



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123737 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200980131382. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 12

A61K 47/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

P200801796 2008. 06. 13 ES

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/ES2009/070224 2009. 06. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/150284 ES 2009. 12. 17

(71) 申请人 西马生物医学计划公司

地址 西班牙纳瓦拉

(72) 发明人 赫苏斯·玛丽亚·普列托·巴尔图埃
纳

佩德罗·贝龙多·洛佩斯

杰西卡·菲奥拉万蒂

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 楼高潮

权利要求书 2 页 说明书 37 页

序列表 21 页 附图 17 页

(54) 发明名称

用于生物活性化合物施用的轭合物

(57) 摘要

本发明涉及包含 ApoA 分子或其功能等价变体以及治疗所需化合物的轭合物,其中两种组分共价连接。本发明还涉及所述轭合物在特异性靶向所述化合物至显示 ApoA 分子特异性结合位点组织的治疗中的应用。

1. 一种轭合物,其包括:
 - (i) Apo A 分子或其功能等价变体,以及
 - (ii) 治疗所需的化合物其中组分 (i) 和 (ii) 共价结合。
2. 根据权利要求 1 所述的轭合物,其中所述 Apo A 分子选自以下物质组成的组中: ApoA-I、ApoA-II、ApoA-III、ApoA-IV 和 ApoA-V 或其功能等价变体。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的轭合物,其中所述 Apo A 分子选自人 Apo A 和鼠 Apo A。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的轭合物,其中所述组分 (ii) 是多肽。
5. 根据权利要求 4 所述的轭合物,其中所述组分 (i) 和 (ii) 形成单个多肽链。
6. 根据权利要求 5 所述的轭合物,其中所述组分 (i) 的 C 末端结合至组分 (ii) 的 N 末端或其中组分 (i) 的 N 末端结合至组分 (ii) 的 C 末端。
7. 根据权利要求 4-6 中任一项所述的轭合物,其中所述组分 (ii) 是干扰素。
8. 根据权利要求 7 所述的轭合物,其中所述干扰素是人或小鼠干扰素 $\alpha 1$ 或干扰素 $\alpha 5$ 。
9. 根据权利要求 4-6 任一项所述的轭合物,其中所述组分 (ii) 是 TGF- β 抑制剂。
10. 根据权利要求 9 所述的轭合物,其中所述 TGF- β 抑制剂选自 SEQ ID NO :1 (P144) 和 SEQ ID NO :2 (P17) 或其功能等价变体。
11. 根据权利要求 4-10 中任一项所述的轭合物,其中所述组分 (i) 和 (ii) 通过连接肽连接。
12. 根据权利要求 11 所述的轭合物,其中所述连接肽是柔性肽和 / 或含有蛋白酶识别位点。
13. 根据权利要求 12 所述的轭合物,其中所述连接肽选自 SEQ ID NO :3 (APAETKAEPMT)、SEQ ID NO :4 (GAP) 或基质金属蛋白酶 -9 识别位点。
14. 一种包含编码权利要求 5-13 中任一项所述多肽的多核苷酸的多核苷酸或基因构建体。
15. 一种包含权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体的载体。
16. 一种包含权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体或权利要求 15 所述的载体的宿主细胞。
17. 一种包含权利要求 1-14 中任一项所述的轭合物的纳米脂质体颗粒。
18. 根据权利要求 17 所述的纳米脂质体颗粒,其中所述纳米脂质体颗粒是高密度脂蛋白 (HDL)。
19. 一种包含治疗有效量的权利要求 1-13 中任一项所述的轭合物、权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞或权利要求 17 或 18 所述的纳米脂质体颗粒以及药物学上可接受载体或赋形剂的药物制剂。
20. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的轭合物、权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 或 18 所述的纳米脂质体颗粒或权利要求 19 所述的药物制剂在医学中的用途。

21. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的轭合物、权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 或 18 所述的纳米脂质体颗粒或权利要求 19 所述的药物制剂用于肝脏疾病或与免疫系统相关疾病的治疗。

22. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的轭合物、权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 或 18 所述的纳米脂质体颗粒或权利要求 19 所述的药物制剂用于以下疾病的治疗,所述疾病选自以下组中:慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝癌、帕金森氏症、急性间歇性卟啉症、肺纤维化、骨转移、系统性硬化、硬斑病、皮肤癌、光化性角化病、瘢痕疙瘩、烧伤、心肌纤维化、肾纤维化、病毒感染、细菌感染、寄生虫感染、类风湿关节炎和非霍奇金淋巴瘤。

23. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的轭合物、权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 或 18 所述的纳米脂质体颗粒或权利要求 19 所述的药物制剂作为疫苗佐剂、免疫治疗佐剂、结肠癌治疗中的佐剂、抗血管生成药物、肝功能剂或肾功能保护剂的应用。

24. 一种组合物,包含:

(a) 第一组分,其选自权利要求 1-13 中任一项所述的轭合物、权利要求 14 所述的多核苷酸或基因构建体、权利要求 15 所述的载体、权利要求 16 所述的宿主细胞、权利要求 17 或 18 所述的纳米脂质体颗粒或权利要求 17 所述的药物制剂,其中组分 (ii) 是 TGF- β 1 抑制肽,以及

(b) 第二组分,其选自免疫刺激细胞因子、编码所述细胞因子的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、TGF- β 1 抑制肽、细胞毒素剂或其组合。

25. 根据权利要求 24 所述的组合物,其中组分 (a) 或组分 (b) 中的所述 TGF- β 1 抑制肽选自肽 p144 和肽 p17。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的组合物,其中组分 (b) 中的所述免疫刺激细胞因子是 IL-12。

27. 根据权利要求 24-26 中任一项所述的组合物用于癌症治疗。

用于生物活性化合物施用的轭合物

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗所需的化合物以特定方式稳定并靶向靶组织的方法领域。特别地,本发明基于载脂蛋白 A 能够靶向治疗所需化合物至所有那些表面结合位点对所述蛋白具有高亲和力的组织。

技术背景

[0002] 应用大分子作为活性组分的新治疗形式的发展,催生了开发稳定并靶向所述分子至其合适细胞靶标的有效形式的需求。要求特异性靶向靶组织的治疗实例包括,基于特异性生长因子的使用或基于在靶组织中取代缺失或缺陷基因的基因的使用的疗法。那些不基于病毒载体的组织特异性系统常常为其低或无的细胞特异性的问题所困扰。

[0003] 已经描述了基于内含治疗性化合物的脂质囊泡靶向治疗性化合物至肝细胞的不同系统,并且其通过存在对肝细胞膜具有亲和性的囊泡表面分子而具有靶向作用。

[0004] 例如, W007130873 公开了通过在所述胶囊表面整合被肝细胞内的脱唾液酸糖蛋白、透明质酸、N-乙酰基半乳糖胺或甘露糖受体所识别的化合物的方式,靶向微囊泡至肝细胞的方法。W002086091 描述了通过在所述纳米囊泡中整合乙型肝炎病毒外壳蛋白的方式靶向纳米囊泡至肝细胞的方法。W0200473684 描述了基于表面含有 ApoA-I 的磷脂盘状囊泡靶向部分疏水性化合物至肝细胞的方法。Lou 等 (World J. Gastroenterol., 2005, 11: 954-959) 描述了基于 HDL 容纳疏水性化合物如胆固醇的能力,应用高密度脂蛋白 (HDL) 作为载体,靶向亲脂性抗癌化合物至肝细胞性肝癌细胞的方法。

[0005] 最后, Kim 等 (Molecular Therapy, 2007, 15: 1145-1152) 描述了基于包含干扰 RNA 且表面具有 ApoA-I 的脂质体的靶向干扰 RNA 至肝细胞的方法。然而,这些方法具有以下缺点: 由于所述化合物存在于囊泡或人工膜内部与磷脂的疏水部分相接触,它们仅能允许运载疏水性化合物。

[0006] 可选地,可通过使用所述化合物与那些可为肝脏特异性捕获的试剂轭合的方式运载亲水性化合物。例如, Kramer 等 (J. Biol. Chem., 1992, 267: 18598-18604) 描述了通过所述化合物与胆汁酸轭合的方式靶向治疗性化合物 (细胞生长抑制剂苯丁酸氮芥以及脯氨酰-4-羟化酶 I-硝基苯-2-氧杂-1,3-叠氮- β - α -丙氨酸-苯丙氨酸-5-羟脯氨酸 (oxaproline)-甘氨酸抑制剂) 至肝细胞的方法。然而,这种轭合方式仅允许运载至肝脏,其阻止了施用治疗所需化合物至其它组织的应用。

[0007] W004082720 描述了通过在由乙型肝炎病毒外壳蛋白形成的伪病毒颗粒中整合所述化合物的方式靶向治疗活性化合物至肝细胞的方法。然而,这些载体存在的问题在于具有缩短的血浆半衰期,其要求持续不断地给药或高剂量给药以达到持续不变的治疗性血浆水平。此外,形成伪病毒颗粒的病毒蛋白产生体液免疫应答。

[0008] W08702061A 描述了通过使用由载脂蛋白 B 或 E 受体结合区与活性组分形成的融合蛋白,靶向化合物至表达 LDL 受体的组织的方法。

[0009] 干扰素的短半衰期的问题已经被 W007021494 解决,其描述了由白蛋白和干扰素

形成的融合蛋白。这些融合蛋白的血浆半衰期约为 14 天。

[0010] 因此,需要用于特异性靶向治疗性化合物至肝细胞的合适载体,并且使轭合物达到长的血浆半衰期。

[0011] 发明概述

[0012] 在第一方面,本发明涉及一种轭合物,其包括:

[0013] (i) Apo A 分子或其功能等价变体,以及

[0014] (ii) 治疗所需的化合物

[0015] 其中组分 (i) 和 (ii) 共价结合。

[0016] 在第二方面,本发明涉及一种多核苷酸或基因构建体,其包括:编码根据本发明的轭合物的多核苷酸,其中治疗所需的化合物 (ii) 是与组分 (i) 形成单链的多肽。

[0017] 在接下来的方面,本发明涉及包含根据本发明的多核苷酸或基因构建体的载体,并涉及包含根据本发明的多核苷酸、基因构建体或载体的宿主细胞,或包含根据本发明轭合物的纳米脂质体颗粒。

[0018] 在另一方面,本发明涉及根据本发明的轭合物、多核苷酸、基因构建体、载体、宿主细胞或纳米脂质体颗粒在药物中的应用。

[0019] 在另一方面,本发明涉及根据本发明的轭合物、多核苷酸、基因构建体、载体、宿主细胞或纳米脂质体颗粒在治疗肝脏疾病或与免疫系统相关疾病中的应用。

[0020] 在另一方面,本发明涉及一种组合物,其包括:

[0021] (a) 第一组分,选自由以下物质构成的组中:根据本发明的轭合物、多核苷酸、基因构建体、载体、宿主细胞、纳米脂质体颗粒或药物制剂,其中组分 (ii) 是一种 TGF- β 1 抑制肽,以及

[0022] (b) 第二组分,选自由以下物质构成的组中:免疫刺激性细胞因子、编码所述细胞因子的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、TGF- β 1 抑制肽、细胞毒素剂或其组合。

[0023] 在另一方面,本发明涉及本发明的组合物在药物以及特别是癌症治疗中的应用。

附图说明

[0024] 图 1. IFN α 表达的动力学。用表达 ApoAI (Apo)、IFN α (IFN)、Apo-IFN(AF) 或 IFN-Apo(IA) 的质粒高压注射 (hydrodynamic injection) BALB/c 鼠。在 6 小时后、第 1 天、第 3 天、第 6 天以及第 9 天,采血并通过 ELISA 分析血清中的 IFN α 水平。典型实验每组 4 只动物,平均值以及平均值的标准误差如图所示。通过重复测量方差分析和 Bonferroni 检验分析结果。质粒 AF 和 IA 诱导的 IFN α 在第 1 天和第 3 天的水平,与质粒 IFN 诱导的 IFN α 水平存在显著性差异 ($p < 0.001$)。

[0025] 图 2. IFN α 1 的肝脏 mRNA 的定量 RT-PCR。每天向三只 BALB/c 鼠高压注射每种质粒。在第 1 天、第 3 天和第 6 天,处死动物并提取肝脏。纯化肝脏 mRNA,用定量 RT-PCR 检测 IFN α 1 基因。典型实验的平均值以及平均值的标准误差如图所示。通过重复测量方差分析和 Bonferroni 检验分析结果。质粒 IFN α 1、AF 和 IA 诱导的 mRNA 水平之间没有显著性差异。

[0026] 图 3. 体温和血清新蝶呤水平。对 BALB/c 鼠施用编码具有 IFN α 的构建体的质粒。在第 3 天采血,通过 ELISA 测量血清新蝶呤 (A) 水平。同时分析体温 (B)。两个独立实

验 ($N = 6$ 只小鼠) 的平均值以及平均值的标准误差如图所示。通过重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 IFN α 组和 ApoAI 对照组相比较。*** $p < 0.0001$ 。

[0027] 图 4. IFN α 1 诱导基因的肝脏 mRNA 的定量 RT-PCR。用表达 IFN α 1 的构建体的质粒高压注射 BALB/c 鼠。在第 3 天, 处死动物并提取肝脏。纯化肝脏 mRNA, 并对 2'-5'OAS(A), USP18(B), ISG15(C) 和 IRF1(D) 基因进行定量 RT-PCR。两个独立实验 ($N = 6$ 只小鼠) 的平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 IFN α 组和 ApoAI 对照组相比较。* $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$ 。

[0028] 图 5. 脾细胞数量及活化的增加。BALB/c 鼠通过高压注射接受具有 IFN α 的不同构建体, 6 天后处死小鼠并分离脾脏。分析脾细胞的数目 (A) 以及 CD4+T 细胞 (B)、CD8+T 细胞 (C)、B 细胞 (D) 和 NK 细胞 (E) 上的早期活化标记 CD69 的表达。典型实验每组 7 只动物, 平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 IFN α 组和 ApoAI 对照组相比较。* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ 。

[0029] 图 6. 在表达 IFN α 的构建体存在下由基因疫苗接种诱导的特异性裂解的上升。通过高压注射表达 β -半乳糖苷酶的质粒和共施用表达具有 IFN α 的不同构建体的质粒作为佐剂来免疫 BALB/c 鼠。7 天后, 静脉内注射加载细胞毒素肽以及高浓度 CFSE 的靶细胞和具有低浓度 CFSE 的对照细胞。24 小时后, 处死动物, 分析靶细胞以及对照细胞的比例以计算特异性裂解的百分数。每组的柱状图代表 (A) 以及每组 3 个动物的典型实验的平均值和平均值的标准误差 (B) 如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 Apo-IFN 和 IFN-Apo 组与 IFN α 相比较。** $p < 0.001$ 。

[0030] 图 7. 不同免疫系统细胞群中 SR-BI 的表达。分离 BALB/c 鼠脾脏中的脾细胞以抗 SR-BI 抗体标记, 并以抗体标记来区分 CD4+T 细胞 (抗 CD4) (A)、CD8+ 淋巴细胞 (抗 CD8) (B)、NK 细胞 (抗 CD49b) (C)、单核细胞 / 巨噬细胞 (抗 CD11b) (D) 或树突细胞 (抗 CD11c) (E)。

[0031] 图 8. 抗肿瘤接种疫苗模型中的佐剂效果。每个处理组 11-17 只 BALB/c 鼠, 用表达 ApoAI (Apo)、IFN α (IFN)、或 IFN-Apo (IA) 的质粒进行高压注射。24 小时后, 用在不完全弗氏佐剂中的细胞毒素肽接种。9 天后, 皮下接种 5×10^6 的 CT26 细胞并随时间观察肿瘤的发病。随时间推移的无瘤小鼠百分比如图所示。通过 Log-rank 检验比较实验组和对照组。*** $p < 0.01$ 。

[0032] 图 9. 循环的白细胞和血小板的动力学。对 BALB/c 鼠施用编码具有 IFN α 的构建体的质粒。在高压注射后的第 1 天从一个组抽血, 在第 3 天从另一个组抽血, 在第 6 天从最后一组抽血。应用 Z1 Coulter 粒子计数器, 依据操作说明书量化白细胞 (A) 和血小板 (B) 数目。两个独立实验 ($N = 4$ 小鼠 / 每天以及每组) 的平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 IFN-Apo 组与 IFN 相比较。*** $p < 0.01$ 。

[0033] 图 10. IFN α 可诱导的基因的脑 mRNA 的定量 RT-PCR。给 BALB/c 小鼠高压注射具有表达 IFN α 的构建体的质粒。在第 1 天, 处死动物并提取大脑。纯化脑 mRNA 并对 USP18(A)、ISG15(B)、2'-5'OAS(C)、Mx1(D) 以及 IRF1(D) 基因进行定量 RT-PCR。两个独立实验 ($N = 5$ 小鼠 / 每组) 的平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 IFN-Apo 组与 IFN 相比较。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。这是

一个代表两个的实验。

[0034] 图 11. 循环高密度脂蛋白 (HDLs) 中融合蛋白的整合。施用编码具有 IFN α 的构建体的质粒给 BALB/c 小鼠。24 小时后, 采血并从获得的血清中通过 NaBr 梯度差速离心提取 HDLs。通过干扰素生物测定, 细胞病变效应保护测定来分析不同组的 HDLs 中 IFN α 的存在 (A)。在无 HDLs (HDLs-) 血清样品中以及含有 HDLs (HDLs+) 的部分, 用免疫印迹确定载脂蛋白 AI 的存在 (B)。

[0035] 图 12. 施用含有 IFN-Apo 的 HDLs 的血液学效应。相当于 10000IU IFN 的含有 IFN-Apo 的 HDLs、10000IU 重组 IFN 或 PBS 被施用给 BALB/c 小鼠。3 天后, 应用 Z1 Coulter 粒子计数器, 依据操作说明书量化白细胞 (A) 和血小板 (B) 数目。两个独立实验 (N = 4-6 小鼠/每组) 的平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将 IFN-Apo 组与 IFN 相比较。 $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ 。

[0036] 图 13. IL12 诱导的 IFN γ 诱导的上升。高压注射一个表达 IL12 的可被强力霉素诱导的增强子调控的质粒, 以及另一个表达对照构建体或具有 TGF β 抑制子 p17 (A) 或 TGF β 抑制子 p144 (B) 之一的构建体的质粒。4 天后, 通过 ELISA 分析血清中 IFN γ 的浓度。每组 3 个动物的典型实验的平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将实验组与对照组相比较。 $**p < 0.001$ 。

[0037] 图 14. 对抗 CT26 肿瘤发展的保护。以不完全弗氏佐剂中的细胞毒素肽 AH1 接种 BALB/c 小鼠。7 天后, 高压注射表达 TGF β 抑制子或以 ApoA-I 作为对照的构建体。再过 7 天, 皮下接种 5×10^5 的 CT26 细胞并随时间推移观察肿瘤的发病。随时间推移的无瘤小鼠百分比如图所示。通过 Log-rank 检验比较实验组和对照组。 $*p < 0.05$; $**p < 0.001$ 。

[0038] 图 15. 循环高密度脂蛋白 (HDLs) 中 Apo- 连接子 -P144 融合蛋白的整合。对 BALB/c 小鼠施用编码具有 Apo 或 Apo- 连接子 -P144 的构建体的质粒。24 小时后, 采血并从所获得的血清中通过 NaBr 梯度差速离心提取 HDLs。在含有 HDLs 的部分, 以免疫印迹确定载脂蛋白 AI 的存在。

[0039] 图 16. 在施用含有 Apo- 连接子 -P144 的 HDLs 后由 IL12 诱导的 IFN γ 诱导的上升。高压注射一个表达 IL12 的可被强力霉素诱导的增强子调控的质粒, 以及一个表达对照构建体 (Apo) 或 Apo- 连接子 -P144 的质粒。最后一组施用 IL12 质粒并腹腔注射 $14 \mu\text{g}$ / 每只小鼠的含有 Apo- 连接子 -P144 的 HDLs。4 天后, 通过 ELISA 检测血清中 IFN γ 的浓度。每组 3 个动物的典型实验的平均值以及平均值的标准误差如图所示。以重复测量方差分析和 Dunnett's 检验分析结果, 将实验组与对照组相比较。 $**p < 0.01$ 。

[0040] 发明详述

[0041] 1. 本发明的轭合物

[0042] 本发明的作者观察到, 由 Apo A 蛋白或其功能等价变体与治疗所需分子的轭合物在施用给患者后, 显示出比给患者施用未轭合的治疗所需分子更大的血清半衰期。此外, Apo A 与治疗所需分子的轭合物被特异性运载至患者肝脏, 其极大地促进了肝脏疾病治疗并减少了治疗性分子在其它组织中产生的副作用。

[0043] 因此, 在第一个方面, 本发明涉及一种轭合物, 其包括:

[0044] (i) Apo A 分子或其功能等价变体, 以及

[0045] (ii) 治疗所需的化合物

[0046] 其中组分 (i) 和 (ii) 共价耦合。

[0047] 不受任何理论限制,据认为,用于肝脏组织的耦合物的亲和力,是基于该事实即所述组织具有 Apo A 蛋白的特异性受体,其拥有捕获表面具有 ApoA-I 的 HDLs 的天然功能。另外,耦合物半衰期的延长看起来与 Apo A 分子在有机体中所显示的长半衰期相关(在 Apo A-I 的情况下,在人体大约为 35 小时或在小鼠体内为 10 小时)。此外,还存在表面表达 Apo A-I 特异性受体的其它细胞,以运载到其它组织。

[0048] 1.1 Apo A 分子

[0049] 在本发明的上下文中,“Apo A 蛋白”应理解为形成高密度脂蛋白(HDLs)部分的 Apo A 家族中的任何成员,其能够与肝细胞表面受体特异性相互作用,从而确保其运载偶联至所述 Apo A 蛋白的所需分子到该器官的能力。可用于本发明的 Apo A 分子优选自由 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-III、ApoA-IV 以及 ApoA-V 或其功能等价变体所组成的组中。

[0050] 在一优选的具体实施方式中,本发明所使用的 Apo A 蛋白是 ApoA-I 蛋白。在本发明的上下文中,ApoA-I 应理解为形成高密度脂蛋白(HDLs)组分的前-proApoA-I 蛋白的成熟形式。ApoA-I 作为含有分泌信号序列的前体(前-proApoA-I)被合成,其中所述分泌信号序列被切除以产生前体。该信号序列由 18 个氨基酸组成,前导肽由 6 个氨基酸组成而蛋白的成熟形式由 243 个氨基酸组成。优选缺乏信号肽的并被加工过的成熟形式蛋白。在一优选的具体实施方式中,ApoA-I 蛋白是人源的并且其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1(UniPort 中的登录号为 P02647)所示。在另一优选的具体实施方式中,ApoA-I 是鼠源的特别是来自于小鼠,并且其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2(UniPort 中的登录号为 Q00623)所示。在另一优选的具体实施方式中,ApoA-I 是鼠源的特别是来自于大鼠,并且其氨基酸序列如 SEQ ID NO:3(UniPort 中的登录号为 P04639)所示。

[0051] ApoA-I 的功能等价变体应理解为所有由前述人或鼠 ApoA-I 序列通过插入、替换或缺失一个或多个氨基酸所产生的,并实质上完整保持了与在肝细胞中形成 HDL 受体的所谓的“B 类 I 型清道夫受体”(SR-BI)相互作用能力的那些多肽。基本上如 Monaco 等(EMBO J., 1987, 6:3253-3260)所描述的,通过 ApoA-I 结合肝实质细胞膜的研究或通过检测 ApoA-I 或其变体抑制 HDL 结合肝细胞膜受体的能力,来检测其与 HDL 受体相互作用的能力。ApoA-I 变体结合肝细胞膜的离解常数优选至少是 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 、 10^{-5}M 或 10^{-4}M 。

[0052] 本发明预期的 ApoA-I 变体包括与 ApoA-I 多肽具有至少 60%、65%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、90% 或 95% 相似性或同一性的多肽。两种肽之间的同一性程度通过计算机算法以及本领域技术人员所熟知的方法来确定。两个氨基酸序列之间的同一性优选通过 BLASTP 算法(BLASTManual, Altschul, S. 等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. 等, J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410)来确定。

[0053] 本发明使用的 ApoA-I 变体优选具有比天然 ApoA-I 更长的血清半衰期,使得 ApoA-I 血清水平达到比用 ApoA-I 所观察到的更高的水平。确定蛋白质以及特别是 ApoA-I 的血清半衰期的方法是本领域公知的,其中包括,Eisenberg, S 等(J. Lipid Res., 1973, 14:446-458)、Blum 等(J. Clin. Invest., 1977, 60:795-807)以及 Graversen 等(J. Cardiovasc Pharmacol., 2008, 51:170-177)所描述的基于以标记蛋白标记代谢的方法。具有更长半衰期的所述变体的例子有,例如,被称为 Milano 的变体(其含有 R173C 突变)。

