



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 102481341 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201080017140.X

(22)申请日 2010.02.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102481341 A

(43)申请公布日 2012.05.30

(30)优先权数据

61/154,730 2009.02.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.10.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/025121 2010.02.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/096838 EN 2010.08.26

(73)专利权人 希托马克斯医疗有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 N·E·斯坦格莉安奥

J·W·威斯特 K·卡姆斯

P·H·贝塞特 J·萨格特

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51)Int.Cl.

A61K 38/21(2006.01)

C07K 14/00(2006.01)

C07K 14/555(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

(56)对比文件

US 20030219402 A1,2003.11.21,

US 20050025751 A1,2005.02.28,

Well J.A et al.Additivity of

multational effects in proteins.

《Biochemistry》.1990,第29卷全文.

审查员 王超

权利要求书2页 说明书49页 附图3页

(54)发明名称

蛋白原及其使用方法

(57)摘要

本发明公开提供了蛋白原以及可以活化的蛋白原组合物。蛋白原含有一种功能性蛋白质(即,一种具有完整长度的蛋白质或者是上述蛋白质的功能片段),其中所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与它的靶向或者结合伴侣进行结合。可以活化的蛋白原含有一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,并且进一步的与一种可以活化的连接物进行了偶联,其中当处于一种未被活化的状态下时,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其靶向或者结合伴侣之间进行结合并且当处于一种被活化的状态下时所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的功能性蛋白质与其靶向或

者结合伴侣之间所进行的结合。蛋白原能够提供降低的毒性以及反向的副作用,如果没有对功能性蛋白质与其结合伴侣之间的结合进行抑制,则功能性蛋白质在非治疗位点上所进行的结合能够导致毒性以及反向的副作用。蛋白原可以进一步的提供改进的生物分布特征。与相应的不含有肽掩蔽物的功能性蛋白质相比,含有一种肽掩蔽物的蛋白原能够表现出一种更长的体内半衰期或者血清半衰期。所述的发明公开进一步的提供了用以筛选、制造、以及使用这样的蛋白原的方法。

1. 一种可以活化的多肽,包括一种干扰素 α 功能性蛋白质,该干扰素 α 功能性蛋白质由氨基酸序列:CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNL FSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNLEACVIQGVGVTEPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE、一种通过至少一种选自由蛋白质裂解酶、HCVNS3/4和基质金属蛋白酶-9所构成的组的蛋白酶进行切断的可以切断的连接物所构成,其中可以切断的连接物由一种选自VHMPGLGFLGP的氨基酸序列,一种选自由DEXXXCA SEQ ID NO:85,DEXXXCS SEQ ID NO:85,DLXXXTA SEQ ID NO:86和DLXXXTS SEQ ID NO:86所构成的组中的HCV-NS3/4丝氨酸蛋白酶的底物的保守序列,和一种选自由XXQARAX SEQ ID NO:87,XXQARVX SEQ ID NO:87和AGPR SEQ ID NO:2所构成的组中的蛋白质裂解酶的底物的保守序列、和一种肽掩蔽物所构成,其中所述的肽掩蔽物能够抑制所述的IFN- α 功能性蛋白质与IFN- α 结合伴侣所进行的结合并且由一种氨基酸序列,该氨基酸序列选自由IAYLEYEHLHMAYG SEQ ID NO:13,TDVDYYREWCWTQVS SEQ ID NO:14以及TDVDYYREWSWTQVS SEQ ID NO:15所构成的组中,并且其中在未裂解状态,所述肽掩蔽物抑制IFN- α 功能性蛋白质与IFN- α 结合伴侣的结合,在裂解状态,所述肽掩蔽物不抑制功能性蛋白质与IFN- α 结合伴侣的结合。

2. 一种可以活化的多肽,包括一种由氨基酸序列QDVDECSLGANPCEHAGKCINTLGSFECQCLQ GYTGPCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTG FTGHL CQ SEQ ID NO:79构成的Notch受体功能性蛋白质、一种通过至少一种选自由血纤维蛋白质溶酶和基质金属蛋白酶-9所构成的组的蛋白酶进行切断的可以切断的连接物,其中所述可以切断的连接物由选自由VHMPGLGFLGP SEQ ID NO:3和QGPMFKSLWD SEQ ID NO:4所构成的组中的氨基酸序列、以及一种肽掩蔽物构成,其中所述的肽掩蔽物能够抑制所述的Notch受体功能性蛋白质与Notch受体结合伴侣所进行的结合,由选自由FPLNTFDLVHELLSR SEQ ID NO:56;FLNDIHRFLHWTDL M SEQ ID NO:57;PYTFVEQVEYWLHAT SEQ ID NO:58;ACVIHFLDRISNILE SEQ ID NO:59;FCYIAAFSAMQRQSC SEQ ID NO:60;PLYLPEIGWMFGLPT SEQ ID NO:61;TVLVIPDLHYLYVDR SEQ ID NO:62;FINNVETALDTIYNL SEQ ID NO:63;SAKHLHPGRLPPMTK SEQ ID NO:64;ATMYAYLERLEAILS SEQ ID NO:65;IYPLDALLRHLNSLC SEQ ID NO:66;CFPTVVWRELYNLYG SEQ ID NO:67;NLDFYLNHLYNTLAG SEQ ID NO:68;DFINSMRSHLQSSDQ SEQ ID NO:69;EPKCSFCSPLIVPSP SEQ ID NO:70;PNCIESFLSSIHD SL SEQ ID NO:71;TDNALFLETVQHLY SEQ ID NO:72;CYPSISWLFADAPRN SEQ ID NO:73;ELTQLLNALVDVRNC SEQ ID NO:74;LLSSFVETMSSILTC SEQ ID NO:75;YLLRLPSLEELWG PS SEQ ID NO:76;和ATCYIINHWWERYII SEQ ID NO:77所构成的组中的氨基酸序列构成,以及 在未裂解状态,所述肽掩蔽物抑制Notch受体功能性蛋白质与Notch受体结合伴侣的结合,在裂解状态,所述肽掩蔽物不抑制Notch受体功能性蛋白质与Notch受体结合伴侣的结合。

3. 根据权利要求1或2所述的可以活化的多肽,其中所述多肽具有如下一个或者多个特点:所述的功能性蛋白质对其结合伴侣所具有的平衡解离常数不超过100nM;肽掩蔽物具有结合功能性蛋白质的平衡解离常数大于功能性蛋白质结合其结合伴侣的平衡解离常数,以及在裂解状态,肽掩蔽物不干扰或者不与功能性蛋白质竞争结合结合伴侣;所述蛋白酶与结合伴侣一起位于组织中,其中,可以切断的连接物位于可裂解的多肽中从而在未裂解状态,可以活化的多肽与结合伴侣的结合被降低,同时其平衡解离常数至少是未修饰的功能性蛋白质结合其结合伴侣的平衡解离常数的至少100倍,并且,在裂解状态,如果结合伴侣

存在的话,功能性蛋白质能够结合结合伴侣;并且

在未裂解状态中的可以活化的多肽具有如下从N-末端至C-末端的结构排列:肽掩蔽物-可以切断的连接物-功能性蛋白质或者功能性蛋白质-可裂解连接体-肽掩蔽物,

其中,肽掩蔽物的耦合减少了功能性蛋白质结合其结合伴侣的能力,因此当与肽掩蔽物耦合时,功能性蛋白质结合其结合伴侣的解离常数比未与肽掩蔽物耦合时大至少100倍。

4. 根据权利要求2所述的可以活化的多肽,其中,所述的Notch受体结合伴侣选自由DLL1,DLL3,DLL4,Jagged1,以及Jagged2所组成的组中。

5. 根据权利要求1或2所述的可以活化的多肽,其进一步的包括一种免疫球蛋白的Fc区域。

6. 根据权利要求1或2所述的可以活化的多肽,其中所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的解离常数低于大约5纳摩。

7. 根据权利要求1或2所述的可以活化的多肽,其中当并不存在一种切断所述的可以切断的连接物的酶时,与存在一种能够切断所述的可以切断的连接物的酶的情况相比,所述的肽掩蔽物能够以至少90%的程度抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合,并且当存在一种切断所述的可以切断的连接物的酶时,所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合。

8. 一种分离的核酸分子,该核酸分子编码权利要求1或2所述的可以活化的多肽。

9. 一种载体,编码权利要求8中所述的分离的核酸分子。

10. 一种通过在导致可以活化的多肽表达的环境下培养细胞生产权利要求1或2所述的可以活化的多肽的方法,其中,所述细胞包括一种载体,这种载体包括能够编码可以活化的多肽的分离的核酸分子。

蛋白原及其使用方法

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求享有申请日为2009年2月23日的美国临时申请No.61/154730所享有的权益,上述申请中的全部内容在本发明中被引入作为参考。

[0003] 发明的背景

[0004] 基于蛋白质的治疗方法以及改变了医药学的样貌,寻找到了在各种不同的疾病中的应用。然而,如同任何的治疗方法一样,对于提高的靶向特异性以及靶向选择性所具有的需要以及期望都是非常令人感兴趣的。

[0005] 在小分子药物的领域中,已经研究出了一种策略,能够提供一种活化的化学个体的前体药物。这样的前体药物是以一种相对而言灭活(或者具有显著降低的活性)的形式被进行施用的。一旦被施用,所述的前体药物在体内进行代谢作用,代谢成为所述的活性化合物。这样的前体药物策略能够为所述的药物提供相对于其指定靶向而言的增强的选择性以及副作用的降低。用来作用于缺氧性癌细胞的药物,经由所述的氧化还原-活化作用的使用,利用大量的还原酶将所述的药物转化成为其细胞毒素的形式,在本质上使其进行活化,其中所述的还原酶是存在于所述的缺氧性细胞之中的。由于所述的前体药物在进行这种活化作用之前具有低的细胞毒性,具有显著降低的损害非癌性细胞的危险,从而提供了由所述的药物所带来的降低的副作用。在所述的领域中存在一种需求,需要提供一种策略,用以作为基于蛋白质的治疗方法提供前体药物的特征,特别是在第二代蛋白质药物的研发中,其中所述的第二代蛋白质药物具有已知的靶向供其进行结合。对所述的疾病位点所具有的增强的靶向性能降低基于系统代谢作用的毒性并且产生更为宽泛的治疗效用。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明公开提供了蛋白原以及可以活化的蛋白原组合物。

[0008] 在一个方面,所述的发明公开提供了一种组合物,所述的组合物包括一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质不是一种抗体或者一种抗体片段,其中所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的肽掩蔽物:(i)能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合并且(ii)并不具有所述的结合伴侣所具有的氨基酸序列。在一种实施方式中,所述的功能性蛋白质进一步的与一种可以切断的连接物进行了偶联,其中所述的连接物可以被切断,这样一来:(i)当处于一种未被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合并且(ii)当处于一种被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。在一种实施方式中,所述的可以切断的连接物能够被一种酶进行特异性的切断,能够被一种还原试剂进行还原,或者能够被进行光解。在一种实施方式中,所述的可以切断的连接物能够以一种至少 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}$ 的速率被一种酶进行特异性的切断。

[0009] 在另外一种实施方式中,所述的肽掩蔽物是被进行重组表达的。在一种实施方式中,所述的肽掩蔽物对于所述的功能性蛋白质而言是唯一的。

[0010] 在一种实施方式中,所述的肽掩蔽物具有8-15个氨基酸的长度。

[0011] 在一种实施方式中,所述的肽掩蔽物与其结合伴侣相比具有少于50%的氨基酸序

列的同一性。

[0012] 在一种实施方式中,所述的肽掩蔽物含有少于50%的遗传非编码氨基酸。在一种相关的实施方式中,所述的遗传非编码氨基酸是D-氨基酸, β -氨基酸,或者 γ -氨基酸。

[0013] 在一种实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种具有完整长度的蛋白质,一种具有完整长度的蛋白质的功能性片段,一种球状蛋白质,一种纤维状蛋白质,或者是一种多聚性蛋白质。在一种具体的实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种配体。在一种相关的实施方式中,所述的配体是一种干扰素蛋白质并且选自由下述蛋白质所组成的组中:I型干扰素,II型干扰素,以及III型干扰素或者选自由下述干扰素所组成的组中:干扰素(IFN)- α ,干扰素(IFN)- β ,干扰素(IFN)- ω 以及干扰素(IFN)- γ 。在一种具体的实施方式中,所述的干扰素蛋白质是干扰素(IFN)- α 。在一种具体的实施方式中,所述的干扰素(IFN)- α 蛋白质选自由2a,2b,以及con 1所组成的组中。在一种相关的实施方式中,所述的结合伴侣是一种所述干扰素蛋白质的受体。在这样的一种实施方式中,所述的干扰素蛋白质的受体选自由下述受体所组成的组中: α 干扰素受体(IFNAR), α 干扰素受体1(IFNAR1), α 干扰素受体2(IFNAR2), γ 干扰素受体(IFNGR),以及 λ 干扰素受体1(IFNLR1)。在一种相关的实施方式中,所述的肽掩蔽物含有一个序列,所述的序列选自在表格3中列出的那些,或者是与那些序列具有至少90%的同一性的序列。在一种具体的实施方式中,所述的肽掩蔽物含有所述的保守序列TDVDYYREWXXXXXXXXX。

[0014] 在另外一种实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种可溶性的膜蛋白质或者是上述蛋白质的功能性片段。在另外一种实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种可溶性的受体或者是上述受体的片段。在一种相关的实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种受体蛋白质的细胞外结构域或者是上述结构域的片段。在具体的实施方式中,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的可溶性受体与其配体所进行的结合或者所述的肽掩蔽物能够抑制所述的受体的配体结合结构域。在一种更为具体的实施方式中,所述的受体是Notch并且可以选自由下述受体所组成的组中:Notch1,Notch2,Notch3以及Notch4。在一种相关的实施方式中,所述的Notch配体选自由下述配体所组成的组中: δ 样配体1(DLL1), δ 样配体3(DLL3), δ 样配体4(DLL4),Jagged1,以及Jagged2。在一种具体的实施方式中,所述的肽掩蔽物含有一种序列,所述的序列选自在表格14中列出的那些,或者是与那些序列具有至少90%的同一性的序列。

[0015] 在其他的实施方式中,所述的可以切断的连接物是一种酶的底物,其中所述的底物选自在表格2中列出的所述底物。在相关的实施方式中,所述的可以切断的连接物是一种酶的底物,其中所述的酶选自由下述的酶所组成的组中:蛋白质裂解酶,血纤维蛋白溶酶,基质金属蛋白酶-9(MMP-9),尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA),丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶,前列腺特异性抗原(PSA)酶,以及天冬酰胺肽链内切酶legumain,或者具体的是一种蛋白质裂解酶或者丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶的底物。在一种实施方式中,所述的蛋白质裂解酶底物所具有的保守序列包括XXQAR(A/V)X或者AGPR。在另外一种实施方式中,所述的丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶的底物所具有的保守序列包括DEXXXC(A/S)或者DLXXXT(A/S)。在另外一种实施方式中,所述的基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的底物所具有的序列包括VHMPGLFLGP。在另外一种实施方式中,所述的血纤维蛋白溶酶的底物所具有的序列包括QGPMFKSLWD。

[0016] 在另外一种实施方式中,所述的组合物进一步的含有一种免疫球蛋白的Fc区域。

[0017] 在另外一种实施方式中,所述的肽掩蔽物与所述的功能性蛋白质之间进行的偶联是非共价的。

[0018] 在一些实施方式中,所述的肽掩蔽物能够以变构的方式抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合。在其他的实施方式中,所述的肽掩蔽物能够以空间的方式抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合。

[0019] 在绝大多数的实施方式中,所述的肽掩蔽物对所述的功能性蛋白质所具有的结合亲和力小于所述的结合伴侣对所述的功能性蛋白质所具有的结合亲和力。在一种具体的实施方式中,所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的解离常数(K_d)比所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的解离常数高至少100倍。在一种更为具体的实施方式中,所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的解离常数低于大约5纳摩。

[0020] 在另外一种实施方式中,当所述的组合物中并不存在一种能够切断所述的可以切断的连接物的酶时,与当所述的组合物中存在一种能够切断所述的可以切断的连接物的酶的情况相比,所述的肽掩蔽物能够以至少90%的程度抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合,并且当所述的组合物中存在一种能够切断所述的可以切断的连接物的酶时,所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合。

[0021] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种药物组合物,其中所述的药物组合物包括一种治疗有效剂量的组合物以及药物学可接受性的赋形剂,所述的组合物中包括一种并不属于抗体或者抗体片段的功能性蛋白质,其中所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的肽掩蔽物:(i)能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合并且(ii)并不具有所述的结合伴侣所具有的氨基酸序列。在这种药物组合物的一种具体的实施方式中,所述的功能性蛋白质进一步的与一种可以切断的连接物进行了偶联,这样一来:(i)当处于一种未被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合并且(ii)当处于一种被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合。

[0022] 在另外一个方面,本发明公开同样提供了一种用以治疗疾病或者障碍的方法,其中施用一种药物组合物,所述的药物组合物包括一种治疗有效剂量的组合物以及药物学可接受性的赋形剂,所述的组合物中包括一种并不属于抗体或者抗体片段的功能性蛋白质,其中所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的肽掩蔽物:(i)能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合并且(ii)并不具有所述的结合伴侣所具有的氨基酸序列。在这种方法的一种具体的实施方式中,所述的功能性蛋白质进一步的与一种可以切断的连接物进行了偶联,这样一来:(i)当处于一种未被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合并且(ii)当处于一种被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行的结合。在一种具体的实施方式中,所述的疾病或者障碍是癌症。在另外一种具体的实施方式中,所述的疾病或者障碍是一种肝病例如丙型肝炎病毒感染或者肝细胞癌。在另外一种具体的实施方式中,所述的疾病或者障碍包括血管再生。

[0023] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种文库,所述的文库包括大量备选的可以活化的功能性蛋白质,这些功能性蛋白质被展示在一种可以复制的生物学实体的表面之

上。在一种实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种干扰素或者是可溶性的Notch受体蛋白质。

[0024] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以制备备选的肽掩蔽物的文库的方法,包括:向可以复制的生物学实体的基因组内导入一批重组的DNA构建体,所述的DNA构建体能够分别编码一种肽掩蔽物,所述的导入能够产生重组的可以复制的生物学实体;并且在适宜进行所述的备选肽掩蔽物的表达以及展示的条件下对所述的重组的可以复制的生物学实体进行培养。在一种相关的实施方式中,对所述的备选的肽掩蔽物进行筛选,其中所述的筛选是针对所具有的结合干扰素蛋白质或者可溶性的Notch受体的能力而进行的。在一种具体的实施方式中,所述的干扰素蛋白质是干扰素原- α (pro-IFN- α)。

[0025] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以筛选肽掩蔽物的方法,所述的方法包括:将大量的备选的肽掩蔽物与一种功能性蛋白质进行接触;并且利用一种功能性蛋白质对第一代成员进行筛选;其中所述的方法提供了对肽掩蔽物的筛选。在一种实施方式中,对所述的备选的肽掩蔽物进行筛选,其中所述的筛选是针对所具有的结合干扰素蛋白质或者可溶性的Notch受体的能力而进行的。在一种具体的实施方式中,所述的干扰素蛋白质是干扰素原- α (pro-IFN- α)。

[0026] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以筛选可以活化的功能性蛋白质的方法,其中所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的方法包括:将大量备选的可以活化的蛋白质与一种结合伴侣以及一种酶进行接触,其中所述的结合伴侣能够与所述的功能性蛋白质进行结合,所述的酶能够切断所述的可以活化的蛋白质所具有的可以切断的连接物;对所述的群体中的第一代成员进行筛选,选择那些在存在有所述的酶的条件下能够与所述的结合伴侣进行结合的成员;在不存在有所述的酶的条件下,将所述的第一代与所述的结合伴侣进行结合;并且在所述的第一代中进行第二代成员的筛选,所述的筛选是通过下述方式来实现的:在不存在有所述的酶的条件下,删除那些与所述的结合伴侣发生结合的第一代成员,其中所述的方法提供了对备选的可以活化的功能性蛋白质的筛选,当与在存在有所述酶的条件下与结合伴侣所进行的结合相比,在不存在有所述的酶的条件下,所述的功能性蛋白质表现出减少的与结合伴侣所进行的结合。在一种实施方式中,对所述的备选的肽掩蔽物进行筛选,其中所述的筛选是针对所具有的结合干扰素蛋白质或者可溶性的Notch受体的能力而进行的。在一种具体的实施方式中,所述的干扰素蛋白质是干扰素原- α (pro-IFN- α)。

[0027] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以制备备选的可以活化的功能性蛋白质的文库的方法,其中所述的功能性蛋白质分别与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的方法包括:向可以复制的生物学实体的基因组内导入一批重组的DNA构建体,所述的DNA构建体能够编码大量备选的可以活化的功能性蛋白质,所述的导入能够产生重组的可以复制的生物学实体;并且在适宜进行所述的备选的可以活化的功能性蛋白质的表达以及展示的条件下对所述的重组的可以复制的生物学实体进行培养。在一种实施方式中,所述备选的可以活化的功能性蛋白质在它们所偶联的肽掩蔽物所具有的序列方面是存在差异的。在一种具体的实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种干扰素或者是一种可溶性的Notch受体蛋白质。

[0028] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以筛选可以活化的功能性蛋白质的方

法,其中所述的功能性蛋白质与一种肽进行了偶联,所述的方法包括:将大量备选的可以活化的蛋白质与一种结合伴侣以及一种酶进行接触,其中所述的结合伴侣能够与所述的功能性蛋白质进行结合,所述的酶能够切断所述的可以活化的蛋白质所具有的可以切断的连接物;对所述的群体中的第一代成员进行筛选,选择那些在存在有所述的酶的条件下能够与所述的结合伴侣进行结合的成员;在不存在有所述的酶的条件下,将所述的第一代与所述的结合伴侣进行结合;并且在所述的第一代中进行第二代成员的筛选,所述的筛选是通过下述方式来实现的:在不存在有所述的酶的条件下,删除那些与所述的结合伴侣发生结合的第一代成员,其中所述的方法提供了对备选的可以活化的功能性蛋白质的筛选,当与在存在有所述酶的条件下与结合伴侣所进行的结合相比,在不存在有所述的酶的条件下,所述的功能性蛋白质表现出减少的与结合伴侣所进行的结合。在一种实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种干扰素或者是一种可溶性的Notch受体蛋白质。

[0029] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以编码功能性蛋白质以及肽掩蔽物的载体,其中所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣进行结合的能力。在一种实施方式中,所述的功能性蛋白质是一种干扰素或者是一种可溶性的Notch受体蛋白质。

[0030] 在一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的干扰素- α (IFN- α) 蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被蛋白质裂解酶切断的底物。

[0031] 在另外一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的干扰素- α (IFN- α) 蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶切断的底物。

[0032] 在另外一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的可溶性的Notch受体蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被基质金属蛋白酶切断的底物。

[0033] 在另外一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的可溶性的Notch受体蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被血纤维蛋白溶酶切断的底物。

[0034] 在另外一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的可溶性的Notch受体蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被天冬酰胺肽链内切酶legumain切断的底物。

[0035] 在另外一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的可溶性的Notch受体蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被尿激酶型纤溶酶原激活剂 (uPA) 切断的底物。

[0036] 在另外一个具体的方面,本发明公开提供了一种经过修饰的可溶性的Notch受体蛋白质,所述的蛋白质包括一种能够被前列腺特异性抗原 (PSA) 酶切断的底物。

[0037] 在另外一个方面,本发明公开提供了一种用以进行丙型肝炎的治疗的蛋白质治疗剂,所述的蛋白质治疗剂具有提高的生物可利用率,其包括一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物以及一种可以切断的连接物进行了偶联,其中与在一种非肝脏的组织中所述的蛋白质治疗剂对其靶向所具有的结合亲和力相比,在肝脏组织中所述的蛋白质治疗剂对其靶向所具有的结合亲和力更高,其中靶向同时存在于两种组织之中。在一种实施方式中,所述的可以切断的连接物包括一种底物,所述的底物对一种蛋白质裂解酶或者丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶具有特异性。

