. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子通过口服、肠胃外或通过吸入给药。

55. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子通过静脉内路径、皮下路径、腹腔内路径、心脏内路径或透皮路径肠胃外给药。

56. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子不是核酸分子。

57. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述嵌合分子还含有和第一组分分子但不和连接子连接的额外分子, 其中该额外分子在生产宿主中高度表达。

58. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第一和第二组分分子中的至少一个是抗体或其活性片段, 该抗体选自抗-IL8、抗-CD11a、抗-ICAM-3、抗-CD80、抗-CD2、抗-CD3、抗-补体 C5, 抗-TNF α 、抗-CD4、抗- $\alpha 4 \beta 7$ 、抗-CD40L(配体)、抗-VLA4、抗-CD64、抗-IL5、抗-IL4、抗-IgE、抗-CD23、抗-CD147、抗-CD25、抗- $\beta 2$ 整联蛋白、抗-CD18、抗-TGF β 2、抗-因子 VII、抗-II $_b$ II $_a$ 受体、抗-PDGFR、抗-F 蛋白(来自 RSV)、抗-gp120(来自 HIV)、抗-Hep B、抗-CMV、抗-CD14、抗-VEFG、抗-CA125(卵巢癌)、抗-17-LA(结肠细胞表面抗原)、抗-抗-独特型 GD3 表位、抗-EGFR、抗-HER2/neu、抗- $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白、抗-CD52、抗-CD33、抗-CD20、抗-CD22、抗-HLA 和 抗-HLA DR 或其活性片段。

59. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述组合物还含有药物学上可接受的载体或赋形剂。

60. 一种试剂盒, 该试剂盒包含含有嵌合分子的组合物和套装插件, 该套装插件包括向人或非人治疗宿主给予组合物的说明书, 其中所述该嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子; 其中的连接子含有酶切位点且至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接, 从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点;

其中该切割位点构建为由治疗宿主酶体内切割且在生产宿主中抵抗切割;

其中, 在切割位点切割嵌合分子后, 至少一个组分分子被功能活化; 以及

其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

61. 如权利要求 60 所述的试剂盒, 其中所述切割位点构建为在治疗宿主的胃肠道中体内切割。

62. 如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述切割位点构建为由肠激酶体内切割。

63. 如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞外,而不是细胞表面体内切割。

64. 如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞表面体内切割。

65. 如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述切割位点构建为在治疗宿主中由内源宿主酶在细胞内体内切割。

66. 如权利要求 65 所述的试剂盒,其中所述第一组分分子和第二组分分子的结合不是蛋白转导区和细胞毒性区的结合。

67. 如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞内体内切割,其中该切割位点不是病毒病原体激活切割位点。

68. 如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞内体内切割,该第二组分分子不是细胞毒性分子。

69. 一种嵌合分子,该嵌合分子具有结构式: $A(x_i B_i)^n$, 其中 A 代表第一组分分子, x 代表连接子, B 代表第二组分分子, i 和 n 分别是正整数;其中该嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子;其中的连接子含有酶切位点且其中至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接,从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点;

其中该切割位点构建成在体内由宿主酶切割且在生产宿主中抵抗切割;

其中,在切割位点切割嵌合分子后,至少一个组分分子被功能活化,其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

70. 如权利要求 69 所述的嵌合分子,其中所述结构式选自:

(a) $A(x_1 B_1)$;

(b) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)$, 其中 x_1 和 x_2 可以相同或不同, B_1 和 B_2 可以相同或不同;

(c) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)$, 其中 x_1 、 x_2 和 x_3 分别可以相同或不同, B_1 、 B_2 和 B_3 分别可以相同或不同;

(d) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)(x_4 B_4)$, 其中 x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 分别可以相同或不同, B_1 、 B_2 、 B_3 和 B_4 分别可以相同或不同;和

(e) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)(x_4 B_4)(x_5 B_5)$, 其中 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 和 x_5 分别可以相同或不同, B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 和 B_5 分别可以相同或不同。

71. 如权利要求 69 所述的嵌合分子,其中所述嵌合分子是多蛋白。

72. 编码如权利要求 71 所述嵌合分子的核酸分子。

73. 含有如权利要求 72 所述核酸分子的载体。

74. 含有如权利要求 72 所述核酸分子的宿主细胞。

75. 一种在生产宿主中制备给予治疗宿主的嵌合分子的方法，该方法包括：(a) 制备编码嵌合分子的核酸；(b) 用该核酸转化生产宿主；(c) 使生产宿主生产该嵌合分子；(d) 从生产宿主中回收该嵌合分子；和(e) 调节收集的嵌合分子的质量以使其满足向治疗宿主给药所规定的要求；

其中所述嵌合分子含有组分分子，包括第一组分分子、含有切割位点的连接子和第二组分分子；

其中所述第一组分分子和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白或其片段；

其中所述连接子可操作地与第一和第二组分分子相连，从而产生非天然发生的连接和切割位点；

其中所述切割位点构建为由治疗宿主酶体内切割。

76. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述酶存在于治疗宿主的胃肠道中。

77. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述酶是在治疗宿主的细胞外发生作用，而在细胞表面不发生作用的酶。

78. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述酶是在治疗宿主的细胞表面发生作用的酶。

79. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述酶是在治疗宿主的细胞内发生作用的酶。

80. 如权利要求 79 所述的方法，其中所述嵌合分子不是蛋白转导区和细胞毒性区的结合。

81. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述酶是在治疗宿主的细胞内发生作用的酶，所述的切割位点不是病毒病原体激活切割位点。

82. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述酶是在治疗宿主的细胞内发生作用的酶，所述的第二组分分子不是细胞毒性分子。

83. 如权利要求 75 所述的方法，其中所述生产宿主选自细菌细胞、真菌细胞、哺乳动物细胞、植物细胞、植物种子、昆虫细胞、植物、真菌和动物。

84. 一种含有嵌合分子和药物学上可接受的载体用于向治疗宿主给药的组合物，其中所述嵌合分子含有包括至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子的组分分子；其中的连接子含有酶切位点且至少第一连接子与第一

组分分子和第二组分分子可操作连接,从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点;

其中该切割位点构建为在体内由治疗宿主酶切割且在生产宿主中抵抗切割;

其中,在切割位点切割嵌合分子后,至少一个组分分子被功能活化;以及

其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

85. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述切割位点构建为由治疗宿主的胃肠道中的酶体内切割。

86. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述酶是肠激酶。

87. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述切割位点构建为由治疗宿主的炎性组织中的酶体内切割。

88. 如权利要求 87 所述的组合,其中所述炎性组织是发炎的肠或滑膜。

89. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞外,而不在细胞表面体内切割。

90. 如权利要求 84 所述组合物,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞表面体内切割。

91. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞内由内源治疗宿主酶体内切割。

92. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞内体内切割,其中所述第一和第二组分分子的所述结合不是蛋白转导区和细胞毒性区的结合。

93. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述切割位点构建为在治疗宿主的细胞内体内切割,其中的第二组分分子不是细胞毒性分子。

94. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述组合物被包裹。

95. 如权利要求 84 所述的组合物,其中有一个组分分子与治疗宿主的细胞外基质结合。

96. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述嵌合分子含有两个切割位点,其中一个构建为表达后在生产宿主中体外切割,另一个构建为在治疗宿主中体内切割。

97. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述组合物配制成口服运输。

98. 如权利要求 84 所述的组合物,其中所述组合物配制成肠胃外运输。

99. 如权利要求 98 所述的组合物,其中的肠胃外运输选自皮下、静脉内、动脉内、心室内、颅内、经皮肤和透皮运输。

100. 如权利要求 84 所述的组合物，其中所述组合物配制成鼻内运输或吸入。

101. 如权利要求 84 所述的组合物，其中所述嵌合分子是疫苗。

102. 如权利要求 84 所述的组合物，其中所述嵌合分子含有佐剂作为一个组分分子。

103. 如权利要求 101 所述的组合物，其中所述疫苗含有病原性有机物组分。

104. 如权利要求 101 所述的组合物，其中所述疫苗是癌症疫苗，所述的组分分子是在癌细胞中过量表达的分子。

105. 嵌合分子在制备用于诊断、预防、治疗疾病或症状，或用于提高需求对象营养的药物中的应用，其中所述嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子；其中的连接子含有酶切位点且至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接，从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点；其中该切割位点构建为在体内由治疗宿主酶切割且在生产宿主中对切割不敏感；其中，在切割位点切割嵌合分子后，至少一个组分分子被功能活化；且其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

治疗宿主中切割的嵌合分子

发明领域

本发明涉及嵌合分子领域，该嵌合分子适于向宿主给药以在体内切割而在被治疗宿主的体内产生诊断、预防、治疗和/或滋养效果。

发明背景

已制得嵌合分子使其在体外切割以在微生物宿主中制备和纯化重组蛋白。另外，授予 Regents of the University of California，于 1988 年 9 月 6 日公告的题为“Expression Linkers”的美国专利 No. 4,769,326 (“’326 专利”)还公开了一种重组 DNA 序列“其在自然条件下含有三个不连续的片段，其中第一片段编码真核蛋白且与第二片段相连续，该第二片段编码至少由两个氨基酸组成的特异性切割序列，并与第三片段相连续，其中所述 DNA 表达产物至少被一种酶或化学试剂在连接真核蛋白和特异性切割序列的肽键处切割；第三片段编码一种宿主肽，其中该肽是...非天然地与所述的真核蛋白相连接”(权利要求 1)。

自此，有人设计出了其它的体外生产和加工系统。这些改进的例子如下。

美国专利 No. 4,745,069，公告于 1988 年 5 月 17 日，授予 Eli Lilly & Company 题为“Cloning Vectors for Expression of Exogenous protein”涉及到“一种用于表达外源蛋白的重组 DNA 克隆载体”，其中该克隆载体“构建为依次含有定义为脂蛋白启动子区域的核苷酸序列、定义为脂蛋白 5' 非翻译区的核苷酸序列和编码外源蛋白产物的序列、编码由翻译起始信号密码子连接的产物的序列、和编码脂蛋白基因 5' 非翻译区的 3' 末端的肠激酶剪切位点的核苷酸序列”(第 2 栏, 第 45-62 行)。这个发明的原理表明“脂蛋白基因表现出高水平的组成性转录...推荐将其作为表达外源 DNA 片段的载体。”(第 2 栏, 第 14-17 行)。

美国专利 No. 4,828,988，公告于 1989 年 5 月 9 日，授予了 Smith Kline-RIT，题为“Hybrid polypeptides Comprising Somatocrinine and A₁-Antitrypsin, Method for Their Production from Bacterial Clones and Use Thereof for the Production of Somatocrinine”涉及到“通过将 hGRF 的编码序列与 hAT 的编码序列

或能表达的其片段以理想的方式在细菌中融合可以大大地和提高细菌中 hGRF 的表达....”(第 3 栏, 第 4-9 行)。

美国专利 No. 5, 292, 646 (“’646 专利”), 公告于 1994 年 5 月 8 日, 授予了基因 tics Institute, Inc., 题为“peptide and protein fusions to Thioredoxin and Thioredoxin-like Molecules”涉及到“一种融合序列, 其含有一种与经挑选的异源肽或蛋白融合的硫氧还原类蛋白序列”, 其中该融合蛋白“可以任选地含有一种连接肽”, 该连接肽“在需要的地方产生选择性切割位点...”(第 2 栏, 第 47-60 行)。
’646 专利中描述的发明旨在提供“一种提供可溶性重组蛋白表达的新方法”, 该方法包括“在合适的条件下培养上述宿主细胞以产生融合蛋白”。(第 3 栏, 第 6-10 行)。

美国专利 No. 6, 080, 559, 公告于 2000 年 6 月 27 日, 授予了 AGENNIX, Inc., 题为“Expression of Processed Recombinant Lactoferrin and Lactoferrin Polypeptide Fragments from a Fusions Product in Aspergillus”公开了“通过一种方法产生的一种完整的、去糖基化的乳铁蛋白或单链区、去糖基化的乳铁蛋白多肽片段, 该方法包括培养含有重组质粒的转化曲霉菌真菌细胞, 其中所述质粒从 5’到 3’含有可操作连接的下列部件: (a) 启动子; (b) 编码信号肽的核苷酸序列; (c) 编码高水平表达的内源分泌的曲霉菌多肽的氨基末端部分的基因的核苷酸序列的 5’部分; (d) 编码肽连接子的核苷酸序列, 所述肽连接子含有曲霉菌内源蛋白酶的切割位点; 和(e) 编码乳铁蛋白或乳铁蛋白多肽片段的核苷酸序列; 其中所述转化的曲霉菌真菌细胞在合适的营养培养基中培养直到乳铁蛋白或乳铁蛋白多肽片段以融合产物的形式产生, 然后被特异于所述的连接子序列的蛋白水解酶处理, 其中所述经处理的乳铁蛋白或乳铁蛋白多肽片段分泌到营养培养基中, 然后从培养基中分离, 其中的乳铁蛋白或乳铁蛋白多肽片段已经去糖基化”。(权利要求 1)

WO 97/28272, 由 Technologene 公司申请, 公开于 1997 年 8 月 7 日, 题为“蛋白 Expression System”涉及到“表达和从融合蛋白中纯化确实重组蛋白的发方法。具体地, 本发明涉及到融合蛋白, 其中向融合蛋白中加入额外, 这些区域和/或元件包括通过一个含有铰链区域(3)的多肽与有益蛋白融合的 Fc 片段(1)、亲水的间隔子(4)和氨基酸二盐的内源蛋白酶切位点(5), 其中该间隔子可以被剪切, 然后由羧肽酶 B(6)消化从而产生可信蛋白(2)”(摘要)。

WO 99/58662, 是日本申请, 于 1995 年 5 月 13 日公开, 题为“Fused gene”公开了一种融合蛋白, 该融合蛋白含有“靶蛋白, 其从 N 末端到 C 末端方向含有 a)

信号序列, b) 至少 CH1 区域被删除的免疫球蛋白 Fc 区, c) 在 C 末端含有使肠激酶等发生剪切作用的酶切位点的肽连接子; 和 d) 靶蛋白, 如促红细胞生成素的氨基酸序列, 其特征在于在酶切割完成后, 该靶蛋白的 N 末端不含有起始于肽连接子的氨基酸残基, 因此, 通过酶处理可以有效的生产 N 末端氨基酸没有修饰的靶蛋白”(摘要)。

W000/23472, 由 Biogen 公司申请, 题为“Interferon-Beta Fusion Proteins and Uses”涉及到“与干扰素- β -1b 相比活性提高的干扰素- β -1a 组合物, 其通常还具有融合蛋白的有益属性且活性没有有效丢失....”(第 2 页, 第 17-19 行)。该说明书描述这个发明为涉及“一种分离的多肽, 其具有氨基酸序列 X-Y-Z, 其中 X 是具有含干扰素 β 氨基酸 序列的氨基酸序列的多肽或其片段; Y 是任选的连接子部分; 和 Z 是含有至少一种除干扰素 β 外的多肽部分的多肽”(第 3 页, 第 1-5 行)。这个发明还涉及到“一种制备重组多肽的方法, 该方法包括: 根据该发明制备宿主细胞群落; 在一定条件下生长细胞群落, 于是由重组 DNA 编码的多肽得到表达; 和分离表达的多肽”(第 4 页, 第 3-6 行)。

W000/39310, 由 University of Georgia Research Foundation 申请, 题为“Rubredoxin Fusion Proteins, Protein Expression System and Methods”涉及“一种重组的红素氧还蛋白融合蛋白, 其含有 N-末端的红素氧还蛋白组分和 C-末端的融合多肽”(第 3 页, 第 3-5 行)。这种融合蛋白“在正确折叠时能结合 Fe^{2+} , 使其变成红色从而使接下来的纯化容易”(第 3 页, 第 5-6 行)。“N-末端的红素氧还蛋白组分和 C-末端的融合多肽间的连接处理不需要外是剪切连接”(第 3 页, 第 15-17 行)。

W000/61768, 由 Yeda Research and Development 有限公司申请, 题为“Preparation of Biologically Active Molecule”涉及“分子的制备方法, 该分子在自然的形成过程中以生物失活形式产生, 在其前体切割后变得有活性”。在优选的具体实施方案中该说明书提供了“该方法包括用载体转化宿主, 该载体含有编码在其切割位点发生突变的生物活性分子的前体的 cDNA, 培养该转化的宿主, 表达该前体, 用蛋白酶处理后分离该生物活性分子”(第 3 页, 第 27-31 行)。

W001/14570, 由 Allergan Sales, Inc 申请, 题为“Activable Recombinant Neurotoxins”涉及“重组的分离蛋白, 其含有功能结合区 易位区和治疗区, 其中该蛋白还含有容易在体外被特异性切割并表达位单链的氨基酸序列”(第 7 页, 第 19-22 行)。其中该易位元件“含有具有易位活性的梭菌 神经毒素 H 链的部分”(第

19 页, 第 11-12 行)。这个发明公开了“构建的梭菌毒素的活化程度”是“制造这些材料需加考虑的重要事项”。因此, “如果神经毒素, 如 BoNT[肉毒瘤神经毒素]和 TeTx [tetanus 神经毒素]能在快速生长的细菌(如异源 *E. coli* 细胞)中高产量表达, 如同安全、容易分离和简单转变为全活性形式的相关无毒单链(或具有减毒活性的单链)一样, 那么这就会是一重大进步”(第 6 页, 第 5-11 行)。

融合分子的体内产生和该分子的体外将的描述见 Proc.Natl Acad.Sci USA 91(20):9337-41(Sep 27, 1994), 题为“High-efficiency synthesis of human α -endorphin and magainin in the erythrocytes of transgenic mice:a production system for therapy peptides”。在某些情况下, 在体内表达多肽比运输体外合成的多肽要理想。例如, 在宿主体内合成的多肽可以进行有利的翻译后修饰, 如 C-末端酰胺化或糖基化(参见 US 5, 707, 826, 公告于 1998 年 1 月 13 日, 授予了 BioNebraska, Inc., 第 1 栏, 第 18-25 行; 和 EP 0134085, 公告于 1985 年 5 月 13 日, 由 Salk Institute for Biological Studies 申请, 第 3 页, 第 13-16 行; 第 4 页, 第 3-5 行)。

因此, 已经将基因治疗方法应用于将治疗基因运输到有机体中以在体内生产蛋白。然而基因治疗的实现仍然还很遥远, 且作为治疗形式的基因治疗仍需要验证。核酸的基因治疗运输的例子包括:

美国专利 No.6,228,356, 公告于 2001 年 5 月 8 日, 授予了 University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education, 题为“Viral Vectors to Inhibit Leukocyte Infiltration or Cartilage Degradation of Joints”涉及到一种“抑制哺乳动物关节白细胞渗透或软骨退化的”方法, “该方法包括直接向所述的关节用含有可操作地与启动子连接的核酸序列的病毒载体给药, 该核酸序列在关节中编码能中和 IL-1 效果的蛋白, 其中在所述关节内所述蛋白的表达抑制所述关节内的白细胞渗透和软骨退化”(权利要求 1)。能中和 IL-1 效果的这种蛋白的例子如白介素-1 受体拮抗蛋白(IRAP)(权利要求 2), 可溶性白介素-1 受体(权利要求 3), 可溶性 TNF 受体(权利要求 4)或白介素-10(权利要求 5)。进一步地还揭露了制备一种研究连接组织病理学的动物模型的方法, 其中该方法“包括使用选自细胞因子和蛋白酶的材料作为基因”, 其中该蛋白酶是基质金属蛋白酶, 该基质金属蛋白酶“选自胶原酶, 白明胶酶和基质切割素”(第 14 栏, 第 36 页至第 15 栏, 第 1 行)。虽然该说明书公开了“将至少一种编码产物的基因导入到哺乳动物连接组织的至少一种细胞中”(摘要), 但是没有给出同时运输多个基因的具体