[0054] 1.2 治疗所需的化合物

[0055] 在本发明中,“治疗所需的化合物”应理解为任何能够预防或消除疾病症状的化合物。本发明首先考虑了易受共价修饰而基本上不丧失其生物活性的任意治疗性化合物的应用,诸如其可被辄合至 ApoA-I 或其功能等价变体。因此,本发明考虑了小有机分子、肽、拟肽物、类肽、蛋白质、多肽、糖蛋白、低聚糖、核酸等作为治疗有效成分的应用。

[0056] 举例来说,可辄合至 ApoA-I 或其功能等价变体的化合物包括抗生素、胆碱酯酶剂、阿托品、东莨菪碱、拟交感神经药、催眠药、镇静剂、抗癫痫药、类鸦片、镇痛剂、抗炎药、组胺、脂质衍生物、平喘药、解热镇痛药、黄嘌呤、渗透性利尿剂、水银化合物、噻嗪化物以及磺胺剂、碳酸酐酶抑制剂、有机硝酸盐、抗高血压药、强心甙、抗心律失常药物、催产素、前列腺素、生物碱、抑制分娩药、驱虫剂、抗原虫药物、抗疟疾药物、杀阿米巴药、磺胺类药、青霉素类、trimetropin、头孢菌素类、磺胺甲恶唑、抗真菌药、喹诺酮、抗病毒药、抗生素、氨基糖苷类、四环素、氯霉素、红霉素、烷基化剂、激素、抗代谢物、抗生素、放射性同位素、硫唑嘌呤、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、甲氨蝶呤、抗凝剂、溶栓药物、抗血小板药物、腺垂体激素、甲状腺和抗甲状腺激素、雌激素和孕酮、雄激素、促肾上腺皮质激素、胰岛素、甲状旁腺激素、维生素 D 的类固醇衍生物、维生素、(水溶性维生素诸如维生素 B 复合物以及抗坏血酸或脂溶性维生素诸如维生素 A、D、K 或 E)、抗组胺药、抗癌抗菌素、抗病毒药物、抗真菌化合物。优选使用可有效治疗疾病感染或在肝脏中有其来源的化合物。

[0057] 在一优选的具体实施方式中,本发明辄合物的组分(ii)包含多肽链。在一优选的具体实施方式中,ApoA-I 多肽与形成组分(ii)的多肽形成单链多肽。本发明涵盖了两个多肽的两个相对方位。因此,在一优选的具体实施方式中,组分(i)的 C 末端结合到组分(ii)的 N 末端。在另一优选的具体实施方式中,组分(i)的 N 末端结合到组分(ii)的 C 末端。优选地,当 ApoA-I 辄合物由单链多肽形成时,它们不通过下列方式形成:

[0058] (i) 金黄色葡萄球菌 A 蛋白经 C 末端连接 ApoA-I 蛋白 N 末端

[0059] (ii) ApoA-I 蛋白经 C 末端连接血管肠肽(VIP-1)N 末端

[0060] (iii) 组分(ii)是免疫球蛋白重链或纤维蛋白溶酶原片段

[0061] (iv) 四连接素三聚结构域(TTSE)经 C 末端连接 ApoA-I 蛋白 N 末端。

[0062] 可使用本发明的辄合物运载至肝脏的多肽包括促红细胞生成素(EPO)、瘦素、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、生长激素释放激素(GHRH)、促性腺激素释放激素(GnRH)、促甲状腺激素释放激素(TRH)、催乳素释放激素(PRH)、褪黑激素释放激素(MRH)、催乳素抑制激素(PIH)、抑生长素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促生长激素或生长激素(GH)、促黄体激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH 或甲状腺刺激激素)、催乳素、催产素、抗利尿激素(ADH 或后叶加压素)、褪黑激素、苗勒管抑制因子、降血钙素、甲状旁腺激素、胃泌素、缩胆囊素(CCK)、精氨酸加压素、甲状腺激素、氧化偶氮甲烷、三碘甲状腺氨酸、白细胞抑制因子、双调蛋白、可溶性血栓调节蛋白、干细胞因子、成骨蛋白 1、骨形成蛋白、巨噬细胞生长因子(MGF)、黑瘤生长刺激因子、调蛋白(heregulins)、促黑细胞激素、胰泌素、胰岛素样生长因子 I(IGF-I)、胰岛素样生长因子 II(IGF-II)、心房利钠肽(ANP)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、胰岛素、胰高血糖素、抑生长素、胰多肽(PP)、瘦素、神经肽 Y、肾素、血管紧张素 I、血管紧张素 II、VIII 因子、IX 因子、组织因子、因子 VII、X 因子、凝血酶、凝血因子 V、因子 XI、因子 XIII、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 3(IL-3)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 5(IL-5)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素 7(IL-7)、白细胞介素

8(IL-8)、白细胞介素 9(IL-9)、白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素 11(IL-11)、白细胞介素 12(IL-12)、白细胞介素 13(IL-13)、白细胞介素 14(IL-14)、白细胞介素 15(IL-15)、白细胞介素 16(IL-16)、白细胞介素 24(IL-24)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、CD3、CD134、CD137、ICAM-1、LFA-1、LFA-3、趋化因子包括 RANTES1 α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、神经生长因子 (NGF)、由 Wilms' 肿瘤抑制基因编码的 WT1 蛋白、血小板衍生的生长因子 (PDGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、骨形成蛋白 (BMPs)、成纤维细胞生长因子 (FGF 和 KGF)、表皮生长因子 (EGF 及相关因子)、血管内皮生长因子 (VEGF)、粒细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、神经胶质生长因子、角质细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经胶质细胞源系、神经营养因子 (GDNF)、 α 1- 抗胰蛋白酶、肿瘤坏死因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、心肌营养蛋白 1 (CT-1)、制瘤素 M (OSM)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 (A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10、A11、A12、A13、B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、C1、D1、E1、E2、F1、F2、G1、H1、I1 以及 I2)、环孢霉素、纤维蛋白原、纤连蛋白的 EDA 结构域、乳铁蛋白、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、糜蛋白酶、免疫球蛋白、水蛭素、超氧化物歧化酶、伊米苷酶、 β - 葡糖脑苷脂酶、重组阿葡糖苷酶 - α 、 α -L 型艾杜糖苷酶、艾杜糖醛酸 -2- 硫酸酯酶、加硫酶、人 α - 半乳糖苷酶 A、 α -1 蛋白酶抑制剂、乳糖酶、胰酶 (脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶)、腺苷脱氨酶、免疫球蛋白、白蛋白、A 型和 B 型肉毒杆菌毒素、胶原酶、人脱氧核糖核酸酶 I、透明质酸酶、木瓜酶、左旋天门冬酰胺酶、重组水蛭素、链激酶、胆色素原脱氨酶 (PBGD)、细胞转化因子 β (TGF- β) 抑制剂肽、IL10 抑制剂、FoxP3 抑制剂、TNF α 抑制剂、血管内皮生长因子抑制剂、PD-1 抑制剂和 CD152 抑制剂。

[0063] 在一优选的具体实施方式中,本发明轭合物的组分 (ii) 是干扰素 (IFN)、干扰素分为 I 型、II 型和 III 型。I 型干扰素是一种具有细胞因子活性的多肽家族,最初因其在体外细胞系病毒感染中的抑制活性而被发现 (Pestka, S., Krause, C. D. 和 Walter, M. R. 2004. Immunol Rev. 202 :8-32), 并且其特征在于结合所谓的 IFN α 受体 (IFNAR)。依据其序列上的同源性, I 型干扰素分为干扰素 α (IFN- α)、干扰素 β (IFN- β) 和干扰素 ω (IFN- ω)。IFN- α 和 IFN- β 共享表达在大多数有核细胞表面的单二聚体受体。鉴于其启动促进感染细胞凋亡的死亡以及抑制病毒复制同时有利于抗原提呈的机制,这些细胞因子在针对各种类型病毒感染的免疫应答中的功能非常重要。最近有实验记载,其还可以在免疫应答中通过直接激活 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞以及树突细胞的活性而行使功能 (Le Bon A. 等, 2003. Nat. Immunol. 4 :1009-1015 ; LeBon A. 等, 2006. J. Immunol. 176 :4682-4689 ; Le Bon A. 等, 2006. J Immunol. 176 :2074-8)。II 型干扰素的特征在于其结合干扰素 γ 受体 (IFNGR) 并仅包括 IFN- γ 一个成员。III 型干扰素通过由 IL-10 受体 2 (IL10R2) 和 IFN λ 1 受体 (IFNLR1) 形成的复合物转导信号,并由三种称为 IFN λ -1、IFN λ -2 和 IFN λ -3 的干扰素 λ 组成。

[0064] 在一优选的具体实施方式中,组分 (ii) 是 I 型干扰素如 IFN- α 、IFN- β 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、IFN- τ 和 IFN- ω 。在一特别的具体实施方式中,本发明组合物中的至少一种 I 型干扰素选自干扰素 α (IFN- α) 和干扰素 β (IFN- β)。当所述 I 型干扰素为 IFN- α 时,后者可对应由人 IFN- α 基因家族的任一基因成员所编码的任意干扰素。在一特别的具体实施方式中,至少一种 I 型干扰素是选自 IFN- α 2a、IFN- α 2b、IFN- α 4、IFN- α 5、IFN- α 8 和其组合 (包括其在药物制剂中与其它物质的组合) 的 IFN- α 。在一更特别的具体实施方式中,所述干扰素是 IFN- α 1, 优选是人源干扰素。在一优选的具体实施方式中,所

述干扰素是 IFN- α 5。

[0065] I 型干扰素的类型列表,特别是可用于本发明的 IFN- α 和 IFN- β ,可参见 Bekisz 等 (Growth Factors, 2004 ;22 :243-251) 以及 Petska 等 (Immunological Reviews, 2004 ; 202 :8-32)。此外,本发明提供了包含一种以上类型干扰素的轭合物组合的应用,例如 IFN- α n1 (类淋巴母细胞衍生物) 或 IFN- α 3 (以仙台病毒 (或另一种病毒) 或病毒颗粒刺激人白细胞所产生的干扰素组合)。

[0066] 所使用的 I 型干扰素的来源不是本发明的关键方面。I 型干扰素可以是天然的,从生物液体或组织提取并纯化的,或通过传统的重组基因工程以及如 Sambrook 和 Russel 所描述的那些方法 (“Molecular Cloning: to Laboratory manual” of J. Sambrook, D. W. Russel Eds. 2001, 第三版, Cold Spring Harbor, New York), 通过合成工艺或通过本领域所描述的任何其它常规技术制备。

[0067] 在本发明一特别的具体实施方式中,本发明组合物中的至少一种 I 型干扰素是聚乙二醇形式的。制备聚乙二醇形式的干扰素的一些例子可参见 US5762923 和 US5766582。另外,也可以使用一些商用干扰素,聚乙二醇化的或非聚乙二醇化形式。这包括,不受任何限制的,来源于 Hoffmann LaRoche Inc 的 ROFERON-A (人重组 IFN- α 2a) 以及 PEGASYS (聚乙二醇化 IFN- α), 来源于 Schering Corp 的 INTRON-A (人重组 IFN- α 2b) 以及 PEG-INTRON (聚乙二醇化 IFN- α 2b), 来源于 Interferon Sciences 的 ALFERON-N (IFN- α 3n, 天然干扰素的组合), 或来源于 InterMune Pharmaceuticals Inc 的 IFNERGEN (IFN- α con1), 其序列是不与天然序列完全一致的共有序列。还包括 IFN- β 制剂,例如 Biogen Idec 的 AVONEX (IFN- β 1a), EMD Serono, Inc 的 REBIF (IFN- β 1a), 以及 Bayer Health Care 的 BETASERON (IFN- β 1b)。

[0068] 在一优选的具体实施方式中,本发明的轭合物由 ApoA-I 经其 C 末端并通过柔性连接子与干扰素 α 1 分子 N 末端融合形成。在另一优选的具体实施方式中,本发明的轭合物由干扰素 α 1 分子经其 C 末端并通过柔性连接子与 ApoA-I 分子 N 末端融合形成。

[0069] 在另一优选的具体实施方式中,组分 (ii) 是 TGF- β 抑制剂。能作为根据本发明轭合物部分的 TGF- β 抑制剂包括选自 TGF- β 1 受体序列的肽抑制剂,其结合 TGF- β 1 的受体结合位点从而阻断受体结合。这些类型的肽在 W0200031135 中有描述,其中的全部内容通过引用纳入本文。在一优选的具体实施方式中,TGF- β 1 抑制肽来源于 TGF- β 1 IIII 型受体。在一更优选的具体实施方式中,抑制肽是具有序列为 TSLDASIIWAMMQN (SEQ ID NO :4) 的肽 p144。

[0070] 本发明同样提供了抑制肽在抑制 TGF- β 1 与 TGF- β 1 受体相互作用以及所述相互作用引发的信号中的应用,鉴定这样的肽的噬菌体展示基因文库已被 W0200519244 描述,其中的全部内容通过引用纳入本文。在一优选的具体实施方式中,抑制肽是肽 p17,其特征在于序列为 KRIWFIPRSSWYERA (SEQ ID NO :5) 及其截短的变体,其基本上保留了抑制 TGF- β 1 与 TGF- β 1 受体相互作用的能力,这些在 W02007048857 中已有描述,其中的全部内容通过引用纳入本发明。

[0071] 1. 3ApoA 组分与治疗活性化合物之间的连接元件

[0072] 包含 Apo A 蛋白和具有天然肽的第二组分的本发明的轭合物,含有直接连接 Apo A 蛋白和所述第二组分的键,或者,可选择地,含有在 Apo A 蛋白和具有天然肽的所述第二

组分之间作为连接子的其它氨基酸序列。根据本发明,所述非天然中间氨基酸序列在结构域之间作为铰链区,使得它们相互之间可独立移动同时保持各自结构域的三维构型。从这个意义上来说,本发明的优选非天然中间氨基酸序列应当是以允许这种移动的结构延展性为特征的铰链区。在一特别的具体实施方式中,所述非天然中间氨基酸序列是非天然柔性连接子。在一优选的具体实施方式中,所述柔性连接子是长度为 20 个氨基酸或更短的柔性连接肽。在一更优选的具体实施方式中,连接肽含有 2 个或多个选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的氨基酸。在本发明的一优选具体实施方式中,所述柔性连接子是多聚甘氨酸连接子。可能的连接子/间隔区序列的例子包括 SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO :6)、AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO :7) 或 GGS GGAP (SEQ ID NO :8)。这些序列已用于结合设计的卷曲螺旋至其它蛋白结构域 (Muller, K. M., Arndt, K. M. 和 Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328 :261-281)。所述连接子优选包含氨基酸序列 GGGVEGGG (SEQ ID NO :9) 或由其组成。

[0073] 连接区域的作用是在 Apo A 蛋白和组分 (ii) 之间提供空间。从而确保 ApoA 的二级结构不受组分 (ii) 存在的影响,反之亦然。间隔区优选具有肽性质。连接肽优选包含至少 2 个氨基酸、至少 3 个氨基酸、至少 5 个氨基酸、至少 10 个氨基酸、至少 15 个氨基酸、至少 20 个氨基酸、至少 30 个氨基酸、至少 40 个氨基酸、至少 50 个氨基酸、至少 60 个氨基酸、至少 70 个氨基酸、至少 80 个氨基酸、至少 90 个氨基酸或大约 100 个氨基酸。

[0074] 连接子可通过共价键结合本发明轭合物的两种组分侧翼的组分,并且优选间隔区基本上是非免疫原性的和/或不包含任何半胱氨酸残基。以类似的方式,间隔区的三维结构优选是线性的或基本上是线性的。

[0075] 间隔肽或连接肽的优选例子包括那些已用于结合蛋白质但基本上不削弱所结合蛋白功能的,或至少基本上不削弱其中一个结合蛋白的功能的肽。更优选的,已用于结合蛋白的间隔区或连接子包含卷曲螺旋结构。

[0076] 连接子可包括在四连接素中形成 β 片层的四连接素的 53-56 残基,以及在四连接素中形成转角 (turn) 的 57-59 残基 (Nielsen, B. B. 等, FEBS Lett. 412 :388-396, 1997)。片段的序列是 GTKVHMK (SEQ ID NO :10)。该连接子具有一个优点,当其存在于天然四连接素中时,其通过 CRD 结构域结合三聚结构域,并因而适于连接三聚结构域至另一普通结构域。此外,生成的构建体预期不比没有连接子的构建体具有更强的免疫原性。

[0077] 另外,人纤连蛋白来源的连接链 3 中的子序列可用作连接子,所述子序列对应于氨基酸 1992-2102 (SWISSPROT 编号,登记号 P02751)。优选应用对应于氨基酸 2037-2049 的子序列 PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO :11),其中更优选的是对应于氨基酸 2038-2042 的子序列片段 GTSGQ (SEQ ID NO :52)。该构建体具有不易蛋白裂解的优点,并且,由于纤连蛋白在血浆中高浓度存在,其免疫原性不强。

[0078] 可选地,合适的肽连接子可以是基于小鼠 IgG3 上游铰链区的 10 个氨基酸残基序列。该肽 (PKPSTPPGSS, SEQ ID NO :12) 已被用于生产通过卷曲螺旋二聚的抗体 (Pack P. 和 Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31 :1579-1584),并可用作根据本发明的间隔肽。更优选的是人 IgG3 上游铰链区的相应序列。预期人 IgG3 序列在人体中不具有免疫原性。

[0079] 在一优选的具体实施方式中,连接肽选自序列 APAETKAEPMT (SEQ ID NO :13) 的肽以及具有序列 GAP 的肽。

[0080] 可选地,本发明轭合物的两种组分可通过肽连接,所述肽的序列含有蛋白酶切割靶点,因而能将 Apo A-I 从组分 (ii) 分离。适合整合入本发明多肽的蛋白酶切位点包括肠激酶 (切割位点 DDDDK, SEQ ID NO :14)、Xa 因子 (切割位点 IEDGR, SEQ ID NO :15)、凝血酶 (切割位点 LVPRGS, SEQ ID NO :16)、TEV 蛋白酶 (切割位点 ENLYFQG, SEQ ID NO :17)、PreScission 蛋白酶 (切割位点 LEVLFQGP, SEQ ID NO :18)、内含子等等。在一优选的具体实施方式中,切割位点是表达在肿瘤组织、发炎组织、或肝脏中使得轭合物一到达肝脏就发生 Apo A 与组分 (ii) 分离的蛋白酶切割位点。在一优选的具体实施方式中,连接子含有基质金属蛋白酶-9 识别位点 (切割位点 LFPTS, SEQ ID NO :19)。

[0081] 2. 获得本发明轭合物的方法

[0082] 本发明的轭合物可使用本领域技术人员熟悉的任何方法获得。因此可通过任何标准方法获得 Apo A 蛋白或所述蛋白质的变体。例如,可从个人或实验动物的血清样品中纯化 Apo A-I 蛋白 (W09807751, W09811140, Jackson 等,1976, Biochim Biophys Acta. 420 : 342-349, Borresen, A. L. 和 Kindt, T. J.,1978, J. Immunogenet. 5 :5-12 以及 Forgez, P, 和 Chapman, M. J.,1982, J. Biochem. Biophys. Methods, 6 :283-96)。可选地, Apo A-I 蛋白可在异种生物例如大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母、昆虫细胞中应用本领域已知的方法表达 cDNA 获得,所述方法已描述于 W007023476、W09525786、W08702062、Feng 等, (Protein. Expr. Purif., 2006, 46 :337-42)、Pyle 等,1996 Biochemistry. 35 :12046-52)、Brissette 等, (Protein Expr. Purif. 1991, 2 :296-303) 以及 Bonen, D. K. (J. Biol. Chem., 1997, 272 : 5659-67)。

[0083] 一旦有足够量的纯化 Apo A 蛋白,应当将其轭合至所需的治疗性化合物。可以通过不同方式轭合治疗活性组分 (ii) 至 Apo A 分子。一种可能性是,官能团与治疗活性组分在不干扰所述组分活性的位置直接轭合。如本发明所理解的,官能团涉及分子中的一组特殊原子,其是所述分子具有特征性化学反应的原因。官能团的例子包括但不限于以下物质组成的组:羟基、醛基、烷基、烯基、炔基、酰胺、氨甲酰、伯胺、仲胺、叔胺以及季胺、氨基、叠氮化物、偶氮基 (二酰亚胺)、苄基、碳酸盐、酯、醚、乙醛酰、卤烷基、卤甲酰基、亚胺、酰亚胺、酮、马来酰亚胺、异腈、异氰酸盐、羰基、硝酸盐、亚硝酸盐、硝基、亚硝基、过氧化物、苯基、磷化氢、磷酸盐、膦酰基、吡啶基、硫化物、磺酰基、亚磺酰基、硫酯、硫醇和氧化 3,4-二羟基苯丙氨酸 (DOPA) 基团。所述基团的例子是特异性地与 Apo A 分子中的硫醇基反应的马来酰亚胺或乙醛酰基团,以及与 Apo A 分子中的伯胺反应的氧化 3,4-二羟基苯丙氨酸 (DOPA) 基团。

[0084] 另一种可能性是,通过应用同源或异源双官能团轭合治疗活性组分 (ii) 至 Apo A 分子。双官能团可首先轭合至治疗活性化合物,然后轭合至 Apo A 蛋白,或者,可选地,可轭合双官能团至 Apo A 蛋白,然后将其轭合至治疗活性化合物。这些类型的轭合物的示例包括被称为酮肟 (US20050255042 中有描述) 的轭合物,其中轭合物的第一组分包含结合异源双官能团中的酮官能团的氨基,其顺序结合轭合物第二组分中的氨基基团。

[0085] 在其它具体实施方式中,用于轭合本发明轭合物组分 (i) 和 (ii) 的试剂可以是光分解的、化学的、热处理或酶处理的。特别需要使用能够在细胞靶中以酶水解的连接剂,使得治疗活性化合物仅在细胞内部释放。能够在细胞内处理的连接剂类型的例子已在 W004054622、W006107617、W007046893 和 W007112193 描述。

[0086] 在一优选的具体实施方式中,本发明轭合物的组分(ii)是具有天然肽的化合物,包括低聚肽和肽。化学修饰多肽链的方法是本领域技术人员众所周知的,包括基于半胱氨酸基中的巯基轭合的方法,基于赖氨酸基中的伯氨基轭合的方法(US6809186),基于N末端和C末端部分轭合的方法。用于修饰多肽使得其耦合其它化合物的合适试剂包括:戊二醛(其使得化合物结合多肽的N末端)、碳化二亚胺(其使得化合物结合多肽的C末端)、琥珀酰亚胺酯(例如MBS、SMCC)其激活N末端和半胱氨酸基、对二氨基联苯(BDB)其激活酪氨酸基、高碘酸盐,其激活糖基化蛋白中的糖基。

[0087] 在组分Apo A与所需治疗性化合物形成单肽链的特定情况下,可以使用本发明的编码所述轭合物的基因构建体在单独步骤中表达轭合物,因为所述构建体与转录元件以及可选的翻译控制元件一同被导入合适在异源有机体中表达的载体。本发明表达框中的转录元件以及可选的翻译控制元件包括:启动子,指导其可操作地连接的核苷酸序列转录以及其它必需或适合转录的序列及其位置和时间的适当调控,例如,起始和终止信号、切割位点、多聚腺苷酸化信号、复制起点、转录增强子、转录沉默子等等。用于构建本发明表达框以及重组载体的所述元件以及载体通常根据应用的宿主细胞来选择。

[0088] 3. 本发明的多核苷酸、基因构建体、载体和宿主细胞

[0089] 在另一方面,本发明涉及编码本发明多肽的多核苷酸。本领域技术人员应当理解的是本发明的多核苷酸仅仅编码所述轭合物,其中轭合物的组分(ii)具有肽性质并且多肽Apo A形成单个的肽链,而不考虑相对位置以及不考虑两个组分直接连接或由间隔区隔开的情况。

[0090] 在另一方面,本发明涉及包含本发明多核苷酸的基因构建体。优选的构建体包括,本发明的多核苷酸受调节本发明多核苷酸表达序列的可操控调控。本领域技术人员应当理解的是,本发明的多核苷酸必须接近靶组织的细胞核,并在那转录以及翻译以产生生物活性融合蛋白。为此,当施用的活性组分是多核苷酸时,后者必须优选编码pre-proApoA1或ApoA1变体的前体形式,使得在其表达后由于信号序列而分泌并被加工以生成成熟的ApoA1。

[0091] 在Apo A经C末端与干扰素分子融合形成轭合物用于表达的情况下,优选编码轭合物的多核苷酸位于编码ApoA1信号序列的序列之后。在干扰素分子经C末端与Apo A分子N末端融合形成轭合物用于表达的情况下,优选编码轭合物的多核苷酸位于编码干扰素 $\alpha 1$ 信号序列的序列之后。