[0038] 参考文献的引入

[0039] 在所述的说明书中所提及的全部的公开出版物,专利,以及专利申请均在本发明中被引入,其引入的程度就如同每一篇单独的公开出版物,专利,或者专利申请都被明确的

以及单独的生命被引入作为参考。

[0040] 附图的简要说明

[0041] 本发明所具有的新的特征是在后附的权利要求中的特性中所列出的。参照下述列出了描述性的实施方式的详细描述,将能够获得对本发明所具有的特征以及优点的更好的理解,在所述的详细描述中利用到了本发明所具有的原理,并且其所具有的附图为:

[0042] 附图1描述的是一种范例性的被掩蔽的可以活化的折叠蛋白原。所述的附图展现的是一种不能够与伴侣进行结合的蛋白质,这归因于其与具体的以及唯一的肽掩蔽物之间所进行的相互作用。

[0043] 附图2描述的是干扰素- α (IFN- α) 结合肽的富集,用来作为掩蔽物,这是利用荧光激活的细胞分选术 (FACS) 来进行检测的。

[0044] 附图3描述的是在利用基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 进行治疗之前以及之后,两种干扰素原- α (pro-IFN- α) 分子之间所进行的结合,其中所述的两种分子是干扰素原- α -47 (pro-IFN- α -47) 以及干扰素原- α -49CS (pro-IFN- α -49CS)。

[0045] 附图4描述的是对各种克隆物所进行的测试,测试其与人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13所进行的结合。

[0046] 发明的详细描述

[0047] 蛋白原:导入以及一般性特征

[0048] 本发明公开提供了蛋白原。

[0049] 在本发明中描述的所述的蛋白原组合中含有一种完整长度的蛋白质或者是一种完整长度的蛋白质的功能性片段(在本发明中它们被统称为“功能性蛋白质”),其中所述的蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联。所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣或者靶向(结合伴侣以及靶向在本发明中可以进行互换使用)所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过空间的方式或者变构的方式抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。一般而言,所述的功能性蛋白质能够表现出两种截然不同的水平的与其结合伴侣之间的结合,这依据所述的肽掩蔽物的存在和/或位置。

[0050] 当一种功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联并且存在所述功能性蛋白质的结合伴侣时,与没有跟所述的肽掩蔽物进行偶联的情况下所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合相比,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合可以被减弱或者被抑制。

[0051] 一种功能性蛋白质是一种具有完整长度的蛋白质或者是上述蛋白质的功能性片段并且具有下述的功能性活性或者生理学活性(例如,体内或者体外),例如,与一种靶向或者结合伴侣的结合亲和力,作用于信号途径的能力,具有酶活性,或者类似的活性。一种功能性的蛋白质片段同样保留了功能性活性或者生理学活性(例如,体内或者体外)。这样的活性可以是,例如,保留了所述的完整长度的蛋白质所具有的相关的生物学活性,即,结合,靶向,发信号,触发一种特定的信号级联,调节一种特定的途径,以及类似的活性。

[0052] 在一种实施方式中,所述的功能性蛋白质并不是一种抗体或者抗体片段。

[0053] 本发明中所述的一种功能性蛋白质可以是天然存在或者是非天然存在的。

[0054] 本发明中所述的蛋白原或者所述的功能性蛋白质可以是进行了翻译后的修饰的。

[0055] 一种功能性蛋白质可以是球状的,纤维状的,或者是多聚性质的。

[0056] 一种功能性蛋白质可以是一种配体,一种细胞外配体,例如,一种干扰素蛋白质,或者更为具体的,例如,一种干扰素- α (IFN- α) 完整长度的蛋白质,一种干扰素- β (IFN- β) 完整长度的蛋白质,一种干扰素- γ (IFN- γ) 完整长度的蛋白质,或者一种干扰素- ω (IFN- ω) 完整长度的蛋白质。

[0057] 一种功能性蛋白质可以是一种可溶性的膜蛋白质,例如,一种可溶性的受体,例如一种可溶性的Notch受体,例如Notch 1,Notch 2,Notch 3,或者Notch 4受体。

[0058] 可以以细胞内的方式对一种功能性蛋白质进行接纳或者可以使其保留在细胞外。

[0059] 本发明中所述的蛋白原可以含有天然存在的氨基酸或者非天然存在的氨基酸,或者两者同时存在。本发明中所述的蛋白原可以含有L-氨基酸,D-氨基酸,或者是上述两者的混合物。在具体的实施方式中,本发明中所述的功能性蛋白质可以与一种肽掩蔽物进行偶联,其中所述的肽掩蔽物含有天然存在的或者非天然存在的氨基酸,或者两者同时存在。

[0060] 本发明中所述的蛋白原可以含有一种天然存在的具有完整长度的蛋白质或者功能性的蛋白质片段的变异的变体。即,一种功能性蛋白质可以是一种天然存在的蛋白质的变体。

[0061] 本发明中所述的蛋白原可以通过合成的方式来生成的。

[0062] 本发明中所述的蛋白原可以是进行了重组性的表达的,并且是经过纯化的。

[0063] 本发明公开进一步的也提供了可以活化的蛋白原。

[0064] 一种可以活化的蛋白原中包括一种功能性蛋白质或者是所述蛋白质的功能性片段,其中所述的功能性蛋白质或其功能性片段与一种肽掩蔽物进行了偶联,并且进一步的与一种可以活化的半族(或者是可以活化的连接物例如一种可以切断的连接物)进行了偶联,其中当处于一种未被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的蛋白质与其结合伴侣所进行的结合并且当处于一种被切断的状态下时,所述的肽掩蔽物不能够抑制所述的蛋白与其结合伴侣所进行的结合。

[0065] 当被活化时,所述的可以活化的蛋白原组合物中所具有的可以活化的半族或者可以活化的连接物能够改变所述的肽掩蔽物在与所述的功能性蛋白质的关系中的构象。通过对所述的可以活化的连接物进行活化的方式,所述的功能性蛋白质能够具有针对其结合伴侣或者靶向的不同的结合亲和力。

[0066] 在一些情形中,所述的可以活化的连接物是一种可以切断的连接物,含有一种底物,所述的底物能够被一种酶进行特异性的切断,其中所述的酶是蛋白酶或者是肽酶。在其他的情形中所述的可以活化的连接物能够被一种还原试剂进行还原。在另外的情形中,所述的可以活化的连接物是一种光敏感底物,能够通过光分解作用被进行活化。当在本发明中被进行使用时,切断一词是可以被进行交替使用的,用来代表通过一种酶、一种还原试剂、或者光分解作用而产生的活化作用。

[0067] 在附图1中提供了一种可以活化的蛋白原的示意图。正如所描述的,对所述的可以活化的蛋白原所具有的组分进行安排,这样一来当其处于一种未被切断的状态下时(或者相对而言灭活的状态下)所述的蛋白质与所述的靶向结合伴侣所进行的结合被得到了抑制,这种抑制归因于通过所述的肽掩蔽物而产生的对所述的蛋白质的掩蔽作用。

[0068] 可以活化的指的是:当以一种天然的状态或者未被活化的状态(即,第一种构象)

存在时,所述的蛋白原能够表现出第一种水平的与一种结合伴侣所进行的结合,并且当处于所述的被活化的状态下时(即,第二种构象)能够表现出第二种水平的与一种结合伴侣所进行的结合,其中所述的第二种水平的结合高于所述的第一种水平的结合。一般而言,当存在一种酶/还原试剂/光时,一种结合伴侣与所述的功能性蛋白质的接触多于不存在这样的酶/还原试剂/光的情况,其中所述的酶/还原试剂/光能够对所述的可以活化的连接物进行活化。因此,当处于所述的未被活化或者未被切断的状态下时,所述的蛋白质被进行了掩蔽从而不能够与靶向进行结合(即,所述的第一种构象指的是所述的肽掩蔽物能够抑制所述的结合伴侣与所述的蛋白质之间所进行的接触),并且当处于所述的被活化的状态下时所述的蛋白质对于所述的结合伴侣而言是未被掩蔽的。

[0069] 当所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物以及一种可以活化的半族同时进行了偶联,并且在存在有所述蛋白质的结合伴侣但不存在足够的酶/还原酶/光用以对所述的可以活化的半族进行活化的条件下,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合受到了抑制,这种抑制是相较于在存在足够的酶/还原酶/光用以对所述的可以活化的半族进行活化的条件下,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合而言的。

[0070] 蛋白原能够提供降低的毒性和/或反向的副作用,如果不对功能性蛋白质及其结合伴侣之间的结合进行抑制的话,所述的毒性和/或反向的副作用将产生于所述的功能性蛋白质在非治疗位点上进行的结合。蛋白原能够提供改进的生物分布特征。与相应的未进行掩蔽的蛋白质相比,含有一种被掩蔽的蛋白质的蛋白原能够表现出一种更长的体内半衰期或者血清半衰期。

[0071] 一般而言,可以通过下述的方式对一种蛋白原进行设计:选自一种感兴趣的具有完整长度的或者功能性片段的蛋白质,并且对所述的蛋白原的其余部分进行构建,这样一来,当通过构象的方式对其进行约束时,所述的肽掩蔽物能够通过空间的方式或者通过变构的方式对所述的蛋白质所具有的结合位点提供掩蔽。结构设计标准可以被纳入到考虑范围,用以提供所述的掩蔽特征。优选的,所述的蛋白原是经过遗传编码的以及重组表达的,但同样可以是通过合成的方式制备得到的。

[0072] 提供了一种蛋白原,所述的蛋白原能够表现出一种具有期望的靶向结合的动态范围的可以活化的表型,这种动态范围是在一种被切断的构象与未被切断的构象之间的。动态范围一般而言指的是一种比率,所述的比率是(a)在第一组条件下一个参数所具有的可检测性的水平与(b)在第二组条件下所述的参数所具有的可检测性的水平之间的比率。例如,在一种蛋白原的情形下,所述的动态范围指的是下述的比率:(a)在存在有一种能够切断所述的蛋白原所具有的可以切断的连接物的酶的条件下,其中所述的酶例如是蛋白酶,所述的靶向蛋白所具有的结合蛋白原的可检测性的水平与(b)在不存在所述的蛋白酶的条件下所述的靶向蛋白所具有的结合蛋白原的可检测性的水平之间的比率。可以对一种蛋白原所具有的动态范围进行计算,将其计算为下述的比率:一种蛋白原切断试剂(例如,酶)所进行的处理所具有的平衡解离常数与所述的蛋白原切断试剂所进行的处理所具有的平衡解离常数。一种蛋白原所具有的动态范围越大,所述的蛋白原所具有的可以活化的表型就越好。具有相对而言更高的动态范围数值(例如,高于1,2,3,4,5,或者更高)的蛋白原能够表现出更为期望的活化表型,这样一来,与不存在一种切断试剂的情况相比,当处于存在一种切断试剂(例如,酶)的情况下时,所述的蛋白原所发生的靶向蛋白的结合能够在更大的

程度上发生(例如,突出的发生),其中所述的切断试剂能够切断所述的可以切断的连接物。

[0073] 可以以各种不同的结构构象来提供可以活化的蛋白原。在下文中提供了蛋白原的范例性的结构式。特别可以预期到的是,在一种蛋白原之中,所述的功能性蛋白质所具有的N-末端到C-末端的顺序,所述的肽掩蔽物,以及所述的可以切断的连接物是可以颠倒的。同样特别可以预期到的是,所述的可以切断的连接物以及肽掩蔽物可以在氨基酸序列上存在重叠,例如,这样一来所述的可以切断的连接物被包含在所述的肽掩蔽物之中。

[0074] 例如,可以通过下述的结构式(从氨基(N)末端区域到羧基(C)末端区域的顺序)对蛋白原进行表示。

[0075] (肽掩蔽物)-(连接物)-(功能性蛋白质)

[0076] (功能性蛋白质)-(连接物)-(肽掩蔽物)

[0077] (肽掩蔽物)-(可以活化的连接物)-(功能性蛋白质)

[0078] (功能性蛋白质)-(可以活化的连接物)-(肽掩蔽物)

[0079] 应当被注释的是,尽管在上述的结构式中所述的肽掩蔽物以及可以切断的连接物被表示为截然不同的祖坟,在本发明中所公开的所有的范例性的实施方式中可以预期的是所述的肽掩蔽物以及所述的可以活化的连接物所具有的氨基酸序列可能是重叠的,例如,这样一来所述的可以切断的连接物被完全的或者一部分的包含在所述的肽掩蔽物之中。除此之外,上述的结构式提供了另外的氨基酸序列,所述的氨基酸序列可能位于所述的蛋白原组分的N-末端或者C-末端上。

[0080] 在许多实施方式中,向所述的蛋白原构建体中插入一个或者多个连接物可能是令人期望的,其中所述的连接物例如是弹性的连接物,这样一来能够在一个或者多个所述的肽掩蔽物-可以活化的/可以切断的连接物的连接处、所述的可以活化的/可以切断的连接物-蛋白的连接处、或者上述两种连接处之间提供弹性。例如,所述的功能性蛋白质,肽掩蔽物,和/或可以活化的/可以切断的连接物可能并不含有足够数量的氨基酸残基(例如,甘氨酸,丝氨酸,天冬氨酸,天冬酰胺,特别是甘氨酸以及丝氨酸,尤其是甘氨酸)用以提供所期望的弹性。所述的连接物中可以包括天然存在的或者非天然存在的氨基酸延伸。这样一来,这种蛋白原构建体所具有的可以活化的表型能够通过一个或者多个氨基酸的导入而获得益处,从而提供一种有弹性的连接物。

[0081] 范例性的有弹性的连接物包括甘氨酸聚合物(G)_n,甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如,甘氨酸丝氨酸聚合物(GS)_n,甘氨酸丝氨酸甘氨酸甘氨酸丝氨酸聚合物(GSGGS)_n以及甘氨酸甘氨酸甘氨酸丝氨酸聚合物(GGGS)_n,其中n是一个至少为一的整数),甘氨酸-丙氨酸聚合物,丙氨酸-丝氨酸聚合物,以及本领域中已知的其他有弹性的连接物。甘氨酸以及甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对而言无结构的,并且因此能够被用来作为存在于组分之间的中性的链条。甘氨酸与丙氨酸相比显著的占用了更多的 ψ - ϕ 空间,并且与具有较长侧链的残基相比具有少得多的限制(参见Scheraga(于1992年)在Rev.Computational Chem.《计算化学评论》11173-142中发表的文章)。范例性的有弹性的连接物包括,但不局限于甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸,甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸-甘氨酸,甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸,甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-,甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸,甘氨酸-丝氨酸-丝氨酸-丝氨酸-甘氨酸,以及类似的连接物。所属领域的普通技术人员将能够认识到,一种蛋白原的设计可以包括连接物,所述的连接物可以是完全弹

性的或者具有一定程度的弹性的,这样一来所述的连接物能够包括一种有弹性的连接物以及一个或者多个提供较小弹性的部分,从而提供一种期望的蛋白原结构。

[0082] 适合用在蛋白原中的连接物通常情况下是那些能够为所述的蛋白原提供弹性用以帮助形成一种被掩蔽的构象的连接物。这样的连接物通常情况下被称为弹性连接物。适合的连接物是很容易进行选择并且可以具有不同的长度,例如从1个氨基酸(例如,甘氨酸)至20个氨基酸,从2个氨基酸至15个氨基酸,从3个氨基酸至12个氨基酸,包括从4个氨基酸至10个氨基酸,从5个氨基酸至9个氨基酸,从6个氨基酸至8个氨基酸,或者从7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个,10个,11个,12个,13个,14个,15个,16个,17个,18个,19个或者20个氨基酸。

[0083] 例如,可以通过下述的结构式(从氨基(N)末端到羧基(C)末端的顺序)对含有这样的任选的有弹性的连接物的蛋白原进行表示。

[0084] (肽掩蔽物)-(任选的有弹性的连接物)-(可以活化的连接物)-(任选的有弹性的连接物)-(功能性蛋白质)

[0085] (功能性蛋白质)-(任选的有弹性的连接物)-(可以活化的连接物)-(任选的有弹性的连接物)-(肽掩蔽物)

[0086] 除了在上文中描述的组分之外,所述的蛋白原可以与其他组分或者额外的特征进行偶联,例如一种其他的治疗半族,一种用以促进向目标细胞或者组织中的递送的靶向半族,一种用以直接与一种靶向受体进行结合从而促进所述的蛋白原的定位的半族,一种能够增加所述的蛋白原所具有的血清半衰期的免疫球蛋白Fc区域,例如,以及类似的组分或者特征。

[0087] 例如,可以通过下述的结构式(从氨基(N)末端到羧基(C)末端的顺序)对含有这样的任选的其他组分或者特征的蛋白原进行表示。

[0088] (用于进行细胞吸收的靶向半族)-(肽掩蔽物)-(可以活化的连接物)-(功能性蛋白质)

[0089] (功能性蛋白质)-(可以活化的连接物)-(肽掩蔽物)-(用以进行细胞吸收的靶向半族)

[0090] (Fc)-(肽掩蔽物)-(可以活化的连接物)-(功能性蛋白质)

[0091] (功能性蛋白质)-(可以活化的连接物)-(肽掩蔽物)-(Fc)

[0092] 当与一种肽掩蔽物进行偶联时,所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的所述的解离常数(K_d)高于当不与一种肽掩蔽物进行偶联时所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的所述的解离常数。相反的,当与一种肽掩蔽物进行偶联时,所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的所述的结合亲和力低于当不与一种肽掩蔽物进行偶联时所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的所述的结合亲和力。

[0093] 所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的所述的解离常数(K_d)通常情况下大于所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的所述的解离常数。相反的,所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的所述的结合亲和力通常情况下小于所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的所述的结合亲和力。

[0094] 所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够结合所述的功能性蛋白质所具有的一个结合结构域并且抑制所述的功能

性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过空间的方式干扰所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过变构的方式来抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。在这些实施方式中,当所述的功能性蛋白质被进行了修饰或者与一种肽掩蔽物进行了偶联时,并且当存在有所述的结合伴侣时,与没有同肽掩蔽物进行偶联的所述功能性蛋白质所进行的结合相比,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间没有进行结合或者在本质上没有进行结合。正如本发明中所描述的,这可以在掩蔽效率检测(Mask Efficiency Assay)、免疫吸附检测中进行体内或者体外的测量。

[0095] 当一种功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联时,所述的肽掩蔽物能够“掩蔽”或者减少、或者抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合。当一种功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联时,这样的偶联或者修饰能够达到一种结构的改变,所述的改变能够减少或者抑制所述的功能性蛋白质所具有的与其结合伴侣进行特异性的结合的能力。

[0096] 本发明公开进一步的提供了使用肽掩蔽的功能性蛋白质的方法,筛选肽掩蔽的功能性蛋白质的方法,以及制备肽掩蔽的功能性蛋白质的方法。

[0097] 本发明中所提供的所述的蛋白原组合物中的组分将在下文中被进行更为详细的描述。

[0098] 功能性蛋白质以及结合伴侣

[0099] 本发明公开提供了一种具有完整长度的蛋白质或者是一种功能性的蛋白质片段,所述的蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联,所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与一种结合伴侣或者靶向之间产生的相互作用。可以预期在本发明公开中进行使用的所述的功能性蛋白质可以是任何的具有完整长度的蛋白质或者是上述蛋白质的功能性片段(可以通过交替呼唤的方式被称之为“功能性蛋白质”)。功能性蛋白质,表示的是所述的具有完整长度的蛋白质,或者是上述蛋白质的功能性片段,保留了相关的生物学活性,即,结合,靶向,发信号,等等。一旦未进行掩蔽,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣或者靶向所进行的结合能够提供一种期望的生物学作用,例如,对所述的靶向蛋白所具有的活性的抑制作用和/或对一种靶向蛋白的检测作用。一旦未进行掩蔽,一种功能性蛋白质能够与一个结合伴侣或者多个结合伴侣进行结合。

[0100] 所述的功能性蛋白质可以是一种天然存在的或者非天然存在的蛋白质。

[0101] 所述的功能性蛋白质可以是经过重组表达的,遗传编码的,和/或经过翻译后的修饰的。所述的功能性蛋白质可以通过合成的方式被构建的。

[0102] 所述的功能性蛋白质可以是一种天然存在的蛋白质的变体。相对于所述的未变异的功能性蛋白质而言,所述的经过变异的功能性蛋白质能够保留不超过95%,90%,80%,75%,70%,60%,50%,40%,30%,25%,或者20%的核酸序列同一性或者氨基酸序列同一性。

[0103] 所述的功能性蛋白质可以是球状的,纤维状的,或者是多聚性的。所述的功能性蛋白质可以表现出折叠结构,并且可以表现出一级结构,二级结构,或者四级结构。

[0104] 所述的功能性蛋白质可以是一种配体,例如,是一种干扰素蛋白质,例如是干扰素(IFN)- α 蛋白质(2a型,2b型或者con 1型),干扰素(IFN)- β 蛋白质,干扰素(IFN)- γ 蛋白质,或者干扰素(IFN)- ω 蛋白质。所述的功能性蛋白质可以是一种可溶性的膜蛋白质,例如,是

一种可溶性的受体,例如是一种可溶性的Notch受体(例如是Notch 1,Notch 2,Notch 3,或者Notch 4受体)。

[0105] 所述的功能性蛋白质可以被设计成为仍然存在于细胞之外或者被设计成为能够在其未被掩蔽的状态下进行细胞的吸收。

[0106] 在所述的发明公开的范围之内所述的术语结合伴侣以及靶向是可以互换使用的。所述的功能性蛋白质所具有的结合伴侣可以是细胞外蛋白质,细胞内蛋白质,或者是一种跨膜蛋白质。在一种实施方式中所述的功能性蛋白质所具有的结合伴侣是一种细胞外蛋白质,例如是一种配体或者是一种可溶性的受体。在另外一种实施方式中所述的功能性蛋白质所具有的结合伴侣是一种细胞内蛋白质并且所述的功能性蛋白质可以被进行细胞吸收并且其被设计成为以一种未被掩蔽的方式进入细胞之中。在另外一种实施方式中,所述的功能性蛋白质所具有的结合伴侣是一种膜相关受体。

[0107] 范例性的结合伴侣/靶向是干扰素蛋白质受体,或者具体的是 α 干扰素受体(IFNAR), α 干扰素受体1(IFNAR1), α 干扰素受体2(IFNAR2),以及 λ 干扰素受体1(IFNLR1)。其他范例性的结合伴侣/靶向是Notch配体例如 δ 样配体1(DLL1), δ 样配体3(DLL3), δ 样配体4(DLL4),Jagged1,以及Jagged2。

[0108] 本发明中所述的一种功能性蛋白质能够与其靶向或者结合伴侣进行特异性的结合,其中所述的结合所具有的解离常数(K_d)不超过1000纳摩,100纳摩,50纳摩,10纳摩,5纳摩,1纳摩,500匹摩,400匹摩,350匹摩,300匹摩,250匹摩,200匹摩,150匹摩,100匹摩,50匹摩,25匹摩,10匹摩,5匹摩,1匹摩,.5匹摩,或者.1匹摩。

[0109] 在某些实施方式中所述的与一种肽掩蔽物进行偶联的功能性蛋白质并不是一种抗体或者抗体片段。

[0110] 在表格1中提供的是可以预期到的所述功能性蛋白质的范例性的来源,所述的功能性蛋白质用来生成干扰素相关性蛋白原。

[0111] 表格1:干扰素相关性蛋白原的范例性的来源

[0112]

聚乙二醇化的干扰素 λ
PEGASYS (聚乙二醇化的干扰素 α -2a)
聚乙二醇化的干扰素 (Rebetol)
Actimmune (干扰素 γ 1b)
Avonex (干扰素 β 1a)
Betaseron (干扰素 β 1b)
Rebif (干扰素 β 1a)
INTRONA (干扰素 α -2b)
PegIntron (聚乙二醇化的干扰素 α -2b)

