(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108350041 A
(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680062198.3

(22)申请日 2016.08.25

(30)优先权数据
62/210,771 2015.08.27 US
62/323,218 2016.04.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.04.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/048706 2016.08.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/035359 EN 2017.03.02

(71)申请人 美国卫生和人力服务部
地址 美国马里兰州

(72)发明人 刘士辉 斯蒂芬·H·莱普拉
托马斯·H·巴格
亚力山大·N·韦恩
黛安·E·彼得斯 刘洁 陈光华

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C07K 14/325(2006.01)
A61K 39/07(2006.01)

权利要求书2页 说明书40页
序列表27页 附图22页

(54)发明名称

修饰的炭疽毒素保护性抗原

(57)摘要

公开了包含保护性抗原(PA)氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)PA,其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207、I210、E654、I656、R659、M662、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代,条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代,并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。还公开了相关组合物、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、治疗或预防哺乳动物的癌症的方法以及抑制靶细胞生长的方法。

CN 108350041 A

1.包含保护性抗原(PA)氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)PA,其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207、I210、E654、I656、R659、M662、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代,条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代,并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。

2.如权利要求1所述的PA,其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207和I210中的一个或两个被独立地取代,条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代,并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。

3.如权利要求1或2所述的PA,其中氨基酸残基I210被天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸或丝氨酸取代。

4.如权利要求1或2所述的PA,其中氨基酸残基I207被精氨酸、色氨酸或酪氨酸取代。

5.如权利要求1或2所述的PA,其中氨基酸残基I207被精氨酸取代。

6.如权利要求1和3-5中任一项所述的PA,其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I656、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代。

7.如权利要求1和3-6中任一项所述的PA,其中氨基酸残基I656被谷氨酰胺、缬氨酸、丙氨酸、半胱氨酸或谷氨酸取代。

8.如权利要求1和3-7中任一项所述的PA,其中氨基酸残基Y681被丙氨酸取代。

9.如权利要求1和3-8中任一项所述的PA,其中氨基酸残基L687被丙氨酸取代。

10.如权利要求1、3-5和7-9中任一项所述的PA,其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基E654、R659和M662中的一个或多个被独立地取代。

11.如权利要求1、3-5和7-10中任一项所述的PA,其中氨基酸残基E654被苏氨酸取代。

12.如权利要求1、3-5和7-11中任一项所述的PA,其中氨基酸残基R659被丝氨酸取代。

13.如权利要求1、3-5和7-12中任一项所述的PA,其中氨基酸残基M662被精氨酸取代。

14.如权利要求1-13中任一项所述的PA,其包含基质金属蛋白酶(MMP)切割位点。

15.如权利要求14所述的PA,其中所述MMP切割位点是SEQ ID NO:6或7。

16.核酸,其包含编码权利要求1-15中任一项所述的PA的核苷酸序列。

17.重组表达载体,其包含权利要求16所述的核酸。

18.宿主细胞,其包含权利要求17所述的重组表达载体。

19.组合物,其包含含有第一保护性抗原(PA)氨基酸序列的第一炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)PA和含有第二PA氨基酸序列的第二PA,其中所述第二PA氨基酸序列不同于所述第一PA氨基酸序列,

其中第一PA是权利要求1-15中任一项所述的PA,以及

其中所述第二PA氨基酸序列中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基R200被取代。

20.如权利要求19所述的组合物,其中所述第二PA氨基酸序列的氨基酸残基R200被丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、丝氨酸、缬氨酸或色氨酸取代。

21.如权利要求19所述的组合物,其中所述第二PA氨基酸序列的氨基酸残基R200被丙氨酸取代。

22.如权利要求19-21中任一项所述的组合物,其中所述第二PA包含纤溶酶原激活物切割位点。

23.如权利要求22所述的组合物，其中所述纤溶酶原激活物切割位点选自SEQ ID NO:8-15。

24.如权利要求19-23中任一项所述的组合物，其还包含以下的一种或多种：(i)炭疽芽孢杆菌致死因子(LF)，(ii)炭疽芽孢杆菌水肿因子(EF)，(iii)FP59，和(iv)与炭疽芽孢杆菌毒素LF缀合或融合的细胞致死膨胀毒素亚基B(CdtB)。

25.组合物，其包含权利要求1-15中任一项所述的PA，权利要求16所述的核酸，权利要求17所述的重组表达载体，权利要求18所述的宿主细胞，或权利要求19-24中任一项所述的组合物，其还包含被配制用于肠胃外施用的药学上可接受的载体。

26.如权利要求19-25中任一项所述的组合物，其还包含喷司他丁和环磷酰胺。

27.组合物，其包含权利要求1-15中任一项所述的PA，权利要求16所述的核酸，权利要求17所述的重组表达载体，权利要求18所述的宿主细胞，或权利要求19-26中任一项所述的组合物，其用于治疗或预防哺乳动物的癌症的用途。

28.套装，其包含(a)喷司他丁和环磷酰胺以及(b)权利要求1-15中任一项所述的PA，权利要求16所述的核酸，权利要求17所述的重组表达载体，权利要求18所述的宿主细胞，或权利要求19-26中任一项所述的组合物，其用于治疗或预防哺乳动物的癌症的用途。

29.如权利要求28所述用途的套装，其中(a)在施用(b)之前施用或者(a)与(b)依次施用。

30.如权利要求27-29中任一项所述用途的组合物或套装，其还包含以下的一种或多种：(i)炭疽芽孢杆菌LF，(ii)炭疽芽孢杆菌EF，(iii)FP59，和(iv)与炭疽芽孢杆菌毒素LF缀合或融合的CdtB，其用于治疗或预防哺乳动物的癌症的用途。

31.如权利要求27-30中任一项所述用途的组合物或套装，其中所述癌症是实体瘤。

32.喷司他丁和环磷酰胺的组合，其用于治疗或预防哺乳动物的实体瘤的用途。

33.如权利要求31或32所述用途的组合物、套装或组合，其中所述实体瘤的内皮细胞表达CMG2。

34.如权利要求31-33中任一项所述用途的组合物、套装或组合，其中所述实体瘤是口腔鳞状癌肿瘤、黑色素瘤、肺肿瘤或卵巢肿瘤。

35.如权利要求27-34中任一项所述用途的组合物、套装或组合，其中所述哺乳动物是人、小鼠、猫或狗。

36.权利要求1-15中任一项所述的PA，权利要求16所述的核酸，权利要求17所述的重组表达载体，权利要求18所述的宿主细胞，或权利要求19-26中任一项所述的组合物，其用于抑制靶细胞生长的用途。

修饰的炭疽毒素保护性抗原

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2016年4月15日提交的美国临时专利申请号62/323,218和2015年8月27日提交的美国临时专利申请号62/210,771的权益，其各自通过引用全文并入本文中。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究和开发的声明

[0004] 本发明是由国立卫生研究院、国立过敏和传染病研究所在项目编号HL006185-01、ZIA A10009829-12、1ZIA AI000929-12和Z01DE0699的政府支持下完成的。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0006] 通过引用整体并入本文的是计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表，其与本文同时递交并通过如下来识别：一个名为“726173_ST25.TXT”的49,007字节ASCII的(文本)文件，日期为2016年8月25日。

[0007] 发明背景

[0008] 炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)的炭疽毒素是具有细胞毒活性的细菌毒素，其可以有效破坏或抑制不需要的细胞(例如癌细胞)的生长。因此，炭疽毒素的一种或多种组分可用于治疗或预防诸如例如癌症的疾病。然而，炭疽毒素或其组分可能对正常细胞有毒性。因此，需要改进的炭疽毒素。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的一个实施方案提供了包含保护性抗原(PA)氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参考SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207、I210、E654、I656、R659、M662、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代，并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。

[0011] 本发明的另一个实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207和I210中的一个或两个被独立地取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代，并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。

[0012] 本发明的另一个实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I656、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代。

[0013] 本发明的另一个实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基E654、R659和M662中的一个或多个被独立地取代。

[0014] 本发明的另一个实施方案提供治疗或预防哺乳动物的实体瘤的方法，所述方法包括以有效治疗或预防哺乳动物的实体瘤的量向所述哺乳动物施用喷司他丁和环磷酰胺。

[0015] 本发明进一步的实施方案提供了相关的组合物、核酸、重组表达载体、宿主细胞以及治疗或预防癌症的方法。

附图说明

[0016] 图1是PA寡聚体的示意图，其中每个LF-结合位点包括位于相邻PA单体上的三个亚位点(圆圈)。尽管显示了七聚体，但在八聚体内发生相同的相互作用。

[0017] 图2图示了在100ng/mL LF存在下，用约500ng/mL的所示的PA变体处理RAW264.7巨噬细胞20h的细胞活力(%)。

[0018] 图3A是PA变体的分子间互补的示意图。

[0019] 图3B图示了在100ng/mL LF存在下，用500ng/mL的所示的PA变体(单一蛋白，无阴影柱)、或在100ng/mL LF存在下用250ng/mL的所示的PA变体加250ng/mL PA-R200A(阴影柱)或PA-R200C(条纹柱)，处理RAW264.7巨噬细胞6h的细胞活力(%)。

[0020] 图4A图示了用不同浓度(ng/mL)的PA变体PA-U2-R200A(实心圆)、PA-L1-I207R(实心方块)、PA-L1-I210A(菱形)、PA-L1-I207R+PA-U2-R200A(空心方块)、PA-L1-I210A+PA-U2-R200A(空心圆)，处理的B16-BL6细胞的活力(%)。

[0021] 图4B图示了在第0、1和2天用三次剂量的20μg PA-L1-I207R(方块)或PA-L1-I210A(菱形)加上10μg FP59，经腹膜内注射C57BL/6J小鼠的存活。

[0022] 图5图示了用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(方块)、L1-I210A/U2-R200A/LF(7.5mg/7.5mg/5mg)(圆圈)、L1-I210A/U2-R200A/LF(22.5mg/22.5mg/15mg)(菱形)、L1-I207R/U2-R200A/LF(7.5mg/7.5mg/5mg)(▲)、或L1-I207R/U2-R200A/LF(22.5mg/22.5mg/15mg)(▼)，经腹膜内处理的B16-BL6荷瘤小鼠中的肿瘤重量。在箭头所示的5天中每天施用剂量。

[0023] 图6A-6C图示了在接种后不同时间点(天)，具有A549(A)、LL3(B)或B16(C)肿瘤的$Cmg2^{+/+}$(方块)、$Cmg2^{+/-}$(菱形)或$Cmg2^{-/-}$(圆圈)小鼠的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。

[0024] 图6D-6E图示了在接种后不同时间点(天)，具有LL3(D)或B16(E)肿瘤的$Tem8^{-/-}$小鼠(圆圈)和同窝的$Tem8^{+/+}$小鼠(方块)的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。

[0025] 图6F-6H图示了在接种后不同时间点(天)，具有A549(F)、LL3(G)或B16(H)肿瘤的$Cmg2^{+/+}$(方块)、$Cmg2^{+/-}$(菱形)或$Cmg2^{-/-}$(圆圈)小鼠的体重(g)(平均值±SD)。

[0026] 图6I图示了在接种肿瘤细胞的当天，具有LL3肿瘤的$Tem8^{-/-}$小鼠(灰色条)和同窝的$Tem8^{+/+}$小鼠(黑色条)的体重(g)(平均值±SD)。

[0027] 图6J图示了在接种后不同时间点(天)，具有B16肿瘤的$Tem8^{-/-}$小鼠(圆圈)和同窝的$Tem8^{+/+}$小鼠(方块)的体重(g)(平均值±SD)。

[0028] 图7A和7B图示了在首次处理后不同时间点(天)，用PBS(方块)、PA-L1(圆圈)(A)、或IC2-PA/LF(菱形)(B)处理的LL3荷瘤小鼠的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。在由箭头指示的日期施用处理。

[0029] 图7C图示了在首次处理后各个时间点(天)，用PBS(方块)、PA-L1(圆圈)或IC2-PA/LF(菱形)处理的B16-BL6荷瘤小鼠的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。在由箭头指示的日期施用处理。

[0030] 图7D图示了在LF存在下，用PA(空心方块)或PA-L1(实心方块)处理的LL3细胞、或者用PA(空心圆圈)或PA-L1(实心圆圈)处理的B16-BL6细胞的细胞活力(%)(平均值±SD)。

[0031] 图7E和图7F图示了在首次处理后的日期，用15μg PA-L1加7.5μg LF处理的$Cmg2^{+/+}$(方块)、$Cmg2^{+/-}$(菱形)和$Cmg2^{-/-}$(圆圈)小鼠的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)(E)和体重(g)(平均值±SD)(F)。在由箭头指示的日期施用处理。

[0032] 图7G和7H图示了在首次处理后的日期，用15μg PA-L1加7.5μg LF处理的A549荷瘤的同窝$Tem8^{+/+}$(方块)、$Tem8^{+/-}$(菱形)和$Tem8^{-/-}$(圆圈)小鼠的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)(G)和体重(g)(平均值±SD)(H)。在由箭头指示的日期施用处理。

[0033] 图8A-8C图示了在首次处理后的日期，用30μg PA-L1加上15μg LF处理的，具有所示CMG2基因型的具有B16-BL6黑色素瘤的小鼠的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。在由箭头指示的日期施用处理。

[0034] 图8D图示了在箭头指示的日期用30μg IC2-PA(15μgPA-L1-I207R+15μg PA-U2-R200A)加上10μg LF或PBS处理的，具有B16-BL6黑色素瘤的无内皮细胞特异性CMG2的小鼠和无髓细胞特异性CMG2的小鼠($Cmg2(Mye)^{-/-}$)的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。

[0035] 图8E图示了在由箭头所指示的日期用PA-L1/LF处理的WT小鼠和$Cmg2^{EC}$小鼠的存活(%)。

[0036] 图8F图示了在第0天、第2天和第4天用PBS(左边条)或3次剂量的30μg PA-L1加上15μg LF(右边条)处理的小鼠每10mm^2的血管数目。

[0037] 图9A图示了在LF(500ng/mL)存在下，与不同浓度的PA-L1一起孵育的肿瘤内皮细胞的细胞密度(%)。数据显示为平均值±SD。

[0038] 图9B图示了在基础条件或在依次添加线粒体抑制剂(寡霉素、FCCP和抗霉素A)后的条件下，在不同时间点(min)所测量的经或未经PA-L1/LF(各1μg/mL)处理24h的肿瘤内皮细胞的ECAR(mpH/min)。将ECAR读数标准化为具有50mg总蛋白的细胞量，平均值±SD。(n＝3次独立实验)。

[0039] 图9C图示了在基础条件或在依次添加线粒体抑制剂(寡霉素、FCCP和抗霉素A)后的条件下，在不同时间点(min)所测量的经或未经PA-L1/LF(各1μg/mL)处理24h的肿瘤内皮细胞的OCR(pM/min)。将OCR读数标准化为具有50mg总蛋白的细胞量，平均值±SD。(n＝3次独立实验)。

[0040] 图9D图示了用(黑灰色柱)或不用(浅灰色柱)PA-L1/LF(各1μg/mL)处理的细胞的(i)通过从内皮细胞的基础OCR减去添加寡霉素后的OCR获得的OCR_{ATP}，(ii)备用呼吸能力(SRC)，以及(iii)最大呼吸(MR)值。数据显示为平均值±SD。

[0041] 图9E图示了用PA-L1/LF(各0.5μg/mL或2μg/mL)处理24h的肿瘤内皮细胞相对于未处理细胞的相对细胞ATP水平。数据显示为平均值±SD。

[0042] 图9F图示了用或不用PA-L1/LF(各1μg/mL)处理24h的肿瘤内皮细胞中所示基因的表达变化(%)。使用真核翻译起始因子EIF35S作为内部标准化对照。*，$P<0.05$；***，$P<0.01$。

[0043] 图10A和10B图示了在肿瘤接种后的不同时间点(天)，用PBS(实心方块)，IC2-PA/LF(20μg/6.7μg)(*和空心圆)，PC方案(1mg喷司他丁和50mg环磷酰胺)(▽)，高(25μg/8.1μg)(△)、中等(20μg/6.7μg)(空心方块)或低(15μg/5μg)(菱形和▲)剂量的IC2-PA/LF与PC方案的组合处理的具有LL3肺癌的免疫活性C57BL/6小鼠的肿瘤体积(mm^3)(A)和体重(g)(B)。箭头表示PC和毒素处理的时间表。肿瘤重量，平均值±SE。体重，平均值±SD。

[0044] 图10C图示了第1轮(实心圆)或第2轮(空心圆)治疗之后，在从图10A和10B中的代表性小鼠获得的不同稀释度的血清存在下，与IC2-PA/LF(各100ng/mL)孵育5h的RAW264.7细胞的活力(%)。第2轮(菱形)或第3轮(△)治疗后，用PC和IC2-PA/LF处理的细胞的活力，用PC(▼)或PBS(方块)处理的细胞的活力也被示出。

[0045] 图10D图示了第一轮治疗(圆圈)后，在从图10A和10B中的代表性小鼠获得的不同稀释度的血清存在下，与IC2-PA/LF(各100ng/mL)孵育5h的RAW264.7细胞的活力(%)。第4

轮治疗(方块)后,用PC和IC2-PA/LF处理的细胞的活力也被示出。

[0046] 图10E图示了使用各种浓度的14B7抗-PA单克隆抗体作为中和抗体的阳性对照,如图10A-10D所述进行处理的细胞的活力(%)。

[0047] 图11A-11D图示了在用PBS(灰色柱)、PC(黑柱)、IC2-PA/LF(右条纹柱)或组合的PC和毒素(左条纹柱)进行第二循环治疗后,通过流式细胞术测量的从具有B16-BL6黑色素瘤的小鼠中分离的对所示的B细胞(A)、T细胞(B和C)、或粒细胞标志物(D)呈阳性的细胞数(百万)。测量初始未处理的细胞(白色柱)作为对照。

[0048] 图11E图示了图11A-11D中处理的小鼠的总脾细胞计数(百万)。

[0049] 图12A图示了在接种后不同时间点(天),$Tem8^{-/-}$小鼠(圆圈)、$Tem8^{+/-}$小鼠(菱形)、具有A549肿瘤的$Tem8^{+/+}$小鼠(方块)的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。

[0050] 图12B图示了在接种后不同时间点(天),$Tem8^{-/-}$小鼠(灰色条)和具有LL3肿瘤的$Tem8^{+/+}$小鼠(黑色条)的肿瘤体积(mm^3)(平均值±SE)。

[0051] 图12C图示了在接种后不同时间点(天),$Tem8^{-/-}$小鼠(圆圈)、$Tem8^{+/-}$小鼠(菱形)、具有A549肿瘤的$Tem8^{+/+}$小鼠(方块)的体重(g)(平均值±SD)。

[0052] 图12D图示了在接种后不同时间点(天),$Tem8^{-/-}$小鼠(灰色条)和具有LL3肿瘤的$Tem8^{+/+}$小鼠(黑色条)的体重(g)(平均值±SD)。

[0053] 图12E图示了具有下列基因型并且喂食以下食物的牙齿不整齐的小鼠的百分比:$Tem8^{+/+}$(硬质食物)(n=46)(实心方块);$Tem8^{+/+}$(软质食物)(n=26)(空心方块);$Tem8^{+/-}$(硬质食物)(n=91)(实心菱形);$Tem8^{-/-}$(硬质食物)(n=61)(空心菱形);$Tem8^{+/-}$(软质食物)(n=151)(实心圆);和$Tem8^{-/-}$(软质食物)(n=74)(空心圆圈)。

[0054] 图12F和12G图示了喂食硬质食物且具有以下基因型的雌性(F)和雄性(G)小鼠的体重:$Tem8^{+/+}$(方块);$Tem8^{+/-}$(菱形);和$Tem8^{-/-}$(圆圈)。

[0055] 图12H和12I图示了喂食软质食物且具有以下基因型的雌性(H)和雄性(I)小鼠的体重:$Tem8^{+/+}$(方块);$Tem8^{+/-}$(菱形);和$Tem8^{-/-}$(圆圈)。

[0056] 图13A图示了用LF和不同浓度的PA处理的细胞的活力(%)。细胞类型和处理如下:用PA/LF处理的A549细胞(空心方块);用PA-L1/LF处理的A549细胞(实心方块);用PA/LF处理的Colo205细胞(空心圆圈);和用PA-L1/LF处理的Colo205细胞(实心圆圈)。

[0057] 图13B图示了用FP59和不同浓度的PA处理的细胞的活力(%)。细胞类型和处理如下:用PA/FP59处理的A549细胞(虚线右边的条纹柱);用PA-L1/FP59处理的A549细胞(虚线右侧的阴影柱);用PA/FP59处理的Colo205细胞(虚线左边的条纹柱);和用PA-L1/FP59处理的Colo205细胞(虚线左边的阴影柱)。

[0058] 图14图示了在首次处理后的不同时间点(天),小鼠中的Colo205肿瘤体积(mm^3)。在箭头所示的日期施用处理。基因型和处理如下:用PBS处理的$Cmg2^{+/+}$小鼠(空心方块);用PA-L1/LF处理的$Cmg2^{+/+}$小鼠(实心方块);用PBS处理的$Cmg2^{-/-}$小鼠(空心菱形);和用PA-L1/LF处理的$Cmg2^{-/-}$小鼠(实心菱形)。

[0059] 图15A和15B图示了在肿瘤接种后不同时间点(天),接受指定处理的具有B16-BL6黑色素瘤肿瘤的小鼠的肿瘤体积(mm^3)(A)和体重(g)(B)。在箭头所示的日期进行处理。处理如下:PBS(实心方块);IC2-PA/LF(圆圈);PC(三角形);和PC+IC2-PA/LF(空心方块)。

[0060] 图15C图示了在指定的治疗轮次后,在从图15A和15B中的代表性小鼠获得的不同

稀释度的血清存在下，与指定处理一起孵育的细胞的活力(%)。处理和治疗轮次如下：IC2-PA/LF(第2轮)(圆圈)；PC(▼)；PC+IC2-PA/LF(第2轮)(△)；PC+IC2-PA/LF(第5轮)(▲)；PBS(实心方块)；和初始(未经处理)(空心方块)。

[0061] 图15D图示了用LF和指定浓度的PA处理的细胞的活力(%)。PA的EC_{50}为6ng/mL。

[0062] 图16A和16B图示了用不同浓度的环磷酰胺(A)或喷司他丁(B)处理的LL3(圆圈)和B16-BL细胞(方块)的活力(%)。

[0063] 图16C图示了用不同浓度的喷司他丁和环磷酰胺处理的LL3(圆圈)或B16-BL细胞(方块)的活力(%)。

[0064] 图16D图示了用不同浓度的喷司他丁和环磷酰胺处理的内皮细胞的活力(%)。

[0065] 图17A图示了在注射天然的PA和FP59后的不同时间点(h)，野生型(WT)(方块)、$CMG2^{-/-}$(圆圈)和$TEM8^{-/-}$(菱形)小鼠的存活(%)。为每种毒素指示出组的大小。

[0066] 图17B图示了在注射PA I656Q和FP59后的不同时间点(h)，WT(方块)、$CMG2^{-/-}$(圆圈)和$TEM8^{-/-}$(菱形)小鼠的存活(%)。为每种毒素指示出组的大小。

[0067] 图17C图示了在注射PA I656V和FP59后的不同时间点(h)，WT(方块)、$CMG2^{-/-}$(圆圈)和$TEM8^{-/-}$(菱形)小鼠的存活(%)。为每种毒素指示出组的大小。

[0068] 图17D图示了(i)注射PA E654T/R659S/M662R蛋白(缩写为PA TSR)和FP59后，在不同时间点(h)的WT(空心方块)和$CMG2^{-/-}$(空心圆圈)小鼠，以及)和(ii)注射天然PA和FP59后在不同时间点(h)的WT(实心方块)和$CMG2^{-/-}$(实心圆圈)小鼠的存活率(%)。为每种毒素指示出组的大小。

[0069] 图18A图示了带有HeLa细胞异种移植物并经腹膜内注射以下物质的小鼠的体重(g)：PBS(■)、15μg PA-L1+5μg LF(▲)、15μg PA-L1I656Q+5μg LF(●)、或30μg PA-L1TSR+10μg LF(◆)。为每种毒素指示出组的大小。

[0070] 图18B图示了带有HeLa细胞异种移植物并经腹膜内注射以下物质的小鼠中皮内肿瘤结节的重量(g)(表示为肿瘤重量的平均值)：PBS(■)、15μg PA-L1+5μg LF(▲)、15μg PA-L1I656Q+5μg LF(●)、或30μgPA-L1TSR+10μg LF(◆)。为每种毒素指示出组的大小。箭头表示注射毒素的日期。PBS相对于PA-L1/LF＝$P<0.01$。PBS相对于PA-L1-I656Q/LF＝$P<0.01$。PA-L1-TSR/LF相对于PA-L1/LF＝$P<0.01$。PA-L1-TSR/LF相对于PA-L1-I656Q/LF＝$P<0.01$。

[0071] 图19A和19C图示了在首次处理后的不同时间点(天)，用750μgIC2-PA(PA-L1-I207R+PA-U2-R200A)加250μg LF处理的狗1(A)和狗2(C)中口腔黑色素瘤肿瘤大小(cm^3)。最右边的箭头表示手术切除肿瘤。剩下的箭头表示用IC2-PA加LF处理狗的日期。

[0072] 图19B和19D图示了在用IC2-PA加LF第一次处理后的不同时间点，狗1(B)和狗2(D)的体重(kg)。

[0073] 发明详述

[0074] 炭疽毒素是由炭疽芽孢杆菌产生的蛋白毒素。炭疽毒素包括三个组分：保护性抗原(PrAg或PA)、致死因子(LF)和水肿因子(EF)。PA能结合PA的细胞表面受体。天然野生型PA在序列RKKR(SEQ ID NO:4)之后被细胞表面弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样蛋白酶切割成两个片段：PrAg63和PrAg20。PrAg63是保留受体结合并形成同源寡聚七聚体的63kDa的C-末端片段。PrAg20是释放到细胞培养基中的20kDa的N末端片段。PrAg63同源寡聚七聚体形成效应

物组分LF和/或EF的结合位点。每个LF/EF结合位点由两个相邻PA单体上的三个亚位点组成。在LF和/或EF与PA结合后，所得到的复合物被内化于靶细胞中，在这里LF和/或EF发挥毒性作用。

[0075] 未成熟的天然野生型PA氨基酸序列如Genbank登录号No.NP_052806(SEQ ID NO:2)所示。未成熟的天然野生型PA氨基酸序列的编码序列是SEQ ID NO:33的核苷酸序列。另一种未成熟的PA氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。未成熟的PA含有在成熟形式PA中被去除的N-末端信号肽(SEQ ID NO:3，其对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-29)。成熟的野生型PA氨基酸序列(不含N-末端信号肽)如SEQ ID NO:1所示。

[0076] 除非另外指明，在本文中通过参照成熟的野生型PA氨基酸序列SEQ ID NO:1的氨基酸序列来定义PA的氨基酸残基位置编号。因此，在本文中通过参照存在于特定位置的氨基酸残基，接着是在所讨论的特定取代中替换该残基的氨基酸，来描述PA的取代。就此而言，在本文中按照如SEQ ID NO:1所定义的位置，来提及PA的特定实施方案的氨基酸序列的位置。PA的特定实施方案的氨基酸序列的实际位置是相对于SEQ ID NO:1的相应位置来定义，并且可以表示与SEQ ID NO:1的残基位置编号不同的残基位置编号。因此，例如，取代是指PA的特定实施方案的氨基酸序列中对应于SEQ ID NO:1的735个氨基酸的序列的指定位置的氨基酸残基的替换，理解为在各个氨基酸序列中的实际位置可以不同。例如，当位置如SEQ ID NO:1所定义时，术语“R200”是指通常存在于SEQ ID NO:1的位置200的精氨酸，“R200A”是指通常存在于SEQ ID NO:1的位置200的精氨酸被丙氨酸替换，而“I207R”是指通常存在于SEQ ID NO:1的位置207上的异亮氨酸已经被精氨酸替换。在两个或更多个位置发生多重取代的情况下，两个或更多个取代可以相同或不同，即被取代的两个或更多个氨基酸残基中的每一个氨基酸残基可以被相同或不同的氨基酸取代，除非另外明确指出。

[0077] PA的变体及其组合可以提供癌细胞特异性细胞毒性。例如，PA变体PA-U2-R200A是尿激酶纤溶酶原激活物活化的PA变体，其LF结合亚位点II残基R200突变为Ala；并且PA变体PA-L1-I210A是基质金属蛋白酶活化的PA变体，其LF结合的亚位点III残基I210突变为Ala。当单独使用时，PA-U2-R200A和PA-L1-I210A提供降低的细胞毒性。然而，当PA-U2-R200A和PA-L1-I210A(统称为IC-PA)组合时，其通过分子间互补形成能够进行LF-结合的异源寡聚体，并在肿瘤靶向中实现高特异性。然而，IC-PA可能对正常组织提供不希望的非特异性毒性。

[0078] 已经发现，将炭疽芽孢杆菌PA的位置207和210中的一个或两个上的天然氨基酸残基替换为除丙氨酸以外的氨基酸残基，有利地降低对正常组织的非特异性毒性，并提供有效的抗肿瘤活性。因此，本发明的实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1定义的氨基酸残基I207和I210中的一个或两个被独立地取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代，并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。

[0079] 在优选的实施方案中，PA包含PA氨基酸序列，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207被取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代。

[0080] 氨基酸残基I207和I210可独立地被丙氨酸以外的任何氨基酸残基取代。优选地，氨基酸残基I210被天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸或丝氨酸取代。优选地，氨基酸残基I207被精氨酸、色氨酸或酪氨酸取代。在特别优选的实施方案中，氨基酸残基I207被精氨酸取代。

[0081] 还发现，替换炭疽芽孢杆菌PA的位置656、681和687中一个或多个的天然氨基酸残基，有利地提高对CMG2(其由肿瘤内皮细胞表达)的选择性，降低对正常组织的非特异性毒性，并提供有效的抗肿瘤活性。因此，本发明的实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I656、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代。

[0082] 氨基酸残基I656、Y681和L687可独立地被任何氨基酸残基取代。优选地，氨基酸残基I656被谷氨酰胺、缬氨酸、丙氨酸、半胱氨酸或谷氨酸取代。优选地，氨基酸残基Y681被丙氨酸取代。优选地，氨基酸残基L687被丙氨酸取代。

[0083] 还发现，替换炭疽芽孢杆菌PA的位置654、659和662中的一个或多个的天然氨基酸残基，有利地提高了对TEM8的选择性。因此，本发明的实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基E654、R659和M662中一个或多个被独立地取代。其中氨基酸残基E654、R659和M662中的一个或多个被取代的PA，可以用作例如研究工具和/或可以提供针对具有TEM8高表达的肿瘤的抗肿瘤活性。

[0084] 氨基酸残基E654、R659和M662可独立地被任何氨基酸残基取代。优选地，氨基酸残基E654被苏氨酸取代。优选地，氨基酸残基R659被丝氨酸取代。优选地，氨基酸残基M662被精氨酸取代。

[0085] 本发明的PA可包含本文所述的任何氨基酸残基取代的任何组合。因此，本发明的实施方案提供了包含PA氨基酸序列的炭疽芽孢杆菌PA，其中参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207、I210、E654、I656、R659、M662、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代，并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代。

[0086] 如本文所用，术语“保护性抗原”、“PA”和“PrAg”包括这样的PA，其包括以下修饰中的任何一种或多种：(a)天然细胞识别结构域被非天然细胞识别结构域取代；(b)天然蛋白水解活化位点被非天然蛋白水解活化位点取代；(c)修饰第一PA以生成第一修饰的PA，由此第一修饰的PA可以仅与第二PA配对；或(d)修饰第一PA和第二PA，由此效应物组分(例如LF和/或EF)可以仅在由第一PA和第二PA相互作用形成的位点处结合。

[0087] 例如，PA可以通过将天然细胞识别结构域用非天然细胞识别结构域取代来修饰，如在例如美国专利7,947,289中所描述的，该专利通过引用并入本文。非天然细胞识别结构域识别和/或结合在靶细胞群(例如癌细胞)表面上的分子，从而使修饰的PA特异性地靶向靶细胞。天然细胞识别结构域的取代，可包括例如用针对另一种细胞表面分子的识别结构域取代天然细胞识别结构域。PA可以被修饰以使其不再与PA受体结合，但与其他细胞表面分子(例如细胞因子受体)结合。PA也可以被修饰以使其除了结合其他细胞表面分子之外还结合PA受体。示例性的非天然细胞识别结构域包括例如抗体、细胞因子或细胞表面受体配体。合适的非天然细胞识别结构域包括：例如VEGF、C-CSF、GM-CSF、EPO、EGF、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、干扰素α、干扰素γ、生长激素、催乳素、血小板生成素和TGF-β。示例性抗体可包括：例如特异性结合在癌细胞上过表达的蛋白的抗体，所述蛋白例如Her2/Neu、CD19、CD276、CD25、CD30、CA19-9、CA-125、VEGF受体、C-CSF受体、GM-CSF受体、EPO受体、EGF受体、白介素受体(例如IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-5R或IL-6R)、干扰素受体(例如干扰素α或干扰素γ)、生长激素受体、催乳素受体、血小板生成素受体和TGF-β受体。