方法。与此相关的是美国专利 No. 5, 858, 355, 题为“IRAP gene as treatment for arthritis”, 公开于 1999 年 1 月 12 日。其公开了在体外转化滑膜细胞细胞, 通过关节内注射将该感染的滑膜细胞移植到关节炎连接区, 从而减少软骨退化和减少滑膜炎的发生。

美国专利 No. 6, 017, 896, 公告于 2000 年 1 月 25 日, 授予了 University of Alabama Research Foundation and Southern Research Institute, 题为“Purine Nucleoside Phosphorylase Gene Therapy for Human Malignancy”涉及一种通过 (a) 用编码能剪切腺苷的嘌呤切割酶的核酸来转染或转导哺乳动物细胞; 和 (b) 将转染或转导的细胞与有效量的嘌呤切割酶底物接触”来杀死复制或非复制、转染或转导的哺乳动物细胞和旁观细胞的”方法, “其中该底物对于哺乳动物细胞完全无毒, 经酶剪切后对转染或转导的哺乳动物细胞和旁观细胞产生嘌呤毒性, 从而杀死表达该酶的哺乳动物细胞和旁观细胞”(权利要求 1)。

US 6, 080, 575, 公告于 2000 年 6 月 27 日, 授予了 Hoechst Aktiengesellschaft AG, 题为“Nucleic acid Construct for Expressing Active Substances which can be Activated by Proteases, and Preparation and Use”涉及“一种核酸构建体”, 其“由哺乳动物细胞释放的酶激活, 该构建体包括下列部件:a) 至少一个启动子元件; b) 至少一种编码活性化合物(蛋白 B)的 DNA 序列; c) 至少一种编码能被哺乳动物释放的酶特异性剪切的氨基酸序列(部分构建体 C)的 DNA 序列, 和 d) 至少一种编码肽或蛋白(部分结构 D)的 DNA 序列, 该肽或蛋白通过剪切氨基酸序列(部分结构 C)而与活性化合物结合并抑制活性化合物的活性....”(摘要)。

美国专利 No. 6, 147, 055, 公告于 2000 年 11 月 14 日, 授予了 Vical Incorporated, 题为“Cancer Treatment Method Utilizing Plasmids Suitable for IL-2 Expression”涉及“一种治疗人患者癌症的方法, 包括向所述的患者的肿瘤直接体内给予带有阳离子脂的 DNA 质粒, 其中所述质粒包括(1)编码成熟人白介素 2(IL-2)多肽的第一多核苷酸; (2)编码与所述的第一多核苷酸可操作连接的肽引导子的第二多核苷酸, 其中所述肽引导子指导所述的 IL-2 的分泌; 和(3)与第一和第二多核苷酸可操作连接的启动子....”(权利要求 1)。

外源基因也已经实现了导入并在植物中表达, 例如, 美国专利 No. 5, 939, 541, 公告于 1999 年 8 月 17 日, 授予了 University of South Carolina, 题为“Method for Enhancing Expression of a Foreign Gene or Endogenous Gene Product in Plants”涉及“一种增强序列, 其含有 P1 密码区、辅助成分-蛋白酶(HC-Pro)和 P3

部分,因此所述的增强序列包括编码蛋白切割位点的区域,该蛋白切割位点是所述植物细胞、植物原生质体或整株植株的马铃薯 Y 病毒属(potyvirus)基因组的 HC-Pro 羧基末端自身水解加工所必需的,因此,所述外源基因或内源植物基因与不含所述增强序列的所述植物细胞、植物原生质体或整株植株的表达相比得到了提高”(权利要求 1)。

美国专利 No.5,491,076,公告于 1996 年 1 月 13 日,授予了 Texas A&M University System,题为“Expression of Foreign Genes Using a Replicating Polyprotein Producing Virus Vector”涉及“适于在多蛋白产生植物病毒(Polyprotein-producing plant virus)易感植物中表达异源蛋白的表达载体。该载体利用独特的病毒多蛋白蛋白酶的能力来从病毒多蛋白中剪切异源蛋白”(摘要)。值得注意的是,该病毒载体含有 cDNA,“其中所述 cDNA 含有编码多蛋白产生 Tobacco Etch 病毒的可复制型基因组的序列”(权利要求 1 和 2)。

WO 00/11175 A1,公开于 2000 年 3 月 2 日,由 Zeneca Limited 申请,题为“Genetic Method for the Expression of Polyprotein in Plants”涉及“一种在转基因植物中表达或提高一种或多种蛋白表达水平的方法,包括将 DNA 序列插入到所述的植物基因组中,该 DNA 含有与两个或多个蛋白编码区可操作连接的启动子区和 3'-末端区域,其中所述蛋白编码区域由连接子前肽的编码序列彼此间隔,所述的前肽提供切割位点,因此该表达的多蛋白翻译后加工成组分蛋白分子。具体地,还含有信号序列,因此翻译后加工在植物的分泌途径中发生作用。在该方法中所用的合适连接子序列和 DNA 构建体也有描述”(摘要)。

美国专利 No.5,912,167,公告于 1999 年 6 月 5 日,由 Wisconsin Alumni Research Foundation 申请,题为“Autocatalytic Cleavage Site and Use Thereof in a Protein Expression Vector”涉及“利用在小核糖核酸病毒中发现的自身催化切割位点有效地表达重组肽或蛋白的方法”(第 3 栏,第 24-26 行)。还公开了“一种核酸构建体,其至少含有两个拷贝的编码自身催化的肽切割位点的核酸序列”,其中该位点含有特异性氨基酸序列和“其中该构建体是复制型小核糖核酸病毒序列的一部分及其中的拷贝位于自然发生自身催化切割位点的位点”(权利要求 1)。权利要求 4 是权利要求 1 的从属权利要求,描述了一种聚合连接子,其“位于两拷贝编码自身催化位点的核酸序列之间”。权利要求 6 是权利要求 5 的从属权利要求,权利要求 5 引用权利要求 4,描述了由该核酸序列编码的氨基酸序列,该氨基酸序列

含有“多蛋白，其中该多蛋白含有被自身催化切割位点分离的异源蛋白”。在另一从属权利要求中，权利要求 1 所述的载体是门果病毒(mengovirus) (权利要求 7)。

US 6,221,355, 公告于 2001 年 4 月 24 日，授予了 Washington University, 题为“Anti-phathogeny System and Methods of Use Thereof”涉及“一种或多种融合蛋白”的用途，“该融合蛋白含有转导区和细胞毒性区。该细胞毒性区由病原体感染特异性激活，该抗病原体系统能有效地杀死或破坏被一种或多种不同病原体组合感染的细胞”(摘要)。

WO 98/13059, 由 Bristol-Myers Squibb Co 申请，题为“Hydrolyzable prodrugs for Delivery of Anticancer Drugs to Metastatic Cells”涉及可水解的前药，其“由位于转移性细胞的细胞膜的蛋白酶激活，从而产生能被转移性细胞吸收的活性抗癌药物。一般来说，本发明的可水解前药含有氨基末端的帽肽，其是位于转移性细胞表面的肽水解酶的底物，通过足够长的自我牺牲型间隔子(self-immolating spacer)与治疗药物共价连接从而防止发生空间阻碍。该治疗药物一般是抗癌药。该抗癌药一般是阿霉素、紫衫醇、喜树碱、丝裂霉素 C 或 esperamycin。一般地，水解可水解前药底物肽水解酶是组织蛋白酶 B”(摘要)。

US 6,251,392, 于 2001 年 6 月 26 日授予了 Epicyte Pharmaceuticals, Inc, 题为“Epithelial Cell Targeting Agent”涉及“用于将生物试剂运输到非极性上皮细胞的”靶分子，如果实现运输，“该生物试剂对上皮细胞是致死的。例如，可以将该靶分子用于杀死转移性上皮细胞”(摘要)。许多疾病或症状都与几种基因产物的存在或缺乏有关，因此，用含有一种活性成分的药物给药来调节几种基因产物的存在或缺乏可能还不能非常有效地控制该疾病或症状。另外，如果药物的半衰期能够延长，那么就可能每天给予较少次数的药，根据许多因素，如方便、价格 and 安全性来确定优选的给药方案。还有，如果给药的剂量能减少，那将是理想的，因为这样，当该药被有效地运输到需要作用的部位时其副作用就降低。此外，如果有方法将用于运输到治疗宿主的纯化超过 90% 纯度所需费用低，而不是高的活性分子运输，那么将是理想的。因此需要更有效低或有效率地将一个或多个活性分子运输到治疗宿主的目标位点。

进一步地认识到，需要表达系统生产在宿主中不会被降解的小分子，如重组小分子肽。

发明概述

本发明的一个目标是满足如上所述的本领域未满足的需要。

本发明的另一个目标是提供一种一次运输多个组分分子到多细胞宿主(“治疗宿主”)中以实现诊断、治疗、预防或滋养的方法。

本发明的又一目标是提供一种运输分子到治疗宿主中的方法,该分子在治疗宿主中被正常降解。

本发明的又一目标是将分子运输到治疗宿主的作用位点,以使该分子的治疗效果最大化和副作用最小化。

根据本发明的目标之一,本发明提供了运输多个组分分子到多细胞宿主的方法,该方法包括:(a)提供含有嵌合分子的组合物;和(b)将该嵌合分子给予宿主以产生治疗宿主,其中该嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子。其中的连接子含有酶切位点且其中至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接,从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点。其中该切割位点构建成在体内由宿主酶切割且在生产宿主中抵抗切割,其中,在切割位点切割嵌合分子后,至少一个组分分子被功能活化,其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

根据另一目标,本发明提供了如上所述的方法,其中上述切割位点构建来在体内由系统循环的酶切割,因此,该剪切酶可以定位于,如消化道、生殖泌尿道、眼泪、唾液等中。该剪切酶还可以存在于全身。在一个具体实施方案中,该剪切酶存在于宿主的胃肠道中,如任何消化酶,包括任何肠肽酶,如胰岛素、糜蛋白酶、胰蛋白酶E、肠激酶,或组织型纤溶酶原激活物,如与转移过程有关的酶和同样相关的基质金属蛋白酶。

根据又一目标,本发明提供了如上所述的方法,其中上述切割位点构建来在治疗宿主体内的细胞外切割,而不是在细胞表面切割,例如其中的一个或两个组分分子都不是或不同于干扰素- β 。

根据又一目标,本发明提供了提供了如上所述的方法,其中上述切割位点构建来在治疗宿主体内的细胞表面切割,例如其中的第一组分分子不是或不同于抗体或抗体片段。

根据又一目标,本发明提供了提供了如上所述的方法,其中上述切割位点构建来由内源的治疗宿主酶切割。

在一具体实施方案中,上述切割位点构建来由内源的治疗宿主的酶切割,该酶选自凝血因子、ADAMTS 4 和 5、Aggreganases 1 和 2、凝血酶、纤溶酶、补体因子、

gastricin、颗粒蛋白酶、基质金属蛋白酶、膜型基质金属蛋白酶、II 型跨膜丝氨酸蛋白酶、ADAM、中性溶酶、尿激酶型纤溶酶原 激活物、组织型纤溶酶原激活物和胰冬酶。

根据又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中上述切割位点构建来在体内由治疗宿主中的酶细胞外切割，第一和第二组分分子的组合不是蛋白转导区和细胞毒性区的组合。

根据又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中上述切割位点构建来在体内由治疗宿主中的酶细胞外切割，且该切割位点不是病毒病原体活化的切割位点。

根据又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中上述切割位点构建来在体内由治疗宿主中的酶细胞外切割，且第二组分不是或不同于细胞毒性分子。

根据又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中上述切割位点构建来在治疗宿主体内的细胞外由酶切割，其中，在酶切割位点切割嵌合分子后，至少两个组分分子被功能活化。

根据本发明的又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中，在嵌合分子切割前至少有一个组分分子被功能活化。

在一具体实施方案中，上述组分分子是非抑制分子。在另一具体实施方案中，该组分分子是非细胞毒性分子。

在某具体实施方案中，上述第一和第二组分分子是相同的。在另一具体实施方案中，该第一和第二组分分子是不同的。

根据本发明的又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中上述嵌合分子具有结构式： $A(x_i B_i)^n$ ，其中 A 代表第一组分分子，x 代表连接子，B 代表第二组分分子，i 和 n 是正整数。

根据本发明的又一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中结构式选自：

(a) $A(x_1 B_1)$ ；

(b) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)$ ，其中 x_1 和 x_2 可以相同或不同， B_1 和 B_2 可以相同或不同，A 和 B_1 、 B_2 可以相同或不同；

(c) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)$ ，其中 x_1 、 x_2 和 x_3 可以相同或不同， B_1 、 B_2 和 B_3 相同或不同，A 与 B_1 、 B_2 和 B_3 相同或不同；

(d) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)(x_4 B_4)$ ，其中 x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 可以相同或不同， B_1 、 B_2 、 B_3 和 B_4 相同或不同，A 与 B_1 、 B_2 和 B_3 和 B_4 相同或不同；和

(e) $A(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)(x_4B_4)(x_5B_5)$, 其中 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 和 x_5 可以相同或不同, B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 和 B_5 相同或不同, A 与 B_1 、 B_2 和 B_3 、 B_4 和 B_5 相同或不同。例如, A 可以是在生产宿主中高水平表达的肽或多肽, 因此嵌合分子促进提高组分分子的生产。

根据又一目标, 本发明提供了如上所述的方法, 其中第一组分分子是肽或蛋白质或其活性片段, 至少一个第二组分分子选自肽、蛋白质、核酸、糖类、合成的聚合物、植物产物、真菌产物、小分子药物、可探测分子、半抗原、配体、抗感染物及其类似物和片段。

根据该嵌合分子是多蛋白。

根据又一目标, 本发明提供了如上所述的方法, 其中至少一个组分分子选自抗原、可溶性受体、生长因子、细胞因子、淋巴因子、趋化因子、酶、抗感染物、前药、毒素及其活性片段。

根据又一目标, 本发明提供了如上所述的方法, 其中至少一个组分分子选自可溶性 p75TNF α 受体 Fc 融合体、人生长激素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- α 2b、聚乙二醇化(PEG)干扰素- α 、PEG-asparagase、PEG-adamase、抗-C017-1A、水蛭素、组织型纤溶酶原激活物、促红细胞生成素、人 DNA 酶、IL-2、凝血因子 IX、IL-11、TNK 酶、活化的蛋白 C、PDGF、凝血因子 VIIa、胰岛素、干扰素 α -N3、干扰素 γ 1b、干扰素 α 共有序列、血小板活化因子乙酰水解酶及其活性片段。

根据另一目标, 本发明提供了如上所述的方法, 其中第一组分分子是肽、蛋白质或其活性片段, 第二组分分子是化学化合物。在一可选择的具体实施方案中, 两个或多个或所有的组分分子是化学化合物, 如激素、糖类或小分子。在这种情况下, 用常规技术将这些化学化合物在体外与本发明的连接子连接在一起。根据本发明的另一目标, 本发明提供了上述方法, 其中至少一个组分分子是抗体。在一具体实施方案中, 该第一组分分子是抗体或其活性片段, 该第二组分分子不是抗体。在另一具体实施方案中, 第二组分分子是抗体或其活性片段, 该第一组分分子不是抗体。在又一具体实施方案中, 该第一和第二组分分子分别是抗体或其活性片段。

根据另一目标, 本发明提供了如上所述的方法, 其中至少一个组分分子选自抗微生物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。在一具体实施方案中, 至少一个组分分子是防卫肽、溶菌酶或乳铁蛋白。

根据另一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中至少一个组分分子选自肽、蛋白质、其类似物或活性片段,它们是人或非动物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。在另一具体实施方案中,它们是植物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。在又一具体实施方案中,它们是鱼或微生物的肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

根据另一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中至少两个组分分子选自肽、蛋白质、其类似物或活性片段。

根据另一目标,本发明还提供了如上所述的肽,其中该肽选自 IGF-I、EGF、PDGF、ITF、KGF、乳铁蛋白质、溶菌酶、血纤蛋白原、 α_1 -抗胰蛋白酶、促红细胞生成素、hGH、tPA、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、共有序列干扰素、胰岛素、人绒毛膜促性腺素、白喉蛋白和 抗嗜血因子。

根据另一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中至少一个组分分子是激素。在一具体实施方案中,该激素选自雌激素、睾酮和孕酮。

根据又一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中至少一个组分分子选自细胞毒性化合物,如紫杉醇或其类似物或衍生物,酶抑制剂,如基质金属蛋白酶抑制剂和抗感染物。

根据又一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中至少两个组分分子选自乳铁蛋白/乳铁蛋白质、乳铁蛋白/溶菌酶、溶菌酶/溶菌酶、乳铁蛋白/EGF、EGF/EGF、乳铁蛋白/ITF、ITF/ITF、ITF/EGF、EGF/KGF、KGF/KGF、ITF/KGF、KGF/PDGF、PDGF/PDGF、 α_1 -抗胰蛋白酶/MMP 抑制剂、雌激素/孕酮、抗体/抗体、ITF/ITF 及其类似物、变体或衍生物。

根据一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中上述嵌合分子是疫苗。在一具体实施方案中,该嵌合分子含有作为组分分子之一的辅助物。在另一具体实施方案中,该疫苗含有病原有机体组分。在又一具体实施方案中,该疫苗是癌症疫苗,该组分分子是在癌细胞中过量表达的分子。

根据一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中上述嵌合分子的给药达到选自下列的生物效果:诊断、预防、治疗和滋养。

根据另一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中上述嵌合分子还含有至少一种其它多肽片段,其中该多肽在生产宿主中高度表达。

根据另一目标,本发明还提供了如上所述的方法,其中上述嵌合分子还至少含有引导序列以指导该嵌合分子从生产宿主,如酵母宿主、哺乳动物细胞宿主或

E. coli 宿主中分泌, 或指导该嵌合分子在生产宿主, 如植物宿主或 E. coli 宿主中储存。

根据另一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述嵌合分子还含有靶分子。例如, 该靶分子可以指导该嵌合分子到治疗宿主的特定定位点以发生作用。

根据又一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述嵌合分子还含有纯化标记, 其中该纯化标记便于该嵌合分子从生产宿主中产生后的体外纯化。

根据又一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述连接子含有两切割位点和这两个连接位点间的间隔子。

根据又一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述嵌合分子是可食用产品的组分。在一具体实施方案中, 该可食用产品选自牛奶, 植物, 种子, 如谷物, 微生物细胞, 如酵母或细菌, 例如乳酸菌及其衍生物和提取物。

根据又一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述嵌合分子通过口服, 肠胃外, 如静脉内、皮下、腹腔内、透皮、心脏内或通过吸入给药。

根据又一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述嵌合分子不是核酸分子。

根据又一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中第一和第二组分分子中的至少一个是抗体或其活性片段, 该抗体选自抗-IL8、抗-CD11a、抗-ICAM-3、抗-CD80、抗-CD2、抗-CD3、抗-补体 C5, 抗-TNF α 、抗-CD4、抗- $\alpha 4 \beta 7$ 、抗-CD40L(配体)、抗-VLA4、抗-CD64、抗-IL5、抗-IL4、抗-IgE、抗-CD23、抗-CD147、抗-CD25、抗-整联蛋白、抗-CD18、抗-TGF β 2、抗-因子 VII、抗-IIBIIA 受体、抗-PDGFR、抗-F 蛋白(来自 RSV)、抗-gp120(来自 HIV)、抗-Hep B、抗-CMV、抗-CD14、抗-VEFG、抗-CA125(卵巢癌)、抗-17-LA(结肠细胞表面抗原)、抗-抗-独特型 GD3 表位、抗-EGFR、抗-HER2/neu、抗- $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白、抗-CD52、抗-CD33、抗-CD20、抗-CD22、抗-HLA 和 抗-HLA DR 或其活性片段。