[0092] 原则上,任何启动子均可用于本发明的基因构建体,只要所述启动子与待表达的多核苷酸的细胞兼容。因此,适合本发明具体实施方式的启动子包括但不限于:组成型启动子,例如真核病毒基因组的衍生物,所述真核病毒如多瘤病毒、腺病毒、SV40、CMV、鸟类肉瘤病毒、乙型肝炎病毒;金属硫蛋白基因启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶基因启动子;逆转录酶病毒LTR区;免疫球蛋白基因启动子;肌动蛋白基因启动子;EF-1 α 基因启动子;以及蛋白质表达依赖于额外的分子或外源信号的可诱导启动子,如四环素系统、NF κ B/紫外光系统、Cre/Lox系统;以及热休克基因启动子;WO2006/135436所述的RNA聚合酶II的可调控启动子以及组织特异性启动子。在一优选的具体实施方式中,本发明的基因构建体含有位于主要在肝脏表达基因的启动子区域的表达-增强区,所述基因如人血清白蛋白基因、凝血酶原基因、 $\alpha 1$ 微球蛋白基因或醛缩酶基因,或者是几个拷贝形式的单拷贝,或者是

孤立形式或与其它肝脏特异表达元件如巨细胞病毒、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶或白蛋白启动子的组合。

[0093] 组织特异启动子的其它例子包括白蛋白基因启动子 (Miyatake 等, 1997, J. Virol, 71 :5124-32)、肝炎病毒的核心启动子 (Sandig 等, 1996, Gene Ther., 3 :1002-9)、 α -甲胎蛋白 (phetoprotein) 基因的启动子 (Arbuthnot 等, 1996, Hum. Gene Ther., 7 :1503-14)、以及结合甲状腺素的球蛋白结合蛋白的启动子 (Wang, L., 等, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :11563-11566)。

[0094] 本发明的多核苷酸或形成其的基因构建体可成为载体的一部分。因此, 在另一方面, 本发明涉及包含本发明多核苷酸或基因构建体的载体。本领域技术人员应当理解的是可使用的载体类型没有限制, 因为所述载体可以是适合增殖以及适合获得所述多核苷酸的克隆载体、或合适的基因构建体、或合适纯化物的不同异源有机体中的表达载体。因此, 根据本发明的合适载体包括原核生物表达载体如 pUC18、pUC19、Bluescript 及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、CoIE1、pCR1、RP4、噬菌体和穿梭载体如 pSA3 以及 pAT28, 酵母表达载体如 2 微米质粒类型载体、整合质粒、YEP 载体、着丝粒质粒等等, 昆虫细胞表达载体如 pAC 系列和 pVL 系列载体, 植物中的植物表达载体如 pIBI、pEarleyGate、pAVA、pCambia、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pORE 系列载体等等, 基于病毒载体 (腺病毒、与腺病毒相关的病毒以及逆转录病毒和慢病毒) 的高等真核细胞表达载体以及非病毒载体如 pSilencer 4.1-CMV (Ambion)、pcDNA3、pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVL 和 pKSV-10、pBPV-1、pML2d 以及 pTDT1。

[0095] 本发明的载体可用于转化、转染或感染那些可被所述载体转化、转染或感染的细胞。所述细胞可以是原核的或真核的。例如, 其中引入所述 DNA 序列的载体可以是质粒, 或是一种当其被引入宿主细胞时整合在所述细胞基因组并与所整合的染色体一同复制的载体。所述载体可通过本领域技术人员已知的常规方法获得 (Sambrook 等, 2001, 如上所述)。

[0096] 因此, 在另一方面, 本发明涉及包含本发明的多核苷酸、基因构建体或载体的细胞, 因为所述细胞已被本发明所提供的构建体或载体转化、转染或感染。可通过本领域技术人员已知的常规方法获得 (Sambrook 等, 2001, 如上所述) 转化、转染或感染的细胞。在一特别的具体实施方式中, 所述宿主细胞是以合适载体转染或感染的动物细胞。

[0097] 适用于表达本发明融合物的宿主细胞包括但不限于哺乳动物、植物、昆虫、真菌以及细菌细胞。细菌细胞包括但不限于革兰氏阳性细菌细胞如芽孢杆菌属、链霉菌属以及葡萄球菌种属, 革兰氏阴性细菌细胞如埃希氏菌属和假单胞菌属。优选的真核细胞包括酵母细胞如酵母属 (Saccharomyces)、毕赤酵母 (Pichia pastoris) 以及多形汉逊酵母 (Hansenula polymorpha)。昆虫细胞包括但不限于果蝇细胞以及 Sf9 细胞。植物细胞包括, 特别是, 农作物细胞如谷类植物、药用植物、观赏植物或球茎植物。适合本发明的哺乳动物细胞包括上皮细胞系 (猪的, 等等)、骨肉瘤细胞系 (人的, 等等)、神经母细胞瘤细胞系 (人的, 等等)、上皮癌 (人的, 等等)、神经胶质细胞 (小鼠的, 等等)、肝细胞系 (源于猴的, 等等)、CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞、COS 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、911、AT1080、A549、293 或 PER. C6、NTERA-2 人 ECC 细胞、mESC 细胞系的 D3 细胞、人胚胎干细胞如 HS293 和 BGV01、SHEF1、SHEF2 以及 HS181、NIH3T3 细胞、293T、REH 和 MCF-7 以及 hMSC 细胞。

[0098] 在另一方面,本发明涉及包含本发明轭合物的纳米脂质体颗粒。

[0099] 如本文所使用的,术语“纳米脂质体颗粒”等同于术语“脂蛋白”或“脂蛋白颗粒”并可互换使用。所谓“纳米脂质体颗粒”在此应理解为任何由非极性脂类(如酯化胆固醇和甘油三酯)核心被载脂蛋白、磷脂和游离胆固醇形成的外部极性包被所形成的水溶性颗粒。

[0100] 根据密度将纳米脂质体颗粒或脂蛋白分为乳糜微粒、极低密度脂蛋白(VLDL)、中间密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)以及高密度脂蛋白(HDL)。不同脂蛋白的特性如表1所示。

[0101] 表1

[0102]

密度(g/mL)	类别	直径 r(nm)	%蛋白	%胆固醇	%磷脂	%三酰基甘油
> 1.063	HDL	5-15	33	30	29	8
1.019-1.063	LDL	18-28	25	50	21	4
1.006-1.019	IDL	25-50	18	29	22	31
0.95-1.006	VLDL	30-80	10	22	18	50
< 0.95	乳糜微粒	100-1000	< 2	8	7	84

[0103] 在一特别的具体实施方式中,根据本发明的纳米脂质体颗粒是表1所示组成的HDL,并且其中由Apo A、Apo C、Apo D以及Apo E形成蛋白部分。

[0104] 本发明的纳米颗粒可应用本领域技术人员已知的方法获得。例如,所述纳米脂质体颗粒可通过如Lerch等(Vox Sang, 1996, 71:155-164)所述的,在体外添加胆固醇和磷脂酰胆碱至本发明的轭合物而获得,或在体内通过应用非人转基因动物而获得,所述动物在肝脏内表达本发明轭合物使得纳米颗粒分泌至血清中从而可被分离。

[0105] 4. 本发明轭合物的医药用途

[0106] 本发明的轭合物在运载治疗所需化合物至肝脏并稳定化合物方面是有效的。因此,在另一方面,本发明涉及包含治疗有效量的本发明的轭合物、多核苷酸、基因构建体、载体或宿主细胞、或纳米脂质体颗粒,以及药物学上可接受的载体或赋形剂的药物制剂。

[0107] 在另一方面,本发明涉及本发明的多肽、多核苷酸、基因构建体、载体、纳米脂质体颗粒或药物组合物在医药中的应用。

[0108] 对于在医药上的应用,本发明的轭合物可以是前药、盐、溶剂化物或包合物,或者是独立形式或者与其它活性剂组合。根据本发明化合物的组合可以与从制药观点上可接受的赋形剂一同配制。优选用于本发明的赋形剂包括糖、淀粉、纤维素、树胶以及蛋白质。在一特别的具体实施方式中,本发明的药物组合物被制成固体药物剂型(例如片剂、胶囊、糖衣片剂、颗粒剂、栓剂、结晶或可被再造为液体形式的无定形固体等等)、液体药物剂型(如溶液、悬浮液、乳剂、酏剂、洗剂、软膏等)或半固体药物剂型(凝胶剂、软膏剂、霜剂等等)。本发明的药物组合物可通过任意途径给药,包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、脊

髓内、鞘内、心室内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下或直肠途径。活性组分施用、赋形剂应用以及制备工艺的各种形式的综述可参见 *Tratado de Farmacia Galénica*, C.Faulí Trillo, Luzán 5, S.A.de Ediciones,1993 以及 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(A.R.Gennaro,Ed.),第 20 版,Williams & Wilkins PA,USA(2000)。药物学上可接受载体的例子是本领域已知的,包括磷酸盐缓冲液、水、乳浊液如油/水乳浊液、不同类型的湿润剂、无菌溶液等等。包含所述载体的组合物可由本领域已知的常规工艺配制。

[0109] 在施用核酸(本发明的多核苷酸、载体或基因构建体)的情况下,本发明提供了特别用于所述核酸给药的药物组合物。该药物组合物可包含所述核酸的裸核酸,即没有保护核酸免于有机体的核酸酶降解的化合物,其优点在于减小了用于转染的试剂的相关的毒性。裸化合物的合适给药途径包括血管内、瘤内、颅内、腹膜内、脾内、肌肉内、视网膜下、皮下、粘膜、局部以及口服途径(Templeton,2002, *DNA Cell Biol.*,21:857-867)。可选择地,所述核酸可作为结合胆固醇或结合化合物的脂质体的组成部分来施用,所述化合物可通过细胞膜促进移位,如来源于 HIV-1 TAT 蛋白的 Tat 肽、果蝇触角足蛋白同源域的第三个螺旋、单纯疱疹病毒的 VP22 蛋白、精氨酸寡聚体以及 W007069090 所描述的那些肽(Lindgren, A. 等,2000, *Trends Pharmacol. Sci.*,21:99-103, Schwarze, S. R. 等,2000, *Trends Pharmacol. Sci.*,21:45-48, Lundberg, M 等,2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 以及 Snyder, E. L. 和 Dowdy, S. F.,2004, *Pharm. Res.* 21:389-393)。可选择地,所述多核苷酸可作为质粒载体、病毒载体、优选基于腺病毒的载体、腺病毒相关病毒载体或逆转录病毒载体如基于鼠白血病毒(MLV)或慢病毒(HIV、FIV、EIAV)的组成部分施用。

[0110] 在另一具体实施方式中,本发明的组合物和多核苷酸通过所谓的“高压给药”的方式施用,其已被 Liu, F. 等(*Gene Ther*,1999,6:1258-66)描述过。根据所述的方法,化合物以高速大体积由血管导入有机体,导致更分散分布的高转染水平。已被证实的是细胞内途径的效力直接依赖于施用液体的体积和注射速率(Liu 等,1999, *Science*,305:1437-1441)。在小鼠中,所述施用已被优化为在 3-5 秒内 1mL/10g 体重(Hodges 等,2003, *Exp. Opin. Biol. Ther*,3:91-918)。高压给药后使体内多核苷酸转染细胞的精确机制并不完全清楚。在小鼠的情况下,据认为是通过尾静脉施用的频率超过了心率,其引起施用液体聚集在上腔静脉。该液体随后进入器官中的血管,随后通过所述血管上的穿孔到达血管外空间。所述多核苷酸因此在与血液混合前与靶器官的细胞接触,因而减小了被核酸酶降解的可能性。

[0111] 本发明的组合物可以以每千克体重不超过 10mg 的剂量施用,优选不超过 5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.001、0.0005、0.0001、0.00005 或 0.00001mg 每千克体重以及不超过 200nmol 的 RNA 制剂,即大约 4.4×10^{16} 拷贝每千克体重或不超过 1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15 或 0.075nmol 每千克体重。单位剂量可注射给药、吸入给药或局部给药。本发明的双功能多核苷酸及组合物可在靶 mRNA 表达的器官内直接施用,这种情况下每个器官施用的剂量为 0.00001mg 至 3mg,或优选每个器官 0.0001mg 至 0.001mg,每个器官约 0.03mg 至 3.0mg,每个器官约 0.1 至 3.0mg 或每个器官 0.3 至 3.0mg。

[0112] 该剂量依赖于待治疗病症的严重程度及反应,并可在数天内、数月内或直至观察到病症缓解的时间内而变动。最佳剂量可通过定期测量患者机体中的药剂浓度来确定。最佳剂量可通过在先动物模型的体外或体内试验所获得的 EC50 值来确定。单位剂量可以是

每天施用一次或每天少于一次,优选每 2、4、8 或 30 天少于一次。可选择地,可以施用一个初次剂量,然后接着使用一到数次的通常比初次剂量小的维持剂量。维持方案可涉及以 0.01 μ g-1.4mg/kg 体重每天的剂量治疗患者,例如 10、1、0.1、0.01、0.001、或 0.0001mg 每千克体重每天。维持剂量优选每 5、10 或 30 天至多施用一次。治疗必须持续一段时间,其根据患者所患的疾病、严重程度和病人的症状而变化。治疗后,必须监测患者的进展以确定在疾病对治疗没有反应的情况下是否必须增加剂量,或观察到疾病改善或不良副作用时是否必须降低剂量。

[0113] 日剂量可单次量施用或根据特殊情况两次或多次量施用。如果需要重复施用或频繁施用,推荐植入给药设备如泵、半永久性(静脉内、腹膜内、脑池内或囊内)导管或容器。

[0114] 鉴于所述轭合物具有运载治疗所需化合物至靶组织的能力,本发明的轭合物、编码轭合物的多核苷酸、包含所述多核苷酸的基因构建体和载体以及本发明的纳米脂质体颗粒可用于治疗方法。本领域技术人员应能理解能应用本发明的化合物治疗的疾病取决于(i)与 Apo A 关联的活性组分以及(ii)所述轭合物被运载至的组织。表 2 以非限制性的方式描述了能以所述轭合物治疗的可能疾病及必须整合至轭合物的活性组分。

[0115]

轭合物	疾病
<i>Apo-IFNα5</i>	慢性丙型肝炎

[0116]

	慢性乙型肝炎 佐剂疫苗 肝癌
<u>Apo-制瘤素</u>	慢性丙型肝炎 慢性乙型肝炎 肝癌
<u>Apo-心肌营养蛋白</u>	肝移植 肾移植 肝切除
<u>Apo-IL6</u>	肝移植 肾移植 肝切除
<u>Apo-双调蛋白</u>	肝移植 肝切除
<u>Apo-EDA</u>	佐剂疫苗
<u>Apo-IL15</u>	免疫佐剂
<u>Apo-IL12</u>	肝癌
<u>Apo-CD134</u>	免疫佐剂
<u>Apo-CD137</u>	免疫佐剂
<u>Apo- PBGD</u>	急性间歇性卟啉病
<u>Apo-p17 (TGF-β1 抑制剂)</u>	结肠癌中的佐剂 肺纤维化 骨转移
<u>Apo-p144 (TGF-β1 抑制剂)</u>	结肠癌中的佐剂 乳房修复术 系统性硬化

[0117]

	硬斑病 烧伤 心肌纤维化 肾纤维化
<u>Apo-IL10 抑制剂</u>	病毒感染 细菌感染 寄生虫感染 非霍奇金淋巴瘤
<u>Apo-FoxP3 抑制剂</u>	免疫佐剂（封闭调节性 T 细胞）
<u>Apo-TNFα 抑制剂</u>	风湿性关节炎
<u>Apo-VEGF 抑制剂</u>	血管生成抑制
<u>Apo-PD-1 抑制剂</u>	免疫佐剂
<u>Apo-CD152 抑制剂</u>	免疫佐剂

[0118] 本发明的轭合物具有靶向器官或组织的能力,所述器官或组织表达对 Apo A 分子有足够亲和力并具有结合所述多肽后的内化能力的表面分子。所述表面分子包括 SR-B1(清道夫受体 B 型 1 类)、SR-A1(清道夫受体 A 型 1 类)、SR-A2(清道夫受体 A 型 2 类)以及 SR-C(清道夫受体 C 型)。因此所述治疗活性化合物能被运载至所述靶器官或靶组织。这些器官不仅包括肝脏还包括在表面表达足量 SR-B1 受体的所有细胞。本发明的实施例 7 因而举例说明了 SR-B1 在免疫系统不同群体特别是在 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、NK 细胞、树突细胞以及单核细胞/巨噬细胞中存在。因而本发明还提供了本发明的轭合物在治疗免疫系统相关疾病中的应用。此外,已知的是 SR-B1 受体在破骨细胞 (Brodeur 等,2008, J. Bone Miner Res. 23 :326-37)、内皮细胞 (Yeh 等,2002, Atherosclerosis, 161 :95-103)、小肠上皮细胞 (Cai, S. F. 等,2001, J. Lipid Res. 42 :902-909)、胆管上皮细胞 (Miquel 等, Gut., 2003, 52 :1017-1024)、脂肪组织 (Acton 等,1994, J. Biol. Chem., 269 :21003-21009)、以及肺脏 (Acton 等,1994, J. Biol. Chem., 269 :21003-21009) 中都表达。

[0119] 因此,本发明的轭合物适用于运载治疗所需化合物至如前所述的区室。因此,考虑到靶器官,本发明的轭合物可用于治疗肝脏疾病如肝内胆汁郁积、脂肪肝(酒精性脂肪肝、雷依氏综合征)、肝静脉血栓形成、肝豆状核变性、肝肿大、肝肺综合征、肝肾综合征、门静脉高压症、肝脓肿、肝硬化(酒精性、胆汁性、实验性肝硬化)、酒精性肝疾病(脂肪肝、肝炎、肝硬化)、寄生虫病(包虫病、肝片吸虫病、阿米巴脓肿)、黄疸(溶血的、肝细胞的以及胆汁郁积的)、肝炎(酒精性肝炎、慢性肝炎、自身免疫性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、药物性肝炎、中毒性肝炎、病毒性肝炎(甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎以及戊型肝炎)、威尔森氏症、肉芽肿性肝病、继发性胆汁肝硬化、原发性胆汁性肝硬化、肝性脑病、门脉

高压症、肝细胞腺瘤、血管瘤、胆结石、肝肿瘤（血管肌脂瘤、钙化肝转移、囊性肝转移、纤维板层肝癌、局灶性结节性增生、肝腺瘤、肝胆囊腺瘤、肝母细胞瘤、肝细胞性肝癌、肝细胞瘤、肝癌、肝血管内皮瘤、再生结节性增生、良性肝肿瘤、肝囊肿（简单囊肿、多囊性囊肿、肝胆囊腺瘤、间充质肝肿瘤〔间叶性错构瘤、小儿血管内皮瘤、血管瘤、肝紫癜症、脂肪瘤、炎性假瘤〕、胆管上皮肿瘤、胆管错构瘤、胆管腺瘤、恶性肝肿瘤〔肝细胞的、肝母细胞瘤、肝细胞癌、胆管细胞型肝癌、胆管细胞癌、胆管上皮癌、囊腺瘤、毛细血管瘤、血管肉瘤、卡波济氏肉瘤、血管内皮瘤、胚胎性肉瘤、纤维肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、癌肉瘤、畸胎瘤、鳞状上皮细胞癌、原发性淋巴瘤〕）、赤肝卟啉症、肝性卟啉症（急性间歇性卟啉症、皮肤晚期卟啉症）、泽韦格综合征。

[0120] 本发明的轭合物可用于治疗免疫系统疾病，如：

[0121] ●自身免疫病：阿狄森氏病、自身免疫性溶血性贫血、抗肾小球基底膜抗体疾病、抗磷脂综合征、类风湿性关节炎、自身免疫性神经系统疾病、疱疹性皮炎、1 型糖尿病、家族性地中海热、IGA 肾小球性肾炎、膜性肾小球肾炎、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯氏病、自身免疫性肝炎、兰伯特－伊顿肌无力综合征、系统性红斑狼疮、交感性眼炎、天疱疮，自身免疫性多内分泌腺疾病、特发性血小板减少性紫癜、莱特尔氏病和自身免疫性甲状腺炎，

[0122] ●血型不容引起的疾病：胎儿成红细胞增多症、Rh 同种免疫，

[0123] ●膜性增生性肾小球肾炎，

[0124] ●移植物抗宿主病，

[0125] ●过敏症：对药物过敏、环境病、迟发型超敏反应（细胞迁移抑制、急性播散性脑脊髓炎）、速发型超敏反应（过敏反应、过敏性结膜炎、过敏性皮炎）、免疫复合体病（过敏性血管炎、阿瑟斯反应、血清病）、乳胶过敏、韦斯勒氏综合征，

[0126] ●免疫缺陷综合征如异常丙种球蛋白血症、HIV-1 感染、HTLV-1 或 HTLV-2 感染、流行性牛白血病、淋巴球减少症，噬菌体功能障碍如白细胞异常色素减退综合征、慢性肉芽肿性疾病、乔布综合征、血丙种球蛋白缺乏症、共济失调毛细血管扩张症，常见多种免疫缺陷、迪格奥尔格综合征、白细胞粘附缺陷综合征、威斯科特－奥尔德里奇综合征，

[0127] ●血小板减少性紫癜，

[0128] ●免疫增生症：高球蛋白血症（Schnitzler's 综合征）、淋巴细胞增生症（肉芽肿瘤、重链病、毛细胞白血病、淋巴细胞性白血病、骨髓性白血病、淋巴管肌瘤、淋巴瘤、结节病、血中丙球蛋白贫乏、巨大淋巴结增生症、免疫母细胞淋巴瘤、传染性单核细胞增多症、淋巴瘤样肉芽肿、马立克氏病、塞扎莱综合征、肿瘤溶解综合征、瓦尔登斯特的巨球蛋白血症、免疫增生小肠疾病、浆细胞性白血病、病变蛋白血症和血小板减少性紫癜）、病变蛋白血症。

[0129] 本发明的轭合物可用于治疗毛细血管内皮细胞疾病，如动脉硬化、闭塞性动脉病、连通性导致的雷诺氏病、原发性高血压和继发性肺动脉高血压、糖尿病微血管病变、血栓闭塞性脉管炎、系统性硬化、血管炎以及所有以内皮细胞损伤和继发性缺血为特征的疾病。

[0130] 本发明的轭合物可用于治疗骨疾病，如以骨骼生长异常为特征的发育异常。这些病症的代表性例子有软骨发育不全症、锁骨颅骨发育不全、内生软骨瘤病、纤维组织发育异常、高雪氏病、低磷性佝偻病、马凡氏综合征、遗传性多发性外生性骨疣、多发性神经纤维瘤病、成骨不全症、骨硬化病、脆弱性骨硬化症、硬化性病变、骨折、牙周病、假关节、化脓性骨

髓炎,导致骨质减少的病症如贫血症、类固醇和肝素引起的骨质减少、骨髓病、坏血病、营养不良、缺钙、特发性骨质疏松症、先天性骨质缺乏、酒精中毒、肾上腺皮质功能亢进、肢端肥大症、性腺机能减退、短暂局限性骨质疏松症和软骨病。

[0131] 本发明的轭合物可用于治疗肠上皮细胞疾病,如吸收不良综合征、克罗恩氏病、肠憩室病、麻痹性肠梗阻以及肠梗阻。

[0132] 本发明的轭合物可用于治疗呼吸系统疾患,如鼻前庭炎、非过敏性鼻炎(例如过敏性鼻炎、慢性鼻炎、萎缩性鼻炎、血管舒缩性鼻炎)、鼻息肉、鼻窦炎、青少年血管纤维瘤、鼻癌以及青少年乳头状瘤、声带息肉、小瘤、接触性溃疡、声带麻痹、喉囊肿、咽炎、扁桃体炎、扁桃体蜂窝组织炎、咽旁脓肿、喉炎、喉囊肿、咽喉癌(例如鼻咽癌、扁桃体癌、喉癌)、肺癌(鳞状细胞癌、小红细胞癌、大红细胞癌、腺癌)、变态反应性疾病(嗜酸细胞性肺炎、过敏性肺炎、过敏性间质性肺炎、过敏性支气管肺曲菌病、哮喘、韦格纳肉芽肿、古德帕斯氏综合征、肺炎(例如细菌性肺炎(例如,由肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)导致的、由金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)导致的、由革兰氏阴性菌如克雷白氏杆菌(*Klebsiella*)以及假单胞菌属(*Pseudomonas* sp)导致的、由肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)所导致的、由流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)导致的、由 *Legionella pneumophila* 导致的以及由鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)导致的),以及病毒性肺炎(例如流感或水痘))、细支气管炎、脊髓灰质炎、喉气管支气管炎(也叫作哮吼综合征)、合胞病毒引发的呼吸道感染、腮腺炎、传染性红斑、玫瑰疹、风疹、真菌性肺炎,(例如组织胞浆菌病、球孢子菌病、芽生菌病以及免疫抑制患者中的真菌感染如新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)导致的隐球菌病、曲霉菌(*Aspergillus* spp)导致的曲霉病、念珠菌属(*Candida*)导致的念珠菌病,以及毛霉菌病)、肺炎费囊虫(*Pneumocystis carinii*)导致的感染、非典型肺炎(例如,由支原体(*Mycoplasma*)和衣原体(*Chlamydia* spp)引起的)、机遇性肺炎、医院获得性肺炎、化学性肺炎和吸入性肺炎、胸腔疾病(例如胸膜炎、胸膜腔积液以及气胸(例如自发性气胸、复合自发性气胸、张力气胸))、梗阻性呼吸道疾病(例如哮喘、慢性阻塞性肺病、肺气肿、慢性或急性支气管炎)、职业性肺疾病(例如矽肺病、黑肺病、石棉沉着病、铍中毒、职业性哮喘、棉尘肺以及良性尘肺)、浸润性肺疾病如肺纤维化、纤维化性肺炎、特发性肺纤维化、脱屑性间质性肺炎、淋巴细胞性间质性肺炎、组织细胞增多症 X(例如莱特勒-西韦病、慢性特发性黄瘤病、嗜酸细胞肉芽肿)、特发性肺含铁血黄素沉着症、肉状瘤病以及肺泡蛋白沉积症、急性呼吸窘迫综合征、水肿、肺栓塞、支气管炎(例如病毒性、细菌性支气管炎)、支气管扩张症、肺膨胀不全、肺脓肿以及囊肿性纤维症。

