



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103648525 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201280033583.7

(22)申请日 2012.05.04

(30)优先权数据

61/483,531 2011.05.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.01.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/036456 2012.05.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/154530 EN 2012.11.15

(73)专利权人 由卫生与公共服务部部长代表的

美国政府

地址 美国马里兰州

(72)发明人 I.H.帕斯坦 J.维尔顿 R.比尔斯

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 钟鸣

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/21(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009032954 A1, 2009.03.12,

WO 2009032954 A1, 2009.03.12,

US 7081518 B1, 2006.07.25,

审查员 湛侃

权利要求书2页 说明书43页

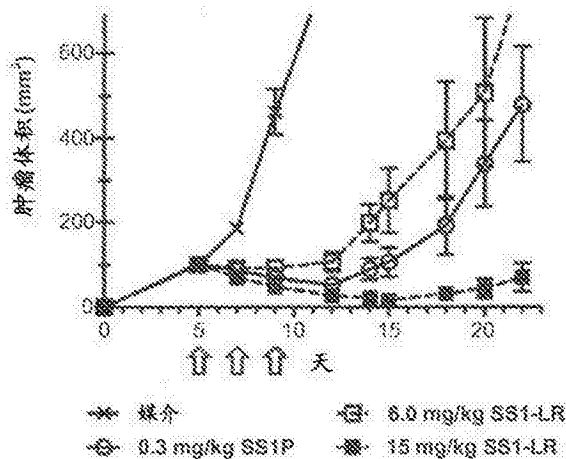
序列表24页 附图11页

(54)发明名称

靶向间皮素的重组免疫毒素

(57)摘要

间皮素是一种存在于卵巢癌、间皮瘤和几种其它类型的人癌症的表面的分化抗原。由于在正常组织间,间皮素仅存在于间皮细胞上,它代表一种用于抗体介导的细胞毒剂投递的良好靶物。本发明涉及改善的重组免疫毒素,其包含抗间皮素抗体(包括对间皮素具有特别高的亲和力的Fv分子)和假单胞菌外毒素模块,该假单胞菌外毒素模块已经修饰为降低其免疫原性和蛋白酶敏感性,并且对表达间皮素的细胞提供较好的细胞毒性。RIT非常适合于治疗表达间皮素的卵巢癌、胃癌、鳞状细胞癌、间皮瘤和其它恶性细胞。



1. 一种嵌合分子,其包含具有式M-L1-FCS-FL-功能性PE域III的融合多肽,其中M是特异性结合间皮素的抗体,或其特异性结合间皮素的片段;
L1由1至10个连续的氨基酸残基组成;
FCS是弗林蛋白酶切割位点,其由能够被弗林蛋白酶切割的连续氨基酸残基组成;
FL由GGSG组成;
功能性PE域III由在序列上与SEQ ID NO:1从位置395至613相同的连续氨基酸残基组成,其中用丙氨酸、甘氨酸或丝氨酸独立地取代SEQ ID NO:1中的以下氨基酸残基的至少一个:D406,R432,R467,R490,R513,E548,K590和Q592,
其中所述嵌合分子的特征在于,与没有FL的嵌合分子相比,所述嵌合分子具有对表达间皮素的细胞改进的细胞毒性并且不增加弗林蛋白酶的切割。
2. 权利要求1的分子,其中所述抗体是微型抗体(minibody)、双抗体(diabody)、三抗体(triabody)、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链Fv蛋白("scFv")、或二硫化物稳定化的Fv蛋白("dsFv")片段。
3. 权利要求1的分子,其中所述抗体片段包含经由重链与L1的连接与所述分子的剩余部分融合的二硫化物稳定化的轻链和重链免疫球蛋白可变区。
4. 权利要求1的分子,其中所述抗体包含:
V_H链,该V_H链包含CDR1氨基酸序列GYTMN(SEQ ID NO:51)、CDR2氨基酸序列LITPYNGASSYNQKFRG(SEQ ID NO:52)、和CDR3氨基酸序列GGYDGRGFDY(SEQ ID NO:53),和
V_L链,该V_L链包含CDR1氨基酸序列SASSSVSYMH(SEQ ID NO:54)、CDR2氨基酸序列DTSKLAS(SEQ ID NO:55)、和选自下组的CDR3氨基酸序列:QQWSGYPLT(SEQ ID NO:56), QQWSKHPLT(SEQ ID NO:57), QQWSGHPLT(SEQ ID NO:58), QQWSAHPLT(SEQ ID NO:59), QQWSQIPLT(SEQ ID NO:60), QQWGFNPLT(SEQ ID NO:61), QQWGTNPLT(SEQ ID NO:62), QQWGSHPPLT(SEQ ID NO:63), QQWGDFFPLT(SEQ ID NO:64), QQWGDHPLT(SEQ ID NO:65), QQWSAHPLT(SEQ ID NO:66),和QQWSGYPTT(SEQ ID NO:67)。
5. 权利要求4的分子,其中所述V_L CDR3氨基酸序列是QQWSKHPLT(SEQ ID NO:57)。
6. 权利要求1的分子,其中L1的长度是3至5个氨基酸。
7. 权利要求1的分子,其中L1是ASGG(SEQ ID NO:19)。
8. 权利要求1的分子,其中所述氨基酸残基D406被取代成丙氨酸,所述氨基酸残基R432被取代成甘氨酸,所述氨基酸残基R467被取代成丙氨酸,所述氨基酸残基R490被取代成丙氨酸,所述氨基酸残基R513被取代成丙氨酸,所述氨基酸残基E548被取代成丝氨酸,所述氨基酸残基K590被取代成丝氨酸,和所述氨基酸残基Q592被取代成丙氨酸。
9. 权利要求1的分子,其中所述弗林蛋白酶切割序列是RHRQPRGWEQL(SEQ ID NO:17)。
10. 权利要求1的分子,其中所述PE功能域III是LR中具有SEQ ID NO:4中从位置20至237或SEQ ID NO:5中从位置20至237的氨基酸序列的PE功能域III域。
11. 权利要求1的分子,其中抗体包含二硫化物稳定化的SS1可变轻链SEQ ID NO:6和SS1可变重链序列SEQ ID NO:7。
12. 权利要求1的分子,其中所述分子包含所述SS1可变轻链SEQ ID NO:6和所述SS1可变重链-PE融合多肽SEQ ID NO:8,其中所述可变轻链和重链形成二硫化物稳定化的抗体。
13. 权利要求1至12中任一项的分子,其中所述FCS在序列上与SEQ ID NO:1从位置274

至284是相同的或者是氨基酸序列RHRSKRGWEQL(SEQ ID NO:29)。

14.一种药物组合物,其包含权利要求1至12中任一项的分子和药学可接受赋形剂。

15.一种核酸,其编码权利要求1至12中任一项的分子。

16.一种载体,其包含权利要求15的核酸。

17.宿主细胞,其包含权利要求15的核酸。

18.权利要求1至12中任一项的嵌合分子在制备用于在有此需要的受试者中治疗过表达间皮素的癌症的药物中的用途。

19.权利要求18的用途,其中所述癌症是肺腺癌、卵巢癌、间皮瘤和/或表皮样癌。

20.一种具有式FCS-FL-PE功能域III的融合多肽,其中:

FCS由在序列上与SEQ ID NO:1从位置274至284相同的连续氨基酸残基组成或者由氨基酸序列RHRSKRGWEQL(SEQ ID NO:17)组成;

FL由GGS组成;

PE功能域III由在序列上与SEQ ID NO:1从位置395至613相同的连续氨基酸残基组成,其中用丙氨酸、甘氨酸或丝氨酸独立地取代SEQ ID NO:1中的以下氨基酸残基的至少一个:D406,R432,R467,R490,R513,E548,K590和Q592,

其中所述嵌合分子的特征在于,与没有FL的嵌合分子相比,所述嵌合分子具有对表达间皮素的细胞改进的细胞毒性并且不增加弗林蛋白酶的切割。

21.一种核酸,其编码权利要求20的多肽。

靶向间皮素的重组免疫毒素

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年5月6日提交的美国临时专利申请系列号61/483531的优先权权益,并且其通过全文提述并入本文。

[0003] 关于在联邦资助的研究和开发下得到的发明的权利的声明不适用。

[0004] 参考光盘上提交的“序列表”、表或计算机程序表附录不适用。

[0005] 发明背景

[0006] 重组免疫毒素(RIT)是组合抗体片段与源自细菌或植物来源的细胞毒性蛋白的工程化治疗性蛋白质。RIT设计成选择剂,用于在没有多种与化学治疗策略有关的继发毒性的情况下靶向消除细胞。用于治疗癌症的RIT可以通过融合针对肿瘤关联细胞表面抗原的抗体的可变片段(Fv)与假单胞菌(*Pseudomonas*)外毒素A(PE)的片段来构建。使用假单胞菌外毒素A的38-kDa截短(PE38)得到的RIT已经在临床试验中获得值得注意的成功,但是具有限制,其包括较差的实体瘤穿透、高免疫原性、和非特异性毒性(Kreitman RJ等,Clin Cancer Res.,15(16):5274-9(2009);Hassan R等,Clin Cancer Res.,13(17):5144-9(2007);Wayne AS等,Clin Cancer Res.,16(6):1894-903(2010);Kreitman RJ等,J Clin Oncol.,27(18):2983-90(2009);Sampson JH等,Neuro Oncol.,10(3):320-9(2008);Powell DJ Jr等,J Immunol.,179(7):4919-28(2007);Kreitman RJ,J Clin Oncol.,23(27):6719-29(2005);Pal LH等,Nat Med.,2(3):350-3(1996))。

[0007] 为了改善用RIT治疗的结果,PE中毒途径的知识对于了解这些蛋白质的设计是重要的。RIT经由受体介导的胞吞及通过内溶酶体系统运输到高尔基(Golgi)(在那里,它们经历逆向转运至内质网(ER))被内在化。在此运输阶段期间,毒素经由二硫键的还原及PE38中某个位点处蛋白酶弗林蛋白酶的切割(其分开Fv与PE片段)而活化。随后,活化的PE必须移位到胞质溶胶中,在那里,它进行ADP核糖基化并且使延长因子2(一种翻译装置必需的组分)失活。这使蛋白质合成停止,并且最终导致细胞死亡(关于PE中毒途径的综述,参见9)。先前设计为改善基于PE的RIT的细胞毒性活性的策略包括用规范的ER保留信号KDEL(SEQ ID NO:16)取代PE的C端残基REDLK(SEQ ID NO:15)(见tharam S等,J Biol Chem.,266(26):17376-81(1991);Du X,Ho M,and Pastan I,J Immunother.,30(6):607-13(2007);Rozemuller H.等,Int J Cancer.,92(6):861-70(2001);Kreitman RJ and Pastan I.,Biochem J.,307(Pt1):29-37(1995))。已知此变化增强PE的细胞毒性,据推测其通过改善从高尔基逆向转运到ER的效率实现。此策略是有效的,但是通常也增强RIT的非特异性毒性。另一种策略是通过改善Fv与其靶物之间的亲和力来增强RIT受体复合物的有效的内在化,并且由此增加细胞中的毒素量(Salvatore G等,Chn Cancer Res.,8(4):995-1002(2002);Decker T等,Blood.,103(7):2718-26(2004))。

[0008] 新近,蛋白酶抗性RIT已经设计为经受住内溶酶体系统中的降解,所述系统为有效免疫毒素治疗的潜在障碍(Johannes L和Decaudin D,Gene Ther.,12(18):1360-8(2005);Fitzgerald D.Why toxins Semin Cancer Biol.,7(2):87-95(1996))。此“溶酶体降解抗性”(LR)变体RIT通过除去PE38的蛋白酶敏感性区域,并用源自RIT HA22的高亲和力抗

CD22Fv将其靶向至B细胞CD22受体来产生(Weldon JE, Blood., 113(16):3792-800(2009))。LR突变没有严重影响对细胞系的体外活性,但是在小鼠中极大地降低非特异性毒素,而且在体外显著增强对患者衍生的慢性淋巴细胞性白血病(CLL)细胞的活性。另外,LR变体消除两种主要的小鼠B细胞表位组(Onda M等, J Immunol., 177(12):8822-34(2006))和来自PE38的抗原加工位点,这有助于降低其在小鼠中的免疫原性(Hansen JK等, J Immunother., 33(3):297-304(2010))。由于RIT的模块性质,可以通过用一种Fv交换另一种将PE的LR变体靶向至其它肿瘤相关抗原。因而,公开PE的II和Ib域的减少的技术一般教导从分子除去蛋白酶敏感性和抗原性位点的优点。此技术一般还教导源自这些变化的较小RIT的药动学优点。

[0009] 一种临床相关靶候选物是肿瘤相关抗原间皮素,其经常在癌症中高度表达,所述癌症包括间皮瘤和肺、卵巢和胰腺癌。因而,需要改善的RIT,其特异性靶向在其表面上表达间皮素的癌细胞。本发明通过提供治疗表达或过表达间皮素的癌症的RIT、药物组合物、和方法为这些和其它需要做准备。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了具有降低的免疫原性、改善的对溶酶体蛋白酶的抗性、和改善的对表达间皮素的细胞的细胞毒性的改善的假单胞菌外毒素A(“PE”)。在结构上,本发明的改善的PE将PE的I域除去,将PE的II域的大部分除去,并且具有功能性PE III域,任选地,其具有a)用甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸对PE III域氨基酸残基位置D406,R432,R467,R490,R513,E548,K590和/或Q592的取代和/或b)用甘氨酸、丝氨酸、或丙氨酸对PE III域氨基酸残基位置D403,R412,R427,E431,R458,D461,R505,E522,R538,R551,R576和/或L597的取代。改善在于插入短的且柔性的肽接头(“FL”),其长度为3至8个氨基酸且由改善的PE的弗林蛋白酶切割位点和功能性PE III域之间的序列中的甘氨酸和/或丝氨酸残基组成。因而,短接头由甘氨酸和/或丝氨酸残基组成。在一些实施方案中,接头是下式的肽:(Xaa1)_n,其中每个Xaa1独立选自甘氨酸和丝氨酸,且n是3至8。本发明的改善的PE分子在除去B细胞表位的情况下保留高细胞毒性活性。令人惊讶地,短的柔性接头的纳入在不实质性改变弗林蛋白酶对分子切割的情况下改善分子的细胞毒性。改善的PE分子以本文称为(LR/FL/8X, SEQ ID NO:4)和LR/FL/8M(SEQ ID NO:5)的本发明具体实施方案例示。另外,有如下的实施方案,其中与SEQ ID NO:1的PE的功能域相比,PE分子在其功能域III中具有一处或多处突变,如SEQ ID NO:4或5中找到的。在别的实施方案中,在与SEQ ID NO:1的609-613对应的一个或多个残基中有额外的取代,涵盖的是其也具有天然序列的内质网保留功能。在又一些实施方案中,将PE II域弗林蛋白酶切割位点修饰或用另一种弗林蛋白酶切割位点取代。

[0012] 在一些实施方案中,进一步与上述任何内容一致,PE包含功能域III,其具有一处或多处对SEQ ID NO:2的PE毒素的功能域(位置12至230)或选自下表的突变,其除去PE III域的一个或多个表位:

[0013] 表2

[0014]

除去的表位	突变
2	R467A
4	R432G,D406A

[0015]

5	R490A
6	E548A, R513A
7	K590S, Q592A

[0016] *表位记载于例如Onda,等,Proc Natl Acad Sci U S A.2008105(32):11311-6及W02007/016150。

[0017] 在一个相关方面,本发明提供了作为嵌合分子的RIT(“本发明的RIT”),该嵌合分子包含的(a)间皮素靶向模块,其与(b)如上文提供的经修饰的假单胞菌外毒素A(“PE”)缀合或融合。在一些实施方案中,所述模块是选自下组的抗体:scFv、dsFv、Fab、单域抗体和F(ab')₂、或包含抗体的CDR的多肽。SS1和MORab-009是优选的靶向模块。另外,抗间皮素抗体可以包含可变重(“V_H”)链和可变轻(“V_L”)链,该V_H和V_L链各自分别具有第一、第二和第三互补决定区(“CDR”),其中所述重链的第一CDR(“CDR1”)、第二CDR(“CDR2”)、和第三CDR(“CDR3”),分别具有对CDR1(GYTMN;SEQ ID NO:51)、CDR2(LITPYNGASSYNQKFRG;SEQ ID NO:52)、和CDR3(GGYDGRGFYD;SEQ ID NO:53)显示的氨基酸残基序列,且其中所述V_L链的CDR1、2和3分别具有对CDR1(SASSSVSYMH;SEQ ID NO:54)、CDR2(DTSKLAS;SEQ ID NO:55)、和CDR3(QQWSGYPLT;SEQ ID NO:56)显示的氨基酸残基序列。在一些实施方案中,轻链的CDR3是经修饰的,并且具有序列QQWSKHPLT(SEQ ID NO:57)、QQWSGHPLT(SEQ ID NO:58)、QQWSAHPLT(SEQ ID NO:59)、QQWSQIPLT(SEQ ID NO:60)、QQWGFNPLT(SEQ ID NO:61)、QQWGTNPLT(SEQ ID NO:62)、QQWGSHPPLT(SEQ ID NO:63)、QQWGFPLT(SEQ ID NO:64)、QQWGDHPLT(SEQ ID NO:65)、QQWSAHPLT(SEQ ID NO:66)、或QQWSGYPTT(SEQ ID NO:67)。在一些别的实施方案中,抗间皮素抗体是scFv、dsFv、Fab、或F(ab')₂。在又一些实施方案中,要用于RIT的抗间皮素抗体包含选自下组的CDR中至少一个氨基酸的氨基酸取代:V_L CDR1、V_L CDR2、V_H CDR1、和V_H CDR2,所述氨基酸由包含属于选自下组的热点基序的核苷酸的密码子编码:AGY或RGYW,其中R是A或G,Y是C或T和W是A或T。

[0018] 在别的方面,本发明提供了药物组合物,其包含:

[0019] (a)如上文提供的本发明的RIT和(b)药学可接受载体。

[0020] 在一个相关方面,本发明提供了编码上文描述的经修饰的假单胞菌外毒素A(“PE”)FL或RIT的分离的核酸。在一些实施方案中,核酸进一步编码间皮素靶向抗体的全部或片段(可变轻或重链或CDR)。

[0021] 因而,在第一组实施方案中,本发明提供了分离的经修饰的假单胞菌外毒素A(“PE”),其包含下式的连续多肽序列:FCS-FL-PE功能域III或L1-FCS-FL-PE功能域III,其中L1由长度为1至10个氨基酸残基的连续肽序列组成;FCS代表弗林蛋白酶切割位点或序列(例如RHRQPRGWEQL;SEQ ID NO:17),或弗林蛋白酶可切割的另一种序列;且FL代表柔性接头肽序列,其由3至8个独立选自甘氨酸和丝氨酸的氨基酸残基组成;且PE功能域III包含SEQ ID NO:1的残基395-613,任选地,其包含(i)与SEQ ID NO:1的609-613对应的一个或多个残基中的取代,(ii)与SEQ ID NO:1的位置490对应的位置处甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸对精氨酸的取代,(iii)一个或多个与SEQ ID NO:1的残基对应的残基的取代,该SEQ ID NO:1的残基维持PE域III的表位或亚表位的免疫原性,或(iv)(i)-(iii)中任一项的组合。在优选的实施方案中,PE功能域是LR/FL/8X(SEQ ID NO:4)的或LR/GGS/8M

(SEQ ID NO:3)的PE功能域。

[0022] 在又一组实施方案中,本发明提供了嵌合分子或RIT,其包含(a)配体或靶向模块(其特异性结合细胞表面上的间皮素),其缀合或融合于(b)如上文描述的经修饰的假单胞菌外毒素A(PE)。在一些实施方案中,所述配体是抗体或保留抗原识别能力的其片段。在优选的实施方案中,抗体源自SS1亲本抗体。优选地,RIT是SS1-LR/GGS/8X,其具有插入FCS和功能域III之间的GGS FL。因而,这些RIT可以包含SEQ ID NO:6的SS1可变轻链和SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的SS1可变重链重组免疫毒素序列,其中SS1可变轻链和重链形成二硫化物稳定化的抗体。

[0023] 在又一组实施方案中,本发明提供了杀死靶细胞或抑制靶细胞生长的治疗性方法,所述靶细胞在细胞外部表达或过表达间皮素。该方法包括使细胞与本发明的RIT接触。间皮素是一种存在于卵巢癌、间皮瘤和几种其它类型的人癌症表面上的分化抗原。例如,本发明的RIT可以用于在体外或在体内杀死或抑制表达间皮素的卵巢、胃、鳞状细胞癌、间皮瘤和其它恶性细胞的生长。涵盖治疗患有这些状况且需要通过本发明RIT的此类治疗的方法。

[0024] 在又一组实施方案中,本发明提供了编码上文描述的突变PE和RIT的核酸。

[0025] 在任何上述内容的一些实施方案中,柔性接头是GGS或GGSGGS(SEQ ID NO:18)。

[0026] 在又一些实施方案中,抗体选自下组:scFv、dsFv、Fab、单域抗体和F(ab')₂。在上述内容的一些别的实施方案中,抗体是SS1或再工程化SS1(SS1抗体的scFv、dsFv、Fab、单域抗体或F(ab')₂,或提供SS1抗体的CDR部分的片段)。在一些实施方案中,抗体的CDR用作靶向模块。在一些实施方案中,抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中,经修饰的PE是LR/GGS/8M(SEQ ID NO:3)或LR/(Xaa1)_n/8X(SEQ ID NO:4)或LR/(Xaa1)_n/8M(SEQ ID NO:5)。在一些别的实施方案中,嵌合分子是SS1-LR/GGS/8X(SEQ ID NO:6和7)或SS1-LR/GGS/8M(SEQ ID NO:6和8),其中其相应的靶向模块包含SS1抗体的V_L和V_H部分。

[0027] 别的实施方案对于普通技术人员会是显而易见的,并且在本文中描述。

[0028] 因而,在一些实施方案中,本发明提供了嵌合分子,其包含抗间皮素抗体片段、与该抗间皮素抗体片段在序列上直接连接的长度为3至8个氨基酸的第一肽接头、与该第一肽接头在序列上直接连接的弗林蛋白酶多肽切割位点RHRQPRGWEQL(SEQ ID NO:17)、与该弗林蛋白酶多肽切割位点在序列上直接连接的由3至6个选自Gly和Ser的氨基酸组成的第二肽接头、和与该第二肽接头在序列上直接连接的假单胞菌外毒素A的功能域III的N端氨基酸。在一些别的实施方案中,功能域是LR或LR/8M的III域,且抗体片段是SS1-LR的dsFv。在一些实施方案中,其中第一肽接头(L1)在序列上与dsFv的VH部分的羧基端直接连接。还提供了嵌合分子的药物组合物及其在有需要的受试者中治疗过表达间皮素的癌症的方法中的用途。在别的实施方案中,癌症是肺腺癌、卵巢癌、间皮瘤、或表皮样癌(epidermoid carcinoma)。

[0029] 附图简述

[0030] 图1:重组免疫毒素。(A)重组免疫毒素SS1P由经由来自重链的短肽接头(ASGG; SEQ ID NO:19)偶联的来自抗间皮素单克隆抗体SS1的可变片段(Fv)的二硫化物稳定化(ds)重(VH)和轻(VL)多肽链和假单胞菌外毒素A的38-kDa片段(PE38)组成。PE38由来自天然假单胞菌外毒素A的域II、域III、和域Ib的片段构成。域II包含以形成二硫键的半胱氨酸为边界

的暴露于溶剂的环,其含有弗林蛋白酶蛋白酶切割位点(RHRQPRGWEQL;SEQ ID NO:17)。(B)除了含有来自域II的弗林蛋白酶切割位点的11个残基的区段之外,SS1P的溶酶体降解抗性变体SS1-LR缺乏PE的域Ib和域II。创建了多个构建体,其具有SS1-LR的弗林蛋白酶切割位点周围的突变(加下划线)(SEQ ID NO:20-24)。

[0031] 图2:SS1-LR对间皮素阳性细胞系的细胞毒性。将细胞系L55、NCI-H322M、HAY、KB31、M30、A431/K5、OVCAR-8、和A1847与增加浓度的SS1P(空心圆形,实线)或SS1-LR(空心正方形,虚线)一起温育。在3天后,用比色WST-8测定法评估细胞存活力(viability),并且将其在未处理的和经环己酰胺处理的对照之间标准化。将来自六个重复的平均数值和标准误差绘图。SS1-LR包含SEQ ID NO:6的二硫化物稳定化的SS1V_L多肽链和SEQ ID NO:74的SS1V_H-PE多肽链。

[0032] 图3:高剂量SS1-LR具有有力的抗肿瘤活性。植入后第5天、第7天和第9天用RIT缓冲液(PBS中的0.2%HSA;十字形,实线)、0.3mg/kg SS1P(空心圆形,实线)、或6(空心正方形,虚线)或15(实心正方形,虚线)mg/kg剂量的SS1-LR静脉内处理具有A431/K5异种移植肿瘤的裸鼠。箭头标示施用处理时的日期。在22天的过程里测量肿瘤大小。点代表处理组中所有小鼠(n=6)的平均肿瘤大小。误差棒标示每个平均数值的标准误差。

[0033] 图4:内在化的免疫毒素加工。将A431/K5细胞与(A)SS1P或(B)SS1-LR连续温育,在0至24小时的多个时间点时裂解,并通过用抗PE抗体的非还原性SDS-PAGE Western印迹分析。标示全长的、还原性的、和经弗林蛋白酶切割的条带。(C)对SS1P(空心圆形,实线)和SS1-LR(空心正方形,虚线)显示了每个时间点时相对于所有条带的总强度的经弗林蛋白酶切割的条带强度。

[0034] 图5:柔性接头的添加增强SS1-LR的细胞毒性。将细胞系(A)KB31和(8)NCI-H322M与增加浓度的SS1P(空心圆形,实线)、SS1-LR(空心正方形,虚线)、SS1-LR/GGS(空心菱形,实线)或SS1-LR/GGS R279G(实心六边形,无线条)一起温育。在3天后,用比色WST-8测定法评估细胞存活力,并在未处理的和经环己酰胺处理的对照之间标准化。将来自六个重复的平均数值和标准误差绘图。

[0035] 图6:SS1-LR/GGS/8M对患者细胞的细胞毒性。将从间皮瘤患者的胸膜液或腹水培养的细胞与增加浓度的RIT SS1P(白色柱形)或SS1-LR/GGS/8M(灰色柱形)一起铺板。在4天后,将细胞固定,并用结晶紫染色以检测完整的细胞。相对于未处理对照标准化在595nm处得到的吸光度。将来自三个重复的平均数值和标准误差绘图。无星号= $p>0.05$;*= $p<0.05$;**= $p<0.01$;***= $p<0.001$ 。

[0036] 图7:SS1-LR/GGS/8M的体内行为。A)SS1-LR/GGS/8M的抗肿瘤活性。在植入后第7天、第9天和第12天用RIT缓冲液(D-PBS中的0.2%HAS;十字形,实线)、0.4mg/kg SS1P(空心圆形,实线)、或0.4(空心正方形,虚线)或2.5(实心正方形,虚线)mg/kg剂量的SS1-LR/GGS/8M静脉内处理具有L55异种移植肿瘤的裸鼠。箭头标示施用处理时的日期。在30天的过程里测量肿瘤大小。点代表处理组中所有小鼠(n=7)的平均肿瘤大小。误差棒标示每个平均数值的标准误差。B)毛细血管漏综合征(capillary leak syndrome)的大鼠模型。用PBS、SS1P或SS1-LR/GGS/8M静脉内处理大鼠,在24小时后观察,随后处死。将来自被实施安乐死的动物的胸部流体收集并测量。将几只大鼠的肺固定,切片,并用苏木精和曙红染色。C)显示了200倍放大率的代表性照片。D)SS1-LR/GGS/8M的药动学。给BalbC小鼠静脉内注射10 μ g