根据另一目标, 本发明还提供了如上所述的方法, 其中上述组合物还含有药物学上可接受的载体或赋形剂。

根据本发明的另一目标, 本发明提供了一种试剂盒, 其包括含有嵌合分子的组合物和套装插件, 其中该套装插件包括向人或非人治疗宿主给予组合物的说明书, 该嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子。其中的连接子含有酶切位点且至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接, 从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割

位点。其中该切割位点构建成在体内由治疗宿主酶切割且在生产宿主中抵抗切割，其中，在酶切割位点切割嵌合分子后，至少两个组分分子被功能活化，其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的试剂盒，其中嵌合分子中的该切割位点构建来由酶体内切割，如在治疗宿主的胃肠道中切割，该酶是，例如肠激酶。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的试剂盒，其中嵌合分子中的该切割位点构建来在细胞外或细胞表面或其它地方体内切割。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的试剂盒，其中嵌合分子中的该切割位点构建来在治疗宿主中由内源宿主酶等在细胞外体内切割。在一具体实施方案中，该嵌合分子不是蛋白转导区和细胞毒性区的结合。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的试剂盒，其中嵌合分子中的该切割位点构建来在治疗宿主的细胞内体内切割，该切割位点不是病原体激活切割位点。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的试剂盒，其中上述切割位点构建来在治疗宿主的细胞内体内切割，该第二组分分子不是细胞毒性分子。

根据本发明的另一目标，本发明提供了具有下列结构式的嵌合分子： $A(x_i B_i)^n$ ，其中A代表第一组分分子，x代表连接子，B代表第二组分分子，i和n是正整数。其中该嵌合分子含有至少一个第一组分分子、至少一个连接子和至少一个第二组分分子。其中的连接子含有酶切位点且其中至少第一连接子与第一组分分子和第二组分分子可操作连接，从而在第一组分分子和第二组分分子间产生非天然发生的连接和切割位点。其中该切割位点构建成在体内由宿主酶切割且在生产宿主中抵抗切割，其中，在酶切割位点切割嵌合分子后，至少两个组分分子被功能活化，其中第一和第二组分分子中至少有一个含有肽、蛋白和/或其活性片段。

根据本发明的另一目标，本发明提供了如上所述的嵌合分子，其中所述结构式选自：

(a) $A(x_1 B_1)$ ；

(b) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)$ ，其中 x_1 和 x_2 可以相同或不同， B_1 和 B_2 可以相同或不同，A 和 B_1 、 B_2 可以相同或不同；

(c) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)$ ，其中 x_1 、 x_2 和 x_3 可以相同或不同， B_1 、 B_2 和 B_3 相同或不同，A 与 B_1 、 B_2 和 B_3 相同或不同；

(d) $A(x_1 B_1)(x_2 B_2)(x_3 B_3)(x_4 B_4)$ ，其中 x_1 、 x_2 、 x_3 和 x_4 可以相同或不同， B_1 、 B_2 、 B_3 和 B_4 相同或不同，A 与 B_1 、 B_2 和 B_3 和 B_4 相同或不同；和

(e) $A(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)(x_4B_4)(x_5B_5)$ ，其中 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 和 x_5 可以相同或不同， B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 和 B_5 相同或不同， A 与 B_1 、 B_2 和 B_3 、 B_4 和 B_5 相同或不同。例如， A 可以是在生产宿主中高水平表达的肽或多肽，因此嵌合分子促进提高组分分子的生产。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的嵌合分子，其中该嵌合分子是多蛋白。

根据另一目标，本发明提供了编码上述嵌合分子的核酸分子。在本发明的另一方面，本发明提供了含有编码该嵌合分子的核酸分子的载体。

本发明进一步提供了含有上述核酸分子的宿主细胞。

根据本发明的另一目标，本发明提供了在生产宿主中制备给予治疗宿主的嵌合分子的方法，该方法包括：(a)制备编码嵌合分子的核酸；(b)用该核酸转化生产宿主；(c)使生产宿主生产该嵌合分子；(d)从生产宿主中回收该嵌合分子；和(e)调节收集的嵌合分子的质量以使其满足向治疗宿主给药所规定的要求。

根据另一目标，本发明提供了制备如上所述的嵌合分子的方法，其中该生产宿主选自细菌细胞，如 *E. coli*，真菌细胞，如酵母或曲霉菌，植物细胞，植物种子，如谷物，例如稻、小麦、黑麦、燕麦和大麦，哺乳动物细胞，如 CHO 细胞，昆虫细胞，如 SF9 细胞，植物，如烟草植物，和动物，如转基因牛、山羊、绵羊或猪。

根据另一目标，本发明提供了含有如上所述的嵌合分子和药物学上可接受的载体的组合物用于向治疗宿主给药，。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的组合，其中的切割位点构建来由治疗宿主胃肠道的治疗宿主酶切割，如该酶使肠激酶。在一具体实施方案中，该切割位点构建来在发炎位点，如滑膜或在肿瘤位点，如胃癌处切割。

根据另一目标，本发明提供了如上所述的方法，其中的组合物被包裹。

具体来说，本发明不是现有技术中所揭露的任何方法或组合物，但可以是其改良或改进。

只要阅读本说明书，本领域的普通技术人员将会明白本发明的其它目标、特征和优点。这些其它的目标、特征和优点是本发明的一部分。

附图的简要说明

图 1 是酶(“靶酶”)类型的示意图，对于该酶，设计切割位点来连接本发明的嵌合分子。

发明详述

由于本说明书所用的技术术语是本领域常用的，因此这些术语是清楚的，可以参考如下技术词典：Lewin, *Genes V*, Oxford University Press 出版，1994 (ISBN 0-19-854287-9)；Kendrew 等(编)，*The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd 出版，1994 (ISBN 0-632-02182-9)；和 Robert A. Meyers (编)，*Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc 出版，1995 (ISBN 1-56081-8)。可选择地，可以通过网站获得生物技术术语的定义，如<http://biotechterms.org>。为了更好地理解本发明，下列术语有其特定的含义：

术语“活性片段”或“生物活性片段”意思是指分子，如蛋白质、核酸或抗体，该分子具有生物活性或具有参与该活性的能力，该能力包括但不限于：特异性结合另一种分子的能力，如在抗体/抗原反应或 DNA/DNA 或 DNA/RNA 杂交中；为了诊断的目的，作为抗原或免疫原的能力；具有酶活性；具有酶识别位点；作为酶底物；与配体或受体反应的能力和抑制其它生物活性分子的能力。这些片段与天然产生的核酸、多肽或抗体具有相似的活性，但不必要完全相同。该片段的生物活性包括提高需要的活性或降低不需要的活性。抗体活性片段的例子如免疫球蛋白的 Fc 或 Fab 片段，或免疫球蛋白重链可变区或轻链可变区。

术语“类似物”意思是指与上述分子相比具有至少 70% 序列同源性的分子。分子及其相应的类似物的差别的例子可以包括但不限于，保守氨基酸改变或其相应密码子改变；删除一个或多个氨基酸残基或其相应密码子，例如删除一个或多个二硫键连接位点；增加氨基酸或其相应密码子，如甲硫氨酸，例如，来协助细菌中的表达；不影响化学分子结合效果的该化学分子侧链的保守改变，例如，将甲基改变为乙基、丙基或丁基；或其它相似例子。

术语“抗体”指在人或非人动物中天然产生或诱导产生的抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人化抗体、单链抗体及其片段，如 Fab 或 Fc 片段或免疫球蛋白的重链或轻链可变区。

术语“抗感染物”包括抗细菌、抗病毒、抗真菌及其它抗病原体的分子或化合物，其具有抑制细胞生长或杀细胞活性，通过诱导具有直接抑制细胞生长或杀细胞作用的分子的产生直接或剪接地发生作用。抗感染物的例子是定义，对其不产生限制。

在抗体结合的上下文中，术语“特异性结合”是指抗体与特定多肽，或更准确地与特定多肽的特定表位高活性和/或高亲和力结合。抗体与该特定表位的结合一般强于同一抗体与其它任何表位或不含有该特定表位的任何其它多肽的结合，该特异性抗体一般是通过向动物注射上述特异性多肽来诱导产生该抗体而获得，这种特异性抗体可以与其它多肽弱结合，但仍可检测(例如，是特异性多肽所表现出的结合的10%或更小)。这种弱结合可以与特异性抗体结合容易地区分，例如，通过使用合适的对照。一般地，本发明的抗体与特定多肽特异性结合，其亲和力为大于或等于 10^{-7}M ，优选地为大于或等于 10^{-8}M (如 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 等)。

关于分子的术语“生物活性”包括：如果可以检测该分子，则是诊断活性；如果该分子能作为疫苗或佐剂，则是预防活性；如果该分子可以作为治疗基本或症状的治疗剂，则是治疗活性；如果该分子可以抑制微生物，如细菌、病毒、真菌、变性蛋白颗粒(prions)、寄生虫等的生长和增值，则为抗感染活性；如果该分子具有提高食品的营养价值的能力，则为滋养活性和该分子参与其它的生物反应的能力，如酶反应；在免疫学、抗体-抗原结合、配体-受体结合或信号转导反应等中的结合活性；和相似的活性。

术语“生物学效果”是指任何生物活性的结果，例如包括：诊断效果、预防效果、治疗效果、抗感染效果、滋养及其它公知的常规生物学效果。

术语“内源的治疗宿主分子”或“内源的治疗宿主酶”是指由治疗宿主的基因组编码的分子或酶。

术语“表达盒”是重组或合成产生的核酸结构，其含有一系列在宿主表达系统中能被转录或翻译成一种或多种重组多肽的特定核酸元件。该表达盒可以通过粒子轰击整合道质粒或病毒载体中，如形成表达载体，或者整合到宿主染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。一般该表达盒的序列中包括启动子、转录起始点、翻译起始点、异源有益基因、翻译终止子和转录终止子。可选择地，该表达盒可以含有一个或多个选择性标记。

“表达载体”是指含有或适于用于表达盒以在宿主细胞中表达异源DNA或RNA的载体。许多原核或真核表达载体可以从商业途径获得，合适表达载体的选择是本领域普通技术人员公知的。

任选地，表达载体可以含有一种或多种选择性标记以用于筛选含有该表达载体的宿主细胞。

与本发明的嵌合分子的剪切有关的术语“细胞外”是指在治疗宿主的细胞的外面剪切该嵌合分子，例如，在胃肠道中、血液中、淋巴液中、腹膜液中、组织间液、脊髓液、滑液、阴道液或肺液及其类似空间中。

与本发明的嵌合分子的剪切有关的术语“细胞内”是指在治疗宿主的细胞的里面剪切该嵌合分子。

在可食用产品中使用的术语“微生物细胞”包括微生物体，如酵母和乳酸菌，其适合于人或动物消费。

术语“微生物蛋白”意思是指与从微生物体获得的那些蛋白完全相同或从其衍生的蛋白，这些微生物体包括但不限于：细菌、病毒、真核、变性蛋白颗粒、其它的单细胞有机体、寄生虫及其类似物。

术语“分子”包括任何化合物或其盐，无论是天然产生的还是合成的，包括寡肽；多肽；蛋白，如糖蛋白；核酸，无论是DNA还是RNA；糖；天然产物，如植物产物；其它聚合物，如合成的聚合物和片段；激素；化学化合物，如紫衫醇，其类似物或衍生物；其组合物和类似物。

术语“天然产生的”是指以非人工介入而产生的形式天然存在的任何分子。

在嵌合分子的组分分子与切割位点间的连接中引用的术语“可操作连接”意思是组分分子以这种方式连接，例如，一旦嵌合分子在切割位点切割，那么该组分分子就能表现出一种或多种生物活性。

在本申请中使用的“药学上可接受的载体”意思是指适于上述嵌合分子或含有该嵌合分子的组合物的运输模式的载体。例如，对于肠胃外给药，可接受的载体可以是生理盐水；对于口服给药，可接受的载体可以是经遗传构建而含有上述嵌合分子的食品，如稻米、牛奶、蔬菜等，其中该食品可以是经过加工或抽提的。药学上可接受的载体一般是无毒性的固态、半固态或液态填充剂、稀释剂、包被材料或任何常规形式的剂型佐剂，其使用的剂量和浓度对受体无毒性，且与制剂的其它成分相容。例如，用于制剂的含有多肽的该载体优选地不含有氧化剂和已知会损害该多肽的半衰期或保存期的其它化合物。合适的载体包括但不限于：水、葡萄糖、甘油、生理盐水及其组合。该载体可以含有附加试剂，如加湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂或能提高制剂效果的佐剂。在需要时，可以加入其它材料，如抗氧化剂、保湿剂、粘性稳定剂和相似试剂。还可以加入经皮肤渗透的增强剂，如氮酮。在本申请中用于口服给药的组合物可以形成溶液、悬液、片剂、药丸、胶囊、持续释放制剂或粉末。

术语本申请使用的术语“药物学上可接受的盐”包括酸性加成盐(由多肽的游离氨基形成)和与无机酸,如盐酸、磷酸或有机酸,如乙酸、苦杏仁酸、草酸、酒石酸形成的盐。与羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,如氢氧化钠、钾、铵、钙或铁。这种有机碱是异丙胺、三甲胺等。

在可食用产品中使用的术语“植物”包括蔬菜和谷类,如谷物,典型地如稻、小麦、大麦、玉米、粟、高粱和燕麦。

术语“多肽”是氨基酸聚合物“分子”,其可以或不可以经“生产宿主”进行额外的翻译后修饰,如糖基化或体外修饰,如合成的聚合物,如聚乙二醇的化学加成。术语“多肽”和“多肽组合物”用于指肽、寡肽、蛋白质及其活性片段或衍生物。

术语“生产宿主”是指生产本发明的嵌合分子的宿主系统,该宿主系统包括体内或体外的宿主细胞,其可以是或已经是任何重组载体、质粒或编码上述嵌合分子的分离多核苷酸的受体或后裔。

术语“蛋白”可以与术语“多肽”同义,或可以另外地指两个或多个多肽复合体,可以是一级、二级或三级结构。

术语“靶酶”是指又来消化本发明的嵌合分子的切割位点的酶。例如,如果本发明的嵌合分子设计为由肠激酶消化切割位点,那么“肠激酶”就是靶酶。

术语“治疗宿主”是指预备将本发明的嵌合分子运输到其中从而发生生物效果,如诊断、预防或滋养效果的宿主。这种治疗宿主包括但不限于:人,非人动物,如耕畜,如牛、猪、山羊和马和家畜,如狗和猫,还有啮齿动物,非人灵长类,鸟类,如鸡,植物,微生物,寄生虫和鱼类。“治疗宿主”可以包括两个宿主,例如,如果将含有微生物(下文称作“靶微生物”)特异性切割位点的嵌合分子向对象给药,那么使该微生物通过该患者的胃肠道。该嵌合分子可以在细胞内被靶微生物剪切,或者靶微生物将其完整释放而患者中的“治疗宿主”酶将其切割。例如,如果该嵌合分子携带由可检测信号,如切割活化的绿色荧光蛋白,那么该绿色荧光蛋白就能显示人内脏中存在的微生物。在本说明书中术语“个体”、“对象”、“患者”和“治疗宿主”可以互换。

在对本发明作进一步描述之前,应该明白本发明并不以任何方式限定到所描述的具体实施方案。应该明白,本说明书中所使用的术语仅是为了描述具体实施方案,并不产生限定作用,因为本发明的范围仅由所附的权利要求书来限定。

如果提供了值的范围，那么很明显除非上下文中有相反声明，在该范围上下限之间的每一中间值到该下限单位的十分之一和任何其它的引用值或中间值都包含在本发明的范围之内。这些更小范围的上下限可以独立地从该更小范围中导出，且仍包含在本发明的范围之内，除非在该范围的陈述中有特定的排除性限定。如果所述的范围包括一个或两个限定值，那么不包括这些限定值的一个或两个的范围液包含在本发明的范围之内。

必须注意，在本申请的所附权利要求中所使用的单数形式的术语，如“一”、“一种”、“该”、“多肽”、“多核苷酸”、“嵌合分子”和“分子”，包括其相应的复数形式，除非有明确的声明或描述。例如“多肽”包括多个多肽，“一种试剂”包括一个或多个试剂。

在本申请中讨论的文献仅用来公开本发明申请日前的现有技术，其中的任何文献都不能说明本发明不具有先于在先发明公开的资格。另外，本申请中提供的公开日期可能不同于实际的公开日，其各自需要进行确认。

下文将通过实施例的方式对本发明进行描述，但不以任何方式对本发明产生限定作用。

在本申请中，本发明人发现通过使用一个或多个含有切割位点的连接子，两个或多个组分分子可以有利地组合形成一非天然发生的嵌合分子以向宿主(即“治疗宿主”)给药，其中所述组分分子可以由存在于治疗宿主的切割分子，如酶释放。在本申请中该嵌合分子设计成能被剪切成组分部分的形式，优选地，在治疗宿主的目标部位剪切，从而在切割位点或部位附近产生生物学效果。该嵌合分子的切割可以在治疗宿主的一完全限定范围内发生，如在胃肠道(“G.I”)、滑液或细胞里面，或者切割可以系统发生，如在血液或其它体液中。该嵌合分子切割释放出在治疗宿主中具有功能的组分分子，这些组分分子在从该嵌合分子切割前可以具有或不具有活性。在本发明的一具体实施方案中，在该嵌合分子中，至少有一个组分分子是肽、多肽或其活性片段。

因此，本发明包括通过向治疗宿主给予嵌合分子来运输组分分子到该治疗宿主中以在其中达到生物效果的方法。每个嵌合分子至少含有两个组分分子，每个组分分子通过含有一个或多个切割位点的连接子彼此相连，其中的切割位点由宿主细胞中的切割分子切割。本发明包括嵌合分子，编码其的核酸，含有该核酸分子的载体和宿主细胞，含有该嵌合分子或编码的核酸分子的试剂盒和组合物及其制备和使用方法。具体地，本发明的嵌合分子是非天然发生的。

在其最简单的结构中, 本发明的嵌合分子具有结构式: “ A_xB ,” 其中“A”是第一组分分子, “B”是第二组分分子和“x”是含有一个或多个切割位点的连接子。但是, 本发明的该嵌合分子并不限于 A_xB , 还包括具有结构式 $(x_iB_i)^n$ 的嵌合分子, 其中“i”和“n”分别是正整数, “xB”是主要单元, 可重复(后文为“重复”)。本发明的嵌合分子包括具有结构式 x_1B_1 或 $(x_1B_1)(x_2B_2)$ 的嵌合分子。优选地, 该嵌合分子可以具有结构式: $(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)$ 、 $(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)(x_4B_4)$ 或 $(x_1B_1)(x_2B_2)(x_3B_3)(x_4B_4)(x_5B_5)$ 等, 包括可以合理制备和给药的任何数量的(xB)重复, 其中各个“B”可用相同或不同, 还可以与“A”相同或不同, 各个“x”可以相同或不同。在一些具体实施方案中, 形成重复的组分分子 B 很小。例如, 如果该分子很小, 在单独给药时, 其就会很快被降解。如抗感染肽, 如抗菌肽或小肠三叶因子 (“ITF”)。另外, 没有必要将嵌合分子中的切割位点同时或完全切割, 该嵌合分子中的一个或多个组分分子遭切割, 而其它组分分子仍然保留作为剩余嵌合分子的一部分。例如, 本申请的嵌合分子可以以未切割或部分切割的形式与组织结合, 如与细胞外基质结合, 而且在其部位的酶水平很高时组分分子可以从中逐个地释放。另外, 该组分分子可以不经切割而作为该嵌合分子的一部分被激活, 只要该组分分子具有与其它分子发生翻译的自由活性。