[0133] 在一优选的具体实施方式中,本发明考虑的治疗活性组分是干扰素。如果是那样的话,轭合物或编码其的多核苷酸可用于相应干扰素的肝脏疾病的治疗,如慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝癌、肝硬化、纤维化。

[0134] 另外,鉴于免疫系统细胞中 SR-BI 受体的存在,本发明的轭合物可用于靶向治疗活性化合物至所述细胞。因此,在一优选的具体实施方式中,本发明的含有干扰素作为治疗活性化合物的轭合物,可用作增强疫苗免疫反应的佐剂。所述疫苗可以是靶向针对可触发感染性疾病的有机体的疫苗,可以是靶向针对肿瘤的疫苗或靶向针对变应原的疫苗。所述疫苗可以含有传染原、肿瘤或变应原(肽、多肽、糖蛋白、多表位肽、片段,等等)的组分,或

可以是由编码所述有机体、肿瘤或变应原的多肽的核酸构成的基因疫苗。

[0135] 在另一具体实施方式中,本发明的轭合物含有 TGF- β 1 肽抑制剂。这些轭合物可用于治疗 TGF- β 1 过度表达或不受限表达相关的疾病或病理障碍,如 (i) 与器官或组织功能丧失相关的纤维化,例如肺纤维化、肝纤维化(肝硬变)、心肌纤维化、肾脏纤维化、角膜纤维化等等,以及 (ii) 外科手术及美容并发症,例如皮肤和腹腔手术相关的纤维化、烧伤相关的纤维化、骨关节纤维化、瘢痕疙瘩等。

[0136] 本发明的作者已经示出了包含 TGF- β 1 肽抑制剂与 IL-12 的本发明轭合物的施用,导致 IL-12 调节的 IFN- γ 诱导的刺激。鉴于 IFN- γ 是已知的抗肿瘤剂,发明者的发现开辟了基于免疫刺激细胞因子与本发明包含 TGF- β 1 肽抑制剂的轭合物组合的新抗肿瘤疗法之路。

[0137] 因此,在另一方面,本发明涉及一种组合物,包含

[0138] (a) 第一组分,其选自根据本发明的轭合物、多核苷酸、基因构建体、载体、宿主细胞、纳米脂质体颗粒以及药物组合物,其中组分 (ii) 是 TGF- β 1 肽抑制剂,并且

[0139] (b) 第二组分,其选自免疫刺激细胞因子、编码所述细胞因子的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、TGF- β 1 肽抑制剂、细胞毒素剂及其组合。

[0140] 能与包含 TGF- β 1 肽抑制剂的 Apo A 轭合物共同施用的免疫刺激细胞因子包括但不限于 IL-12、IL-2、IL-15、IL-18、IL-24、GM-CSF、TNF- α 、CD40 配体、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 。在一优选的具体实施方式中,刺激性细胞因子是 IL-12。

[0141] 可形成本发明组合物组分 (b) 的 TGF- β 1 肽抑制剂本质上与前述的构成本发明轭合物一部分的 TGF- β 1 肽抑制剂相同。因此, TGF- β 1 肽抑制剂可以是,但不限于,肽 p144(SEQ ID NO:4) 或肽 p17(SEQ ID NO:5)。构成轭合物一部分的肽与构成本发明第二组分的肽可以是相同的或不同的。本文中所使用的“细胞毒素剂”是一种能选择性或非选择性杀死细胞或抑制细胞生长的化合物。例子包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、鬼臼噻吩甙(tenoposide)、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟蒽醌、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安、嘌呤霉素、表阿霉素和环磷酰胺及其类似物或同源物、抗代谢物(如甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氮烯咪胺)、烷化剂(如氮芥、赛替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡氮芥(BCNU)和环己亚硝脲(CCNU)、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 以及二氯二氨铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类抗生素(如道诺霉素以及阿霉素)、抗生素(如放线菌素 D)、博来霉素。

[0142] 在另一方面,本发明的组合物可用于治疗各种肿瘤,包括但不限于血液癌(例如,白血病或淋巴瘤)、神经系统肿瘤(例如,星形胶质细胞瘤或胶质母细胞瘤)、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、头颈部癌、胃肠道肿瘤(例如,胃、胰腺或结肠癌)、肝脏癌症(例如肝细胞癌)、肾细胞癌、泌尿生殖道肿瘤(例如,卵巢癌、阴道癌、宫颈癌、膀胱癌、睾丸癌、前列腺癌)骨肿瘤和血管瘤。

[0143] 因此,在另一方面,本发明涉及用于治疗癌症的本发明的组合物。在另一方面,本发明涉及治疗癌症的方法,其包括给有此需要的患者施用根据本发明的组合物。在另一方面,本发明涉及本发明组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

[0144] 此处所描述的本发明组合物组分中的治疗有效量将取决于,例如治疗对象、给药

途径、以及患者的状况。因此,优选由治疗师决定剂量并按需求修改给药途径以获得最佳治疗效果。典型的日剂量通常在约 0.01mg/kg 至 250mg/kg 或更多,按每天、每 2 天、每 3 天、每 4 天、每 5 天、每 6 天或每周给药。

[0145] 本发明组合物的施用可通过各种方式实现。例如,组合物的组分(a)和(b)可相继施用、单独施用和/或同时施用。在一具体实施方式中,组合物的组分(a)和(b)是同时施用的(可选重复)。在一具体实施方式中,单独制剂相继施用(可选重复)。在一具体实施方式中,单独制剂分别施用(可选重复)。本领域技术人员应当了解当组分(a)和(b)的单独制剂相继施用或连续施用时,可以是组分(a)之后跟着组分(b),或者是组分(b)之后跟着组分(a)。在一具体实施方式中,组分(a)和(b)的单独制剂可以可选择的计量模式施用。当本发明组合物的组分(a)和(b)的单独制剂相继施用或单独施用时,第二制剂施用的延后不应当例如损失组合治疗的有益效果。

[0146] 基于下列以本发明范围的非限制性说明方式提供的实施例,本发明在下面得以说明。

实施例

[0147] 实施例 1

[0148] 材料和方法

[0149] 1. 表达载体的构建

[0150] 1.1 RNA 提取

[0151] 使用 TRI 试剂(Sigma, Madrid, Spain)从个体样品中分离经处理小鼠肝脏或大脑的总 RNA。样品的浓度和纯度通过分光光度计(生物光度计, Eppendorf)在 260 和 280nm 的吸光度经 320nm 的本底校正而确定。

[0152] 1.2 RT-PCR 合成总 cDNA:

[0153] 用 DNase I 处理总 RNA(3 μ g)并在 RNase OUT 存在下以 M-MLV RT 反转录为 cDNA(所有试剂均来自 Invitrogen, Carlsbed, CA)。获得 25 μ L 肝脏总 cDNA。反应物在 37°C 孵育 1 小时,在 95°C 变性 1 分钟并降至 4°C。样品立即用于 PCR 或在 -20°C 储存。

[0154] 1.3 小鼠载脂蛋白 A1(mApoA1) cDNA 的获得与克隆

[0155] 设计了同义引物 5'-ATGAAAGCTGTGGTGCTGGC-3' (FwATGmApoA1) (SEQ ID NO:20) 和反义引物 5'-TCACTGGGCAGTCAGAGTCT-3' (RvTGmApoA1) (SEQ ID NO:21)。从肝脏总 cDNA 中通过 PCR 扩增 mApoA1 cDNA(795 个总核苷酸,72 个编码信号肽的核苷酸以及 723 个编码天然蛋白的核苷酸),使用 BioTaq DNA 聚合酶(Bioline, London, United Kingdom):在 2720 热循环仪(Applied Biosystems, Foster City, USA)中按如下扩增条件进行:94°C 5 分钟,30 个循环的 94°C 40 秒、55°C 40 秒以及 72°C 40 秒,之后是 72°C 7 分钟。PCR 产物在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶(Pronadisa, Madrid, Spain)中迁移,凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)(Qiagen, Valencia, CA)纯化。mApoA1 的纯化 cDNA 根据制造商提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA(Invitrogen, Carlsbed, CA),其将被称为 pCMV-mApoA1。最后,获得的序列通过测序来确定。

[0156] 1.4 小鼠干扰素 α 1(mIFN α 1) cDNA 的获得和克隆:

[0157] 设计了同义引物 5'-ATGGCTAGGCTCTGTGCTTT-3' (FwATGmIFN α 1) (SEQ ID NO:22) 和反义引物 5'-TCATTCTCTCTCTCAGTC-3' (RvTGAmIFN α 1) (SEQ ID NO:23)。从肝脏总 cDNA 中通过 PCR 扩增 mIFN α 1 cDNA (570 个总核苷酸, 69 个编码信号肽的核苷酸以及 501 个编码天然蛋白的核苷酸), 使用 BioTaq DNA 聚合酶 (Bioline, London, United Kingdom)。在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行: 94°C 5 分钟, 30 个循环的 94°C 40 秒、55°C 40 秒以及 72°C 40 秒, 之后是 72°C 7 分钟。PCR 产物在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。mIFN α 1 的纯化 cDNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbad, CA), 其被称为 pCMV-mIFN α 1。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0158] 1.5 基因融合设计

[0159] 1.5.1 mIFN α 1 C 末端融合至 mApoA1 基因: Apo-IFN

[0160] 设计了反义引物 5'-GGCGCGCCCTGGGCAGTCAGAGTCTCGC-3' (RvAscImApoA1) (SEQ ID NO:24), 其导入 9 个核苷酸序列 (GGCGGCCCC) 形成 ApoA1 基因 3' 端的 AscI 酶的限制性位点并除去了终止密码子。加入的限制性序列将被翻译为短结合肽 GAP, 其给组成蛋白质提供一定的流动性。设计了正义引物 5'-GGCGCGCCCTGTGACCTGCCTCAGACTCA-3' (FwAscImIFN α 1) (SEQ ID NO:25), 其在编码成熟 mIFN α 1 蛋白质 (即, 除去了信号肽序列) 的序列的 5' 端引入 AscI 限制性序列。

[0161] 通过 PCR 进行扩增, 使用 pCMV-mApoA1 作为模板, 引物 FwATGmApoA1 和 RvAscImApoA1, 以及 BioTaq DNA 聚合酶 (Bioline, London, United Kingdom), 在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行: 94°C 5 分钟, 30 个循环的 94°C 40 秒、57°C 40 秒以及 72°C 40 秒, 之后是 72°C 7 分钟。PCR 产物 (804 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。mApoA1-AscI 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbad, CA), 其被称为 pCMV-mApoA1-AscI。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0162] 平行地, 通过使用 pCMV-mIFN α 1 作为模板以及引物 FwAscImIFN α 1 和 RvTGAmIFN α 1 的 PCR 进行扩增。使用 BioTaq DNA 聚合酶 (Bioline, London, United Kingdom) 以及在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行: 94°C 5 分钟, 30 个循环的 94°C 40 秒、57°C 40 秒以及 72°C 40 秒, 之后是 72°C 7 分钟。PCR 产物 (510 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。AscI-mIFN α 1 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbad, CA), 其被称为 pCMV-AscI-mIFN α 1。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0163] 为进行基因融合, 质粒 pCMV-mApoA1-AscI 和 pCMV-AscI-mIFN α 1 使用 pcDNA 3.1 V5-His TOPO[®] TA 骨架中的限制性位点 PmeI, 分别在 37°C 以 AscI/PmeI 酶、1×BSA 以及 Buffer 4 (New England Biolabs) 消化 1.5 小时。两种消化产物均在 1% 琼脂糖凝胶中迁移, 相应条带被纯化为开放载体 pCMV-mApoA1-AscI 和 pCMV-AscI-mIFN α 1 插入体。将产物

以 1 : 3 (载体 : 插入体) 的比例使用高浓度 T4 DNA 连接酶和作为缓冲液的 2×Rapid 连接缓冲液 (Promega Madison, WI, USA) 连接, 室温孵育混合物 10 分钟。随后转化 Top10 细菌 (Invitrogen, Carlsbed, CA)。转化细菌通过其在具有青霉素的 LB 培养基的培养皿中的生长来选择, 因为所述载体含有抗这种抗生素的基因。通过 MiniPrep 技术 (Qiagen, Germany) 提取阳性细菌的质粒 DNA, 随后用 AscI/PmeI 酶 (New England Biolabs) 消化 2 μg 所述质粒, 并在 1% 琼脂糖凝胶中电泳所述消化产物而进行分离, 以证实插入体的存在。所获得的 6825nt 质粒在下文中被称为 pCMV-Apo-IFN (pCMV-AF)。

[0164] 1.5. 2mIFN α 1 基因 N 末端融合至 mApoA1 基因 : IFN-Apo

[0165] 设计了反义引物 5' -GGGCGCGCTTTCTCTCTCTCAGTCTTC-3' (RvAscImIFN α 1) (SEQ ID NO :26), 其引入 9 个核苷酸序列 (GGGCGGCCC) 形成 mIFN α 1 基因 3' 端的 AscI 酶限制性位点并除去了终止密码子。设计了正义引物 5' -CCAGGCGCGCCGGATGAACCCAGTCCCAATG-3' (FwAscImApoA1) (SEQ ID NO :27), 其在编码成熟 ApoA1 蛋白 (即, 除去了信号肽序列) 的序列的 5' 端引入 AscI 限制性序列。所述引物包括 5' 端的 3 个核苷酸使得可使用 AscI 酶切。

[0166] 通过 PCR 进行扩增, 使用 pCMV-mApoA1 作为模板, 引物 FwATGmApoA1 和 RvAscImApoA1, 以及 BioTaq DNA 聚合酶 (Bioline, London, United Kingdom), 在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行 : 94℃ 5 分钟, 30 个循环的 94℃ 40 秒、57℃ 40 秒以及 72℃ 40 秒, 之后是 72℃ 7 分钟。PCR 产物 (732 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。AscI-mApoA1 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-AscI-mApoA1。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0167] 平行地, 通过使用 PCR 进行扩增, pCMV-mIFN α 1 作为模板以及引物 FwAscImIFN α 1 和 RvTGAmIFN α 1, BioTaq DNA 聚合酶 (Bioline, London, United Kingdom) 以及在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行 : 94℃ 5 分钟, 30 个循环的 94℃ 40 秒、57℃ 40 秒以及 72℃ 40 秒, 之后是 72℃ 7 分钟。PCR 产物 (576 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。mIFN α 1-AscI 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-mIFN α 1-AscI。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0168] 为进行基因融合, 质粒 pCMV-AscI-mApoA1 和 pCMV-mIFN α 1-AscI 应用 pcDNA 3.1 V5-His TOPO® TA 骨架中的限制性位点 PmeI, 分别在 37℃ 以 AscI/PmeI 酶、1×BSA 以及 Buffer 4 (New England Biolabs) 消化 1.5 小时。两种消化产物均在 1% 琼脂糖凝胶中迁移, 相应条带被纯化为开放载体 pCMV-mIFN α 1-AscI 和 pCMV-AscI-mApoA1 插入体。将产物以 1 : 3 (载体 : 插入体) 的比例使用高浓度 T4 DNA 连接酶和作为缓冲液的 2×Rapid 连接缓冲液 (Promega Madison, WI, USA) 连接, 室温孵育混合物 10 分钟。随后转化 Top10 细菌 (Invitrogen, Carlsbed, CA)。转化细菌通过其在具有青霉素的 LB 培养基的培养皿中生长来选择, 因为所述载体含有抗这种抗生素的基因。通过 MiniPrep 技术 (Qiagen, Germany) 提取阳性细菌的质粒 DNA, 随后以 AscI/PmeI 酶 (New England Biolabs) 消化 2 μg 所述质粒, 并在 1% 琼脂糖凝胶中电泳所述消化产物而进行分离, 以证实插入体的存在。所获得的

具有 6822 个核苷酸的质粒在下文中被称为 pCMV-IFN-Apo (pCMV-IA)。

[0169] 1.5.3 肽 p17C 末端融合至 mApoA1 基因：

[0170] 设计了引物 5'-TCACGCACGCTCATACCAAGAACTCCTAGGAATAAACCAAATACGCTTGGGCGCGCCCTGGGC-3' (RvmApoA1p17) (SEQ ID NO:28)。使用 pCMV-mApoA1-AscI 作为模板、引物 FwATGmApoA1 和 RvmApoA1p17, 以 Easy-A 高保真 PCR 克隆酶 (Stratagene, La Jolla, CA) PCR 进行扩增。在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行: 95℃ 1 分钟, 30 个循环的 95℃ 40 秒、60℃ 40 秒以及 72℃ 1 分钟, 之后是 72℃ 7 分钟。PCR 产物在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。mApoA1-AscI-p17 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-mApoA1-AscI-p17。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0171] 1.5.4 肽 p144C 末端融合至 mApoA1 基因：

[0172] 设计了引物 5'-TCAATTCTGCATCATGGCCCAGATTATCGAGGCGTCCAGCGAGGTGGGCGCGCCCTGGGC-3' (RvmApoA1p144) (SEQ ID NO:29)。使用 pCMV-mApoA1-AscI 作为模板、以及引物 FwATGmApoA1 和 RvmApoA1p144, 以 Easy-A 高保真 PCR 克隆酶 (Stratagene, La Jolla, CA) PCR 进行扩增。在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行: 95℃ 1 分钟, 30 个循环的 95℃ 40 秒、65℃ 40 秒以及 72℃ 1 分钟, 之后是 72℃ 7 分钟。PCR 产物在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。mApoA1-AscI-p144 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-mApoA1-AscI-p144。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0173] 1.5.5 克隆 mApoA1 信号肽的基因序列：

[0174] 为构建作为 mApoA1 融合以及肽融合实验中的对照质粒, 进行了 mApoA1 信号肽序列 (SPmApoA1) 与肽 p17 和 p144 的基因融合 (未附加用于 AscI 的序列), 并因而确保了所述肽的分泌与 mApoA1-肽的分泌相同。设计了引物 5'-TTGCTGCCATACGTGCCAAG-3' (RvSPmApoA1) (SEQ ID NO:30), 与引物 FwATGmApoA1 一同用于扩增 SPmApoA1, 其使用 pCMV-mApoA1 作为模板。PCR 产物 (72 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。SPmApoA1 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-SPmApoA1。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0175] 1.5.6 肽 p17C 末端融合至 mApoA1 信号肽基因序列：

[0176] 设计了引物 5'-TCACGCACGCTCATACCAAGAACTCCTAGGAATAAACCAAATACGCTTTTGCTGCCAGAAATGCCG-3' (RvSPmApoA1p17) (SEQ ID NO:31), 与引物 FwATGmApoA1 一同用于扩增 SPmApoA1-p17, 其以 pCMV-mApoA1 作为模板。PCR 产物 (120 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EEO 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。SPmApoA1-p17 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV SPmApoA1-p17。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0177] 1.5.7 肽 p144C 末端融合至 mApoA1 信号肽基因序列：

[0178] 设计了引物 5'-TCATTCTGCATCATGGCCCAGATTATCGAGGCGTCCAGCGAGGTTTGCTGCC AGAAATGCCG-3' (RvSPmApoA1p144) (SEQ ID NO :32), 与引物 FwATGmApoA1 一同用于扩增 SPmApoA1-p144, 其以 pCMV-mApoA1 作为模板。PCR 产物 (117 个核苷酸) 在琼脂糖 D-1 低 EE01% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段通过凝胶快速回收纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化。SPmApoA1-p144 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-SPmApoA1-p144。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0179] 1.5.8pCMV-mApoA1-AscI-p144 中 MM9 序列的导入:

[0180] 为赋予所述基因生成的融合蛋白通过肽 p144 切割而释放的可能性, 通过 MEROPS 数据库 (<http://merops.sanger.ac.uk/>) 研究了具有切割融合蛋白的氨基酸序列而释放完整 p144 能力的蛋白酶。搜索到的结果为一个候选的金属蛋白酶 -9 (MMP9), 其进行了将氨基酸 S 保留在 p144 序列中的切割。该蛋白酶的使用进一步赋予所述构建体将这个 TGF- β 抑制剂在需要其抑制作用 (局部而非全身性的抑制) 的位点释放的能力, 因为已描述过它在癌症中的存在。DNA 序列 CTTTCCCGACGTCT (SEQ ID NO :51) (氨基酸 :LFPTS, SEQ ID NO :19) 将被翻译为所述切割位点 LFPT-STSLDASIIWAMMQN (SEQ ID NO :4)。

[0181] 设计了引物 5' -CCAGGCGCGCCGCTTTTCCCGACGTCTACCTCGCTGGACGCCCTC-3' (FwM Mp9AscIp144) (SEQ ID NO :33) 和 5' -TCAATTCTGCATCATGGCCCA-3' (RvMMP9AscIp144) (SEQ ID NO :34)。通过 Easy-A 高保真 PCR 克隆酶 (Stratagene, La Jolla, CA), 使用 pCMV-SPmApoA1-p144 作为模板进行扩增。在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems Foster City, USA) 中按如下扩增条件进行 PCR 反应: 94°C 2 分钟, 30 个循环的 94°C 40 秒、54°C 45 秒以及 72°C 40 秒, 之后是 72°C 7 分钟。PCR 产物在琼脂糖 D-1 低 EE0 1% 琼脂糖凝胶 (Pronadisa, Madrid, Spain) 中迁移, 凝胶片段被纯化 (70 个核苷酸), PerfectPrep DNA Cleanup (Eppendorf, Germany)。DNAAscI-MMP9-p144 的纯化 DNA 根据提供的说明书克隆入表达载体 pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), 其被称为 pCMV-AscI-MMP9-p144。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0182] 为进行基因融合, 分别用 AscI/PmeI 限制性酶消化质粒 pCMV-mApoA1-AscI-p144 和 pCMV-AscI-MMp9-p144, 后者存在于 pcDNA3.1V5-His TOPO® TA 骨架中。在 37°C 用 AscI/PmeI 酶、1×BSA 以及 Buffer4 (New England Biolabs, Beverly, USA) 消化 1.5 小时。两种消化产物均在 1% 琼脂糖凝胶中迁移, 相应条带被纯化为开放载体 pCMV-mApoA1-AscI-p144 和 pCMV-AscI-MMp9-p144 插入体。将产物以 1 : 3 (载体 : 插入体) 的比例使用高浓度 T4DNA 连接酶和作为缓冲液的 2×Rapid 连接缓冲液 (Promega Madison, WI, USA) 连接, 室温孵育混合物 10 分钟。随后转化 Top10 细菌 (Invitrogen, Carlsbed, CA)。转化细菌通过其在具有青霉素的 LB 培养基的培养皿中的生长来选择, 因为所述载体含有抗这种抗生素的基因。通过 MiniPrep 技术 (Qiagen, Germany) 提取阳性细菌的质粒 DNA, 随后以 AscI/PmeI 酶 (New England Biolabs) 消化 2 μ g 所述质粒, 并在 1% 琼脂糖凝胶中电泳所述消化产物而进行分离, 以证实插入体的存在。所获得的 6324 核苷酸质粒在下文中被称为 pCMV-mApoA1-AscI-MMP9-p144。

[0183] 1.5.9pCMV-mApoA1-p144 中连接序列的导入:

[0184] 为赋予所述基因产生的融合蛋白在所述蛋白质和肽 p144 之间运动的可能性, 导

入了编码氨基酸序列为 APAETKAEPMT (SEQ ID NO :13) 的柔性延长连接子的 DNA 序列 (GCAC CAGCAGAAACAAAAGCAGAACCAATGAC, SEQ ID NO :53), 其采用 CCCCCCCCCC (螺旋) 结构, 并作为天然丙酮酸铁氧还蛋白还原酶 (1b0pA_2) 中的结合肽而存在。

[0185] 设计了引物 5'-CGCGCCGGCACCAGCAGAAACAAAAGCAGAACCAATGACAACCTCGCTGGACGCCT CGATAATCTGGGCCATGATGCAGAATTGAGC-3' (FwLINKERp144) (SEQ ID NO :35) 以及 5'-GGCCGCTC AATTCTGCATCATGGCCAGATTATCGAGGCGTCCAGCGAGGTTGTCATTGGTTCTGCTTTTGTCTGCTGGTGCCG G-3' (RvLINKERp144) (SEQ ID NO :36), 每个引物的浓度为 100mM。每种引物 10 μ L, 混合并在热循环仪中杂交: 95 $^{\circ}$ C 2 分钟, 52 $^{\circ}$ C 10 分钟并冷却至 4 $^{\circ}$ C。这些引物的杂交在相应于连接子和 p144 的序列中是完整的, 但保留与 AscI 在 5' 切割相一致的粘性末端以及与 NotI 在 3' 切割相一致的粘性末端。