[0088] 可选地或另外地，如美国专利7,947,289中所述，可以通过用非天然蛋白水解切割

位点取代天然蛋白水解切割位点来修饰PA，所述专利通过引用并入本文。因此，PA可以通过由存在于特定靶细胞类型(例如癌细胞)表面上的蛋白酶来切割而被激活。可以取代PA上的天然切割位点的蛋白水解切割位点的实例，包括本领域已知的任何蛋白酶的切割位点，所述蛋白酶包括：例如金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、纤溶酶原激活物、激肽释放酶、1型跨膜丝氨酸蛋白酶、2型跨膜丝氨酸蛋白酶、或GPI锚丝氨酸蛋白酶。蛋白酶包括：例如纤溶酶原激活物(uPA和tPA)、基质金属蛋白酶(例如MMP-1；MMP-2；MMP-3；MMP-7；MMP-8；MMP-9；MMP-10；MMP-11；MMP-12；MMP-13；MMP-14；MMP-15；MMP-16；MMP-17；MMP-19；MMP-20；MMP-21；MMP-23A；MMP-23B；MMP-24；MMP-25；MMP-26；MMP-27；MMP-28；和MT2-MMP)；金属蛋白酶(例如Meprin a；Meprin b；Decysin；ADAM1a；ADAM2；ADAM3B；ADAM4；ADAM4B；ADAM5；ADAM6；ADAM7；ADAM8；ADAM9；ADAM10；ADAM11；ADAM12；ADAM15；ADAM17；ADAM18；ADAM19；ADAM20；ADAM21；ADAM22；ADAM23；ADAM28；ADAM29；ADAM30；ADAM32；ADAM33；ADAMTS1；ADAMTS2；ADAMTS3；ADAMTS4；ADAMTS5/11；ADAMTS6；ADAMTS7；ADAMTS8；ADAMTS9；ADAMTS10；ADAMTS12；ADAMTS13；ADAMTS14；ADAMTS15；ADAMTS16；ADAMTS17；ADAMTS18；ADAMTS19；ADAMTS20)；丝氨酸蛋白酶(例如激肽释放酶hK1；激肽释放酶hK2；激肽释放酶hK3/PSA；激肽释放酶hK4；激肽释放酶hK5；激肽释放酶hK6；激肽释放酶hK7；激肽释放酶hK8；激肽释放酶hK9；激肽释放酶hK10；激肽释放酶hK11；激肽释放酶hK12；激肽释放酶hK13；激肽释放酶hK14；激肽释放酶hK15；凝血酶；凝血因子VIIa；凝血因子IXa；凝血因子Xa；凝血因子XIa；凝血因子XIIa；蛋白质C；蛋白质Z；马斯汀(Mastin)；类胰蛋白酶α1；类胰蛋白酶α2；类胰蛋白酶β31；类胰蛋白酶δ1；类胰蛋白酶γ1；Marapsin；Marapsin-2；睾蛋白(Testisin)；脑丝氨酸蛋白酶-2；前列腺蛋白；前列腺样蛋白-1；前列腺样蛋白-2；糜蛋白酶；组织蛋白酶G；嗜中性粒细胞弹性蛋白酶；天青杀素(Azurocidin)；Hepsin；HAT相关蛋白酶；HAT(人气道胰蛋白酶样蛋白酶)；I型跨膜丝氨酸蛋白酶、II型跨膜丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、HAT样-1；HAT样-2；HAT样-3；HAT样-4；HAT样-5；DESC1；Corin；蛋白裂解酶；蛋白裂解酶-2；蛋白裂解酶-3；TMPRSS3；TMPRSS4；脊骨蛋白(Spinein)；多聚丝氨酸酶(Polyserase)；MSPL；神经胰蛋白酶；尿激酶纤溶酶原激活物；组织纤溶酶原激活物；纤溶酶原；顶体蛋白(Acrosin)；血浆激肽释放酶样-1；血浆激肽释放酶样-2；血浆激肽释放酶样-3；血浆激肽释放酶样-4；和Seprase)；和天冬氨酸蛋白酶(例如组织蛋白酶D；和组织蛋白酶E)；半胱氨酸蛋白酶(例如组织蛋白酶B；组织蛋白酶C；组织蛋白酶F；组织蛋白酶H；组织蛋白酶K；组织蛋白酶L；组织蛋白酶L2；组织蛋白酶S；组织蛋白酶W；组织蛋白酶Z和组织蛋白酶J)。

[0089] 在优选的实施方案中，通过用MMP切割位点或纤溶酶原激活物切割位点取代天然蛋白水解切割位点来修饰PA。MMP和纤溶酶原激活物蛋白酶都是由肿瘤组织过量产生的，并且参与癌细胞生长和转移(Dano等人，APMIS，107：120-127(1999))。在本发明的实施方案中，PA的天然弗林蛋白酶切割位点(例如，SEQ ID NO:4)被替换为MMP切割位点或纤溶酶原激活物切割位点。可用于本发明PA的MMP切割位点的实例包括GPLGMLSQ(SEQ ID NO:6)和GPLGLWAQ(SEQ ID NO:7)。在这方面，PA可包含MMP切割位点。可用于本发明PA的纤溶酶原激活物切割位点的实例包括：PCPGRVVGG(SEQ ID NO:8)，PGSGRSA(SEQ ID NO:9)，PGSGKSA(SEQ ID NO:10)，PQRGRSA(SEQ ID NO:11)，PCPGRVVGG(SEQ ID NO:12)，GSGRSA(SEQ ID NO:13)，GSGKSA(SEQ ID NO:14)，QRGRSA(SEQ ID NO:15)。在这方面，PA可包含纤溶酶原激

活物切割位点。

[0090] 可选地或另外地，PA可被修饰以便每个单独的PA分子(PA单体)仅可以形成异源寡聚体(即，每个PA单体仅可与不同类型的PA单体(即，具有不同的氨基酸序列)配对)，如例如美国专利7,947,289中所述，其通过引用并入本文。修饰的PA单体可以包含已修饰的PA单体结合位点，使得PA单体仅可结合不同类型的PA单体。在一些实施方案中，PA单体结合位点已被修饰，使得PA单体可以结合两种不同类型的两种PA单体。例如，可以修饰形成七聚体复合物的PA单体，使得每个PA单体仅可结合两种不同但互补的PA单体，每种单体具有修饰的PA单体结合位点。例如，以下氨基酸取代中的一个或多个可以提供仅形成异源寡聚七聚体的PA单体：位置512的天冬氨酸替换为丙氨酸；位置512的天冬氨酸替换为赖氨酸；位置199的赖氨酸替换为谷氨酸；位置468的精氨酸替换为丙氨酸；以及位置470的精氨酸替换为天冬氨酸。例如，如参照SEQ ID NO:1所定义，包含位置512的丙氨酸的修饰的PA单体不能够进行同源寡聚，但可以与具有位置199的谷氨酸、位置468的丙氨酸和位置470的天冬氨酸的修饰的PA形成功能性的异源寡聚体。

[0091] 可选地或另外地，PA可以被修饰以使得需要至少两个PA单体(各自具有不同的氨基酸序列)来结合效应物组分(例如LF和/或EF)，从而效应物组分可以被递送至靶细胞，并发挥生物学作用(例如杀死靶细胞，或抑制靶细胞增殖)，如在例如美国专利7,947,289中所述，其通过引用并入本文。与效应物组分结合的第一PA单体的部分可以被修饰，以使得需要不同类型的第二PA单体(即，具有不同的氨基酸序列)来有效地结合效应物分子。

[0092] 例如，PA的天然致死因子(LF)结合位点可以被突变，以使得需要至少两种不同的PA单体类型来结合LF。在本发明的实施方案中，在一个或多个以下位置处的天然氨基酸残基的取代可以提供不能同源寡聚体化而形成功能性LF结合位点的PA单体：如SEQ ID NO:1所定义的位置178、197、200、207、210和214。然而，在本发明的一个实施方案中，以下组合可形成能结合LF的功能性PA七聚体：(i)包含对位于位置200的天然氨基酸残基的取代的PA单体，和(ii)包含对位于位置207的天然氨基酸残基的取代的PA单体。在本发明的另一个实施方案中，以下组合可形成能结合LF的功能性PA七聚体：(i)包含对位于位置200的天然氨基酸残基的取代的PA单体，和(ii)包含对位于位置210的氨基酸残基的取代的PA单体。例如，一个或多个以下的取代可以提供不能同源寡聚体化而形成功能性LF结合位点的PA单体：如参考SEQ ID NO:1所定义，位置178的精氨酸替换为丙氨酸；位置197的赖氨酸替换为丙氨酸；位置200的精氨酸替换为丙氨酸；位置207的异亮氨酸替换为精氨酸；位置210的异亮氨酸替换为丙氨酸；位置214的赖氨酸替换为丙氨酸。包含位置200的丙氨酸的修饰的PA单体(例如R200A)，包含位置210的丙氨酸的修饰的PA单体(例如，I210A)，包含位置210的精氨酸的修饰的PA单体(例如I207R)，以及包含位置214的丙氨酸的修饰的PA单体(例如K214A)，不能够同源寡聚体化并形成能结合LF的功能性PA七聚体。然而，以下组合可以形成能结合LF的功能性PA七聚体：(i)具有R200A或R200C的取代的PA单体中的任何一个或多个，与(ii)具有I207R、I207W、I210D、I210E、I210K、I210Q、I210R或I210S的取代的PA单体中的任何一个或多个。例如，包含R200A的PA单体和包含I207R的PA单体的组合，可形成能结合LF的功能性PA七聚体。

[0093] 因此，本发明的实施方案还提供了包含本文所述的任何PA单体的组合的组合物，其中当所述PA单体单独使用时不能够同源寡聚体化并形成能结合LF的功能性PA七聚体，但

当组合时可形成能结合LF的功能性PA七聚体。因此，本发明的实施方案提供了组合物，其包含：含有第一PA氨基酸序列的第一PA和含有第二PA氨基酸序列的第二PA。第一PA包含第一PA氨基酸序列，其中(i)如参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207和I210中的一个或两个被独立地取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代，并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代；(ii)如参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I207、I210、E654、I656、R659、M662、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代，条件是氨基酸残基I207不被丙氨酸取代，并且氨基酸残基I210不被丙氨酸取代；(iii)如参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基I656、Y681和L687中的一个或多个被独立地取代；或(iv)如参照SEQ ID NO:1所定义的氨基酸残基E654、R659和M662中的一个或多个被独立地取代。第二PA包含第二PA氨基酸序列，其中如参照SEQ ID NO:1所定义的，第二PA氨基酸序列的氨基酸残基R200被取代。第二PA氨基酸序列不同于第一PA氨基酸序列。

[0094] 第二PA氨基酸序列的氨基酸残基R200，可以被任何氨基酸残基取代。在本发明的实施方案中，第二PA氨基酸序列的氨基酸残基R200被以下的氨基酸取代：丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、丝氨酸、缬氨酸或色氨酸。在优选的实施方案中，第二PA氨基酸序列的氨基酸残基R200被丙氨酸取代。

[0095] 第一PA和第二PA可以包括本文结合本发明的其他方面描述的修饰中的任何修饰。在本发明的实施方案中，通过用本文所述的任何一种或多种非天然蛋白水解切割位点取代天然蛋白水解切割位点来修饰第二PA氨基酸序列。在本发明的实施方案中，第一PA包含MMP切割位点，第二PA包含纤溶酶原激活物切割位点。纤溶酶原激活物切割位点可以选自SEQ ID NO:8-15。

[0096] 本发明的组合物可进一步包含效应物组分，其与由修饰的PA形成的七聚体结合，并发挥生物学效应(例如杀死靶细胞，或抑制靶细胞增殖)。合适的效应物组分包括例如炭疽致死因子、炭疽水肿因子、截短的炭疽致死因子(例如LFn或炭疽致死因子的氨基酸1-254)、FP59(与假单胞菌外毒素A的ADP-核糖基化结构域融合的LFn，其描述于例如Arora等人，J.Biol.Chem.268:3334-3341(1993)和WO 01/21656中)，以及与炭疽芽孢杆菌毒素LF缀合或融合的细胞致死膨胀毒素亚基B(CdtB)，其描述于国际公开号WO 2014/205187中。

[0097] 毒素蛋白，例如本文所述的PA，在施用于哺乳动物时可以是高度免疫原性的。这种免疫原性可以减少可以给予哺乳动物的PA的量，这进而又会降低PA对于治疗或预防诸如癌症的疾病的有效性。已经发现，喷司他丁和环磷酰胺的组合有利地减少或防止诱导针对本文所述的本发明PA的抗体。因此，本发明的实施方案提供了本文所述的任何组合物，其中所述组合物还包含免疫抑制剂。在本发明的实施方案中，免疫抑制剂是喷司他丁和环磷酰胺的组合。

[0098] 本发明的实施方案提供了包含编码本文所述的任何本发明PA的核苷酸序列的核酸。在一个实施方案中，所述核酸包含编码含有I207R取代的PA氨基酸序列的核苷酸序列，其中所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:29。

[0099] 如本文所用，术语“核酸”包括“多核苷酸”，“寡核苷酸”和“核酸分子”，并且通常意指DNA或RNA的聚合物，其可以是单链或双链的，其可以是合成的或从天然来源获得的(例如，分离、纯化、或分离和纯化)，其可以含有天然的、非天然的、或改变的核苷酸，并且其可以含有天然的、非天然的、或改变的核苷酸间连接如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键，而不是

在未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间发现的磷酸二酯。通常优选核酸不包含任何插入、缺失、倒位、取代或其组合。然而，如本文所讨论的，在一些情况下，核酸包含一个或多个插入、缺失、倒位、取代或其组合可能是合适的。

[0100] 优选地，本发明的核酸是重组体。如本文所用，术语“重组体”是指：(i)通过连接天然的或合成的核酸片段而在活细胞外构建的分子，或(ii)由上述(i)中所述的那些分子进行复制而产生的分子。为了本文的目的，复制可以是体外复制或体内复制。

[0101] 可以使用本领域已知的程序基于化学合成、酶促连接反应或其组合来构建核酸。参见例如Green和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第4版(2012)。例如，可以使用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸来化学合成核酸，所述修饰的核苷酸被设计成增加分子的生物稳定性或增加杂交后形成的双链体的物理稳定性(例如硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸)。可用于产生核酸的修饰核苷酸的实例包括但不限于：5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基Q核苷(queosine)、肌苷、N^6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N^6-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基Q核苷、5’-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫代-N^6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。或者，可以从诸如Macromolecular Resources(Fort Collins,CO)和Synthegen(Houston,TX)的公司购买一种或多种本发明的核酸。

[0102] 本发明还提供了核酸，其包含与本文所述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或在严格条件下与本文所述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0103] 在严格条件下杂交的核苷酸序列，优选在高度严格条件下杂交。“高度严格条件”是指，核苷酸序列与靶序列(本文所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交的量，可检测地比非特异性杂交强。高度严格条件包括将具有精确互补序列的多核苷酸，或仅含有少数散布错配的多核苷酸，与恰好仅具有与所述核苷酸序列匹配的几个小区域(例如3-10个碱基)的随机序列区分开的条件。这种互补性的小区域比14-17个或更多个碱基的全长互补物更容易解链，而高度严格杂交使其易于区分。相对高的严格条件将包括：例如，低盐条件、高温条件或它们的组合，如由约0.02-0.1M氯化钠或其等同物在约50-70℃温度下所提供的。这样的高度严格条件容许在核苷酸序列与模板或靶链之间少量的错配(如果有的话)，并且特别适用于检测任何本发明的蛋白或嵌合分子的表达。通常认为，通过加入增加量的甲酰胺可以使条件变得更加严格。

[0104] 本发明还提供了这样的核酸：其包含与本文描述的任何核酸具有约70％或更多，例如约80％或更多，约90％或更多，约91％或更多，约92％或更多，约93％或更多，约94％或更多，约95％或更多，约96％或更多，约97％或更多，约98％或更多，或约99％或更多的同一性的核苷酸序列。

[0105] 本发明的核酸可以掺入重组表达载体中。就此而言，本发明提供了包含任何本发

明的核酸的重组表达载体。为了本文的目的，术语“重组表达载体”是指遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体，当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列，并且使该载体在足以使

[0106] mRNA、蛋白质、多肽或肽在宿主细胞内表达的条件下与宿主细胞接触时，所述构建体允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体整体上不是天然存在的。然而，载体的部分可以是天然存在的。本发明的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸，包括但不限于DNA和RNA，其可以是单链或双链的，其可为合成的或部分从天然来源获得，并且其可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在的、非天然存在的核苷酸间连接或这两种类型的连接。优选地，非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连接不妨碍载体的转录或复制。

[0107] 本发明的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体，并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括那些设计用于繁殖和扩增、或用于表达、或用于这两者的载体，例如质粒和病毒。载体可以选自：pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)，pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,瑞典)，以及pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。也可以使用噬菌体载体，例如λGT10、λGT11、λZapII(Stratagene)、λEMBL4和λNM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI1 01.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。优选地，重组表达载体是病毒载体，例如逆转录病毒载体。

[0108] 本发明的重组表达载体可以使用标准重组DNA技术来制备，其描述于例如Green和Sambrook，同上。可以制备呈环状或线性的表达载体构建体，以含有在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可以来自例如ColE1、2μ质粒、λ、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0109] 可取的是，重组表达载体包含调节序列如转录和翻译起始和终止密码子，视情况而定并考虑载体是基于DNA还是RNA的，其对于导入载体的宿主(例如细菌、真菌、植物或动物)的类型是特异性的。

[0110] 重组表达载体可以包含一个或多个标记基因，其允许选择转化或转染的宿主。标记基因包括杀生物剂抗性，例如对抗生素、重金属等的抗性，在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型等。用于本发明表达载体的合适的标记基因包括，例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0111] 重组表达载体可包含与编码本发明蛋白或嵌合分子(包括功能部分和功能变体)的核苷酸序列，或与编码所述蛋白或嵌合分子的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列，可操作地连接的天然或非天然的启动子。启动子的选择，例如强、弱、可诱导的、组织特异性的和发育特异性的，均在普通技术人员的技术范围内。类似地，核苷酸序列与启动子的组合也在普通技术人员的技术范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子，例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子、或在鼠干细胞病毒的长末端重复中发现的启动子。

[0112] 本发明的重组表达载体可以设计用于瞬时表达、用于稳定表达、或用于这两者。而且，可以制备重组表达载体用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0113] 本发明的另一个实施方案进一步提供了包含本文所述的任何重组表达载体的宿

主细胞。如本文所用，术语“宿主细胞”是指可以容纳本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞如植物、动物、真菌或藻类，或者可以是原核细胞如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞、贴壁细胞或悬浮细胞，即悬浮生长的细胞。为了产生重组的本发明的蛋白或嵌合分子的目的，宿主细胞优选为原核细胞如大肠杆菌细胞。

[0114] 本发明还提供了包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群。细胞群可以是包含宿主细胞(其包含任何所述的重组表达载体)和至少一种另外的细胞(例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞)的异质群体。或者，细胞群可以是基本上同质的群体，其中所述群体主要包含(例如，基本上由其组成)含有重组表达载体的宿主细胞。所述群体也可以是细胞克隆群体，其中所述群体的所有细胞都是包含重组表达载体的单一宿主细胞的克隆，使得该群体的所有细胞都包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中，细胞群是包含如本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0115] 本发明的蛋白、嵌合分子(包括功能部分和功能变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞和细胞群可以是分离的、纯化的、或者分离或纯化的。如本文所用，术语“分离的”意指已经从其天然环境中移出。如本文所用的术语“纯化的”意指已经增加了纯度，其中“纯度”是相对术语，并且不必被解释为绝对纯度。例如，纯度可以是约50％或更多，约60％或更多，约70％或更多，约80％或更多，约90％或更多，或约100％。纯度优选为约90％或更多(例如约90％至约95％)，更优选约98％或更多(例如约98％至约99％)。

[0116] 可以将本发明的PA、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和组合物，其在下文中统称为“本发明的PA材料”，配制成药物组合物。就此而言，本发明提供了药物组合物，其包含本文所述的PA、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群或组合物中的任一种，以及药学上可接受的载体。

[0117] 优选载体是药学上可接受的载体。就药物组合物而言，载体可以是常规使用的那些载体中的任何一种，并且仅受到化学-物理考虑(如溶解性和与活性化合物缺乏反应性)以及施用途径的限制。本文所述的药学上可接受的载体，例如媒介物、佐剂、赋形剂和稀释剂对于本领域技术人员来说是公知的，并且容易被公众获取。药学上可接受的载体优选为对活性剂(一种或多种)具有化学惰性的载体，以及在使用条件下不具有害副作用或毒性的载体。

[0118] 载体的选择将部分地由特定的本发明的PA材料以及用于施用本发明的PA材料的特定方法来确定。因此，本发明的药物组合物存在多种合适的制剂。用于肠胃外(例如皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、瘤内和鞘内)施用和口服施用的以下制剂是示例性的，并且决不是限制性的。可以使用一种以上的途径来施用本发明的PA材料，并且在某些情况下，特定途径可以提供比另一途径更直接和更有效的响应。

[0119] 适用于口服施用的制剂可以包括：(a)液体溶液，例如溶于稀释剂如水或盐水中的有效量的本发明的PA材料；(b)胶囊剂、冲剂(sachet)、片剂、锭剂和糖锭，其各自含有预定量的作为固体或颗粒的活性成分；(c)粉末；(d)于适当液体中的悬浮剂；和(e)合适的乳剂。液体制剂可以包括稀释剂如水和醇(例如乙醇、苯甲醇和聚乙烯醇)，其可以加或不加药学上可接受的表面活性剂。胶囊剂形式可以是普通硬壳或软壳的明胶类型，其含有例如，表面活性剂、润滑剂和惰性填充物如乳糖、蔗糖、磷酸钙和玉米淀粉。片剂形式可以包括以下的一种或多种：乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、微晶纤维素、阿拉伯胶、明

胶、瓜耳胶、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸，以及其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、润湿剂、防腐剂、调味剂和其他药理学相容的赋形剂。锭剂形式可以包括在风味剂(通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中的本发明的PA材料，以及软锭剂(pastille)，该软锭剂包含位于惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶、乳剂、凝胶等中的本发明的PA材料，还含有本领域已知的赋形剂。

[0120] 适用于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性的、等渗无菌注射溶液(其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质)以及可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性的无菌悬浮剂。本发明的PA材料可以在药物载体中在生理上可接受的稀释剂中施用，例如无菌液体或液体混合物，包括水、盐水、葡萄糖水溶液和相关糖溶液，以及醇如乙醇或十六烷醇、二醇如丙二醇或聚乙二醇、二甲基亚砜、甘油、缩酮如2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇、醚类、聚(乙二醇)400、油类、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯、或乙酰化的脂肪酸甘油酯，其添加或不添加药学上可接受的表面活性剂如肥皂或去污剂、悬浮剂如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素、或乳化剂和其它药物佐剂。

[0121] 可用于肠胃外制剂的油包括：石油、动物油、植物油或合成油。油的具体实例包括：花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、凡士林油和矿物油。用于肠胃外制剂的合适脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的实例。

[0122] 用于肠胃外制剂的合适的肥皂包括脂肪碱金属盐、铵盐和三乙醇胺盐，并且合适的去污剂包括：(a)阳离子去污剂，例如二甲基二烷基卤化铵和烷基吡啶鎓卤化物，(b)阴离子去污剂，例如烷基、芳基和烯烃磺酸盐，烷基、烯烃、醚和甘油单酯硫酸盐以及磺基琥珀酸盐，(c)非离子去污剂，例如脂肪胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺和聚氧乙烯-聚丙烯共聚物，(d)两性去污剂，例如烷基-β-氨基丙酸盐和2-烷基-咪唑啉季铵盐，和(e)它们的混合物。

[0123] 肠胃外制剂通常在溶液中含有约0.5％至约2％的本发明的PA材料(以重量/体积计)。可以使用防腐剂和缓冲剂。为了最小化或消除注射部位的刺激，这种组合物可以含有一种或多种亲水-亲脂平衡值(HLB)为约12至约17的非离子表面活性剂。这种制剂中表面活性剂的量以重量计通常为约5％至约15％。合适的表面活性剂包括聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯，如脱水山梨糖醇单油酸酯和环氧乙烷与疏水基的高分子量加合物，其通过环氧丙烷与丙二醇缩合而形成。肠胃外制剂可存在于单位剂量或多剂量的密封容器如安瓿和小瓶中，并且可在冷冻干燥(冻干)条件下储存，其仅需要在使用前直接添加无菌液态赋形剂如水用于注射。即时注射溶液和悬浮液可以由前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。对于肠胃外组合物的有效药物载体的要求是本领域普通技术人员所熟知的(参见，例如Lloyd等人(编辑)，Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Pharmaceutical Press,第22版.(2012))。

[0124] 为了本发明的目的，所施用的本发明的PA材料的量或剂量应该足以在合理的时间范围内在哺乳动物中实现所需的应答，例如治疗或预防性应答。例如，本发明的PA材料的剂量应当足以在从施用时起约2h或更长，例如12-24h或更多时间内抑制靶细胞的生长或治疗或预防癌症。在某些实施方案中，时间段甚至可能更长。剂量将由具体的本发明的PA材料的功效和哺乳动物(例如人)的状况，以及待治疗的哺乳动物(例如人)的体重来确定。

[0125] 用于确定施用剂量的许多测定法是本领域已知的。施用剂量可以在体外(例如细胞培养物)或体内(例如动物研究)测定。例如,可以通过测定IC_{50}(实现症状的半最大抑制的剂量)、LD_{50}(对50%群体的致死剂量)、ED_{50}(在50%群体中治疗有效的剂量),以及细胞培养物、动物研究或其组合中的治疗指数来确定施用的剂量。治疗指数是LD_{50}与ED_{50}的比率(即LD_{50}/ED_{50})。

[0126] 本发明的PA材料的剂量还可以通过可能伴随施用特定的本发明的PA材料的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定。通常,主治医师将考虑各种因素(如年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待施用的本发明的PA材料、施用途径、以及所治疗病况的严重程度)来决定用于治疗每个个体患者的本发明的PA材料的剂量。作为示例而不是意图限制本发明,本发明的PA材料的剂量可为:约0.001至约1000mg/kg受治疗对象的体重/天,约0.01至约10mg/kg体重/天,约0.01mg至约1mg/kg体重/天,约1至约1000mg/kg体重/天,约5至约500mg/kg体重/天,约10至约250mg/kg体重/天,约25至约150mg/kg体重/天,约10mg/kg体重/天,约2mg/kg体重/天至约5mg/kg体重/天,或约4mg/kg体重/天。

[0127] 可以通过本领域已知的测定法来测定本发明的PA材料的细胞毒性。细胞毒性测定法的实例包括MTT(3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑鎓溴化物)测定法,如Liu等人,J.Biol.Chem.,278:5227-5234(2003)中所描述的。

[0128] 预期本发明的PA材料可以用于治疗或预防诸如例如癌症的病况的方法中。不受特定理论或机制的束缚,据信包含本文所述的第一PA和第二PA的组合的组合物通过分子间互补形成能够进行LF-结合的异源寡聚体,并且特异性杀伤癌细胞,而与正常非癌细胞没有或具有最小交叉反应性。就此而言,本发明提供了治疗或预防哺乳动物的癌症的方法,所述方法包括以有效治疗或预防哺乳动物癌症的量向哺乳动物施用本文所述的任何本发明的PA材料。

[0129] 在本发明的实施方案中,该方法还包括向哺乳动物施用一种或多种本文所述的任何效应物组分。第一PA、第二PA和效应物组分可以同时或以任何合适的顺序施用。例如,该方法可以包括在施用第二PA之前施用第一PA,并且在施用第二PA之后施用效应物组分。或者,该方法可包括同时并在施用效应物组分之前施用第一PA和第二PA。在优选实施方案中,该方法包括同时施用第一PA、第二PA和效应物组分。

[0130] 在一个实施方案中,该方法还包括以有效降低对本发明的PA材料的免疫应答的量,向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂。向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂,可以有利地消除或降低抗PA材料的免疫应答,包括例如产生抗-PA材料的抗体和/或T细胞,其否则可能会不利地中和本发明的PA材料的细胞毒活性。为此,向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂可以有利地增加可施用于哺乳动物的本发明的PA材料的量,其进而可以增加本发明的PA材料用于治疗或预防诸如癌症的病况的效力。

[0131] 所述方法可包括将本发明的PA材料和一种或多种免疫抑制剂同时或依次施用于哺乳动物。尽管所述方法可以包括在施用本发明的PA材料之后向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂,但是优选地,所述方法包括在施用本发明的PA材料之前向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂,或者依次施用一种或多种免疫抑制剂和本发明的PA材料。在施用本发明的PA材料之前向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂,可有利地在免疫系统暴露于本发明的PA材料之前,消除或减少对本发明的PA材料的不希望的免疫应答。例如,所述方法可以

包括在向哺乳动物施用本发明的PA材料之前约1至约7天，向哺乳动物施用一种或多种免疫抑制剂。

[0132] 一种或多种免疫抑制剂可以包括适合抑制对本发明的PA材料的免疫应答的任何试剂。在一个实施方案中，一种或多种免疫抑制剂选自：喷司他丁、环磷酰胺和托法替尼(Hassan等人，Sci.Transl.Med.，5(208)：208ra147(2013)；Mossoba等人，Clin.Cancer Res.，17:3697-3705(2011)；以及Onda等人，J.Immunol.，193(1)：48-55(2014))。在本发明的实施方案中，一种或多种免疫抑制剂包括喷司他丁和环磷酰胺的组合。可以同时或顺序施用喷司他丁和环磷酰胺。例如，可以在施用环磷酰胺之前施用喷司他丁。或者，可以在施用喷司他丁之前施用环磷酰胺。

[0133] 还发现，当在不存在任何其他药学活性剂的情况下使用时，喷司他丁和环磷酰胺的组合提供了抗实体瘤的作用。因此，本发明的实施方案提供了治疗或预防哺乳动物的实体瘤的方法，所述方法包括以有效治疗或预防哺乳动物的实体瘤的量，向哺乳动物施用喷司他丁和环磷酰胺。在优选的实施方案中，所述方法包括在不存在任何其他药学活性剂(例如在不存在任何其他抗癌剂)的情况下，施用喷司他丁和环磷酰胺。例如，所述方法包括在不存在本文所述的任何本发明的PA材料的情况下，施用喷司他丁和环磷酰胺。在特别优选的实施方案中，该方法包括单独施用喷司他丁和环磷酰胺(以及无药学活性的载体)。喷司他丁和环磷酰胺可以如本文关于本发明的其他方面所述同时或顺序施用。

[0134] 本文使用的术语“治疗”和“预防”以及由其衍生的词语不一定意指100％或完全的治疗或预防。而是，存在本领域普通技术人员认为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这方面，本发明的方法可以提供任何量或任何水平的对哺乳动物中癌症的治疗或预防。此外，本发明的方法提供的治疗或预防可以包括被治疗或预防的疾病(例如癌症)的一种或多种病况或症状的治疗或预防。另外，出于本文的目的，“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或病况的发作。

[0135] 关于本发明的方法，癌症可以是任何癌症，包括以下的任一种：肾上腺癌、肉瘤(例如滑膜肉瘤、成骨肉瘤、子宫平滑肌肉瘤、血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、粘液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤和畸胎瘤)、淋巴瘤(例如小淋巴细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、肝细胞癌、神经胶质瘤、头癌(例如鳞状细胞癌，例如口腔鳞状细胞癌)、颈癌(例如鳞状细胞癌)、急性淋巴细胞癌、白血病(例如毛细胞白血病、骨髓白血病(急性和慢性)、淋巴白血病(急性和慢性)、幼淋巴细胞白血病(PLL)、骨髓单核细胞性白血病(急性和慢性)以及淋巴细胞性白血病(急性和慢性))、骨癌(成骨肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤、恶性淋巴瘤(网状细胞肉瘤)、多发性骨髓瘤、恶性巨细胞肿瘤、脊索瘤、骨软骨瘤(骨软骨性外生骨疣)、良性软骨瘤、成软骨细胞瘤、软骨粘液样纤维瘤、骨样骨瘤、巨细胞肿瘤)、脑癌(星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、生殖细胞瘤(松果体瘤)、多形性成胶质细胞瘤、少突神经胶质细胞瘤、神经鞘瘤和成视网膜细胞瘤)、输卵管癌、乳腺癌、肛门癌、肛管或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈部癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌(鼻腔)或中耳癌、口腔癌、外阴癌(例如鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌和纤维肉瘤)、骨髓增殖性病症(例如慢性骨髓癌)、结肠癌(例如结肠癌)、食道癌(例如鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤和淋巴瘤)、宫颈癌(宫颈癌和侵袭性宫颈发育不良)、胃癌、胃肠类癌肿瘤、下咽癌、喉癌、肝癌(例如肝细胞癌、胆管癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤

和血管瘤)、肺癌(例如支气管癌(鳞状细胞、未分化的小细胞、未分化的大细胞和腺癌)、肺泡(细支气管)癌、支气管腺瘤、软骨瘤性错构瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌和肺腺癌)、恶性间皮瘤、皮肤癌(例如黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西肉瘤、痣、发育不良痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤和瘢痕瘤)、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、卵巢癌(例如卵巢癌(浆液性囊腺癌、粘液性囊腺癌、子宫内膜癌和透明细胞腺癌)、卵巢粒层细胞-卵巢膜细胞肿瘤、Sertoli-Leydig细胞瘤、无性细胞瘤和恶性畸胎瘤)、胰腺癌(例如导管腺癌、胰岛瘤、胰高血糖素瘤、胃泌素瘤、类癌肿瘤和血管活性肠肽瘤)、腹膜癌、网膜癌、肠系膜癌、咽癌、前列腺癌(例如腺癌和肉瘤)、直肠癌、肾癌(例如腺癌、威尔姆氏瘤(肾母细胞瘤)、肾细胞癌)、小肠癌(腺癌、淋巴瘤、类癌肿瘤、卡波西肉瘤、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤和纤维瘤)、软组织癌、胃癌(例如癌、淋巴瘤和平滑肌肉瘤)、睾丸癌(例如精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎癌、畸胎癌、绒毛膜癌、肉瘤、莱迪希细胞瘤、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样瘤和脂肪瘤)、子宫癌(例如子宫内膜癌)、甲状腺癌和尿路上皮癌(例如鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌、输尿管癌和膀胱癌)。在一个实施方案中,癌症是实体瘤。在一个优选的实施方案中,实体瘤是口腔鳞状癌肿瘤、黑色素瘤、肺肿瘤或卵巢肿瘤。不受特定理论或机制的束缚,据信本发明的PA材料(其中氨基酸残基I207、I210、I656、Y681和L687中的一个或多个进行本文所述的取代)对表达CMG2的肿瘤内皮细胞有毒性。因此,在本发明的实施方案中,实体瘤的内皮细胞表达CMG2。不受特定理论或机制的束缚,据信本发明的PA材料(其中氨基酸残基E654、R659和M662中的一个或多个进行本文所述的取代)对表达TEM8的细胞有毒性。因此,在本发明的实施方案中,肿瘤的细胞表达TEM8。