本发明包括含有切割位点的嵌合分子, 该切割位点设计来在治疗宿主的目标部位切割。例如, 本发明的嵌合分子可以设计为在治疗宿主中由胃肠道中的酶切割以释放组分分子从而激活活性, 如抗感染活性。该具体实施方案的具体应用是用于动物或鸡饲料, 该饲料中含有本发明的嵌合分子而具有抗感染活性, 避免抗生素。本发明还可用于人, 特别是婴儿食品, 如牛奶、奶产品、水果、谷物、肉类和果汁。在本发明中, 该嵌合分子由连接子构建, 该连接子含有针对胃肠道的一种或多种酶的切割位点, 如肠激酶切位点。该肠激酶识别位点或切割位点的氨基酸序列是公知的, 该氨基酸序列一般为: $-Lys-Lys-Lys-Lys-Asp-$ 。可以利用重组技术通过任何常规方法在任何数量的合适宿主表达系统(“生产宿主”)中制备具有肠激酶切位点的嵌合分子。这样的例子在题为“Expression Linkers”的美国专利 No. 4, 769, 326 及其相应的欧洲同族专利 EP0035384 中有描述。除了胃肠道中的肠激酶可以用来切割该嵌合分子外, 连接子中的切割位点还可以针对其它胃肠道酶。

适于整合到本发明嵌合分子的连接子中的切割位点的类型可以是能由某种治疗宿主酶切割(下文为“靶酶”)的某一种, 如图 1 所示。宿主中存在的蛋白酶包括宿主细胞的内源酶和由感染病原体导入的酶。在本申请中适于使用的切割位点不包

括那些是氨或羧肽酶底物的切割位点，也不包括非特异性切割位点。然而，在本发明中使用较低特异性的肽链内切酶，如胰岛素、糜蛋白酶和胰蛋白酶。在本发明的一具体实施方案中，该切割位点包括那些是肽链内切酶底物的切割位点。在本发明的一方面，适于本发明使用的该切割位点包括那些是细胞内酶底物的切割位点。在本发明的另一方面，该切割位点包括那些是酶底物的切割位点，该酶在细胞表面具有活性。需要注意的是，该靶酶是组成性地或诱导性地表达，它们系统地或局部地循环。

本发明还包括具有切割位点的嵌合分子，该切割位点设计为在治疗宿主的细胞外切割。在本发明的一方面，该切割位点设计为治疗宿主的内源细胞外酶切割。在本发明的另一方面，如果该嵌合分子不是由转导区和细胞毒性区组合组成，或者第二组分分子不是细胞毒性分子，那么该切割位点就设计为由治疗宿主细胞外存在的任何酶切割，无论是否是内源酶。在本发明的另一方面，如果该切割位点不是来自病原体感染的治疗宿主细胞的病原体激活型切割位点，那么该切割位点就设计或构建为在治疗宿主的细胞内切割。例如，本发明的该切割位点可以针对在治疗宿主中单独诱导或单独导入到治疗宿主中的酶来设计。

本发明还包括将具有上述结构的嵌合分子给药，但是其中的切割位点设计为在治疗宿主的细胞外由酶切割，而不考虑该酶是否是宿主的内源的，在宿主中是组成型表达还是诱导表达。细胞外切割可以在宿主的任何部位发生，如在体液中，包括但不限于在淋巴液、血液、滑液、腹膜液、骨髓液、阴道分泌物和肺液中。细胞外切割可以是在细胞表面切割，因此本发明包括含有连接子的嵌合分子，该连接子的切割位点设计为在治疗宿主的细胞表面酶切割。

根据本发明，挑选合适切割位点及其序列，以用于本发明的嵌合分子使其在治疗宿主内的目标部位切割是本领域公知的。关于酶及其切割位点的信息可以从许多来源中得到，例如，网站 <http://us.expasy.org/cgi-bin/enzyme-search-cl> 中列出了酶种类的列表。如其显示，类“3.4.-.-”是“作用于肽键(肽酶)”的酶，类“3.4.24.-”是“金属肽链内切酶”。另外，点击“3.4.21.9 肽链内切酶”的链连进入下一页，得到该酶的更多信息，其显示“肠激酶”是选择性名称。当进行催化反应时，其特异地“选择性切割胰蛋白酶原的-Lys-/-Ile 键”。其提供了在 Medline 中与该酶相关的参考文章。在另一个例子中，点击“3.4.21.38 凝血因子 XIIa”的链连进入下一页，该页将哈格曼因子作为凝血因子 XIIa 的另一名称，在

进行催化反应时,其作用于因子 VII 的“选择性剪切的 Arg-/Ile 键产生因子 VIIa, 作用于因子 VI 形成因子 XIa”

关于酶及其切割位点的其它参考信息源有 AHFS 药物信息 (AHFS Drug Information), 由 American Society of Health-System Pharmacists, Inc. (7272 Wisconsin Avenue, Bethesda, MD 20814, USA) 每年公开一次。例如, 在 “20:40 Thrombolytic Agents p. 1477” 中, 列出了作为溶血栓试剂的阿替普酶, 其是 “酶人组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 的生物合成 (重组 DNA 来源的) 形式”。而且, “内源人 t-PA 分泌成单链多肽, 其由几种内源酶, 如纤溶酶、组织激肽释放酶、活性因子 X (因子 Xa) 和胰岛素在精氨酸²⁷⁵-异亮氨酸²⁷⁶ 肽键处切割, 从而形成两条链的衍生物。”

另外, 关于用于本发明嵌合分子的酶和剪切位点的其它信息有公开的文献, 如政府网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> 中公开的文献。例如, 输入检索式 “arthritis” 和 “protease”, 就会出现超过 200 篇相关文章。人们能很快明白基质金属蛋白酶 3 (“MMP-3”, 公知为 “基质切割素-1”) 在正常的和骨关节炎的早期变性阶段强烈表达, MMP-2 和 MMP-11 在疾病的晚期阶段正向调节, 如 Aigner, T 等, Arthritis Rheum. 44(12):2777-89 (2001 年 12 月) 的描述。另外, 发现具有强烈蛋白聚糖降解活性的组织蛋白酶 K 在滑膜成纤维细胞中也高度表达, 而且发现组织蛋白酶 K 产生的蛋白聚糖切割产物特异性地加强组织蛋白酶 K 的活性, 如 Hou W. S 等, Am. J. Pathol. 159(6):2167-77 (2001 年 11 月) 的描述。因此, 鉴定用于整合本发明的嵌合分子的合适治疗宿主酶剪切位点式本领域的普通技术人员公知的。

另外, Tortorella, M. D 等, J. Biol. Chem. 275(24):18566-18573 (2000 年 6 月 16 日) 公开了重组人蛋白聚糖酶-11 (“ADAMTS-4”) 对蛋白聚糖的切割, 蛋白聚糖是一种主要的软骨蛋白聚糖, 是在关节炎疾病中遭到可检测损伤的主要基质成分。蛋白聚糖酶-1 和蛋白聚糖酶-2 (“ADAMTS-11/5”) 是锌结合金属蛋白酶的 adamalysin 家族成员。Tortorella 等报道了重组人蛋白聚糖酶-1 在几个位点剪切蛋白聚糖, 所有的位点在 P₁ 位点含谷氨酸残基, 在 P₁' 位点含非极性或无电荷极性的残基 (丙氨酸、亮氨酸或甘氨酸)。最有效的剪切位点是分子的 Glu¹⁶⁶⁷-Gly¹⁶⁶⁸ 键和 G2-G3 区, G1 片段进一步地还在 Glu¹⁴⁸⁰-Gly¹⁴⁸¹ 处遭剪切, 接着在 Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ 处发生剪切。另外, 该作者报道了蛋白聚糖酶-1 和蛋白聚糖酶-2 不在 Asn³⁴¹-Phe³⁴² 处发生剪切, 其是至今为止唯一的在蛋白聚糖酶的 Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ 位点处发生剪切, 而不在基质金

属蛋白酶(“MMP”)位点发生剪切的酶。该作者还报道了其它的研究,这些研究表明在蛋白酶 Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ 位点发生剪切的两种酶, MMP-8 和衲脊蛇溶血素-C 在 Asn³⁴¹-Phe³⁴²MMP 位点处也发生剪切。因此,在设计用于将组分分子运输到滑液中以治疗关节炎的连接子时,例如, Glu-Ala 序列可以插入到在 P₁ 位点具有谷氨酸残基和在 P₁'位点具有无电荷极性残基(丙氨酸、亮氨酸或甘氨酸)的本发明的连接子中,或者使用 Glu-Gly 序列。

在本发明的上述嵌合分子中含有剪切位点的靶酶的例子有许多,且是本领域的普通技术人员公知的。在表 1 中列出了一些例子,但不限于:肠激酶(在内脏中激活),凝血因子,如因子 VIIa、Ixa、Xa、XIa 和 XIIa(在血液中激活), ADAMTS-4、-5(蛋白聚糖酶-1、-2)(在关节、心脏、脑、肺中激活),凝血酶(在血液中激活)、纤溶酶(在血液中激活),补体因子,如因子 D、Clr、C3/C5 转化酶(在血液中激活),胃分泌激素(在胃中激活),颗粒蛋白酶,如胰蛋白酶 E 和 PR-3(在中性粒细胞和白细胞中激活并以活性形式分泌),基质金属蛋白酶(“MMP”,大多数作为酶原分泌),如 MMP-2(在乳腺癌和前列腺癌和受伤的肝中被正向调节)、MMP-7(基质切割蛋白,在腺上皮,如结肠中激活,在肿瘤中被正调节)、MMP-9、MMP-11、MMP-13(MMP-11 和 MMP-13 在乳腺癌中被正向调节),膜型 MMP,如 MT-1、MT-2、MT-3 和 MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-24(在细胞表面活化的跨膜蛋白,一些被排出,在转移中被正向调节),II 型跨膜丝氨酸蛋白酶,如 TMPRSS-2、-4 和 Matriptase(在细胞表面活化的跨膜蛋白,其在肿瘤中被正向调节),30 种去组合蛋白和金属蛋白酶的 ADAM 家族,如 ADAM-10、ADAM-17 和 TACE(TNF 转化酶)(在大多数组织种表达,在质膜中激活),中性溶酶(在正常和损伤肝细胞中表达,在质膜上激活)、组织蛋白酶 K(由滑膜成纤维细胞分泌)、肥大细胞类胰蛋白酶(在哮喘中激活)和组织型纤溶酶原激活物。

在一些具体实施方案中,本发明嵌合分子的切割位点不仅仅包括蛋白酶底物,还包括其它酶的底物,如糖苷酶和肝素酶

在另一具体实施方案中,嵌合分子中的酶切位点或构建的位点设计为使酶在疾病、应急、病原体、过敏、早期生长或衰老条件及其它需要治疗的调节下表达或提高。

本发明连接子包括具有一个或多个切割位点的连接子。例如,本发明的连接子可以有利地含有间隔子分子以使该切割位点更好地暴露与酶而切割。因此,在一具体实施方案中,本发明的连接子中含有使酶更好地作用于切割位点的间隔子。在该

实施方案中, 该连接子可以是一系列不发生自身折叠的任意氨基酸残基, 因此, 这些氨基酸的例子可以是一系列的亲水氨基酸分子。另外, 当使用间隔子时, 本发明的连接子中可以任选地含有额外的另一切割位点, 因而该间隔子可以与切割位点一起遭剪切而产生具有合适或天然 C-末端或 N-末端的组分分子或合适活性片段。

在本发明的另一方面, 如果在连接子各边的组分分子在切割之前都具有活性且有良好的蛋白酶亲和性, 那么本发明的该连接子优选含有大约 10-20 各氨基酸残基, 更优选为约 11-17 个氨基酸残基(后文称为“间隔子”)。例如, 本发明可以在蛋白 X 和 Y 之间含有间隔子, 其中该间隔子含有氨基酸序列: 如蛋白 X-ASGGGG**IEGR**GGGSA-蛋白 Y, 其中黑体和下划线标出的序列代表因子 Va 切割位点, 蛋白 X 和 Y 是组分分子。因此在保证组分分子活性的情况下, 可以将额外的氨基酸构建到该嵌合分子的酶切位点的上游和/或下游以确保该切割位点暴露于剪切酶。这种氨基酸的例子是本领域公知的, 如参考 Hosfield, T 和 Lu, Q., “Influence of the Amino Acids Residue Downstream of (ASP)₄ Lys on Enterokinase Cleavage of a Fusion Protein”, Anal. Biochem. 269:10-16(1999)。

在本发明的另一方面, 如果上述组分分子直到剪切后才具有活性, 那么使用较少的氨基酸, 例如, 该嵌合分子可以含有氨基酸序列: 蛋白 X-GGR**SSG**G-蛋白 Y, 其中 RS 代表纤溶酶的切割位点, 蛋白 X 和 Y 是组分分子。

本发明还包括很少发生的具体实施方案, 其中当一组分分子的 C 末端与第二组分分子的 N 末端相连时, 该融合组分分子可以自身产生用于切割的切割位点, 而不需要额外的连接子分子。

在本发明的一具体实施方案中, 当该切割位点设计为在非细胞表面的细胞外切割时, 该嵌合分子不是糖基干扰素 β 。

本发明的组分分子可以是在宿主中可能实现生物学功能的任何分子, 因此, 本发明的组分分子包括肽、蛋白质、核酸、糖类、其它天然或合成的聚合物、小分子药物、用于诊断的可探测分子、半抗原、配体、抗感染物及其类似物和活性片段。

本发明的组分分子可以是任何起源或来源、人或非人、天然或合成的。因此, 该组分分子可以是肽、蛋白或其类似物或衍生物, 其与从人、非人动物、植物、鱼、昆虫和微生物, 如细菌、病毒、真菌和寄生虫中获得的组分分子完全一致。

在本发明的另一方面, 该嵌合分子是多蛋白, 其中的组分分子至少有两个或全部是肽或多肽或其活性片段(后文称为“蛋白组分”)。在本发明中适于使用的蛋白

组分包括但不限于：抗体、抗原、受体、生长因子、激素、细胞因子、淋巴因子、趋化因子、酶、抗感染物、前药、毒素、营养改良分子及其活性片段。

表 1：样品靶酶：用于切割治疗宿主体内的嵌合分子的内源蛋白酶

	切割位点 (...PI*PI'...)	部位	表达/作用
肠激酶	DDDDK*A		十二指肠和小肠
<u>凝聚因子</u> ： 因子 Xa 因子 VIIa, IXa, XIIa 因子 XIa	IGER*T (PI', 非 R/T) R*I R*A/V		血液
ADAMTS 4、5 Aggrecanases 1、2	KEEE*GLSS		关节、心脏、脑、肺 (对于关节炎)
凝血酶	(P4) (P3) PR* (P1') (P2') 其中 (P3) (P4)=疏水的 (P1') (P2')=非酸性的		血液
纤溶酶	K/R*S		血液
<u>补体因子</u> ： 因子 D Clr C3/C5 转化酶	R*K K/R*I R*S		血液
Gastricin	Y*(PI')		胃液
颗粒蛋白酶： 胰肽酶 E PR-3	AAPV*(P1') PLAQAV*RSSS	以活性形式分泌	嗜中性粒细胞，白细胞
基质金属蛋白酶： MMP-7(基质切割蛋白) 和 MMP 2, 9, 11, 13 等	ELR*EST	大多数以酶原形式分泌	腺上皮(结肠)中的 MMP-7， 但在肿瘤中正向调节，包括： 乳腺癌中的 MMP 2, 11, 13。 MMP-2 在前列腺癌和肝损伤 中也正向调节
<u>膜型 MMP</u> ： MT1, 2, 3; MMPs 14- 16; 24		细胞表面，跨膜 蛋白； 一些脱落	在转移中正调节
<u>II 型跨膜丝蛋白酶</u> ： TMPRSS 2, 4; Matriptase	类胰岛素	细胞表面，跨膜 蛋白；	在肿瘤中正调节
<u>ADAM</u> ： 去组合蛋白和金属蛋白 酶家族：约 30 个成员， 包括 ADAM10, 17 TACE (TNF 转化酶)	PLAQA*VRSS	质膜	大多数组织

中性溶酶	(PI)*F/Y 其中(P1)= 疏水性的	质膜	正常的或肿瘤肝
胱冬酶:1, 3, 8, 9 半胱氨酸蛋白酶 3	选择性, 粘性末端 DEVD*G	细胞质	普遍存在, 由细胞压力诱导 半胱氨酸蛋白酶 1 激活 IL-18

在本发明另一具体实施方案中, 至少一组分子选自可溶性 p75TNF α 受体 Fc 融合体、人生长激素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- α 2b、聚乙二醇化(PEG)干扰素- α 、PEG-asparagase、PEG-adamase、抗-C017-1A、水蛭素、组织型纤溶酶原激活物、促红细胞生成素、人 DNA 酶、IL-2、凝血因子 IX、IL-11、TNK 酶、活化的蛋白 C、PDGF、凝血因子 VIIa、胰岛素、干扰素 α -N3、干扰素 γ 1b、干扰素 α 共有序列、血小板活化因子乙酰水解酶及其活性片段。

在本发明的另一具体实施方案中, 上述嵌合分子含有作为组分分子的肽、蛋白或其活性片段, 其选自白介素, 生长因子, 如 IGF-I、EGF、FGF、PDGF、ITF 和 KGF, 集落刺激因子, 如 GM-CSF 和 M-CSF, 凝血因子, 如因子 VIII 或因子 IX、tPA, 生长激素, 如 hGH, 抗感染物, 如乳铁蛋白和溶菌酶, 血纤蛋白原, α_1 -抗胰蛋白酶, 促红细胞生成素, 干扰素, 如干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 和共有序列干扰素, 胰岛素, 人绒毛膜促性腺素, 白喉蛋白, 抗嗜血因子, 受体, 疫苗, 抗生素或其类似物或片段。

在本发明的优选具体实施方案中, 将食品药品监督管理局(“FDA”)核准的那些药物用作组分分子是特别理想的, 这些药物在网站: www.FDA.gov 中有列出。例如在生物制剂下被核准的生物分子, 在 2002 Biological License Application Approvals 下的链连列出了分子, 如用于治疗复合硬化症的回复形式的干扰素 β -1a(商业名称为“Rebif”), 白喉和破伤风毒素和非细胞百日咳疫苗(商业名称为“Daptacel”), 用于治疗成年C型慢性肝炎的聚乙二醇干扰素 α -2a(peginterferon α -2a)(商业名称为“Pegasys”)和阿达木单抗(商业名称为“Humira”), 该阿达木单抗是特异于人肿瘤坏死因子(“TNF”), 用于治疗风湿性关节炎的重组人 IgG1 抗体。在核准年份下还列出了其它核准生物试剂。

在本发明的一具体实施方案中, 没有组分分子是抗体。

在本发明的另一具体实施方案中, 一个或两个或多个组分分子是抗体或其活性片段(后文称作“抗体组分”)。本发明中的抗体组分包括任何适于治疗、预防或诊

断的组分。在优选具体实施方案中，该抗体组分选自 FDA 核准的抗体系列。这种抗体的例子包括但不限于：抗-IL8、抗-CD11a、抗-ICAM-3、抗-CD80、抗-CD2、抗-CD3、抗-补体 C5、抗-TNFA、抗-CD4、抗-A4B7、抗-CD40L(配体)、抗-VLA4、抗-CD64、抗-IL5、抗-IL4、抗-IgE、抗-CD23、抗-CD 147、抗-CD25、抗-J82 整联蛋白、抗-CD18、抗-TGF β 2、抗-因子 VII、抗-IIBIIA 受体、抗-PDGFR、抗-F 蛋白(来自 RSV)、抗-gp120(来自 HIV)、抗-Hep B、抗-CMV、抗-CD14、抗-VEFG、抗-CA125(卵巢癌)、抗-17-LA(结肠细胞表面抗原)、抗-抗-独特型 GD3 表位、抗-EGFR、抗-HER2/neu、抗-AVB3 整联蛋白、抗-CD52、抗-CD33、抗-CD20、抗-CD22、抗-HLA、抗-TNF 和 抗-HLA DR。