SS1P或SS1-LR/GGS/8M,并在离注射时间2-60分钟的几个时间间隔放血。通过ELISA确定多个时间间隔时血清中免疫毒素的浓度,并将其拟合至单指数衰变函数。标示相应的半衰期($t_{1/2}$)。每个点是一只小鼠的血清中的免疫毒素浓度,并且从至少两只不同小鼠确定每个时间间隔的浓度。

[0037] 图8:SS1-LR/GGS/8M的人抗原性。使用置换测定法比较SS1P和SS1-LR/GGS/8M与血清中先前存在的抗体的反应性以确定两种RIT将检测血清抗体的ELISA的信号降低50%的浓度(IC₅₀)。在这里将SS1P对SS1-LR/GGS/8M的相对IC₅₀值绘图。对于所有血清,SS1-LR/GGS/8M的抗原性相对于SS1P显著降低。

[0038] 图9:SS1-LR/GGS/8M对患者细胞的细胞毒性的汇总。相对存活力对处理。将从间皮瘤患者的胸膜液或腹水培养出的细胞与增加浓度的SS1P(白色柱形)或SS1-LR/GGS/8M(灰色柱形)一起铺板。在4天后,将细胞固定,并用结晶紫染色以检测完整的细胞。相对于未处理对照标准化595nm处得到的吸光度。将来自三个重复的平均数值和标准误差绘图。星号标示 $p<0.01(**)$ 或 $p<0.001(***)$ 的显著差异。

[0039] 发明详述

[0040] 根据基于PE的抗间皮素RIT SS1P,本发明提供了毒性较小且免疫原性较小的抗间皮素RIT变体。我们对SS1-LR(其基于用基于PE的抗CD22RITHA22-LR进行的先前工作生成(Weldon等,Blood113(6):3792-3800)(2009))的初始评估在体外在选择间皮素表达细胞系中显示高度可变活性。在小鼠A431/K5异种移植物肿瘤测定法中,SS1-LR(SEQ ID NO:6和7)比SS1P活性小,但是SS1-LR可以以高得多的剂量施用以实现显著的肿瘤消退。当探索其相对于SS1P的高度可变活性的原因时,我们研究了SS1-LR的内在化和加工,并且发现了经弗林蛋白酶切割的SS1-LR的比例比SS1P的所述比例低得多。这提示了降低的弗林蛋白酶切割可以限制SS1-LR的活性,并且我们设计并产生几种突变体以测试此假说。在弗林蛋白酶切割位点后添加短的Gly-Gly-Ser接头增强SS1-LR对细胞系的活性,但是令人惊讶地,增强的细胞毒性不对应于增强的弗林蛋白酶切割。本发明涉及此令人惊讶的发现,即短的柔性接头对抗间皮素RIT构建体的细胞毒性的重要性,其不依赖于对弗林蛋白酶对PE切割的任何影响。在进一步工作中,将8处已经显示降低PE免疫原性的点突变掺入SS1-LR/GGS中,然后对来自间皮瘤患者的原代恶性细胞测试该分子。最终分子SS1-LR/GGS/8M(SEQ ID NO:6和8)呈现与SS1P类似的细胞毒性。另外,依照本发明的RIT可以在哺乳动物中提供显著降低的非特异性毒性(例如,毛细血管漏综合征)。

[0041] 使用体内A431/K5异种移植物肿瘤小鼠模型观察到SS1-LR和SS1P之间的抗肿瘤效应的约20倍差异。此差异不能全部归因于细胞毒性,因为体外细胞毒性数据指示对A431/K5细胞的细胞毒性的4倍降低。取而代之,此差异的剩余部分有可能是由于小鼠中SS1-LR的药动学特性所致。我们先前已经显示了HA22-LR比HA22具有短几乎2倍的小鼠中血清半衰期(分别为7.8对14.6分钟),并且假定该差异是由于较小LR分子的升高的肾过滤所致(Weldon JE,Blood.,113(16):3792-800(2009))。通过检查衰变曲线下的面积,半衰期的此差异提示在1小时的过程里可用蛋白质的约4倍差异。如此,体内活性差异可以归因于降低的细胞毒性和较短的半衰期两者。

[0042] 虽然SS1-LR在体内比SS1P表明更低的抗肿瘤活性,但是其非特异性毒性在小鼠中也大大降低。我们利用此特性以在异种移植物肿瘤测定法中显著增加SS1-LR相比于SS1P的

剂量(50倍),这导致极大地增强的抗肿瘤效应。先前的实验已经以不同方式显示了SS1P的单剂静脉内LD50是1.0mg/kg(在Balb/C小鼠中)(Filpula D等,Bioconjug Chem.,18(3):773-84(2007))和0.75mg/kg(在NIH Swiss小鼠中)(Onda M等,Cancer Res.,61(13):5070-7(2001))。使用与临床日程表相似的QODx3剂量给药日程表,小鼠已经耐受最大剂量0.3mg/kg SS1P(未发表的观察结果)。然而,在A431/K5异种移植物抗肿瘤实验中以剂量15mg/kg以QODx3施用SS1-LR而无有害效应。先前,20mg/kg的静脉内单剂HA22-LR没有显示对小鼠的毒性(Weldon JE,Blood.,113(16):3792-800(2009)),并且我们已经在不引起死亡的情况下对小鼠给予高达45mg/kg的单剂HA22 • LR(未发表的观察结果)。虽然尚未在临床上测试LR分子,但是此效应提示LR变体RIT在人患者中可以具有降低的毒性,其可以防止剂量限制性毒性并且容许施用较高剂量。

[0043] 虽然SS1-LR在体外和在体内是有效的,但是我们由于相对于SS1P的一般降低的活性而担忧。一种关于此不一致的可能的解释是细胞内中毒途径的差异。PE38的LR变体含有PE的II和Ib域中的广泛缺失,并且这些缺失可能已经负面影响PE运输到胞质溶胶的能力。令人感兴趣地,我们检测用SS1P和SS1-LR处理的细胞的裂解物中的全长和经加工PE的初始实验显示经弗林蛋白酶加工的RIT量的显著差异。经SS1P处理的细胞中的较大部分的总RIT受到加工,但是经SS1-LR处理的细胞中仅小部分的总RIT受到加工。此结果提示较差的弗林蛋白酶切割可能限制SS1-LR的活性,并且我们着手改善PE中毒途径的此步骤。

[0044] 我们通过提高弗林蛋白酶切割位点的易接近性来增强SS1-LR的细胞毒性的努力产生了更具活性的RIT,但是我们无法显示增强的弗林蛋白酶切割。短的Gly-Gly-Ser接头(SS1-LR/GGS,图1B)、较长的接头(SS1-LR/GGSx2,图1B)、或侧翼有短Gly-Gly-Ser接头的弗林蛋白酶位点重复(SS1-LR/2x弗林蛋白酶,图1B)的添加均允许适度的细胞毒性升高。然而,这些分子无一在经处理的A431/K5细胞中增强经弗林蛋白酶切割的SS1-LR的比例或者在体外增加弗林蛋白酶切割速率。我们得出结论,即接头的添加必须经由另一种机制增强细胞毒性,所述机制可能涉及测试细胞中分子的细胞内运输。

[0045] 这些实验还证明弗林蛋白酶切割对于保留SS1P的细胞毒性的绝对必要性。SS1-LR/GGS中将对于切割必需的精氨酸改变成甘氨酸的点突变(SS1-LR/GGS R279G,图1B)产生不被弗林蛋白酶切割的蛋白质。此RIT对NCI-H322M和KB31细胞两者均不显示活性。最近已经对弗林蛋白酶切割在PE中毒途径中的必要性提出疑问(Morlon-Guyot J等,Infect Immun.,77(7):3090-9(2009)),但是存在着弗林蛋白酶在中毒期间执行重要作用的大量证据(Ornatowski W等,J Clin Invest.,117(11):3489-97(2007);Shiryaev SA等,J Biol Chem.,282(29):20847-53(2007);Sarac MS等,Infect Immun.,70(12):7136-9(2002);Chiron MF,Fryling CM,and FitzGerald D,J Biol Chem.,272(50):31707-11(1997);Gu M等,Infect Immun.,64(2):524-7(1996);Inocencio NM,Moehring JM,and Moehring TJ,J Biol Chem.,269(50):31831-5(1994);Moehring JM等,J Biol Chem.,268(4):2590-4(1993))。在本文呈现的情况中,在不含适合于弗林蛋白酶加工的位点的情况下PE中毒失败。正在进行研究以探索弗林蛋白酶切割与细胞毒性之间的关系。

[0046] 我们实验室的不同研究方向最近已经产生HA22变体HA22-LR-8M,其由于消除B细胞表位而具有极低的免疫原性(Onda M等,提交以供发表于PNAS.)。HA22-LR-8M与PE的LR变体含有相同的缺失,但是在PE的域'”中还掺入8处点突变。将这些突变放入SS1P中以产生

SS1-LR/GGS/8M.HA22-LR-8M和SS1-LR/GGS/8M之间的差异仅是抗体Fv和弗林蛋白酶切割位点后的GGS接头。由于大量对RIT的免疫应答针对PE,SS1-LR/GGS/8M应当展现出类似降低的免疫原性。

[0047] 在来自间皮瘤患者的原代恶性细胞上与SS1P比较SS1-LR/GGS/8M的细胞毒性,并且结果显示了SS1-LR/GGS/8M与SS1P相比具有相当或更好的细胞毒性。在良好的活性外,SS1-LR/GGS/8M比SS1P具有潜在的优点,包括降低的非特异性毒性和低免疫原性。本文描述的实验提示SS1-LR/GGS/8M由于其低免疫原性、低非特异性毒性、和良好的细胞毒性而会是用于临床的卓越候选物。

[0048] 定义

[0049] 单位、前缀、和符号以其国际单位制(Système International de Unites,SI)公认形式表示。数字范围包括限定范围的数量本身。除非另有指示,核酸以5'至3'方向从左至右书写;氨基酸序列以氨基至羧基方向从左至右书写。本文中提供的标题不是对本发明的各个方面或实施方案的限制,所述方面或实施方案可以通过整体参考说明书得到。因而,就在下文定义的术语通过完整参考说明书更为完全地定义。

[0050] 天然的假单胞菌外毒素A(“PE”)是一种由铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)分泌的极有活性的单体蛋白质(分子量66kD),其抑制真核细胞中的蛋白质合成。天然PE序列在美国专利No.5,602,095(其通过提述并入本文)的SEQ ID NO:1中列出。作用方法是通过ADP-核糖基化使延长因子2(EF-2)失活。所述外毒素含有一致起作用以引起细胞毒性的三个结构域。域Ia(氨基酸1-252)介导细胞结合。域II(氨基酸253-364)负责移位到胞质溶胶中,以及域III(氨基酸400-613)介导延长因子2的ADP核糖基化。PE的初始结构将域III分类为残基405-613,而非400-613。Allured VS, Collier RJ, Carroll SF&McKay DB, Proc Natl Acad Sci USA83,1320-1324(1986)。域Ib(氨基酸365-399)的功能仍然不明确,尽管其大部分,即氨基酸365-380可以缺失而不丧失细胞毒性。参见Siegall,等, J Biol Chem264:14256-61(1989)。大量此类修饰是本领域中已知的,包括但不限于消除域Ia,域Ib、II和III中的多处氨基酸缺失,单一氨基酸取代和在羧基端添加一种或多种序列,诸如KDEL(SEQ ID NO:16)和REDL(SEQ ID NO:26)。参见Siegall,等, J.Biol.Chem.264:14256-14261(1989)。本发明的免疫毒素能够在靶定细胞中移位和EF-2核糖基化。

[0051] PE的突变在本文中通过提及存在于天然PE的613个氨基酸的序列(SEQ ID NO:1)的特定位置处的氨基酸残基及其后在所讨论的特定突变中已经替换所述残基的氨基酸描述。如此,例如术语“R490A”指提及分子的位置490处的“R”(精氨酸,在标准单字母代码中)用“A”(丙氨酸,在标准单字母代码中)替换,而“K590Q”指通常存在于位置590处的赖氨酸已经用谷氨酰胺替换。下文列出了常见氨基酸的标准单字母代码。

[0052] 术语“PE功能域III”或“功能性PE域III”指天然PE的残基395-613(天然序列是SEQ ID NO:1)。虽然域III的结构边界已经设于残基405-613,但是功能性分析已经显示了域III需要域Ib的某个区段来保留ADP-核糖基化活性(Hwang, J.等, Cell, 48:129-136(1987); Siegall, C.B.等, J Biol Chem, 264:14256-14261(1989))。如此,PE功能域III以PE的残基395-613限定(Kihara, A. and Pastan, I., Bioconjug Chem, 5:532-538(1994))。在本文中,功能性PE域III序列包含降低抗原性的任选修饰和任选的备选内质网保留序列。

[0053] PE域III的末端残基REDLK(SEQ ID NO:15)可以以如下的方式改变,该方式会提高

依照本发明所得的RIT的细胞毒性。例如,用以序列KDEL(SEQ ID NO:16)、REEL(SEQ ID NO:27)或RDEL(SEQ ID NO:28)为末端的突变PE制成的免疫毒素可以比用携带天然末端序列的PE38制成的免疫毒素对靶细胞具有多得多的毒性。参见Kreitman和Pastan,Biochem J,307(Pt1):29-37(1995)。这些序列的重复也可以用于本RIT。参见例如美国专利5,854,044;5,821,238;和5,602,095及国际公开文本W099/51643。虽然以KDEL(SEQ ID NO:16)为末端的PE可用于体外目的,但是它们在动物中可能具有更多的非特异性毒性,并且对于体内使用是不太优选的。

[0054] 术语“间皮素”指存在于一些人细胞表面上且例如被K1抗体结合的蛋白质及其片段。间皮素的核酸和氨基酸序列在例如PCT公布申请W097/25,068及美国专利No.6,083,502和6,153,430中列出。还可参见Chang,K.&Pastan,I.,Int.J.Cancer57:90(1994);Chang,K.&Pastan,I.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA93:136(1996);Brinkmann U.,等,Int.J.Cancer71:638(1997);Chowdhury,P.S.,等,Mol.Immunol.34:9(1997),及美国专利No.6,809,184。间皮素以约69kDa的前体蛋白表达,然后,该前体蛋白被加工以释放30kDa蛋白,而留下附着于细胞表面的背景中描述的40kDa糖基磷脂酰肌醇连接的细胞表面糖蛋白。40kDa糖蛋白是本文中以术语“间皮素”提及的。间皮素的核酸和氨基酸序列已经从几个物种记录,例如人(NM_005823.4→NP_005814.2;和NM_013404.3→NP_037536.2)、小鼠(NM_018857.1→NP_061345.1)、大鼠(NM_031658.1→NP_113846.1)、牛(NM_001100374.1→NP_001093844)。

[0055] 为了便于参考,如本文中使用的,术语“抗体”包括完全(本文中有时称为“完整”)抗体、保留抗原识别和结合能力的抗体片段(无论通过完全抗体的修饰产生还是使用重组DNA方法重新(de novo)合成)、单克隆抗体、多克隆抗体、和抗体模拟物,除非上下文另有要求。抗体可以是IgM、IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgD、IgA或IgE。

[0056] 多年来本领域中公知IgG亚类的恒定区序列(例如Honjo等,Ce11,18:559-68(1979);Tucker等,Science,206:1303-6(1979);Yamawaki等,Nature283:786-9(1980);Ellison等,Nucl Acids Res10:4071-9(1982);Ellison等,DNA1:11-8(1981);Ellison and Hood,Proc Natl Acad Sci USA79:1984-8(1982))。由于可变区的CDR决定抗体特异性,可以将针对靶细胞表面抗原的抗体的CDR或Fv移植或工程化改造到选择的抗体中以对所述抗体赋予针对靶细胞表面抗原的特异性。例如,可以将针对靶细胞表面抗原的抗体的CDR移植到已知三维结构的人抗体框架上(参见例如W098/45322;W087/02671;美国专利No.5,859,205;5,585,089;及4,816,567;EP专利申请0173494;Jones,等Nature321:522(1986);Verhoeyen,等,Science239:1534(1988),Riechmann,等Nature332:323(1988);及Winter&Milstein,Nature349:293(1991))以形成在对人施用时会产生很少的免疫原性应答或不产生免疫原性应答的抗体。或者,抗体的恒定区可以通过用通常在人类中找到的残基替换在非人动物(诸如小鼠)中找到的残基来工程化改造。以此方式工程化改造的抗体称为“人源化抗体”,并且是优选的,因为它们具有较低的诱导副作用的风险,并且可以在循环中保持更久。使抗体人源化的方法是本领域中已知的,并且在例如美国专利No.6,180,377;6,407,213;5,693,762;5,585,089;及5,530,101中列出。

[0057] 术语“抗体片段”指包含完整抗体的部分,一般为完整抗体的抗原结合或可变区的分子。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂、和Fv片段;单域抗体(参见例如Wesolowski,

Med Microbiol Immunol.(2009)198(3):157-74;Saerens,等,Curr Opin Pharmacol.(2008)8(5):600-8;Harmsen和de Haard,Appl Microbiol Biotechnol.(2007)77(1):13-22);螺旋稳定化抗体(参见例如Arndt等,J Mol Biol312:221-228(2001));双抗体(diabody)(见下文);单链抗体分子(“scFv”,参见例如美国专利No.5,888,773);二硫化物稳定化抗体(“dsFv”,参见例如美国专利No.5,747,654和6,558,672),和域抗体(“dAb”,参见例如Holt等,Trends Biotech21(11):484-490(2003),Ghahroudi等,FEBS Lett.414:521-526(1997),Lauwereys等,EMBO J17:3512-3520(1998),Reiter等,J.Mol.Biol.290:685-698(1999),Davies and Riechmann,Biotechnology,13:475-479(2001))。

[0058] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一多肽链(V_H - V_L)中相连接的可变重域(“ V_H ”或“ VH ”)和可变轻域(“ V_L ”或“ VL ”)。通过使用太短以致于不能容许同一链上的两个域间配对的接头,迫使该域与另一条链的互补域配对,并且创建两个抗原结合位点。双抗体及其产生更完整记载于例如EP404,097;W093/11161;及Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)。

[0059] 术语“亲本抗体”意指要突变或改变以获得与亲本抗体结合相同表位,但是具有更高亲和力的抗体或其片段的任何感兴趣抗体。

[0060] “靶向模块”指免疫缀合物中意图将免疫缀合物靶向至感兴趣细胞的部分。通常,靶向模块是抗体,或保留抗原识别能力的抗体片段,诸如scFv、dsFv、Fab或 $F(ab')_2$ 。

[0061] “毒性模块”指免疫毒素中使免疫毒素对感兴趣细胞有细胞毒性的部分。就作为本发明主题的免疫毒素而言,毒性模块是已经修饰/突变为降低其非特异性细胞毒性的假单胞菌外毒素A,如下文更为详细描述。

[0062] 通常,免疫球蛋白具有重链和轻链。每条重链和轻链含有恒定区和可变区,(区又称为“域”)。轻链和重链可变区含有以三个又称作“互补决定区”或“CDR”的高变区中断的“框架”区。框架区和CDR的范围已经限定。不同轻链或重链的框架区的序列在物种内是相对保守的。抗体的框架区(其是组成性轻链和重链的组合框架区)用来在三维空间中定位和排列(aligned)CDR。

[0063] CDR主要负责结合抗原的表位。每条链的CDR通常称为CDR1、CDR2、和CDR3(其从N端开始序贯编号),并且通常还通过特定CDR定位的链鉴定。如此, V_H CDR3位于其见于的抗体重链的可变域,而 V_L CDR1是来自其见于的抗体轻链的可变域的CDR1。

[0064] 提及“ V_H ”或“ VH ”指免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的。提及“ V_L ”或“ VL ”指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的。

[0065] 短语“单链Fv”或“scFv”指传统的两链抗体的重链和轻链的可变域已经连接以形成一条链的抗体。通常,在两条链间插入接头肽以容许正确折叠并创建活性结合位点。

[0066] 短语“二硫键”或“半胱氨酸-半胱氨酸二硫键”指两个半胱氨酸间的共价相互作用,其中半胱氨酸的硫原子被氧化以形成二硫键。与对于氢键的1-2kcal/mol相比,二硫键的平均键能是约60kcal/mol。

[0067] 短语“二硫化物稳定化的Fv”或“dsFv”指轻链和重链之间有二硫键的免疫球蛋白可变区。在本发明的语境中,形成二硫键的半胱氨酸在抗体链的框架区内,并且用来稳定抗体的构象。通常,工程化改造抗体以在框架区中在取代不会干扰抗原结合的位置处引入半胱氨酸。

[0068] 术语“接头肽”包括提及抗体结合片段(例如Fv片段)内的肽,其用来将重链的可变域与轻链的可变域间接键合。

[0069] 术语“热点”意指可变域的CDR或框架区的核苷酸序列中作为特别高度天然变异位点的部分。虽然认为CDR自身是高变异性区域,但是已经认识到突变不是贯穿CDR均匀分布的。特定定位点或热点已经鉴定为这些经历集中突变的位置。热点的特征在于许多结构特征和序列。这些“热点基序”可以用于鉴定热点。两个特别完善表征的共有序列基序是四核苷酸序列RGYW和丝氨酸序列AGY,其中R是A或G,Y是C或T,且W是A或T。

[0070] 与特定抗原有免疫学反应的抗体可以通过重组方法,诸如选择噬菌体或类似载体中的重组抗体文库,参见例如Huse等,Science246:1275-1281(1989);Ward,等,Nature341:544-546(1989);及Vaughan,等,Nature Biotech.14:309-314(1996),或者通过用抗原或用编码抗原的DNA免疫动物来生成。

[0071] 术语“效应器模块”意指免疫缀合物中意图具有对通过靶向模块靶向的细胞的影响或鉴定免疫缀合物的存在的部分。在本发明的背景中,效应器模块是经修饰的或突变的假单胞菌外毒素A。

[0072] 术语“免疫缀合物”包括指效应器分子与抗体的共价连接。

[0073] 术语“有效量”或“对于…有效的量”或“治疗有效量”包括指足以产生期望结果,诸如将细胞蛋白合成抑制至少50%,或杀死细胞的治疗剂剂量。

[0074] 在本发明的背景中,毒素是突变的假单胞菌外毒素A。

[0075] 术语“接触”包括指置于直接物理联合中。

[0076] “表达质粒”包括与启动子可操作连接的编码感兴趣分子的核苷酸序列。

[0077] 如本文中使用的,“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,包括指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。该术语也适用于含有保守氨基酸取代,使得蛋白质仍为功能性的聚合物。

[0078] 术语“残基”或“氨基酸残基”或“氨基酸”包括指掺入蛋白质、多肽或肽(通称“肽”)中的氨基酸。氨基酸可以是天然存在的氨基酸,并且除非另有限制,可以涵盖可以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥功能的天然氨基酸的已知类似物。

[0079] 本文中提及的氨基酸和类似物通过如下在表A中的缩写名称描述:

[0080] 表A:氨基酸命名

	名称	3 字母	1 字母
[0081]	丙氨酸	Ala	A
	精氨酸	Arg	R
	天冬酰胺	Asn	N

	天冬氨酸	Asp	D
	半胱氨酸	Cys	C
	谷氨酸	Glu	E
	谷氨酰胺	Gln	Q
	甘氨酸	Gly	G
	组氨酸	His	H
	高丝氨酸	Hse	-
	异亮氨酸	Ile	I
	亮氨酸	Leu	L
	赖氨酸	Lys	K
[0082]	甲硫氨酸	Met	M
	甲硫氨酸亚砷	Met (O)	-
	甲硫氨酸甲基硫	Met (S-Me)	-
	正亮氨酸	Nle	-
	苯丙氨酸	Phe	F
	脯氨酸	Pro	P
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	色氨酸	Trp	W
	酪氨酸	Tyr	Y
	缬氨酸	Val	V

[0083] “保守取代”在描述蛋白质时指不实质性改变蛋白质活性的蛋白质的氨基酸组成变化。如此,特定氨基酸序列的“保守修饰的变异”指对于蛋白质活性不重要的那些氨基酸的氨基酸取代或用具有相似特性(例如酸性、碱性、带正电荷或负电荷的、极性或非极性,等等)的其它氨基酸取代氨基酸使得甚至重要的氨基酸的取代不实质上改变活性。提供功能相似氨基酸的保守取代表是本领域中公知的。表B中的下列六组各含有作为彼此保守取代的氨基酸:

[0084] 表B

[0085] 1)丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T);

[0086] 2)天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0087] 3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0088] 4)精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0089] 5)异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);和

[0090] 6)苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W)。

[0091] 还可见Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and Company, New York(第二版, 1992)。

[0092] 术语“缀合”、“联接”、“键合”或“连接”指使两个多肽成为一个连续的多肽分子。在本发明的语境中, 该术语包括指将抗体模块与效应器分子(EM)连接。连接可以通过化学或重组手段进行。化学手段指抗体模块与效应器分子之间的反应, 使得存在有两种分子之间形成共价键以形成一个分子。

[0093] 如本文中使用的, “重组的”包括指使用在其天然状态中不具有能够表达蛋白质的DNA的内源拷贝的细胞所产生的蛋白质。该细胞产生重组蛋白, 因为它们已经通过引入合适的分离的核酸序列进行遗传改变。该术语还包括指已经通过引入异源核酸或将天然核酸改变成对于细胞非天然的形式而修饰的细胞、或核酸、或载体, 或者所述细胞源自如此修饰的细胞。如此, 例如, 重组细胞表达不见于细胞的天然(非重组)形式的基因, 表达见于天然形式内的基因突变体, 或者表达在其它情况中异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。

[0094] 如本文中使用的, “核酸”或“核酸序列”包括指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物, 并且除非另有限定, 涵盖以与天然存在的核苷酸相似的方式与核酸杂交的天然核苷酸的已知类似物。除非另有指示, 特定的核酸序列包括其互补序列及保守变体, 即存在于密码子和变体的摆动位置中的核酸, 其在翻译成蛋白质时导致氨基酸的保守取代。

[0095] 如本文中使用的, “编码”就规定的核酸而言包括指包含供翻译成规定蛋白质的信息的核酸。该信息由密码子使用规定。通常, 氨基酸序列使用“通用”遗传密码由核酸编码。然而, 通用密码的变体(诸如存在于一些植物、动物和真菌线粒体、细菌山羊支原体(*Mycoplasma capricolum*)(*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:2306-2309(1985), 或纤毛虫大核(ciliate Macronucleus)中的)可以在使用这些生物体的翻译装置表达核酸时使用。

[0096] 短语“框内融合(fusing in frame)”指连接两个或更多个编码多肽的核酸序列, 使得连接的核酸序列翻译成包含初始多肽链的单链蛋白质(“融合蛋白”)。

[0097] 如本文中使用的, “表达的”包括指将核酸翻译成蛋白质。蛋白质可以表达, 并且保持为胞内的, 变成细胞表面膜的组分或被分泌到胞外基质或介质中。

[0098] “宿主细胞”意指可以支持表达载体复制或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞, 诸如大肠杆菌(*E. coli*), 或真核细胞, 诸如酵母、昆虫、两栖动物、或哺乳动物细胞。

[0099] 术语“相同的”或百分比“同一性”在两个或更多个核酸或多肽序列的语境中指根据使用下列序列比较算法之一或通过视觉检查进行测量时, 在为了实现最大对应性而比较并比对时, 相同或具有规定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的两个或更多个序列或亚序列。