[0113] 肽掩蔽物

[0114] 本发明公开提供了一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物(同样可以以交替互换的方式被称之为一种掩蔽肽或者一种掩蔽半族)进行了偶联,其中所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与一种结合伴侣之间进行的相互作用。所述的肽掩蔽物能够特异性的与所述的功能性蛋白质进行相互作用并且减少或者抑制发生在所述

的功能性蛋白质与其结合伴侣之间的所述的相互作用。

[0115] 当所述的功能性蛋白质处于一种“被掩蔽”的状态下时,即使在存在有一种所述的功能性蛋白质的结合伴侣的条件下,所述的肽掩蔽物能够干扰或者抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。然而,当所述的功能性蛋白质处于所述的未被掩蔽的状态下时,所述的肽掩蔽物对所述的功能性蛋白质与其靶向所进行的结合而产生的干扰作用被减小,从而允许所述的功能性蛋白质更多的接触所述的靶向并且提供了靶向的结合。

[0116] 例如,当所述的蛋白原包括一种可以活化的半族时,在存在酶的情况下,可以通过所述的可以活化的半族的切断,使所述的功能性蛋白处于未被掩蔽的状态,其中所述的酶优选的是一种疾病特异性酶。因此,所述的肽掩蔽物是这样的物质:当所述的蛋白原未被切断时,所述的肽掩蔽物能够提供对所述的功能性蛋白质的掩蔽,使其不能够进行靶向的结合,但是当所述的蛋白原处于一种被切断的构象中时,所述的肽掩蔽物不能够在本质上或者显著性的对所述的功能性蛋白质与所述的靶向进行的结合产生干扰或者竞争。因此,由所述的肽掩蔽物以及所述的可以活化的半族所组成的组合能够促进所述的可以切换的/可以活化的表型,当所述的蛋白原未被切断时利用所述的肽掩蔽物能够减少靶向的结合,并且所述的可以活化的半族的断裂能够提供增加的靶向结合,其中所述的可以活化的半族的断裂是通过蛋白酶来作用的。

[0117] 所述的肽掩蔽物所具有的结构性质可以根据各种不同的因素而发生变化,其中所述的因素例如是,为了干扰蛋白质与靶向的结合所需要的最小的氨基酸序列,所述的目标靶向蛋白-蛋白质结合对,所述的功能性蛋白质所具有的大小,所述的可以活化的半族所具有的长度,所述的可以活化的半族是否存在于所述的肽掩蔽物之中并且同样能够对存在于所述的未被切断的蛋白原之中的所述的功能性蛋白质进行掩蔽,所述的连接物的存在或者不存在,一种半胱氨酸的存在或者不存在,以及类似的因素,其中所述的半胱氨酸存在于所述的功能性蛋白质之中或者与所述的功能性蛋白质侧面相接,所述的半胱氨酸适于提供一种可以活化的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键半族。

[0118] 在一种实施方式中,所述的肽掩蔽物可以通过共价结合的方式与所述的功能性蛋白质进行偶联。在另外一种实施方式中,通过将所述的肽掩蔽物结合至所述的功能性蛋白质的N-末端的方式,阻止了所述的功能性蛋白质与其靶向所进行的结合。在另外一种实施方式中,所述的功能性蛋白质通过半胱氨酸-半胱氨酸二硫桥接与所述的肽掩蔽物进行了偶联,其中所述的半胱氨酸-半胱氨酸二硫桥接是存在于所述的肽掩蔽物以及所述的功能性蛋白质之间的。

[0119] 可以以各种不同的形式来提供所述的肽掩蔽物。可以从所述的功能性蛋白质所具有的已知的结合伴侣中选择所述的肽掩蔽物,只要所述的肽掩蔽物能够以相对于所述的靶向蛋白而言较低的亲和性和/或亲和力与所述的功能性蛋白质进行结合,在经过所述的可以活化的半族的断裂之后,能够降低所述的肽掩蔽物对靶向蛋白结合所产生的干扰作用,其中所述的功能性蛋白质已经被设计好能够与所述的靶向蛋白进行结合。换句话说,正如上文中所讨论的,所述的肽掩蔽物是这样的物质:当所述的蛋白原未被切断时,所述的肽掩蔽物能够提供对所述的功能性蛋白质的掩蔽,使其不能够进行靶向的结合,但是当所述的蛋白原处于一种被切断的构象中时,所述的肽掩蔽物不能够在本质上或者显著性的对所述的功能性蛋白质与所述的靶向进行的结合产生干扰或者竞争。

[0120] 一般而言,所述的肽掩蔽物对于所述的目标功能性蛋白质而言是唯一的。能够与所述的蛋白原所具有的所述的功能性蛋白质发生特异性的相互作用的范例性的肽掩蔽物包括那些被进行了特异性的筛选的肽掩蔽物,其能够与所述的功能性蛋白质或者蛋白质片段所具有的一个结合结构域进行结合。在本发明中提供了用以对肽掩蔽物进行筛选的方法,并且可以包括蛋白质展示方法,从而获得这样的肽掩蔽物,其对于所述的功能性蛋白质而言是唯一的并且能够与一种结合伴侣/靶向所具有的一个结合结构域进行特异性的和/或选择性的结合。

[0121] 本发明公开提供了肽掩蔽物,所述的肽掩蔽物能够特异性的抑制发生在所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间的相互作用。每一种肽掩蔽物对所述的功能性蛋白质具有某种程度的结合亲和力。通常情况下所述的结合亲和力低于存在于所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间的所述的结合亲和力。

[0122] 本发明公开中所述的肽掩蔽物通常情况下指的是一种氨基酸序列,所述的氨基酸序列与一种功能性蛋白质进行了偶联并且存在于一定的位置上,这样一来它能够降低所述的功能性蛋白质所具有的特异性的结合其结合伴侣的能力。在一些情形中所述的肽掩蔽物通过连接物的方式与所述的功能性蛋白质进行了偶联。

[0123] 当所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联时并且在存在其结合伴侣的情况下,所述的功能性蛋白质对其结合伴侣所具有的特异性的结合被减少或者被抑制,这是与没有结合一种肽掩蔽物的所述的功能性蛋白质所具有的特异性结合相比较而言的,或者与所述的母本蛋白质对其结合伴侣所具有的特异性的结合相比较而言的。当所述的功能性蛋白质同时与一种可以活化的半族以及一种肽掩蔽物进行了偶联并且在存在其结合伴侣但不存在足够的酶或者酶活性用以切断所述的可以活化的半族的情况下,所述的经过修饰的蛋白质对其结合伴侣所具有的特异性的结合被减少或者被抑制,这是与在下述的情况中所述的功能性蛋白质所具有的特异性结合相比较而言的:所述的功能性蛋白质与一种可以活化的半族以及一种肽掩蔽物进行了偶联,在存在其结合伴侣以及足够的酶/酶活性/还原试剂/还原试剂活性/光用以活化所述的可以活化的半族的情况下。

[0124] 所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够结合所述的功能性蛋白质所具有的结合结构域并且能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过空间的方式抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过变构的方式抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。

[0125] 正如本发明中所描述到的,当在体内进行测量或者在掩蔽效率检测(Mask Efficiency Assay)、体外免疫吸附检测中进行测量时,在至少2小时,4小时,6小时,8小时,12小时,28小时,24小时,30小时,36小时,48小时,60小时,72小时,84小时,96小时,或者5天,10天,15天,30天,45天,60天,90天,120天,150天,180天,或者1个月,2个月,3个月,4个月,5个月,6个月,7个月,8个月,9个月,10个月,11个月,12个月或者更长的时间内,当一种功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联并且在存在结合伴侣的情况下,没有发生所述的功能性蛋白质与所述的结合伴侣之间的结合或者本质上没有发生所述的功能性蛋白质与所述的结合伴侣之间的结合,或者不超过.001%,.01%,.1%,1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,或者50%的所述功能性蛋白质与所

述结合伴侣之间的结合,上述的结果是与下述的结合相比较而言的:没有与一种肽掩蔽物进行偶联的所述的功能性蛋白质所进行的结合,所述的母本蛋白质所进行的结合,或者没有一种肽掩蔽物与其结合伴侣进行偶联的所述的功能性蛋白质所进行的结合。

[0126] 所述的肽掩蔽物可以通过合成的方式制成的氨基酸串,所述的氨基酸串能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间的相互作用。所述的肽掩蔽物可以是一种连接物或者可以活化的半族中的一部分。在相关的实施方式中,可以通过对所述的肽掩蔽物所具有的对所述的功能性蛋白质的特异性的以及选择性的结合进行筛选,从而以一种没有偏见的方式对所述的肽掩蔽物进行筛选。

[0127] 在某些实施方式中,所述的肽掩蔽物中可以含有至少一部分的或者完整的氨基酸序列,其中所述的氨基酸序列是所述的功能性蛋白质的一种天然存在的结合伴侣所具有的。所述的肽掩蔽物可以是一种天然存在的结合伴侣所具有的一个片段。所述的片段可以保留不超过95%,90%,80%,75%,70%,60%,50%,40%,30%,25%,或者20%的核酸序列同一性或者氨基酸序列同一性,其中所述的序列同一性是相对于所述的天然存在的结合伴侣而言的。

[0128] 在一些情形中所述的肽掩蔽物具有一种并不是天然存在的氨基酸序列或者并不含有一种天然存在的结合伴侣或者靶向蛋白所具有的氨基酸序列。在某些实施方式中所述的肽掩蔽物并不是所述的功能性蛋白质所具有的一种天然的结合伴侣。所述的肽掩蔽物可以是一种经过修饰的所述的功能性蛋白质的结合伴侣,其中含有氨基酸的改变,所述的改变至少轻微的降低了对所述的功能性蛋白质的结合亲和性和/或亲和力。在一些实施方式中所述的肽掩蔽物并不含有或者本质上不含有与所述的功能性蛋白质的天然结合伴侣相比而言的核酸同一性或者氨基酸同一性。在其他的实施方式中所述的肽掩蔽物与所述的功能性蛋白质所具有的天然结合伴侣相比而言具有不超过5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,或者80%的相似度。

[0129] 本发明公开同样提供了一种给定的肽掩蔽物的变体。所述的肽掩蔽物所具有的序列可以是存在变化的,从而保留了与所述的肽掩蔽物相比至少95%,90%,80%,75%,70%,60%,50%,40%,30%,25%,或者20%的核酸序列同一性或者氨基酸序列同一性。这样的序列变化能够提供一种改进的掩蔽能力。

[0130] 正如在本发明公开的实施例部分中所描述到的,可以通过一项掩蔽效率检测(Masking Efficiency Assay)、使用一种体外的免疫吸附检测对当发生偶联时所述的肽掩蔽物所具有的抑制所述的功能性蛋白质与其靶向进行结合的效率进行测量。通过至少两个参数可以确定出肽掩蔽物所具有的掩蔽效率:所述的肽掩蔽物对所述的功能性蛋白质所具有的亲和力以及所述的肽掩蔽物相对于所述的功能性蛋白质所具有的结合界面而言的空间关系,其中所述的结合界面指的是针对其靶向的结合界面。

[0131] 关于亲和力,举个例子,一种肽掩蔽物可能具有高度的亲和力但是只能够在一定程度上对存在于所述的功能性蛋白质之上的结合位点进行抑制,而另外一种肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质而言可能具有一种较低的亲和力但是能够完全抑制靶向的结合。在短时间段内,所述的较低亲和力的肽掩蔽物可能表现出足够的掩蔽作用;相反的,随着时间的推移,上述的肽掩蔽物可能会被所述的靶向进行替代(这归因于对所述的功能性蛋白质没有足够的亲和力)。

[0132] 以一种类似的方式,具有相同的亲和力的两种肽掩蔽物可能表现出不同程度的掩蔽作用,这取决于它们促进存在于所述的功能性蛋白质之上的所述结合位点的抑制作用的良好程度或者防止所述的功能性蛋白质与其结合伴侣进行结合的良好程度。在另外一个例子中,一种具有高度亲和力的肽掩蔽物能够与所述的功能性蛋白质进行结合并且改变所述的功能性蛋白质所具有的结构,这样一来所述的功能性蛋白质与其靶向之间的结合被进行了完全的抑制,而另外一种具有高度亲和力的肽掩蔽物可能仅仅在一定程度上对结合进行抑制。作为结果,对一种有效的肽掩蔽物的发现通常并不仅仅依据亲和力,同样可以包括一种掩蔽效率的经验性的测量。可以对在所述的功能性蛋白质中发生的所述的肽掩蔽物的时间依赖性的靶向取代作用进行测量,用以对肽掩蔽物进行最优化以及筛选。在本发明中会描述到一种用于这一目的的新颖的掩蔽效率检测(Masking Efficiency Assay)。

[0133] 可以对一种肽掩蔽物进行识别并且进一步的对其进行最优化处理,其中所述的识别以及最优化处理是经由一种筛选步骤来进行的,所述的筛选是在一个具有各种各样的肽掩蔽物的备选蛋白原文库中进行的。例如,可以对一种功能性蛋白质以及可以活化的半族进行筛选,从而提供一种期望的酶/靶向的组合,并且可以通过在下文中描述的所述的筛选步骤对所述的肽掩蔽物所具有的氨基酸序列进行识别,从而识别出一种能够提供可以切换的表型的肽掩蔽物。例如,可以在本发明公开的所述的筛选方法中使用一种随机的肽文库(例如,从至少2个氨基酸到至少40个氨基酸或者更多),用以识别出一种适合的肽掩蔽物。在具体的实施方式中,可以经由一种筛选步骤来识别出对于一种功能性蛋白质而言具有特异性的结合亲和力的肽掩蔽物,其中所述的筛选步骤包括:提供一个由备选的肽掩蔽物构成的肽支架文库,其中每一个支架是由一个跨膜蛋白以及所述的备选的肽掩蔽物所组成的。在此之后将所述的文库与一个完整的蛋白质或者一个蛋白质的一部分进行接触,并且对具有可以检测到的结合蛋白的一种或者多种备选的肽掩蔽物进行识别,其中所述的蛋白质例如是一种具有完整长度的蛋白质,一种天然存在的蛋白质片段,或者是一种非天然存在的含有蛋白质的片段(同样能够与所述的目标结合伴侣进行结合)。筛选可以包括不止一轮的磁激活的细胞分选术(MACS)或者荧光激活的细胞分选术(FACS)。筛选同样可以包括对所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的解离常数(K_d)所进行的测定以及随后的对所述的掩蔽效率所进行的测定。

[0134] 通过这种方式,可以对含有一种肽掩蔽物的蛋白原进行识别,并且可以进一步的提供提供对于一种蛋白原的选择,所述的蛋白原对于所述的可以切换的表型而言具有一种最佳的动态范围,其中所述的肽掩蔽物在处于一种未被活化的状态下时能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合,并且在处于一种被活化的状态下时允许所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间进行结合。用以筛选蛋白原的方法将在本发明中被进行更为详细的描述,其中所述的蛋白原具有一种期望的可以切换的表型。或者可供选择的,所述的肽掩蔽物可能并不会与所述的功能性蛋白质进行特异性的结合,而是经由一种非特异性的相互作用的方式干扰蛋白质-结合伴侣之间的结合,其中所述的非特异性的相互作用方式例如是空间位阻。例如,可以将所述的肽掩蔽物放置于所述的未被切断的蛋白原之中,这样一来所述的蛋白原所具有的三级结构或者四级结构能够允许所述的肽掩蔽物经由基于电荷的相互作用对所述的功能性蛋白质进行掩蔽,从而将所述的肽掩蔽物保留在原位用以干扰结合伴侣与所述的功能性蛋白质的接触。

[0135] 为了促进所述的可以切换的表型的形成,蛋白原同样可以以一种构象限制的结构被进行提供,例如是一种环形的结构。这可以通过将一对半胱氨酸容纳在所述的蛋白原构建体中的方式来实现,这样一来存在于所述的半胱氨酸对之间的一个二硫键的形成能够将所述的蛋白原放置在一种圆环的结构或者环形的结构之中。因此所述的蛋白原仍然能够被所期望的蛋白酶进行切断从而提供对所述的功能性蛋白质的靶向结合的抑制作用。通过所述的可以活化的半胱氨酸的活化作用,所述的环形结构被打开,允许结合伴侣与所述的功能性蛋白质进行接触。

[0136] 所述的半胱氨酸对可以以任意的位点存在于所述的蛋白原之中,其中所述的位点能够提供一种构象限制的蛋白原,但是,在经过了可以活化的半胱氨酸的还原之后,不能够在本质上或者显著性的干扰靶向与所述的功能性蛋白质所进行的结合。例如,所述的半胱氨酸对所具有的半胱氨酸残基可以存在于所述的肽掩蔽物之中以及一个连接物之中,其中所述的连接物与所述的肽掩蔽物以及蛋白质进行了侧面的连接,存在于一个连接物之内,其中所述的连接物与所述的肽掩蔽物以及蛋白质进行了侧面的连接,或者其他适合的构象。例如,所述的肽掩蔽物或者与一种肽掩蔽物进行了侧面的连接,连接物中可以包括一个或者多个半胱氨酸残基,当所述的蛋白原处于一种折叠的状态下时,所述的半胱氨酸残基与另外一个半胱氨酸残基形成了一个二硫桥接,其中所述的另外一个半胱氨酸残基存在于所述的肽掩蔽物的相对位置上。通常情况下令人期望的是,所述的半胱氨酸对所具有的半胱氨酸残基存在于所述的功能性蛋白质以外的位置上,其结果是在经过了所述的蛋白原的断裂之后能够避免对靶向的结合产生干扰。当所述的半胱氨酸对所具有的半胱氨酸以二硫键结合的形式存在于所述的功能性蛋白质之内时,令人期望的是在被暴露于一种还原试剂之中时,能够避免对蛋白质-靶向的结合产生干扰作用。

[0137] 在某些实施方式中,一旦一种可以活化的蛋白原被进行了活化,所述的肽掩蔽物从所述的功能性蛋白质上发生了解偶联,借以对所述的功能性蛋白质解除了掩蔽。在一些实施方式中,一旦从所述的功能性蛋白质上发生了解偶联并且处于一种游离的状态下时,所述的肽具有生物学活性或者一种治疗作用,例如结合能力。例如,所述的游离的肽能够与所述的相同的或者不同的结合伴侣进行结合。在某些实施方式中所述的游离的肽掩蔽物(未进行偶联的肽掩蔽物)能够发挥一种治疗作用,向本发明中所述的组合物提供一种次级功能。

[0138] 本发明公开所预期到的所述的肽掩蔽物可以存在于1-50个氨基酸的范围之内;在一些情形中至少多于3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个,10个,12个,15个,20个,30个,或者40个氨基酸,或者不超过40个,30个,20个,15个,12个,10个,9个,8个,7个,6个,5个,4个,或者3个氨基酸。在具体的实施方式中本发明中所述的肽掩蔽物具有8-15个氨基酸的长度。

[0139] 本发明中所述的肽掩蔽物可以含有遗传编码性氨基酸或者遗传非编码性氨基酸。遗传非编码性氨基酸的例子是但不局限于D-氨基酸, β -氨基酸,以及 γ -氨基酸。在具体的实施方式中,所述的肽掩蔽物中含有不超过50%,40%,30%,20%,15%,10%,5%或者1%的遗传非编码性氨基酸。

[0140] 当与一种肽掩蔽物进行偶联时,所述的功能性蛋白质针对所述的靶向或者结合伴侣所具有的解离常数(K_d)可以高至少5倍,10倍,25倍,50倍,100倍,250倍,500倍,1000倍,2500倍,5000倍,10000倍,50000倍,100000倍,500000倍,1000000倍,5000000倍,10000000倍

倍,50000000倍或者更高的倍数,或者5-10倍,10-100倍,10-1000倍,10-10000倍,10-100000倍,10-1000000倍,10-10000000倍,10-100000000倍,100-1000倍,100-10000倍,100-100000倍,100-1000000倍,100-10000000倍,1000-10000倍,1000-100000倍,10000-1000000倍,1000-10000000倍,10000-1000000倍,10000-10000000倍,10000-100000000倍,100000-10000000倍,或者100000-100000000倍,其中所述的倍数是相对于没有与一种肽掩蔽物进行偶联时所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的解离常数或者所述的母本蛋白所具有的解离常数。相反的,当与一种肽掩蔽物进行偶联时,所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的结合亲和力可以低至少5倍,10倍,25倍,50倍,100倍,250倍,500倍,1000倍,2500倍,5000倍,10000倍,50000倍,100000倍,500000倍,1000000倍,5000000倍,10000000倍,50000000倍或者更高的倍数,或者5-10倍,10-100倍,10-1000倍,10-10000倍,10-100000倍,10-1000000倍,10-10000000倍,100-1000倍,100-10000倍,100-100000倍,100-1000000倍,100-10000000倍,1000-10000倍,1000-100000倍,10000-1000000倍,1000-10000000倍,10000-1000000倍,10000-10000000倍,10000-100000000倍,100000-10000000倍,或者100000-100000000倍,其中所述的倍数是相对于没有与一种肽掩蔽物进行偶联时所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的结合亲和力。

[0141] 通常情况下,所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的解离常数高于所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的解离常数。所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的解离常数可以高于所述的功能性蛋白质针对其结合蛋白所具有的解离常数的至少5倍,10倍,25倍,50倍,100倍,250倍,500倍,1000倍,2500倍,5000倍,10000倍,100000倍,1000000倍或者甚至100000000倍。相反的,通常情况下,所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的结合亲和力低于所述的功能性蛋白质针对其结合伴侣所具有的结合亲和力。所述的肽掩蔽物针对所述的功能性蛋白质所具有的结合亲和力可以低于所述的功能性蛋白质针对其结合蛋白所具有的结合亲和力的至少5倍,10倍,25倍,50倍,100倍,250倍,500倍,1000倍,2500倍,5000倍,10000倍,100000倍,1000000倍或者甚至100000000倍。

[0142] 正如本发明中所描述到的,当在体内进行测量或者在掩蔽效率检测(Mask Efficiency Assay)、体外免疫吸附检测中进行测量时,在至少2小时,4小时,6小时,8小时,12小时,28小时,24小时,30小时,36小时,48小时,60小时,72小时,84小时,96小时,或者5天,10天,15天,30天,45天,60天,90天,120天,150天,180天,或者1个月,2个月,3个月,4个月,5个月,6个月,7个月,8个月,9个月,10个月,11个月,12个月或者更长的时间内,当所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联并且在存在所述的结合伴侣的情况下,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣之间所进行的特异性的结合被进行了减少或者抑制,这种减少或者抑制是相比较于没有与一种肽掩蔽物进行偶联的所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合而言的。当与没有与一种肽掩蔽物进行偶联的所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合相比较时,在与一种肽掩蔽物进行偶联的情况中,所述的功能性蛋白质所具有的结合所述的结合伴侣的能力可能被降低了至少50%,60%,70%,80%,90%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%并且甚至是100%。

[0143] 所述的肽掩蔽物能够抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够结合所述的功能性蛋白质所具有的一个结合结构域并且抑制所述的功能

性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过空间的方式干扰所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。所述的肽掩蔽物能够通过变构的方式来抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合。在这些实施方式中,正如本发明中所描述到的,当在体内进行测量或者在掩蔽效率检测 (Mask Efficiency Assay) 中进行测量时,在至少2小时,4小时,6小时,8小时,12小时,28小时,24小时,30小时,36小时,48小时,60小时,72小时,84小时,96小时,或者5天,10天,15天,30天,45天,60天,90天,120天,150天,180天,或者1个月,2个月,3个月,4个月,5个月,6个月,7个月,8个月,9个月,10个月,11个月,12个月或者更长的时间内,当所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联并且在存在结合伴侣的情况下,没有发生所述的功能性蛋白质与所述的结合伴侣之间的结合或者本质上没有发生所述的功能性蛋白质与所述的结合伴侣之间的结合,或者不超过.001%,.01%,.1%,1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,或者50%的所述功能性蛋白质与所述结合伴侣之间的结合,上述的结果是与下述的结合相比较而言的:没有与一种肽掩蔽物进行偶联的所述的功能性蛋白质所进行的结合,或者没有一种肽掩蔽物与其结合伴侣进行偶联的所述的功能性蛋白质所进行的结合。