在一具体实施方案中，该第一组分分子是抗体或其活性片段，该第二组分分子或其它组分不是抗体或抗体片段。在另一具体实施方案中，该第一组分分子不是抗体或抗体片段，但第二组分分子或其它组分分子是抗体或其片段。在本发明的变体中，嵌合分子的所有的组分分子是抗体或其活性片段。

在一具体实施方案中，本发明还包括其中至少有一个组分分子是抗微生物的肽、蛋白或其类似物或活性片段的嵌合分子。该抗微生物的肽是公知的，如包括抗菌肽、溶菌酶、乳铁蛋白质、ITF、蛙皮素及其它天然抗感染物。

在另一具体实施方案中，本发明包括其中的第一组分分子是上述的肽、蛋白或其活性片段，第二组分分子是化学化合物的嵌合分子。适于本发明的化学化合物优选是 FDA 核准的化合物，例如，在 www.FDA.gov 中由 CDER 核准的化合物。在本发明的一方面，该化合物是激素，如睾酮、雌激素、孕酮或其类似物或衍生物。在本发明的另一方面，该化合物是有毒化合物，如紫衫醇、阿霉素，顺铂或其类似物或衍生物。在本发明的变体中，该化合物是抑制剂，如基质金属蛋白酶抑制剂或化学抗感染剂。

嵌合分子的例子包括两组分分子，包括但不限于下列组合：乳铁蛋白/乳铁蛋白质、乳铁蛋白/溶菌酶、溶菌酶/溶菌酶、乳铁蛋白/EGF、EGF/EGF、乳铁蛋白/ITF、ITF/ITF、ITF/EGF、EGF/KGF、KGF/KGF、ITF/KGF、KGF/PDGF、PDGF/PDGF、 α_1 -抗胰蛋白酶/MMP 抑制剂、雌激素/孕酮、抗体/抗体、ITF/ITF 及其类似物、变体或衍生物。

上述嵌合分子的组分分子可以具有不同活性，例如，如果该组分分子是基质金属蛋白酶("MMP")，挑选该组分分子用来改变细胞生长，调节细胞凋亡，影响细胞迁移、影响细胞与细胞间的交流和影响肿瘤进程。如同 McCawley, L. J 在 "MMP-7-

generated soluble Fas ligand is effective in killing Fas-expressing tumor cells”和 Matrisian, L.M 在“Matrix metalloproteinase:they’re not just for matrix anymore ” Current Opinion in Cell Biology 13:534-540 at 536(2001)中的阐述。在可选择的具体实施方案中,本发明的嵌合分子可以含有是 MMP 活性抑制剂的组分分子。

将本发明的嵌合分子组合给予治疗宿主以在该治疗宿主中产生生物学效果,该生物学效果可以是诊断、治疗、预防、抗感染或滋养。

在需要调节宿主中目标多肽的活性的情况下,可以将本发明的嵌合分子组合物用作治疗剂以在特定解剖学位点提供活性。

上述组分分子可以有利地组合成嵌合分子以用于运输或在治疗宿主中的不同位点发生剪切。在一具体实施方案中,将嵌合分子,如含有抗感染物的嵌合分子运输到治疗宿主的内脏中。这种组分的例子包括但不限于位于胃肠道中,例如包括但不限于:抗感染物,如小肠三叶因子 (“ITF”)和蛙皮素,乳铁蛋白,如铁蛋白,表面活性剂蛋白,如 SP-A、SP-D 和溶菌酶;抗-发炎分子,如环氧合酶(COX)-2 抑制剂(J. Pharmacol. Exp. Ther. 290:551(1999));抗-癌分子,例如是分泌的肿瘤抑制剂的 DMBT1(Deleted in malignant brain tumors 1),其在食道癌和消化道癌中被删除,如同 Cancer Res. 61:8880(2001)的描述;营养改良分子,如牛奶蛋白;和生长因子,如上皮生长因子 (“EGF”)、胰岛素类生长因子 (“IGF-I”)和角化细胞生长因子 (“KGF”)。在胃肠道中释放的组分分子包括那些在胃肠道中具有活性的分子和那些被转移到覆盖内脏的上皮细胞中的分子,如 IgA。在本发明的具体实施方案中,该酶一般存在于治疗宿主的内脏中,不需要加入或给予其它酶。

也可以将组分分子有利地组合来向肺给药,如使用合适的气雾剂来防止或治疗感染、疾病,如癌症、充血或过敏反应,或其它炎性条件。适于本发明使用的抗感染物包括作为组分分子的表面活性剂蛋白蛋白 SP-B 和 SP-C。

另外,组分分子可以有利地作为本发明的嵌合分子局部地给予发炎部位,如风湿性关节炎患者的关节。这些组分分子包括但不限于:IL-10、白介素 1 受体拮抗剂(IL-1R α)和可溶性 TNF- α 受体 (“solTNFR”)等。

在本发明的另一方面,本发明嵌合分子适于静脉内给药,例如但不限于:刺激多元造血作用的 GM-CSF 和/或 IL-3,用于乳腺癌的 Flt2 和 TRAIL。在一些实施例中,可以通过蛋白酶切位点来提供治疗效果,该蛋白酶切位点在体内组分分子具有

活性的位置或附近发生优先切割。这通过在嵌合分子中设计一个或多个由蛋白酶选择性识别的切割位点来实现,该蛋白酶的表达和/或活性在被治疗条件下局部升高。

在一具体实施方案中,在本发明嵌合分子中的至少一个组分分子可以是抑制分子,如 α -天花粉蛋白,一种来自 *Trichosanthes kirilowii* 的真核核糖体失活蛋白,其抑制人免疫缺陷病毒(“HIV”)的复制(参见 Kumagai 等,Proc. Natl. Acad. Sci. 90:427-430(1993))。

在本发明的优选实施方案中,如果该嵌合分子的第一组分分子通过连接子与第二组分分子相连,那么该第一组分分子不抑制第二组分分子的活性,反之亦然。

在另一具体实施方案中,本发明的嵌合分子包括指导嵌合分子到宿主的作用部位的靶分子。该靶分子包括受体的配体,如细胞表面受体,或对一部位具有亲和性的其它分子。例如与 T 细胞结合但不使其活化的抗-CD40 抗体或与 EGF 受体结合但不使其结合的 EGF 片段。该靶分子可以替换本发明嵌合分子中的第一组分分子或与第一组分分子连接并从其切割。

任选地,本发明的嵌合分子包括指导该嵌合分子分泌或贮存的信号肽或引导序列,因而当该嵌合分子在生产宿主中产生时,该嵌合分子可以从生产宿主分泌或指导在生产宿主中的贮存。引导序列的例子包括但不限于:来源于酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的 α -因子分泌引导子,如同 US 4,870,008 的描述;或如果该嵌合分子是在单子叶植物的种子中生产,来源于种子贮存蛋白,如来源于 Gt1 和 G1b 基因的信号肽,如同 WO 01/83792 的描述。

在一具体实施方案中,本发明的嵌合分子还含有作为第一组分分子的在生产宿主中高度表达的生产宿主蛋白或其部分(后文称为“生产宿主肽”)。在本发明的一方面,具有高度表达的生产宿主肽的嵌合分子同时与一个或多个第二组分分子相连,该第二组分分子在缺乏生产宿主肽时一般很难表达。这种第二组分分子的例子包括小分子肽,如 ITF、蛙皮素及其它天然抗感染物。因此,在本发明的一具体实施方案中,该嵌合分子可以用下列通式表示:生产宿主肽-(连接子-小分子肽)_n,或者生产宿主肽-连接子-(小分子肽)_n,其中 n 是 1-10 的正整数,任选为 2-7,更任选为 3-5。该小分子可以是任何表达有益的小分子,例如可以含有约 2-60 个氨基酸残基的序列,任选地约 5-40 个,更任选地约 7-25 个,更任选地约 10-20。任选地,本发明的嵌合分子还可以含有便于在从生产宿主中生产出来后纯化的部分,如组氨酸标记。

在一具体实施方案中，本发明还包括其中的连接子含有间隔子的嵌合分子。该间隔子可以仅含有几个氨基酸残基，例如不影响该嵌合分子在切割位点的酶切割，但仍可以使切割位点更容易地切割的氨基酸残基。在另一具体实施方案中，该连接子含有两个切割位点，在该间隔子的每一端各一个，因此该间隔子不与任一组分分子相连接。

本发明的嵌合分子可以制成许多形式而运输到治疗宿主中。例如，在一具体实施方案中，当将编码该嵌合分子的核酸倒入到治疗宿主中时，该嵌合分子是可食用产品的组分。该可食用产品包括但不限于：牛奶(当该生产宿主时动物，如山羊或牛时)、植物(当该生产宿主时蔬菜，如西红柿时)、种子(当该生产宿主时谷物，如稻、小麦、大麦、燕麦或粟)、微生物细胞(当该生产宿主时乳酸菌或酵母时)及其衍生物和提取物。

因此，本发明包括通过口服、口腔、阴道、直肠、颅内、心室内、肠胃外或通过吸入给予嵌合分子而将该嵌合分子运输到治疗宿主中的方法，运输的肠胃外路径包括静脉内、动脉内、鼻内、肌肉内、皮下、腹膜内、透皮或经皮肤。

在本发明的另一具体实施方案中，上述嵌合分子包括作为组分分子的多肽或核酸疫苗和/或作为组分分子的辅助分子或其结合。疫苗可以是感染性有机体的组分、毒素或在癌细胞中过量表达的癌抗原。

在一具体实施方案中，该嵌合分子不是核酸分子。但是，如果该嵌合分子是多蛋白，本发明就包括编码该嵌合分子的核酸分子和含有该核酸分子的载体及含有该核酸分子的宿主细胞。因此，一般地，如果该嵌合分子是多蛋白，那么本发明就提供核酸分子，其从 5'到 3'方向依次编码：第一组分分子，与第一组分分子相连的编码连接子的核酸，与该核酸连接的编码第二核酸分子的核酸分子。本发明的嵌合分子可以构建表达盒的形式，该表达盒含有启动子，和任选的转录终止子和更任选的翻译终止子，所有的这些都插入到可用于转染适合宿主的表达载体中，如表达该嵌合分子的生产宿主中。

在本发明的另一具体实施方案中，上述嵌合分子含有的组分分子是核酸分子，其中的连接子含有如上所述的酶切位点。可以将这种嵌合分子运输到治疗宿主中，在治疗宿主中，一旦切割，该核酸组分分子就被转录和/或翻译而在治疗宿主中发生作用。

本发明还包括含有上述嵌合分子的组合物和药物学上可接受的载体或赋形剂。适于本发明使用的药物学可接受的载体或赋形剂是本领域常用的。该组合物形成适

于向治疗宿主给予该嵌合分子的路径的形式，因此，该组合物可以制成适于口服运输，口腔运输，直肠运输，阴道运输，颅内运输，心室内运输，肠胃外运输，如静脉内、动脉内、鼻内、肌肉内、皮下、腹膜内、透皮运输和吸入的形式

在另一具体实施方案中，本发明包括包含本发明的嵌合分子组合物和向治疗宿主给予该组合物的说明书的试剂盒。该说明书一般描述组合物的给药路径，如口服运输，口腔运输，直肠运输，阴道运输，颅内运输，心室内运输，肠胃外运输，如静脉内、动脉内、鼻内、肌肉内、皮下、腹膜内、透皮运输和吸入。

将含有组分分子的嵌合分子运输到治疗宿主是将活性分子运输到治疗宿主以产生生物效果的一种有效方法，当该嵌合分子在体内由一种或多种治疗宿主中存在的酶切割时，本发明的嵌合分子可以构建来将活性分子运输到宿主中，其运输时间比运输单个组分分子药长。本发明的嵌合分子也可以构建来将活性分子运输到治疗宿主的某一位点以使其切割并发生作用。本发明的嵌合分子还可以构建来组合一个或多个能发生协同作用或其它作用的活性分子以治疗疾病或症状。

本发明的嵌合分子可以用本领域的常规方法制备，例如这样一种方法：将编码第一组分分子的核酸序列在 5'到 3'方向与含有至少一个切割位点的连接子连接，该连接子再与第二组分分子连接。一般连接子在合适的限制酶识别位点和切割位点处产生，其中将不同的核酸片段与调控序列，如启动子、转录和翻译终止子及任选的增强子连接，从而产生一个含有或不含有选择性标记的表达盒。任选地，该选择性标记可以存载体中，该表达盒可以插入到该载体中而形成表达载体，从而用于转染细胞（“生产宿主”）以产生嵌合分子。为了说明的目的，下文描述了怎样制备本发明的嵌合分子的实施例，它们不产生限制。虽然该嵌合分子、组合物和含有其的试剂盒是新的，但是所用的都是常规技术。

多肽组合物

术语“目标蛋白和多肽”是指一个具体实施方案，在该具体实施方案中，本发明的嵌合分子的组分分子是蛋白和多肽。这些目标蛋白和多肽可以从天然发生的来源中获得或合成制得，如通过重组技术制得。天然发生的蛋白和多肽的来源一般依赖于该蛋白来源的种，该目标蛋白也可以通过合成方式制得，例如通过在合适宿主中表达编码有益蛋白的基因。使用任何常规的蛋白纯化步骤来纯化。例如，可以用最初原料制得溶解产物并用 HPLC、筛析色谱法、凝胶电泳或亲和层析纯化。单

个的组分分子可以通过化学方式连接在一起或表达成单链多肽,例如通过在生产宿主中表达编码核酸分子。

本发明还提供了在本发明的嵌合分子中作为组分分子的多肽片段的用途。在一些具体实施方案中,片段表现出一种或多种与相应的天然发生多肽相关的活性。例如,片段可以用于产生全长多肽的抗体和检测与多肽活性有关的和/或调节多肽活性的试剂的方法。目标多肽片段一般长度至少有约 10-300 个氨基酸,任选地,该片段的长度至少约为 25 个氨基酸,更任选地,该片段的长度为约 50 个氨基酸,更任选地,该片段的长度为约 75 个氨基酸,更优选地,该片段的长度约为 100 个氨基酸,更优选地,该片段的长度约为 200 个氨基酸。特定的目标片段包括那些具有酶活性的片段,那些具有生物活性的片段或能与其它蛋白或核酸结合的片段。

除了天然发生蛋白,本发明的组嵌合蛋白的组分分子可以含有非天然发生形式的多肽,例如变体,如融合蛋白,其类似物和衍生物,其中该变体与天然发生蛋白同源或完全相似。在实施例,该融合蛋白可以含有目标多肽或其片段,和与在目标蛋白的 C 末端和/或 N 末端框架内融合的非目标多肽的多肽,或插入到目标多肽的非目标多肽的多肽。该融合组分可以或不可以通过本发明的连接子与组分分子连接。

合适的融合组分包括但不限于能与特异于该融合组分的抗体结合的多肽(如,表位标记,如红血球凝聚素、FLAG 和 c-myc),能提供可检测信号的多肽(如荧光蛋白,如绿荧光蛋白质、来自珊瑚虫种的荧光蛋白质、 β -牛乳糖,荧光素酶,cre 重组酶),具有催化作用或诱导细胞反应的多肽,能使融合蛋白从真核细胞中分泌的多肽,能使融合蛋白从原核细胞中分泌的多肽,能结合金属离子的多肽(如,His_n,其中 n = 3-10,如 6His)。

例如,如果上述融合组分具有免疫识别表位,那么就可用表位特异性抗体来定律检测多肽的水平。在一些具体实施方案中,该融合组分具有可检测信号,在这些具体实施方案中,基于该融合组分产生的信号的类型选自检测方法。例如,如果该融合组分是荧光蛋白,那么就检测该荧光。

如果上述融合组分是能产生可检测产物的酶,那么可以用合适的方法来检测该产物。例如, β -牛乳糖酶作用底物可以产生能用分光光度计检测到的有色产物,荧光酶、荧光素酶可以产生用光度计检测的发光产物。

本发明的嵌合分子多肽在非天然发生环境中存在，即它们已从其天然发生环境中分离出来。例如，在某些具体实施方案中，如果该嵌合分子存在于不含其它蛋白的组合物中，则该嵌合分子完全纯化。

本发明的嵌合分子多肽可以以与其它蛋白或其它天然发生的生物分子，如寡糖、多核苷酸及其片段等完全分离的形式存在。在某些具体实施方案中，该嵌合分子纯度至少为约 95%，通常为至少约 97%，更通常地为约 97%，任选地为至少约 98% 或 99%。

任何常规的纯化方法都可以使用以实现本发明的目的。例如，如果合适，可以参考 Guide to Protein Purification (Deuthser 编) (Academic Press, 1990) 中的蛋白质纯化技术的描述。

肽

在本发明的一些具体实施方案中，上述组分分子是肽。在一些具体实施方案中，该肽显示处一种或多种下列活性：抑制目标多肽与作用蛋白的结合，抑制目标多肽与另一多肽的结合，抑制目标多肽的信号转导活性，抑制目标多肽的酶活性，抑制目标多肽的 DNA 结合活性。在一些具体实施方案中，该多肽含有相应的天然发生蛋白的 3-10 个、5-30 个或 10-25 个氨基酸的序列。

肽可以是天然发生或非天然发生的氨基酸，肽可以是 D-氨基酸，D-氨基酸和 L-氨基酸的组合和具有特定属性的不同“类型”氨基酸(如， β -甲基氨基酸， $C\alpha$ -甲基氨基酸和 $N\alpha$ -甲基氨基酸等)。另外，肽还可以是环肽。为了导入特定的结构部分，肽可以含有非标准氨基酸，任何已知的非标准氨基酸都可以使用。非标准氨基酸包括但不限于：1, 2, 3, 4-四氢异唑啉-3-羧酸酯、(2S, 3S)-甲基苯基丙氨酸、(2S, 3R)-甲基-甲基苯基丙氨酸、(2R, 3S)-甲基-苯基丙氨酸和 (2R, 3R)-甲基-苯基丙氨酸、2-氨基四氢化萘-2-羧酸、羟基-1, 2, 3, 4-四氢异唑啉-3-羧酸酯、 β -吡啶(D 和 L)、HIC(组氨酸异唑啉 羧酸)和 HIC(组氨酸环脒)。氨基可以将酸类似物和类肽(peptidomimetics)插入到肽中以诱导或帮助特定二级结构的形成，该类似物和类肽包括但不限于：LL-Acp(LL-3-氨基-2-propenidone-6-羧酸)、 β -转角诱导二肽类似物、 β -片层诱导类似物、 β -转角诱导类似物、 α -螺旋诱导类似物、 γ -转角诱导类似物、Gly-Ala 转角类似物、氨基结合等构物(amide bond isoster)或 tetrazol。

肽可以是线状或环状假肽(Kuisle 等, 1999), 可以是环肽或双环肽, 例如, 可以将 C-末端羧基或 C-末端酯基诱导形成环: 将羧基或酯基内的-OH 或酯基(-OR) 分别替换为 N-末端氨基从而形成环肽。例如, 在合成和切割而得到肽酸后, 用合适的羧基激活物, 如二环己基碳二亚胺(DCCI) 在溶液中, 如在二氯甲烷 CH_2Cl_2)、二甲替甲酰胺(DMF) 混合物中将自由酸转化为活性酯, 然后通过用 N-末端胺替换内部的该活性酯而形成环肽。使用非常稀的溶液可以提高内环化而防止聚合。产生环肽的方法是本领域公知的。

抗体

本发明提供了含有作为组分分子的特异性识别一特定多肽(后文称作“靶多肽”) 的抗体或其活性片段的嵌合分子, 可以用本领域的各种常规方法生产合适抗体, 如多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体和抗体片段。本发明的抗体包括本领域常规的非人灵长类抗体、鼠抗体、家鼠抗体、绵羊抗体、山羊抗体、兔抗体、猪抗体、牛抗体等, 无论其是否是内源形式或“人源化的”。本发明的抗体还包括灵长源抗体和嵌合抗体。