[0186] 用 AscI (Buffer 4, New England Biolabs) 消化质粒 pCMV-mApoA1-AscI-p144, 用 PerfectPrep DNA Cleanup (Eppendorf, Germany) 纯化 DNA, 并由于消化缓冲液之间的不兼容性, 随后以 NotI (Buffer3 以及 BSA, New England Biolabs) 消化。1% 琼脂糖凝胶迁移, 开放载体以 PerfectPrep DNA Cleanup (Eppendorf, Germany) 纯化。将产物以 1 : 3 (载体: 插入体) 的比例使用高浓度 T4 DNA 连接酶和作为缓冲液的 2 $\times$ Rapid 连接缓冲液 (Promega Madison, WI, USA) 连接, 室温孵育混合物 10 分钟。随后转化 Top10 细菌 (Invitrogen, Carlsbed, CA)。转化细菌通过其在具有青霉素的 LB 培养基的培养皿中的生长来选择, 因为所述载体含有抗这种抗生素的基因。所获得的含有 6373 个的核苷酸质粒在下文中被称为 pCMV-mApoA1-AscI-LINKER-p144。最后, 所述序列通过测序来确定。

[0187] 2. 实验

[0188] 2.1 动物:

[0189] 实验在雌性免疫活性的 5-7 周 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠中进行 (Harlan, Barcelona, Spain)。根据 Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Pamplona, Spain) 的指示和道德规则, 在特殊的外部无病原体的条件下处理所述动物。

[0190] 2.2 动物处理与肿瘤模型:

[0191] 每种 DNA 质粒 (20 μ g) 在 1.8mL 的 0.9% 盐水 (Braun) 中重悬, 经尾静脉通过高压注射导入 (Liu 等, 1999, Gene Ther., 6 :1258-1266), 使用 27.5G 针头和 2.5mL 注射器 (Becton-Dickinson, Spain) 注射。在吸入异氟烷 (Forane, Abbott) 麻醉后, 通过眼球后途径获得血样。通过两次连续的 9.1xg5 分钟离心回收血清并储存在 -20 $^{\circ}$ C。肠道外麻醉通过每只鼠腹腔内注射 200 μ L 的 9 : 1 氯胺酮 (Imalgene) 和甲苯噻嗪 (Rompun) 混合物而施行。通过腹部接触 ThermoKlinik 温度计 (Artsana, Grandate, Italy) 测量温度。

[0192] 2.2.1 血液分析:

[0193] 从小鼠中采血至具有终浓度为 0.5% 肝素 (Mayne) 的管中。确定: i) 总的白细胞数, 在测量前以 20mL Isoton II 稀释液在管中 1 : 1000 稀释全血, 并加入 3 滴 Zap-Oglobin II 裂解液裂解 2 分钟, ii) 总的红细胞数, 以 10mL Isoton II 稀释液在管中 1 : 50000 稀释全血, iii) 血小板, 以 500 μ L Isoton II 稀释液在管中 1 : 25 稀释全血, 4 $^{\circ}$ C 600g 离心 1.5 分钟, 以 1 : 400 的稀释上清后转入具有 20mL Isoton II 稀释液的管中, 所述样品在 Z1 Coulter 粒子计数器中以生产商推荐用于各种情况的设置进行分析 (所有的材料和试剂均来自 Beckman Coulter)。

[0194] 2.2.2 抗 CT26 的接种疫苗模型：

[0195] 为分析基因转移的抗肿瘤效果，实施了两种接种疫苗方案：

[0196] A) A 接种疫苗方案对每只小鼠施用 50 μ g 具有氨基酸序列为 SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 54) (Proimmune Ltd., Oxford, United Kingdom) 的溶解在 100 μ L 0.9% 生理盐水中的肽 AH-1 和 100 μ L 弗氏不完全佐剂 (IFA, SIGMA, Madrid, Spain)。所述混合物在 Branson SONIFIER 250 中超声。每只动物以 25G 针头和 1mL 注射器 (Becton-Dickinson, Spain) 接种 200 μ L 混合物，其中在小鼠左侧腹导入 100 μ L，在足底导入 50 μ L。7 天后，通过高压注射 (Liu 等, 1999, Gene Ther., 6:1258-1266) 施用不同的构建体。高压注射 7 天后，通过以胰岛素注射器 (Becton-Dickinson, Spain) 在同源 BALB/c 小鼠右腹侧皮下注射重悬于 200 μ L HBSS (Gibco-BRL, Paisley, UK) 的 5×10^5 CT26 结肠腺癌细胞的方式形成肿瘤。

[0197] B) 通过高压注射的方式施用基因构建体。高压注射 1 天后，以前述的方式接种肽 AH-1。9 天后，通过皮下注射方式接种 5×10^6 CT26 结直肠腺癌细胞。以数字精密测量进行肿瘤跟踪。

[0198] 2.3 所使用细胞系的详细说明：

[0199] CT26 细胞系来源于 BALB/c 小鼠结直肠腺癌并被致癌物 N-亚硝基-N-甲基-氨基甲酸乙酯诱导，在加入 56°C 灭活 10% 胎牛血清 (FCS)、2mM 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、1% 5×10^{-3} β -巯基乙醇的完全 RPMI-1640 培养基 (Gibco-BRL, Paisley, UK) 中培养。MC38 细胞系 (小鼠腺癌细胞)、L929 (来源于小鼠成纤维细胞的细胞) 以及 293 (以属于人 5 型腺病毒的 E1 区稳定转染的人胚肾细胞, ECACC 号 85120602) 在完全 DMEM (加入 56°C 灭活 10% 胎牛血清 (FCS)、2mM 谷氨酰胺、100U/mL 链霉素、100U/mL 青霉素) 中培养。

[0200] 所描述的细胞在 37°C 的潮湿培养室内和 5% CO₂ 环境下培养。培养瓶和培养皿来自 Greiner Bio-one (Essen, Germany)。

[0201] 2.4 mIFN α 1、IFN γ 和新蝶呤的测定

[0202] mIFN α 1 水平通过 ELISA 在 NUNC maxisorp flat 96 孔板中测量。抗 mIFN α 1 中和 Ab 抗体 (RMMA-1, PBL) 在 PBS 1 $\times$ 中以 1/1000 稀释，每孔 100 μ L 并在潮湿环境下 0/N 4°C 孵育。在以 PBS 1 $\times$ -0.1% Tween-20 (pH 7.2-7.4) 洗涤 5 次后，所述板以每孔 300 μ L 的 PBS 1 $\times$ 1% BSA 溶液在室温封闭 1 小时。血清样品在 PBS 1 $\times$ 1% BSA 溶液中 1/100 稀释并在室温孵育 1 小时。用 PBS 1 $\times$ -0.1% Tween-20 洗涤 5 次后，以每孔 100 μ L 的 1/1000 稀释于 PBS 1 $\times$ 1% BSA 溶液中的兔抗 IFN α 多克隆抗体 (PBL) 孵育 1 小时。以 PBS 1 $\times$ -0.1% Tween-20 洗涤 5 次后，每孔加入 100 μ L 的 1/4000 稀释于 PBS 1 $\times$ 1% BSA 溶液中的 HRP 标记的驴 α -兔 IgG (Southern Biotech, Birmingham, CA, USA)，室温孵育 1 小时。用 PBS 1 $\times$ -0.1% Tween-20 洗涤 5 次后，每孔加入 100 μ L 的 BD OptEIA 底物溶液 (BD)，室温并处于黑暗中 15 分钟后，加入 50 μ L 的 2N H₂SO₄。最后，测量在 450nm 的吸光度，并在 540nm 校正。

[0203] 用 IFN- γ ELISA Set (BD Biosciences, San Diego, CA) 测量血清中的 IFN γ 水平。根据生产商提供的用法说明书以 Neopterin ELISA (IBL, Hamburg) 测量血清中的新蝶呤水平。

[0204] 2.5 定量 PCR

[0205] 使用 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) 孵育 2 μ L 的 cDNA 与表 1

中的特异性引物。小鼠肌动蛋白用作基因表达的标准,因为其表达不受 mIFN α 1 或 mApoA1 的影响。mRNA 值通过公式 $2^{\Delta C_t}$ 表现,其中 ΔC_t 表示 mActin 和靶基因之间阈值循环之间的区别。

[0206]

名称	序列	SEQ ID NO:
FwATGmApoA1	5'-ATGAAAGCTGTGGTGCTGGC-3'	20
RvTGmApoA1	5'-TCACTGGGCAGTCAGAGTCT-3'	21
Fw AscI mApoA1	5'-CCAGGCGCGCCGGATGAACCCCAGTCCCAATG-3'	27
RvAscImApoA1	5'-GGCGCGCCCTGGGCAGTCAGAGTCTCGC-3'	24
RvSPmApoA1	5'-TTGCTGCCATACGTGCCAAG-3'	30
RvmApoA1p17	5'-TCACGCACGCTCATACCAAGAACTCCTAGG AATAAACCAAATACGCTTGGGCGCGCCCTGGGC-3'	28
RvmApoA1p144	5'-TCAATTCTGCATCATGGCCCAGATT	29

[0207]

名称	序列	SEQ ID NO:
	ATCGAGGCGTCCAGCGAGGTGGGCGCGCCCTGGGC-3'	
RvSPmApoA1p17	5'-TCACGCACGCTCATACCAAGAACT CCTAGGAATAAACCAAATACGCTTTTGCTGCCAGAAATGCCG-3'	31
RvSPmApoA1p144	5'-TCAATTCTGCATCATGGCCCAGATTATCGA GGCGTCCAGCGAGGTTTGCTGCCAGAAATGCCG-3'	32
FwMMp9AscIp144	5'-CCAGGCGCGCCGCTTTTCCCGACGTCTACCTCGCTGGACGCCT C-3'	33
RvMMp9AscIp144	5'-TCAATTCTGCATCATGGCCCA-3'	34
FwLINKERp144	5'-CGCGCCGGCACCAGCAGAAACAAAAGCAGAACCA ATGACAACCTCGCTGGACGCCTCGATAATCTGGGCCATGATGCAGA ATTGAGC-3'	35
RvLINKERp144	5'-GGCCGCTCAATTCTGCATCATGGCCCAGA TTATCGAGGCGTCCAGCGAGGTTGTCATTGGTTCTGCTTTTGTTC TGCTGGTGCCGG-3'	36
FwATGmIFNa1	5'-ATGGCTAGGCTCTGTGCTTT-3'	22
RvTGAmIFNa1	5'-TCATTTCTCTTCTCTCAGTC-3'	23
FwAscImIFNa1	5'-GGCGCGCCCTGTGACCTGCCTCAGACTCA-3'	25
RvAscImIFNa1	5'-GGGCGCGCCTTTCTCTTCTCTCAGTCTTC-3'	26
FwUSP18	5'-CCAAACCTTGACCATTACACC-3'	37
RvUSP18	5'-ATGACCAAAGTCAGCCCATCC-3'	38
FwISG15	5'-GATTGCCCAGAAGATTGGTG-3'	39
RvISG15	5'-TCTGCGTCAGAAAGACCTCA-3'	40
FwIRF1	5'-CCAGCCGAGACACTAAGAGC-3'	41
RvIRF1	5'-CAGAGAGACTGCTGCTGACG-3'	42
FwMx1	5'-ATCTGTGCAGGCACTATGAG-3'	43
RvMx1	5'-CTCTCCTTCTTTCAGCTTCC-3'	44

[0208]

名称	序列	SEQ ID No :
FwmActin	5' -CGCGTCCACCCGCGAG-3'	45
RvmActin	5' -CCTGGTGCCTAGGGCG-3'	46
qPCR FwmIFNa	5' -TCTYTCYTGCTGAAGGAC-3'	47
qPCR RvmIFNa	5' CACAGRGGCTGTGTTTCTTC-3'	48
Fw 2-50AS	5' -ACTGTCTGAAGCAGATTGCG-3'	49
Rv 2-50AS	5' -TGGAAGTGTGAAGCAGTC-3'	50

[0209] 表 1 所使用的引物列表

[0210] 2.6 体内杀伤

[0211] 使雌性 BALB/c 小鼠 (N = 3/ 组) 通过如前所述的高压注射在第 0 天以 20 μ g pCMV-LacZ 和 20 μ g 的各种构建体免疫用以研究 : (i) pCMV-mApoA1 ii) pCMV-IFN α 1 iii) pCMV-mApo-IFN iv) 溶解在 0.9% 生理盐水 (Braun) 中的 pCMV-mIFN-ApoA1。在第 7 天, 分离非免疫 BALB/c 小鼠的脾细胞, 以 ACK 溶液 (Cambrex, Walkersville, MD) 裂解红细胞。获得的脾细胞分为两组, 其中一组在 37°C 用 RPMI 1640 培养基和 9 μ M 的肽 TPHPARIGL (β 半乳糖苷酶来源的细胞毒素表位, Proimmune Ltd., Oxford, United Kingdom) 培养 30 分钟。第二组用不含有所述肽的相同方式处理。加载所述肽的脾细胞以 2.5 μ M CFSE (CFSE^高) (Molecular Probes, Eugene, OR) 标记。对照脾细胞以 0.25 μ M CFSE (CFSE^低) 标记。最后, 两细胞群以 1 : 1 的比例混合, 未经免疫的小鼠或免疫过的小鼠静脉内注射 10^7 细胞。24 小时后, 处死所述动物。破碎摘取的脾脏, 通过使用 FACSalibur (Becton Dickinson, Mountain View, Calif, USA) 的流式细胞仪分析 CFSE^高 和 CFSE^低 细胞的比例。特异性裂解的比例根据下述公式计算 :

[0212]

$$\text{裂解} = 100 - \left[100 \times \frac{\left(\frac{\% \text{免疫的 CFSE}^{\text{高}}}{\% \text{免疫的 CFSE}^{\text{低}}} \right)}{\left(\frac{\% \text{对照 CFSE}^{\text{高}}}{\% \text{对照 CFSE}^{\text{低}}} \right)} \right]$$

[0213] 2.7 SRB1 表达的测量 :

[0214] 分离 C57BL/6 小鼠的脾细胞。提取并被破碎的脾被分为 8 组, 其中 4 组以兔抗 SR-B1 多克隆抗体 (Novus Biologicals Littleton, CO) 和 BD Pharmingen 抗体孵育 10 分钟 : i) R-PE 轂合的大鼠抗小鼠 CD4 (L3T4) 单克隆抗体以分辨 CD4⁺ 细胞群, 以及 APC 轂合的大鼠抗小鼠 CD8a (Ly-2) 单克隆抗体, 以分辨 CD8⁺ 细胞群。ii) APC 轂合的小鼠抗小鼠 NK-1.1 (NKR-P1B 和 NKR-P1C) 单克隆抗体以分辨 NK 细胞群。iii) APC- 大鼠抗小鼠 CD11b 以分辨单核细胞群。iv) APC-CD11c 以分辨树突状细胞群。其余 4 组用作对照, 用不含有抗 SRB1 的相应抗体孵育 10 分钟。标记的脾细胞以 PBS 和 5% 胎牛血清洗涤, 并以 FITC 轂合

的驴抗兔 IgG 抗体 (JacksonImmunoResearch, West Grove, PA) 孵育 10 分钟。从而染色的样品通过使用 ACSalibur (Becton Dickinson, Mountain View, Calif, USA) 的流式细胞仪分析。

[0215] 2.8 溴化钠梯度中通过微分超速离心分离 HDLs :

[0216] 高压注射质粒 mApoA1、IFN α 1、Apo-IFN、IFN-Apo 或 ApoAI- 连接子 -P14424 小时后,从小鼠采血并置于具有终浓度为 0.5% 肝素 (Mayne) 的管中,通过离心 (5000g, 20 分钟) 立即提取血浆。

[0217] 在蒸馏水中制备不同密度的溴化钠 (NaBr) 溶液,终体积为 25mL。加入终浓度为 0.05% (w/v) 的 EDTA。加入 NaBr (Fluka) 以获得溶液: 0.225g ($\rho = 1.006\text{g/mL}$)、1.431g ($\rho = 1.04\text{g/mL}$)、7.085g ($\rho = 1.21\text{g/mL}$) 以及 13.573g ($\rho = 1.4\text{g/mL}$)。基于 NaBr 是高吸湿盐的事实,证实了所述密度,必要时通过添加蒸馏水校正。

[0218] 超速离心之后通过浮选执行顺次分离脂蛋白的方法,使用 Rodriguez-Sureda 等 (Analytical Biochemistry 303,73-77 (2002)) 描述的方案的小改进,在 Ultracentrifuge Optima MAX 中,以 TLA100.4 转子 (BeckmanCoulter),从 2-4mL 的小鼠血浆 (根据所述样品统一标准) 以下述密度施行: VLDL $< 1.006\text{g/mL}$ 、LDL $1.006-1.04\text{g/mL}$ 以及 HDL $1.04-1.21\text{g/mL}$ 。i) VLDL 的分离: 400 μL 的小鼠血浆被转至 3mL 聚碳酸酯管中,加入 1100 μL 的 $\rho = 1.006\text{g/mL}$ NaBr 溶液。样品在 4°C 下,336000g 离心 2 小时。大约 650 μL 的上清液被收集在移液管中并于 -20°C 储存。ii) LDL 的分离: 沉淀物的残余体积通过添加经 $\rho = 1.4\text{g/mL}$ NaBr 溶液的公式计算所得的体积转为 1.04 的密度:

[0219] $\rho = m/V$

[0220] $V_{1.4\text{NaBr}} = V_{\text{bf}}(d-d_{\text{bf}})/1.4-d$ $V_{1.4\text{NaBr}} = 1.4$ 溶液的体积

[0221] 待加入的

[0222] V_{bf} = 沉淀物的体积

[0223] d_{bf} = 沉淀物的密度

[0224] 所述体积被 $\rho = 1.04\text{g/mL}$ NaBr 溶液转至 1.5mL,并且所述样品在 4°C 下,336000g 离心 2.5 小时。300-400 μL 上清被收集在移液管中并储存在 -20°C。iii) HDL 的分离: 大约 800 μL 的沉淀物被转移至新管内,所述密度如前所述的那样被调节至 1.21g/mL,以 $\rho = 1.21\text{g/mL}$ NaBr 溶液调节至 1.5mL 体积。所述样品在 4°C 下,336000g 离心 3.5 小时。收集对应于 HDL 的约 400 μL 上清部分,以及对应于无脂蛋白血浆 (LDP) 的沉淀部分并储存在 -20°C。

[0225] 2.9 mApoA1 的电泳和免疫印迹:

[0226] 每种样品中的 25 μL HDL 或 LDP 部分在 4-20 % Tris-hepes PAGE LongLife iGels (Nusep) 梯度凝胶中分离,被转移至硝化纤维膜 (Whatman)。所述蛋白质用 1 : 200 稀释的山羊抗 mApoA1 多克隆抗体 (山羊抗载脂蛋白 A1 多克隆抗体, Santa Cruz Biotechnology) 以及 1 : 20000 稀释的抗山羊 IgG 抗体 (抗山羊 IgG 全分子) -HRP 轭合, Sigma-Aldrich) 检测。所述膜使用 ECL Plus 免疫印迹检测试剂显影 (Amersham)。

[0227] 2.10 IFN 活性的生物测定: 细胞病变效应 (CPE):

[0228] 从含有 Apo-IFN 和 IFN-Apo 的小鼠血浆分离的 HDL 部分的 IFN 活性单位通过活性生物测定计算,测量 IFN 保护细胞在通过样品连续稀释浓度的 IFN 大浓度范围上不受脑心

肌炎裂解病毒 (EMCV) 引起的细胞病变的能力。在这种稀释法中, 96 孔 Cellstar 细胞培养板 (Greiner bio-one) 中每孔放置 3×10^5 L929 细胞, 并在 O/N 37°C 5% CO₂ 条件下孵育以获得单层的贴壁细胞。然后, 每孔加入相同 pfu 量的 EMCV 并孵育 24 小时直至作为对照的未处理细胞溶解。在这个时候, 通过具有 ViaLight Plus Kit 显影液 (Lonza) 的化学冷光仪根据生产商的用法说明测量被 IFN 效应保护的活细胞。读数器绘图以生成剂量反应曲线 (Prism 5, GraphPad Software, Inc.), IFN 制剂在抗病毒活性单位方面的效力可参照各种检测中所使用的 rIFN α 重组蛋白标准 (PBL) 的稀释法计算。

[0229] 2.11 使用 rIFN 以及分离的 HDL IFN-Apo 部分的实验:

[0230] 活性生物测定检测的 1000IU 的小鼠 rIFN α (CHO 来源小鼠, HycultBiotechnol) 或 10000IU 的 HDL IFN-Apo 通过眼窝注入小鼠。

[0231] 2.12 数据的统计分析:

[0232] 使用 Prism 5 计算机程序 (GraphPad Software, Inc.) 进行数据统计分析。肿瘤外观数据在 Kaplan-Meier 图中呈现并通过 log-rank 检验分析。不同时间研究的数据通过重复测量方差分析及随后的 Bonferroni 检验进行分析。剩下的参数通过方差分析及随后的 Dunnett's 事后分析进行分析用于完成多重比较。p < 0.05 的值被认为是显著性的。

[0233] 实施例 2

[0234] 嵌合构建体 ApoAI-IFN α 的高压施用增加了血清 IFN 水平

[0235] 为比较小鼠血清 IFN α 水平, 表达载脂蛋白 AI (ApoAI)、小鼠干扰素 α 1 (IFN α 1)、Apo-IFN (ApoAI 与 IFN α 的融合) 或 IFN-Apo (IFN α 1 和 ApoAI 的融合) 的质粒通过高压注射施用给四组小鼠。通过夹心 ELISA 分析在 6 小时后以及第 1、3、6 以及 9 天获得血清。接受表达 ApoAI 对照质粒的小鼠的血清不具有可检测的 IFN α 水平, 表明高压施用本身或 ApoAI 表达不会诱导内源性 IFN α 的表达 (图 1)。注射表达 IFN α 1 质粒的小鼠在 6 小时后具有高水平的 IFN α 并迅速减少 (图 1)。接受编码 Apo-IFN 或 IFN-Apo 质粒的小鼠在第 1 天具有更高的血清干扰素水平。此外, 在第 3 天可检测到高水平 IFN α , 不同于注射 IFN α 1 质粒的小鼠 (图 1)。因此, 表达 IFN α 和 ApoAI 融合蛋白的构建体具有更高且更持续的血清 IFN α 水平。

[0236] 实施例 3

[0237] 在嵌合构建体 ApoAI-IFN α 中信使 RNA 动力学无变化

[0238] 血清 IFN α 水平的不同可通过与 IFN α 的融合蛋白相关的血浆半衰期的增加或通过这些蛋白的表达增加来解释。为辨别这两种情况, 分析了这些构建体的信使 RNA (mRNA) 的动力学。为此, 在第 0、1、3 和 6 天收集了接受表达 ApoAI、IFN α 1、Apo-IFN 和 IFN-Apo 质粒高压注射的小鼠的肝脏。提取这些样品的 RNA 并进行定量 RT-PCR。正如可在图 2 中观察到的, 第 1 天在 IFN α 1、Apo-IFN 和 IFN-Apo 样品中检测到 IFN α 1 mRNA 水平但未在 ApoAI 样品中检测到 IFN α 1 mRNA 水平。在任何具有 IFN α 的构建体的组间, mRNA 水平没有显著性差异。在第 3 天和第 6 天, 任何样品中均检测不到 IFN α 1 mRNA 水平。因此, 在接受含有 IFN α 1 的构建体的所有组中, mRNA 动力学是相似的, 有关嵌合构建体 ApoAI-IFN α 1 中表达增加的猜想可以被放弃。

[0239] 实施例 4

[0240] 注射嵌合构建体 ApoAI-IFN α 的小鼠具有更高的血清新蝶呤水平和体温水平

[0241] 为证实 i) 所述嵌合蛋白保留 IFN α 的生物活性以及 ii) 更持续的水平与更高的生物活性相关联, 分析了 IFN α 施用后两个增长的参数。在质粒施用 3 天后研究了这些参数, 届时无法再检测到具有 IFN α 1 的构建体产生的 IFN α , 但可检测到嵌合构建体所产生的 IFN α 。首先, 分析了血清新蝶呤水平。新蝶呤是 GTP 的一种代谢产物, 由 I 型和 II 型干扰素刺激的巨噬细胞合成。含有 IFN α 序列的三种质粒增加了血清新蝶呤水平但只有嵌合构建体增加显著 (图 3A)。其次, 测量了被注射小鼠腹部区域的体温。三种构建体观察到了高体温水平, 在嵌合构建体施用后获得的体温水平得到了加强 (图 3B)。因此, 嵌合蛋白能够增长干扰素诱导的两种生物参数, 证明了其保留生物活性并且这种活性与第 3 天的血清 IFN α 水平相关。

