



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101238145 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 24

(21) 申请号 200680028473. 6

(22) 申请日 2006. 06. 14

(30) 优先权数据

60/690, 269 2005. 06. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 02. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2006/000971 2006. 06. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02006/133553 EN 2006. 12. 21

(73) 专利权人 普罗陶克斯有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚

(72) 发明人 詹姆士·托马斯·巴克雷

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

C07K 14/195(2006. 01)

A61K 38/16(2006. 01)

A61K 35/74(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 03018611 A2, 2003. 03. 06,

CN 1616091 A, 2005. 05. 18,

审查员 岳礼溪

权利要求书2页 说明书72页

序列表33页 附图44页

(54) 发明名称

修饰的成孔蛋白在制备治疗或预防良性前列腺增生的药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一种使用修饰的成孔蛋白(MPP) 治疗 BPH(良性前列腺增生) 的方法。这些 MPP 衍生自天然存在的细胞毒蛋白(nPP), 所述天然存在的细胞毒蛋白通过在细胞膜中形成孔或通道而杀伤细胞, 从而导致细胞死亡。MPP 是通过 nPP 的修饰而产生的, 其使得 MPP 能够在正常前列腺细胞上被选择性活化。所述修饰可包括将前列腺特异性蛋白酶切割位点添加至活化序列, 和 / 或添加使得选择性靶向前列腺细胞的前列腺特异性靶向结构域。这些 MPP 能够在体内选择性地靶向和杀伤正常的前列腺细胞。MPP 可以单独使用或与其他疗法结合用于治疗 BPH。

1. 一种修饰的成孔蛋白在制备用于治疗良性前列腺增生 (BPH) 的药剂中的用途,所述修饰的成孔蛋白来自天然存在的成孔蛋白,并且包括一个或多个前列腺选择性修饰,所述前列腺选择性修饰选自可由前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列和一个或多个能够选择性靶向前列腺细胞的前列腺特异性靶向结构域,其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白与用于良性前列腺增生的一种或多种其他治疗联合使用。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述天然存在的成孔蛋白为气单胞菌溶素原或 α -毒素。

4. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白包括可由前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列。

5. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白包括前列腺特异性靶向结构域。

6. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白包括可由前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列,和一个或多个前列腺特异性靶向结构域。

7. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述可由前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列功能性取代所述天然存在的成孔蛋白的天然活化序列。

8. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述前列腺特异性蛋白酶是前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 或人腺体激肽释放酶 2 (hK2)。

9. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述前列腺特异性蛋白酶是前列腺特异性抗原。

10. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述前列腺特异性靶向结构域是促黄体激素释放激素,或前列腺特异性膜抗原的抗体。

11. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白还包括在所述天然存在的成孔蛋白的结合结构域中的一个或多个突变。

12. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白还包括亲和标签。

13. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白被配制成用于前列腺内给药的制剂。

14. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白被配制成用于静脉内给药的制剂。

15. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述天然存在的成孔蛋白为嗜水气单胞菌的气单胞菌溶素原。

16. 根据权利要求 15 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白包括可由前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列。

17. 根据权利要求 15 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白还包括在气单胞菌溶素原的结合结构域中的一个或多个突变。

18. 根据权利要求 15 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白由 SEQ ID NO:4 中所列的氨基酸序列和亲和标签构成,并且其中蛋白具有 1 至 10 个保守性氨基酸的取代。

19. 根据权利要求 15 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白由 SEQ ID NO:31 中所列的氨基酸序列构成,并且其中蛋白具有 1 至 10 个保守性氨基酸的取代。

20. 根据权利要求 17 所述的用途,其中所述一个或多个突变选自在对应于 SEQ ID NO : 2 的 Y162 位置的突变、在对应于 SEQ ID NO :2 的 W324 位置的突变、在对应于 SEQ ID NO :2 的 R323 位置的突变、在对应于 SEQ ID NO :2 的 R336 位置的突变以及在对应于 SEQ ID NO : 2 的 W127 位置的突变。

21. 根据权利要求 17 所述的用途,其中至少一个突变对应于 SEQID NO :2 的 R336A。

22. 根据权利要求 15 所述的用途,其中所述修饰的成孔蛋白由 SEQ ID NO :31 中所列的氨基酸序列构成。

修饰的成孔蛋白在制备治疗或预防良性前列腺增生的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及良性前列腺肥大领域,且特别涉及修饰的成孔蛋白用于治疗良性前列腺增生(BPH)的用途。

背景技术

[0002] 许多溶细胞蛋白已有描述(Lesieur等, Mol. Membr. Biol. 14 :45064, 1997)。这些天然存在的细胞毒蛋白包括哺乳动物蛋白(例如穿孔素),和细菌蛋白,例如气单胞菌溶素(由嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)产生)、 α -溶血素(由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)产生)、 α -毒素(由败血梭状芽胞杆菌(*Clostridium septicum*)产生)、 δ -毒素(由苏芸金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)产生)、炭疽保护性抗原、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)VCC毒素、葡萄球菌(*Staphylococcus*)杀白细胞素、硫磺菌(*Laetiporus sulphureus*)的LSL毒素、产气荚膜梭状芽胞杆菌(*Clostridium perfringens*)的 ϵ -毒素,以及刺胞动物(*Cnidaria* spp)产生的水螅溶素(hydralysin)。

[0003] 这些细胞毒蛋白中的某些,例如气单胞菌溶素原(proaerolysin)和 α -毒素,作为无活性的毒素原合成。这些毒素原含有不连续的官能团,所述官能团包括使得毒素原与细胞结合的结合结构域、毒素结构域,以及或者是含有蛋白酶切割位点的N末端或C末端抑制性肽结构域。蛋白酶切割位点上的抑制性肽结构域的切割使得毒素原活化,导致质膜中的细胞毒素寡聚化,产生了导致快速的溶细胞性细胞死亡的孔(Rossjohn等, J. Struct. Biol. 121 :92-100, 1998)。孔的形成物理上破坏细胞膜,且在细胞周期的所有阶段导致细胞死亡,包括非增殖性细胞(即 G_0 阻滞)。这些细胞毒素对它们能够杀伤的细胞类型而言是非特异性的,这是因为它们的结合结构域靶向存在于大多数细胞上的分子,且它们通常由非细胞特异性的蛋白酶活化。

[0004] 溶细胞成孔蛋白或这些蛋白的修饰形式已被建议作为用于治疗癌症的潜在治疗剂。例如,美国专利第5,777,078号描述了在细胞表面受到多种条件(包括蛋白水解)活化而溶解细胞的成孔剂。这些成孔剂通常可用于破坏与动物的病理状况有关的非期望的细胞。这样的细胞包括,但不限于肿瘤细胞、病毒慢性感染的细胞,或当被不适当地调节或表达时而导致疾病状态的细胞,例如免疫系统的细胞。W098/020135描述了与被修饰而具有选择性毒性的假单胞菌外毒素前蛋白有关的方法和组合物。通过在所述前蛋白中插入蛋白酶敏感性序列而使得此外毒素被修饰成由所需的蛋白酶活化。在一个实施例中,此外毒素被修饰成插入前列腺特异性抗原(PSA)切割位点,以用于靶向并杀伤前列腺癌细胞的目的。

[0005] 美国专利申请第2004/0235095号描述了修饰的溶细胞成孔蛋白用于治疗前列腺癌和其他癌症的用途。此溶细胞蛋白可被修饰成包括前列腺特异性切割位点,和/或前列腺特异性靶向结构域,并且可用于选择性靶向并杀伤前列腺癌细胞。

[0006] 癌症的特征为衍生自正常组织的异常细胞或增生性细胞的数量增加,其增殖形成肿瘤块,这些增生性肿瘤细胞侵犯邻近组织,并产生恶性细胞,所述恶性细胞最终通过血液

或淋巴系统播散至区域淋巴结和通过所谓的转移的过程播散至远距离部位。在癌性的状态中,细胞在正常细胞不能生长的条件下增殖。与正常细胞不同的是,癌细胞通常持续增殖,它们不特化或变得成熟,且它们具有从机体内的起源组织向其他部位播散的能力。癌细胞的这些特征通常起因于与正常细胞内的基因表达模式相比这些细胞的基因表达相关模式的变化。开发用于治疗癌症的治疗剂的许多策略集中在利用正常细胞和癌细胞之间基因表达的差异,且使用癌细胞特异性分子标记物靶向癌细胞。

[0007] 相比较而言,良性前列腺增生(BPH,也称为良性前列腺肥大)为非癌性病症,其由前列腺生长随年龄自然进展的增大所造成。前列腺增大可以是前列腺细胞增殖增加或前列腺细胞大小增加的结果。这种进展性前列腺生长通常直到生命晚期才引起问题。国立卫生研究院(NIH)估计,60%的60多岁的美国男性具有一些BPH的症状,并且此病症影响超过90%的70多岁和80多岁的男性。世界上大约1亿1千5百万的50岁年龄以上组的男性具有不同程度的BPH。由于人口的老龄化,预期患病率在以后的20年内会显著增加。严重的BPH可引起严重的问题,例如尿路感染,膀胱和肾脏损坏,包括膀胱结石,尿失禁,且最严重的是梗阻性尿路病引起的肉眼血尿和肾衰竭。

[0008] 目前有几种用于治疗BPH的策略。这些包括观察等待,医学疗法,例如 α 阻断剂疗法和非那司提(finasteride)疗法,气囊扩张术和各种手术操作,例如经尿道前列腺切开术(TUIP),经尿道前列腺切除术(TURP),以及开放性前列腺切除术。很少有治疗方法不具有任何的不良后果,且特别是对于BPH的治疗方法来说更是如此,其中在可使用的治疗方法的益处和缺点之间具有微妙的平衡方案。在采用目前可使用的BPH治疗方法后的不良事件包括阳痿(对于各种手术操作来说,大约4%至40%,在一些内科治疗之后阳痿的发生率也增加),尿失禁(手术后大约3%的压迫性尿失禁,总体的尿失禁接近1%),以及需要复治。对于所公布的数据的综合分析估计,TURP的手术期间死亡率(手术操作的90天内死亡)的平均概率为1.5%。对于开放性手术来说,为2.4%,对于气囊扩张术来说,为3.5%。

[0009] 目前,最常用的激素疗法是口服施用非那司提。非那司提,可自Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N. J. 以商业名称ProscarTM商购获得,其为一种合成的4-氮杂类固醇化合物,类固醇II型5 α -还原酶的特异性抑制剂,以及将雄激素睾酮转化为5 α -双氢睾酮(DHT)的胞内酶。非那司提有助于缩小增大的前列腺,并降低良性前列腺病症导致的PSA升高。然而,据知非那司提引起非期望的副作用,包括阳痿或性欲降低,射精的问题,以及乳房增大,和/或乳房压痛。度他雄胺(Dutasteride, Duagen)是用于治疗BPH的另一种药物,它能够阻断I型和II型5 α -还原酶。性副作用与非那司提的性副作用相似。

[0010] 目前, α -1肾上腺素受体阻断剂也用于良性前列腺增生的临床治疗。其实例包括盐酸坦索洛新、盐酸特拉唑嗪、盐酸阿夫唑嗪和甲磺酸多沙唑嗪。在施用 α -1肾上腺素受体阻断剂之后,BPH的症状减轻和尿流率的改善与膀胱颈和前列腺中的 α -1肾上腺素受体的阻断产生的平滑肌松弛有关。

[0011] 另外,植物甾醇和提取物也已用于治疗良性前列腺增生。

[0012] 美国专利申请第20040081659号描述了用于治疗BPH的偶联物,其包括:1)带有被PSA选择并蛋白水解切割的氨基酸序列的寡肽,2)长春花生物碱细胞毒素剂,1)与2)化学连接。理论上,此偶联物中生物碱的细胞毒活性低,并当连接键被PSA切割时增加。

[0013] 欧洲专利申请0652014描述了一种BPH的治疗方法,其包括:施用与免疫原性载体

连接的 PSA (前列腺特异性抗原), 以诱导抗 PSA 抗体的产生。也可以使用抗 PSA 抗体。所述免疫原性载体可为破伤风毒素、白喉毒素或霍乱毒素 B 链。

[0014] 美国专利第 6, 379, 669 号描述了一种将治疗剂与抗体或其片断偶联而靶向特异性器官的方法。这些偶联的治疗剂 (或免疫偶联物) 可用于治疗前列腺癌、BPH 或前列腺炎。所包括的免疫偶联物为与不同生物活性剂连接的抗 PSA 的抗体。所述生物活性剂可以包括细菌毒素。相似地, 在美国专利申请第 20020001588 号中, 还探讨了抗体和不同的生物活性治疗剂的化学连接键。

[0015] 提供此背景技术信息的目的是为了公开申请人所相信与本发明可能相关的信息。不是打算承认, 而且也不应该解释为: 任何先前的信息构成了抵触本发明的现有技术。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明的目的是提供一种使用修饰的成孔蛋白治疗或预防良性前列腺增生的方法。

[0018] 根据本发明的一个方面, 提供了一种用于减小受治疗者的前列腺大小的修饰的成孔蛋白, 所述修饰的成孔蛋白衍生自天然存在的成孔蛋白, 并且包括一个或多个前列腺选择性修饰, 所述前列腺选择性修饰选自能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列; 以及包括能够选择性靶向前列腺细胞的一个或多个前列腺特异性的靶向结构域, 其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

[0019] 根据本发明的另一个方面, 提供了一种用于治疗良性前列腺增生 (BPH) 的修饰的成孔蛋白, 所述修饰的成孔蛋白衍生自天然存在的成孔蛋白, 并且包括一个或多个前列腺选择性修饰, 所述前列腺选择性修饰选自能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列; 以及包括能够选择性靶向前列腺细胞的一个或多个前列腺特异性靶向结构域, 其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

[0020] 根据本发明的另一个方面, 提供了修饰的成孔蛋白在制备用于减小受治疗者的前列腺大小的药剂中的用途, 所述修饰的成孔蛋白衍生自天然存在的成孔蛋白, 并且包括一个或多个前列腺选择性修饰, 所述前列腺选择性修饰选自能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列; 以及包括能够选择性靶向前列腺细胞的一个或多个前列腺特异性靶向结构域, 其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

[0021] 根据本发明的另一个方面, 提供了修饰的成孔蛋白在制备用于治疗良性前列腺增生 (BPH) 的药剂中的用途, 所述修饰的成孔蛋白衍生自天然存在的成孔蛋白, 并且包括一个或多个前列腺选择性修饰, 所述前列腺选择性修饰选自能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列; 以及包括能够选择性靶向前列腺细胞的一个或多个前列腺特异性靶向结构域, 其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

[0022] 根据本发明的另一个方面, 提供了一种减小受治疗者的前列腺大小的方法, 其包括给所述受治疗者施用有效量的修饰的成孔蛋白, 所述修饰的成孔蛋白衍生自天然存在的成孔蛋白, 并且包括一个或多个前列腺选择性修饰, 所述前列腺选择性修饰选自能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列; 以及包括能够选择性靶向前列腺细胞的一个或多个前列腺特异性靶向结构域, 其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

[0023] 根据本发明的另一个方面, 提供了一种治疗受治疗者的良性前列腺增生 (BPH) 的方法, 其包括给所述受治疗者施用有效量的修饰的成孔蛋白, 所述修饰的成孔蛋白衍生自

天然存在的成孔蛋白,并且包括一个或多个前列腺选择性修饰,所述前列腺选择性修饰选自能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列;以及包括能够选择性靶向前列腺细胞的一个或多个前列腺特异性靶向结构域,其中所述修饰的成孔蛋白能够选择性杀伤前列腺细胞。

[0024] 根据本发明的另一个方面,提供了一种修饰的气单胞菌溶素原蛋白,其包括大叶结合结构域中的一个或多个突变和一个或多个前列腺特异性修饰,所述前列腺特异性修饰选自能够选择性靶向前列腺细胞的前列腺特异性靶向结构域和能够被前列腺特异性蛋白酶切割的活化序列,其中所述修饰的气单胞菌溶素原能够选择性杀伤前列腺细胞。

附图说明

[0025] 在下述参考附图的详细说明中,本发明的这些和其他特征将变得更加明显。

[0026] 图1描述了气单胞菌溶素原结构域的示意图(没有按比例画),并显示了被弗林蛋白酶活化的结果。

[0027] 图2描述了显示溶血测定的结果的条形图,其中MPP1与人血浆或添加有酶活性的PSA的人血浆(10,000ng/ml)预温育。

[0028] 图3描述了根据本发明的实施方案将几种MPP的体外毒性与气单胞菌溶素原的体外毒性进行对比的曲线图。MPP衍生自气单胞菌溶素原,且包括置换天然弗林蛋白酶位点的PSA切割位点。

[0029] 图4A-4E为示意图(未按比例),其显示了:根据本发明的实施方案,如何能将气单胞菌溶素原蛋白改变以产生衍生自气单胞菌溶素原的几种不同的MPP。“*”符号表示一个或多个点突变,和/或一个或多个缺失,它们降低气单胞菌溶素原结合结构域的功能(即在细胞膜中集中的能力)。

[0030] 图4A描述了野生型气单胞菌溶素原的示意图。图4B描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列。图4C描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括一个或多个前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列。图4D描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列和功能性缺失的天然结合结构域。此功能性缺失的天然结合结构域由一个或多个点突变或一个或多个缺失产生。图4E描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列和功能性置换的天然结合结构域。此功能性缺失的天然结合结构域如图4D所述产生。在该实施方案中,在MPP的N末端或MPP的毒素结构域的C末端可以连接一个或多个前列腺特异性靶向结构域。

[0031] 图5A描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列和功能性置换的天然结合结构域。此天然结合结构域由一个或多个点突变或一个或多个缺失修饰。一个或多个前列腺特异性靶向结构域可任选地在Y215C或A300C处与MPP连接。图5B描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列和功能性缺失的天然结合结构域。此天然结合结构域由气单胞菌溶素原的一个天然结合结构域缺失而功能性缺失。图5C描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的MPP的示意图,其带有被修饰成包括前列

腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列和功能性置换的天然结合结构域。在该实施方案中，一个或多个前列腺特异性靶向结构域可与 MPP 的毒素结构域的 N 末端或 MPP 的毒素结构域的 C 末端连接。MPP 的一个天然结合结构域如图 5B 所述缺失。图 5D 描述了一种衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的示意图，其带有被修饰成包括前列腺特异性蛋白酶切割位点的活化序列和功能性置换的天然结合结构域。一个或多个前列腺特异性靶向结构域可在 Y215C 或 A300C 处与 MPP 连接。MPP 的一个天然结合结构域如图 5B 所述缺失。

[0032] 图 6A 描述了根据本发明的一个实施方案衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的示意图，其带有功能性置换的天然结合结构域。此 MPP 还包括一个或多个前列腺特异性靶向结构域。此 MPP 的天然结合结构域因一个或多个氨基酸残基的突变或缺失而功能性缺失。图 6B 描述了根据本发明的一个实施方案衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的示意图，其带有功能性置换的天然结合结构域。此 MPP 还包括在 Y215C 或 A300C 处与气单胞菌溶素原连接的一个或多个前列腺特异性靶向结构域。此 MPP 的天然结合结构域因一个或多个氨基酸残基的突变或缺失而功能性缺失。图 6C 描述了根据本发明的一个实施方案衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的示意图，其带有功能性置换的天然结合结构域。此 MPP 还包括一个或多个前列腺特异性靶向结构域。此天然结合结构域因气单胞菌溶素原的一个天然结合结构域缺失而功能性缺失。图 6D 描述了根据本发明的另一个实施方案衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的示意图，其带有功能性置换的天然结合结构域。此 MPP 还包括在 Y215C 或 A300C 处与气单胞菌溶素原连接的一个或多个前列腺特异性靶向结构域。此天然结合结构域因气单胞菌溶素原的一个天然结合结构域缺失而功能性缺失。

[0033] 图 7 描述了野生型气单胞菌溶素原的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :1)。

[0034] 图 8 描述了野生型气单胞菌溶素原的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

[0035] 图 9 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP1) 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :3)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0036] 图 10 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP1) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0037] 图 11 描述了见于人精液凝固蛋白 I 和蛋白 II 的 PSA 切割位点的氨基酸序列 (SEQ ID NO :5)。

[0038] 图 12 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP2) 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :6)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0039] 图 13 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP2) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :7)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0040] 图 14 描述了 PSA 切割位点的一个例子 (SEQ ID NO :8)。

[0041] 图 15 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP3) 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :9)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0042] 图 16 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP3) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :10)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0043] 图 17 描述了 PSA 切割位点的另一个例子 (SEQ ID NO :11)。

[0044] 图 18 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP(MPP4) 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :12)，其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0045] 图 19 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP (MPP4) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 13), 其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换。

[0046] 图 20-27 描述了根据本发明另外的 PSA 切割位点的氨基酸序列 (分 别是 SEQ ID NO :14-21)。

[0047] 图 28 描述了天然的促黄体激素释放激素 (LHRH) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :22)。

[0048] 图 29 描述了修饰的促黄体激素释放激素 (LHRH) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :23)。

[0049] 图 30 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP (MPP6) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 24), 其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点被 PSA 切割位点置换, 且气单胞菌溶素原的天然结合结构域被修饰。

[0050] 图 31 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP (MPP7) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 25), 其中气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶位点保留, 且气单胞菌溶素原的天然结合结构域缺失并被 SEQ ID NO :23 置换。

[0051] 图 32 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP (MPP5) 在猴的前列腺中治疗 3 天后的作用。A 和 B 描述了单独使用载体治疗的对照猴的前列腺, C 和 D 描述了使用 1 μ g 的 MPP 治疗的猴的前列腺, E 和 F 描述了使用 5 μ g 的 MPP 治疗的猴的前列腺, G 和 H 描述了使用 25 μ g 的 MPP 治疗的猴的前列腺。

[0052] 图 33 描述了根据本发明的一个实施方案的 MPP (MPP5) 在猴的前列腺中治疗 15 天后的作用。A 和 B 描述了单独使用载体治疗的对照猴的前列腺, C 和 D 描述了使用 1 μ g 的 MPP 治疗的猴的前列腺, E 和 F 描述了使用 5 μ g 的 MPP 治疗的猴的前列腺, G 和 H 描述了使用 25 μ g 的 MPP 治疗的猴的前列腺。

[0053] 图 34 描述了 MPP5 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :30)。ATG 起始密码子和 TAA 终止密码子加有下划线并用黑体表示。HindIII 和 EcoRI 限制性位点为黑体文本。PSA 切割位点加有下划线, 且 6His 标签为黑体斜体文本。

[0054] 图 35 描述了 MPP5 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :31)。此氨基酸序列衍生自图 34 所示的核苷酸序列。427-432 位氨基酸 (PSA 切割位点) 加有下划线并用黑体表示。6His 标签为黑体文本。

[0055] 图 36 描述了通过洗涤的红细胞的水解度测定的 MPP5 在前列腺组织片段的条件培养基中的活化。

[0056] 图 37 描述了多种物种的血清切割 MPP5 的能力。

[0057] 图 38 描述了 MPP5 对猴前列腺的作用。

[0058] 图 39 描述了在猴中对施用 MPP5 的体液反应。

[0059] 图 40 描述了野生型败血梭状芽胞杆菌 α -毒素的核苷酸序列 (SEQ ID NO :73)。

[0060] 图 41 描述了野生型败血梭状芽胞杆菌 α -毒素的氨基酸序列 (SEQ ID NO :74)。

[0061] 发明详述

[0062] 本发明涉及修饰的成孔蛋白用于治疗 BPH 的用途。所述 MPP 衍生自天然存在的成孔蛋白 (nPP), 所述天然存在的成孔蛋白通过插入靶细胞的细胞膜中并在靶细胞的细胞膜中形成孔或通道而杀伤细胞, 从而导致细胞死亡。在一个实施方案中, 所述 MPP 不可逆地插入细胞膜中, 且由此使得旁观细胞 (bystander cell) 不受影响。所述 MPP 包括前列腺选择性修饰, 所述前列腺选择性修饰导致 MPP 具有相对于其他组织的细胞而选择性靶向正常前

列腺细胞的能力。所述 MPP 在体内能够选择性杀伤正常前列腺细胞,并且在体内能够减小正常前列腺的重量或体积。因此,根据本发明,所述 MPP 可单独使用或与其他疗法结合使用用于治疗 BPH。这与美国专利申请第 20040235095 号所述的分子大不相同,美国专利申请第 20040235095 号描述了修饰的溶细胞蛋白治疗局限性前列腺癌或转移性前列腺癌的用途。

[0063] 定义

[0064] 除非另有定义,本申请所使用的所有技术术语和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0065] 技术和操作通常根据本领域和各种常见的参考文献的传统方法进行(通常参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 和 Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press(1983) for fluorescence techniques)。标准技术用于化学合成、化学分析,以及生物学测定。如贯穿公开内容所应用的,下述术语应理解为具有下述含义,除非另有指明。

[0066] 本申请所使用的术语“大约”是指正常值的 $\pm 10\%$ 变化。应理解,在本申请所提供的任何给定值中总是包括这种变化,不管是否特别提及。

[0067] 本申请在提及实体(entity)或部分(moiety)时所使用的术语“前列腺特异性”是指实体/部分或实体/部分的性质与其他细胞类型相比时对于前列腺细胞的选择性。例如,前列腺特异性实体/部分可选择性地由前列腺细胞表达、选择性地与前列腺细胞相关、选择性地由前列腺细胞活化、能够选择性地结合前列腺细胞,等等。

[0068] 本申请所使用的术语“前列腺特异性活化序列”是指掺入一个或多个前列腺特异性蛋白酶切割位点的氨基酸残基的序列,其被前列腺特异性蛋白酶选择性切割或水解。

[0069] 本申请所使用的术语“前列腺特异性靶向结构域”是指诸如肽配体、毒素或抗体的分子,当与其结合其他细胞类型的能力相比时,能够选择性结合前列腺细胞。

[0070] 本申请所使用的术语“基因”是指编码各蛋白或 RNA 的核苷酸片段(也称为“编码序列”或“编码区”),连同可位于所述编码序列的上游或下游的相关的调节区,例如启动子、操纵子、终止子等。

[0071] 本申请所使用的术语“选择性杂交”是指核苷酸可检测地和特异性地与另一核苷酸结合的能力。多核苷酸、寡核苷酸及其片段与靶核苷酸链在最小化可检测地结合非特异性核苷酸的可评估量的杂交和洗涤条件下选择性地杂交。高严谨性条件可用于获得如本领域已知和本申请所述的选择性杂交条件。通常,根据传统的杂交方法在高严谨性条件下实施杂交和洗涤条件。洗涤条件通常为 $1-3 \times \text{SSC}$, $0.1-1\%$ SDS, $50-70^\circ\text{C}$, 大约 5-30 分钟后更换洗涤液。

[0072] 术语“相应于”或“对应于”是指多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的所有或部分具有同一性。相比之下,本申请所使用的术语“互补于”是指多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的互补链的所有或部分具有同一性。为了描述起见,核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”,并互补于参考序列“GTATA”。

[0073] 下列术语在本申请中用于描述在两个或更多多核苷酸或两个或更多多肽之间的序列关系:“参考序列”、“对比窗”、“序列同一性”、“序列同一性百分数”以及“显著同一性”。“参考序列”是用作序列对比基础的确定序列,参考序列可以为较大序列的亚组,例如作为

全长 cDNA、基因或蛋白质序列的片段,或可以包括完整的 cDNA、基因或蛋白质序列。通常,参考多核苷酸序列为至少 20 个核苷酸长度,并且通常为至少 50 个核苷酸长度。参考多肽序列通常为至少 7 个氨基酸长度,并且通常为至少 17 个氨基酸长度。

[0074] 本申请所使用的“对比窗”是指至少 15 个连续核苷酸位置或至少 5 个连续氨基酸位置的参考序列的概念片段,候选序列可通过该片段与参考序列对比,且其中对于所述两个序列的最佳比对来说,经对比窗的候选序列的部分可包括相对于参考序列(不含有添加或缺失)20%或更少的添加或缺失(即间隔)。本发明考虑了用于对比窗的不同长度的参考序列或候选序列,以至包括全长的参考序列或候选序列。用于比对对比窗的序列的最佳比对可以使用下述方法来进行:Smith 和 Waterman 的局部同源性算法(Adv. Appl. Math. (1981)2:482), Needleman 和 Wunsch 的同源性比对算法(J. Mol. Biol. (1970)48:443), Pearson 和 Lipman 的相似性检索方法(Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) (1988)85:2444), 以及使用这些算法的计算机化实施方法(例如 Wisconsin Genetics Software Package Release7.0, Genetics ComputerGroup,573 Science Dr., Madison, WI 的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA)、可公开获得的计算机软件例如 ALIGN 或 Megalign(DNASTAR) 进行,或通过目测进行。然后选择最佳比对(即导致经对比窗的最高同一性百分数)。

[0075] 术语“序列同一性”是指两个多核苷酸序列或多肽序列经过对比窗的同一性(即,基于核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸)。

[0076] 本申请所使用的关于参考序列的术语“序列同一性百分数(%)”被定义为候选序列中与参考多肽序列中的残基具有同一性的核苷酸或氨基酸残基的百分数,所述候选序列经对比窗在所述序列的最佳比对,和如有必要,引入间隔,以获得最大的序列同一性百分数,不考虑作为部分序列同一性的任何保守置换。

[0077] 本申请所使用的术语“显著同一性”表示多核苷酸或多肽序列的特征,其中所述多核苷酸或多肽包括经对比窗与参考序列相比具有至少 50%序列同一性的序列。经对比窗与参考序列相比具有至少 60%序列同一性、至少 70%序列同一性、至少 80%序列同一性或至少 90%序列同一性的多核苷酸和多肽序列也被认为与参考序列具有显著同一性。

[0078] 本申请所使用的术语“功能性缺失”表示对基因序列做出的使得部分基因序列无功能的突变、部分或完全缺失、插入或其他改变。例如,气单胞菌溶素原(PA)结合结构域的功能性缺失导致 PA 结合细胞膜并在细胞膜上集中的能力降低。此功能性缺失可通过将诸如前列腺特异性靶向结构域(例如 LHRH 肽)的另一功能性结合结构域插入气单胞菌溶素原而逆转。本申请中这种功能性缺失的逆转被称为“功能性置换”。在另一个实施例中,天然 PA 弗林蛋白酶切割位点的功能性缺失导致与野生型 PA 分子相比 PA 被弗林蛋白酶切割和活化的能力降低。

[0079] 本申请可互换使用的术语“治疗”和“处置”是指为改善受治疗者的状况而进行的介入。所述改善可为主观的或客观的,并与缓解有关预防受治疗的疾病或病症的发展或改变其病理的症状相关。因此,术语“治疗”和“处置”以最广的含义使用,且包括在不同阶段预防(防止)、缓解、减轻和治愈疾病或病症。此术语还包括预防受治疗者的状况的恶化。因此,需要治疗/处置的受治疗者包括已患有疾病或病症的那些,具有发展所述疾病或病症的倾向或处于发展所述疾病或病症的风险的那些,以及要预防所述疾病或病症的那些。

[0080] 术语“缓解”包括受治疗的疾病或病症的一种或多种症状、体征和特征的临时和长

期的阻断、预防、减轻或改善。

[0081] 本申请所使用的术语“受治疗者”或“患者”是指需要治疗的动物。

[0082] 本申请所使用的术语“动物”是指人类和非人类的动物,包括,但不限于哺乳类、禽类和鱼类。

[0083] 本发明蛋白质或多肽“联合”一种或多种其他治疗剂或另外的治疗而施用,意在包括同时(并行)施用和连续施用。连续施用意在包括根据不同顺序和通过不同途径将本发明的治疗剂或其他治疗和化合物施用于受治疗者。

[0084] 本申请可互换使用的术语“抗原”和“抗原物质”是指能够诱导动物的免疫反应的一个分子,多个分子,分子的一部分或多部分,或分子组合,以至包括整个细胞和组织。抗原物质可包括单个抗原表位或抗原决定簇,或可包括多个抗原表位或抗原决定簇。

[0085] 本申请所使用的术语“免疫反应”是指动物的免疫系统响应抗原或抗原物质的反应性的改变,并可涉及抗体产生、诱导细胞介导的免疫、补体活化和/或免疫耐受的发展。

[0086] 本申请所使用的术语“抑制”是指减小、减轻、减缓或预防。

[0087] “结合对”是指相互具有亲和力的两个部分(如化学或生物化学的)。结合对的实例包括同型二聚体、异型二聚体、抗原/抗体、凝集素/亲和素、靶多核苷酸/探针、寡核苷酸、抗体/抗抗体、受体/配体、酶/配体,等等。“结合对的一个成员”是指所述对的一个部分,例如抗原或配体。

[0088] “分离的多核苷酸”是指基因组、cDNA 或合成起源的多核苷酸或它们的组合,其中就其起源来说,“分离的多核苷酸”(1)与“分离的多核苷酸”天然存在的细胞无关联,或(2)可操作性地与并非天然连接的多核苷酸连接。

[0089] 本申请所使用的术语“多肽”作为通用术语是指至少 20 个氨基酸长度的氨基酸序列,其可为野生型(天然存在的)蛋白质序列、野生型蛋白质序列的片段、野生型蛋白质序列的变体、野生型蛋白质序列的衍生物,或野生型蛋白质序列的类似物。因此,如本申请所定义的,认为天然蛋白质序列和天然蛋白质序列的片段、变体、衍生物和类似物为多肽上位概念的下位概念。

[0090] 本申请所使用的术语“分离的多肽”是指就其起源来说与正常情况下与之天然相关联的其他多肽无关联的多肽,和/或分离自正常情况下存在的细胞的多肽,和/或不来自相同细胞来源的其他多肽的多肽,和/或由不同物种的细胞表达的多肽,和/或天然不存在的多肽。

[0091] 当本文所使用的“天然存在的”或“天然的”应用于对象时,是指对象可天然存在的事实。例如,可分离自天然来源并且未在实验室中进行有意人工修饰的存在于生物体(包括病毒)的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0092] “可操作性连接”是指并列(juxtaposition),其中所述组件(components)处于使得它们以所期望的方式行使功能的关系。“可操作性连接”至编码序列的对照序列以下述方式连接:在与对照序列相匹配的条件下获得编码序列的表达。

[0093] “对照序列”是指必然影响它们所连接的编码序列和非编码序列的表达的多核苷酸序列。这些对照序列的性质根据宿主生物体而不同,在原核生物中,这些对照序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,这些对照序列通常包括启动子和转录终止序列。术语“对照序列”意在至少包括其存在可影响表达的组件,且还可包括其

存在为有利的其他组件,例如,前导序列和融合的配偶体序列。

[0094] “多核苷酸”是指至少 10 个碱基长度的核苷酸的多聚体形式,或核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一类型的核苷酸的修饰形式。此术语包括单链和双链形式的 DNA 或 RNA。

[0095] “多肽片段”是指具有氨基末端和 / 或羧基末端缺失,但其余氨基酸序列通常与所推导的天然存在的序列(例如全长的 cDNA 序列)中的相应位置同一的多肽。片段通常为至少 5、6、8 或 10 个氨基酸长度。在一个实施方案中,片段为至少 14 个氨基酸长度。在另一个实施方案中,片段为至少 20 个氨基酸长度。在又一个实施方案中,片段为至少 50 个氨基酸长度。在又一个实施方案中,片段为至少 70 个氨基酸长度。

[0096] 术语“标记”或“标记的”是指掺入可检测的标记物,例如掺入放射性标记的氨基酸或连接至可通过标记的亲合素(例如含有荧光标记物或可通过光学或比色方法检测酶活性的链亲和素)检测的多肽的生物素基部分。各种标记多肽和糖蛋白的方法为本领域已知且可以被使用。用于多肽的标记物的实例包括,但不限于下列:放射性同位素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I),荧光标记物(例如 FITC、若丹明、稀土元素-磷光体),酶标记物(或报道基因)(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、 β -内酰胺酶(lactamase)、荧光素酶、碱性磷酸酶),化学发光体,生物素基,二级报道基因识别的预先确定的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标签被通过不同长度的间隔臂连接而减小潜在的空间位阻。

[0097] 天然存在的氨基酸完全通过下文指明的传统的 3-字母或 1-字母缩写形式识别,所述缩写形式通常为肽领域所接受,并为 IUPAC-IUB 的生物化学命名委员会所推荐:

[0098] 表 1. 氨基酸代码

[0099]

名称	3-字母代码	1-字母代码	名称	3-字母代码	1-字母代码
丙氨酸	Ala	A	亮氨酸	Leu	L
精氨酸	Arg	R	赖氨酸	Lys	K
天冬酰胺	Asn	N	蛋氨酸	Met	M
天冬氨酸	Asp	D	苯丙氨酸	Phe	F
半胱氨酸	Cys	C	脯氨酸	Pro	P
谷氨酸	Glu	E	丝氨酸	Ser	S
谷氨酰胺	Gln	Q	苏氨酸	Thr	T
甘氨酸	Gly	G	色氨酸	Trp	W
组氨酸	His	H	酪氨酸	Tyr	Y
异亮氨酸	Ile	I	缬氨酸	Val	V