[0136] 本文使用的术语“哺乳动物”指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目的哺乳动物,如小鼠和仓鼠;兔形目,如兔;食肉目,包括猫科(猫)和犬科(狗);偶蹄目,包括牛科(牛)和猪科(猪);奇蹄目,包括马科(马);灵长目、猿(Ceboids)目或猴(Simoids)目(猴);或者类人猿目(人和类人猿)。在优选的实施方案中,哺乳动物为人、小鼠、猫或狗。

[0137] 还提供了抑制靶细胞生长的方法,其包括使细胞与有效抑制靶细胞生长的量的本文所述的任何本发明的PA材料接触。靶细胞的生长可被抑制任何量,例如约10%或更多,约15%或更多,约20%或更多,约25%或更多,约30%或更多,约35%或更多更多,约40%或更多,约45%或更多,约50%或更多,约55%或更多,约60%或更多,约65%或更多,约70%或更多,约75%或更多,约80%或更多,约85%或更多,约90%或更多,约95%或更多,或约100%。靶细胞可以提供在生物样品中。生物样品可用任何合适的方式从任何合适来源的哺乳动物获得。生物样品可以例如通过抽血、白细胞去除术、肿瘤活组织检查、尸检或其组合来获得。对于哺乳动物,接触步骤可以体外或体内发生。优选地,接触是体外的。

[0138] 在本发明的实施方案中,靶细胞是癌细胞。优选地,靶细胞是癌细胞。靶细胞可以是本文描述的任何癌症的癌细胞。在本发明的实施方案中,靶标可表达细胞表面分子。细胞表面标志物可以是本文结合本发明的其他方面所述的任何细胞表面分子。

[0139] 所述方法可以包括使细胞与本发明的PA材料和效应物组分同时或依次接触。在本发明的实施方案中,所述方法包括在使细胞与效应物组分接触之前,使所述细胞与本发明的PA材料接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在施用本发明的PA材料之前,使细胞与效应物组分接触。优选地,所述方法包括使细胞与效应物组分和本发明PA同时接触。

[0140] 以下实施例进一步说明本发明,但是,当然不应该以任何方式解释为限制其范围。

[0141] 实施例1-3

[0142] 实施例1-3描述的实验中采用以下材料和方法。

[0143] 诱变PCR

[0144] 通过采用NNS密码子的重叠聚合酶链式反应(PCR)将突变导入质粒pYS52(炭疽芽孢杆菌表达载体pYS5的衍生物(Singh等人,J.Biol.Chem.,264:19103-19107(1989)),pYS52含有编码PA的结构域II(其具有另外的唯一的限制性位点)的合成的DNA序列。将PHUSION高保真DNA聚合酶(New England Biologicals,Ipswich,MA)用于诱变PCR反应。用于所有反应的侧翼引物为:SEQ ID NO:16(PA-250)和SEQ ID NO:17(Pa-SwaI-Rev)。特异性引物为:SEQ ID NO:18(R178X mut)、SEQ ID NO:19(R178X rev)、SEQ ID NO:20(R200X mut)、SEQ ID NO:21(R200X rev)、SEQ ID NO:22(I207X mut)、SEQ ID NO:23(I207/210X rev)、SEQ ID NO:24(I210X mut)、SEQ ID NO:25(K214X mut)和SEQ ID NO:26(K214X rev)。将诱变引物与PA-SwaI-Rev组合,并将反向引物与PA-250组合,用于第一轮PCR。产物进行凝胶纯化,以10个循环的PCR将互补的PCR片段延伸至全长,然后添加PA-250和PA-SwaI-rev,并再进行35个循环。将这些诱变插入物进行凝胶纯化,并将插入物与pYS52一起用PstI和HindIII消化。将消化产物连接过夜,并转化到化学感受态大肠杆菌MC1061中,将其接种在含有100μg/mL氨苄青霉素的溶原性液体培养基(LB)-琼脂平板上。使用PA-250和PA-SwaI-Rev引物进行菌落PCR,以鉴定阳性克隆。使用引物PA-250筛选菌落,以测序质粒并鉴定具有所有可能取代的克隆。然后将选择的克隆在含有100μg/mL氨苄青霉素的LB中培养过夜,并通过小规模制备来提取质粒。

[0145] 蛋白质文库的表达

[0146] 将来自大肠杆菌MC1061的小量制备的质粒转化至化学感受态大肠杆菌SCS110,其为dam^-和dcm^-。然后将来自SCS110的纯化的未甲基化质粒转化至电感受态炭疽芽孢杆菌BH480菌株中,将其接种在含有20μg/mL卡那霉素的LB-琼脂上。BH480是一种无毒的大质粒消除的孢子形成缺陷的炭疽芽孢杆菌菌株,其缺失8种蛋白酶,是用作重组蛋白表达的有效宿主(Pomerantsev等人,Protein Expr.Purif.,80:80-90(2011))。将单个菌落在含有20μg/mL卡那霉素的5mL FA培养基中培养过夜(Pomerantsev等人,同上)。含有突变PA蛋白的上清液,通过离心进行灭菌,并使用AMICON ULTRA-4(30K)离心过滤装置(Millipore Corp.,Billerica,MA)浓缩~10倍。通过天然凝胶电泳分析上清液,用考马斯蓝染料染色,并且通过密度测定法估计蛋白质浓度,从而将上清液条带与纯化的PA样品进行比较。对每种蛋白质进行两次。

[0147] PA变体筛选

[0148] 将RAW264.7巨噬细胞和鼠黑色素瘤B16-BL6细胞,在补充有胎牛血清至10%(Invitrogen)和50μg/mL庆大霉素(Invitrogen)的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Life Technologies,Grand Island,NY)中,于37℃在具有5%CO_2组织培养箱中培养。

[0149] 为了测试PA变体的功能丧失,将RAW 264.7巨噬细胞以10^5个细胞/孔接种在96孔板中,并过夜培养。第二天,以500ng/mL的浓度添加PA变体,并且以100ng/mL的浓度添加LF。将细胞孵育20小时(h),并以500μg/mL加入MTT(3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑鎓溴化物,Sigma,St.Louis,MO)持续最后一小时。吸出培养基,并将氧化的MTT溶解于含有0.5%SDS和0.038M盐酸的91%异丙醇中,然后使用SPECTRAMAX 190酶标仪

(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)在570nm处读取。与未处理的对照相比,使用吸光度来确定存活百分比。对表现出比原始构建体PA-R200A和PA-I210A更低毒性的PA变体,进行双重试剂功能获取测试。如上所述接种RAW264.7巨噬细胞,并加入与PA-R200A或PA-I210A(250ng/mL)和100ng/mL LF组合的各PA变体(250ng/mL)。将细胞孵育6h,并如上所述测量活力。

[0150] PA-L1-I207R的产生和细胞毒性

[0151] 使用定点诱变将突变I207R导入pYS5-L1ff(PA-L1的过表达质粒),其中弗林蛋白酶切割序列RKKR(SEQ ID NO:4)(残基164-167)被替换为MMP底物序列GPLGMLSQ(SEQ ID NO:6)(Liu等人,Cancer Res.,60:6061-6067(2000))。使用的引物是SEQ ID NO:27(I207R正义)、SEQ ID NO:28(I207R反义)。利用QUIKCHANGE LIGHTNING试剂盒(Agilent,Santa Clara,CA),根据制造商的建议来使用正义引物和反义引物,并转化到化学感受大肠杆菌XL-10GOLD细胞。小量制备质粒,测序,并转化到大肠杆菌SCS110中,然后转化到BH480中进行表达并纯化。PA-L1-I207R的编码序列是SEQ ID NO:29的核苷酸序列。PA-L1-I207R和PA-L1-I210A的细胞毒性,在30ng/mL FP59存在下,单独地进行测试和与PA-U2-R200A(其中弗林蛋白酶切割序列被替换为uPA底物序列PGSGRSA(SEQ ID NO:9)(Liu等人,J.Biol.Chem.,276,17976-17984(2001))组合进行测试。将B16-BL6细胞与指定的毒素在96孔板中孵育48h,并如上所述通过MTT测定法测定细胞活力。

[0152] 蛋白纯化

[0153] 使用来自炭疽芽孢杆菌BH480菌株的基于pYS5的表达质粒,表达PA-L1-I210A、PA-L1-I207R、PA-U2-R200A、LF和FP59。如先前所述纯化分泌到培养物上清液中的重组蛋白(Pomerantsev等人,同上;Liu等人,Cell.Microbiol.,9:977-987(2007))。简言之,将表达质粒转化的BH480菌株在具有10μg/ml卡那霉素的FA培养基中于37℃培养12h。于旋转瓶中在2M硫酸铵存在下,将分泌到培养物上清液中的蛋白沉淀到PHENYL-SEPHAROSE 6FAST FLOW树脂(低取代,GE Healthcare Life Sciences,Pittsburg,PA)(每升30ml上清液)上。将树脂收集在多孔塑料漏斗上,用洗涤缓冲液(1.5M硫酸铵,10mM Tris-HCl(pH 8.0),1mM EDTA)洗涤,并用洗脱缓冲液(0.3M硫酸铵,10mM Tris-HCl(pH 8.0),1mM EDTA)洗脱蛋白。通过加入2M硫酸铵使洗脱的蛋白沉淀。通过离心收集沉淀,将其重新悬浮并在10mM Tris-HCl(pH 8.0),1mM EDTA中透析。在Q-SEPHAROSE FAST FLOW柱(GE Healthcare Life Sciences)上,通过层析法进一步纯化毒素蛋白,并用在20mM Tris-HCl,0.5mM EDTA(pH 8.0)中的0-0.5M NaCl梯度洗脱。使用10mM Tris-HCl(pH 8.0),100mM NaCl和0.5mM乙二胺四乙酸(EDTA),通过SEPHACRYL S-200高分辨率凝胶过滤(GE Healthcare Life Sciences),将毒素蛋白进一步纯化成处于预期分子量的一条明显条带。

[0154] PA突变体的体内毒性

[0155] 在0、24和48h,向C57BL/6J雄性和雌性小鼠(10-12周龄)经腹膜内注射20μg PA-L1-I207R或PA-LI-I210A以及10μg FP59,并在第一次注射后检查不适迹象和死亡率,每天两次,持续两周。实验结束时将小鼠安乐死。所有动物研究均按照国家过敏和传染病动物护理和使用委员会批准的方案进行。

[0156] 体内抗肿瘤研究

[0157] 向12周龄雌性C57BL/6J小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,Maine)肩胛骨中

部的皮下组织注射5×10^{5}个B16-BL6细胞。通过在低和高放大倍数下持续评估细胞形态，来鉴定B16-BL6黑色素瘤细胞。注射后8天，用数字卡尺(FV Fowler Company,Inc.,Newton,MA)测定已建立的肿瘤。用最长和最短的肿瘤尺寸按以下公式估算肿瘤重量：肿瘤重量(mg)＝(以mm计的长度×以mm^{2}计的宽度)×0.5(Geran等人，Cancer Chemother.Rep.,3:1-103(1972))。将荷瘤小鼠随机分组，并在研究第0天(肿瘤细胞注射后第8天)、2、4、7和9天经腹膜内注射含有PA变体蛋白和LF的200μL PBS溶液，剂量如图5所示。每次注射前对小鼠称重并测量肿瘤。该研究在第10天结束，当时在单独PBS的对照组中肿瘤达到体重的10％，这是根据动物研究方案需要安乐死的情况。

[0158] 统计分析

[0159] 使用EXCEL软件用未配对学生T检验进行统计分析。使用GRAPHPAD PRISM软件，用对数秩检验(Mantel-Cox)分析存活曲线。

[0160] 实施例1

[0161] 该实施例展示了PA突变体的诱变和表达。

[0162] 为了选择活性严格依赖于用于LF结合的分子间互补的PA变体，构建在逆时针方向单体上的LF结合亚位点残基R200处以及在顺时针方向单体上的残基R178、I207、I210和K214处具有NNS(N＝任何核苷酸，S＝C或G)密码子的PA变体文库(图1)。尽管分离了所有可能的PA变体的DNA编码序列，但是从相应转化的无毒力炭疽芽孢杆菌BH480菌株中一些蛋白未表达，或仅以非常低的水平表达。在95种突变体的理论文库中，79种被成功表达，并且包含分泌的PA变体的上清液被制备用于初始测试。通常通过相应转化的BH480菌株以高水平表达PA蛋白，通常达到培养物上清液中总蛋白的50％以上的水平。在未表达的16种蛋白中，9种是K214的突变体(C、D、E、F、G、P、S、W、Y)，4种是在I207的突变体(D、K、P、S)，两种是I210的突变体(G、N)，以及一种是R178的突变体(P)。K214位于α-螺旋的末端，并且侧链不与PA上的任何其他残基紧密接触。尚不清楚为什么在这个位置有如此多的突变体无法表达。

[0163] 实施例2

[0164] 该实施例证明，PA-I207R是一种改进的顺时针方向单体变体。

[0165] 视情况而定使用细胞毒性测定，筛选灭菌的含有PA蛋白的上清液相对于分子间互补的原始形式(PA-R200A或PA-I210A)的活性。在筛选逆时针方向单体突变体中，最初鉴定出10种突变型PA-R200X蛋白(C、D、E、G、I、M、P、S、V和W)，其比PA-R200A具有更小的内在毒性。然而，后来的详细表征发现，这些PA变体也显示与PA-I210的分子间互补减少，导致较少的LF诱导的细胞毒性。作为示例，尽管PA-R200C的毒性略低于PA-R200A，但在与PA-I210A互补促进RAW264.7细胞的杀伤的效力上也略低。因此，没有发现逆时针方向的单体PA变体明显优于原始的PA-R200A。

[0166] 在筛选顺时针方向的单体变体PA-R178X、PA-I207X、PA-I210X和PA-K214X中，鉴定出对RAW264.7巨噬细胞的固有细胞毒性大大降低的8种蛋白质：I207R、I207W、I210D、I210E、I210K、I210Q、I210R和I210S(图2)。将这些与R200A和R200C组合以测试它们分子间互补的能力(图3B)。所有这些顺时针方向的突变体都可以与PA-R200A互补，并且在较小程度上与PA-R200C互补。在这些PA变体中，在与PA-R200A和PA-R200C互补以实现杀伤RAW264.7细胞方面，PA-I207R表现最佳。因此，PA-I207R被鉴定为用于分子间互补PA系统的改进的顺时针方向的单体变体，其单独使用时显示非常低的细胞毒性。

[0167] 为了进一步表征PA-I207R,产生MMP-活化的变体(即PA-L1-I207R(SEQ ID NO:30)),并纯化该蛋白。将PA-L1-I207R和PA-U2-R200A的新组合与PA-L1-I210A和PA-U2-R200A的原始组合对小鼠黑色素瘤B16-BL6细胞的细胞毒性进行比较,所述B16-BL6细胞表达高水平的MMP和uPA。在FP59(以PA依赖性方式杀死细胞的LF融合效应蛋白)存在下与PA-U2-R200A互补以杀死B16-BL6细胞方面,PA-L1-I207R表现出与PA-L1-I207A相似的活性(Arora等人,Infect.Immun.,62:4955-4961(1994))(图4A)。值得注意的是,单组分PA-L1-I207R没有显示出细胞毒性,而在这些测定中单独使用时,原始对应物PA-L1-I210A对B16-BL6细胞显示出中度细胞毒性(IC_{50}=200ng/mL)(图4A)。在这些环境中单独使用时,PA-U2-R200A也未显示出细胞毒性(图4A)。

[0168] 进一步比较当与FP59一起施用于C57BL/6J小鼠时,PA-L1-I207R和PA-L1-I210A的毒性。发现PA-L1-I207R的毒性比PA-L1-I210A低得多,因为用3次剂量的20μg PA-L1-I207R和10μg FP59激发的所有小鼠存活,而用3次剂量的20μg PA-L1-I210A和10μg FP59激发的所有小鼠在一周内均死于该激发(P=0.0007,对数秩检验(Mantel-Cox))(图4B)。

[0169] 实施例3

[0170] 该实施例证明,PA-L1-I207R和PA-U2-R200A的组合在抗肿瘤活性方面提供了高效力。

[0171] 为了进一步评估新PA变体的抗肿瘤活性,在治疗C57BL/6J小鼠的B16-BL6同系肿瘤中,将新组合即PA-L1-I207R(SEQ ID NO:30)加上PA-U2-R200A(SEQ ID NO:32),与PA-L1-I210A和PA-U2-R200A的原始组合进行并行比较。由SEQ ID NO:31的核苷酸序列编码PA-U2-R200A。荷瘤小鼠用PBS、低剂量的新组合或原始组合的PA变体加LF(7.5μg/7.5μg/5μg)、或高剂量的每种组合加LF(22.5μg/22.5μg/15μg)处理。与PBS对照组相比,所有毒素处理组均显示出显著的抗肿瘤活性(图5)(对于所有毒素处理组,P<0.0001,学生T检验)。相比PA-L1-I210A和PA-U2-R200A的原始组合,PA-L1-I207R和PA-U2-R200A的新组合显示显著更高的抗肿瘤活性(图5)(在第10天对于两个高剂量组,P=0.0326,学生T检验)。在第10天实验终止前,在PBS组中观察到20%的死亡率,死亡显然是由于高肿瘤负荷。接受低剂量的两种组合的组死亡率为10%,而在高剂量组中,新组合显得更安全,其以10%的死亡率比对原始组合的组的30%的死亡率(尽管这种差异在统计学上并不显著)。

[0172] 实施例4-10

[0173] 在实施例4-10描述的实验中采用以下材料和方法。

[0174] 蛋白和试剂

[0175] 如前所述(Gupta等人,PLoS ONE,3:e3130(2008);Pomerantsev等人,同上),从BH480(无毒的孢子形成缺陷的蛋白酶缺陷型炭疽芽孢杆菌菌株)的上清液中纯化重组PA变体和LF蛋白。FP59是LF氨基酸1-254和铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)外毒素A的催化结构域的融合蛋白,其在通过PA递送至胞质溶胶后通过真核延伸因子-2的ADP-核糖基化杀死细胞。这里使用的LF和FP59含有天然氨基末端序列AGG(Gupta 等人,同上)。MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓溴化物)和喷司他丁(SML0508-25mg)来自Sigma(Atlanta,GA)。环磷酰胺(NDC10019-957-01)来自Baxter Healthcare(Deerfield,IL)。

[0176] 细胞和细胞毒性测定

[0177] 所有培养的细胞于37℃在5％CO 2气氛中生长。在补充有10％胎牛血清的DMEM(达尔伯克氏改良伊格尔培养基)中培养以下细胞:鼠B16-BL6黑色素瘤细胞、LL3Lewis肺癌细胞、人肺癌A549细胞和结直肠癌Colo205细胞。按照肺内皮细胞分离方案分离小鼠肺内皮细胞和来自B16-BL6黑色素瘤的肿瘤内皮细胞(Reynolds等人,Methods Mol.Med.,120:503-509(2006))。简而言之,用I型胶原酶消化小鼠肺和B16-BL6肿瘤,并将其接种在明胶和胶原包被的烧瓶上。然后使用Fc阻断剂(大鼠抗-小鼠CD16/CD32,目录号553142,BD Pharmingen,San Diego,CA),通过用羊抗-大鼠抗体包被的磁珠对细胞进行连续阴性分选以去除巨噬细胞,并使用抗-分子间粘附分子2(ICAM2或CD102)抗体(目录号553326,大鼠抗小鼠CD102,BD Pharmingen)通过磁珠进行阳性分选以分离内皮细胞。将内皮细胞培养于补充有20％胎牛血清、内皮细胞生长添加物(30mg于500mL DMEM中)(E2759-15mg,Sigma)、肝素(50mg于500mL DMEM中)(H3149-100KU,Sigma)的DMEM中。

[0178] 对于细胞毒性测定,将生长在96孔板(50％汇合)中的细胞与多种浓度的PA或PA变体蛋白与500ng/mL LF的组合一起孵育72h。在一些实验中,将细胞与多种浓度的喷司他丁或环磷酰胺、或它们的组合一起孵育72h。然后通过先前所述(Liu等人,J.Biol.Chem.,278:5227-5234(2003))的MTT测定细胞活力,其表示为未处理细胞的MTT信号的百分比。

[0179] MEK切割分析

[0180] 将在12孔平板上生长的肿瘤内皮细胞与指定浓度的PA-L1加LF于37℃孵育3h,然后用汉克氏平衡盐溶液(Biofluids,Rockville,MD)洗涤三次以除去未结合的毒素。然后将细胞在含有蛋白酶抑制剂的改良放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(Liu等人,J.Biol.Chem.,278:5227-5234(2003))中裂解,并将裂解物进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western印迹,以使用抗-MEK2(N-末端)抗体(sc-524,Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA)来检测MEK2切割。

[0181] 基因表达

[0182] 用或不用PA-L1/LF处理在12孔板中培养的内皮细胞24h,然后使用TRIZOL试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA)制备总RNA。按照制造商手册(Invitrogen),使用逆转录酶反应试剂盒合成单链cDNA。使用SYBR Green PCR Mastermix试剂盒,通过实时定量PCR来分析参与葡萄糖摄取、糖酵解、三羧酸循环、谷氨酰胺分解和脂质合成的所选关键基因的表达变化。

[0183] 氧气消耗速率和细胞外酸化速率

[0184] 在XF24细胞外通量分析仪(Seahorse Bioscience,North Billerica,MA)中评估肿瘤内皮细胞的代谢活性。将在24孔XF24组织培养板中生长至汇合的肿瘤细胞和肿瘤内皮细胞,与或不与PA-L1/LF(各自1μg/mL)一起孵育24h,一式五份(in pentaplicate)。将细胞更换入具有200mM GlutaMax-1培养基、25mM D-葡萄糖,pH 7.4的新鲜无缓冲无血清DMEM中,并在培养基中平衡1h。然后于37℃在基础条件和按顺序添加寡霉素(0.5μM)、FCCP(羰基氰化物对-三氟甲氧基苯腙)(0.5μM)和抗霉素A(1μM)的条件下,测量实时细胞外酸化速率(ECAR)和氧气消耗速率(OCR)。ECAR和OCR标准化至细胞裂解物中的50mg总蛋白。将三磷酸腺苷(ATP)产生-偶联的OCR计算为基础OCR与添加寡霉素后的OCR之间的差异。备用呼吸能力(SRC)定义为,添加FCCP之后的OCR和基础条件下的OCR之间的差异。最大呼吸(MR)定义为,添加FCCP之后的OCR和添加寡霉素之后的OCR之间的差异。使用ATPLITE一步法试剂盒

(PerkinElmer,Boston,MA)测量细胞ATP水平。

[0185] 小鼠和肿瘤研究

[0186] 按之前产生无TEM8和无CMG2的小鼠(Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,106:12424-12429(2009))。还将无TEM8和无CMG2的小鼠与无胸腺裸鼠($Foxn^{nu/nu}$)(Jackson Laboratory,Bar Harbor,Maine)杂交,以产生无胸腺裸的无TEM8和无CMG2的小鼠,其用于建立人肿瘤异种移植物。各无组织特异性CMG2的小鼠,包括$Cmg2(EC)^{-/-}$、$Cmg2(SM)^{-/-}$、$Cmg2(Mye)^{-/-}$小鼠,以及表达组织特异性CMG2的小鼠,包括$Cmg2^{EC}$和$Cmg2^{SM}$小鼠,如先前所述生成(Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,106:12424-12429(2009);Liu等人,Cell Host Microbe,8:455-462(2010);Liu等人,Nature,501:63-68(2013))。在图8A-8E的图例中提供了基因型的完整描述。对于肿瘤研究,使用10-14周龄的雄性和雌性小鼠。为了培养同系肿瘤,将5×10^5个细胞/小鼠B16-BL6黑色素瘤细胞或LL3肺癌细胞,注射到具有指定基因型的预剃毛小鼠肩胛骨中部的皮下组织中。对于人肿瘤异种移植物,将1×10^7个细胞/小鼠Colo205结直肠癌细胞或A549肺癌细胞,经皮内注射入具有指定TEM8或CMG2基因型的无胸腺裸鼠中。用数字卡尺(FV Fowler Company,Inc.,Newton,MA)测量肿瘤,并用肿瘤长度、宽度和高度尺寸使用以下公式来估计肿瘤重量:肿瘤重量(mg)=1/2(以mm计的长度×以mm^2计的宽度)或1/2(以mm计的长度×以mm计的宽度×以mm计的高度)。将荷瘤小鼠随机分组,并按照图中所示的时间表经腹膜内注射PBS、工程化的毒素,PC方案或联合治疗。对小鼠称重并在每次注射前测量肿瘤。所有动物研究均按照国家过敏和传染病动物护理和使用委员会批准的方案进行。

[0187] 用亲脂性羰花青染料DiI对血管的可视化

[0188] 方法如先前描述(Li等人,Nat.Protoc.,3:1703-1708(2008))。简言之,通过CO_2吸入使利用三次剂量的30μg PA-L1加上15μg LF或PBS处理的B16-BL6荷瘤小鼠安乐死,随后立即用PBS、DiI染料(Sigma)和4%多聚甲醛依次进行心脏灌注。然后制备冷冻组织切片用于荧光显微镜检查,以使肿瘤和各正常组织的血管可视化。对于肿瘤血管定量,在每个肿瘤样品(每个处理组,n=3)的5个随机视野($11mm^2$/视野)中对血管进行计数。

[0189] 毒素中和抗体的测量

[0190] 来自不同处理组的B16-BL6或LL3荷瘤小鼠,最终被放血并制备血清。为了滴定血清中的毒素中和抗体,将在96孔板中生长的RAW264.7细胞与100ng/mL PA加100ng/mL LF(杀死>95%细胞的量)在不同稀释度的血清存在下孵育5h,然后如上所述进行MTT测定以确定细胞活力。

[0191] 流式细胞术

[0192] 在第二轮处理后,将来自初始小鼠的脾以及来自用PBS、PC方案、IC2-PA/LF、或PC和毒素的组合处理的组中的具有B16-BL6黑色素瘤的小鼠的脾切下并称重,如图15A-15D所示。分离脾细胞,计数并用荧光染料缀合的mAb抗-CD45R APC-Cy7(目录号552094,BD Pharmingen)、抗-CD4APC(目录号553051,BD Pharmingen)、抗-CD8PE(目录号553033,BD Pharmingen)、抗-CD11b PerCP-Cy5(目录号550993,BD Pharmingen)和抗-Gr-1FITC(目录号553127,BD Pharmingen)、或抗-IgD FITC(目录号553439,BD Pharmingen)、抗-IgM PE(目录号553409,BD Pharmingen)和抗-CD27 PerCP-Cy5(目录号563603,BD Pharmingen)进行染色。使用BD FACSCanto流式细胞仪分析细胞,并获得对于指定免疫细胞标志物呈阳性

的每种细胞群的百分比。通过以下获得针对每种免疫细胞标志物呈阳性的细胞数量：总脾细胞×标志物阳性细胞的百分比。

[0193] 统计分析

[0194] 使用EXCEL软件用未配对学生T检验进行统计分析。使用GRAPHPAD PRISM软件，用对数秩检验(Mantel-Cox)分析存活曲线。

[0195] 实施例4

[0196] 该实施例证明，肿瘤间质区中的CMG2和TEM8对于肿瘤生长并不重要。

[0197] 不受限于特定的理论或机制，认为血管生成过程对于肿瘤生长是的。为了直接评估炭疽毒素受体CMG2和TEM8在肿瘤血管生成中的作用，测量了先前描述的无TEM8和无CMG2的小鼠中3种不同实体瘤的生长速率(Liu等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,106:12424-12429(2009))。评估的肿瘤是人肺癌A549异种移植物以及同系小鼠LL3Lewis肺癌和B16-BL6黑色素瘤(图6A、6B、6C、6F、6G和6H)。一致的是，所有3种肿瘤在无CMG2的小鼠中如在其同窝对照小鼠中一样快速生长，这表明肿瘤生长不需要肿瘤基质区(例如内皮细胞和炎性细胞)中的CMG2表达(图6A、6B和6C)。荷瘤同窝$Cmg2^{+/+}$、$Cmg2^{+/-}$和$Cmg2^{-/-}$小鼠之间没有观察到体重差异(图6F-6H)。

[0198] 在初步研究中，观察到无TEM8的小鼠中肿瘤生长比其同窝出生的对照慢(图12A、12B、12C和12D)。然而，发现几乎所有的$Tem8^{-/-}$小鼠在断奶时(3周龄)开始逐渐发育出不整齐的过度发育的门齿(咬合不正)，导致这些小鼠难以咀嚼常规提供的硬质食物(图12D)。因此，$Tem8^{-/-}$小鼠营养不良，反映在与皮下脂肪沉积缺乏相关的较低体重(图12E、12F、12G、12H和12I)。随着$Tem8^{-/-}$小鼠的成熟，营养不良的表型变得更加明显，导致1岁时约50％的死亡率。发现在提供软质食物(Nutra-Gel，来自Bio-Serv，Frenchtown，NJ)后，$Tem8^{-/-}$小鼠被完全从营养不良中拯救出来(图12E、12F、12G、12H和12I)。因此，$Tem8^{-/-}$小鼠营养不良的表型的原因是它们不能获得足够量的营养素。此外，在$Tem8^{-/-}$小鼠看到的咬合不正的频率，通过软质食物喂食大大减少(图12E)。因此，TEM8对维持硬质食物啃咬和咀嚼所需的小鼠牙齿功能至关重要。

[0199] 为了研究在上面观察到的$Tem8^{-/-}$小鼠中肿瘤生长减慢是否是由于营养不良表型造成的，然后使同系LL3肺癌和B16-BL6黑色素瘤在软质食物喂养的体重校正的$Tem8^{-/-}$小鼠中生长。值得注意的是，现在同窝出生的$Tem8^{-/-}$和$Tem8^{+/+}$小鼠之间没有观察到肿瘤生长的显著差异(图6D、6E、6I和6J)。综上所述，上述结果表明基质区中CMG2和TEM8的表达对于肿瘤生长以及暗示肿瘤血管生成都不是重要的。

[0200] 实施例5

[0201] 该实施例证明，工程化炭疽致死毒素通过宿主CMG2阻断肿瘤生长。

[0202] 为了研究工程化致死毒素的抗肿瘤机制，将LL3荷瘤小鼠和具有B16-BL6黑色素瘤的小鼠用PA-L1加LF或IC2-PA加LF进行全身处理。“IC2-PA”是指PA-L1-I207R和PA-U2-R200A的组合。这些类型的肿瘤对体内的这些工程化的致死毒素高度且同样敏感(图7A、7B和7C)。在体外细胞毒性测定中LL3细胞对致死毒素敏感，而B16-BL6细胞是高度耐受的(图7D)。这些结果表明，靶向肿瘤基质区中的某些细胞类型可能在肿瘤对毒素的反应中起作用。

[0203] 因为无CMG2和无TEM8的小鼠都能够支持正常的肿瘤生长，所以这些小鼠提供了强

大的遗传工具来分析工程化炭疽毒素控制肿瘤生长的机制。为了确定基质区在工程化炭疽致死毒素的强效抗肿瘤活性中的作用，在肿瘤已经生长到大约1g之后用PA-L1/LF处理A549荷瘤的$Cmg2^{-/-}$和$Tem8^{-/-}$小鼠及其同窝对照小鼠。A549细胞含有野生型BRAF，并且在体外细胞毒性测定中对PA-L1/LF具有抗性(图13A和13B)。虽然$Cmg2^{+/+}$和$Cmg2^{+/-}$小鼠中的A549肿瘤对毒素非常敏感，但在$Cmg2^{-/-}$小鼠中生长的肿瘤灵敏度要低得多(图7E和7F)。相反，在$Tem8^{-/-}$小鼠以及其同窝对照小鼠中生长的A549肿瘤，均对毒素处理敏感(图7G和7H)。这些结果清楚地表明，工程化毒素的抗肿瘤活性涉及靶向某些肿瘤基质区。结果还揭示，CMG2而非TEM8是介导毒素的抗肿瘤活性的主要毒素受体。在存在基质CMG2表达的情况下，工程化毒素是高度有效的，即使对于尺寸非常大(约为总体重的5％)的肿瘤也显示效力(图7E、7F、7G和7H)。

[0204] 实施例6A

[0205] 该实施例表明，靶向肿瘤内皮细胞负责工程化炭疽致死毒素的抗肿瘤活性。

[0206] 为了确定肿瘤基质区中的哪种细胞类型负责PA-L1/LF的抗肿瘤作用，将B16-BL6肿瘤接种到三种类型的小鼠中：$Cmg2^{-/-}$小鼠，仅在内皮细胞中表达CMG2-转基因的$Cmg2^{-/-}$小鼠(以下称为$Cmg2^{EC}$，对于详细描述参见Liu等人，Nature，501:63-68(2013))，以及具有仅在血管平滑肌细胞中表达的CMG2-转基因的$Cmg2^{-/-}$小鼠($Cmg2^{SM}$)(对于详细描述参见Liu等人，Nature，501:63-68(2013))。在体外细胞毒性测定中，B16-BL6细胞对PA-L1/LF不敏感(图7D)。如上文针对A549肿瘤所见(图7E)，$Cmg2^{-/-}$小鼠中的B16-BL6黑色素瘤对PA-L1/LF不敏感，而在$Cmg2^{+/+}$小鼠中的相同肿瘤是极其敏感的(图8A和8B)。虽然在$Cmg2^{SM}$小鼠中的B16-BL6肿瘤与在$CMG2^{-/-}$小鼠中一样对所述毒素不敏感，但在$Cmg2^{EC}$小鼠中的肿瘤则完全敏感(图8A和8B)。因此，CMG2内皮表达足以介导毒素的抗肿瘤活性。为了进一步评估在癌症靶向治疗中靶向肿瘤血管内皮细胞的作用，使B16-BL6肿瘤生长于无内皮细胞特异性CMG2的小鼠(以后称为$Cmg2(EC)^{-/-}$，对于详细描述参见Liu等人，Nature，501:63-68(2013))中。$Cmg2(EC)^{-/-}$小鼠中的肿瘤完全失去对PA-L1/LF以及PA-IC2/LF的敏感性(图8C和8D)，而在无髓细胞CMG2特异性CMG2的小鼠($Cmg2Mye)^{-/-}$，对于详细描述参见文献Liu等人，Cell Host Microbe，8:455-462(2010))中的肿瘤仍然对PA-IC2/LF敏感(图8D)。当单独使用PA-L1时没有观察到抗肿瘤活性，这证实这些毒素的抗肿瘤活性需要LF(毒素的酶促部分)的作用。