[0144] 当一种功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联时,所述的肽掩蔽物能够“掩蔽”或者减少,或者抑制所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的特异性的结合。当一种功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联时,这样的偶联或者修饰作用能够导致一种结构的变化,这种结构的变化能够降低或者抑制所述的功能性蛋白质所具有的特异性的结合其结合伴侣的能力。

[0145] 可以通过下述的结构式(从一个氨基(N)末端到一个羧基(C)末端的顺序)来表示一种功能性蛋白质,其中所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联。正如在所述的结构式中所描述的,进一步的令人期望的是向所述的组合物中插入一个或者多个连接物,例如,有弹性的连接物,用以提供增加的弹性。

[0146] (肽掩蔽物)-(功能性蛋白质)

[0147] (功能性蛋白质)-(肽掩蔽物)

[0148] (肽掩蔽物)-(连接物)-(功能性蛋白质)

[0149] (功能性蛋白质)-(连接物)-(肽掩蔽物)

[0150] 范例性的肽掩蔽物可以含有在表格3以及表格14中列出的序列。本发明中所述的一种肽掩蔽物中可以含有这样的序列,所述的序列选自在表格3中列出的那些,或者所述的序列与表格3中列出的那些至少具有20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或者95%的同一性。本发明中所述的一种肽掩蔽物中可以含有这样的序列,所述的序列选自在表格14中列出的那些,或者所述的序列与表格14中列出的那些至少具有20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或者95%的同一性。

[0151] 一种范例性的肽掩蔽物中可以含有下述的保守序列TDVDYYREWXXXXXXXXXX。

[0152] 其他的范例性的肽掩蔽物可以对一种干扰素蛋白具有特异性,其中所述的干扰素蛋白例如是干扰素 (IFN)- α 蛋白质 (2a型,2b型或者con1型),干扰素 (IFN)- β 蛋白质,干扰素 (IFN)- γ 蛋白质,或者干扰素 (IFN)- ω 蛋白质。其他的范例性的肽掩蔽物可以对一种Notch受体具有特异性,其中所述的Notch受体例如是Notch 1,Notch 2,Notch 3,或者Notch 4受体。

[0153] 可以活化的半族

[0154] 本发明提供了同时含有一种肽掩蔽物以及一种可以活化的半族或者结构域的可以活化的蛋白原,其中所述的肽掩蔽物以及可以活化的半族或者结构域能够对所述的蛋白原所具有的与其结合伴侣进行结合的能力进行调节。这样的组合物被称之为可以活化的蛋白原。

[0155] 可以活化的指的是当以一种天然的状态(例如,未被切断的状态)(即,第一种构象)存在时,所述的蛋白原能够表现出第一种水平的与一种结合伴侣所进行的结合,并且当处于所述的被活化的状态下时(例如,被切断的状态)(即,第二种构象)能够表现出第二种水平的与一种结合伴侣所进行的结合。所述的第二种水平的结合高于所述的第一种水平的结合。

[0156] 例如,一种蛋白原可以包括一种具有完整长度的蛋白质或者是上述蛋白质的功能性片段,一种肽掩蔽物以及一种可以活化的半族,其中所述的肽掩蔽物以及可以活化的半族能够对所述的功能性蛋白质所具有的结合其靶向或者结合伴侣的能力进行调节。所述的可以活化的半族可以是一种可以切断的连接物。在这样的一个例子中,当处于一种未被切断的状态下时,所述的功能性蛋白质与所述的肽掩蔽物进行了偶联并且所述的肽掩蔽物能够干扰所述的功能性蛋白质所具有的与其结合伴侣进行结合的能力,但是当处于一种被切断的状态下时,所述的功能性蛋白质未进行偶联并且所述的功能性蛋白质能够与其结合伴侣之间进行相互作用。在本发明中描述了用以筛选酶的底物的方法,其中所述的底物可以被用来作为依据本发明所述的可以切断的连接物。

[0157] 本发明公开中所述的可以切断的连接物可以包括一种氨基酸序列,其中所述的氨基酸序列可以作为一种蛋白酶、还原酶、或者光解作用的底物。所述的可以切断的连接物存在于所述的被掩蔽的功能性蛋白质之中,这样一来,在存在有一种结合伴侣的情况下,当所述的连接物被例如一种酶或者蛋白酶切断从而产生一种被切断的状态时,所述的功能性蛋白质能够与所述的结合伴侣进行结合,并且当处于一种未被切断的状态下时,在存在有所述的结合伴侣的情况下,所述的功能性蛋白质与其结合伴侣所进行的结合被所述的肽掩蔽物进行了抑制。应当被注意到的是,所述的可以切断的连接物所具有的氨基酸序列可能与所述的肽掩蔽物之间存在重叠或者被包含在所述的肽掩蔽物之中,这样一来当所述的蛋白原处于一种未被切断的构象下时,所述的可以切断的连接物的整体或者一部分能够促进所述的功能性蛋白质的“掩蔽”。

[0158] 一般而言,在存在一种能够切断所述的可以切断的连接物的酶的条件下,结合伴侣与所述的功能性蛋白质所进行的接触要高于不存在这样一种酶的条件下的情形。因此,当处于所述的天然状态或者未被切断的状态下时所述的蛋白原被阻止了与其伴侣所进行的结合(即,所述的第一种构象是,其能够干扰所述的结合伴侣与所述的蛋白原所进行的接触),并且当处于所述的被切断的状态下时所述的功能性蛋白质没有受到掩蔽从而能够与其伴侣进行结合。

[0159] 可以根据蛋白酶来对所述的可以活化的半族进行选择,其中所述的蛋白酶是与所述的功能性蛋白质所具有的期望的结合伴侣共同存在于组织之中的蛋白酶。各种各样不同的病症是已知的,在所述的病症中一种目标结合伴侣与一种蛋白酶共同存在,其中所述的蛋白酶所具有的底物是本领域已知的。在癌症的例子中,所述的结合伴侣组织可以是一种

癌性的组织,特别是一种实体肿瘤的癌性组织。在文献中已经报道了在各种各样的癌症中具有已知底物的升高水平的蛋白酶,其中所述的癌症例如是实体肿瘤。参见,例如,La Rocca等人(于2004年)在British J.of Cancer《英国癌症杂志》90(7):1414-1421中发表的文章。疾病的非限制性的例子包括:所有类型的癌症(乳腺癌,肺癌,结肠直肠癌,前列腺癌,脑癌以及颈癌,胰腺癌,等等),风湿性关节炎,克罗恩氏病,恶性黑素瘤,系统性红斑狼疮(SLE),心脏血管损伤,局部缺血,等等。此外,抗血管再生靶向,例如血管内皮生长因子(VEGF),是已知的。这样一来,当所述的功能性蛋白质被选定并且其能够与一种抗血管再生靶向进行结合时,一种适合的可以活化的半族将是这样的半族:所述的半族包括一种肽底物,所述的肽底物能够被一种存在于所述的癌性治疗位点上的蛋白酶切断,特别是以升高的水平存在于所述的癌性治疗位点上的蛋白酶,这种升高的水平是相比较于非癌性组织而言的,其中所述的抗血管再生靶向例如是Notch 1。在一种范例性的实施方式中,一种功能性蛋白质能够与一种干扰素受体进行结合并且所述的可以活化的半族可以是一种基质金属蛋白酶(MMP)底物,并且因此能够被一种基质金属蛋白酶(MMP)进行切断。在其他的实施方式中,所述的功能性蛋白质能够与一种目标靶向进行结合并且所述的可以活化的半族可以是,例如,天冬酰胺肽链内切酶legumain,血纤维蛋白溶酶,蛋白质裂解酶,丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶,跨膜丝氨酸蛋白酶II-3/4(TMPRSS-3/4),基质金属蛋白酶-9(MMP-9),膜型1-基质金属蛋白酶(MT1-MMP),组织蛋白酶,人类嗜中性粒细胞弹性蛋白酶, β -分泌酶,尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA),或者前列腺特异性抗原(PSA)酶。在其他的实施方式中,在除了癌症之外的疾病中,所述的蛋白原是通过其他的疾病特异性蛋白酶而被活化的,其中所述的除了癌症之外的疾病例如是丙型肝炎。

[0160] 所述的未被修饰的或者未被切断的可以活化的半族能够允许对所述的功能性蛋白质进行有效的抑制或者掩蔽,所述的抑制或者掩蔽是通过将所述的肽掩蔽物栓在所述的功能性蛋白质之上的方式来实现的。当所述的可以活化的半族被进行了修饰(切断,还原,光解)时,所述的功能性蛋白质不再受到抑制或者解除了掩蔽并且能够与其结合伴侣进行结合。

[0161] 可以通过一种试剂(即,酶,还原试剂,光)对所述的可以活化的半族进行特异性的修饰(切断,还原或者光解),其中所述的修饰作用是以大约 $0.001-1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的速率进行的,或者是以至少0.001,0.005,0.01,0.05,0.1,0.5,1,2.5,5,7.5,10,15,20,25,50,75,100,125,150,200,250,500,750,1000,1250,或者 $1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的速率进行的。

[0162] 为了利用一种酶进行特异性的切断,将所述的酶与可以活化的半族进行接触。当所述的蛋白原中包括一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物以及一种可以活化的半族进行了偶联,并且在存在有靶向以及足够的酶活性的条件下时,所述的可以活化的半族能够被切断。足够的酶活性指的是所述的酶所具有的与所述的可以活化的半族进行接触并且实现切断的能力。可以容易的设想到的是,一种酶可能存在于所述的可以活化的半族的附近但是却不能够进行切断,这是因为其他的细胞因素或者所述的酶所具有的蛋白质修饰作用。

[0163] 范例性的底物可以包括但不局限于那些能够被表格2中所列出的一种或者多种下述的酶或者蛋白酶进行切断的底物。

[0164] 表格2-范例性的酶/蛋白酶

[0165]

解整合素样金属肽酶 (ADAM) 10	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 8	组织蛋白酶 (Cathepsin) S	基质金属蛋白酶 (MMP) 8
解整合素样金属肽酶 (ADAM) 12	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 9	Fas 相关磷酸酯酶 (FAP)	基质金属蛋白酶 (MMP) 9
解整合素样金属肽酶 (ADAM) 17	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 10	端粒酶 B	基质金属蛋白酶 (MMP) -13
血管性血友病因子裂解酶 (ADAMTS)	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 11	Guanidinobenzoatase (GB)	基质金属蛋白酶 (MMP) 14
血管性血友病因子裂解酶 (ADAMTS) 5	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 12	丝氨酸蛋白酶 (Hepsin)	膜型-丝氨酸蛋白酶 (MT-SP1)
β 分泌酶 (BACE)	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 13	人类嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE)	脑啡肽酶 (Neprilysin)
半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspases)	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 14	天冬酰胺肽链内切酶 (Legumain)	丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4 丝氨酸蛋白酶
半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 1	组织蛋白酶 (Cathepsins)	蛋白质裂解酶 2 (Matriptase 2)	血纤维蛋白溶酶 (Plasmin)

[0166]	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 2	组织蛋白酶 (Cathepsin) A	内肽酶 (Meprin)	前列腺特异性抗原 (PSA) 酶
	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 3	组织蛋白酶 (Cathepsin) B	基质金属蛋白酶 (MMP) 1	前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 酶
	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 4	组织蛋白酶 (Cathepsin) D	基质金属蛋白酶 (MMP) 2	肿瘤坏死因子 α 转化酶 (TACE)
	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 5	组织蛋白酶 (Cathepsin) E	基质金属蛋白酶 (MMP) 3	跨膜丝氨酸蛋白酶 II-3/4 (TMPRSS-3/4)
	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 6	组织蛋白酶 (Cathepsin) K	基质金属蛋白酶 (MMP) 7	尿激酶型纤溶酶原激活剂 (uPA)
	半胱氨酸天冬氨酸特异性酶 (Caspase) 7	膜型 1-基质金属蛋白酶 (MT1-MMP)	Neurosin	钙蛋白酶 (calpain)
	组织多肽抗原酶 (tPA)	丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4A 丝氨酸蛋白酶		

[0167] 在表格11以及表格12中表示的是用于特异性的酶的范例性的保守序列。在一种实施方式中对于一种蛋白质裂解酶底物而言所述的保守序列包括XXQAR (A/V) X或者AGPR。在另外一种实施方式中对于一种丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4A丝氨酸蛋白酶底物而言所述的保守序列包括DEXXXC (A/S) 或者DLXXXT (A/S)。

[0168] 在一种实施方式中对于一种基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 底物而言所述的序列是VHMPLGFLGP。在另外一种实施方式中对于一种血纤维蛋白溶酶底物而言所述的序列是QGPMFKSLWD。

[0169] 对蛋白原及其组分的识别以及最优化

[0170] 用以对蛋白原及其组分进行识别和/或最优化的方法,以及能够有效的用于这样的方法之中的组合物,在下文中被进行了描述。

[0171] 备选的蛋白原及其组分的文库,以及在可以复制的生物学实体上的展示

[0172] 一般而言,所述的用以识别一种蛋白原及其组分和/或用以最优化一种蛋白原的可以活化的表型的筛选方法包括制造一种可以复制的生物学实体(其例如是细胞)的文库,其中所述的生物学实体能够在它们的表面上展示大量不同的备选蛋白原,其中所述的蛋白原组分例如是所述的肽掩蔽物/肽以及所述的可以切断的连接物。在此之后可以将这样的文库应用到所述的筛选方法中用以识别备选的蛋白原以及组分,其中所述的蛋白原及其组分具有一种蛋白原及其组分所具有的一种或者多种期望的特征。

[0173] 所述的备选蛋白原文库中可以含有备选的蛋白原,其中所述的备选蛋白原之间的

差异可以存在于下述的一种或者多种之中：所述的肽掩蔽物，连接物（其可以是所述的肽掩蔽物中的一部分），可以切断的连接物（其可以是所述的肽掩蔽物中的一部分），以及蛋白质。为了对备选的肽掩蔽物或者肽进行识别，存在于所述的文库之中的所述备选的蛋白原对于所述的肽掩蔽物和/或所述的连接物而言可以是存在变化的。

[0174] 适合的可以复制的生物学实体包括细胞（例如，细菌（例如，大肠杆菌），酵母（例如，酿酒酵母），哺乳动物细胞），抗菌素，以及病毒。细菌性宿主细胞以及抗菌素，特别是细菌性宿主细胞，是令人感兴趣的。

[0175] 使用可以复制的生物学实体的各种不同的展示技术是本领域内已知的。这些方法以及实体包括，但不局限于，展示方法例如mRNA以及核糖体展示，真核病毒展示，以及噬菌体、细菌、酵母、以及哺乳动物细胞表面展示。参见Wilson, D. S. 等人于2001年在PNAS USA《美国科学院院刊》98 (7) : 3750-3755中发表的文章；Muller, O. J. 等人（于2003年）在Nat. Biotechnol.《自然生物技术》3: 312中发表的文章；Bupp, K. 以及M. J. Roth（于2002年）在Mol. Ther.《分子治疗学》5 (3) : 3293513中发表的文章；Georgiou, G. 等人（于1997年）在Nat. Biotechnol.《自然生物技术》15 (1) : 293414中发表的文章；以及Boder, E. T. 和K. D. Wittrup（于1997年）在Nature Biotech.《自然生物技术》15 (6) : 553557中发表的文章。表面展示技术是具有吸引力的，因为它们能够应用荧光激活的细胞分选技术（FACS）用以进行文库的分析以及筛选。参见Daugherty, P. S. 等人（于2000年）在J. Immunol. Methods《免疫学方法杂志》243 (12) : 211 2716中发表的文章；Georgiou, G.（于2000年）在Adv. Protein Chem.《高级蛋白质化学》55: 293315中发表的文章；Daugherty, P. S. 等人（于2000年）在PNAS USA《美国科学院院刊》97 (5) : 20293418中发表的文章；Olsen, M. J. 等人（于2003年）在Methods Mol. Biol.《分子生物学方法》230: 329 342中发表的文章；Boder, E. T. 等人（于2000年）在PNAS USA《美国科学院院刊》97 (20) : 10701 10705中发表的文章；Mattheakis, L. C. 等人（于1994年）在PNAS USA《美国科学院院刊》91 (19) : 9022 9026中发表的文章；以及Shusta, E. V. 等人（于1999年）在Curr. Opin. Biotech.《生物技术当代观点》10 (2) : 117 122中发表的文章。范例性的噬菌体展示以及细胞展示组合物以及方法在下述的美国专利中被进行了描述：Nos. 5223409; 5403484; 7118879; 6979538; 7208293; 5571698; 以及5837500。可以被用来识别一种肽的其他的展示方法在美国专利No. 7256038中被进行了描述，上述公开物中的全部内容在本发明中被引入作为参考，其中所述的肽能够与一种目标生物学靶向进行结合。

[0176] 任选的，所述的展示骨架可以包括一个蛋白酶切断位点（不同于所述的可以切断的连接物所具有的蛋白酶切断位点），从而允许将一种蛋白原或者备选蛋白原从一种宿主细胞的表面上切断。

[0177] 用以制备一种蛋白原文库和/或备选蛋白原文库的方法包括：(a) 按照下文中的描述构建一组重组的DNA载体，其中所述的DNA载体能够编码大量的蛋白原和/或备选蛋白原；(b) 利用步骤(a)中所述的载体对宿主细胞进行转化；并且(c) 在适宜所述的融合多肽进行表达以及展示的条件下对在步骤(b)中被转化的所述的宿主细胞进行培养。

[0178] 编码备选蛋白原以及备选蛋白原组分的构建体

[0179] 本发明公开进一步的提供了载体以及核酸构建体，其中所述的载体以及核酸构建体包括用于编码蛋白原和/或备选蛋白原的序列。适合的核酸构建体包括，但不局限于，能

够在原核细胞或者真核细胞中进行表达的构建体。通常情况下,只要表达构建体能够与它们所要使用的所述的宿主细胞具有相容性,就可以对其进行选择。在某些实施方式中,所述的载体能够编码一种蛋白质以及一种肽掩蔽物或者一种蛋白质,一种肽掩蔽物,以及一种可以切断的连接物。

[0180] 例如,非病毒构建体载体和/或病毒构建体载体是可以被制备并且进行使用的,所述的构建体载体能够提供蛋白原的复制-或者编码备选蛋白原的DNA的复制和/或在一种宿主细胞中的表达,其中所述的非病毒构建体载体和/或病毒构建体载体包括质粒。对所述的载体所进行的选择将取决于所述的细胞类型以及所述的繁殖目的,其中在所述的细胞中繁殖作用是期望的。某些构建体能够有效的用于进行扩增并且制备大量所期望的DNA序列。其他的载体是适合于在培养的细胞中进行表达的载体。对所述的适宜的载体所进行的选择是本领域技术人员所熟知的。许多这样的载体是可以通过商业购买获得的。可以使用本领域所熟知的方法来实现用以生成构建体的方法。

[0181] 为了实现在一种宿主细胞中的表达,编码一种蛋白原或者备选蛋白原的所述的多核苷酸与一种调控序列进行了可操作性的连接,其中所述的调控序列适于促进所期望的表达特性。这样的调控序列可以包括启动子,增强子,终止子,运算子,阻遏物,以及诱导物。表达构建体在通常情况下同样能够提供一种转录以及翻译起始区域,这种区域可能是需要的或者是期望的,所述的区域可以是诱导的或者可以构建的,其中所述的编码区域进行了可操作性的连接,受到所述的转录起始区域所进行的转录控制,所述的表达构建体同样能够提供一种转录以及翻译终止区域。这样的控制区域可以是天然存在于所述的物种之中的,或者可以来自于外源性的来源,其中所述的物种是获得所述的核酸的物种。

[0182] 构建体,包括表达构建体,同样可以包括一种可选择性的标记物,其中所述的可选择性的标记物是在所述的宿主中运作的,用以促进,例如,含有所述的目标构建体的宿主细胞的生长。这样的可选择性的标记物基因能够提供一种表型特性,用以对被转化的宿主细胞进行筛选,其中所述的表型特性例如是对于真核细胞培养而言所具有的二氢叶酸还原酶或者新霉素抗性。

[0183] 用以编码备选蛋白质的核酸序列的制备

[0184] 可以使用本领域中已知的方法来实现备选蛋白原的制备,其中所述的备选蛋白原是被用在所述的筛选方法之中的。多肽展示,单链抗体展示,抗体展示以及抗体片段展示是本领域内熟知的方法。一般而言,对一种蛋白原中所具有的一个组分所进行的选择是随机的,其中所述的组分例如是肽掩蔽物,所述的组分在所述的备选蛋白原文库中是存在各种变化的。存在于所述的文库之中的所述的备选蛋白原可以是完全随机的,一定程度上随机的或者在它们的随机性方面存在着偏向性,例如,通常情况下在核苷/残基频率方面或者在氨基酸存在于一种组分之中的位置方面。例如,所述的蛋白原组分(例如,备选的肽掩蔽物)可以是在一定程度上随机的,从而在一个被选定的位置上只能提供一种氨基酸子集(例如,在存在于所述的氨基酸序列之中的被选定的位置上提供一种有弹性的连接物,提供一种具有期望的特征(例如,疏水性,极性,阳性带电,阴性带电,等等)的氨基酸残基)。在另外一个例子中,所述的蛋白原组分(例如,备选的肽掩蔽物)可以是在一定程度上随机的,这样一来在一个蛋白原文库成员群体或者亚群体中,对存在于所述的随机氨基酸序列之中的一个或者多个残基进行选定并且使其保持不变(例如,这样一来在所述的备选的肽掩蔽物之中的

一个期望的位置上提供一种半胱氨酸)。

[0185] 用以筛选蛋白原及其组分的方法

[0186] 用以筛选肽掩蔽物的方法

[0187] 通常情况下,可以通过一种主动的筛选步骤(用以识别那些能够与所述的功能性蛋白质进行结合的成员)以及一种被动的筛选步骤(用以识别那些不能够与所述的功能性蛋白质进行结合的成员)来实现所述的筛选方法,其中所述的筛选方法所筛选的是肽掩蔽物以及具有一种所期望的掩蔽表型的肽掩蔽物。所述的被动筛选的步骤可以通过下述的方式来实现,例如,从所述的群体成员中删除那些在不存在所述的肽掩蔽物的条件下能够结合所述的功能性蛋白质的成员。应当被注意到的是,本发明中所描述的文库筛选方法可以通过下述方式来开始:首先进行所述的被动筛选,用以筛选出不能够与所述的功能性蛋白质进行结合的备选物并且在此之后进行所述的主动筛选(即,使可以复制的生物学实体展示备选肽掩蔽物文库暴露于一种功能性蛋白质之中并且选择出那些能够与所述的功能性蛋白质进行结合的成员)。

[0188] 可以使用流式细胞术方便的进行所述的主动筛选步骤以及被动筛选步骤,其中所述的流式细胞术用以根据一种可检测性的被标记的功能性蛋白质的结合对备选的掩蔽物进行分拣。所述的筛选方法的“一轮”或者一个“周期”同时包括一个主动的筛选步骤以及一个被动的筛选步骤。对于一个文库而言可以重复所述的方法,这样一来可以完成多个周期(包括完整的周期以及一部分的周期,例如,1.5个周期,2.5个周期,等等)。通过这样的方式,所述的大量备选的掩蔽物成员可能富集在上述得到的群体之中,其中所述的掩蔽物成员能够表现出与所述的功能性蛋白质的结合。