[0100] 本申请所列出的肽序列根据通常接受的惯例书写,由此 N 末端氨基酸在左, C 末端氨基酸在右。按照惯例, L 氨基酸由大写字母表示, D 氨基酸由小写字母表示。

[0101] 修饰的成孔蛋白 (MPP)

[0102] 本发明的修饰的成孔蛋白 (MPP) 衍生自天然存在的成孔蛋白 (nPP), 且被修饰成

包括一个或多个前列腺选择性修饰,使得它们能够相对于来自其他正常组织的细胞选择性杀伤正常的前列腺细胞。相对于来自其他正常组织的细胞选择性杀伤正常的前列腺细胞是指,比起其他类型的正常细胞例如肺脏、脾脏或血液细胞,MPP 能够更有效地杀伤正常的前列腺细胞。合适的 MPP 包括美国专利申请第 20040235095 号中所述的那些。

[0103] 1. 天然存在的成孔蛋白 (nPP)

[0104] 可衍生本发明的 MPP 的合适的 mPP 包括能够在靶细胞膜中形成孔或通道而导致细胞死亡的各种细菌毒素。合适的细菌毒素包括作为毒素原产生并接着由溶蛋白性切割活化的那些,以及以活性形式产生且不需要另外加工的那些。在一个实施方案中,所述 nPP 是作为毒素原合成的大细胞毒蛋白,其在活化序列处由蛋白酶切割活化,以在靶细胞的细胞膜中形成孔或通道,由此导致快速的溶细胞性细胞死亡。根据该实施方案的合适的 nPP 具有下列特征:通过蛋白酶切割去除抑制性结构域而活化的成孔活性,和通过一个或多个结合结构域结合存在于细胞膜上的受体的能力。已克隆了许多这样的 nPP,并且制备了重组形式(见,例如,Imagawa 等,FEMS. Microbiol. Lett. 17 :287-92,1994 ;Meza 等,FEMS Microbiol. Lett. 145 :333-9,1996)。

[0105] 在一个实施方案中,MPP 衍生自诸如气单胞菌溶素或气单胞菌溶素相关的多肽的 nPP。其实例包括,但不限于气单胞菌溶素同系物,例如嗜水气单胞菌、易损气单胞菌 (*Aeromonas trota*) 和杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 的气单胞菌溶素原,和败血梭状芽胞杆菌的 α -毒素 (Ballard 等,Infect. Immun. 63 :340-4,1995 ;Gordon 等,J. Biol. Chem. 274 :27274-80,1999 ;Genbank 登录号 S75954),以及下述多肽:炭疽芽胞杆菌保护性抗原、霍乱弧菌 VCC 毒素、产气荚膜梭菌的 ϵ -毒素和苏芸金芽胞杆菌的 δ -毒素 (Genbank 登录号 D00117)。

[0106] 上述的气单胞菌种的气单胞菌溶素原 (PA) 多肽已被表征。这些多肽之间表现出大于 80% 的序列配对同一性 (Parker 等,Progress in Biophysics & Molecular Biology 88 (2005) 91-142)。这些 PA 多肽中的每一种均为具有大约 470 个氨基酸残基的大约 52kDa 的毒素原。嗜水气单胞菌的野生型 PA 的 cDNA 序列示于 SEQ ID NO :1 (图 7),且此野生型 PA 的相应的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :2 (图 8)。许多天然存在的 nPP 的核苷酸序列和蛋白质序列为本领域已知。其非限制性实例列于下列表格中:

[0107] 表 2:示例的 nPP 和相应的 GenBank™ 登录号

[0108]	nPP	核苷酸序列 (GenBank™ 登录号)	氨基酸序列 (GenBank™ 登录号)
	嗜水气单胞菌的气单胞菌溶素	Buckley AerA, 未校正: M16495	Buckley AerA 校正的 P09167
	温和气单胞菌 (<i>A. sobria</i>) 的气单胞菌溶素原 ¹	Y00559	CAA68642
	温和气单胞菌的溶血素 ²	X65046	CAA46182
	易损气单胞菌的气单胞菌溶素原 ³	AF064068	AAC26217
	杀鲑气单胞菌的溶血素 ⁴	X65048	CAA46184

[0109] ¹Husslein 等, Mol. Microbiol. 2(4), 507-517 (1988)

[0110] ²Hirono 等, Microb. Pathog. 13(6), 433-446 (1992)

[0111] ³Kahn 等, Appl. Environ. Microbiol. 64(7), 2473-2478 (1998)

[0112] ⁴Hirono 等, Microb. Pathog. 15(4), 269-282 (1993)

[0113] 嗜水气单胞菌 PA 蛋白包括结合结构域 (SEQ ID NO:2 的大约 1-83 位氨基酸) 和 C 末端抑制性肽 (CIP) 结构域 (SEQ ID NO:2 的大约 427-470 位氨基酸), 其中结合结构域据知为多肽的小片 (small lobe), 且在本申请中被称为小片结合结构域 (SBD), C 末端抑制性肽 (CIP) 结构域在活化序列处由蛋白酶切割去除而活化 PA。在活化序列处切割而去除 CIP 结构域可由多种普遍存在的蛋白酶 (包括弗林蛋白酶和胰蛋白酶) 进行。SEQ ID NO:2 的大约 84-426 位氨基酸残基据知为 PA 多肽的大叶 (large lobe), 且含有毒素结构域和其他功能性的结构域——包括第二结合结构域, 其在本申请中被称为大叶结合结构域 (LBD)。野生型嗜水气单胞菌 PA 的 cDNA 序列示于 SEQ ID NO:1。

[0114] 基于显著的序列同一性和其他相似性, 败血梭状芽胞杆菌的 α -毒素被认为是气单胞菌溶素原的同系物 (Parker 等, 见上文)。 α -毒素作为 46, 450Da 的毒素原 (大约 443 个氨基酸) 分泌, 该毒素原在活化序列处由蛋白酶切割去除 C 末端抑制性肽 (CIP) 结构域而活化, 并且 α -毒素还结合糖基-磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定蛋白。然而, α -毒素不具有对应于 PA 的小片的区域。该多肽的活化通过在弗林蛋白酶切割位点处由蛋白酶切割而发生 (Gordon 等, Infect. Immun. 65:4130-4, 1997)。败血梭状芽胞杆菌 α -毒素核苷酸序列的一个实例在 GenBank™ 登录号 S75954 (SEQ ID NO:73, 图 40) 中提供, 败血梭状芽胞杆菌 α -毒素蛋白质序列的一个实例在 GenBank™ 登录号 AAB32892 (SEQ ID NO:74, 图 41) 中提供。基于序列同源性, α -毒素被认为具有相似的结构和相似的结合 GPI 锚定蛋白的能力。

[0115] 苏芸金芽胞杆菌 δ -毒素的活化序列由某些昆虫的中肠蛋白酶切割而产生活性的内毒素 (Miranda 等, Insect Biochem. Mol. Biol. 31:1155-63, 2001)。该内毒素的结构已经解决, 并显示由三个结构域——通道形成结构域、结合结构域以及稳定结构域组成。

[0116] 在一个实施方案中, 根据本发明的 MPP 衍生自气单胞菌溶素原多肽。在另一个实施方案中, MPP 衍生自嗜水气单胞菌的气单胞菌溶素原多肽。在本发明的另一个实施方案

中, MPP 衍生自 α -毒素多肽。

[0117] 在另一个实施方案中, MPP 衍生自不需要蛋白酶切割活化的 nPP, 且因此不具有活化序列。这些 nPP 可被修饰成向所述 nPP 插入前列腺 特异性蛋白酶切割位点, 以产生能够被选择性活化而杀伤前列腺细胞的 MPP。这些 nPP 的实例包括金黄色葡萄球菌 α -溶血素。对于所述 nPP, 如本领域已知, 活化序列可被插入成孔结构域的中心 (Panchal 等, (1996) Nat. Biotech. 14 :852-856)。

[0118] 本发明还包括衍生自 nPP 的生物活性片段的 MPP。nPP 的生物活性片段为能够形成孔并杀伤细胞的那些。合适的片段包括能够在靶细胞中通过去除 CIP 结构域而被活化形成孔的那些。例如, 对于 PA, 合适的片段为包括蛋白质的结合结构域和 CIP 结构域以及活化序列的片段。因此, 在本发明的一个实施方案中, MPP 衍生自包括结合结构域、CIP 结构域以及活化序列的气单胞菌溶素原的片段。在另一个实施方案中, MPP 衍生自包括结合结构域、活化序列, 仅部分 CIP 结构域的气单胞菌溶素原的片段。

[0119] 2. 前列腺特异性修饰

[0120] 根据本发明, 所选的 nPP 被修饰形成包括一个或多个前列腺特异性修饰的 MPP。本发明所考虑的前列腺特异性修饰包括掺入前列腺特异性活化序列, 和 / 或一个或多个结合结构域的功能性缺失 (包括功能性置换), 和 / 或添加前列腺特异性靶向结构域。

[0121] 在一个实施方案中, 根据本发明的 MPP 包括使得前列腺细胞的 MPP 选择性活化的前列腺特异性活化序列。前列腺特异性活化序列可通过对 nPP 的天然存在的活化序列修饰而产生, 或它可以通过向不具有天然存在的活化序列的 nPP 添加前列腺特异性活化序列而产生。在另一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列和一个或多个前列腺特异性靶向结构域。在另一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列和对 SBD 的修饰。在另一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列和对 LBD 的修饰。

[0122] 在一个实施方案中, 根据本发明的 MPP 包括使得前列腺细胞的 MPP 选择性活化的一个或多个前列腺特异性靶向结构域。在另一个实施方案中, MPP 包括一个或多个前列腺特异性靶向结构域和对 SBD 的修饰。在另一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性靶向结构域和对 LBD 的修饰。

[0123] 在又一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列、一个或多个前列腺特异性靶向结构域以及对 LBD 的修饰。在另一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列、一个或多个前列腺特异性靶向结构域以及对 SBD 的修饰。

[0124] 在一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列和对天然结合结构域的一个或多个修饰。在另一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性靶向结构域和对天然结合结构域的一个或多个修饰。在又一个实施方案中, MPP 包括前列腺特异性活化序列、前列腺特异性靶向结构域和对天然结合结构域的一个或多个修饰。

[0125] 可对气单胞菌溶素原进行的前列腺特异性修饰的组合的代表性非限制性实例示于图 4、5 和 6。

[0126] 活化序列的修饰

[0127] 如上所述, nPP 可通过对天然存在的活化序列修饰以提供前列腺特异性活化序列而被修饰成掺入前列腺特异性活化序列, 或前列腺特异性活化序列可被添加至不具有天然存在的活化序列的 nPP。根据本发明的前列腺特异性活化序列是掺入一个或多个前列腺特

异性蛋白酶切割位点的氨基酸序列。前列腺特异性蛋白酶切割位点是被前列腺特异性蛋白酶识别并选择和有效水解（切割）的氨基酸序列。在一个实施方案中，前列腺特异性蛋白酶是较其他细胞类型在前列腺细胞中更高水平表达的蛋白酶。前列腺特异性蛋白酶的实例包括，但不限于：PSA（前列腺特异性抗原），PSMA（前列腺特异性膜抗原），以及 HK2（人腺体激肽释放酶 2）切割序列。由这些前列腺特异性蛋白酶识别的切割位点的许多实例为本领域已知，并将在下文进一步描述。

[0128] 对天然存在的活化序列修饰而提供前列腺特异性蛋白酶活化序列可如本领域已知的来实现。天然存在的活化序列的修饰导致天然活化序列功能性缺失。功能性缺失可通过突变、部分或完全缺失、插入或对天然存在的活化序列做出的导致其失活的其他变化来实现。在一个实施方案中，nPP 的天然存在的活化序列通过插入前列腺特异性活化序列而功能性缺失。在另一个实施方案中，天然存在的活化序列的功能性缺失通过产生前列腺特异性活化序列的天然活化序列的一个或多个氨基酸残基中的突变来实现。在一个备选实施方案中，nPP 的天然存在的活化序列通过使用前列腺特异性蛋白酶切割位点取代活化序列的天然蛋白酶切割位点而功能性缺失。

[0129] 在一个实施方案中，一个或多个前列腺特异性蛋白酶切割位点功能性置换 MPP 的天然蛋白酶切割位点。例如，前列腺特异性蛋白酶切割位点可功能性置换 PA 的天然弗林蛋白酶切割位点（见图 4B）。该置换产生了在具有酶活性的前列腺特异性蛋白酶（例如 PSA、PSMA 或 HK2）存在下变得具有溶细胞活性的 MPP。合适的 PSA、PSMA 或 HK2 切割位点为本领域已知，并在下文描述。

[0130] 在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的 MPP 可通过缺失 nPP 的天然蛋白酶切割位点和插入前列腺特异性活化序列而产生。例如，可缺失 PA 的弗林蛋白酶切割位点（SEQ ID NO:2 的 427-432 位氨基酸），和插入前列腺特异性蛋白酶切割位点——例如 PSA 切割位点（见图 4B）。

[0131] 在另一个实施方案中，nPP 的天然蛋白酶切割位点被突变，使得它不再具有功能，且前列腺特异性活化序列被插入突变的蛋白酶切割位点内，或添加至天然的蛋白酶切割位点的 N 末端或 C 末端。例如，PA 的弗林蛋白酶切割位点可被致突变，并且前列腺特异性蛋白酶切割位点（例如 PSA 切割位点）可插入突变的弗林蛋白酶位点内或添加至突变的弗林蛋白酶位点的 N 末端或 C 末端（见图 4C）。

[0132] 在又一个实施方案中，前列腺特异性活化序列被添加至不具有天然存在的活化序列的 nPP。例如，不需要蛋白酶切割以活化而杀伤细胞的金黄色葡萄球菌 α -溶血素，可被设计成包括一个或多个前列腺特异性蛋白酶切割位点，由此使得它能够被选择性活化而杀伤前列腺细胞。

[0133] 前列腺特异性切割位点

[0134] 如上所述，各种前列腺特异性蛋白酶及其识别的蛋白酶切割位点为本领域已知。其实例包括，但不限于 PSA、PSMA 以及 HK2。

[0135] 在一个实施方案中，MPP 被修饰成包括含有 PSA 特异性切割位点的前列腺特异性活化序列。PSA 特异性切割位点为由前列腺特异性抗原（PSA）识别并选择和有效水解（切割）的氨基酸序列。PSA 是具有识别和水解特异性肽序列能力的丝氨酸蛋白酶。它以酶活性形式由前列腺细胞分泌，并当进入循环时失活。由于血液或除前列腺以外的正常组织均

不含有具有酶活性的 PSA, 因此 PSA 的蛋白水解活性可用于活化前列腺的 MPP。各 PSA 特异性切割位点为本领域已知。其实例包括, 但不限于 SEQ ID NO :5、8、11 和 14-21 所示的那些, 以及美国专利第 5,866,679、5,948,750、5,998,362、6,265,540、6,368,598 和 6,391,305 所公开的那些。在一个实施方案中, MPP 具有包括 SEQ ID NO :5 所示的 PSA 切割位点的活化序列。

[0136] 根据人精液凝固蛋白 I 和蛋白 II 的 PSA 切割图谱和基于纤维素膜的测定 (见表 3 和 Denmeade 等, Cancer Res., 57:4924-30, 1997), 其他的 PSA 特异性切割位点为已知, 并可用于产生本发明的修饰的 MPP。例如, 本发明的 MPP 可被修饰成包括表 3 所示的 PSA 切割位点中的一个, 如本领域已知, 该 PSA 切割位点可取代气单胞菌溶素原的野生型弗林蛋白酶活化位点 (SEQ ID NO :2 的 427-432 位氨基酸)。

[0137] 在一个实施方案中, MPP 具有 SEQ ID NO :3、4、6、7、9、10、12、13 和 24 的任一个的氨基酸序列, 所述氨基酸序列包括含有 PSA 切割位点的活化序列。

[0138] 表 3: PSA 底物 (PSA 切割位点) 和 PSA 水解的动力学 *

[0139]

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

[0140] * 肽被荧光标记 (氨甲基香豆素)。在 50mM Tris, 0.1M NaCl, pH7.8 中进行测定。

[0141] 在另一个实施方案中, MPP 包括含有 PSMA 特异性切割位点的前列腺特异性活化序列。合适的 PSMA 特异性切割位点的实例为本领域已知, 且可见于例如国际公布第 WO 02/43773 号。一般来说, PSMA 切割位点包括至少二肽 X_1X_2 。该二肽在 X_1 位置处含有氨基酸 Glu 或 Asp。 X_2 可为 Glu、Asp、Gln 或 Asn。三肽 $X_1X_2X_3$ 也是合适的, 其中 X_1 和 X_2 为如上所定义的, X_3 为 Glu、Asp、Gln 或 Asn。四肽 $X_1X_2X_3X_4$ 也是合适的, 其中 X_{1-3} 为如上所定义的, X_4 为 Glu、Asp、Gln 或 Asn。五肽 $X_1X_2X_3X_4X_5$ 也是合适的, 其中 X_{1-4} 为如上所定义的, X_5 为 Glu、Asp、Gln 或 Asn。六肽 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 也是合适的, 其中 X_{1-5} 为如上所定义的, X_6 为 Glu、Asp、Gln 或 Asn。更长序列长度的其他肽可以以相似方式构建。通常, 所述肽具有下列序列: $X_1 \cdots X_n$, 其中 n 为 2 至 30、2 至 20、2 至 15 或 2 至 6, 其中 X_1 为 Glu、Asp、Gln 或 Asn。在一个实施方案中, X_1 为 Glu 或 Asp, 且 X_2-X_n 独立选自 Glu、Asp、Gln 和 Asn。其他可能的肽序列如上所述, 除了 X_2-X_{n-1} 独立选自 Glu 和 Asp, 以及 X_n 独立选自 Glu、Asp、Gln 和 Asn。PSMA 切割位点的实例为 Asp-Glu、Asp-Asp、Asp-Asn、Asp-Gln、Glu-Glu-Glu、Glu-Asp-Glu、Asp-Glu-Glu、

Glu-Glu-Asp、Glu-Asp-Asp、Asp-Glu-Asp、Asp-Asp-Glu、Asp-Asp-Asp、Glu-Glu-Gln、Glu-Asp-Gln、Asp-Glu-Gln、Glu-Glu-Asn、Glu-Asp-Asn、Asp-Glu-Asn、Asp-Asp-Gln,以及 Asp-Asp-Asn。

[0142] 在另一个实施方案中, MPP 包括含有 HK2 特异性切割位点的前列腺特异性活化序列。HK2 特异性切割位点的实例也为本领域已知, 且在例如国际公布第 W0 01/09165 号中有所描述。HK2 识别的切割位点侧翼至少氨基酸序列 $X_4X_3X_2X_1$ 。该氨基酸序列在 X_1 位置处含有氨基酸精氨酸、组氨酸或赖氨酸。 X_2 可为精氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或组氨酸。 X_3 可为赖氨酸、丝氨酸、丙氨酸、组氨酸或谷氨酰胺。 X_4 可为 0 至 20 个其他的氨基酸, 并可为至少两个其他的氨基酸。在一个实施方案中, HK2 切割位点包括 X_4 的序列, 该序列与野生型精液凝固蛋白 I 或精液凝固蛋白 II 序列的 20 个氨基酸基本同一, 所述 20 个氨基酸为被识别的精液凝固蛋白切割位点的 N 末端侧的第 4 至第 24 个氨基酸。所述氨基酸序列可进一步包括 X_{-1} , 它与 X_1 的羧基端连接形成氨基酸序列 $X_4X_3X_2X_1X_{-1}$ 。 X_{-1} 具有达 10 个的其他氨基酸, 并可包括不同的氨基酸。 X_{-1} 可具有与 X_1 的羧基端连接的亮氨酸、丙氨酸或丝氨酸。 X_{-1} 可包括 L 或 D 氨基酸。HK2 切割位点位于 X_1 的羧基端侧。

[0143] HK2 切割位点的实例示于表 4 (注意: 符号) [表示 HK2 切割位点] :

[0144] 表 4 : 示例的 HK2 切割位点

[0145]

Lys-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 32	Ser-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 53
Ser-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 33	Ala-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 54
Ala-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 34	Ala-Arg-Arg][Ser	SEQ ID NO: 55
His-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 35	His-Arg-Arg][Ala	SEQ ID NO: 56
Gln-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 36	Gln-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 57
Ala-Phe-Arg][	SEQ ID NO: 37	Ala-Phe-Arg][Leu	SEQ ID NO: 58
Ala-Gln-Arg][	SEQ ID NO: 38	Ala-Gln-Arg][Leu	SEQ ID NO: 59
Ala-Lys-Arg][	SEQ ID NO: 39	Ala-Lys-Arg][Leu	SEQ ID NO: 60
Ala-Arg-Lys][	SEQ ID NO: 40	Ala-Arg-Lys][Leu	SEQ ID NO: 61
Ala-His-Arg][	SEQ ID NO: 41	Ala-His-Arg][Leu	SEQ ID NO: 62
Gln-Lys-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 42	His-Ala-Gln-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 63
Lys-Ser-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 43	Gly-Gly-Lys-Ser-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 64
Ala-Lys-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 44	His-Glu-Gln-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 65
Lys-Lys-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 45	His-Glu-Ala-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 66
His-Lys-Arg-Arg][	SEQ ID NO: 46	Gly-Gly-Gln-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 67
Lys-Ala-Phe-Arg][	SEQ ID NO: 47	His-Glu-Gln-Lys-Arg-Arg][Ala	SEQ ID NO: 68
Lys-Ala-Gln-Arg][	SEQ ID NO: 48	Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 69
Lys-Ala-Lys-Arg][	SEQ ID NO: 49	His-Glu-Gln-Lys-Arg-Arg][Ser	SEQ ID NO: 70
Lys-Ala-Arg-Lys][	SEQ ID NO: 50	Gly-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 71
Lys-Ala-His-Arg][	SEQ ID NO: 51	Gly-Gly-His-Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 72
Lys-Arg-Arg][Leu	SEQ ID NO: 52		

[0146] [0146] 前列腺特异性靶向结构域的添加

[0147] 在本发明的一个实施方案中, MPP 包括一个或多个前列腺特异性靶向结构域, 它们允许选择性靶向前列腺细胞。前列腺特异性靶向结构域能够引导 MPP 至前列腺细胞, 在那

里使 MPP 活化,并随后杀伤前列腺细胞。靶向结构域可以位于 MPP 的 N 末端或 C 末端,或者同时位于两者。可选地,靶向结构域可以位于 MPP 的其他区域,前提是其不影响 MPP 的成孔活性。

[0148] 合适的前列腺特异性靶向结构域的实例包括,但不限于诸如肽配体、毒素或者抗体这些对前列腺细胞比其他细胞类型具有更高特异性的分子。在一个实施方案中,前列腺组织特异性结合结构域在前列腺组织或细胞中具有比在其他细胞类型中更低的 K_D 值(即与其他正常组织相比能够选择性地结合前列腺组织),例如至少低 10 倍的 K_D ,至少低 20 倍、50 倍、75 倍、100 倍或甚至低 200 倍的 K_D 。这些分子可用于将 MPP 靶向至前列腺。其实例包括,但不限于:识别具有相对前列腺特异性的蛋白质(诸如 PSA、PSMA、HK2、prostasin 和 hepsin)的抗体;具有前列腺特异性受体的配体——诸如天然和人工合成的促黄体激素释放激素(LHRH);以及内皮素(与同源的内皮素受体结合)。

[0149] 在本发明的一个实施方案中,前列腺特异性靶向结构域的添加导致 nPP 的天然结合结构域功能性缺失。在另一个实施方案中,气单胞菌溶素原的天然非特异性 GPI 锚定蛋白结合结构域功能性缺失,并置换为前列腺特异性靶向结构域。图 4D 和图 5B 描述了衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的具体实例,这些 MPP 具有功能性缺失的天然结合结构域。图 4E、图 5A、图 5C 和图 5D 以及图 6A-6D 显示了衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的实例,这些 MPP 包括能够功能性取代气单胞菌溶素原的天然结合结构域的前列腺特异性靶向结构域。

[0150] 一个或多个前列腺组织特异性结合结构域能够与 MPP 的一个或多个氨基酸连接,而且理想地不明显干扰在细胞膜中形成孔的能力,或在适用的情况下,不明显干扰 MPP 被前列腺特异性的蛋白酶如 PSA 活化的能力。蛋白质或肽与 MPP 的接合方法为本领域已知,并包括,例如,在与前列腺组织特异性结合结构域连接之前改变蛋白质的 N 末端氨基酸修饰成 Cys 或其他氨基酸的,以有助于前列腺组织特异性结合结构域与 MPP 的连接。

[0151] 在一个实施方案中,前列腺组织特异性结合结构域连接至或是插入至衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的 N 末端和/或 C 末端(例如,见图 4E 和图 5C)。在一些实施例中,气单胞菌溶素原的天然结合结构域缺失(即 SEQ ID NO:2 或 4 的 1-83 位的氨基酸),使得前列腺组织特异性结合结构域与 N 末端的连接或相连导致连接至 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的 84 位氨基酸(例如,见图 5C 和图 6C)。在其他的实施例中,向气单胞菌溶素原的天然结合结构域中引入较小的缺失或点突变,使得前列腺组织特异性结合结构域与 N 末端的连接或相连导致连接至 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的第 1 位氨基酸(或任何一个在气单胞菌溶素原天然结合结构域功能性缺失之后的 N 末端的氨基酸)(例如,见图 4E 和图 5D)。

[0152] 作为前列腺特异性靶向结构域的抗体

[0153] 在一个实施方案中,前列腺特异性靶向结构域是一种特异性结合于与前列腺细胞相关的抗原的抗体或者抗体片段,由此将 MPP 靶向前列腺细胞。可以被所述前列腺特异性靶向结构域特异性结合的与前列腺细胞相关的抗原包括 PSA、PSMA 和 LHRH 受体,它们在前列腺细胞中的表达量升高。可以使用现有技术中公知的基因融合的方法将抗体与 MPP 的 N 末端或 C 末端相连(例如,参见 Debinski 和 Pastan, Clin. Cancer Res. 1:1015-22, 1995)。可选地,可以通过共价交联将抗体与 MPP 相连(例如,参见 Woo 等, Arch. Pharm. Res. 22(5):459-63, 1999; Debinski 和 Pastan, Clin. Cancer Res. 1(9):1015-22, 1995)。交联可以是非特异性的,如利用同型双功能-赖氨酸反应性交联剂;或者,交联也可以是特异性的,如

利用与抗体上的氨基和与位于 MPP 上的半胱氨酸残基反应的交联剂。在一个实施方案中,气单胞菌溶素原的氨基酸诸如 SEQ ID NO:2 的 Cys19、Cys75、Cys159 和 / 或 Cys164 可用于将抗体与修饰的气单胞菌溶素原分子交联。例如,抗体可以取代待被修饰的 nPP 的天然结合结构域;或者抗体能够添加至天然结合结构域中已经具有突变的 MPP。这样的 MPP 还可以包括增加其特异性的前列腺特异性活化序列。在一个实施方案中,抗体是与 PA 毒素结构域融合的 PSMA 的单链抗体。

[0154] 合适的抗体包括完整的抗体以及抗体片段,例如,诸如 (i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段;(ii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iii) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(iv) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward 等, *Nature* 341:544-6, 1989);(v) 分离的互补决定区 (CDR);和 (vi) F(ab')₂ 片段,其为包括两条在绞链区通过二硫桥键连接起来的 Fab 片段的二价片段。合适的抗体包括单链的 Fv 抗体和骆驼化抗体 (例如,见 Tanha 等, *J. Biol. Chem.* 276:24774-80, 2001), 其中单链的 Fv 抗体是通过重组的方法使 Fv 片段的两个结构域通过合成的连接体 (linker) 连接来制备的 (Bird 等, *Science* 242:423-6, 1988; 和 Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-83, 1988)。

[0155] 在另一个实施方案中,抗体片段能够交联其靶抗原,例如,诸如 F(ab')₂ 片段的二价片段。或者,本身不能跟其靶抗原交联的抗体片段 (如 Fab 片段) 可连同用以交联抗体片段的二级抗体一起使用,从而与靶抗原交联。可使用常规技术使抗体片段化,并如针对完整抗体所述的和本领域已知的相同方法筛选片段的实用性。抗体还意在包括特异性结合靶抗原的纳米抗体、双特异性分子和嵌合体分子。

[0156] “特异性结合”,当用于提及抗体时,是指各抗体与特定抗原特异性地发生免疫反应的能力。抗体分子与抗原的抗原决定簇的结合是非随机的结合反应。合需的结合特异性一般是由抗体对特定的和无关的抗原的不同结合能力的参考点来决定的,并因此区别两种不同的抗原,尤其是两种具有独特表位的抗原。特异性结合特定表位的抗体被称为“特异性抗体”。

[0157] 作为前列腺特异性靶向结构域的小肽配体

[0158] 在一个实施方案中,前列腺特异性靶向结构域是与表达于前列腺细胞膜上的关联 (cognate) 的前列腺特异性受体相结合的小肽配体。其实例包括,但不限于以高亲和力与 LHRH 受体结合的天然和合成的促黄体激素释放激素 (LHRH) 激动剂肽 (例如,见 Genbank 登录号 CAA25526 和 SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23), 和能够选择性地结合 PSMA 的肽。前列腺细胞以及仅少数其他细胞展示有 LHRH 受体。这种差异性表达提供了结合的特异性。

[0159] 可如本领域已知对小肽配体进行修饰,以促进其与 MPP 连接。例如, LHRH 的某些残基,如第 6 位的 Gly (Gly6) 可以被取代而不影响受体结合亲和力 (Janaky 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:972-6, 1992; Nechushtan 等, *J. Biol. Chem.*, 272:11597-603, 1997)。因此, MPP (其中天然结合结构域功能性缺失) 可以通过与纯化的 LHRH D-Lys6 (该赖氨酸的 ϵ -胺) 共价偶联而产生。

[0160] LHRH D-Lys6 (SEQ ID NO:23) 可以在 nPP 内的不同位置连接而提供具有前列腺特异性靶向结构域的 MPP。如上所述,小肽配体的连接不会显著干扰毒素插入膜形成孔的能力。例如,可使用本领域已知的方法如通过二羧酸连接体将 D-Lys6 类似物的 ϵ -胺与 MPP 的氨基末端偶联。通过活化序列的切割而引起的 MPP 的活化将导致 C 末端抑制性部分的释

放,而毒素仍然与 LHRH 受体结合。

[0161] 可选地或另外,小肽配体可以直接与 MPP 的 C 末端偶联。例如,LHRH 的 D-Lys6 类似物的 ϵ -胺能够通过下述方式直接与 MPP 的 C 末端羧基偶联:在 MPP 的 C 末端添加 Cys,然后使这个 Cys 与 LHRH 的 D-Lys6 类似物的 ϵ -胺交联。这种偶联将产生其中 LHRH 肽与 C 末端抑制性结构域相连的 MPP。通过活化序列的切割引起的 MPP 的活化将释放出 MPP,并且留下抑制性片段与 LHRH 受体结合。另外,可以制备其中修饰的 LHRH 肽与 MPP 的 N 末端和 C 末端两者融合的重组融合蛋白。

[0162] 还考虑了小肽配体可以通过二硫桥键与 MPP 连接。例如,向 LHRH 肽的第 6 位引入半胱氨酸残基,并且该肽通过二硫桥键与 MPP 连接。天然的 nPP 序列中可以存在肽与之形成二硫桥键的半胱氨酸,或者 nPP 可突变成包括半胱氨酸残基。在一个实施方案中,衍生自 PA 的 MPP 可以在例如 SEQ ID NO:2 的 215 和 / 或 300 位氨基酸处引入半胱氨酸残基,其中 215 和 / 或 300 位氨基酸突变成半胱氨酸。

[0163] 在另一个实施方案中,制备了其中 LHRH 肽与 MPP 的氨基末端融合的重组蛋白。

[0164] 可选地或另外,MPP 可以通过一个或多个前列腺特异性靶向结构域与 MPP 的其他氨基酸的连接或相连而产生。例如,对于衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 而言,诸如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的 215 或 300 位氨基酸的氨基酸(例如,见图 5A、图 5D、图 6B 和图 6D)可以用于与一个或多个前列腺特异性靶向结构域连接。在一些实施例中,Cys 氨基酸取代了原有位置的天然氨基酸。例如,可以对 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 做如下改变:Tyr215Cys 或 Ala300Cys。可选地,可以利用存在于 nPP 天然序列的半胱氨酸残基。对于衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 而言,诸如 SEQ ID NO:2 的 Cys19、Cys75、Cys159 和 / 或 Cys164 氨基酸的氨基酸适用于此目的。

[0165] 在一个实施方案中,MPP 衍生自气单胞菌溶素原,且具有选自 SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:25 的序列,它们包括作为前列腺特异性靶向结构域的 LHRH。

[0166] MPP 天然结合结构域的修饰

[0167] 本发明的 MPP 衍生自本领域已知的含有一个或多个结合结构域的 nPP。在本发明的全文中,当 nPP 包括一个结合结构域时,则被认为是“大叶结合结构域”。根据适用范围,本发明的 MPP 可以包括一个或多个结合结构域的修饰。例如,气单胞菌种的天然的气单胞菌溶素原包括两个结合结构域:小片结合结构域和大叶结合结构域。相比之下,败血梭状芽胞杆菌的天然的 α -毒素仅包括大叶结合结构域。在一个实施方案中,结合结构域的修饰包括结合结构域的功能性缺失。MPP 中功能性缺失的结合结构域导致 MPP 与其细胞表面受体结合能力减退,但是仍然保留成孔能力。功能性缺失可以通过 MPP 的一个或多个结合结构域的缺失或突变而产生。在一个实施方案中,整个结合结构域或其部分可缺失。在另一个实施方案中,将异源序列插入至结合结构域,也可以用于使结合结构域功能性缺失。这些异源序列的添加可以赋予 MPP 其他的功能(即结合结构域的功能性置换)。例如,异源序列的添加可以导致添加作为本申请所述的前列腺特异性靶向结构域而起作用的区域。在又一个实施方案中,也可以对 nPP 天然结合结构域的氨基酸序列进行点突变,以降低结合结构域与其受体结合的能力。有关这些修饰的其他细节在下文描述。

[0168] 缺乏结合结构域的 MPP 保留其溶细胞活性,但是需要以较高剂量施用以确保细胞膜中毒素的浓度。可使用本领域已知的方法来制备具有结合结构域功能性缺失的 MPP。这

些方法包括如 Sambrook 等（如上文所述）所述的 DNA 重组技术的使用。可选地，还可以根据本领域已知的方法通过蛋白质自身的直接修饰实现结合结构域的功能性缺失，例如蛋白水解产生 MPP 片段，然后这些片段可以利用化学方法连接在一起。

[0169] 在本发明的一个实施方案中，MPP 通过它的小片结合结构域（SBD）的功能性缺失而被修饰。示例的 SBD 的功能性缺失可以如下文所述在嗜水气单胞菌的气单胞菌溶素原多肽中进行。整个 SBD，即对应于 SEQ ID NO:2 的 1-83 位氨基酸可以缺失，或者该区域的部分如 SEQ ID NO:2 的 45-66 位氨基酸可以缺失。可选地，可以如下文所述在 W45A、I47E、M57A、Y61A、K66Q（氨基酸编号涉及 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4）并如 Mackenzie 等，J. Biol. Chem. 274:22604-22609, 1999 中所述进行点突变。描述在结合结构域中具有一个或多个突变的 MPP 的实例的示意图示于图 4D，其中 * 表示一个或多个突变或缺失。

[0170] 在本发明的一个实施方案中，nPP 通过其大叶结合结构域（LBD）的功能性缺失而被修饰。气单胞菌溶素原的 LBD（含在 SEQ ID NO:2 的大约 84-426 位氨基酸残基中）的典型功能性缺失可以按下述方法来提供 MPP。气单胞菌溶素原的整个 LBD 可以缺失。可选地，在本发明的一个实施方案中，衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 的 LBD 区域包括氨基酸残基 Y162、W324、R323、R336 和 / 或 W127 的一个或多个点突变。在本发明的另一实施方案中，衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 在 W127 和 / 或 R336 位置包括一个或多个点突变。在又一个实施方案中，衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 包括点突变 Y162A 和 / 或 W324A。在另一个实施方案中，衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 包括点突变 R336A、R336C 和 / 或 W127T。在另一个实施方案中，MPP 包括与 GPI 蛋白配体直接相互作用的其他残基的突变。

