

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02816622.1

[51] Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月20日

[11] 授权公告号 CN 100488981C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.8.23 [21] 申请号 02816622.1

[30] 优先权

[32] 2001.8.24 [33] US [31] 60/314,613

[86] 国际申请 PCT/US2002/027061 2002.8.23

[87] 国际公布 WO2003/018611 英 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.24

[73] 专利权人 维多利亚大学创新和发展公司

地址 加拿大哥伦比亚

共同专利权人 约翰斯霍普金斯大学

[72] 发明人 萨穆尔·R·登米德

约翰·T·伊萨克斯

詹姆士·托马斯·巴克利

[56] 参考文献

US5777078A 1998.7.7

US5817771A 1998.10.6

WO0001419A1 2000.1.13

The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. Laurence Abrami 等. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273 No. 49. 1998

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书4页 说明书95页 附图5页

[54] 发明名称

含有蛋白酶激活序列的气单胞菌溶素原及其应用

[57] 摘要

在此公开了修饰的气单胞菌溶素原(PA)肽。在某些实施例中,该蛋白包含一个前列腺特异性蛋白酶切割位点,以及还可以包含一个前列腺组织特异性结合结构域,它在功能上代替天然的PA结合结构域。在其它的实施例中,该蛋白包含一个费林蛋白酶切割位点以及一个前列腺组织特异性结合结构域,它在功能上代替天然的PA结合结构域。还公开了使用这些肽治疗前列腺癌的方法。

1. 一种含有变体气单胞菌溶素原氨基酸序列的纯化的肽，其中变体气单胞菌溶素原氨基酸序列含有一个前列腺特异性蛋白酶切割位点和一个功能性缺失的弗林蛋白酶切割位点，其中前列腺特异性蛋白酶切割位点含有一个前列腺特异性抗原(PSA)切割位点、一个前列腺特异性膜抗原(PSMA)切割位点或一个人源的血管舒缓素 2(hK2)切割位点，其中前列腺特异性蛋白酶切割位点替换弗林蛋白酶切割位点，或添加到突变的弗林蛋白酶切割位点。

2. 权利要求 1 的肽，其中 PSA 切割位点含有 SEQ ID NO:5、8、11、14、15、16、17、18、19、20 或 21。

3. 权利要求 2 的肽，其中 PSA 切割位点含有 SEQ ID NO:5。

4. 权利要求 1 的肽，其中变体气单胞菌溶素原氨基酸序列具有功能性缺失的结合结构域。

5. 权利要求 4 的肽，其中结合结构域通过缺失 SEQ ID NO:2 或 4 的 1-83 位氨基酸而被功能性缺失。

6. 权利要求 4 的肽，其中结合结构域通过引入至少一个突变而被功能性缺失，所述突变选自 SEQ ID NO:2 或 4 的 W45A、I47E、M57A、Y61A 和 K66Q。

7. 权利要求 4 的肽，其中肽还含有一个前列腺组织特异性结合结构域。

8. 权利要求 7 的肽，其中前列腺组织特异性结合结构域含有一个促黄体激素释放激素(LHRH)序列。

9. 权利要求 8 的肽，其中 LHRH 序列是 SEQ ID NO:22 或 23。

10. 权利要求 5 的肽，其中肽还含有一个与变体气单胞菌溶素原的 N-端连接的 LHRH 序列。

11. 权利要求 9 的肽，其中 LHRH 序列连接到 SEQ ID NO:2 或 4 的 215 或 300 位氨基酸上，其中 215 或 300 位氨基酸已经被突变为半胱氨酸。

12. 权利要求 7 的肽，其中前列腺组织特异性结合结构域含有能够识别 PSA、hK2、PSMA 或 LHRH 的抗体。

13. 权利要求 12 的肽，其中抗体被连接到变体气单胞菌溶素原的 N-端。

14. 权利要求 12 的肽，其中抗体被连接到变体气单胞菌溶素原的 C-端。

15. 权利要求 8 的肽，其中肽序列含有 SEQ ID NO:24 或 25。

16. 权利要求 1 的肽，其中肽被固定到一个表面上。

17. 权利要求 16 的肽，其中表面是小珠。

18. 权利要求 17 的肽，其中小珠还含有一个前列腺特异性配体。

19. 权利要求 1-18 任一项的肽在制备用于治疗受试者前列腺癌的药物中的应用。

20. 权利要求 19 的应用，其中肽制成适于通过肿瘤内和/或前列腺内给药的制剂。

21. 权利要求 19 的应用，其中肽制成通过静脉内、肌内、皮下或口服给药的制剂。

22. 权利要求 19 的应用，其中药物给药导致前列腺肿瘤细胞体积的减小。

23. 权利要求 22 的应用，其中前列腺癌细胞体积减小至少 10%。

24. 权利要求 22 的应用，其中前列腺肿瘤细胞体积减少至少 50%。

25. 编码权利要求 1-18 任一项的肽的核酸序列在制备用于治疗受试者前列腺癌的药物中的应用。

26. 细胞裂解物在制备用于在受试者中全身性治疗前列腺癌的药物中的应用，所述细胞裂解物来自下列步骤：

将人前列腺癌细胞系与权利要求 1-18 任一项的肽接触，从而产生细胞裂解物。

27. 权利要求 26 的应用，其中受试者患有转移性前列腺肿瘤。

28. 权利要求 26 的应用，其中药物还含有粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

29. 权利要求 28 的应用，其中药物还含有辐射的前列腺癌细胞。

30. 权利要求 26 的应用，其中药物给药导致前列腺肿瘤细胞体积的减小。

31. 权利要求 30 的应用，其中药物给药还导致转移性前列腺肿瘤的减少。

32. 权利要求 30 的应用，其中药物给药还导致对转移性前列腺肿瘤的治疗。

33. 一种编码权利要求 1-15 任一项的肽的纯化的核酸序列。

含有蛋白酶激活序列 的气单胞菌溶素原及其应用

相关申请的参考

本申请要求 2001 年 8 月 24 日提交的美国临时专利申请 No. 60/314613 的优先权，在此以其全文引为参考。

技术领域

本申请涉及新的变体气单胞菌溶素原(proaerolysin)(PA)蛋白，以及将它们用于治疗局部性和转移性前列腺癌的方法。

技术背景

在美国男性中，每三个诊断出的癌症中就有一个是起源于前列腺，这使前列腺癌成为美国男性中最经常被诊断出来的恶性肿瘤(Berges 等, Clin. Cancer Res. 1:473-480, 1995)。在美国，前列腺癌的发病率尚未随着生活方式的改变而降低；事实上，自从 1930 年以来，临床前列腺癌的发病率一直在稳定地增长(Pinski 等, Cancer Res. 61:6372-6, 2001)。前列腺癌的发病率随着年龄的增长而增加的速度比任何其它类型的癌症都要快；在诊断出前列腺癌的患者中只有不到 1% 的人年龄在 50 岁以下(Furuya 等, Cancer Res. 54:6167-75, 1994)。因此，随着男性人群的预期寿命随时间不断增加，临床前列腺癌的发病率也将增加(Furuya 等, Cancer Res. 54:6167-75, 1994)。

目前，尚没有一种治疗方法能够显著地延长患有转移性前列腺癌的男性的存活率(Khan 和 Denmeade, Prostate 45:80-83, 2000)。口服雌激素药物去雄(雄激素消融作用)是癌症的第一种有效的全身性治疗方法，至今仍是总体上最有用的前列腺癌治疗方法。尽管雄激素消融疗法具有重要的缓和作用，但它对总体的存活率几乎没有影响(Berges

等, Clin. Cancer Res. 1:473-480, 1995)。这种疗法最终失败的原因是由于在受试者个体内的转移性前列腺癌异源地由雄激素依赖性和雄激素不依赖性的癌细胞构成(Christensen 等, Bioorg. Medicinal Chem. 7:1273-80, 1999)。在雄激素消融后, 这些肿瘤中的雄激素依赖性细胞停止繁殖, 并激活了一种称为程序性细胞死亡(PCD)或细胞凋亡的细胞自杀途径。由于消除了雄激素依赖性细胞这一分支, 大部分患有转移性前列腺癌的患者对雄激素去除疗法有良好的反应。然而, 所有的病人最终会恶化到对进一步的抗雄激素疗法没有反应的状态, 不论这种疗法进行得多么彻底, 这是由于在转移的位点存在雄激素不依赖性前列腺癌细胞。不幸的是, 由于目前还没有能够有效消灭雄激素不依赖性前列腺癌细胞的疗法, 此疾病发展到这种情况时一律会致命(Khan 和 Denmeade, Prostate 45:80-83, 2000)。

已经提出了几种治疗前列腺癌的替代方法。其中之一是发展了一些方法, 当癌症仍然还在前列腺中并因而通过明确的局部疗法(local therapy)还可能治疗时, 主动地筛选局部疾病。局部癌症通常分化较为缓和, 体积也较小。在最近的几十年中, 对局部前列腺癌的外科和放疗治疗已取得进步。这些进步在最近几年达到了顶点, 使得前列腺癌的死亡率在 50 年来第一次下降。

然而, 在这些进展增加了治愈率的同时, 仍然有大量男性没有被局部疗法所治愈, 并最终死于转移性癌症。这种临床上的现实导致了对转移性前列腺癌的非激素疗法的开发。标准的抗增殖化疗剂在治疗前列腺癌上尚未成功。这种试剂对于雄激素不依赖性前列腺癌可能是无效的, 因为与其它的肿瘤类型和许多正常组织例如皮肤、胃肠道和骨髓相比, 这些癌症的增殖速度明显较低。例如, 对 11 名刚刚死亡的雄激素消融疗法失败的病人进行尸体解剖, 所获得的 117 个前列腺癌转移位点中生长分数为 $7.1 \pm 0.8\%$ (Pinski 等, Cancer Res. 61:6372-6, 2001)。这种低的增殖速度可以解释人体中的前列腺癌细胞对标准的抗增殖化学疗法的相对无反应性, 而在体外高速增殖的雄激素不依赖性

前列腺癌细胞系对 PCD 诱导保持了极度的敏感性。

已经提出了几种策略来治疗慢速增殖的前列腺癌。一种方法是鉴定出前列腺癌细胞在恶性转化过程中所需要的独特的赖以生存的特异性信号途径。一旦鉴定出来,就可以开发这些途径的小分子或生物抑制剂作为治疗药物。这种方法的一个例子是使用 Her2/neu 或 EGF 受体途径的小分子或单克隆抗体抑制剂。另一种方法是抑制一种普遍存在的细胞内蛋白,其功能是管理所有细胞类型的存活。这种方法可以克服不均质性和“抗性”的问题,因为一个肿瘤中所有的癌细胞都可以通过这种方法杀死。但是,这种细胞毒性将不是细胞类型特异的,施用这种通用的毒素将涉及严重的全身性中毒。因此,需要一种能够将细胞毒素直接定位到前列腺癌位点的方法。

另一种治疗缓慢增殖的前列腺癌的策略是投送一种细胞毒素,它不是通过在抑制了关键的信号或代谢途径后诱导细胞凋亡来杀死细胞,而是通过破坏细胞质膜引起非特异性细胞裂解来杀死细胞。已经描述了许多这样的细胞裂解毒素(Lesieur 等, *Mol. Membr. Biol.* 14:45064, 1997)。这些细胞裂解毒素通常是来源于细菌,并且一般是 β -片层结构的蛋白,它们在质膜上寡聚化以产生充分表征的小孔,这些小孔一旦形成就很快地导致裂解性的细胞死亡(Rossjohn 等, *J. Struct. Biol.* 121:92-100, 1998)。这些毒素在杀死细胞的能力方面也是非特异性,因此不可能在治疗时施用而不具有明显的毒性。因此,需要一种治疗前列腺癌的药物,它主要只对前列腺癌细胞具有细胞毒性。

发明概述

在此公开了变体气单胞菌溶素原(PA)分子,以及将它们用于治疗局部和转移性前列腺癌、例如慢性增殖的前列腺癌的方法。

在一个实施例中,一个变体 PA 分子包含了一个前列腺特异性蛋白酶切割位点、例如一个前列腺特异性抗原(PSA)-、前列腺特异性膜

抗原(PSMA)-、或者人血管舒缓素 2(hK2)-特异性切割位点，其在功能上代替了天然 PA 的费林蛋白酶(furin)切割位点。在这种方法中，给患有前列腺癌的受试者施用这种公开的变体 PA 分子，将导致在存在前列腺特异性蛋白酶的情况下激活这种公开的变体 PA 分子，并使细胞，例如前列腺癌细胞裂解。在某些例子中，变体 PA 分子还包含了一个前列腺组织特异性结合结构域，以增强其到癌细胞的定位。

在另一个实施例中，一个变体 PA 分子包含了一个费林蛋白酶切割位点，以及一个前列腺组织特异性结合结构域，它在功能上代替了天然 PA 的结合结构域，以帮助定位到前列腺癌细胞。

还公开了使用这些公开的变体 PA 分子治疗局部或转移性前列腺癌的方法。此外，还公开了刺激受试者的免疫系统以增强治疗局部和转移性前列腺癌的方法。

附图简述

图 1 是气单胞菌溶素原结构域的示意图(没有按比例画)，并显示了被费林蛋白酶激活的结果。

图 2 是一个条形图，显示了溶血分析的结果，其中 PSA-PA1 与人血浆或用酶法激活的 PSA 强化的人血浆(10000ng/ml)预先保温。

图 3 比较了几个用 PSA 切割位点代替天然的费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原变体相对于野生型气单胞菌溶素原的体外毒性。

图 4 是一张条形图，比较了在体内 PSA-PA1 在 PSA 产生(LNCAp)和非 PSA 产生(SN12C)肿瘤中的特异性。

图 5 是一张示意图(未按比例)，显示了如何将一个气单胞菌溶素原的序列进行改变以产生几个不同的变体 PA 分子。“*”号代表了一个或多个点突变，和/或一个或多个缺失，它们降低了 PA 结合结构域的功能(即在细胞膜中集中的能力)。

序列表

列于随附的序列表中的核酸和氨基酸序列，对于核苷酸碱基使用标准的字母缩写来表示，对于氨基酸使用三字母的代码来显示。每个核酸序列只显示了一条链，但是通过参照所示的链，其互补链也应包括在其中。

SEQ ID NO:1 和 2 分别显示了野生型的气单胞菌溶素原的 cDNA 和蛋白序列。

SEQ ID NO:3 和 4 分别显示了 PSA-PA1 的 cDNA 和蛋白序列，其中气单胞菌溶素原的费林蛋白酶位点已经被一个 PSA 切割位点取代。

SEQ ID NO:5 和 15-21 是在人 semenogelin I 和 II 蛋白中发现的 PSA 切割位点。

SEQ ID NO:6 和 7 分别显示了 PSA-1K 的 cDNA 和蛋白序列，其中气单胞菌溶素原的费林蛋白酶位点已经被一个 PSA 切割位点取代。

SEQ ID NO:8、11 和 14-21 是其它的 PSA 切割位点。

SEQ ID NO:9 和 10 分别显示了 PSA-PA2 的 cDNA 和蛋白序列，其中气单胞菌溶素原的费林蛋白酶位点已经被一个 PSA 切割位点取代。

SEQ ID NO:12 和 13 分别显示了 PSA-PA3 的 cDNA 和蛋白序列，其中气单胞菌溶素原的费林蛋白酶位点已经被一个 PSA 切割位点取代。

SEQ ID NO:22 是天然的促黄体激素释放激素(LHRH)的蛋白序列。

SEQ ID NO:23 是一个修饰的 LHRH 的蛋白序列。

SEQ ID NO:24 是一个变体 PA 肽的蛋白序列，其中 PA 的费林蛋白酶位点已经被一个 PSA 切割位点取代，以及其中 PA 的天然的结合结构域被缺失了并用 SEQ ID NO:23 取代。

SEQ ID NO:25 是一个变体 PA 肽的蛋白序列，其中 PA 的费林蛋白酶位点被保留，并且 PA 的天然的结合结构域被缺失了并用 SEQ ID NO:23 取代。

几个实施方案的详细描述

缩写和术语

对术语和方法提供下面的解释以更好地描述本发明，并指导在执行本发明时的那些本领域普通专业技术人员。在这里以及随附的权利要求中，除非在上下文中有明确的指示，单数形式的“一个”或“一种”或“这个”也包括了复数的意义。例如，提到“一个变体 PA 分子”时包括了多个这样的分子，提到“这种抗体”时包括了涉及的一个或多个抗体及其本领域专业技术人员熟知的等价物，依此类推。

除非另有解释，在此所用的全部技术和科学术语都与在本发明所属领域内的专业技术人员所通常理解的意义相同。

气单胞菌溶素：一种形成通道的毒素，在产生时作为无活性的毒素原的形式，称为气单胞菌溶素原(PA)(野生型的 PA 显示在 SEQ ID NO:1 和 2 中)。PA 蛋白包括许多分离的功能区域，包括一个结合结构域(大约为 SEQ ID NO:2 的 1-83 位氨基酸)、一个毒素结构域(大约为 SEQ ID NO:2 的 84-426 位氨基酸)以及一个含有蛋白酶激活位点(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)的 C-末端抑制肽结构域(大约为 SEQ ID NO:2 的 427-470 位氨基酸)。

结合结构域能够识别并结合到例如在 T 淋巴细胞的 Thy-1 中发现的糖基化磷脂酰肌醇(GPI)膜锚、在红细胞膜上发现的 PIGA 基因产物以及前列腺干细胞抗原(PSCA)上。大多数哺乳动物细胞在它们的表面表达 GPI 锚定的蛋白。气单胞菌溶素原中的激活或蛋白切割位点是一个 6 个氨基酸的序列, 可以被弗林蛋白酶家族识别为蛋白水解的底物。PA 在被弗林蛋白酶水解掉 C-末端的抑制区段后被激活(图 1)。被激活的气单胞菌溶素结合到细胞膜中的 GPI 锚定蛋白上, 形成了一个七聚体, 它插入到膜中产生了已经明确定义的大约 17Å 的通道。通道的形成通过坏死导致细胞快速死亡。野生型的气单胞菌溶素在例如 1nM 或更低的浓度下就对哺乳动物细胞包括红细胞具有毒性。

动物: 活的多细胞有脊椎的生物体, 其中包括例如哺乳动物和鸟类。

抗体: 免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子具有免疫活性的部分, 即含有能够与抗原特异性结合(发生免疫反应)的抗原结合位点的分子。

天然存在的抗体(例如 IgG)包括 4 条多肽链, 两条重链(H)和两条轻链(L)通过二硫键相互连接。但是, 抗体的抗原结合功能可以由天然存在的抗体的片段来执行。因此, 术语“抗体”也被用于指称这些抗原结合片段。涵盖在术语“抗体”中的结合片段的例子包括(1)由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段; (2)由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (3)由抗体的一个单一臂上的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段; (4)由 VH 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等, Nature 341:544-6, 1989); (5)分离的互补决定区域(CDR); 以及(6)F(ab')₂ 片段, 这是一种二价的片段, 含有两个 Fab 片段, 在铰链区通过一个二硫桥连接起来。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域是由单独的基因编码的, 但可以通过重组的方法制造一个合成的接头将它们连接成一个单一的蛋白

链(称为单链 Fv(scFv); Bird 等, Science 242:423-6, 1988; 以及 Hunston 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-83, 1988)。这样的单链抗体也包括在内。在一个实施方案中, 抗体包括了骆驼化的抗体 (camelized antibodies)(例如参见 Tanha 等, J. Biol. Chem. 276:24774-80, 2001)。

在一个实施例中, 抗体片段能够与它们的靶抗原交联, 例如二价片段, 如 F(ab')₂ 片段。此外, 其自身不能与其靶抗原交联的抗体片段(例如 Fab 片段)可以与第二个抗体结合使用, 第二个抗体可以用来交联抗体片段, 从而将靶抗原交联起来。抗体可以使用常规的技术分为片段, 片段的筛选采用与完整抗体所用的相同的方法。抗体还可以包括能够特异性结合靶抗原的双特异性和嵌合的分子。

“特异性结合”是指每个抗体与抗原进行特异性免疫反应的能力。结合是在抗体分子与 T 细胞表面分子的抗原决定簇之间的非随机性结合反应。预期的结合特异性一般是由抗体与 T 细胞表面分子和无关的抗原之间不同的结合能力作为参照点来决定的, 因而在两个不同的抗原之间是不同的, 特别是当两个抗原具有独特的表位时。特异性结合到一个特定的表位的抗体被称为一个“特异性抗体”。