[0100] 短语“基本上相同”在两个核酸或多肽的语境中指根据使用下列序列比较算法之一或通过视觉检查进行测量时, 在为了实现最大对应性而比较并比对时, 具有至少60%, 更优选65%, 甚至更优选70%, 还更优选75%, 甚至更优选80%, 且最优选90-95%核苷酸或氨基酸残基同一性的两个或更多个序列或亚序列。优选地, 实质性同一性存在于长度至少约50个残基的序列区域里, 更优选地, 至少约100个残基的区域里, 且最优选地, 序列在至少约150个残基里是基本上相同的。在一个最优选的实施方案中, 序列在比较肽或编码区的整个长度里是基本上相同的。

[0101] 对于序列比较,通常,一个序列的作用为与测试序列比较的参照序列。在使用序列比较算法时,将测试和参照序列输入计算机中,在必要时指定亚序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参照序列的百分比序列同一性。

[0102] 可以进行供比较的序列的最佳比对,例如通过Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)的搜索相似性方法,通过这些算法(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的GAP, BESTFIT, FASTA, 和TFASTA)的计算机化实现,或者通过视觉检查(一般参见Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel等编, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc., (1995增刊)(Ausubel))进行。

[0103] 适合于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的例子是BLAST和BLAST2.0算法,其分别记载于Altschul等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410和Altschuel等(1977) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402。用于实施BLAST分析的软件通过国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对公众可获得。此算法涉及首先通过鉴定询问序列中长度W的短字(short word)来鉴定高得分序列对(HSP),所述短字在与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足一些正值的阈值得分T。T称为邻域字得分阈值(neighborhood word score threshold)(Altschul等, 见上文)。这些初始邻域字命中的作用为用于启动搜索以寻找含有它们的较长HSP的种子(seed)。然后,以两个方向沿着每个序列延伸字命中,只要累积比对得分可以增加。累积得分的计算使用(对于核苷酸序列)参数M(匹配残基对的奖分;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)。对于氨基酸序列,评分矩阵用于计算累积得分。在如下情况下停止每个方向的字命中延伸:累积比对得分自其最大实现数值减少数量X;由于一个或多个负评分残基比对的积累,累积得分变为0以下;或者达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏性和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)为11,期望值(E)为10, M=5, N=-4, 以及两条链的比较作为缺省。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用字长(W)为3, 预期值(E)为10, 以及BLOSUM62评分矩阵作为缺省(参见Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989))。

[0104] 在计算百分比序列同一性外, BLAST算法还对两种序列间的相似性实施统计学分析(参见例如Karlin和Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5877(1993))。一种由BLAST算法提供的相似性测量是最小和概率(P(N)), 其提供偶然会发生两种核苷酸或氨基酸序列间匹配的概率的指示。例如, 若比较测试核酸与参照核酸中的最小和概率小于约0.1, 更优选小于约0.01, 且最优选小于约0.001, 则认为核酸与参照序列相似。

[0105] 两种核酸序列或多肽基本上相同的进一步指示是由第一核酸编码的多肽与由第二核酸编码的多肽具免疫学交叉反应性, 如下文描述的。如此, 例如在两种肽仅相差保守取代的情况下, 多肽通常与第二多肽基本上相同。两种核酸序列基本上相同的另一种指示是两种分子在严格条件下彼此杂交, 如下文描述的。

[0106] 术语“体内”包括指在获得细胞的生物体的身体内部。“离体”和“体外”意指在获得细胞的生物体的身体外部。

[0107] 短语“恶性细胞”或“恶性”指侵入性和/或能够经历转移(即癌性细胞)的肿瘤或肿瘤细胞。

[0108] 如本文中使用的,“哺乳动物细胞”包括指源自哺乳动物,包括人、大鼠、小鼠、豚鼠、黑猩猩、或猕猴的细胞。可以在体内或在体外培养细胞。

[0109] 术语“选择性反应的”就抗原而言指抗体(整体或部分)与携带所述抗原的细胞或组织而不对缺乏所述抗原的细胞或组织的优先结合。当然,公认的是,分子和非靶细胞或组织之间可以发生某种程度的非特异性相互作用。不过,选择性反应性可以以经由抗原的特异性识别介导而区别。虽然选择性反应性抗体结合抗原,但是它们可能以低亲和力这样做。另一方面,特异性结合导致在抗体与携带抗原的细胞之间比在结合的抗体与缺乏抗原的细胞之间强得多的结合。与缺乏靶抗原的细胞或组织相比,特异性结合通常导致与携带靶抗原的细胞或组织结合的抗体量(每单位时间)增加至大于5倍,更优选大于10倍,且最优选大于100倍。在此类条件下对蛋白质的特异性结合需要就其对特定蛋白质的特异性而选择的抗体。多种免疫测定法形式适合于选择与特定蛋白质具特异性免疫反应性的抗体。例如,固相ELISA免疫测定法常规用于选择与蛋白质具特异性免疫反应性的单克隆抗体。关于可以用于确定特异性免疫反应性的免疫测定法形式和条件的描述,参见Harlow和Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)。

[0110] 术语“免疫学反应性条件”包括指容许针对特定表位产生的抗体以比对基本上所有其它表位的结合大得可检测的程度和/或基本上排除对基本上所有其它表位的结合的方式结合所述表位的条件。免疫学反应性条件依赖于抗体结合反应的形式,并且通常是那些用于免疫测定方案的条件或体内遇到的那些条件。关于免疫测定形式和条件的描述,参见Harlow和Lane, 见上文。优选地,本发明的方法中采用的免疫学反应性条件是“生理学条件”,其包括指在活哺乳动物或哺乳动物细胞内部典型的条件(例如温度、渗量、pH)。虽然认为一些器官经受极端条件,但是生物体内和细胞内环境通常位于pH7左右(即pH6.0至pH8.0,更通常pH6.5至7.5),含有水作为主要溶剂,并且以高于0°C且低于50°C的温度存在。渗量在支持细胞生存和增殖的范围内。

[0111] 术语“患者”、“受试者”、“个体”可互换,指哺乳动物,例如人或非人灵长类、驯养哺乳动物(例如犬或猫类)、农业哺乳动物(例如牛、猪、绵羊、马)、实验室动物(小鼠、大鼠、仓鼠、兔)。

[0112] 术语“共施用”指个体血液中同时存在两种活性剂。共施用的活性剂可以同时或序贯投递。

[0113] 如本文中使用的,术语“治疗”和“处理”指该术语适用的疾病或状况,或此类疾病或状况的一种或多种症状的发作的延迟,进展的延迟或反转、或减轻或预防。

[0114] 术语“抑制”、“降低”、“减少”就肿瘤或癌症生长或进展而言指将受试者中的肿瘤或癌症的生长、扩散、转移抑制到使用本领域中已知的任何方法可测量的量。若与共施用本发明的PE(例如作为嵌合分子的一部分)前的肿瘤负荷相比,肿瘤负荷降低至少约10%, 20%, 30%, 50%, 80%, 或100%, 则肿瘤或癌症的生长、进展或扩散受到抑制、降低或减少。在一些实施方案中,与施用PE前的肿瘤负荷相比,将肿瘤或癌症的生长、进展或扩散抑制、降低或减少至少约1倍, 2倍, 3倍, 4倍, 或更多倍。

[0115] 重组免疫毒素的组分

[0116] A. 弗林蛋白酶切割位点(FCS)

[0117] 弗林蛋白酶切割位点可以是任何可被弗林蛋白酶切割的多肽位点。如由Duckert等, *Protein Engineering, Design&Selection* 17(1):107-112(2004)报告的(下文为“Duckert等”, 其通过全文提述并入本文, 并且特别就弗林蛋白酶可切割序列和基序而言, 其公开了), 弗林蛋白酶是一种属于“称作枯草杆菌蛋白酶/kexin样前蛋白(proprotein)转化酶的进化保守二碱基和单碱基特异性CA₂+依赖性丝氨酸蛋白酶家族”的酶。同上, 在第107页。弗林蛋白酶, 又称为“成对碱性氨基酸切割酶”或“PACE”, 是该家族的7种哺乳动物成员之一, 并且牵涉加工几种内源人蛋白质。一般参见例如Thomas G, *Nat Rev Mol Cell Biol*, (10):753-66(2002)。它是一种主要在反式高尔基网络中找到的膜结合蛋白。从20世纪90年代早期起已经知道人弗林蛋白酶序列。参见例如Hatsuzawa, K.等, *J. Biol. Chem.*, 267:16094-16099(1992); Molloy, S.等, *J. Biol. Chem.*, 267:16396-16402(1992)。

[0118] 最小程度的切割位点通常在氨基酸残基的单字母代码R-X-X-R中, 其中在第二个“R”之后发生切割。Duckert等汇总了关于文献中报告为具有弗林蛋白酶切割位点的38种蛋白质(包括哺乳动物蛋白质、病原性细菌的蛋白质、和病毒蛋白质)序列可用的信息。它报告了审阅的31种, 或81%的切割基序具有R-X-[R/K]-R共有序列, 其中11种或29%具有R-X-R-R, 且20种或52%是R-X-K-R。三种切割基序仅含有最小程度的切割序列。Duckert等进一步比对比序, 并且同时对切割基序自身及在周围残基中鉴定每个弗林蛋白酶中每个位置处找到的残基。Duckert等的图1A根据相对大小显示最常在每个位置处找到的残基。根据惯例, 弗林蛋白酶切割位点周围的残基从易切断的键(其通常以符号“↓”标示)起编号。向N端计数, 底物残基称作P1、P2等等, 而向C端计数, 残基称作P1'、P2'等等。参见例如Rockwell, N.C.和J.W.Thorner, *Trends Biochem.Sci.*, 29:80-87(2004); Thomas G., *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 3:753-766(2002)。如此, 遵循惯例, 可以使用以下序列来对最小程度的切割序列的残基和周围残基进行比对和编号:

[0119] P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5',

[0120] 其中最小程度的弗林蛋白酶切割序列以P4-P1编号。Duckert等对弗林蛋白酶切割的38种序列的比对鉴定出容许的变异, 其取决于存在于各个位置的残基。例如, 若P4处的残基不是R, 则该残基可以通过在P2和P6处具有精氨酸或赖氨酸残基而补偿。同上, 在第109页。

[0121] 在天然PE中, 位于毒素的域II中的富含精氨酸的环中的精氨酸279和甘氨酸280之间发生弗林蛋白酶切割。下文列出PE的域II中的天然弗林蛋白酶切割序列(编号指示613个氨基酸的天然PE序列中的残基位置), 并且进行比对以显示其在上文记录的惯例下的编号:

[0122] 274-R H R Q P R G W E Q L-284(SEQ ID NO:17)

[0123] P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5'

[0124] 在本发明基础的研究中, 在位置P3和P2处做出取代以形成以下序列, 其中取代加下划线:

[0125] 274-R H R S K R G W E Q L-284(SEQ ID NO:29).

[0126] 此序列已经显示了比天然序列的切割速率快的切割速率, 并且在例示性免疫毒素中使用时对靶细胞产生与天然序列的细胞毒性大致相同的细胞毒性。

[0127] 基于这点和我们先前的研究,用于将靶向分子附着于PE域III的弗林蛋白酶切割序列可以是最小限度的弗林蛋白酶切割序列R-X-X-R或本领域中已知的或Duckert等的图1A容许的任何其它弗林蛋白酶切割序列,只要若在鉴定为P2'的位置处存在有一个残基,则它应当是色氨酸,或者若不是色氨酸,它不应是缬氨酸或丙氨酸。例如,在一些实施方案中,序列可以是RKRR(SEQ ID NO:30),RRRR(SEQ ID NO:31),RKAR(SEQ ID NO:32),SRVARS(SEQ ID NO:33),TSSRKRRFW(SEQ ID NO:34),或ASRRKARSW(SEQ ID NO:35)。

[0128] 如Duckert等中所指出的,如果通过位置P2和P6处的精氨酸或赖氨酸残基补偿,使得P2、P4和P6处的三个残基中至少两个是碱性的,那么可以在位置P4使用与R相比不太有利的残基(主要是缬氨酸)。如此,在一些实施方案中,弗林蛋白酶可切割序列是RRVKRRFW(SEQ ID NO:36),RNVVRRDW(SEQ ID NO:37),或TRAVRRRSW(SEQ ID NO:38)。位置P1处的残基可以是存在于天然序列中的精氨酸,或赖氨酸。如此,可以用赖氨酸取代例如上文所列的任何序列中的位置P1处的精氨酸。

[0129] 在一些实施方案中,弗林蛋白酶可切割序列的序列遵循PE的弗林蛋白酶切割序列的序列:R-H-R-Q-P-R-G-W-E-Q-L(SEQ ID NO:15)或天然序列的截短型式,只要它含有最小限度的弗林蛋白酶切割序列且可被弗林蛋白酶切割。如此,在一些实施方案中,弗林蛋白酶可切割序列可以是R-Q-P-R(SEQ ID NO:39),R-H-R-Q-P-R-G-W(SEQ ID NO:40),R-H-R-Q-P-R-G-W-E(SEQ ID NO:41),H-R-Q-P-R-G-W-E-Q(SEQ ID NO:42),或R-Q-P-R-G-W-E(SEQ ID NO:43)。在一些实施方案中,序列是R-H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L(SEQ ID NO:29)或此序列的截短型式,只要它含有最小限度的弗林蛋白酶切割序列且可被弗林蛋白酶切割。如此,在一些实施方案中,弗林蛋白酶可切割序列可以是R-S-K-R(SEQ ID NO:44),R-H-R-S-K-R-G-W(SEQ ID NO:45),H-R-S-K-R-G-W-E(SEQ ID NO:46),R-S-K-R-G-W-E-Q-L(SEQ ID NO:47),H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L(SEQ ID NO:48),或R-H-R-S-K-R(SEQ ID NO:49)。任何特定的弗林蛋白酶可切割序列可以通过使它进入具有SS1-LR中使用的抗体的免疫毒素中,并在间皮素+细胞系上在体外测试所得的免疫毒素来容易地测试。

[0130] 可以通过本领域中已知的方法确定任何特定的序列是否可被弗林蛋白酶切割。例如,可以通过于25°C以1:10酶:底物摩尔比将序列与弗林蛋白酶缓冲液(0.2M NaOAc (pH5.5),5mM CaCl₂)中的弗林蛋白酶一起温育16小时来测试弗林蛋白酶是否可切割序列。这些条件先前已经确立为对于弗林蛋白酶切割PE是最佳的。优选地,使用的弗林蛋白酶是人弗林蛋白酶。重组截短的人弗林蛋白酶可商购自例如New England Biolabs(Beverly, MA)。还可见Bravo等,J Biol Chem,269(14):25830-25837(1994)。PCT专利公开文本No.WO2009/032954,2009年3月12日公布)中也教导了合适的FCS,并且其通过提述并入本文,特别就其中公开的弗林蛋白酶切割序列而言。

[0131] B. 功能域III

[0132] 在结构上,域Ib理解为包含残基365-399。如本文中进一步讨论的,虽然认为PE的域III的结构边界在残基405处开始,但是功能性分析已经显示了域III需要结构域Ib的某个区段来保留ADP-核糖基化活性。因而,功能域III定义为PE的残基395-613,并且如此,优选的是本发明的毒素包含PE的残基395-613,具有下文进一步描述的某些容许的变异。缺失残基365-394中除了弗林蛋白酶切割序列中的那些残基外是期望的,因为缺失消除存在于PE分子的这些部分中的任何免疫原性表位。在本发明的PE中,弗林蛋白酶切割序列,或其截

短的或经修饰的变体在其羧基端附着于域III,两者之间已经插入3至8个独立选自甘氨酸和丝氨酸的氨基酸的柔性接头。

[0133] 在优选的实施方案中,PE分子的功能域修饰为具有用丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或谷氨酰胺替换通常存在于域III内的位置D406和Q592处的氨基酸残基的取代。位置D406和Q592处的取代可以与域III内的位置R432,R467,R490,R513,E548和K590处的丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或谷氨酰胺取代组合。另外,在一些实施方案中,至少一个与选自D403,R412,R427,E431,R458,D461,R505,E522,R538,R551,R576和L597的位置处的氨基酸残基对应的氨基酸残基用丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或谷氨酰胺取代。对各位置处的残基的取代取代域III内取代域III的氨基酸残基位置D406,R432,R467,R490,R513,E548,K590和Q592。在一些实施方案中,PE功能域III与SS1-LR/GGS/8M的PE功能域的氨基酸序列基本上相同或相同。在一些实施方案中,PE功能域III与SS1-LR/GGS/8X的PE功能域的氨基酸序列基本上相同或相同。

[0134] 应当理解,上文讨论的天然PE和变体的序列可以具有保守取代并且保留细胞毒性能力及期望地与PE的天然序列相比具有降低的抗原性。在优选的实施方案中,PE的经修饰的变体或其细胞毒性片段与感兴趣的PE功能域III,即SS1-LR/GGS/8M或SS1-LR/GGS/8M的PE功能域III在氨基酸水平上具有至少80%序列相似性,优选地至少85%序列相似性,更优选地至少90%序列同一性,且最优选地至少95%序列相似性。20011年3月17日公布且对应于2010年9月10日提交的PCT/US2010/048504的PCT公开文本No.WO/2011/032022公开了降低PE的功能域II的抗原性的合适突变。就提供功能域III的降低的免疫原性的其中公开的突变和取代及分子而言,此公布申请通过全文提述并入本文。

[0135] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。就特定的核酸序列而言,保守修饰的变体指那些编码相同或基本上相同氨基酸序列的核酸序列,或者若核酸不编码氨基酸序列,则指基本上相同的核酸序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的多肽。例如,密码子GCA,GCC,GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。如此,在丙氨酸由密码子规定的每个位置,密码子可以在不改变编码多肽的情况下改变成描述的任何相应密码子。此类核酸变异是“沉默变异”,其是一种的保守修饰变异。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述每个可能的核酸沉默变异。技术人员会认可核酸中的每个密码子(除了AUG外,AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子)可以修饰为产生功能上相同的分子。因而,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含于每个描述的序列中。

[0136] 关于氨基酸序列,技术人员会认可在编码序列中改变、添加或缺失单一氨基酸或小百分比的氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别取代、缺失或添加是“保守修饰变体”,其中改变导致氨基酸用化学相似的氨基酸取代。

[0137] 测定PE的细胞毒性或抗原性

[0138] 可以通过本领域技术人员公知的测定法对本发明中采用的假单胞菌外毒素测定期望的细胞毒性水平。如此,可以容易地对PE的细胞毒性片段及此类片段的保守修饰变体测定细胞毒性。可以通过本领域中公知的方法对大量候选PE分子同时测定细胞毒性。例如,可以对候选分子的亚组测定细胞毒性。可以将候选分子的正反应亚组继续细分,并且再次测定,直到鉴定出期望的细胞毒性片段。此类方法容许快速筛选PE的大量细胞毒性片段或保守变体。可以使用本领域中已知的任何方法,包括WO2007/016150中教导的测定法测定抗

原性。

[0139] C. 抗间皮素抗体

[0140] 嵌合分子的靶向组分特异性结合细胞表面标志物间皮素。作为嵌合分子的靶物的细胞表面抗原是本领域中公知的,并且汇总于例如Mufson,Front Biosci(2006)11:337-43;Frankel,Clin Cancer Res(2000)6:326-334及Kreitman,AAPS Journal(2006)8(3):E532-E551。可以通过靶向间皮素降低或抑制其生长、扩散和/或进展的例示性癌症包括卵巢癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、肺腺癌、输卵管癌、头和颈癌、宫颈癌和胰腺癌。在另一个优选的实施方案中,靶向模块是抗体片段,优选特异性结合细胞上的表面标志物的抗体片段。优选的抗体片段是单链Fv。在本文中,描述了基于细胞毒素的免疫毒素的构建和表征,其中细胞毒素与scFv融合。可以与毒素或细胞毒性片段融合的其他优选的抗体片段包括Fab, Fab', F(ab')₂, Fv片段,螺旋稳定化的抗体,双抗体,二硫化物稳定化的抗体,和单域抗体(例如骆驼类抗体)。针对间皮素的抗体包括SS1, SSP1, HN1, HN2, MN, K1及其变体。MORAb-009(SS1的一种人源化型式)是特别合适的抗体。

[0141] 已经显示了SS1P特异性杀死间皮素表达细胞系,并且引起小鼠中的间皮素表达肿瘤消退(Hassan,R.等,Clin Cancer Res8:3520-6(2002);Onda,M.等,Cancer Res61:5070-7(2001))。基于这些研究和合适的安全性数据,2个用SS1P进行的I期试验在国立癌症研究所(National Cancer Institute)在间皮素表达癌症患者中进行(Chowdhury,P.S.等,Proc Natl Acad Sci USA95:669-74(1998);Hassan,R.等,Proc Am Soc Clin Oncol21:29a(2002),就其中公开的SS1P主题而言,每篇通过提述并入本文)。另外,其它靶向间皮素的疗法在临床前开发中(Thomas,A.M.等,J Exp Med200:297-306(2004))。HN1和HN2是人抗间皮素抗体,其记载于例如Feng,等,Mol Cancer Ther(2009)8(5):1113-8。SS1P免疫毒素,其中已经除去供溶酶体蛋白酶用的切割簇。这些变体记载于例如Weldon等,Blood,(2009)113(16):3792-800及W02009/032954,就其中公开的抗体、FCS和功能域III而言,其通过全文提述并入本文。

[0142] 本发明的RIT包括但不限于存在有PE分子与抗体或其它靶向剂的共价连接的分子。细胞毒素与抗体或抗体片段的融合通常至抗体或抗体片段的C端。此类融合通常采用重组DNA技术实现。特定靶向剂的选择取决于要靶向的特定细胞。靶向免疫毒素的抗体可以是多克隆、单克隆、或重组抗体,诸如嵌合物或可变区片段。若抗体是非重组的,则免疫毒素必须通过抗体与毒性模块的化学缀合形成。若抗体是重组产生的,则抗体可以经由化学键合或经由重组融合与毒素连接。在重组融合中,将编码抗体的cDNA以框内方式插入质粒中,所述质粒已经含有编码毒素的cDNA。当然,也可以反之进行;可以将毒素cDNA插入携带编码抗体的cDNA的质粒中。由于免疫毒素的潜在较大的尺寸,有时期望仅将抗体片段与毒性模块连接。可以从多克隆、单克隆和嵌合抗体产生Fab、Fab'和F(ab)₂片段,然后,将它们经由化学键合与毒素连接。或者,可以产生cDNA,其中抗体的可变区与必需的框架区连接。然后,将这些较小的抗体以双链Fv抗体或者(若重链和轻链区直接或经由肽接头连接)以单链Fv抗体(scFv)分泌。特别优选的间皮素抗体及片段(其中除去供溶酶体蛋白酶用的切割簇)披露于2000年7月12日公布的PCT专利公开文本No. W0/2000/073346(其对应于2000年5月26日提交的PCT/US2009/014829),其与本发明转让给相同受让人,且特别就其中公开的抗体主题而言,其通过全文提述并入本文。

[0143] 创建scFv的一种方法是通过噬菌体展示文库进行,所述噬菌体展示文库从用免疫原免疫的小鼠的脾mRNA制成(Chowdhury等,Mol. Immunol. 34:9-20(1997))。然而,若蛋白质免疫原天然存在于哺乳动物中但在原核生物中重组表达,则该蛋白质不会具有正确的糖基化样式,并且可能没有正确的构象。由响应此免疫原的小鼠形成的抗体可能不识别天然状态的所述蛋白质。此问题的一种解决办法是用在哺乳动物细胞中制成的天然蛋白质免疫动物,但是从哺乳动物细胞纯化足够量的一些蛋白质,特别是细胞表面蛋白可能是不可能的。另一种办法(尽管不常见)是用编码免疫原的cDNA免疫动物。将合适启动子调控下的cDNA导入动物中。在加强注射后且在抗体滴度达到最大值时,将动物处死,并取出脾以创建噬菌体展示文库。通过用含有编码间皮素的DNA的质粒免疫小鼠,我们能够引发较高的抗间皮素抗体滴度。使用脾RNA和噬菌体展示技术,可以分离我们称作SS scFv的单链Fv(“scFv”),其以高亲和力结合间皮素。

[0144] 可以将用于本发明的抗间皮素抗体通过FCS氨基端与FCS连接。类似地,可以将FCS与抗体的重、轻、Fc(恒定区)或框架区直接连接。连接可以经由抗体的氨基或羧基端,或者经由内部氨基酸残基发生。本发明的多价免疫缀合物组合物中使用的抗体可以针对相同或不同间皮素表位。

[0145] 在本发明的优选实施方案中,抗间皮素抗体是重组抗体诸如scFv或二硫化物稳定化的Fv抗体。Fv抗体通常是约25kDa,且含有每条重链和轻链具有3个CDR的完整抗原结合位点。若V_H和V_L链不连续表达,则Fv抗体的链通常通过非共价相互作用保持在一起。然而,这些链趋于在稀释后解离,因此,已经开发出经由戊二醛、分子间二硫化物、或肽接头交联各条链的方法。

[0146] 在一个特别优选的实施方案中,抗体是单链Fv(scFv)。scFv抗体的V_H和V_L区构成单链,其折叠为创建与两条链分子中找到的抗原结合位点相似的抗原结合位点。一旦折叠,非共价相互作用稳定化单链抗体。在一个更优选的实施方案中,scFv是重组产生的。技术人员会认识到可以制成本发明的抗体的保守变体。scFv片段中采用的此类保守变体会保留对于V_H和V_L区之间的正确折叠和稳定化必需的至关重要的氨基酸残基。在本发明的一些实施方案中,经由轻链将scFv抗体与FCS直接连接。

[0147] 虽然一些抗体实施方案的V_H和V_L区可以直接连接在一起,但是技术人员会领会各区可以由一个或多个氨基酸组成的肽接头分开。肽接头及其用途是本领域中公知的。参见例如Huston等,Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8:5879(1988); Bird等,Science 242:4236(1988); Glockshuber等, Biochemistry 29:1362(1990); 美国专利No. 4,946,778, 美国专利No. 5,132,405及Stemmer,等, Biotechniques 14:256-265(1993),其全部通过提述并入本文。一般地,除了连接各区域或者保留它们之间的某种最小距离或其它空间关系外,肽接头不会具有特定的生物学活性。然而,肽接头的组成性氨基酸可以选择为影响分子的一些特性,诸如折叠、静电荷、或疏水性。任选地,单链Fv(scFv)抗体包括长度不超过50个氨基酸,一般不超过40个氨基酸,优选不超过30个氨基酸,且更优选不超过20个氨基酸的肽接头。在一些实施方案中,肽接头是序列Gly-Gly-Gly-Ser(SEQ ID NO:50),优选2,3,4,5,或6个此类序列的多联体。然而,应当领会,可以在接头内进行一些氨基酸取代。例如,可以用缬氨酸取代甘氨酸。

[0148] 优选地,抗体或其片段包含突变的抗体重链可变区或轻链可变区、比亲本抗体具

有高至少5倍的对抗原的结合亲和力的多肽、具有在互补决定区(CDR)中与亲本抗体相差至少一个氨基酸的氨基酸取代的序列的多肽、由包含属于选自下组的热点基序的核苷酸的密码子编码的氨基酸:AGY或RGYW,其中R是A或G,Y是C或T,且W是A或T。可以在轻链或重链可变区的CDR3中发生取代。可以在轻链或重链可变区的CDR1或CDR2中发生取代。在一些实施方案中,抗间皮素抗体是2006年7月25日公告的美国专利No.7,081,518中公开的抗体材料,就此类抗体、其核酸序列用途及制备方法而言,该专利通过提述并入本文。