[0171] 衍生自 α -毒素的 MPP 的 LBD 的典型突变如下所述，并包括 α -毒素受体结合结构域中的至少一个取代的氨基酸，所述 α -毒素受体结合结构域包括 SEQ ID NO:33 所示的天然的 α -毒素序列的 53、54、62、84-102、259-274 和 309-315 位氨基酸残基。在本发明的一个实施方案中，衍生自 α -毒素的 MPP 包括如下一个或多个残基的突变：W85、Y128、R292、Y293 和 R305。

[0172] MPP 的进一步修饰

[0173] 本发明考虑了不影响 MPP 选择性靶向前列腺细胞的能力的 MPP 的进一步修饰。这些修饰包括氨基酸的取代、插入或者缺失、减少 MPP 抗原性的修饰，以及增强 MPP 稳定性或改善 MPP 的药代动力学的修饰。在一个实施方案中，对 MPP 的进一步修饰产生仅少数氨基酸与 MPP 不同的多肽。这些修饰包括缺失（例如 1-3 或更多的氨基酸）、插入（例如 1-3 或更多的残基）或取代，它们不影响 MPP 选择性靶向并杀伤正常前列腺细胞的能力。在一个实施方案中，对 MPP 的进一步修饰产生下述多肽：即其保留与 MPP 具有至少 70%、80%、85%、90%、95%、98% 或更高的序列同一性，并维持 MPP 选择性靶向并杀伤正常前列腺细胞的能力。

[0174] MPP 可以通过取代来进行修饰，借此，氨基酸序列中的至少一个残基被去除，且不同的残基在其位置插入。在一个实施方案中，取代为保守置换。保守置换是指用具有相似生化特性的氨基酸残基来取代一个或多个氨基酸（例如 2、5 或 10 个残基）。通常，保守置换对产生的多肽的活性几乎没有影响。例如，理想地，含有一个或多个保守置换的 MPP 保留对应的 nPP 的活性。用于取代蛋白质的初始氨基酸并被认为是保守置换的氨基酸的实例包括：Ser 取代 Ala；Lys 取代 Arg；Gln 或 His 取代 Asn；Glu 取代 Asp；Ser 取代 Cys；Asn 取代

Gln ;Asp 取代 Glu ;Pro 取代 Gly ;Asn 或 Gln 取代 His ;Leu 或 Val 取代 Ile ;Ile 或 Val 取代 Leu ;Arg 或 Gln 取代 Lys ;Leu 或 Ile 取代 Met ;Met、Leu 或 Tyr 取代 Phe ;Thr 取代 Ser ;Ser 取代 Thr ;Tyr 取代 Trp ;Trp 或 Phe 取代 Tyr ;以及 Ile 或 Leu 取代 Val。

[0175] 可使用例如标准方法如定点诱变或 PCR 对编码多肽的核苷酸序列进行操作来将 MPP 修饰成包括一个或多个保守置换。关于保守置换的其他信息除了其他处以外还可见于：Ben-Bassat 等, (J. Bacteriol. 169 :751-7, 1987) ;O' Regan 等, (Gene 77 :237-51, 1989) ;Sahin-Toth 等, (Protein Sci. 3 :240-7, 1994) ;Hochuli 等, (Bio/Technology 6 :1321-5, 1988) ;WO 00/67796 (Curd 等) 以及遗传学和分子生物学标准教科书。

[0176] 在另一个实施方案中,这种取代是允许的取代。允许的取代是氨基酸的非保守置换,但是也不明显改变 MPP 活性。例如,在气单胞菌溶素原多肽序列 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4 的第 300 位用 Cys 取代 Ala。

[0177] 在一个实施方案中, MPP 被修饰成包括单个残基的一个或多个氨基酸取代。在另一个实施方案中, MPP 被修饰成包括一个氨基酸取代。在另一个实施方案中, MPP 被修饰成包括大约 2 个至大约 10 个氨基酸取代。在另一个实施方案中, MPP 被修饰成包括大约 3 个至大约 5 个氨基酸取代。

[0178] 衍生自气单胞菌溶素原的 MPP 进一步修饰的非限制性实例列于表 5。

[0179] 表 5 :衍生自天然气单胞菌溶素原多肽的 MPP 的示例的单个突变

H107N	G202C	G251C	T284C	H341N
K22C	H121N	W203C	E252C	V285C
W127T	T253S	V293C	K361C	N459C
C164S	D216C	T253C	K294C	K369Q
Q254C	K294Q	W371L	D372N	I445C
Y135A	R220Q	E296C	K299C	K349C
Y135F	K171C	K238C	W373L	A418C
K22C	A300C	S256C	K309C	H332N
H186N	P248C	E258C	I416C	Q263C
K198C	L249C	I259C	G417C	
K114C	C159S	V201C	V250C	

[0180]

[0181] 还考虑了拟肽 (peptidomimetic) 和拟有机物 (organomimetic) 的实施方案,由此所述拟肽和拟有机物的化学组分的三维排列模拟多肽 骨架和多肽的氨基酸侧链组件的三维排列,从而产生具有溶解前列腺细胞的能力的 MPP 的所述拟肽和拟有机物。对于计算机模型的应用,药效基团是理想化的,具有生物学活性需要的结构的三维空间定义。利用目前的计算机模型软件 (使用计算机辅助的药物设计或 CADD) 来设计拟合各药效基团的拟肽和拟有机物,见 Walters, " Computer-Assisted Modeling of Drugs" , in Klegerman & Groves, eds. ,1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press :Buffalo Grove, Ill., 第 165-174 页和 Principles of Pharmacology (ed. Munson, 1995), 102 章关于 CADD

使用技术的描述。

[0182] 对 MPP 所做的其他修饰包括,例如,对于 MPP 的无论位于羧基末端或侧链的羧酸基团的修饰,其中这些基团为药学上可接受的阳离子的盐形式,或被酯化形成 C_1-C_{16} 酯,或转化为式 NR_1R_2 的酰胺,其中 R_1 和 R_2 为各自独立的 H 或者 C_1-C_{16} 烷基,或组合形成杂环,诸如 5 元环或 6 元环。不管是氨基末端还是侧链的多肽的氨基,都可为药学上可接受的酸加成盐的形式,诸如 HCl 盐、HBr 盐、乙酸盐、苯甲酸盐、甲苯磺酸盐、马来酸盐、酒石酸盐以及其他有机盐,或可以修饰成 C_1-C_{16} 烷基或二烷基氨基或进一步转化为酰胺。

[0183] 其他修饰包括使用公知技术将多肽侧链的羟基转化成 C_1-C_{16} 烷氧基或转化成 C_1-C_{16} 酯。多肽侧链的苯环和酚环可以用诸如 F、Cl、Br 或者 I 的一个或多个卤素原子来取代,或者用 C_1-C_{16} 烷基、 C_1-C_{16} 烷氧基、羧酸及其酯类,或这些羧酸的酰胺来取代。多肽侧链的亚甲基可以扩展至同系的 C_2-C_4 亚烷基。巯基可以用许多公知的保护基团中的任何一种来保护,如乙酰胺基团。本领域技术人员也会知道将环状结构引入本申请所述的多肽以选择和提供导致稳定性增强的对于结构的构象约束的方法。例如,可以将羧基末端或氨基末端半胱氨酸残基添加至多肽,使得当多肽被氧化时含有二硫键,从而产生环肽。其他肽环化的方法包括硫醚、羧基末端和氨基末端酰胺以及酯类的形成。

[0184] 本发明还考虑到对 MPP 进行进一步的修饰,其中将 MPP 连接或者固定至诸如珠的表面。所述珠还可包括增加对前列腺细胞靶向性的前列腺特异性配体。固定化的指的是结合至表面,如固体表面。固体表面可以是聚合物的,如聚苯乙烯或聚丙烯。固体表面可以是珠的形式。在一个实施方案中,表面包括固定化的 MPP,而在其他实施方案中还包括一个或多个前列腺特异性结合配体,如 LHRH 肽、PSMA 抗体以及 PSMA 单链抗体。在另一个实施方案中,一旦所述珠到达前列腺细胞靶,MPP 就从所述珠上释放出来。在固体表面固定化肽的方法为本领域已知,并可见于 WO 94/29436 和美国专利第 5,858,358 号。

[0185] 本发明还考虑了 MPP 可以包括进一步的修饰,所述修饰的目的是当 MPP 施用于受治疗者时,改善分子的药代动力学特性。能够降低治疗蛋白的免疫原性和/或增加治疗蛋白质的半衰期的各种修饰为本领域已知。例如,根据本领域已知的标准方法,MPP 可以经受糖基化、异构化或去糖基化。类似地,MPP 可以通过非天然存在的共价修饰来修饰,如通过添加聚乙二醇部分(聚乙二醇化)或者脂化。在一个实施方案中,本发明的 MPP 能够与聚乙二醇结合(PEG 化)以促进其药物代谢分布。可通过本领域技术人员已知的技术进行结合(参见,例如 Deckert 等, *Int. J. Cancer* 87:382-390,2000;Knight 等, *Platelets* 15:409-418,2004;Leong 等, *Cytokine* 16:106-119,2001;和 Yang 等, *Protein Eng.* 16:761-770,2003)。在一个实施方案中,可以通过诱变来鉴定和改变抗原表位。如同使这些抗原表位突变的方法一样,鉴定抗原表位的方法也为本领域所已知(参见,例如 Sette 等, *Biologicals* 29:271-276)。

[0186] 制备 MPP 的方法

[0187] 本发明的 MPP 可以通过许多本领域已知的标准方法来制备。可通过例如使用 DNA 重组技术对编码 MPP 的核苷酸改造而修饰 MPP。或者,对 MPP 的修饰可以用化学修饰和/或限制性蛋白水解对 MPP 多肽自身进行修饰来实现。如同样为本领域所已知的,这些方法的组合也可用于制备本发明的 MPP。

[0188] 使用重组方法制备 MPP

[0189] 如本领域已知的,蛋白质的基因工程一般需要首先将编码蛋白质的核苷酸进行分离和克隆。不同 nPP 的序列可以从如本申请所述的 GenBank 获得。分离和克隆编码这些蛋白质的核苷酸序列可以因此通过采用标准的技术来实现(参见,例如 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, NY(1997 and updates); Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold-Spring Harbor Press, NY(2001))。例如,通过标准技术提取 mRNA,然后从 mRNA 模板合成 cDNA(例如通过 RT-PCR),可以直接从合适的生物体如嗜水气单胞菌获得核苷酸序列。或者,通过标准程序可以从适当的 cDNA 或基因组 DNA 文库获得编码 nPP 的核苷酸序列。然后将分离的 cDNA 或基因组 DNA 插入至合适的载体。本领域技术人员应当理解所用的精确载体对于本发明而言不是关键要素。合适载体的实例包括,但不限于:质粒、噬菌粒、粘粒、噬菌体、杆状病毒、逆转录病毒或者 DNA 病毒。载体可以是克隆载体,或可以是表达载体。

[0190] 一旦获得了编码 nPP 的核苷酸序列,就可通过本领域公知的体外定点诱变技术在特定的预选位置引入一个或多个结合结构域或活化序列的突变。可以通过一个或多个组成编码序列的合适核苷酸的缺失、插入、取代、倒位或其组合来引入突变。例如,这可通过将引物设计为引入一个或多个核苷酸的错配、插入或缺失等基于 PCR 的技术来实现。突变的存在可以通过多种标准技术,如限制酶切分析或 DNA 测序来证实。

[0191] 如果需要的话,在引入一个或多个合适的突变之后,可以将编码 MPP 的核酸序列插入至合适的表达载体。合适的表达载体的实例包括,但不限于:质粒、噬菌粒、粘粒、噬菌体、杆状病毒和逆转录病毒,以及 DNA 病毒。

[0192] 本领域技术人员应当理解,表达载体还可包括调控元件,如 MPP 编码序列有效转录所需的转录元件。可掺入载体的调控元件的实例包括,但不限于启动子、增强子、终止子和多聚腺苷酸化信号。因此,本发明提供了含有与编码基因工程 MPP 的核苷酸序列操作性连接的调控元件的载体。本领域技术人员应当理解对合适的调控元件的选择取决于所选用于表达基因工程 MPP 的宿主细胞,并且这些调控元件可来自多种来源,包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物或昆虫基因。

[0193] 例如,对睾酮和其他雄激素起反应的前列腺特异性启动子,可用于启动前列腺细胞中的基因的表达。其实例包括,但不限于 probasin 启动子、前列腺特异性抗原(PSA)启动子、前列腺特异性膜抗原(PSMA)启动子,以及人腺体激肽释放酶 2(HK2)启动子。

[0194] 在本发明中,表达载体还可以含有利于纯化表达的 MPP 的异源核苷酸序列。这些异源核苷酸序列的实例包括,但不限于:亲和标签如金属亲和标签、组氨酸标签、亲和素/链亲和素编码序列、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)编码序列以及生物素编码序列。根据本领域已知方法可以在使用前将对应于核苷酸表达的氨基酸从表达的 MPP 去除。或者,对应于异源核苷酸序列表达的氨基酸可以保留在 MPP 上,前提是它们不干扰 MPP 靶向和杀伤前列腺细胞的能力。

[0195] 在本发明的一个实施方案中,MPP 作为具有组氨酸标签的蛋白质表达。在另一个实施方案中,组氨酸标签位于 MPP 的羧基末端。

[0196] 可以通过本领域已知的多种方法之一将表达载体引入至合适的宿主细胞或组织。这些方法通常可见于 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, NY(1997 and updates); Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

Cold-Spring Harbor Press, NY(2001), 并包括例如稳定或瞬时转染、脂质体转染、电穿孔以及使用重组病毒载体的感染。本领域技术人员应理解, 对于 MPP 表达的合适宿主细胞的选择取决于所选载体。宿主细胞的实例包括, 但是不限于细菌、酵母、昆虫、植物以及哺乳动物细胞。

[0197] 另外, 可以选择调节插入序列的表达或以特定的所需方式修饰和加工基因产物的宿主细胞。蛋白质产物的这些修饰(如糖基化)和加工(如切割)对于蛋白质的功能是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白质和基因产物翻译后加工以及修饰的特征性的和特定的机制。可选择适合的细胞系或宿主系统, 以确保所表达的外源蛋白的正确修饰以及加工。为此, 可使用具有对初级转录本进行适当加工以及翻译后修饰(如基因产物的糖基化以及磷酸化)的细胞机制(cell machinery)的真核宿主细胞。这些哺乳动物宿主细胞包括, 但不限于 CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38。

[0198] 克隆以及表达蛋白质的方法为本领域所公知, 重组蛋白表达的技术以及系统的详细说明可见于例如 Current Protocols in Protein Science(Coligan, J.E., 等, Wiley & Sons, New York)。分子生物学领域的技术人员应理解, 多种多样的表达系统可用于提供重组蛋白。所用的宿主细胞对本发明来说不是关键的。因此, 本发明考虑到可以在原核宿主(如大肠杆菌(E. coli), 杀鲑气单胞菌或枯草芽胞杆菌)或真核宿主(如酵母菌或毕赤酵母菌(Pichia); 哺乳动物细胞, 如 COS、NIH 3T3、CHO、BHK、293 或 HeLa 细胞; 或昆虫细胞)中制备 MPP。

[0199] 可根据本领域已知的标准技术从宿主细胞中纯化 MPP。如果需要, 可通过使用完整蛋白质或其蛋白水解片段的标准肽测序技术来测定设计入蛋白质的氨基酸序列的改变。

[0200] 作为将突变引入天然存在的成孔蛋白的定向方法的替代方法, 可通过本领域已知的技术使得表达成孔蛋白的克隆基因经受随机诱变。接着表达和筛选由此产生的蛋白质突变体形式, 使得能够鉴定和分离本发明的 MPP。

[0201] 本发明的 MPP 还可以制备成片段或融合蛋白。融合蛋白是包括与不抑制 MPP 选择性靶向和杀伤正常前列腺细胞能力的其他氨基酸序列相连的 MPP 的蛋白质。在一个实施方案中, 其他氨基酸序列为不超过 5、6、7、8、9、10、20、30 或 50 个氨基酸残基的长度。

[0202] 制备融合蛋白的方法为本领域技术人员所公知。例如美国专利第 6, 057, 133 号公开了制备融合分子的方法, 所述融合分子由人白细胞介素-3(hIL-3) 变异体或突变体蛋白与另一集落刺激因子、细胞因子、淋巴因子、白细胞介素、造血生长因子或 IL-3 变异体功能性连接而构成。授予 Davis 等的美国专利第 6, 072, 041 号公开了包括单链 Fv 分子的融合蛋白的生成, 其中所述单链 Fv 分子定向于与治疗蛋白共价连接的胞转受体(transcytotic receptor)。

[0203] 相似的方法可用于生成包括连接其他氨基酸序列如前列腺特异性靶向结构域(如 LHRH 或抗体)的 MPP(或其变异体、片段等)的融合蛋白。连接区可用于使蛋白质的两个部分彼此隔开并提供它们之间的柔性。连接区通常是 1-500 个氨基酸长度的多肽, 如小于 30 个氨基酸长度。一般而言, 连接两分子的连接体可被设计成: (1) 允许两分子能够彼此独自折叠和起作用, (2) 不具有形成会干扰两个蛋白质的功能结构域的有序二级结构的偏向性, (3) 具有最低的与蛋白质功能结构域相互作用的疏水性或带电特性, 和 / 或 (4) 提供两个区域的空间上的分离。柔性蛋白区域的典型表面氨基酸包括 Gly、Asn 和 Ser。其他的

中性氨基酸（如 Thr 和 Ala）也可用于连接序列。连接体还可包括提供连接序列中的独特性位点以利于构建融合体。根据需要，还可包括其他部分。这些可包括可用于纯化和加工融合蛋白的结合区，（如亲和素或表位）或标签（如多组氨酸标签）。另外，可将可检测的标记物与融合蛋白连接，这样可以方便地监测融合蛋白经过机体或细胞的运送（traffic）。这些标记物包括放射性核素、酶、荧光团等等。

[0204] MPP 核苷酸序列与其他蛋白质（或变异体，其片段）核苷酸序列的融合可以通过使用中间的载体来实现。或者，可以将一个基因直接克隆至含有其他基因的载体中。连接体和适体（adapter）可用于连接核苷酸序列和取代丢失序列（loss sequence），其中限制性酶切位点在感兴趣的区域内。将编码一种多肽、肽连接体以及其他多肽的基因物质（DNA）插入至合适的表达载体用于转化原核或真核细胞，所述原核或真核细胞如细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞。培养转化的生物体，并通过标准技术分离蛋白质，例如，如果使用了多组氨酸标签，则通过使用可检测标记物的如镍-螯合物亲和层析来分离蛋白质。因此，所产生的产物是一种新蛋白质——具有任选通过连接体与另一蛋白质连接的 MPP 的融合蛋白。为了确认融合蛋白被表达，纯化的蛋白质例如可进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，以及用已建立的方法转移至硝酸纤维素膜滤器上。通过蛋白质印记分析，使用针对各组分即多组氨酸标签和 / 或 MPP 的抗体来鉴定蛋白产物。

[0205] 如果本发明的 MPP 通过表达融合基因而产生，那么肽键就作为 MPP 与前列腺特异性靶向结构域的连接体起作用。例如，可根据本领域已知的方法，如 Huston 等，Meth. Enzymol. 203 :46-88, 1991, 来制备抗体的单链 Fv 片段与成孔蛋白毒素的重组融合蛋白。

[0206] 本领域普通技术人员应当理解，可以使用多种方法对 DNA 进行改变，而不影响所编码的蛋白质的生物学活性。例如，PCR 可用于使编码 MPP 的 DNA 序列产生变异。这些编码 MPP 的 DNA 序列的变异，可用于优化用于表达蛋白质的宿主细胞中密码子的偏爱性，或可以含有其他有利于表达的序列改变。

[0207] 制备 MPP 的其他方法

[0208] 前列腺特异性靶向结构域和上文所述的任选的连接体可以通过共价键或非共价键或两者一起连接至本发明的 MPP。非共价相互作用可以是离子、疏水或者亲水的，诸如涉及亮氨酸拉链的相互作用或抗体-蛋白 G 相互作用（Derrick 等，Nature 359 :752, 1992）。其他非共价相互作用的实例包括但不限于下列结合对：抗原或半抗原和抗体；抗体和抗-抗体；受体和配体；酶或酶片段和底物，底物类似物或配体；生物素或凝集素和亲和素或链亲和素；凝集素和碳水化合物；亮氨酸对拉链基序（见，例如美国专利第 5,643,731 号），以及本领域已知的各种同型二聚体以及异型二聚体。如本领域已知，MPP 可以被修饰成包括结合对的一个成员，且前列腺特异性靶向结构域可以被修饰成包括结合对的另一个成员。

[0209] 共价键可以采用二硫键的形式。编码这些组分之一 DNA 序列可以被设计为含有唯一的半胱氨酸密码子。可选地，可以使用天然存在的半胱氨酸残基。第二组分可以使巯基与第一组分的半胱氨酸反应而衍生。可选地，巯基自身或作为半胱氨酸残基部分的巯基可以使用固相多肽技术引入。例如，Hiskey (Peptides 3 :137, 1981) 所述的将巯基引入肽。

[0210] 蛋白质可以通过标准技术添加巯基来进行化学修饰。例如，Traut's 试剂（2-亚氨基硫醇（iminothioline）-HCl）（Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）可用于在伯胺诸如

赖氨酸残基或 N 末端胺上引入巯基。然后用 Traut' s 试剂修饰过的蛋白质或肽可与用试剂诸如 N- 琥珀酰亚胺基 (succinimidyl) 3-(2- 吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP) 或琥珀酰亚胺基 4-(N- 马来酰亚胺甲基) 环己烷 -1- 羧酸酯 (SMCC) 修饰过的蛋白质或肽发生反应 (Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)。

[0211] 一旦各组分存在恰当的巯基,则纯化这两个组分,还原各组分的巯基;将组分混合;并在室温下完成二硫键的形成。为了提高偶联反应的效率,可在如半胱氨酸-MPP 的组分之一半胱氨酸残基添加至反应混合物之前,通过本领域已知的方法,使用 5,5' - 二硫代双(2- 硝基苯甲) 酸 (DTNB) 或 2,2' - 二硫代吡啶对其进行活化。反应后,用磷酸盐缓冲生理盐水将混合物进行透析,以去除未偶联的分子。然后,进行葡聚糖凝胶层析等来基于大小而分离本发明化合物与其组分。

[0212] 还可以使用 Maiti 等, Int. J. Cancer Suppl. 3 :17-22, 1988 所述的聚合体-单甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 来连接组分。

[0213] 前列腺特异性靶向结构域与 nPP 或 MPP 也可以通过使用本领域已知的标准的偶联化学方法进行偶联,诸如碳化二亚胺介导的偶联(例如, DCC、EDC 或活化的 EDC),以及使用 2- 亚氨基硫醇来将 ϵ - 氨基转化成用于交联的巯基,并使用 m- 马来酰亚胺苯甲酰基-n- 羟基琥珀酰亚胺基酯 (MBS) 作为交联剂。本领域已知的各种其他的偶联方法可用于结合前列腺特异性靶向结构域与 nPP 或 MPP。

[0214] MPP 的大量制备

[0215] MPP 的制备也可使用本领域已知的标准技术大量进行,以便用于例如生产的目的,其中所述标准技术诸如用于生产重组蛋白的大规模发酵过程,以及用于重组蛋白纯化的超滤法、离子交换层析法、固定化的金属离子亲和层析法。

[0216] 检测 MPP 的方法

[0217] 本发明的 MPP 保留其成孔活性并且选择性杀伤前列腺细胞。可使用本领域已知的标准方法检测 MPP 选择性杀伤前列腺细胞的能力。下文及本申请包括的实施例中提供了检测候选 MPP 的示例方法。本领域技术人员应当理解,检测候选 MPP 的其他方法为本领域已知且也适于检测本发明的 MPP。

[0218] 体外方法

[0219] 含有前列腺特异性活化序列的本发明的 MPP,可根据本领域已知的方法检测其被合适的前列腺特异性蛋白酶切割的能力。例如,将不同浓度的合适的蛋白酶与 MPP 一起温育,然后将温育产物在 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳,且通过检测凝胶上多肽的大小来评定 MPP 的切割。

[0220] 为了确定与蛋白酶温育的 MPP 是否保留成孔活性,以及由此在与蛋白酶温育后保留杀伤细胞的能力,可使用本领域已知的溶血测定来检测反应产物。合适的测定的实例在 Howard, S. P., and Buckley, J. T. 1985. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. J. Bacteriol. 163 :336-340 中有描述。

[0221] 可根据本领域已知的方法来检测本发明的 MPP 杀伤前列腺细胞的能力。例如,可以使用合适的前列腺细胞系在体外测定 MPP 杀伤前列腺细胞的能力。通常,将所选的检测细胞系的细胞培养至适当的密度,并添加候选 MPP。在适当的培养时间后(例如,大约 48-72 小时),评定细胞存活率。测定细胞存活率的方法为本领域所公知,并且其包括,但不限于

刃天青还原试验 (见 Fields & Lancaster(1993)Am. Biotechnol. Lab. 11:48-50; O'Brien 等, (2000)Eur. J. Biochem. 267:5421-5426 以及美国专利第 5,501,959 号), 硫代若丹明分析法 (Rubinstein 等, (1990)J. Natl. Cancer Inst. 82:113-118), 或者中性红染料试验 (Kitano 等, (1991)Euro. J. Clin. Investg. 21:53-58; West 等 (1992)J. Investigative Derm. 99:95-100), 或台盼蓝测定。也可以使用多种可商购获得的试剂盒, 例如 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution CellProliferation Assay (Promega)。将处理的培养物与一种或多种对照培养物进行细胞存活率对比来测定细胞毒性, 所述对照培养物例如未处理的培养物, 和 / 或使用对照化合物 (通常是已知的治疗剂) 预处理的培养物, 或其他合适的对照。被认为有效杀伤正常前列腺细胞的 MPP 能够将细胞存活率减小, 例如, 至少 10%, 至少 20%, 至少 30%, 至少 40% 或至少 50%。

[0222] 可对包括前列腺特异性靶向结构域的 MPP 评定它们的选择性靶向前列腺细胞的能力, 例如通过将 MPP 杀伤正常前列腺细胞的能力与其杀伤其他组织细胞的能力进行比较。可选地, 本领域已知的流式细胞计数方法, 可以用于确定包括前列腺特异性靶向结构域的 MPP 是否能够选择性地靶向前列腺细胞。另外可选地, 前列腺特异性靶向结构域的结合配体可以掺入人工脂膜, 且可以使用本领域技术人员熟悉的方法来检测 MPP 形成通道的能力。

[0223] 可用于检测本发明的 MPP 的特异性溶解前列腺细胞的能力的测定方法在例如实施例 2 和 3 中描述。例如, 可对具有 PSA 切割位点的 MPP 评定相对于其溶解不生成 PSA 的细胞能力的特异性溶解生成 PSA 的细胞的能力。本发明的 MPP, 在比杀伤不生成 PSA 的细胞所需更低的浓度下, 例如低至少 2 倍、5 倍、10 倍或 100 倍的浓度, 与生成 PSA 的细胞 (诸如前列腺细胞) 接触时, 促进细胞的溶解和死亡。

[0224] 适合于检测候选 MPP 的多种前列腺细胞系为本领域已知且许多可商购获得 (例如, 来自美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection), 马纳萨斯, VA)。用于体外检测的合适的前列腺细胞系的实例包括, 但不限于 PNT1A、PNT2、BPH-1、DuK50、NRP152、PS-1 细胞系。

[0225] 如有必要, MPP 对非前列腺细胞的毒性也可以使用标准技术在体外进行最初评定。例如, 在体外可以用 MPP 转染人初级成纤维细胞, 然后在处理后不同时间点使用标准的成活力测定来检测它们的成活力, 其中所述成活力测定诸如上述测定方法, 或台盼蓝拒染法。还可以使用例如胸腺嘧啶核苷掺入法对细胞合成 DNA 的能力进行测定, 和例如使用标准的细胞分类法结合荧光计数细胞分选仪 (fluorocytometer cell sorter) (FACS) 来评定细胞的细胞周期动力学变化。

[0226] 还可如本领域已知检测本发明的 MPP 在血浆或血清中的活性。例如, 将 MPP 与血清温育适当时间, 然后用例如电泳和与活化的 MPP 相应的电泳条带的光密度分析来测定 MPP 的活化程度。

[0227] 体内方法

[0228] 本发明的 MPP 的毒性可根据本领域已知的方法在体内检测。例如, MPP 的全部全身毒性可以如实施例 4 所述, 通过测定单次静脉内注射后杀伤 100% 小鼠的剂量 (即 LD₁₀₀) 来检测。由于全身或前列腺内施用 MPP 导致的毒性也可通过例如将 MPP 施用于狗、大鼠或者猴来进行体内评定。

[0229] 本发明的MPP减小前列腺大小而由此提示适用于治疗BPH的能力可使用本领域已知的动物模型在体内进行检测。例如,可以使用狗,或诸如食蟹猴、猩猩和狒狒的非人灵长类,检测MPP的体内活性。例如通过肛门周围前列腺内注射施用MPP。在施用后前列腺体积的变化可通过例如,磁共振成像或前列腺组织尸体剖检和/或前列腺重量测定来评估。

[0230] 如上所述,能够减小动物模型的前列腺大小,或减缓前列腺的进一步生长的MPP被认为适于治疗BPH。减小前列腺大小是指减小前列腺的重量或体积,以及减缓前列腺的进一步生长是指其中在动物中施用受试化合物之后前列腺的重量或体积增加最少或没有增加的情况。在一个实施方案中,当本发明所涉及的MPP施用于动物后,能够减小前列腺大小,例如,至少10%、20%、30%、40%或50%。

[0231] MPP抗原性的测定以及减少

[0232] 当治疗蛋白施用于受治疗者时,可引起一定水平的抗体反应,其中在一些情况下可导致潜在的严重副作用。因此,如有必要,MPP的抗原性可如本领域已知和下文所述来进行评定。另外,描述了减少潜在抗原性的方法。

[0233] 本申请所述的MPP的抗体反应的动力学以及强度可在例如具有免疫能力的小鼠中测定,并可用于促进开发可用于具有免疫能力的人的给药方案。对具有免疫能力的小鼠诸如C57-BL6系施用静脉剂量的MPP。在不同间期(例如单次给药后,多次给药后)将小鼠处死,并获得血清。通过基于ELISA的测定方法检测抗MPP抗体的存在。

[0234] 为了减少本发明的MPP的抗原性,MPP的天然结合结构域可功能性缺失并例如使用如上所述的前列腺特异性靶向结构域取代。这些MPP的抗原性可使用上述方法在暴露于缺失部分天然结合结构域的MPP的不同方案之后进行测定。可用于允许使用MPP持续治疗的另一种方法是使用依序施用的衍生自具有无重叠抗原性的其他nPP的可选MPP。例如,衍生自气单胞菌溶素原的MPP可以与衍生自败血梭状芽胞杆菌 α -毒素或苏芸金芽胞杆菌 δ -毒素的MPP交替使用。所有这些MPP可靶向前列腺细胞,但是不能被相同抗体识别或中和。另一个实施例是使用衍生自人组织的MPP,诸如溶细胞的人T细胞产生的人穿孔素。这些MPP可以被施用,并且因为所述蛋白质为人源性而不会产生抗体反应。

[0235] 药物组合物

[0236] 本发明提供了药物组合物,其包括MPP和一种或多种无毒性的药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂和/或助剂。如果需要,所述组合物中可以包括其他活性组分。如上所述,所述组合物用于治疗BPH。

[0237] 药物组合物可以包括大约1%至大约95%的本发明的MPP。配制用于以单一剂量形式施用的组合物可包括,例如大约20%至大约90%的本发明的MPP;而非单一剂量形式的组合物可包括,例如大约5%至大约20%的本发明的MPP。最终制剂中的MPP浓度可以低至 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 。例如,最终制剂中的浓度可在大约 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 和大约 $1,000 \mu\text{g/mL}$ 之间。在一个实施方案中,最终制剂中的浓度在大约 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 和大约 $100 \mu\text{g/mL}$ 之间。单位剂量形式的非限制性实例包括锭剂(dragees)、片剂、安瓿(ampoules)、小瓶(vials)、栓剂和胶囊剂。

[0238] 所述组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂或散剂。对于固体组合物(如,散剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式)而言,传统的无毒固体载体包括,例如药用级甘露糖、乳糖、淀粉、糖精钠、纤维素、碳酸镁或硬脂酸镁。所述组合物可以使用常

规的粘合剂和载体（如甘油三酯）配制成栓剂。

[0239] 对于动物施用而言，所述药物组合物可配制用于多种途径施用。例如，所述组合物可配制用于口服、局部、直肠或胃肠外给药，或用于吸入或喷雾给药。这里所用的术语“胃肠外”包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、鞘内注射、胸骨内注射或者输注技术。还考虑了向前列腺内直接注射或输注。本发明还考虑了蛋白毒素的标准给药方式—对流增强型递送。

[0240] MPP 可以与药学上可接受的载体一起给药。理想地，这类载体可增强稳定性和/或改善输送的特性。因此，本发明还提供了 MPP 与合适载体诸如人工膜泡（包括脂质体、囊泡体（noisome）、纳米体等）、微粒或微囊的制剂，或包括药学上可接受的聚合物的胶体制剂。使用这些载体/聚合物对实现 MPP 的持续释放是有益的。可选地，或另外，MPP 制剂可包括稳定诸如人血清白蛋白的体内蛋白的添加剂，或本领域已知的用于蛋白质治疗剂的其它稳定剂。

[0241] 口服使用的药物组合物可配制成例如片剂、糖锭剂、锭剂、水性或油性悬浮液、可分散的散剂或颗粒剂、乳剂、硬胶囊或软胶囊、或糖浆剂或酏剂。所述组合物可以根据本领域已知的制备药物组合物的标准方法来制备，并可含有选自甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂的组中的一种或多种试剂，以提供药学上美观和适口的制剂。片剂含有活性组分，所述活性组分与下述组分混合：合适的药学上可接受的无毒性赋形剂，其包括，例如惰性稀释剂，诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；粒化剂及崩解剂，诸如玉米淀粉或海藻酸；粘合剂，诸如淀粉、明胶或阿拉伯胶；以及润滑剂，诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以不用包衣，或者通过已知技术进行包衣，以延缓其在胃肠道中的崩解和吸收，并由此提供在较长时间内的持续作用。例如，可使用诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的延时材料。

[0242] 口服使用的药物组合物还可以是其中活性组分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合的硬明胶胶囊，或者是其中活性组分与水或诸如花生油、液体石蜡或橄榄油的油性介质混合的软明胶胶囊。

[0243] 配制成水性悬浮液的药物组合物包括与一种或多种合适的赋形剂混合的活性化合物，其中所述赋形剂例如悬浮剂，诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基-β-环糊精、黄蓍树胶和阿拉伯树胶；分散剂或润湿剂，诸如天然存在的磷脂，如卵磷脂，或烯化氧与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，如十七烷乙烯氧基十六醇（heptadecaethyleneoxycetanol），或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的部分酯类的缩合产物，如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的部分酯类的缩合产物，如聚乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂，例如乙基或 n-丙基、p-羟基-苯甲酸酯，一种或多种着色剂，一种或多种调味剂，或一种或多种甜味剂，诸如蔗糖或糖精。

[0244] 药物组合物可以通过将活性化合物悬浮于诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油的植物油或诸如液体石蜡的矿物油中而制备成油性悬浮液。油性悬浮液可含有增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或十六醇。可添加如上所述的甜味剂和/或调味剂，以提供适口的口服制剂。这些组合物可通过添加抗氧化剂例如抗坏血酸加以保护。

[0245] 所述药物组合物可以配制为可分散的散剂或颗粒剂，所述散剂或颗粒剂随后可通

过加水用于制备水性悬浮液。这些可分散的散剂或颗粒剂提供了与一种或多种分散剂或湿润剂、悬浮剂和 / 或防腐剂混合的活性组分。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂由上文所提到的那些举例说明。在这些组合中,还可以包括其他赋形剂,例如甜味剂、调味剂以及着色剂。

[0246] 本发明药物组合物还可以配制成水包油乳剂。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或是如液体石蜡的矿物油,或可以是这些油的混合物。这些组合中所包含的合适乳化剂包括天然存在的树胶,如阿拉伯树胶或黄蓍树胶;天然存在的磷脂,如大豆、卵磷脂;或衍生自脂肪酸和己糖醇、酐的酯类或部分酯类,例如脱水山梨糖醇单油酸酯,以及所述部分酯类与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。所述乳剂还可任选地含有甜味剂和调味剂。

[0247] 所述药物组合物可通过将活性组分与一种或多种甜味剂例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖组合而配制成糖浆剂或酏剂。这些制剂还可任选地含有一种或多种缓和剂(demulcents)、防腐剂、调味剂和 / 或着色剂。