癌症: 经历了特征性的退行性发育、失去了分化能力的恶性肿瘤, 生长速度增加, 侵染周围的组织, 并且能够转移。

cDNA(互补 DNA): 一段缺失了内部非编码区段(内含子)和决定转录的调控序列的 DNA。cDNA 可以在实验室中通过对从细胞中提取的信使 RNA 进行反转录而合成。

化学合成: 一种用来制造蛋白或肽的人工方法。合成蛋白或合成肽是指通过这样的人工方法制造的蛋白或肽。

化学疗法: 在癌症治疗中, 化学疗法是指施用一种或一组化合物

以杀死或减缓快速增殖细胞的繁殖。化疗剂包括那些本领域的专业技术人员所熟知的药剂，包括但不限于：5-氟尿嘧啶(5-FU)、咪唑硫嘌呤、环磷酰胺、抗代谢物(如氟达拉滨(Fludarabine))、抗肿瘤药物(如鬼臼亚乙苷、阿霉素、氨甲蝶呤和长春花新碱)、卡铂(carboplatin)、顺氯氨铂(cisplatin)以及紫杉烷类(taxanes)，例如紫杉醇和克癌易(taxotere)。这些药剂可以与此处公开的变体 PA 分子共同给受试者施用。或者或此外，化疗剂也可以在给受试者施用此处公开的变体 PA 分子之前和/或之后施用。在一个实施例中，化疗剂与激素类和放射治疗共同使用，同时施用此处公开的变体 PA 分子，用来治疗局部的前列腺癌。

保守取代：用一个或多个氨基酸(例如 2、5 或 10 个残基)取代具有相似的生物化学性质的氨基酸残基。一般来说，保守取代对产生的多肽的活性几乎没有或完全没有影响。例如，在理想情况下，包含了一个或多个保守取代的修饰的 PA 肽保留了气单胞菌溶素原活性。可以使用标准的程序如定点突变或 PCR 方法来操作编码该多肽的核苷酸序列从而产生含有一个或多个保守取代的该多肽。

取代的突变体是指那些在其氨基酸序列中至少一个残基被移除并在该位点插入了一个不同的残基的突变体。可以取代蛋白中的原始氨基酸并被认为是保守取代的氨基酸的例子包括：丝氨酸取代丙氨酸；赖氨酸取代精氨酸；谷氨酰胺或组氨酸取代天冬酰胺；谷氨酸取代天冬氨酸；丝氨酸取代半胱氨酸；天冬酰胺取代谷氨酰胺；天冬氨酸取代谷氨酸；脯氨酸取代甘氨酸；天冬酰胺或谷氨酰胺取代组氨酸；亮氨酸或缬氨酸取代异亮氨酸；异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸；精氨酸或谷氨酰胺取代赖氨酸；亮氨酸或异亮氨酸取代甲硫氨酸；甲硫氨酸；亮氨酸或酪氨酸取代苯丙氨酸；苏氨酸取代丝氨酸；丝氨酸取代苏氨酸；酪氨酸取代色氨酸；色氨酸或苯丙氨酸取代酪氨酸；以及异亮氨酸或亮氨酸取代缬氨酸。

许可的取代是非保守的氨基酸取代，但是也不显著地改变气单胞菌溶素原的活性。一个例子是 SEQ ID NO:2 或 4 上 300 位的丙氨酸被半胱氨酸取代。

关于保守取代的进一步信息可以在其它文献中发现，例如在 Ben-Bassat 等(J. Bacteriol. 169:751-7, 1987)、O'Regan 等(Gene 77:237-51, 1989)、Sahin-Toth 等(Protein Sci. 3:240-7, 1994)、Hochuli 等(Bio/Technology 6:1321-5, 1988)、WO00/67796(Curd 等)以及标准的遗传学和分子生物学教科书中。

在一个实施例中，这样的突变体可以通过附加的测试来容易地筛选，方法是进行分析(例如如实施例 2-5 中描述的那样)以确定突变体是否保留了变体 PA 的活性。

含有：一个术语意义为“包括”。例如除非有清楚的明示，“含有 A 或 B”意味着包括 A 或 B，或者包括 A 和 B 两者。

缺失：除去一个核酸的一段序列例如 DNA，然后将两端的区域连在一起。

DNA：脱氧核糖核酸。DNA 是一个长链的聚合物，含有大多数生物体的遗传物质(某些病毒具有含有核糖核酸 RNA 的基因)。在 DNA 聚合物中重复单位是四种不同的核苷酸，每种含有四种碱基腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶之一，它们结合到一个连接了磷酸基团的脱氧核糖上。DNA 分子中的核苷酸三联体称为密码子，编码了多肽中的氨基酸。术语“密码子”也被用于 DNA 序列转录成的 mRNA 中相应的(以及互补的)三个核苷酸的序列。

增强：提高某种物质的质量、数量或力量。在一个实施方案中，当受试者使用一种疗法时，如果受试者对抗肿瘤更加有效，就说这种

疗法增强了受试者减轻肿瘤例如前列腺癌的能力。在另一个实施方案中，在受试者中如果一种药物对于减轻肿瘤更为有效，就说这种疗法增强了这种药物减轻肿瘤例如前列腺癌的能力。这些增强可以使用此处公开的方法进行测量，例如确定肿瘤体积的减小(见实施例 5)。

功能性缺失：对一个基因序列所做的突变、部分或完全缺失、插入或其它的改变，使这部分基因序列无功能。

例如，PA 结合结构域的功能性缺失导致 PA 在细胞膜上结合和聚集能力的下降。功能性缺失可以通过在气单胞菌溶素原中插入另一个功能性结合结构域而逆转，例如插入一个前列腺特异性结合结构域如 LHRH 肽。

可用于功能性缺失气单胞菌溶素原结合结构域的方法的例子包括但不限于：缺失 SEQ ID NO:2 的大约 1-83 位氨基酸或其片段，例如 SEQ ID NO:2 的大约 45-66 位氨基酸，或者将 W45A、I47E、M57A、Y61A、K66Q(氨基酸编号参照 SEQ ID NO:2)突变中的一个或多个插入到变体气单胞菌溶素序列中(例如参见 Mackenzie 等，J. Biol. Chem. 274:22604-22609, 1999)。

在另一个例子中，对天然的 PA 弗林蛋白酶切割位点的功能性缺失导致 PA 被弗林蛋白酶切割和激活的能力与野生型的 PA 分子相比降低。

固定化：结合到一个表面，例如一个固体表面上。固体表面可以是聚合物，例如聚苯乙烯或聚丙烯。在一个实施方案中，固体表面是小珠的形式。在一个实施方案中，固体表面包括一种修饰的 PA 毒素，在某些例子中还包括一个或多个前列腺特异性结合配体，例如 LHRH 肽、PSMA 抗体和 PSMA 单链抗体。在理想情况下，一旦珠子到达前列腺细胞靶，修饰的 PA 毒素就从珠子上释放出来。将多肽固定化在

固体表面的方法可以在 WO 94/29436 和美国专利号 5858358 中发现。

分子如何能够结合到珠子上的例子包括但不限于：PA 毒素-PSA 切割位点-珠子-前列腺结合配体或前列腺结合配体-珠子-PSA 位点-PA 毒素-PSA 切割位点-抑制剂。

分离的：一种“分离的”生物成分(例如核酸分子或蛋白)已经基本上与该成分天然存在的生物体的细胞中的其它生物成分(即其它的染色体和染色体外 DNA 和 RNA)分离或纯化了。已经被“分离的”核酸和蛋白包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白。该术语也包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白以及化学合成的核酸和蛋白。

一种分离的细胞是指已经基本上与细胞天然存在的生物体中的其它生物成分分离或纯化的细胞。

恶性细胞：具有退行发育侵入和转移性质的细胞。

哺乳动物：该术语包括人类和非人类的哺乳动物。同样地，术语“受试者”包括人类和兽类受试者。哺乳动物的例子包括但不限于：人、猪、牛、山羊、猫、狗、兔和小鼠。

肿瘤：异常生长的细胞。

正常细胞：非肿瘤细胞、非恶性细胞、非感染性细胞。

寡核苷酸：一个线性的多核苷酸序列，其长度不超过大约 200 个核苷酸碱基，例如一个至少大约 6 个核苷酸，例如至少 15、50、100 或 200 个核苷酸长的多核苷酸(如 DNA 或 RNA)。

可操作地连接：当第一个核酸序列与第二个核酸序列有功能上的关系时称为第一个核酸序列与第二个核酸序列可操作地连接。例如，如果一个启动子影响了一个编码序列的转录或表达，则该启动子与该编码序列可操作地连接。一般来说，可操作连接的 DNA 序列是连续的，并且必须将两个蛋白编码区连接在同样的阅读框架内。

ORF(可读框)：一系列没有任何终止密码子的编码氨基酸的核苷酸三联体(密码子)。这些序列通常被翻译为一个肽。

多核苷酸：一个任何长度的线性核酸序列。因此，多核苷酸包括至少为 15、50、100、200、400、500、1000、1100 或 1200(寡核苷酸)的分子，以及全长 cDNA 或染色体的核苷酸。

气单胞菌溶素原：气单胞菌溶素的无活性的毒素前体。野生型或天然的气单胞菌溶素原的 cDNA 和蛋白分别显示在 SEQ ID NO:1 和 2 中。

在一个实施例中，一个变体或修饰的气单胞菌溶素原分子包含一个前列腺特异的蛋白酶切割位点，例如一个 PSA 特异性切割位点，这使得在存在前列腺特异的蛋白酶如 PSA、PMSA 或 hK2 的情况下可以使变体 PA 激活(例如参见图 5C-I)。在一个实施例中，一个前列腺特异的蛋白酶切割位点被插入在 PA 天然的弗林蛋白酶切割位点中，以便 PA 在存在前列腺特异的蛋白酶而不是弗林蛋白酶的情况下被激活(例如参见图 5D-I)。此外，也可以使用对 6 个氨基酸序列的突变并插入一个前列腺特异的蛋白酶切割位点来功能性缺失弗林蛋白酶切割位点(例如参见图 5C)。在另一个实施例中，一个变体 PA 分子还包括缺失或取代一个或多个，例如至少两个天然的 PA 氨基酸。在另一个实施例中，变体 PA 分子还包括另一个连接或添加到变体 PA 分子上(或其中)的分子(例如抗体或肽)。在另一个实施例中，变体 PA 分子包含了一个前列腺组织特异性结合结构域。

在另一个实施例中，变体 PA 分子还包含了功能性缺失的结合结构域(大约为 SEQ ID NO:2 的 1-83 位的氨基酸)。可以使用任何本领域已知的方法进行功能性缺失，例如缺失、插入、突变或取代。这样的例子包括但不限于缺失整个结合结构域或其一部分(例如参见图 5G-I)，或者引入点突变(例如上述的那些，例如参见图 5D-F)，从而导致结合结构域的功能降低。例如，一个功能性缺失了结合结构域(并且没有结合序列代替它)的 PA 分子，其在细胞膜上聚集的能力降低，因此比野生型的 PA 序列裂解细胞的速度慢(例如参见图 5D)。此外还公开了如下所述的天然结合结构域被功能性缺失并用前列腺组织特异性结合结构域代替的变体 PA 分子(例如参见图 5E-I)。

在另一个实施例中，变体或修饰的 PA 分子包含了一个弗林蛋白酶切割位点，以及一个被前列腺组织特异性结合结构域代替的功能性缺失的结合结构域(例如参见图 5J-M)。这样的变体 PA 分子通过前列腺组织特异性结合结构域被定向到前列腺细胞中，并在存在弗林蛋白酶的情况下被激活。

特定的非限制的变体 PSA 蛋白的例子显示在 SEQ ID NO:4、7、10、13、24 和 25 中。

修饰的 PA 的活性是影响细胞裂解的试剂的活性。细胞包括但不限于前列腺特异性蛋白酶分泌细胞，例如 PSA-分泌细胞、前列腺癌细胞、慢速增殖的前列腺癌细胞。试剂包括但不限于修饰的 PA 蛋白、核酸、特异性结合试剂，包括在此公开的变异体、突变体、多态性、融合体及其片段。在一个实施例中，当修饰的 PA 蛋白或核酸与一个 PSA-分泌细胞(如前列腺癌细胞)接触时，促进了细胞的裂解和死亡，就可以说修饰的 PA 活性被增强了，增强的程度可以是例如与非 PSA 产生细胞的裂解相比高至少 10%，或高至少 25%、50%、100%、200% 或甚至 500%。在其它的例子中，当修饰的 PA 蛋白和核酸与肿瘤接触，

减少了肿瘤细胞(例如前列腺肿瘤)的体积时,就可以说修饰的 PA 活性被增强了,肿瘤细胞的体积可以减少例如至少 10%,例如至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或甚至 100%(完全消除了肿瘤)。

在此描述了可用于确定一种试剂是否具有修饰的 PA 活性的分析方法,例如在实施例 2-5 和 9 中。例如,可以评估一个修饰的 PA 肽的特异性裂解 PSA-产生细胞的能力(实施例 2 和 5)、在人血浆中的稳定性(实施例 3)、是否为 PSA 酶活性的有效底物(实施例 9)。功能性蛋白活性可以通过裂解 PSA-产生细胞对非 PSA-产生细胞的倾向性、前列腺肿瘤体积的减小、与野生型 PA 相比毒性的减少、以及与野生型 PA 相比在血液中稳定性的增加而加以检测。

同样的分析可用于确定此处公开的任何修饰的 PA 试剂是否能够减少肿瘤(例如前列腺肿瘤)的体积并特异性裂解 PSA-产生细胞。例如,在 SEQ ID NO:4、24 和 25 中显示的修饰的 PA 肽预期能够减少前列腺肿瘤的体积。任何这些分析方法都可以通过使用体内表达修饰的 PA 基因、以及变异体、融合体及其片段来代替施用纯化的蛋白来进行修改。

启动子: 一组核酸控制序列,可以指导核酸的转录。启动子包括靠近转录起始位点的必需的核酸序列,例如在聚合酶 II 型启动子的情况下,其为 TATA 元件。一个启动子也任选包含远端的增强子或阻遏子元件,它们可以位于距转录起始位点多达几千个碱基对之外。

前列腺特异性启动子: 一种对睾酮和其它雄性激素有反应性、因而启动基因在前列腺细胞中表达的启动子。例子包括但不限于 probasin 启动子、前列腺特异性抗原(PSA)启动子、前列腺特异性膜抗原(PSMA)启动子以及人血管舒缓素 2(hK2)启动子。

前列腺特异性蛋白酶切割位点：一段氨基酸序列，能够被前列腺特异性蛋白酶识别并特异性地有效水解(切割)。例子包括但不限于 PSA-特异性切割位点、PSMA-特异性切割位点和 HK-2-特异性切割位点。

PSA-特异性切割位点是一段氨基酸序列，能够被前列腺特异性抗原(PSA)识别并特异性地有效水解。这样的肽序列可以被引入其它的分子，例如 PA，以产生可以被 PSA 激活的药物前体。修饰的 PA 被 PSA 激活后，PA 就具有活性，能够发挥细胞毒性。PSA-特异性切割位点的例子包括但不限于在 SEQ ID NO:5、8、11 和 14-21 中显示的那些，以及在授权于 DeFeo-Jones 等的美国专利号 5866679、授权于 Garsky 等的美国专利号 5948750、授权于 Feng 等的美国专利号 5998362、授权于 Isaacs 等的美国专利号 6265540、授权于 D'Amico 等的美国专利号 6368598 以及授权于 Feng 等的美国专利号 6391305 中所公开的那些(在此全部引为参考)。

特定的 PSMA-特异性切割位点的例子可以在授权于 Isaacs 和 Denmeade 的 WO/0243773 中发现(在此引为参考)。特定的 HK-2-特异性切割位点的例子在授权于 Denmeade 等的 WO/0109165 中被公开(在此引为参考)。

前列腺组织特异性结合结构域：一种分子，例如肽配体、毒素或抗体，它对前列腺细胞比对其它的细胞类型具有较高的特异性。在一个例子中，前列腺组织特异性结合结构域在前列腺组织或细胞中比在其它类型的细胞中具有较低的 K_D (即与受试者的其它正常组织相比选择性结合到前列腺组织上)，例如至少 10 倍低的 K_D ，例如至少 20、50、75、100 或甚至 200 倍低的 K_D 。这样的序列可用于将一种试剂例如一个变体 PA 分子定位到前列腺中。例子包括但不限于：能够识别相对来说是前列腺特异蛋白如 PSA、PSMA、hK2、prostasin 和 hepsin 的抗体；具有前列腺选择性受体的配体，例如天然的或合成的促黄体激

素释放激素(LHRH); 以及内皮缩血管肽(结合到同源的内皮缩血管肽受体上)。

纯化的: 术语“纯化的”并不需要绝对的纯度; 它更倾向于作为一个相对的术语。因此, 例如一个基本上是纯化的蛋白或核酸制剂(例如在此公开的修饰的 PA 毒素)是指这样一种制剂, 其中提到的蛋白或核酸比在其细胞内或生产反应室内(当适当时)的自然环境中的蛋白更纯。例如, 一个修饰的 PA 蛋白制剂, 如果蛋白占到了制剂中的总蛋白含量的至少 50%, 例如至少 70%, 就是纯化的。纯化蛋白和核酸的方法在本技术领域内众所周知。可用于纯化蛋白, 例如修饰的 PA 的方法的例子包括、但不限于在 Sambrook 等(分子克隆: 实验室手册, 冷泉港出版社, 纽约, 1989 年, 第 17 章)中公开的方法。

重组的: 重组的核酸是指一种核酸, 其序列不是天然存在的, 或者其序列是通过将两个分开的序列片段进行人工组合而产生的。人工组合的实现通常是通过化学合成, 或者更常见的是通过例如遗传工程技术对分离的核酸区段进行人工操作。重组的蛋白是指由编码该蛋白的重组核酸的表达而产生的蛋白。

样品: 从一个受试者的细胞获得的含有基因组 DNA、cDNA、RNA 或蛋白的生物样品, 例如存在于外周血、尿液、唾液、精液、活组织切片、外科标本、细针抽出物(aspirate)、羊膜穿刺样品和尸体解剖材料的样品。在一个例子中, 样品包括从一个受试者获得的前列腺癌细胞。

序列同一性/相似性: 两个或多个核酸序列、或两个或多个氨基酸序列之间的同一性/相似性根据序列间的同一性或相似性来表示。序列同一性可以根据同一性百分比来度量; 百分数越高, 序列越一致。序列相似性可以根据相似性百分比来度量(考虑了保守的氨基酸取代); 百分数越高, 序列越相似。

将序列比对用于比较的方法在本领域内众所周知。各种程序和比对算法在下列文献中有描述：Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins 和 Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet 等, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang 等, *Computer Appls. in the Bioscience* 8:155-65, 1992; 以及 Pearson 等, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994。在 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990 中描述了对序列比对方法和同源性计算的详细的考虑。

NCBI 基本局域比对搜索工具(BLAST)(Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990)可从几个来源获得, 包括国立生物信息中心(NCBI, 国立医学图书馆, 38 楼 A 座, 8N805 房, Bethesda, MD20894), 以及在互联网上, 用于联系序列分析程序 `blastp`、`blastn`、`blastx`、`tblastn` 和 `tblastx`。其它的信息可以在 NCBI 网站上发现。

为了比较大于大约 30 个氨基酸的氨基酸序列, 利用了 Blast2 序列功能, 它使用了缺省的 BLOSUM62 矩阵设置以默认参数(间距存在值为 11, 每个残基的间距值为 1)。当比对短的肽时(少于大约 30 个氨基酸), 比对应使用 Blast2 序列功能进行, 使用 PAM30 矩阵设置以默认参数(开放间距 9, 延伸间距 1 补偿)。使用这种方法进行评估时, 与参比序列具有更高相似性的蛋白将显示同一性百分比增加, 例如至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%或甚至 99%的序列同一性。当只有完整序列的一部分被比较序列同一性时, 在 10-20 个氨基酸的短窗口内同源物一般具有至少 75%的序列同一性, 依赖于它们与参比序列的同一性, 可以具有至少 85%、90%、95%或 98%的序列同一性。在这样的短窗口中确定序列同一性的方法在 NCBI 网站上有描述。