本发明的抗体可以执行各种功能, 它们能作为靶抗体、中和抗体、稳定抗体或增强抗体而发生作用。它们能作为其它抗体的激动剂或拮抗剂而发生作用, 它们能接到 ADCC。它们能阻断抗体, 能抑制结合多肽与其配体或其底物的特异性结合。另外, 本发明的抗体能特异性抑制 其它分子底物的与其结合肽的结合。

在一具体实施方案中, 可以通过用含有靶多肽或其部分的多肽来免疫宿主动物而制备多克隆抗体。例如, 为了制备抗人靶多肽的抗体, 合适的宿主动物包括但不限于: 鼠、家鼠、绵羊、山羊、仓鼠、豚鼠、鸡和兔。蛋白免疫原可以来源于任何物种, 包括鼠、人、非人灵长类、兔、猴、鸟、昆虫、爬虫或甲壳虫。宿主动物一般与免疫原不同种。抗体的制备方法是本领域公知的, 如 Howard 和 Bethell (2000) 的描述。一般地, 用作组分分子的抗体是与治疗宿主相容的, 例如, 如果该抗体作为嵌合分子的组分想人给药以达到治疗、预防或诊断的目的, 那么该抗体优选为人抗体或人源化抗体或其活性片段。

上述免疫原可以包括完整蛋白或其片段或衍生物。假如是蛋白或其片段, 那么该免疫原可以包括翻译后修饰, 如糖基化, 如同内源靶蛋白那样。含有靶蛋白细胞外区, 如癌抗原的免疫原可以用本领域公知的各种方法制备, 例如通过用常规重组方法表达克隆基因, 或者从肿瘤细胞培养物上清中分离。

本发明的多克隆抗体用常规技术制备，这些技术包括用含有少于约 1% 杂质的基本纯的靶蛋白免疫宿主动物。可选自地，该宿主动物可以用经编码靶蛋白或其抗原部分的分子转化的全细胞免疫，而使该全细胞在细胞表面高密度表达免疫原或其抗原部分，如膜蛋白。这样的例子是使用含有编码靶多肽的核酸的杆状病毒转化的昆虫细胞或含有该核酸分子的载体转化的鼠细胞。

为了增强宿主动物对免疫原的免疫反应，可以将该靶蛋白与佐剂结合。合适的佐剂包括但不限于：明矾，糖苷，硫酸盐，大的聚合阴离子和油与水的乳液，如弗氏佐剂，完全的或不完全的。该靶蛋白还可以和合成的载体蛋白或合成抗原结合。该靶蛋白通过皮内、皮下、肌肉内或腹腔内以初始剂量，接着一次或多次，通常至少两次额外的加强剂量向宿主给药。在免疫后，从免疫动物中采集血清，用于抗体产量测试，存在于最终抗血清中的免疫球蛋白还可以用已知方法分离，如铵盐分馏法或 DEAE 色谱法。

本发明的单克隆抗体还可以用常规方法制备。一般地，如上所述的免疫宿主动物的脾和/或淋巴结是血浆细胞的来源，然后将该血浆细胞与骨髓瘤细胞融合以制得分泌抗体的杂交瘤细胞。培养该杂交瘤细胞，用标准技术监测单个杂交瘤的培养上清，以鉴定产生具有目的特异性的抗体的克隆。

该抗体可以用常规技术从杂交瘤细胞上清或从宿主中存在的腹水液中纯化，如使用与不溶性支持物，如蛋白 A 琼脂糖结合的抗原的亲和层析。用这种方式产生的抗体随后可以修饰或优化以使其具有目的特性。

该抗体可以制备成单链，替换免疫球蛋白分子的正常多聚合结构，单链抗体在 Jost 等(1994)中有描述。将编码重链可变区和轻链可变区的 DNA 序列与编码至少四个小中心氨基酸，即丙氨酸或丝氨酸的间隔子相连，由这种融合体编码的蛋白使功能可变区集合保留了原始抗体的特异性和亲和性。

本发明还提供了“人造”抗体，如单链抗体和在体外产生和筛选的抗体片段。在一些具体实施方案重，这些抗体展示在噬菌体或其它病毒颗粒的表面。在另一具体实施方案重，人造抗体与病毒或噬菌体结构蛋白，包括但不限于：M13 基因 III 蛋白一起作为融合蛋白存在。制备这种人造抗体的方法是本领域公知的(美国专利 No. 5, 516, 637、5, 223, 409、5, 658, 727、5, 667, 988、5, 498, 538、5, 403, 484、5, 571, 698 和 5, 625, 033)。在一些具体实施方案重，本发明使用的抗体包括一个或多个重链，一个或多个轻链，一个或多个与一个或多个轻链一起的重链，或仅其可变区。

对于体内应用，特别是向人注射，在一些具体实施方案中，降低非人抗体的抗原性是理想的。治疗宿主对含有非人抗体的嵌合分子的免疫反应可以潜在地减少治疗有效周期。人源化抗体的方法是本领域公知的，该人源化抗体可以是具有转基因的人免疫球蛋白不变区基因的动物的产物，如国际专利 W090/10077 和 W090/04036 中的描述。可选择地，该目标抗体可以通过重组 DNA 技术构建，用相应的人序列替换 CH1、CH2、CH3、铰链区和/或框架区，如 WO 92/02190 的描述。

另外，编码免疫球蛋白的基因可以用于本发明中作为嵌合分子的组分或作为编码本发明嵌合分子的核酸。用免疫球蛋白 cDNA 构建的免疫球蛋白基因是本领域公知的，如同 Liu 等(1987a)和 Liu 等(1987b)的描述。信使 RNA 从杂交瘤或脾或其它产生这种抗体的细胞中分离，用于制备 cDNA 文库。可以通过聚合酶链反应(“PCR”)用特异性引物扩增目的 cDNA，如美国专利 No. 4, 683, 195 和 4, 683, 202 的描述。可选择地，制备文库并筛选以分离目标序列。可以将编码抗体可变区的 DNA 序列与人不变区序列融合，该人不变区(“C 区”)是本领域公知的，如 Kabat 等，1991 的描述。人 C 区基因可以容易地从已知克隆中获得，根据目标效应功能(effector function)，如补体结合或抗体依赖型细胞毒性来选择其异型。可以使用 IgG1、IgG3 和 IgG4 异型和 κ 或 λ 轻链不变区，然后用常规方法表达该嵌合的、人源化的抗体。

在另一具体实施方案中，用作本发明嵌合分子的组分分子的抗体可以是完全的人抗体，例如，可以使用与人抗体一致的异种抗体。异种人抗体意思即是完全是人抗体的抗体，但是其在的非人宿主中产生，该宿主通常构建来表达人抗体，例如 W098/50433、W098, 24893 和 WO 99/53049 的描述。

适于本发明使用的抗体片段，如 Fv、F(ab')₂ 和 Fab 可以通过蛋白酶等切割或化学切割完整蛋白来制备。可选择地例如，截短基因可以设计成编码 F(ab')₂ 片段的部分的嵌合基因，该片段包括编码重(“H”)链的 CH1 区和铰链区的 DNA 序列和紧邻的反义终止密码子。

也可用 H 和轻(“L”)链 J 区的相同序列来设计用作引物的寡核苷酸，以向 J 区到入有用的限制性位点，从而随后使可变(“V”)区片段与人 C 区片段相连接。可以通过定点突变修饰 C 区 cDNA 以在人序列的类似位置产生限制性位点。

一种用于制备抗体的常规表达载体是编码功能完全的人 C_H 或 C_L 免疫球蛋白的载体，其带有构建合适的限制性位点，因而可以容易地插入和表达 V_H 或 V_L 序列，如质粒、逆转录病毒、YACS 或 EBV 源游离基因。在这种载体中，剪切经常发生在插入的 J 区的剪切供体位点和前述的人 C 区剪切受体位点之间和人 CH 外显子内产

生的剪切区域中，多聚腺苷酸和转录终止发生在编码区下游的内源染色体位点处。可以将产生的嵌合抗体与任何强启动子连接，例如逆转录病毒 LTR，如 SV-40 早期启动子，如 Okayama 等(1983)的描述；劳氏肉瘤病毒 LTR，如 Gorman 等(1982)的描述；和 Moloney 鼠白血病病毒 LTR，如 Grosschedl 等(1985)的描述或内源免疫球蛋白启动子。

核酸组合物

本发明还提供了核酸分子，该核酸分子每个具有编码目标多肽或其片段的开放阅读框，该阅读框在合适条件下能表达产生如上所述的嵌合分子的目标多肽。该核酸分子可以以含有载体的核酸组合物形式存在。该术语包含 DNA、cDNA、mRNA、剪切变体、反义 RNA、核酶、RNAi、肽核酸核含有目标核酸序列的载体。这个术语还包括与编码目标蛋白同源或完全相同或一致的核酸。因此本发明提供了编码目标蛋白及其同系物或衍生物的基因。

本发明中使用的术语基因或基因组序列意思是指含有编码本发明特定蛋白和多肽的开发阅读框和可以在任何方向上含有大约 20kb 或以上的编码区的 cDNA 或基因组 DNA 或 mRNA，带有或不带有内含子，含有或不含有与调控表达有关的 5'和 3'非编码核苷酸序列。可以将该基因插入到合适载体中以便在染色体外保持或整合到宿主基因组中。

在一具体实施方案中，本发明的多核苷酸可以包括特异性转录和翻译调控序列，如启动子、增强子等，其在转录区的 5'或 3'末端含有大约 1kb 或更长的侧翼基因组 DNA。在某一具体实施方案中，该基因组 DNA 可以分离为 100kbp 或更小的片段和完全游离的侧翼染色体序列。编码区 3'或 5'的侧翼基因组 DNA 或有时存在于内含子中的内部调控序列都含有在合适组织和阶段特异性表达的序列。

本发明的核酸组合物可以编码目标蛋白的所有或部分。可以根据常规方法通过化学合成的寡核苷酸用该 DNA 序列制备双链或单链片段，如限制酶消化、PCR 扩增等。大多情况下，DNA 片段至少为 15nt，通常至少 18-25nt，还可以至少 50nt。

当将本发明的嵌合分子用作探针时，目标核酸可以是插入了直接检测标记，如放射性标记或荧光标记的核酸类似物，或插入了在随后反应中可视的标记，如可变半抗原的核酸类似物。普通的放射性标记类似物包括用 ^{32}P 或 ^{35}S 标记的类似物，如 α - ^{32}P -dATP、-dTTP、-dCTP 和 dGTP 和 γ - ^{35}S -GTP， α - ^{35}S -dATP 等。容易插入到目标核酸中的商业可用的荧光核苷序列包括用 Cy3、Cy5、德克萨斯红、Alexa

荧光染色、若丹明、cascade blue、BODIPY 等标记的脱氧核糖核酸和/或核苷酸类似物。在随后的标记中一般用来连接核苷的半抗原包括生物素、digoxigenin 和 dinitrophenyl。

本发明的核酸可用于反义抑制转录或翻译，如下文所述。如参见 Phillips(编) Antisense Technology, B 部分 Methods in Enzymology 314 卷, Academic Press, Inc. (1999); Phillips(编) Antisense Technology, Part A Methods in Enzymology 313 卷, Academic Press, Inc. (1999); Hartmann 等(编) Manual of Antisense Methodology (Perspectives in Antisense Science) Kluwer Law International (1999); Stein 等(编) Applied Antisense Oligonucleotide Technology Wiley-Liss(1998); Agrawal 等(编) Antisense Research and Applications Springer-Verlag New York, Inc. (1998)。

上述目标核酸分子还可以提供为载体的一部分(如, 多核苷酸构建体), 大量的这种部分是本领域公知的, 在本发明中不需要详细描述。载体包括但不限于: 质粒、粘粒、病毒载体、人、酵母、细菌和 P1 源人造染色体(HAC's、YAC's、BAC'S、PAC'S 等)、迷你染色体等。本领域中的已知的大量文献中公开了载体, 如包括: Short Protocols in Molecular Biology, (1999) F. Ausubel 等编, Wiley & Sons; Jones 等(编) Vectors: Cloning Applications: Essential Techniques John Wiley & Son Ltd(1998); Jones 等(编) Vectors: Expression Systems: Essential Techniques John Wiley & Son Ltd(1998)。载体可以提供来表达目标核酸, 可以提供来传代核酸, 或者两者都可以。

如果目标核酸是载体或质粒的一部分, 那么该载体或质粒可以称作“重组载体”或“构建体”。目标构建体可用于在生产宿主细胞中传代目标核酸(“克隆载体”), 在来源于不同有机体的宿主细胞间穿梭目标核酸(“穿梭载体”), 表达本发明的有义或反义 RNA 转录子(例如, 在细胞游离系统或在培养的宿主细胞中)(“表达载体”)和在生产宿主中生产目标核酸编码的目标多肽(“表达载体”)。

尽管许多整合载体缺乏在宿主体内对染色体修饰具有作用的起点和许多载体缺乏选择性标记, 但是载体一般包含至少一个复制起点, 至少一个外源核酸的插入位点(例如, 含有多个、紧密相连的、单剪切的限制性内切酶识别位点的聚合连接子形式), 和至少一个选择性标记。

对于编码本发明嵌合分子的核酸分子或含有作为组分分子的核酸分子的嵌合分子, 该核酸分子一般含有分离的且基本纯的基因或多核苷酸。通常地, 该 DNA

与不含有目标基因序列或其片段的其它核酸序列完全分离，其纯度一般至少约为50%，通常至少约90%，是典型的“重组体”，该重组体与一个或多个在天然发生的染色体中通常与其无关的核苷侧翼相连。

反义寡核苷酸

在本发明的另一具体实施方案中，用于细胞内向治疗宿主给予上述嵌合分子的组分分子是一种调节宿主中编码靶蛋白的基因表达的试剂，一般是正或负调节，如反义分子、核酶或RNAi。

反义试剂包括反义寡核苷酸(ODN)，其是用天然核酸或表达RNA反义分子的核酸构建体经过化学修饰而合成的ODN。该反义序列互补于靶基因的mRNA，并抑制靶基因产品的表达。反义分子通过不同的机制抑制基因表达，如通过降低可用于翻译的mRNA的量，通过激活RNaseH或空间阻碍。可以给予一个反义分子或反义分子的组合，其中组合可以含有多种不同序列。

反义分子可以通过在合适载体中表达靶基因序列的全部或部分来生产，其中该转录抑制是定向的，因此反义链作为RNA分子产生。可选择地，该反义分子是合成的寡核苷酸。反义寡核苷酸的长度一般至少为约7个，通常至少为12个，更通常至少为20个核苷和不超过500个，不超过50个核苷，不超过35个核苷。其中该长度根据抑制效率，特异性，如无交叉反应来确定，7-8个碱基长的短寡核苷酸能强烈且选择性地抑制基因的表达，如Wagner等(1996)的描述。

挑选内源有义链mRNA序列的特异性区域使其互补于反义序列。寡核苷酸特异性序列的挑选可以使用试验的方法，其中检测的几个候选序列在体外或动物模型中抑制靶基因的表达。还可以使用序列的结合，其中挑选的mRNA序列的几个区域反义互补。

反义寡核苷酸可以用本领域公知的方法来化学合成，如Wagner等(1993)，Milligan等(1993)中的描述。可以化学修饰寡核苷酸的内源磷酸二酯结构以增强其细胞内稳定性和结合亲和性。

作为反义抑制剂的一种选择，接触反应的核酸化合物，如核酶或反义配体也可用来抑制基因表达。核酶可以在体外合成或在表达载体中编码，在靶细胞中核酶从该表达载体中合成。如同WO 9523225和Beigelman等，(1995)的描述。具有催化活性的寡核苷酸的例子在WO 9506764中有描述。含有金属复合物的反义ODN的配体，如terpyridylCu(II)能介导mRNA的杂交，如同Bashkin等(1995)的描述。

干扰 RNA

在一些具体实施方案中,组分分子是干扰 RNA(RNAi),RNA 干扰提供一种使真核基因沉默的方法。双链 RNA 可以诱导线虫(*C. elegans*)、真菌、植物、果蝇和哺乳动物中的其共靶 mRNA 的同源依赖性降解(homology-dependent degradation)(Gaudilliere 等,2002)。将 RNAi 用于降低特定 mRNA 和/或蛋白的水平是基于来源于基因编码区的双链 RNA 的干扰属性。该技术是一种破坏基因功能的高通量方法(O'Neil,2001)。

在本发明的一具体实施方案中,来源于目标多核苷酸的完整部分的互补有义和反义 RNA 是在体外合成的。得到的有义和反义 RNA 在注射缓冲液中退火,将双链 DNA 注射或以其它方法导入到受体中,如在食物中或浸泡在含有 RNA 的缓冲液中(W099/32619)。在另一具体实施方案中,通过刺激从合适定位的启动子表达有义和反义 RNA 的而在体内生产来源于本发明基因的 dsRNA,该启动子以有义和反义方向与编码序列可操作相连。

目标多肽的制备

除了下文更详细描述用途外,上述目标核酸组合物可以用于制备本发明嵌合分子的多肽。一般地,为了表达多核苷酸,可以使用含有表达载体的表达盒,该表达载体含有可诱导性或组成性转录和翻译抑制区,其中的编码区可操作地连接在转录起始区、转录和翻译终止区的转录调控下。

因此,本发明的嵌合分子可以用本领域的常规技术制备。很明显,除非特别声明,本发明并不限于任何特定的制备本发明嵌合分子的方法。例如,本发明的嵌合分子可以用重组技术制备,如同本发明所引用的专利和公开的描述或如 Sambrook 等(1989)*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. 和 Ausubel F. M. 等(1993)*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y 的描述。

另外,生物学方案可以通过网站获得,如: <http://www.bioprotocol.com>。本发明中的嵌合分子也可以通过实验室合成,如制备几个多肽序列、聚核苷酸序列或化学实体,并在体外连接这些序列或分子。

在本发明的一具体实施方案中,编码本发明嵌合分子的 DNA 分子可以插入到能在生产宿主中表达的表达载体中以生产该嵌合分子。该表达盒包括转录和翻译调控序列,如启动子,转录起始和终止序列及翻译起始和终止序列。增强子可以以顺或

反位置存在。例如，在 5'到 3'方向，含有转录和翻译调控序列的 DNA 片段可以与编码该嵌合分子的 DNA 相连，其依次包括：编码第一组分分子的第一 DNA 片段，与其连接的编码含有切割位点的连接子的第二 DNA 片段，与第二 DNA 片段连接的编码第二组分分子的第三 DNA 片段，接着是翻译和转录终止序列。连接一般在合适的限制性内切酶限制位点处产生，利用 DNA 连接酶等将不同的片段连接在一起。该表达盒可以是质粒和病毒载体的一部分。常用的载体包括 Gateway 载体 ([www. Invitrogen. com](http://www.invitrogen.com)) 和 Creator 载体 ([www. bdbioscience. com](http://www.bdbioscience.com))。

因此，本发明提供了制备本发明多肽的方法，包括制备当嵌合分子是多蛋白时的本发明的该嵌合分子，当组分分子是肽和多肽及其活性片段时的该组分分子的方法。该方法一般包括导入如上所述的核酸构建体到宿主细胞中以在体内或体外进行生产。对于该嵌合分子的体外生产，将该宿主细胞在适于核酸构建体表达和编码的目标多肽的生产的条件下体外培养；收集目标多肽，如从培养基中或从宿主细胞中（例如，通过切割该宿主细胞）或以这两种方式收集。