[0242] 实施例 5

[0243] 嵌合构建体 ApoAI-IFN α 增加了干扰素刺激的基因的肝脏表达水平

[0244] 通过干扰素刺激的基因 (ISGs) 编码的蛋白质调节 I 型干扰素的活性。在 IFN α 结合其膜受体后, 导致 ISG 转录活化的信号级联放大被激活。为证实嵌合构建体是否也诱导这些基因, 在高压施用后第 3 天分析了 4 种这些基因的 mRNA 水平。分析的基因是 IRF1、2'-5' OAS、USP18、ISG15、Mx1。正如可在图 4 中观察到的, 嵌合构建体增加了所研究的 ISGs 的 mRNA 水平。也能检测到表达 IFN α 的质粒所诱导的增长, 尽管事实上在第 3 天再也检测不到血清 IFN α 水平。

[0245] 实施例 6

[0246] 具有 IFN α 的构建体增加了脾细胞的数量与活化

[0247] 为探究构建体的免疫刺激活性, 首先分析了脾细胞数量和活性的增加。为此, 通过高压注射的方式注射质粒并在 6 天后破碎脾脏, 计算总细胞数并用区分主要淋巴细胞群的抗体和活化标记 (CD69) 标记脾细胞后, 通过流式细胞仪分析。具有 IFN α 的构建体的注射显著增加了脾细胞的数量。编码 IFN-Apo 的构建体在这个试验中相当突出 (图 5A)。为标记不同的脾细胞群体, 抗 CD4 抗体被用作 CD4⁺T 细胞标记, 抗 CD8 被用作 CD8⁺T 细胞标记, 抗 CD19 作为 B 细胞标记, 以及抗 CD49b 作为 NK 细胞标记。关于 CD4⁺T 细胞, 嵌合构建体增加了活化的 CD4⁺ 细胞的百分比, 不像 IFN α 那样 (图 5B)。然而, 尽管以非显著的方式, IFN α 确实增加了 CD8⁺ 细胞的百分比。使用 Apo-IFN 的这种增长更大且更显著, 使用 IFN-Apo 的尤其高 (图 5C)。活化的 B 细胞百分比与 CD8⁺ 的外观相似。在这种情况下, 仅仅 IFN-Apo 导致显著性增长 (图 5D)。最后, NK 细胞被 IFN α 质粒高度激活, 该参数不被嵌合构建体所超过 (图 5E)。该数据表明 IFN-Apo 可具有强有力的佐剂作用。

[0248] 实施例 7

[0249] IFN-Apo 增加细胞毒性淋巴细胞诱导的特异性溶解

[0250] 为证实 IFN-Apo 的佐剂作用, 分析了不同构建体存在下由 DNA 疫苗诱导的细胞毒素活性的增加。编码产生免疫的 β -半乳糖苷酶蛋白的 LacZ 基因被选作抗原模型。编码该蛋白质的质粒与编码 ApoA1、IFN α 1、Apo-IFN 或 IFN-Apo 的质粒一同注射。基因接种 7 天后, 静脉内注射 2.5 μ M CFSE 标记的并加载有来源于 β -半乳糖苷酶蛋白的细胞毒性表位 H2Kd TPHPARIGL 的脾细胞。作为内部对照, 注射具有 0.25 μ M CFSE 但不具有肽的脾细胞。24 小时后, 通过流式细胞仪定量加载有细胞毒性表位的脾细胞的特异性溶解。图 6 中, 观察到相对于 ApoAI, IFN α 的更高的溶解, 之后是 Apo-IFN 和 IFN-Apo 的, 所述构建体获得了最

高值的特异性溶解。这些结果与 CD8⁺T 细胞激活百分比的结果相关联,得出结论:IFN-Apo 是在基因接种模型中具有最强佐剂作用的构建体。

[0251] 实施例 8

[0252] SR-BI 的表达

[0253] 佐剂活性的增加可归因于 IFN α 稳定性的上升,或归因于 IFN-Apo 的 ApoAI 部分使得 IFN α 与免疫系统细胞更多相互作用的事实。为探究后面这个假说,检测了不同免疫系统群体中 ApoAI 主要受体 SR-BI 的存在。分离未经处理小鼠的脾细胞,用抗 SRB-I 抗体和区分种群的抗体标记。应用下述抗体:抗 CD4,作为 CD4⁺T 细胞标记;抗 CD8,作为 CD8⁺T 细胞标记;抗 CD49b,作为 NK 细胞标记;抗 CD11b,作为单核细胞/巨噬细胞标记;以及抗 CD11c,作为树突状细胞标记。在所有分析的群体中检测 SRB-I 受体。在免疫系统的效应细胞(CD4⁺T、CD8⁺T 以及 NK 细胞)中,表达该受体的细胞的百分比在 15%至 28%的范围内。在具有抗体提呈能力的细胞如单核细胞和树突细胞中,该比例增至 50%以上(图 7)。该结果表明增加佐剂能力的一个可能机制可以是抗原提呈细胞的更高成熟度。

[0254] 实施例 9

[0255] IFN-Apo 改善抗肿瘤接种方案的效力

[0256] 在证明 IFN-Apo 比 IFN 具有更高佐剂活性之后,评估了在接种方案中这种效应是否能转换为更高的抗肿瘤效力。为此,BALB/c 小鼠接受高压注射 Apo、IFN 或 IFN-Apo 质粒,并且在第二天,以包含在不完全弗氏佐剂中的细胞毒性肽 AH-1 免疫。该肽由 CT26 肿瘤细胞系呈递,所述细胞在免疫 9 天后接种不同的实验组。接受免疫以及高压注射 Apo 质粒的对照组的大部分小鼠,在接种 CT26 肿瘤细胞的位置形成皮下瘤。除了免疫外接受 IFN 的小鼠表现出与对照组非显著性差异的行为。然而,约 60%接受接种和 IFN-Apo 质粒的小鼠能够排斥肿瘤细胞并且在实验的 30 天内不出现肿瘤(图 8)。因此,更强的 IFN-Apo 佐剂效应导致接种方案效力的增加。

[0257] 实施例 10

[0258] IFN-Apo 表现出比 IFN 更低的血液学毒性

[0259] IFN 的一个局限性是它相当大的血液学毒性,其可在某些产生强烈的白细胞减少症和/或血小板减少症的病人中导致治疗的中断。在高压施用不同的构建体后,分析了血液中白细胞和血小板的发展。在图 9A 中可看到,所有具有干扰素的构建体在高压施用质粒后第 1 天表现出白细胞的低血液水平。这种早期效应可通过所描述的用于 IFN 的阻断白细胞从二级淋巴器官离开来调节(Shiow LR 等。Nature. 440(7083):540-4(2006))。然而,在第 3 天,当基于 IFN 抗增殖特性的毒效可见时,仅仅是用 IFN 处理的小鼠表现出低水平。在用 IFN-Apo 处理的小鼠中,血液白细胞恢复到其正常水平。至于血小板(图 9B),第 3 天在那些用 IFN 处理的动物中观察到了其降低。这种降低显著低于用 IFN-Apo 处理的小鼠。因此,IFN-Apo 减少了 IFN 诱导的白细胞和血小板的降低。

[0260] 实施例 11

[0261] 在大脑中 IFN-Apo 增加少于 IFN 的干扰素诱导基因。

[0262] IFN 的另一种限制其用于某些病人的主要副作用是神经精神系统紊乱。为研究新融合分子在中枢神经系统中的这种作用,BALB/c 小鼠注射编码不同构建体的质粒,并且,在 24 小时后,处死小鼠并提取其大脑。不同组中的干扰素诱导基因(ISGs)的增加通过定

量 RT-PCR 分析 (图 10)。尽管融合蛋白的血浆水平高于 IFN 的血浆水平 (图 1), IFN 中的 ISGs 增加显著强于 IFN-Apo 分子中的。该数据表明 Apo 分子与 IFN 的融合改变了血脑屏障 (BBB) 通道。0.02% -0.18% 的干扰素 α 通过被动扩散穿过血脑屏障 (Greig, N. H., 等。J Pharmacol Exp Ther, 245(2) :574-80(1988) ;Greischel, A., 等。Arzneimittelforschung, 38(10) :1539-43(1988) ;Smith, R. A., 等。ClinPharmacol Ther. 37(1) :85-8. (1985))。因此, 大脑中的浓度水平将与血浆浓度成比例。相反, HDLs 的血脑屏障通道通过 SR-BI 调节的主动运输进行, 维持了严格控制性以及低水平 (Karasinska, J. M., 等。J Neurosci. 29(11) :3579-89(2009))。我们的结果表明, 生物活性化合物与载脂蛋白 AI 的结合促使这些嵌合分子遵循 HDLs 转运通过血脑屏障的机制。

[0263] 实施例 12

[0264] IFN-Apo 融合蛋白循环整合入高密度脂蛋白 (HDLs)。

[0265] 约 97% 的载脂蛋白 AI 存在于血液中, 以被称为高密度脂蛋白的大分子脂蛋白复合物形式循环。为研究所述融合蛋白是否能整合入 HDLs, 在高压途径注射编码 IFN 和 IFN-Apo 的质粒 24 小时后, 通过 NaBr 梯度的差速离心从血清中分离 HDLs。IFN 的生物测定, 即对病毒细胞病变效应保护的检测, 在这些组分中进行, 其中先与连续稀释样品中的 IFN 孵育的细胞与细胞病变的病毒相比较。如果样品中有干扰素, 所述病毒将不能溶解预处理的细胞。从接受编码 IFN 质粒的小鼠获得的 HDLs 不能保护细胞免受脑脊髓炎病毒的病变效应, 表明 IFN 并不结合 HDLs 而循环。相反, 确实能通过该技术在 HDLs 中检测到两种 IFN-Apo 分子 (图 11A)。然后, 进行免疫印迹以检测每个实验群组中的无 HDLs (HDLs-) 血清部分以及 HDLs (HDLs+) 部分中的载脂蛋白 AI。在任何 HDL 缺失部分中均未检测到载脂蛋白 AI, 指示 HDLs 的正确分离。两组接受 Apo 质粒的群组中以及接受 IFN 质粒的群组中, 在 HDLs 部分中仅检测到 1 个对应于内源性载脂蛋白 AI 高度的条带。相反, 在接受 Apo-IFN 分子的群组中检测到更大高度的条带, 对应于融合分子。在 IFN-Apo 的情况下, 除内源性 ApoAI 外还检测到两个条带, 指示部分嵌合蛋白中二聚体的形成 (图 11B)。这个现象可归因于构建体的 C 末端是游离的, 允许与其它 ApoAI 分子相互作用。该数据表明融合分子能够整合入高密度脂蛋白。因此, 这些分子的生物分布将由 HDLs 的生物分布规则所支配, 其可解释, 至少部分地, 某些 IFN 活性中观察到的剧变。

[0266] 实施例 13

[0267] 含有 IFN-Apo 的 HDLs 的再施用保持了高压注射后观察到的特性。

[0268] 从施用编码 IFN-Apo 质粒小鼠的血清纯化含有 IFN-Apo 的 HDLs 的可能性, 提供生理学上的 IFN-Apo 纳米脂质体颗粒以研究其体内和体外特性。纯化具有 IFN-Apo 的 HDL, 每只小鼠施用相当于 1000IU IFN 的量。在第 3 天, 测量血液中白细胞和血小板数量。重组 IFN 所述剂量的施用不能引起这些参数的下降。但接受具有 IFN-Apo 的 HDLs 的小鼠表现出显著的更高水平 (图 12A)。该现象可归因于 IFN-Apo 比 IFN 更有效地刺激潜在造血细胞的增殖 (Essers MA, 等。Nature. Feb 11(2009))。在第 1 天, 检测这些小鼠中的由 IFN 诱导的抑制状态。再次地, 在接受重组 IFN 的小鼠与接受等剂量具有 IFN-Apo 的 HDLs 的小鼠之间存在显著性差异, 再现了在高压施用后所获得的数据。

[0269] 实施例 14

[0270] ApoAI- 连接子 -P144 构建体增加 IL12 介导的 IFN γ 诱导。

[0271] 白细胞介素 12(IL12) 是一种具有强有力的抗肿瘤活性的免疫刺激细胞因子。其活性基本上受 IFN γ 调节。该中介物的产生受 TGF β 调控,因而通过抑制肽 p17 或 p144 的封闭可增加 IFN γ 诱导,并且因此增加 IL12 的抗肿瘤活性。为研究 ApoAI 与 TGF β 抑制肽通过不同肽序列耦合并形成的嵌合构建体是否能增加 IL12 介导的 IFN γ 诱导,编码小鼠 IL12 和编码不同构建体的质粒通过高压注射施用。ApoAI 用作对照。两种构建体通过 p17 产生:i) spP17,含有在 ApoAI 信号肽后的编码肽 p17 的序列,完成了肽 p17 至细胞外基质的释放;ii) ApoAI-P17,含有接着三个结合氨基酸 (GAP) 的编码 ApoAI 的基因,和编码 p17 的序列。用 p144 产生的 spP144 和 ApoAI-P144 构建体,以编码 p144 的序列替代编码 p17 的序列。此外生成另外两个构建体:i) ApoAI-MMP9-P144,含有金属蛋白酶 9 (MMP9) 的靶作为结合肽;ii) ApoAI-连接子-P144,含有具有延展构象的作为结合肽的序列。

[0272] 高压注射 4 天后,通过 ELISA 检测血清 IFN γ 水平。编码 IL12 和 ApoAI 的质粒的注射产生了可检测的 IFN γ 水平。具有 p17 的构建体的注射没有增加这些水平(图 13A)。然而,产生 p144 的构建体的施用显著增加了 IFN γ 水平(图 13B)。构建体 ApoAI-连接子-P144 产生了最高水平,显著性地大于由 p144 单独诱导的水平(图 13B)。奇怪的是,构建体 ApoAI-P144 和 ApoAI-MMP9-P144 没有增加 IFN γ 诱导,表明结合肽序列在嵌合构建体活性上有巨大影响。ApoAI-MMP9-P144 构建体是仅在 MMP9 存在时有活性的潜在抑制剂的例子,其在结合 ApoAI 序列切割时,在 MMP9 表达的位置释放活性肽 p144。该蛋白酶被包括肝癌的很多类型肿瘤以及侵入肿瘤间质的骨髓抑制细胞表达。因此,该构建体使得 p144 在其主要作用位点释放,限制了全身性 TGF β 抑制的副作用。

[0273] 实施例 15

[0274] 表达 p17 和 ApoAI-连接子-P144 的构建体增加了无肿瘤免疫小鼠的百分比

[0275] 为证实具有 TGF β 抑制肽的构建体在独立实验模型中的生物活性,BALB/c 小鼠以不完全弗氏佐剂中的细胞毒性表位 H2Kd AH1 (SPSYVYHQF, SEQ ID NO:54) 接种。7 天后,通过高压注射施用不同的构建体。另一个 7 天后,皮下接种 5×10^5 CT26 细胞。随时间推移检测无肿瘤动物的百分比。在接受疫苗以及表达 ApoAI 的对照构建体的群组中,所有小鼠在 CT26 细胞接种位置形成了皮下肿瘤。然而,在接受两个表达 p17 的构建体之一的小鼠中,超过 50% 的小鼠在实验结束时保持无瘤(图 14A)。至于具有 p144 的构建体,表达肽 p144 的构建体、ApoAI-P144 构建体和 ApoAI-MMP9-P144 构建体具有非常有限的影响,实验结束时无瘤小鼠少于 20%。令人吃惊地, ApoAI-连接子-P144 构建体能够预防肿瘤在 85% 以上的小鼠中发病。

[0276] 实施例 16

[0277] ApoAI-连接子-P144 蛋白循环整合入高密度脂蛋白

[0278] 为研究 ApoAI-连接子-P144 蛋白是否与 HDLs 形成复合物,从通过高压途径施用编码 ApoAI-连接子-P144 的质粒的小鼠血清中分离含有 HDLs 的组分。为此,血清在 NaBr 梯度中差速离心。一旦 HDLs 被纯化,进行免疫印迹以检测载脂蛋白 AI。除了对应于内源性载脂蛋白 AI 的主要条带外,检测到对应于 ApoAI-连接子-P144 分子的更高条带(图 15)。因此,具有融合的治疗性肽的载脂蛋白 AI 能够以生理学上的纳米脂质体颗粒形式整合并循环。

[0279] 实施例 17

[0280] 含有 ApoAI-连接子-P144 的 HDLs 增加 IL12 诱导的 IFN γ 。

[0281] 含有 ApoAI-连接子-P144 的 HDLs 的纯化容许获得具有抑制 TGF β 活性的生理学纳米脂质体颗粒。为显示其体内活性,从表达 ApoAI-连接子-P144 的动物纯化的 HDLs 接种到高压注射表达白细胞介素 12 质粒的小鼠中,响应强力霉素的施用而同时施用。质粒 ApoAI-连接子-P144 共施用作为阳性对照。HDLs 施用后获得的 IFN γ 水平类似于那些高压注射后获得的水平(图 16)。在两种情况下,它们都显著性高于以没有 TGF β 抑制剂的 IL-12 质粒诱导后获得的水平。因此,存在于 HDLs 中的肽 P144 能够在体内封闭 TGF β ,容许更强的 IFN γ 诱导。因此,肽通过与载脂蛋白 AI 融合的整合进入 HDLs 示出了形成新治疗活性肽的诱人战略。

[0001]

序列表

<110> 西马生物医学计划公司

<120> 用于生物活性化合物施用的轭合物

<130> FP10ES1168

<150> ES P200801796

<151> 2008-06-13

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
85 90 95

[0002]

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
260 265

[0003]

<210> 2
<211> 264
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Met Lys Ala Val Val Leu Ala Val Ala Leu Val Phe Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gln Ala Trp His Val Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Gln Trp Asp
20 25 30

Lys Val Lys Asp Phe Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser
35 40 45

Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ser Leu Gly Gln Gln
50 55 60

Leu Asn Leu Asn Leu Leu Glu Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val
65 70 75 80

Ser Gln Leu Gln Glu Arg Leu Gly Pro Leu Thr Arg Asp Phe Trp Asp
85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Val Arg Gln Glu Met Asn Lys Asp
100 105 110

Leu Glu Glu Val Lys Gln Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Glu Phe Gln
115 120 125

Lys Lys Trp Lys Glu Asp Val Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Ala Pro
130 135 140

[0004]

Leu Gly Ala Glu Leu Gln Glu Ser Ala Arg Gln Lys Leu Gln Glu Leu
145 150 155 160

Gln Gly Arg Leu Ser Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg
165 170 175

Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro His Ser Glu Gln
180 185 190

Met Arg Glu Ser Leu Ala Gln Arg Leu Ala Glu Leu Lys Ser Asn Pro
195 200 205

Thr Leu Asn Glu Tyr His Thr Arg Ala Lys Thr His Leu Lys Thr Leu
210 215 220

Gly Glu Lys Ala Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg His Ser Leu Met
225 230 235 240

Pro Met Leu Glu Thr Leu Lys Thr Lys Ala Gln Ser Val Ile Asp Lys
245 250 255

Ala Ser Glu Thr Leu Thr Ala Gln
260

<210> 3
<211> 259
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 3

Met Lys Ala Ala Val Leu Ala Val Ala Leu Val Phe Leu Thr Gly Cys
1 5 10 15

[0005]

Gln Ala Trp Glu Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Gln Trp Asp
20 25 30

Arg Val Lys Asp Phe Ala Thr Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser
35 40 45

Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser Ser Thr Leu Gly Lys Gln
50 55 60

Leu Asn Leu Asn Leu Leu Asp Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val
65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Ala
85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Leu Arg Asn Glu Met Asn Lys Asp
100 105 110

Leu Glu Asn Val Lys Gln Lys Met Gln Pro His Leu Asp Glu Phe Gln
115 120 125

Glu Lys Trp Asn Glu Glu Val Glu Ala Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Pro
130 135 140

Leu Gly Thr Glu Leu His Lys Asn Ala Lys Glu Met Gln Arg His Leu
145 150 155 160

Lys Val Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Val Asn Ala Asp
165 170 175

Ala Leu Arg Ala Lys Phe Gly Leu Tyr Ser Asp Gln Met Arg Glu Asn
180 185 190

[0006]

Leu Ala Gln Arg Leu Thr Glu Ile Lys Asn His Pro Thr Leu Ile Glu
195 200 205

Tyr His Thr Lys Ala Ser Asp His Leu Lys Thr Leu Gly Glu Lys Ala
210 215 220

Lys Pro Ala Leu Asp Asp Leu Gly Gln Gly Leu Met Pro Val Leu Glu
225 230 235 240

Ala Trp Lys Ala Lys Ile Met Ser Met Ile Asp Glu Ala Lys Lys Lys
245 250 255

Leu Asn Ala

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Peptido inhibidor de TGF-beta1 p144

<400> 4

Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met Met Gln Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Peptido inhibidor de TGF-beta1 p17

<400> 5

[0007]

Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala

1 5 10 15

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador rico en Gly 1

<400> 6

Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador rico en Gly 2

<400> 7

Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr

1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador rico en Gly 3

<400> 8

Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro

1 5

[0008]

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador rico en Gly 4

<400> 9

Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de trimerizacion de tetranectina

<400> 10

Gly Thr Lys Val His Met Lys
1 5

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador de la fibronectina

<400> 11

Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln
1 5 10

[0009]

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador derivado de la IgG3

<400> 12

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 13

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr
1 5 10

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de enteroquinasa

<400> 14

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 15
<211> 5

[0010]

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de corte de factor Xa

<400> 15

Ile Glu Asp Gly Arg

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de corte de trombina

<400> 16

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de corte de la proteasa TEV

<400> 17

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

[0011]

<220>

<223> Sitio de corte de la proteasa PreScission

<400> 18

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de corte de la proteasa MMP9

<400> 19

Leu Phe Pro Thr Ser

1 5

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador FwATGmApoA1

<400> 20

atgaaagctg tggctgctggc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvTGmApoA1

[0012]

<400>	21	
tcactgggca gtcagagtct		20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador FwATGmIFNalpha1	
<400>	22	
atggctaggc tctgtgcttt		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador RvTGAmIFNalpha1	
<400>	23	
tcatttctct tctctcagtc		20
<210>	24	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador RvAscImApoA1	
<400>	24	
ggcgcgcctt ggcagtcag agtctcgc		28
<210>	25	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	

[0013]

<220>

<223> Cebador FwAscImIFNalpha1

<400> 25

ggcgcgcct gtgacctgcc tcagactca

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvAscImIFNalpha1

<400> 26

ggcgcgcct ttctttctc tcagtcttc

29

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador FwAscImApoA1

<400> 27

ccaggcgcgc cggatgaacc ccagtccaa tg

32

<210> 28

<211> 63

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvmApoA1p17

<400> 28

tcacgcacgc tcataccaag aactcctagg aataaaccaa atacgcttg gcgcgcctg

60

ggc

63

[0014]

<210> 29

<211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvmApoA1p144

<400> 29

tcaattctgc atcatggccc agattatcga ggcgtccagc gaggtgggcg cgccctgggc 60

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvSPmApoA1

<400> 30

ttgctgccat acgtgccaag 20

<210> 31

<211> 66

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvSPmApoA1p17

<400> 31

tcacgcacgc tcataccaag aactcctagg aataaaccaa atacgctttt gctgccagaa 60

atgccg 66

<210> 32

<211> 62

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

[0015]

<220>

<223> Cebador RvSPmApoA1p144

<400> 32

tcattctgca tcatggccca gattatcgag gcgtccagcg aggtttgctg ccagaaatgc 60

cg

62

<210> 33

<211> 44

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador FwMMp9AscIp144

<400> 33

ccaggcgcgc cgttttccc gacgtctacc tcgctggacg cctc 44

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador RvMMp9AscIp144

<400> 34

tcaattctgc atcatggccc a 21

<210> 35

<211> 87

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador FwLINKERp144

<400> 35

cgcgccggca ccagcagaaa caaagcaga accaatgaca acctcgctgg acgcctcgat 60

[0016]

aatctgggcc atgatgcaga attgagc		87
<210>	36	
<211>	87	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador RvLINKERp144	
<400>	36	
ggccgctcaa ttctgcatca tggcccagat tatcgaggcg tccagcgagg ttgtcattgg		60
ttctgctttt gtttctgctg gtgccgg		87
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador FwUSP18	
<400>	37	
ccaaaccttg accattcacc		20
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador RvUSP18	
<400>	38	
atgaccaaag tcagccatc c		21
<210>	39	
<211>	20	

[0017]

<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador FwISG15	
<400>	39	
	gattgccccag aagattggtg	20
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador RvISG15	
<400>	40	
	tctgcgtcag aaagacctca	20
<210>	41	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador FwIRF1	
<400>	41	
	ccagccgaga cactaagagc	20
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador RvIRF1	
<400>	42	
	cagagagact gctgctgacg	20

[0018]

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador FwMx1

<400> 43
atctgtgcag gcactatgag 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador RvMx1

<400> 44
ctctccttct ttcagcttcc 20

<210> 45
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador FwmActina

<400> 45
cgcggtccacc cgcgag 16

<210> 46
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

[0019]