蛋白同源物其特征一般为使用 NCBI 基本 Blast2.0, 有间隙的 `blastp`

以及数据库例如 nr 或 swisspor 数据库，在氨基酸序列全长比对的基础上计算出的序列同一性为至少 70%，例如至少 75%、80%、85%、90%、95%或甚至 98%。用 blastn 程序搜索的查询用 DUST 过滤(Hancock 和 Armstrong, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:67-70)。其它程序使用 SEG。

本领域的专业技术人员将会意识到提供这些序列同一性的范围只是指导性的，有可能在提供的范围之外获得极其显著的同源物。在此提供的是上述的肽同源物以及编码这些同源物的核酸分子。

然而，不显示出高度同一性的核酸序列可以编码相同或相似的(保守的)氨基酸序列，这是由于遗传密码的简并性。使用这种简并性可以造成核酸序列的变化，从而产生多个核酸分子，但它们都编码基本上相同的蛋白。用这种方法测定，这些同源的肽可以具有例如至少 75%、80%、90%、95%、98%或 99%的序列同一性。当不是完整的序列被比较序列同一性时，在 10-20 个氨基酸的小窗口中同源物可以具有例如至少 75%、85%、90%、95%、98%或 99%的序列同一性。在这样的短窗口中确定序列同一性的方法可以在 NCBI 网站上发现。本领域的专业技术人员将会意识到提供这些序列同一性的范围只是指导性的，有可能在提供的范围之外获得显著的同源物或其变异体。

受试者：一类活的多细胞的有脊椎的生物体，包括了需要增加所需的生物学效应的人类和兽类受试者。例子包括但不限于人、猿、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、马、猪和牛。

治疗有效量：一种足够达到所需的生物学效应的量，例如能够有效减小尺寸(即体积)、副作用和/或前列腺癌转移的量。在一个实施例中，它是足够降低前列腺癌的症状或效应，例如肿瘤的大小的量。在特定的实施例中，它是能够有效减少前列腺肿瘤的大小和/或前列腺肿瘤转移至少 30%、40%、50%、70%、80%、90%、95%、99%或甚至 100%(完全消除肿瘤)所需的量。

在特定的实施例中，它是在例如一个患有的一种或多种前列腺肿瘤并施用了修饰的 PA 分子的受试者中，有效减小前列腺肿瘤所需的修饰的 PA 分子的量和/或前列腺癌细胞被修饰的 PA 裂解的量。在另一个实施例中，它是能够有效减少前列腺肿瘤的转移所需的修饰的 PA 分子的量和/或前列腺癌细胞被这种修饰的 PA 分子裂解的量。

在一个实施方案中，治疗有效量也包括足以在被治疗受试者中实现期望的效果所需的修饰的 PA 的量和/或前列腺癌细胞被修饰的 PA 裂解的量。例如，这些量可以是一种改善诸如癌症如前列腺癌的征兆和/或症状所必需的量。

有效量的修饰的 PA 和/或被这种修饰的 PA 分子裂解的前列腺癌细胞可以在一剂或在几剂中施用，例如在一个疗程中每日施用。但是，有效量依赖于被治疗的受试者、被治疗的症状的严重性和类型、以及给药的方式。例如，治疗有效量的修饰的 PA，如果静脉内施用可以在每 70 公斤体重大约 1-10mg 之间变化，例如大约 2.8mg，如果在前列腺内或肿瘤内施用可以在每 70 公斤体重大约 10-100mg 之间变化，例如大约 28mg。此外，被 PA(变异体或野生型)裂解的前列腺癌细胞的治疗有效量可以在大约 10^6 到 10^8 个细胞之间变化。

治疗有效剂量：在一个实施例中，在施用它的受试者体内足够减小肿瘤细胞例如前列腺肿瘤的体积、导致病理症状消退或能够缓解由病症引起的征兆或症状所需的修饰 PA 的剂量。在一个特定的实施例中，它是足够减少前列腺癌转移所需的修饰 PA 的剂量。

在另一个实施例中，它是由于细胞与在施用它的受试者体内足够减小肿瘤细胞例如前列腺肿瘤的体积、导致病理症状消退或能够缓解由病症引起的征兆或症状所需的修饰 PA 接触而产生的细胞裂解物的剂量。在一个特定的实施例中，它是由于细胞与足够减少前列腺癌转

移所需的修饰或野生型 PA 接触而产生的细胞裂解物的剂量。

肿瘤：一种赘生物。包括实体和血液(或液体)肿瘤。

血液肿瘤的例子包括但不限于：白血病、包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病以及成髓细胞性、前髓细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性白血病和红白血病)、慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、脾大性红细胞增多、淋巴瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤(包括低度、中度和高度的)、多发性骨髓瘤、Waldenström 氏巨球蛋白血症、重链病、骨髓发育异常综合征、套细胞淋巴瘤和脊髓发育不良。

实体肿瘤例如肉瘤和癌的例子包括但不限于：纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing 氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、扁平细胞癌、基细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、Wilm 氏肿瘤、宫颈癌、睾丸癌、膀胱癌以及中枢神经系统肿瘤(例如神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质细胞瘤、melangioma、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤)。

转化的：一种转化的细胞是一个其中通过分子生物学技术导入了核酸分子的细胞。在此所用的术语“转化”包含了所有可用于将核酸分子导入这样的细胞的技术，包括用病毒载体转染、用质粒载体转化、以及通过电穿孔、脂转染和微粒枪加速导入裸 DNA。

转基因细胞：含有外源的非天然 DNA 的转化细胞。

转基因哺乳动物：含有外源的非天然 DNA 的转化的哺乳动物。在一个实施方案中，非天然的 DNA 是含有一个 PSA 切割位点的修饰的 PA，例如 SEQ ID NO:3，或编码 SEQ ID NO:24 或 25 所示蛋白的核酸序列。

变异体或片段或融合蛋白：修饰的 PA 分子的产生可以以各种方法完成(例如参见实施例 12 和 16)。可以改造编码修饰的 PA 蛋白或融合蛋白、或蛋白的一个片段或变异体(例如与修饰的 PA 具有 80%、90% 或 95% 序列同一性的片段或变异体)的 DNA 序列，以允许蛋白在真核细胞或生物体、细菌、昆虫和/或植物内表达。为了获得表达，DNA 序列可以改变，并与其它调控序列进行可操作的连接。最终的含有调控序列和治疗性修饰 PA 蛋白的产物称为载体。载体可以被导入真核细胞、细菌、昆虫和/或植物细胞。一旦进入细胞，载体就使得蛋白得以生产。

融合蛋白含有与其它氨基酸序列相连的修饰的 PA(或其变异体、多态性、突变体或片段)，所述其它氨基酸序列不抑制所需的蛋白活性，例如裂解 PSA-分泌细胞的能力。在一个实施例中，所述其它氨基酸序列在长度上不超过 5、6、7、8、9、10、20、30 或 50 个氨基酸残基。

本领域的专业技术人员将会意识到，DNA 可以以大量的方式进行改变而不会影响到被编码蛋白的生物学活性。例如，可以使用 PCR 在编码变异的 PA 毒素的 DNA 序列中产生变化。这样的变异体可以是对用于表达蛋白的宿主细胞中的密码子偏好性或其它方便了表达的序列改变进行优化的变异体。

载体：当被导入宿主细胞时产生了转化的宿主细胞的核酸分子。载体可以包含允许它在宿主细胞内复制的核酸序列，例如复制原点。载体还可以包括一个或多个可选择的标记基因和其它本领域熟知的遗

传元件。

其它在分子遗传学中常用术语的定义可以在下列文献中发现：牛津大学出版社 1994 年出版的 Benjamin Lewin 编辑的《基因》(第 5 版)(ISBN 0-19-854287-9)、Blackwell 科学有限公司 1994 年出版的 Kendrew 等编辑的《分子生物学百科全书(The Encyclopedia of Molecular Biology)》(ISBN 0-632-02182-9)、以及 VCH 出版公司 1995 年出版的 Robert A. Meyers 编辑的《分子生物学和生物技术：综合案头参考书(Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference)》(ISBN 1-56081-569-8)。

突变的气单胞菌溶素原分子

细菌毒素，例如由嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)产生的气单胞菌溶素和由金黄色葡萄球菌(*Staph aureus*)产生的 α -溶血素，是 β -片层结构的蛋白，它们在质膜上聚合产生孔，导致快速的细胞裂解性细胞死亡(图 1)。孔的形成实质上破坏了细胞膜，导致在细胞周期所有阶段的细胞、包括非增殖细胞(即 G0 休止的细胞)的死亡。但是，野生型的气单胞菌溶素不加区分地杀死所有的细胞。此处公开的是气单胞菌溶素的一种无活性的毒素前体形式(变异 PA)，它可以被定位到前列腺癌特异性蛋白并被该蛋白激活。该公开的变异 PA 分子用于治疗局部和转移性前列腺癌的一个优点是，它将一种不依赖于增殖的疗法与前列腺特异性药物的递送相结合，从而对病人产生最小的副作用。本领域的专业技术人员将理解，其它的毒素前体，例如脓毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium septicum*)的 α 毒素、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 δ -毒素以及人类的穿孔素(perforin)，都可以代替气单胞菌溶素原。

此处公开的变体 PA 分子，包括了 DNA 序列和蛋白序列，含有前列腺特异性蛋白酶切割序列。前列腺特异性蛋白酶切割序列的例子包括但不限于：PSA、PSMA 和 hK2 切割序列。前列腺特异性蛋白酶

切割序列在功能上代替了 PA 的天然的弗林蛋白酶切割位点(例如参见图 5B-I)。这种代替产生了一种气单胞菌溶素原的变体,它只有在存在具有酶活性的蛋白酶,如 PSA、PSMA 或 hK2 的情况下才变得具有细胞裂解活性。PSA 是一种丝氨酸蛋白酶,能够识别和水解特异性肽序列。它由正常的和癌化的前列腺细胞以一种具有酶活性的形式分泌出来,进入血液循环后变为无活性。由于在血液和除了前列腺的其它正常组织中都不含有具有酶活性的 PSA,PSA 的蛋白水解活性可用于在前列腺癌的位点活化毒素前体。任何 PSA、PSMA 或 hK2 的切割位点都可以使用。PSA 切割位点的例子包括但不限于在 SEQ ID NO:5、8、11 和 14-21 中显示的那些。在一个特定的实施例中,PSA 切割位点包含 SEQ ID NO:5。

在一些实施例中,PA 的弗林蛋白酶切割位点(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)被缺失并插入一个前列腺特异性蛋白酶切割位点,例如一个 PSA 切割位点(例如参见图 5B)。在其它的实施例中,PA 的弗林蛋白酶切割位点被突变,并将一个前列腺特异性蛋白酶切割位点,例如一个 PSA 切割位点插入或添加到弗林蛋白酶位点的 N-端或 C-端(例如参见图 5C)。

还公开了变体 PA 分子,其中 PA 结合结构域被功能性缺失(例如参见图 5D-M)。这样的变体 PA 分子可以含有一个天然的弗林蛋白酶切割位点(例如参见图 5J-M),由此通过用一个前列腺组织特异性结合结构域功能性取代 PA 结合结构域以达到向前列腺细胞的定位。此外,变体 PA 分子也可以含有一个前列腺特异性蛋白酶切割位点(例如参见图 5D-I),由此毒素前体的激活一般发生在分泌前列腺特异性蛋白酶的细胞中。PA 结合结构域包括 SEQ ID NO:2 的大约 1-83 位氨基酸。可以使用任何本领域已知的方法将结合结构域功能性缺失,例如通过缺失结合结构域的所有或部分氨基酸,比如缺失 SEQ ID NO:2 或 4 的 1-83 位氨基酸(例如参见图 5G),或比如缺失在 SEQ ID NO:2 或 4 的 45-66 位氨基酸中的一个或多个氨基酸(例如参见图 5D,其中*号表示

一个或多个缺失)。在另一个实施例中,通过在变体 PA 序列中引入一个或多个位点特异性突变来将结合结构域功能性缺失,例如 SEQ ID NO:2 或 4 的 W45A、I47E、M57A、Y61A 和 K66Q(例如参见图 5D,其中*号表示一个或多个突变)。

公开了含有天然的 PA 结合结构域被前列腺组织特异性结合结构域功能性取代的变体 PA 分子(例如参见图 5E、5F、5H 和 5I-M)。一个或多个前列腺组织特异性结合结构域的使用可以增强公开的变体 PA 分子向前列腺细胞及其转移细胞的定向。已知几种前列腺组织特异性结合结构域。例子包括但不限于促黄体激素释放激素(LHRH)序列,例如在 SEQ ID NO:22 和 23 中所示的那些,以及识别 PSA 和/或 PSMA 的抗体。

一个或多个前列腺组织特异性结合结构域可以连接到一个或多个公开的变体 PA 分子的氨基酸上,但是在理想情况下,可以不明显地干扰变体 PA 被前列腺特异性蛋白酶如 PSA 激活的能力,以及在细胞膜上形成孔的能力。例如,前列腺组织特异性结合结构域可以连接或插入到变体 PA 的 N-端和/或 C-端(例如参见图 5E 和 5H)。在一些实施例中,PA 的天然结合结构域(即 SEQ ID NO:2 或 4 的 1-83 位氨基酸)被缺失了,以便在 N-端添加或连接前列腺组织特异性结合结构域导致添加在 SEQ ID NO:2 或 4 的 84 位氨基酸上(例如参见图 5H 和 5L)。在其它的实施例中,在 PA 的天然结合结构域中引入了较小的缺失或点突变,以便在 N-端添加或连接前列腺组织特异性结合结构域导致添加在 SEQ ID NO:2 或 4 的 1 位氨基酸上(或功能性缺失天然的 PA 结合结构域后紧接的 N-端氨基酸上)(例如参见图 5E 和 5I)。在一些实施例中,PA 的 N-端氨基酸在结合前列腺组织特异性结合结构域前被改变为半胱氨酸或其它氨基酸,以帮助将前列腺组织特异性结合结构域连接到变体 PA 蛋白上。

也可以选择或加上这样的步骤,即将一个或多个前列腺组织特异

性结合结构域添加或连接到变体 PA 分子的其它氨基酸上,例如 SEQ ID NO:2 或 4 的 215 位或 300 位氨基酸(例如参见图 5F、5I、5K 和 5M)。在一些实施例中,半胱氨酸代替了那个位置的天然氨基酸。例如,可以对 SEQ ID NO:2 或 4 进行下列改变:215 位的酪氨酸变为半胱氨酸或 300 位的丙氨酸变为半胱氨酸。在一个实施例中,当前列腺组织特异性结合结构域是一个抗体时,可以使用交联将抗体添加到变体 PA 上,例如将抗体的氨基基团与位于 PA 突变体上的半胱氨酸反应(例如 SEQ ID NO:2 中的 19 位、75 位、159 位和/或 164 位的半胱氨酸)。

还公开了特定的变体 PA 分子,例如在 SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12、13、24 和 25 中显示的那些。

在一些实施例中,公开的变体 PA 分子被连接或固定化到一个表面上,例如一个珠子。珠子也可以含有前列腺特异性配体以增强向前列腺细胞,例如局部或转移性前列腺癌细胞的定向。

使用修饰的气单胞菌溶素原治疗前列腺癌

上面公开和讨论的变体 PA 分子在前列腺癌位点中通过前列腺特异性蛋白酶如 PSA、PSMA 和 hK2 的蛋白水解活性被特异性地激活成为潜在的细胞毒素。在一些实施例中定向是通过包含了一个或多个前列腺组织特异性结合结构域来达到的,例如 LHRH 肽,它可以结合到由前列腺癌细胞表达的同源的 LHRH 受体上,或者 PSMA 或 LHRH 抗体,它们可以结合到在前列腺癌细胞表面表达的 PSMA 或 LHRH 上。本领域的专业技术人员将意识到使用包含弗林蛋白酶切割位点和 LHRH 肽或抗体的变体 PA 分子,以及使用变体 PA 分子和此处公开的方法,可以治疗其它表达 LHRH 受体的癌症,例如黑素瘤和乳腺、卵巢和肺癌。此外,本领域的专业技术人员将意识到使用包含弗林蛋白酶或 PSMA 切割位点和/或 PSMA 抗体的变体 PA 分子,以及使用变体 PA 分子和此处公开的方法,可以治疗其它表达 PSMA(例如在肿瘤的血管系统中)的癌症,例如乳腺、结肠、肾、睾丸和脑癌。

公开的变体 PA 分子，例如核酸和/或蛋白，可以使用本领域任何已知的方法，局部地或全身地给药到患有局部或转移性前列腺癌的受试者中。此外，公开的变体 PA 分子可以给药到受试者进行免疫刺激治疗。由于公开的变体 PA 分子的结合和激活特异性，局部和全身给药将对病人的正常组织产生极小的影响，并在理想情况下产生很少至完全没有副作用。

在一个实施例中，公开的变体 PA 分子被注射到患有前列腺癌如局部肿瘤的受试者的前列腺中(前列腺内给药)和/或前列腺肿瘤中(肿瘤内给药)。在前列腺中的这种局部注射和随后的前列腺癌细胞的裂解可以产生免疫刺激效应，导致治疗的受试者中微型转移性疾病的减少或消除。采用这种方式，全身性疾病通过一种极小毒性、局部使用的治疗方法得到治疗或缓解。

此外，或可以选择的是，公开的变体 PA 分子可以全身性给药，例如静脉内、肌内、皮下或口服给药到患有前列腺癌例如转移性前列腺肿瘤的受试者中。全身性疗法也可能具有免疫刺激性抗肿瘤效应。含有 PSA 切割位点的公开的变体 PA 分子不被血清蛋白酶或血液内失去酶活的 PSA 水解。代之以未被水解的公开的变体 PA 分子通过血液被运送到转移性癌沉积物中的细胞外体液中，在那里它们可以被这些前列腺癌细胞分泌的有酶活性的 PSA 水解成为有活性的治疗性毒素。一旦被水解，释放出的毒素由于它的高度的细胞膜通透能力进入紧邻的 PSA 产生细胞和不产生 PSA 的旁观细胞，并诱导这些细胞的细胞裂解性死亡。

还公开了另一种全身性治疗受试者中的前列腺癌的方法。在这种方法中，将前列腺癌细胞从患有前列腺癌如转移性前列腺肿瘤的受试者中取出。可以选择或加上的是，可以使用已建立的前列腺癌细胞系。可以使用的前列腺癌细胞系的例子包括但不限于：PSA 产生细胞例如

LNCaP(例如 ATCC NO:CRL-1740 和 CRL-10995)和 CWR22R(ATCC NO:CRL-2505 和 Nagabhushan 等, Cancer Res. 56(13):3042-6, 1996)、或非 PSA 产生细胞例如 PC-3(ATCC NO:CRL-1435)和 DU145(ATCC NO:HTB-81)。将取出的细胞或细胞系与公开的变体 PA 分子保温或接触。保温导致细胞被变体 PA 分子裂解, 产生了细胞裂解物, 将它给药到受试者。在一个实施例中, 该方法还包括给药免疫刺激因子、来自经改造能够产生免疫刺激因子的前列腺癌细胞的裂解物、和/或被辐射的前列腺癌细胞(包括被改造能够产生免疫刺激因子的前列腺癌细胞)。免疫刺激因子的例子包括但不限于: 粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素蛋白家族的成员包括但不限于白细胞介素 2 和白细胞介素 6、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、以及干扰素家族的成员例如 α -、 β -或 γ -干扰素。给受试者施用这些物质可以与细胞裂解物同时(共给药)、在施用细胞裂解物之前、和/或在施用细胞裂解物之后进行。

在一个实施例中, 这样的给药增强了受试者减小前列腺肿瘤和/或转移性肿瘤的体积的能力。例如, 公开的方法可以减小前列腺肿瘤细胞的体积和/或转移性肿瘤细胞的体积, 例如至少 10%, 例如至少 20% 或以上。此外, 公开的方法还可以导致与前列腺肿瘤和/或转移性前列腺肿瘤相关的症状的减轻。