本发明还提供了用游离细胞体外转录/翻译方法生产目标多肽的方法，该方法为本领域公知的，如使用兔网状细胞游离细胞切割液、青蛙卵母细胞切割液、小麦胚芽切割液、细菌切割液等。如 WO 00/68412、WO 01/27260、WO 02/24939、WO 02/38790、WO 91/02076 和 WO 91/02075 的描述。

本发明还提供了在体内制备目标多肽的方法，例如在转基因动物体内。如同 WO 93/25567 的描述。

本发明还提供了宿主细胞，如含有目标核酸的重组宿主细胞和含有目标重组载体的宿主细胞。目标宿主细胞可以在体外培养或是多细胞有机体的一部分。在下文种将详细描述宿主细胞。

任选地，如果合适，编码用于指导上述嵌合分子到生产宿主的某些小室或细胞器中进行加工和/或分泌的信号、引导或转移肽的信号、引导或转移序列可以插入到调控序列和编码第一组分分子的第一 DNA 片段之间。这种信号序列可以来源于分泌蛋白的前或后序列，如酵母的 α 因子，如同美国专利 No. 4, 870, 008 的描述。

可选择地，如果生产宿主是植物，如稻，可以使用调控序列和引导序列来构建表达盒以在植物种子中表达上述嵌合分子，如 WO 99/16890 的描述。在植物生产宿主中生产本发明嵌合分子的表达盒还可以如同 WO 00/04146 的描述来制备。

还可以制备用于在真菌宿主，如曲霉菌中生产本发明嵌合分子的表达盒，如同 WO 97/45156 和 WO 93/22348 的描述。

本发明的嵌合分子还可以用在生产宿主中高度表达的蛋白的全部或部分来制备。这种表达盒已有描述，如美国专利 No. 4, 828, 988 和美国专利 No. 5, 292, 646。

适于本发明用于生产编码上述嵌合分子的核酸分子的表达盒通常含有方便的限制性位点，其位于启动子序列附近以提供核酸分子的插入。在表达宿主中起作用的选择性标记可以任选地存在于该构建体中。另外，表达载体可以含有编融合组分的核酸分子，其中该融合组分提供额外的功能，如增加蛋白合成、分泌引导序列、稳定性、与已知抗血清的反应性、酶标记，如 β -牛乳糖等。

适于本发明使用的表达盒可以制备成含有转录起始区、基因或其片段和转录终止区。特别有利的是使用能表达功能表位或区域，通常长度为至少约 8 个氨基酸，更通常为至少约 15-25 个氨基酸的序列或任何上述片段及该基因的完整开放阅读框。当将该 DNA 导入到生产宿主后，含有该构建体的细胞可以通过选择性标记的方式筛选，扩增细胞，然后用于表达。

根据表达的目的，可以根据常规方法将含有蛋白，多肽，如抗体作为组分分子的上述嵌合分子在原核或真核细胞中表达。为了大规模生产该蛋白，可以用单细胞有机体，如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母、毕赤酵母或乳酸克鲁维酵母、米曲霉，含有杆状病毒载体的昆虫细胞，如 SF9 细胞或 High Five 细胞或更高级有机体的细胞，如植物或蔬菜细胞，特别地动物细胞，如 COS7 细胞作为表达宿主细胞。在一些情况下，在真核细胞中表达基因是理想的，这样有利于编码的蛋白进行内源折叠核翻译后修饰。合适的植物细胞包括但不限于：双子叶植物，如烟草植株、西红柿植株，或单子叶植物及其种子，如谷物：燕麦、稻、小麦、大麦、高粱核其它可食植物。启动子、增前子、终止子的组合可以优化各个宿主中的表达。小肽还可以在实验室中合成。当所有的在实施例中描述的上述宿主细胞或其它合适的宿主细胞或有机体被用来复制和/或表达含有本发明核苷酸或核酸的嵌合分子时，得到的复制的核酸、RNA、表达的蛋白或多肽作为生产宿主细胞或有机体的产物都包含在本发明的范围之内。该产物可以用本领域公知的方法回收，如可以用原始原料制备切割液(如表达内源目的多肽的细胞或含有标目标多肽的表达载体的细胞)，用 HPLC、筛析色谱、凝胶电泳、亲和层析等纯化。

适于本发明使用的表达系统的其它描述包括，如美国专利 No. 4, 745, 069、4, 828, 988、6, 312, 923、6, 342, 375、6, 235, 878、RE 37, 343、6, 068, 994、6, 080, 559、

5, 695, 985、6, 277, 633、6, 232, 105、6, 222, 094、5, 888, 814、5, 981, 275、6, 025, 540、5, 750, 172、6, 329, 137、U. S. 6, 303, 369。

如果本发明的嵌合分子是在植物生产宿主中表达，那么该嵌合分子在植物的叶或芽中靶向表达。可选择地，该嵌合分子可以在谷物或植物种子中靶向表达，如在谷类单子叶植物，如稻、小麦、大麦、燕麦、粟、玉米和高粱中表达。在植物生产宿主种子中表达能以该嵌合分子的活性保留或完全维持的方式进行。因此，可以制备含有该嵌合分子的提取物，并将该提取物加入到食品中作为食品佐剂或滋养添加剂。可选择地，可以用低温工艺处理种子或种子提取物，如在合适条件下向麦芽发酵液中加入提取物，其中谷物中的淀粉转化为了麦芽糖且该多肽保持完整。加入本发明使用这种系统来生产该嵌合分子，那么不得不将该嵌合分子中的切割位点设计成使其在种子或提取物处理过程中不被激活。

组合物

本发明还提供了含有本发明嵌合分子的组合物，包括药物组合物。这些组合物可以含有根据该嵌合分子的目的用途挑选的缓冲液，还可以含有其它适于目的用途的物质。

本领域的普通技术人员能容易地挑选合适的缓冲液，适于目的用途的大量的缓冲液是本领域公知的。在一些实施例中，该组合可以含有药物学上可接受的赋形剂，大量赋形剂是本领域公知的，在此处不需要作详细的描述。适于本发明使用的药物学上可接受的赋形剂在许多公开中有描述，如包括：A. Gennaro(1995) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy"，第19版本，Lippincott, Williams, & Wilkins。

根据可能的给药方式来确定本发明的组合物的剂型，因此，如果本发明的组合物倾向于鼻内或吸入给药，那么可以将该组合物制成本领域常用的粉末形式以实现目的，其它的剂型，如口服或肠胃外运输也可以如本领域通用的方式使用。

赋形剂和剂型

在一些具体实施方案中，提供了含有药物学上可接受的赋形剂的组合物，各种不同赋形剂是本领域公知的，例如 Gennaro, 2000; Ansel 等, 1999 ; Kibbe 等, 2000 的描述。药物学上可接受的赋形剂，如运载体、佐剂、载体或稀释剂可以容

易的从公知领域得到，而且，药物学上可接受的辅助物质，如 pH 调节和缓冲试剂、毒性调节剂、稳定剂、加湿剂等也能从公知领域得到。

关于药物学剂型，本发明的嵌合分子可以以其药物学上可接受的盐的形式给药，可以单独使用，也可以与其它药物学上的活性化合物进行合适组合而以组合物形式使用。下面的方法和赋形剂仅是举例，并不产生任何限制。

为了口服，上述嵌合分子可以单独使用或与合适的添加剂组合而形成片剂、粉末、颗粒或胶囊来使用。合适的添加剂如常规添加剂，如乳糖、甘露糖、玉米淀粉或马铃薯淀粉；粘合剂，如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯树胶、玉米淀粉或白明胶；崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠；润滑剂，如云母或硬脂酸镁；如果需要，还可以是稀释剂、缓冲剂、加湿剂、防腐剂和风味剂。

合适的赋形剂有如水、生理盐水、葡萄糖、甘油和乙醇及其组合。另外，如果需要，该赋形剂可以含有少量的辅助物质，如加湿或乳化剂或 pH 缓冲剂。制备这些剂型的实用方法是本领域公知的，或者对于本领域的普通技术人员来说显而易见的 (Remington, 1985)。在任何情况下，用于给药的该组合物或剂型含有的嵌合分子的量足够使被治疗的患者达到目的状态。

可以通过将上述嵌合分子溶解、悬浮或乳化在水或非水溶剂中而将其制成用于注射的制剂，这些溶剂如植物或其它相似油、合成的脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇。如果需要，还可以添加常规的添加剂，如增溶剂、等渗试剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

上述嵌合分子可以用于气雾剂中以通过吸入给药。本发明的化合物可以配置成加压可接受的压缩剂，如二氯二氟甲烷、丙烷或氮。

另外，可以通过与不同的碱，如乳化碱或水溶性碱混合而制成栓剂，本发明的化合物通过栓剂可以直肠给药。该栓剂可以含有在体温下融解而在室温下固化的运载体，如可可油、聚乙二醇和聚氧乙烯。

可以提供用于口服或直肠给药的单位剂量形式，如糖浆、西也剂和悬浮液，其中每一剂量单位，如一茶匙的量，一大汤匙的量、片剂或栓剂含有预定量的包含一种或多种抑制剂的组合物。同样，用于注射或静脉内给药的单位剂量形式在组合物中可以含有抑制剂，如无菌水溶液、正常生理盐水或另一种药物学上可接受的载体。

促进诊断、预防、治疗和滋养方法

本发明提供了各种促进诊断、预防、治疗和滋养的方法，其中该方法包括向治疗宿主给予有效量的本发明的嵌合分子或含有该嵌合分子的组合物，其中该嵌合分子中的组分分子具有促进诊断、预防、治疗和滋养的活性。

在一些具体实施方案中，本发明包括向治疗宿主给予嵌合分子或含有嵌合分子的组合物，其中的组分分子可以与生物分子结合而达到诊断目的。例如，该组分分子可以是携带有可检测性标记，能与编码自体抗原或传染性有机体抗原的循环核酸分子结合的多核苷酸。

在一些具体实施方案中，上述方法包括向治疗宿主给予嵌合分子或含有嵌合分子的组合物，其中该组分分子是可实现预防目的的疫苗。例如，该组分分子可以是多肽或 DNA 疫苗。该疫苗可以具有独特的优点，其中的组分分子是不降解的小肽。

在一些具体实施方案中，上述方法包括向治疗宿主给予嵌合分子或含有嵌合分子的组合物，其中的组分分子具有治疗属性，如调节，如激活、增强或抑制治疗宿主蛋白或载体的生物学活性。在一些具体实施方案中，该方法包括调节治疗宿主蛋白的酶活性。在其它具体实施方案中，提供了调节治疗宿主蛋白的信号转导活性的方法。在另外的实施方案中，提供了调节目标蛋白与另一反应蛋白或其它大分子(如 DNA、糖、酯)的相互反应的方法。

在一些具体实施方案中，本发明的方法包括向治疗宿主给予嵌合分子或含有嵌合分子的组合物以提高治疗宿主的营养，或者提供具有滋养价值的组分分子或提供抗感染物来优化食品营养价值。

本发明还提供了向治疗宿主给予或运输嵌合分子或含有嵌合分子的组合物，其中该嵌合分子有利地降低了组分分子的降解。

本发明还还提供了向治疗宿主给予或运输嵌合分子或含有嵌合分子的组合物，其中该嵌合分子有利地提高了组分分子的活性。

根据本发明的方法可以治疗各种宿主，如人或非人动物。一般地该宿主是“哺乳动物”。其中该术语用来宽泛地描述哺乳纲的有机体，包括食肉目(如狗和猫)、啮齿目(如鼠、豚鼠、家鼠)及其它哺乳动物，如牛、山羊、绵羊、兔、猪和灵长类(如人、黑猩猩和猴)。在一些具体实施方案中，该宿主是人，动物模型对于试验研究、为人疾病的治疗提供模型来说是有益的。

剂型、剂量和给药途径

向宿主给予有效率的上述嵌合分子(含有作为组分分子的小分子、特异于目标多肽的抗体或目标多肽)。其中“有效量”是指剂量足够产生目的效果。例如,在一些具体实施方案中,目标效果是与对照相比较至少降低了目标多肽的原有的生物学活性。在其它具体实施方案中,该目的效果是与对照比较提高了目标多肽的活性水平(个体或个体的局部解剖学位点)。还有的例子如,在一些具体实施方案中,该目标效果是与对照比较至少降低了目标多肽的酶活性。在其它具体实施方案中,该目标效果是与对照比较提供了目标多肽的酶活性水平(个体或个体的局部解剖学位点)。

一般地,本发明的组合至少含有约1%-95%的活性组分,优选为约10%-50%。一般地,给予小孩100mg-500mg,给予成人500mg-5g。一般通过注射给药,通常注射到局部区域。根据病人的反应和护理调节确定给药的次数。本领域的普通技术人员通过常规试验建立剂量反应曲线很容易确定其它的有效剂量。

为了计算嵌合分子或组分分子的量,本领域的普通技术人员可以容易地得到有关达到目标效果的组分分子的必需量的信息。提高本发明多肽活性水平的必需的组分分子的量可以用体外试验来计算,当然,根据所使用的具体组分分子,组分分子的该量有不同。

在本发明的方法中,上述嵌合分子可以用能产生目的活性的任何便利的方法向宿主给药。因此,该嵌合分子可以制成不同的剂型以向宿主给药。

更具体地,本发明的嵌合分子可以通过与合适的、药物学上可接受的载体或稀释剂混合来制成药物组合物,可以制成固态、半固态、液态或气态形式的制剂,如片剂、胶囊、粉末、颗粒、药膏、溶液、栓剂、注射液、吸入剂和气雾剂。

同样地,上述嵌合分子可以通过不同方式给药,如口服、口腔、直肠、肠胃外给药,包括鼻内、静脉内、动脉内、腹腔内、皮内、透皮、皮下、经皮肤、intracheal、心脏内、心室内、颅内等和通过吸入给药。该试剂可以在适当时或在确定的时候每天、每星期给药。

在本发明中所使用的术语“单位剂量形式”是指适于作为单一剂量用于人或动物对象的物理分散单元,每一单元含有预定量的本发明的化合物和药物学上可接受的稀释剂、载体或运载体,其中的预定量根据产生目的效果的足够量来计算。本发明对新的单位剂量形式的说明依赖于所使用的具体化合物和要达到的效果,及各种化合物在宿主中的药效。

如果该嵌合分子含有作为组分分子的多肽、多核苷酸或其类似物或模拟物，如抗体组合物，可以通过许多途径，如病毒干扰、微注射、小泡融合而将其导入到组织或宿主细胞中。注射器注射可以用于肌肉内给药，如 Furth 等(1992)，*Anal Biochem* 205:365-368 的描述。可以将 DNA 包被成金微颗粒，通过粒子轰击装置或“基因枪”经皮肤运输，如文献(参见如 Tang 等(1992)，*Nature* 356:152-154)的描述。如果金微颗粒是用治疗性 DNA 包被，那么就轰击皮肤细胞。

普通技术人员能够理解，剂量水平可以根据特定化合物的功能、症状的严重性和患者对副作用的敏感性而发生变化。本领域的普通技术人员用各种方法可以容易地确定所给化合物的优选剂量。

治疗至少意味着缓解困扰宿主的病理疾病的有关症状，如果在宽泛意义上使用，那么缓解是指至少降低一参数的大小，例如如病理疾病的相关症状，如由其引起的发炎和疼痛。同样，治疗还包括病理疾病状况或至少与其相关的症状被完全抑制，如发生得到预防或阻止，例如治愈，以至于宿主不再患该病理疾病或出现该病理疾病的特征症状。

本发明提供了含有单位剂量活性试剂的试剂盒，该活性试剂通常为口服或可注射剂量。在该试剂盒中，除了容器外，含有的单位剂量是一信息套装插件，其描述了药物在治疗目的病理疾病方面的用途和附带的优点。优选的化合物和单位剂量在上文中有描述。

在一具体实施方案中，含有以抗体作为组分分子的上述嵌合分子向需要治疗的患者给药来治疗癌症或增生性失调、免疫紊乱、代谢失调。该抗体可以通过如下方式给药：系统性注射，如静脉内注射；注射或应用到相关部位，如直接注射到肿瘤或直接应用到受伤部位；局部应用，例如在失调是在皮肤上时。该抗体可以单独给药或与其它试剂，如细胞毒性试剂组合给药。

可以用本发明的方法治疗的肿瘤包括癌，如结肠、直肠、前列腺、乳腺、恶性皮肤瘤、血管、子宫内膜、胃、胰腺、间皮瘤、发育异常的口腔粘膜、恶性口腔癌、非小细胞肺癌(“NSCL”)、转移性鳞状上皮细胞尿道癌等；神经性恶性肿瘤，如成神经细胞瘤、神经胶质瘤、星细胞瘤、神经胶质瘤等；血液恶性肿瘤，如儿童急性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、恶性皮肤 T-细胞、蕈样肉芽肿、非 MF 皮肤性 T 细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、富含 T 细胞的皮肤性淋巴增生、类天疱疮、盘状红斑狼疮、扁平苔藓等；妇科癌症，如子宫颈和卵巢；

睾丸癌；肝癌，如肝细胞癌(“HCC”)和胆汁导管肿瘤；多发性骨髓瘤；食道癌；其它肿瘤，如小细胞和透明细胞；霍奇金氏淋巴瘤；不同器官中的肉瘤等。

在其它具体实施方案中，例如，当需治疗的疾病或症状时炎症或免疫功能时，本发明的提供含有多核苷酸、多肽、抗体、小分子等的嵌合分子用来治疗这种炎症和免疫失调。使用本发明的制剂可以治疗的疾病包括各种类型的关节炎，如风湿性关节炎和骨关节炎，各种慢性的皮肤炎性疾病，如牛皮癣，炎症性肠疾病(“IBD”)，胰岛素依赖型糖尿病，自体免疫疾病，如多发性硬化症(“MS”)和系统性红斑狼疮(“SLE”)，过敏性疾病，移植排斥，成人呼吸窘迫综合征，动脉硬化，由于外周血管系统、心脏血管系统和中枢神经系统(“CNS”)关闭导致的缺血性疾病。在阅读了本发明的描述后，本领域的普通技术人员能够明白本发明的制剂给药后能治疗和/或缓解的前体疾病和/或症状。

实施例

下面的实施例用来向本领域的普通技术人员提供怎样实施和使用本发明的完整揭露和描述，并不限定本发明要求保护的范围，也不代表下面的试验是本发明的所有或能实施的唯一试验。已经作出了努力使所用的数值(如量、稳定等)确保精确，但是一些试验错误和偏差是允许的。除非特别说明，份数是重量份数，分子量是重量平均分子量，温度是摄氏度，压力是大气压或接近大气压。

实施例 1：在细菌中表达

本发明的嵌合分子能在细菌生产宿主中表达。在细菌中的表达系统包括如 Chang 等, *Nature* (1978) 275:615; Goeddel 等, *Nature* (1979) 281:544; Goeddel 等, *Nuclei Acides Res.* (1980) 8:4057; EP 0 036, 776; 美国专利 No. 4, 551, 433; DeBoer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* (1983) 80:21-25; 和 Siebenlist 等, *Cell* (1980) 20:269 中描述的系统。

实施例 2：在酵母中表达

本发明的嵌合分子可以在酵母生产宿主中表达。在酵母中的表达系统包括 Hinnen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* (1978) 75:1929; Ito 等, *J. Bacteriol.* (1983) 153:163; Kurtz 等, *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:142; Kunze 等, *J. Basic Microbiol.* (1985) 25:141; Gleeson 等, *J. Gen. Microbiol.* (1986) 132:3459; Roggenkamp 等, *Mol. Gen. Genet.* (1986) 202:302; Das 等, *J. Bacteriol.* (1984) 158:1165; De