<223> Cebador RvmActina	
<400> 46	
cctggcgcct agggcg	16
<210> 47	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador qPCR FwmIFNa	
<400> 47	
tctyctygy ctgaaggac	19
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador qPCR RvmIFNa (SEQ ID NO: 48)	
<400> 48	
cacagrggct gtgtttcttc	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador Fw 2-5 OAS	
<400> 49	
actgtctgaa gcagattgcg	20
<210> 50	
<211> 20	

[0020]

<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador Rv 2-5 OAS	
<400>	50	
	tggaactgtt ggaagcagtc	20
<210>	51	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de corte de la MMP9	
<400>	51	
	cttttcccg cgtct	15
<210>	52	
<211>	5	
<212>	PRT	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Fragmento del enlazador de la fibronectina	
<400>	52	
	Gly Thr Ser Gly Gln	
	1 5	
<210>	53	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Secuencia de nucleótidos que codifica el enlazador descrito	

[0021]

en la SEQ ID NO: 13

<400> 53
gcaccagcag aaacaaaagc agaaccaatg ac 32

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido AH-1

<400> 54

Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe
1 5

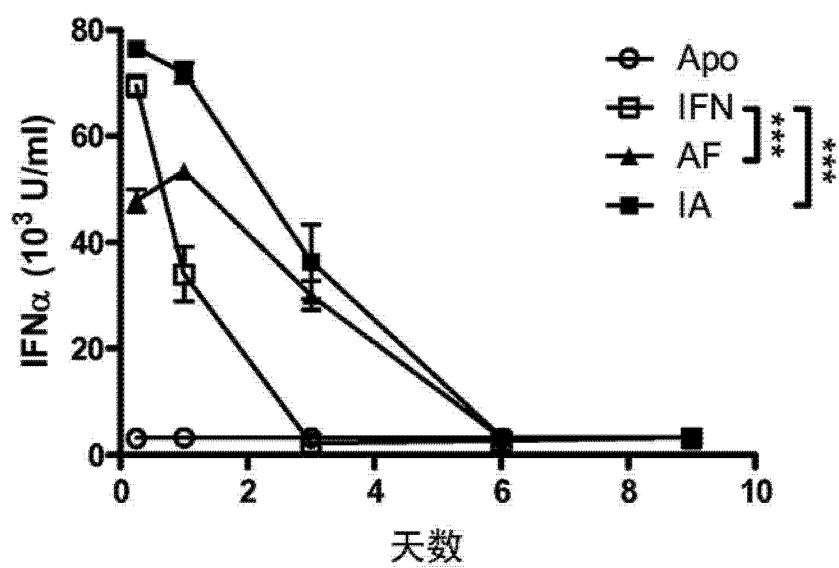


图 1

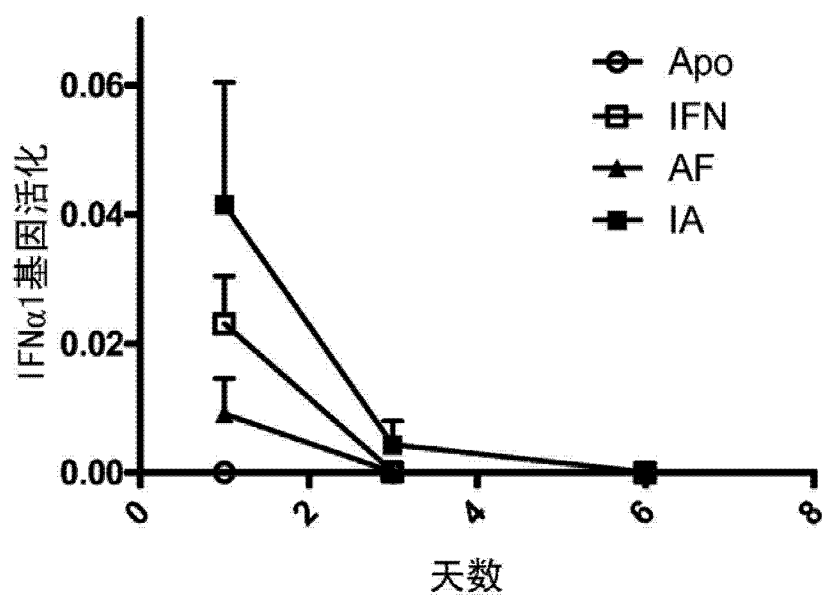


图 2

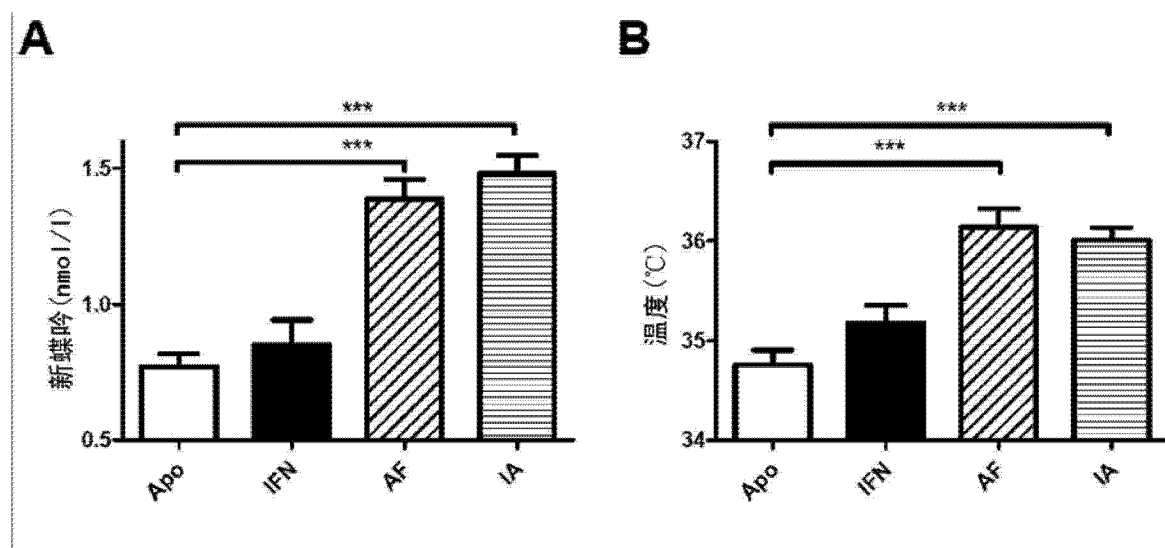


图 3

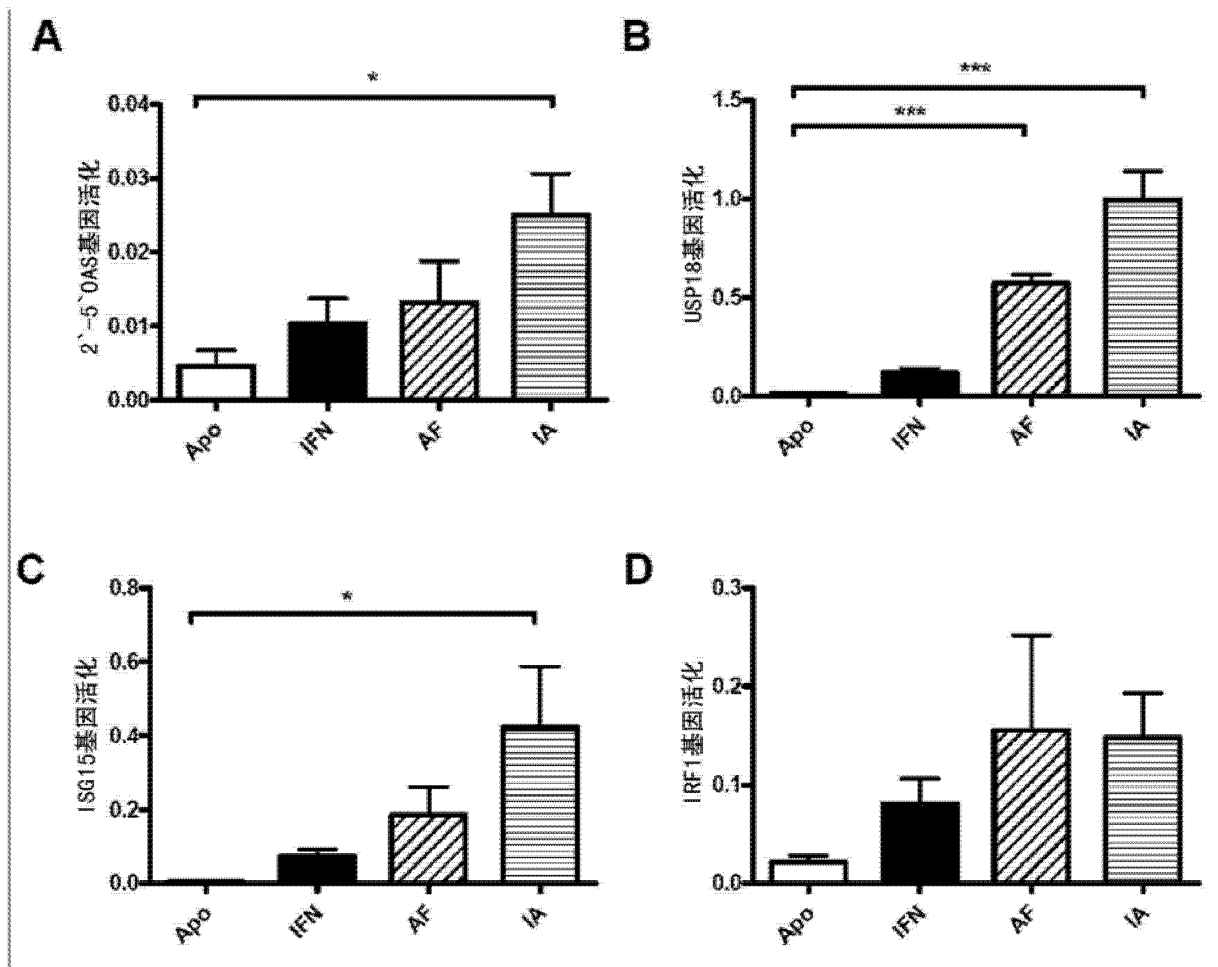


图 4

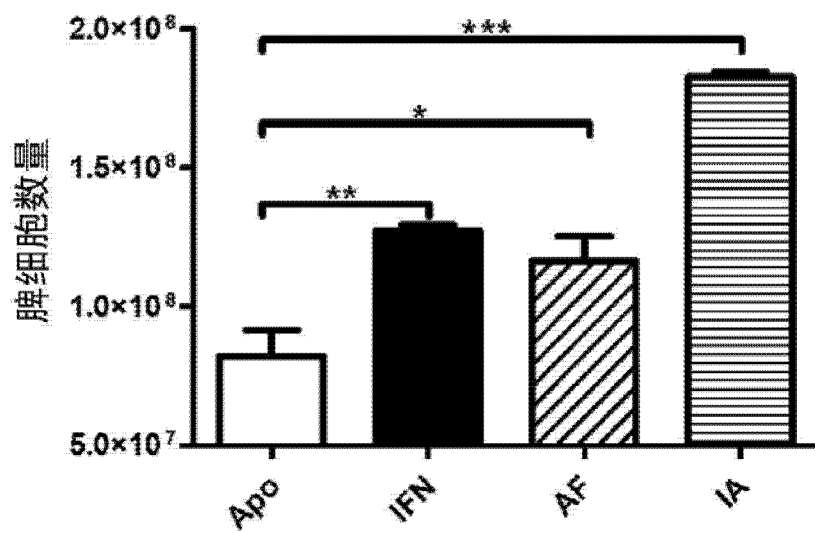
A

图 5

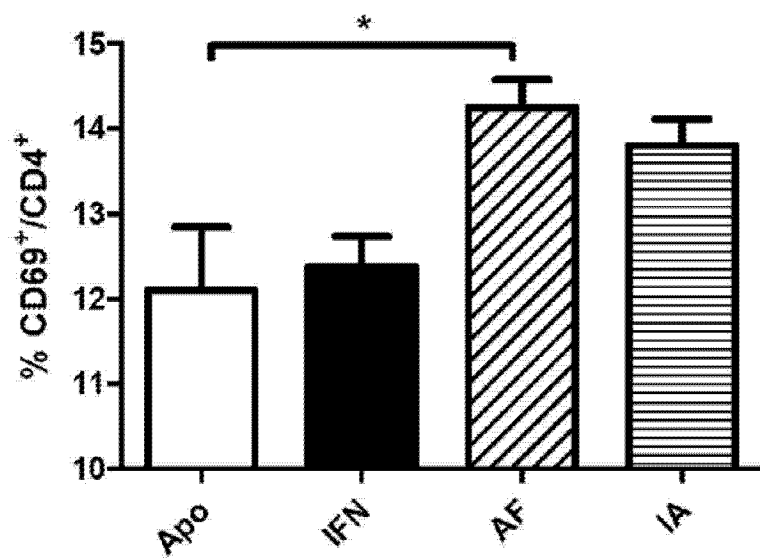
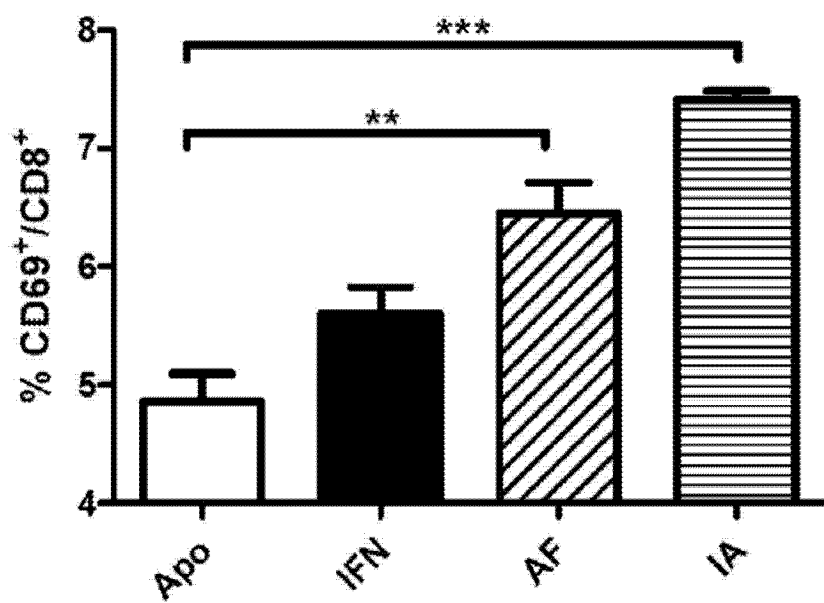
B**C**

图 5

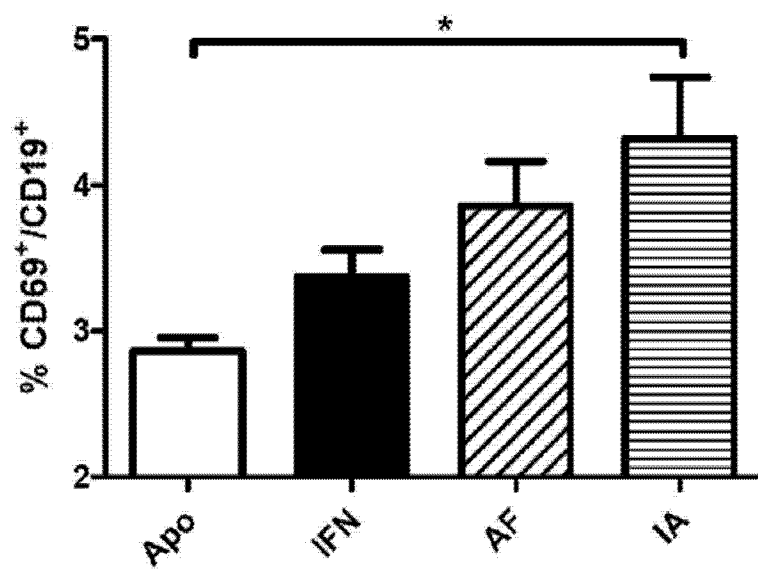
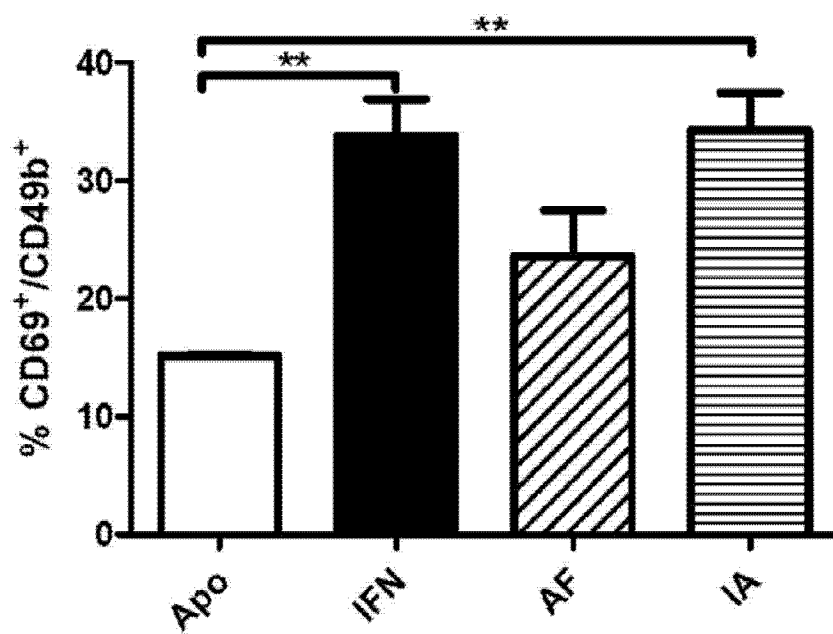
D**E**