公开的变体 PA 分子可以作为单一形式的疗法给药, 也可以与其它疗法结合使用, 例如放射疗法和/或雄激素去除疗法(例如 LHRH 受体激动剂/拮抗剂、抗雄激素、雌激素、肾上腺类固醇合成抑制剂酮康唑(ketoconazole)和氨基苯乙哌啶酮)。此外, 公开的变体 PA 分子可以单独施用, 也可以与可药用的载体结合使用, 和/或其它治疗化合物结合使用, 例如那些能够减少产生针对施用的变体 PA 蛋白的抗体的化合物(例如美罗华(Rituximab)和类固醇)以及其它的抗肿瘤剂。

某些特定的实施例的公开不意味着排除了其它的实施方案。此

外，任何此处描述的治疗不需要排除其它的治疗，而可以与其它的生物活性剂或治疗方案结合使用。

实施例 1

PSA 激活的气单胞菌溶素原毒素的产生

本实施例描述了用于产生表 1 中所示的被 PSA 激活的突变气单胞菌溶素原毒素的方法。本领域的专业技术人员将会理解同样的方法可以用于生产其它的被 PSA 或任何其它的前列腺特异性蛋白酶激活的变体气单胞菌溶素原蛋白。这些蛋白可以通过用一个前列腺特异性蛋白酶切割位点，例如 PSA 特异性切割序列取代气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶序列而产生(见实施例 9)。

表 1: PSA 特异性气单胞菌溶素原变体

突变体 (SEQ ID NO)	所做的变化 (SEQ ID NO)	与野生型气单胞菌溶素原的比较 ADSKVRRARSVDGAGQGLRLEIPLD (SEQ ID NO:2 的 424-448 位氨基酸)
PSA-PA1 (3 和 4)	(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)KVRRAR 变为 HSKLQ(5)	ADSHSSKLQSV DGAGQGLRLEIPLD (SEQ ID NO:4 的 424-448 位氨基酸)
PSA-1K (6 和 7)	(SEQ ID NO:2 的 427-434 位氨基酸)KVRRARSV 变为 HSKLQSA(8)	ADSHSSKLQSA DGAGQGRLEIPLD (SEQ ID NO:7 的 424-448 位氨基酸)
PSA-PA2 (9 和 10)	(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)KVRRAR 变为 QFYSSN(11)	ADSQFYSSNSVDGAGQGLRLEIPLD (SEQ ID NO:10 的 424-448 位氨基酸)
PSA-PA3 (12 和 13)	(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)KVRRAR 变为 GISSFQS(14)	ADSGISSFQSSVDGAGQGLRLEIPLD (SEQ ID NO:13 的 424-448 位氨基酸)

表 1 所示的变体或修饰的气单胞菌溶素原(PA)包含了一个气单胞菌溶素原序列(野生型 PA 显示于 SEQ ID NO:1 和 2 中)，其中的 6 个氨基酸的弗林蛋白酶识别位点(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)被一个 PSA 底物所取代。例如，命名为 PSA-PA1 的变体气单胞菌溶素原(PA)毒素(SEQ ID NO:3 和 4)，包含了一个 PA 序列，其中的弗林蛋白酶切割位点被 PSA 底物 HSKLQ 取代(SEQ ID NO:5)。

使用前述的方法(Vallette 等, Nucl. Acids Res. 17:723-33, 1988)通

过重组 PCR, 用 PSA-特异性切割位点(SEQ ID NO:5、8、11 或 14)代替气单胞菌溶素的弗林蛋白酶位点(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)。简而言之, 在总体积为 50 μ l pfu 反应缓冲液[20mM Tris-HCl(pH8.8), 10mM KCl, 10mM(NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 以及 0.1mg/ml BSA]中进行重组 PCR, 其中含有 0.2mM 脱氧核苷酸三磷酸(dNTPs)、0.5 μ M 正向和反向引物、0.1 μ g 模板 DNA 和 2.5 单位克隆的 pfu 聚合酶。

使用 Taq 聚合酶通过 PCR 筛选带有气单胞菌溶素原插入的转化细胞。在 PCR 反应缓冲液[50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 以及 10mM Tris-HCl(pH9.0)]中制备了含有 0.2mM dNTPs、0.5 μ M 正向和反向引物及 5 单位 Taq 聚合酶的混合物。10 μ l 这种混合物样品被等分到 0.2ml 的管中, 并使用无菌牙签加入转化的细胞。

最终的 PCR 产物用适当的限制性酶消化, 然后连接到克隆载体 pTZ18u(BioRad)中用于扩增。简而言之, 限制性消化在 Pharmacia 通用(One-Phor-All)缓冲液[10 mM Tris-乙酸(pH7.5), 10mM 乙酸镁, 以及 50mM 乙酸钾]中于 37 $^{\circ}$ C 进行 90 分钟, 每 μ g DNA 加入大约 1 单位的限制性酶。产生的插入片段和 pTZ18u 载体 DNA 以大约 5:1 的比例混合, 在 45 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟。然后样品用通用缓冲液稀释并加入 ATP, 对于粘性末端的连接加到终浓度为 1mM, 而对于平末端的连接加到终浓度为 0.5mM。然后, 在每个样品中加入 11 单位的 T4 DNA 连接酶, 并将样品轻轻混合。连接在 13 $^{\circ}$ C 进行 4 小时(对于粘性末端连接)或 16 小时(对于平末端连接)。

对 DNA 进行测序以确保正确的取代发生。然后从克隆载体分离插入的片段并亚克隆到宿主范围广泛的质粒 pMMB66HE 中(Furste 等, Gene 48:119-131, 1986)以便在大肠杆菌中表达。使用以前描述的 CaCl₂ 洗涤的方法(Cohen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-4, 1972)将大肠杆菌 DH5 α 细胞制作为感受态。指数相生长的细胞(OD₆₀₀=0.4-0.7)

通过收集，并用四分之一体积的冷的 100mM MgCl₂ 洗涤。再次离心收集细胞，重新悬浮在 2 倍体积的冷的 100mM CaCl₂ 中。然后将细胞冰浴大约 45 分钟。接着将细胞离心并重新悬浮在十分之一体积的 100mM CaCl₂ 中。继续冰浴 45 分钟，然后加入甘油到终浓度为 15%。使用前感受态细胞被储存在 -70°C。

根据 Inoue 等的方法(Gene 96:23-8, 1990)将重组质粒转化到大肠杆菌感受态细胞中。感受态细胞(200μl 的等分试样)与 0.5-10ng 的 DNA 一起在冰上保温 1 小时。然后将细胞在 42°C 热冲击 4 分钟。将细胞快速移回到冰上 5 分钟。随后在每个样品中加入 500μl LB 培养基，并将细胞在 37°C 孵育 1 小时，轻轻搅动。将等分试样(150μl)铺在含有 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上。平板在 37°C 保温。

使用 Harayama 等的滤膜杂交技术(Mol. Gen. Genet. 180:47-56, 1980)通过接合将重组的 pMMB66HE 克隆转移到杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) CB3 株中(参见 Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68:221-4, 1990)。使用这种蛋白酶缺陷的杀鲑气单胞菌(*A. Salmonicida*) 菌株导致产生没有被激活的气单胞菌溶素污染的气单胞菌溶素原变体，并导致产生大量的蛋白。最终的气单胞菌溶素原蛋白采用以前描述的羟基磷灰石层析和离子交换层析来纯化(Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68:221-4, 1990)。该方法使得气单胞菌溶素原的制备从一批到另一批是一致的。

实施例 2

PSA-PA1 在体外特异性裂解 PSA 产生细胞

本实施例描述了用于确定实施例 1 中描述的气单胞菌溶素原变异体的特异性方法。这样的方法可用于测试任何包含 PSA 特异性切割位点的气单胞菌溶素原变异体的特异性。

针对 PSA 产生的 LNCaP 细胞(美国典型培养物保藏中心(ATCC),

Manassas, VA)和非 PSA 产生的 TSU 细胞(Dr. T. Itzumi, Teikyo University, Japan)测试了 PSA-PA1 毒素。细胞在存在 10^{-12} 到 10^{-6} M 毒素的情况下保温 24 小时。然后,基于细胞排除台盼蓝(Trypan Blue)的能力对细胞进行计数并记录细胞存活百分数。测定了毒素针对 LNCaP 和 TSU 细胞系杀死 50%细胞所需的浓度(IC_{50})。

PSA-PA1 对 PSA 产生细胞的 LD_{50} 是 10^{-10} M。相反,对非 PSA 产生细胞 TSU 的 LD_{50} 是大约 5×10^{-8} M。这个结果表明 PSA-PA1 毒素被 PSA 特异性激活,其证据为它对 PSA 产生和非 PSA 产生的人类癌细胞系的毒性有 500 倍的差别。

实施例 3

在含有 PSA 的血液中 PSA-PA1 不被激活

公开的前列腺特异性蛋白酶激活的变体气单胞菌溶素原肽,例如实施例 1 中描述的那些,当局部治疗前列腺癌时可以前列腺内(或肿瘤内)注射。当全身性治疗转移性前列腺癌时毒素也可以静脉内(或肌内)注射。这些含有 PSA 位点的变体 PA 分子在血液中应不被激活,这是因为存在大大过量摩尔的血清蛋白酶抑制剂如 α_1 -抗胰凝乳蛋白酶和 α_2 -巨球蛋白,从而使得 PSA 在血液中失去酶活性。

为了测试 PSA-PA1 被其它的血清蛋白酶和人血清中的 PSA 的非特异性激活作用,进行了如下灵敏的溶血分析。在含有 PSA-PA1 毒素 ± PSA 的血浆或缓冲液中加入红细胞(RBC, 2% v/v)。通过测量释放到上清液中的血红蛋白来分析溶血的程度。加入 0.1% Triton 导致在几秒钟内 100%的溶血,从而被用做阳性对照。水解的量以样品在 540nm 处的吸收值与 Triton 处理的样品的吸收值的比率来表示。在加入 RBC 之前将 PSA-PA1 毒素(10^{-8} M)与 PSA 在缓冲水溶液中预先单独保温 1 小时导致大约 45%的溶血(图 2)。

为了测定 PSA-PA1 在人血浆中是否被激活,将 PSA-PA1 毒素

(10^{-8} M)在 50%的人血浆中保温 1 小时。在相关的实验中, 首先在人血浆中加入过量的 PSA(10000ng/ml)并保温几个小时。然后将含有血浆±PSA 的 PSA-PA1 与人 RBC(2% v/v)保温。在人血浆或用高浓度的 PSA 增效的人血浆中加入 PSA-PA1, 没有产生明显的溶血(即小于 Triton 对照的 1%)(图 2)。这些结果表明, 即使在血液中含有可测量到的 PSA, PSA-PA1 也可以被全身性用药而不会在血液中有明显的激活。

实施例 4

气单胞菌溶素原变体在体外和体内的毒性

本实施例描述了用于测定公开的修饰的气单胞菌溶素原蛋白在体外和体内的毒性的方法。该方法可用于测量任何可被前列腺特异性蛋白酶切割的气单胞菌溶素原变异体蛋白的毒性。

为了测定体外的毒性, 如下进行了细胞存活分析。E14 小鼠 T-细胞淋巴瘤细胞(ATCC TIB-39)被培养在 MTS/PMS 96 孔细胞滴度板(Promega)中, 每个孔 10^5 个细胞。如图 3 所示加入 1×10^{-13} M 到 1×10^{-7} M 的气单胞菌溶素原变异体, 与细胞在 37°C 温育 4 小时。然后根据 MTS/PMS 试剂盒生产商的指示, 通过在读板器上读板来确定细胞的存活率。如图 3 所示, 气单胞菌溶素原变异体的毒性低于野生型的气单胞菌溶素原, LC_{50} 为 4×10^{-9} (PSA-PA1)、 1×10^{-9} (PSA-1K)和 1×10^{-7} (PSA-PA2), 野生型的 LC_{50} 为 1.5×10^{-10} 。

为了测定体内的毒性, 将气单胞菌溶素原变异体通过静脉内给药到小鼠。野生型的气单胞菌溶素原(SEQ ID NO:2)对小鼠有高度毒性; $1 \mu\text{g}$ 的剂量导致在 1 小时内死亡, 单次静脉内注射后 24 小时的 LD_{100} (即在 24 小时内杀死 100%动物的剂量)为 $0.1 \mu\text{g}$ 。相反, PSA-PA1(SEQ ID NO:4)在注射后 24 小时的 LD_{100} 高 25 倍(即 $2.5 \mu\text{g}$ 的总剂量)。

实施例 5

PSA-PA1 减小了 PSA 分泌肿瘤细胞的体积

在实施例 4 中描述的毒性数据的基础上, 一组带有 LNCaP 的小鼠(能够产生 PSA 的人 LNCaP 前列腺癌异种移植)和一组带有 SN12C 的小鼠(不能产生 PSA 的带有人肾癌异种移植的对照小鼠)被单次通过肿瘤内注射 100 μ l 给药 0.25 到 25 μ g PSA-PA1(0.1 到 10 倍的 LD₁₀₀ 剂量)。在注射后 48 小时, 收获肿瘤, 用 H&E 固定并染色, 用于 Ki-67(增殖指数)和 Tunel(凋亡指数)的测定。样品内肿瘤的百分数通过对肿瘤薄片进行图象分析后计算存活的肿瘤与全部肿瘤面积的比率来确定。

如图 4 所示, 给药 2.5 到 25 μ g 的 PSA-PA1 减小了肿瘤体积 85-99%, 而给药 0.25 μ g 的 PSA-PA1 时观察到的减小少于 20%。相反, 当带有不能产生 PSA 的人肾癌异种移植的 SN12C 小鼠(细胞由 Isaiah 博士提供, Fidler Anderson 癌症中心, Houston TX)被肿瘤内注射 PSA-PA1 时, 在同样的剂量范围内没有观察到存活肿瘤的百分数明显下降(即小于 25%)(图 4)。

在对照肿瘤(SN12C 小鼠)中, 在肿瘤内给药 PSA-PA1 后 48 小时增殖指数是大约 40%。相反, 在相应的 PSA-PA1 处理的肿瘤中, Ki-67 阳性细胞的百分数在 48 小时时小于 1%。此外, 在对照肿瘤中凋亡指数在肿瘤内给药 PSA-PA1 后 48 小时时小于 1%, 而在 PSA-PA1 处理的肿瘤中到 48 小时时所有的细胞都是阳性的(即凋亡指数大于 99%)。

这些结果表明 PSA-PA1 毒素能够有效、快速地杀死 PSA 产生细胞, 这种体内的细胞毒性是特异性, 依赖于肿瘤细胞外体液中所含的 PSA 的存在。

实施例 6

通过前列腺特异性结合结构域定向毒素前体

本实施例描述了产生和使用变体前列腺特异性蛋白酶激活的气单胞菌溶素原毒素的方法, 该毒素中野生型(或天然的)PA 结合结构域(大

约位于 SEQ ID NO:2 的 1-83 位氨基酸)被前列腺组织特异型结合结构域, 例如 LHRH 肽功能性取代。PA 的天然结合结构域可以通过本领域任何已知的方法进行功能性缺失, 例如通过缺失 SEQ ID NO:2 中的大约 1-83 位的氨基酸(或其片段, 如 45-66 位的氨基酸), 或通过插入能够降低 PA 在细胞膜上聚集的能力的突变。

PA 的 GPI 锚定蛋白结合结构域的 N-端(大约位于 SEQ ID NO:2 的 1-83 位氨基酸)可以被功能性缺失(例如通过缺失 1-83 位的氨基酸或通过插入突变以使该结构域失去功能), 而对孔的形成没有显著的影响。但是, 结合结构域是毒素在细胞膜上聚集所必需的。只有当细胞暴露在高几个数量级浓度的毒素下, 缺少结合结构域的突变蛋白才是细胞裂解的。在实施例 4 中描述的野生型和变体 PSA 激活的 PA 的大多数体内毒性是由于它非特异性地结合到能被大多数哺乳动物细胞表达的 GPI 锚定蛋白上。为了产生更特异的更少全身毒性的毒素前体, 可以将气单胞菌溶素原的非特异性 GPI 锚定蛋白结合结构域功能性缺失, 并用一个前列腺组织特异性结合结构域代替。

抗体

能够用于高度特异性地将修饰的气单胞菌溶素原蛋白定位到前列腺组织的结合部分的一个例子是一种含有针对前列腺特异性膜蛋白的单链抗体的融合蛋白, 以及能够识别与毒素结构域融合的 PSMA 或 LHRH 的抗体。在理想情况下, 将抗体添加到修饰的 PA 分子上将不会显著地干扰分子在细胞膜上结合和聚集从而导致细胞死亡的能力。使用本领域熟知的基因融合方法可以将抗体结合到修饰的 PA 的 N-端或 C-端(例如参见 Debinski 和 Pastan, *Clin. Cancer Res.* 1:1015-22, 1995)。例如, 抗体可以取代气单胞菌溶素原的天然的小裂片(SEQ ID NO:2 的 1-83 位氨基酸), 或者抗体可以添加到在天然结合结构域发生变体 PA 分子上。这样的修饰的气单胞菌溶素原也可以含有一个 PSA 激活序列以增加特异性。在一个实施例中, 抗体是针对与 PA 的毒素结构域融合的 PSMA 的单链抗体。

此外，抗体或 Fab 片段可以通过共价交联结合到修饰的 PA 上(例如参见 Woo 等, Arch. Pharm. Res. 22(5):459-63, 1999 和 Debinski 和 Pastan, Clin. Cancer Res. 1:1015-22, 1995)。交联可以是非特异性，例如通过使用同型双功能的赖氨酸反应交联试剂，也可以是特异性，例如通过使用能够与抗体的氨基基团和与气单胞菌溶素原变体上的半胱氨酸(例如 SEQ ID NO:2 中 19、75、159 和/或 164 位的半胱氨酸)反应的交联试剂。

配体

其它可以使用的结合部分是能够与它们在前列腺癌细胞膜上表达的同源受体结合的小肽配体。例子包括但不限于天然的和合成的促黄体激素释放激素(LHRH)激动剂肽(例如参见 Genbank 登记号 CAA25526 和 SEQ ID NO:22 和 23)，可以高度亲和性地与 LHRH 受体结合，以及能够选择性结合于 PMSA 的肽。LHRH 受体能够被高比例的人前列腺癌表达，但不能被造血细胞表达。这种不同的表达提供了结合的特异性。

已经知道 LHRH 的某些残基，例如第 6 位的甘氨酸(Gly6)可以被取代而不牺牲与受体结合的亲和性(Janaky 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:972-6, 1992; Nechushtan 等, J. Biol. Chem., 272:11597-603, 1997)。因此，可以生产与纯化的 LHRH D-Lys6(在赖氨酸的 ϵ -氨基位)共价结合的变体 PA 毒素(其中天然的结合结构域被功能性缺失)。

LHRH D-Lys6(SEQ ID NO:23)可以被添加到功能性缺失了结合结构域的修饰的气单胞菌溶素原蛋白的不同部分。然而在理想情况下，这样的添加将不会显著地干扰毒素插入细胞膜形成孔的能力。例如，D-Lys6 类似物的 ϵ -氨基可以通过一个二羧酸接头连接到修饰的气单胞菌溶素原的氨基末端。弗林蛋白酶或前列腺特异性蛋白酶的切割(依赖于在气单胞菌溶素原肽上存在的切割位点)将导致 C-端的抑制部分被

释放而毒素仍然与 LHRH 结合。

此外或可以选择的是，LHRH D-Lys6 类似物的 ϵ -氨基可以通过在修饰的 PA 的 C-端添加一个半胱氨酸，然后将该半胱氨酸与 LHRH D-Lys6 类似物的 ϵ -氨基交联，从而直接连接到缺少功能性的野生型结合结构域的修饰的气单胞菌溶素原的 C-端羧基上。这种结合将产生衍生的 PA 蛋白，其中 LHRH 肽被连接到 PA 的 C-端抑制结构域上。弗林蛋白酶或前列腺特异性蛋白酶例如 PSA 的切割将释放出毒素，留下抑制片段结合在 LHRH 受体上。因此，孔的形成不会由于紧密地与受体结合而受到抑制。此外，也可以产生重组的融合蛋白，其中修饰的 LHRH 肽与缺少功能性天然结合结构域的修饰的 PA 毒素的 N-和 C-端同时融合。