[0248] 所述药物组合物可根据本领域已知的方法并使用合适的如上所述的一种或多种分散剂或润湿剂和 / 或悬浮剂配制成无菌可注射水性悬浮液或油性悬浮液。无菌注射剂可以是溶于无毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂的无菌的可注射溶液或悬浮液,例如溶于1,3-丁二醇的溶液。所用的可接受载体和溶剂包括,但不限于水、林格氏溶液、乳酸盐林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。其他实例包括常规用作溶剂或悬浮介质的无菌非挥发性油,和多种温和的非挥发性油,包括例如合成的单酸甘油酯或甘油二酯。诸如油酸的脂肪酸也可以用于注射剂的制备。

[0249] 其它药物组合物及制备药物组合物的方法为本领域已知,并在例如"Remington: The Science and Practice of Pharmacy"(先前为"Remingtons Pharmaceutical Sciences");Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA(2000)中有所描述。

[0250] 上述本发明药物组合物包括一种或多种有效量的本发明MPP以实现预期目的。因此,术语“治疗有效剂量”是指改善BPH症状或特征的MPP的量。化合物的治疗有效剂量的测定在本领域技术人员的能力范围内。例如,治疗有效剂量最初可以使用细胞培养测定,或诸如本申请所述的那些动物模型来评定。动物模型也可用于测定合适的浓度范围和给药途径。然后,使用本领域普通技术人员已知的标准方法,可将这些信息用于确定在其他动物(包括人)中给药的有用剂量和途径。

[0251] 治疗效果和毒性还可通过标准药学方法如通过测定半数有效剂量或 ED_{50} (即在群体的50%中治疗有效的剂量)和半数致死量或 LD_{50} (即导致群体的50%死亡的剂量)来测定。治疗效果与毒性效应之间的剂量比被称为“治疗指数”,它可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 的比值。从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制人或动物用的剂量范围。这些组合中含有的剂量通常在包括 ED_{50} 和表现少许毒性或无毒性的浓度范围内。在这个范围内的剂量随所使用的剂型、受治疗者的敏感性以及给药途径等而变化。

[0252] 医生可根据需要治疗的受治疗者的有关因素来确定给药于受治疗者的精确剂量。将剂量和给药调整到提供足够水平的MPP和 / 或维持预期效应。确定合适的剂量时可考虑的因素包括疾病状态的严重性、受治疗者的一般健康状况、年龄、体重,以及受治疗者的性

别、饮食、给药时间以及频率、药物联合、对治疗的反应敏感性和耐受性 / 反应。医生可以根据上述因素和诸如特定制剂的半衰期和清除率的因素来设计给药方案。

[0253] 根据常规方法, 药物有效量的本发明的 MPP 可以与药学上可接受的载体一起配制, 以用于胃肠外、口、鼻、直肠、局部以及经皮给药等。所述制剂还可包括一种或多种稀释剂、填充剂、乳化剂、防腐剂、缓冲剂、赋形剂等, 并且可以以如液体、散剂、乳剂、栓剂、脂质体、透皮贴剂和片剂的形式提供。缓释或延长释放递送系统, 包括多种生物聚合物 (基于生物学的系统) 中的任何一种、应用脂质体的系统以及聚合物递送系统, 也可与本申请所述的组合物一起使用, 以提供 MPP 的持续或长期来源。这些缓释系统适用于例如口服、局部和胃肠外使用的制剂。术语“药学上可接受的载体”是指不影响活性组分的生物活性作用, 并对宿主或患者没有毒性的载体介质。本领域技术人员可以根据适当的方法并按照可接受的操作来配制本发明的化合物, 例如 Remington The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton Pa., 第 19 版, 1995 所揭示的。

[0254] 在一个实施方案中, MPP 与水溶性聚合物偶联, 例如, 以增加稳定性或循环半衰期或减少免疫原性。临床上可接受的水溶性聚合物包括, 但不限于聚乙二醇 (PEG)、聚乙二醇丙醛、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚丙二醇均聚物 (PPG)、聚氧乙基化多元醇 (POG) (如丙三醇) 和其他聚氧乙基化多元醇、聚氧乙基化山梨醇, 或聚氧乙基化葡萄糖, 和其他的碳水化合物聚合物。将多肽与水溶性聚合物如 PEG 偶联的方法, 例如在美国专利公布号 20050106148 及其引用的参考文献中有所描述。

[0255] MPP 用于治疗良性前列腺增生 (BPH) 的用途

[0256] 相对于其他正常组织的细胞, 本发明的 MPP 选择性杀伤正常前列腺细胞。因此, 本发明的 MPP 可用于治疗或预防 BPH。

[0257] 在一个实施方案中, BPH 的治疗是指减小患有 BPH 的受治疗者的前列腺大小。前列腺的大小可通过本领域已知的方法包括如测面积法、扁长椭圆体积计算 (HWL) 以及椭圆体体积测量技术测定其体积来确定。前列腺大小还可以通过例如直肠指检或直肠超声或细胞检查来直接测量, 或例如通过测量血液 PSA 水平的变化或血液游离 PSA 和总 PSA 的比例变化来间接测量。

[0258] 在一个实施方案中, MPP 的给药减小受治疗者的前列腺体积。例如, 所揭示的方法能够减小前列腺的体积, 例如至少 10%, 至少 20%, 或至少 30%, 至少 40%, 或至少 50%。

[0259] 在另一个实施方案中, BPH 的治疗涉及降低 BPH 的一个或多个症状的严重程度。BPH 的症状包括排尿变化或排尿问题, 诸如尿流迟疑、中断或变弱、尿急和渗漏或滴沥, 或尿频 (特别是夜间)。这些症状也称为下尿路症状 (LUTS)。LUTS 可以如本领域已知使用美国泌尿学会 (AUA) 症状指数、Madsen-Iversen 评分系统或 Boyarsky 系统来测定。

[0260] 在另一个实施方案中, BPH 的治疗涉及预防或抑制前列腺的继续生长, 并且可以如上所述通过体积增长率或血液 PSA 增长率的减少或 BPH 症状的减轻来测定。

[0261] 联合治疗

[0262] 本发明的 MPP 可以单独使用或联合一种或多种用于 BPH 的其他治疗方法。BPH 的其他治疗方法包括施用诸如 α -1- 肾上腺素受体拮抗剂和 5- α 还原酶抑制剂的药物、植物药疗法、外科手术以及微创技术。

[0263] α -1- 肾上腺素受体拮抗剂的实例有阿夫唑嗪 / 哌唑嗪、坦索洛新、特拉唑嗪以及

多沙唑嗪。5- α 还原酶抑制剂的实例有非那司提和度他雄胺。

[0264] 植物药疗法的实例包括锯叶棕浆果 / 矮棕榈 (*Serenoa repens*), 非洲李子树皮 (*Pygeum africanum*), 南非星草 / β -谷固醇 (*Hipoxis rooperi*), 紫锥花 (*Echinacea purpurea*), 南瓜籽 (*Cucurbita pepo*), 黑麦 (*Secale cereale*), 以及刺荨麻 (*Urtica dioica*)。

[0265] 外科手术的实例包括经尿道前列腺切除术 (TURP)、经尿道针刺消融术 (TUNA)、经尿道前列腺切开术 (TUIP)、经尿道微波热疗 (TUMT)、激光前列腺切除术、气囊扩张术、电汽化前列腺切除术和开放性前列腺切除术。

[0266] 如果需要减轻对 MPP 的全身免疫反应, 可在使用 MPP 同时联合施用免疫抑制疗法。免疫抑制疗法的实例包括, 但不限于全身或局部用皮质类固醇 (Suga 等, *Ann. Thorac. Surg.* 73:1092-7, 2002)、环孢霉素 A (Fang 等, *Hum. Gene Ther.* 6:1039-44, 1995)、环磷酸胺 (Smith 等, *Gene Ther.* 3:496-502, 1996)、脱氧精胍菌素 (Kaplan 等, *Hum. Gene Ther.* 8:1095-1104, 1997) 以及 T 细胞和 / 或 B 细胞抗体 [如抗-CD40 配体、抗 CD4 抗体、抗-CD20 抗体 (利妥昔单抗)] (Manning 等, *Hum. Gene Ther.* 9:477-85, 1998)。可在 MPP 给药之前、给药期间或给药之后施用这些药剂。本发明的 MPP 可以与上述的治疗方法分开、依序或同时给药。

[0267] MPP 的给药

[0268] 可以使用本领域已知的方法将治疗有效量的本发明 MPP 或编码 MPP 的核苷酸局部或全身施用于患有 BPH 的受治疗者。

[0269] 在一个实施方案中, 将 MPP 注射到患有 BPH 的受治疗者的前列腺内 (前列腺内注射)。例如, 可使用类似于近距离放疗的多次注射途径的给药途径, 其中适于作为组合物或制剂并以合适剂型存在的多等份纯化的肽可以使用针通过会阴注射。

[0270] 此外, 或可选地, MPP 可以全身施用于患有 BPH 的受治疗者, 例如通过静脉注射、肌肉注射、皮下注射或口服。

[0271] MPP 的治疗有效量是指足够产生所需的生物学效应的量, 例如有效减小前列腺大小 (即体积和 / 或重量), 或减缓前列腺的进一步生长, 或减轻 BPH 的症状的量。在一个实施方案中, 它是足够减轻受治疗者的 BPH 的体征或症状的量。在特定实施例中, 它是有效减小前列腺体积至少 10%、20%、30%、40% 或 50% 的量。在另一实施方案中, 它是足够预防前列腺体积或重量进一步增加的量。有效剂量可以来源于体外或动物模型试验系统的剂量效应曲线来外推。

[0272] 在治疗过程中, MPP 的有效量可以单次剂量或多次剂量 (例如每天) 给药。然而, MPP 的有效量取决于受治疗者、受治疗病症的严重性以及类型, 以及给药方式。在一个实施方案中, 对于前列腺内给药, MPP 的治疗有效量为大约 0.01 μ g/g 前列腺重量至 50 μ g/g 前列腺重量。在另一个实施方案中, 对于前列腺内给药, MPP 的治疗有效量为大约 0.02 μ g/g 前列腺重量至 40 μ g/g 前列腺重量。在另一个实施方案中, 对于前列腺内给药, MPP 的治疗有效量为大约 0.02 μ g/g 前列腺重量至 35 μ g/g 前列腺重量。在另一个实施方案中, 对于前列腺内给药, MPP 的治疗有效量为大约 0.03 μ g/g 前列腺重量至 25 μ g/g 前列腺重量。在另一个实施方案中, 对于前列腺内给药, MPP 的治疗有效量为大约 0.04 μ g/g 前列腺重量至 20 μ g/g 前列腺重量。在另一个实施方案中, 对于前列腺内给药, MPP 的治疗有效量为大约

0.04 μ g/g 前列腺重量至 10 μ g/g 前列腺重量。

[0273] 在一个实施方案中,对于 70kg 的人,MPP 的前列腺内有效静脉剂量为大约 1mg 至大约 10mg MPP。在另一个实施方案中,MPP 的有效静脉剂量为大约 1mg 至大约 5mg。在另一个实施方案中,MPP 的有效静脉剂量为大约 1mg 至大约 3mg。在又一个实施方案中,MPP 的有效静脉剂量为大约 2.8mg。在一个实施方案中,对于 70kg 的人,MPP 的有效前列腺内剂量为大约 10mg 至大约 100mg MPP。在另一个实施方案中,对于 70kg 的人,MPP 的有效前列腺内剂量为大约 10mg 至大约 50mg MPP。在另一个实施方案中,对于 70kg 的人,MPP 的有效前列腺内剂量为大约 10mg 至大约 30mg MPP。在另一个实施方案中,对于 70kg 的人,MPP 的有效前列腺内剂量为大约 28mg。

[0274] MPP 的体内表达

[0275] 为替代 MPP 给药(或在此之外)来治疗 BPH,可通过在体内表达编码 MPP 的核苷酸而实现 BPH 的长期或全身治疗。

[0276] 编码 MPP 的核苷酸

[0277] 本发明考虑到使用编码 MPP 的核苷酸或 DNA 分子来治疗 BPH。这些 DNA 分子可以通过标准的分子生物学实验技术和本申请所揭示的序列信息来获得。

[0278] 合适的 DNA 分子和核苷酸包括在严紧性条件下与所揭示的 DNA 序列杂交的那些或其片段,前提是它们编码功能 MPP。导致特定程度严紧性的杂交条件根据杂交方法的特性以及所使用的杂交 DNA 的组成和长度而不同。通常,杂交的温度和杂交缓冲剂的离子强度(特别是 Na^+ 浓度)决定杂交的严紧性。关于达到特定量的严紧性所需的杂交条件的计算在 Sambrook 等(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor, N.Y., 1989, 第 9 和 11 章)中有描述。使用标记有 [^{32}P]-dCTP 的靶探针的杂交通常在高离子强度溶液(如 6 倍的 SSC)中以低于解链温度 T_m 约 5-25°C 的温度进行。严紧性条件的实例是:对于短探针(例如 10-50 个核苷酸)而言,在 pH 7.0-8.3 以及至少大约 30°C 的温度下,至少大约 0.01M 到 1.0M 的钠离子(或其他盐)的盐浓度。严紧性条件可以通过添加诸如甲酰胺的去稳定剂来实现。例如,在 25-30°C, 5 倍 SSPE (750mM NaCl, 50mM 磷酸钠, 5mM EDTA, pH 7.4) 的条件适于等位基因特异性探针杂交。

[0279] 遗传密码的简并性还允许 DNA 分子核苷酸序列内的变异,同时维持所编码蛋白质的氨基酸序列。例如,氨基酸 Ala 由核苷酸密码子三联体 GCT、GCG、GCC 和 GCA 编码。因此,可以改变核苷酸序列而不影响所编码蛋白质的氨基酸组成或该蛋白质的特征。根据遗传密码的简并性,使用上述的标准的 DNA 诱变技术或通过 DNA 序列合成可以从参考 DNA 分子获得变异体 DNA 分子。本公开内容还包括由于基于遗传密码简并性的序列变异而在严紧性条件下不与所揭示的 DNA 序列杂交的 DNA 序列。

[0280] 本发明提供了表达 MPP 的方法,例如在细胞或组织内体内表达修饰的气单胞菌溶素原多肽。在一个实施例中,细胞或组织的转染在体外进行。在该实施例中,细胞或组织(诸如移植物)取自受治疗者,并用含有编码目标蛋白的 cDNA 的表达载体转染。转染的细胞产生功能蛋白,并且可以再导入受治疗者中。在另一个实施例中,将编码目标蛋白的核酸直接施用于(诸如静脉内或前列腺内)受治疗者,并在体内产生转染。

[0281] 目前,人细胞转染所需的科学和医学操作是常规方法。美国专利第 5,529,774 号公开了将基因转入供体细胞内的一般策略。通常,将编码具有所需治疗效果的蛋白质的基

因克隆至病毒表达载体中,然后将该载体引入靶生物体。病毒感染细胞,并在体内产生蛋白质序列,其中所述蛋白质具有所需的治疗效果(Zabner等,Cell 75:207-16,1993)。

[0282] 只需将DNA或蛋白质元件导入某些细胞或组织,例如,前列腺即可。然而,在一些情况下,例如通过血管内(i.v.)或口服施用可更治疗有效和更简单地治疗所有受治疗者的细胞或更广泛地分散载体。

[0283] 编码MPP的核苷酸序列受合适的启动子的调控。可使用的合适的启动子包括,但不限于:基因天然启动子,逆转录病毒的LTR启动子或腺病毒启动子,如腺病毒主要晚期启动子;CMV启动子;RSV启动子;诱导型启动子,如MMTV启动子;金属硫蛋白启动子;热休克启动子;白蛋白启动子;组蛋白启动子;(x-肌动蛋白启动子;TK启动子;B19细小病毒启动子;以及ApoAI启动子。在一个实施例中,启动子是前列腺特异性启动子,如probasin启动子。然而,公开内容不限于特异性的外源基因或启动子。

[0284] 可通过使得重组核苷酸到达合适细胞的已知方法将重组的核苷酸给药于受治疗者。这些方法包括注射、输注、沉积、移植或局部给药。注射可以是皮内或皮下注射。如下文进一步描述,重组核苷酸可以作为病毒载体的部分或作为诸如裸DNA或脂质体包被的DNA的非感染形式进行递送,所述病毒载体诸如禽痘病毒、重组痘苗病毒、复制缺陷腺病毒毒株或脊髓灰质炎病毒。

[0285] 腺病毒载体基本上包括全部的腺病毒基因组(Shenk等,Curr.Top.Microbiol.Immunol.111:1-39,1984)。可选地,腺病毒载体为其中至少一部分腺病毒基因组缺失的修饰的腺病毒载体。在一个实施例中,所述载体包括腺病毒5' ITR;腺病毒3' ITR;腺病毒壳体化信号;编码治疗剂的DNA序列;以及表达编码治疗剂的DNA序列的启动子。该载体没有腺病毒E1和E3 DNA序列的至少大部分,并且不一定全没有E2和E4 DNA序列,而且编码腺病毒蛋白的DNA序列由腺病毒的主要晚期启动子转录。在另一个实施例中,所述载体为诸如美国专利第4,797,368号(Carter等)和McLaughlin等(J.Virol.62:1963-73,1988)所述的腺相关病毒(AVV),和4型AAV(Chiorini等,J.Virol.71:6823-33,1997)以及5型AAV(Chiorini等,J.Virol.73:1309-19,1999)。

[0286] 这种载体可以根据标准技术使用穿梭质粒来构建,所述穿梭质粒5,末端起始含有腺病毒5' ITR,腺病毒壳体化信号,以及E1a增强子序列,启动子(可以是腺病毒启动子或外源启动子),三联前导序列,多克隆位点(可以是本申请所述),多聚腺苷酸(poly A)信号,以及对应于腺病毒基因组片段的DNA片段。所述DNA片段作为与修饰或突变的腺病毒同源重组的底物,且可以包括例如腺病毒5'基因组不超过碱基3329到碱基6246的片段。所述质粒还可以包括可选择的标记物和复制起始区。所述复制起始区可以是细菌的复制起始区。编码治疗剂的所需DNA序列可以插入至质粒的多克隆位点。

[0287] 可用于实践本申请所述方法的载体的实例包括,但不限于下列文献中公开的那些:Woo等的WO 95/27512;Walsh等的WO 01/127303; Couto等的美国专利第6,221,349号;High等的美国专利第6,093,392号。

[0288] 临床试验

[0289] 本领域技术人员应当理解,在体外和动物模型中证实了MPP用于治疗BPH的有效性之后,应在临床试验中对MPP进行试验以进一步评价MPP在治疗BPH中的效果以及获得治疗用途的监管审批。如本领域已知,临床试验经过几期试验,它们分为I期、II期、III期

和 IV 期。

[0290] 最初,在 I 期试验中评价 MPP。通常,I 期试验用于确定给药的最佳模式(例如通过丸剂或通过注射)、给药频率以及化合物的毒性。I 期研究常常包括实验室检测,如验血和活检,以评价患者体内的潜在治疗效果。对于 I 期试验,小组的 BPH 患者用特定剂量的 MPP 来治疗。在试验期间,通常挨组增加剂量,以确定与所述化合物相关的最大耐受剂量 (MTD) 和剂量限制性毒性 (DLT)。这个过程确定用于随后 II 期试验的合适剂量。

[0291] II 期试验用于进一步评价 MPP 的效果和安全性。在 II 期试验中,将 MPP 以 I 期试验中有效的剂量给药于多组 BPH 患者。

[0292] III 期试验集中于确定与标准或最广泛接受的治疗相比 MPP 的治疗效果如何。在 III 期试验中,随机将患者分入两个或更多“分组 (arm)”之一中。在具有两个分组的试验中,例如一个分组接受标准治疗(对照组),另外一个分组接受 MPP 治疗(研究组)。

[0293] IV 期试验用于进一步评价 MPP 的长期安全性和效果。IV 期试验不如 I、II、III 期试验常见,且在 MPP 被批准用于标准用途之后进行。

[0294] 用于临床试验的患者的中选条件

[0295] 参与者的中选标准可以从一般(例如年龄、性别、疾病类型)到具体(例如先前治疗的类型和数目、疾病特征、血细胞计数、器官机能)。在一个实施方案中,中选的患者已经被诊断为 BPH。中选标准还可随着试验期不同而不同。临床试验的中选患者也可以根据尿路梗阻的客观测量,以及对口服治疗 BPH 无反应来选择。例如,在 I 期和 II 期试验中,所述标准常排除那些由于器官功能异常或其他因素而对研究性治疗有危险的患者。在 II 期和 III 期试验中,常包括有关疾病的类型和阶段以及先前治疗的数目和类型的其他标准。

[0296] I 期试验通常包括 15-30 名对其他治疗选择无效果的参与者。II 期试验通常包括达 100 名已接受药物治疗或手术但是治疗没有效果的参与者。II 期试验的参与者常常由于先前所接受的治疗而受限制。III 期试验通常包括成百上千的参与者。为了确定 MPP 与标准治疗的效果是否存在真正差异,大量的参与者是必需的。III 期包括从新诊断患有 BPH 的患者到患有广泛性疾病的患者,以覆盖疾病连续带 (diseasecontinuum)。

[0297] 本领域技术人员应该理解,临床试验的设计应尽可能地全面,而不使受研究群体差异太大以致于不能确定治疗对较精细定义的群体是否有效。试验中包括的受研究群体差异越大,结果对于一般群体更为适用,尤其是在 III 期试验中。认为临床试验各期的合适的参与者的选择是在本领域工作者的普通技能范围之内。

[0298] 治疗前患者的评定

[0299] 在研究开始之前,可使用本领域已知的几种测定方法对患者进行初分类。例如,首先使用见于家庭医疗手册 (Family Practice Notebook) 网页上的良性增生症状指数来评定患者。也可以根据患者疾病的类型和/或其疾病的阶段和/或前列腺的大小对患者进行分类。

[0300] 临床试验中 MPP 的给药

[0301] 通常,通过注射将 MPP 给药于试验参与者。在一个实施方案中,通过前列腺内注射进行 MPP 的给药。

[0302] 可对 MPP 的剂量范围进行试验。只要具有临床前试验的信息,熟练的医生就能容易地确定用于临床试验的 MPP 的合适剂量。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.01 μ g/g

前列腺至大约 50 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.02 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 40 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.02 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 35 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.03 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.04 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 20 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.04 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 10 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.1 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 5 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.2 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 3 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在一个实施方案中,剂量范围为大约 0.5 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至大约 2 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。

[0303] 药物代谢动力学监测

[0304] 为了符合 I 期标准,例如,通过对定时采集的诸如血液或尿的样品进行化学分析来监测 MPP 的分布。例如,可以定时采集样品直到输注开始后大约 72 小时为止。

[0305] 如果不立即进行分析,可以将样品采集后置于干冰上,然后转到冰箱 -70°C 保存,直到可以进行分析。用于分析的样品可以使用本领域已知的标准技术来制备,并且所存在的 MPP 的量可以通过例如高效液相色谱方法 (HPLC) 来测定。

[0306] 药代动力学数据可以通过与临床药理学专家合作来获取和分析,并用于确定如清除率、半衰期以及最大血浆浓度。

[0307] 患者结果的监测

[0308] 临床试验的终点为表明所评估的化合物的效果的可检测结果。终点在临床试验开始之前确定,并且根据临床试验的类型和时期而不同。终点的实例包括,例如前列腺体积减小,血 PSA 水平降低,泌尿道症状改善,尿流量改善,以及急性尿潴留减轻。其他终点包括毒性和生活质量。

[0309] 药物试剂盒

[0310] 本发明还提供了治疗试剂盒或试剂包,其含有用于治疗 BPH 的一种或多种 MPP 或包括一种或多种 MPP 的药物组合物。所述 MPP 可以以单位剂型在试剂盒中提供。试剂盒的各组分可以用单独的包装物包装,当适用时,与之相关的可以有由管理药物或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定的形式的通告,所述通告反映了用于人或动物给药的生产、使用或销售的政府机构的批准。所述试剂盒还可任选包括与本发明的 MPP 联合使用的一种或多种其他治疗剂。所述试剂盒可任选包括说明 MPP 和 / 或其他治疗剂的使用方法或给药方案的指导书或说明书。

[0311] 当试剂盒的组分以一种或多种液体溶液提供时,所述液体溶液可以是水溶液,例如无菌的水溶液。在这种情况下,包装物装置本身可以是吸入器、注射器、吸量管、眼滴管,或其他类似的器械,所述组合物可以从这些装置给药于患者或用于与试剂盒内的其他组分混合。

[0312] 所述试剂盒的组分还可以以干燥或冻干形式提供,并且所述试剂盒还可含有用于重溶冻干组分的合适的溶剂。不考虑包装物的数量或类型,本发明的试剂盒还可含有辅助组合物给药于患者的工具。这种工具可以是吸入器、注射器、吸量管、镊子、测量勺、眼滴管,或类似的医学上认可的递药工具。

[0313] 现在将参考具体实施例来描述本发明。应当理解,下述实施例意在描述本发明的实施方案而非意在以任何方式限制本发明。

[0314] 实施例

[0315] 实施例 1 :制备由 PSA 活化的 MPP

[0316] 本实施例描述用来根据如表 6 内所示的本发明实施方案制备由 PSA 活化的 MPP 的方法。这些 MPP 衍生自气单胞菌溶素原。本领域技术人员应理解,可以使用相似的方法来制备由 PSA 或任何其它的前列腺特异性蛋白酶活化的其它 MPP。此类蛋白质可以通过将气单胞菌溶素原的弗林蛋白酶序列取代为前列腺特异性蛋白酶切割位点如 PSA 特异性切割序列而产生。

[0317] 表 6 具有活化序列的 MPP 与野生型气单胞菌溶素原的比较,其中所述的活化序列含有由 PSA 切割的蛋白酶切割位点

MPP (SEQ ID NO:)	所产生的变化(SEQ ID NO:)	与野生型气单胞菌溶素原
		ADSKVRRARSVDGAGQGLR LEIPLD(SEQ ID NO: 2 的氨基酸 424-448)相比
MPP1 (3 和 4)	KVRRAR(SEQ ID NO: 2 的氨基酸 427-432)变成 HSSKLQ(5)	ADSHSSKLQSV DGAGQGLRL EIPLD(SEQ ID NO: 4 的氨基酸 424-448)
[0318] MPP2 (6 和 7)	KVRRARSV(SEQ ID NO: 2 的氨基酸 427-434)变成 HSSKLQSA(8)	ADSHSSKLQSADGAGQGRLE IPLD(SEQ ID NO: 7 的氨基酸 424-448)
MPP3 (9 和 10)	KVRRAR(SEQ ID NO: 2 的氨基酸 427-432)变成 QFYSSN(11)	ADSQFYSSNSVDGAGQGLRL EIPLD(SEQ ID NO: 10 的氨基酸 424-448)
MPP4 (12 和 13)	KVRRAR(SEQ ID NO: 2 的氨基酸 427-432)变成 GISSFQS(14)	ADSGISSFQSSVDGAGQGLR LEIPLD(SEQ ID NO: 13 的氨基酸 424-448)

[0319] 表 6 内所示的 MPP 包括气单胞菌溶素原序列 (SEQ ID NO :1 和 2 内所示的野生型 PA),其中弗林蛋白酶的 6 氨基酸识别位点 (SEQ ID NO : 2 的氨基酸 427-432) 由 PSA 切割位点替换。例如, MPP1(SEQ ID NO :3 和 4) 包括其中弗林蛋白酶切割位点由 PSA 底物 HSSKLQ(SEQ ID NO :5) 替换的气单胞菌溶素原序列。

[0320] 使用如前所述的方法 (Vallette 等, Nucl. Acids Res. 17 :723-33, 1988), 使用重组 PCR 来将气单胞菌溶素的弗林蛋白酶位点 (SEQ ID NO :2 的氨基酸 427-432) 取代成 PSA 特异性切割位点 (SEQ ID NO :5、8、11 或 14)。简而言之,使用 50 μ l 终体积进行重组 PCR,其中所述的终体积含有 0.2mM 脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、0.5 μ M 正向引物和反向引物、0.1 μ g 模板 DNA 和在 pfu 反应缓冲液 [20mM Tris-HCl (pH 8.8)、10mMKCl、10mM(NH₄)₂SO₄、

2mM MgSO_4 、0.1% Triton X-100 和 0.1mg/mlBSA] 的 2.5 单位克隆的 pfu 聚合酶。

[0321] 通过使用 Taq 聚合酶的 PCR 来筛选具有气单胞菌溶素原插入物的转化细胞。使用含有 0.2mM dNTP、0.5 μM 正向引物和反向引物和 5 单位 Taq 聚合酶的 PCR 反应缓冲液 [50mM KCl、1.5mM MgCl_2 和 10mM Tris-HCl (pH 9.0)] 制备混合物。将这种混合物的 10 μl 样品等分至 0.2ml 管内并且使用无菌牙签添加转化的细胞。

[0322] PCR 终产物使用适宜的限制酶切消化,随后连接至克隆载体 pTZ18u(BioRad) 用于扩增。简而言之,限制酶切消化在 37°C 在含有每 μgDNA 大约 1 单位限制酶的 Pharmacia One-Phor-All 缓冲液 [10mMTris- 乙酸盐 (pH 7.5)、10mM 乙酸镁和 50mM 乙酸钾] 内进行 90 分钟。得到的插入物和 pTZ18u 载体 DNA 以大约 5 : 1 的比率进行混合并在 45°C 加热 15 分钟。随后,将样品使用 One-Phor All 缓冲液稀释并且添加 ATP 至终浓度 1mM 用于粘端连接或至终浓度 0.5mM 用于平端连接。随后,将 11 单位的 T4 DNA 连接酶添加至每份样品内并且温和地混合样品。连接在 13°C 实施 4 小时 (粘端连接) 或 16 小时 (平端连接)。

[0323] 进行 DNA 测序以确保产生正确的取代。插入物随后从克隆载体中分离并亚克隆至广范宿主性质粒 pMMB66HE (Furste 等, Gene48 :119-131,1986) 用于在大肠杆菌中表达。使用前述的 (Cohen 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 :2110-4,1972) CaCl_2 洗涤法使大肠杆菌 DH5 α 细胞变成感受态。通过离心收获对数期内的细胞 ($\text{OD}_{600} = 0.4-0.7$) 并在 1/4 体积的冰冷 100mM MgCl_2 内洗涤。使细胞再次沉淀 (pelleted) 并重悬于 2 体积的冰冷 100mM CaCl_2 。细胞随后在冰上温育大约 45 分钟。随后将细胞离心并重悬于 1/10 体积的 100mM CaCl_2 。继续温育额外的 45 分钟,随后添加甘油至 15% 终浓度。感受态细胞贮存在 -70°C 直至使用。

[0324] 将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞根据 Inoue 等 (Gene 96 :23-8,1990) 的方法进行。感受态细胞 (200 μl 等分试样) 与 0.5-10ng 的 DNA 在冰上温育 1 小时。随后使细胞在 42°C 热休克 4 分钟。将细胞迅速转移回到冰上 5 分钟。随后,将 500 μl 的 LB 培养基添加至每份样品并将细胞在 37°C 温育 1 小时,同时温和地搅拌。将等分试样 (150 μl) 涂布在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 琼脂上。这些平板在 37°C 温育过夜。

[0325] 使用 Harayama 等 (Mol. Gen. Genet. 180 :47-56,1980) 的滤膜接合技术,使重组 pMMB66HE 克隆通过接合而转移至杀鲑气单胞菌株 CB3 (见 Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68 :221-4,1990)。使用杀鲑气单胞菌的这种蛋白酶缺陷菌株导致产生不混杂已活化的气单胞菌溶素的 MPP 并导致大量蛋白质产生。MPP 通过如前 (Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68 :221-4,1990) 所述的羟基磷灰石层析法和离子交换层析法加以纯化。这种方法产生批次与批次之间相同的 MPP 制品。

[0326] 实施例 2 :MPP1 在体外特异性裂解产生 PSA 的细胞

[0327] 本实施例描述用来测定根据如实施例 1 内所述的本发明实施方案的 MPP 特异性的方法。此类方法可以用来检验包含 PSA 特异性切割位点的 MPP 的特异性。

[0328] 检测 MPP1 对产生 PSA 的 LNCaP 细胞 (美国模式培养物保藏所,马纳萨斯,Va.) 和不产生 PSA 的 TSU 细胞 (T. Itzumi 博士,日本帝京大学) 的对抗。细胞在 10^{-12}M 至 10^{-6}M MPP1 存在下温育 24 小时。随后,进行细胞计数并基于排出台盼蓝的能力评定活细胞百分数。测定 MPP1 相对于 LNCaP 和 TSU 系杀死 50% 细胞所需要的浓度 (IC_{50})。

[0329] MPP1 针对产生 PSA 的细胞的 LD_{50} 是 10^{-10}M 。相反,针对不产生 PSA 的 TSU 细胞的

LD₅₀ 是大约 5×10^{-8} M。如同对产生 PSA 的人细胞系与对不产生 PSA 的人细胞系的毒性相差 500 倍所证实的一样,该结果表明 MPP1 被 PSA 特异性地活化。

[0330] 实施例 3 :MPP1 不在含有 PSA 的血液内活化

[0331] 包含 PSA 切割位点的 MPP 不应在血液内活化,原因是血液内因存在摩尔大为过量的血清蛋白酶抑制物如 α -1-抗胰凝乳蛋白酶和 α -2-巨球蛋白而使 PSA 受到酶灭活。

[0332] 为检验人血清内其它血清蛋白酶和 PSA 对 MPP1 的非特异性活化,敏感的溶血测定如下进行。添加血液红细胞 (RBC, 2% v/v) 至含有 MPP1 $\pm$ PSA 的血浆或缓冲液。溶血的程度通过测量释放至上清液内的血红蛋白进行分析。添加 0.1% Triton 在数秒内引起 100% 溶血并且用作阳性对照。水解的量表述为 540nm 处样品吸光度与 Triton 处理的样品的吸光度的比率。在添加 RBC 前, MPP1 (10^{-8} M) 与 PSA 在含水缓冲液内单独预温育 1 小时,引起大约 45% 溶血 (图 2)。

[0333] 为确定 MPP1 是否在人血浆内被活化,将 MPP1 (10^{-8} M) 在 50% 人血浆内温育 1 小时。在相关的实验中,首先添加过量的 PSA (10,000 ng/ml) 至人血浆内并允许温育数小时。含有 MPP1 的血浆 $\pm$ PSA 随后与人 RBC (2% v/v) 温育。添加 MPP1 的人血浆或添加高浓度 PSA 的人血浆未导致可察觉的溶血 (即 $<$ Triton 对照的 1%, 图 2)。这些结果表明 MPP1 可以全身性施用而在血液内无任何显著活化,即便血液含有可测量的 PSA。

[0334] 实施例 4 :MPP1、MPP2 和 MPP3 的体外毒性和体内毒性

[0335] 本实施例描述用来测定 MPP 体外毒性和体内毒性的方法。

[0336] 为测定体外毒性,如下进行细胞生存力测定。EL4 小鼠 T- 细胞淋巴瘤细胞 (ATCC TIB-39) 在 MTS/PMS Cell Titer 96 (Promega) 内以每孔 10^5 个细胞进行培养。如图 3 内所示,将 MPP1、MPP2 和 MPP3 以 1×10^{-13} M- 1×10^{-7} M 添加并与细胞在 37°C 温育 4 小时。随后根据 MTS/PMS 试剂盒的制造商的指导,通过在平板读数仪上对平板读数而测定细胞生存力。如图 3 内所示, MPP 毒性比野生型气单胞菌溶素原低,其 LC₅₀ 是 4×10^{-9} (MPP1)、 1×10^{-9} (MPP2) 和 1×10^{-7} (MPP3),相反,野生型的 LC₅₀ 是 1.5×10^{-10} 。

[0337] 为测定体内毒性,将 MPP 静脉内施用至小鼠。野生型气单胞菌溶素原 (SEQ ID NO :2) 对小鼠的毒性高;1 μ g 剂量在 1 小时内引起死亡并且在单次 IV 注射 24 小时后的 LD₁₀₀ (即在 24 小时内杀死 100% 动物的剂量) 是 0.1 μ g。与之相比, MPP1 (SEQ ID NO :4) 在注射 24 小时后的 LD₁₀₀ 高 25 倍 (即 2.5 μ g 总剂量)。

[0338] 实施例 5 :MPP5 (组氨酸标记的 MPP) 的制备

[0339] 本发明组氨酸标记的 MPP (MPP5) 如下制备。对含有编码 MPP1 的基因的质粒插入物进行修饰以使纯化更简易并提高产量。对 35 个核苷酸的片段 (stretch) 进行修饰以防止环形成,并留出 ATG 起始密码子上游的 23 个核苷酸 (Diep 等, Mol. Microbiol. 30 :341-52, 1998), 其中所述 35 个核苷酸的片段包括核糖体结合位点和 ATG 起始密码子,而且其在转录时形成导致蛋白质的产量减少的二级环结构 (Burr 等, J. Bacteriol. 183 :5956-63, 2001)。这增加了可以释放至 CB3 的培养上清液内的 MPP 的量 (Burr 等, J. Bacteriol. 183 :5956-63, 2001)。将具有 这种新上游序列的构建体命名为 γ 123 启动子构建体。通过用 KpnI 和 EcoRI 消化 MPP1 构建体,随后连接所得片段至 γ 123-aerA::pTZ18U 的 KpnI/EcoRI 位点而实现变化。所得构建体称作 γ 123-MPP1::pTZ18U。