[0189] 蛋白原掩蔽效率检测:对一种有效的肽掩蔽物所进行的选择并不必然仅仅以亲和力为依据,同样可以包括对“掩蔽效率”所进行的一种经验性的测量。两种范例性的检测是可以被使用的。所述的第一种检测是对一种蛋白原结合一种细胞表面所具有的亲和力所进行的测量,所述的测量是通过例如荧光激活的细胞分拣技术(FACS)来进行的,其中所述的细胞表面能够展示一种备选的肽掩蔽物。在所述的第二种检测中可以对一种肽掩蔽物所具有的抑制蛋白原与其结合伴侣进行结合的能力进行测量,其中所述的检测是在治疗学相关的浓度以及时间的条件下进行的。为了进行所述的第二种方法,已经研发出了一种免疫吸附检测(MEA,掩蔽效率检测),用以对所述的蛋白原所具有的与其结合伴侣进行结合的时间依赖性结合进行测量。

[0190] 对一种有效的肽掩蔽物所进行的选择并不必然仅仅以亲和力为依据,但是必须包括对掩蔽效率所进行的一种经验性的测量。为了做到这一点我们已经使用了两种检测。所述的第一种检测是对一种蛋白原结合一种细胞表面所具有的亲和力所进行的测量,所述的测量是通过荧光激活的细胞分拣技术(FACS)来进行的,其中所述的细胞表面展示有肽掩蔽物。在所述的第二种检测中我们对一种肽掩蔽物所具有的抑制蛋白原与其靶向进行结合的能力进行测量,其中所述的检测是在治疗学相关的浓度以及时间的条件下进行的。为了做到这一点我们研发了一种免疫吸附检测(MEA,掩蔽效率检测),用以对存在于所述的蛋白原之中的所述的肽掩蔽物所进行的时间依赖性的结合伴侣取代进行测量。

[0191] 一般而言,所述的筛选方法是通过下述方式来进行的:首先建立一个核酸文库,所述的核酸文库能够在一个展示骨架中编码大量的备选掩蔽物,继而将所述的备选的掩蔽物

导入到一种展示骨架之中用以在一种可以复制的生物学实体所具有的表面上进行表达。

[0192] 在进行所述的筛选方法之前,对那些能够在所述的细胞表面之上表达一种适合的肽展示骨架的细胞进行富集可能是令人期望的。上述的可以选择的富集作用允许细胞从所述的细胞文库中的去除,其中所述的细胞(1)不能够在所述的细胞外膜上表达肽展示骨架,或者(2)在所述的细胞外膜上表达了非功能性肽的展示骨架。“非功能性的”指的是所述的肽展示骨架不能够适当的展示一种肽掩蔽物,例如,这是一种终止密码子或者一种删除性突变所产生的结果。

[0193] 细胞的富集可以通过下述的方式来实现:使所述的细胞群体进行生长并且诱导其进行所述的肽展示骨架的表达。在此之后对所述的细胞进行分拣,这种分拣是例如以下述的方式为依据的:对一种可以检测的信号或者半族所进行的检测,其中所述的信号或者半族已经被导入到所述的骨架之中了,或者通过使用一种可以检测到的经过标记的抗体的方式,其中所述的抗体能够与所述的展示骨架或者所述的蛋白原所具有的一个共享的部分进行结合。这样的方法在美国专利7256038以及公开与2007年3月22日的美国专利申请公开文本No:2007/0065878中被进行了更为详细的描述,并且上述文献的全部内容被引入作为参考。

[0194] 用以筛选被用来作为可以切断的连接物的蛋白酶底物的方法

[0195] 一般而言,可以通过一种主动的筛选步骤(用以识别那些在被暴露于酶中之后能够切断所述的底物的成员)以及一种被动的筛选步骤(用以识别那些当被暴露于酶中时不能够切断所述的底物的成员)来实现所述的筛选方法,其中所述的筛选方法所筛选的是备选的底物,所述的底物能够实现所期望的蛋白原的可以活化的表型。所述的被动筛选的步骤可以通过下述的方式来实现,例如,从所述的群体成员中删除那些在不存在所述的蛋白酶的条件下能够切断所述底物的成员。应当被注意到的是,本发明中所描述的文库筛选方法可以通过下述方式来开始:首先进行所述的被动筛选,用以筛选出那些在不存在所述的酶处理的条件下不能够切断所述的底物的备选物并且在此之后进行所述的主动筛选(即,利用酶进行处理并且筛选出那些切断了所述的底物的成员)。

[0196] 可以使用流式细胞术方便的进行所述的主动筛选步骤以及被动筛选步骤,其中所述的流式细胞术用以根据切断的状况对备选的底物进行分拣。所述的筛选方法的“一轮”或者一个“周期”同时包括一个主动的筛选步骤以及一个被动的筛选步骤。对于一个文库而言可以重复所述的方法,这样一来可以完成多个周期(包括完整的周期以及一部分的周期,例如,1.5个周期,2.5个周期,等等)。通过这样的方式,所述的大量备选的底物成员可能富集在上述得到的群体之中,其中所述的底物成员能够表现出所述的活化特征。

[0197] 一般而言,所述的筛选方法是通过下述方式来进行的:首先建立一个核酸文库,所述的核酸文库能够在一个展示骨架中编码大量的备选底物,继而将所述的备选的底物导入到一种展示骨架之中用以在一种可以复制的生物学实体所具有的表面上进行表达。

[0198] 在进行所述的筛选方法之前,对那些能够在所述的细胞表面之上表达一种适合的肽展示骨架的细胞进行富集可能是令人期望的。上述的可以选择的富集作用允许细胞从所述的细胞文库中的去除,其中所述的细胞(1)不能够在所述的细胞外膜上表达肽展示骨架,或者(2)在所述的细胞外膜上表达了非功能性肽的展示骨架。“非功能性的”指的是所述的肽展示骨架不能够适当的展示一种备选的底物,例如,这是一种终止密码子或者一种删除

性突变所产生的结果。

[0199] 细胞的富集可以通过下述的方式来实现：使所述的细胞群体进行生长并且诱导其进行所述的肽展示骨架的表达。在此之后对所述的细胞进行分拣，这种分拣是例如以下述的方式为依据的：对一种可以检测的信号或者半族所进行的检测，其中所述的信号或者半族已经被导入到所述的骨架之中了，或者通过使用一种可以检测到的经过标记的抗体的方式，其中所述的抗体能够与所述的展示骨架或者所述的蛋白原所具有的一个共享的部分进行结合。这样的方法在美国专利7256038以及公开与2007年3月22日的美国专利申请公开文本No：2007/0065878中被进行了更为详细的描述，并且上述文献的全部内容被引入作为参考。

[0200] 用以筛选可以活化的蛋白原的方法

[0201] 一般而言，可以通过一种主动的筛选步骤（用以识别那些在被暴露于酶中之后能够与一种结合伴侣进行结合的成员）以及一种被动的筛选步骤（用以识别那些当没有被暴露于酶中时不能够与一种结合伴侣进行结合的成员）来实现所述的筛选方法，其中所述的筛选方法所筛选的是备选的蛋白原，所述的蛋白原具有一种令人期望的可以活化的表型。所述的被动筛选的步骤可以通过下述的方式来实现，例如，从所述的群体成员中删除那些在不存在所述的蛋白酶的条件下能够与所述的结合伴侣进行结合的成员。应当被注意到的是，本发明中所描述的文库筛选方法可以通过下述方式来开始：首先进行所述的被动筛选，用以筛选出那些在不存在所述的酶处理的条件下不能够与经过标记的结合伴侣进行结合的备选物（即，当没有被切断时不能够与经过标记的结合伴侣进行结合）并且在此之后进行所述的主动筛选（即，利用酶进行处理并且筛选出那些在处于所述的被切断的状态下时与经过标记的结合伴侣进行了结合的成员）。

[0202] 可以使用流式细胞术方便的进行所述的主动筛选步骤以及被动筛选步骤，其中所述的流式细胞术用以根据一种可以检测到的经过标记的结合伴侣所发生的结合状况对备选的蛋白原进行分拣。所述的筛选方法的“一轮”或者一个“周期”同时包括一个主动的筛选步骤以及一个被动的筛选步骤。对于一个文库而言可以重复所述的方法，这样一来可以完成多个周期（包括完整的周期以及一部分的周期，例如，1.5个周期，2.5个周期，等等）。通过这样的方式，所述的大量备选的蛋白原成员可能富集在上述得到的群体之中，其中所述的蛋白原成员能够表现出一种蛋白原所具有的活化特征。

[0203] 一般而言，所述的筛选方法是通过下述方式来进行的：首先建立一个核酸文库，所述的核酸文库能够在一个展示骨架中编码大量的备选蛋白原，继而将所述的备选的蛋白原导入到一种展示骨架之中用以在一种可以复制的生物学实体所具有的表面上进行表达。

[0204] 在进行所述的筛选方法之前，对那些能够在所述的细胞表面之上表达一种适合的肽展示骨架的细胞进行富集可能是令人期望的。上述的可以选择的富集作用允许细胞从所述的细胞文库中的去除，其中所述的细胞（1）不能够在所述的细胞外膜上表达肽展示骨架，或者（2）在所述的细胞外膜上表达了非功能性肽的展示骨架。“非功能性的”指的是所述的肽展示骨架不能够适当的展示一种备选的蛋白原，例如，这是一种终止密码子或者一种删除性突变所产生的结果。

[0205] 细胞的富集可以通过下述的方式来实现：使所述的细胞群体进行生长并且诱导其进行所述的肽展示骨架的表达。在此之后对所述的细胞进行分拣，这种分拣是例如以下述

的方式为依据的：对一种可以检测的信号或者半族所进行的检测，其中所述的信号或者半族已经被导入到所述的骨架之中了，或者通过使用一种可以检测到的经过标记的抗体的方式，其中所述的抗体能够与所述的展示骨架或者所述的蛋白原所具有的一个共享的部分进行结合。这样的方法在美国专利7256038以及公开与2007年3月22日的美国专利申请公开文本No：2007/0065878中被进行了更为详细的描述，并且上述文献的全部内容被引入作为参考。

[0206] 可检测性的标记

[0207] 当在本发明中被进行使用时，所述的术语“标记”，“可检测性的标记”以及“可检测性的半族”是可以进行互换使用的，用以指代一种能够被进行检测的分子，包括，但不局限于，放射性同位素，荧光剂，化学发光剂，发色团，酶，酶底物，酶辅助因子，酶抑制剂，发色团，染料，金属离子，金属溶胶，配体（例如，生物素，抗生物素蛋白质，链霉亲和素或者半抗原）以及类似的分子。所述的术语“荧光剂”指的是这样的一种物质或者是上述物质中的一个部分，所述的物质能够表现出存在于所述的可以检测的范围内的荧光性。适合用来作为标记物的范例性的可检测性半族包括，亲和标签以及荧光性蛋白质。

[0208] 在本领域中熟知的任意一种荧光性的多肽（在本发明中同样也被称之为一种荧光性的标记物）均适合被用来作为一种可检测性的半族或者与在本发明中描述的所述的肽展示骨架所具有的一种亲和标签一同进行使用。一种适合的荧光性的多肽将是这样的一种多肽：其能够在一种期望的宿主细胞中进行表达，并且将能够容易的提供一种可检测性的信号，可以被进行定性的（阳性/阴性）以及定量的（相对的荧光性程度）评价，其中所述的宿主细胞例如是一种细菌性细胞或者是一种哺乳动物细胞。范例性的荧光性多肽包括，但不局限于，黄色荧光蛋白（YFP），青色荧光蛋白（CFP），绿色荧光蛋白（GFP），小鼠红色荧光蛋白（mRFP），红色荧光蛋白（RFP）（tdimer2），远红荧光蛋白（HCRED），等等，或者是上述蛋白质的任何的变体（例如，经过修饰的荧光性蛋白质，用以提供增强的荧光性或者一种转换的发射光谱）类似物，或者衍生物。进一步的适合的荧光性多肽，以及那些在本发明中所列出的具体的例子，是本领域中所提供的并且是本领域内所熟知的。

[0209] 基于生物素的标记物同样可以在本发明所公开的方法中找到用处。靶向分子以及底物的生物素化是熟知的，例如，为了进行所述的蛋白质、核酸、碳水化合物、羧酸的生物素化，大量的生物素化试剂是已知的，包括胺-反应性试剂以及硫醇-反应性试剂；参见，例如，Molecular Probes Catalog《分子探针类别》，第四章，Haugland，第6版，1996年，被引入作为参考。可以通过与一种经过可检测性标记的生物素结合伴侣进行结合的方式对一种生物素化的底物进行检测，其中所述的生物素结合伴侣例如是抗生物素蛋白质或者链霉亲和素。相类似的，大量的半抗原化（haptenylation）试剂同样是已知的。

[0210] 筛选方法

[0211] 用以提供目标蛋白原的分离以及回收的任意适合的方法均是可以被利用的。例如，可以通过荧光激活的细胞分选技术（FACS）、免疫色谱法对一种能够展示目标蛋白原的细胞进行分离，或者，当所述的可检测性的标记物是具有磁性的标记物时，通过磁性分离方法对所述的细胞进行分离。作为所述的分离所产生的结果，所述的群体中富含所述的细胞，其中所述的细胞能够表现出所期望的特征，例如，在经过切断之后能够表现出与结合伴侣所进行的结合，或者在不存在切断的情况下与结合伴侣具有减少的结合或者不存在可以

检测性的结合。

[0212] 例如,可以使用本领域中已知的各种不同的技术来完成对备选的蛋白原所进行的筛选,其中所述的蛋白原已经结合了带有可检测性标记的结合伴侣。例如,流式细胞术(例如,FACS®)方法可以被用来从未经过标记的备选的蛋白原之中分拣出那些经过可检测性标记的备选的蛋白原。可以执行流式细胞术方法,用以提供在所述的备选蛋白原群体的分离中或多或少的严格需求,例如,通过对出入(gating)进行的修饰作用允许“光暗调节器”或者需要“更亮的”细胞群体,其目的在于将其分离进入所述的第二个群体之中,用以进行进一步的筛选。

[0213] 在另外一个例子中,免疫亲和色谱法可以被用来从那些没有与靶向进行结合的备选蛋白原中分离出那些与靶向进行了结合的备选蛋白原。例如,可以将一种支持物(例如,柱,磁性珠)与所述的备选蛋白原进行接触,其中所述的支持物已经结合有抗靶向抗体,所述的备选蛋白原已经被暴露于蛋白酶以及结合伴侣之中。已经结合了靶向的备选的蛋白原能够与所述的抗靶向抗体进行结合,因此促进了从备选的缺乏结合靶向的蛋白原中所进行的分离。当所述的筛选步骤是为了提供一种富集了未被切断的备选蛋白原的群体时,所述的目标亚群体是那些缺乏结合靶向的成员,或者具有一种相对而言降低的可检测性信号的成员,其中所述的未被切断的备选蛋白原具有相对而言减少的靶向结合或者不存在可以检测到的靶向结合(例如,相对于其他的备选蛋白原而言)。例如,当一种免疫亲和技术被用在这样的针对结合靶向所进行的被动筛选中时,所述的目标亚群体是那些没有与所述的抗靶向支持物进行结合的成员。

[0214] 蛋白原的治疗剂用途

[0215] 可以对本发明中所描述的蛋白原进行筛选,将其用于对适合的宿主进行治疗的方法之中,其中所述的治疗所依据的是所提供的可以切断的连接物-蛋白组合物。蛋白原所具有的范例性的非限制性的用途是用于丙型肝炎,癌症,以及血管再生。例如,可以向患有的一种病症(例如,在上文中所描述的那些)的患者施用治疗有效剂量的蛋白原。

[0216] 与所述的未经过修饰的蛋白质或者母本蛋白质相比,一种蛋白原的使用能够允许减少的剂量频次。

[0217] 所述的蛋白原可以通过任意适合的方式被进行施用,所述的方式包括肠胃外,皮下,腹膜内,肺内,以及鼻内,并且,如果需要的话可以用于进行局部的注射(例如,在一个实体肿瘤的位点之上)。肠胃外的施用途径包括肌肉内施用,静脉内施用,动脉内施用,腹膜内施用,或者皮下施用。

[0218] 所述的蛋白原所具有的适宜剂量将取决于需要接受治疗的所述的疾病类型,所述的疾病所具有的严重程度以及过程,所述患者的临床病史以及对所述的蛋白原所进行的应答,以及所述医师的判断力。可以向所述的患者适当的进行蛋白原的施用,一次或者在一系列的治疗过程中。

[0219] 根据所述的疾病所具有的类型以及严重程度,大约1微克/千克至100微克/千克,或者至少1微克/千克,5微克/千克,10微克/千克,50微克/千克,100微克/千克,500微克/千克,1毫克/千克,5毫克/千克,10毫克/千克,20毫克/千克,25毫克/千克,50毫克/千克,或者100毫克/千克的蛋白原可以作为一种初始的备选剂量对所述的患者进行施用,无论是例如通过一次或者多次单独的施用,还是通过连续输液的方式来进行施用的。一种典型的每日

剂量可能存在于大约1微克/千克至100毫克/千克或者更多的范围之内,这取决于例如在本发明中所提及的那些因素。根据所述的病症,为了在几天或者更长的时间内进行重复的施用,所述的治疗被得以持续直至发生了对一种疾病症状的所期望的抑制作用。然而,其他的剂量方案可能是有用的。

[0220] 将可以以一种与良好的医学实践相协调的方式对所述的蛋白原组合物进行配制,称量,以及施用。在这种情形中需要考虑的因素包括接受治疗的所述的具体障碍,接受治疗的所述的具体哺乳动物,所述的个体患者所具有的临床病症,所述障碍所具有的起因,所述的蛋白原的递送位点,所述的施用方法,所述的施用时间安排,以及医学从业者所知晓的其他因素。需要进行施用的所述的蛋白原所具有的治疗有效剂量将通过这样的考虑来被进行管理,并且所述的剂量是用以预防、改善、或者治疗一种疾病或者障碍所必须的最小剂量。

[0221] 通常情况下,一种疾病或者障碍的缓解或者治疗包括一种或者多种由所述的疾病或者障碍所带来的症状或者医学问题的减轻。例如,在癌症的情形中,所述的治疗有效剂量的所述药物能够实现下述状况中的一种或者组合:减少所述的癌症细胞的数量;减少所述的肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减轻和/或终止)癌症细胞向周围器官内的渗透;抑制肿瘤的转移;在一定程度上,抑制肿瘤的生长;和/或在一定程度上对由所述的癌症所带来的一种或者多种症状进行减轻。在一些实施方式中,本发明中所述的一种组合物可以被用来防止所述的疾病或者障碍在一种宿主或者哺乳动物体内的发作或者复发。

[0222] 蛋白原能够在本质上减少已知的药物所具有的已知的副作用并且提高所述的已知药物所具有的功效,其中所述的药物例如是在表格1中所列出的那些已知的药物。

[0223] 蛋白原可以被用来与一种或者多种另外的治疗试剂或者治疗方法进行组合使用(例如,在相同的制剂中或者在单独的制剂中) (“组合治疗”)。蛋白原可以存在于与另外一种治疗试剂所组成的混合物中而被进行施用,或者可以以单独的制剂的形式被进行施用。可以与一种蛋白原进行组合施用的治疗试剂和/或治疗方法包括外科手术(例如,癌性组织的外科手术切除),放射性治疗,骨髓移植术,化学治疗剂治疗,前述的某些组合,以及类似的治疗试剂和/或治疗方法,其中所述的治疗试剂和/或治疗方法是根据需要接受治疗的所述病症来进行选择的。

[0224] 范例性的实施方式

[0225] 在本发明中所提供的组合物以及蛋白原可以被有效的用于各种不同的目的,包括治疗以及诊断。

[0226] 能够调节干扰素信号途径的蛋白原在肝病的治疗中的用途

[0227] 当所述的蛋白原中含有一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质能够调节干扰素信号,例如当所述的功能性蛋白质是干扰素- α (IFN- α) 时,所述的蛋白原能够在下述病症的治疗中找到用处,其中所述的病症例如是丙型肝炎病毒感染以及肝癌(例如,肝细胞癌)。

[0228] 一种干扰素- α (IFN- α) 蛋白原可以被用来作为一种治疗试剂和/或一种诊断试剂。这样的一种蛋白原能够被一种切断试剂(例如,酶,例如一种蛋白质裂解酶,丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶,血纤维蛋白溶酶或者在本发明中所讨论的其他的酶)进行活化,其中所述的切断试剂与其共同存在于所述的肝脏之中。用于进行丙型肝炎病毒感染的治疗之中范例性的蛋白原是由蛋白质裂解酶活化的干扰素原- α (pro-IFN- α) 以及由丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶活化的干扰素原- α (pro-IFN- α)。

[0229] 能够被有效的用于进行丙型肝炎病毒感染的治疗和/或诊断之中的一种范例性的蛋白原可以是一种聚乙二醇化的干扰素 α -2a原或者是一种可以通过酶进行活化的被掩蔽的聚乙二醇化的干扰素 α -2a原,例如是一种PEGASYS®的蛋白原形式或者是一种可以通过酶进行活化的被掩蔽的PEGASYS®。例如,所述的蛋白原可以是能够被蛋白质裂解酶或者丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶进行活化的。可以被用来在干扰素相关的蛋白原组合物中进行使用的其他的范例性的蛋白原在表格1中进行了表示。

[0230] 癌症抑制蛋白原

[0231] 癌症抑制蛋白原可以在几种类型的肿瘤的治疗中找到用处。

[0232] 当所述的蛋白原中含有一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质能够调节所述的Notch途径时,所述的蛋白原可以在下述病症的治疗中找到用处,其中所述的病症例如是癌症,例如是乳腺癌以及前列腺癌。在一种实施方式中所述的蛋白原中可以含有一种可以通过酶进行活化的可溶性的Notch受体或者Notch受体片段。用于进行各种不同的癌症的治疗的范例性的含有通过酶进行活化的Notch的蛋白原包括但不限于:用于进行所述的结肠直肠癌的治疗的通过天冬酰胺肽链内切酶legumain进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的头颈癌的治疗的通过天冬酰胺肽链内切酶legumain进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的前列腺癌的治疗的通过天冬酰胺肽链内切酶legumain进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的肺癌的治疗的通过天冬酰胺肽链内切酶legumain进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的卵巢癌的治疗的通过天冬酰胺肽链内切酶legumain进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的前列腺癌的治疗的通过前列腺特异性抗原(PSA)酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的三阴性乳腺癌的治疗的通过血纤维蛋白溶酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的结肠直肠癌的治疗的通过血纤维蛋白溶酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的头颈癌的治疗的通过血纤维蛋白溶酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的胰腺癌的治疗的通过血纤维蛋白溶酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的肺癌的治疗的通过血纤维蛋白溶酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的卵巢癌的治疗的通过血纤维蛋白溶酶进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的三阴性乳腺癌的治疗的通过尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的结肠直肠癌的治疗的通过尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的头颈癌的治疗的通过尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的胰腺癌的治疗的通过尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),用于进行所述的肺癌的治疗的通过尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1),或者用于进行所述的卵巢癌的治疗的通过尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)进行活化的Notch 1原(pro-Notch 1)。

[0233] 血管再生抑制蛋白原可以在宿主(例如,人类)的实体肿瘤的治疗中找到用处,特别是那些含有一种关联的血管床的实体肿瘤,所述的血管床能够对所述的肿瘤提供喂养这样一来对血管再生所产生的抑制作用能够提供对肿瘤生长的抑制作用。抗血管再生的蛋白原同样可以在其他的病症中找到用处,其中所述的其他病症具有一种或者多种服从于治疗的病症,其中所述的治疗是通过对异常的血管再生所进行的抑制来实现的。