[0149] 抗间皮素抗体可以包含可变重(“V_H”)链和可变轻(“V_L”)链,该V_H和V_L链各自具有第一、第二和第三互补决定区(“CDR”),其中所述重链的第一CDR(“CDR1”)、第二CDR(“CDR2”)、和第三CDR(“CDR3”)分别具有对CDR1(GYTMN;SEQ ID NO:51),CDR2(LITPYNGASSYNQKFRG;SEQ ID NO:52),和CDR3(GGYDGRGFDY;SEQ ID NO:53)显示的氨基酸残基序列,且其中所述V_L链的CDR1、2和3分别具有对CDR1(SASSSVSYM;SEQ ID NO:54)、CDR2(DTSKLAS;SEQ ID NO:55)、和CDR3(QQWSGYPLT;SEQ ID NO:56)显示的氨基酸残基序列。在一些实施方案中,轻链CDR3是经修饰的,并且具有序列QQWSKHPLT(SEQ ID NO:57),QQWSGHPLT(SEQ ID NO:58),QQWSAHPLT(SEQ ID NO:59),QQWSQIPLT(SEQ ID NO:60),QQWGFNPLT(SEQ ID NO:61),QQWGTNPLT(SEQ ID NO:62),QQWGSHPPLT(SEQ ID NO:63),QQWGFPLT(SEQ ID NO:64),QQWGDHPLT(SEQ ID NO:65),QQWSAHPLT(SEQ ID NO:66),或QQWSGYPTT(SEQ ID NO:67)。在一些实施方案中,通过接头肽GVGGSG₄SG₄S(SEQ ID NO:25)将V_H与V_L连接。在一些别的实施方案中,抗间皮素抗体是scFv,dsFv,Fab,或F(ab')₂。在又一些实施方案中,要用于RIT的抗间皮素抗体包含选自下组的CDR中至少一个氨基酸的氨基酸取代:V_L CDR1,V_L CDR2,V_H CDR1,和V_H CDR2,所述氨基酸由包含属于选自下组的热点基序的核苷酸的密码子编码:AGY或RGYW,其中R是A或G,Y是C或T,且W是A或T。

[0150] D.L1

[0151] 通过额外的接头将抗体与FCS连接,所述额外的接头优选是键或长度1至10个连续氨基酸的多肽。在一些实施方案中,此接头的长度是1,2,3,4,5,6,7,8,或9个氨基酸。在一些优选的实施方案,接头由甘氨酸和丝氨酸残基组成。在一些别的实施方案中,接头是ASGG(SEQ ID NO:19)或ASGGSGGG(SEQ ID NO:68)。在优选的实施方案中,接头形成连续的多肽链,其将抗体的羧基端与FCS的N端直接连接。

[0152] E. 柔性接头

[0153] 柔性接头将FCS与PE功能域III直接偶联。柔性接头是式(Xaa1)_n的连续肽,其中每个Xaa1独立选自甘氨酸和丝氨酸,且n是3至8。在优选的实施方案中,n是3。在一个更优选的实施方案中,接头是GGG。在另一个实施方案中,n是4,5,6,或7。在其它实施方案中,柔性接头是GGGS(SEQ ID NO:50),GGGSG(SEQ ID NO:69),GGGGSG(SEQ ID NO:70)或GGSGGS(SEQ ID NO:18)。

[0154] 将柔性接头在序列上与FCS的C端融合,并在序列上与PE的功能域III直接融合,因此形成具有FCS和功能域III的一条连续肽链。

[0155] 免疫缀合物的产生

[0156] i. 非重组方法

[0157] 在本发明的一个非重组实施方案中,使用本领域技术人员已知的许多手段将靶向分子,诸如抗体与本发明的PE分子连接。共价和非共价附接手段两者可以与本发明的PE分

子一起使用。

[0158] 用于将PE分子附接于抗体或其它靶向分子(“TM”)的规程会随TM的化学结构而有所变化。多肽通常含有多种官能团;例如羧酸(COOH),游离胺(-NH₂)或硫氢基(-SH)基团,其可用于与抗体上的合适官能团的反应,例如以导致PE分子的结合。

[0159] 或者,将抗体或其它TM衍生化以暴露或附接别的反应性官能团。衍生化可以牵涉附接多种接头分子,诸如那些可购自Pierce Chemical Company,Rockford Illinois的接头分子。

[0160] 如本文中使用的,“接头”是一种用于将TM与PE分子连接的分子。接头能够与抗体和效应器分子两者形成共价键。合适的接头是本领域技术人员公知的,并且包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头、或肽接头。在抗体和效应器分子是多肽的情况下,接头可以经其侧基(例如经由与半胱氨酸的二硫化物连接)与组成性氨基酸连接。然而,在一个优选的实施方案中,接头会与末端氨基酸的alpha碳氨基和羧基基团连接。

[0161] 在一些情况中,在免疫缀合物到达了其靶部位时期望从TM释放PE分子。因此,在这些情况中,免疫缀合物会包含在靶部位附近可切割的连接。可以通过酶促活性或者免疫缀合物在靶细胞内部或在靶部位附近经受的条件促进对接头的切割以从TM释放PE分子。在靶部位是肿瘤时,可以使用在肿瘤部位存在的条件下可切割(例如在暴露于肿瘤相关酶或酸性pH)的接头。

[0162] ii. 重组方法

[0163] 可以通过任何合适的方法(包括例如克隆合适的序列)或者通过方法(诸如Narang等,Meth.Enzymol.68:90-99(1979)的磷酸三酯方法;Brown,等,Meth.Enzymol.68:109-151(1979)的磷酸二酯方法;Beaucage,等,Tetra.Lett.22:1859-1862(1981)的二乙基亚磷酰胺方法;由Beaucage和Caruthers,Tetra.Letts.22(20):1859-1862(1981)描述的固相亚磷酰胺三酯方法,例如使用自动化合成仪进行,如记载于例如Needham-VanDevanter等Nucl.Acids Res.12:6159-6168(1984)的;及美国专利No.4,458,066的固体支持物方法)直接化学合成来制备本发明的核酸序列。化学合成产生单链寡核苷酸。这可以通过与互补序列杂交,或者使用单链作为模板通过用DNA聚合酶聚合转化成双链DNA。技术人员会认可,虽然DNA的化学合成限于约100个碱基的序列,但是更长的序列可以通过连接较短的序列获得。

[0164] 在一个优选的实施方案中,通过克隆技术制备本发明的核酸序列。合适的克隆和测序技术的例子及足以通过大量克隆练习指导技术人员的指导可参见Sambrook等,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL(第2版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory(1989)),Berger和Kimmel(编),GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES,Academic Press,Inc.,San Diego CA(1987)),或者Ausubel等(编),CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Green Publishing and Wiley-Interscience,NY(1987)。来自生物学试剂和实验设备制造商的产品信息也提供有用的信息。此类制造商包括SIGMA Chemical Company(Saint Louis,MO),R&D Systems(Minneapolis,MN),Pharmacia LKB Biotechnology(Piscataway,NJ),CLONTECH Laboratories,Inc.(Palo Alto,CA),Chem Genes Corp.,Aldrich Chemical Company(Milwaukee,WI),Glen Research,Inc.,GIBCO BRL Life Technologies,Inc.(Gaithersburg,MD),Fluka Chemica-Biochemika

Analytika(Fluka Chemie AG,Buchs,Switzerland),Invitrogen,San Diego,CA,和 Applied Biosystems(Foster City,CA),以及技术人员已知的许多其它商业来源。

[0165] 编码天然PE的核酸也可以修饰为形成本发明的免疫缀合物。通过定点诱变的修饰是本领域中公知的。可以通过体外方法扩增编码PE的核酸。扩增方法包括聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)、自身维持的序列复制系统(3SR)。极其多种克隆方法、宿主细胞和体外扩增方法是技术人员公知的。

[0166] 在一个优选的实施方案中,通过将编码抗体或选择的其它TM的cDNA插入包含编码本发明的期望PE的cDNA的载体中来制备免疫缀合物。进行插入,使得靶向剂(为了容易讨论,本文中的讨论会假设靶向剂是Fv,虽然可用其它靶向剂取代而具有相等效果)和PE在框内读取,也就是说在含有功能性Fv区和功能性PE区的一条连续多肽中。在一个特别优选的实施方案中,可以将编码本发明PE的cDNA与scFv连接,使得毒素位于scFv的羧基端。在其它优选的实施方案中,将编码本发明PE的cDNA与scFv连接,使得毒素位于scFv的氨基端。

[0167] 一旦将编码P本发明的E、抗体、或免疫缀合物的核酸分离并克隆,可以在重组工程化细胞,诸如细菌、植物、酵母、昆虫和哺乳动物细胞中表达期望的蛋白质。预期本领域技术人员了解许多可用于表达蛋白质的表达系统,包括大肠杆菌、其它细菌宿主、酵母、和各种高等真核细胞诸如COS、CHO、HeLa和骨髓瘤细胞系。不会进行尝试详细描述多种已知用于在原核生物或真核生物中表达蛋白质的方法。简言之,编码本发明的分离的蛋白质的天然或合成核酸的表达通常会通过可操作连接DNA或cDNA与启动子(其是组成性或诱导型的),接着掺入表达盒中来实现。该盒可以适合于在原核生物或真核生物中复制和整合。典型的表达盒含有转录和翻译终止子、启动序列、和可用于调节编码蛋白质的DNA表达的启动子。为了获得高水平的克隆基因表达,期望构建表达盒,其最少含有指导转录的强启动子、用于翻译启动的核糖体结合位点、和转录/翻译终止子。对于大肠杆菌,这包括启动子诸如T7, trp, lac或lambda启动子、核糖体结合位点和优选地转录终止信号。对于真核细胞,调控序列可以包含启动子和优选地源自免疫球蛋白基因,SV40,巨细胞病毒的增强子,和多腺苷酸化序列,并且可以包括剪接供体和接受序列。可以通过公知的方法,诸如氯化钙转化或电穿孔(对于大肠杆菌)和磷酸钙处理、电穿孔或脂转染(对于哺乳动物细胞)将本发明的盒转移到选择的宿主细胞中。可以通过由所述盒中含有的基因(诸如amp, gpt, neo和hyg基因)赋予的对抗生素的抗性选择由该盒转化的细胞。

[0168] 技术人员会认可可以对编码本发明的多肽(即,PE或从本发明的PE形成的免疫缀合物)的核酸进行修饰而不降低其生物学活性。可以进行一些修饰以促进靶向分子的克隆、表达或对融合蛋白的掺入。此类修饰是本领域技术人员公知的,包括例如终止密码子、为了提供启动位点而在氨基端添加的甲硫氨酸、为了创建方便定位的限制性位点而在任一末端放置的别的氨基酸、或为了帮助纯化步骤的别的氨基酸(诸如多聚His)。

[0169] 在重组方法外,本发明的免疫缀合物和PE也可以使用标准肽合成整体或部分构建。长度小于约50个氨基酸的本发明多肽的固相合成可以通过将序列的C端氨基酸附接于不溶性支持物,接着序贯添加序列中剩余的氨基酸来实现。关于固相合成的技术由Barany和Merrifield,THE PEPTIDES:ANALYSIS,SYNTHESIS,BIOLOGY.VOL.2:SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS,PART A.pp.3-284;Merrifield等J.Am.Chem.Soc.85:2149-2156(1963),及Stewart,等,SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS,2ND ED.,Pierce Chem.Co.,

Rockford, Ill. (1984) 描述。较大长度的蛋白质可以通过缩合较短片段的氨基和羧基端来合成。通过活化羧基末端(例如通过使用偶联剂N,N'-二环己基碳二亚胺进行)形成肽键的方法是技术人员已知的。

[0170] iii. 纯化

[0171] 一旦表达,可以依照本领域的标准规程纯化本发明的重组免疫缀合物和PE,所述标准规程包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析,等等(一般参见R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982))。至少约90至95%同质性的基本上纯的组成是优选的,且对于药学用途,98至99%或更多的同质性是最优选的。一旦部分纯化或(若要治疗性使用)纯化至合意的同质性,多肽应当基本上没有内毒素。

[0172] 用于从细菌诸如大肠杆菌表达单链抗体和/或重折叠成合适的活性形式(包括单链抗体)的方法是已经描述且公知的,并且可适用于本发明的抗体。参见Buchner等, Anal. Biochem. 205:263-270(1992); Pluckthun, Biotechnology 9:545(1991); Huse等, Science 246:1275(1989)及Ward等, Nature 341:544(1989),其全部通过提述并入本文。

[0173] 经常,来自大肠杆菌或其它细菌的功能性异源蛋白质从包含体分离,并且需要使用强变性剂来溶解及随后进行重折叠。在溶解步骤过程中,如本领域中公知的,必须存在还原剂以分开二硫键。具有还原剂的例示性缓冲液是:0.1M Tris pH8, 6M胍, 2mM EDTA, 0.3M DTE(二硫赤藓糖醇)。如记载于Saxena等, Biochemistry 9:5015-5021(1970)(其通过提述并入本文)的,且特别如由Buchner等, 见上文描述的,可以在还原性和氧化性形式中在存在低分子量硫醇试剂的情况下发生二硫键的再氧化。

[0174] 复性通常通过将变性且还原的蛋白质稀释(例如以100倍)到重折叠缓冲液中来实现。例示性缓冲液是0.1M Tris, pH8.0, 0.5M L-精氨酸, 8mM氧化的谷胱甘肽, 和2mM EDTA。

[0175] 作为对两条链抗体纯化方案的修改,将重链和轻链区分开溶解并还原,然后在重折叠溶液中组合。在这两种蛋白质以如下的摩尔比混合,使得不超出一种蛋白质比另一种的5倍摩尔过量时获得优选的产量。期望在完成氧化还原改组(redox-shuffling)后对重折叠溶液添加过量的氧化谷胱甘肽或其它氧化性低分子量化合物。

[0176] 2. 药物组合物和施用

[0177] 在一个方面,本发明提供了药物组合物或药物,其包含至少一种本发明的嵌合蛋白,优选靶向性毒素,和任选地药学可接受载体。可以对患者施用药物组合物或药物以治疗状况,包括但不限于恶性疾病或癌症。

[0178] a. 配制剂

[0179] 可以通过标准技术使用一种或多种生理学可接受载体或赋形剂配制本发明中使用的药物组合物或药物。合适的药用载体记载于本文中及Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins (2005)。可以配制本发明的嵌合蛋白以通过任何合适的路径施用,包括经由吸入、表面、鼻、口服、胃肠外、或直肠施用。如此,可以用注射器或其它装置通过皮内、皮下、静脉内、肌肉内、鼻内、吸入、大脑内、气管内、动脉内、腹膜内、膀胱内、胸膜内、冠状动脉内、皮下或肿瘤内注射进行药物组合物的施用。也涵盖经皮施用,吸入或气雾剂施用亦然。片剂和胶囊剂可以口服、直肠或阴道施用。

[0180] 施用的组合物通常会包含溶解于药学可接受载体,优选水性载体中的嵌合蛋白,

优选靶向性毒素的溶液。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且一般不含不需要的物质。可以通过常规的公知的灭菌技术来对这些组合物灭菌。组合物可以含有近似生理学条件需要的药学可接受辅助物质,诸如pH调节和缓冲剂、毒性调节剂,等等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠,等等。这些配制剂中的融合蛋白的浓度可以广泛变化,并且依照选择的特定施用模式和患者的需要,主要会根据流体体积、粘度、体重等进行选择。

[0181] 本发明的靶向性毒素组合物适合于胃肠外施用,包括静脉内施用或对体腔施用。

[0182] 可以配制本发明的嵌合蛋白,优选靶向性毒素以通过注射,例如通过推注或连续输注进行胃肠外施用。注射的配制剂可以在单位剂量形式中,例如在安瓿中或在多剂量容器中在添加防腐剂的情况下呈现。优选地,可注射组合物是水性等张溶液或悬液,且优选地,栓剂从脂肪乳剂或悬液制备。组合物可以是灭菌的和/或含有佐剂,诸如防腐剂、稳定剂、湿润剂或乳化剂、溶液促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。或者,活性成分可以为粉末形式,在使用前用合适的媒介物,例如无菌无热原水重构。另外,它们也可以含有其它治疗上有价值的物质。组合物可以分别依照常规的混合、粒化或涂层方法制备,并且含有约0.1至75%,优选地约1至50%的活性成分。

[0183] 本发明的靶向性毒素组合物的受控释放胃肠外配制剂可以作为植入物、油性注射液、或以颗粒系统制成。对于蛋白质投递系统的广泛概述,参见Banga,A.J.,*Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing,and Delivery Systems*,Technomic Publishing Company,Inc.,Lancaster,PA,(1995),其通过提述并入本文。颗粒系统包括微球、微粒、微囊剂、纳米胶囊(nanocapsule)、纳米球、和纳米颗粒。微囊剂含有作为中心核心的治疗性蛋白质。在微球中,治疗剂分散于整个颗粒中。小于约1 μ m的颗粒、微球、和微囊剂一般分别称为纳米颗粒、纳米球、和纳米胶囊。毛细管具有约5 μ m的直径,从而仅纳米颗粒在静脉内施用。微粒的直径通常是100 μ m左右,并且其在皮下或肌肉内施用。参见例如Kreuter J.,*Colloidal Drug Delivery Systems*,J.Kreuter编,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY,pp.219-342(1994);及Tice&Tabibi,*Treatise on Controlled Drug Delivery*,A.Kydonieus编,Marcel Dekker,Inc.New York,NY,pp.315-339(1992),这两者通过提述并入本文。

[0184] 聚合物可以用于本发明的靶向性毒素组合物的离子受控释放。用于受控药物投递的各种可降解和不可降解的聚合基质是本领域中已知的(Langer R.,*Accounts Chem.Res.*,26:537-542(1993))。例如,嵌段共聚物Polaxamer407在低温时以粘而可动的液体存在,但是于体温形成半固体凝胶。已经显示了它是一种对于重组白介素-2和脲酶的配制和持续投递有效的媒介物(Johnston等,*Pharm.Res.*,9:425-434(1992);及Pec等,*J.Parent.Sci.Tech.*,44(2):58-65(1990))。或者,羟磷灰石已经作为微载体用于蛋白质的受控释放(Ijntema等,*Int.J.Pharm.*,112:215-224(1994))。在又一个方面,脂质体用于脂质包囊药物的受控释放以及药物靶向(Betageri等,*Liposome Drug Delivery Systems*,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA(1993))。许多用于治疗性蛋白质的受控投递的其它系统是已知的。参见例如美国专利No.5,055,303;5,188,837;4,235,871;4,501,728;4,837,028;4,957,735和5,019,369;5,055,303;5,514,670;5,413,797;5,268,164;5,004,697;4,902,505;5,506,206;5,271,961;5,254,342和5,534,496,每篇通过提述

并入本文。

[0185] 适合于经皮施用的配制剂包括有效量的具有载体的本发明组合物。优选的载体包括可吸收的药理学可接受溶剂以帮助通过宿主的皮肤。例如,经皮装置为绷带形式,其包含敷层成员(backing member)、含有任选具有载体的组合物的储库、任选地在延长的时间段里以受控且预先确定的速率对宿主皮肤投递组合物的速率控制屏障、和使装置绑住皮肤的装置。也可以使用基质经皮配制剂。

[0186] 适合于表面施用(例如对皮肤和眼)的配制剂优选是本领域中公知的水性溶液、软膏剂、乳膏或凝胶。其可以含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0187] 对于口服施用,药学组合物或药物可以采取例如通过常规手段与药学可接受赋形剂一起制备的片剂或胶囊剂形式。优选的是片剂和明胶胶囊剂,其包含活性成分,即本发明的组合物,以及(a)稀释剂或填充剂,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素(例如乙基纤维素、微晶纤维素)、

[0188] 甘氨酸、果胶、聚丙烯酸酯和/或磷酸氢钙、硫酸钙,(b)滑润剂,例如硅土、滑石、硬脂酸、其镁或钙盐、金属硬脂酸盐、胶体二氧化硅、氢化植物油、玉米淀粉、苯甲酸钠、乙酸钠和/或聚乙二醇,对于片剂还有(c)粘合剂,例如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯酮和/或羟丙基甲基纤维素;若需要时(d)崩解剂,例如淀粉(例如马铃薯淀粉或淀粉钠)、乙醇酸盐(glycolate)、琼脂、海藻酸或其钠盐、或泡腾剂混合物;(e)湿润剂,例如月桂基硫酸钠,和/或(f)吸收剂、着色剂、香料和增甜剂。

[0189] 可以依照本领域中已知的方法对片剂加薄膜衣或肠溶衣。口服施用的液体制剂可以采取例如溶液、糖浆剂、或悬液的形式,或者它们可以以干产物呈现,在使用前用水或其它合适的媒介重构。可以通过常规手段用药学可接受添加剂,例如助悬剂,例如山梨糖醇糖浆剂,纤维素衍生物,或氢化食用脂肪;乳化剂,例如卵磷脂或阿拉伯树胶;非水性媒介,例如杏仁油,油性酯、乙醇、或分级植物油;和防腐剂,例如对羟基苯甲酸甲或丙酯或山梨酸制备此类液体制剂。在适当时,制剂也可以含有缓冲剂盐、芳香剂、着色剂、和/或甜味剂。在想要时,可以适当配制口服施用的制剂以提供活性组合物的受控释放。

[0190] 对于通过吸入的施用,嵌合蛋白,优选抗体和/或靶向性毒素可以以气雾剂喷雾呈现形式从加压包或喷雾器通过使用合适的推进剂方便地投递,所述推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、1,1,1,2-四氟乙烷、二氧化碳、或其它合适的气体。在加压气雾剂的情况中,可以通过提供阀以投递计量量来确定剂量单位。可以配制例如用于吸入器或吹入器的明胶的胶囊和药筒,其含有嵌合蛋白,优选抗体和/或靶向性毒素的粉末混合物和合适的粉末基质,例如乳糖或淀粉。

[0191] 组合物也可以配制为直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂,例如其含有常规的栓剂基质,例如可可油或其它甘油酯。

[0192] 此外,组合物可以配制为贮积制剂(depot preparation)。可以通过植入(例如,皮下或肌肉内)或者通过肌肉内注射施用此类长效配制剂。如此,例如可以用合适的聚合或疏水性材料(例如作为可接受油中的乳剂)或离子交换树脂,或者作为略溶性衍生物,例如作为略溶性盐配制组合物。

[0193] 在想要时,组合物可以在可以含有一个或多个含有活性成分的单位剂量形式的包装或分配器装置中呈现。该包装可以例如包含金属或塑料箔,例如泡罩包装。所述包装或分

配器装置可以伴有施用说明书。

[0194] b. 剂量

[0195] 在本发明的一个实施方案中,以治疗有效剂量对患者施用药物组合物或药物以预防、治疗或控制疾病或恶性状况,诸如癌症。以足以在患者中引发有效治疗或诊断应答的量对患者施用药物组合物或药物。有效的治疗或诊断应答是至少部分阻止或减缓疾病或恶性状况的症状或并发症的应答。足以实现这点的量定义为“治疗有效剂量”。

[0196] 施用的嵌合蛋白,优选靶向性毒素或组合物的剂量依赖于温血动物(哺乳动物)的物种、体重、年龄、个体状况、要处理区域的表面积及施用形式。剂量的大小也会由伴随在特定受试者中施用特定化合物的任何不利效应的存在、性质和程度决定。对约50至70kg的哺乳动物施用的单位剂量可以含有约5-500mg活性成分。通常,本发明的化合物的剂量是足以实现期望的效果的剂量。

[0197] 可以通过测量受试者身体中嵌合蛋白(优选靶向性毒素)积累计算最佳的剂量给药日程表。一般地,剂量是每kg体重1ng至1,000mg,并且可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次。本领域一般技术人员可以容易地确定最佳的剂量、剂量给药方法和重复率。本领域技术人员会能够确定遵循本领域中已知的公认方案和本文中的公开内容对人施用嵌合蛋白,优选靶向性毒素的最佳剂量给药。

[0198] 组合物的最佳剂量、毒素、和治疗功效可以随个别组合物的相对效力而变化,并且可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药物规程确定,例如通过测定LD₅₀(对50%群体致死的剂量)和ED₅₀(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。展现出较大治疗指数的组合物是优选的。虽然可以使用展现出毒性副作用的组合物,应当注意设计投递系统,其将此类组合物靶向至受累组织的部位以使对正常细胞的潜在损害最小化,由此降低副作用。

[0199] 从例如动物研究(例如啮齿类和猴)获得的数据可以用于配制人用的剂量范围。优选地,本发明的化合物的剂量位于包括具有很少或无毒性的ED₅₀的循环浓度范围内。剂量可以在此范围内变化,这取决于采用的剂量形式和给药途径。对于用于本发明方法的任何组合物,可最初从细胞培养测定法评估治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以实现循环血浆浓度范围,其包括如细胞培养中测定的IC₅₀(实现症状的半最大抑制的测试化合物浓度)。此类信息可以用于更精确确定可用于人的剂量。可以例如通过高效液相层析(HPLC)测量血浆中的水平。一般地,嵌合蛋白,优选靶向性毒素的剂量当量是约1ng/kg至100mg/kg(对于典型受试者)。

[0200] 静脉内施用的本发明的典型靶向性毒素组合物会是每天每名患者约0.1至10mg。可以使用每天每名患者0.1多至约100mg的剂量。用于制备可施用组合物的实际方法会是本领域技术人员已知或显而易见的,并且更为详细记载于诸如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,University of the Sciences in Philadelphia, Lippencott Williams&Wilkins(2005)的出版物。

[0201] 本文中描述的组合物的例示性剂量包括每千克受试者或样品重量毫克或微克量的组合物(例如每千克约1微克至每千克约500毫克,每千克约100微克至每千克约5毫克,或每千克约1微克至每千克约50微克)。此外,应当理解,合适的组合物剂量取决于就要实现的期望效果而言的组合物效力。在要对哺乳动物施用这些中的一种或多种组合物时,内科医

生、兽医、或研究人员可以例如首先开具相对较低的剂量,随后提高剂量,直到获得合适的响应。另外,应当理解,任何特定哺乳动物受试者的特定剂量水平会取决于多种因素,包括采用的特定组合物的活性、受试者的年龄、体重、一般健康、性别、和饮食、施用次数、给药途径、排泄率、任何药物组合、和要调制的表达或活性的程度。

[0202] 在本发明的一个实施方案中,包含本发明的嵌合蛋白,优选靶向性毒素的药物组合物或药物例如以范围为每kg受试者重量约1mg化合物(1mg/kg)至约1g/kg的日剂量施用。在另一个实施方案中,剂量是范围为约5mg/kg至约500mg/kg的剂量。在又一个实施方案中,剂量是约10mg/kg至约250mg/kg。在另一个实施方案中,剂量是约25mg/kg至约150mg/kg。优选的剂量是约10mg/kg。日剂量可以每日施用一次或者分成亚剂量,并且在多剂中施用,例如每日施用两次、三次或四次。然而,如技术人员会领会,可以以不同量且以不同次数施用本文中描述的组合物。技术人员还会领会,某些因素可以影响有效治疗受试者需要的剂量和时机,包括但不限于疾病或恶性状况的严重性、先前治疗、受试者的一般健康和/或年龄,和存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的组合物治疗受试者可以包括单一治疗,或者优选地,可以包括一系列治疗。