[0207] 综上所述，上述结果清楚地表明，工程化炭疽毒素的有效抗肿瘤活性是由于毒素对宿主来源的肿瘤内皮细胞，而非针对肿瘤基质区中的其他细胞类型，例如血管平滑肌细胞和髓系细胞的独特毒性。额外的观察结果是，在肿瘤试验中使用的$Cmg2^{EC}$小鼠本身(当无肿瘤时)对用PA-L1/LF激发高度耐受，因为100％$Cmg2^{EC}$小鼠存活了5次剂量的50μg PA-L1加50μg LF，这是一种杀死50％野生型小鼠的方案(图8E)。这些结果表明，工程化毒素对于增殖的肿瘤内皮细胞而非对不表达MMP或uPA的大部分静止的正常内皮细胞有选择性毒性。为了检验该假设，将用PBS或PA-L1/LF处理B16-BL6荷瘤小鼠的血管，通过心脏灌注用荧光亲脂性羰花青染料DiI进行标记(Li等人，Nat.Protoc.，3:1703-1708(2008))。在灌注期间，DiI接触时直接并入内皮细胞膜，使肿瘤和正常组织内的血管结构通过荧光显微镜可视化。值得注意的是，在用PBS和毒素处理的B16-BL6荷瘤小鼠的各正常组织，包括脾脏、肾脏、肝脏和心脏的血管结构中未检测到差异。很明显，虽然在用PBS处理的肿瘤中血管丰富，但在用PA-L1/LF处理的肿瘤中血管很少被检测到(图8F)。还在将荷瘤小鼠用PA-L1/LF或PBS处

理后，将B16-BL6黑色素瘤和LLC癌切片并进行组织学分析。在毒素处理的B16-BL6和LLC肿瘤中，容易检测到广泛的肿瘤坏死(H&E染色)和伴随着肿瘤血管结构丧失的细胞增殖降低(Ki67染色)。这些结果支持这样的观点：工程化致死毒素选择性损伤肿瘤内皮细胞而保留正常内皮细胞。还对B16-BL6肿瘤进行了CD31和TUNEL共染色。尽管在PA-L1/LF处理的肿瘤中检测到广泛的凋亡性肿瘤细胞死亡，但在毒素处理的肿瘤的很少检测到的肿瘤内皮细胞中未鉴定出凋亡性细胞死亡，这表明所述毒素可通过影响内皮细胞增殖而非通过诱导细胞凋亡来发挥抗肿瘤作用。

[0208] 实施例6B

[0209] 该实施例表明，工程化炭疽致死毒素抑制肿瘤内皮细胞的增殖。

[0210] 通过分子间粘附分子2(ICAM2)分选，从B16-BL6肿瘤中分离肿瘤内皮细胞，以研究工程化毒素对肿瘤内皮细胞的毒性作用。通过另一种内皮标志物CD31证实了分离的内皮细胞的纯度。如通过使用MEK1、MEK2、ERK和磷酸化-ERK抗体的Western印迹所测量的，通过对MEK1和MEK2的切割并伴随着ERK1/2磷酸化的显著降低，证实了LF通过PAL1递送至内皮细胞的胞质溶胶中。在FP59存在下，通过细胞对蛋白酶活化的PA变体(PA，PA-L1(MMP-活化的PA变体)和PA-U2(尿激酶活化的PA变体)的敏感性，也证实了由内皮细胞表达毒素活化的蛋白酶。FP59是LF氨基酸1-254和铜绿假单胞菌外毒素A的催化结构域的融合蛋白，其在通过PA递送至胞质溶胶后通过eEF2的ADP核糖基化杀死所有细胞。为了检查毒素对肿瘤内皮细胞的细胞毒性作用，分别用PA-L1/LF处理细胞48h和72h，然后用膜联蛋白V加碘化丙啶(PI)染色以通过流式细胞术来鉴定凋亡细胞。尽管PA-L1加上FP59可以在孵育24h后诱导显著的凋亡性细胞死亡，但即使在孵育72h后PA-L1加LF也不能做到这样。尽管工程化致死毒素不直接杀伤内皮细胞，但毒素对内皮细胞增殖显示有效的抑制作用。因此Ki67染色显示，在与毒素孵育72h后，肿瘤内皮细胞增殖几乎完全停止。毒性对内皮细胞的影响能够完全通过曲美替尼(trametinib)来重复(尽管需要更高的摩尔浓度)，这是一种FDA批准的用于治疗患有$BRAF^{V600E}$突变的转移性黑色素瘤的患者的MEK1/2小分子抑制剂。这些数据表明，工程化毒素的抑制作用是通过破坏MEK-ERK途径。

[0211] 实施例7

[0212] 该实施例证明了工程化毒素在靶向具有BRAF突变的肿瘤中的额外益处。

[0213] 由于其对肿瘤内皮细胞的独特作用，即使对于由对毒素不敏感的癌细胞组成的肿瘤，肿瘤相关蛋白酶活化的炭疽致死毒素也表现出有效的抗肿瘤活性。然而，一部分人类癌细胞具有致癌BRAF突变如$BRAF^{V600E}$，其使得肿瘤细胞依赖于RAF-MEK-ERK途径存活，同时也使其对炭疽致死毒素敏感(Abi-Habib等人，Mol.Cancer Ther.，4:1303-1310(2005))。据推测，工程化炭疽致死毒素在治疗具有$BRAF^{V600E}$突变的实体瘤中具有额外的益处。为了测试这一点，将含有致癌$BRAF^{V600E}$突变且对体外PA-L1/LF敏感的人结直肠癌Colo205细胞(图13A和13B)，接种到同窝的$Cmg2^{-/-}$和$Cmg2^{+/+}$小鼠中，并且用PA-L1/LF处理。显著地，$Cmg2^{-/-}$小鼠中的Colo205肿瘤对毒素处理敏感，尽管对毒素处理的反应低于在$Cmg2^{+/+}$小鼠中生长的肿瘤的强烈反应(图14)。这些结果表明，在“毒素敏感性”肿瘤中，毒素的抗肿瘤活性依赖于靶向肿瘤内皮细胞以及癌细胞。

[0214] 实施例8

[0215] 该实施例展示了炭疽致死毒素对肿瘤内皮细胞代谢的影响。

[0216] 从B16-BL6肿瘤中分离肿瘤内皮细胞，以研究工程化毒素对肿瘤内皮细胞的毒性作用的潜在机制。值得注意的是，在将在内皮细胞生长培养基中培养的内皮细胞与PA-L1/LF孵育72h后，该细胞的增殖显著降低(图9A)。通过与毒素孵育3h后对MEK2的切割，证明了通过PA-L1将LF递送到内皮细胞的胞质溶胶中。在用或不用5μg/mL PA-L1加0.5μg/mL LF孵育72h后，对活的MTT染色的内皮细胞采集图像。注意到用毒素处理的细胞的相对较低的密度。由于细胞代谢对于所有细胞过程至关重要，所以检查致死毒素是否影响肿瘤内皮细胞的生物能量。与PA-L1/LF孵育24h后，在基础条件下以及在添加线粒体抑制剂寡霉素(ATP合酶抑制剂)、FCCP(线粒体氧化磷酸化解偶联剂)和抗霉素A(复合物III抑制剂)之后测量肿瘤内皮细胞的细胞外酸化速率(ECAR)和氧气消耗速率(OCR)。ECAR反映胞质糖酵解活性，而OCR反映线粒体氧化磷酸化。在基础条件下以及线粒体受到抑制时，工程化毒素显著抑制内皮细胞糖酵解活性(图9B)。试图补偿在线粒体抑制(通过寡霉素和FCCP)期间能量产生减少的糖酵解活性的上调，也被毒素损害(图9B)。此外，毒素也显著降低了内皮细胞的基础OCR、ATP产生偶联OCR($OCR_{ATP\ S}$)、最大呼吸(MR)、备用呼吸能力(SRC)和细胞ATP水平(图9C、9D和9E)。这些结果表明，所述毒素通过影响糖酵解以及线粒体氧化磷酸化而深远影响肿瘤内皮细胞代谢。

[0217] 为了探索毒素影响内皮细胞代谢的潜在机制，通过实时PCR分析研究了关键基因在中心代谢中的表达水平。令人惊讶的是，对葡萄糖摄取、糖酵解、三羧酸循环、谷氨酰胺使用以及脂质合成关键的许多基因被PA-L1/LF显著下调(图9F)。由于葡萄糖和谷氨酰胺是能量代谢和大分子合成的两个主要碳源，并且脂质合成为细胞增殖提供了的质膜结构单元，所以毒素对肿瘤生长的深远影响至少部分归因于对此处展示的关键代谢基因的转录抑制。

[0218] 实施例9

[0219] 该实施例证明，防止对工程化毒素的抗体应答允许重复处理过程。

[0220] 肿瘤相关蛋白酶活化的炭疽毒素提供高肿瘤特异性和高抗肿瘤功效。然而，这些细菌蛋白是哺乳动物宿主的外来抗原，并可能诱导阻止长期使用的中和抗体。因此，预防免疫应答的策略可能是有用的。

[0221] 为了检查喷司他丁和环磷酰胺(PC)的组合是否阻断中和工程化炭疽毒素的抗体的产生，使用在同系免疫活性C57BL/6小鼠中建立的高度转移性LL3(小鼠)癌进行试验。按照图10A和10B所示的时间表，用PBS、PC方案、IC2-PA/LF、或PC方案和IC2-PA/LF的联合疗法，处理荷瘤小鼠。对于联合处理组，在首次毒素处理之前的3天和4天，用PC的剂量准备荷瘤小鼠。联合处理组用总共4个周期的毒素和PC处理，周期间隔5-7天。单独的IC2-PA/LF显示出强烈的抗肿瘤作用(图10A和10B)。令人惊讶的是，所有的联合处理在早期和晚期表现出高得多的抗肿瘤效力，即使在治疗的第4个周期后肿瘤仍然对处理有响应(图10A-10B)。重要的是，在低(15μg IC2-PA+5μg LF)和中等(20μg IC2-PA+6.7μg LF)剂量组中没有观察到死亡。事实上，接受联合处理的小鼠在42天后仍然存活，远远滞后于其他小组的小鼠由于它们的高肿瘤负荷而必须被安乐死(图10A-10B)。PC方案单独显示有效的抗肿瘤活性(图10A-10B)。如预期的那样，在用毒素单独处理的所有小鼠中检测到中和抗体。早在首次处理首次处理后10天即检测到抗体，这是肿瘤响应于毒素(单独)处理而开始显示减少的时间。引人注目的是，甚至在第4轮治疗之后在联合治疗组的荷瘤小鼠中没有检测到中和抗体(图10C、10D和10E)。

[0222] 该项研究下一步扩展到包括对植入免疫活性C57BL/6小鼠中的另一种高度恶性的同系肿瘤，B16-BL6黑色素瘤的治疗。该实验采用如图15A-15B所示的修饰的毒素和PC方案。在第一周和接下来的几周内的每周，用PBS、IC2-PA/LF(30μg/10μg)、PC方案或PC方案和IC2-PA/LF的联合疗法，处理具有B16-BL6黑色素瘤的小鼠两次(图15A-15B)。此外，单独的PC方案具有显著的抗肿瘤作用(图15A-15B)，并且联合处理显示出显著的功效，即使在治疗的第5个周期后肿瘤仍然对处理有响应(图15A-15B)。一致的是，即使在治疗的5个周期后，在用联合的PC和毒素处理的小鼠中也未检测到针对工程化毒素的中和抗体(图15C-15D)。

[0223] 总之，上述结果表明，联合的毒素和PC疗法具有显著和延长的抗肿瘤作用。已证实，PC方案有助于联合疗法的抗肿瘤功效，这不仅通过阻止中和抗体的诱导而允许多个治疗周期，而且通过其之前未被认识到的抗实体肿瘤活性。体外细胞毒性测定显示，当单独或组合使用时，喷司他丁和环磷酰胺对B16-BL6、LL3和内皮细胞均没有毒性(图16A、16B、16C和16D)，这表明在这项工作中发现的PC的抗肿瘤作用，可能通过对支持肿瘤细胞增殖和存活的免疫细胞区的影响而发生。

[0224] 实施例10

[0225] 该实施例证明了喷司他丁和环磷酰胺对免疫细胞的影响。

[0226] 为了研究PC方案对免疫细胞的影响，如图15A-15B所示，在第二轮处理后从初始小鼠和来自不同处理组的具有B16-BL6黑色素瘤的小鼠中分离脾细胞。流式细胞术分析显示，在PC和联合治疗组中B细胞群(CD45R$^+$、IgM$^+$、IgD$^+$细胞)几乎完全耗尽(图11A)。在较小程度上，在这些处理组中的T细胞群(CD4$^+$、CD8$^+$和CD27$^+$细胞)也减少(图11B和11C)。PC方案和联合的PC和毒素处理不影响粒细胞群(CD11b$^+$和Gr-1$^+$细胞)。发现与初始小鼠中CD11b$^+$和Gr-1$^+$粒细胞的数目相比，荷瘤小鼠中的数目显著增加，而与处理类型无关，这表明存在对肿瘤的先天免疫应答(图11E)。单独的IC2-PA/LF不会显著影响这些细胞群(图11A、11B、11C、11D和11E)。因此，上述结果清楚地表明，PC方案有效地消耗淋巴细胞，特别是B细胞，同时保留先天免疫。与PC对淋巴细胞的作用一致，用PC方案单独处理或与毒素联合处理的小鼠的总脾细胞也显著降低(图11E)。不受特定理论或机制的束缚，认为对工程化毒素缺乏体液免疫应答是由于PC方案引起的B细胞消耗。

[0227] 实施例11-18

[0228] 在实施例11-18的实验中采用以下材料和方法。

[0229] 试剂

[0230] 用于DNA操作和修饰的酶购自New England Biolabs(Beverly,MA)。Dynabeads TALON获自Invitrogen(Carlsbad,CA)。按以下文献中所描述的制备PA和FP59:Pomerantsev等人，Protein Expr.Purif.,80:80-90(2011)；Liu等人，Cell.Microbiol.,9:977-987(2007)；和Gupta等人，PLoS One,3:e3130(2008)。CMG2的胞外结构域(ECD)(氨基酸40-218)在大肠杆菌中产生且具有N端His6标签(Santelli等人，Nature,430:905-908(2004)；Chen等人，J.Biol.Chem.,282:9834-9846(2007))。具有C端His6序列的TEM8的ECD(氨基酸35-227)在CHO细胞中表达。将后一种蛋白质用镍-次氮基三乙酸柱(Qiagen,Valencia,CA)从培养基中浓缩并纯化，并通过MONOQ柱层析(GE Healthcare,Pittsburgh,PA)进一步纯化。最低必需培养基α、HEPES缓冲液、潮霉素B、汉克斯平衡盐溶液(HBSS)和胎牛血清(FBS)来自Invitrogen。诱变核苷三磷酸8-氧代-2'-脱氧鸟苷三磷酸(8-氧代-dGTP)和6-(2-脱氧-β-

D-呋喃核糖基)-3,4-二氢-8H-嘧啶并[4,5-c][1,2]恶嗪-7-酮三磷酸(dPTP),购自Trilink Biotechnologies(San Diego,CA)。其他化学试剂获自Sigma(St.Louis,MO)。

[0231] 随机突变的PAD4噬菌体展示文库的构建

[0232] 通过用10ng pYS5模板DNA和核苷酸类似物8-氧代-dGTP和dPTP进行PCR扩增,来实现PAD4的随机诱变(Chen等人,J.Biol.Chem.,282:9834-9846(2007);Zaccolo等人,J.Mol.Biol.,255:589-603(1996))。PCR反应(总体积为25μl)含有2.5单位的Takara Ex TaqDNA聚合酶(Clontech,Mountain View,CA),正向引物5'GCTTGAATTCATTTCATTATGATAGAAATAAC3'(SEQ ID NO:34)和反向引物5'AATTCAAGCTTTCCTATCTCATAGCCTTTTTT 3'(SEQ ID NO:35)各1μM(EcoRI和HindIII位点分别加下划线和粗体),2mM $MgCl_2$,10mM Tris-HCl,pH 8.3,50mM KCl,dATP、dCTP、dGTP、dTTP各400μM,50μM的8-氧代-dGTP和10μM的dPTP。在42次循环(94℃持续1min,60℃持续1.5min和72℃持续5min)后,将1μl扩增的DNA用于第二次PCR,其中使用上述条件,不同之处在于8-氧代-dGTP和dPTP被略去。将第二次PCR产物用EcoRI和HindIII消化,克隆到T7Select10-3噬菌体展示系统中,并根据制造商的说明书(Novagen,Madison,WI)包装入噬菌体。

[0233] 使用磁珠对CMG2-和TEM8-特异性PAD4变体的选择

[0234] 通过利用Dynabeads TALON的四轮淘选,选择噬菌体文库中的CMG2特异性克隆。通过用TALON结合和洗涤缓冲液(50mM磷酸钠,pH 8.0,300mM NaCl,5mM $MgCl_2$,0.01%Tween-20,和100μg/ml牛血清白蛋白)洗涤1mg Dynabeads TALON,然后加入10μg CMG2的胞外结构域,来开始每轮淘选。于4℃在滚转器上孵育30min后,将珠用相同缓冲液洗涤4次。然后将噬菌体(1×10^{9}个颗粒)加入到混合物中,并于4℃孵育90min。在四个连续的淘选循环中,在10min、2h、5h和20h的总时段内,用相同的缓冲液洗涤珠5次。在每个循环最后的一次洗涤后,通过于4℃在滚转器上孵育混合物10min,用100μl TALON洗脱缓冲液(150mM咪唑,50mM磷酸钠,pH 8.0,300mM NaCl,5mM $MgCl_2$,0.01%Tween-20和100μg/ml牛血清白蛋白)从珠上洗脱噬菌体。噬菌体通过在大肠杆菌BLT5403中生长来扩增,并在下一循环的淘选中使用。为了选择TEM8特异性PAD4变体,进行上述实验程序,不同之处在于使用10μg TEM8的胞外结构域与Dynabeads磁珠结合。

[0235] 对T7噬菌体中的DNA插入片段测序

[0236] 从单个噬菌体斑中挑选来自第四轮淘选的噬菌体,将其悬浮于M9LB液体培养基(Novagen,Madison,WI)中,并在室温下放置2h以使噬菌体颗粒从琼脂扩散。然后将EDTA加入到噬菌体悬浮液中以得到10mM的终浓度,并将该悬浮液在65℃加热10min。将1μl样品在含有2.5单位的Takara Ex Taq DNA聚合酶,正向引物5'TAAGTACGCAATGGGCCACG3'(SEQ ID NO:36)和反向引物5'AACTCAGCGGCAGTCTCAAC3'(SEQ ID NO:37)的反应中用于PCR扩增,除了退火温度为50℃之外,其PCR条件如上所述。通过双脱氧介导的测序反应对PCR产物进行测序。

[0237] PA I656和PA E654突变体的构建

[0238] 用质粒pYS54进行突变的PA结构域4序列的克隆,所述质粒pYS54是在对应于氨基酸650-652和665-667的位置分别具有沉默限制位点StuI和XhoI的表达载体(Chen等人,J.Biol.Chem.,282:9834-9846(2007))。为了获得I656或E654的全部19个氨基酸取代,合成具有SEQ ID NO:38的正义链序列和SEQ ID NO:39的反义链序列的寡核苷酸,其中正义链中

的E654密码子gaa或I656密码子ata(但不是两者)以及反义链中的相应密码子完全随机化。此外,通过在上述寡核苷酸中包含659S和662R密码子,以相似的方式制备了具有R659S/M662R取代加E654的所有19个氨基酸取代的突变体。在每种情况下,通过在100℃加热正义链和反义链的混合物10min,并使混合物缓慢冷却至室温来获得双链盒。所得产物用StuI和XhoI消化,并连接到用相同限制性内切核酸酶消化的pYS54中,并将连接混合物转化到大肠杆菌XL-1Blue中。对从单个克隆分离的质粒DNA进行测序,以选择所有20个氨基酸取代。

[0239] 具有PAD4取代并具有修饰的弗林蛋白酶位点的PA蛋白的构建

[0240] 为了制备在鉴定为参与结合CMG2和TEM8的残基(I656等)中具有取代以及还有不可切割的弗林蛋白酶位点的PA蛋白,用PstI和HindIII消化上述的pYS54构建体,并将插入区替换为从编码PA-U7的质粒分离的相应PstI到HindⅢ的片段(Liu等人,J.Biol.Chem.,276:17976-17984(2001)),其中^{164}RKKR^{167}序列由PGG取代。由PA I656V和PA I656Q衍生的双取代PA蛋白因此分别被命名为PA-U7 I656V和PA-U7 I656Q。以类似的方式,将改变的弗林蛋白酶位点序列插入具有多个取代的构建体中,包括PA E654T/R659S/M662R蛋白(缩写为PA TSR)。在这种情况下,使用的替代的弗林蛋白酶位点序列包括来自PA-U7(如上)和PA-L1的那些,后者是被基质金属蛋白酶切割的那些(Liu等人,Cancer Res.,60:6061-6067(2000))。由PA TSR衍生的双突变PA蛋白,因此命名为PA-U7TSR和PA-L1TSR。

[0241] PA蛋白的表达和纯化

[0242] 将编码上述单个构建体的质粒转化到非毒性炭疽芽孢杆菌菌株BH450或BH460中,并使转化体在含有10μg/ml卡那霉素的FA培养基中于37℃生长15h(Pomerantsev等人,Protein Expr.Purif.,80:80-90(2011))。通过先前描述的方法,从培养物上清液浓缩PA蛋白,并通过在MONOQ柱(GE Healthcare)上的层析来纯化(Pomerantsev等人,Protein Expr.Purif.,80:80-90(2011);Park et al.,Protein Expr.Purif.18,293-302(2000))。

[0243] PA对受体的亲和力的测量

[0244] 如先前所述,使用Schild图分析(Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,106:12424-12429(2009);Ittelson等人,Nature,242:330-332(1973)),以确定PA变体蛋白对细胞受体的亲和力(表观K_d)。简而言之,使用无毒PA-U7、PA-U7 I656Q、PA-U7 I656V和PA-U7 TSR蛋白作为竞争剂,以阻断野生型PA对CHO细胞的毒性。进行多次PA剂量-反应细胞毒性测定,每次在不同固定浓度的竞争剂存在下进行。将剂量-反应曲线上的中点(Ti)相对于竞争剂浓度作图。Ti是在特定的固定竞争剂浓度下获得的剂量-反应曲线的中点。To是没有添加竞争剂时的Ti值。在该点所得直线的截距,其中log((Ti/To)-1)=0,识别竞争剂浓度等于表观K_d值,其是竞争剂针对毒素产生毒性所用的受体的亲和力的度量。

[0245] 细胞和培养基

[0246] 亲本野生型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(CHO WTP4),以及分别过表达CMG2和TEM8的表达PA受体的CHO CMG2-C4和CHO TEM8-T4细胞,如先前所述(Liu等人,Cell.Microbiol.9:977-987(2007);Liu等人,J.Biol.Chem.278:5227-5234(2003))。在含有或不含300μg/ml潮霉素B的具有5%FBS、2mM谷氨酰胺、5mM HEPES,pH7.4和50μg/ml庆大霉素的最低必需培养基α中培养CHO细胞。将HeLa和SN12C细胞于具有10%FBS、2mM谷氨酰胺和50μg/ml庆大霉素的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中培养。如先前所描述,小鼠胚胎成纤维(MEF)细胞从野生型、CMG2$^{-/-}$、TEM8$^{-/-}$和CMG2$^{-/-}$/TEM8$^{-/-}$小鼠(下面将要描述)的E13.5胚胎分离(Liu等人,

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,106:12424-12429(2009)),并培养于具有10%FBS、2mM谷氨酰胺和50μg/ml庆大霉素的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中。MEF细胞在85-90%汇合时通过1:4拆分来传代,并在前六次传代中使用。

[0247] 培养细胞的细胞毒性试验

[0248] 将细胞以10,000个细胞/孔接种在96孔板中,并在处理前培养24h。将PA蛋白与用于CHO细胞的100ng/ml的FP59以及用于MEF细胞的400ng/ml的FP59组合加入到细胞中,使终体积为200μl/孔。通过用50μl含有2.5mg/ml MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓溴化物)的培养基代替该培养基来测定处理后48h的细胞活力。在37℃孵育1h后移除培养基,并将由活细胞产生的蓝色颜料溶解于50μl/孔的在90%(v/v)异丙醇中的0.5%(w/v)SDS,25mM HCl。将板涡旋,并且使用酶标仪(Spectra Max 190,Molecular Devices,Sunnyvale,CA)将氧化的MTT测量为A_{570}。用PRISM软件(GraphPad Software Inc.,San Diego,CA)分析结果,作为含有FP59而不含PA的对照孔的百分比活力。通过具有可变斜率的非线性回归S形剂量-反应分析确定EC_{50}值。每个测定进行三次,并显示来自代表性测定的数据。

[0249] PA变体对受体缺陷小鼠的致死性

[0250] 先前描述了此处使用的$CMG2^{-/-}$、$TEM8^{-/-}$和$CMG2^{-/-/}TEM8^{-/-}$(双重无效)C57BL/6小鼠(Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,106:12424-12429(2009);Liu等人,Nature,501:63-68(2013))。这些小鼠和同窝的对照小鼠(全部8～10周龄),用两次剂量的PA或PA变体以及FP59(在0.5ml PBS中,剂量如在表和图中所示)以2天的间隔经腹膜内激发。在注射后一周内每天两次观察小鼠的不适迹象。所有小鼠研究均按照国家过敏和传染病动物护理和使用委员会批准的方案进行。

[0251] PA变体的杀肿瘤活性

[0252] 用1×10^7个HeLa细胞/小鼠经皮内注射无胸腺裸鼠,并使肿瘤异种移植物生长至体重的0.05%。如图中所示,将荷瘤小鼠随机分组,并且以2或3天的时间间隔经腹膜内注射6次剂量的PBS或工程化毒素。以2或3天的间隔测量体重和肿瘤质量。用数字卡尺(FV Fowler Company,Inc.,Newton,MA)测量肿瘤,并且使用肿瘤尺寸的长度、宽度和高度,用以下公式估计肿瘤重量:肿瘤重量(mg)=1/2(以mm计的长度×以mm^2计的宽度),或1/2(以mm计的长度×以mm计的宽度×以mm计的高度)。

[0253] 实施例11

[0254] 该实施例展示了选择与CMG2结合的PAD4突变体。

[0255] 使用与磁珠结合(Dynabeads TALON)的CMG2和TEM8的可溶形式的胞外结构域,开发了改进的淘选程序。通过显示用100ng PA预孵育珠减少了90%的噬菌体结合(表1),验证了噬菌体展示的PAD4与每种类型的珠的特异性结合。

[0256] 表1

[0257]

处理	结合 Dynabeads 的噬菌体
实验#1 – CMG2 磁珠	
对照 [a]	7.5×10^2
CMG2-磁珠	6.6×10^4
CMG2-磁珠 + PA[b]	5.6×10^3
实验#2 – TEM8 磁珠	
对照 [a]	7.4×10^2
TEM8-磁珠	7.0×10^4
TEM8-磁珠 + PA[b]	5.6×10^3

[0258] [a]不加入胞外结构域的情况下噬菌体与Dynabeads的结合。

[0259] [b]在添加到Dynabeads之前，将100ng PA与噬菌体裂解物混合。

[0260] 表1：噬菌体结合后，用结合和洗涤缓冲液洗涤混合物5次总共10min，用洗脱缓冲液洗脱噬菌体并滴定。

[0261] 为了富集具有高亲和力的PAD4变体，采用10min、2h、5h和20h的洗涤时间增加每轮连续扩增中洗涤的严格性。第三轮淘选的噬菌体数量增加了600倍。CMG2上的第四轮淘选，导致噬菌体数目减少65％(表2)，这可能是因为到第三轮已达到最高可能的亲和力，并且延长的20h洗涤除去了这些紧密结合的噬菌体中的一些。在TEM8珠上淘选时，没有看到类似的效果。第四轮淘选后，选择单个噬菌斑并测序。

[0262] 表2

[0263]

淘选轮次	结合 Dynabeads 的噬菌体
实验#1 – CMG2-磁珠	
第一轮	3.8×10^4
第二轮	3.8×10^5
第三轮	2.3×10^7
第四轮	8.1×10^6
实验#2 – TEM8-磁珠	
第一轮	7.0×10^4
第二轮	1.2×10^7
第三轮	1.1×10^7
第四轮	4.5×10^7

[0264] 表2:实验程序同如表1中所描述的,不同之处在于在淘选的第一轮、第二轮、第三轮、第四轮分别将磁珠洗涤10min、2h、5h和20h。

[0265] 在对应于PA氨基酸596-735的420个碱基对(bp)区域上总共测序了104个噬菌体克隆。将这些DNA序列进行比对。测定克隆所得的氨基酸序列。在检查的所得总共43,680bp中,共发现616个变化,突变率为1.4%。然而,该值和随后的分析是针对选择与CMG2结合后的噬菌体文库。这种选择将消除编码错误折叠或不稳定蛋白的大部分序列,以及具有减少受体识别的特定表面残基变化的那些序列。该选择也预计会富集沉默突变。发现密码子位置1-3处的取代数分别为207、165和244。因此,不太可能改变氨基酸的第3位的取代被富集,与预期的消除具有最常见的诱变事件(减少结构和/或功能的氨基酸改变)的克隆一致。

[0266] 虽然计算了突变频率和其他数值,但这些只能被看作是估计值。DNA和氨基酸序列的比较显示许多克隆是相关的。在多个克隆中观察到的bp变化必须在早期的PCR循环中发生,然后扩展到许多子代序列中。这说明克隆不是独立的,这是实现准确的统计分析所需要的。

[0267] 因为8-氧代-GTP引起A到C和T到G的颠换,并且dPTP引起A到G和T到C的转变(Zaccolo等人,J.Mol.Biol.,255:589-603(1996)),所以应该产生广谱的氨基酸取代,尽管含有G和C的密码子受影响较小。尽管CMG2选择的文库中几乎每个克隆都有多个突变,但是惊人地发现,在测序的86个克隆的85个中发生了在4β6和4β7之间的区域(氨基酸656-665)中Ile656到Val的突变,这表明残基Ile656在PA与CMG2受体结合中起作用。相比之下,TEM8选择的文库显示出更多样化的取代。然而,与Ile656在相同的区域中的残基Glu654,经常发生突变。因此,在测序的95个随机克隆中,27个具有由Gly或Ala取代的Glu654,这表明该残基可能在PA与TEM8的结合中起作用。

[0268] 实施例12

[0269] 该实施例证明了在Ile656处具有取代的PAD4变体。

[0270] 为了进一步表征Ile656在PA与TEM8结合中的作用，将Ile656突变为所有其他19种氨基酸。用Leu、Met、Gln、Ser、Thr、Val和Tyr取代Ile656被良好耐受，因为这些蛋白保留了对野生型CHO WTP4细胞的细胞毒性(表3)。尽管这些Ile656突变体还保留了对CHO CMG2-C4细胞(仅过度表达CMG2的CHO细胞系)的活性，但所有这些PA变体显示出大大降低的对CHO TEM8-T4细胞(仅过表达TEM8)的细胞毒性。具体而言，PA I656Q和I656S在80ng/ml的所测试得最高浓度下显示对CHO TEM8-T4细胞没有细胞毒性。因此，PA I656Q和I656S对CMG2具有高度选择性。所有其他变体对所有三种类型的CHO细胞均显示出降低的细胞毒性。即使在所测试的最高浓度(80ng/ml)下，PA I656W也显示对所述细胞系没有细胞毒性(表3)。几乎所有I656取代变体都显示出，对CHO TEM8-T4细胞比对CHO CMG2-C4和CHO WTP4细胞大得多的细胞毒性损失。

[0271] 表3

[0272]

PA 变体	针对 CHO 细胞[#]的 EC_{50} (ng/ml)			针对 CMG2 vs. TEM8[$] 的选择性
	WTP4	TEM8-T4	CMG2-C4	
PA (天然)	0.14*	0.21	0.05	4
PA I656Q	0.48*	>83.3	0.05	>1667
PA I656S	0.42	>83.3	0.07	>1190
PA I656N	1.10	>83.3	0.12	>694
PA I656H	4.11	>83.3	0.17	>490
PA I656E	1.71	>83.3	0.17	>490
PA I656A	3.87	>83.3	0.26	>320
PA I656G	1.83	>83.3	0.29	>287
PA I656K	9.27	>83.3	0.31	>269
PA I656C	0.63*	17.33	0.10	173
PA I656M	0.24	4.70	0.05	99
PA I656Y	2.13	13.61	0.14	99
PA I656L	0.22	3.71	0.04	92
PA I656F	1.76	7.29	0.12	61
PA I656T	0.28	1.59	0.03	53
PA I656D	15.33	>83.3	1.91	>44
PA I656P	2.76	5.25	0.22	24
PA I656V	0.35	1.34	0.06	22
PA I656R	>83.3	>83.3	5.33	>16
PA I656W	>83.3	>83.3	>83.3	nc[#]

[0273] [$]比率：(对TEM8-T4的$EC_{50}$)/(对CMG2-C4的$EC_{50}$)。根据该值将变体分类。

[0274] [#]nc表示无法计算。

[0275] [#]在EC_{50}值中，标准偏差(SD)表示如下：

[0276] 没有星号表示SD＝<0.5×绝对值或无法计算，一个星号表示SD＝0.5-1.0×绝对值。

[0277] 表3：测试了在位置656含有全部20种氨基酸的PA I656突变体对CHO细胞的毒性。表中的值是EC_{50}，其为当与100ng/ml的FP59组合时杀死50％细胞的PA蛋白的浓度。分析进行