[0234] 一般而言,当新的血管以一种疾病的状态或者能够导致疾病产生的状态进行过度的生长,不足的生长或者不适宜的生长(例如,从医学上的观点来看所述的血管再生所具有的位置,时机或者发生是不期望的)时,能够发生异常的血管再生。当出现一种新血管的生长,所述的生长导致了所述的疾病状态的恶化或者引发了一种疾病状态时,能够发生过度的、不适宜的或者失去控制的血管再生,其中所述的疾病状态是下述的疾病:例如是癌症,特别是血管化的实体肿瘤以及转移性肿瘤(包括结肠癌,肺癌(特别是小细胞肺癌),或者前列腺癌),通过血管的血管新生作用而引发的疾病,特别是糖尿病性失明,视网膜病,原发性糖尿病性视网膜病或者年龄诱发的黄斑变性以及发红;银屑病,银屑病性关节炎,血管母细胞瘤例如血管瘤;炎症性肾病,例如肾小球肾炎,特别是系膜增生性肾小球肾炎,溶血性尿毒症综合症,糖尿病性肾病或者高血压性肾硬化;各种不同的炎性疾病,例如关节炎,特别是风湿性关节炎,炎症性肠病,银屑病,肉状瘤病,动脉性动脉硬化以及发生在移植之后的疾病,子宫内膜异位或者慢性哮喘以及那些本领域普通技术人员能够容易的意识到的其他病症。所述的新的血管能够为所述的疾病组织、破坏的正常组织提供喂养,并且在癌症的情形中,所述的新的血管能够允许肿瘤细胞流出并且进入到所述的循环以及其他器官的所在地之中(肿瘤的转移)。

[0235] 基于蛋白原的抗血管再生治疗同样可以在下述疾病的治疗中找到用处,其中所述的疾病是:移植排异反应,肺部炎症,肾病综合症,先兆子痫,心包积液,例如与心包炎有关联的心包积液,以及胸腔积液,以不期望的血管渗透性为特征的疾病以及障碍,例如,由脑肿瘤所带来的水肿,由恶性肿瘤所带来的腹水,美格斯氏综合症,肺部炎症,肾病综合症,心包积液,胸腔积液,由心血管疾病所带来的渗透性,例如在经过心肌梗塞以及脑卒中之后的所述病症,以及类似的疾病。

[0236] 可以使用在本发明中所描述的抗血管再生蛋白原进行治疗的其他的血管再生依赖性疾病包括血管纤维瘤(倾向于出血的异常血管),新生血管性青光眼(血管在眼睛内的生长),动静脉畸形(发生在动脉以及静脉之间的异常通讯),肱骨干骨折(将不能够被治愈的骨折),动脉粥样硬化斑块(动脉的硬化),化脓性肉芽瘤(由血管构成的普通的皮肤病变),硬皮病(一种形式的结缔组织疾病),血管瘤(由血管所构成的肿瘤),沙眼(在第三世界国家能够导致失明),血友病性关节,血管粘附以及肥厚性瘢痕(异常的瘢痕形成)。

[0237] 为了提供一种期望的治疗效果,用于进行施用的蛋白原的剂量将根据各种各样的因素而发生变化,其中所述的因素例如是在上文中所讨论到的那些。一般而言,在所述的癌症治疗的情形中,一种蛋白原的治疗有效剂量指的是这样的一种剂量,其能够有效的抑制血管再生,并且因此促进宿主体内的例如肿瘤的负载量、动脉硬化症的减轻,这种减轻的程度为相比较于一种适合的对照而言至少大约5%,至少大约10%,至少大约20%,至少大约25%,至少大约50%,至少大约75%,至少大约85%,或者至少大约90%,直至所述肿瘤的彻底根除。在一种试验性的动物体系中,一种适合的对照可以是一种在遗传学上相同的动物,所述的动物没有接受所述试剂的治疗。在非试验性的体系中,一种适合的对照可以是在进行所述试剂的施用之前所存在的肿瘤负载量。其他适合的对照可以是一种安慰剂对照。

[0238] 可以使用任何已知的方法来确定一种肿瘤的负载是否得到了降低,所述的方法包括,但不局限于,测量所述的实体肿瘤的质量;使用细胞学检测对所述的肿瘤细胞所具有的数量进行计数;荧光激活的细胞分选技术(例如,使用对一种与肿瘤相关的抗原具有特异性

的抗体)用以确定承受一种给定的肿瘤抗原的所述细胞的数量;对肿瘤进行计算机断层扫描,磁共振成像,和/或x射线扫描,用以评估和/或监测肿瘤的尺寸;测量存在于一种生物学样本之中的所述的与肿瘤相关的抗原所具有的剂量,其中所述的生物学样本例如是血液或者血清;以及类似的方法。

[0239] 在一些实施方式中,所述的方法能够有效的降低所述的肿瘤的生长速率,这种降低的程度为相比较于一种适合的对照而言至少大约5%,至少大约10%,至少大约20%,至少大约25%,至少大约50%,至少大约75%,至少大约85%,或者至少大约90%,直至所述肿瘤的生长被彻底的抑制。因此,在这样的实施方式中,一种蛋白原所具有的“有效剂量”指的是这样的剂量,其足以能够降低肿瘤的生长速率,这种降低的程度为相比较于一种适合的对照而言至少大约5%,至少大约10%,至少大约20%,至少大约25%,至少大约50%,至少大约75%,至少大约85%,或者至少大约90%,直至所述肿瘤的生长被彻底的抑制。在一种试验性的动物体系中,一种适合的对照可以是一种在遗传学上相同的动物,所述的动物没有接受所述试剂的治疗。在非试验性的体系中,一种适合的对照可以是在进行所述试剂的施用之前所存在的肿瘤负载量或者肿瘤的生长速率。其他适合的对照可以是一种安慰剂对照。

[0240] 可以使用任何已知的方法来确定一种肿瘤的生长是否被得到了抑制,所述的方法包括,但不局限于,一种针对肿瘤生长的体内检测;一种体外的增殖作用检测;一种³H-胸腺嘧啶核苷吸收检测;以及类似的方法。

[0241] 生物分布因素

[0242] 在本发明中所描述的组合物所具有的治疗潜能能够允许所述的经过修饰的功能性蛋白质具有更多的生物分布以及生物学可利用率。在本发明中所描述的组合物提供了一种蛋白质治疗剂,所述的蛋白质治疗剂具有一种提高的生物学可利用率,其中在一种健康的组织中所述的功能性蛋白质治疗剂所具有的结合其结合伴侣的亲合力相比较于一种疾病组织而言是较低的。一种包括功能性蛋白质的药物组合物在一种疾病组织之中能够表现出相比较于一种健康的组织而言更高的亲合力,其中所述的亲合力是针对其结合伴侣而言的,所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物进行了偶联。在优选的实施方式中,在所述的疾病组织中所述的亲合力比存在于所述的健康组织之中的所述亲合力高5-10000000倍。在一种范例性的实施方式中,在所述的疾病组织中所述的亲合力比存在于所述的健康组织之中的所述亲合力高大约10000倍。

[0243] 总体而言,本发明公开提供了一种蛋白原治疗剂,所述的蛋白原治疗剂具有一种提高的生物学可利用率,其中当进行比较时,所述的治疗剂在第一种组织中所具有的结合其结合伴侣的亲合力低于在第二种组织中所述的治疗剂所具有的结合其结合伴侣的亲合力。在各种不同的实施方式中,作为例子,所述的第一种组织是一种健康的组织并且所述的第二种组织是一种疾病的组织;所述的第一种组织是一种早期阶段的肿瘤并且所述的第二种组织是一种晚期阶段的肿瘤;所述的第一种组织是一种良性的肿瘤并且所述的第二种组织是一种恶性的肿瘤;所述的第一种组织是肝脏组织并且所述的第二种组织是非肝脏组织;所述的第一种组织是未被感染的肝脏组织并且所述的第二种组织是被病毒进行感染了肝脏组织;或者所述的第一种组织以及第二种组织是在空间上被进行了分离的组织。在所述的具体例子中当所述的第一种组织是一种健康的组织并且所述的第二种组织是一种

疾病的组织时,所述的疾病组织可以是一种含有肿瘤的组织,一种发炎的组织,或者是一种被病毒进行了感染的组织。在另外一个具体的例子中,所述的第一种组织是上皮组织并且所述的第二种组织是乳腺,头,颈,肺脏,胰腺,神经系统,肝脏,前列腺,泌尿生殖器,或者子宫颈组织。

[0244] 在一种范例性的实施方式中,本发明提供了一种用于治疗丙型肝炎病毒的蛋白原治疗剂,其中所述的蛋白原治疗剂具有一种提高的生物学可利用率。这样的一种蛋白原中含有一种功能性蛋白质,所述的功能性蛋白质与一种肽掩蔽物以及一种可以切断的连接物进行了偶联,其中当进行比较时,所述的功能性蛋白质治疗剂在肝脏组织中所具有的结合其靶向的亲合力高于在一种非肝脏组织中所述的功能性蛋白质治疗剂所具有的结合其靶向的亲合力,其中靶向是同时存在于两种组织之中。此外,所述的蛋白原可以含有一种可以切断的连接物,所述的连接物中包括对一种酶具有特异性的底物,其中所述的酶在丙型肝炎或者在一种被肝细胞癌侵袭的组织中被进行了上调,所述的底物例如是一种蛋白质裂解酶的底物或者是一种丙型肝炎病毒(HCV)-NS3/4丝氨酸蛋白酶的底物。

[0245] 药物组合物

[0246] 可以将本发明公开中所述的蛋白原导入到药物组合物之中,其中所述的药物组合物中含有,例如,治疗有效剂量的一种可以活化的被掩蔽的目标蛋白质以及一种载体药理学可接受性的赋形剂(同样被称之为药理学可接受性的载体)。许多药理学可接受性的赋形剂是本领域所已知的,通常情况下根据下述的情形对其进行选择:所述的施用途,需要进行治疗的所述病症,以及本领域中非常熟悉的其他这样的变量。药理学可接受性的赋形剂已经被详细的描述于各种不同的公开出版物之中,包括,例如,A.Gennaro(于2000年)发表的“Remington:The Science and Practice of Pharmacy《雷明顿药物科学与实践》”,第20版,Lippincott,Williams,& Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems《药物剂量形式以及药物递送体系》(1999年)H.C.Ansel等人编著,第7版,Lippincott,Williams,& Wilkins;以及Handbook of Pharmaceutical Excipients《药理学赋形剂手册》(2000年)A.H.Kibbe等人编著,第3版,Amer.Pharmaceutical Assoc.(美国药物协会)。药物组合物中同样可以包括其他的组分,例如pH调节剂以及缓冲试剂,毒性调节试剂,稳定剂,润湿剂以及类似的组分。在一些实施方式中,纳米颗粒或者脂质体能够承载一种包含蛋白原的药物组合物。

[0247] 可以利用那些使用了所述的功能性蛋白质的药物组合物对适合用于蛋白原药物组合物中的组分进行指导,其中所述的功能性蛋白质被进行了掩蔽。

[0248] 一般而言,制备一种或者多种蛋白原的药物制剂,将其以所述的冻干制剂或者水溶液的形式进行储存,所述的制备是通过下述的方式来实现的:将所述的蛋白原与任选的生理学可接受性载体,赋形剂或者稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿药物科学》第16版,Osol,A.编著(于1980年))进行混合,其中所述的蛋白原具有一种期望程度的纯净度。可接受性的载体,赋形剂,或者稳定剂指的是在所使用的剂量以及浓度下对于接受者而言是无毒性的,并且包括缓冲剂例如磷酸盐,柠檬酸盐,以及其他的有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸以及蛋氨酸;防腐剂例如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六羟季铵;氯化苯甲羟胺,苄索氯铵;苯酚,丁醇或者苯甲醇;烷基苯甲酸酯类例如甲基苯甲酸酯或者丙基苯甲酸酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚;低分子量(小于大约10个

残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白,凝胶,或者免疫球蛋白;亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸,谷氨酸盐,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸,或者赖氨酸;单糖,二糖,以及其他的碳水化合物包括葡萄糖,甘露糖,或者糊精;螯合试剂例如乙二胺四乙酸(EDTA);糖类例如蔗糖,甘露醇,海藻糖或者山梨糖醇;盐形成反义离子例如钠;金属复合物(例如,锌-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂例如TWEENTM(吐温),PLURONICSTM或者聚乙二醇(PEG)。

[0249] 用于进行体内施用的所述的制剂必须是无菌的。这可以通过过滤的方式来容易的实现,其中所述的过滤是经由无菌过滤膜所进行的过滤。当对于需要接受治疗的所述的具体的迹象而言必要时,药物制剂中同样可以含有不止一种的活性化合物,其中所述的另外的活性化合物通常情况下是那些与所述的蛋白原具有互补的活性的化合物。

[0250] 所述的药物制剂可以通过各种不同的剂量形式被进行提供,例如一种全身性的注射型制品或者局部注射型制品。所述的组分可以以存在于一种载体之中的方式被进行提供,其中所述的载体例如是一种微胶囊,例如,通过凝聚技术或者通过界面聚合方法制备得到的微胶囊,例如,分别存在于胶质药物递送系统(例如,脂质体,白蛋白微球体,微乳液,纳米颗粒以及纳米胶囊)之中或者存在于大分子乳状液之中的羟基甲基纤维素或者凝胶-微胶囊以及聚-(甲基丙烯酰氧基甲基)微胶囊。这样的技术在Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿药物科学》第16版,Osol, A. 编著(于1980年)中被进行了公开。

[0251] 持续释放的制品同样存在于所述的含有蛋白原的制剂的范围之内。范例性的持续释放的制品可以包括固体含有所述的抗体的疏水性聚合物的半渗透性基质,其中所述的基质是以所述的成型颗粒的形式存在的,例如,膜,或者微胶囊。持续释放的基质的例子包括聚酯,水溶胶(例如,聚(2-羟基乙基)-丙烯酰氧基甲基盐),或者聚(乙烯醇),聚交酯(参见美国专利No.3773919),L-谷氨酸与 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物,非降解性乙烯-醋酸乙烯共聚物,可降解性乳酸-乙醇酸共聚物例如所述的LUPRON DEPOTTM(可注射型的微球体,是由乳酸-乙醇酸共聚物以及醋酸亮丙瑞林所构成的),以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管例如乙烯-醋酸乙烯共聚物以及乳酸-乙醇酸共聚物之类的聚合物能够在100天的时间内进行分子的释放,某些水溶胶能够在较短的时间段内进行蛋白质的释放。

[0252] 蛋白原可以与递送溶媒进行共轭,用以进行一种活性试剂的靶向性的递送,从而提供一种治疗的目的。例如,蛋白原可以与纳米颗粒或者脂质体进行共轭,其中所述的纳米颗粒或者脂质体能够将药物包含在其内或者将药物交联在其上。通过这种方式,可以实现所述药物的特异性的、靶向性的递送。用以将多肽与脂质体进行交联的方法是本领域内所熟知的并且这样的方法可以被用来将蛋白原交联在脂质体之上,用以进行所述的脂质体内含物的靶向性的递送和/或选择性的递送。作为例子,可以经由硫醚键的形式将多肽共价的连接到脂质体之上。聚乙二醇化的凝胶纳米颗粒以及聚乙二醇化的脂质体同样可以被用来作为一种支持物,用于进行所述的多肽的连接,其中所述的多肽例如是一种单链抗体。参见,例如,Immordino等人(于2006年)在Int J Nanomedicine《国际纳米药物杂志》九月;1(3):297-315中发表的文章,上述文章中所公开的用以对多肽进行共轭的方法被引入到本发明中作为参考,其中所述的多肽例如是抗体片段,将其共轭至脂质体之上。

[0253] 在某些实施方式中本发明中所述的蛋白原进一步的与一种保护性的链进行了共轭,其中所述的保护性的链例如是聚乙二醇(PEG)或者聚乙二醇单甲醚(mPEG),或者任何的

烷基-聚乙二醇 (PEG)。这样的共轭物应当对非特异性的体内的水解性切断具有较弱的敏感性,具有增加的体内半衰期,并且能够降低所述的功能性蛋白质所具有的免疫原性,同时保持了生物学活性。

[0254] 蛋白原的非治疗性用途

[0255] 蛋白原同样可以被用在诊断方法和/或成像方法之中。例如,具有一种可以通过酶学作用被切断的连接物的蛋白原可以被用来对一种酶的存在与否进行检测,其中所述的酶能够切断所述的可以切断的连接物。这样的蛋白原可以被用在诊断学中,其可以包括对酶活性所进行的体内检测(例如,定性的或者是定量的),所述的检测伴随着一种目标结合伴侣的存在,所述的检测是通过对存在于一个给定的宿主有机体内的一个给定的组织之中的被活化的蛋白原的聚集进行测量的方式来实现的。

[0256] 例如,可以对所述的可以活化的连接物进行选择,使其成为一种酶的底物,其中所述的酶是在所述的肿瘤位点上发现的酶,是在所述的病毒感染或者细菌感染的位点上发现的酶,是在一种生物学受限的位点(例如,在一种脓肿之中,在一种器官之中,以及类似的位点)上发现的酶。通过使用本领域技术人员所熟知的方法,可以将一种可检测性的标记物(例如,一种荧光标记物)与所述的功能性蛋白质或者所述的功能性蛋白质所具有的其他区域进行共轭。通过使用一种对一种疾病靶向存在特异性的功能性蛋白质,以及一种在所述的目标疾病组织中其活性能够被提升的酶,蛋白原能够表现出增加的与疾病组织进行结合的速率,这种增加是相对于下述的组织而言的:在所述的组织中,不存在一种可以检测的水平的对所述的可以切断的连接物具有特异性的酶,或者以低于疾病组织的水平存在对所述的可以切断的连接物具有特异性的酶。在非疾病组织之中,由于不存在可以检测的水平的对所述的可以切断的连接物具有特异性的酶(或者其以较低的水平而存在),相对于非疾病组织而言,在所述的疾病组织之中所述的被活化的蛋白原的聚集作用被得以增强。

[0257] 可以被用来作为检测性试剂的可检测性标记物的非限制性例子包括:含有放射性同位素的成像试剂,其中所述的放射性同位素例如是镓或者镓;用于磁共振成像(MRI)以及其他应用的造影剂,所述的造影剂中含有碘,钆或者铁的氧化物;酶例如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,或者 β -半乳糖苷酶;荧光性物质以及荧光团例如绿色荧光蛋白(GFP),铈的衍生物;发光物质例如N-甲基吡啶衍生物或者类似的物质。

实施例

[0258] 实施例1:一种肽文库的筛选以及对肽掩蔽物所进行的识别,其中所述的肽掩蔽物对干扰素- α (IFN- α) 具有特异性

[0259] 为了识别出对干扰素- α (IFN- α) 具有特异性的肽掩蔽物,对一种肽文库进行筛选。干扰素- α (IFN- α) 被用来对一个随机的15X的肽文库进行筛选,其中X可以是任意的氨基酸,其全部种类达到 5×10^{10} 。所述的筛选是由第一轮MACS(磁激活的细胞分选技术)以及随后的四轮FACS(荧光激活的细胞分选技术)所构成的。所述的初始的磁激活的细胞分选技术(MACS)以及三轮的荧光激活的细胞分选技术(FACS)是利用生物素化的干扰素- α (IFN- α) 来完成的,其中所述的生物素化的干扰素- α (IFN- α) 的浓度为500纳摩。为了进行磁激活的细胞分选技术(MACS),对大约 1×10^{11} 个细胞所发生的结合进行筛选并且收集到 3.4×10^7 个细胞。NeutrAvidin-PE(中性链霉亲和素-磷脂酰乙醇胺)被用来作为一种荧光素探针,用于进

行所述的初始几轮的荧光激活的细胞分选技术 (FACS)。所述的第四轮的荧光激活的细胞分选技术 (FACS) 筛选是利用500纳摩的经过Dylight (荧光二抗) 标记的干扰素- α (Dylight-IFN- α) 来完成的。所述的第三轮以及第四轮的荧光激活的细胞分选技术 (FACS) 在附图2中被进行了表示,其被利用经过Dylight (荧光二抗) 标记的干扰素- α (Dylight-IFN- α) 进行了标记。

[0260] 范例性的结合肽在下文的表格3中被进行了表示。

[0261] 表格3:结合了干扰素- α (IFN- α) 的肽

[0262]

47	IAYLEYEHLHMAYG
48	TDVDYYREWCWTQVS
49CS	TDVDYYREWSWTQVS

[0263] 实施例2:干扰素原- α (pro-IFN- α) 的构建以及表达

[0264] 在大肠杆菌碱性磷酸酶 (PhoA) 的控制下干扰素- α 的构建:所述的人类干扰素- α 基因是从Open Biosystems处购买获得的。通过下述的方式将干扰素- α (IFN- α) 克隆至所述的Phagmid X (大肠杆菌碱性磷酸酶驱动的细菌表达载体) 之中。使用引物CX0573以及CX0566对干扰素- α (IFN- α) 进行扩增。通过使用所述的引物CX0571以及CX0572从所述的Phagmid X中对所述的大肠杆菌碱性磷酸酶 (PhoA) 启动子进行扩增。将这两种重叠产物合并到一项聚合酶链式反应之中并且使用所述的引物CX0581以及CX0572对其进行扩增。通过使用所述的HindIII以及EcoRI限制性位点将所述的最终产物克隆至Phagmid X之中。

[0265] 在大肠杆菌碱性磷酸酶 (PhoA) 的控制下被掩蔽的干扰素- α 的构建:按照下述的方式对一种掩蔽接受载体进行构建,其中所述的掩蔽接受载体中带有GGs连接物并且不具有蛋白酶底物。利用所述的反向引物CX0566与所述的向前重叠的引物CX0557, CX0579, 以及CX0580一同对所述的干扰素- α (IFN- α) 的cDNA进行扩增,其中所述的干扰素- α (IFN- α) 带有一个GGs连接物以及掩蔽接受位点。将这种产物克隆至所述的含有STII的Phagmid X载体之中,其中所述的克隆是通过使用所述的BamHI以及EcoRI限制性位点来实现的。在此之后将这种载体用来作为一种模板,用于进行所述的含有基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 底物的载体的构建。通过使用所述的引物对CX0573/CX0612以及CX0611/CX0566对两种重叠的聚合酶链式反应 (PCR) 产物进行扩增。将这两种产物合并到一项聚合酶链式反应 (PCR) 之中,使用所述的引物CX0573以及CX0566对其进行扩增,并且通过使用所述的HindIII以及EcoRI限制性位点将其克隆至Phagmid X之中。

[0266] 通过使用所述的SfiI以及XhoI位点将所述的干扰素- α (IFN- α) 肽掩蔽物克隆至所述的基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 蛋白原载体之中。在此之后通过分别使用CX0289/CX0448以及CX0582/CX0583对所述的47以及49肽掩蔽物 (表格3) 进行扩增,所述的扩增使用到了所述的ecpX3.0克隆物,其中所述的克隆物能够编码出所指示的细菌展示的掩蔽肽。所述的CX0582/CX0583引物对使存在于所述的49掩蔽肽之中的半胱氨酸突变成为一个丝氨酸,从而生成了所述的掩蔽物49CS (表格3)。

[0267] 表格4:用于进行被掩蔽的干扰素- α (IFN- α) 的构建的引物序列

[0268]	CX0289 gctttcaccgcaggtacttccgtagctggccagtctggcc
	CX0448 gagttttgtcggatccaccagagccaccgctgccaccgctcgagcc
	CX0566 gcgttatcccgaattcctagtgtgtgatgtgtgatgttccttacttcttaaactttcttgc
	CX0571 agtgaattgtaagctttggagattatcgtcac
	CX0572 caggctgtgggtttgaggcagatcacacattttattttctccatgtacaaatac
	CX0573 tgtgatctgcctcaaaccacagcctg
	CX0577 ggtggcagcatgtgtgatctgcctcaaaccac
[0269]	CX0579 ggctcgagcggcggtccggcggtagcgggtggctctggtggcagcatgtgtgatctgc
	CX0580 tgcgtatgcaggatccggccagtctggccagcaagtcattctgagaagcggctcgagcggcggtcc
	CX0582 ttccgtagctggccagtctggccagacggacgtggactattatagggagtggtc
	CX0583 gctgccaccgctcgagcctgatacttgagtccaggaccactccctataatagtc
	CX0611 catgccactgggcttctgggtccgggtggcagcatgtgtgatc
	CX0612 ccaggaagcccagtggcatgtgcacggagccgccgctcgagccgc