[0203] 在成功治疗后,可以期望使受试者经历维持疗法以防止治疗的疾病或恶性状况的复发。

[0204] c. 施用

[0205] 对于治疗性处理,可以施用本发明的组合物。在治疗性应用中,对患有疾病或恶性状况,诸如癌症的患者以足以治愈或至少部分停止疾病及其并发症的量施用组合物。足以实现这点的量定义为“治疗有效剂量”。对于此用途有效的量会取决于疾病的严重性和患者健康的一般状态。化合物的有效量是提供症状的主观减轻或根据临床医生或其他有资格的观察者的记录在客观上可鉴定的改善的量。

[0206] 尤其鉴于本文中提供的详细公开内容,有效量的确定完全在本领域技术人员的能力内。一般地,免疫缀合物的有效力的或有效的量如下确定,即首先施用低剂量或少量的免疫缀合物,然后按增量增加施用的剂量,在需要时添加第二或第三种药物,直到在处理的受试者中在最小或无毒性副作用的情况下观察到期望的效果。

[0207] 根据患者需要且耐受的剂量和频率,执行组合物的单一或多次施用。无论如何,组合物应当提供足够数量的本发明蛋白质以有效治疗患者。优选地,剂量施用一次,但是可以定期应用,直到实现治疗结果或者直到副作用使疗法的中断有正当理由。一般地,剂量足以治疗或改善疾病的症状或体征,而不对患者产生不可接受的毒性。

[0208] 为了实现期望的治疗效果,组合物可以以治疗有效日剂量施用多天。如此,在受试者中治疗本文中描述的疾病或恶性状况的组合物的治疗有效施用可以需要定期(例如每日)施用,其持续范围为三天至两周或更长的时段。通常,会将组合物施用至少连续三天,经常为至少连续五天,更经常为连续至少10,且有时连续20,30,40或更多天。虽然连续日剂量是实现治疗有效剂量的优选路径,但是即使不每日施用化合物或组合物也可以实现治疗有益效果,只要重复施用频繁至足以维持受试者中组合物的治疗有效浓度。例如,可以每隔一天、每三天、或者(若采用且受试者耐受较高的剂量范围)一周一次施用组合物。

[0209] 3. 抑制肿瘤生长的方法

[0210] 本发明的组合物以多种方式得到应用。例如,本发明的PE分子(例如作为嵌合分子

的部分)可用于(i)在携带一种或多种表面标志物的细胞中诱导凋亡,(ii)抑制携带一种或多种细胞表面标志物的细胞的不想要的生长、超增殖或存活,(iii)治疗状况,诸如癌症,和(iv)为已经形成由携带一种或多种细胞表面标志物的细胞的存在引起的疾病的哺乳动物提供疗法。

[0211] 表达间皮素作为细胞表面标志物的任何细胞或肿瘤细胞可以用于实施本发明的方法。本发明的方法可以在体外或在体内实施。在提及细胞时,应当理解此术语还包括细胞群,即超过一个细胞。

[0212] 使用组合物以在携带一种或多种细胞表面标志物的细胞中诱导凋亡

[0213] 凋亡在多细胞生物体的发育和稳态两者中发挥中心作用。“凋亡”指程序化细胞死亡,并且特征在于某些细胞特征,诸如膜起泡(blobbing)、染色质凝聚和片段化、凋亡体的形成和[阳性“TUNEL”(末端脱氧核苷酸基转移酶介导的UTP缺口端标记)染色样式。凋亡过程的后期步骤是质膜的降解,这使凋亡细胞对各种染料(例如碘化丙啶)泄漏。

[0214] 凋亡可以由多种独立的信号传导途径诱导,所述信号传导途径会聚于最终的效应器机制,其由几种死亡受体与其配体(其属于肿瘤坏死因子(TNF)受体/配体超家族)之间的多种相互作用构成。最充分表征的死亡受体是CD95(“Fas”)、TNFR1(p55)、死亡受体3(DR3或Apo3/TRAM0)、DR4和DR5(apo2-TRAIL-R2)。凋亡的最终效应器机制是活化一系列称作胱天蛋白酶的蛋白酶。这些胱天蛋白酶的活化导致对一系列至关重要的细胞蛋白质的切割及细胞死亡。

[0215] 本发明提供了用于在表达间皮素的细胞中诱导凋亡的方法。在一个方面,用于在细胞中诱导凋亡的方法包括使表达间皮素作为细胞表面标志物的细胞暴露于或接触本发明的RIT的步骤。通常,将细胞暴露于有效量的免疫缀合物或者与有效量的免疫缀合物接触,其中所述接触导致诱导凋亡。

[0216] 在本发明的另一个方面,提供了诱导在其表面上表达间皮素的肿瘤细胞经历凋亡的方法,包括对受试者施用本发明的RIT的步骤。

[0217] 使用组合物以抑制携带一种或多种细胞表面标志物的细胞的生长、超

[0218] 增殖或存活

[0219] 本发明的一个目的是提供使用本发明的组合物治疗癌症的改善的治疗策略。在本发明的一个方面,提供了用于抑制细胞的不想要的生长、超增殖或存活中至少一项的方法。此方法包括使表达间皮素作为表面标志物的细胞与有效量的本发明的PE(例如作为如本文中描述的嵌合分子的一部分)接触的步骤,其中接触步骤导致抑制细胞的不想要的生长、超增殖或存活中至少一项。在一个实施方案中,此方法包括确定细胞是否表达一种或多种细胞表面标志物,例如细胞表面受体的步骤。通常,将细胞暴露于有效量的免疫缀合物或与有效量的免疫缀合物接触,其中所述接触导致抑制细胞的不想要的生长、超增殖或存活中至少一项。

[0220] 如此,在本发明的一个方面,提供了抑制携带间皮素的细胞群的生长的方法。在一个优选的实施方案中,此方法包括步骤(a)使细胞群与依照本发明的嵌合蛋白接触。许多肿瘤形成转移。如此,在本发明的另一个方面,本发明的组合物用于预防转移的形成。此方法包括对肿瘤细胞施用本发明的组合物的步骤,其中所述施用导致转移的预防。在一个优选的实施方案中,组合物包含靶向性毒素,该靶向性毒素包含针对细胞表面抗原的抗体和本

发明的PE。通常,将细胞暴露于有效量的免疫缀合物或与有效量的免疫缀合物接触,其中所述接触导致转移的预防。其生长、扩散和/或进展可以受到抑制的例示性癌症包括卵巢癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、肺腺癌瘤和胰腺癌。

[0221] 使用组合物以治疗癌症

[0222] 本发明的方法可以在体外和在体内实施。如此,在本发明的另一个方面,提供了用于治疗患有癌性状况的受试者的方法。此方法包括对已经诊断为癌症的受试者施用治疗有效量的本发明的RIT的步骤,如本文中描述的,其中癌性状况的特征在于表达一种或多种细胞表面标志物的细胞的不想要的生长或增殖,且其中施用步骤导致受试者的治疗。通常,将细胞暴露于有效量的免疫毒素或与有效量的免疫毒素接触,其中所述接触导致受试者的治疗。

[0223] 在本发明的一个实施方案中,使用包含本发明的PE的免疫毒素来治疗患有由间皮素-CA125结合相互作用介导的癌症的受试者。其生长、扩散和/或进展至少部分由CA125/间皮素结合介导的例示性癌症包括卵巢癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、肺腺癌瘤和胰腺癌。

[0224] 任选地,用于治疗癌症的方法可以包括下列一个或多个步骤:从个体获得组织或流体的生物学样品;通过使生物学样品与针对表面标志物的抗体接触对生物学样品筛选间皮素表达或者通过检测表面标志物mRNA对生物学样品筛选表面标志物多核苷酸的表达。这可以使用本领域中已知的标准技术,例如Western印迹、Northern印迹或PCR来完成。

[0225] 使用组合物以治疗已经形成由携带一种或多种细胞表面标志物的细胞

[0226] 的存在引起的疾病的受试者

[0227] 还提供了为已经形成由优先携带或过表达间皮素的细胞的存在或异常增殖引起的疾病的哺乳动物提供疗法的方法。在一个优选的实施方案中,此方法包括对所述哺乳动物施用本发明的RIT的步骤。通常,将细胞暴露于有效量的免疫毒素或与有效量的免疫毒素接触,其中所述接触导致受试者的治疗。

[0228] 在另一个实施方案中,本发明提供了使用本发明的RIT在体外或离体消除靶细胞。例如,包含本发明的RIT的嵌合分子可以用于从培养中细胞群消除靶定细胞。如此,例如可以通过使培养物与如本文中描述的针对间皮素的嵌合分子接触对自患有表达间皮素的癌症的患者培养的细胞消除癌细胞。

[0229] 在一些例子中,靶细胞可以包含在生物学样品内。如本文中使用的,“生物学样品”指含有靶细胞和非靶细胞的生物学组织或流体样品。此类样品包括但不限于来自活组织检查的组织、血液、和血细胞(例如白细胞)。生物学样品通常获自多细胞真核生物,优选哺乳动物,诸如大鼠、小鼠、牛、犬、豚鼠、或兔,且更优选灵长类,诸如猕猴、黑猩猩、或人。最优选地,样品来自人。

[0230] 监测对用本发明的RIT处理的响应的的方法

[0231] 本发明提供了在患有可以用本发明的RIT治疗的癌症或对该癌症易感的患者中检测对肿瘤生长抑制的方法。该方法特别可用于监测使用本发明的RIT对患者施用的治疗过程。该方法可以用于监测对有症状患者的治疗性处理和对无症状患者的预防性处理两者。

[0232] 监测方法需要在施用本发明RIT的剂量前确定患者中肿瘤负荷的基线数值,并且将这与治疗后的肿瘤负荷的数值或者与不接受治疗的患者中肿瘤负荷比较。

[0233] 肿瘤负荷数值的显著降低(即,大于同一样品的重复测量中的实验误差的典型差

数,表示为距离此类测量的平均值的1个标准误差)表示阳性处理结果(即,本发明的RIT的施用已经阻断肿瘤生长的进展和/或转移)。

[0234] 在其它方法中,对对照群体或正常群体测定肿瘤负荷的对照数值(即,平均值和标准误差)(例如负荷=0)。通常,对照群体中的个体未接受先前治疗。然后,将施用本发明的RIT后测量的患者中的肿瘤负荷数值与对照数值比较。相对于对照数值的肿瘤负荷显著降低(例如,距离平均值大于1的标准误差)表示阳性处理结果。缺乏显著降低或升高表示阴性处理结果。

[0235] 在其它方法中,从已经经历接受本发明的RIT(例如如本文中描述的嵌合分子的一部分)方案的处理的对照个体群体确定肿瘤负荷的对照数值(例如平均值和标准误差)。将患者中测量的肿瘤负荷数值与对照数值比较。若患者中测量的水平与对照数值没有显著差异(例如超过1个标准误差),则可以中断处理。若患者中的肿瘤负荷水平显著高于对照数值,则药剂的继续施用是有正当的理由。

[0236] 在其它方法中,对目前没有接受治疗但是已经经历先前的治疗过程的患者监测肿瘤负荷以确定是否需要恢复治疗。可以将患者中测量的肿瘤负荷数值与在先前的治疗过程后先前在患者中实现的肿瘤负荷数值比较。肿瘤负荷相对于先前测量的显著增加(即,大于同一样品的重复测量中的误差的典型差数)指示可以恢复治疗。或者,可以将患者中测量的数值与在经历治疗过程后在患者群体中确定的对照数值(平均值加标准误差)比较。或者,可以将患者中测量的数值与仍没有疾病症状的预防性处理的患者群体,或显示疾病特征改善的治疗性处理患者群体中的对照数值比较。在所有这些情况中,肿瘤负荷相对于对照水平的增加(即,超过1个标准误差)指示应当在患者中恢复治疗。

[0237] 分析用的组织样品通常是来自患者的血液、血浆、血清、粘液、组织活组织检查、肿瘤、腹水或脑脊液。可以对样品分析瘤形成的迹象。可以使用本领域中已知的任何方法,例如有资格的病理学家对活组织检查的视觉观察,或其它显现技术,例如射线照相术、超声、磁共振成像(MRI)检测瘤形成或肿瘤负荷。

[0238] 试剂盒、容器、装置、和系统

[0239] 对于用于上文描述的诊断、研究和治疗应用,本发明还提供了试剂盒和系统。本发明的试剂盒会包含本发明的RIT,例如作为嵌合分子的一部分。另外,试剂盒和系统可以包含指导性材料,其含有关于实施本发明方法的指导(即,方案)。用法说明书可以以多种形式存在于主题试剂盒中,所述形式中的一种或多种可以存在于试剂盒中。虽然指导性材料通常包含书面或印刷材料,但是它们不限于此。本发明涵盖能够存储此类用法说明书并将它们与最终用户通信的任何介质。此类介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、盒式磁盘、芯片)、光学介质(例如CD ROM),等等。此类介质可以包括提供此类指导性材料的因特网站点的地址。

[0240] 根据试剂盒和系统的意图用户和用户的特定需要,可以依照本发明制备极其多种试剂盒、系统和组合物。

[0241] 提供了具有活性组合物的单位剂量,例如为口服、阴道、直肠、经皮、或可注射剂量(例如用于肌肉内、静脉内、或皮下注射)的试剂盒。在此类试剂盒中,在含有单位剂量的容器外还会有信息性包装插页,其描述组合物在治疗疾病或恶性状况中的用途和伴随的益处。合适的活性组合物和单位剂量是那些在上文描述的。

[0242] 虽然为了清楚和理解已经通过例示和例子相当详细地描述了前述发明,但是根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员会显而易见的是可以在不必然偏离本发明的精神和范围的前提下对其做出等同方案的某些变型、变化、修改和替代。因此,对本文中描述的实施方案进行各种修改、变化等等,本发明的范围仅通过参考其所附权利要求书确定。本领域技术人员会容易认可可以改变、变更或修改多个不重要的参数而产生基本上相似结果。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体的实施方案,而并不意图为限制性的,因为本发明的范围仅会以所附权利要求书限定。

[0243] 虽然本发明的每个要素在本文中描述为含有多个实施方案,但是应当理解,除非另有指示,本发明的给定要素的每个实施方案能够与本发明的其它要素的每个实施方案一起使用,且每个此类用途意图形成本发明的独特实施方案。

[0244] 本文中提及的参考的专利、专利申请、和科学文献(包括GenBank数据库序列的登录号)在此通过全文提述并入本文,就像每篇单独的出版物、专利或专利申请明确且单独指示通过提述并入。本文中引用的任何参考文献与本说明书的特定教导之间的任何矛盾应当有利于后者而解决。同样地,词语或短语的本领域理解的定义与本说明书中明确教导的词语或短语的定义之间的任何矛盾应当有利于后者而解决。

[0245] 如可以从上述公开内容领会,本发明具有极其多种应用。

[0246] 本发明通过以下实施例进一步例示,所述实施例仅是例示性的,而不意图以任何方式限制本发明的定义和范围。

实施例

[0247] 提供以下实施例以例示而不限要求保护的发明。

[0248] 蛋白质

[0249] 在大肠杆菌BL21(ΔDE3)中从SS1(VH)-PE和SS1(VL)的载体表达SS1P(SS1(dsFv)-PE38)和所有源自SS1P的突变体,随后,将其如描述的那样(Pastan I, Beers R和Bera TK, Methods Mol Biol., 248:503-18(2004))重折叠并纯化。SS1P的储液由Advanced BioScience Laboratories, Inc.(Kensington, MD)制备。所有其它RIT在国立癌症研究所(Bethesda, MD)的分子生物学实验室中制备。用来自Lofstrand Labs Limited(Gaithersburg, MD)的引物使用Quikchange定点诱变(Stratagene, La Jolla, CA)产生SS1P中的突变。

[0250] 细胞系

[0251] 在此研究中使用多种间皮素阳性人衍生细胞系。L55肺腺癌瘤和M30间皮瘤细胞系由宾夕法尼亚大学(Philadelphia, PA)的Steven Albelda博士提供。HAY间皮瘤细胞系由斯特林癌症研究基金会(Stehlin Foundation for Cancer Research, Houston TX)提供。OVCAR-8和A1847卵巢癌细胞系分别由国立癌症研究所(Bethesda, MD)的Hisataka Kobayashi博士和S. Aaronson博士提供。NCI-H322M肺腺癌瘤细胞系获自国立癌症研究所(Bethesda, MD)的Mitchell Ho博士。KB31细胞系是人表皮癌瘤KB细胞系的亚克隆(Akiyama S等, Somat Cell Mol Genet., 11(2):117-26(1985))。细胞系A431/K5是一种用人间皮素转染(Chowdhury PS等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 95:669-674(1998))并在Dulbecco氏改良必需培养基(DMEM)中培养的A431表皮样癌瘤细胞系的衍生物,所述Dulbecco氏改良必需培养

基(DMEM)补充有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、100U青霉素、100 μ g链霉素、和750 μ g/mL G-418(遗传霉素(geneticin))。除非另有规定,将所有细胞系于37°C以5%CO₂在RPMI-1640培养基中培养,所述RPMI-1640培养基补充有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、100U青霉素、和100 μ g链霉素(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)。

[0252] 细胞毒性测定法

[0253] 使用细胞计数试剂盒-8WST-8测定法(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)测量用免疫毒素处理的细胞系的存活力,基本上如记载于技术手册中的。简言之,将5,000至10,000个细胞/孔铺板于96孔板中,容许附着,并且以终体积0.2ml与不同浓度的RIT一起温育72小时,此后,将10 μ l CCK-8试剂添加至每孔。将板于37°C温育,直到具有450nm最大吸光度的孔达到约1个OD的数值。将数值在环己酰胺(10 μ g/ml)和缓冲液(PBS中的0.2%人血清清蛋白)对照之间标准化,并使用GraphPad PRISM程序将其拟合至标准的具有可变斜率的4参数S形方程(sigmoidal equation)以获得存在有50%细胞死亡的免疫毒素浓度(EC₅₀)。

[0254] 如描述的那样测定间皮瘤患者的细胞的存活力测定法。简言之,从间皮瘤患者的胸膜液或腹水获得细胞,并以5 $\times 10^4$ 个细胞/孔的密度在具有各种浓度的RIT SS1P、SS1-LR、BL22(抗CD22/PE38)作为阴性对照和HB21(抗转铁蛋白受体/PE38)作为阳性对照的24孔板中接种。将细胞温育96小时,固定,并用结晶紫染料染色。以595nm的波长通过Versamax微板阅读器(Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA)测定每孔的颜色强度。一式三份测定每个数值。使用GraphPad Prism软件(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)实施通过ANOVA对所得数据的统计学分析。

[0255] 小鼠异种移植瘤抗肿瘤测定法

[0256] 在第0天给24只雌性裸鼠在体侧中皮下注射A431/K5细胞,如先前描述的(Zhang Y, Clin Cancer Res., 12(15):4695-701(2006))。对于接着的6周,通过测径器定期测量肿瘤体积。在平均肿瘤大小达到约100mm³时,即在植入后5天,将小鼠分成四个6只的组,并以QODX3注射0.2-ml在PBS中的0.2%MSA(仅媒介)或含有SS1P(0.3mg/kg)或SS1-LR(6.0或15mg/kg)的媒介。若小鼠的肿瘤超出1000mm³或者在实验结束时对小鼠实施安乐死。依照得到国立癌症研究所动物护理和使用委员会(Animal Care and Use Committee of the National Cancer Institute)批准的国立健康研究所指南处理动物。

[0257] RIT内在化测定法

[0258] 将A431/K5细胞(10⁶/孔)铺板于6孔板(10cm²/细胞)中,并保持温育过夜。次日,将每孔中的培养基用1ml含有1 μ g要评估的RIT的新鲜培养基更换。将细胞于37°C温育多个时间间隔,此后,将孔用2ml冷PBS、1ml冷剥离缓冲液(0.2M甘氨酸中的1mg/ml BSA, pH2.5),并再次用2ml冷PBS短暂漂洗。随后,将细胞用200 μ l含有蛋白酶抑制剂混合物(Sigma, St. Louis, MO)的RIPA缓冲液(150mM NaCl、1mM EDTA、1%NP-40、0.5%脱氧胆酸钠、0.1%SDS、50mM Tris-Cl, pH8.0)裂解。使用兔抗PE38多克隆抗体通过非还原性Tris-甘氨酸SOS-PAGE Western印迹分析样品。

[0259] SS1-LR的可变细胞毒性

[0260] 用SS1-LR进行的初始实验证明相对于SS1P,它在选择间皮素表达细胞系上具有高度可变的细胞毒性,范围为活性大至4倍至活性小20倍。然而,一般趋向于活性较低的分子。

相对于SS1P,SS1-LR对测试的8种细胞系中的5种的活性小超过20%,且仅对单个细胞系的活性多大于20%。此趋势与LR分子的抗CD22型式HA22-LR显著不同,所述HA22-LR通常呈现细胞系和患者细胞两者的相似或升高的细胞毒性(Weldon JE,Blood.,113(16):3792-800(2009))。这些观察结果指示在表达间皮素的上皮细胞和表达CD22的B细胞中PE的中毒途径间有内在差异。

[0261] 表1:SS1-LR细胞毒性的汇总

[0262]

	EC ₅₀	(ng/ml)	
细胞系	SS1P	SS1-LR	相对活性
L55	5.32	4.66	1.14
NCI-H322M	0.63	1.80	0.35
HAY	4.79	1.05	4.56
KB31	0.47	9.34	0.05
M30	2.56	3.23	0.79
A431/K5	0.17	0.72	0.24
OVACR-8	1.40	4.13	0.34
A1847	4.59	4.70	0.98

[0263] 体外SS1-LR活性

[0264] 免疫毒素SS1P(图1A)由与PE38连接的经二硫化物稳定化的两链抗间皮素SS1Fv组成(Chowdhury PS等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,95:669-674(1998);Chowdhury PS和Pastan I.,Nat Biotechnol.,17:568-572(1999);Reiter Y和Pastan I.,Clin.Cancer Res.,2:245-252(1996))。我们将LR mutation(Weldon JE,Blood.,113(16):3792-800(2009);PE Δ 251-273& Δ 285-394)引入SS1P中以创建SS1-LR变体(图1B),并且与SS1P相比在体外评估其针对几种间皮素表达细胞系的活性。图2显示了来自8种不同细胞系的代表性细胞毒性测定法。

[0265] 肺癌细胞系L55(A)显示对两种RIT的相似敏感性。相比之下,肺癌系NCI-H322M(Pa1 LH等,Nat Med.,2(3):350-3(1996))对SS1-LR比对SS1P的敏感性小约3倍。间皮瘤细胞系HAY(G)对SS1-LR比对SS1P的敏感性大至4倍,但是M30间皮瘤系(D)对SS1-LR的敏感性小约20%。与SS1P相比,A431/K5细胞系(H),即一种用间皮素稳定转染的上皮系(Chowdhury PS等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,95:669-674(1998);Chang K和Pastan I.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,93,136-140(1996))对SS1-LR的敏感性小约4倍。另外,宫颈癌系KB31(C)对SS1P的杀伤易感,但是相对于SS1-LR,其EC₅₀小20倍。还评估了卵巢癌细胞系A1847(F)和OVCAR-8(E)对SS1-LR的敏感性。SS1-LR显示了对A1847系与SS1P相似的EC₅₀,但对OVCAR-8系降低2倍的EC₅₀。表I汇总了此数据,并且呈现比较SS1P和SS1-LR的相对EC₅₀值。SS1-LR相对于SS1P的活性在不同细胞系间广泛变化。

[0266] 在分析数据时,我们注意到SS1-LR不能将我们评估的多种细胞系的存活力(NCI-H322M,KB31,M30,OVCAR-8,和A1847)完全降低到对照水平,所述水平通过用10μg/ml环己酰胺处理的细胞所定义。这提示一细胞亚群可对SS1P敏感,但是对SS1-LR有抗性。我们通过将OVCAR-8和A1847细胞与10ng/ml SS1-LR一起温育4天,并尝试培养任何存活的细胞来评估

这种可能性。在RIT处理后没有观察到进一步的细胞生长。我们得出结论,即虽然通过我们的测定法没有获得完全代谢抑制,但是这些细胞系中没有对SS1-LR有抗性的亚群。

[0267] 体内SS1-LR活性

[0268] 接着,我们使用小鼠异种移植物肿瘤模型评估SS1-LR的效力。我们在体外测试的细胞系中,仅A431/K5在我们的异种移植物模型中一致生长。以6.0或15mg/kg的剂量用SS1-LR以QODX3(每隔一天达三剂)静脉内处理具有平均值为约100mm³的A431/K5异种移植物肿瘤的裸鼠。为了比较,用缓冲液(PBS中的0.2%HSA)或0.3mg/kg SS1P(在此剂量给药日程表下最大耐受剂量的SS1P)以QODX3静脉内处理别的组。植入后定期测量每只小鼠的肿瘤大小达22天(图3)。

[0269] 经PBS处理的小鼠的肿瘤在植入后第14天快速生长至大于1000mm³的平均大小。第5天、第7天和第9天用0.3mg/kg SS1P处理的小鼠显示肿瘤消退,其在第12天使平均肿瘤大小恢复到约53mm³的最小值。到第20天,所有肿瘤恢复快速生长。6.0mg/kg剂量的SS1-LR比0.3mg/kg SS1P的效力略小。用6.0mg/kg SS1-LR处理的小鼠中的肿瘤在第7天和第9天达到92mm³的平均最小大小,并且到第18天全部恢复快速生长。15mg/kg剂量的SS1-LR比0.3mg/kg SS1P呈现显著更好的抗肿瘤活性。用15mg/kg SS1-LR处理的小鼠中的肿瘤消退至17mm³的平均最小大小。在第22天,6个肿瘤中的4个已经恢复生长,1个肿瘤从第18天起在10mm³未改变,并且1个肿瘤在第15天后检测不到。虽然在此模型中,SS1-LR比SS1P的活性小约20倍,但是其较低的非特异性毒性容许我们以高剂量处理小鼠,并且实现卓越的抗肿瘤效果。

[0270] 对内在化RIT的加工

[0271] SS1P和SS1-LR之间的胞内运输和加工的差异可能造成我们在两种RIT间观察到的活性变化。为了测试此假设,我们通过Western印迹在A431/K5细胞中检查SS1P和SS1-LR的内在化和加工(图4)。选择A431/K5细胞,因为它们表达高水平的间皮素(约106个位点/细胞),并内在化大量RIT以供显现。我们对通过1μg/ml SS1P或SS1-LR连续温育多个时间间隔处理的A431/K5细胞的全细胞裂解物实施非还原性SOS-PAGE Western印迹。图4A显示SS1P处理的时间过程,而图4B显示SS1-LR处理的时间过程。

[0272] 如预期的,用SS1P或SS1-LR处理的A431/K5细胞在指示两种RIT的全长(分别为62-kDa和50-kDa)和还原性(分别为51-kDa和39-kDa)形式的位置处具有显著条带。这两种RIT在Fv区中含有三个二硫键:V_H和V_L片段中各一个链内键,以及V_H和V_L之间的一个链间键(图1)。SS1P在域II中在弗林蛋白酶切割位点侧翼的半胱氨酸残基(Cys²⁶⁵和Cys²⁸⁷)之间含有额外的二硫键。SS1P中的该额外的二硫键的氧化状态似乎改变SS1P在SOS-PAGE中的迁移,这引起观察到的双重线(图4A,还原性)。这些条带在用还原剂处理时瓦解成单一条带(数据未显示)。