了三次，并列出了平均值。

[0278] 实施例13

[0279] 该实施例展示了在Glu654处具有取代的PAD4变体。

[0280] 为了进一步表征位置654在与CMG2结合中的作用，使E654突变为所有其他19种氨基酸。在许多情况下，取代导致对CHO-CMG2-C4的效力降低比对CHO-TEM8-T4细胞的效力降低更大(表4)，尽管该效力损失小于由I656处的取代引起的效力损失(表3)。如对这两种细胞类型保留的毒性所显示的，只有Val的取代被完全耐受。相比之下，Ala、Cys、Gly、His、Asn、Gln、Ser、Thr、Trp和Tyr的取代，导致对CHO-CMG2-C4细胞的效力降低，其并不与对CHO-TEM8-T4的效力降低平行。实际上，这些取代中的许多显示出导致对CHO-TEM8-T4细胞的效力轻微增加，特别是在E654Q、E654V和E654W变体中可见的。与天然PA相比，这些变体对CHO-TEM8-T4的毒性高2-3倍，这表明E654残基在确定对两种受体的相对亲和力方面发挥作用。

[0281] 表4

[0282]

PA 变体	针对 CHO 细胞[#]的 EC_{50} (ng/ml)		对 TEM8 vs. CMG2[$] 的选择性
	TEM8-T4	CMG2-C4	
PA (天然)	0.52	0.39*	0.7
PA E654C	0.16	0.81*	4.9
PA E654N	0.16	0.68	4.3
PA E654Q	0.13	0.39	2.9
PA E654S	0.10	0.26*	2.6
PA E654H	0.22	0.53	2.4
PA E654F	0.63	1.43	2.3
PA E654Y	0.16	0.36	2.3
PA E654W	0.15*	0.34	2.2
PA E654T	0.42	0.89	2.1
PA E654I	0.73	1.27	1.7
PA E654M	0.35	0.58	1.7
PA E654A	0.54	0.88	1.6
PA E654L	0.52	0.70	1.3
PA E654G	0.58	0.59	1.0
PA E654V	0.19*	0.20	1.0
PA E654R	2.40	1.12	0.5
PA E654P	7.20	2.80	0.4
PA E654D	2.40	0.83	0.3
PA E654K	2.50	0.50	0.2

[0283] [$]比率：(对CMG2-C4的$EC_{50}$)/(对TEM8-T4的$EC_{50}$)。根据此值将变体分类。

[0284] [#]在EC_{50}值中，标准偏差(SD)表示如下：

[0285] 没有星号表示SD＝<0.5×绝对值或不能计算，一个星号表示SD＝0.5-1.0×绝对值。

[0286] 表4：测试了在位置654处含有全部20种氨基酸的PA E654变体对CHO细胞的毒性。表中的值是EC_{50}，其为当与100ng/ml的FP59组合时杀死50％细胞的PA蛋白的浓度。分析进行

了三次，并列出了平均值。

[0287] 实施例14

[0288] 该实施例展示了在多个残基中具有取代的PAD4变体。

[0289] 为了检查组合取代的效果，选择了将所有19种氨基酸取代E654与R659S/M662R取代组合的PA变体。全部19个取代突变体显示对CHO-CMG2-C4细胞的毒性降低(表5)。特别地，PA变体KSR、PSR和RSR，当以80ng/ml(所测试的最高浓度)添加时对CHO-CMG2-C4细胞无毒性。相比之下，变体PA ASR、GSR、HSR、MSR、NSR、QSR、SSR、TSR和WSR具有等于或略高于天然PA的对CHO-TEM8-T4细胞的效力(表5)。例如，PA TSR对CHO-TEM8-T4细胞的毒性是天然PA的2倍，但对CHO-CMG2-C4细胞的毒性低23倍。PA QSR、MSR和GSR变体类似于PA TSR，仅具有稍低的选择性。基于这些数据，选择PA MSR、QSR和TSR作进一步研究。

[0290] 表5

[0291]

PA 变体		针对 CHO 细胞的 EC_{50} (ng/ml) *		对 TEM8 vs. CMG2[$] 的选择性
名称	取代 (除 R659S/M662R 以外的)	TEM8-T4	CMG2-C4	
PA (天然)		0.40	0.16	0.4
MSR	E654M	0.60	6.83	11.4
TSR	E654T	0.35	3.00	8.5
QSR	E654Q	0.44	3.20	7.3
GSR	E654G	0.49	3.47	7.1
YSR	E654Y	0.63	4.33	6.8
VSR	E654V	0.71	3.93	5.5
RSR	E654R	15.67	>83	>5.3
LSR	E654L	3.53	17.3	4.9
FSR	E654F	0.62	2.97	4.8
ISR	E654I	2.00	9.33	4.7
NSR	E654N	0.43	1.73	4.1
CSR	E654C	6.40	17.0	2.7
SSR	E654S	0.35	0.91*	2.6
KSR	E654K	40.2	>83	>2
HSR	E654H	0.21	0.38	1.8

[0292]

ASR	E654A	0.36	0.60	1.7
WSR	E654W	0.47	0.63	1.3
DSR	E654D	8.00	5.00	0.6
PSR	E654P	>83	>83	nc[#]

[0293] [$]比率：(对CMG2-C4的$EC_{50}$)/(对TEM8-T4的$EC_{50}$)。

[0294] [#]nc是无法计算的。

[0295] [#]在EC_{50}值中，标准偏差(SD)表示如下：

[0296] 没有星号表示SD＝<0.5×绝对值或不能计算，一个星号表示SD＝0.5-1.0×绝对值。

[0297] 表5：测试了具有R659S和M662R取代以及其他19种氨基酸中每一种在位置654处的

取代的PA变体，对CHO细胞的毒性。3个字母的名称确定在位置654、659和662处的非天然取代。表中的值是EC_{50}，其为当与100ng/ml的FP59组合时产生50％杀伤的PA蛋白的浓度。分析进行了三次，并列出了平均值。

[0298] 实施例15

[0299] 该实施例证实PA变体对受体缺陷的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的细胞毒性。

[0300] 虽然表达单一受体的CHO细胞系对于确定PA变体对CMG2和TEM8的偏好是必需的，但试图验证PA蛋白对于其他细胞类型的行为。缺失每种受体的小鼠以及从它们分离的细胞，提供了明确的遗传系统来检查PA变体的受体特异性(Liu等人，Cell Host Microbe，8:455-462(2010)；Liu等人，Nature，501:63-68(2013)；Liu等人，Toxins(Basel)，5:1-8(2012))。具有在I656处的取代的PA变体(来自表3)针对从这些小鼠分离的MEF的细胞毒性测试，清楚地证明了PA I656变体对CMG2的高特异性(实验1，表6)。野生型(WT)MEF细胞显示表达两种受体，而CMG2-/-MEF对PA I656Q高度耐受，同时对天然PA和其他可使用剩余TEM8受体的变体保持敏感。来自缺失两种受体的小鼠的MEF细胞对所有PA变体都高度耐受，这与之前除了CMG2和TEM8之外没有生理学显著受体的证据一致(Liu等人，Nature，501:63-68(2013)；Liu等人，Toxins(Basel)，5:1-8(2012))。

[0301] 在平行实验中(表6，实验#2)，再次使用MEF，观察到PA三重取代变体如PA TSR通过TEM8受体发挥其毒性，因为CMG2受体的缺失几乎没有影响它们的效力，而TEM8受体的缺失降低效力>100倍。总之，使用MEF细胞的这些数据证实了表3和5中所示的PA变体的选择性。

[0302] 表6

[0303]

	针对 MEF 的 EC_{50} (ng/ml)			
PA 变体	WT	$CMG2^{-/-}$	$TEM8^{-/-}$	$CMG2^{-/-}$/ $TEM8^{-/-}$
实验#1				
PA (天然)	0.8	4.8	0.9	>1000
PA I656Q	0.9	>1000	0.9	>1000
PA I656V	1.0	7.0	1.1	>1000
PA I656W	>1000	>1000	>1000	>1000
实验#2				
PA (天然)	0.9	17	1.0	
PA MSR	9.5	19	>1,000	
PA QSR	9.0	16	700	
PA TSR	3.5	7	130	

[0304] 表6：测试了PA变体对所示MEF细胞的细胞毒性。表中的值是EC_{50}，其为当与400ng/ml的FP59组合时杀死50％细胞的PA蛋白的浓度。分析进行了两次，结果与所提供的相似。

[0305] 实施例16

[0306] 该实施例证明了由Schild图分析所确定的PA变体对受体的亲和力。

[0307] 预期如上所述的PA变体的毒性差异，主要来自受体结合亲和力的差异。为了检验这个假设，通过竞争性Schild图分析来测量表观亲和力。这些分析要求蛋白配体是目标蛋白的无毒变体。通过如下来构建PA I656Q、PA I656V和PA TSR蛋白的无毒变体：用之前表征的PA-U7蛋白的不可切割的序列PGG替换它们的弗林蛋白酶切割位点^{164}RKKR^{167}(SEQ ID NO:4)(Liu等人，J.Biol.Chem.，276:17976-17984(2001))。得到的PA-U7 I656Q、PA-U7 I656V

和PA-U7 TSR被用作无毒的受体结合竞争剂。在不同量的竞争剂中进行的剂量-反应曲线中点的倒数作图，显示了竞争剂对PA受体的表观亲和力的表观解离常数(K_d)。这些分析显示，PA I656Q保留了对CMG2受体的亲和力，但极大地失去了对TEM8受体的亲和力(表7，实验#1)。尽管PA I656V保留了对CMG2的亲和力，但它对TEM8的亲和力适度降低。相反，PA-U7 TSR显示对CMG2的亲和力的降低(表7，实验#2)，与其对TEM8的偏好一致。

[0308] 表7

[0309]

竞争剂	针对细胞系的 Kd (nM)	
	CHO CMG2-C4	CHO TEM8-T4
实验#1		
PA-U7	8	25
PA-U7 I656V	8	46
PA-U7 I656Q	8	>240
实验#2		
PA-U7	12	35
PA-U7 TSR	48	30

[0310] 表7：如方法部分所述进行分析。PA-U7、PA-U7 I656V和PA-U7 I656Q以及PA-U7 TSR在利用列出的两种细胞系进行的细胞毒性测定中用作PA的竞争剂。Schild图分析确定了竞争剂针对两种细胞系上的受体的表观亲和力。

[0311] 实施例17

[0312] 该实施例证明了PA变体对CMG2和TEM8敲除小鼠的毒性。

[0313] 为了探索上述PA变体的不同受体特异性是否适用于体内，使用20μg PA变体加20μg FP59对$CMG2^{-/-}$和/或$TEM8^{-/-}$小鼠及其同窝对照小鼠进行激发(图17A-17D)。所有WT和$TEM8^{-/-}$小鼠在24h内被天然PA+FP59杀死(图17A)，而大多数$CMG2^{-/-}$小鼠存活到48h，但是在随后的24h内死于在48h时给与的第二次剂量，这与CMG2是介导小鼠致死性的主要毒素受体一致。所有$CMG2^{-/-}$小鼠经两次剂量的CMG2选择性PA I656Q+FP59仍存活(图17B)，而其所有同窝对照小鼠和$TEM8^{-/-}$小鼠均死亡，大多数在经毒素激发后24h内，这证明PA I656Q对CMG2的高特异性延伸至完整小鼠的情况。PA I656V对CMG2特异性的适度增加也得到了证实，因为50％的$CMG2^{-/-}$小鼠存活至接受两次剂量的PA I656V+FP59后的75h(图17C)，而在用天然PA+FP59激发之后所有$CMG2^{-/-}$小鼠在这一时间已经死亡(图17A和17C，比较)。

[0314] 推定的TEM8特异性PA TSR变体对野生型小鼠和无CMG2小鼠的效力的比较，产生了如图17D所示的结果。与天然PA相比，PA TSR变体对野生型小鼠的毒性小得多，这与CMG2受体是毒素敏感性的主要决定因素一致。然而，与对野生型小鼠相比，PA TSR对无CMG2小鼠更有效。在无CMG2的小鼠中，死亡必定是由靶向某些(未确定的)组织中的TEM8受体导致的，并且PA TSR显示比天然PA更有效地实现这一点。

[0315] 实施例18

[0316] 该实施例证明了PA变体对小鼠中人HeLa异种移植物的杀肿瘤活性。

[0317] 为了检查改变PA的受体特异性对其靶向肿瘤的能力的影响，与先前描述的PA-L1变体相比较，针对小鼠中的HeLa细胞异种移植物测试了两种PA变体。此处使用的PA变体在弗林蛋白酶位点处包含MMP特异性L1序列以实现肿瘤特异性，并且使用的效应物是LF而非FP59。通过以2或3天的间隔经腹膜内注射6次剂量的毒素，来激发具有实体皮内肿瘤结节

(构成总体重的约0.05%)的小鼠。在使用的剂量下,各组之间的小鼠体重没有差异(图18A)。另外,小鼠没有表现出疾病或严重异常的身体迹象。然而,PA变体对肿瘤大小的影响存在很大差异。与PBS处理的肿瘤相比,PA-L1和PA-L1I656Q具有强的和相似的抗肿瘤活性,将肿瘤尺寸减小>80%(图18B)。相比之下,肿瘤对用PA-L1TSR处理的反应较少,仅发生50%的肿瘤尺寸减少(图18B)。这些数据与其他证据相一致,即当PA通过CMG2而非TEM8起作用时靶向肿瘤是最有效的。

[0318] 实施例19

[0319] 本实施例展示了通过施用IC2-PA和LF来治疗猫的口腔黑色素瘤的方法。

[0320] 在旨在建立初步安全性和有效性数据的0期试验中,募集了5只猫并用微剂量(15μg PA-U2-R200A+15μg PA-L1-I207R+10μg LF,定义为低于在小鼠中观察到的安全剂量的1/100)在一周内经肿瘤内注射3次。所有的猫都能很好地耐受处理,并且没有明显的副作用。两只猫的理毛行为和进食能力有所增强。如通过计算机断层扫描(CT)所测量的,1只猫在3次注射IC2-PA+LF后肿瘤体积减少了31%。4只猫疾病稳定。组织学分析显示,3只猫的肿瘤细胞凋亡率显著增加。

[0321] 在0期试验结果的鼓励下,启动了I/II期联合剂量的剂量探索和疗效试验。该试验的第一群组和第二群组分别接受6次注射,剂量分别比0期试验大5倍或25倍。在5只猫中的3只观察到肿瘤体积减小,没有副作用。该试验目前正在进行中。

[0322] 实施例20

[0323] 该实施例展示了通过施用IC2-PA和LF来治疗狗的口腔黑色素瘤的方法。

[0324] 在该正在进行的1期试验中,2只具有口腔黑色素瘤的狗被募集,并用375μg PA-U2-R200A+375μg PA-L1-I207R+250μg LF处理,每周3次经肿瘤内注射持续两周,随后手术切除肿瘤。这2只狗对处理耐受良好,没有明显的副作用。在整个研究中测量狗的体重和肿瘤尺寸。结果如图19A-19D中所示。一只狗的肿瘤体积减少50%(图19A),另一只的肿瘤体积适度减少(图19C)。该试验当前正在进行中。

[0325] 在此将本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利通过引用并入,其程度如同将各参考文献单独且明确指明通过引用并入,并且在本文整体示出一样。

[0326] 术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”和“所述(the)”和“至少一个/一种”以及类似的指代物在描述本发明的上下文中(特别是在下述权利要求的上下文中)的使用应被解释为既涵盖单数又涵盖复数,除非本文另外指明或者上下文明显矛盾。术语“至少一个/一种”之后为一个或多个项目的列表的使用(例如,“A和B中的至少一个”),应被解释为表示选自所列出的项目(A或B)的一项或所列项目(A和B)中两个或更多个的任何组合,除非本文另外指明或者上下文明显矛盾。术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”以及“含有(containing)”应被解释为开放式术语(即,意为“包括但不限于”)除非另外标注。本文数值范围的叙述仅意图作为单独指落入范围内的各独立数值的速记法,除非本文另外指明,并且各独立的数值并入说明书如同本文单独对其进行叙述一样。可以以任何合适的顺序实施本文所述的所有方法,除非本文另外指明或者在其它方面与上下文明显矛盾。本文提供的任何或所有实施例或者示例性语言(例如“如”)的使用仅意图更好地阐明本发明,并且不对本发明的范围构成限制,除非另外声明。说明书中的语言均不应被解释为指示任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必要的。

[0327] 本文描述了本发明的优选实施方案，包括发明人已知的实施本发明的最佳方式。经阅读前述描述，那些优选实施方案的改变对于本领域普通技术人员而言可以变得显而易见。发明人期望本领域技术人员视情况应用此类改变，并且发明人意图以与本文具体所述的不同的方式实施本发明。因此，如适用的法律所允许的，本发明包括在此所附的权利要求中所述的主题的所有修改和等同物。此外，本发明涵盖以上所述元素的所有可能的改变的任何组合，除非本文另外指明或者在其它方面与上下文明显矛盾。

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部(THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)

<120> 修饰的炭疽毒素保护性抗原

<130> 726173

<150> US 62/323,218

<151> 2016-04-15

<150> US 62/210,771

<151> 2015-08-27

<160> 39

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 735

<212> PRT

<213> 炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)

<400> 1

```
Glu Val Lys Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser
1               5                  10                  15
Gln Gly Leu Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro
            20                  25                  30
Met Val Val Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser
        35                  40                  45
Glu Leu Glu Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile
    50                  55                  60
Trp Ser Gly Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala
65                  70                  75                  80
Thr Ser Ala Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val
                85                  90                  95
Ile Asn Lys Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg
            100                 105                 110
Leu Tyr Gln Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys
        115                 120                 125
Gly Leu Asp Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu
    130                 135                 140
Val Ile Ser Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser
145                 150                 155                 160
Ser Asn Ser Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro
                165                 170                 175
```

Asp Arg Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr
180 185 190
Thr Val Asp Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser
195 200 205
Asn Ile His Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu
210 215 220
Lys Trp Ser Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr
225 230 235 240
Gly Arg Ile Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val
245 250 255
Ala Ala Tyr Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser
260 265 270
Lys Asn Glu Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr
275 280 285
Ile Ser Lys Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His
290 295 300
Gly Asn Ala Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val
305 310 315 320
Ser Ala Gly Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His
325 330 335
Ser Leu Ser Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu
340 345 350
Asn Thr Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn
355 360 365
Thr Gly Thr Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val
370 375 380
Leu Gly Lys Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln
385 390 395 400
Leu Ser Gln Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu
405 410 415
Ala Pro Ile Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile
420 425 430
Thr Met Asn Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu
435 440 445
Arg Leu Asp Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe
450 455 460
Glu Asn Gly Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val
465 470 475 480
Leu Pro Gln Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys

485 490 495

Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp

500 505 510

Pro Leu Glu Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys

515 520 525

Ile Ala Phe Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly

530 535 540

Lys Asp Ile Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln

545 550 555 560

Asn Ile Lys Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr

565 570 575

Val Leu Asp Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg

580 585 590

Asp Lys Arg Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp

595 600 605

Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr

610 615 620

Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser

625 630 635 640

Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile

645 650 655

Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly

660 665 670

Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr

675 680 685

Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu

690 695 700

Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly

705 710 715 720

Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly

725 730 735

<210> 2

<211> 764

<212> PRT

<213> 炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)

<400> 2

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile

1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys

20 25 30

Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu

35 40 45

Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly

85 90 95

Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala

100 105 110

Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys

115 120 125

Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln

130 135 140

Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp

145 150 155 160

Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser

165 170 175

Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser

180 185 190

Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp

195 200 205

Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp

210 215 220

Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His

225 230 235 240

Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser

245 250 255

Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile

260 265 270

Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr

275 280 285

Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu

290 295 300

Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys

305 310 315 320

Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala

325 330 335

Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly
340 345 350
Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser
355 360 365
Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala
370 375 380
Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr
385 390 395 400
Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys
405 410 415
Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln
420 425 430
Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile
435 440 445
Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn
450 455 460
Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp
465 470 475 480
Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly
485 490 495
Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln
500 505 510
Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn
515 520 525
Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu
530 535 540
Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe
545 550 555 560
Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile
565 570 575
Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys
580 585 590
Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp
595 600 605
Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg
610 615 620
Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
625 630 635 640
Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu

645 650 655

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
660 665 670

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
675 680 685

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
690 695 700

Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
705 710 715 720

Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
725 730 735

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
740 745 750

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
755 760

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)
<400> 3

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala
20 25

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)
<400> 4

Arg Lys Lys Arg
1

<210> 5
<211> 764
<212> PRT
<213> 炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)
<400> 5

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys

20 25 30

Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu

35 40 45

Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly

85 90 95

Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala

100 105 110

Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys

115 120 125

Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln

130 135 140

Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp

145 150 155 160

Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser

165 170 175

Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser

180 185 190

Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp

195 200 205

Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp

210 215 220

Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His

225 230 235 240

Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser

245 250 255

Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile

260 265 270

Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr

275 280 285

Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu

290 295 300

Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys

305 310 315 320

Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala

325 330 335

Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly
340 345 350
Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser
355 360 365
Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala
370 375 380
Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr
385 390 395 400
Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys
405 410 415
Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln
420 425 430
Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile
435 440 445
Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn
450 455 460
Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp
465 470 475 480
Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly
485 490 495
Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln
500 505 510
Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn
515 520 525
Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu
530 535 540
Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe
545 550 555 560
Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile
565 570 575
Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys
580 585 590
Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Val Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp
595 600 605
Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg
610 615 620
Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
625 630 635 640
Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu

645 650 655

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
660 665 670

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
675 680 685

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
690 695 700

Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
705 710 715 720

Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
725 730 735

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
740 745 750

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
755 760

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 6
Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 7
Gly Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gln
1 5
<210> 8
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 8
Pro Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly
1 5
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 9
Pro Gly Ser Gly Arg Ser Ala
1 5
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 10
Pro Gly Ser Gly Lys Ser Ala
1 5
<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的

<400> 11
Pro Gln Arg Gly Arg Ser Ala
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 12
Pro Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly
1 5
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 13
Gly Ser Gly Arg Ser Ala
1 5
<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 14
Gly Ser Gly Lys Ser Ala
1 5
<210> 15
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 15
Gln Arg Gly Arg Ser Ala
1 5
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 16
gttagacgat aaaccagtcc t 21
<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 17
ctaccagatt taaatccttt ccattaaaaa t 31
<210> 18
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)

<223> n为a, c, g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n为g或c
<400> 18
caagtgctgg acctacggtt ccagacnnng acaatgatgg aatcccta 48
<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 19
ctggaaccgt aggtccagca cttg 24
<210> 20
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n为a, c, g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> n为g或c
<400> 20
cgaggtagaa ggatatacgg ttgatgtcaa aaataaannn acctttcttt caccatgg 58
<210> 21
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 21
tgacatcaac cgtatatcct tctacctcg 29
<210> 22
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n为a, c, g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> n为g或c
<400> 22
caaaaataaa aggacctttc tttcaacatg gnnntctaat attcatgaaa agaaaggg 58
<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 23
catggtgaaa gaaaggtcct tttatttttg 30
<210> 24
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>

<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n为a, c, g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> n为g或c
<400> 24
caaaaataaa aggacctttc tttcaccatg gatatctaat nnncatgaaa agaaaggg 58
<210> 25
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> n为a, c, g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n为g或c
<400> 25
ctttcaccat ggatatctaa tattcatgaa aagnnngggt taaccaaata taaatcatc 59
<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 26

cttttcatga atattagata tccatggtga aag 33

<210> 27

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> gene

<222> ()..()

<223> 合成的

<400> 27

aaaataaaag aacttttctt tcaccatggc gttctaatat tcatgaaaag aaaggatta 59

<210> 28

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> gene

<222> ()..()

<223> 合成的

<400> 28

taatcctttc ttttcatgaa tattagaacg ccatggtgaa agaaaagttc ttttatttt 59

<210> 29

<211> 2307

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> gene

<222> ()..()

<223> 合成的

<400> 29

atgaaaaaac gaaaagtgtt aataccatta atggcattgt ctacgatatt agtttcaagc 60

acaggtaatt tagaggtgat tcaggcagaa gttaaacagg agaaccggtt attaaatgaa 120

tcagaatcaa gttcccaggg gttactagga tactatttta gtgatttgaa ttttcaagca 180

cccatggtgg ttacctcttc tactacaggg gatttatcta ttcctagttc tgagttagaa 240

aatattccat cggaaaacca atattttcaa tctgctattt ggtcaggatt tatcaaagtt 300

aagaagagtg atgaatatac atttgctact tccgctgata atcatgtaac aatgtgggta 360

gatgaccaag aagtgattaa taaagcttct aattctaaca aaatcagatt agaaaaagga 420

agattatatc aaataaaaat tcaatatcaa cgagaaaatc ctactgaaaa aggattggat 480

ttcaagttgt actggaccga ttctcaaaat aaaaaagaag tgatttctag tgataactta 540

caattgccag aattaaaaca aaaatcttcg aactcaggac cattaggaat gttgagtcaa 600
agtacaagtg ctggacctac ggttccagac cgtgacaatg atggaatccc tgattcatta 660
gaggtagaag gatatacggt tgatgtcaaa aataaaagaa cttttctttc accatggcgc 720
tctaatattc atgaaaagaa aggattaacc aaatataaat catctcctga aaaatggagc 780
acggcttctg atccgtacag tgatttcgaa aaggttacag gacggattga taagaatgta 840
tcaccagagg caagacaccc ccttgtggca gcttatccga ttgtacatgt agatatggag 900
aatattattc tctcaaaaaa tgaggatcaa tccacacaga atactgatag tcaaacgaga 960
acaataagta aaaatacttc tacaagtagg acacatacta gtgaagtaca tggaaatgca 1020
gaagtgcatg cgtcgttctt tgatattggt gggagtgtat ctgcaggatt tagtaattcg 1080
aattcaagta cggtcgcaat tgatcattca ctatctctag caggggaaag aacttgggct 1140
gaaacaatgg gtttaaatac cgctgataca gcaagattaa atgccaatat tagatatgta 1200
aatactggga cggctccaat ctacaacgtg ttaccaacga cttcgttagt gttaggaaaa 1260
aatcaaacac tcgcgacaat taaagctaag gaaaaccaat taagtcaaat acttgcacct 1320
aataattatt atccttctaa aaacttggcg ccaatcgcat taaatgcaca agacgatttc 1380
agttctactc caattacaat gaattacaat caatttcttg agttagaaaa aacgaaacaa 1440
ttaagattag atacggatca agtatatggg aatatagcaa catacaattt tgaaaatgga 1500
agagtgaggg tggatacagg ctcgaactgg agtgaagtgt taccgcaaat tcaagaaaca 1560
actgcacgta tcatttttaa tggaaaagat ttaaatctgg tagaaaggcg gatagcggcg 1620
gttaatccta gtgatccatt agaaacgact aaaccggata tgacattaaa agaagccctt 1680
aaaatagcat ttggatttaa cgaaccgaat ggaaacttac aatatcaagg gaaagacata 1740
accgaatttg attttaattt cgatcaacaa acatctcaaa atatcaagaa tcagttagcg 1800
gaattaaacg caactaacat atatactgta ttagataaaa tcaaattaaa tgcaaaaatg 1860
aatattttaa taagagataa acgttttcat tatgatagaa ataacatagc agttggggcg 1920
gatgagtcag tagttaagga ggctcataga gaagtaatta attcgtcaac agagggatta 1980
ttgttaaata ttgataagga tataagaaaa atattatcag gttatattgt agaaattgaa 2040
gatactgaag ggcttaaaga agttataaat gacagatatg atatgttgaa tatttctagt 2100
ttacggcaag atggaaaaac atttatagat tttaaaaaat ataatgataa attaccgtta 2160
tatataagta atcccaatta taaggtaaat gtatatgctg ttactaaaga aaacactatt 2220
attaatccta gtgagaatgg ggatactagt accaacggga tcaagaaaat tttaatcttt 2280
tctaaaaaag gctatgagat aggataa 2307

<210> 30
<211> 768
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 30

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15
Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys
20 25 30
Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu
35 40 45
Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val
50 55 60
Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu
65 70 75 80
Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly
85 90 95
Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala
100 105 110
Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys
115 120 125
Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln
130 135 140
Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp
145 150 155 160
Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser
165 170 175
Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser
180 185 190
Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val
195 200 205
Pro Asp Arg Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly
210 215 220
Tyr Thr Val Asp Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Arg
225 230 235 240
Ser Asn Ile His Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro
245 250 255
Glu Lys Trp Ser Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val
260 265 270
Thr Gly Arg Ile Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu
275 280 285
Val Ala Ala Tyr Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu
290 295 300
Ser Lys Asn Glu Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg

305 310 315 320
Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val
325 330 335
His Gly Asn Ala Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser
340 345 350
Val Ser Ala Gly Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp
355 360 365
His Ser Leu Ser Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly
370 375 380
Leu Asn Thr Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val
385 390 395 400
Asn Thr Gly Thr Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu
405 410 415
Val Leu Gly Lys Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn
420 425 430
Gln Leu Ser Gln Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn
435 440 445
Leu Ala Pro Ile Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro
450 455 460
Ile Thr Met Asn Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln
465 470 475 480
Leu Arg Leu Asp Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn
485 490 495
Phe Glu Asn Gly Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu
500 505 510
Val Leu Pro Gln Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly
515 520 525
Lys Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser
530 535 540
Asp Pro Leu Glu Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu
545 550 555 560
Lys Ile Ala Phe Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln
565 570 575
Gly Lys Asp Ile Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser
580 585 590
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr
595 600 605
Thr Val Leu Asp Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile
610 615 620

Arg Asp Lys Arg Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala
625 630 635 640
Asp Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser
645 650 655
Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu
660 665 670
Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val
675 680 685
Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp
690 695 700
Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu
705 710 715 720
Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys
725 730 735
Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn
740 745 750
Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
755 760 765

<210> 31
<211> 2304
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 31

atgaaaaaac gaaaagtgtt aataccatta atggcattgt ctacgatatt agtttcaagc 60
acaggtaatt tagaggtgat tcaggcagaa gttaaacagg agaaccggtt attaaatgaa 120
tcagaatcaa gttcccaggg gttactagga tactatttta gtgatttgaa ttttcaagca 180
cccatggtgg ttacctcttc tactacaggg gatttatcta ttcctagttc tgagttagaa 240
aatattccat cggaaaacca atattttcaa tctgctattt ggtcaggatt tatcaaagtt 300
aagaagagtg atgaatatac atttgctact tccgctgata atcatgtaac aatgtgggta 360
gatgaccaag aagtgattaa taaagcttct aattctaaca aaatcagatt agaaaaagga 420
agattatatc aaataaaaat tcaatatcaa cgagaaaatc ctactgaaaa aggattggat 480
ttcaagttgt actggaccga ttctcaaaat aaaaaagaag tgatttctag tgataactta 540
caattgccag aattaaaaca aaaatcttcg aactcaccag gaagtggaag atcagcaagt 600
acaagtgctg gacctacggt tccagaccgt gacaatgatg gaatccctga ttcattagag 660
gtagaaggat atacggttga tgtcaaaaat aaagcaactt ttctttcacc atggatttct 720

aatattcatg aaaagaaagg attaaccaaa tataaatcat ctcctgaaaa atggagcacg 780
gcttctgatc cgtacagtga tttcgaaaag gttacaggac ggattgataa gaatgtatca 840
ccagaggcaa gacacccccct tgtggcagct tatccgattg tacatgtaga tatggagaat 900
attattctct caaaaaatga ggatcaatcc acacagaata ctgatagtca aacgagaaca 960
ataagtaaaa atacttctac aagtaggaca catactagtg aagtacatgg aaatgcagaa 1020
gtgcatgcgt cgttctttga tattggtggg agtgtatctg caggatttag taattcgaat 1080
tcaagtacgg tcgcaattga tcattcacta tctctagcag gggaaagaac ttgggctgaa 1140
acaatgggtt taaataccgc tgatacagca agattaaatg ccaatattag atatgtaaat 1200
actgggacgg ctccaatcta caacgtgtta ccaacgactt cgttagtgtt aggaaaaaat 1260
caaacactcg cgacaattaa agctaaggaa aaccaattaa gtcaaatact tgcacctaat 1320
aattattatc cttctaaaaa cttggcgcca atcgcattaa atgcacaaga cgatttcagt 1380
tctactccaa ttacaatgaa ttacaatcaa tttcttgagt tagaaaaaac gaaacaatta 1440
agattagata cggatcaagt atatgggaat atagcaacat acaattttga aaatggaaga 1500
gtgagggtgg atacaggctc gaactggagt gaagtgttac cgcaaattca agaaacaact 1560
gcacgtatca tttttaatgg aaaagattta aatctggtag aaaggcggat agcggcggtt 1620
aatcctagtg atccattaga aacgactaaa ccggatatga cattaaaaga agcccttaaa 1680
atagcatttg gatttaacga accgaatgga aacttacaat atcaagggaa agacataacc 1740
gaatttgatt ttaatttcga tcaacaaaca tctcaaaata tcaagaatca gttagcggaa 1800
ttaaacgcaa ctaacatata tactgtatta gataaaatca aattaaatgc aaaaatgaat 1860
attttaataa gagataaacg ttttcattat gatagaaata acatagcagt tggggcggat 1920
gagtcagtag ttaaggaggc tcatagagaa gtaattaatt cgtcaacaga gggattattg 1980
ttaaatattg ataaggatat aagaaaaata ttatcaggtt atattgtaga aattgaagat 2040
actgaagggc ttaaagaagt tataaatgac agatatgata tgttgaatat ttctagttta 2100
cggcaagatg gaaaaacatt tatagatttt aaaaaatata atgataaatt accgttatat 2160
ataagtaatc ccaattataa ggtaaatgta tatgctgtta ctaaagaaaa cactattatt 2220
aatcctagtg agaatgggga tactagtacc aacgggatca agaaaatttt aatcttttct 2280
aaaaaaggct atgagatagg ataa 2304

<210> 32
<211> 767
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 32

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15
Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys

20 25 30

Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu

35 40 45

Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly

85 90 95

Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala

100 105 110

Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys

115 120 125

Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln

130 135 140

Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp

145 150 155 160

Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser

165 170 175

Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser

180 185 190

Pro Gly Ser Gly Arg Ser Ala Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro

195 200 205

Asp Arg Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr

210 215 220

Thr Val Asp Val Lys Asn Lys Ala Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser

225 230 235 240

Asn Ile His Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu

245 250 255

Lys Trp Ser Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr

260 265 270

Gly Arg Ile Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val

275 280 285

Ala Ala Tyr Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser

290 295 300

Lys Asn Glu Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr

305 310 315 320

Ile Ser Lys Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His

325 330 335

Gly Asn Ala Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val
340 345 350
Ser Ala Gly Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His
355 360 365
Ser Leu Ser Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu
370 375 380
Asn Thr Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn
385 390 395 400
Thr Gly Thr Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val
405 410 415
Leu Gly Lys Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln
420 425 430
Leu Ser Gln Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu
435 440 445
Ala Pro Ile Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile
450 455 460
Thr Met Asn Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu
465 470 475 480
Arg Leu Asp Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe
485 490 495
Glu Asn Gly Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val
500 505 510
Leu Pro Gln Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys
515 520 525
Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp
530 535 540
Pro Leu Glu Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys
545 550 555 560
Ile Ala Phe Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly
565 570 575
Lys Asp Ile Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln
580 585 590
Asn Ile Lys Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr
595 600 605
Val Leu Asp Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg
610 615 620
Asp Lys Arg Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp
625 630 635 640
Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr

645 650 655

Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser
660 665 670

Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile
675 680 685

Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly
690 695 700

Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr
705 710 715 720

Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu
725 730 735

Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly
740 745 750

Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
755 760 765

<210> 33

<211> 2295

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> gene

<222> ()..()

<223> 合成的

<400> 33

atgaaaaaac gaaaagtgtt aataccatta atggcattgt ctacgatatt agtttcaagc 60

acaggtaatt tagaggtgat tcaggcagaa gttaaacagg agaaccggtt attaaatgaa 120

tcagaatcaa gttcccaggg gttactagga tactatttta gtgatttgaa ttttcaagca 180

cccatggtgg ttacctcttc tactacaggg gatttatcta ttcctagttc tgagttagaa 240

aatattccat cggaaaacca atattttcaa tctgctattt ggtcaggatt tatcaaagtt 300

aagaagagtg atgaatatac atttgctact tccgctgata atcatgtaac aatgtgggta 360

gatgaccaag aagtgattaa taaagcttct aattctaaca aaatcagatt agaaaaagga 420

agattatatc aaataaaaat tcaatatcaa cgagaaaatc ctactgaaaa aggattggat 480

ttcaagttgt actggaccga ttctcaaaat aaaaaagaag tgatttctag tgataactta 540

caattgccag aattaaaaca aaaatcttcg aactcaagaa aaaagcgaag tacaagtgct 600

ggacctacgg ttccagaccg tgacaatgat ggaatccctg attcattaga ggtagaagga 660

tatacggttg atgtcaaaaa taaaagaact tttctttcac catggatttc taatattcat 720

gaaaagaaag gattaaccaa atataaatca tctcctgaaa aatggagcac ggcttctgat 780

ccgtacagtg atttcgaaaa ggttacagga cggattgata agaatgtatc accagaggca 840

agacaccccc ttgtggcagc ttatccgatt gtacatgtag atatggagaa tattattctc 900

tcaaaaaatg aggatcaatc cacacagaat actgatagtc aaacgagaac aataagtaaa 960
aatacttcta caagtaggac acatactagt gaagtacatg gaaatgcaga agtgcatgcg 1020
tcgttctttg atattggtgg gagtgtatct gcaggattta gtaattcgaa ttcaagtacg 1080
gtcgcaattg atcattcact atctctagca ggggaaagaa cttgggctga aacaatgggt 1140
ttaaataccg ctgatacagc aagattaaat gccaatatta gatatgtaaa tactgggacg 1200
gctccaatct acaacgtgtt accaacgact tcgttagtgt taggaaaaaa tcaaacactc 1260
gcgacaatta aagctaagga aaaccaatta agtcaaatac ttgcacctaa taattattat 1320
ccttctaaaa acttggcgcc aatcgcatta aatgcacaag acgatttcag ttctactcca 1380
attacaatga attacaatca atttcttgag ttagaaaaaa cgaaacaatt aagattagat 1440
acggatcaag tatatgggaa tatagcaaca tacaattttg aaaatggaag agtgagggtg 1500
gatacaggct cgaactggag tgaagtgtta ccgcaaattc aagaaacaac tgcacgtatc 1560
atttttaatg gaaaagattt aaatctggta gaaaggcgga tagcggcggt taatcctagt 1620
gatccattag aaacgactaa accggatatg acattaaaag aagcccttaa aatagcattt 1680
ggatttaacg aaccgaatgg aaacttacaa tatcaaggga aagacataac cgaatttgat 1740
tttaatttcg atcaacaaac atctcaaaat atcaagaatc agttagcgga attaaacgca 1800
actaacatat atactgtatt agataaaatc aaattaaatg caaaaatgaa tattttaata 1860
agagataaac gttttcatta tgatagaaat aacatagcag ttggggcgga tgagtcagta 1920
gttaaggagg ctcatagaga agtaattaat tcgtcaacag agggattatt gttaaatatt 1980
gataaggata taagaaaaat attatcaggt tatattgtag aaattgaaga tactgaaggg 2040
cttaaagaag ttataaatga cagatatgat atgttgaata tttctagttt acggcaagat 2100
ggaaaaacat ttatagattt taaaaaatat aatgataaat taccgttata tataagtaat 2160
cccaattata aggtaaatgt atatgctgtt actaaagaaa acactattat taatcctagt 2220
gagaatgggg atactagtac caacgggatc aagaaaattt taatcttttc taaaaaaggc 2280
tatgagatag gataa 2295

<210> 34
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 34
gcttgaattc atttcattat gatagaaata ac 32

<210> 35
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>

<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 35
aattcaagct ttcctatctc atagcctttt tt 32
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 36
taagtacgca atgggccacg 20
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 37
aactcagcgg cagtctcaac 20
<210> 38
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 合成的
<400> 38
tgaagatact gaaggcctta aagaagttat aaatgacaga tatgatatgt tgaatatctc 60
gagtttacgg caaga 75
<210> 39
<211> 75
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> gene

<222> ()..()

<223> 合成的

<400> 39

tcttgccgta aactcgagat attcaacata tcatatctgt catttataac ttctttaagg 60

ccttcagtat cttca 75

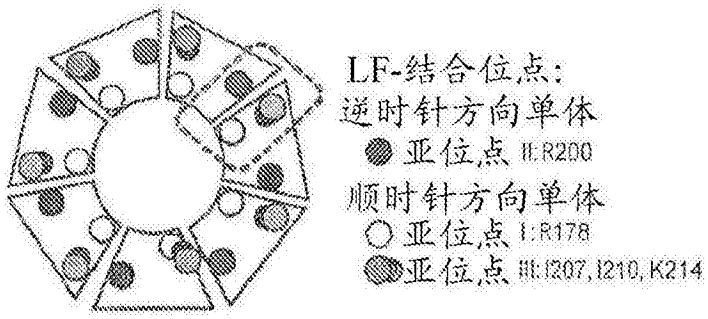

LF-结合位点:
逆时针方向单体
亚位点 II:R200
顺时针方向单体
亚位点 I:R178
亚位点 III:I207, I210, K214

图1

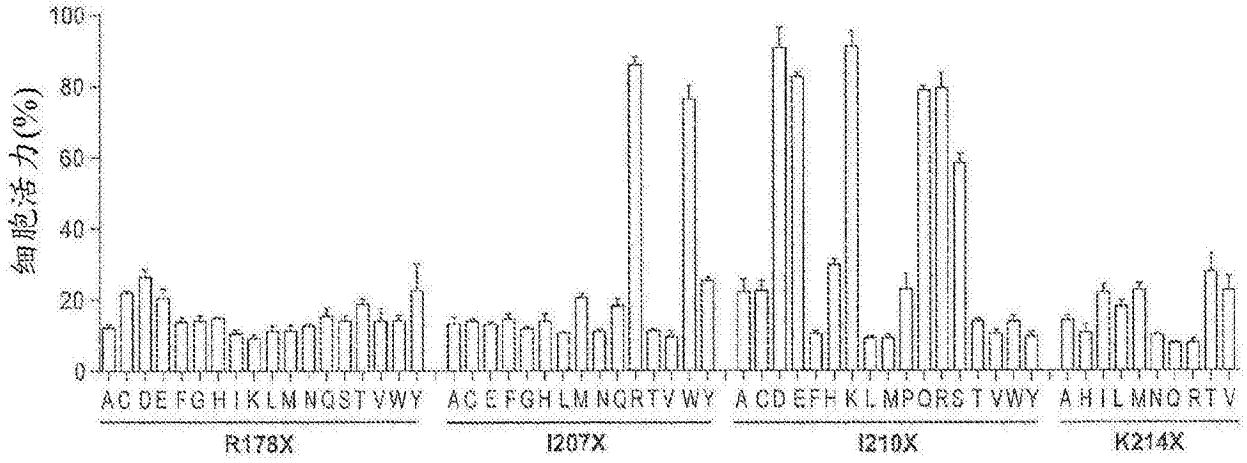

细胞活力(%)
100
80
60
40
20
0
A C D E F G H I K L M N Q S T V W Y
A C E F G H L M N Q R T V W Y
A C D E F H K L M P Q R S T V W Y
A H I L M N Q R T V
R178X
I207X
I210X
K214X

图2

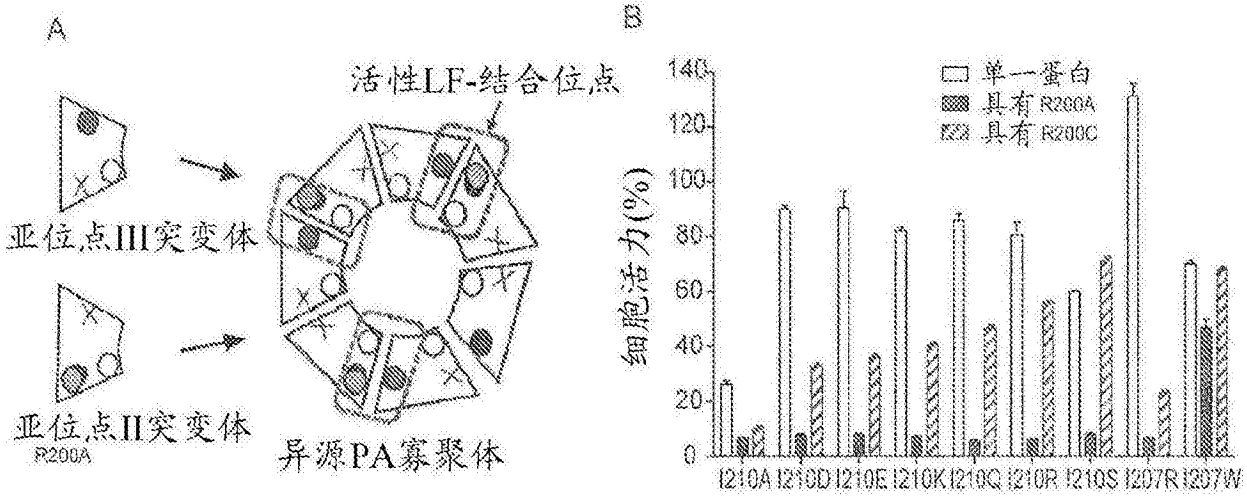

A
B
活性LF-结合位点
亚位点III突变体
亚位点II突变体
R200A
异源PA寡聚体
细胞活力(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
单一蛋白
具有 R200A
具有 R200C
I210A I210D I210E I210K I210Q I210R I210S I207R I207W

图3

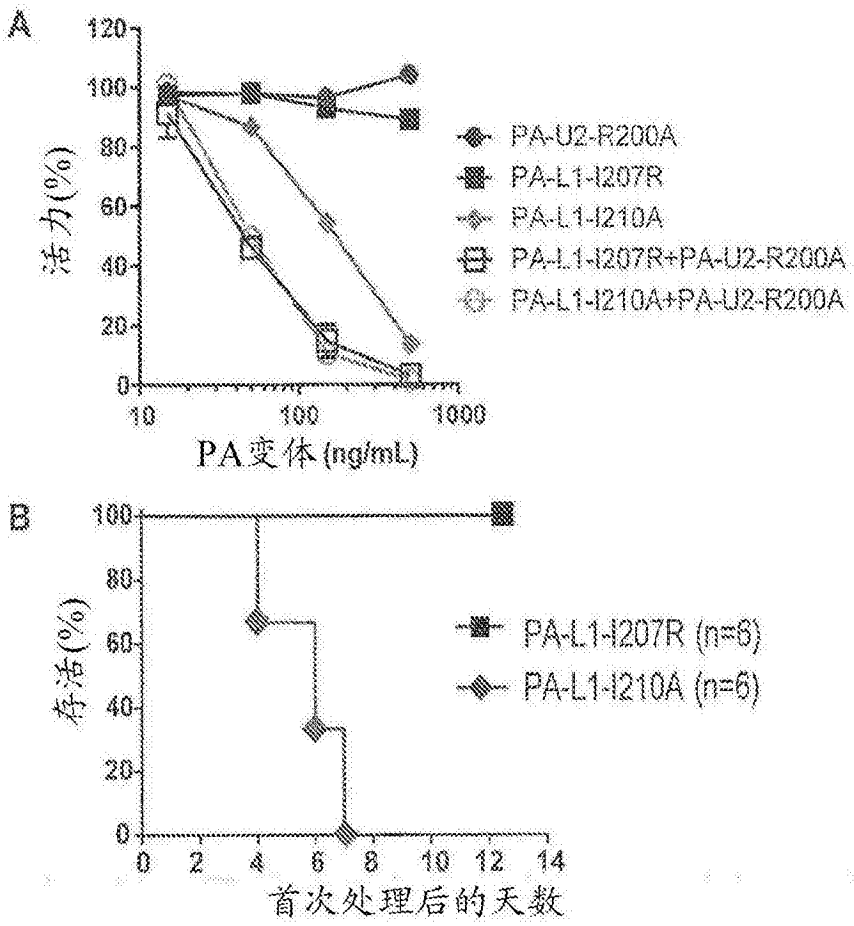

A
活力(%)
PA变体(ng/mL)
PA-U2-R200A
PA-L1-I207R
PA-L1-I210A
PA-L1-I207R+PA-U2-R200A
PA-L1-I210A+PA-U2-R200A
B
存活(%)
首次处理后的天数
PA-L1-I207R (n=6)
PA-L1-I210A (n=6)

图4

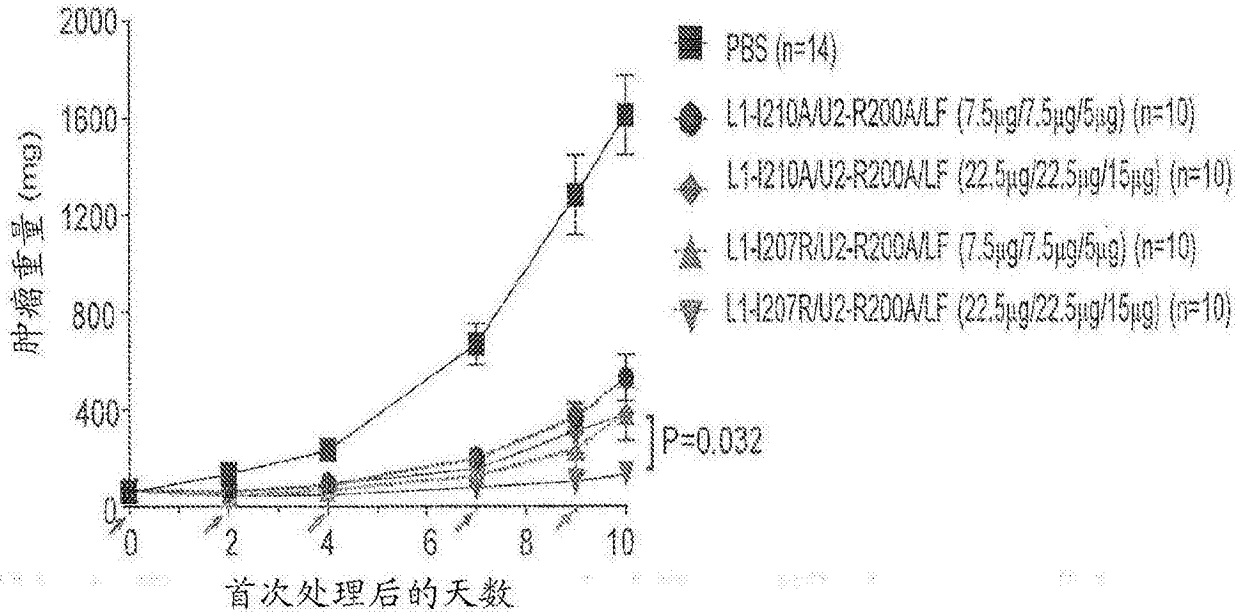
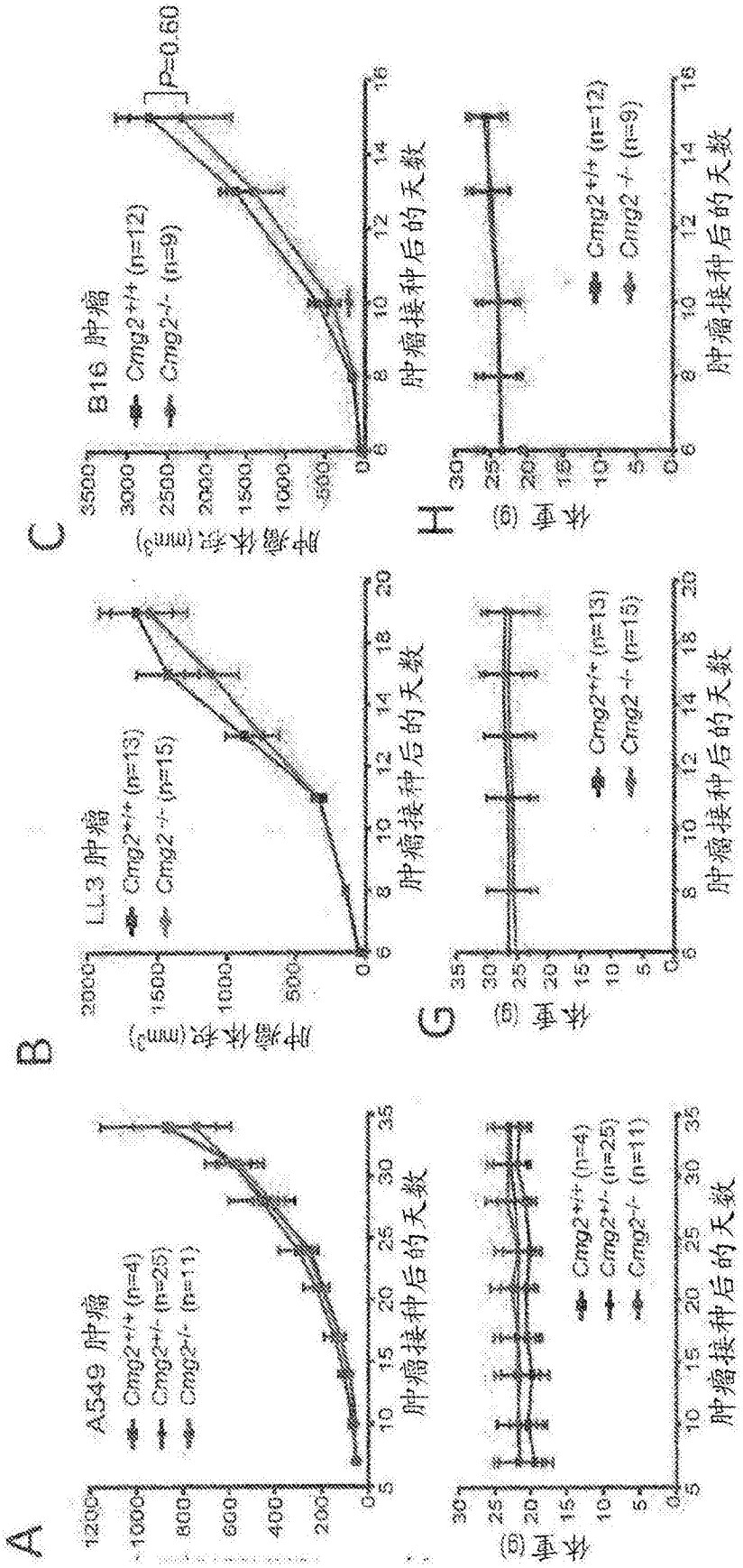

肿瘤重量 (mg)
首次处理后的天数
PBS (n=14)
L1-I210A/U2-R200A/LF (7.5μg/7.5μg/5μg) (n=10)
L1-I210A/U2-R200A/LF (22.5μg/22.5μg/15μg) (n=10)
L1-I207R/U2-R200A/LF (7.5μg/7.5μg/5μg) (n=10)
L1-I207R/U2-R200A/LF (22.5μg/22.5μg/15μg) (n=10)
P=0.032

图5


A
A549 肿瘤
Cmg2+/+ (n=4)
Cmg2+/- (n=25)
Cmg2-/- (n=11)
肿瘤体积 (mm³)
肿瘤接种后的天数
体重 (g)
B
LL3 肿瘤
Cmg2+/+ (n=13)
Cmg2-/- (n=15)
C
B16 肿瘤
Cmg2+/+ (n=12)
Cmg2-/- (n=9)
P=0.60
G
H

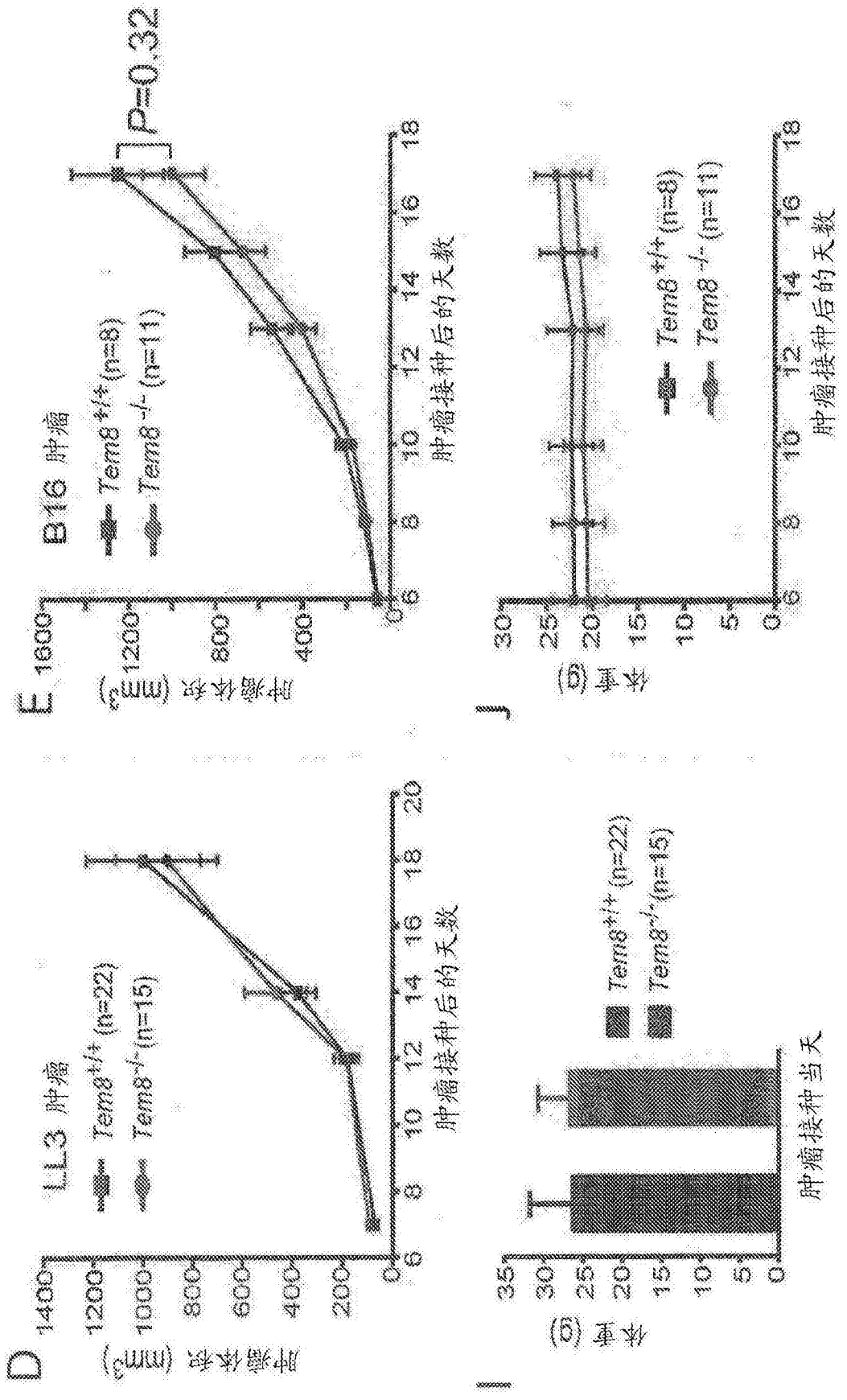
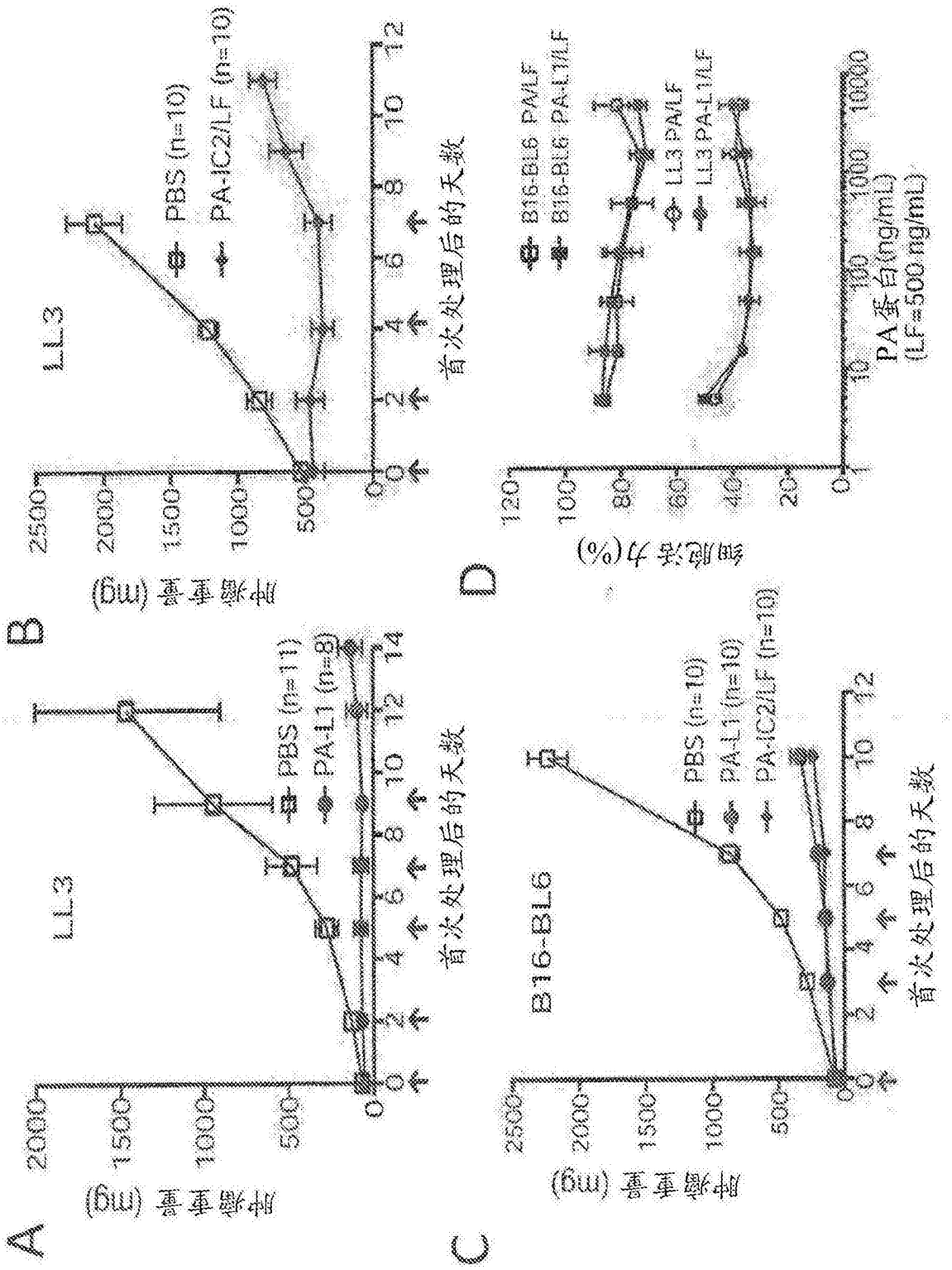

D
LL3 肿瘤
Tem8+/+ (n=22)
Tem8-/- (n=15)
肿瘤体积 (mm3)
肿瘤接种后的天数
E
B16 肿瘤
Tem8+/+ (n=8)
Tem8-/- (n=11)
P=0.32
肿瘤体积 (mm3)
肿瘤接种后的天数
I
体重 (g)
Tem8+/+ (n=22)
Tem8-/- (n=15)
肿瘤接种当天
J
体重 (g)
Tem8+/+ (n=8)
Tem8-/- (n=11)
肿瘤接种后的天数

图6


A
LL3
肿瘤重量 (mg)
首次处理后的天数
PBS (n=11)
PA-L1 (n=8)
B
LL3
肿瘤重量 (mg)
首次处理后的天数
PBS (n=10)
PA-IC2/LF (n=10)
C
B16-BL6
肿瘤重量 (mg)
首次处理后的天数
PBS (n=10)
PA-L1 (n=10)
PA-IC2/LF (n=10)
D
细胞活力(%)
B16-BL6 PA/LF
B16-BL6 PA-L1/LF
LL3 PA/LF
LL3 PA-L1/LF
PA 蛋白(ng/mL)
(LF=500 ng/mL)

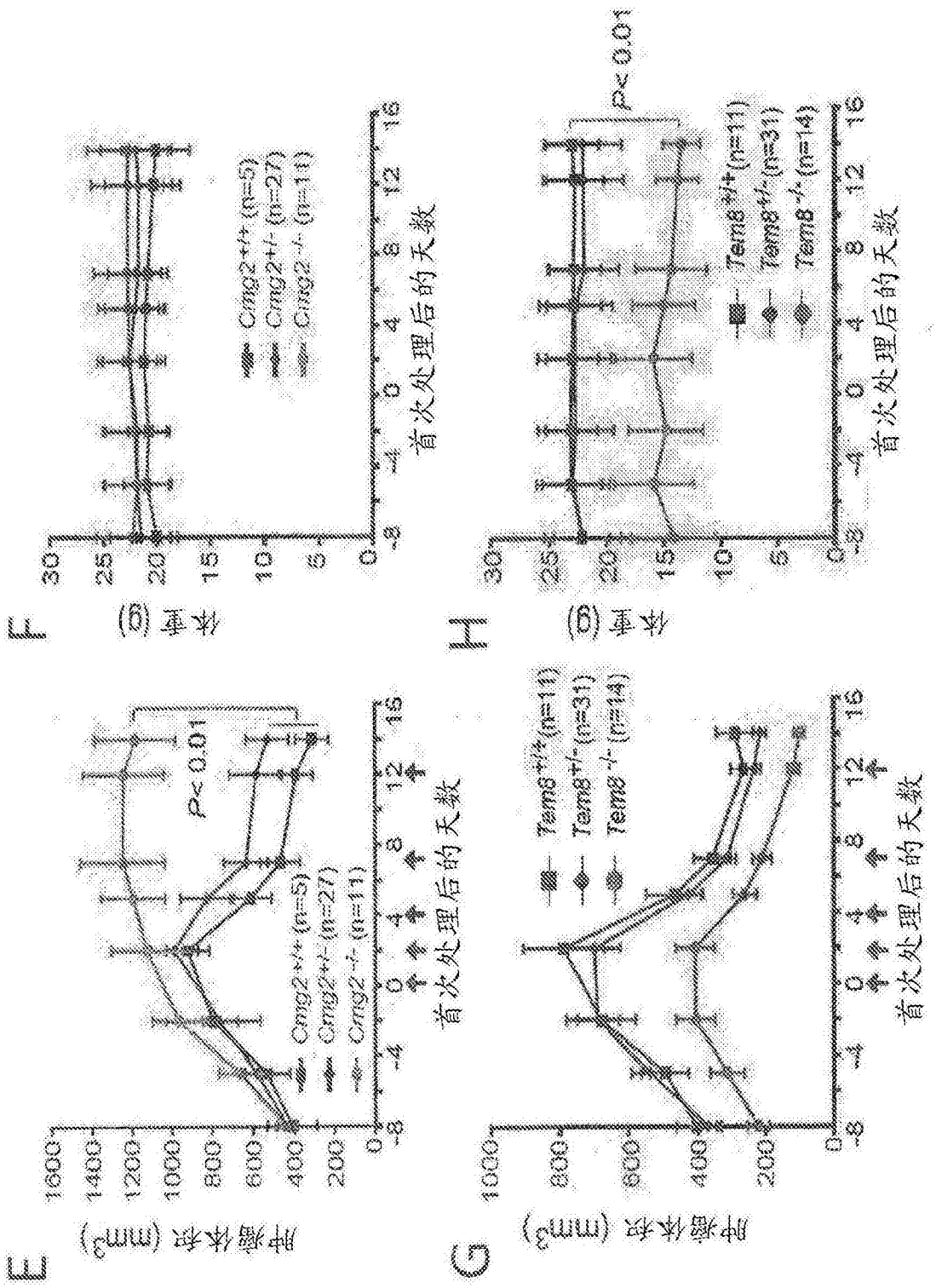
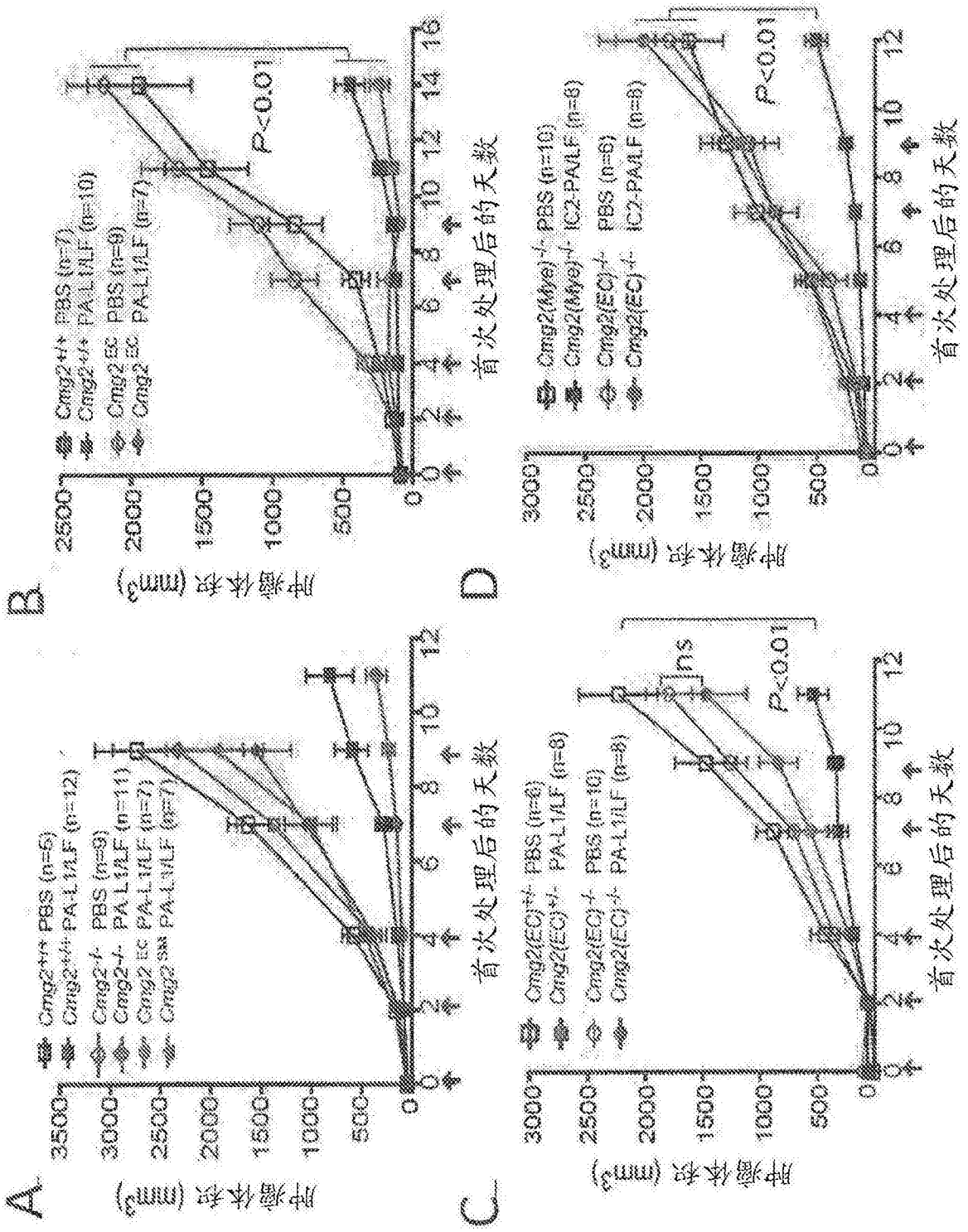