[0270] 干扰素- α 的表达以及内含体的纯化:在所述的大肠杆菌碱性磷酸酶(PhoA)启动子的控制之下,干扰素以及干扰素原- α 构建体在所述的大肠杆菌(E.coli)的细胞质内进行了表达。内含体是按照下述的方式被进行纯化的:使来自于1升的新鲜过夜培养液中的细菌生长在磷酸盐限定的培养基之中(每升=3.57克硫酸铵,0.71克二水合柠檬酸钠,1.07克氯化钾,5.36克酵母提取物,5.36克HycaseSF-Sheffield,利用氢氧化钾将pH调整至7.3,将体积调整到872毫升,高压灭菌。在进行高压灭菌之后向其中补充110肽掩蔽物3-(N-吗啡啉)-丙磺酸(MOPS) pH 7.3,0.5%的葡萄糖,7微摩硫酸镁以及50微克/毫升的羧苄青霉素)。将所述的培养物制成小球状并且在此之后利用20毫升的BPERII (Pierce) 对其进行溶解。在14000x g的条件下对所述的溶解产物进行离心并且弃去所述的上清液。在此之后将所述的小球重新悬浮在由BPERII与水以1:10所组成的溶液之中,向其中添加720Ku的溶菌酶以及40Ku的DNaseI,并且在室温下对所述的溶解产物进行1小时的培养。在14000x g的条件下对所述的溶解产物进行离心并且利用1:20的BPERII对所述的内含体(IB)进行再一次的洗涤。将被制成小球状的内含体储存在-20℃之下直至再一次的使用。

[0271] 干扰素- α 的纯化以及复性:将从1升的培养液中分离出来的内含体溶解在20毫升的内含体(IB)溶解缓冲液之中(50肽掩蔽物Tris,8摩的尿素,1肽掩蔽物磷酸三(β-氯乙基)酯(TCEP),pH 8.0)。在向一个Ni-NTA(镍离子金属螯合亲和层析介质)柱(Qiagen)内添加所述的被溶解的蛋白质之前,通过离心作用去除所述的不溶解的蛋白质。利用5毫升的内含体(IB)溶解缓冲液对所述的发生结合的蛋白质进行洗涤,在此之后利用5毫升的含有5肽掩蔽物β-巯基乙醇代替磷酸三(β-氯乙基)酯(TCEP)的内含体(IB)缓冲液对其进行洗涤。利用洗脱缓冲液(0.2摩的甘氨酸,8摩的尿素,pH 3.0)对经过纯化的蛋白质进行洗脱并且以逐滴的方式将其加入到100毫升的搅拌冷却的复性缓冲液(0.75摩的精氨酸,0.055%的聚乙二醇(PEG)(重量/体积),2.2毫摩的氯化钙,2.2毫摩的氯化镁,55毫摩的Tris,0.44毫摩的氯化钾,10.56摩的氯化钠,4毫摩的还原型谷胱甘肽,0.4毫摩的氧化型谷胱甘肽,pH 7.5)之

中。允许复性在4℃下进行过夜,并且伴随着持续不断的缓慢搅拌。经过复性之后,将所述的蛋白质粗略的透析至磷酸盐缓冲液(PBS)之中并且在此之后将其施加到Ni-NTA(镍离子金属螯合亲和层析介质)柱内。利用磷酸盐缓冲液(PBS)对所述的发生结合的蛋白质进行洗涤并且利用咪唑洗脱缓冲液(50毫摩的Tris,300毫摩的氯化钠,250毫摩的咪唑)对其进行洗脱。通过使用一种超微过滤离心浓缩机对经过纯化的蛋白质进行浓缩并且将缓冲液更换为pH为7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0272] 实施例3:对干扰素原- α (pro-IFN- α) 的掩蔽以及解除掩蔽所进行的分析

[0273] 为了对所述的干扰素原- α (pro-IFN- α) 的掩蔽进行证实,将所述的经过复性的蛋白质,47-基质金属蛋白酶-干扰素- α (47-MMP-IFN- α) 或者49-基质金属蛋白酶-干扰素- α (49-MMP-IFN- α) 以1:1的比例在基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 消化缓冲液(50毫摩的Tris,20毫摩的氯化钠,2毫摩的氯化钙,100微摩的氯化锌,pH为6.82)中进行稀释,并且利用大约35Units的基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在37℃下对上述样本中的一半进行3小时的消化。随后,将60微升、40微升、20微升以及6.6微升的所述的经过消化的材料以及未经过消化的材料添加到400微升的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温(PBS-T)(磷酸盐缓冲液,0.05%的吐温,pH为7.4)溶液之中,并且通过酶联免疫吸附检测(ELISA)对其进行分析,描述如下:

[0274] 干扰素的酶联免疫吸附检测:一种重组的干扰素受体1-Fc (IFNR1-Fc) 融合蛋白质(R&D Systems)被用来对干扰素- α (IFN- α) 所进行的结合进行检测。简要的说,在室温(RT)下,将所述的受体吸附至酶联免疫吸附检测(ELISA)培养板上1小时,其中所述的受体是以5微克/毫升的浓度存在于磷酸盐缓冲液(PBS)之中的。在此之后,在室温(RT)下利用2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温(PBS-T)溶液对孔进行1小时的封闭。向所述的孔内添加干扰素- α ,其中所述的干扰素- α 是以三种浓度存在于100微升的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温(PBS-T)溶液之中的,所述的三种浓度为60纳摩,40纳摩,20纳摩以及6.6纳摩。利用磷酸盐缓冲液-吐温(PBS-T)对孔进行三次洗涤并且利用以1:1000的滴定量存在的抗-His₆单克隆抗体(Invitrogen)在每孔100微升的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温(PBS-T)溶液内对所述的干扰素进行检测,其中在所述的抗-His₆单克隆抗体中混合有以1:2000的滴定量存在的抗-鼠科动物Fc-辣根过氧化物酶(HRP)共轭物(Fisher)。按照制造商给出的方案,利用100微升的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) (Pierce)对所述的酶联免疫吸附检测(ELISA)进行显影(附图3)。附图3表示的是在利用基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 进行处理之前以及之后,所述的两种干扰素原- α 分子所进行的结合,其中所述的干扰素原- α 分子为干扰素原- α -47(表格7以及表格8)以及干扰素原- α -49CS(表格8以及表格9)。所述的附图3中的第一个四柱图(短小的格子花纹)表示的是在进行处理之前干扰素原- α -49CS不能够与干扰素受体 α (IFNRA) 进行结合,然而在将掩蔽物49CS中的基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 进行去除之后,上述得到的干扰素- α (IFN- α) (第二组的四柱图,附图,大的格子花纹)分子能够与干扰素受体 α (IFNRA) 进行结合。与之相反,当被导入到干扰素原- α -47中时,掩蔽物47能够微弱的阻止干扰素- α (IFN- α) 与干扰素 α 受体 (IFNRA) 所进行的结合(附图3,第三组的四柱图,水平线),这可以通过利用基质金属蛋白酶9 (MMP9) 所进行的处理来恢复(附图3,最后一组四柱图,垂直线)。

[0275] 表格5:干扰素- α 所具有的核苷酸序列

[0276]

```
atgtgtgatcgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcacagatgaggagaatctctcttttctcctgctgaaggacagacat
gactttggatttccccaggaggagtttgcaaccagttccaaaaggctgaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcagatcttcaatctcttcagcaca
aggactcatctgctgcttgggatgagaccctctagacaaattctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatacaggggtggg
ggtagacagagactccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaataacttccaaagaatcactctctatctgaagagaagaatacagccctgtg
cctgggaggtgtcagagcagaaatcatgagatcttttcttctgaacaaacttgcaagaaagttaagaagtaaggaaacatcacatcatcaccat
```

[0277] 表格6:干扰素- α 所具有的氨基酸序列[0278] 圆括号描绘的是在各种不同的序列结构域之间所进行的划分:(干扰素- α)-(亲和标签)

[0279]

```
(MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEM
IQQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAV
RK YFQRITLYLKEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE)(HHHHHH)
```

[0280] 表格7:干扰素原- α -47所具有的核苷酸序列

[0281]

```
ggccagctgcccagattgcgtaccttgagtattatgagcacctacatatggcctacggctcgagcggcggtcctgtgcacatgccactgggcttctgggtcc
gggtggcagcatgtgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcacagatgaggagaatctctcttttctcctgctga
aggacagacatgactttggatttccccaggaggagtttgcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcagatcttcaate
ctttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctctagacaaattctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatac
```

[0282]

```
aggggggtgggggtgacagagactccctgatgaaggaggactccattctggtgtgaggaataacttccaaagaatcactctctatctgaagagaagaata
cagccctgtgcctgggaggtgtcagagcagaaatcatgagatcttttcttctgaacaaacttgcaagaaagttaagaagtaaggaaacatcacatcac
cat
```

[0283] 表格8:干扰素原- α -47所具有的氨基酸序列[0284] 圆括号描绘的是在各种不同的序列结构域之间所进行的划分:(连接物)-(掩蔽肽)-(连接物)-(基质金属蛋白酶-9底物)-(连接物)-(干扰素- α)-(亲和标签)

[0285]

```
(GQSGQ)(IAYLEYEHLHMAY)(GSSGGS)(VHMLGFLGP)(GGS)(MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQM
RRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ QIFNLFSTKDSSAAWDETL L
DKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSPCAWE
V VRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE)(HHHHHH)
```

[0286] 表格9:干扰素原- α -49CS所具有的核苷酸序列

[0287]

```
ggccagctgcccagacggacgtggactattataggagtggtcctggactcaagatcaggctcgagcggcggtcctgtgcacatgccactgggcttctg
ggctccgggtggcagcatgtgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcacagatgaggagaatctctcttttctcctg
ctgaaggacagacatgactttggatttccccaggaggagtttgcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcagatctt
caatctcttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctctagacaaattctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtg
gatacaggggggtgggggtgacagagactccctgatgaaggaggactccattctggtgtgaggaataacttccaaagaatcactctctatctgaagagaa
gaaatacagccctgtgcctgggaggtgtcagagcagaaatcatgagctcttttcttctgaacaaacttgcaagaaagttaagaagtaaggaaacatcacat
catcaccat
```

[0288] 表格10:干扰素原- α -49CS所具有的氨基酸序列[0289] 圆括号描绘的是在各种不同的序列结构域之间所进行的划分:(连接物)-(掩蔽肽)-(连接物)-(基质金属蛋白酶-9底物)-(连接物)-(干扰素- α)-(亲和标签)

[0290]

```
(GQSGQ)(TDVDYYREWSWTQVS)(GSSGGS)(VHMLGFLGP)(GGS)(MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ QIFNLFSTKDSSAAWDETL
LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSPCAW
E V VRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE)(HHHHHH)
```

[0291] 实施例4：一种可以活化的干扰素- α (IFN- α) 蛋白原文库的构建以及测试，其中所述的蛋白原文库能够展示备选的底物以及肽掩蔽物，所述的干扰素- α (IFN- α) 蛋白原是利用蛋白质裂解酶或者丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶来进行活化的

[0292] 为了识别出那些具有所期望的活化特征(即，当处于一种未被切断的构象时，与其干扰素受体 α (IFNRA) 受体具有减少的结合，这种减少是相对于当处于一种被切断的构象时所具有的与干扰素受体 α (IFNRA) 受体的结合而言的)的干扰素- α 蛋白原，建立备选的干扰素- α (IFN- α) 蛋白原，其中所述的蛋白原具有可以改变的蛋白质裂解酶或者丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶可切断的连接物，并且在所述的肽掩蔽物中具有不同的可以变化的氨基酸序列，并且在所述的肽掩蔽物中所述的半胱氨酸具有不同的位置。

[0293] 在表格11-12中本发明提供了蛋白质裂解酶以及丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶的保守序列

[0294] 表格11：蛋白质裂解酶的保守序列

[0295]

XXQAR (A/V) X
AGPR

[0296] 表格12：丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶的保守序列

[0297]

DEXXXC (A/S)
DLXXXT (A/S)

[0298] 干扰素- α 的纯化以及复性：将从1升的培养液中分离出来的内含体溶解在20毫升的内含体 (IB) 溶解缓冲液之中 (50肽掩蔽物Tris, 8摩的尿素, 1肽掩蔽物磷酸三 (β-氯乙基) 酯 (TCEP), pH 8.0)。在向一个Ni-NTA (镍离子金属螯合亲和层析介质) 柱 (Qiagen) 内添加所述的被溶解的蛋白质之前，通过离心作用去除所述的不溶解的蛋白质。利用5毫升的内含体 (IB) 溶解缓冲液对所述的发生结合的蛋白质进行洗涤，在此之后利用5毫升的含有5肽掩蔽物β-巯基乙醇代替磷酸三 (β-氯乙基) 酯 (TCEP) 的内含体 (IB) 缓冲液对其进行洗涤。利用洗脱缓冲液 (0.2摩的甘氨酸, 8摩的尿素, pH 3.0) 对经过纯化的蛋白质进行洗脱并且以逐滴的方式将其加入到100毫升的搅拌冷却的复性缓冲液 (0.75摩的精氨酸, 0.055%的聚乙二醇 (PEG) (重量/体积), 2.2毫摩的氯化钙, 2.2毫摩的氯化镁, 55毫摩的Tris, 0.44毫摩的氯化钾, 10.56摩的氯化钠, 4毫摩的还原型谷胱甘肽, 0.4毫摩的氧化型谷胱甘肽, pH 7.5) 之中。允许复性在4℃下进行过夜，并且伴随着持续不断的缓慢搅拌。经过复性之后，将所述的蛋白质粗略的透析至磷酸盐缓冲液 (PBS) 之中并且在此之后将其施加到Ni-NTA (镍离子金属螯合亲和层析介质) 柱内。利用磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的发生结合的蛋白质进行洗涤并且利用咪唑洗脱缓冲液 (50毫摩的Tris, 300毫摩的氯化钠, 250毫摩的咪唑) 对其进行洗脱。通过使用一种超微过滤离心浓缩机对经过纯化的蛋白质进行浓缩并且将缓冲液更换为pH为7.4的磷酸盐缓冲液 (PBS)。

[0299] 为了对所述的干扰素原- α (pro-IFN- α) 的掩蔽进行证实，将所述的经过复性的蛋白质，掩蔽的-蛋白质裂解酶-干扰素- α (Mask-Matriptase-IFN- α) 或者掩蔽的-丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶-干扰素- α (Mask-HCV NS3/4-IFN- α) 以1:1的比例在消化缓冲液 (50毫摩的Tris, 20毫摩的氯化钠, 2毫摩的氯化钙, pH为7.2) 中进行稀释，并且利用大约

20纳摩的蛋白质裂解酶或者丙型肝炎病毒 (HCV) -NS3/4丝氨酸蛋白酶在37℃下对上述样本中的一半进行3小时的消化。随后,将60微升、40微升、20微升以及6.6微升的所述的经过消化的材料以及未经过消化的材料添加到400微升的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温 (PBS-T) (磷酸盐缓冲液,0.05%的吐温,pH为7.4) 溶液之中,并且通过酶联免疫吸附检测 (ELISA) 对其进行分析,这将在下文中被进行描述。

[0300] 干扰素的酶联免疫吸附检测:一种重组的干扰素受体1-Fc (IFNR1-Fc) 融合蛋白质 (R&D Systems) 被用来对干扰素- α (IFN- α) 所进行的结合进行检测。简要的说,在室温 (RT) 下,将所述的受体吸附至酶联免疫吸附检测 (ELISA) 培养板上1小时,其中所述的受体是以5微克/毫升的浓度存在于磷酸盐缓冲液 (PBS) 之中的。在此之后,在室温 (RT) 下利用2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温 (PBS-T) 溶液对孔进行1小时的封闭。向所述的孔内添加干扰素- α ,其中所述的干扰素- α 是存在于100微升的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温 (PBS-T) 溶液之中的。利用磷酸盐缓冲液-吐温 (PBS-T) 对孔进行三次洗涤并且利用以1:1000的滴定量存在的抗-His₆单克隆抗体 (Invitrogen) 在每孔100微升的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温 (PBS-T) 溶液内对所述的干扰素进行检测,其中在所述的抗-His₆单克隆抗体中混合有以1:2000的滴定量存在的抗-鼠科动物Fc-辣根过氧化物酶 (HRP) 共轭物 (Fisher)。按照制造商给出的方案,利用100微升的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) (Pierce) 对所述的酶联免疫吸附检测 (ELISA) 进行显影。

[0301] 干扰素- α (IFN- α) 掩蔽效率检测:在4℃下,使干扰素- α (IFN- α) 吸附在一个酶联免疫吸附检测 (ELISA) 培养板的孔内过夜。通过下述方式对所述的培养板进行封闭:添加大约150微升2%的脱脂无水乳 (NFDM) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 以及大约0.5%体积/体积的吐温20 (PBST) 的溶液并且在室温下对其进行大约1小时的培养。利用磷酸盐缓冲液-吐温 (PBST) 对所述的培养板进行大约三次的洗涤。向其中添加大约50微升的封闭缓冲液 (superblock) (Thermo Scientific),其中补充有蛋白酶抑制剂 (Complete,Roche)。向其中添加大约50微升的干扰素原- α (pro-IFN- α) 溶液并且在大约37℃下对其进行所期望的时间的培养,其中所述的干扰素原- α 是溶解于补充有蛋白酶抑制剂 (Complete,Roche) 的封闭缓冲液之中的。利用磷酸盐缓冲液-吐温 (PBST) 对所述的培养板进行大约三次的洗涤。向其中添加100微升的抗-His-辣根过氧化物酶 (HRP) 的2%的脱脂无水乳的磷酸盐缓冲液-吐温溶液 (NFDM/PBST) 并且在室温下对其进行大约1小时的培养。利用磷酸盐缓冲液-吐温 (PBST) 对所述的培养板进行大约四次的洗涤并且利用磷酸盐缓冲液 (PBS) 对其进行大约两次的洗涤。按照制造商的说明使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) (Thermo Scientific) 对所述的检测进行显影。可以预料到的是,一种经过了有效的掩蔽的干扰素原- α (pro-IFN- α) 将表现出不超过10%的结合,其中所述的结合指的是在未进行掩蔽的干扰素- α (IFN- α) 中所观察到的结合。

[0302] 实施例5:一种被掩蔽的可溶性的可以活化的Notch受体蛋白质的构建,其中所述的蛋白质是利用血纤维蛋白溶酶或者基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 来进行活化的

[0303] 在这个实施例中,提供了用以构建一种被掩蔽的可以活化的可溶性的Notch受体片段的序列,其中所述的可溶性的Notch受体片段可以利用血纤维蛋白溶酶以及基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 来进行活化。在正常的条件下这样的蛋白原是灭活的,这归因于与其进行连接的所述的肽掩蔽物。细菌细胞的表面展示被用来寻找适合的肽掩蔽物,其中所述的肽

掩蔽物是用于所述的可溶性的Notch受体蛋白质的。在这个实施例中,被选定的肽掩蔽物与一种血纤维蛋白溶酶或者基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的底物进行结合,用来生成一种蛋白原构建体,所述的蛋白原构建体在发生了酶介导的活化作用之后有能力进行靶向性的结合,其中所述的血纤维蛋白溶酶或者基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的底物被用来作为一种引发物。

[0304] 通过对重叠的寡核苷酸CX509-CX528 (表格13) 进行聚合酶链式反应 (PCR) 组配,构建成一种用以编码人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13) 的基因,利用EcoRI/BglIII对其进行消化,并且将其连接在pINFUSE-人类免疫球蛋白G1 (hIgG1) -Fc2 (InvivoGen) 之上,其中所述的pINFUSE-人类免疫球蛋白G1 (hIgG1) -Fc2已经被利用EcoRI/BglIII进行了消化。上述得到的质粒被用来进行人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13) 在中国仓鼠卵巢悬浮细胞 (CHO-S) 中进行的表达,其中所述的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13) 与所述的人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域进行了融合 (hN111-13-hFc)。通过蛋白质A色谱法从细胞培养上清液中将所述的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc) 纯化出来并且按照标准的方案利用聚乙二醇 (PEG) -生物素或者DyLight 488 (Thermo Pierce) 对其进行标记。

[0305] 表格13:用于对人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13) 进行构建的寡核苷酸

[0306]

CX509	GTCACGAATTCGACGAGCGTCGACGAGTGCTCGCTGGGT
CX510	GCTCGCAGGGGTTGGCACCCAGCGAGCACTCGT
CX511	GCCAACCCCTGCGAGCATGCGGGCAAGTGCATCA
CX512	GAAGGAGCCCAGCGTGTGATGCACTTGCCCGCAT
CX513	ACACGCTGGGCTCCTTCGAGTGCCAGTGTCTGCAGG
CX514	CGGGGGCCCGTGTAGCCCTGCAGACACTGGCACTC
CX515	GCTACACGGGCCCCCGATGCGAGATCGACGTCAACG
CX516	ACGGGTTCGAGACGCACTCGTTGACGTCGATCTCGCAT
CX517	AGTGCGTCTCGAACCCGTGCCAGAACGACGCCACC
CX518	CCCAATCTGGTCCAGGCAGGTGGCGTCGTTCTGGC

[0307]

CX519	TGCCTGGACCAGATTGGGGAGTTCCAGTGCATCTGCATGC
CX520	CACACCCTCGTAGCCGGGCATGCAGATGCACTGGAAGTC
CX521	CCGGCTACGAGGGTGTGCACTGCGAGGTCAACACAGA
CX522	GGCTGCTGGCACACTCGTCTGTGTTGACCTCGCAGTG
CX523	CGAGTGTGCCAGCAGCCCCCTGCCTGCACAATGGCC
CX524	TCATTGATCTTGTCCAGGCAGCGGCCATTGTGCAGGCAGG
CX525	GCTGCCTGGACAAGATCAATGAGTTCCAGTGCAGTGCCC
CX526	GCCCAGTGAAGCCCGTGGGGCACTCGCACTGGAAC
CX527	CACGGGCTTCACTGGGCATCTGTGCCAGGGCAGC

CX528 GTCGTCTGGTGGATCCACCGCTGCCCTGGCACAGAT
--

[0308] 一种被展示在所述的大肠杆菌 (*E. coli*) 表面上的含有15个随机氨基酸的肽文库被用来筛选那些与融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc) 进行了结合的肽。通过下述的方式对大约 1.5×10^{11} 个文库细胞进行了链霉亲和素 (SA) 结合剂的耗尽, 其中在37℃下利用0.04%的阿拉伯糖对所述的文库细胞进行了诱导, 所述的方式是: 在Tris缓冲的盐水中 (50毫摩的Tris-盐酸, pH为7.4, 150毫摩的氯化钠) 利用 10^9 个带有链霉亲和素 (SA) 涂层的磁性珠 (Invitrogen Dynabeads MyOne SA-C1) 对其进行培养, 其中在所述的Tris缓冲的盐水中含有2毫摩的氯化钠以及0.5%的牛血清白蛋白 (TBS-Ca-B)。在此之后通过使用磁铁去除所述的磁性珠, 并且将所述的剩余细胞群体与300纳摩的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc) 以及5微摩的凝集 (pooled) 的人类免疫球蛋白G (IgG) 进行混合, 其中已经利用酰胺-丙酸琥珀酰亚胺酯-聚乙二醇-生物素 (NHS-PEG-biotin) (Thermo Pierce) 对所述的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc) 进行了生物素化处理 (hN111-13-hFc-biot), 并且已经将所述的凝集 (pooled) 的人类免疫球蛋白G (IgG) 中的大肠杆菌结合抗体进行了耗尽 (hIgG)。利用含有2毫摩的氯化钠以及0.5%的牛血清白蛋白的Tris缓冲的盐水 (TBS-Ca-B) 对所述的细胞进行洗涤, 并且利用 10^9 个带有链霉亲和素 (SA) 涂层的磁性珠以及5微摩的人类免疫球蛋白G (hIgG) 对其进行培养。在此之后对所述的珠进行三次洗涤, 并且在LB培养基中对其进行过夜的培养, 用以对所述的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc) 的结合群体进行扩增。第二轮的磁性筛选按照与第一轮相同的方式来进行, 利用下述的物质开始反应: 3×10^8 细胞个来自于第一轮中富集的群体, 600纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc-biot), 10微摩的人类免疫球蛋白G (hIgG), 以及 5×10^8 个带有链霉亲和素 (SA) 涂层的磁性珠。