在另一个实施例中，一个半胱氨酸残基被引入 LHRH 肽的第 6 位，该肽通过一个二硫键与修饰的 PA 毒素结合，例如在 SEQ ID NO:2 的 215 和/或 300 位氨基酸，其中 215 和/或 300 位氨基酸已经被突变为半胱氨酸。在另一个实施例中，产生了一种重组蛋白，其中 LHRH 肽被融合到修饰的 PA 毒素的氨基末端。

使用实施例 1-5 中描述的方法，对获得的含有前列腺组织特异性结合结构域功能性取代了天然的 PA 结合结构域的修饰的气单胞菌溶素原蛋白进行体外和体内测试，测试其结合特异性和毒素的激活。

为了证实前列腺组织特异性结合结构域例如 LHRH 或 PSMA 可以功能性地取代天然的 PA 结合结构域，进行了下面的实验。下述的方法描述了一种其中天然的 PA 结合结构域已被缺失、LHRH 结合到得到的气单胞菌溶素原上的分子的使用。但是同样的方法也可以用来测试任何变体 PA 分子，例如其中使用了其它的前列腺组织特异性结合结构域、并且 PA 结合结构域被突变(例如通过插入一个或多个下列的突变：W45A、I47E、M57A、Y61A、K66Q 和 W324A)而不是缺失

的分子。

产生了含有天然的 PA 弗林蛋白酶激活序列的 LHRH-气单胞菌溶素原。使用实施例 2 中描述的方法比较了这些毒素与 LHRH 受体阳性细胞(LNCaP)和阴性细胞(TSU)结合的特异性。两个细胞系都激活野生型的含有弗林蛋白酶激活位点的 PA。因此，当每个细胞系都可以激活 LHRH-气单胞菌溶素原蛋白时，理想的肽是在低浓度下对 LHRH 受体阳性细胞有毒性的肽。使用这些方法，鉴定出了气单胞菌溶素原上可以结合 LHRH 而不干扰毒素引起的通道形成的区域。

为了证实 LHRH-气单胞菌溶素原蛋白都结合到 LHRH 受体上并且能够被 PSA 激活，使用实施例 1 中描述的方法产生了含有 PSA 激活位点而非弗林蛋白酶位点的毒素。使用实施例 2 中描述的方法，比较了这些毒素被 LHRH 阳性的产生 PSA 的 LNCaP 细胞与被 LHRH 受体阴性的不产生 PSA 的 TSU 细胞的激活。

LHRH-PSA 激活的气单胞菌溶素原毒素在体内进行测试以证实导入的 LHRH 结合部分导致了非特异性毒性的降低和定向能力的增加。如上所述，使用实施例 4 中描述的方法确定了这些毒素在单次静脉内注射后的 LD₁₀₀，并与相应的不含 LHRH 的 PSA 激活的毒素进行了比较。然后，将毒素以不同的剂量，例如 0.1 μ g 到 1mg，通过静脉内给药到带有 LNCaP 的动物，以证实在较高、较低的毒素剂量下观察到的增强的抗肿瘤效应。

实施例 7

确定气单胞菌溶素原的抗原性

本实施例提供了确定此处公开的修饰的气单胞菌溶素原肽是否具有抗原性的方法。此外还公开了降低潜在的抗原性的方法。

如前面的实施例所述，肿瘤内注射 PSA-PA1(SEQ ID NO:4)证实

了毒素通过前列腺内注射在治疗局部前列腺癌中的用处。但是，这种治疗也可以通过其它途径给药，例如静脉内(iv)、肌内、口服等以全身性治疗转移性前列腺癌。但是，此处公开的全身性给药变体 PA 肽有可能会产生中和抗体反应的发展，从而限制重复地用药。

对任何此处公开的 PA 变异体的抗体反应的动力学和强度可以如下述确定。例如，针对 PSA-PA1(SEQ ID NO:4)的抗原性反应可以在具有免疫能力的小鼠中确定，以发展一种可用于具有免疫能力的人中的剂量方案。具有免疫能力的小鼠(C57-BL6)静脉内给药 PSA-PA1(SEQ ID NO:5)，每天 5 次每周三次，剂量范围从 0.1 μ g 到 5 μ g。在不同的时期(例如在给药一剂之后，给药多剂之后)的小鼠被处死并取得血清。可以使用基于 ELISA 的分析方法来检测抗气单胞菌溶素原抗体的存在。在该分析中，确定量的气单胞菌溶素原被固定在 96 孔板的聚苯乙烯表面上。在用牛血清白蛋白(BSA)进行足够的封闭之后，以不同的稀释度在孔中加入来自暴露于气单胞菌溶素原的小鼠血清。在保温确定的时间后，洗涤孔，加入碱性磷酸酶偶联的山羊抗小鼠第二抗体，然后加入底物。存在的抗体的量通过在分光光度计上测量吸光度而确定，这使抗体对变化的静脉内给药 PSA-PA1 的日程和剂量的反应的时间过程和强度得以确定。

为了减少气单胞菌溶素原的抗原性，天然的结合结构域可以被功能性缺失并用例如 LHRH 取代，如实施例 6 所示。在以不同的给药计划暴露到缺失了天然的结合结构域部分的 LHRH-气单胞菌溶素原蛋白后，这些肽的抗原性可以使用上述的方法测定。可以使用的另一种允许用前列腺特异性蛋白酶激活的毒素进行连续治疗的方法是使用具有非重叠抗原性的其它裂解毒素(见实施例 10)。一个例子是使用一种修饰的结构相关的细菌毒素例如脓毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium septicum*)的 α -毒素，它也可以被前列腺特异性蛋白酶例如 PSA 激活，但是不被识别 PA 的抗体识别或中和(见实施例 10)。另一个例子是使用一种由人组织产生的孔形成毒素，例如由细胞裂解性人 T 细胞产生的人穿孔

素。其中野生型激活序列被作为前列腺特异性蛋白酶的底物的肽例如 PSA 取代的修饰的穿孔素可以被给药而不会产生抗体反应，因为这些蛋白是人源的。

此外，提供了确定产生的抗体是否能够中和气单胞菌溶素的细胞裂解性质的方法。公开的修饰的 PA(例如 SEQ ID NO:4、24 和 25)与 PSA 保温以激活毒素。被激活的毒素与不同剂量的含有抗体的血清保温。加入洗涤过的 RBC，按照上面实施例 2 的描述确定与对照(没有暴露到毒素的血清)相比的溶血程度。

此外，带有产生 PSA 的肿瘤的动物可以用 PSA 激活的气单胞菌溶素原毒素接种两次，然后用致死剂量的毒素(见实施例 4)再次攻击，以确定抗体是否在体内中和毒性。随后，在对接种免疫的动物肿瘤内注射后评估抗肿瘤反应，以确定当肿瘤内注射时抗体是否中和毒素。

实施例 8

诱导全身性免疫刺激反应

本实施例提供了方法可用于证明气单胞菌溶素原介导的细胞裂解产生全身性免疫刺激效应。这种由前列腺内给药此处公开的毒素所引起的全身性免疫刺激效应会提供对于前列腺内的前列腺癌的局部治疗，同时也诱导了针对潜伏的微型转移性病征的全身性抗肿瘤效应。或者或此外，受试者还可以在存在或不存在细胞因子如 GM-CSF 的情况下用修饰的气单胞菌溶素原裂解的前列腺癌细胞进行接种免疫，以治疗复发或原发性转移性病征。

用修饰的气单胞菌溶素原裂解的前列腺肿瘤细胞的给药

为了证实用修饰的气单胞菌溶素原处理的细胞可以在受试者中刺激全身性免疫反应，使用了下述的方法。简而言之，受试者(例如患有前列腺癌的具有免疫活性的小鼠或人类受试者)被给药用一种或多种此处公开的修饰的气单胞菌溶素原分子裂解的前列腺肿瘤细胞(例如 TC2

小鼠前列腺癌细胞、从患有前列腺癌的受试者获得的前列腺癌细胞、和/或用于给药到病人的人前列腺癌细胞系)。为了确定是否发生了全身性免疫反应,已经给药裂解的前列腺癌细胞的小鼠可以用同样的细胞进行重新攻击,并测量这些接种的肿瘤细胞的生长。例如,C57-BL6小鼠用气单胞菌溶素原裂解的TC2细胞皮下注射。为了完成这一步,通过无菌的磷酸盐缓冲液(PBS)中与气单胞菌溶素原在37°C保温1小时,10⁷个TC2细胞被裂解。给药动物每周两次注射这种细胞裂解物以刺激针对TC2细胞的免疫反应。然后在第二次裂解物接种后一星期,用皮下注射TC2癌细胞再次攻击动物。TC2是一个从TRAMP小鼠(Foster等, *Cancer Res.* 57:3325-30, 1997)分离的癌组织衍生的小鼠前列腺癌细胞系。对照受试者被注射同样数量的通过冻溶裂解或用辐射处理诱导了凋亡的细胞。另一个对照组只注射修饰的气单胞菌溶素原肽。使用实施例5中描述的方法比较了组间的肿瘤生长。

对于人类受试者,可以使用在前列腺切除术或活组织检查时从病人获得的前列腺癌细胞或人前列腺癌细胞系。人前列腺癌细胞系的例子包括产生PSA的LNCaP(例如ATCC Nos. CRL-1740和CRL-10995)或CWR22R(ATCC No. CRL-2505和Nagabhushan等, *Cancer Res.* 56(13):3042-6, 1996)细胞、或不产生PSA的PC-3(ATCC No. CRL-1435)和DU145(ATCC No. HTB-81)。来自各种来源的(病人或细胞系)大约10⁷-10⁸个的细胞在灭菌的PBS中与1μg PA(野生型或变异体)在37°C保温1小时。通过剧烈吹打将得到的裂解物完全混合,然后通过皮下注射大约0.5ml将悬浮液给药受试者。病人可以每星期治疗3剂。对病人进行严密的监控并每星期进行身体检查。针对PSA、PSMA和hK2的抗体的存在进行分析,并使用以前描述的方法(Simons等, *Cancer Res.* 59:5160-8, 1999)分析B和T细胞反应,可以监测针对皮下注射PA的免疫反应。

或者或此外,来自病人的前列腺癌细胞或被改造能够表达免疫刺激蛋白(例如GM-CSF)的前列腺癌细胞系与PA(野生型或变异体)保

温，并用于产生裂解物(例如参见 Simons 等, *Cancer Res.* 59:5160-8, 1999)。PA 裂解的前列腺癌细胞可以与产生免疫刺激分子的被辐射的前列腺癌细胞共同给药。辐射诱导细胞经历凋亡。将细胞裂解杀死的细胞和诱导凋亡杀死的细胞结合起来预料产生优良的免疫刺激效应(Sauter 等, *J. Exp. Med.* 191:423-33, 2000)。在一个例子中, 对受试者同时给药与免疫刺激蛋白混合的 PA 裂解的前列腺癌细胞。在另一个例子中, PA 裂解的前列腺癌细胞通过皮下给药, 免疫刺激蛋白, 例如 GM-CSF, 白细胞介素, 干扰素, G-CSF(Dranoff 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3539-43, 1993)则全身性给药。

修饰的气单胞菌溶素原的前列腺内给药

另一种可用于在患有前列腺癌的受试者体内刺激全身性免疫反应的方法是直接将此处公开的修饰的气单胞菌溶素原毒素给药到受试者的前列腺中。例如, 修饰的气单胞菌溶素原毒素可以直接给药到患有前列腺肿瘤的人类受试者的前列腺中(或其肿瘤中), 或者给药到通过将红细胞凝集素(HA)引发的 T 细胞过继转移后得到的转基因 ProHA 小鼠中。预计在前列腺内注射修饰的气单胞菌溶素原毒素后导致的细胞裂解, 将在 ProHA 小鼠的前列腺中激发针对 HA 或针对人的前列腺肿瘤抗原的免疫反应。ProHA 转基因小鼠在前列腺限制性启动子 probasin 的控制下表达流感的蛋白 HA。ProHA 小鼠只在前列腺中表达 HA。在这个系统中, 来自单独供体小鼠的特异性 CD4 和 CD8 T 细胞与 HA 接触而引发, 然后过继转移到 HA 转基因动物中。

受试者被给药亚致死前列腺内剂量的修饰的气单胞菌溶素原(例如使用实施例 4 中描述的方法确定)。由于 ProHA 小鼠不产生 PSA 或酶学上等价的类似物, 使用了野生型的气单胞菌溶素。然而在人中给药一种或多种公开的修饰的气单胞菌溶素原毒素。在前列腺内注射 24 小时后, 处死一些小鼠, 取出前列腺并分析坏死的程度。第二组注射的小鼠接受的是 HA 特异性 CD4 和 CD8 T 细胞, 它们收集自以前描述的用 10^9 个空斑形成单位的表达重组红细胞凝集素的痘苗病毒接种

免疫的 TCR 转基因供体(Staveley-O'Carroll 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1178-83, 1998)。这些 T 细胞是 Thy 1.1+, 被转移到 Thy 1.2+ 的 ProHA 小鼠中。在过继转移到气单胞菌溶素原处理的 ProHA 小鼠后 4 天, 受体小鼠被处死, 脾脏、腋下(无关的)和前列腺导管节被切下、分离并洗涤。

为了评估特异性 T 细胞的活化进行了下列分析: 使用藻红素标记的抗 Thy1.1 抗体和细胞色素标记的抗 CD4 或 CD8 抗体(Pharmingen, San Diego, CA)将一百万个分离的细胞染色。使用 FacsScan(Becton Dickinson)对分离的细胞进行分析。HA 特异性 T 细胞增长的指数通过用在 ProHA 处理的动物中的纯系型(Thy1.1+)细胞的百分数除以在未处理的 ProHA 对照的同样组织位点中的纯系型细胞的百分数来计算。此外, 在前列腺导管中与无关的淋巴结中的纯系型细胞的百分数的比率, 提供了 PA 治疗后的前列腺特异性增殖的指数。在另一个分析中, 按照以前描述的方法(Adler 等, J. Exp. Med. 187:1555-64, 1998)测量了抗原特异性增殖。简而言之, 收集的淋巴细胞或脾细胞与 II 类 HA 肽(CD4 细胞特异性增殖)或 I 类 HA 肽(CD8 细胞特异性增殖)一起保温。细胞培养 3 天, 然后用氘化的胸腺嘧啶脉冲过夜, 然后收获并确定读数。相对于对照的总读数增加意味着特异性 T 细胞的活化。

来自接受了 HA 特异性 Thy1.1 T 细胞的 PA 处理的 ProHA 小鼠的前列腺被分析如下。使用标准的免疫组化程序将来自处理的小鼠的固定化前列腺切片用生物素化的 Thy1.1 抗体(Pharmingen)染色, 并用链霉亲和素过氧化物酶进行负染色。为了确定刺激的程度, 阳性染色的程度与盐水处理的对照进行了比较。

为了评估前列腺内注射气单胞菌溶素原是否可以影响随后的肿瘤发育、生长或扩散形式, 可以使用下述的方法。在动物生命周期的不同时间点(性成熟前、性成熟后患有转移性肿瘤前、患有转移性肿瘤时)在 TRAMP 小鼠的前列腺中注射气单胞菌溶素原(或此处公开的修饰的

气单胞菌溶素原肽)。在无菌条件下对麻醉的动物进行前列腺内注射。在前列腺内接种后的不同时间点,动物被处死并进行尸体剖检以评估肿瘤的程度。前列腺被取出并进行免疫组化分析以评估前体病灶和明显的前列腺癌的存在。同样地,性成熟前的 TRAMP 小鼠可以皮下给药两次用气单胞菌溶素原裂解的 TC2 细胞,或用气单胞菌溶素原裂解的从患有晚期癌症的 TRAMP 小鼠中取出的原发肿瘤。这些动物被追踪,并在确定的时间点处死,以评估与对照相比肿瘤发育的时间过程和程度。

同样的方法可以用于将修饰的 PA 给药到患有局部性前列腺癌的病人。这样的前列腺内给药修饰的 PA 疗法可以单独、也可以与放射(外粒子束或短程放射治疗)和/或雄激素消融疗法结合使用,作为局部性前列腺癌的起始治疗。前列腺内给药修饰的 PA 疗法也可以用于给药到用放射疗法治疗失败并且被怀疑为只是在前列腺内患有局部前列腺癌复发的病人。前列腺内给药修饰的 PA 疗法也可以使用在患有局部性或转移性前列腺癌的病人身上,以直接治疗局部性癌症,并通过刺激全身性抗肿瘤免疫反应来治疗转移性癌症。

为了进行前列腺内给药修饰的 PA 疗法,按照与施用前列腺内短程放射治疗相同的既定样板将修饰的 PA 注射到病人的前列腺中。进行前列腺内给药所需的技术和设备也与用于短程放射治疗的相同,已经在以前描述过了(Deweese 等, *Cancer Res.* 61:7464-72, 2001)。为了确定前列腺内给药的合适剂量,进行了发现剂量的临床试验。病人在涵盖了整个前列腺的预定位点接受多次的注射(20-80 次)。修饰的 PA 的总的给药剂量在大约 0.1-1.0mg 的范围,总共不超过 10mg。每次注射的剂量用总剂量除以总的注射次数确定。病人被当作住院病人对待,在注射后在医院中监测 48 小时。其后病人每星期检查毒性的病征。前列腺的核磁共振成像(MBI)可用于在前列腺的尺度上直接监测治疗的效果。对前列腺内给药 PA 的免疫反应将如以前描述的那样进行检测(Simons 等, *Cancer Res.* 59:5160-8, 1999)。

实施例 9

添加的 PSA 切割位点

添加的 PSA 切割位点是已知的，基于人类精液蛋白 semenogelin I 和 II 的 PSA 切割图谱和基于纤维素膜的分析(参见表 2 和 Denmeade 等, Cancer Res. 57:4924-30, 1997)。使用实施例 1 中描述的方法，可以用表 2 中显示的 PSA 切割位点代替气单胞菌溶素原中野生型弗林蛋白酶激活位点(SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸)。简单地说，可以使用重组 PCR 将 PA 的弗林蛋白酶位点用 PSA 特异性切割位点代替，例如表 1 和表 2 中显示的那些。变体 PA 序列被亚克隆到 pMMB66HE 中以便在大肠杆菌中表达。重组的克隆被转移到蛋白酶缺陷的菌株杀鲑气单胞菌(*A. Salmonicida*)中，产生的变体气单胞菌溶素原蛋白用羟基磷灰石层析和离子交换层析纯化。

表 2、PSA 水解的动力学*

PSA 底物 (SEQ ID NO)	$K_m(\mu\text{M})$	$K_{cat}(\text{s}^{-1})$	$K_{cat}/K_m(\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$
KGISSQY(15)	160	0.043	270
SRKSQQY(16)	90	0.023	260
ATKSKQH(17)	1310	0.0091	6.9
KGLSSQC(18)	300	0.0017	5.6
LGGSSQL(19)	900	0.0037	4.1
EHSSKLQ(20)	1165	0.012	10.6
HSSKLQ(5)	470	0.011	23.6
SKLQ(21)	813	0.020	24.6

*肽被荧光标记(氨基甲基香豆素)。分析在 50mM Tris, 0.1M NaCl, pH7.8 中进行。

表 2 中显示的序列中包含了能够被 PSA 有效但不是特异性水解的底物(KGISSQY, SEQ ID NO:15 和 SRKSQQY, SEQ ID NO:16)，以及不能被 PSA 有效但是特异性水解的底物(ATKSKQH, SEQ ID NO:17 和 LGGSSQL, SEQ ID NO:19)。这些修饰的毒素的性质可以与含有 HSSKLQ(SEQ ID NO:5)序列的 PSA-PA1 相比。作为对照，产生了一

个其中激活位点被完全缺失的修饰的毒素(EX-PA)

使用实施例 3 中描述的溶血分析方法筛选了这些纯化的毒素的 PSA 水解能力。野生型气单胞菌溶素原不被激活并引起红细胞裂解。但是气单胞菌溶素原被蛋白酶激活后会引发快速的溶血。简单来说, 为了分析 PSA 的激活, 不同浓度的纯化的变异 PA 毒素与 PSA 保温 1 小时, 清洗, 加入无血清的红细胞(RBC)(2% v/v)。在另外 1 小时后, 将保温的混合物离心, 测定上清液在 540nm 处的吸收值。确定裂解 50% RBC 所需的最小浓度的修饰毒素, 以便在 PSA 水解效率的基础上对毒素进行排序。