[0340] 使用 2 步法 QuikChange (Stratagene) 方案完成添加 His 标签。在第一步骤内, 3 个

His 残基通过合成两种引物 (3 个 CAT 密码子编码额外的 His 残基) 而添加到 γ 123-MPP1 DNA 的末端:

[0341] EndHis1(有义):5'-GCT GCC AAT CAA CAT CAT CAT TAACGG CAG CGC-3' (SEQ ID NO:26)

[0342] EndHis1(反义)5'-GCG CTG CCG TTA ATG ATG ATG TTG ATTGGC AGC-3' (SEQ ID:27)

[0343] 这些引物按照 Stratagene 对 QuikChange 试剂盒所建议的方案使用。一旦 3 个 His 残基的 DNA 的加入通过测序得到证实,则进行第二次 QuikChange 反应以便添加最后 3 个 His 残基的核苷酸。在该步骤内,所用的引物是:

[0344] EndHis2(有义)5'-GCC AAT CAA CAT CAT CAT CAT CAT CATTAA CGG CAG CGC-3' (SEQ ID NO:28)

[0345] EndHis2(反义)5'-GCC AAT CAA CAT CAT CAT CAT CAT CATTAA CGG CAG CGC-3' (SEQ ID NO:29)。

[0346] 在第二轮 PCR 后,筛选克隆并对其测序以证实 6 个 His 残基在 γ 123-MPP1 末端以正确的可读框内正确插入,并对 γ 123-MPP1 序列没有造成其它变化。得到的质粒命名为 γ 123-MPP5::pTZ18U,并对 γ 123-PSAH6 插入区测序 (见图 34)。

[0347] γ 123-MPP5 的核苷酸序列与 MPP1 构建体核苷酸序列在 ATG 起始密码子之前的区域内的差异是 γ 123 启动子替换正常 aerA 上游序列。 γ 123-MPP5 的核苷酸序列还具有紧邻 TAA 终止密码子之前的额外 CAT 重复序列。当 γ 123-MPP5 的可读框翻译成氨基酸序列时,与 MPP1 氨基酸序列比较可见的仅存差异是在蛋白质的 C 末端添加了 6 个组氨酸残基。

[0348] γ 123-MPP5 克隆至 pMMB208 表达载体

[0349] 将通过添加 γ 123 启动子和 His 标签产生的 γ 123-MPP5 克隆至质粒 pMMB208 内。该质粒因其赋予氯霉素抗性而选择,它含有 IPTG 诱导型 tac 启动子并且可以通过转接作用转移至杀鲑气单胞菌内。因此,将 γ 123-PSA PAH6 插入物克隆至 pMMB208 质粒的 Hind III 和 EcoRI 位点内。得到的质粒 γ 123-MPP5::208 转接至杀鲑气单胞菌菌株 CB3 用于产生 MPP5。

[0350] 为纯化 GLP MPP5,用大约 1% v/v 摇瓶接种物接种初始 pH 设定为 6.90 ± 0.15 及温度 27°C 的 30L 无菌确定成分培养基。培养基的 pH 通过发酵期间自动添加无菌的酸/碱而维持在 6.90 ± 0.15 。调节发酵罐 RPM 和 SLM 以便在全部时间内维持容器内的溶氧浓度 (DOT) $\geq 20\%$ 。细胞密度达到 $600\text{nm OD } 0.3-0.6$ 时,添加异丙基硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导 MPP5 表达。表达的蛋白质分泌至培养基并在诱导数小时后得以收获。使用 60 SP CUNO 滤器回收含有 MPP5 的上清液。细胞分离后,上清液使用 30,000 NMWC TFF 膜浓缩。浓缩的上清液使用两个层析步骤加以纯化产生可接受纯度蛋白质:镍螯合层析,随后阴离子交换层析。合并来自阴离子交换层析步骤中的含有 MPP5 的部分,并且将得到的材料通过超滤作用浓缩至大约 1mg/mL 并且随后透析滤过 (diafiltered) 至制剂缓冲液内。纯化的 MPP5 使用 $0.22\mu\text{m}$ 绝对过滤器在鉴定的生物安全柜内无菌过滤并冷冻至 -70°C 直至需要时。使用该方法纯化的 MPP5 终产率是大约 100mg/L 。

[0351] 实施例 6:在白化大鼠内 MPP5 的急性前列腺内或静脉内推注的毒性研究。

[0352] 本实施例显示表明对大鼠前列腺内施用组氨酸标记的 MPP (MPP5) 能够减少前列

腺重量的研究的初步结果。

[0353] 结果简述

[0354] 本研究的目的在于证实单次前列腺内注射或静脉内推注至雄性大鼠,随后观察 1、14 或 28 日时间后,MPP (MPP5) 的最大耐受剂量 (MTD) 并旨在研究 MPP (MPP5) 的潜在毒性和毒性动力学。MPP5 是包含 PSA 切割位点的组氨酸标记的气单胞菌溶素原分子。

[0355] 研究设计详述于表 7 和 8 内:

[0356] 表 7:研究设计

[0357] MTD 研究

[0358]

组	处理	剂量水平(μg)	剂量体积(μL)		雄性的数目	
			IP	IV	IP	IV
6	MPP5	10	20	500	3	3
7	MPP5	20	20	500	3	3
8	MPP5	40	20	500	3	3
9	MPP5	50	-	500	-	3

[0359] IP- 前列腺内, IV- 静脉内,动物在 48 小时观察时间后被处死。

[0360] 表 8:主要研究设计和毒物动力学研究设计

[0361]

组	处理	剂量水平(μg)	途径	主要研究结束每组处死的雄性动物			TK 研究动物
				第 2 日	第 15 日	第 29 日	
1	对照	0	IP	7	7	6	9
2	MPP5	2	IP	7	7	6	9
3	MPP5	10	IP	7	7	6	9
4	MPP5	25	IP	7	7	6	9
5	MPP5	25	IV	7	7	6	9

[0362] IP- 前列腺内 (20 μL), IV- 静脉内 (0.05mL)、TK- 毒物动力学

[0363] 评价如下项目:临床征兆、体重、食物消耗、眼科学、血液学、血清化学、尿分析、毒物动力学、尸体剖检的大体观察、器官重量和 组织病理学。体重、体重增加、食物消耗、眼科学或尿分析参数不受影响。在第 2 日发现一只使用 40 μg 做前列腺内处理的 MTD 动物死亡。其在死亡之前不存在与处理相关的临床征兆。胃内见深色病灶并且在注射部位 (前列腺) 处有明显暗色区域和肿胀。在第 2 日发现两只使用 25 μg 做前列腺内处理的主要研究动物死亡。在死亡之前,其中一只动物不存在处理相关性临床征兆,而另一只动物观察到绒毛染色 (furstaining) (口鼻部)、蓝色皮肤、活动性降低、虚弱、下降的肌肉张力、清亮液体排出物 (眶周)、苍白眼 (pale eyes)、呼吸费力、侧卧和触感冰凉。其中一只动物的肉眼检查结果包括:在注射部位 (前列腺) 处的暗色区域;睾丸内的深色病灶;腹腔内苍白色的清亮流

体,包括靠近肝脏的苍白色物质。在另一只动物中,脂肪和空肠内见损害,包括变色。肝脏内见粘连,胰脏增厚,胃和胸腺内有多个暗色区域并且在靠近附睾的腹部脂肪内有深色病灶。然而,没有确定这两只雄性大鼠的具体死因,据推测接近肾脏的前列腺炎症的严重性和并发的全身性退化改变导致这些动物死亡。

[0364] 在以全部 MTD IP 剂量水平处理的动物内均可见到处理相关性临床征兆。第 1 日和第 4 日间,在全部组的一些动物中的一个或多个部位(包括口鼻部、颚、前爪、眶周和腹侧/背侧的颈部)内见到了红色的绒毛染色。注意到在使用 20 μ g 和 40 μ g 时,分别具有 1/3 的动物出现蓝色皮肤变色(手术部位、腹部部位、泌尿生殖器部位或腹股沟部位),其中包括使用 40 μ g 的一只动物内的泌尿生殖器肿胀。据记录,在静脉内处理的 MTD 动物内,使用 50 μ g 处理的动物中红色绒毛染色(口鼻部和/或眶周)的发生率更高。

[0365] 红色绒毛染色(口鼻部)主要在来自全部 IP 剂量水平的主要研究动物(包括对照)内见到,但是通常在处理的动物内具有更高的发生率。认为此临床征兆可能是处理相关的。红色的绒毛染色(口鼻部)还在全部 IV 的主要研究动物内观察到。在注射部位(尾部)记录到了其它的临床征兆,其包括皮肤结痂和/或发红或其它变色。此外,由于损害和怀疑其自残,必须对两只动物进行断尾。这些稍后的变化提示了在组织病理学检查后得以进一步证实的检品制剂的潜在刺激性。

[0366] 第 2 天,在主要研究的 IP 动物中,观察到一些白细胞参数具有剂量相关性增加。在所有使用 10 μ g 和/或 25 μ g 处理的组中,WBC 计数、嗜中性粒细胞计数、单核细胞计数和嗜碱性粒细胞计数均增加。在使用 25 μ g 的 MCHC 内以及在全剂量水平的 MPV 内也见到了增加。在全部的剂量水平均记录到网织红细胞百分数和绝对值的减少。在活化的部分促凝血酶原激酶时间内记录到全部 IP 剂量水平均具有轻微而剂量相关性的增加。在使用 25 μ g 静脉内处理的动物中观察到相似的变化。WBC 计数、嗜中性粒细胞计数和嗜碱性粒细胞计数增加。MCHC、MPV 和红细胞分布宽度(RDW)也增加并且网织红细胞的百分数和绝对值减少。在 14 日观察后处死的动物内,仅见到 RDW 和 MPV 增加并且在 28 日后,在血液学参数方面没有记录到差异。认为在观察 1 日后处死的动物内所记录到的变化与检品相关。在 15 日和 28 日观察时间后所示的结果证实了从这些变化中的恢复。

[0367] 使用 25 μ g 时,在第 2 日见到平均天冬氨酸氨基转移酶浓度和平均丙氨酸氨基转移酶浓度的剂量相关性增加,并认为是明显的。在使用 25 μ g IP 时,也记录到直接胆红素、尿素、肌酸酐和三酰甘油浓度的增加。在 25 μ g 时见到葡萄糖浓度减少并且在 ≥ 10 μ g 时白蛋白浓度减少,但是仅在 25 μ g 时才会使相关的白蛋白对球蛋白比率减少和使总蛋白浓度减少。在 25 μ g IV 处理的动物内,见尿素和钙浓度的轻微增加,并且还记录到球蛋白浓度的轻微增加,因而使得白蛋白对球蛋白的比率相应减少。认为这些变化与在注射部位处观察到的炎症相关。在第 29 日,只有 25 μ g IP 记录到了丙氨酸氨基磷酸酶浓度的增加和间接胆红素浓度的减少。

[0368] 对于静脉内施用,估计复合的消除半衰期为 12.8 小时。 $C_{\max}$ 可以反向外推出 0 小时时具有的值为 81.3ng/mL。观察到的峰值(在首次采样时间)是 74.3ng/mL。全身清除率(CL)和分布容积(V_z)据估计分别为 46.3mL/h 和 841mL。前列腺内施用后,对于所有的情况而言,所观察到的 $t_{\max}$ 均在给药 4 小时后出现,其中 10 μ g 的峰值是 2.95ng/mL,25 μ g 的峰值是 3.51ng/mL。观察到的 $AUC_{0-t_{\text{最后}}}$ 似乎在较高剂量时减少,原因是所观察到的 $t_{\text{最后}}$ 不

同。使用 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0-t_{\text{最后}}}$ 评估用于前列腺内途径的剂量线性。经剂量归一化的两种暴露参数均从 $10 \mu\text{g}$ 减少至 $25 \mu\text{g}$, 并且估计的相应生物利用率是 23.7% 和 4.38%, 全部这些参数表示随剂量水平渐增, MPP5 从前列腺被有限地吸收至全身循环内。

[0369] 在 MTD 相期间, MPP5 在雄性大鼠内以 $40 \mu\text{g}$ 的单次 IP 剂量给药与具体死因不明的死亡有关。MPP5 在雄性大鼠内单次 IV 给药的最大耐受剂量高达 $50 \mu\text{g}$ 。

[0370] 在主要研究相期间, MPP5 在雄性大鼠内以 $25 \mu\text{g}$ 单次 IP 注射引起 2 只大鼠死亡, 在 $\geq 2 \mu\text{g}$ 时引起前列腺注射部位大体变化、微观变化和器官重量变化。不能确定地找到两只雄性大鼠的死因, 但是推测前列腺炎症的严重性和相关变化对这些动物的恶化 / 死亡有作用。另一个检品相关性变化在恢复期的第 2、15 和 / 或 29 日观察到。认为在其它组织内的大体变化、微观变化和器官重量变化继发于前列腺注射部位变化。

[0371] MPP5 在雄性大鼠内以 $\geq 25 \mu\text{g}$ 的剂量单次 IV 注射引起尾静脉注射部位的大体变化和 / 或微观变化。这些在 $25 \mu\text{g}$ 时所产生的变化于恢复期的第 2、15 和 29 日随进行性恢复而被观察到, 并说明检品的刺激性效应。认为其它组织内的大体变化和微观变化继发于注射部位变化。第 2 日的肝脏和脾脏的器官重量变化没有微观的相关性并在第 15 日恢复。

[0372] 结论是: MPP5 通过在多达 $40 \mu\text{g}$ 剂量水平上的单次前列腺内注射或在多达 $50 \mu\text{g}$ 剂量水平上的单次静脉内注射施用引起以 $25 \mu\text{g}$ 和 $40 \mu\text{g}$ IP 的无清晰死因的死亡, 然而, 认为检品相关性前列腺炎症的程度和与肾脏接近和并发的全身性退化是死亡的促进性因素。 $\geq 10 \mu\text{g}$ 时可见可逆变化大多在临床征兆 ($\geq 2 \mu\text{g}$)、血液学和临床生物化学参数。病理学变化在全部剂量水平上以剂量相关性方式持续存在, 但是在静脉内处理的动物内显示出衰退迹象。因此, 未对前列腺内途径或静脉内途径确定不可观察的效应水平 (NOEL)。

[0373] 实验方法

[0374] 3.1 试验系统

[0375] 使用总共 180 只雄性 Sprague Dawley (Cr1:CD[®] (SD) IGS BR) 大鼠 (褐鼠)。在处理开始时, 动物为 12 至 15 周龄并且体重范围是 399g 至 495g。

[0376] 3.2 兽医学处理

[0377] 在第 4 日和第 7 日, 分别对动物 5010 和 5004 实施断尾, 原因是怀疑其自残。当这些动物进行静脉内处理时, 将切断的组织保留在中性缓冲的 10% 福尔马林内用于病理学评价。

[0378] 在处理之前, 将全部动物称重并使用基于计算机的随机化方法将其随机分配到处理组内。使用体重作为参数, 通过分层进行随机化。不将健康状况不良的动物分配到组内。研究设计详述于表 9 (MTD) 和表 7 (主要)。

[0379] 表 9:

[0380] MTD 研究

[0381]

组	处理	剂量水平 (μg)	剂量体积(μL)		雄性动物数	
			IP	IV	IP	IV
6	MPP5	10	20	500	3	3
7	MPP5	20	20	500	3	3
8	MPP5	40	20	500	3	3
9	MPP5	50	-	500	-	5

[0382] IP- 前列腺内, IV- 静脉内

[0383] 分配到 MTD 研究的动物在 48 小时观察时间后处死。在第 1 日, 分配到 IP 剂量方案的动物 6001 和 8001 因技术失误 (给药超过分配给它们的剂量 10 倍) 而分别由备用动物 6101 和 8101 替换。同一日稍后, 发现动物 8001 (400 μg) 在给药大约 4 小时后死亡, 并且动物 6001 (100 μg) 在第 1 日结束时因不良状态而进行安乐死。这些动物接受尸体剖检, 包括详细的外部检查和内部检查, 然而, 未保留用于组织病理学检查的组织。在死亡之前, 动物 6001 的临床征兆包括虚弱、下降的肌肉张力、部分闭眼、触感冰凉、减少的活动和异常步态。动物 8001 的临床征兆包括侧卧、呼吸费力、减少的呼吸频率、蓝色皮肤、苍白眼、触感冰凉、减少的活动、虚弱和下降的肌肉张力。对动物 6001 的大体检查显示在施用部位 (前列腺) 处仅有暗色区域。对动物 8001 而言, 在下颌骨淋巴结内两侧具有深色变色并且在注射部位 (前列腺) 具有肿胀。认为这些死亡可能与高剂量 MPP5 施用相关并且加以报道以便为本研究内的 MTD 提供进一步参考。

[0384] 因为在 $\leq 40 \mu\text{g}$ 时所见到的观察结果有限, 故在第 13 日 (MTD 研究) 添加了以 50 μg 的剂量水平经静脉内途径给药的额外动物, 目的是进一步探测经过该途径的 MPP5 毒性。

[0385] 在开始给药之前, 认为动物 1025 因错位咬合而不适合研究用途, 并由备用动物替换, 此备用动物变成动物 1125。遣散来自该研究的仍未分配至组内的全部动物并且记录对它们的处置。

[0386] 3.3. 检品和载体对照品

[0387] 检品是浓度 3.2mg/mL 的 MPP5 (批号 PTIC-MF-PAL-DS-001)。该检品冷冻时是无色固体并且在 -20°C 避开直射光线进行贮存。载体对照是磷酸盐缓冲盐水-EDTA (pH 7.4)。

[0388] 3.4 给药制剂的制备

[0389] 剂量制剂在使用当日制备。在每一日, 量取适宜量的 3.2mg/mL MPP5 贮存液并将其用适宜量的 PBS, 1mM EDTA 稀释。

[0390] 3.5 施用检品 / 对照品

[0391] MTD 研究

[0392] 具有三只大鼠的组如 3.2 部分和表 9 内所述在单日内以前列腺内或静脉内方式给药, 并观察临床征兆和潜在毒性直至给药后 48 小时。对于静脉内施用, 检品以 0.5mL 的剂量体积经尾静脉静脉内注射施用。

[0393] 对于前列腺内组,在剂量施用前,使用异氟烷麻醉动物。在手术前至少 1 小时并在手术后多达 2 日,动物接受抗生素苄星青霉素 G 和普鲁卡因青霉素 G(0.1mL) 肌内注射。动物还在手术当日接受丁丙诺啡 (0.05mg/kg) 皮下注射。

[0394] 使用手术刀片,从阴茎颅侧 0.5cm 开始,行大约 2cm 的正中切口。将腹部切开同样长度。定位前列腺的两片腹叶并使用适宜的注射器将 20 μ L 配制的 MPP5 或 PBS/EDTA pH 7.4 注射至右侧腹叶。在缝合前,该部位用温热 (大约 37°C) 的 0.9% 氯化钠注射液 (U. S. P.) 冲洗。使用适宜的缝合材料分层缝合该部位。

[0395] 对于分配至静脉内途径组的动物,经尾静脉,静脉内施用 0.5mL 剂量体积的检品。

[0396] 主要研究

[0397] 根据在 MTD 相期间建立的方法对动物剂量给药。对于分配至静脉内途径组的动物,经尾静脉,静脉内施用 0.5mL 剂量体积的检品。处理完成后,对主要研究动物在第 1、14 或 28 日恢复期内保持不剂量给药。

[0398] 3.6 观察

[0399] 临床观察:在整个研究期间,每日均对全部动物观察两次 (在抵达日和尸体剖检日,观察一次) 死亡率和不良健康征兆和 / 或对处理的反应。此外,在处理开始前进行至少一次详细检查以及在整个处理和恢复期期间每日均进行详细检查 (主要研究动物和 MTD 研究动物)。

[0400] 体重:在随机分配的当日对全部动物测量个体体重并在整个处理和恢复期期间每周测量两次个体体重 (主要研究动物)。此外,在计划尸体剖检前对每只主要研究动物 / 恢复动物称重 (禁食)。在剂量给药前和在终末期处死前对 MTD 研究动物称重。

[0401] 食物消耗:从预处理期的最后一周开始并在整个处理期和恢复期期间,对全部主要研究动物每周测量个体食物消耗。

[0402] 眼科学:眼底镜检查 (间接的眼底检查法) 和生物显微镜 (裂隙灯) 检查由委员会认为合格的兽医眼科医师在开始处理 (全部动物) 前进行一次并在尸体剖检 (主要研究动物) 前再进行一次。

[0403] 实验室研究:对全部主要研究动物在第 2、15 和 29 日尸体剖检时进行用于血液学和血清化学检验的血液采样。在血液采样前对动物禁食过夜。在异氟烷麻醉下从腹主动脉内收集血液样品。

[0404] 尿样品在尸体剖检前在第 2、15 和 29 日从置于代谢笼内的主要研究动物内收集大约 16 小时时间,在此期间对动物禁食。

[0405] 所检查的血液学参数是:活化的部分促凝血酶原激酶时间、血液细胞形态学、红细胞指数 (MCV、MCH、MCHC 和 RDW)、红细胞比积、血红蛋白、平均血小板体积、血小板计数、凝血酶原时间、红细胞计数、网织红细胞计数 (绝对值和百分数)、血液白细胞计数 (总数、绝对值和百分数的微分)。

[0406] 所检查的血清化学参数是:(计算的)A/G 比率、丙氨酸氨基转移酶、白蛋白、碱性磷酸酶、天冬氨酸氨基转移酶、血液尿素氮、氯化钙、胆固醇、肌酸酐、(计算的)球蛋白、葡萄糖、无机磷、钾、钠、总胆红素、总蛋白、三酰甘油。

[0407] 所检查的尿分析参数是:胆红素、血液颜色和外观、肌酸酐、葡萄糖、酮、显微镜检查亚硝酸盐的离心沉积物、pH、蛋白质、比重、尿胆素原、体积。

[0408] 免疫原性评估（仅在主要研究的第 14 日和第 28 日进行）

[0409] 给药前（基线）从每只主要研究大鼠的颈静脉中收集血液样品并在终末期处死时异氟烷麻醉后（随用于临床病理学的血液采样一起）自腹主动脉收集血液样品。样品放置在血清分离管内，颠倒数次，允许在室温凝固 20 分钟至 30 分钟，且随后在大约 4℃ 下以大约 1200g 离心 10 分钟。

[0410] 3.7 毒性动力学

[0411] 在研究第 1 日，在给药前，给药后 15 分钟和 30 分钟及 1、2、4、8、24 和 48 小时的每个时间点依次从每组的三只毒物动力学研究大鼠中，通过颈静脉穿刺收集血液样品（~0.5mL）至 K3 EDTA 管内。血液样品立即置于湿冰（wet ice）上直至通过大约 2700rpm 冷冻（大约 2℃ 至 8℃）离心 10 分钟进行分离。将血浆分离，转移至第二个管内并置于干冰上。血浆样品贮存在大约 -20℃ 并对 MPP5 的水平进行分析。

[0412] 通过基于抗体夹心原理的酶联免疫吸附测定（ELISA）分析血浆样品。对 MPP5 特异的捕获抗体（小鼠抗气单胞菌溶素单克隆抗体）包被在 96 孔微量滴定平板上以产生捕获标准物和质控样品内存在的分析物的固相。随后添加与分析物分子的不同表位结合的第二抗体（兔抗气单胞菌溶素多克隆抗体）以完成抗体-分析物-抗体夹心。随后添加与兔 IgG 抗体恒定区结合的检测抗体酶缀合物（山羊抗兔 IgG，马辣根过氧化物酶缀合物）。捕获的缀合物使用四甲基联苯胺底物进行显像并使用 SpectraMAX 平板读数仪在 450nm 测量。

[0413] 对于前列腺内给药途径，根据血浆浓度数据进行无房室毒物动力学分析。作为惯例，毒物动力学分析包括评估 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、AUC、 k 和 $t_{1/2}$ 。 $t_{\max}$ 和 $C_{\max}$ 是观察值。如果可能，通过梯形法则（Gibaldi 和 Perrier, 1982），使用标准的计算机软件程序 WinNonlin (3.2 版本) 计算 AUC 参数。通过浓度-时间曲线的表观终末期内所选时点的线性回归分析确定 K 。表观终末半衰期如下计算： $t_{1/2} = \ln 2/k$ 。

[0414] 对于静脉内给药途径，根据血浆浓度数据进行无房室毒物动力学分析。作为惯例，毒物动力学分析包括评估 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、AUC、 k 、 $t_{1/2}$ 、 V_z 和 CL。 $C_{\max}$ 将反向外推至时间 0 小时。通过梯形法则（Gibaldi 和 Perrier, 1982），使用标准的计算机软件程序 WinNonlin (3.2 版本) 计算 AUC 参数。通过浓度-时间曲线的表观终末期内的所选时点的线性回归分析确定 K 。表观终末半衰期如下计算： $t_{1/2} = \ln 2/k$ 。清除率 (CL) 由剂量/AUC 计算并且分布的表观容积 (V_z) 计算为 CL/k 。

[0415] 3.8. 处死方法

[0416] 大体病理学：使研究期间发现死亡的 MTD 研究动物接受尸体剖检处理，不保存组织。使研究期间发现死亡的全部主要研究动物和恢复动物接受尸体剖检处理并且保留组织样品。

[0417] 在处理和恢复期结束时，全部存活的动物在异氟烷麻醉后从腹主动脉放血并且收集血液样品用于实验室研究。为了避免自体溶解变化，使全部的主要研究动物在安乐死后，尽可能快地进行尸体的完整大体病理学检查。

[0418] 器官重量：对于计划尸体剖检时进行安乐死的每只主要研究动物，切下不带脂肪的如下器官并称重：肾上腺、脑、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、睾丸、垂体、前列腺、脾脏、胸腺、甲状腺叶（和甲状旁腺）。成对的器官一起称重并计算相对于体重的器官重量比率。

[0419] 组织保存：在每只主要研究动物的尸体剖检结束时，保留如下的组织和器官：异

常物、动物标识、肾上腺、主动脉（胸廓）、骨和骨髓（胸骨）、脑（大脑、小脑、中脑和延髓）、盲肠、结肠、十二指肠、附睾、食管、眼、哈德氏腺、心脏（包括主动脉部分）、回肠、组 1 至 4 的注射部位（前列腺）、组 5 的注射部位（尾静脉）、空肠、肾脏、泪腺、肝脏（2 片叶的样品）、肺脏（2 片叶的样品）、（下颌骨和肠系膜）淋巴结、（腹股沟）乳腺、鼻腔和鼻窦（3 个水平）、视神经、胰脏、垂体、前列腺（未注射的叶）、直肠、唾液腺、坐骨神经、精囊、骨骼肌、（腹股沟）皮肤、（颈部）脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺叶（和甲状旁腺）、舌、气管、（双侧）输尿管、膀胱。

[0420] 中性缓冲的 10 % 福尔马林用于组织固定和保存，除了在岑克尔固定液（zenker's fluid）内固定（仅安乐死的动物）的附睾、眼、视神经和睾丸之外。对于全部安乐死的动物，制备并染色三张股骨骨髓涂片。保留涂片但不进行评价。

[0421] 组织病理学：

[0422] 将组织包埋在石蜡内、切片（鼻腔和鼻窦、胸骨和尾静脉注射部位在切片前进行脱钙）并用苏木精及伊红染色并做如下组织病理学检查：

[0423] 组 1、4 和 5：列于组织保存下的组织（除了动物标识和直肠）

[0424] 组 2 和组 3：显示处理相关性结果的组织，以下列出全部大体损害和靶组织：

[0425] 对于全部剂量组内的全部主要研究动物，将靶组织的组织样品进行加工并检查，其中所述的靶组织包括脑、心脏、肾脏、肝脏、淋巴结、注射部位（前列腺）、前列腺（未注射的叶）、脾脏、甲状腺叶（和甲状旁腺）、输尿管和膀胱。视神经、甲状旁腺和乳腺如果分别存在于眼、甲状腺和皮肤的常规切片内，则仅做组织病理学检查。

[0426] 统计分析：

[0427] 对研究进行期间所获得的数字数据计算组均值和标准差。对于每种目的参数，使用 Levene 氏检验在 0.05 显著性水平上比较组方差。当组方差间的差异未见显著时，则进行参数的单因素方差分析（ANOVA）。若 ANOVA ($p \leq 0.05$) 显示均值间差异显著，随后使用 Dunnett's "t" 检验来进行对照组和每个处理组间的组均值比较。

[0428] 无论如何当 Levene 氏检验显示非均匀的组方差 ($p \leq 0.05$) 时，则使用无参数 Kruskal-Wallis 检验来比较所考虑的全部组。如果 Kruskal-Wallis 检验是显著的 ($p \leq 0.05$)，随后使用 Dunn 氏检验评估对照组和每个处理组间差异的显著性。

[0429] 对于每一目的配对组比较，显著性在 0.05、0.01 和 0.001 水平上报道。

[0430] 结果和讨论

[0431] 1. 剂量制剂分析

[0432] 在表 10 内显示对研究中所用的给药制剂的 pH、摩尔渗透压浓度 和密度评估的结果。

[0433] 表 10：剂量制剂的 pH、摩尔渗透压浓度和密度

[0434]

组编号	剂量水平 (μg)	途径	pH	摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)	密度 (g/cm^3)
1	0	IP	7.39	300	1.0037
2	2	IP	7.38	299	1.0030
3	10	IP	7.36	298	1.0041
4	25	IP	7.36	295	1.0049
5	25	IV	7.36	301	0.9999
6	10	IV/IP	7.35/7.35	308/304	0.9941/1.0043
7	20	IV/IP	7.35/7.34	307/302	1.0052/1.0002
8	40	IV/IP	7.35/7.32	305/297	1.0048/1.0040
9	50	IV	7.37	308	1.0057

[0435] 2. 死亡率

[0436] MTD 研究

[0437] 在第 2 日,发现动物 8101 ($40 \mu\text{g}$ 、IP) 死亡。其在死亡前,不存在处理相关的临床征兆。在尸体剖检时,在胃内见到深色病灶并且在注射部位(前列腺)记录到暗色区域和肿胀。未确定清晰死因。

[0438] 主要研究

[0439] 在第 2 日,发现动物 4005 和 4013 ($25 \mu\text{g}$ 、IP) 死亡。在死亡前,未记录到动物 4013 存在处理相关的临床征兆。对于动物 4005 而言,记录到绒毛染色(口鼻部)、蓝色皮肤、减少的活动、虚弱、下降的肌肉张力、清亮液体排出物(眶周)、苍白眼、呼吸费力、侧卧和触感冰凉。

[0440] 在对动物 4005 尸体剖检时,大体尸检结果包括:在注射部位(前列腺)的暗色区域、睾丸内深色病灶、腹腔内苍白色的清亮流体,包括毗邻肝脏的苍白色物质。对于动物 4013,在脂肪和空肠内见到损害,包括变色。肝脏内见粘连、胰脏增厚,胃和胸腺内的多个暗色区域和在腹部脂肪内毗邻附睾的深色病灶。然而,死因在两例动物内不确定,据推测组织病理学所观察到的接近肾脏的前列腺炎症的严重性和并发的全身性退化改变对这些动物死亡有作用。

[0441] 3. 临床观察

[0442] MTD 研究

[0443] 在全部 MTD IP 剂量水平 ($10 \mu\text{g}$ 至 $40 \mu\text{g}$) 处理的动物内均见到处理相关的效应。在第 1 日和第 4 日之间,在全部组的 2/3 动物中的一个或多个部位(包括口鼻部、颞、前爪、眶周和腹侧/背侧的颈部)内见到了红色绒毛染色。注意到在使用 $20 \mu\text{g}$ 和 $40 \mu\text{g}$ 时,分别具有 1/3 的动物出现蓝色皮肤变色(手术部位、腹部部位、泌尿生殖器部位或腹股沟部位),其中包括在动物 8002 ($40 \mu\text{g}$) 内的泌尿生殖器肿胀。虽然这些观察可能与手术操作相关,但是使用 $40 \mu\text{g}$ 时其发生率和严重性增加。

[0444] 在静脉内处理的动物中,处理相关性临床征兆限于红色绒毛染色(口鼻部和/或眶周),据记录在使用 50 μ g 处理的动物内具有更高的发生率。在第 1 日和第 4 日期间,与在 < 50 μ g 观察到的 1/3 动物具有这些征兆相比,多达 5/5 的给予高剂量的动物观察到具有这些征兆。

[0445] 主要研究

[0446] 第 2 日结束

[0447] 据记录,来自全部 IP 剂量水平的一些动物具有红色绒毛染色(口鼻部、眶周和/或颅),其中这些动物包括 3/7 对照动物、使用 2 μ g 的 1/7 动物、使用 10 μ g 的 5/7 动物和使用 25 μ g 的 3/7 动物。观察到动物 4014(25 μ g) 具有来自双眼的红色排出物,并且动物 4015 在第 2 日尸体剖检前活动减少而且触感冰凉。

[0448] 4. 食物消耗

[0449] 对食物消耗没有影响。

[0450] 5. 眼科学

[0451] 无眼科学结果。

[0452] 6. 血液学

[0453] 在第 2 日处死的 IP 动物内,观察到一些白细胞参数具有 2 倍或更高倍数的剂量相关性增加。全部处理组的血液白细胞(WBC)计数、嗜中性粒细胞计数、单核细胞计数和嗜碱性粒细胞计数均增加,并且在 10 μ g 和/或 25 μ g 时达到统计显著性。在 25 μ g 上的平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)及在全部剂量水平上的平均血小板体积(MPV)内也见到了统计学上显著的增加。记录到在全部剂量水平的网织红细胞百分数和绝对值减少。据记录,活化的部分促凝血酶原激酶时间在全 IP 剂量水平上均具有轻微而剂量相关性的增加,并且在 25 μ g 上达到统计显著性。

[0454] 在用 25 μ g MPP5 静脉内处理的动物内观察到相似变化。WBC 计数、嗜中性粒细胞计数和嗜碱性粒细胞计数增加。MCHC、MPV 和红细胞分布宽度(RDW)也增加并且网织红细胞的百分数和绝对值减少。在观察 14 日后处死的动物内,仅见到 RDW 和 MPV 增加。在观察 28 日后,血液学参数方面不存在差异。在观察 1 日后处死的动物内记录到的变化被认为是检品相关性的并且与组织病理学相关。在 15 日和 28 日观察时间后所示的结果显示了从这些变化中恢复的迹象。认为其它微小差异是偶然的并且与处理不相关。

[0455] 7. 血清化学

[0456] 在第 2 日,见到平均天冬氨酸氨基转移酶浓度和平均丙氨酸氨基转移酶浓度剂量相关性增加在 25 μ g IP 时达到统计显著性。认为这些是在 25 μ g 上的明显变化。在使用 25 μ g IP 时,也记录到直接胆红素浓度、尿素浓度、肌酐浓度和三酰甘油浓度的增加。在 25 μ g 时见到葡萄糖浓度减少。在 $\geq$ 10 μ g 时白蛋白浓度减少,但是仅在 25 μ g 时才会使白蛋白对球蛋白的相关的比率减少和使总蛋白浓度减少。

[0457] 在 25 μ g IV 处理的动物内,见到尿素浓度和钙浓度的轻微增加。还记录到球蛋白浓度的轻微增加,伴随白蛋白/球蛋白(A/G)比率相应减少。认为球蛋白(及因此 A/G 比率)的变化可能与注射部位处的炎症相关。

[0458] 在第 15 日,在全部剂量水平上(包括 IV 处理动物)均见到了三酰甘油浓度的统计显著的减少。认为这些减少不是毒理学显著性的并且可能与脂代谢方面的微小变动相关。

[0459] 在第 29 日,仅在 25 μ g IP 时记录到丙氨酸氨基磷酸酶浓度的增加和间接胆红素浓度的减少。这些变化可能与组织病理学描述的继发变化相关。

[0460] 没有其它毒理学显著的变化。

[0461] 8. 尿分析

[0462] 对尿分析参数没有明显影响。

[0463] 9. 毒性动力学

[0464] MPP5 的血浆浓度通常在每组的单只动物之间在每一时点上相似的。由于剂量水平没有根据体重或前列腺重进行归一化,因而预期到在血浆浓度值上的某些变动。在从对照动物中收集的样品内或在给药前所收集的样品内的 MPP5 是不可定量的。