[0273] 我们还预期观察到与SS1P和SS1-LR的C端弗林蛋白酶切割片段(分别为34-kDa和24-kDa)对应的条带。来自经SS1P处理的细胞的裂解物显示34-kDa附近的显著条带,指示弗林蛋白酶切割片段。比较而言,来自经SS1-LR处理的细胞的裂解物仅显示与24-kDa对应的较弱条带。用ImageQuant软件(GE Healthcare)量化每个条带的强度。图4C显示了在每个时间点时弗林蛋白酶切割的片段占总条带强度的百分比。弗林蛋白酶切割的SS1P达到占有所有条带强度总和的略超过30%的最大值,而SS1-LR达到占有总强度的6%的最大值。在每个时间点时,在经切割的SS1P和经切割的SS1-LR的比例之间有大于5倍的差异,这提示SS1-LR可以以

没有SS1P有效的方式被弗林蛋白酶加工。

[0274] 柔性接头突变体

[0275] 由于我们的数据提示SS1-LR以没有SS1P有效的方式被弗林蛋白酶加工,我们设法通过提高其弗林蛋白酶切割效率来增强SS1-LR的活性。我们设计几种突变体来探索对弗林蛋白酶切割位点的改变是否可以通过改善胞内弗林蛋白酶切割的效率来增强SS1-LR的活性。我们的策略是通过添加短的非结构化Gly/Ser接头来提高弗林蛋白酶切割位点的柔性,如此提高其对弗林蛋白酶的可接近性。SS1-LR/GGS(图1B)包括11个残基的弗林蛋白酶切割位点C端末端的Gly-Gly-Ser接头,并且对NCIH322M和KB31细胞系两者都具有增强的活性(图5)。增加接头(SS1-LR/GGSx2;图1B)的长度没有进一步增强活性(数据未显示)。具有额外接头区的弗林蛋白酶切割位点的重复(SS1-2x弗林蛋白酶;图1B)也不能使活性增强得超出SS1-LR/GGS的活性(数据未显示)。与SS1-LR不同,所有延伸的接头突变体呈现与环己酰胺对照等同的完全代谢抑制。另外,为了确认弗林蛋白酶切割的重要性,我们制备了突变体SS1-LR/GGS R279G,其包括使弗林蛋白酶不能切割位点的R279G突变。此突变体针对NCI-H322M和KB31细胞两者是完全无活性的(图5),这证明了弗林蛋白酶切割对于活性的必要性。

[0276] 然后,我们测试我们的如下假设,即GGS接头增强SS1-LR的弗林蛋白酶切割效率。然而,对用SS1-LR/GGS处理的A431/K5细胞的Western印迹分析没有显示切割的相对于总的RIT的比例的改善(数据未显示)。同样地,弗林蛋白酶对SS1-LR/GGS的体外切割没有显示弗林蛋白酶切割率的改善(数据未显示)。这些结果指示SS1-LR/GGS的改善的细胞毒性不是由于增强的弗林蛋白酶切割所致,而且取而代之是不同机制的结果。可能的解释包括胞内运输过程中毒素的移位增强。

[0277] 对患者细胞的活性

[0278] 虽然此研究正在进行,但是域III中的一系列的8处点突变设计为通过消除已知的B细胞表位来降低PE在用RIT处理的患者中的免疫原性(Onda M等,提交供PNAS发表)。这些突变(D406A,R432G,R467A,R490A,R513A,E548S,Q592A,和K590S)没有影响RIT的活性,而是取而代之降低蛋白质的免疫原性。我们将这8处突变引入SS1-LR/GGS中,制成称作SS1-LR/GGS/8M的新变体,并且针对从间皮瘤患者的胸膜液或腹水采集的原代细胞测试其细胞毒性。从患者采集的流体含有细胞的混合物(它们不都是恶性的),并且它们没有均一地表达间皮素。如此,该测定法提供了相对活性的良好评估,但是仅是绝对细胞毒性的粗略估值。在早期传代时用多个浓度的SS1P或SS1-LR/GGS/8M处理细胞,并在4天后如描述的那样通过结晶紫测定法评估存活力。在评估对SS1P响应的几种患者细胞中,2种(NCI-M-02和NCI-M-03)显示对处理的良好响应(在100ng/ml剂量水平时存活力降低大于65%)。我们评估SS1P-LR/GGS/8M对这两种群体的活性,并将其与SS1P活性比较。数据在图6中以占未处理对照数值的分数数值呈现。

[0279] 患者细胞NCI-M-02和NCI-M-03两者对用SS1P或SS1-LR/GGS/8M处理敏感,在100ng/ml或更低的剂量相对于未处理的对照显示存活力降低大于60%。NCI-M-02和NCI-M-03对1.0和10ng/ml剂量水平的SS1-LR/GGS/8M特别灵敏,证明在与这些浓度的SS1P相比时显著更高的细胞毒性($p < 0.05$)。作为对照,还用RIT BL22和HB21处理患者细胞(数据未显示)。BL22(其靶向B细胞特异性标志物CD22)在100ng/ml的剂量对任一细胞群体的存活力没

有影响。HB21(其靶向遍在的转铁蛋白受体,并且已知对几乎所有细胞极端有活性)在10ng/ml的剂量将这两种细胞系的存活力降低几乎90%。总体上,数据显示了SS1-LR/GGS/8M与SS1P相比对两种不同患者细胞群体具有相似或更好的细胞毒性。我们得出结论,即两种抗间皮素免疫毒素虽然不相同运行,但是具有相当的细胞毒性活性。

[0280] 实施例2

[0281] 此外,延伸关于构建、评估和对比SS1-LR/GGS/8M(一种具有改善的治疗特性的SS1P变体)的报告。如上文讨论的,SS1-LR/GGS/8M掺入先前显示改善RIT的突变,以及增强其活性的新突变。SS1-LR是SS1P的截短变体,其含有通过11个残基的PE弗林蛋白酶切割位点相连接的PE催化片段和SS1Fv。对7种细胞系评估SS1-LR的细胞毒性,并且发现其基本上低于SS1P。在培养的细胞中进一步分析SS1-LR指示它在中毒途径过程被弗林蛋白酶较差地加工。为了改善弗林蛋白酶切割,我们将3个残基的接头引入SS1-LR中,创建SS1-LR/GGS。SS1-LR/GGS对细胞系的活性显著更多,但是没有显示增强的弗林蛋白酶切割。我们将8处点突变引入SS1-LR/GGS的催化片段中,已经显示这通过消除B细胞表位降低RIT免疫原性。此新RIT,即SS1-LR/GGS/8M在本文中显示卓越的抗肿瘤活性、在啮齿类中的低非特异性毒性、和降低的与抗SS1P人血清的反应性。此外,间皮瘤患者的原代细胞显示相对于SS1P对SS1-LR/GGS/8M的增强的响应。SS1-LR/GGS/8M由于其低抗原性、低非特异性毒性、和高活性而是一种用于临床开发的卓越治疗性候选物。

[0282] 在本研究中使用几种间皮素阳性人衍生细胞系。一般如实施例1中提供的那样获得并培养这些细胞。

[0283] 细胞毒性测定法

[0284] 使用细胞计数试剂盒-8WST-8测定法(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)测量用免疫毒素处理的细胞系的存活力。将细胞(2,000个细胞/孔)铺板于96孔板中,保持过夜以粘附,并且以终体积0.2ml与不同浓度的RIT一起温育72小时,在温育期结束时,将10 μ l CCK-8试剂添加至每孔,并将板于37°C温育,直到具有450nm最大吸光度的孔达到约1个OD的数值。将数值在环己酰胺(10 μ g/ml)和缓冲液(含有0.2%人血清清蛋白(HSA)的没有Ca和Mg的Dulbecco氏磷酸盐缓冲盐水(D-PBS; Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD))对照之间标准化,然后,使用GraphPad PRISM软件(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)拟合至具有可变斜率(对于坪(plateau)、基线、和Hill斜率)的S形方程。随后,使用该方程来内插将细胞存活力降低至50%水平的RIT浓度(EC50)。

[0285] 将间皮瘤患者的细胞培养,并评估其对SS1P和SS1-LR/GGS/8M的响应,基本上如描述的(Xiang X,等,PLoS One2011;6:e14640.)。使用D-PBS和10ng/ml HB21(抗转铁蛋白受体/PE40)作为细胞死亡的阴性和阳性对照。一式三份评估每种条件。使用GraphPad Prism软件实施通过ANOVA对所得数据的统计学分析。

[0286] 小鼠异种移植瘤抗肿瘤测定法

[0287] 在第0天给28只雌性裸鼠在体侧在皮下注射具有4mg/ml基质胶(BD Biosciences, San Jose, CA)的0.2ml RPMI中的5x10⁶个L55细胞。对于接着的30天,通过测径器定期测量肿瘤体积。植入后7天(约100mm³平均肿瘤),将小鼠分成相等的四组,并在7、9、和12天静脉内注射0.2-ml在D-PBS中的0.2%HAS(媒介)或含有SS1P(0.4mg/kg)或SS1-LR/GGS/8M(0.4或2.5mg/kg)的媒介。此实验及所有后续动物实验依照得到国立癌症研究所动物护理和使用

委员会批准的国立健康研究所指南处理。

[0288] 小鼠血清药动学

[0289] 给9只雌性Balb/c小鼠的组静脉内注射0.2ml具有0.2%HAS的D-PBS中的10 μ g SS1P或SS1-LR/GGS/8M。以2和20、5和30、或10和60分钟的时间间隔给3只小鼠的组放血。如先前描述的那样(Bang S,等,Clin Cancer Res2005;11:1545-50.25)),通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)分析血清。

[0290] 大鼠毛细管渗漏测定法

[0291] 使用先前描述的RIT诱发的毛细管渗漏综合征的大鼠模型(Siegall CB,等,Proc Natl Acad Sci USA1994;91:9514-8.)来评估SS1-LR/GGS/8M的非特异性毒性。简言之,给6至8周龄雌性Wistar Furthand Rowett,nu/nu(无胸腺)大鼠(Harlan-Sprague-Dawley)静脉内注射D-PBS、SS1P(0.2或0.3mg/kg)、或SS1-LR/GGS/8M(6或12mg/kg)。在24小时后,通过暴露于CO₂对大鼠实施安乐死。通过将尸体以背躺着放置,除去腹胸壁,并使用3-ml注射器和27.5号针抽吸流体从被实施安乐死的动物收集胸腔积液流体。将几只大鼠的肺取出,在10%福尔马林中固定3天,切片,并染色。

[0292] 基本上如上文描述的那样实施RIT内在化测定法,使用兔抗PE38多克隆抗体通过非还原性western印迹分析样品。

[0293] 抗原性测定法

[0294] 基本上如描述的那样(Onda M,等,Proc Natl Acad Sci USA2011;108:5742-7)分析SS1P或SS1-LR/GGS/8M对患者血清中的抗体的结合,只是CD22-rFc和HA22用于通过ELISA检测PE特异性抗体。

[0295] 结果

[0296] 体外SS1-LR测定法

[0297] 免疫毒素SS1P(图1)是与PE38连接的二硫化物稳定化的两链抗间皮素SS1Fv。我们将LR突变((Weldon JE,等Blood2009;113:3792-800);PE Δ 251-273和 Δ 285-394)引入SS1P中以创建SS1-LR,并在体外对7种间皮素表达细胞系评估其活性。表2以平均EC₅₀值和平均值的标准误差汇总了来自至少3个分开的细胞毒性实验的数据。与SS1P相比,SS1-LR对HAY细胞系的活性更大,但是对剩余的系的活性更小。SS1-LR的活性在不同细胞系间广泛变化,但是它对卵巢癌系的活性最小。

[0298] 表2

[0299]

细胞系	起源的 癌症	EC ₅₀ ± SEM (ng/ml)				
		SS1P	SS1-LR	SS1-LR/GGS	SS1-LR/GGS/8M	SS1-LR/GGS R279G
HAY	间皮瘤	2.24 ± 0.21	0.52 ± 0.07	0.10 ± 0.04	0.22 ± 0.02	>1000
M30	间皮瘤	0.57 ± 0.07	3.70 ± 0.85	0.93 ± 0.18	1.46 ± 0.20	>1000
NCI-H322M	肺腺癌	0.30 ± 0.07	1.65 ± 0.23	0.18 ± 0.05	0.42 ± 0.09	>1000
L55	肺腺癌	2.89 ± 0.43	6.67 ± 1.27	1.08 ± 0.17	1.73 ± 0.31	>1000

[0300]

OVCAR-8	卵巢癌	0.84 ± 0.21	49.1 ± 37.9	2.84 ± 1.43	14.4 ± 8.78	>1000
A1847	卵巢癌	1.01 ± 0.21	27.0 ± 8.70	2.73 ± 0.79	17.7 ± 7.13	>1000
A431/K5	表皮样 癌瘤	0.044 ± 0.005	0.561 ± 0.198	0.199 ± 0.033	0.194 ± 0.038	15.12 ± 3.625

[0301] SS1-LR/GGS/8M

[0302] 免疫原性仍然是基于PE的RIT的一项重大问题(Weldon JE,等,FEBS J.2011Dec; 278(23):4683-700)。虽然比较HA22-LR与HA22的工作(Hansen JK,等,J Immunother2010; 33:297-304))使我们预期SS1-LR会比SS1P的免疫原性小,但是PE的剩余元件会快速引发中和性抗体。为了消除PE中的免疫原性B细胞表位,最近已经设计域III中的一系列的8处点突变(Onda M,等,Proc Natl Acad Sci USA2011;108:5742-7.)。这些突变(D406A,R432G,R467A,R490A,R513A,E548S,Q592A,和K590S)显著降低HA22-LR在小鼠中的免疫原性,但是没有极大地降低其细胞毒性。我们将所述突变掺入SS1-LR/GGS中,制成称作SS1-LR/GGS/8M的新变体,并且针对7只间皮素表达细胞系测试RIT。在表2中报告了来自这些实验的EC50值。SS1-LR/GGS/8M比SS1-LR更具活性,且有时比SS1P(HAY,L55)更具活性,但是比SS1-LR/GGS活性小。活性的降低对卵巢癌系是特别明显的。

[0303] 非特异性毒性

[0304] 在用抗CD22RIT HA22的先前工作中,我们发现了单一静脉内剂量2mg/kg HA22对于小鼠是致命的,而一剂20mg/kg HA22-LR没有显示毒性(Weldon JE,等,Blood2009;113:3792-800)。我们从此对小鼠给予高达45mg/kg的单剂HA22-LR而不引起死亡(未发表的观察结果,数据未显示),并且我们预期来自SS1-LR及其变体的相似性能。先前的实验将SS1P的单剂静脉内LD50确定为1.0mg/kg(在Balb/C小鼠中)(Filpula D,等,Bioconjug Chem2007; 18:773-84)和0.75mg/kg(在NIH Swiss小鼠中)(Onda M.,等,Cancer Res2001;61:5070-

7)。使用与临床日程表相似的QODx3(每隔一天施用三次)剂量给药日程表,小鼠已经耐受最大剂量0.4mg/kg SS1P(未发表的观察结果,数据未显示),但是给予SS1-LR的小鼠已经以QODx3接受多至15mg/kg的剂量而没有毒性(数据未显示)。

[0305] 虽然基于LR的RIT在小鼠中降低的非特异性毒性是令人感兴趣的,但是它可能与临床试验中观察到的主要毒性无关。小鼠中的RIT非特异性毒性是肝损伤的结果(Weldon JE,等,Blood2009;113:3792-800;Onda M,等,J Immunol.2000;165:7150-6),其在患者中通常观察不到。非特异性毒性的更相关的动物模型是大鼠中的RIT诱发的毛细管渗漏综合征(Siegall CB,等,Proc Natl Acad Sci USA1994;91:9514-8.,Siegall CB,等,Clin Cancer Res1997;3:339-45)。毛细管渗漏综合征(其中流体从血液渗漏到间隙空间中)是一种在基于PE的RIT的临床试验中观察到的常见毒性。使用此模型,我们观察到用2mg/kg SS1P静脉内处理的大鼠在24小时后似乎是生病的;它们具有用力呼吸和流体在其胸腔中的积累(图7A)。将SS1P剂量增加至3mg/kg增加胸液的体积。比较而言,用D-PBS或SS1-LR/GGS/8M处理的大鼠没有显示疾病体征,并且没有保留流体。施用剂量6mg/kg和12mg/kg SS1-LR/GGS/8M而没有可观察到的效应。在将用D-PBS、SS1P、和SS1-LR/GGS/8M处理的大鼠的肺固定并染色时,那些用D-PBS或SS1-LR/GGS/8M处理的大鼠的肺显示正常,而那些来自用SS1P处理的大鼠的肺显示严重损伤的体征(图7B)。虽然尚未在临床上测试基于LR的分子,但是此观察结果加强如下的命题,即基于LR的RIT在患者中可以具有降低的毒性。

[0306] 体内SS1-LR/GGS/8M活性

[0307] 接着,我们使用L55肺癌细胞系用小鼠异种移植物肿瘤模型在体内评估SS1-LR/GGS/8M的效力。在第7天、第9天和第12天以剂量0.4和2.5mg/kg用SS1-LR/GGS/8M静脉内处理一组7只具有平均值为约100mm³的肿瘤的裸鼠。为了比较,按同一日程表用媒介(D-PBS中的0.2%HSA)或0.4mg/kg SS1P(此剂量给药日程表下SS1P的最大耐受剂量)静脉内处理其它组。对于植入后30天,定期测量每只小鼠的肿瘤大小(图7C)。

[0308] 经媒介处理的小鼠的肿瘤在植入后第16天生长至平均大小约500mm³。用0.4mg/kg SS1P处理的小鼠显示肿瘤生长的短暂延迟,其要求肿瘤直到植入后第23天达到大小约500mm³。我们在用0.4mg/kg SS1-LR/GGS/8M处理的小鼠中观察到几乎相同的响应,这提示在此模型中SS1P和SS1-LR/GGS/8M相当。虽然SS1P由于其非特异性毒性而不能以比0.4mg/kg高的剂量按此日程表对小鼠施用,但是可以在没有不良作用的情况下以高得多的剂量给小鼠给予SS1-LR/GGS/8M。在此肿瘤模型中测试高约6倍的剂量的SS1-LR/GGS/8M(2.5mg/kg)。我们在此组小鼠(其肿瘤在第9天达到最小大小约73mm³)中观察到显著的(使用成对两尾t检验,p<0.01)肿瘤消退。此组小鼠也经历增强的肿瘤生长抑制,在植入后第30天达到大小约500mm³。

[0309] 虽然SS1-LR/GGS/8M在小鼠L55异种移植物肿瘤模型中具有与SS1P等同的活性,它在体外对L55细胞相对于SS1P呈现增强的活性。此活性差异可以通过两种分子间小鼠血清半衰期的差异解释。在小鼠中比较HA22-LR(约51kDa)与HA22(约63kDa)的半衰期的先前工作(Weldon JE,等,Blood2009;113:3792-800.)显示了HA22-LR比HA22具有几乎短2倍的半衰期(分别为7.8和14.6小时)。我们假设此差异是由于较小分子的肾过滤升高所致,且我们在比较SS1-LR/GGS/8M(约50kDa)与SS1P(约63kDa)时预期相似的结果。与对于SS1P为19分钟半衰期相比,对从用SS1-LR/GGS/8M注射的小鼠采集的血清样品的分析显示13分钟的半

衰期(图7D)。我们得出结论,即SS1-LR/GGS/8M和SS1P之间的半衰期差异造成体外和体内的两种分子间相对活性差异。

[0310] SS1-LR/GGS/8M的抗原性

[0311] 基于用RIT HA22进行的先前研究(Onda M,等,Proc Natl Acad Sci USA2011;108:5742-7),我们预期SS1-LR/GGS/8M中的突变会从SS1P除去B细胞表位。为了评估此命题,我们比较SS1P和SS1-LR/GGS/8M与来自5名患者的血清的反应性,所述患者已经响应用SS1P处理而形成中和性抗体。最初,将患者血清与SS1P或SS1-LR/GGS/8M混合。随后,使用ICC-ELISA检测血清中未结合的PE38特异性抗体(Onda M,等,Proc Natl Acad Sci USA2011;108:5742-7)。通过这些数据,确定ELISA信号降低50%的SS1P和SS1-LR/GGS/8M浓度(IC₅₀)。如先前报告的(Onda M,等,J Immunol2006;177:8822-34),IC₅₀值与抗体-抗原相互作用的亲和力相关联。在图8中相对于SS1-LR/GGS/8M将SS1P的IC₅₀值以百分比绘图。对于所有患者血清,SS1P与SS1-LR/GGS/8M IC₅₀值的比率实质上低于10%,指示血清中主要部分的SS1P反应性抗体与SS1-LR/GGS/8M无反应性。

[0312] 对患者细胞的活性

[0313] 为了补充我们在体外和在体内对细胞系的SS1-LR/GGS/8M评估,我们针对从间皮瘤患者的胸膜液或腹水获得并且在培养中维持几代的原代细胞进一步测试其活性。由于从患者采集的流体含有细胞混合物,测定法提供良好的相对活性评估,但是仅是绝对细胞毒性的大致估值。用多个浓度的SS1P处理来自另外两名患者的细胞,并使用结晶紫测定法在4天后评估其存活力。早期传代间皮瘤患者细胞NCI-M-16和NCI-M-19显示对用SS1P处理的明显响应(在100ng/ml剂量水平,存活力降低大于75%)。我们在这两个额外的患者衍生细胞群评估SS1P-LR/GGS/8M的活性。数据在图9中以D-PBS(100%能活的)和10ng/ml抗转铁蛋白受体/PE40RIT HB21(0%生存的)的对照处理之间标准化的分数数值呈现。所有患者细胞群对用SS1P-LR/GGS/8M处理极端敏感,证明比SS1P显著增强的细胞毒性。

[0314] SS1P是一种基于假单胞菌外毒素A的抗间皮素重组免疫毒素,其目前在临床开发中,用于治疗间皮瘤,但是具有治疗多种表达间皮素的实体瘤的潜力。在临床试验中,SS1P已经实现适度但鼓舞人心的结果。然而,其效力受限于剂量限制性毒性及患者中中和性抗体的快速生成。在这里,我们报告了SS1-LR/GGS/8M,即一种具有低抗原性的SS1P变体具有卓越的活性,以及在啮齿类中明显降低的非特异性毒性。

[0315] SS1-LR/GGS/8M是作为一种高度有活性的、毒性较小的、且抗原性较小的基于PE的抗间皮素RIT SS1P变体。我们对SS1-LR的初始评估显示在体外对选择的间皮素表达细胞系的高度可变的但一般较低的活性(表1和2)。当探索了其相对于SS1P的低活性的原因时,我们研究了SS1-LR的内在化和加工,并且发现了经弗林蛋白酶切割的SS1-LR的比例在用两种RIT处理的细胞中比SS1P的比例低得多。这提示降低的弗林蛋白酶切割可能限制SS1-LR的活性,并且我们设计并产生几种突变体以测试此假设。在弗林蛋白酶切割位点后添加短的Gly-Gly-Ser接头没有增强弗林蛋白酶切割,但是的确增强SS1-LR对细胞系的活性。通过组合SS1-LR与GGS接头和已经显示降低PE的免疫原性的额外的8处点突变,我们生成了我们最终的分子SS1-LR/GGS/8M。与SS1P相比,SS1-LR/GGS/8M呈现在大鼠毛细血管渗漏模型中极大地降低的非特异性毒性、增强的针对患者细胞的细胞毒性、和降低的与患者血清中的抗体的反应性。用SS1-LR进行的初始实验证明相对于SS1P对细胞系的可变细胞毒性。然而,主要

趋向于活性较小的分子。SS1-LR对HAY系活性大,且对其它六种系活性小。此趋势与LR分子的抗CD22型式HA22-LR(其呈现对大多数细胞系和患者细胞的相似或增强的细胞毒性(Weldon JE,等,Blood2009;113:3792-800))明显不同。此差异提示PE靶向上皮细胞上的间皮素和PE靶向B细胞上的CD22的中毒途径之间存在有内在差异。

[0316] 关于相对于SS1P一般降低的SS1-LR活性,此差异的一种可能的解释是胞内中毒途径的差异。PE38的LR变体在PE的域II和Ib中含有广泛的缺失,并且这些缺失可以已经负面影响PE运输至胞质溶胶的能力。我们在用SS1P和SS1-LR处理的A431/K5细胞的裂解物中检测全长和经加工的PE的实验显示经弗林蛋白酶加工的RIT量的显著差异。在经SS1P处理的细胞中占总体的较大部分的RIT是经加工的,但是仅占总体的小部分的RIT在经SS1-LR处理的细胞中是切割的。此结果提示了较差的弗林蛋白酶切割可能限制SS1-LR的活性,并且我们着手改善PE中毒途径的此步骤。

[0317] 通过将柔性接头附加到SS1-LR弗林蛋白酶位点,我们产生更具活性的RIT,但是我们未能呈现增强的弗林蛋白酶切割。添加短Gly-Gly-Ser接头(SS1-LR/GGS,图1)、较长的接头(SS1-LR/GGSx2,图1)、或侧翼有短Gly-Gly-Ser接头的弗林蛋白酶位点重复(SS1-LR/2x弗林蛋白酶,图1)均造成适度的细胞毒性升高。然而,这些分子无一增强经处理的A431/K5细胞中弗林蛋白酶切割的SS1-LR的比例或者在体外增加弗林蛋白酶切割率(数据未显示)。我们得出结论,即接头的添加必须经由另一种机制增强细胞毒性,该机制可能涉及胞内运输或增强的毒素稳定性,并且我们继续探索这些可能性。我们的实验还证明弗林蛋白酶切割在SS1P的细胞毒性中的必要性。SS1-LR/GGS中将对于切割必需的精氨酸改变为甘氨酸的点突变(SS1-LR/GGS R279G,图1)产生弗林蛋白酶无法切割的蛋白质。此RIT对所有细胞显示极端差的活性,在120 μ g/ml的浓度对测试的7种细胞系中的6中具有可忽略的活性。不可切割的突变体仅对A431/K5细胞显示低于1 μ g/ml的EC50(表2),但是其活性仍然严重受损。另外,此细胞系中高得不自然的间皮素表达不能代表那些天然表达间皮素的系。最近已经对弗林蛋白酶切割在PE中毒途径中的必要性提出质疑(Morlon-Guyot J,等,Infect Immun2009;77:3090-9),但是存在大量证据证明弗林蛋白酶在中毒期间发挥重要的作用(Ornatowski W,等;J Clin Invest2007;117:3489-97;Shiryaev SA,等,J Biol Chem2007;282:20847-53;Sarac MS,等,Infect Immun2002;70:7136-9;Chiron MF,等,J Biol Chem1997;272:31707-11;Gu M,等,Infect Immun1996;64:524-7;Inocencio NM,等,J Biol Chem1994;269:31831-5;及Moehring JM,等,J Biol Chem1993;18:2590-4)。在这里提出的情况中,PE中毒在没有适合于弗林蛋白酶加工的位点的情况下一般失败。

[0318] 我们的实验室最近已经产生由于消除B细胞表位而具有极低的免疫原性的RIT,即HA22-LR-8M(Onda M,等,Proc Natl Acad Sci USA2011;108:5742-7)。HA22-LR-8M含有PE的LR变体缺失和域III中额外的8处点突变。将这些突变置于SS1P中,生成SS1-LR/GGS/8M。由于对RIT的大量免疫应答导向PE,我们预期SS1-LR/GGS/8M展现出相似降低的免疫原性。为了确认SS1-LR/GGS/8M确实从SS1P除去人B细胞表位,我们检查SS1-LR/GGS/8M与来自患者的血清的反应性,所述患者在经历用SS1P治疗期间形成中和性抗体。在我们测试的5例病例中,与SS1P相比,SS1-LR/GGS/8M显示显著降低的抗原性。此结果与HA22和HA22-LR/8M的观察结果(Onda M,等,Proc Natl Acad Sci USA2011;108:5742-7)一致,并且指示我们已经在基于PE的RIT中鉴定并除去许多免疫原性表位。