为了确定 PSA 的激活作用和激活的特异性, 使用实施例 2 中描述的方法, 通过在体外将纯化的 PSA-气单胞菌溶素原毒素暴露到产生 PSA(LNCAp)和不产生 PSA 的癌细胞系(TSU)进行细胞毒性分析。对于每种变异 PA 毒素针对 LNCAp 和 TSU 细胞系测定杀死 50%细胞所需的浓度(IC₅₀)。细胞毒性相差的倍数被用来在特异性基础上对 PSA 激活的毒素进行排序。

还可以使用实施例 5 中描述的方法, 通过将变异 PA 毒素肿瘤内注射到裸鼠内产生 PSA 的 LNCAp 的异种移植物, 在体内筛选变异 PA 毒素的抗肿瘤活性。如同前面的实施例 5 中所描述的, 肿瘤内注射 PSA-PA1 毒素在 48 小时内减小了肿瘤。相反, 野生型气单胞菌溶素原, 它在体外能够更有效地被产生 PSA 和不产生 PSA 的细胞系激活, 对 LNCAp 的异种移植物却效果最小。这表明毒素激活的动力学可能对于全面的抗肿瘤效应是重要的。PSA-PA1 被 PSA 的激活更为特异, 但是激活的动力学比野生型毒素慢。这使得 PSA-PA1 可以在肿瘤内分布得更广泛。因此, 在激活位点中更好的 PSA 底物, 却反而可能导致在体内全面的抗肿瘤效应降低。

为了评估 PSA 激活的气单胞菌溶素原对野生型 PA 在肿瘤内或正

常组织中的分布，可以使用荧光标记(例如 FITC)的 PSA-PA1 和 PA 蛋白。用荧光标记的 PSA-PA1 和 PA 注射产生 PSA 的 LNCaP 异种移植物。在肿瘤内注射后 24 小时，收获肿瘤，固定并切片用于显微镜分析。插入细胞膜的荧光标记的气单胞菌溶素原蛋白在固定过程中保留下来。然后使用带有适当的滤光片的荧光显微镜分析切片，滤光片被设置为确定气单胞菌溶素原毒素在肿瘤样本中的分布程度。

然后，将变体 PA 毒素注射到 LNCaP 异种移植物中，在 48 小时后使用实施例 5 中描述的方法通过肿瘤测量评估抗肿瘤反应。变体 PA 毒素根据肿瘤内注射后体内的抗肿瘤效应进行排序。

此外，也可以使用实施例 4 中描述的方法，通过测定在单次静脉内注射后能够杀死 100%小鼠的剂量(即 LD_{100})来测试变体 PA 毒素的整体的全身性毒性。

使用这些方法，可以鉴定出那些能够最有效和最特异地被 PSA 激活、并且在体内其毒性至少全身性的并产生最显著的抗肿瘤效应的 PSA 激活的变体 PA 毒素。这样的 PSA 激活的变体 PA 毒素也可以使用实施例 6 中描述的方法进行修饰。

实施例 10

减少 PSA 激活的修饰的气单胞菌溶素原毒素的抗原性

本实施例描述了可用于生产和表征其它修饰的形成孔的蛋白酶激活的毒素前体的抗原性和抗肿瘤效应的其它方法。

一种克服公开的变体 PA 毒素的潜在抗原性的方法是连续地给药那些同样地被 PSA 激活但不被气单胞菌溶素原抗体识别的结构相关的毒素前体。这些毒素前体的例子包括但不限于脓毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium septicum*)的 α -毒素(Ballard 等, *Infect. Immun.* 63:340-4, 1995; Gordon 等, *J. Biol. Chem.* 274:27274-80, 1999; Genbank 登记号

S75954)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 δ -毒素(Genbank 登记号 D00117)以及人类的穿孔素(Genbank 登记号 NM005041)。这些毒素前体在机理上与气单胞菌溶素相似,但具有不同的肽序列,因此特异性针对气单胞菌溶素原的抗体不能识别它们。这些毒素前体已经被克隆并以重组的形式被生产(Imagawa 等, *FEMS. Microbiol. Lett.* 17:287-92, 1994; Meza 等, *FEMS Microbiol. Lett.* 145:333-9, 1996)。

这些毒素前体象气单胞菌溶素原一样,含有一个 C-端的抑制肽,为了激活必需通过蛋白水解作用除去它。每个这些蛋白毒素中的激活位点已经被确定。对于脓毒梭状芽孢杆菌的 α -毒素,激活位点是弗林蛋白酶切割位点(Gordon 等, *Infect. Immun.* 65:4130-4, 1997)。苏云金芽孢杆菌的 δ -毒素的激活位点可以被某些昆虫中肠中的蛋白酶切割(Miranda 等, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:1155-63, 2001)。对于人类的穿孔素,激活序列已经确定,但是激活的蛋白酶还没有被鉴定(Uellner 等, *EMBO J.* 16:7287-96, 1997)。

每种这些毒素前体的激活位点,都可以使用实施例 1 中描述的方法被修饰为含有前列腺特异性蛋白酶切割位点(例如表 1-2 中显示的 PSA 切割位点)。如果需要,天然的毒素前体结合结构域可以使用实施例 6 中描述的方法被功能性缺失,并用前列腺组织特异性结合结构域代替。此外,激活位点可以不被修饰,但结合结构域使用实施例 6 中描述的方法被功能性缺失,并用前列腺组织特异性结合结构域代替。这些修饰的毒素前体例如可以使用 RBC 溶血分析(实施例 3)来分析蛋白酶激活,分析体外的针对产生 PSA 和不产生 PSA 的细胞系的活性(实施例 2),以及在人血清中的稳定性(实施例 3)。如果这些毒素能够被 PSA 特异性地有效激活,那么就使用实施例 5 中描述的方法在体内测试它们针对产生 PSA 的异种移植物的活性。此外,使用实施例 7 中描述的方法确定抗体产生的动力学和程度。用每种毒素处理的动物的血清被筛选它们与毒素家族的每个其它成员之间的交叉反应性,以确定交叉识别的程度。

另一种减少全身性免疫反应的方法是施用免疫抑制疗法。免疫抑制疗法的例子包括但不限于全身或局部的皮质类固醇(Suga 等, *Ann. Thorac. Surg.* 73:1092-97, 2002)、环孢菌素 A(Fang 等, *Hum. Gene Ther.* 6:1039-44, 1995)、环磷酰胺(Smith 等, *Gene Ther.* 3:496-502, 1996)、脱氧精胍菌素(Kaplan 等, *Hum. Gene Ther.* 8:1095-1104, 1997)和针对 T 和/或 B 细胞的抗体[例如抗-CD4 配体、抗 CD4 抗体、抗 CD20 抗体 (Rituximab)](Manning 等, *Hum. Gene Ther.* 9:477-85, 1998)。这些试剂可以在给药修饰的 PA 分子和/或与 PA(野生型或变异体)保温产生的细胞裂解物之前、期间或之后给药。

实施例 11

序列变异体的生产

此处公开的是通过给药含有前列腺特异性蛋白酶切割位点的修饰的气单胞菌溶素原肽治疗前列腺癌的试剂和方法。本领域的专业技术人员可以理解使用其它的气单胞菌溶素原、PSA、LHRH 和 PSMA 序列(例如多态性、片段或变体)可以用于实行本发明公开的方法, 只要这些序列的独特功能特点能够保留。例如, 气单胞菌溶素原变体, 如果它们保留了被前列腺特异性蛋白酶激活及在细胞膜上形成孔道导致细胞死亡的能力, 就可用于实践此处公开的方法。使用此处公开的分析方法, 例如实施例 2-5 中描述的方法, 可以容易地测定活性。在另一个实施方案中, 修饰的气单胞菌溶素原分子具有特异性裂解 PSA 产生细胞的特性(例如裂解 PSA 产生细胞的程度比不产生 PSA 的细胞高)。

本公开促进了 DNA 分子以及蛋白的使用, 它们衍生于天然蛋白, 但它们精确的核苷酸或氨基酸序列与天然的序列相比发生了改变。这样的变异体可以通过标准的分子生物学实验室技术获得, 序列信息在此公开。

衍生自天然 DNA 分子的 DNA 分子和核苷酸序列也可以被定义为在严紧条件下与公开的 DNA 序列或其片段杂交的 DNA 序列。导致特定程度的严紧性的杂交条件随着杂交方法的性质和用于杂交的 DNA 的组成和长度而变化。一般来说，杂交的温度和杂交缓冲液的离子强度(特别是 Na^+ 的浓度)决定了杂交的严紧性。关于为获得特定量的严紧性所需的杂交条件的计算被 Sambrook 等讨论(分子克隆：实验室手册，冷泉港出版社，纽约，1989 年，第 9 和 11 章)，在此引为参考。一般来说，与用 [^{32}P]-dCTP 标记的靶探针的杂交在高离子强度的溶液例如 6xSSC 中、在比溶解温度 T_m 低约 5-25 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行。严紧条件的一个例子是盐浓度为至少大约 0.01 到 1.0M Na 离子浓度(或其它盐)、在 pH7.0 到 8.3，对于短的探针(例如 10 到 50 个核苷酸)温度为至少大约 30 $^{\circ}\text{C}$ 。通过加入去稳定试剂例如甲酰胺也可以获得严紧的条件。例如，5xSSPE(750mM NaCl, 50mM 磷酸钠, 5mM EDTA, pH7.4)和 25-30 $^{\circ}\text{C}$ 的条件适合于等位基因特异性探针杂交。

遗传密码的简并性进一步扩大了本公开的范围，因为它使得在 DNA 分子的核苷酸序列发生较多变异而同时还能维持被编码蛋白的氨基酸序列。例如氨基酸丙氨酸由核苷酸三联体密码子 GCT、GCG、GCC 和 GCA 编码。因此，核苷酸序列可以改变而不影响编码蛋白的氨基酸组成或蛋白的性质。基于遗传密码的简并性，可以使用上述的标准 DNA 突变技术或通过 DNA 序列的合成从 cDNA 分子衍生变异的 DNA 分子。由于遗传密码的简并性而产生的序列变异，某些 DNA 序列在严紧条件下不能与公开的 cDNA 序列杂交，这些序列也包含在本公开中。

PA 的变异体、片段、融合蛋白和多态性将保留裂解 PSA 产生细胞的能力，如使用此处公开的分析方法所确定的那样(例如参见实施例 2 和 5)。如同本领域的专业技术人员所理解的，公开的序列的变异体和片段保留了与蛋白的氨基酸序列相比至少 70%、80%、85%、90%、95%、98%或更高的序列同一性，并维持了蛋白的功能活性。

实施例 12

蛋白的重组表达

利用公共可用的 cDNA 和相应的氨基酸序列以及此处公开的 PA 变体、片段和融合蛋白，能够使用标准的实验室技术表达和纯化任何蛋白。纯化的蛋白可用于病人的治疗。本领域的专业技术人员将会明白，公开的修饰的 PA 毒素可以在任何目的细胞或生物体中生产，并在给药到受试者前加以纯化。

生产重组蛋白的方法在本领域内众所周知。因此，本公开的范围包括了任何蛋白的重组表达。例如参见授权于 Johnson 等的美国专利号 5342764、授权于 Pausch 等的美国专利号 5846819、授权于 Fleer 等的美国专利号 5876969 和 Sambrook 等(分子克隆：实验室手册，冷泉港出版社，纽约，1989 年，第 17 章，在此引为参考)。

实施例 13

肽的修饰

能够被前列腺特异性蛋白酶如 PSA 激活的修饰的 PA 蛋白，可以使用各种化学技术进行修饰，以产生与未修饰的肽具有基本相同的活性以及任选具有其它所需性质(例如减少的抗原性)的衍生物。例如，肽的羧基基团，不论是羧基末端还是侧链，都可以以可药用的阳离子的盐的形式被提供，或被酯化形成 C₁-C₁₆ 的酯，或被转化为通式为 NR₁R₂ 的酰胺，其中 R₁ 和 R₂ 各自独立为 H 或 C₁-C₁₆ 烷基，或组合起来形成一个杂环，例如一个 5-或 6-员环。肽的氨基基团，不论是氨基末端还是侧链，都可以以可药用的酸加成盐，例如盐酸、氢溴酸、乙酸、苯甲酸、甲苯磺酸、马来酸、酒石酸和其它有机酸加成盐的形式被提供，或被修饰为 C₁-C₁₆ 烷基或双烷基氨基或进一步转化为酰胺。

肽侧链的羟基可以使用普遍接受的技术被转化为 C₁-C₁₆ 烷氧基或 C₁-C₁₆ 酯。肽侧链的苯基和酚基环可以被一个或多个卤素原子，例如

F、Cl、Br 或 I 取代，或被 C₁-C₁₆ 烷基、C₁-C₁₆ 烷氧基、羧酸及其酯或这些羧酸的酰胺取代。肽侧链的亚甲基基团可以被延长为同系的 C₂-C₄ 亚烷基。巯基可以被许多普遍接受的保护基团中的任何一个，例如乙酰胺基团来保护。本领域的专业技术人员也意识到在此处公开的肽内引入环状结构的方法，以选择和提供对结构的构象限制，产生增强的稳定性。例如，可以在肽的羧基末端或氨基末端加上半胱氨酸残基，以便在氧化时，肽将含有一个二硫键，产生一个环状的肽。其它的环化肽的方法包括形成硫酯和羧基和氨基末端的酰胺和酯。

为了维持有功能的肽，肽的特定变体与肽只能有少量的氨基酸不同。这样的变体可以含有不干扰肽的所需活性的缺失(例如 1-3 个或更多的氨基酸的缺失)、插入(例如 1-3 个或更多的氨基酸的插入)或取代。取代的变体是其中氨基酸序列上的至少一个残基被除去并在它的位点插入了一个不同的残基。在特定的实施方案中，这样的变体含有单个残基的氨基酸取代，例如在一个蛋白中有 1、3、5 或甚至 10 个取代。

此处也公开了肽模拟和有机模拟的实施方案，这样的肽和有机模拟物的化学成分的三维排列模拟了肽中的骨架和组分氨基酸侧链的三维排列，由此产生了这样的能够裂解 PSA 产生细胞的修饰的 PA 毒素的肽和有机模拟物。对于计算机模拟应用，一个药效基团是对生物学活性的结构需要的一个理想化的三维定义。肽和有机模拟物可以被设计成将每个药效基团适合于现在的计算机模拟软件(使用计算机辅助的药物设计或 CADD)。对 CADD 中所用的技术描述参见 Walters 的《药物的计算机辅助模拟(Computer-Assisted Modeling of Drugs)》，在 Klegerman 和 Groves 1993 年主编的《药物生物技术(Pharmaceutical Biotechnology)》第 165-174 页，Interpharm 出版社，Buffalo Grove, IL，和 Munson 1995 年主编的《药理学原理(Principles of Pharmacology)》第 102 章。

实施例 14

表达修饰的气单胞菌溶素原肽的方法

作为施用修饰的气单胞菌溶素原肽治疗前列腺癌的一个选择或附加的方法，还可以通过在体内表达公开的修饰的气单胞菌溶素原毒素来完成长期的或全身性的治疗(例如治疗或防止肿瘤的转移)。

本公开提供了在细胞或组织中体内表达修饰的气单胞菌溶素原肽的方法。在一个例子中，细胞或组织的转染发生在体内。在这个例子中，细胞或组织(例如一个移植物)从受试者中取出，然后用一个含有编码目的蛋白的 cDNA 的表达载体转染。转染的细胞将产生有功能的蛋白，并可以被重新导入受试者体内。在另一个例子中，一个编码目的蛋白的核酸被直接给药到受试者(例如静脉内、肿瘤内或前列腺内)，然后在体内发生转染。

此处公开的修饰的气单胞菌溶素原肽和方法可用于治疗患有前列腺肿瘤的受试者。这样的方法将减小肿瘤的体积，并且在某些实施方案中能够防止或治疗前列腺肿瘤的转移。

人类细胞转染所需的科学和医学步骤现在是常规的方法。气单胞菌溶素原、结合结构域以及前列腺特异性蛋白酶蛋白和 cDNA 序列可以公共地得到，使得基于这些步骤的人(和其它哺乳动物)体内基因表达得到发展。此外，此处公开了特定的变体气单胞菌溶素原分子。使用基因工程的肿瘤渗透淋巴细胞(TILs)对黑素瘤病人的免疫疗法已经被 Rosenberg 等报道(N. Engl. J. Med. 323:570-8, 1990)。在这个研究中，使用了一个逆转录病毒载体将一个新霉素抗性基因导入了 TILs。同样的方法可以用来将修饰的气单胞菌溶素原肽 cDNA 导入患有前列腺癌的受试者中。

将基因转入供体细胞的通用策略在美国专利号 5529774 中公开，在此引为参考。一般来说，编码具有所需疗效的蛋白的基因被克隆到一个病毒表达载体中，然后将该载体导入靶生物体。病毒感染细胞，

并在体内产生蛋白序列，在那里它具有了所需的疗效(Zabner 等，Cell 75:207-16, 1993)。

可能只需要将 DNA 或蛋白元件导入某些细胞或组织中。例如，如果一个受试者只患有前列腺肿瘤，只将蛋白或 DNA 导入前列腺(或肿瘤)中可能就足够了。然而，在某些情况下，治疗受试者的所有细胞，或更广泛地分散载体，例如通过血管内(i.v.)或口服给药，可能更有疗效并更简单。例如，如果受试者患有的前列腺肿瘤已经转移，全身性地导入蛋白或 DNA 可能是必需的。

编码至少一种治疗剂例如修饰的气单胞菌溶素原毒素的核酸，是在适当的启动子的控制之下。可以使用的适当的启动子包括但不限于基因的天然启动子、逆转录病毒 LTR 启动子或者腺病毒启动子例如腺病毒的主要晚期启动子；CMV 启动子；RSV 启动子；可诱导的启动子例如 MMTV 启动子；金属硫蛋白启动子；热休克启动子；白蛋白启动子；组蛋白启动子； α -肌动蛋白启动子；TK 启动子；B19 细小病毒启动子以及 ApoAI 启动子。在一个例子中，启动子是一个前列腺特异性启动子，例如一个 probasin 启动子。但是本公开不限于特定的外源基因或启动子。

重组核酸可以通过任何一种能够使重组核酸到达适当的细胞的方法给药到受试者。这些方法包括注射、灌输、沉积、植入或局部给药。注射可以是皮内的或皮下的。重组核酸可以作为病毒载体，例如 avipox 病毒、重组痘苗病毒、复制缺陷的腺病毒或脊髓灰质炎病毒的一部分被投送，也可以以非传染性的形式例如裸露的 DNA 或脂质体包裹的 DNA 的形式被投送，如同在实施例 15 中所进一步描述的。

实施例 15

用于体内基因表达的病毒载体

腺病毒载体基本上包含了全部的腺病毒基因组(Shenk 等，Curr.