F
体重 (g)
首次处理后的天数
Cmg2+/+ (n=5)
Cmg2+/- (n=27)
Cmg2-/- (n=11)
H
体重 (g)
首次处理后的天数
P< 0.01
Tem8+/+ (n=11)
Tem8+/- (n=31)
Tem8-/- (n=14)
E
肿瘤体积 (mm3)
首次处理后的天数
P< 0.01
Cmg2+/+ (n=5)
Cmg2+/- (n=27)
Cmg2-/- (n=11)
G
肿瘤体积 (mm3)
首次处理后的天数
Tem8+/+ (n=11)
Tem8+/- (n=31)
Tem8-/- (n=14)

图7


A
B
C
D
肿瘤体积 (mm³)
首次处理后的天数
Cmg2+/+ PBS (n=5)
Cmg2+/+ PA-L1/LF (n=12)
Cmg2-/- PBS (n=9)
Cmg2-/- PA-L1/LF (n=11)
Cmg2 EC PBS (n=7)
Cmg2 EC PA-L1/LF (n=7)
Cmg2 SM PA-L1/LF (n=7)
Cmg2+/+ PBS (n=7)
Cmg2+/+ PA-L1/LF (n=10)
Cmg2 EC PBS (n=9)
Cmg2 EC PA-L1/LF (n=7)
P<0.01
Cmg2(EC)+/+ PBS (n=6)
Cmg2(EC)+/- PA-L1/LF (n=8)
Cmg2(EC)-/- PBS (n=10)
Cmg2(EC)-/- PA-L1/LF (n=8)
ns
P<0.01
Cmg2(Mye)-/- PBS (n=10)
Cmg2(Mye)-/- IC2-PA/LF (n=8)
Cmg2(EC)-/- PBS (n=6)
Cmg2(EC)-/- IC2-PA/LF (n=8)
P<0.01

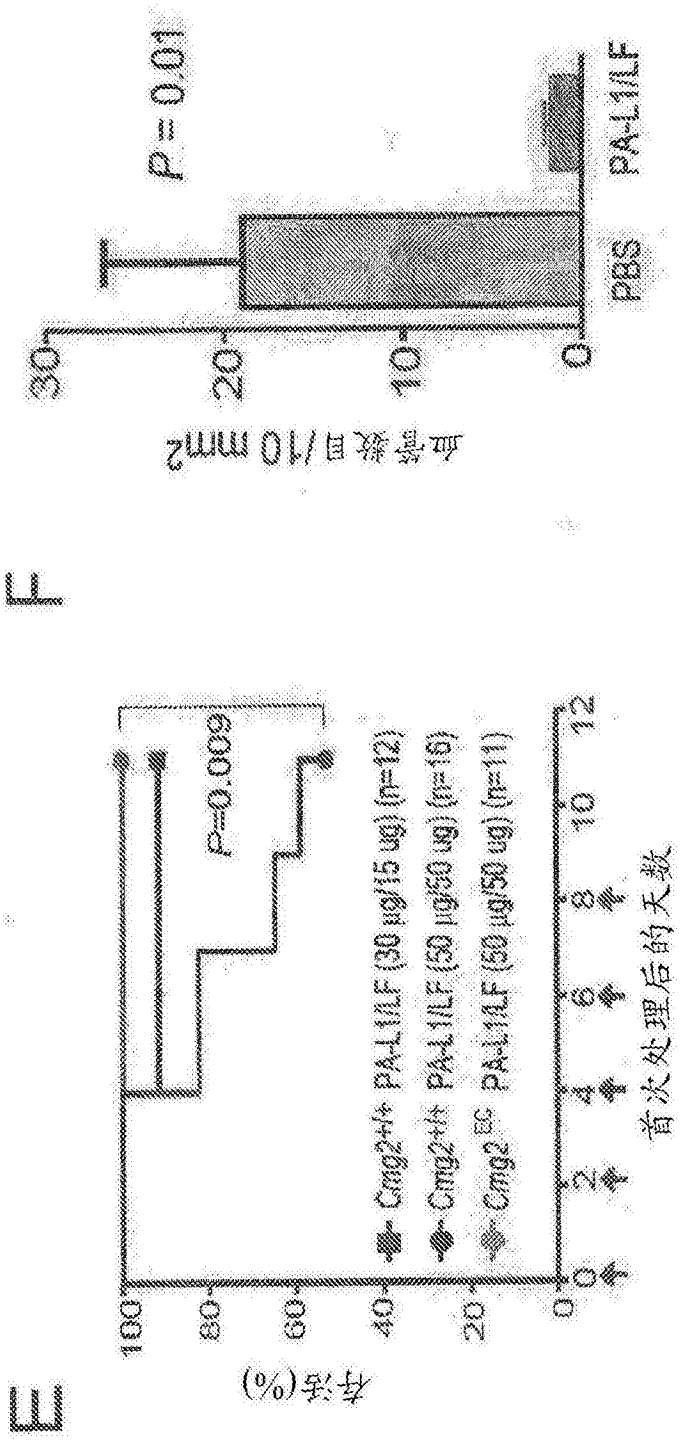
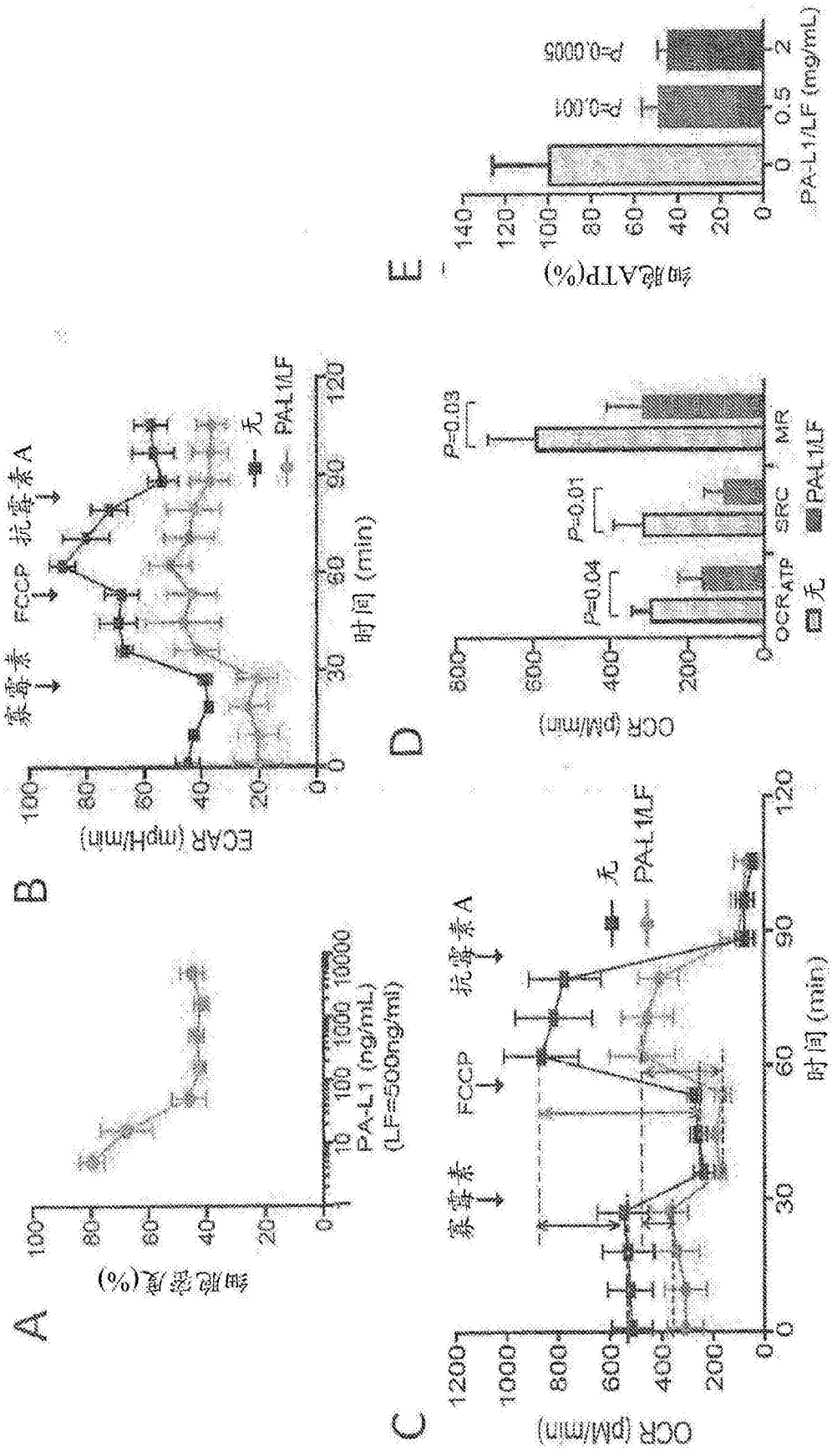

F
血管数目/10 mm2
P = 0.01
PBS
PA-L1/LF
0
10
20
30
E
存活(%)
P=0.009
Cmg2+/+ PA-L1/LF (30 μg/15 ug) (n=12)
Cmg2+/+ PA-L1/LF (50 μg/50 ug) (n=16)
Cmg2EC PA-L1/LF (50 μg/50 ug) (n=11)
首次处理后的天数
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
8
10
12

图8


A
细胞密度(%)
PA-L1 (ng/mL)
(LF=500ng/ml)
B
ECAR (mpH/min)
寡霉素
FCCP
抗霉素A
无
PA-L1/LF
时间 (min)
C
OCR (pM/min)
寡霉素
FCCP
抗霉素A
无
PA-L1/LF
时间 (min)
D
OCR (pM/min)
P=0.03
P=0.01
P=0.04
OCR/ATP
SRC
MR
无
PA-L1/LF
E
细胞ATP(%)
P=0.001
P=0.0005
PA-L1/LF (mg/mL)

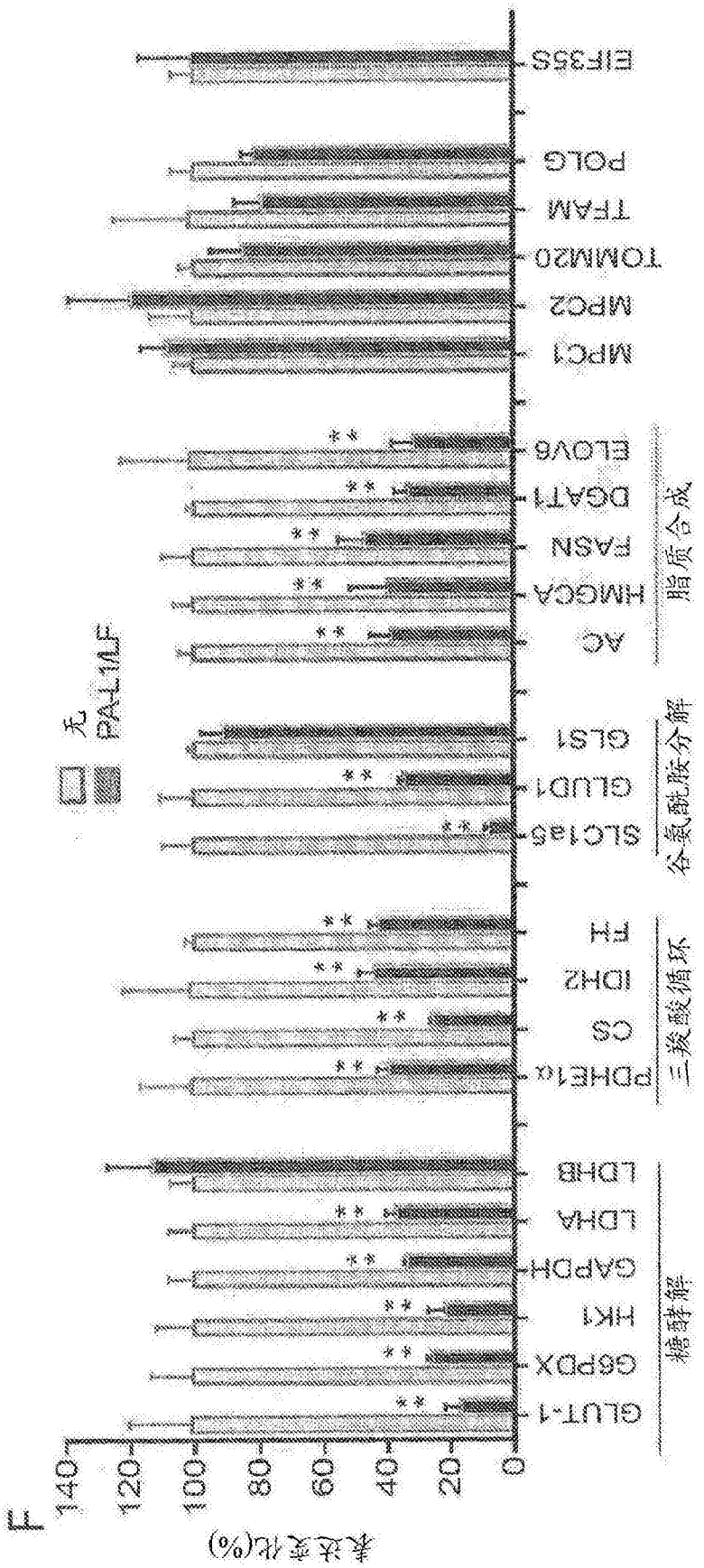
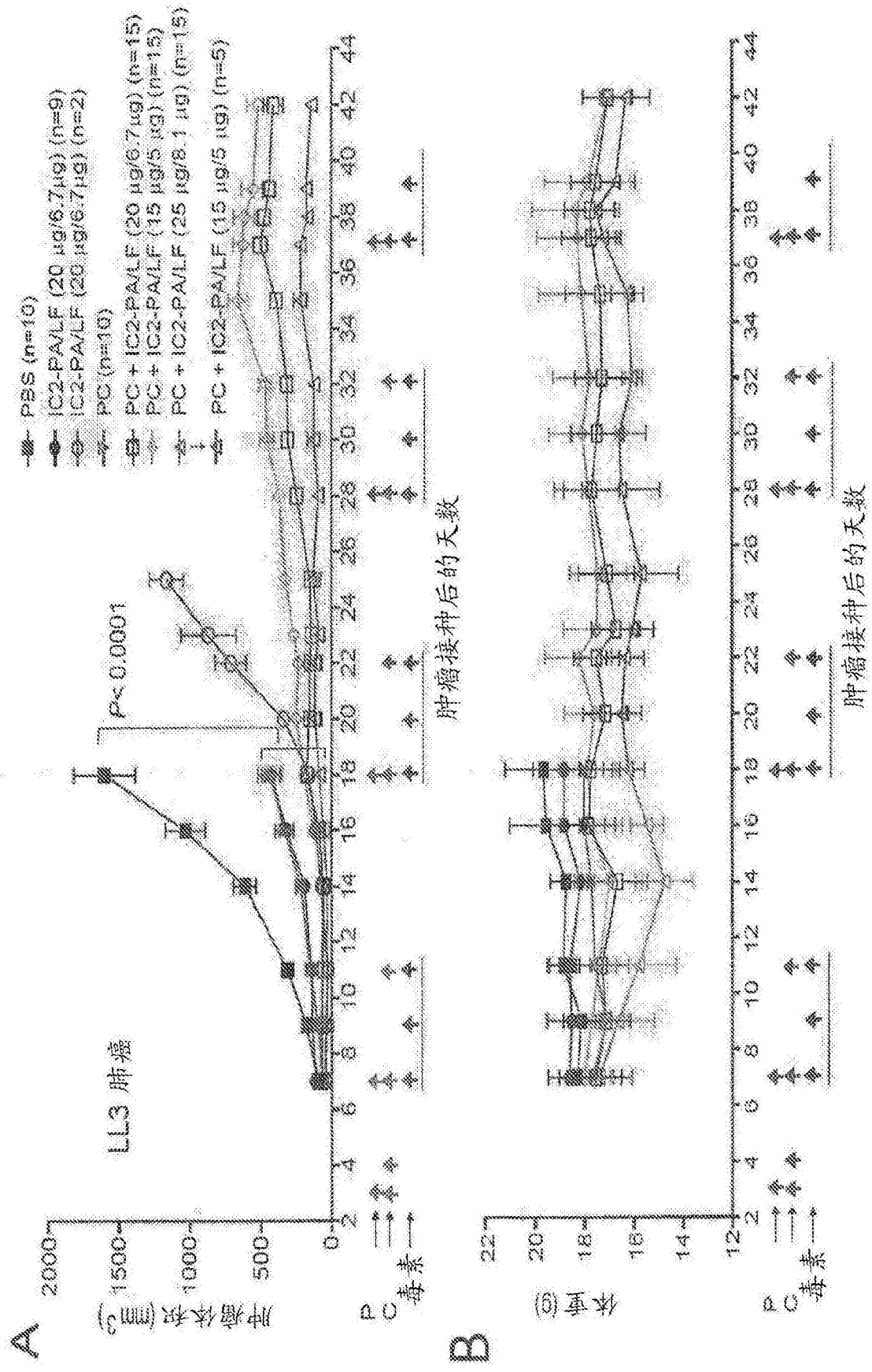

表达变化(%)
0
20
40
60
80
100
120
140
无
PAL1/LF
糖酵解
GLUT-1
G6PDX
HK1
GAPDH
LDHA
LDHB
三羧酸循环
PDHE1α
CS
IDH2
FH
谷氨酰胺分解
SLC1a5
GLUD1
GLS1
脂质合成
AC
HMGCA
FASN
DGAT1
ELOV6
MPC1
MPC2
TOMM20
TFAM
POLG
EIF3S

图9


A
B
LL3 肿瘤
PBS (n=10)
IC2-PA/LF (20 μg/6.7μg) (n=9)
IC2-PA/LF (20 μg/6.7μg) (n=2)
PC (n=10)
PC + IC2-PA/LF (20 μg/6.7μg) (n=15)
PC + IC2-PA/LF (15 μg/5 μg) (n=15)
PC + IC2-PA/LF (25 μg/8.1 μg) (n=15)
PC + IC2-PA/LF (15 μg/5 μg) (n=5)
P< 0.0001
肿瘤体积 (mm3)
体重 (g)
肿瘤接种后的天数
毒素
0 d

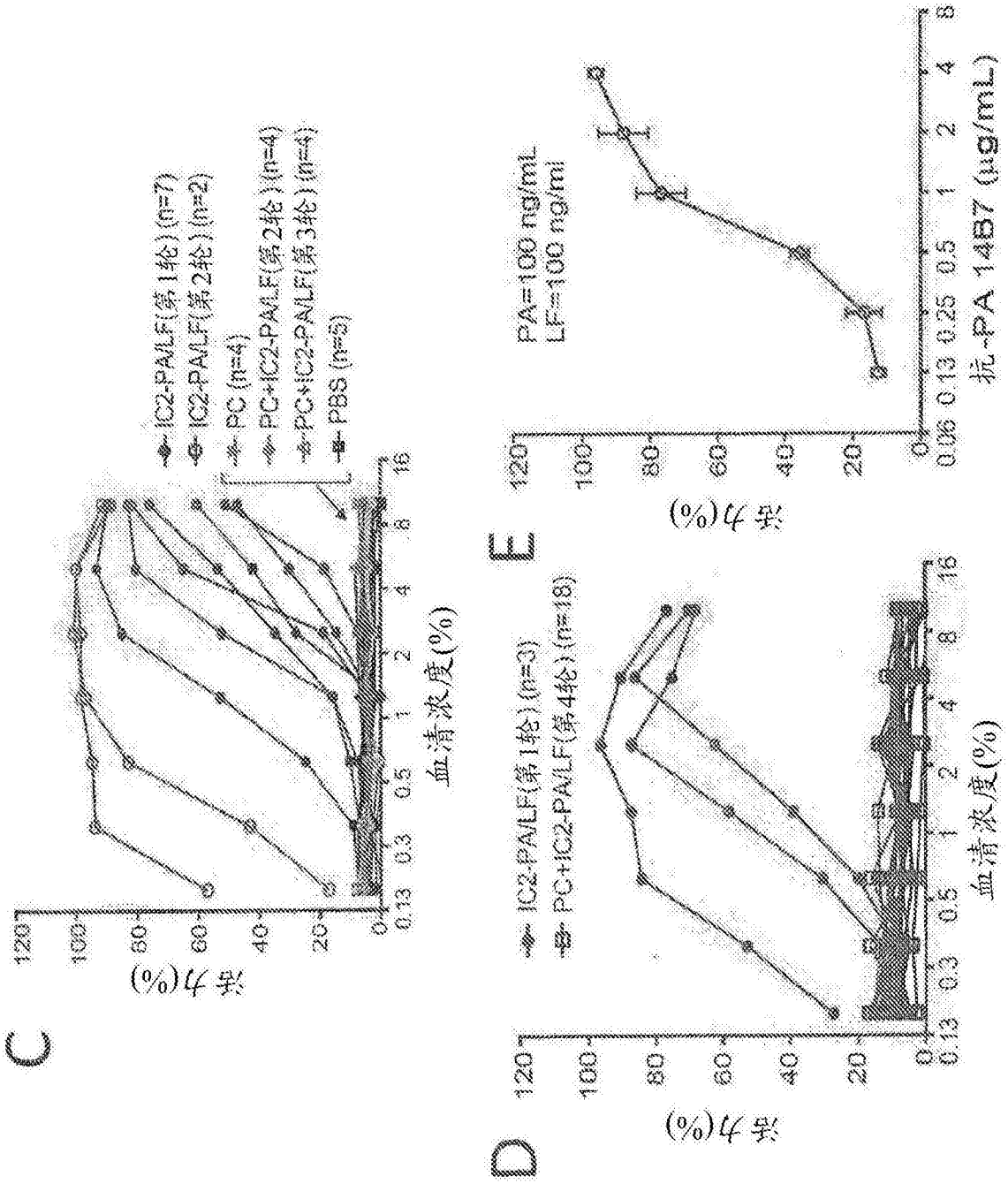

C
IC2-PA/LF(第1轮)(n=7)
IC2-PA/LF(第2轮)(n=2)
PC (n=4)
PC+IC2-PA/LF(第2轮)(n=4)
PC+IC2-PA/LF(第3轮)(n=4)
PBS (n=3)
存力(%)
血清浓度(%)
D
IC2-PA/LF(第1轮)(n=3)
PC+IC2-PA/LF(第4轮)(n=18)
存力(%)
血清浓度(%)
E
PA=100 ng/mL
LF=100 ng/ml
存力(%)
抗-PA 14B7 (μg/mL)

图10

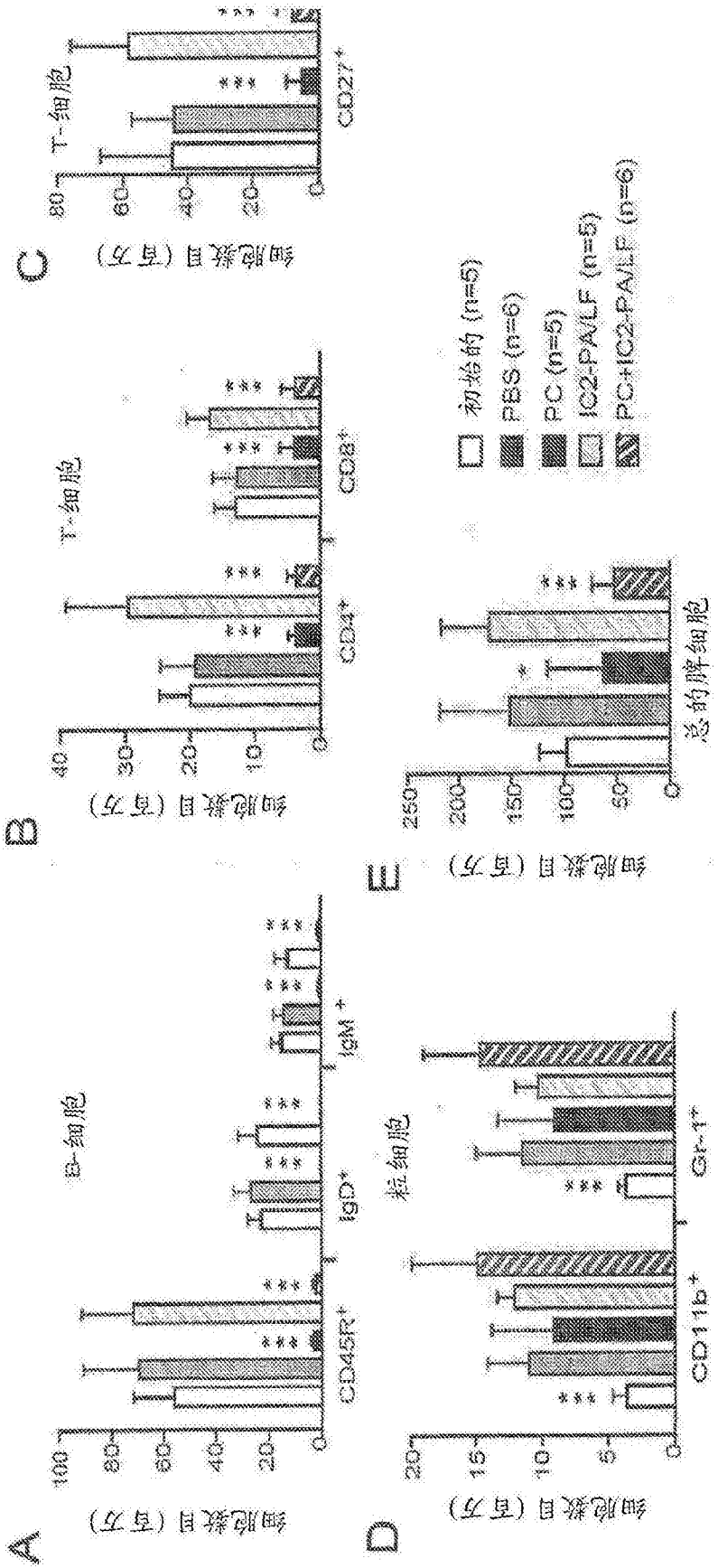
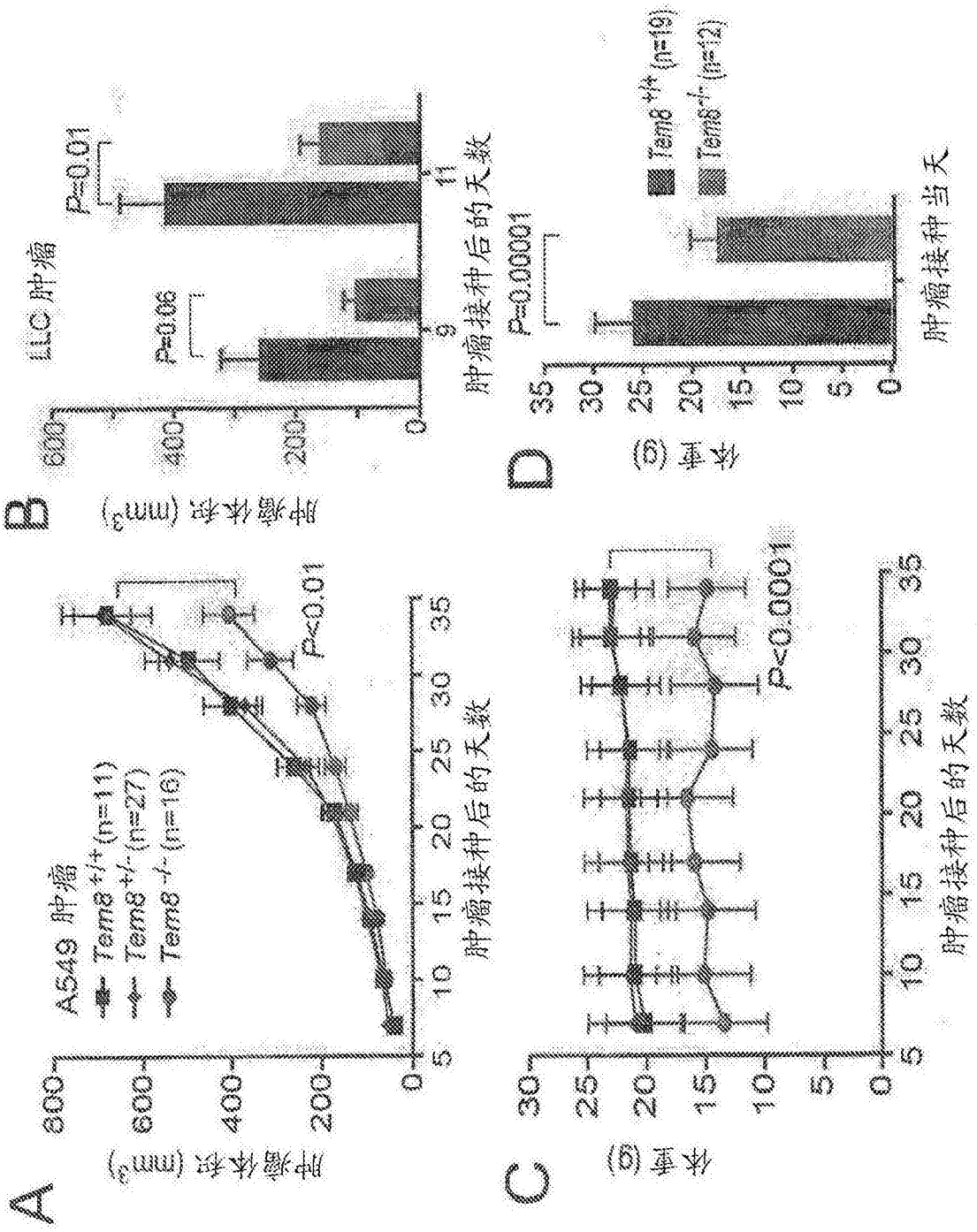

A
细胞数目（百万）
B-细胞
CD45R+
IgD+
IgM+
B
细胞数目（百万）
T-细胞
CD4+
CD8+
C
细胞数目（百万）
T-细胞
CD27+
D
细胞数目（百万）
粒细胞
CD11b+
Gr-1+
E
细胞数目（百万）
总的脾细胞
初始的 (n=5)
PBS (n=6)
PC (n=5)
IC2-PA/LF (n=5)
PC+IC2-PA/LF (n=6)

图11


A
A549 肿瘤
Tem8 +/+ (n=11)
Tem8 +/- (n=27)
Tem8 -/- (n=16)
P<0.01
肿瘤体积 (mm3)
肿瘤接种后的天数
B
LLC 肿瘤
P=0.01
P=0.06
肿瘤体积 (mm3)
肿瘤接种后的天数
C
P<0.0001
体重 (g)
肿瘤接种后的天数
D
P=0.00001
Tem8 +/+ (n=19)
Tem8 -/- (n=12)
体重 (g)
肿瘤接种当天