[0319] 在几种细胞系、小鼠肿瘤模型、和来自间皮瘤患者的原代细胞中评估SS1-LR/GGS/8M的细胞毒性。相对于SS1P, SS1-LR/GGS/8M在肺癌和间皮瘤细胞系中表明卓越的细胞毒性, 但是对卵巢癌系的活性较差。此结果是想不到的, 因为卵巢系对SS1-LR/GGS敏感, 并且指示PE催化域中的8处点突变可以干扰SS1-LR/GGS/8M的活性。在小鼠肿瘤模型中, L55异种移植物肿瘤类似地响应SS1-LR/GGS/8M和SS1P, 尽管可以施用较高剂量的SS1-LR/GGS/8M以增强抗肿瘤效果。最后, 在针对来自间皮瘤患者的原代恶性细胞测试时, SS1-LR/GGS/8M比SS1P展现出明显增强的细胞毒性。总体上, 我们对SS1-LR/GGS/8M的评估显示卓越的细胞毒性活性。

[0320] 在高活性和低抗原性外, 相对于SS1P, SS1-LR/GGS/8M显示降低的非特异性毒性。RIT诱导的毛细管渗漏综合征的大鼠模型有效呈现此差异。用PBS处理的大鼠和用SS1-LR/GGS/8M处理的大鼠之间没有显著差异, 而用SS1P处理的大鼠在肺中形成使大鼠衰弱的流体积累。当流体从毛细管渗漏时发生毛细管渗漏综合征(又称作血管渗漏综合征), 导致血清清蛋白下降、流体滞留、水肿、和重量增加。此毒性经常在用多种免疫毒素(包括那些基于PE的免疫毒素)处理的患者中观察到, 并且推测源自脱靶内皮细胞损伤。限制RIT的非靶向性毒性可以通过容许安全施用较高剂量来潜在增强其效力。与这里描述的其它实验一起, 此实验提示了SS1-LR/GGS/8M会是用于临床的卓越候选物。SS1-LR/GGS/8M的低抗原性、低非特异性毒性和高细胞毒性对于抗间皮素RIT的未来开发是高度有希望的。

[0321] 应当理解, 本文中描述的例子和实施方案仅为了例示目的, 并且鉴于其的各种修改或变化对于本领域技术人员会是提示性的, 并且应当包括在本申请的精神和范围及所附权利要求书的范围内。本文中引用的所有登录号、出版物、专利和专利申请在此通过全文提述并入本文以供所有目的。

序列表

<110> Pastan, Ira H.
Weldon, John
Hasan, Raffit

<120> 靶向间皮素的重组免疫毒素

<130> 77867-803685

<140> US 尚未转让

<141> 尚未转让

<160> 73

<170> 用于 Windows 第 4.0 版的 FastSEQ

<210> 1

<211> 613

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<220>

<223> 天然假单胞菌外毒素 A (PE)

<400> 1

[0001]

```

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

```

```

                275                280                285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290                295                300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305                310                315                320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
                325                330                335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
                340                345                350
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
                355                360                365
Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
370                375                380
Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
385                390                395                400
Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
                405                410                415
Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
                420                425                430
Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
                435                440                445
Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
450                455                460
Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
465                470                475                480
Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
                485                490                495
Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
                500                505                510
Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
                515                520                525
[0002] Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
530                535                540
Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
545                550                555                560
Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
                565                570                575
Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
                580                585                590
Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
                595                600                605
Arg Glu Asp Leu Lys
610

<210> 2
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有降低的免疫原性的合成假单胞菌外毒素 A

<220>
<221> 变体
<222> (1)...(230)
<223> Xaa = Gly, Ala 或 Ser

<400> 2
Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu
1 5 10 15
Phe Leu Gly Asp Gly Gly Xaa Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
20 25 30

```



```

Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
   35                               40                               45
Xaa Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
   50                               55                               60
Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
   65                               70                               75                               80
Ala Ile Trp Xaa Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
   85                               90                               95
Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Xaa Gly Arg Ile Arg Asn
  100                               105                               110
Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
  115                               120                               125
Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
  130                               135                               140
Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
  145                               150                               155                               160
Gly Pro Glu Glu Xaa Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
  165                               170                               175
Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
  180                               185                               190
Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Xaa Glu
  195                               200                               205
Xaa Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
  210                               215                               220
Pro Arg Glu Asp Leu Lys
  225                               230

```

<210> 3

<211> 233

<212> PRT

[0003]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的经修饰的假单胞菌外毒素 A

PE-LR/GGS/8M

<400> 3

```

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr
   5                               10                               15
Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg
  20                               25                               30
Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
  35                               40                               45
Leu Glu Glu Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
  50                               55                               60
Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
  65                               70                               75                               80
Asp Leu Asp Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
  85                               90                               95
Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg
  100                               105                               110
Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
  115                               120                               125
Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
  130                               135                               140
Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
  145                               150                               155                               160
Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
  165                               170                               175
Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
  180                               185                               190
Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro

```

```

          195                200                205
Asp Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
    210                215                220
Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
    225                230

```

```

<210> 4
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 合成的经修饰的假单胞菌外毒素 A
      PE-LR/FL/8X

```

```

<220>
<221> 变体
<222> (12)...(14)
<223> Xaa = Gly 或 Ser

```

```

<220>
<221> 变体
<222> (15)...(19)
<223> Xaa = Gly 或 Ser, 可以存在或缺乏

```

```

<220>
<221> 变体
<222> (20)...(230)
<223> Xaa = Gly, Ala 或 Ser

```

[0004]

```

<400> 4
Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
  1          5          10          15
Xaa Xaa Xaa Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Xaa Val
    20          25          30
Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
    35          40          45
Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Xaa Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
    50          55          60
His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
    65          70          75          80
Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Xaa Gly Phe Tyr Ile
    85          90          95
Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
   100          105          110
Asp Ala Xaa Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
   115          120          125
Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr Leu Ala
   130          135          140
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
   145          150          155          160
Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Xaa Gly Gly Arg
   165          170          175
Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
   180          185          190
Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
   195          200          205
Pro Ser Ser Ile Pro Asp Xaa Glu Xaa Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
   210          215          220
Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
   225          230          235

```

<210> 5
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的经修饰的假单胞菌外毒素 A
 PE-LR/FL/8M

<220>
 <221> 变体
 <222> (12)...(14)
 <223> Xaa = Gly 或 Ser

<220>
 <221> 变体
 <222> (15)...(19)
 <223> Xaa = Gly 或 Ser, 可以存在或缺乏

[0005] <400> 5
 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val
 20 25 30
 Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 35 40 45
 Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 50 55 60
 His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile
 85 90 95
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 100 105 110
 Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 115 120 125
 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 130 135 140
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg
 165 170 175
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
 180 185 190
 Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
 210 215 220
 Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 225 230 235

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗间皮素单克隆抗体 SS1
 可变轻链 (VL)

```

<400> 6
Met Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 1           5           10           15
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
          20           25           30
Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
          35           40           45
Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala
          65           70           75           80
Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

```

<210> 7
<211> 355
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体 SS1
      可变重链 (VH)

```

```

[0006] <400> 7
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1           5           10           15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
          20           25           30
Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
          35           40           45
Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
          50           55           60
Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
          65           70           75           80
Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
          85           90           95
Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys
          115          120

```

```

<210> 8
<211> 358
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
      重组免疫毒素 SS1-LR/GGS/8M 可变重链 (VH-PE)

```

```

<400> 8
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1           5           10           15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
          20           25           30
Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
          35           40           45
Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
          50           55           60
Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

```

65 70 75 80
 Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Arg His Arg
 115 120 125
 Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr Gly Ala Glu
 130 135 140
 Phe Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
 145 150 155 160
 Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
 165 170 175
 Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
 180 185 190
 Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
 195 200 205
 Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
 260 265 270
 Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
 275 280 285
 Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
 290 295 300
 Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
 305 310 315 320
 Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu
 325 330 335
 Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
 340 345 350
 Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 355

[0007]

<210> 9

<211> 358

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体

重组免疫毒素 SSL-LR/GGS/8X 可变重链 (VH-PE)

<400> 9

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60
 Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

```

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Arg His Arg
      115      120      125
Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser Pro Thr Gly Ala Glu
      130      135      140
Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
145      150      155      160
Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
      165      170      175
Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
      180      185      190
Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
195      200      205
Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
210      215      220
Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn
225      230      235      240
Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
      245      250      255
Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
      260      265      270
Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
      275      280      285
Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
290      295      300
Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
305      310      315      320
Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu
      325      330      335
Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
      340      345      350
Pro Arg Glu Asp Leu Lys
355

```

[0008]

```

<210> 10
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体 SS1
      可变轻链 (V-L)

<400> 10
atggacatcg agctcactca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 60
accatgacct gcagtgcag ctcaagtgt agttacatgc actggtacca gcagaagtca 120
ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaac tggcttctgg agtcccaggt 180
cgcttcagtg gcagtgggtc tggaaactct tactctctca caatcagcag cgtggaggct 240
gaagatgatg caacttatta ctgccagcag tgggtccaagc accctctcac gttcgggttc 300
gggacaaagt tggaaataaa ataa 324

<210> 11
<211> 1068
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
      重组免疫毒素 SS1-LR 可变重链 (VH-PE)

<400> 11
atgcaggtae aactgcagca gtctgggcct gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatcctgca aggcacatgg ttactcattc actggtacac ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattgaa agtgccctga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180

```

```

tacaaccaga agttcagggg caaggeccaca ttaactgtag acaagtcato cagcacagcc 240
tacatggacc tctcagttct gacatctgaa gactctgcag tctattttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggaggggttt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca ccgtcaacca cgcggttggg aacagctgcc aaccggtgcc 420
gagttcctgg gcgacggggg cgatgtgtcc tttagcaccg gtggtacca gaactggacg 480
gtagagggcc tgctgcaggg acatcgtcag ctggaagagg gtggtatgt attcgttggc 540
taaccaggga cttttctgga agcagctcag tccatcgtgt ttggtggtgt ccgtgcccgt 600
tctcaagacc tggatgcgat ttggcgtggg ttctacattg caggcgatcc agcgtggcca 660
taeggttatg cgcaggacca ggaaccggat gctcgggtgc gcattcgtaa tgggtgcgtg 720
ctgcgcgtat atgtgcgcg ttccagcctg ccgggttctt accgcactag cctgaccctg 780
gcgcgcgcgg aggcgcgcgg tgaagtggaa cgtctgattg gtcactctct gcctctgcgc 840
ctggatgcca tcaccggccc agaggaggag ggcggtcgtc tggaaaccat tctgggctgg 900
ccgctggctg aacgtacggg cgttattccg agcgcgatto ctaccgatcc tcgtaacggt 960
ggcggcgcatc tggaccatc ttctattcca gataaggagg aggcaatctc ccgctgcgcg 1020
gattatgcaa gccaacggg taaaccacct cgtgaagatc tgaaataa 1068

```

<210> 12

<211> 1077

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体

重组免疫毒素 SS1-LR/GGS/8M 可变重链 (VH-PE)

<400> 12

```

atgcaggtae aactgcagca gtctgggctt gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatcttcca aggcattctg ttactcatte actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattgaa agtgccctga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggeccaca ttaactgtag acaagtcato cagcacagcc 240
tacatggacc tctcagttct gacatctgaa gactctgcag tctattttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggaggggttt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca tcgccagccg cgcggttggg aacaactggg tggaaagccc 420
actggcgcgg agttcctcgg cgacgggggc gcagtcagct tcagcacccg cggcaccgag 480
aactggacgg tggagcggct gctccaggcg caccggccaa tggaggaggg cggctatgtg 540
ttcgtcggct accacggcac cttctctgaa gcggcgcaaa gcactgtctt cggcgggggtg 600
cgcgcgcgca gccaggacct cgacgcgata tgggcgggtt tctatatcgc cggcgatccg 660
gcgctggcct accgttacgc ccaggaccag gaaccgcagc cagccggccg tatccgcaac 720
ggtgcctctg tcggggtcta tgtgcgcgc tcagacctgc cgggcttcta cggcaccagc 780
ctgaccctgg ccgcgcgcga ggcggcgggc gaggtcgaa ggctgatcgg ccatccgtcg 840
ccgctgcgcc tggacgccat caccggcccc gagagtcag gcgggcgcct ggagaccatt 900
ctcggctggc cgtcggcga gcgcacgtg gtgattcctt cggcgatccc caccgaccgg 960
cgcaacgtcg gcggcgacct cgaccgtcc agcatcccgc acagcgaagc agcgatcagc 1020
gccttgcggg actacgccag ccagccgggc aaaccggcgc gcgaggacct gaagtaa 1077

```

<210> 13

<211> 1068

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体

重组免疫毒素 SS1-LR/8M 可变重链 (VH-PE)

<400> 13

```

atgcaggtae aactgcagca gtctgggctt gagctggaga agcctggcgc ttcagtgaag 60
atatcttcca aggcattctg ttactcatte actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 120
agtcattgaa agtgccctga gtggattgga cttattactc cttacaatgg tgcttctagc 180
tacaaccaga agttcagggg caaggeccaca ttaactgtag acaagtcato cagcacagcc 240
tacatggacc tctcagttct gacatctgaa gactctgcag tctattttctg tgcaaggggg 300
ggttacgacg ggaggggttt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctctca 360
aaagcttccg gaggtcgtca tcgccagccg cgcggttggg aacaactgcc cactggcgcg 420
gagttcctcg gcgacggggg cgcagtcagc ttcagcaccg gcggcagcca gaactggacg 480

```

```

gtggagcggc tgcctcaggc gcaccgccaa ctggaggagg gcggtatgt gttcgtggc 540
taccacggca ccttcctega agcggcgcaa agcatcgtct tcggcggggt gcgcgcggc 600
agccaggacc tcagcgcgat ctgggcgggt ttctatatcg ccggcgatcc ggcgctggcc 660
tacggctaag ccaggaacca ggaacccgac gcagccggcc gtatccgcaa cggtgccctg 720
ctgcgggtct atgtgcggcg ctgcagcctg ccgggcttct acgccaccag cctgaccctg 780
gcgcgcggcg aggcggcggg cgaggtcgaa cggctgatcg gccatecgct gcgcgtggc 840
ctggacgcca tcaccggccc cgaggagtca ggcgggcgcc tggagaccat tctcggctgg 900
ccgctggccg agcgacccgt ggtgattccc tcggcgatcc ccaccgacc gcgcaacgtc 960
ggcgcgaccc tcgacccgtc cagcatcccc gacagcgaag cagcgatcag cgcctgcgc 1020
gactacgcca gccagcccg ccaaccgccc cgcgaggacc tgaagtaa 1068

```

<210> 14

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗间皮素 Fv 抗体(SS scFv)

<400> 14

[0010]