图 5

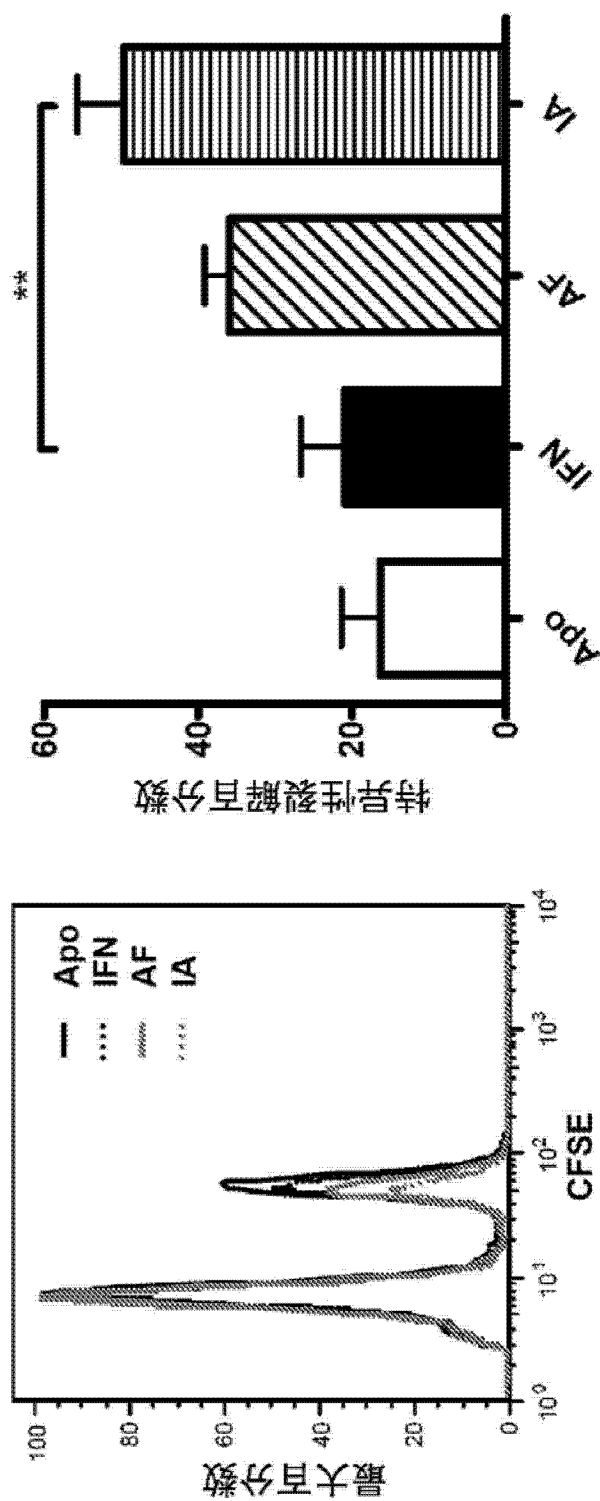


图 6

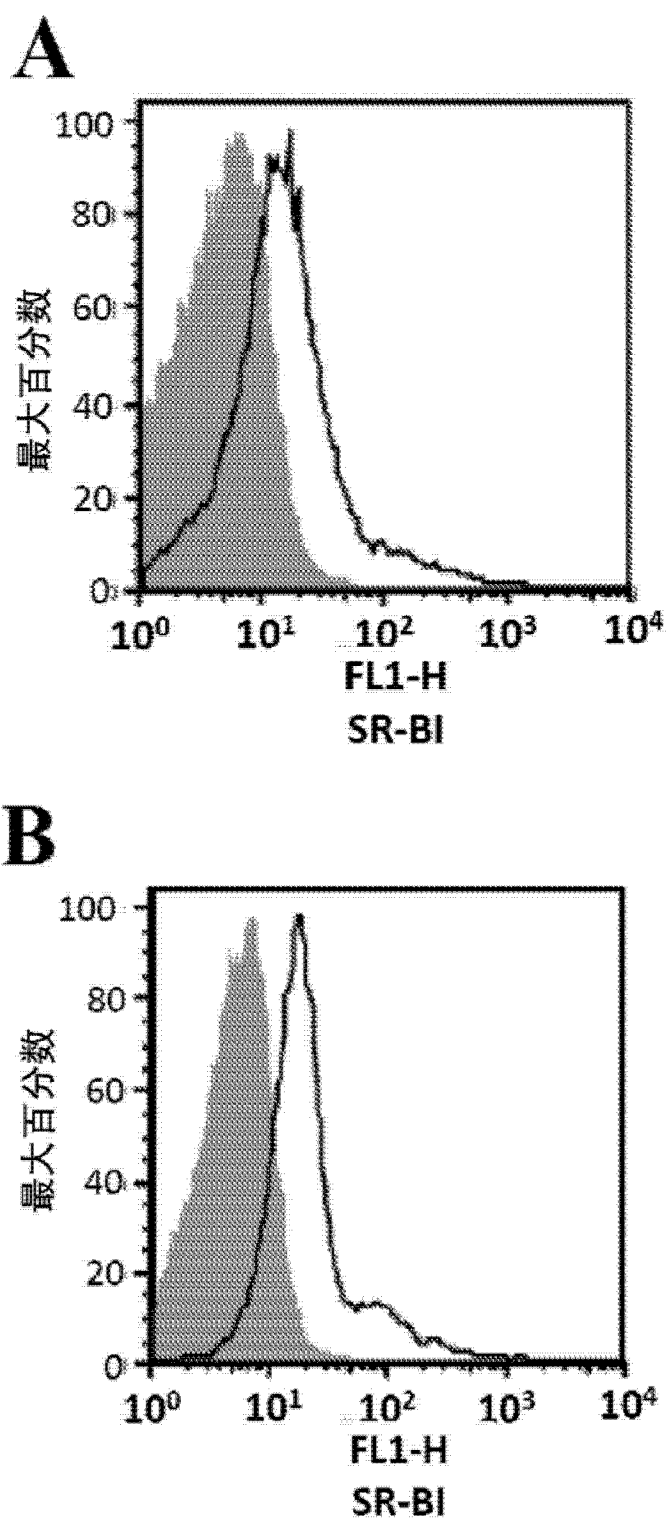


图 7

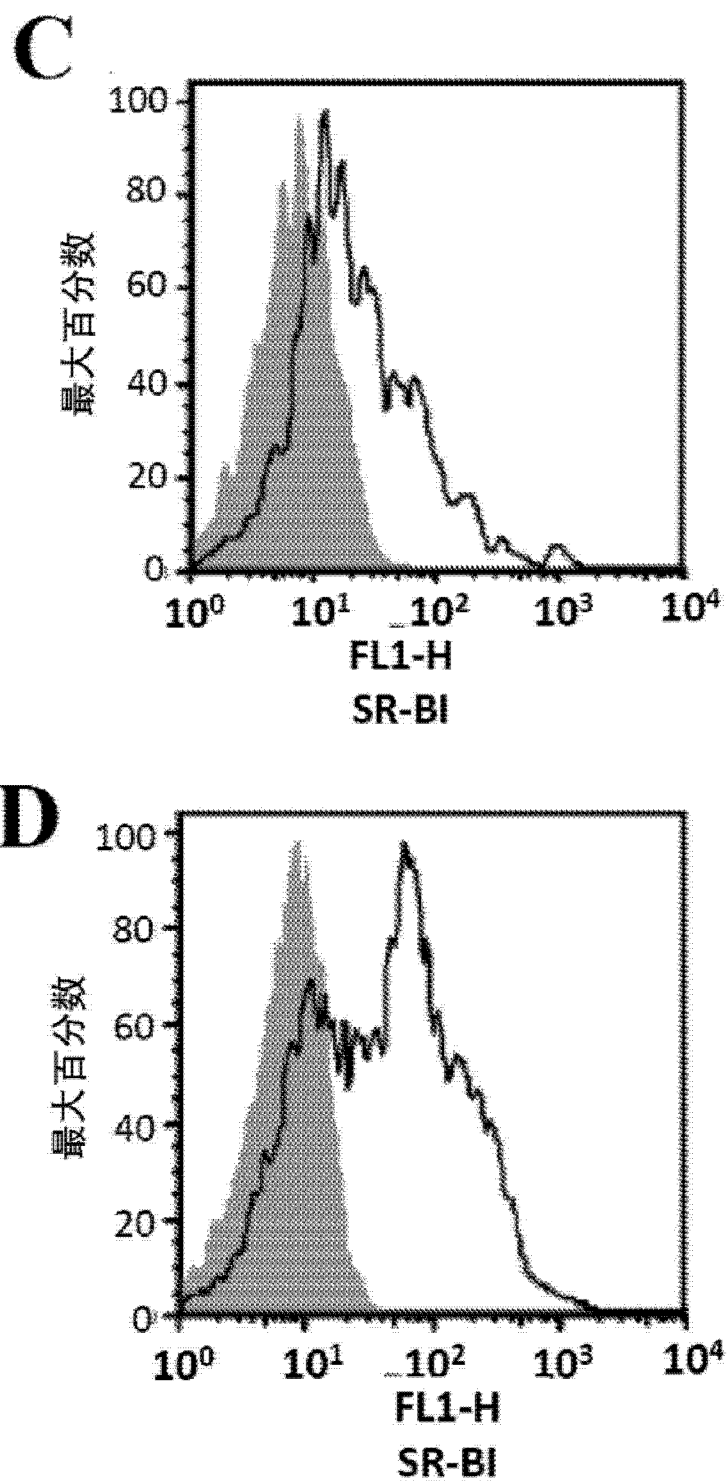


图 7

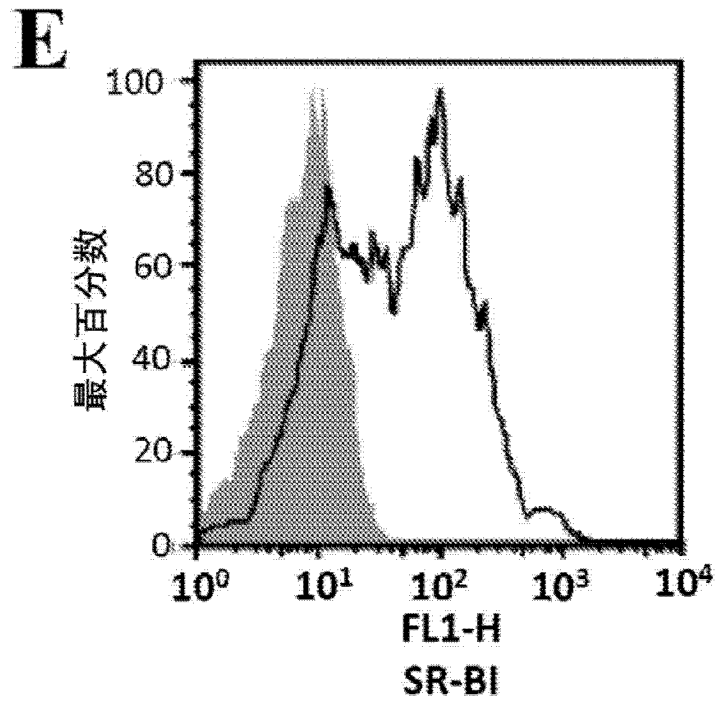


图 7

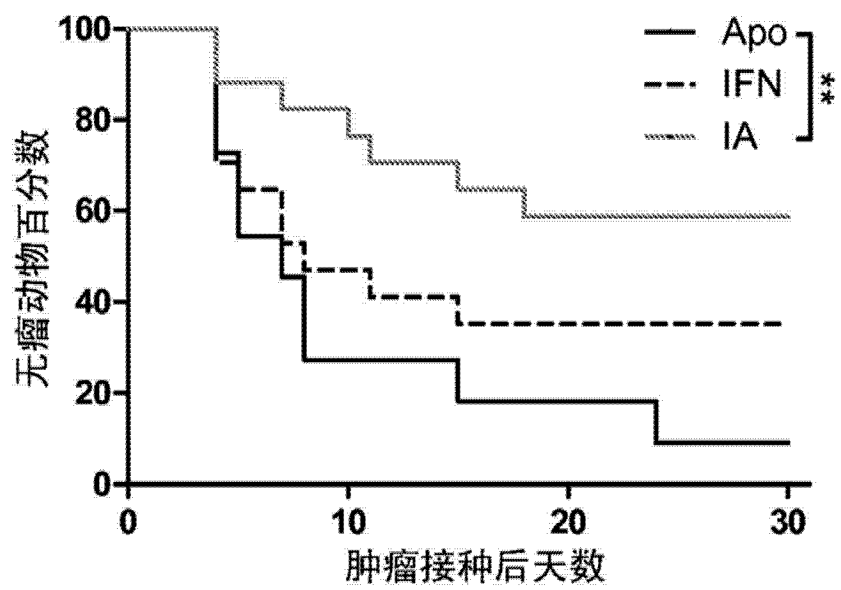


图 8

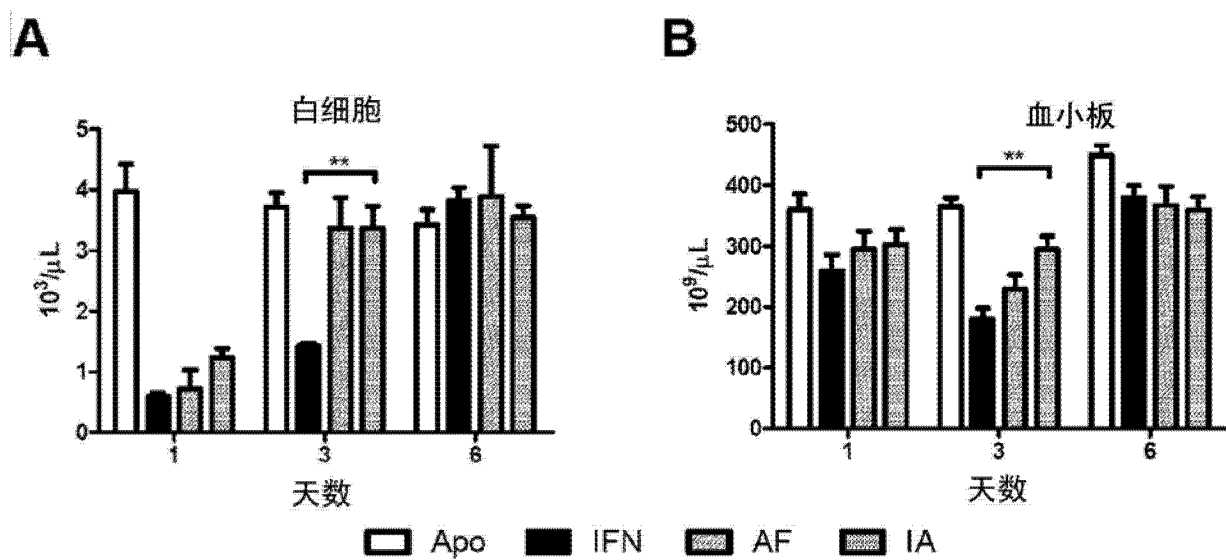


图 9

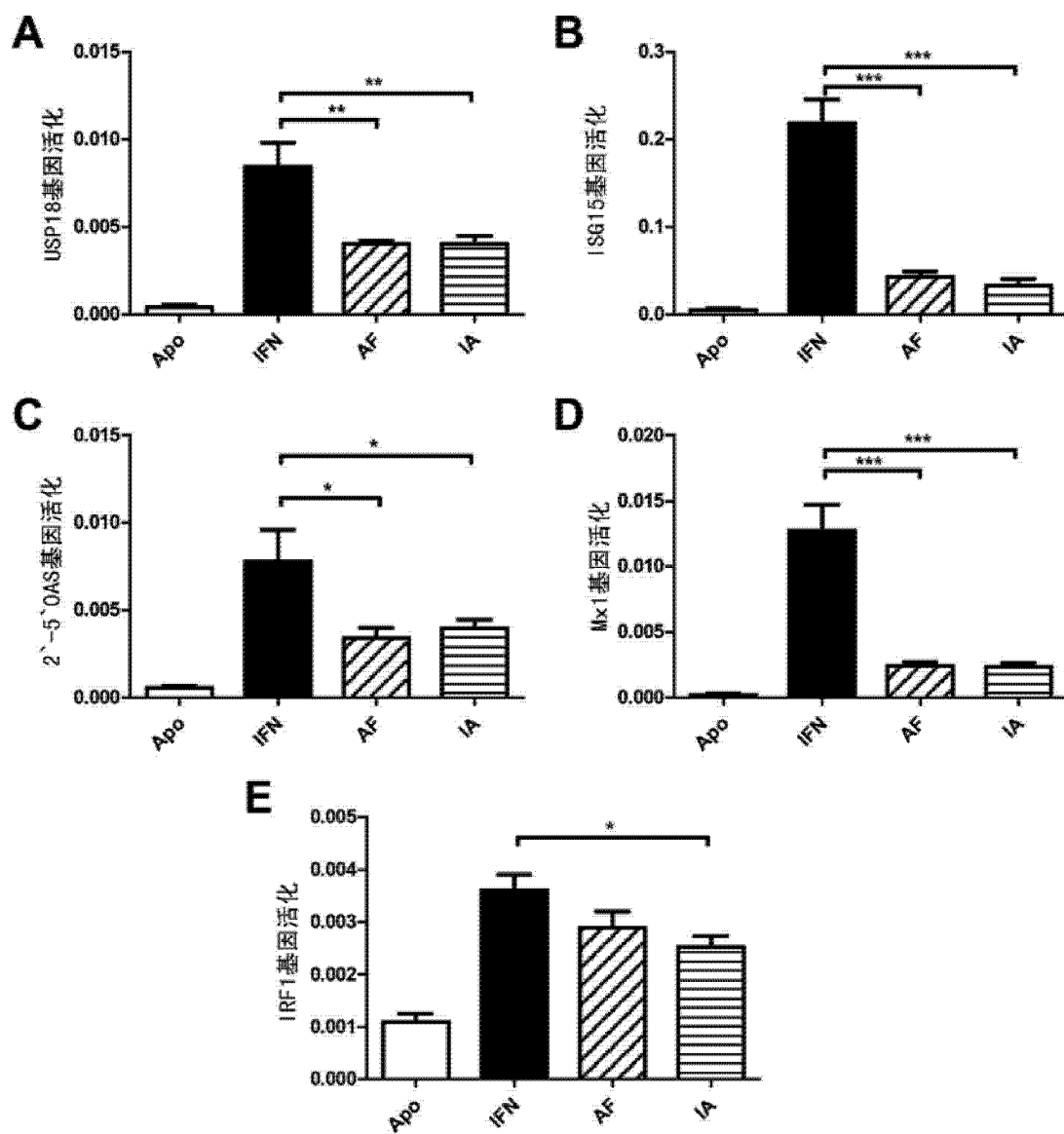


图 10

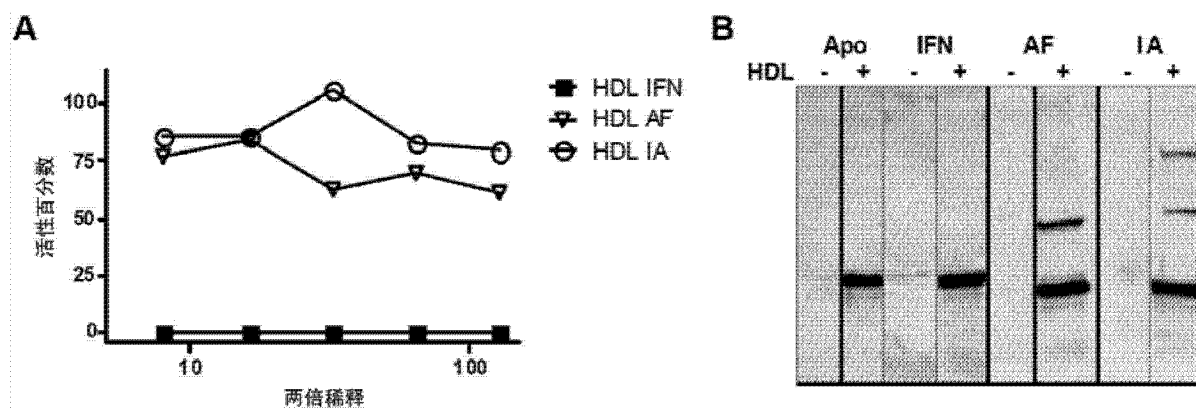


图 11

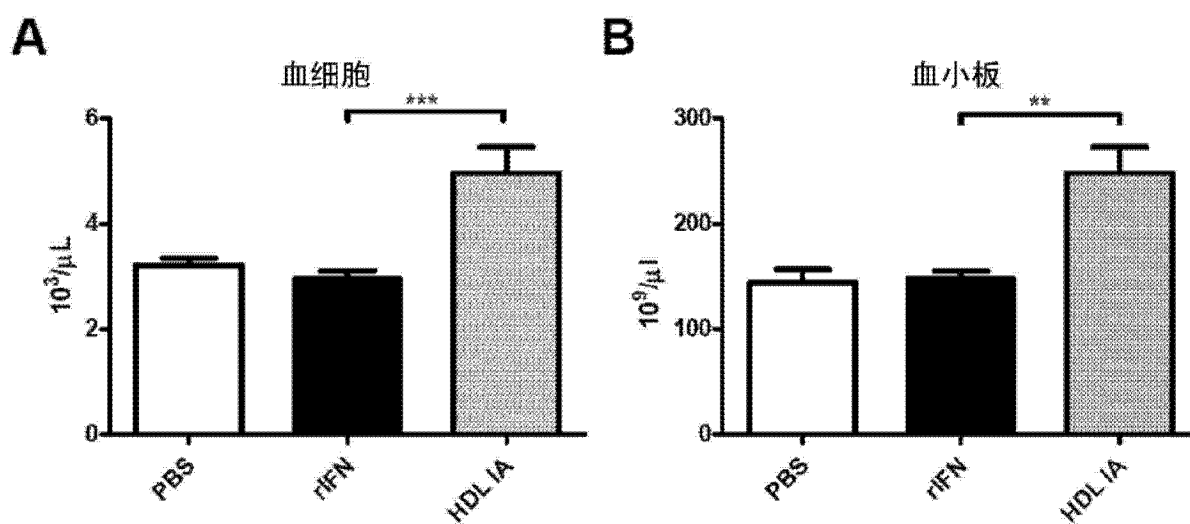


图 12

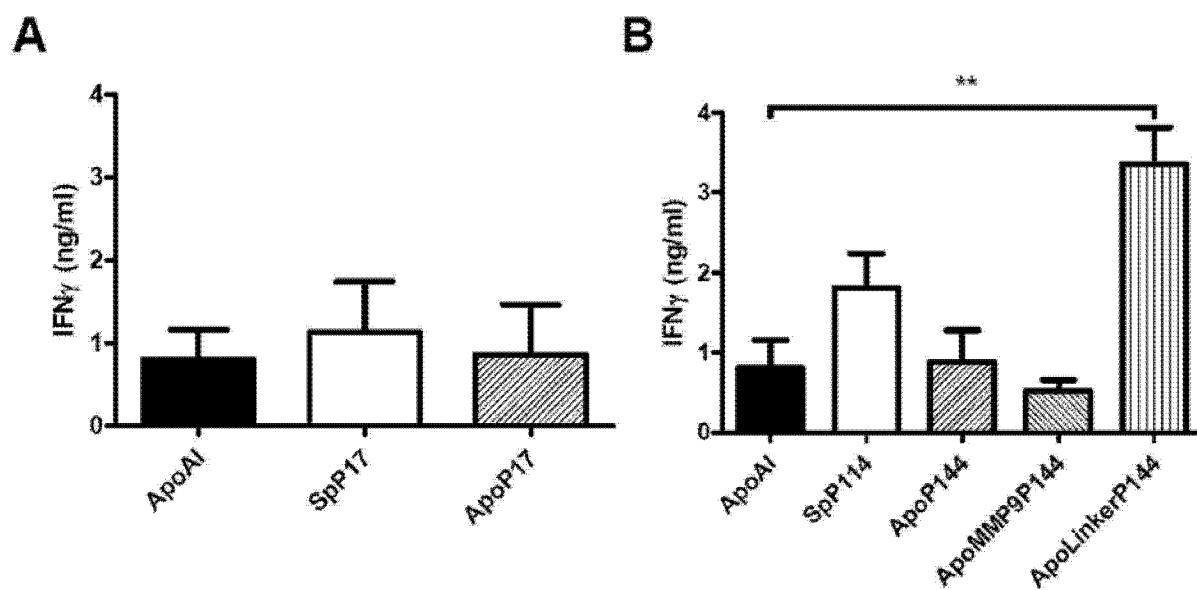


图 13

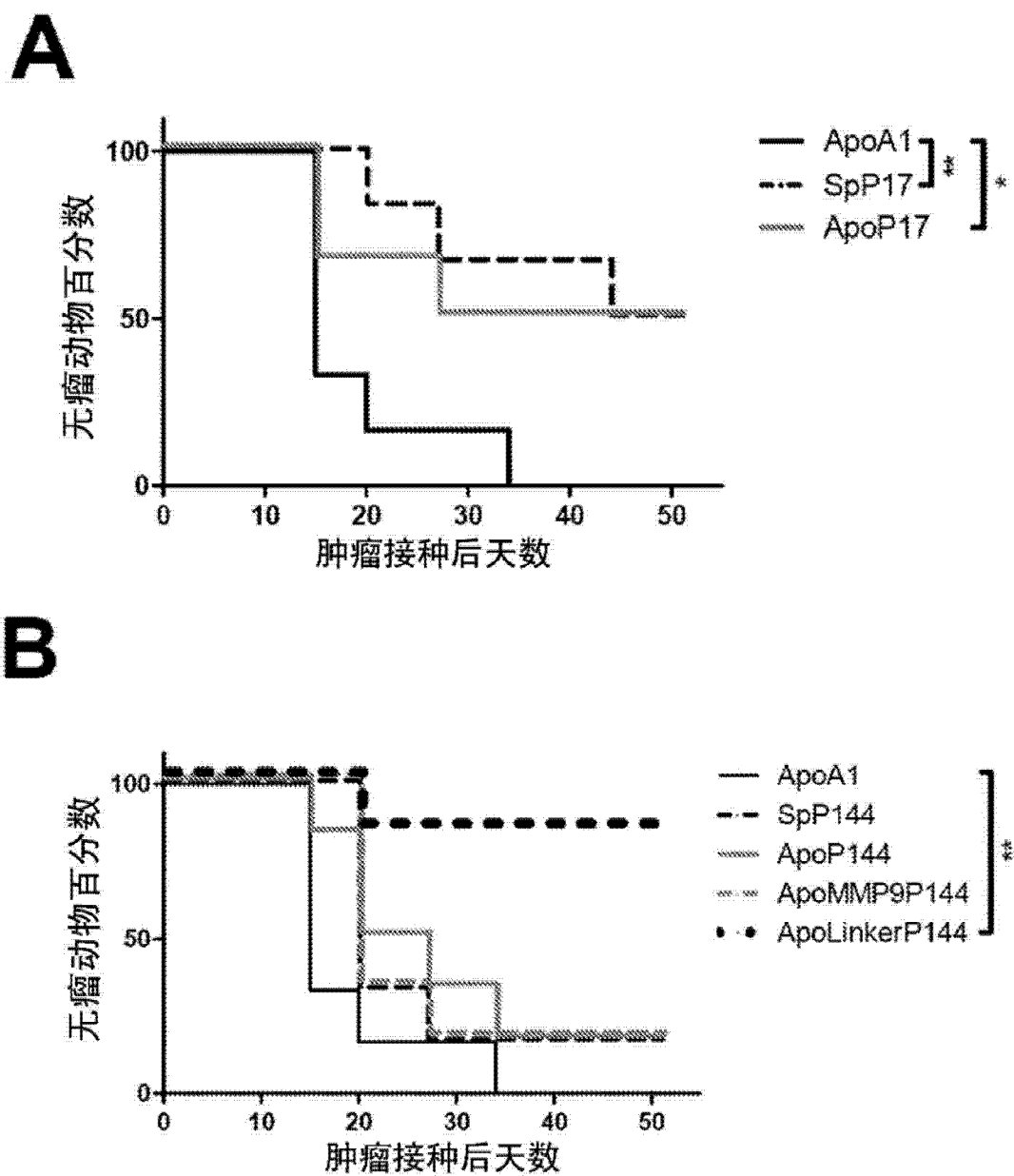


图 14

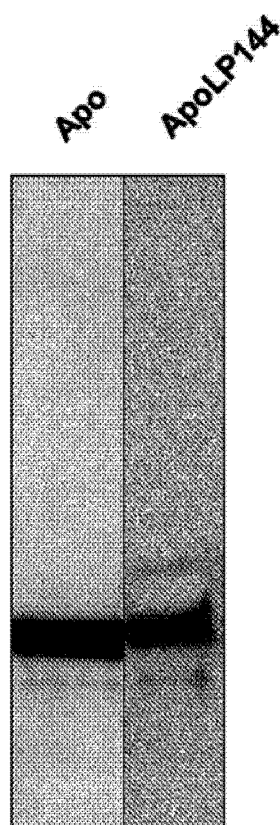


图 15

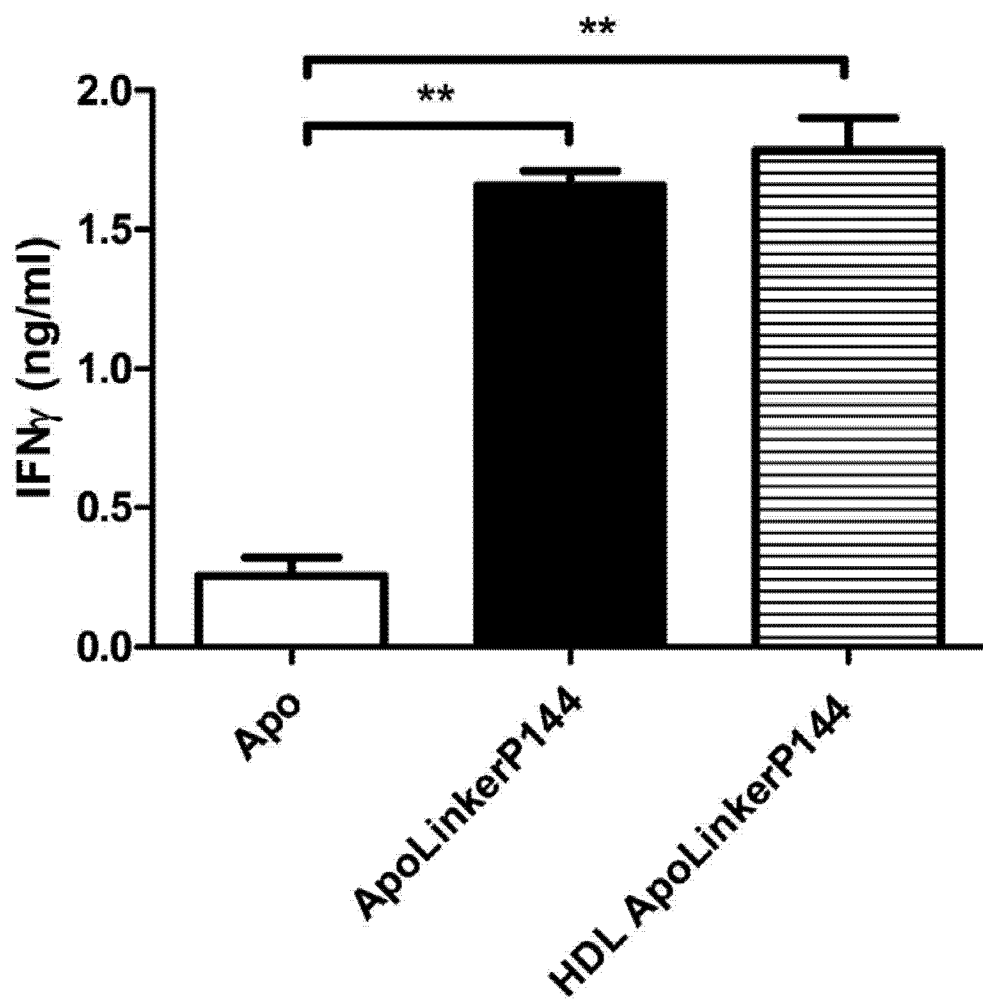


图 16