[0465] 在试验组内,MPP5 的血浆浓度通常随前列腺内所施用的检品的剂量水平增加而增加,在从给予 2 μ g 的动物中收集的任意样品中无可检测到的浓度的 MPP5。直至 24 小时在 10 μ g 处理的动物内是可检测的,直至 8 小时在 25 μ g 处理的动物内是可检测 MPP5 的并且直至 48 小时在组 5 (25 μ g, 静脉内) 是可检测的。总之,获得三条复合曲线并考虑对其做出进一步评价。

[0466] 可以对复合的 IV 曲线估计终末期,其中估计终末半衰期是 12.8 小时。对于其余曲线,不能可靠地估计终末期。因此,未报告衍生自 k 的全部参数 ($t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 % 外推)。对于 IV 曲线,从 $AUC_{0-t_{\text{最后}}}$ 外推的 $AUC_{0-\infty}$ 的百分数小于 6%,标示该曲线从实验数据中得以良好表征。

[0467] 在前列腺内给药后,对于所有的情况而言,所观察到的 t_{max} 在给药后 4 小时均出现,其中 10 μ g 和 25 μ g 的峰水平分别是 2.95ng/mL 和 3.51ng/mL。观察到的 $AUC_{0-t_{\text{最后}}}$ 在较高剂量时减少 (48.5 对 22.4ng/h/mL)。然而,在 25 μ g IP 时观察到的较短 $t_{\text{最后}}$ (8 小时对在 10 μ g IP 的 24 小时) 使该结果偏倚。在 IV 给药后, C_{max} 可以反向外推至时间 0 小时,得到 81.3ng/mL 的值。观察到的峰值 (在首次采样时间) 是 74.3ng/mL。全身清除率 (CL) 和分布容积 (V_z) 据估计分别为 46.3mL/h 和 841mL。

[0468] 前列腺内给药后的剂量线性用剂量归一化的平均血浆峰浓度和暴露参数曲线下的面积 (分别是 C_{max} 和 $AUC_{0-t_{\text{最后}}}$), 在 10 μ g 至 25 μ g 剂量水平上进行评估。来自 10 μ g 至 25 μ g 的经剂量归一化的两种暴露参数减少。这可能表示 MPP5 从前列腺被有限地吸收至全身循环内。

[0469] 基于前列腺内施用后在中等剂量至高剂量观察到的面积 ($AUC_{0-t_{\text{最后}}}$), 通过将这些面积 (对剂量水平归一化) 与静脉内施用后所获得的剂量归一化面积相比,测定生物利用率百分数。估计的生物利用率是 23.7% 和 4.38%。

[0470] 10. 器官重量

[0471] 前列腺内注射

[0472] 偶尔达到统计显著性的绝对器官重量和相对器官重量 (器官重量对体重) 的变化在全部处死日的前列腺内及在处死第 2 日的脾脏内被记录到。与对照比较,使用 10 μ g 和 25 μ g 的动物内前列腺重量在第 2 日增加 26% 至 45%。与对照比较,在以 $\geq 10 \mu$ g 处理的动物内前列腺重量在第 15 日降低 16% 至 24% 并且在第 29 日降低 19% 至 21%。这些变化与观察到的微观结果一致。与对照比较,脾脏重量在 25 μ g 时在第 2 日降低大约 36%。认为该变化是继发变化并且此变化在第 15 日恢复。

[0473] 静脉内注射

[0474] 与对照相比,以 25 μ g IV 的动物在第 2 日具有高大约 21% 的肝脏重量和脾脏重量,但是其没有组织学相关性,并在第 15 日恢复。

[0475] 11. 大体病理学

[0476] MTD 研究

[0477] 在全部 IP 剂量水平上鉴定前列腺注射部位变化。变动包括深度变色 / 分布区、斑纹和肥大 / 肿胀。在第 1 日替换的动物 (编号 6001、8001) 或 IP 注射后在第 2 日发现死亡的动物 (编号 8101) 具有一些如上所述的前列腺注射部位变化。未确定具体死因。在尾静脉进行静脉内 (IV) 注射与组 8 和组 9 动物的尾部上的痂有关。认为其它变化是散在的、与操作相关的或者是末期的 (agonal) 而且不与处理相关的。

[0478] 主要研究

[0479] 前列腺注射部位变化在全部处死日进行鉴定。第 2 日变化以全部剂量水平上的深度变色 / 分布区 / 病灶、粘连和肥大 / 肿胀为特征。在以 $\geq 10 \mu$ g 处理的动物中,第 15 日和第 29 日的变化描述为苍白区、隆起、坚硬和 / 或细小。以 $\geq 10 \mu$ g 处理时,在第 15 和 29 处死日时往往在肝脏和脾脏上看到粘连和苍白区,并且所述粘连和苍白区可能继发于前列腺注射部位变化。在 (25 μ g IP) 第 2 日发现死亡的动物 4005 具有一些如上所述的前列腺注射部位变化。未确定具体死因。

[0480] 在尾静脉进行的静脉内注射与全部处死日时尾部上的痂有关。溃疡在第 15 日和第 29 日出现,其损伤尾稍或不损伤尾稍。在第 2 处死日观察到肝脏增大。

[0481] 认为其它变化是散在的、与操作相关的或者是濒死的而且不与处理相关的。

[0482] 12. 组织病理学

[0483] 前列腺内注射

[0484] 在前列腺注射部位以 $\geq 2 \mu$ g 施用,第 2、15 和 29 日观察到归因于 MPP5 的微观变化。在第 2 日,全部剂量均观察到了细微至严重的急性炎症,所述急性炎症的严重性通常具有剂量依赖性的增加。炎症以血纤蛋白、混合的细胞浸润和腺泡坏死为特征。水肿和出血均在处理动物和对照动物中观察到,因此认为这具有部分的操作相关性。在第 15 日和第 29 日,全部剂量均观察到细微至明显的慢性炎症和 / 或纤维变性,所述慢性炎症和 / 或纤维变性的严重性通常具有剂量依赖性的增加。纤维变性、单核细胞浸润和腺泡坏死是炎症的特征。这些变化常常伴随并发的腺泡萎缩 / 腺泡扩张。在第 29 日,对照内罕见地观察到了细微的纤维变性和腺泡萎缩 / 腺泡扩张,并且由此认为这主要与处理相关。还在相邻的前列腺叶内观察到急性变化和慢性变化,所述急性变化和慢性变化通常具有较低的发生率和较弱的变化严重性。急性炎症、水肿和出血与第 2 日较高的前列腺重量相关,而慢性炎症、纤维变性和腺泡萎缩 / 腺泡扩张与第 15 日和第 29 日较低的前列腺重量相关,并且通常与大体尸检结果相关。这些变化显示 MPP5 在前列腺注射部位的刺激性效应。

[0485] 认为其它组织内的大量微观观察结果继发于前列腺注射部位炎症,或因其扩展至毗邻盆腔器官并遍及整个腹腔,或因其产生全身反应性变化和 / 或退化性变化。分别在脂肪、肝脏、大肠和小肠、胰脏、脾脏、胃、精囊、附睾、睾丸和膀胱内观察到具有或不具有囊表面或浆膜表面出血及纤维变性的急性炎症和慢性炎症。反应性变化和 / 或退化性变化包括:骨髓细胞样增生;脾脏内增加的髓外血细胞生成作用;淋巴结、脾脏和胸腺的淋巴

萎缩和 / 或增生 ;肝单核细胞浸润、单个细胞坏死和增加的有丝分裂象 ;以及睾丸萎缩 (并发附睾过小 (epididymis oligo) / 无精)。脾淋巴萎缩可以用于解释所记录到的施用 25 μ g 的雄性大鼠在第 2 日内的低脾脏重量,并且因此认为其是继发性的。

[0486] 未对第 2 日发现死亡的两只雄性大鼠 (25 μ g) 确定具体死因。然而,推测接近肾脏的前列腺炎症的严重性和并发的全身性退化改变可能对这些动物死亡有作用。

[0487] 其它变化是散在的、偶然的、濒死的或是在该年龄和品种的大鼠内可预期的并且不直接与处理相关的。

[0488] 静脉内注射

[0489] 在第 2、15 和 29 日,在尾静脉注射部位观察到归因于 MPP5 的微观变化。在第 2 日观察到的细微至明显的真皮及皮下组织急性炎症以血纤蛋白、出血、坏死和混合的细胞浸润为特征,伴随大多数动物具有或不具有表皮溃疡和痂形成。其中一只动物具有扩展到临近组织和局部淋巴结的中等程度坏死。在第 15 日和第 29 日变化发生率和严重性的降低显示进行性恢复。观察到以纤维变性和单核细胞浸润为特征的慢性炎症,其产生或不产生表皮溃疡及痂形成以及附近骨罕见的坏死和炎症。微观结果通常与宏观变化相关。这些变化显示 MPP5 的刺激效应,尤其在注射部位的血管周围组织内。

[0490] 认为其它组织内的低发生率的变化继发于在第 2 日观察到的注射部位炎性变化,并且这些变化通常在第 15 日和第 29 日恢复。这些变化包括:脾脏内的坏死和炎症;附睾、精囊、睾丸和肝脏内血管周围的嗜中性粒细胞浸润、单核细胞浸润或混合的细胞浸润;骨髓细胞样增生;淋巴结水肿;淋巴结、脾脏和胸腺内淋巴萎缩;以及在第 29 日观察到的睾丸萎缩。在第 2 日增加的肝脏重量和脾脏重量没有微观相关性。

[0491] 结论

[0492] 总之,通过单次在多达 40 μ g 剂量水平上的前列腺内注射或单次在多达 50 μ g 剂量水平上的静脉内注射施用 MPP5 引起以 25 μ g 和 40 μ g IP 的无清晰死因的死亡率,然而,认为检品相关性的前列腺炎症的程度及与肾脏接近和并发的全身性退化是死亡的潜在促进性因素。可逆变化大多在临床征兆 (≥ 2 μ g)、血液学和临床生物化学参数 (≥ 10 μ g) 内见到。病理学变化在全部剂量水平上以剂量相关性方式持续存在,但是在静脉内处理的动物内显示出衰退迹象。因此,未对前列腺内途径或静脉内途径确定不可观察的效应水平 (NOEL)。

[0493] 参考文献

[0494] Dunn, O.J. 1964, Multiple Comparisons using Rank Sums, Technometrics, 6, 241-256。

[0495] SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT[®] User's Guide, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 第 3884 页。

[0496] 实施例 7: MPP5 在猴中的急性毒性

[0497] 本实施例显示研究的初步结果,其中所述的研究表明前列腺内施用包含 PSA 切割位点的组氨酸标记的 MPP (MPP5) 导致对前列腺的剂量依赖性损伤。本研究的目的是在性成熟雄性猕猴 (食蟹猴) 中经过两周时间评估单次前列腺内注射 MPP5 的潜在局部毒性。

[0498] 实验设计概述

[0499] 一般描述:

[0500] 将总共 16 只雄性猕猴（食蟹猴）分配到下表 11 内所示的处理组内。动物大约 3.6 岁至 11.7 岁并且重量是大约 2.8kg 至 7.9kg。动物从中国、越南、印度尼西亚和毛里求斯进口。

[0501] 表 11：

[0502]

组编号	雄性动物数	剂量水平 ($\mu\text{g/g}$ 前列腺 ¹)	处死的动物数	
			第 3 日	第 15 日
1	4	0(对照)	2	2
2	4	1	2	2
3	4	5	2	2
4	4	25	2	2

[0503] ¹ 前列腺重量将从先前建立的前列腺重量与体重之间的关系中估计。将一半剂量注射到前列腺的每一叶内。

[0504] 全部动物一旦全身麻醉即经肛周的前列腺内注射给药。剂量给药首日称为第 1 日。对动物评价临床征兆（每日两次）、食物消耗（每日一次）、体重（第 1、3、8 和 15 日）、心电图（研究前和第 2 和 14 日）和眼状况（研究前和第 14 日）的变化。研究前和在第 3 和 14 日测定临床病理学指数（血清化学 [包括 C 反应蛋白]、血液学和血凝固）。在剂量施用后，在多个时间点收集用于毒性动力学分析的血液样品、对检品和前列腺特异性抗原 (PSA) 的抗体。如表 11 内所示在第 3 和 15 日使 8 只动物安乐死。在处死时，对全部动物进行全面尸体剖检并且收集、保留、处理和显微镜法检查组织（包括选择的前列腺周围组织）。本研究评价 MPP5 的急性局部毒性。

[0505] 检品是 MPP5 (批号 PTIC-MF-PAL-DS-001) 并且对照品是 PBS-EDTA。活性成分浓度 3.2mg/mL 的检品贮存品在制备日于给药溶液制备前经合适的 0.22 微米 PVDF 滤器过滤。在给药日，用对照载体稀释过滤的检品贮存液以获得具有适合实现预期剂量的浓度的给药溶液。

[0506] 如 USDA 动物福利法案 (9 CFR、第 1、2 和 3 部分) 内规定及如 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press) 内所述饲养动物。

[0507] 起初如下表内所示赋予动物反映猴来源的 Provantis 编号。赋予 Provantis 编号 6001-6008 的动物来自中国。赋予 Provantis 编号 7001-7004 的动物来自印度尼西亚。赋予 Provantis 编号 8001-8003 的动物来自毛里求斯。赋予 Provantis 编号 9001 的动物来自越南。

[0508] 因为动物来源及体重的广泛范围，根据下表将动物随机分配到处理组内。

[0509]

组编号	组 A		组 B	
	中国/越南	印度尼西亚/毛里求斯	中国/越南	印度尼西亚/毛里求斯
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1

[0510] 检品和对照品的施用、组分配和剂量水平：

组编号	雄性动物数	剂量水平	剂量体积	给药溶液浓度
		($\mu\text{g/g}$ 前列腺 ¹)	($\mu\text{L/g}$ 前列腺 ²)	($\mu\text{g} / \text{mL}$)
1	4	0(对照)	50	0
2	4	1	50	20
3	4	5	50	100
4	4	25	50	500

[0512] ¹ 前列腺重量从先前建立的前列腺重量与体重之间的关系中估计。

[0513] ² 将一半剂量注射到前列腺的每一叶内,即大约 $25 \mu\text{L/g}$ 前列腺 / 叶。

[0514] 如下实施给药。注射途径是肛周前列腺内推注并且频率是一次。最初以肌内注射氯胺酮对猴进行镇静并放置临时静脉内导管以在手术操作期间施用镇静药和 / 或麻醉药。在肛门下的肛周区取一个皮肤小切口并钝性分离肌肉组织和皮下组织以允许露出 (visualization) 前列腺并对其进行确认。基于前列腺重量施用检品和对照品。前列腺的大致重量根据动物体重和先前建立的前列腺重量与体重之间的关系中估计 (前列腺重量 (g) = $0.07294 + (-0.2309 \times \text{kg}) + (0.06296 \times \text{kg}^2)$, 其中 kg 是体重)。检品和对照品以大约相等的体积施用至前列腺左叶和右叶中的每一叶内。

[0515] 选择肛周途径是因为这是直接施用检品至前列腺的最精确手段。检品还将局部地施用至人内的前列腺。

[0516] 笼旁观察:每日观察两次(上午和下午),在给药日之前至少7日开始并持续直到样品收集的最后一日。对每只动物观察整体外观和行为的变化。

[0517] 作为日常笼旁观察的部分,每日一次投食,给药日之前至少7日开始并持续直到样品收集的最后一日(除下文说明之外)。观察从前一日饲喂留下的饼干数量。对于该方法而言,用于研究方法的禁食日例外。

[0518] 体重测量值在首次给药(第1日)前并在第3、8和15日根据如下方法获得。在测量体重前撤除食物。

[0519] 心电图使用导联:I、II、III、aVR、aVL和aVF在研究前、在第2日和第14日记录。为了进行该操作,将猴在笼外暂时禁锢在猴椅内,但不加以镇静。

[0520] 由兽医在研究前(在3周内的第1日)并在第14日实施眼部检查。在用氯胺

酮浅表镇静下,使用直接检眼镜来检查眼前房和眼后房。将几滴扩瞳药溶液(通常为1%托吡卡胺)滴入每只眼内以辅助检查。

[0521] 用于评价血清化学、血液学和血凝固参数的血液样品在第1周期 间并在第3日(在尸体剖检前)和第14日(在眼部检查前)从全部动物中收集。在用于血清化学的血液收集前将动物禁食至少8小时(但是不超过16小时,无合适的证明)。

[0522] 尿通过笼盘收集法在研究前和在给药后早晨(第2日、在给药后大约24小时)和在每次尸体剖检(第3和15日)时在处死的动物内通过膀胱穿刺收集用于尿分析。

[0523] a) 血清化学收集法

[0524] 收集方法:静脉穿刺-任何可用的静脉,优选股骨静脉。

[0525] 表12:

血清化学参数	
钠	钙
钾	磷
氯	尿素氮(BUN)
二氧化碳	肌酸酐
总胆红素*	总蛋白
碱性磷酸酶(ALP)	白蛋白
乳酸脱氢酶(LDH)	球蛋白
天冬氨酸氨基转移酶(AST)	白蛋白/球蛋白比值
丙氨酸氨基转移酶(ALT)	葡萄糖
γ -谷氨酰基转移酶(GGT)	胆固醇
C反应蛋白(CRP)	三酰甘油

[0527] *如果出现总胆红素发生可疑检品相关性增加,则将测定直接胆红素浓度和间接胆红素浓度。

[0528] b) 血液学

[0529] 血液样品通过静脉穿刺任何可用的静脉(优选股骨静脉)而收集。收集体积为1ml 并且所用的抗凝剂是EDTA。

[0530] 分析的参数:

[0531] 表13:

血液学参数	
红细胞(RBC)计数	红细胞平均血红蛋白(MCH)
白细胞(WBC)计数*	平均红细胞容积(WV)
血红蛋白浓度	红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)
血细胞比容	血小板计数
网织红细胞计数	血细胞形态学**

[0533] * 包括总白细胞、分叶核嗜中性粒细胞、带状嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和根据需要的其它细胞计数。

[0534] ** 来自全部动物的血液涂片将在每个时间点（包括研究前）上进行检查。

[0535] c) 血凝固参数

[0536] 样品通过静脉穿刺任何可用的静脉（优选股骨静脉）而收集。收集体积为 1.8ml 并且所用抗凝剂是柠檬酸钠。将样品处理成血浆并分析如下参数：活化的部分促凝血酶原激酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）和血纤蛋白原。

[0537] d) 尿分析

[0538] 样品通过笼盘收集法（在研究前和在给药后大约 24 小时）收集和在尸体剖检时通过膀胱穿刺获得。收集体积当可获得时多达 5mL。样品根据本领域已知的标准方法处理。

[0539] 分析如下参数：

[0540]	尿分析参数	
	颜色/特征	酮
	pH	胆红素
	比重	潜血
	蛋白质	显微镜检
	葡萄糖	

[0541] [0541] F. 所实施的分析：

[0542] 1. 毒性动力学样品

[0543] 样品通过静脉穿刺任何可用的静脉（优选股骨静脉）而收集。样品在给药前并在给药后 1、2、4、8、24 和 48 小时采取。收集体积是 2mL 并且不使用抗凝剂。将样品处理成血清。

[0544] 血清分成大约等体积的两个等分试样。每一样品标上动物编号、剂量组、收集日、日期、标称的收集时间、研究编号和等分试样编号。样品贮存在大约 -70℃ 并通过 ELISA 分析 MPP5 浓度。

[0545] 2. 抗体样品

[0546] 检测来自全部可获得的组 / 动物的样品。样品通过静脉穿刺任何可用的静脉（优选股骨静脉）在给药前和在第 14 日进行收集。收集体积是 2mL。未使用抗凝剂。将样品处理成血清。样品贮存在大约 -70℃。

[0547] 前列腺特异性抗原分析

[0548] 检测来自全部可获得的组 / 动物的样品。样品通过静脉穿刺任何可用的静脉（优选股骨静脉）在给药前和在第 2、3 和 10 日进行收集。收集体积是 2mL。未使用抗凝剂。将样品处理成血清并贮存在大约 -70℃。

[0549] 处死方法和解剖病理学

[0550] 处死：动物在用氯胺酮和 Beuthanasia[®]-D 或等效物所诱导的深度麻醉下通过放血处死。在处死日前一夜撤除食物供应。根据以下计划处死动物：

[0551]

组 编 号	第 3 日 B 组雄性动物数	第 15 日 A 组雄性动物数
1	2	2
2	2	2
3	2	2
4	2	2

[0552] [0552] 终体重 : 在尸体剖检时获得全部计划处死动物和非计划处死动物的最终体重。使用该体重来计算器官 / 身体重量比和器官 / 脑重量比。

[0553] 大体尸体剖检 : 对研究期间发现死亡的或被处死 (计划处死和非计划处死) 的全部动物实施完整的大体尸体剖检。尸体剖检包括检查 : 躯体和肌与骨骼系统、全部外表面和孔洞、颅腔和脑的外表面、颈及附属器官和组织、胸腔、腹腔和盆腔及附属器官和组织。

[0554] 尿样品 : 尿 (当可获得时最多 5 mL) 在尸体剖检从膀胱内收集并如本方法的临床病理学部分内所述进行分析。

[0555] 器官重量 : 如下器官 (当存在时) 在固定前进行称重。成对器官将在一起称重, 除非存在明显异常, 此时将对它们分别称重。垂体在固定后进行称重。

[0556]

称重的器官	
肾上腺	脑
附睾	心脏
肾脏	肝脏
肺脏	垂体(固定后)
前列腺(无精囊)	脾脏
睾丸	胸腺
甲状腺和甲状旁腺	

[0557] (使用尸体剖检前获得的终体重) 计算器官 / 体重比率, 以及器官 / 脑重量比率。

[0558] 组织收集和保存 : 收集如下组织和器官 (或其部分) 并保存在中性缓冲液的 10% 福尔马林内 (眼除外, 其在用于最佳固定的 Davidson 氏 固定剂内保存)。

[0559]

收集的组织	
心血管系统	泌尿生殖器
主动脉	肾脏
心脏	膀胱
消化组织	睾丸
(下颌骨)唾液腺	附睾
舌	前列腺
食道	前列腺周围组织
胃	肛门括约肌
小肠	靠近前列腺的膀胱
十二指肠	前列腺尿道
空肠	精囊
回肠	输尿管
大肠	输精管
盲肠	内分泌
结肠	肾上腺
直肠	垂体
胰脏	甲状腺/甲状旁腺 ^a
肝脏	皮肤/骨骼肌
胆囊	皮肤
呼吸系统	骨(股骨头)
气管	骨(第七肋)
肺	骨骼肌(腰肌和膈肌)
淋巴/造血系统	神经/五官
骨髓(胸骨)	带视神经的眼
胸腺	坐骨神经
脾脏	脑
淋巴结	脊髓(胸腔)
腹股沟淋巴结	其它
肠系膜淋巴结	动物编号纹身
	明显损害

[0560] ^a 甲状旁腺从常规组织切片中的偶然缺失不需要重新切片。

[0561] 组织病理学：对于全部的尸体剖检动物，将上表内所列的组织（除纹身以外）包埋在石蜡内、切片、用苏木精和伊红染色并由 ACVP 认证的兽医病理学家检查。

[0562] 统计分析

[0563] 对由 Sierra 获得的全部数字数据计算组均值和标准差，包括体重、临床病理学参

数（排除非数字数据）和器官重量数据。

[0564] 用 SAS[®] 系统 8.1 版本进行进一步统计分析。显著组间差异将使用方差分析 (ANOVA)，随后进行多重比较检验加以评价。允许使用参数 ANOVA 的假设将使用用于数据正态性的 Shapiro-Wilkes 检验和用于方差齐性的 Levene 氏检验进行验证，其中以任一检验所需要的 $p \leq 0.001$ 显著性水平来排除该假设。如果两种假设均满足，则应用单因素 ANOVA，以动物分组作为因子，使用 $p \leq 0.05$ 显著性水平。如参数 ANOVA 在 $p \leq 0.05$ 上是显著的，将使用 Dunnett 氏检验来在 0.05 显著性水平上确定对照组与每个检品处理组间的统计性显著差异。如果任一个参数假设不满足，则使用 Kruskal-Wallis 非参数 ANOVA 方法来评价组间差异 ($p \leq 0.05$)。如果这个 ANOVA 是显著的（再利用显著性水平 $p \leq 0.05$ ），则应用 Dunn 氏多重比较检验。

[0565] 初步结果

[0566] 前列腺：全部处理的动物均在其前列腺内具有损害（见图 32C-H 和 33C-H）。组 1（对照）动物在第 3 日具有细微的炎症、出血和纤维变性并在第 15 日具有纤维变性，这与对注射的反应和痊愈相一致。组 3 和组 4 内存在明显的严重损害（图 32E-32H、图 33 E-H）和 33F）。组 3（5 μ g/g 前列腺）和组 4（25 μ g/g 前列腺）间在损害的范围或严重性上没有差异。组 2（1 μ g/g 前列腺）内存在明显的、严重性较轻的损害（图 32C、32D、33C、33D）。

[0567] 在第 3 日，对检品的主要反应是大部分的前列腺凝集性坏死，同时具有广泛出血、混合的细胞炎症。炎症主要是嗜中性粒细胞性的，较少数目的炎症是嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞性的。在某些区域内，存在液化性坏死。凝集性坏死在组 2 内是轻微的而在组 3 和组 4 内是中度至明显的。

[0568] 第 3 日在组 2 内，广泛的修复正在发生，其中在凝集性坏死区域的边缘具有向鳞状化生进展的腺上皮的明显再生性增生，并且间质细胞具有轻微至明显的活化和增殖。第 3 日于组 3 和组 4 内，修复刚开始，由间质细胞的轻微活化和增殖所显示。

[0569] 第 15 日在组 2 内，坏死和出血已经消退。未观察到前列腺的空腔形成。损害已经形成纤维性组织，腺体继续进行细微至轻微的再生性增生和鳞状化生。炎症主要是巨噬细胞性的和淋巴细胞性的，较少数目的炎症是多形核白细胞性的。在一只动物内，这些炎症主要是嗜酸性粒细胞性的。

[0570] 在第 15 日在组 3 和组 4 内，存在继续进行的凝集性坏死和出血，其中具有更严重的液化性坏死和前列腺空腔形成，以及继续进行的混合细胞炎症。在这些组内的修复由坏死性损害边缘间质的中度至明显的纤维变性和纤维组织形成所组成，其中具有进展至鳞状化生的腺体再生性增生。炎症在继续发生坏死的区域内主要是嗜中性粒细胞性的，但是在纤维变性区域内的损害边缘具有相对较高的淋巴细胞和巨噬细胞百分数。

[0571] 前列腺周围组织：

[0572] 精囊：第 3 日，在 5/6 的处理动物中，精囊在腺体腔内具有细微至中度的分泌物矿化作用。该现象作为背景偶尔会见到，但是不至于到这种程度或不如此处那样频繁见到。因此，这可能继发于前列腺内的变化。在第 15 日，唯一受到影响的是对照动物。

[0573] 前列腺尿道具有一些炎性细胞浸润，其可能继发于前列腺内的变化。

[0574] 实施例 8：MPP5 由前列腺组织活化

[0575] 考查了来自多种动物的前列腺的提取物活化本发明 MPP 的能力。进行这样的体外

研究,其中将大鼠、狗、猴和人的前列腺组织提取物与MPP5温育以测定MPP的活化百分数。

[0576] 实验方法如下。从Sprague Dawley大鼠和单只beagle狗中获得新鲜前列腺组织。冰冻的前列腺组织从单只猕猴和从单人中获得。人前列腺组织作为存档研究材料从约翰霍普金斯大学IRB批准的临床研究中获得。对于本分析,将前列腺切片(每片~100-500mg)并以每个组织体积对等体积培养基的浓度在无血清RPMI 1640细胞培养基内混悬。组织样品在该培养基内于37℃温育2小时。离心后,上清液在-80℃冷冻。

[0577] 溶血测定:样品在37℃融化,离心并收集上清液。使用Bradford测定法测定每份上清液的蛋白浓度。将样品稀释到相同的初始蛋白浓度。获得来自猴样品和人样品内的上清液的等分试样以便使用标准ELISA(Hybritech[®], Beckman Coulter)法测定PSA。每日

制备混悬于无酚红的Hanks缓冲盐溶液(HBSS)内的2%新鲜人血液红细胞(RBC)溶液。使血液红细胞沉淀,重悬于3体积的HBSS以除去多余血清并重悬以产生在无酚红HBSS内的50%溶液。为制备检测样品,温和地涡旋混合50%RBC样品以混悬RBC。将RBC的等分试样添加至230μL无酚红HBSS以产生4%(v/v)溶液。向该混悬液添加240μL前列腺切片条件RPMI培养基的等分试样,随后添加来自100μg/mL贮存液的10μLMPP5等分试样,以使每个试样内添加的总MPP5是1μg并且试样终体积是500μL。这种RBC/MPP5/组织溶液在室温下温育1小时。随后对样品离心以沉淀未裂解的RBC,并且获得来自每个样品内的上清液的100μL等分试样,并且立即对该试样以分光光度方式在540nm处测量由于RBC裂解所致的血红蛋白释放。对照包括伪处理的RBC(阴性对照)和用1%Triton-x100裂解的RBC(阳性对照)。为了比较水解的程度,分析经前列腺组织调理的培养基的每种样品的连续稀释物。在本研究中,使用提取物1:1、1:2、1:4、1:8、1:16和1:32的稀释物。全部样品一式三份对溶血进行分析。

[0578] 结果显示人前列腺组织对切割MPP5最具活性,与此同时大鼠前列腺组织和猴前列腺组织只产生较低的反应,而狗前列腺组织不对MPP5显示任何活性(图36)。虽然大鼠缺少PSA基因,但是已经证实大鼠拥有人PSA的S3激肽释放酶同系物(Onozawa等,2001)。在大鼠腹侧前列腺内鉴定的这种PSA样蛋白与人PSA分别显示64%的核苷酸序列同源性和49%的氨基酸序列同源性。此外,大鼠S3激肽释放酶与人PSA具有相似的等电点和分子量。因此MPP5在大鼠前列腺组织内有可能由这种PSA样S3激肽释放酶活化。

[0579] 狗前列腺缺乏活化能力与狗没有PSA基因的观察相一致。

[0580] 实施例9:MPP5由血浆/血清活化

[0581] 如下测定来自人、猴、狗、大鼠或小鼠的血清切割MPP5的能力。

[0582] MPP5(1.073mg/mL)在4℃于冰上融化,等分和在-80℃再冷冻。对每种条件进行两次分析。将5μLMPP5在总体积250μL的、含有150mM NaCl和25μL人、猴、狗、大鼠或小鼠血清的20mM HEPES缓冲液(pH 7.4)内于37℃温育10分钟。在对照实验中,将25μg胰凝乳蛋白酶在添加血清(阳性对照)前添加至反应混合物内。在其它对照实验中,血清以等体积的缓冲液(阴性对照)替换。反应通过添加5μL的100mM PMSF异丙醇溶液,随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的15μL等分试样添加至含有0.5%β-巯基乙醇的等量2×BioRad加样缓冲液内,并在95℃加热5分钟以便使全部蛋白质变性并阻断蛋白质-蛋白质的相互作用。5μL样品在预制的4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen)上,使用XT MOPS电泳缓冲液(BioRad Laboratories)在100V下电泳60分钟。凝胶内的蛋白质转

印至硝酸纤维素膜 (BioRadLaboratories) 并且该膜以脱脂乳 (含有 0.1% Tween20 (TBST) 的 5% tris- 缓冲盐水) 在室温封闭 1 小时。MPP5 通过将膜在纯化的大鼠多克隆抗 MPP5 的 TBST 溶液 (稀释度为 1 : 250,000) 内室温温育 1 小时进行检测。印迹物用 TBST 洗涤三次后,在 HRP 连接的山羊抗大鼠抗体 (JacksonImmunoResearch) 的 TBST 溶液 (稀释度为 1 : 20,000) 中温育。与膜结合的抗体根据试剂盒制造商 (Cell Signaling) 说明,使用化学发光法检测,并使用具有避免饱和作用的化学发光自动曝光设置的 AlphaInnotech FluorChem SP,用 4 百万像素 CCD 照相机进行实时记录。使用基于 voxel 的程序 (ImageQuant software ;Alpha Innotech, San Leandro, CA),以密度测定方式定量印迹物。在对背景进行校正后,通过将已切割条带的密度除以完整条带密度及已切割条带密度的总和来测定每个泳道剩下的已切割蛋白质的百分数。切割百分数随后与无血清和加血清的胰凝乳蛋白酶对照进行比较。

[0583] MPP5 切割百分数的估计通过电泳和蛋白质印迹的密度测定定量完成。切割百分数随后与仅有 MPP5 (阴性) 的对照和 MPP5+ 胰凝乳蛋白酶 (阳性) 对照比较,以确定 MPP5 是否被血清酶切割。在这些实验条件下,检测不到人、猴、狗、大鼠或小鼠血清对 MPP5 的切割。表 14 显示与多种血清温育后被切割的 MPP5 的百分数。图 37 显示 MPP5 在多种血清存在或不存在下温育 10 分钟后的蛋白质印迹。图板 A 显示以 250 μ L 试样体积与来自男性 (H) (泳道 2-5) 或猕猴 (Mk) (泳道 6-7) 的 25 μ L 血清温育的 MPP5。泳道 3 含有 MPP5、人血清和胰凝乳蛋白酶,但未温育。泳道 8 是分子量标记物。(B) 以 250 μ L 试样体积与来自小鼠 (Mu) (泳道 2-5)、狗 (D) (泳道 6-7) 或大鼠 (R) (泳道 8-9) 的 25 μ L 血清温育的 MPP5。泳道 3 含有 MPP5、人血清和胰凝乳蛋白酶,但未温育。泳道 10 是分子量标记物。

[0584] 表 14 :血清内 MPP5 的切割百分数的物种比较

[0585]	切割百分数	缓冲液	人	猴	狗	大鼠	小鼠
		1.45 $\pm$ 1.08	0.90 $\pm$ 0.31	1.78 $\pm$ 1.51	1.20 $\pm$ 1.0	1.87 $\pm$ 0.32	1.33 $\pm$ 0.10

[0586] 这些结果显示 MPP5 在正常人血清内不被活化,并且还显示在前列腺内注射后泄露至血液内时, MPP5 将不会变成活化的,甚至在具有异乎寻常高水平的血清 PSA 的男性中也是如此。这些结果与公开的数据一致,其中所述的数据证实 PSA 在血液内通过血清蛋白酶抑制物 (主要是 α 1- 抗胰凝乳蛋白酶和 α 2- 巨球蛋白) 以酶方式灭活 (Lilja 等, 1991 ; Otto 等, 1998)。

[0587] 实施例 10 :MPP5 由非 PSA 蛋白酶活化

[0588] 进行体外研究以测定 MPP5 对于前体药物在与前列腺以外的组织无意接触时可能潜在遇到的非 PSA 蛋白酶的敏感性。具体而言,评估了数种常见蛋白酶切割 MPP5 的效力,这些蛋白酶包括 PSA、弗林蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、凝血酶、MMP-7、组织蛋白酶 B (半胱氨酸蛋白酶) 和丝氨酸蛋白酶 hK1、hK2 和 uPA。

[0589] 如下实施分析。将天然气单胞菌溶素原 (野生型 PA ;0.84mg/mL) 和 1.073mg/mL 的 MPP5 用于检验全部蛋白酶的分析,其中使用弗林蛋白酶的分析 #2 例外,在分析 #2 中使用批号为 #N-PTIC-MF-PAL-BX 的 1mg/ml 的 MPP5。