```

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

```

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>天然 PE 的合成的 C 端残基

<400> 15

Arg Glu Asp Leu Lys

	1	5
	<210> 16 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成的规范内质网保留信号 <400> 16 Lys Asp Glu Leu 1	
	<210> 17 <211> 11 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成的弗林蛋白酶切割位点 (FCS) <400> 17 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu 1 5 10	
[0011]	<210> 18 <211> 6 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成的柔性接头 (FL) <400> 18 Gly Gly Ser Gly Gly Ser 1 5	
	<210> 19 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成的短肽接头 <400> 19 Ala Ser Gly Gly 1	
	<210> 20 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> SS1-LR 的合成的短肽接头和弗林蛋白酶切割位点	

<400> 20
Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10 15

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SS1-LR/GGS 的合成短肽接头和弗林蛋白酶切割位点

<400> 21
Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly
1 5 10 15
Gly Ser

<210> 22
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SS1-LR/GGSx2 的合成短肽接头和弗林蛋白酶切割位点

<400> 22
Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
1 5 10 15
[0012] Glu Gln Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SS1-LR/2x 弗林蛋白酶的合成短肽接头和弗林蛋白酶切割位点

<400> 23
Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly
1 5 10 15
Gly Ser Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SS1-LR/GGS R279G 的合成短肽接头和弗林蛋白酶切割位点

<400> 24
Ala Ser Gly Gly Arg His Arg Gln Pro Gly Gly Trp Glu Gln Leu Gly
1 5 10 15
Gly Ser

[0013]

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 scFv 接头肽

<400> 25
Gly Val Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的羧基端内质网保留信号

<400> 26
Arg Glu Asp Leu
1

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PE 的合成突变末端残基

<400> 27
Arg Glu Glu Leu
1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PE 的合成突变末端残基

<400> 28
Arg Asp Glu Leu
1

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的取代的弗林蛋白酶切割位点

<400> 29

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的最小限度弗林蛋白酶切割位点

<400> 30
Arg Lys Lys Arg
1

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的最小限度弗林蛋白酶切割位点

<400> 31
Arg Arg Arg Arg
1

[0014]

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的最小限度弗林蛋白酶切割位点

<400> 32
Arg Lys Ala Arg
1

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 33
Ser Arg Val Ala Arg Ser
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 34

Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 35

Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp
1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 36

Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp
1 5

[0015]

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 37

Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 38

Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp
1 5

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 39
Arg Gln Pro Arg
1

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 40
Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 41
[0016] Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 42
His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 43
Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5

<210> 44

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 44
Arg Ser Lys Arg
1

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 45
Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017] <220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 46
His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 47
Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 48
His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

[0018]

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的弗林蛋白酶切割位点

<400> 49
Arg His Arg Ser Lys Arg
1 5

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 scFv 肽接头

<400> 50
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变重链 CDR1

<400> 51
Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变重链 CDR2

<400> 52
Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
 可变重链 CDR3

<400> 53
Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
 可变轻链 CDR1

<400> 54
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0019] <220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
 可变轻链 CDR2

<400> 55
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
 可变轻链 CDR3

<400> 56
Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
 可变轻链 CDR3

<400> 57
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 58
Gln Gln Trp Ser Gly His Pro Leu Thr
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 59
Gln Gln Trp Ser Ala His Pro Leu Thr
1 5

[0020]

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 60
Gln Gln Trp Ser Gln Ile Pro Leu Thr
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 61
Gln Gln Trp Gly Phe Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 62

[0021]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 62
Gln Gln Trp Gly Thr Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 63
Gln Gln Trp Gly Ser His Pro Leu Thr
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 64
Gln Gln Trp Gly Asp Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 65
Gln Gln Trp Gly Asp His Pro Leu Thr
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 66
Gln Gln Trp Ser Ala His Pro Leu Thr
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
可变轻链 CDR3

<400> 67
Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Thr Thr
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 连接抗体的羧基端与弗林蛋白酶切割位点的 N 端的合成接头

[0022] <400> 68
Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的柔性接头

<400> 69
Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的柔性接头

<400> 70
Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 71

<211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的柔性接头 (FL)

<400> 71
 Gly Ser Gly Gly
 1

<210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的柔性接头 (FL)

<400> 72
 Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 73
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0023]

<220>
 <223> 合成的柔性接头 (FL)

<400> 73
 Gly Gly Ser Gly
 1

<210> 74
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的抗间皮素单克隆抗体
 重组免疫毒素 SS1-LR 可变重链 (VH-PE)

<400> 74
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60
 Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Arg His Arg
 115 120 125
 Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly
 130 135 140
 Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr
 145 150 155 160
 Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr
 165 170 175
 Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile
 180 185 190
 Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp
 195 200 205
 Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala
 210 215 220
 Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr
 245 250 255
 Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu
 260 265 270
 Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu
 275 280 285
 Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu
 290 295 300
 Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile
 325 330 335
 Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu
 340 345 350
 Asp Leu Lys
 355

[0024]

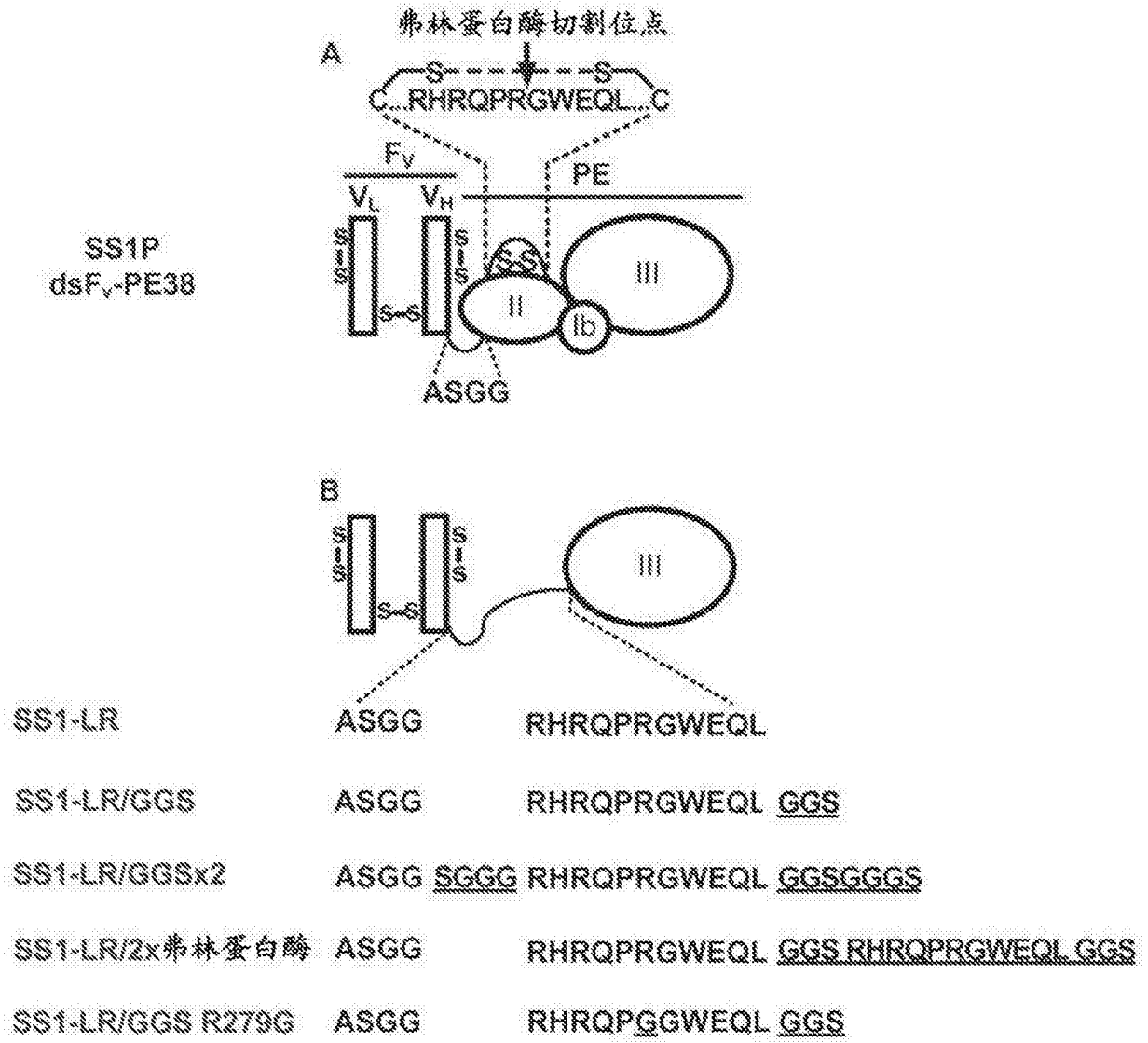


图1

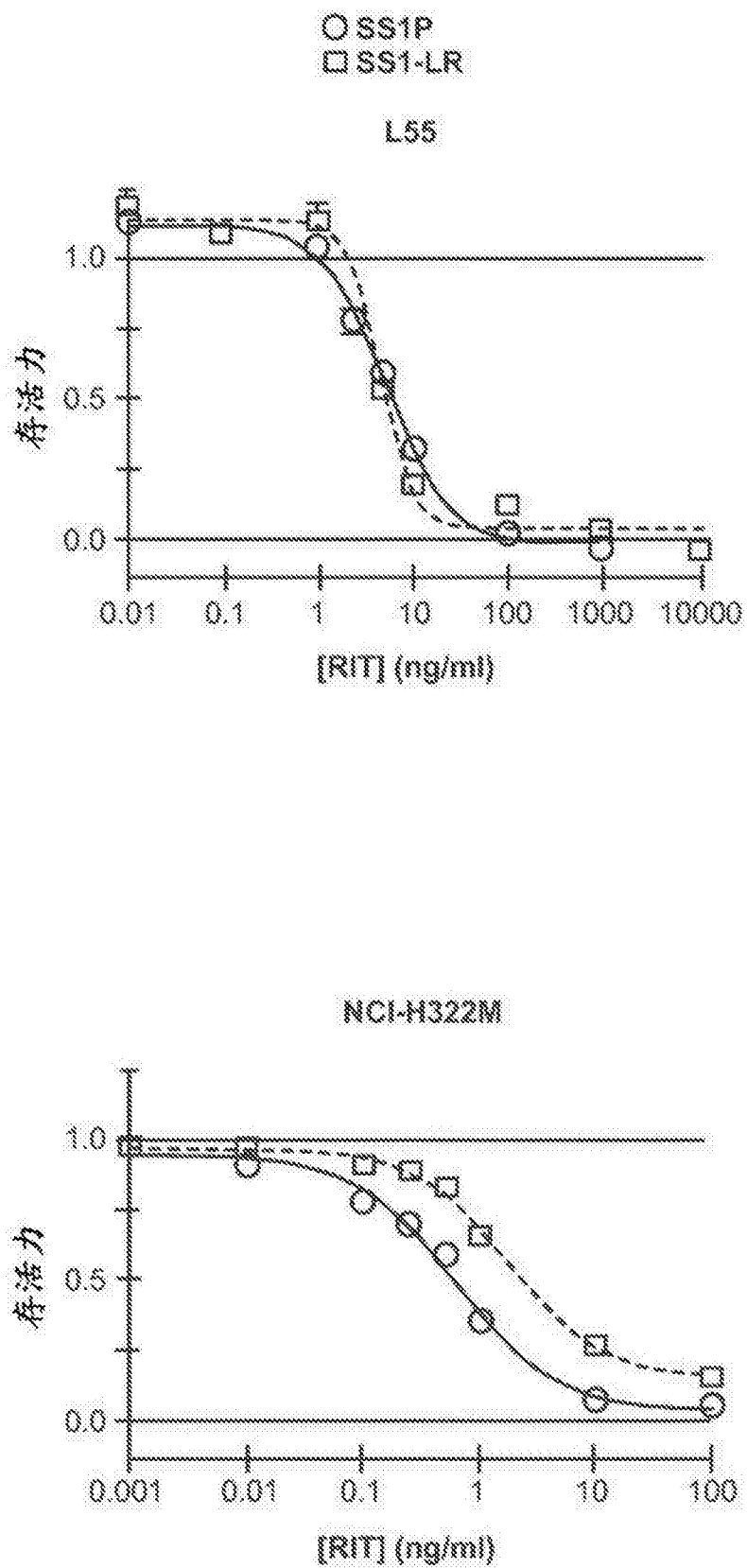


图2

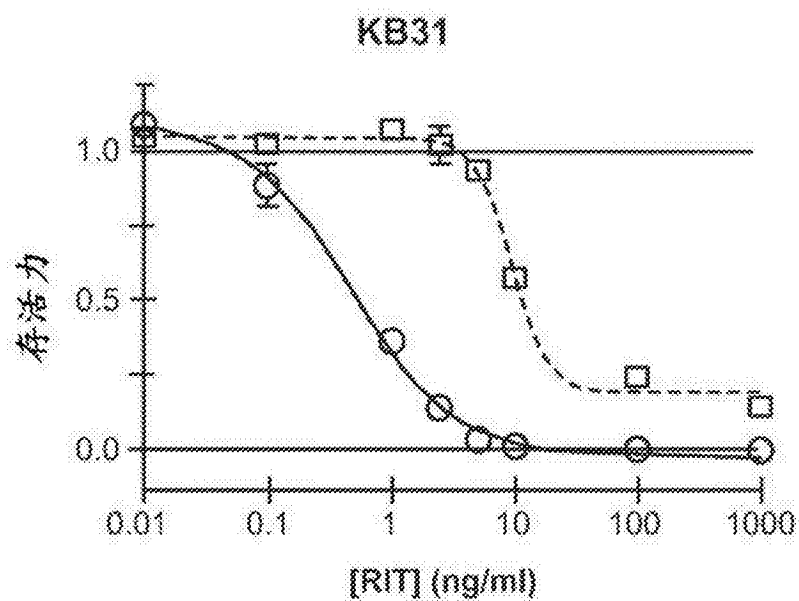
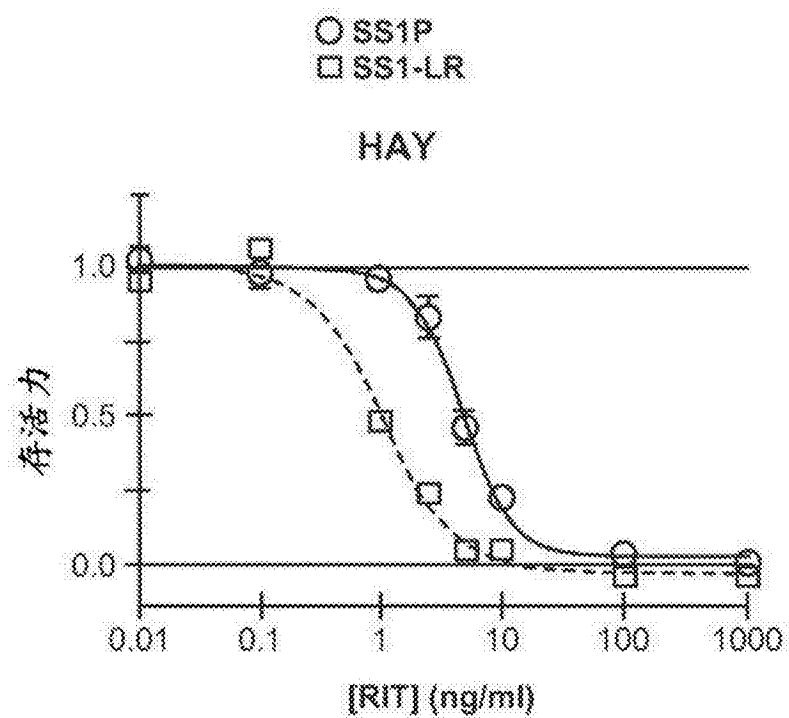


图2(续)

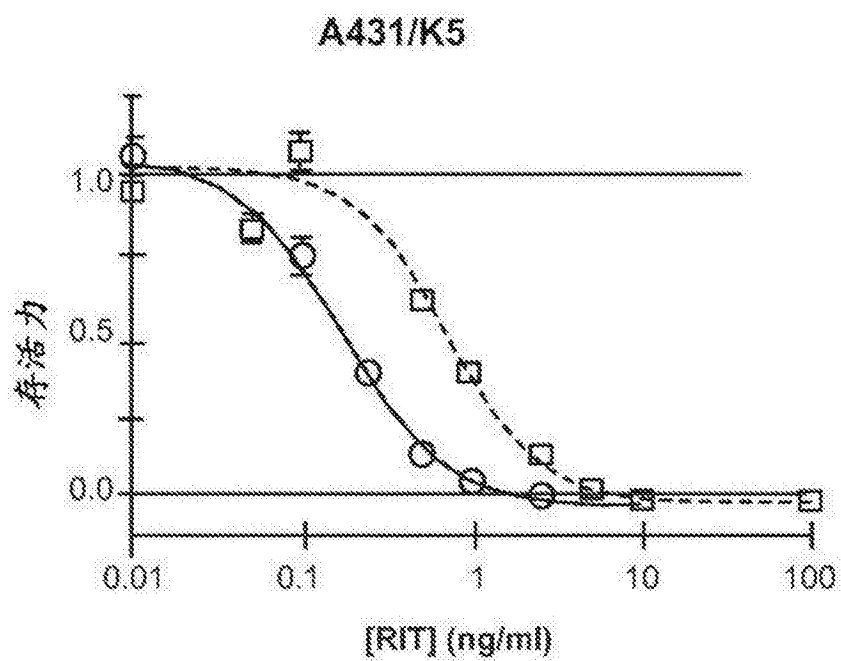
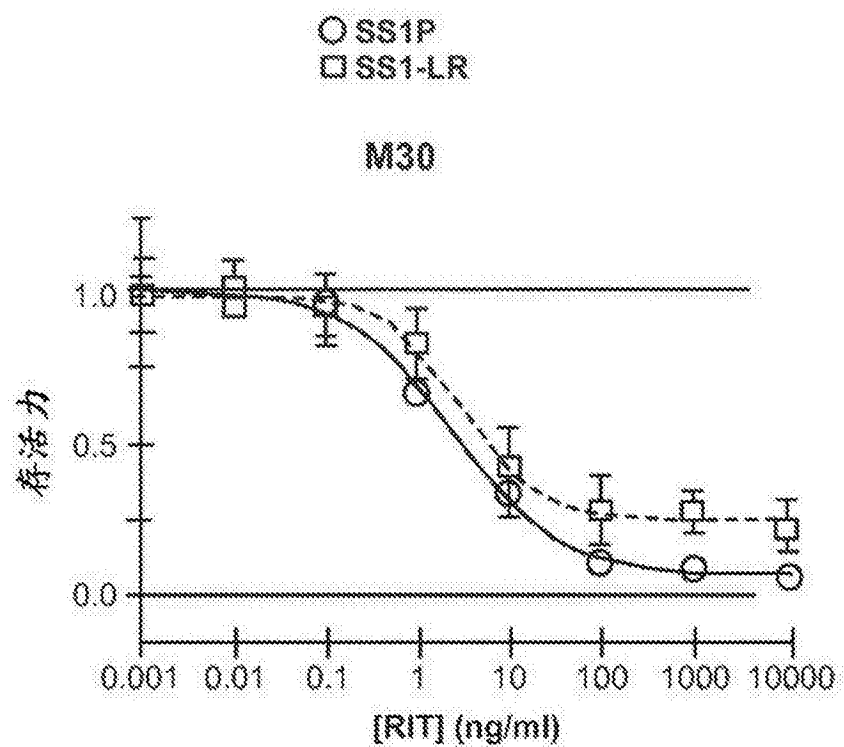


图2(续)

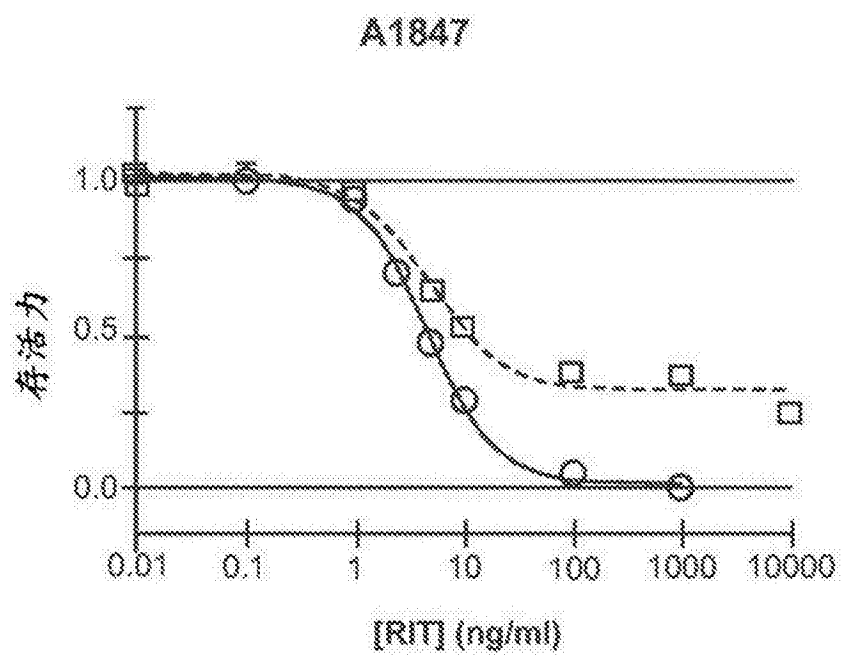
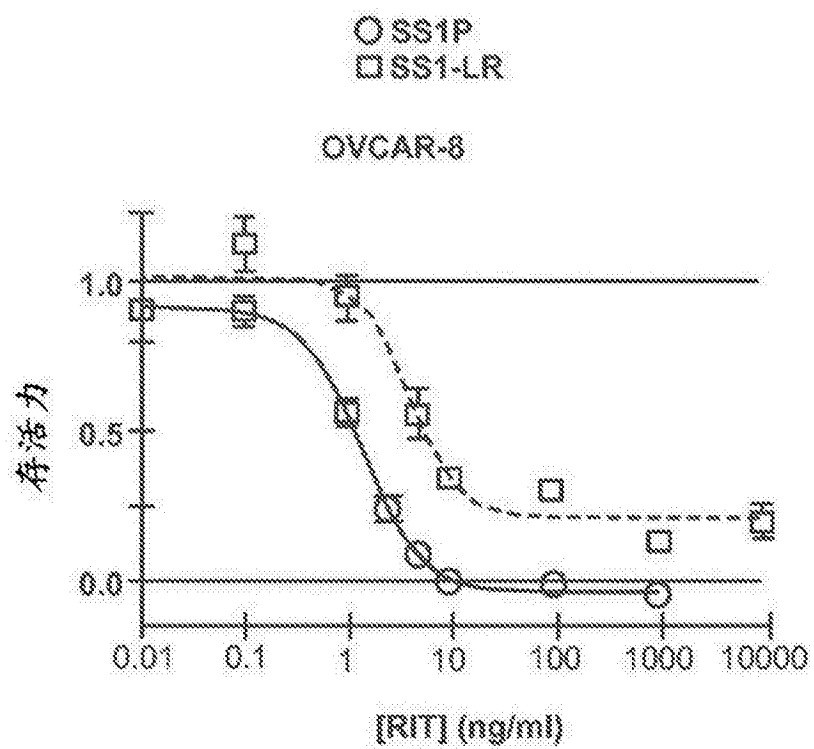


图2(续)

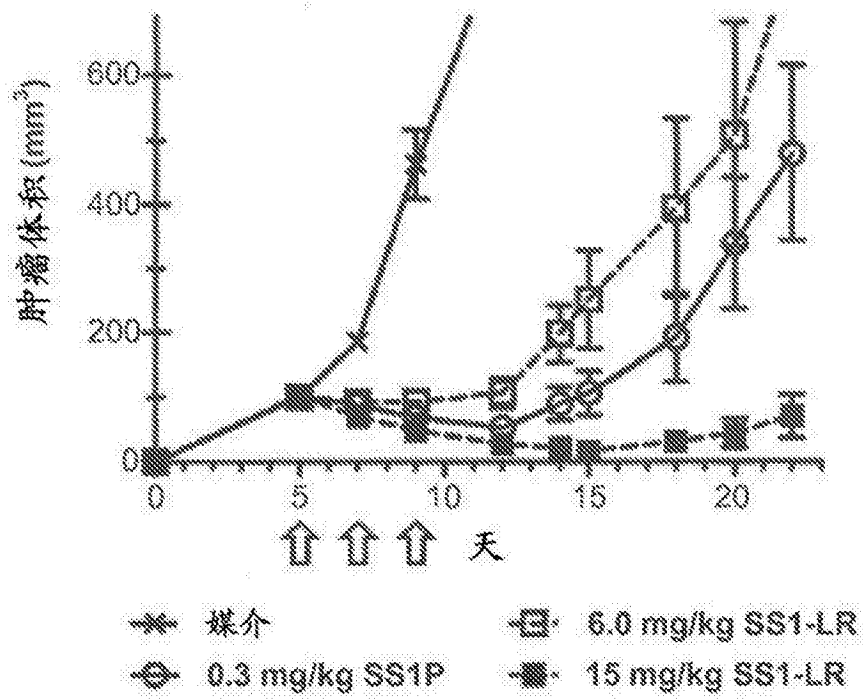


图3

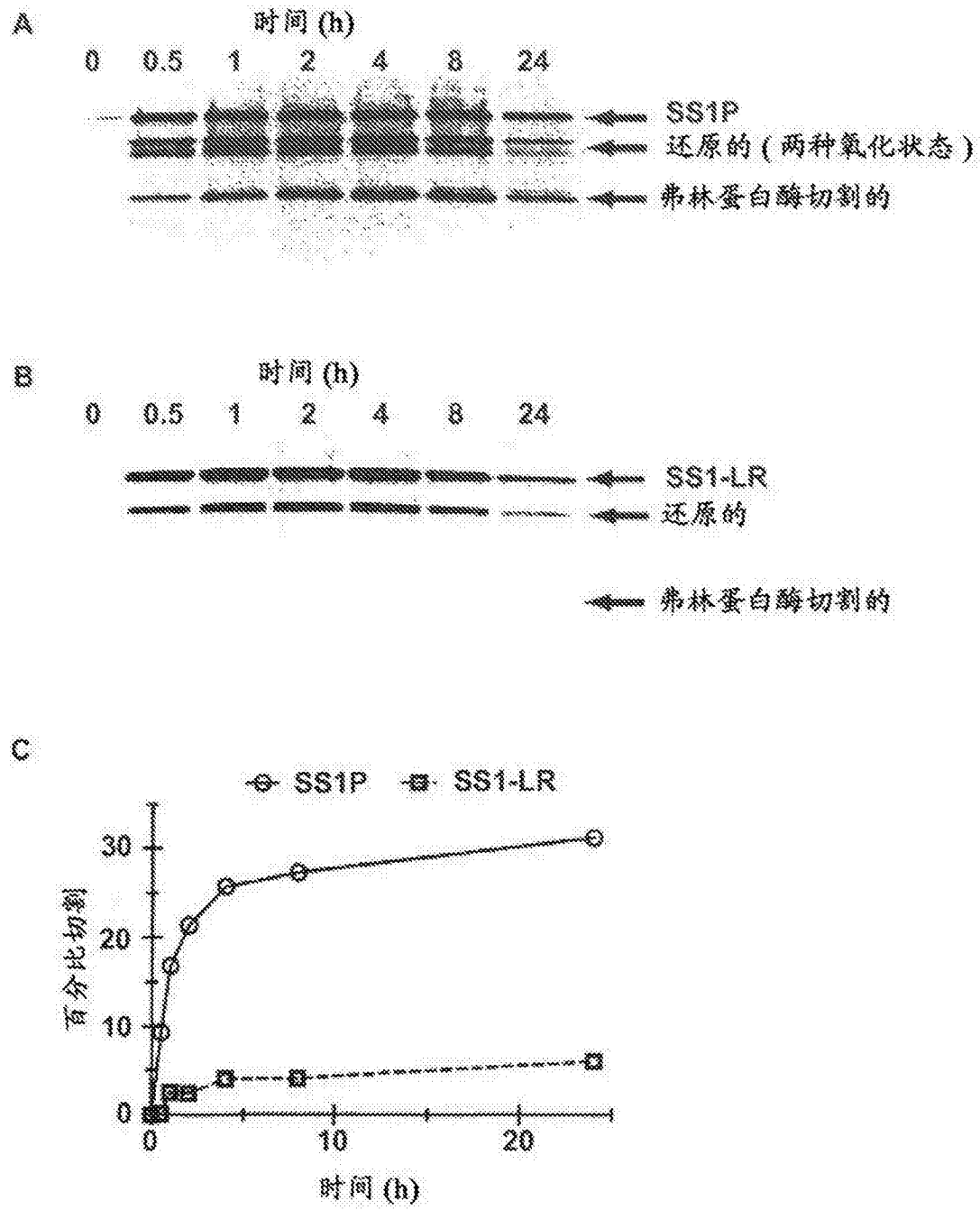


图4

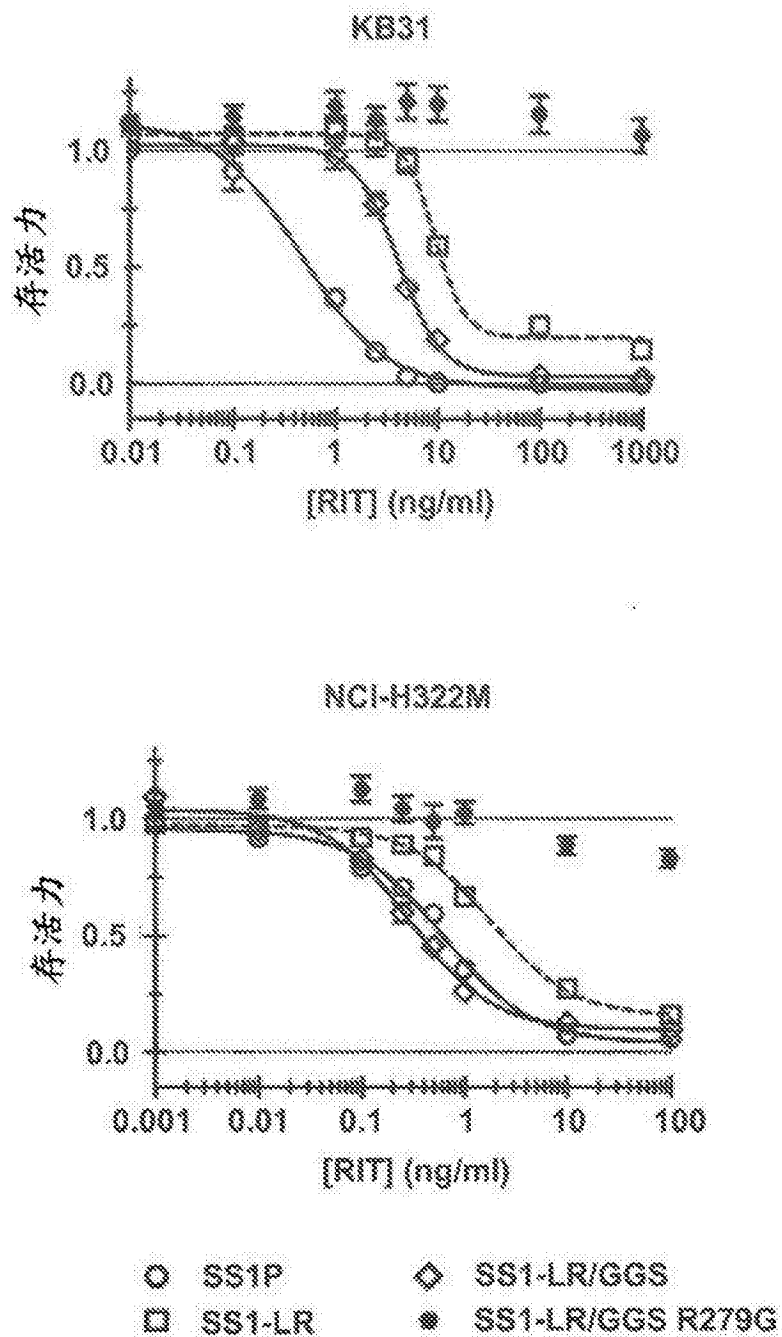


图5

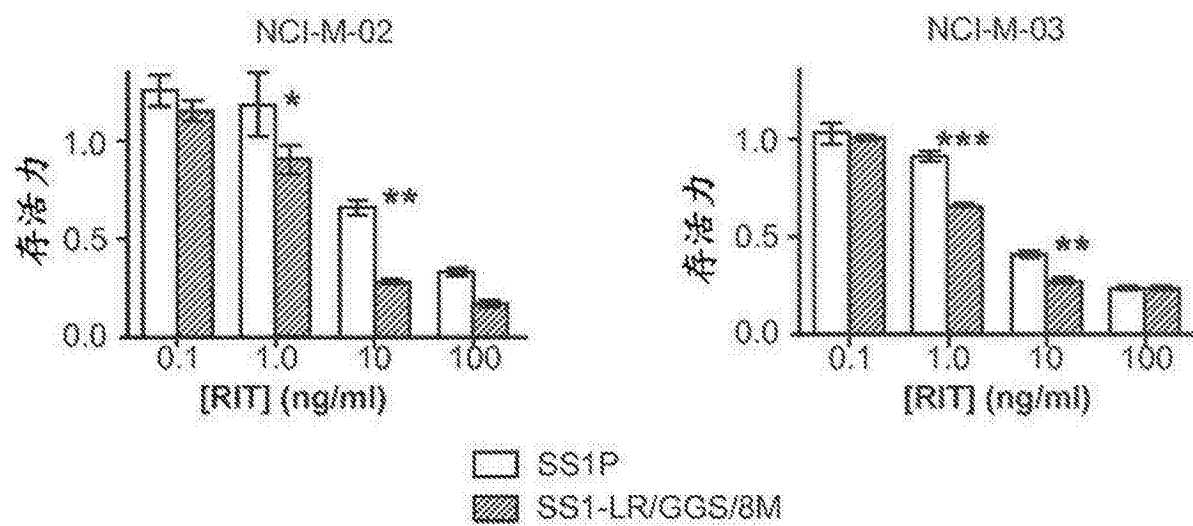


图6

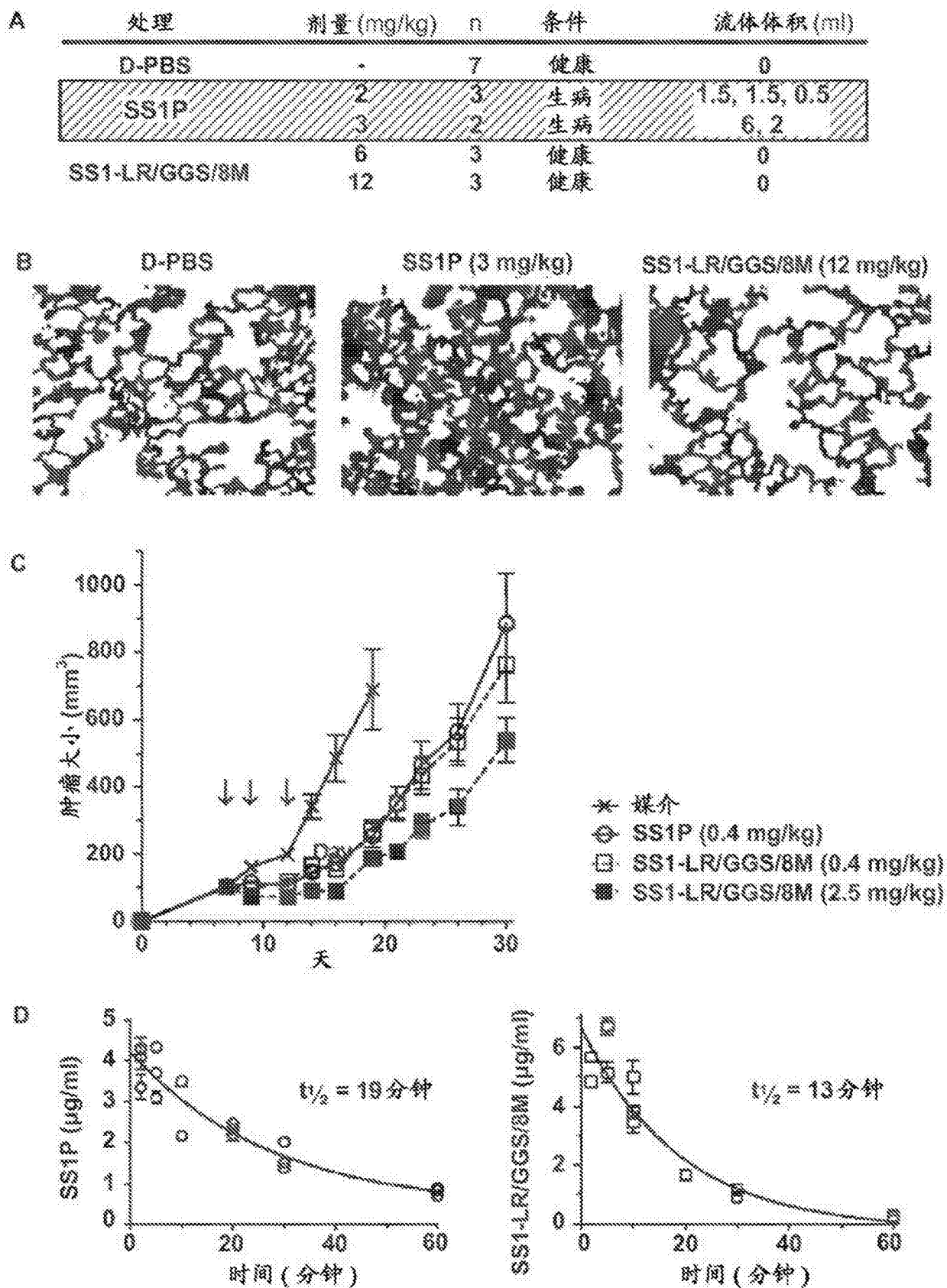


图7

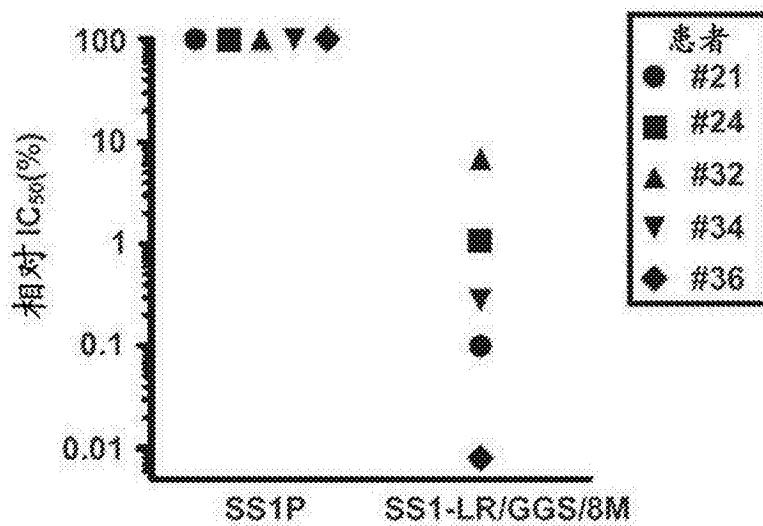


图8

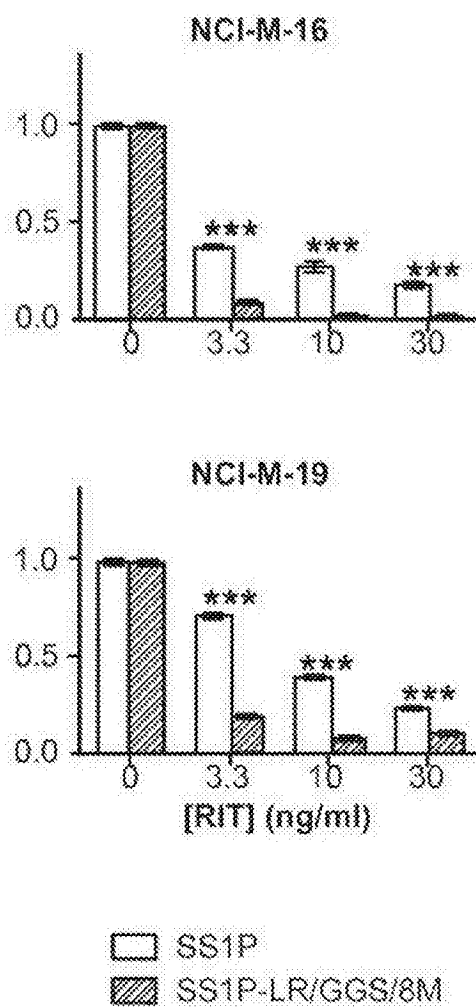


图9