Louvencourt 等, *J. Bacteriol* (1983) 154 :737; Van den Berg 等, *Bioltechnology* (1990) 8:135; Kunze 等, *J. Basic Microbiol* (1985) 25:141; Cregg 等, *Mol. Cell. Biol.* (1985) 5:3376; 美国专利 No. 4, 837, 148 和 4, 929, 555; Beach 和 Nurse, *Nature* (1981) 300:706; Davidow 等, *Curr. Genet.* (1985) 10:380; Gaillardin 等, *Curr. Genet.* (1985) 10:49; Ballance 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 112: 284-289; Tilburn 等, *Gene* (1983) 26:205-221; YELTON 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:1470-1474; Kelly 和 Hynes, *Embo J.* (1985) 4:475479; EP 0 244, 234 和 WO 91/00357 中描述的系统。

实施例 3: 在杆状病毒表达系统中表达

本发明的嵌合分子可以在昆虫生产宿主中表达。在昆虫中表达异源基因根据美国专利 No. 4, 745, 051; Friesen 等, "THE Regulation of Baculovirus Gene Expression", 摘自 *The Molecular Biology Of Baculoviruses* (1986) (W. Doerfler 编); EP 0 127, 839 ; EP 0 155, 476 ; 和 Vlak 等, *J. Gen. Virol.* (1988) 69:765-776; Miller 等, *Ann. Rev. Microbiol.* (1988) 42:177; Carbonell 等, *Gene* (1988) 73:409; Maeda 等, *Nature* (1985) 315:592-594; Lebacq-Verheyden 等, *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8:3129; Smith 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1985) 82:8844; Miyajima 等, *Gene* (1987) 58 :273 和 Martin 等, *DNA* (1988) 7:99 中的描述进行。来自宿主的许多 baculoviral 菌株和变体和相应的允许昆虫细胞在 Luckow 等, *Biotechnology* (1988) 6 :47-55, Miller 等, *Generic Engineering* (1986) 8 :277-279 和 Maeda 等, *Nature* (1985) 315 :592-594 中有描述。

实施例 4: 在哺乳动物细胞中表达

上述嵌合分子还可以在哺乳动物细胞中表达, 哺乳动物的表达根据 Dijkema 等, *Embo J.* (1985) 4:761, GORMAN 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:6777, Boshart 等, *Cell* (1985) 41:521 和美国专利 No. 4, 399, 216 中的描述进行。哺乳动物表达的其它特征如 Ham 和 Wallace, *Meth. Enz.* (1979) 58:44, Barnes 和 Sato, *Anal. Biochem.* (1980) 102:255, 美国专利 No. 4, 767, 704, 4, 657, 866, 4, 927, 762, 4, 560, 655, WO 90/103430, WO 87/00195 和 U. S. RE 30, 985 中的描述。

实施例 5: 含有 EFG 和 TEF 的嵌合分子

在治疗宿主的内脏或肠道中有利释放的组分分子包括那些具有抗微生物活性的分子，如乳铁蛋白和溶菌酶和那些对粘膜组织具有保护或治疗属性的分子，如人上皮生长因子(EGF)和三叶草因子家族肽：TFF1(以前称作Ps2)、TFF2(以前称作hSP)和TFF3(以前称作小肠三叶因子)。在本发明的这样一个具体实施方案中，该组合分子的切割位点设计来由在消化道的表面或里面活化的酶切割。例如人肠激酶在十二指肠和空肠中激活。

在本发明的优选具体实施方案中，该嵌合分子包括一个或多个人EGF和TFF2拷贝，每个通过含有肠激酶切位点的连接子相连。该重组产物作为纯化药与药物学上可接受的载体或作为表达转基因牛、绵羊、山羊的奶或转基因植物产物，如稻中的营养食品口服给药。可以从这种治疗中受益的病人人群包括但不限于：急性胃肠炎性疾病，如溃疡性大肠炎和 flare-ups of Crohn's disease 及这些疾病的慢性形式。由感染或饮酒或NSAID导致的溃疡或粘膜损伤的病人也可以从该治疗方法中受益。

由于几个原因，TEF2和EGF显然地非常适于作为口服运输的重组嵌合分子的组分。它们通常在消化道中产生，对于其中的环境稳定并表现出生物学协同作用(Oertel, M.等, Am J Respir Cell Mol Biol 25:418, 2001)。EGF是具有广泛生物学潜能的分子，其在患坏死性肠炎、卓艾综合征、胃肠溃疡和先天性微绒毛萎缩症的患者中能检测到(Guglietta, A等, Eur J Gastroenterol Hepatol 7:945-50, 1995)。EGF促进胃肠粘膜的有丝分裂，抑制胃酸分泌，这两个作用能加速康复。据报道，重组人EGF在安慰剂对照，双盲临床研究中具有治疗十二指肠溃疡的口服活性(Palomino, A等, Scand J Gastroenterol 35:1066-22, 2000)。

由EGF的N末端，接着是含有肠激酶切位点的连接子和TFF2组成的嵌合分子可以在几个方面提高EGF的产率和使用。成熟的EGF在MW中大约6kD，据报道由于生产或纯化过程中的C末端加工，因而其在许多生产宿主中生产时不具有活性(Engler, D等, J Biol Chem 263:12384-90, 1986)。EGF C末端的融合组分可以防止或消除这种不需要的加工，同时可能地提高表达水平。将EGF与TFF2融合也可以在目标部位维持EGF活性更长的时间，从而使TFFs具有结合胃和小肠粘膜中的粘液素糖蛋白的能力(Poulson, S.等, Gut 43:240-47, 1998)。同样地，在这种融合的构建体中，静脉内给药的重组EGF(Calnan, D等, Gut 47:622-27, 2000)的8分钟的半衰期预期会得到提高，因而使TFF2具有粘液素结合能力并在MW中得到提高。

上述嵌合分子构建体的 TFF2 组分在 MW 中大约 12-14kD，依赖于所用的生产宿主是否能在信号 N 连接点处完全糖基化该分子。在鼠模型中，重组 TFF2 通过皮下和口服路径加速了胃溃疡的愈合(Poulsen, S 等, Gut 45:516-22, 1999)，提高了粘膜血流量并抑制胃分泌物(Konturek, P 等, Regul Pept 68:71-9, 1997)，刺激人单核细胞的迁移(Cook, G 等, FEBS Lett 456:155-59, 1999)。如同根据这些发现所预测的那样，TFF2 受试鼠表现出胃粘膜生长降低、胃酸分泌增加且在用茚甲新治疗后对胃溃疡的敏感性增加(Farrell, J 等, J Clin Invest 109:193-204, 2002)。在多种溃疡病例中，形成产生三叶因子(three trefoil factor)，如 EGF 的腺结构，其可能有利于局部愈合(Poulsom, R., Baillieres Clin Gastroenterol 110:113-34, 1996)。在夏天，构建体分子中的 TFF2 可以和 EGF 一起有效地发生作用来促进重组产物的生产和对上述胃肠不适的有效性。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)已成功用来生产重组形式的 EGF(Herber Biote SA, Havana, Cuba)和 TFF2(Thim, L 等, FEBS Lett 318:345-52, 1993)。*Escherichia coli* 也被成功用来制备再折叠的重组 EGF(Lee, J 等, Biotechnol Appl Biochem 31:245-48, 2000)和 TFF1，一种与 TFF2 一致的分子，但有一个而不是两个富含丝氨酸的三叶形区域。因此，可以使用这些生产宿主的一种或两种来制备有用量的活性重组嵌合分子。

实施例 6：含有人表皮生长因子、含有肠激酶切位点的连接子和人 TFF2 的嵌合分子的制备

根据本发明，制备 EGF/肠激酶切位点-连接子/TFF2 融合复合物，用 PCR 扩增在该复合物的末端设计合适的限制性位点，分别用商业上可用的限制酶和 DNA 连接酶剪切并将这些片段连接起来，于是在 5'到 3'方向连接成该复合物 DNA 序列，这是本领域公知的。依次地，该复合物含有：酵母 GAPDH 启动子序列、酵母 α 交配因子引导序列、编码 SEQ ID NO:1 蛋白的人表皮生长因子的 DNA 序列。向其 3'端加入编码含有肠激酶剪切位点的连接子，如 SEQ ID NO:2 所示的 DNA 序列。最后，向 3'端加入人三叶形家族因子 2(TFF2，如已知的 hSP，见 Tomassetto, C., EMBO J 9:407, 1990) 的 DNA 序列，如编码 SEQ ID NO:3 蛋白的序列，最后是酵母 α 交配因子终止子。

上述构建体的确认通过 DNA 测序来证实，然后将其克隆到商业可用的酵母表达载体，Yep24(来自美国典型培养物保藏中心，其含有 Ura 3 基因作为选择性标记)中，用本领域公知的方法将该构建体转化到生产酵母菌株，INVSCI(来自

Invitrogen, 缺 Ura 3) 中。挑选含有最终质粒, pEET-1 的转化体, 将其用于发酵来生产作为大量分泌产品的融合复合多肽。

将该转化体在 8L 加有 60ng/l 酵母提取物的 YPD 培养基中 30°C 下培养, 直到 OD₆₅₀ 超过 50。如同 Thim, L. 等, FEBS Lett 318:345-52, 1993 的描述。通过离心、Amicon 过滤浓缩清除发酵液, 调节 pH 到 1.7, 传导性到 4.5mS, 加载到快速 S-琼脂糖柱中洗脱, 如 Thim, L. FEBS Lett 318:345-52, 1993 所述。在对 EGF 进行的初级鼠肝细胞增生试验中, 通过检测中和等分的活性来检测最终馏分的融合蛋白, 如 Calnan, D 等, Gut 47:622-27, 2000 所述。用 SDS-PAGE 证实峰馏分的活性, 于是含有大量融合蛋白的馏分具有等于或约 20kD MW 的带, 剪切该带, 接着将另一等分与肠激酶(Stratagene)一起温浴, 如 Gaillard, I. 等, Biochemistry 35: 6150, 1996 的描述, 同时不改变未剪切的带。

进一步地, 用无内毒素的设备和 Vydac C4 反向 HPLC 柱色谱法如 Thim, L., FEBS Lett 318:345-52, 1993 的描述来纯化收集的馏分, 在乙腈和 TFA 中进行如上所述的 RP-HPLC, 将未糖基化的融合蛋白与糖基化的分开, 同时将凝聚的和不要的内毒素与目标产物分离。用鲎阿米巴样细胞检测法(Associates of Cape Cod, Inc, Woods Hole, MA)来测定最终收集材料中的内毒素, 其少于纯化蛋白中的 LEU/MG。如上所述用 SDS-PAGE 分析法检测峰馏分, 收集, 用 20mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.8)超滤。

通过过滤将纯化材料浓缩到合适浓度用于治疗性给药, 如约 8mg 蛋白/ml, 溶于 1%羧甲基纤维素(用于口服给药)或溶于 40mg/ml 甘露糖(用于无菌过滤和肠胃外药物的冻干保藏)中。口服制剂在-20°C 下贮藏, 冻干材料在 4°C 下保持稳定。

最终的制剂通过质量调控检测法检测, 例如, 在 12%凝胶的还原性 SDS-PAGE 中具有超过 95%的纯度, 在非还原性 SDS-PAGE 中具有小于 5%的低聚体, 在 Edman 降解中表现出超过 99%的期望 N 末端序列, 每毫克蛋白具有小于 1EU 的内毒素, 在用等摩尔浓度的 EGF 生物检测法进行检测时, 每摩尔融合蛋白的生物学活性有 20%是单体 EGF 组分的活性。同样, 当用等摩尔浓度的上皮细胞迁移测试进行体外测试时, 该纯化的融合复合物有 20%是 TFF2 组分的生物活性(POULSOM, R., Baillieres Clin Gastroenterol 10:113-34, 1996)。

需治疗的急性肠胃疾病病人服用口服剂型的融合复合物的量为 50mg/每天, 皮下注射在新鲜的无菌水中制备的制剂的量为 2mg/kg/天。

本发明通过参考其特定的具体实施方案而得到了描述，本领域的普通技术人员能够理解在不偏离本发明的精神和范围的情况下可以进行改变或进行等效替换。另外，为了适应本发明的具体情况、材料、物质组合、工艺、加工步骤及目标、精神和范围，可以作许多改进，所有的这些改进都包含在本发明所附权利要求的范围之内。

参考文献

Ansel, H.C., Allen, L, Popovich, N.G.(编) (1999) Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第 7 版, Lippencott Williams and Wilkins Publishers.

Bashkin, J.K., Sampath, U., Frolova, E. (1995) Ribozyme mimics as catalytic antisense reagents.*Appl.Biochem.Biotechnol.*54:43-56.

Beigelman, L., Karpeisky, A., Matulic-Adamic, J., Haeberli, P., Sweedler, D., Usman, N. (1995) Synthesis of 2'-modified nucleotides and their incorporation into hammerhead ribozymes.*Nucleic Acids Res.*23:4434-42.

Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N.(编)(1990)Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology(Methods in Enzymology Series, 第 182 卷), Academic Press.

Gaudilliere, B., Shi, Y., Bonni, A.(2002) RNA interference reveals a requirement for MEF2A in activity-dependent neuronal survival.*J.Biol.Chem.* 2002 Sep 13; [epub ahead of print].

Gennaro, A.(编) (2000) Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, Lippincott, Williams,& Wilkins.

Gorman, C.M., Merlino, G.T., Willingham, M.C., Pastan, I., Howard, B.H.(1982) The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eucaryotic cells by DNA-mediated transfection.*Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)* 79: 6777- 6781.

Grosschedl R., Baltimore D.(1985)Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements.*Cell* 41:885-97.

Howard, G.C., Bethell, D.R.(2000)Basic Methods in antibody Production and Characterization.CRC Press.

Jost, C.R.Kurucz I., Jacobus C.M., Titus J.A., George A.J., Segal D.M.(1994) mammalian Expression and Secretion of Functional Single-Chain Fv Molecules. J.Biol. Chem.269:26267-73.

Kabat 等, (1991)sequences of protein of Immunological Interest, N.I.H.publication no.91-3242.

Kibbe, A.H.(编) (2000)Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第三版, Amer. Pharmaceutical Assoc.

Liu A.Y., Robinson R.R., Murray E.D.Jr., Ledbetter J.A., Hellstrom I., Hellstrom K.E.(1987) Production of a mouse-human chimeric monoclonal antibody to CD20 with potent Fc-dependent biologic activity J.Immunol.139:3521-6.

Liu A.Y., Robinson R.R., Hellstrom K.E., Murray E.D.Jr., Chang C.P., Hellstrom I.(1987) Chimeric Mouse-Human IGGI antibody that can Mediate Lysis of Cancer Cells, Proc.Natl.Acad.Sci.U S A 84:3439-43.

Milligan, J.F., Matteucci, M.D., Martin, J.C.(1993)Current concepts in antisense drug design.J.Med.Chem.36:1923-1937.

Okayama H, Berg P.(1983)A CDNA cloning vector that permits expression OF CDNA inserts in mammalian cells.Mol.Cell.Bio.3:280-9.

O'NEIL, N.J., Martin, R.L., Tomlinson, M.L., Jones, M.R., Coulson, A., Kuwabara, P.E.(2001)RNA-mediated interference as a tool for identifying drug targets. Am.J.Pharmacogenomics 1:45-53.

Remington, J.P.(1985) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Company.

Wagner RW, Matteucci MD, Lewis JG, Gutierrez AJ, Moulds C, Froehler BC.(1993) Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. Science 260:1510-1513.

Wagner, R.W., Matteucci, M.D., Grant, D., Huang, T., Froehler, B.C.(1996) Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. Nat. Biotechnol.14:840-844.

表 2. 序列的简要描述

描述	SEQ ID NO
----	-----------

REB BAC DNA 的正向 PCR 引物: 5'-CTGATATGTGCCCATGTTCCAAAC-3'	3
REB BAC DNA 的反相 PCR 引物: 5'-CCTTGTCGAATGCAGATGTTTCAC-3'	4
NPS/rv PCR 引物 CGGCAACAGGATTCAATCT	5

(1) 总论

(iii) 序列编号:

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 53 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型:
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

v) 片段类型: 内部

(ix)序列描述: SEQ ID NO:1:

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
20 25 30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg
50

(3) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 8 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型:
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(ix) 序列描述: SEQ ID NO:2:

Gly Gly Gly Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

(4)SEQ ID NO:3 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 8 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型:

(D)拓扑学: 线性

(ii)分子类型: 肽

v) 片段类型: 内部

(ix)序列描述: SEQ ID NO:3:

Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser Arg Leu Ser Pro His Asn Arg
1 5 10 15

Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn
20 25 30

Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr Gly Val Pro Trp Cys Phe His
35 40 45

Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln Cys Val Met Glu Val Ser Asp
50 55 60

Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser
65 70 75 80

Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe
85 90 95

Phe Pro Asn Ser Val Glu Asp Cys His Tyr
100 105

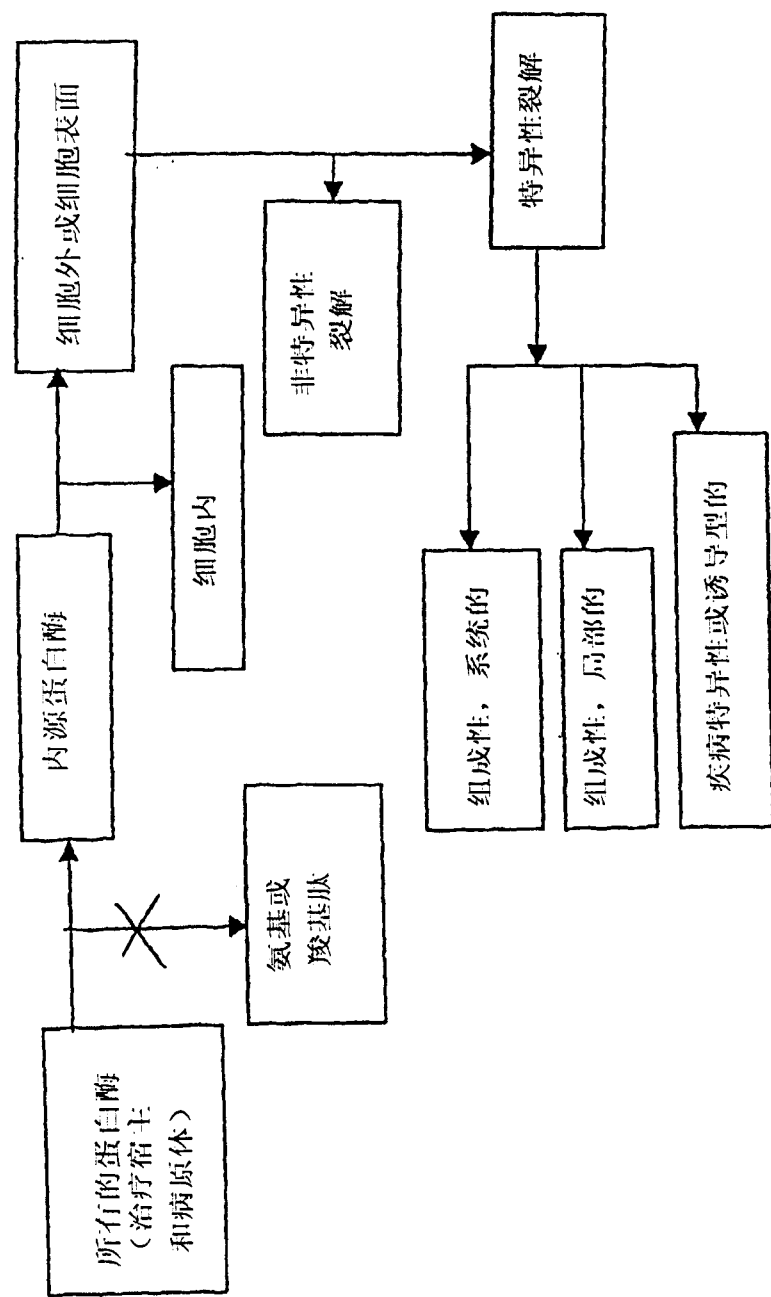


图 1