[0590] 为测量因 PSA 切割所致的活化,将 5 μ g 天然气单胞菌溶素原或 MPP5 在含有 150mM

NaCl 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内温育。添加不同量的 PSA (根据对数比例的 0–10 μ g PSA) 并以 250 μ L 总体积于 37°C 温育 60 分钟。反应通过添加 5 μ L 的 100mM PMSF 的异丙醇溶液, 随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样添加至含有 0.5% β -巯基乙醇的等量 2 $\times$ BioRad 加样缓冲液内并在 95°C 加热 5 分钟。样品在预制的 10% Tris-HCl 凝胶上, 使用 XT MOPS 电泳缓冲液 (BioRad Laboratories) 在 200V 下电泳 30 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0591] 为在研究 #1 内测量因弗林蛋白酶切割所致的活化, 将 5 μ g 天然 PA 或 MPP5 在含有 150mM NaCl 和不同量的弗林蛋白酶 (根据对数比例的 0–3.2ng 弗林蛋白酶) 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内, 以 250 μ L 总体积于 37°C 温育 10 分钟。反应通过添加 5 μ L 的 100mM PMSF 异丙醇溶液, 随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样添加至含有 0.5% β -巯基乙醇的等量 2 $\times$ BioRad 加样缓冲液内并在 95°C 加热 5 分钟。样品在预制的 10% Tris-HCl 凝胶上, 使用 XT MOPS 电泳缓冲液 (BioRad Laboratories) 在 200V 下电泳 30 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0592] 为在研究 #2 内测量因弗林蛋白酶切割所致的活化, 将 5 μ g 天然 PA 或 MPP5 在含有 150mM NaCl、1mM CaCl_2 和 0 至 3 单位弗林蛋白酶的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内, 以 250 μ L 总体积于 37°C 温育 60 分钟。注意在前一个实验 (弗林蛋白酶, 研究 #1) 中, 相同酶浓度的温育时间是 10 分钟。反应通过添加 2.5 μ L 的 100mM PMSF 乙醇溶液, 随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样添加至含有 0.5% β -巯基乙醇的等量 2 $\times$ BioRad 加样缓冲液内并在 95°C 加热 5 分钟。样品在预制的 10% Novex Bis-Tris Nupage 凝胶 (Invitrogen) 上, 使用 1 $\times$ MOPS-SDS 电泳缓冲液在 200V 下电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0593] 为测量因胰凝乳蛋白酶所致的活化, 将 5 μ g 天然 PA 或 MPP5 在含有 150mM NaCl 和不同量的胰凝乳蛋白酶 (根据对数比例的 0–500ng 胰凝乳蛋白酶) 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内, 以 250 μ L 总体积于 37°C 温育 10 分钟。反应通过添加 5 μ L 的 100mM PMSF 异丙醇溶液, 随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样添加至含有 0.5% β -巯基乙醇的等量 2 $\times$ BioRad 加样缓冲液内并在 95°C 加热 5 分钟。样品在预制的 10% Tris-HCl 凝胶上, 使用 XT MOPS 电泳缓冲液 (BioRad Laboratories) 在 200V 下电泳 30 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0594] 为在研究 #1 内测量因凝血酶所致 MPP5 的活化, 将 5 μ g 气单胞菌溶素相关蛋白质 (天然 PA 或 MPP5) 在含有 150mM NaCl 和不同量的凝血酶 (根据对数比例, 0–12 μ g 的 0.23 单位 / μ g 凝血酶) 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内, 以 250 μ L 总体积于 37°C 温育 10 分钟。反应通过添加 5 μ L 的 100mM PMSF 异丙醇溶液, 随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样添加至含有 0.5% β -巯基乙醇的等量 2 $\times$ BioRad 加样缓冲液内并在 95°C 加热 5 分钟。样品在预制的 10% Tris-HCl 凝胶上, 使用 XT MOPS 电泳缓冲液 (BioRad Laboratories) 在 200V 下电泳 30 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0595] 为在研究 #2 内测量因凝血酶所致 MPP5 的活化, 用这些实验内使用的凝血酶试剂盒 (Novagen) 所提供的凝血酶稀释缓冲液来制备两份凝血酶稀释物: 1/66 和 1/25。用凝血酶试剂盒所提供的 1 $\times$ 切割缓冲液来制备含有 10 μ g MPP5 (N-PTIC-MF-PAL-BX) 的两份反应混合物。以相同方式制备含有带 His 标签的天然气单胞菌溶素原 (PA-EndHis) 的两份反应

混合物。凝血酶以 0.15 单位添加至其中一份 PA-EndHis 混合物中并以 0.4 单位添加至其中一份 MPP5 混合物中。温育总体积在每一例子中是 50 μ l。反应混合物在室温下温育 6.5 小时,并且随后通过添加苯甲基磺酰氟 (Sigma) 至终浓度 1mM 而抑制蛋白水解。样品在 4℃ 在冰上贮存过夜。样品随后在 1×LDS 样品缓冲液 (Invitrogen) 内准备并在 70℃ 加热 10 分钟,随后上样并在 10% Bis-Tris NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上,在非还原条件下于 200V 恒定电压的 1×MOPS-SDS 电泳缓冲液内电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0596] 为测量因胰蛋白酶所致的活化,将 5 μ g 气单胞菌溶素相关蛋白质 (野生型 PA 或 MPP5) 在含有 150mM NaCl 和不同量的 I 型胰蛋白酶 (根据对数比例的 0-500ng 胰蛋白酶) 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内,以 250 μ L 总体积于 37℃ 温育 10 分钟。反应通过添加 5 μ L 的 100mM PMSF 异丙醇溶液,随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样添加至含有 0.5% β -巯基乙醇的等量 2×BioRad 加样缓冲液内并在 95℃ 加热 5 分钟。样品在预制的 10% Tris-HCl 凝胶上,使用 XT MOPS 电泳缓冲液 (BioRad Laboratories) 在 200V 下电泳 30 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0597] 为测量因 uPA 所致的活化,将 5 μ g PA 和 MPP5 分别在含有 150mM NaCl 和 10-0.16 μ g uPA 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内,以 250 μ L 总体积于 37℃ 温育 4 小时。反应通过添加 5 μ L 的 100mM PMSF 异丙醇溶液,随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样在含有 0.5% 2-巯基乙醇的 1×样品缓冲液 (Invitrogen) 内准备并在 95℃ 加热 5 分钟。样品 (100ng) 在预制的 10% Novex Bis-Tris NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上,使用 1×MOPS-SDS 电泳缓冲液在还原条件下,于 200V 电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0598] 为测量因组织蛋白酶 B 所致的活化,将 5 μ g PA 和 MPP5 分别在含有 150mM NaCl、1mM EDTA、5mM L-半胱氨酸和 24-0.375 单位组织蛋白酶 B 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内,以 250 μ L 总体积于 37℃ 温育 4 小时。反应通过添加亮抑蛋白酶肽至终浓度 2 μ M (Sigma 法),随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样在含有 0.5% 2-巯基乙醇的 1×样品缓冲液 (Invitrogen) 内准备并在 95℃ 加热 5 分钟。样品 (100ng) 在预制的 10% Novex Bis-Tris NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上,使用 1×MOPS-SDS 电泳缓冲液在还原条件下,于 200V 电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0599] 为测量因 MMP-7 所致的活化,将 5 μ g PA 和 MPP5 分别在含有 150mM NaCl、10mM CaCl_2 和 1.5-0.0234 μ g MMP-7 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内,以 250 μ L 总体积于 37℃ 温育 3 小时。反应通过添加 8.4 μ L 的 31mM 1,10-菲咯啉一水合物的乙醇溶液 (最终 1 μ M),随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 15 μ L 等分试样在含有 0.5% 2-巯基乙醇的 1×样品缓冲液 (Invitrogen) 内准备并在 95℃ 加热 5 分钟。样品 (100ng) 在预制的 10% Novex Bis-Tris NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上,使用 1×MOPS-SDS 电泳缓冲液在还原条件下,于 200V 电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0600] 为测量因 hK1 所致的活化,5 μ g hK1 由在终体积 50 μ l 的 TCN 缓冲液 (50mM Tris、10mM CaCl_2 、0.15M NaCl、pH 7.5) 内的 0.05 μ g 嗜热菌蛋白酶活化,在 37℃ 温育 1 小时并用 2.5 μ l 的 200mM 1,10-菲咯啉一水合物的 95% 乙醇抑制 (R & D Systems 法)。1 μ g PA 和 PSA-PAH1 分别在含有 150mM NaCl、1mM EDTA 和 1 μ g-0.015625 μ g 活化的 hK1 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内,以 50 μ L 总体积于 37℃ 温育 4 小时。反应通过添加 PMSF 的异丙

醇溶液至终浓度 2mM,随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 5 μ L 等分试样在含有 0.5% 2- 巯基乙醇的 1 $\times$ 样品缓冲液 (Invitrogen) 内准备并在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟。样品 (100ng) 在预制的 10% Novex Bis-Tris NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上,使用 1 $\times$ MOPS-SDS 电泳缓冲液在还原条件下,于 200V 电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0601] 为测量因 hK2 所致的活化,1 μ gPA 和 MPP5 分别在含有 150mMNaCl 和 0.25-0.0039 μ g hK2 的 20mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 内,以 50 μ L 总体积于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。反应通过添加 PMSF 的异丙醇溶液至终浓度 2mM,随后在冰上冷却而终止。将终止的反应混合物的 10 μ L 等分试样在含有 0.5% 2- 巯基乙醇的 1 $\times$ 样品缓冲液 (Invitrogen) 内准备并在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟。样品 (100ng) 在预制的 10% Novex Bis-TrisNuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上,使用 1 $\times$ MOPS-SDS 电泳缓冲液在还原条件下,于 200V 电泳 50 分钟。蛋白质通过银染法检测。

[0602] 本研究的结果表明在 MPP5 与气单胞菌溶素原 (PA) 之间的敏感性曲线差异明显,其中天然气单胞菌溶素原 (PA) 比 MPP5 对多种蛋白酶 (PSA 例外) 更敏感 (表 15)。

[0603] 表 15 :体外蛋白酶敏感性研究结果

[0604]

蛋白酶名称	切割 50% MPP5 所需要 的量	切割 50%天然 气单胞菌溶素 原所需要的量	对 MPP5 的特异性 活性	对气单胞菌溶素原的特 异性活性
弗林蛋白酶	> 3.2 ng	1.2 ng	0.24 nM/ μ g/min	9.69 nM/ μ g/min
胰蛋白酶	813 ng	9.5 ng	5,700 nM/ μ g/min	489,000 nM/ μ g/min
胰凝乳蛋白酶	31 μ g	3.0 μ g	150 nM/ μ g/min	1550 nM/ μ g/min
凝血酶	> 12 μ g	> 12 μ g	<0.00000078 nM / μ g/min	<0.00000078 nM/ μ g/min
MMP-7	无活性	无活性	0	0
组织蛋白酶 B	170 单位	51.6 单位	1.2 fmol/ μ g/min	3.9 fmol/ μ g/min
hK1	无活性	2.63 μ g	0	15.3 fmol/ μ g/min
hK2	无活性	0.1 μ g	0	1.61 pmol/ μ g/min
前列腺特异性 抗原(PSA), 又 称作 hK3	12.2 μ g	49.7 μ g	0.0635 nM/ μ g/min	0.0156 nM/ μ g/min
uPA	173 μ g	7.79 μ g	1.1 fmol/ μ g/min	25.8 fmol/ μ g/min

[0605] 注意 :报道的单位反映如原始数据内所记录的那些单位

[0606] 实施例 11 :MPP5 在大鼠内的生物分布

[0607] 为了确定单次剂量前列腺内施用后 MPP5 在前列腺内的生物分布及其在周围组织的潜在分布,在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中进行使用 ^{125}I -MPP5 的放射标记的定量性完整身体放射自显影法研究。给药制剂内的放射性活度浓度 ($\pm$ S. D.) 是 $1.6 \times 10^9 \pm 44.02 \times 106 \text{ dpm/g}$ ($730.94 \mu \text{Ci/g}$)。基于平均浓度值附近的标准差和变异系数,认为给药制剂是均匀的。通过注射而施用至前列腺内的所配制 ^{125}I -MPP5 的平均剂量是 $8.73 \mu \text{g/动物}$ ($5.86 \mu \text{Ci/动物}$ / $10 \mu \text{L}$ 体积)。

[0608] 取两等分试样的血液 ($2 \times 50 \mu \text{L}$) 用于放射性活度分析。血液在 3500rpm 和 4°C 离心大约 10 分钟 (在采集的 60 分钟内),并且取两等分试样的血浆 ($2 \times 50 \mu \text{L}$) 用于放射性活度分析。使已称重的两等分试样的全血增溶 (Solucene-350) 并用过氧化氢 (30% w/v) 脱色,随后与用于放射性活度测量的液体闪烁流体混合。将两等分试样的血浆直接与用于放射性活度测量的液体闪烁流体混合。

[0609] 对于定量性整体自放射发光照相技术,将动物在己烷与干冰的混合物内深度冷冻 20 分钟。随后根据标准操作方法使用冷冻支架将动物右侧卧地包埋在 2% CMC 介质内以便收集完整身体矢状切片。在每个冷冻的 CMC 块内打十二个孔以便引入 10 种 ^{125}I 标准溶液和两种质控液。将添加 ^{14}C 或 ^{125}I 的血液挤入每个 CMC 块内的 4 个钻孔内,所述的血液根据需要作为用于鉴定呈现低放射性活度水平或低反差的结构的参考点使用。每个动物标本块使用 Leica CM 3600 低温恒冷冰冻切片 (Leica CM 3600 cryomicrotome) 切片。收集 $30 \mu \text{m}$ 切片并确定动物编号、时点、切片编号、切片日期和刀片位置。

[0610] 结果显示在单次剂量前列腺内施用后,血液和血浆内放射性活度的浓度低,表明前列腺内施用后微弱的表观吸收。放射性活度的最高浓度 ($9.445 \mu \text{g Eq/g}$) 在首次采样时点 (3h) 从右腹侧前列腺注射部位中获得。高水平的放射性活度也在前列腺的其它叶 (左腹侧叶、右背侧叶和左背侧叶) 内观察到,但是随时间至终末采样时点 96 小时而减少。在所述终末时点上,前列腺内放射性活度的浓度在前列腺的全部区域内是低的,除了右腹侧前列腺注射部位 ($0.268 \mu \text{g Eq/g}$) 以外。除了前列腺之外,仅膀胱和甲状腺显示比血液或血浆更高的放射性活度的浓度。甲状腺的放射性活度 (^{125}I) 水平在给药后 12 至 48 小时时间范围内增加并保持高水平直至在处理 96 小时的最终时点。甲状腺内 ^{125}I 的隔离可能指示分布至甲状腺的游离 ^{125}I 。在下列中观察到低浓度的放射性活度:肾上腺 ($\leq 0.034 \mu \text{g Eq/g}$)、肾脏 ($\leq 0.032 \mu \text{g Eq/g}$)、肝脏 ($\leq 0.045 \mu \text{g Eq/g}$)、肺脏 ($\leq 0.041 \mu \text{g Eq/g}$) 和胰脏 ($\leq 0.022 \mu \text{g Eq/g}$)。脑显示最低浓度的放射性活度 ($\leq 0.003 \mu \text{g Eq/g}$)。在所有的其它主要器官中,总是观察到极低水平的放射性活度,其表明没有出现明显的全身分布。组织水平对血浆水平随时间增加,表明 MPP5 从血浆中比从组织中更快地得到清除。因此,这项生物分布研究表明 MPP5 主要停留在施用的局部位置,其对周围的细胞仅有有限的周边分布和毒性。

[0611] 实施例 12 :MPP5 在猴内的毒性动力学

[0612] MPP5 的毒性动力学也在前列腺内施用后,如实施例 7 内所述在性成熟的雄性猕猴内确定。每组 4 只猴使用 $2 \times 25 \mu \text{L}$ 注射 ($25 \mu \text{L/叶}$),以对照盐水或 0.35 、 4.14 或 $25.79 \mu \text{g MPP5/g}$ 前列腺组织进行前列腺内给药。血液样品在给药之前并在给药后 1、2、4、8、24 和 48 小时从全部猴 (16 只) 内获得。本研究的初步结果还在实施例 7 内描述。如下代表本研究最终完成的毒性动力学结果。

[0613] 使用已验证的 ELISA 方法对研究样品分析 MPP5。使用 50 μ L 血清重复分析, ELISA 方法的最低定量限 (LLOQ) 是 5ng/mL。在前列腺内施用后未检测到可评估的 MPP5 全身水平。组 2 内的一只动物在全部时间点均显示出高于 LLOQ (5ng/mL) 的浓度。与来自相同剂量组的动物相比, 认为该动物是特殊的, 并且来自该动物的全部样品在后续的分析内进行重复分析以便证实。全部原始结果在重复分析内得到证实。由于给药前的样品也超过 LLOQ, 因而确定在该只动物内所观察到的浓度可能归因于基质干扰并且与处理无关。

[0614] 实施例 13 : 评价 MPP5 处理的猴的前列腺形态学

[0615] 对实施例 7 和 12 内所述的研究中收集的猴前列腺切片进行进一步分析。进行苏木精 & 伊红 (H&E) 染色以检查所处理前列腺的形态学, 对 PSA 进行免疫组织化学染色以检查 PSA 的分布, 并且进行 MPP5 染色以便检查 MPP5 的分布。所用的方法描述如下。

[0616] 材料和试剂 : 来自对照和来自 MPP5 处理的猴前列腺中的 96 张 (每只猴 6 张) 切片贮存在室温密封的容器内。制备前列腺组织的切片并用 H&E 染色, 其中所述的前列腺组织来自载体或 0.35、4.1 或 25 μ gMPP5/g 前列腺经前列腺内给药的猴。切片还根据本领域内已知方法对 PSA 和 MPP5 进行免疫组织化学染色。

[0617] 图像分析 : 猴前列腺组织切片使用 1.25 $\times$ 物镜评价。使用 MetamorphTM 软件包 (Molecular Device, Sunnyvale, CA) 来画出前列腺总面积和 MPP5 诱导性损伤总面积的轮廓。该软件提供作为像素数的总面积。将 1 $\times$ 1cm 的正方形置于每张载玻片上作为测定每 cm^2 像素数的标准。随后测定来自每个 MPP5 剂量的损伤面积并转换成损伤的 Gm^2 。损伤面积百分数由受损面积 / 前列腺总面积的比率乘以 100 确定。

[0618] 对照 (正常) 猴前列腺的分析显示猕猴前列腺就腺的形态学而言与人前列腺相似, 并且 PSA 的分布限于导管内层的柱状上皮细胞。象人一样, 猴前列腺包围尿道。因此, 猴前列腺代表了在前列腺内注射 PSA 活化的蛋白质毒素 MPP5 时, 用于研究 MPP5 活化和毒性的可获得的最佳动物模型。

[0619] 来自本研究中前列腺组织的形态学表征以及前列腺内 PSA 和 MPP5 的分布显示在 0.35 μ g/g 前列腺至 4.14 μ g/g 前列腺的剂量时, 前列腺损伤面积 / 百分数存在剂量 - 反应; 然而, 在 4.14 μ g/g 前列腺至 25.79 μ g/g 前列腺时, 剂量 - 反应没有明显增加 (表 15)。在接受剂量 4.14 μ g/g 前列腺的猴内观察到了所计算的最大损伤面积, 在所述的猴内每叶单次注射 25 μ L 损伤总腺体的大约 50%。该结果表明最大损伤可能受限于前列腺每叶 25 μ L 注射体积的总分布。

[0620] 在 MPP5 诱导正常腺组织明显梗死的处理区域内, PSA 染色明显减弱, 而在前列腺的邻近未受损区域内, PSA 染色在分布和程度方面是正常的。这些结果表明 MPP5 对腺体内柱状上皮细胞的杀伤消除 PSA 产生。该结果还显示在中等剂量水平和高剂量水平上 MPP5 的分布与梗死区域重叠, 如图 38 内所示。在给药后第 15 日, 在中等剂量水平上没有观察到残余 MPP5。此外, MPP5 在本研究内已评价的任意切片内似乎未穿透前列腺包膜。

[0621] 表 15 : 因 MPP5 所致前列腺损伤¹ 的面积和百分数

剂量	0.35 $\mu\text{g/g}$ 前列腺		4.14 $\mu\text{g/g}$ 前列腺		25.79 $\mu\text{g/g}$ 前列腺	
	面积(cm^2)	百分数	面积(cm^2)	百分数	面积(cm^2)	百分数
[0622]	0.33	20.2	0.78	46.6	0.57	63.4
	0.36	30.2	0.87	47.9	0.32	23.2
	0.20	13.8	0.89	54.9	0.51	41.0
	0.46	36.8	1.23	56.6	0.47	51.0
	0.46	36.8	1.23	56.6	0.47	51.0
平均数 ($\pm$ 标准差)	0.33 $\pm$ 0.11	25.3 $\pm$ 5.9	0.94 $\pm$ 0.20	51.5 $\pm$ 2.9	0.47 $\pm$ 0.11	44.7 $\pm$ 9.8

[0623] ¹ 在每叶注射 25 μL 后的损伤 (总腺体的面积 / 百分数)

[0624] 在 MPP5 诱导正常腺组织明显梗死的处理区域内, PSA 染色明显减弱。在邻近未受损区域内, PSA 染色在分布和程度方面是正常的。这些结果表明 MPP5 对腺体内柱状上皮细胞的杀伤消除 PSA 产生。然而, MPP5 不改变未损害区域内的 PSA 产生, MPP5 也不选择产生较低水平 PSA 的上皮细胞。在环绕尿道的肌肉套 (cuff) 内未观察到 PSA 染色。尿道组织内 PSA 的缺少可以部分地解释尿道没有任何明显的损伤。因此, 小体积 (25 μL) 注射 MPP5 至前列腺的单叶可以在猴正常前列腺内导致产生 PSA 的腺组织大面积明显梗死, 而对不产生 PSA 的结构 (例如尿道) 没有明显损伤。

[0625] 实施例 14 : MPP5 在狗内的毒性

[0626] 在雄性 beagle 狗内进行试验性质的毒理学研究, 以便确定 MPP5 单次前列腺内给药后的潜在的直接前列腺内毒性和 MTD。MPP5 经前列腺内注射 (左叶) 100 μL 剂量体积的 0、50、107、200 或 400 μg (基于前列腺重量, 这些剂量分别等同于 0、22、24.4、40 和 72.2 $\mu\text{g/g}$ 前列腺) 施用至雄性 beagle 狗 (1 只 / 组)。动物在给药后观察 1 周。不存在死亡或不存在对临床观察、体重、食物消耗或临床病理学的处理相关性影响。不存在对前列腺重量的明显 MPP5 相关性效应。大体病理学变化在前列腺左叶和邻近的腹部脂肪内确定, 并由延伸至前列腺实质的前列腺暗色区域组成。腹部脂肪的粘连和 / 或在腹部脂肪内的暗色区域与前列腺内观察到的 MPP5 相关性效应有关。在用 400 μg 处理的狗中, 暗色区域数量更多并且前列腺左叶增大。认为这些病理学变化的严重性的增加对预期的 MPP5 药理学效应有作用。似乎不存在任何明显的前列腺外毒性。总而言之, 在前列腺内观察到明显的处理相关性大体变化, 其中在环绕的或邻近的腹部脂肪组织具有有限的相关性效应, 在 400 μg 水平上严重性增加。

[0627] 狗前列腺与人前列腺具有结构相似性, 它们都包括 2 叶结构、本质上是腺泡导管和存在丰富的间质 (Wienjes 等, 2005)。虽然人前列腺比狗前列腺具有更高比例的间质性组织, 但是不知道人前列腺与狗前列腺之间纤维隔膜 (fibrous partition) 结构和血液及淋巴引流模式的差异达到何种程度。不过, 以前已经证实狗可以作为研究前列腺内注射效应的有用模型 (Rosser 等, 2004)。然而, 在 MPP5 的例子中, beagle 狗似乎没有清楚地显出对这种化合物的细胞溶解性效应敏感。其原因可能在于狗中缺乏 PSA 表达 (或能够切割 MPP5 的其它非特异性酶)。狗模型显示在 PSA 不存在下, MPP5 在极高的剂量上不活化, 其

证实了非活化前体药物的安全性。相反,已知大鼠和非人灵长类分别表达 PSA 样激肽释放酶和 PSA,并且已经证实甚至对低浓度的 MPP5 敏感。因此,虽然狗前列腺在解剖上与人前列腺相似,但是狗前列腺似乎没有在 MPP5 活化方面显示与人前列腺的功能性相关,因而不再继续以狗作为 MPP5 的毒理学模型。然而,对狗的研究显示 MPP5 在不被 PSA 切割时似乎无药理学活性,这就为其提供了依据——即当 MPP5 在不产生 PSA 的组织内存在时,它不会产生显著的毒性。

[0628] 实施例 15 :MPP5 在猴内的毒性

[0629] 为明确 MPP5 在产生内源性 PSA 的非啮齿类物种内的毒性,前列腺内毒性研究如实施例 7 内所述在注射 0.35、4.14 或 25.79 μg MPP5/g 前列腺组织的雄性猕猴(4 只/组)内实施。施用两次会阴注射,对前列腺的每叶(25 μL /叶)注射一次。本研究的初步结果在实施例 7 内显示。如下是最终结果的描述。

[0630] 在前列腺内直接施用并观察 2 日或 14 日时间后,与 MPP5 有关的毒性限于前列腺,同时周围的组织几乎没有损伤或具有其它明显的全身效果。血液分析的结果表明雄性猕猴表达可检测水平的 PSA,并且 MPP5 的前列腺内施用释放显著量的 PSA 至血液/血清内。PSA 水平在处理 10 日返回至接近基线水平。在任何剂量水平均没有观察到对临床征兆、体重、眼状况、尿分析或心电图(ECG)评价的处理相关性效应。血清化学和血液学评估揭示短暂的细胞反应和炎症反应。在研究第 3 日,全部组均观察到短暂的急性期免疫学应答并且其归因于与手术方法有关的炎症和局限于前列腺的炎症。在研究第 3 日记录到的 C 反应蛋白(CRP)增加通常是剂量相关性的并且与混合的细胞炎症和显微镜观察到的前列腺坏死的程度相一致。

[0631] 大体病理变化和微观病理变化在全部 MPP5 剂量水平上于第 3 日在前列腺观察。这些变化以坏死、出血和混合的细胞浸润为特征,并且在接受中等剂量和高剂量 MPP5 的动物内更严重。低剂量组的猴还在第 3 日显示组织学变化,其中所述变化与修复一致,该修复包括上皮组织内的再生性增生和鳞状化生以及在间质(间质(mesenchymal))组织内的纤维组织形成。在中等剂量组和高剂量组内的修复在第 3 日是微弱至缺乏的。在第 15 日,低剂量组内的坏死已经消退并且修复继续进行。在中等剂量组和高剂量组内,坏死在第 15 日继续进行并且与修复相一致的变化限于坏死性损害的边缘。相反,在前列腺周围组织或全身组织内在第 3 日或第 15 日没有可归因于 MPP5 的变化。

[0632] 实施例 16 :MPP5 在猴内的免疫应答

[0633] 还对 MPP5 的潜在免疫应答进行了评价。动物如实施例 7 内所述用 MPP5 处理。对 MPP5 的潜在免疫应答如下测定。

[0634] 猴组根据下表接受 MPP5 的多种剂量直接施用至前列腺。在注射日前从动物中收集血清(大约 0.5mL)并在注射后第 14 日再次收集。血清贮存在 -70°C 直至分析。免疫球蛋白反应如单独所述通过 ELISA 测量。简而言之,气单胞菌溶素原(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磷酸盐缓冲盐水)通过在 4°C 包被过夜而结合至 EIA 平板。非特异性结合通过用 5% BSA(Sigma)在室温包被而抑制。将汇集的正常猴血清的连续十倍稀释物(1 : 100–1 : 1,000,000)分成一式四份使用,以形成用于在 MPP5 施用后于多个时间采集的动物血清内测定滴度的比较曲线。将来自 MPP5 处理的猴中的血清样品稀释十倍(1 : 100–1 : 1,000,000)以提供对应于正常血清的浓度。过氧化物酶缀合的山羊抗大鼠 IgG(Jackson ImmunoResearch)与结

合至气单胞菌溶素原包被的孔的抗体结合。根据制造商的说明书,通过添加 OPD 过氧化物酶底物使颜色显现。在 Molecular DynamicsVERSAmix 微量平板读数仪上测量 490nm 处的吸光度。滴度被定义为以上的稀释度,其中吸光度读数小于在相同稀释度下的汇集的正常血清的吸光度读数 +2 个标准差。

[0635] 在 MPP5 施用前,除一只载体对照动物之外的全部猴均没有可检测的滴度。那只对照动物似乎在研究之前已经接触免疫原,因为低滴度的出现在第 14 日样品内得以证实并在再次分析中再次证实。接受 $1 \mu\text{g/g}$ MPP5 的两只动物中的一只动物显示滴度。类似地,接受 $5 \mu\text{g/g}$ MPP5 的两只动物中的一只动物显示滴度。接受 $25 \mu\text{g/g}$ MPP5 的两只动物均显示滴度。

[0636] 将每只动物在施用前和施用后所抽取的血液的滴度列于表 16。

[0637] 表 16 :施用 MPP5 后猴内的抗体滴度

组	猴	剂量 ($\mu\text{g/g}$ 前列腺)	施用途径	抗体滴度	
				第 1 日	第 14 日
1	6001	0	IP	1:1000*	1:1000*
1	8001	0	IP	< 1:100	< 1:100
2	6003	1	IP	< 1:100	1:10,000
2	7002	1	IP	< 1:100	< 1:100
3	6005	5	IP	< 1:100	1:10,000
3	8002	5	IP	< 1:100	1:100
4	6007	25	IP	< 1:100	1:10,000
4	8003	25	IP	< 1:100	1:10,000

[0639] * 该动物在施用前显示相同的微小滴度

[0640] 图 39 显示施用 MPP5 后猴内的抗体滴度。没有滴度高于 10^4 。这表明前列腺内施用 MPP5 没有激发强烈的免疫应答。然而,6 只已处理动物中的 4 只显示高于汇集血清的滴度。

[0641] 在用 $0.35 \mu\text{g/g}$ 前列腺或 $4.14 \mu\text{g/g}$ 前列腺处理的两只猴中处理的两只猴中,均观察到其中的一只猴具有抗体滴度,并且接受 $25.79 \mu\text{g/g}$ 前列腺的两只动物均显示滴度。因此,MPP5 的施用在一些猴内诱导了可检测但滴度低的免疫应答。

[0642] 基于实施例 11、12 和 15 内的结果,任何剂量水平都不存在前列腺外毒性的迹象;因此,全身性无可见不良作用剂量水平 (NOAEL) 是已检测的最高 MPP5 剂量——即 $25.79 \mu\text{g/g}$ 前列腺 (基于实际前列腺重量)。在前列腺内所观察到的效应既是剂量依赖的,又是基于 MPP5 的已知作用机制可预测的。在全部剂量水平上观察前列腺内的效应,其中所述剂量水平包括已检测的最低剂量 $0.35 \mu\text{g/g}$ 前列腺,该剂量损伤大约 25% 的前列腺。因此,对于局部前列腺效应的最低可观察不良作用水平 (LOAEL) 在本研究中是 $0.35 \mu\text{g/g}$ 前列腺。

[0643] 前述实施例描述了 MPP5 在雄性白化大鼠中静脉内施用或前列腺内施用后以及在

非人灵长类中前列腺内注射后的药物代谢和毒性动力学的研究。用 MPP5 实施的非临床性药物代谢和药物代谢动力学 (DMPK) 研究的总结示于表 17。

[0644] 表 17: 用 MPP5 实施的非临床性药物代谢和药物代谢动力学研究列表

研究题目	结果
MPP5 在白化大鼠中经前列腺内或静脉内推注的急性毒性研究(观察时间为第 1 日、第 14 日或第 28 日)[实施例 6]	在单次前列腺内注射(2、10 或 25 μg)或 IV 注射(25 μg)后提供毒性动力学数据。MPP5 在前列腺内注射 2 μg 后检测不到。 C_{max} 随 10 μg 和 25 μg 上的剂量增加而增加; 然而在 10 μg 上的 AUC 是在 25 μg 上的 AUC 的两倍。在 IV 注射后, t_{max} 是 0(即时)。
[0645] 单次注射 ^{125}I -MPP5 至前列腺内后雄性 Sprague-Dawley 大鼠内放射性活度的组织分布 [实施例 11]	证实在前列腺内施用后, MPP5 具有有限的全身性生物利用率/分布, 并且在前列腺范围内分布不均匀。
MPP5: 在性成熟的雄性猕猴内进行 2 周的前列腺内急性毒性研究 [实施例 7、12、13 和 15]	证实在前列腺内注射(1、5 或 25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺)后缺少全身性暴露。全部血清浓度均在 LLOQ (5.00 ng/mL)以下, 例外的是 1 只低剂量动物在全部时点(包括给药前)具有高于 LLOQ 的浓度。

[0646] 实施例 17: MPP5 在临床试验中用于 BPH 的剂量选择和施用方法

[0647] 以下描述了 MPP5 在临床试验中用于 BPH 的起始剂量选择示例性原理。还描述了施用 MPP5 的示例性方法。

[0648] 基于 PSA 的表达以及猕猴前列腺与人前列腺间的生理相似性, 选择本文中所述的单剂量的猴研究作为估计在人前列腺内安全起始剂量的基础。与大鼠和猴相比, 狗对 MPP5 的效应不敏感; 因此, 认为狗不是用于估计 MPP5 的安全起始剂量的适宜模型。来自本文中所述大鼠研究的数据表明尽管大鼠没有编码 PSA 的基因, 但是 MPP5 可能由大鼠腹侧前列腺内所鉴定的 PSA 样 S3 激肽释放酶活化 (Onozawa 等, 2001)。

[0649] BPH 临床试验内 MPP5 的起始剂量选自 0.03 $\mu\text{g/g}$ 前列腺至 0.25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺的范围。基于单剂量猴研究内已检验的最低剂量 (0.35 $\mu\text{g/g}$ 前列腺) 应用 10 倍的安全系数, 将有效起始剂量设置在 0.03 $\mu\text{g/g}$ 前列腺。在接受 0.35 $\mu\text{g/g}$ 前列腺剂量的猴内, 未观察到全身毒性, 但是观察到了局部前列腺变化。虽然在注射 14 日后全部 3 种剂量均显示前列腺组织局部剥离, 但是中等剂量和较高剂量显示的变化最明显而且缺乏痊愈。得出的结论是最低剂量 (0.35 $\mu\text{g/g}$ 前列腺组织) 具有无全身性后果 (通过组织学分析和实验室分析) 和有限但清晰可观察的局部前列腺效应 (前列腺剥离大约 25%) 的治疗可用组合。认为该剂量是猴内的安全剂量。使用这些数据, 应用至少 10 倍的安全系数并选择用于 BPH 试验第

一组群的起始剂量（每克人前列腺 $0.03 \mu\text{gMPP5}$ ）。

[0650] BPH 试验内施用 MPP5 的示例性方法是常见的经尿道施用途径，其中每种剂量仅进行 4 次注射（每个侧叶进行 2 次注射）。为了在注射期间进行引导，例如，可以使用经直肠超声法。BPH 试验中待施用的总体积是 $50 \mu\text{L/g}$ 前列腺。为了减少注射期间的回流，例如，可以使用凝胶制剂或粘性制剂。

[0651] 虽然本发明已经参考某些具体实施方案进行描述，但是本发明的多种修改对于本领域技术人员而言是显而易见的，并且不脱离如所附权利要求书内所描述的本发明的精神和范围。

[0652] 本说明书中所参考的全部专利、公布文本（包括已公开的专利申请）和数据库条目的所有内容被明确地以引用方式并入本文，就如同上述单独专利、公布文本和数据库条目中的每一个都被明确地和单独地以引用方式并入本文一样。

序 列 表

<110> 普罗陶克斯有限公司 (Protox Therapeutics Incorporated)

<120> 使用修饰的成孔蛋白治疗或预防良性前列腺增生的方法 (Method of Treating or Preventing Benign Prostatic Hyperplasia Using Modified Pore-Forming Proteins)

<130> SCT075803-83

<140> PCT/CA2006/000971

<141> 2006-06-14

<150> 60/690,269

<151> 2005-06-14

<160> 74

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1410

<212> DNA

<213> Aeromonas hydrophila

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1410)

<400> 1

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa	48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa	96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln	
20 25 30	
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc	144
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser	
35 40 45	
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa	192
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu	
50 55 60	
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct	240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro	
65 70 75 80	
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt	288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	
85 90 95	
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc	336
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	
100 105 110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg	384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	
115 120 125	
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	

130	135	140	
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp 145 150 155 160			480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175			528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190			576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205			624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220			672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240			720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255			768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270			816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285			864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300			912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320			960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Asn Ala Trp Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335			1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350			1056
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365			1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380			1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg ccg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400			1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415			1248

```

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

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

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

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

```

<210> 2
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila

```

<400> 2
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1      5      10      15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20     25     30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35     40     45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50     55     60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65     70     75     80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85     90     95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100    105    110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115    120    125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130    135    140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145    150    155    160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165    170    175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180    185    190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195    200    205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210    215    220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225    230    235    240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
245    250    255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260    265    270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275    280    285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290    295    300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305    310    315    320
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325    330    335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340    345    350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val

```

```

      355      360      365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
  370      375      380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
  385      390      395      400
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
      405      410      415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg
      420      425      430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
      435      440      445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
      450      455      460
Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465      470

```

<210> 3
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
 the furin site.

```

<400> 3
gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
  1      5      10      15

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

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

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

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

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

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

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

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

```

130	135	140	
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp 145 150 155 160			480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175			528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190			576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205			624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220			672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240			720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255			768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270			816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285			864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300			912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320			960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Asn Ala Trp Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335			1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350			1056
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365			1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380			1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg ccg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400			1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415			1248

```

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

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

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

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

```

<210> 4
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
 the furin site.

```

<400> 4
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210 215 220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225 230 235 240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
245 250 255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260 265 270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290 295 300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly

```

```

305          310          315          320
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
          325          330          335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
          340          345          350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
          355          360          365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
          370          375          380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385          390          395          400
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
          405          410          415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
          420          425          430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
          435          440          445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
          450          455          460
Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465          470

```

```

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```

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

```

```

<210> 6
<211> 1410
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
      the furin site.