[0309] 经过两轮的磁性筛选之后, 在Becton Dickinson FACS Aria流式细胞仪上进行其余轮的筛选。在所述的第一轮的荧光激活的细胞分拣技术 (FACS) 中, 利用存在于含有2毫摩的氯化钠以及0.5%的牛血清白蛋白的Tris缓冲的盐水 (TBS-Ca-B) 之中的500纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc-biot), 10微摩的人类免疫球蛋白G (hIgG) 对经过诱导的细胞进行培养, 对其进行洗涤, 并且利用10纳摩的荧光素二级标记物中性链霉亲和素-藻红蛋白 (NAPE) (Invitrogen) 对其进行培养, 在此之后通过流式细胞仪对经过荧光素标记的细胞进行分拣。从所述的第一轮的荧光激活的细胞分拣 (FACS) 群体中扩增得到的细胞被进行诱导并且利用与所述的第一轮中相同的标记条件对其进行第二轮的分拣, 或者可供选择的, 通过使用50纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc-biot) 对其进行分拣。第三轮的分拣是按照与所述的第二轮相同的方式来进行的, 区别仅在于利用100纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子 (EGF) 样结构域11-13 (hN111-13-hFc-biot) 并且在所述的二级标记步骤中进行了27纳

摩的Ypet-Mona-SH3的添加。Mona-SH3能够与存在于所述的展示骨架的C-末端上的一个表位进行结合,而不依赖于存在于所述的N-末端上的随机的肽。在此之后根据所述的576纳米处的荧光性(即,中性链霉亲和素-藻红蛋白结合)与530纳米处的荧光性(Ypet-Mona结合)所具有的比例对细胞进行分拣,其目的在于对存在于各个细胞所具有的骨架展示水平之间的差异进行正态化处理。

[0310] 可供选择的,第三轮的分拣是按照下述的方式来进行的:在含有2毫摩的氯化钠以及0.5%的牛血清白蛋白的Tris缓冲的盐水(TBS-Ca-B)中利用10纳摩的或者50纳摩的未进行生物素化的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc)对经过诱导的细胞进行培养,之后对其进行洗涤,利用荧光素二级20微克/毫升抗-人类免疫球蛋白G-DyLight-488对其进行标记,并且根据530纳米处的荧光性对其进行分拣。第三轮的分拣同样可以按照下述的方式进行:使用50纳摩的或者250纳摩的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc),以及10微摩的人类免疫球蛋白(hIgG),并不进行二级标记,其中已经利用DyLight-488(Thermo Pierce)对所述的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13进行了荧光标记(hN111-13-hFc-Dy488)。来自于荧光激活的细胞分拣技术(FACS)的第三轮群体中的菌落被用来进行质粒的测序,其目的在于发现所述的被编码的肽所具有的序列,其中所述的第三轮的群体中富集了融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc-biot)的结合。

[0311] 通过流式细胞仪对各个克隆物进行测试,测试其所具有的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc)的结合,所述的测试是通过下述的方式来进行的:在含有2毫摩的氯化钠以及0.5%的牛血清白蛋白的Tris缓冲的盐水(TBS-Ca-B)中,利用(A) 50纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc-biot)对经过诱导的细胞进行标记,或者(B) 利用100纳摩或者50纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc-biot)以及随后的10纳摩的链霉亲和素-R-藻红蛋白(SAPE)对经过诱导的细胞进行标记。分别利用27纳摩的Ypet-Mona对细胞进行标记,用以测量肽的展示水平。所述的展示骨架本身(ecpX3)被用来作为一种阴性对照。克隆物Jag-ecpX3以及Rjag-ecpX3分别展示出了一个JAG1片段以及一个变异的片段,其中所述的片段已经表现出了与Notch111-13所进行的结合(表格14以及附图4)。附图4表示的是通过流式细胞仪来进行测试的各个克隆物,测试其所具有的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc)的结合,所述的测试是通过在含有2毫摩的氯化钠以及0.5%的牛血清白蛋白的Tris缓冲的盐水(TBS-Ca-B)中,利用100纳摩的经过了生物素化的处理的融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN111-13-hFc-biot)以及随后的10纳摩的链霉亲和素-R-藻红蛋白(SAPE)对经过诱导的细胞进行标记的方式来实现的,并且根据所述的骨架所具有的展示水平进行正态化的处理。克隆物ecpX3展示出了单独的骨架,并且克隆物Jag-ecpX3展示出了一来自于Jagged 1(RVTCDDYYYGFGCNKFGRPA)的肽,其中所述的

Jagged 1是已知能够与Notch 1进行结合的。所述的通过文库的筛选所得到的克隆物与融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN1₁₁₋₁₃-hFc)所进行的结合要好于所述的来自于Jagged-1的肽。

[0312] 表格14:经历过两轮的磁性筛选以及三轮的荧光激活的细胞分拣技术(FACS)之后,融合有人类免疫球蛋白G1所具有的Fc结构域的人类Notch 1表皮生长因子(EGF)样结构域11-13(hN1₁₁₋₁₃-hFc)的结合剂

[0313]

PHB3324 FPLNTFDLVHELLSR
PHB3325 FLNDIHRFLHWTDLM
PHB3327 PYTFVEQVEYWLHAT
PHB3333 ACVIHFLDRISNILE
PHB3334 FCYIAAFSAMQRQSC
PHB3336 PLYLPEIGWMFGLPT
PHB3337 TVLVIPDLHYLYVDR
PHB3340 FINNVETALDTIYNL
PHB3341 SAKHLHPGRLPPMTK
PHB3343 ATMYAYLERLEAILS
PHB3349 IYPLDALLRHLNSLC
PHB3352 CFPTVVWRELYNLYG
PHB3476 NLDLYLNHLYNTLAG
PHB3478 DFINSMRSHLQSSDQ
PHB3479 EPKCSFCSPLIVPSP
PHB3480 PNCIESFLSSIHDSL

[0314]

PHB3482 TDNALFLETQHYLY
PHB3485 CYPISWLFADAPRN
PHB3486 ELTQLLNALVDVRNS
PHB3487 LLSSFVETMSSILTC
PHB3488 YLLRLPSLEELEGPS
PHB3489 ATCYIINHWWERYII

[0315] 表格15:所述的可溶性Notch受体片段所具有的核苷酸序列

[0316]

```
caggacgtcgacgagtgctcgctgggtgccaaacctgcgagcatcgggcaagtgcataaacacgctgggctccttcgagtgccagtgctgcagggtc
cacgggccccgatgcgagatcgacgtcaacgagtcgctcgaacctgtccagaacgacgccacctgcctggaccagattggggagttccagtgcatct
gcatgcccggtacgaggggtgcactgcgaggtcaacacagacgagtggtccagcagccccctgcctgcacaatggccgctgcctggacaagatcaatga
gttcagtcgagtgccccacgggttcactgggcatctgtgccag
```

[0317] 表格16:所述的可溶性Notch受体片段所具有的氨基酸序列

[0318]

```
qdvdecslganpcehagkcintlgfecqlqgytgpceidvnevcvsnpcqndatcldqigefqicmppyegvhcevtdecasspchlhgrcldki
nefqcecptgftghlcq
```

[0319] 表格17:可以活化的被掩蔽的可溶性的Notch受体片段所具有的核苷酸序列,其中所述的受体片段可以利用血纤维蛋白溶酶来进行活化

[0320]

```
cgcgtaactgtgacgattactactacggattcgggtgtaacaagttgtagaccgccggcgccggatcaggcggagggtcaggaggcggtagcgccgg
gggtccggcgccgggtcaggggaggatcccaaggaccaatgtcaaaagcctatgggacggaggccaggacgtcgacagtgctcgctgggtgccaa
ccccgcgagcatgcgggcaagtgcataacacgctgggtcctctcagtgccagtgtctgcagggtacacgggccccgatcgagatcgacgtcaac
gagtgctgctgaaccctgtccagaacgacgccacctgcctggaccagattggggagttccagtgcattctcatgccccgctacgagggtgtgactgcga
ggtcaacacagacgagtggtccagcagccccctgcctgcacaatggccgctgcctggacaagaatcaatgagttccagtgcgagtgccccacgggttactg
ggcatctgtgccag
```

[0321] 表格18:可以活化的被掩蔽的可溶性的Notch受体片段所具有的氨基酸序列,其中所述的受体片段可以利用血纤维蛋白溶酶来进行活化

[0322] 圆括号描绘的是对所述的各种不同的序列结构域之间的划分

[0323] (肽掩蔽物)-(连接物)-(血纤维蛋白溶酶底物)-(GC连接物)-(可溶性的Notch受体片段)

[0324]

```
(RVTCDYYGFGCNKFGRPA)(GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG)(QGPMFKLWD)(GG)(QDV
DECSLGANPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMP
GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHL CQ)
```

[0325] 表格19:可以活化的被掩蔽的可溶性的Notch受体片段所具有的核苷酸序列,其中所述的受体片段可以利用基质金属蛋白酶(MMP9)来进行活化

[0326]

```
cgcgtaactgtgacgattactactacggattcgggtgtaacaagttgtagaccgccggcgccggatcaggcggagggtcaggaggcggtagcgccgg
gggtccggcgccgggtcaggggaggatccgttcataatgcccttgggtttcctggggccaggaggccaggacgtcgacagtgctcgctgggtgccaa
ccctgcgagcatgcgggcaagtgcataacacgctgggtcctctcagtgccagtgtctgcagggtacacgggccccgatcgagatcgacgtcaacg
agtgctgctgaaccctgtccagaacgacgccacctgcctggaccagattggggagttccagtgcattctcatgccccgctacgagggtgtgactgcgag
gtcaacacagacgagtggtccagcagccccctgcctgcacaatggccgctgcctggacaagaatcaatgagttccagtgcgagtgccccacgggttactg
gcatctgtgccag
```

[0327] 表格20:可以活化的被掩蔽的可溶性的Notch受体片段所具有的氨基酸序列,其中所述的受体片段可以利用基质金属蛋白酶9(MMP9)来进行活化

[0328] 圆括号描绘的是对所述的各种不同的序列结构域之间的划分

[0329] (肽掩蔽物)-(连接物)-(基质金属蛋白酶底物)-(GC连接物)-(可溶性的Notch受体片段)

[0330]

```
(RVTCDYYGFGCNKFGRPA)(GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG)(VHMLPLGFLGP)(GG)(QDV
DECSLGANPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMP
GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHL CQ)
```

[0331] 尽管已经对本发明所具有的优选的实施方式进行了表示以及描述,对于本领域技术人员而言将能够显而易见的是,这样的实施方式仅仅是通过举例的方式被进行提供的。本领域技术人员将能够进行各种变化,改变,以及代替,这并不会背离本发明。应当理解的是,在本发明中所描述的本发明实施方式中的各种可供选择的变量可以被用在本发明的实践当中。其意图是,下述的权利要求对本发明所具有的范围进行了定义并且因此能够将存

在于这些权利要求的范围之内的方法以及结构以及它们的等价变换涵盖在内。

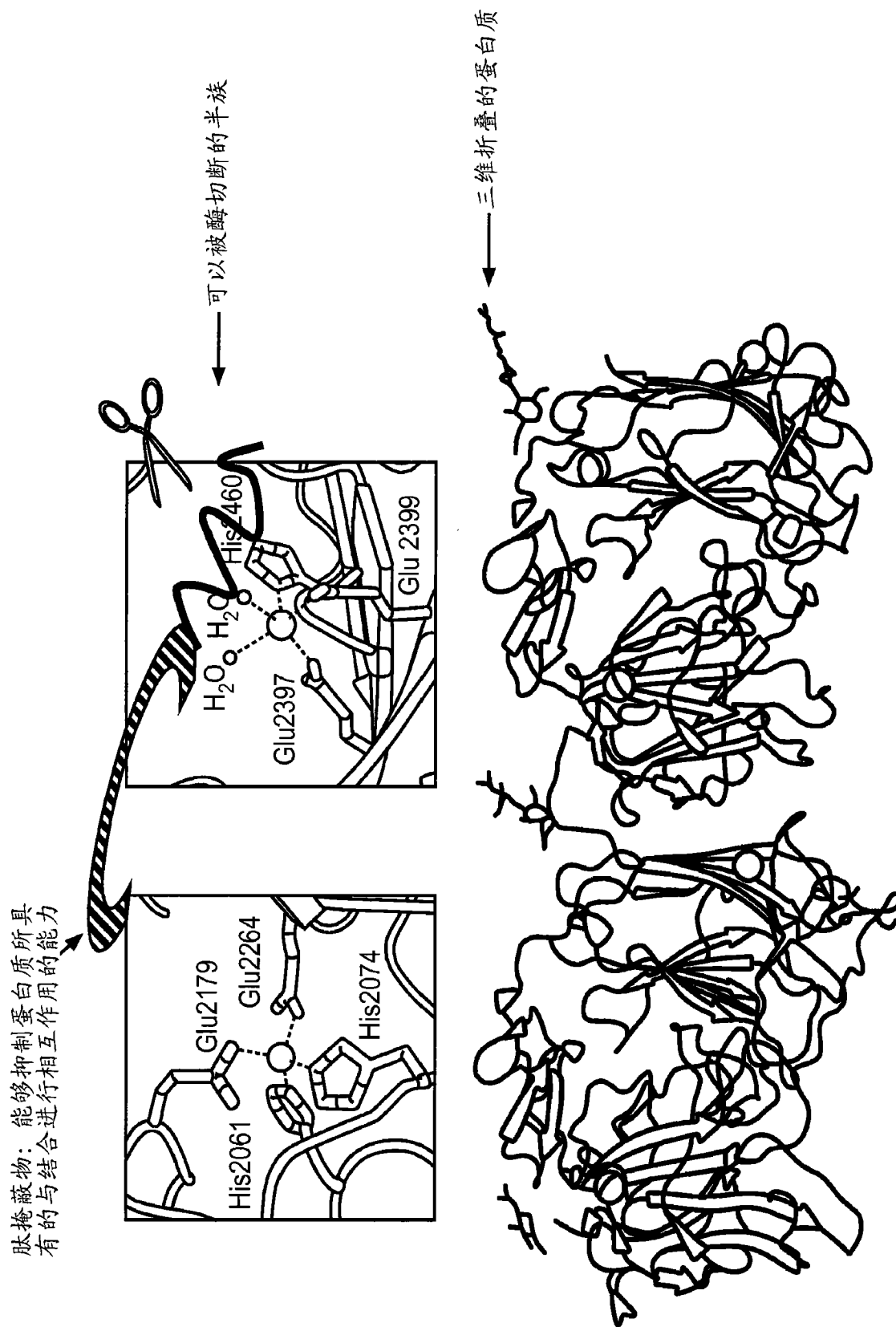
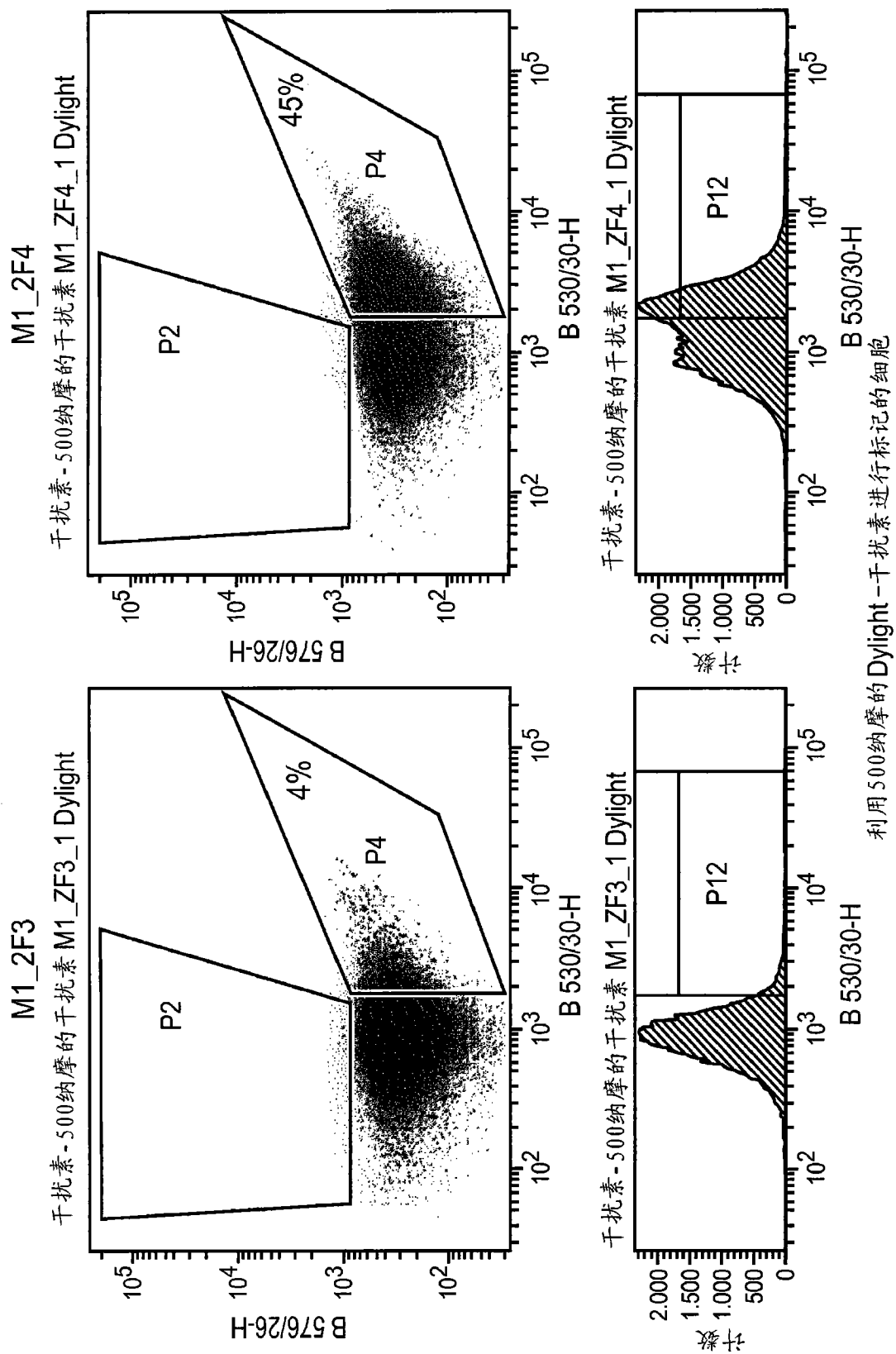


图1



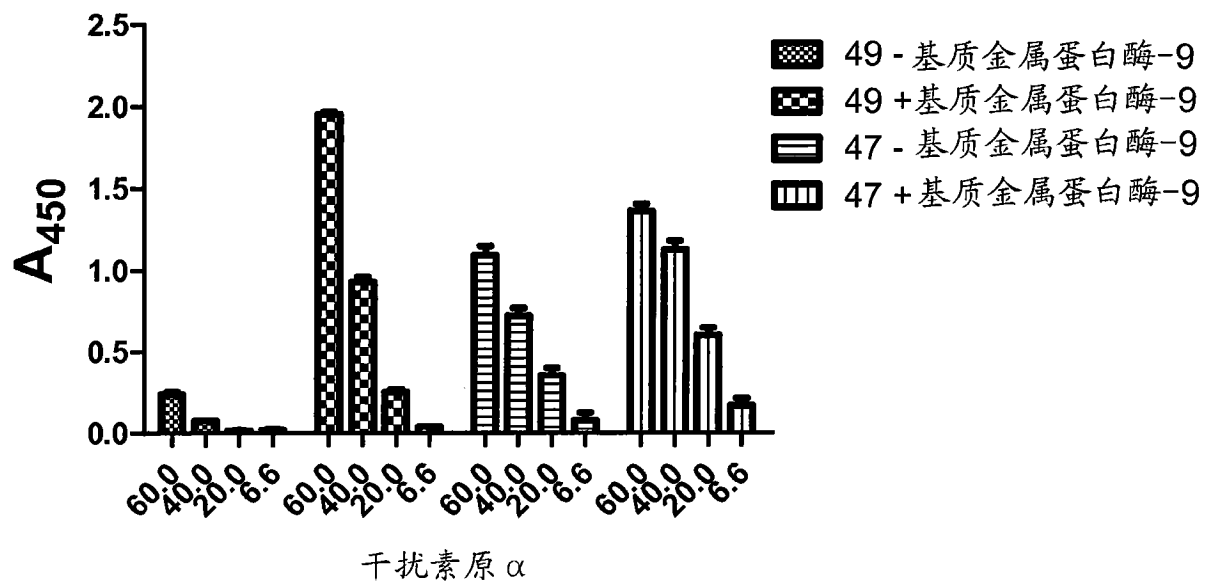


图3

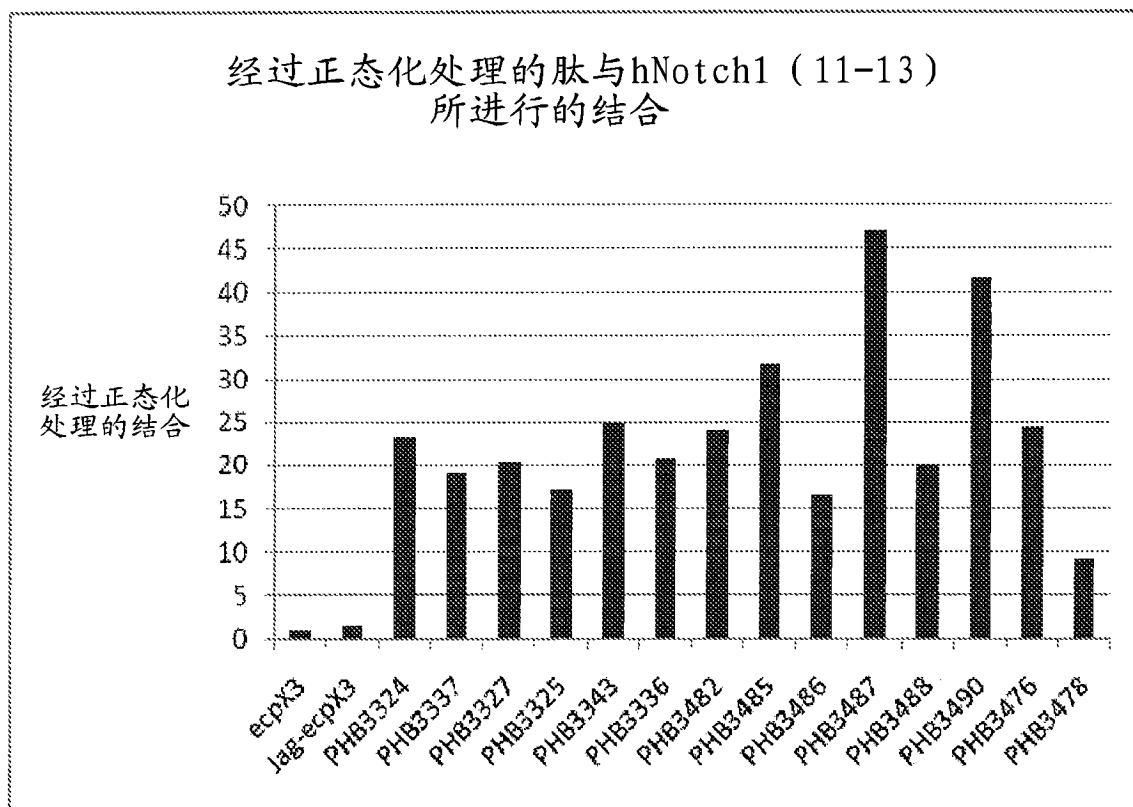


图4