Top. Microbiol. Immunol. 111:1-39, 1984)。此外，腺病毒载体是一种修饰的腺病毒载体，其中至少一部分的腺病毒基因组被缺失了。在一个例子中，载体包含了腺病毒的 5'ITR、腺病毒的 3'ITR、腺病毒的衣壳化信号、一个编码治疗剂的 DNA 序列以及用于表达编码治疗剂的 DNA 序列的启动子。载体至少不含腺病毒 E1 和 E3 DNA 序列的大部分，但是不是必须不含 E2 和 E4 DNA 序列的全部，以及编码由腺病毒主要晚期启动子转录的腺病毒蛋白的 DNA 序列。在另一个例子中，载体是一种例如在 Carter 等的美国专利号 4797368 和 McLaughlin 等(J. Virol. 62:1963-73, 1988)中描述的腺病毒相关的病毒(AAV)和 4 型 AAV(Chiorini 等, J. Virol. 71:6823-33, 1997)以及 5 型 AAV(Chiorini 等, J. Virol. 73:1309-19, 1999)。

这样的载体可以按照标准的技术来构建，使用一个穿梭质粒，其从 5'端开始含有腺病毒的 5'ITR、腺病毒的衣壳化信号、一个 E1a 增强子序列、一个启动子(其可以是一个腺病毒启动子或一个外源启动子)、一个三重的前导序列、一个多克隆位点(可以是此处描述的多克隆位点)、一个 poly A 信号以及相应于腺病毒基因组区段的一个 DNA 区段。该 DNA 区段用作与修饰的或突变的腺病毒进行同源性重组的底物，可以包含例如一个不长于腺病毒 5'基因组的 3329 到 6246 位碱基的区段。质粒还可以包含一个可选择的标记和一个复制原点。复制原点可以是细菌的复制原点。编码治疗剂的所需的 DNA 序列可以被插入到质粒的多克隆位点中。

可用于实现此处公开的方法的载体的例子包括但不限于在授权于 Woo 等的 WO 95/27512、授权于 Walsh 等的 WO 01/127303、授权于 Couto 等的美国专利号 6221349 和授权于 High 等的美国专利号 6093392 中公开的那些载体。

实施例 16

融合蛋白的产生和表达

制造融合蛋白的方法对于本领域的专业技术人员来说是众所周知的。例如授权于 Bauer 等的美国专利号 6057133(在此引为参考)公开了生产融合分子的方法, 这些融合分子的组成是人类白细胞介素-3(hIL-3)变异体或突变体蛋白在功能上连接到第二个集落刺激因子、细胞因子、淋巴因子、白细胞介素、促红细胞生长因子或 IL-3 变异体上。授权于 Davis 等的美国专利号 6072041(在此引为参考)公开了生产融合蛋白的方法, 该融合蛋白含有一个与治疗蛋白共价连接的导向跨细胞受体的单链 Fv 分子。

同样的方法可以用于产生含有与其它氨基酸序列, 例如前列腺特异性结合结构域(例如 LHRH 或抗体)连接的 PA(或其变异体、片段等)的融合蛋白。接头区域可用于将蛋白的两个部分彼此分开并在它们之间提供挠性。接头区域一般是一个长度在 1 到 500 个氨基酸之间的多肽, 例如长度小于 30 个氨基酸的多肽。连接两个分子的接头可以被设计为(1)允许两个分子彼此独立地折叠和行动, (2)不具备发展出能够干扰两个蛋白的功能结构域的有序的二级结构的倾向, (3)具有最小的疏水或带电荷性质, 这些性质可能与功能性蛋白结构域相互作用, 以及(4)为两个区域提供空间上的分离。在挠性蛋白区域的典型的表面氨基酸包括甘氨酸、天冬酰胺和丝氨酸。其它的中性氨基酸, 例如苏氨酸和丙氨酸, 也可用于接头序列中。由于在接头序列中添加了独特的限制性内切酶位点以方便融合子的构建, 其它的氨基酸也可以包含在接头中。如果需要, 其它部分也可以被包含在其中。这些部分包括结合结构域, 例如亲和素或表位, 例如一个多聚组氨酸标记, 它对融合蛋白的纯化和加工是有用的。此外, 可检测的标记也可以连接到融合蛋白上, 以便可以方便地监测融合蛋白通过身体或细胞的运输量。这样的标记包括放射性核素、酶、荧光团等。

可以通过使用中间载体将 PA(或其变异体、片段等)的核酸序列与其它蛋白(或其变异体、片段等)的核酸序列相融合。此外, 一个基因可以被直接克隆在含有另一个基因的载体中。接头和衔接子可用于连

接核酸序列，以及替换丢失的序列，其中在目的区域中含有一个限制性内切酶位点。编码一个多肽、肽接头和另一个多肽的遗传物质(DNA)被插入一个适当的表达载体中，用于转化原核或真核细胞，例如细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞。转化的生物体被培养，然后通过标准技术分离蛋白，例如如果使用了多聚组氨酸标记，可以使用可检测的标记如镍螯合的亲和层析。因此得到的产物是一个新的蛋白，即一种融合的蛋白，其含有一个修饰的 PA，它被一个接头区域连接到第二个蛋白上。为了证实融合蛋白的表达，纯化的蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，使用建立的方法转移到硝酸纤维素滤膜上。使用针对单一的组分，即多聚组氨酸标记和 PA 的抗体通过 Western 印迹分析来鉴定蛋白产物。

实施例 17

药物组合物和给药方式

此处所用的药物有效的载体是常规的。在 Remington 的《制药学 (Pharmaceutical Science)》，Martin, Mack 出版公司，Easton, PA, 第 15 版(1975 年)中描述了适合于药物投送的组合物和制剂。

肽的给药

在一个将修饰的 PA 毒素例如 SEQ ID NO:4、24 和 25 给药到受试者的实施方案中，蛋白可以使用任何在本技术领域使用的途径进行投送。例子包括但不限于静脉内、肿瘤内、口服、前列腺内、肌内、皮下注射、经皮给药等。本公开还提供了仅包括药物有效量的修饰的 PA 毒素或与其与可药用的载体在一起的药物组合物。此外，药物组合物或治疗方法可以与一种或多种其它的治疗方法结合(或分开)施用。其它治疗方法的例子包括但不限于抗肿瘤剂、细胞裂解物(例如那些通过与修饰的 PA 毒素保温而产生的)、非裂解的细胞(例如那些已经被辐射杀死的)、免疫抑制剂(例如 Rituximab、类固醇)和/或细胞因子(例如 GM-CSF)。如同那些本领域的专业技术人员所了解的那样，公开的实施方案包括药物，可以使用常规的可药用的载体、佐剂和平衡离子

来制备。

修饰的 PA 毒素可以与至少一种，例如一种或多种药物有效的载体，例如药物和生理上可接受的流体结合使用。药物有效载体的例子包括但不限于水、生理盐水、平衡的盐溶液、葡萄糖水溶液、芝麻油、甘油、乙醇及其组合等作为载体。载体和组合物可以是无菌的，制剂适合于给药的方式。除了生物中性的载体，施用的药物组合物可以含有少量的无毒性的辅助物，例如润湿剂或乳化剂、防腐剂以及 pH 缓冲剂等，例如乙酸钠或单月桂酸山梨聚糖。

组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、缓释剂或粉剂。对于固体组合物(例如粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式)，可以包括常规的无毒性的固体载体，例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、糖精、纤维素、碳酸镁或硬脂酸镁。组合物可以使用传统的结合剂和载体例如甘油三酯配制成栓剂。

修饰的 PA 毒素例如 SEQ ID NO:4、24 和 25 在治疗特定的紊乱或病症例如前列腺癌中的有效量，依赖于紊乱或病症的性质，可以通过标准的临床技术来确定。此外，也可以使用体外分析方法来鉴定最适的剂量范围(参见实施例 2、4 和 5)。在制剂中使用的准确剂量也依赖于疾病或紊乱的严重性，将根据执业医生的判断和每个受试者的情况而决定。有效剂量可以从得自体外或动物模型试验系统的剂量反应曲线推断出来。对于一个 70 公斤的人，修饰的 PA 毒素的静脉内有效剂量的例子是大约 1-10mg 的修饰的 PA 毒素，例如大约 1-5mg，例如大约 1-3mg，例如大约 2.8mg。对于一个 70 公斤的人，修饰的 PA 毒素的前列腺内或肿瘤内有效剂量的例子是大约 10-100mg 的修饰的 PA 毒素，例如大约 10-50mg，例如大约 10-30mg，例如大约 28mg。

本公开还提供了一个药物包或盒，含有一个或多个容器，其中充满了药物组合物的一种或多种成分。任选与这样的容器在一起的可以

是一个告示，采用控制药物或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定的形式，该告示反映了生产、使用或销售机构对于可用于人施用的批准。还可以包括使用组合物的说明书。

核酸分子的给药

在一个使用核酸并允许核酸在细胞内表达的例子中，核酸通过细胞内投送(例如通过从核酸载体的表达或通过受体介导的机制)。在一个实施方案中，核酸编码一个修饰的 PA，例如 SEQ ID NO:4、24 或 25。

已经知道了多种给药核酸的投送系统，包括包裹在脂质体、微粒、微囊中、受体介导的胞饮作用(Wu 和 Wu, *J. Biol. Chem.* 1987, 262:4429-32)，以及将治疗核酸构建为逆转录病毒或其它载体的一部分。导入的方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内和口服途径。化合物可以通过任何方便的途径给药，例如通过灌输或团注、通过上皮或粘膜皮肤衬吸收(例如口腔粘膜、直肠、阴道和肠粘膜等)，可以与其它生物活性剂一起给药。给药可以是全身性的或局部的。

脂质体与靶位点融合并胞内递送腔内的内含物。为了发生融合，利用各种维持接触的方法，例如分离和结合试剂，使脂质体与靶细胞保持接触维持足够的时间。可以使用能够介导膜融合的纯化的蛋白或肽，例如仙台病毒或流感病毒来制备脂质体。脂可以是任何已知的能够形成脂质体的脂，包括阳离子脂，例如磷脂酰胆碱的有用组合。其它潜在的脂包括中性脂，例如胆固醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油等。Kato 等(*J. Biol. Chem.* 1991, 266:3361)描述的步骤可用于制备脂质体。

当药物分子是核酸时，可以通过使用一种合适能够用于给药的核酸表达载体来进行给药，以便使核酸进入细胞内，例如通过使用逆转录病毒载体(参见美国专利号 4980286)，或者通过直接的注射、或通过使用微粒轰击(例如基因枪；Biolistic, Dupont)、或者通过用脂或细胞

表面受体或转染试剂包被、或者通过将其与已知能够进入细胞核的类似同源异型框的肽连接起来给药(参见例如 Joliot 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:1864-8)等。此外,核酸可以被导入细胞内,通过同源重组整合在宿主细胞 DNA 内来表达。

载体 pcDNA 是将外源 cDNA 导入细胞、在一个强的病毒启动子下(CMV)驱动表达的方法的一个例子。但是,其它的载体也可以使用(参见实施例 15)。其它的逆转录病毒载体(例如 pRETRO-ON, Clontech)也使用这个启动子,但是只有当靶细胞正在分裂时(如癌细胞那样,特别是在化疗后第一次缓解期间)具有无需任何转染帮助进入细胞、才整合到靶细胞的基因组中的优点,并且它们是受调控的。当使用这些质粒时,也可能可以通过给药四环素来开启核酸的表达。

其它的质粒载体,例如 pMAM-neo(Clontech)或 pMSG(Pharmacia)使用 MMTV-LTR 启动子(可以被类固醇调节)或 SV40 晚期启动子(pSVL, Pharmacia)或对金属硫蛋白反应的启动子(pBPV, Pharmacia)或其它病毒载体,包括逆转录病毒。其它病毒载体的例子包括腺病毒、AAV(腺病毒相关病毒)、重组 HSV、痘病毒(牛痘)和重组的慢病毒(例如 HIV)。这些载体达到了将 cDNA 序列和转录所需的控制元件投送到靶细胞中的基本目标。本公开包括所有形式的核酸的投送,包括合成的寡聚体、裸露的 DNA、质粒和病毒,它们或者被或者不被整合到基因组中。

已经解释并描述了新的修饰的气单胞菌溶素原毒素,以及使用这些分子治疗前列腺癌和转移肿瘤的方法,对于本领域的专业技术人员来说,显然可以在不偏离这些原则的情况下对本公开的安排方式和细节进行修改。鉴于我们公开的原则可以应用到许多可能的实施方案中,应该认识到解释所用的实施方案仅仅是本公开的特定的实施例,并不对本公开的范围构成限制。更确切地说,本公开的范围与下述的权利要求相符合。因此,我们要求所有在这些权利要求的范围和精神之内的事物作为我们的发明的权利。

序列表

- <110> 维多利亚大学创新和发展公司
(University of Victoria Innovation and Development Corporation)
约翰斯霍普金斯大学 (The Johns Hopkins University)
- <120> 含有蛋白酶激活序列的气单胞菌溶素原及其在前列腺癌治疗中的使用方法
(PROAEROLYSIN CONTAINING PROTEASE ACTIVATION SEQUENCES AND METHODS OF USE FOR
TREATMENT OF PROSTATE CANCER)
- <130> SCT040525-47
- <140>
- <141>
- <150> 60/314,613
- <151> 2001-08-24
- <160> 25
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 1410
- <212> DNA
- <213> 嗜水气单胞菌 (Aeromonas hydrophilia)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1410)
- <223>
- <400> 1
- gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
- Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
- 1 5 10 15
- ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa 96
- Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
- 20 25 30
- agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc 144
- Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
- 35 40 45

ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu 50 55 60	192
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro 65 70 75 80	240
ggt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly 85 90 95	288
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe 100 105 110	336
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val 115 120 125	384
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg 130 135 140	432
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp 145 150 155 160	480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175	528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190	576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205	624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220	672

acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc 720
 Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc 768
 Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg 816
 Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc 864
 Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat 912
 Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc 960
 Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt 1008
 Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg 1056
 Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg 1104
 Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc 1152
 Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc 1200
 Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc 1248
 Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc aag gtg cgt cgt gct cgc 1296
 Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg
 420 425 430

agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat 1344
 Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg 1392
 Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

acc cct gct gcc aat caa 1410
 Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophilia*)

<400> 2

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly

	85		90		95
Asp Glu Val	Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe				
	100		105		110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val					
	115		120		125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg					
	130		135		140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp					
	145		150		155
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala					
			165		170
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser					
	180		185		190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser					
	195		200		205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala					
	210		215		220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr					
	225		230		235
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser					
			245		250
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser					
	260		265		270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg					
	275		280		285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr					
	290		295		300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly					
	305		310		315
					320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 3
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
 (Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)
 <223>

<400> 3

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
 Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa 96
 Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc 144
 Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa 192
 Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct 240
 Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt 288
 Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc 336
 Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg 384
 Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt 432
 Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac 480
 Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc 528
 Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala

165	170	175	
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc			576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser			
180	185	190	
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc			624
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser			
195	200	205	
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc			672
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala			
210	215	220	
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc			720
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr			
225	230	235	240
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc			768
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser			
245	250	255	
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg			816
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser			
260	265	270	
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc			864
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg			
275	280	285	
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat			912
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr			
290	295	300	
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc			960
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly			
305	310	315	320
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt			1008
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg			
325	330	335	
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg			1056
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala			

340	345	350	
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg			1104
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val			
355	360	365	
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc			1152
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr			
370	375	380	
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc			1200
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile			
385	390	395	400
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc			1248
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile			
405	410	415	
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc cat tcc tcc aag ctg cag			1296
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln			
420	425	430	
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat			1344
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp			
435	440	445	
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg			1392
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val			
450	455	460	
acc cct gct gcc aat caa			1410
Thr Pro Ala Ala Asn Gln			
465	470		

<210> 4

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原

(Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<400> 4

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr

225	230	235	240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	245	250	255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	260	265	270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg	275	280	285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr	290	295	300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly	305	310	315
320			
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg	325	330	335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala	340	345	350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val	355	360	365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr	370	375	380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile	385	390	395
400			
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile	405	410	415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln	420	425	430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp	435	440	445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val	450	455	460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 5
His Ser Ser Lys Leu Gln
1 5

<210> 6
<211> 1410
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
(Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)
<223>

<400> 6
gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa 96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc 144
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa 192
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct 240
 Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt 288
 Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc 336
 Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg 384
 Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt 432
 Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac 480
 Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc 528
 Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc 576
 Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc 624
 Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc 672
 Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc 720
 Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255	768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248

ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc cat tcc tcc aag ctg cag 1296
 Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
 420 425 430

agt gcc gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat 1344
 Ser Ala Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg 1392
 Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

acc cct gct gcc aat caa 1410
 Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 7

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
 (Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<400> 7

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly

	85		90		95										
Asp	Glu	Val	Asp	Val	Gln	Trp	Arg	Leu	Val	His	Asp	Ser	Ala	Asn	Phe
	100							105						110	
Ile	Lys	Pro	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ala	His	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ala	Trp	Val
	115							120						125	
Gly	Gly	Asn	His	Ser	Gln	Tyr	Val	Gly	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Thr	Arg
	130							135				140			
Asp	Gly	Asp	Gly	Trp	Val	Ile	Arg	Gly	Asn	Asn	Asp	Gly	Gly	Cys	Asp
145					150					155					160
Gly	Tyr	Arg	Cys	Gly	Asp	Lys	Thr	Ala	Ile	Lys	Val	Ser	Asn	Phe	Ala
			165						170						175
Tyr	Asn	Leu	Asp	Pro	Asp	Ser	Phe	Lys	His	Gly	Asp	Val	Thr	Gln	Ser
		180							185					190	
Asp	Arg	Gln	Leu	Val	Lys	Thr	Val	Val	Gly	Trp	Ala	Val	Asn	Asp	Ser
		195						200					205		
Asp	Thr	Pro	Gln	Ser	Gly	Tyr	Asp	Val	Thr	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Ala
	210						215						220		
Thr	Asn	Trp	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Thr
225						230					235				240
Thr	Lys	Asn	Lys	Phe	Lys	Trp	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Thr	Gln	Leu	Ser
				245						250					255
Ile	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn	Gln	Ser	Trp	Ala	Ser	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser
			260						265					270	
Thr	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Pro	Thr	Val	Pro	Ala	Arg
			275					280					285		
Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Lys	Ile	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ile	Ser	Tyr
	290					295						300			
Pro	Tyr	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly
305					310						315				320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
 420 425 430

Ser Ala Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PSA 切割位点

<400> 8

His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Ala

1

5

<210> 9
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
 (Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)
 <223>

<400> 9

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa	48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa	96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln	
20 25 30	
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc	144
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser	
35 40 45	
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa	192
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu	
50 55 60	
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct	240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro	
65 70 75 80	
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt	288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	
85 90 95	
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc	336
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	
100 105 110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg	384

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	
115	120
125	
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	
130	135
140	
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac	480
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	
145	150
155	160
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc	528
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	
165	170
175	
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc	576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	
180	185
190	
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc	624
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser	
195	200
205	
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc	672
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala	
210	215
220	
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc	720
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr	
225	230
235	240
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc	768
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	
245	250
255	
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg	816
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	
260	265
270	
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc	864
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg	
275	280
285	
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat	912

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr	
290	295 300
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc	960
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly	
305	310 315 320
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt	1008
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg	
	325 330 335
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg	1056
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala	
	340 345 350
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg	1104
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val	
	355 360 365
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc	1152
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr	
	370 375 380
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc	1200
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile	
	385 390 395 400
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc	1248
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile	
	405 410 415
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac tcc cag ttc tat agc agc aat	1296
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn	
	420 425 430
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat	1344
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp	
	435 440 445
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg	1392
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val	
	450 455 460
acc cct gct gcc aat caa	1410

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 10
<211> 470
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
(Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<400> 10
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PSA 切割位点

<400> 11
 Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
 1 5

<210> 12
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
 (Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)
 <223>

<400> 12
 gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
 Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

 ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa 96
 Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

 agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc 144
 Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

 ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa 192
 Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

 ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct 240
 Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

 gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt 288
 Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

 gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc 336
 Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

 atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg 384
 Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

 ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt 432
 Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

 gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac 480
 Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

 ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc 528
 Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190	576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205	624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220	672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240	720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255	768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056

agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg 1104
 Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc 1152
 Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc 1200
 Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc 1248
 Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac ggt ata agt agt ttc cag agt 1296
 Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
 420 425 430

agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat 1344
 Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg 1392
 Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

acc cct gct gcc aat caa 1410
 Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 13

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 以 PSA 序列替换费林蛋白酶位点的气单胞菌溶素原
 (Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site)

<400> 13

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln

465

470

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PSA 切割位点

<400> 14

Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

Lys Gly Ile Ser Ser Gln Tyr

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

Ser Arg Lys Ser Gln Gln Tyr

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

Ala Thr Lys Ser Lys Gln His

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

Lys Gly Leu Ser Ser Gln Cys

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 19

Leu Gly Gly Ser Ser Gln Leu

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

Glu His Ser Ser Lys Leu Gln

1 5

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

Ser Lys Leu Gln

1

<210> 22

<211> 10

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 22
Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LHRH 变异序列

<220>
<221> MISC_特征
<222> (1)..(1)
<223> Glu 是焦谷氨酸

<220>
<221> MISC_特征
<222> (6)..(6)
<223> Lys 为 D-Lys

<400> 23
Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 397
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 变异的气单胞菌溶素原肽

<220>
<221> MISC_特征
<222> (1)..(1)
<223> 焦谷氨酸

<220>

<221> MISC_特征

<222> (6)..(6)