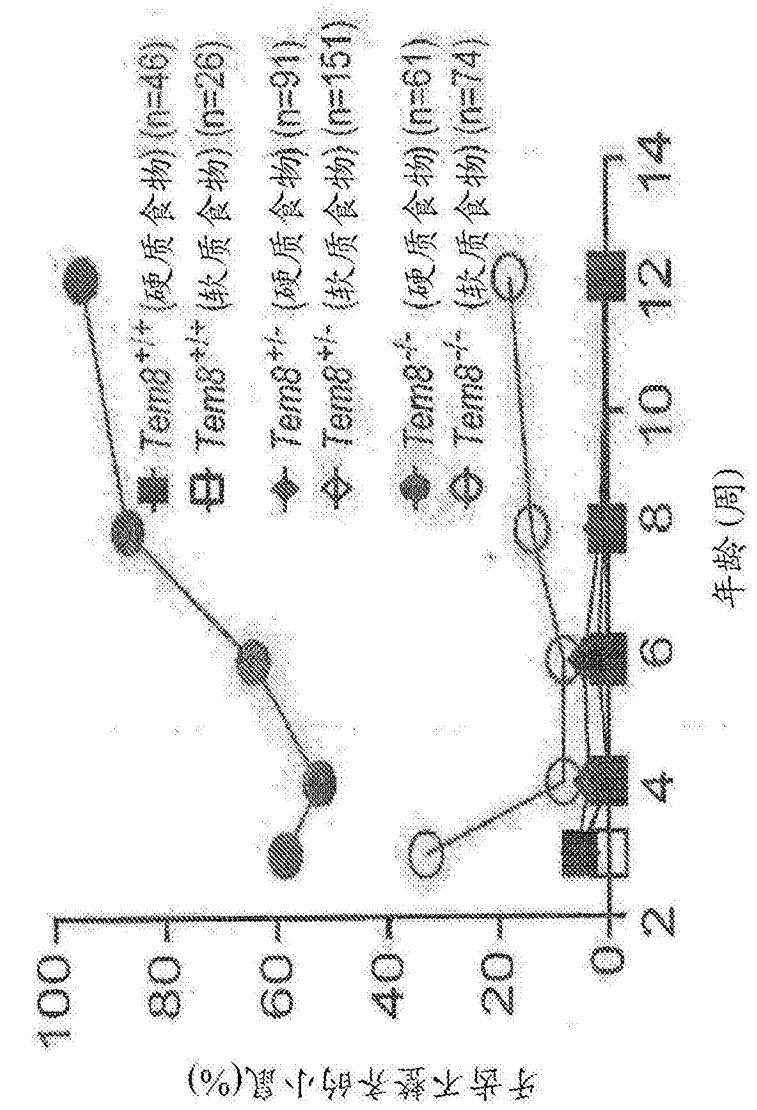

Tem8+/+ (硬质食物) (n=46)
Tem8+/+ (软质食物) (n=26)
Tem8+/- (硬质食物) (n=91)
Tem8+/- (软质食物) (n=151)
Tem8-/- (硬质食物) (n=61)
Tem8-/- (软质食物) (n=74)
牙齿不整齐的小鼠(%)
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12
14
年龄(周)

图 3

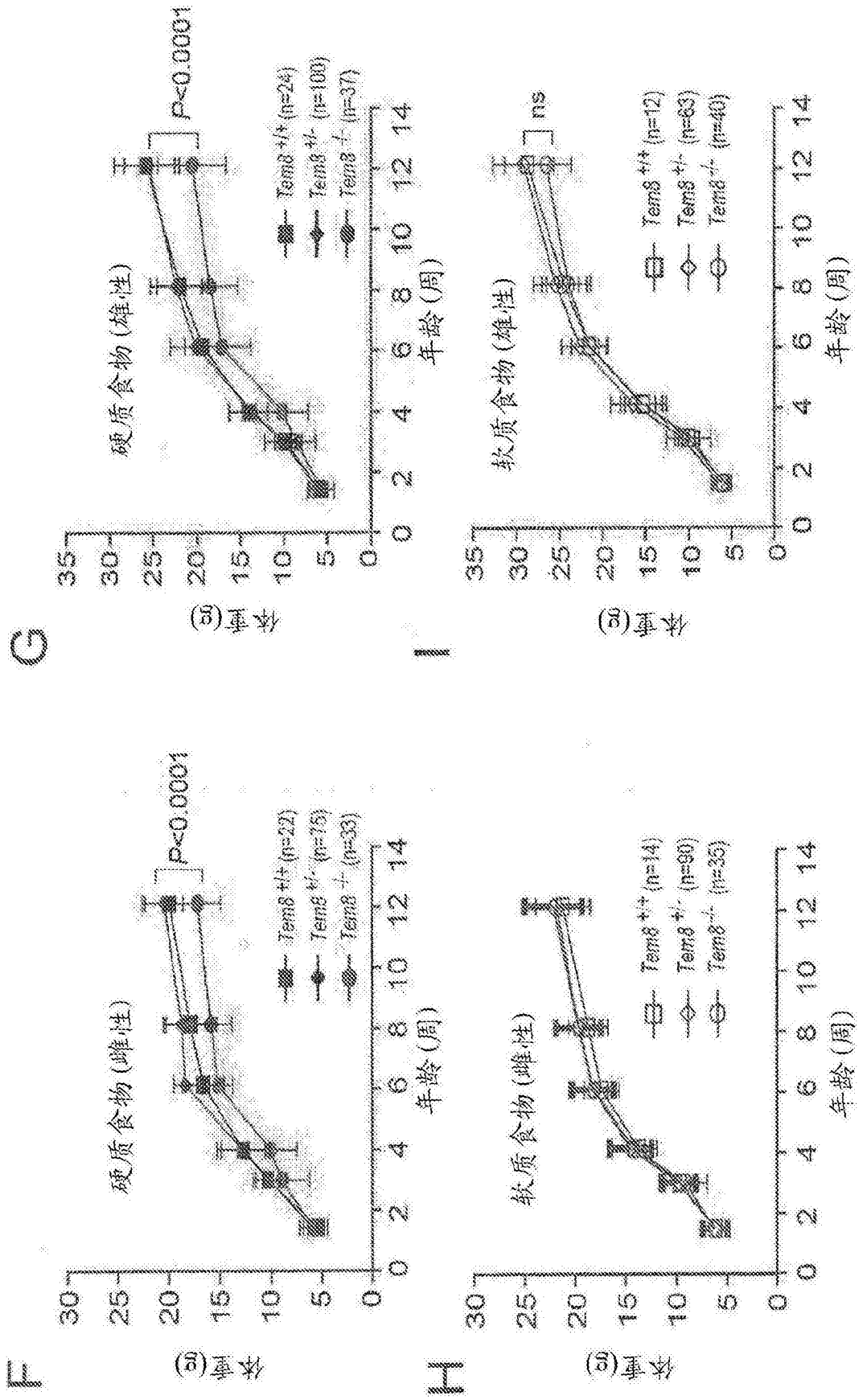

G
硬质食物(雄性)
体重(g)
年龄(周)
P<0.0001
Tem8 +/+ (n=24)
Tem8 +/- (n=100)
Tem8 -/- (n=37)
I
软质食物(雄性)
体重(g)
年龄(周)
ns
Tem8 +/+ (n=12)
Tem8 +/- (n=63)
Tem8 -/- (n=40)
F
硬质食物(雌性)
体重(g)
年龄(周)
P<0.0001
Tem8 +/+ (n=22)
Tem8 +/- (n=76)
Tem8 -/- (n=33)
H
软质食物(雌性)
体重(g)
年龄(周)
Tem8 +/+ (n=14)
Tem8 +/- (n=90)
Tem8 -/- (n=35)

图12

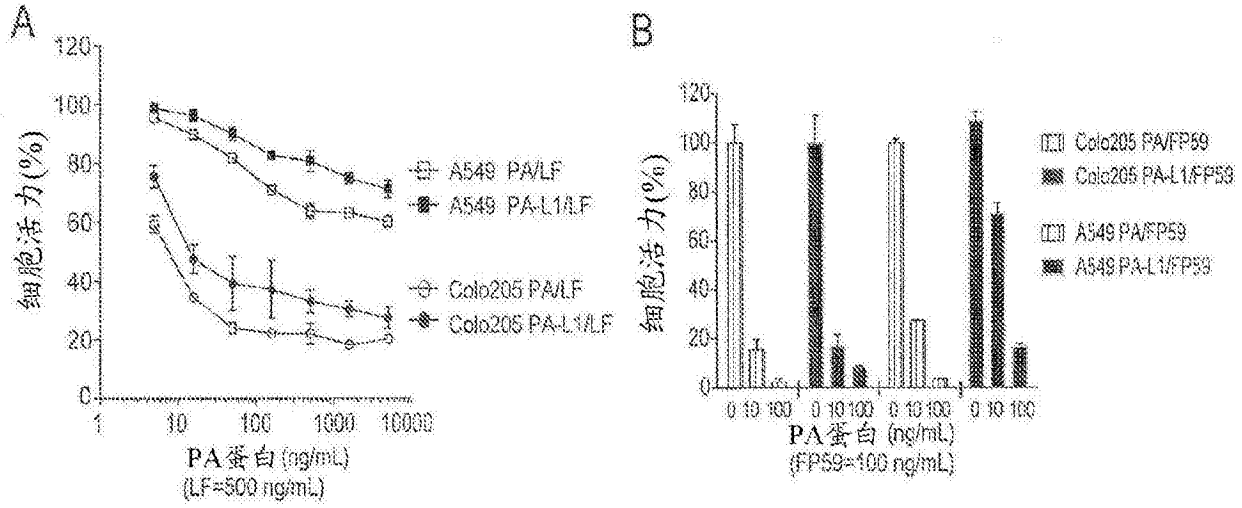

A
细胞活力(%)
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
PA蛋白 (ng/mL)
(LF=500 ng/mL)
A549 PA/LF
A549 PA-L1/LF
Colo205 PA/LF
Colo205 PA-L1/LF
B
细胞活力(%)
0 10 100
PA蛋白 (ng/mL)
(FP59=100 ng/mL)
Colo205 PA/FP59
Colo205 PA-L1/FP59
A549 PA/FP59
A549 PA-L1/FP59

图13

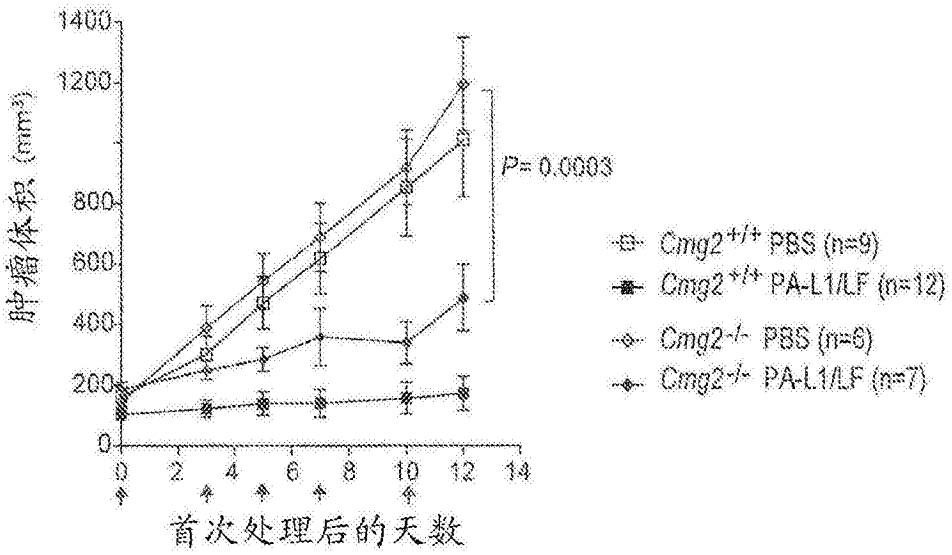
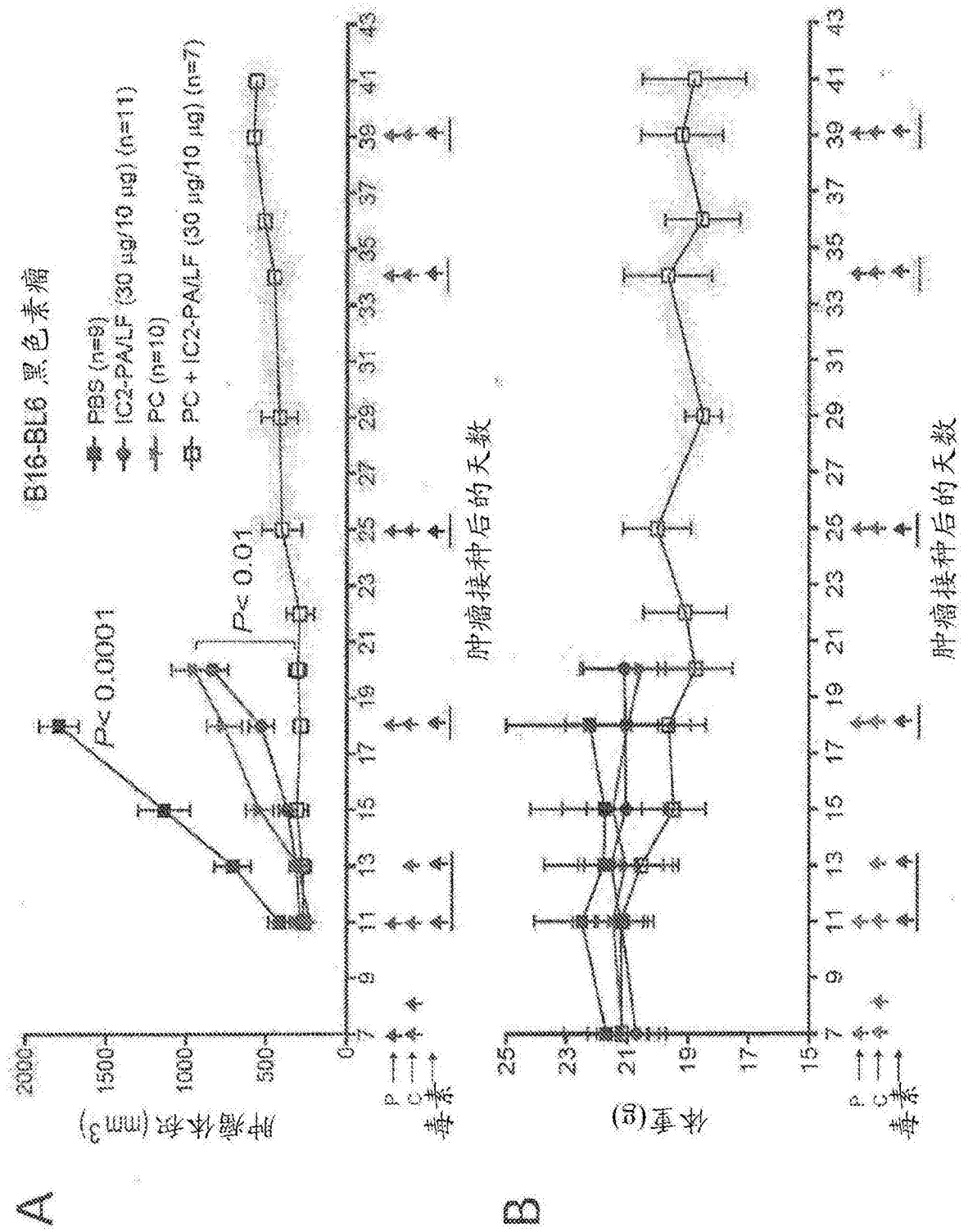

肿瘤体积 (mm³)
1400
1200
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
14
首次处理后的天数
P= 0.0003
Cmg2+/+ PBS (n=9)
Cmg2+/+ PA-L1/LF (n=12)
Cmg2-/- PBS (n=6)
Cmg2-/- PA-L1/LF (n=7)

图14


A
B16-BL6 黑色素瘤
PBS (n=9)
IC2-PAILF (30 μg/10 μg) (n=11)
PC (n=10)
PC + IC2-PAILF (30 μg/10 μg) (n=7)
P< 0.0001
P< 0.01
肿瘤体积 (mm³)
肿瘤接种后的天数
P. C
B
体重(g)
肿瘤接种后的天数
P. C

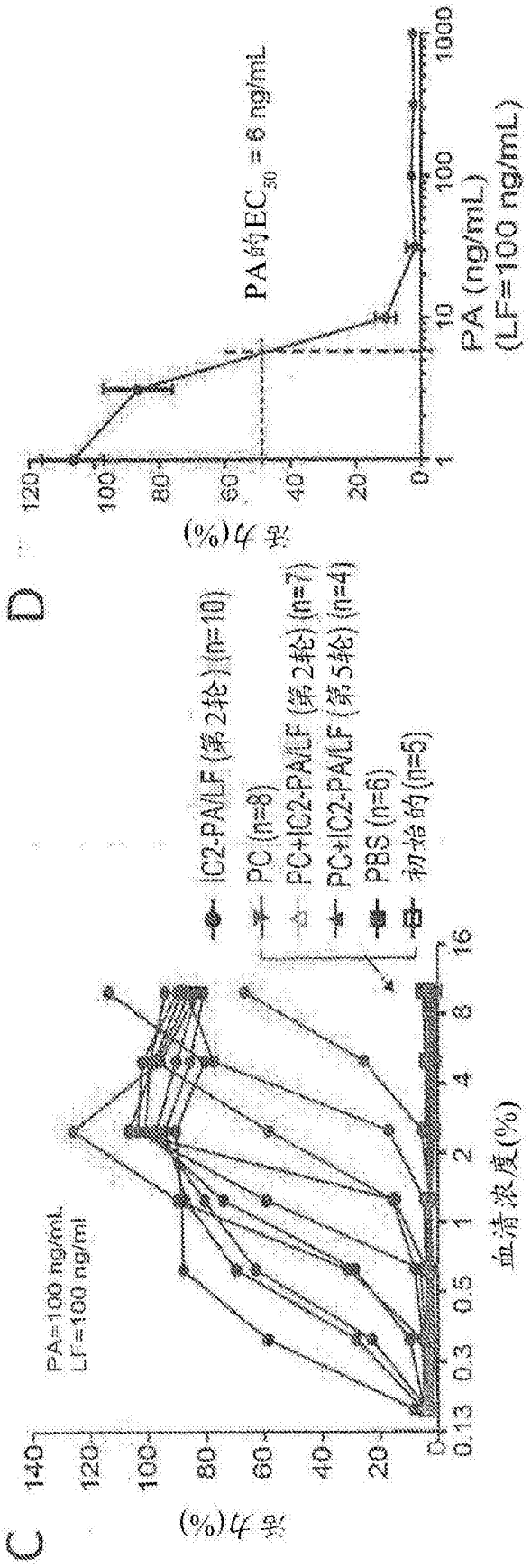

C
D
活力(%)
血清浓度(%)
PA=100 ng/mL
LF=100 ng/ml
IC2-PA/LF (第2轮) (n=10)
PC (n=8)
PC+IC2-PA/LF (第2轮) (n=7)
PC+IC2-PA/LF (第5轮) (n=4)
PBS (n=6)
初始的(n=5)
PA的EC50 = 6 ng/mL
PA (ng/mL)
(LF=100 ng/mL)

图15

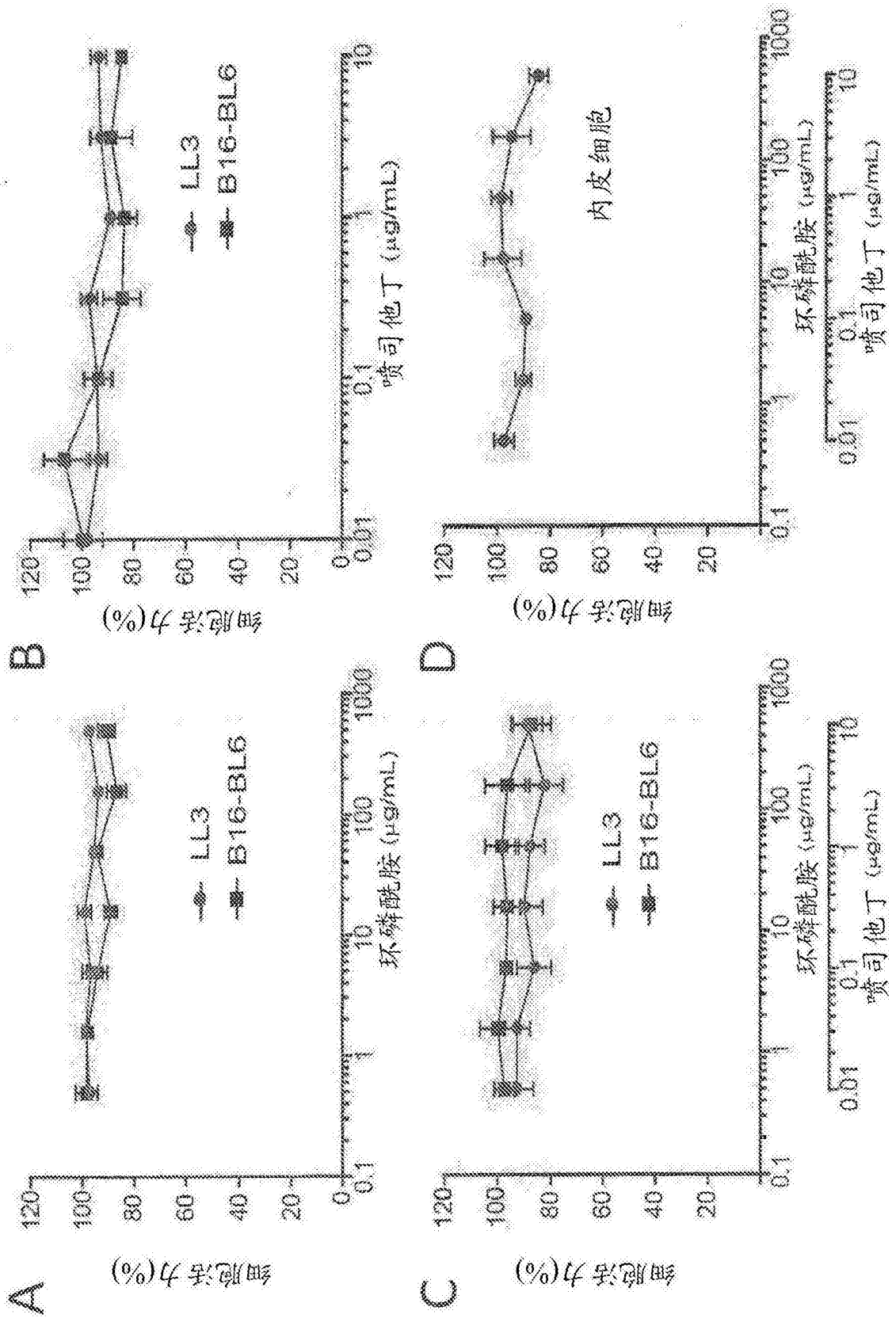


图16

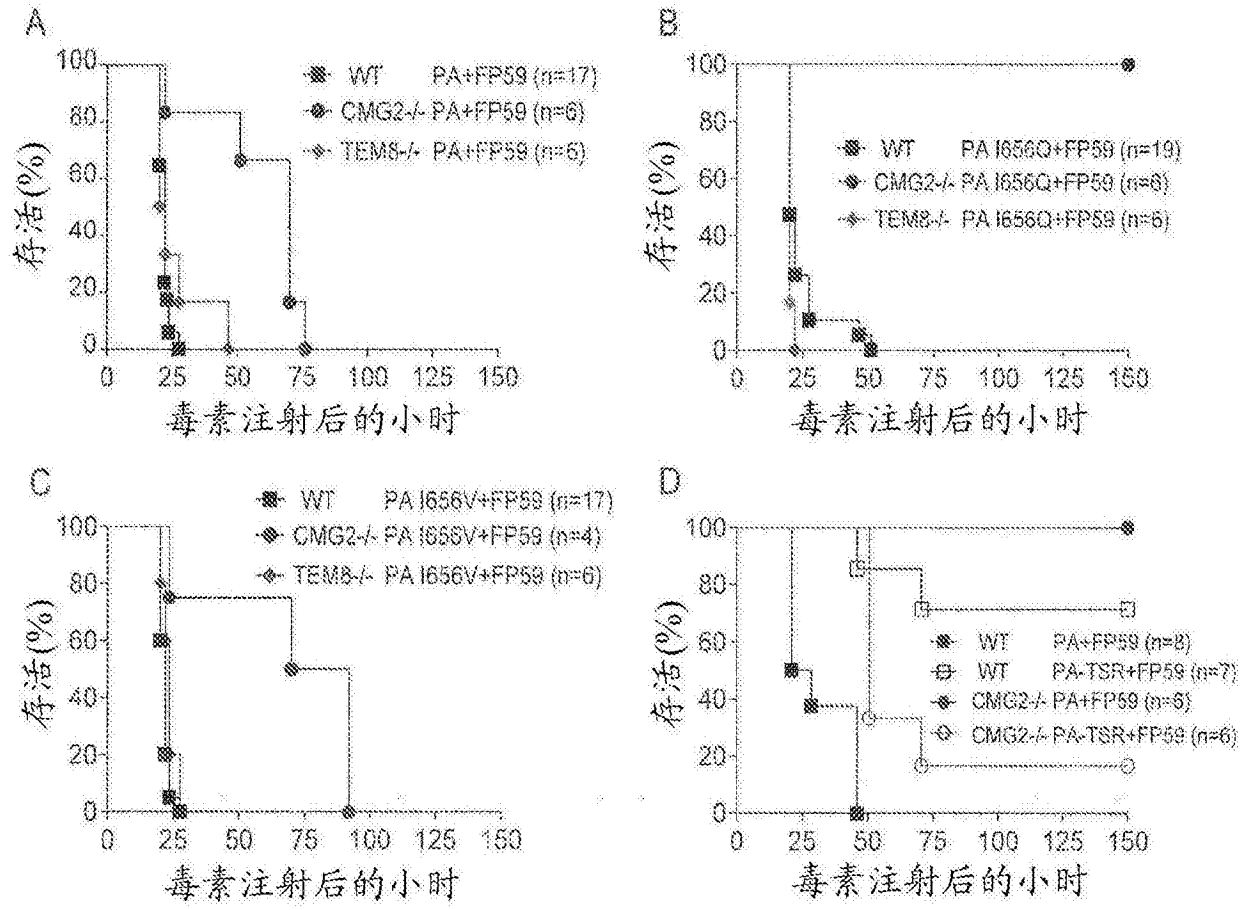

A
存活(%)
WT PA+FP59 (n=17)
CMG2-/- PA+FP59 (n=6)
TEM8-/- PA+FP59 (n=6)
毒素注射后的小时
B
存活(%)
WT PA I656Q+FP59 (n=19)
CMG2-/- PA I656Q+FP59 (n=8)
TEM8-/- PA I656Q+FP59 (n=6)
毒素注射后的小时
C
存活(%)
WT PA I656V+FP59 (n=17)
CMG2-/- PA I656V+FP59 (n=4)
TEM8-/- PA I656V+FP59 (n=6)
毒素注射后的小时
D
存活(%)
WT PA+FP59 (n=8)
WT PA-TSR+FP59 (n=7)
CMG2-/- PA+FP59 (n=6)
CMG2-/- PA-TSR+FP59 (n=6)
毒素注射后的小时

图17

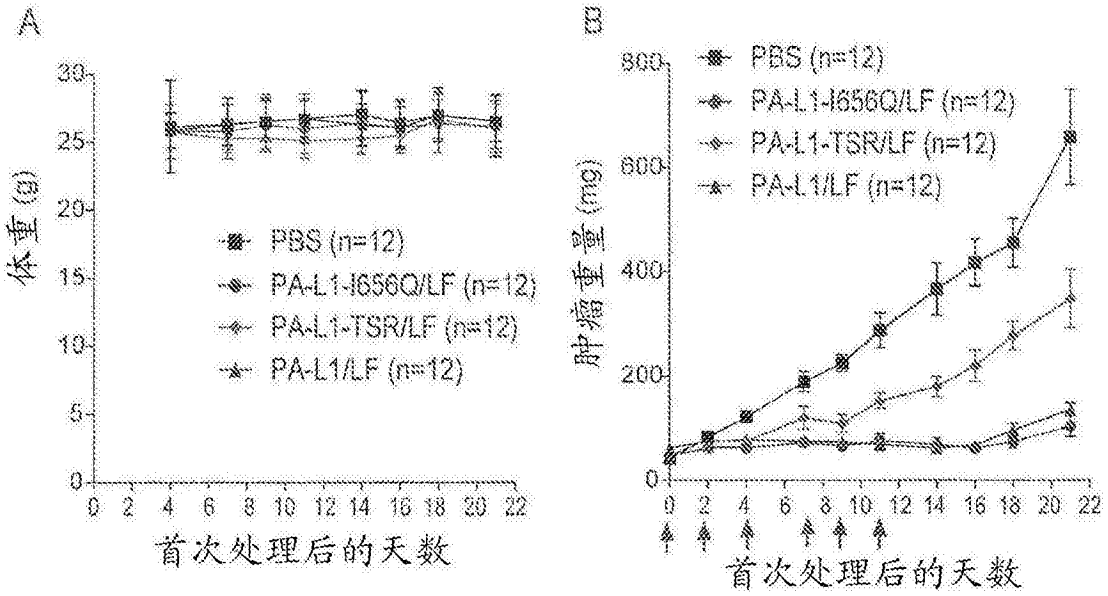

A
体重(g)
PBS (n=12)
PA-L1-I656Q/LF (n=12)
PA-L1-TSR/LF (n=12)
PA-L1/LF (n=12)
首次处理后的天数
B
肿瘤重量(mg)
PBS (n=12)
PA-L1-I656Q/LF (n=12)
PA-L1-TSR/LF (n=12)
PA-L1/LF (n=12)
首次处理后的天数

图18

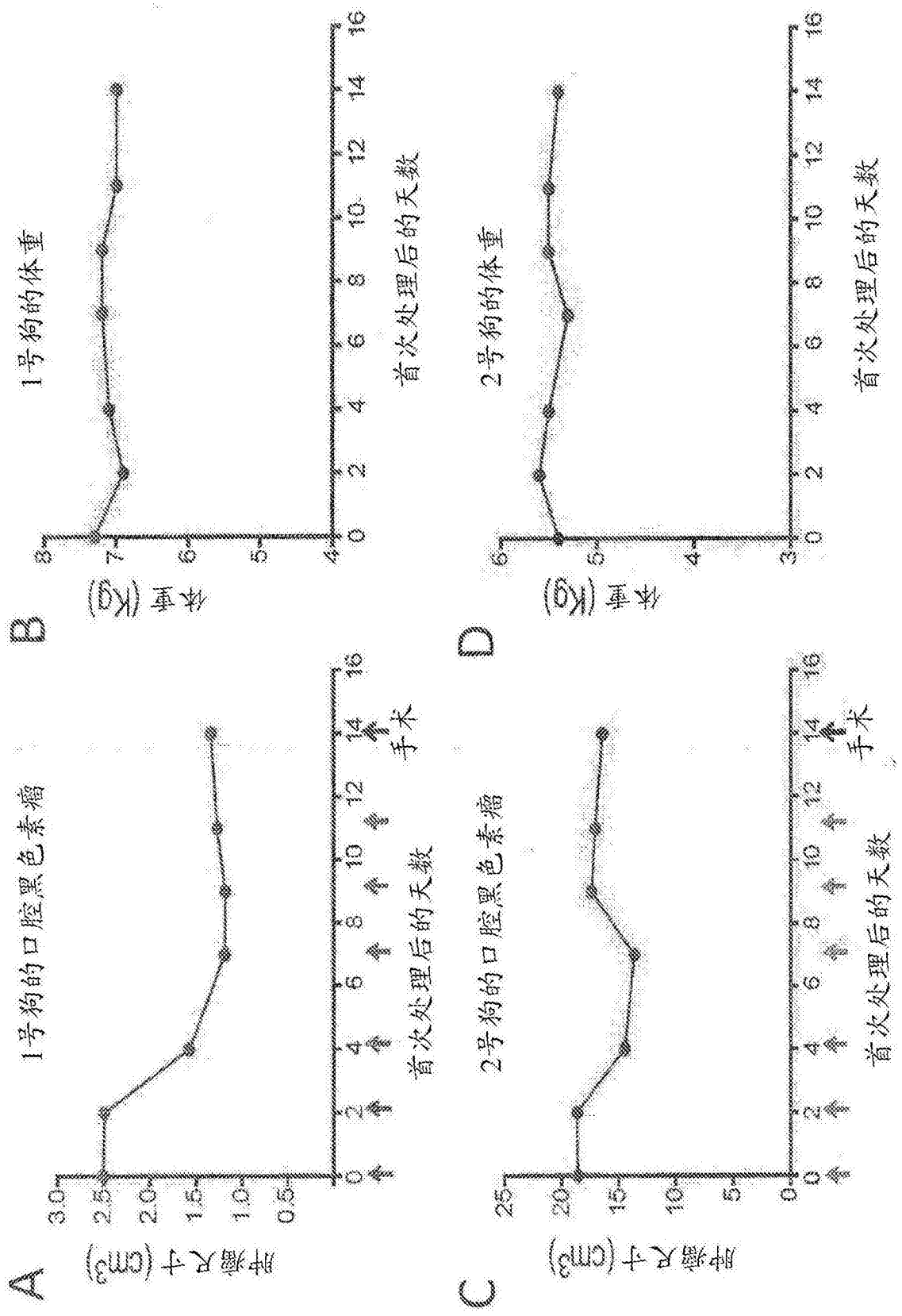

A
1号狗的口腔黑色素瘤
肿瘤尺寸 (cm³)
首次处理后的天数
手术
B
1号狗的体重
体重 (kg)
首次处理后的天数
C
2号狗的口腔黑色素瘤
肿瘤尺寸 (cm³)
首次处理后的天数
手术
D
2号狗的体重
体重 (kg)
首次处理后的天数

图19