<223> D-Lys

<400> 24

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
 20 25 30

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
 35 40 45

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
 50 55 60

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
 65 70 75 80

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
 85 90 95

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
 100 105 110

His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125

Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140

Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
 165 170 175

Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
 180 185 190

Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
 195 200 205

Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
210 215 220

Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
225 230 235 240

Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
245 250 255

Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
260 265 270

Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
275 280 285

Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile
290 295 300

Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
305 310 315 320

Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
325 330 335

Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp
340 345 350

Ser His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu
355 360 365

Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
370 375 380

Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
385 390 395

<210> 25

<211> 397

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 变异的气单胞菌溶素原肽

<220>

<221> MISC_特征

<222> (1)..(1)

<223> 焦谷氨酸

<220>

<221> MISC_特征

<222> (6)..(6)

<223> D-Lys

<400> 25

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
1 5 10 15

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
 20 25 30

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
 35 40 45

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
 50 55 60

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
65 70 75 80

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
 85 90 95

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
 100 105 110

His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125

Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140

Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
145 150 155 160

Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu

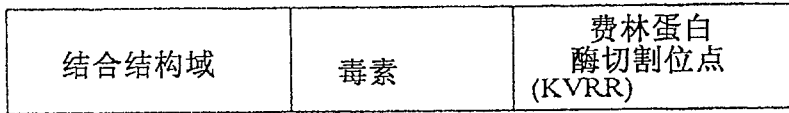
	165		170		175
Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp					
	180		185		190
Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val					
	195		200		205
Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu					
	210		215		220
Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser					
	225		230		235
					240
Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp					
	245		250		255
Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile					
	260		265		270
Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys					
	275		280		285
Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile					
	290		295		300
Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu					
	305		310		315
					320
Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln					
	325		330		335
Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp					
	340		345		350
Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu					
	355		360		365
Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe					
	370		375		380
Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln					
	385		390		395

图1

气单胞菌溶素原



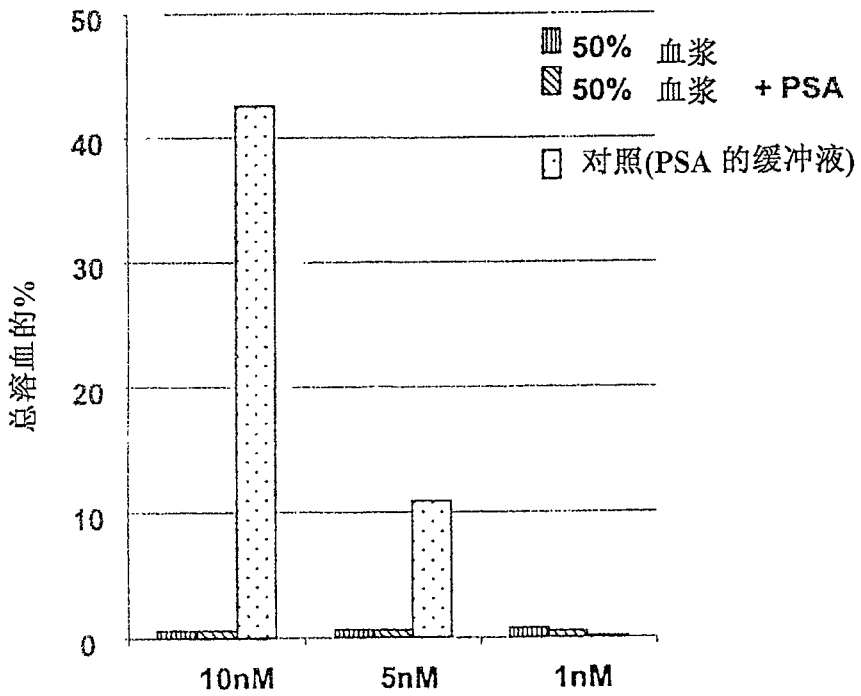
气单胞菌溶素



气单胞菌溶素插入到细胞的细胞膜中形成孔

细胞死亡

图2



PSA-气单胞菌溶素原(PSA-PA1)的浓度

图3

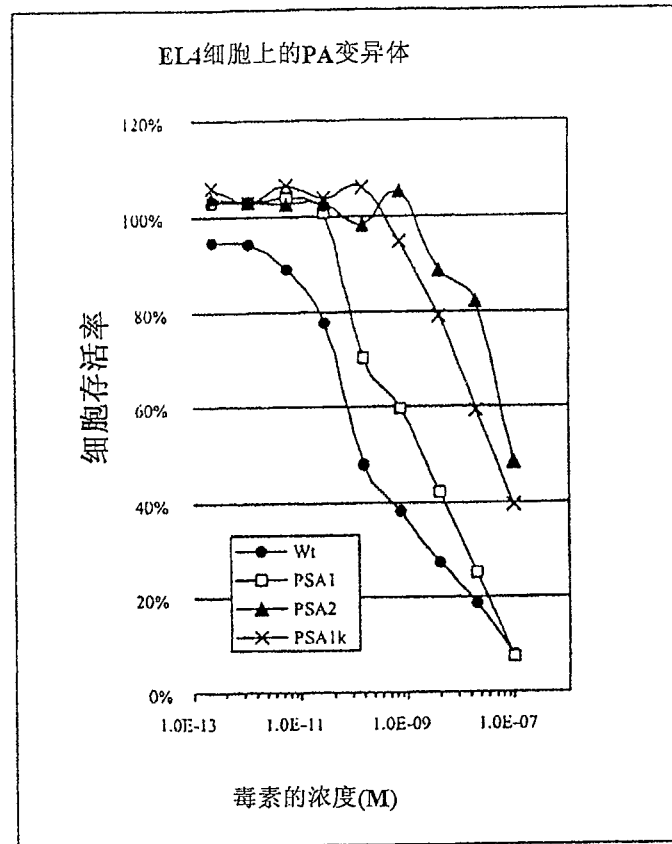


图4

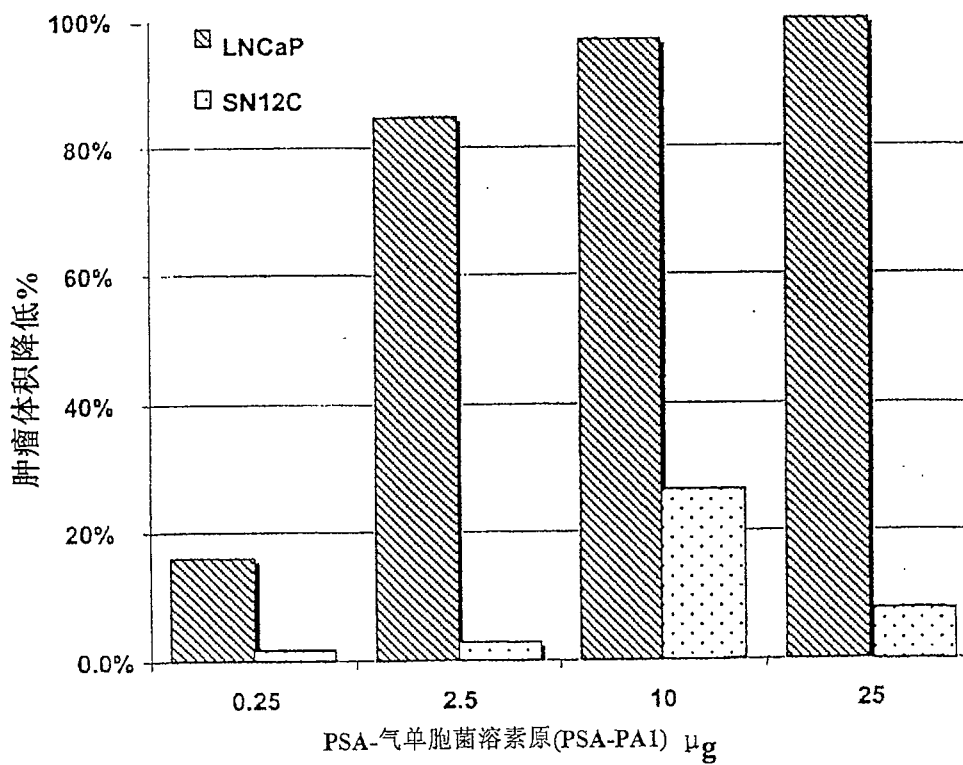


图5A:野生型气单胞菌溶素原(SEQ ID NOS:1和2)

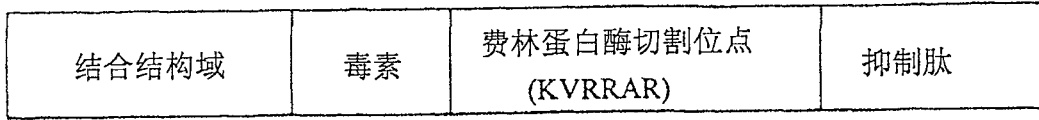


图5B:变异的气单胞菌溶素原的例子(SEQ ID NOS:3和4)

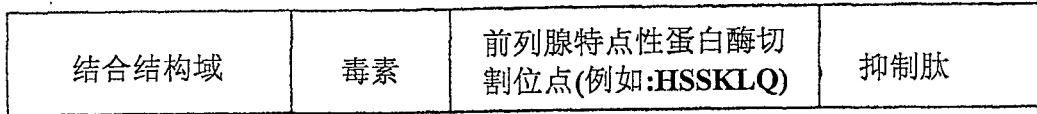


图5C:变异的气单胞菌溶素原的例子

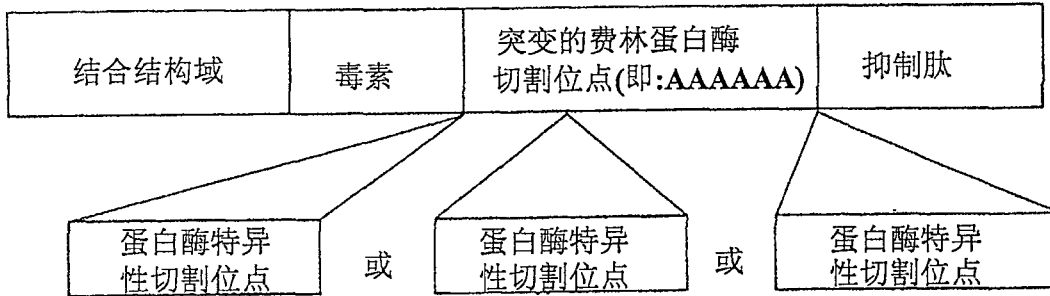


图5D:含有功能性缺失的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

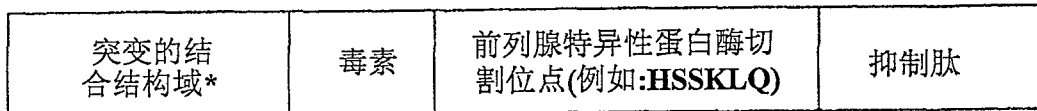


图5E:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

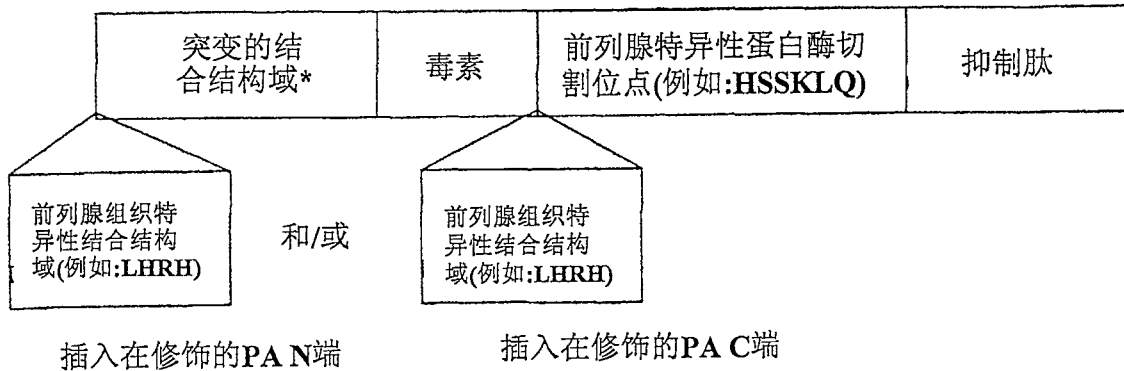


图5F:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

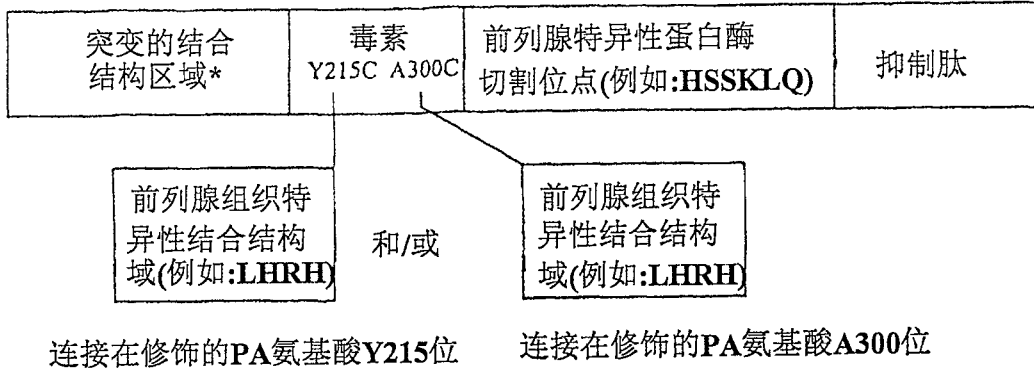


图5G:含有功能性缺失的结合结构域(1-83位氨基酸缺失)的变异气单胞菌溶素原的例子

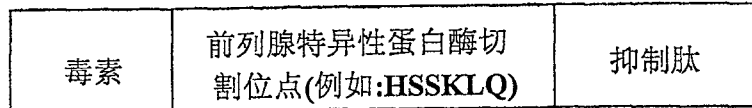


图5H:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

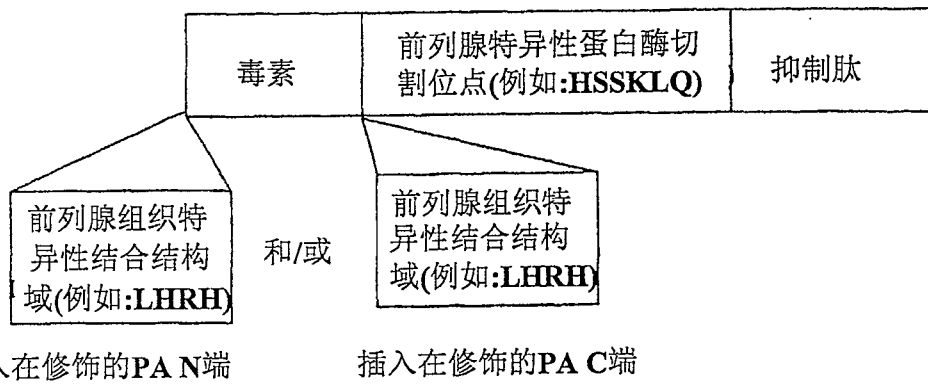


图5I:含有功能性替换的结合结构域变异的气单胞菌溶素原的例子

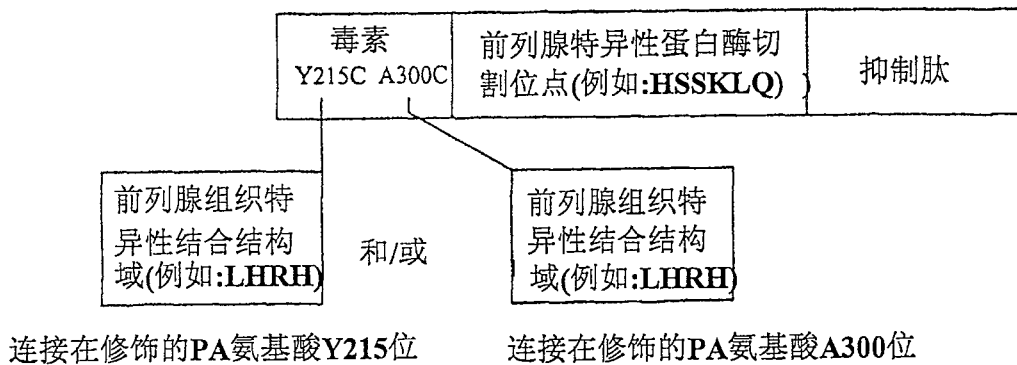


图5J:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

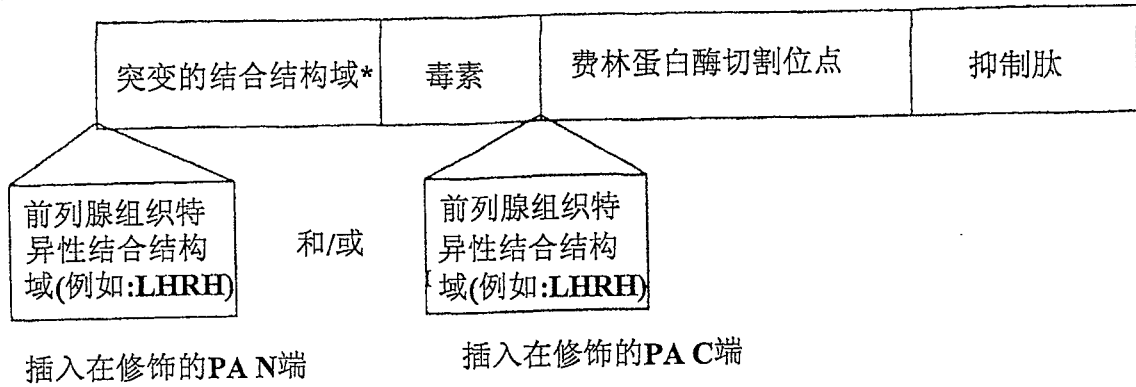


图5K:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

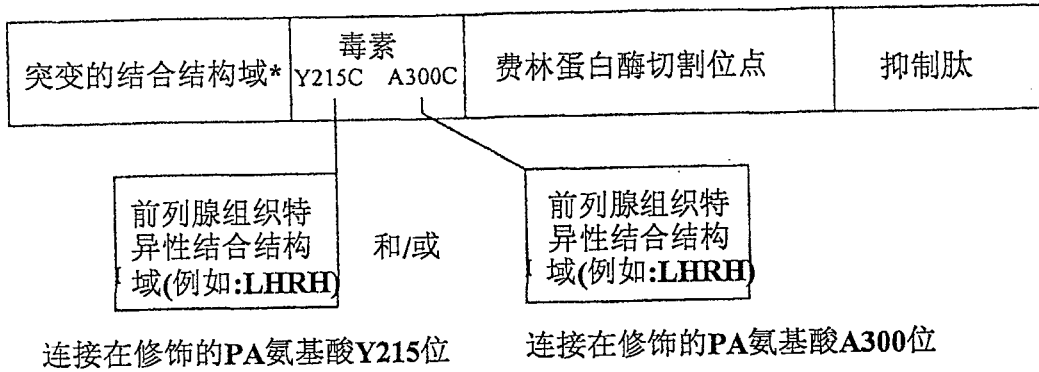


图5L:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

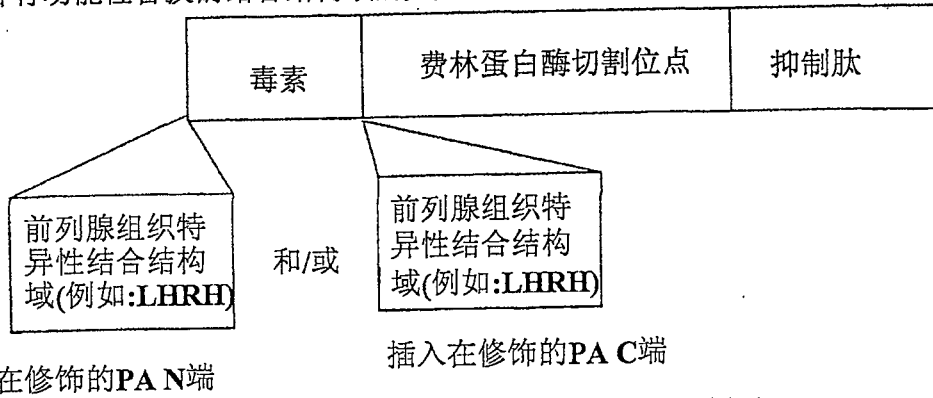


图5M:含有功能性替换的结合结构域的变异气单胞菌溶素原的例子