```

```

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

```

```

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

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

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

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

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

gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt   288

```

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	
85 90 95	
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc	336
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	
100 105 110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg	384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	
115 120 125	
ggc ggc aat cac agc caa tat gtg ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	
130 135 140	
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac	480
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	
145 150 155 160	
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc	528
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	
165 170 175	
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc	576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	
180 185 190	
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc	624
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser	
195 200 205	
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc	672
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala	
210 215 220	
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc	720
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr	
225 230 235 240	
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc	768
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	
245 250 255	
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tgc	816
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	
260 265 270	
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc	864
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg	
275 280 285	
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat	912
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr	
290 295 300	
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc	960
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly	
305 310 315 320	
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt	1008
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg	
325 330 335	
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg	1056
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala	
340 345 350	
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg	1104
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val	

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

<210> 7

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.

<400> 7

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

```

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

```

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PSA cleavage site

<400> 8
 His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Ala
 1 5

<210> 9
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
 the furin site.

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

<400> 9
 gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
 Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln 20 25 30	96
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser 35 40 45	144
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu 50 55 60	192
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro 65 70 75 80	240
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly 85 90 95	288
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe 100 105 110	336
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val 115 120 125	384
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg 130 135 140	432
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp 145 150 155 160	480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175	528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190	576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205	624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220	672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240	720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255	768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864

```

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

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

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

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

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

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

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

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

ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac tcc cag ttc tat agc agc aat   1296
Gly Ala Pro Val Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
                               420                               425                               430

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

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

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

```

<210> 10
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
 the furin site.

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

```

50      55      60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65      70      75      80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
      85      90      95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100     105     110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115     120     125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130     135     140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145     150     155     160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
      165     170     175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180     185     190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195     200     205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210     215     220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225     230     235     240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
      245     250     255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260     265     270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275     280     285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290     295     300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305     310     315     320
Phe Leu Arg Trp Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
      325     330     335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340     345     350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355     360     365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
370     375     380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385     390     395     400
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
      405     410     415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
420     425     430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435     440     445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450     455     460
Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465     470

```

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PSA cleavage site

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

<210> 12
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
 the furin site.

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

<400> 12
 gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
 Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa 96
 Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30
 agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggc caa tgg caa ata agc 144
 Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45
 ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa 192
 Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60
 ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct 240
 Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80
 gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt 288
 Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95
 gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc 336
 Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110
 atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg 384
 Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125
 ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt 432
 Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140
 gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac 480
 Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160
 ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc 528
 Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175
 tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc 576
 Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190
 gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc 624
 Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala	672
210 215 220	
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr	720
225 230 235 240	
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	768
245 250 255	
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	816
260 265 270	
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg	864
275 280 285	
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr	912
290 295 300	
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly	960
305 310 315 320	
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg	1008
325 330 335	
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala	1056
340 345 350	
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val	1104
355 360 365	
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr	1152
370 375 380	
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg ccg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile	1200
385 390 395 400	
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile	1248
405 410 415	
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac ggt ata agt agt ttc cag agt Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser	1296
420 425 430	
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp	1344
435 440 445	
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val	1392
450 455 460	
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln	1410
465 470	

<210> 13
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.

<400> 13
 Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30
 Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45
 Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60
 Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80
 Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95
 Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110
 Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125
 Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140
 Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160
 Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175
 Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190
 Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205
 Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220
 Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255
 Ile Glu Ile Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270
 Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300
 Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320
 Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335
 Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350
 Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365
 Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380
 Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400
 Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415
 Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gly Ile Ser Ser Phe Gln
 420 425 430
 Ser Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu

435 440 445
 Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser
 450 455 460
 Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PSA cleavage site

<400> 14
 Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Lys Gly Ile Ser Ser Gln Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Ser Arg Lys Ser Gln Gln Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Ala Thr Lys Ser Lys Gln His
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Lys Gly Leu Ser Ser Gln Cys
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Leu Gly Gly Ser Ser Gln Leu

1	5
---	---

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Glu His Ser Ser Lys Leu Gln
1 5

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Ser Lys Leu Gln
1

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LHRH variant sequence.

<221> SITE
<222> (1)... (1)
<223> Glu is a pyroglutamate

<221> SITE
<222> (6)... (6)
<223> Lys is a D-Lys

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

<210> 24
<211> 397
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variant proaerolysin peptide.

<221> SITE
 <222> (1)... (1)
 <223> pyroglutamate

<221> SITE
 <222> (6)... (6)
 <223> D-Lys

<400> 24
 Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
 20 25 30
 Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
 35 40 45
 Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
 50 55 60
 Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
 85 90 95
 Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
 100 105 110
 His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125
 Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140
 Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
 165 170 175
 Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
 180 185 190
 Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
 195 200 205
 Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
 210 215 220
 Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
 225 230 235 240
 Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
 245 250 255
 Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
 260 265 270
 Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
 275 280 285
 Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile
 290 295 300
 Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
 305 310 315 320
 Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
 325 330 335
 Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp
 340 345 350
 Ser His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu
 355 360 365
 Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
 370 375 380
 Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 385 390 395

<210> 25
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variant proaerolysin peptide.

<221> SITE
 <222> (1)...(1)
 <223> pyroglutamate

<221> SITE
 <222> (6)...(6)
 <223> D-Lys

<400> 25
 Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
 20 25 30
 Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
 35 40 45
 Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
 50 55 60
 Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
 85 90 95
 Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
 100 105 110
 His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125
 Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140
 Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
 165 170 175
 Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
 180 185 190
 Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
 195 200 205
 Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
 210 215 220
 Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
 225 230 235 240
 Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
 245 250 255
 Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
 260 265 270
 Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
 275 280 285
 Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile
 290 295 300
 Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
 305 310 315 320
 Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
 325 330 335
 Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp
 340 345 350
 Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu
 355 360 365
 Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
 370 375 380
 Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 385 390 395

<210> 26
 <211> 33
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

gctgccaatc aacatcatca ttaacggcag cgc

33

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

gcgctgccgt taatgatgat gttgattggc agc

33

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

gccaatcaac atcatcatca tcattcatc cggcagcgc

39

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

gccaatcaac atcatcatca tcattcatc cggcagcgc

39

<210> 30

<211> 1762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site, and a histidine tag.

```

<400> 30
aagcttgcat gcctgcagaa gaaggagata tacatatgca aaaaataaaa ctaactggct 60
tgtcattaat catatccggc ctgctgatgg cacaggcgca agcggcagag cccgtctatc 120
cagaccagct tcgcttggtt tcattggggc aaggggtctg tggcgacaag tatcgccccg 180
tcaatcgaga agaagcccaa agcgttaaaa gcaatatgt cggcatgatg gggcaatggc 240
aaataagcgg gctggccaac ggctgggtca ttatggggcc gggttataac ggtgaaataa 300
aaccagggac agcgtccaat acctgggtgt atccgaccaa tccgtgttacc ggtgaaatac 360
cgacactgtc tgccctggat attccagatg gtgacgaagt cgatgtgcag tggcgactgg 420
tacatgacag tgcgaatttc atcaaaccaa ccagctatct ggcccattac ctcggttatg 480
cctgggtggg cggcaatcac agccaatatg tcggcggaaga catggatgtg acccgtgatg 540
gcgacggctg ggtgatccgt ggcaacaatg acggcggtcg tgacggctat cgctgtggtg 600
acaagacggc catcaaggtc agcaacttcg cctataacct agatcccgcg agcttcaagc 660
atggcgatgt caccagtcg gaccgccagc tgggtcaagac tgtggtgggc tggcggttca 720
acgacagcga cccccccaa tccggctatg acgtcacct gcgctacgac acagccacca 780
actggtccaa gaccaacacc tatggcctga gcgagaaggt gaccaccaag aacaagttca 840
agtggccact ggtgggggaa accgaactct ccatcgagat tgctgccaat cagtccctggg 900
cgtccagaa cgggggctcg accaccacct ccctgtctca gtccgtgcga ccgactgtgc 960
cggcccgctc caagatcccg gtgaagatag agctctacaa ggccgacatc tcctatccct 1020
atgagttcaa ggccgatgtc agctatgacc tgaccctgag cggttctctg cgctggggcg 1080
gcaacgcctg gtataccac ccggacaacc gtccgaactg gaaccacacc ttcgtcatag 1140
gtccgtacaa ggacaaggcg agcagcattc ggtaccagtg ggacaagcgt tacatcccgg 1200
gtgaagtga gtggtgggac tggaaactgga ccatacagca gaacggtctg tctaccatgc 1260
agaacaacct ggccagagtg ctgcgccggg tgcgggcggg gatcaccggt gatttcagt 1320
ccgagagcca gtttgcggc aacatagaga tcggtgctcc cgtgccgctc gcgctgaca 1380
gccattcctc caagctgcag agtgtggacg gcgctggtca aggcctgagg ctggagatcc 1440
cgctcgatgc gcaagagctc tccgggcttg gcttcaacaa cgtcagcctc agcgtgacct 1500
ctgctgccaa tcaacatcat catcatcatc attaacggca gcgctaacaa catcatcatc 1560
atcatcatta acggcagcgc gttgtagtga tggaaaccgg cctctggccc ggtttttgtt 1620
tgcactggtc gggtttgta aaggcttggt ctttccattt cccacttat actggcgcca 1680
tcttgcgga gtgccaacg tcgaacgacg cgaggctgag accgttaatt cgggatccgt 1740
ggaacctgat ccccggaat tc 1762

```

```

<210> 31
<211> 476
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for
the furin site.

```

```

<400> 31
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala

```

```

165      170      175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180      185      190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195      200      205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210      215      220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225      230      235
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser
245      250      255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260      265      270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275      280      285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290      295      300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305      310      315
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325      330      335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340      345      350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355      360      365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
370      375      380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385      390      395
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
405      410      415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
420      425      430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435      440      445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450      455      460
Thr Pro Ala Ala Asn Gln His His His His His
465      470      475

```

<210> 32
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HK2 Cleavage Site

<400> 32
 Lys Arg Arg
 1

<210> 33
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HK2 Cleavage Site

<400> 33
 Ser Arg Arg
 1

<210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 34
Ala Arg Arg
1

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 35
His Arg Arg
1

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 36
Gln Arg Arg
1

<210> 37
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 37
Ala Phe Arg
1

<210> 38
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 38
Ala Gln Arg
1

<210> 39
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 39
Ala Lys Arg
1

<210> 40
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 40
Ala Arg Lys
1

<210> 41
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 41
Ala His Arg
1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 42
Gln Lys Arg Arg
1

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 43
Lys Ser Arg Arg
1

<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 44
Ala Lys Arg Arg
1

<210> 45
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 45
Lys Lys Arg Arg
1

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 46
His Lys Arg Arg
1

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 47
Lys Ala Phe Arg
1

<210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 48
Lys Ala Gln Arg

1

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 49
Lys Ala Lys Arg
1

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 50
Lys Ala Arg Lys
1

<210> 51
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 51
Lys Ala His Arg
1

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 52
Lys Arg Arg Leu
1

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 53

Ser Arg Arg Leu
1

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 54
Ala Arg Arg Leu
1

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 55
Ala Arg Arg Ser
1

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 56
His Arg Arg Ala
1

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 57
Gln Arg Arg Leu
1

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 58
Ala Phe Arg Leu
1

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 59
Ala Gln Arg Leu
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 60
Ala Lys Arg Leu
1

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 61
Ala Arg Lys Leu
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 62
Ala His Arg Leu
1

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 63
His Ala Gln Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 64
Gly Gly Lys Ser Arg Arg Leu
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 65
His Glu Gln Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 66
His Glu Ala Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 67
Gly Gly Gln Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 68
His Glu Gln Lys Arg Arg Ala
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 69
Gly Gly Ala Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 70
His Glu Gln Lys Arg Arg Ser
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 71
Gly Gly Lys Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HK2 Cleavage Site

<400> 72
Gly Gly His Lys Arg Arg Leu
1 5

<210> 73
<211> 1542
<212> DNA
<213> Clostridium septicum

<400> 73

```

tgtaaataat atgttaatat ttigataaca tttattatat aataaattat ttattttaaa 60
attaaaggga gggatattta tgtcaaaaaa atcttttgct aaaaaagtaa tttgtacatc 120
tatgattgca attcagtgtg cggcagtagt accacatgta caagcttatg cacttacaaa 180
tcttgaagag gggggatatg caaatcataa taatgcttct tcaattaaaa tatttgata 240
tgaagacaat gaagatttaa aagctaaaat tattcaagat ccagagttaa taagaaattg 300
ggcaaatgta gctcattcat taggatttgg atggtgcggt ggaacggcta atccaaacgt 360
tggacaaggt ttigaattta aaagagaagt tggggcaggt ggaaaagtat cttatttatt 420
atctgctaga tacaatccaa atgatcccta tgcaagtgga tatcgtgcaa aagatagact 480
ttctatgaaa atatcaaagt ttagatttgt tattgataat gattctataa aattaggtac 540
acctaaagtg aaaaaattag cacctttaaa ctctgctagt tttgatttaa taaatgaaag 600
taaaactgag tctaaattat caaaaacatt taattataca acttctaaaa cagtttctaa 660
aacagataac tttaaatttg gagaaaaaat aggagtaaaa acatcattta aagtaggtct 720
tgaagctata gctgacagta aagttgagac aagctttgaa tttaatgcag aacaagggtg 780
gtcaaataca aatagtacta ctgaaactaa acaagaaagt actacatata ctgcaacagt 840
ttctccacaa actaaaaaga gattattcct agatgtgta ggatcacaaa ttgatattcc 900
ttatgaagga aaaatatata tggaatacga catagaatta atgggatttt taagatatac 960
aggaaatgct cgtgaagatc atactgaaga tagaccaaca gttaaactta aatttggtta 1020
aaacggtatg agtgcctagg aacatcittaa agatttatat agtcataaga atattaatgg 1080
atattcagaa tgggatttga aatgggtaga tgagaaattt ggttatttat ttaaaaattc 1140
atacgtatgct cttactagta gaaaattagg aggaataata aaaggctcat ttactaacat 1200
taatggaaca aaaatagtaa ttagagaagg taaagaaatt ccacttcctg ataagaagag 1260
aagaggaaaa cgctcagtag attctttaga tgctagatta caaatgaag gtattagaat 1320
agaaaatatt gaaacacaag atgttccagg atttagacta aatagcataa catacaatga 1380
taaaaaattg atattaatta ataatatata attataattt attaaaatat gcttctctat 1440
actttatatt aatattttaa gtataaaaa taacaaaatc tcacttagta ggtagaattg 1500
tataaaaaca aatctaccta ctattttttt attatttagt cg 1542

```

<210> 74

<211> 443

<212> PRT

<213> Clostridium septicum

<400> 74

```

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

```

Gly	Phe	Leu	Arg	Tyr	Thr	Gly	Asn	Ala	Arg	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Asp
290						295					300				
Arg	Pro	Thr	Val	Lys	Leu	Lys	Phe	Gly	Lys	Asn	Gly	Met	Ser	Ala	Glu
305					310					315					320
Glu	His	Leu	Lys	Asp	Leu	Tyr	Ser	His	Lys	Asn	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ser
				325					330					335	
Glu	Trp	Asp	Trp	Lys	Trp	Val	Asp	Glu	Lys	Phe	Gly	Tyr	Leu	Phe	Lys
			340					345					350		
Asn	Ser	Tyr	Asp	Ala	Leu	Thr	Ser	Arg	Lys	Leu	Gly	Gly	Ile	Ile	Lys
		355					360					365			
Gly	Ser	Phe	Thr	Asn	Ile	Asn	Gly	Thr	Lys	Ile	Val	Ile	Arg	Glu	Gly
370						375					380				
Lys	Glu	Ile	Pro	Leu	Pro	Asp	Lys	Lys	Arg	Arg	Gly	Lys	Arg	Ser	Val
385					390					395					400
Asp	Ser	Leu	Asp	Ala	Arg	Leu	Gln	Asn	Glu	Gly	Ile	Arg	Ile	Glu	Asn
				405					410					415	
Ile	Glu	Thr	Gln	Asp	Val	Pro	Gly	Phe	Arg	Leu	Asn	Ser	Ile	Thr	Tyr
			420					425					430		
Asn	Asp	Lys	Lys	Leu	Ile	Leu	Ile	Asn	Asn	Ile					
		435					440								

前气单胞菌溶素

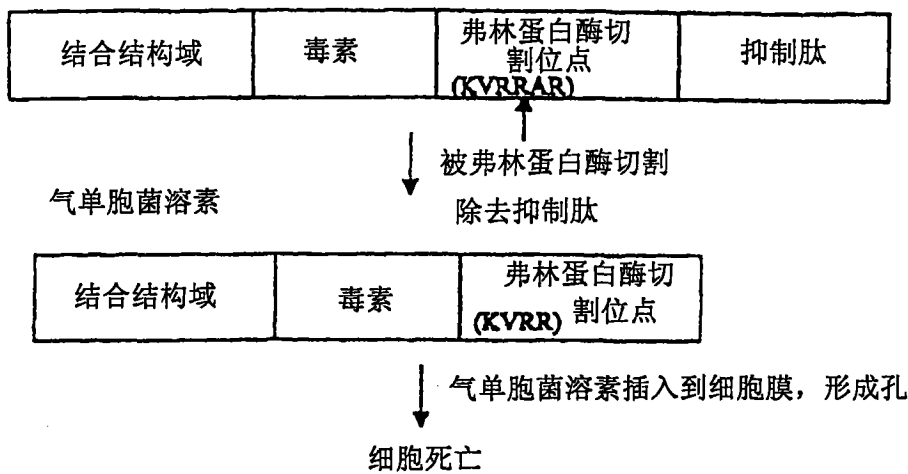


图1

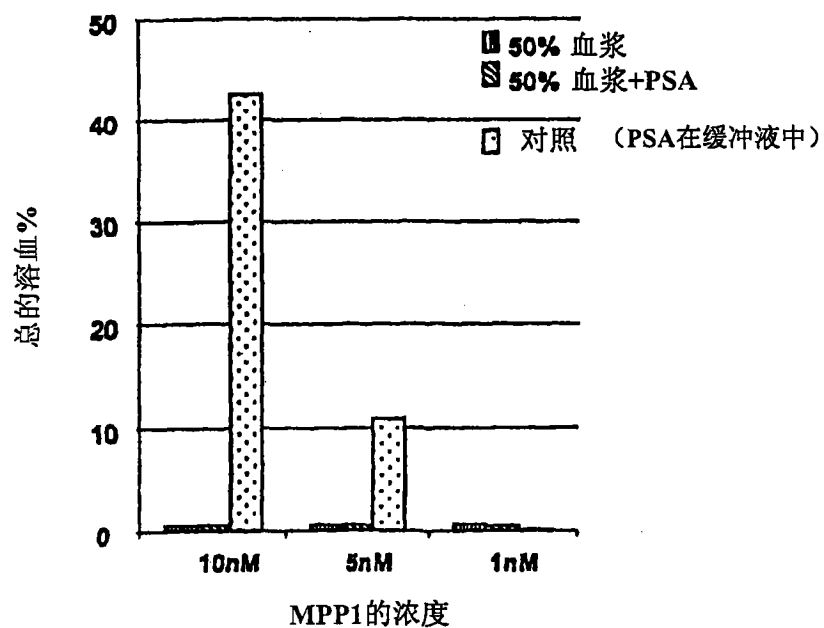


图2

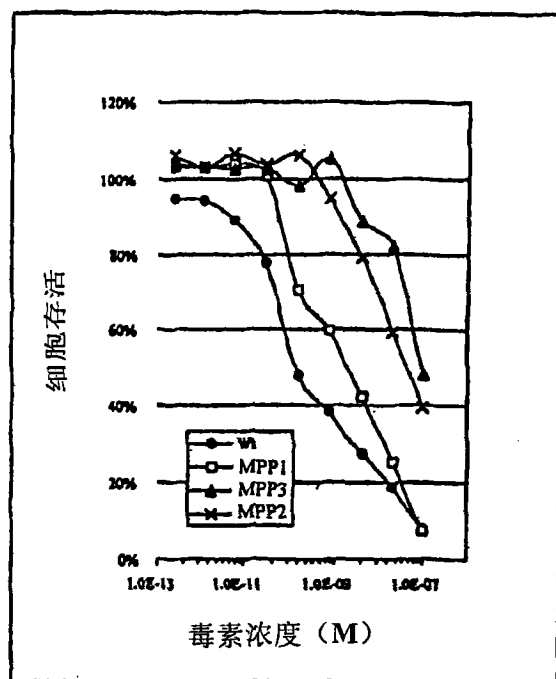


图3

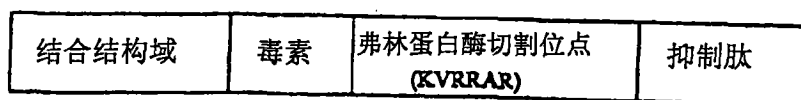


图4A

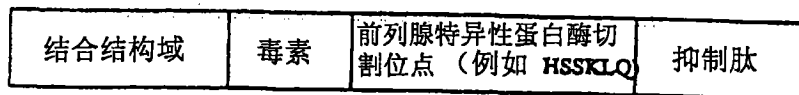


图4B

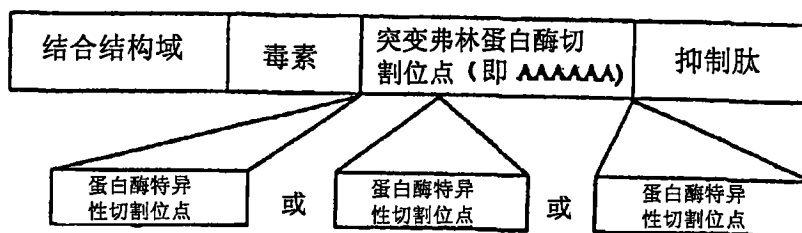


图4C

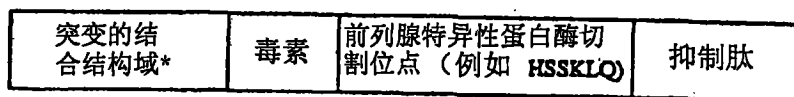


图4D

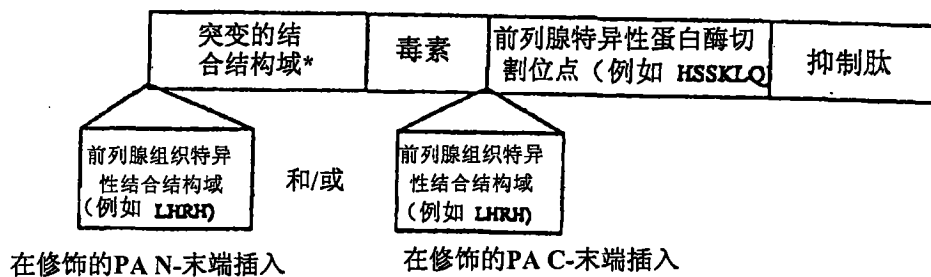


图4E

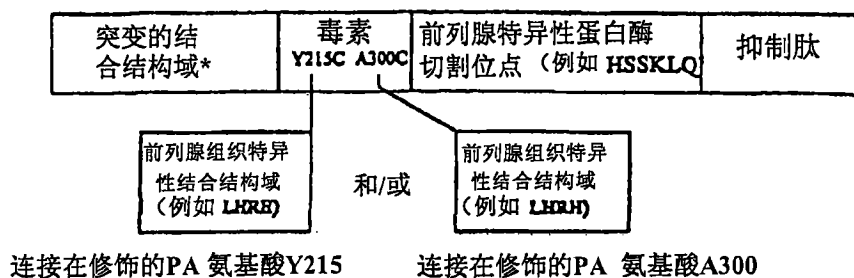


图5A

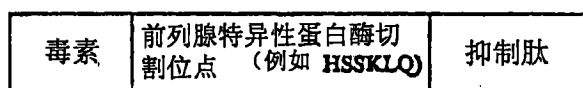


图5B

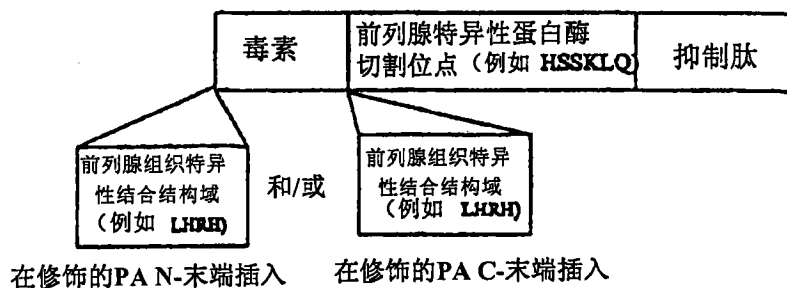


图5C

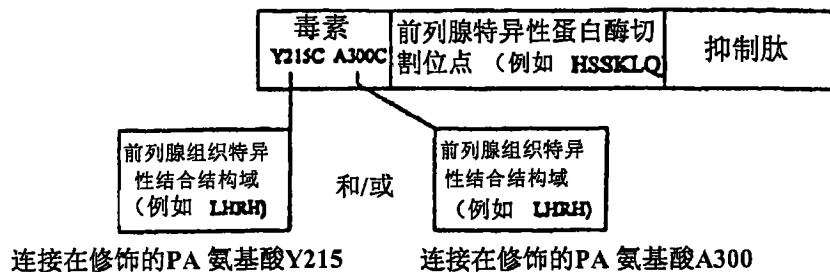
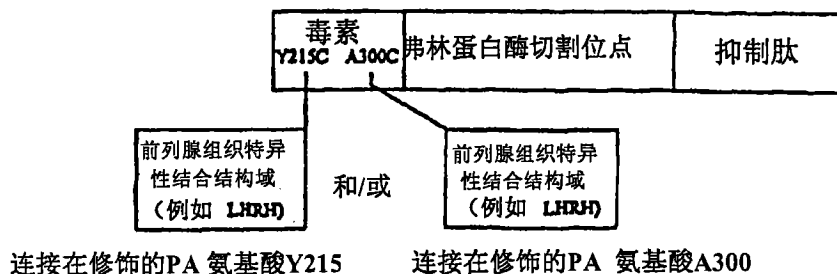
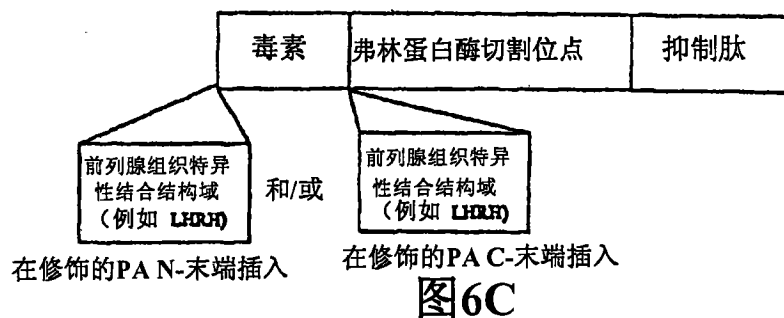
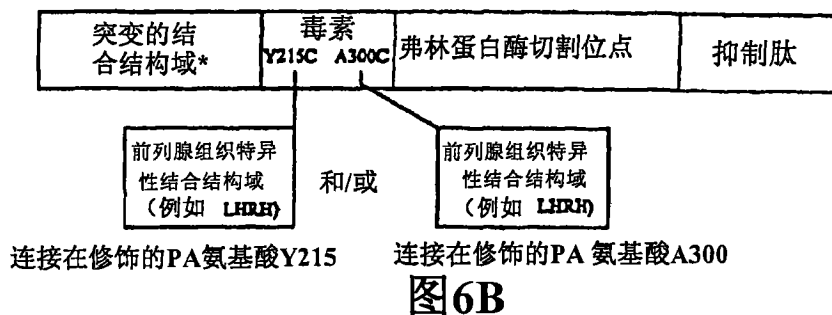
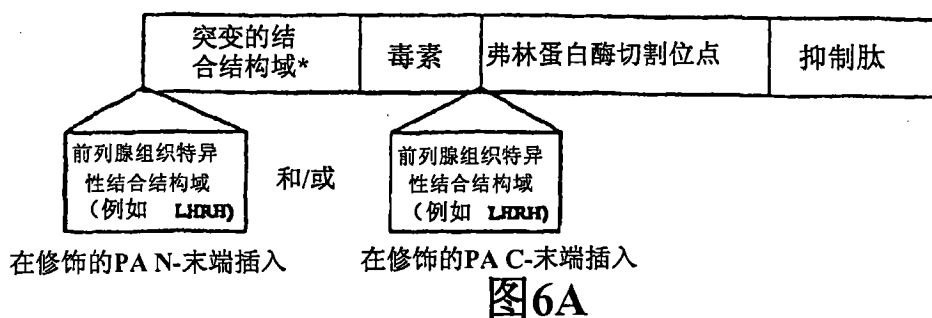


图5D



```

<10> SEQ ID NO 1
<11> LENGTH: 1410
<12> TYPE: DNA
<13> ORGANISM: Aeromonas hydrophila
<14> FEATURE:
<21> NAME/KEY: CDS
<22> LOCATION: (1)..(1410)
<23> OTHER INFORMATION:

<400> SEQUENCE: 1

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

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

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

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

ata aca cca ggc aca ggc tcc aat aac tgg tgt tat cgc aca aat aat     240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65          70          75          80

gtt aac ggt gaa ata cgc aca atg tot gcc atg gat att aca gat ggt     288
Val Thr Gly Gln Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85          90          95

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

ata aca cca aac agc tat atg gcc cat taa ctc ggt tat gcc tgg gtc     384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115         120         125

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

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

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

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

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

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

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

```

续前

acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser 245 250 255	768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gag tcc caq aac ggg ggc tgg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga cag aot gtg cag gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
tcc aag atc cag gtg aag ata gag ctg taa aag gcc gac ata tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
tta ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc ccc cag gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
cag aac tgg aac ccc acc ttc gtc ata ggt cag tcc aag gac aag gag Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056
aga agc att cgg tcc cag tgg gac aag cgt tcc atc cag ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc cag gtg cgg gag ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248
ggt gct ccc gtg cag ctg gag gct gac agc aag gtg cgt cgt gct cgc Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg 420 425 430	1296
agt gtc gac ggc gct ggt cca gcc ctg agg ctg gag atc cag ctg gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435 440 445	1344
gag cca gag ctg tcc ggg att gcc ttc aac aac gtc ago ctg agc gtg Ala Glu Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450 455 460	1392
acc cct gct gcc aat cca Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465 470	1410

图7

```

<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 470
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Aeromonas hydrophila

<400> SEQUENCE: 1
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1      5      10      15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Glu
20     25     30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35     40     45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50     55     60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65     70     75     80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85     90     95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100    105    110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115    120    125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130    135    140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145    150    155    160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165    170    175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180    185    190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195    200    205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210    215    220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225    230    235    240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Gln Thr Gln Leu Ser
245    250    255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260    265    270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275    280    285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Gln Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290    295    300

```

续前

```

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305          310          315          320
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325          330          335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340          345          350
Ser Ser Ile Arg Tyr Glu Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355          360          365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Glu Glu Asn Gly Leu Ser Thr
370          375          380
Met Glu Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385          390          395          400
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Glu Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
405          410          415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg
420          425          430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Glu Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435          440          445
Ala Glu Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450          455          460
Thr Pro Ala Ala Asn Glu
465          470

```

图8

```

<110> SEQ ID NO 3
<111> LENGTH: 1410
<112> TYPE: DNA
<113> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<221> OTHER INFORMATION: Proserolysin with a PSA sequence substituted
for the furin site.
<222> FEATURE:
<223> NAME/KEY: CDS
<224> LOCATION: (1)..(1410)
<225> OTHER INFORMATION:

<400> SEQUENCE: 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

续前

ata gag att got gaa aat cag taa tgg gaa taa cag aac ggg gga taa	816
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	
260 263 270	
aac aac aac taa ctg tat cag taa gta cga aag aat gta aag gaa gga	864
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg	
275 280 285	
taa aag ata aag gta aag ata gag ata taa aag gaa gaa ata taa tat	912
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr	
290 295 300	
aac tat gag taa aag gaa gat gta aag tat gaa ctg aac ctg aag gga	960
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly	
305 310 315 320	
tta ctg aag tgg gga gga aac gaa tgg tat aac aac aag gaa aac aat	1008
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg	
325 330 335	
caa aac tgg aac aac aac tta gta ata ggt aag taa aag gaa aag gaa	1056
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala	
340 345 350	
aag aag att aag taa aag tgg gaa aag aat taa ata aag ggt gaa gta	1104
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val	
355 360 365	
aag tgg tgg gaa tgg aac tgg aac ata aag aag aac ggt ctg tat aac	1152
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr	
370 375 380	
atg aag aac aac ctg gaa aag gta ctg aag aag gta aag gaa gaa ata	1200
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile	
385 390 395 400	
aac ggt gat tta aat gaa aag aag aag ttt gaa gga aac ata gag ata	1248
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile	
405 410 415	
ggt gat aac gta aag ata aag gat gaa aag aat taa taa aag ctg aag	1296
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln	
420 425 430	
aat gta gaa gga gat ggt aac gga ctg aag ctg gag ata aag ata gat	1344
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp	
435 440 445	
gag aac gag ata taa ggg att gga tta aac aac gta aag ata aag gta	1392
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val	
450 455 460	
aac aat gat gaa aat aac	1410
Thr Pro Ala Ala Asn Gln	
465 470	

图9

```

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 470
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Procarboxylase with a PSA sequence substituted
      for the furin site.

<400> SEQUENCE: 4
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1             5             10             15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Gln Glu Ala Gln
 20             25             30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35             40             45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50             55             60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65             70             75             80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85             90             95
Asp Gln Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100            105            110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115            120            125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130            135            140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145            150            155            160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165            170            175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180            185            190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195            200            205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210            215            220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Gln Lys Val Thr
225            230            235            240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
245            250            255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser

```

续前

	260		265		270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Glu Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg					
275		280		285	
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr					
290	295	300			
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly					
305	310	315		320	
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg					
325	330	335			
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala					
340	345	350			
Ser Ser Ile Arg Tyr Glu Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val					
355	360	365			
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Glu Glu Asn Gly Leu Ser Thr					
370	375	380			
Met Glu Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile					
385	390	395		400	
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Glu Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile					
405	410	415			
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Glu					
420	425	430			
Ser Val Asp Gly Ala Gly Glu Glu Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp					
435	440	445			
Ala Glu Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val					
450	455	460			
Thr Pro Ala Ala Asn Glu					
465	470				

图10

```

<210> SEQ ID NO 5
<211> LENGTH: 6
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo Sapiens

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

```

图11

```

<210> SEQ ID NO 6
<211> LENGTH: 1410
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Proserolysin with a PSA sequence substituted
for the furin site
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: CDS
<222> LOCATION: (1)..(1410)
<223> OTHER INFORMATION:

<400> SEQUENCE: 6

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

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

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

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

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

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

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

ata aaa cca aac agc tat atg gcc cat tcc cta ggt tat gcc tgg gtg      384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

```

续前

ggc ggc aat cag aac cag tat gtc ggc gaa gac atg gat gtc aac cgt gly gly asn his ser gln tyr val gly glu asp met asp val thr arg 130 135 140	432
gat ggc gac ggc tgg gtc atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac asp gly asp gly trp val ile arg gly asn asn asp gly gly cys asp 145 150 155 160	480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag aag ggc atc aag gtc agc aac ttc ggc gly tyr arg cys gly asp lys thr ala ile lys val ser asn phe ala 165 170 175	528
tat aac ctg gat ccc gac aac ttc aag cat ggc gat gtc aac cag tcc tyr asn leu asp pro asp ser phe lys his gly asp val thr gln ser 180 185 190	576
gac cgc aag ctg gtc aag cat gtc gtc ggc tgg ggc gtc aac gac aac asp arg gln leu val lys thr val val gly trp ala val asn asp ser 195 200 205	624
gac aac ccc caa tcc ggc tat gac gtc aac ctg cgc tcc gac aac ggc asp thr pro gln ser gly thr asp val thr leu arg tyr asp thr ala 210 215 220	672
aac aac tgg tcc aag aac aac aac tat ggc ctg aac gag aag gtc aac thr asn trp ser lys thr asn thr tyr gly leu ser glu lys val thr 225 230 235 240	720
aac aag aac aag ttc aag tgg ccc ctg gtc ggc gaa aac caa ctg tcc thr lys asn lys phe lys trp pro leu val gly glu thr gln leu ser 245 250 255	768
atc gag att gat gac aat cag tcc tgg gag tcc aag aac ggc ggc tag ile gln ile ala ala asn gln ser trp ala ser gln asn gly gly ser 260 265 270	816
aac aac aac tcc ctg tat aag tcc gtc cgc aag cat gtc aag gac cgc thr thr thr ser leu ser gln ser val arg pro thr val pro ala arg 275 280 285	864
tcc aag atc cag gtc aag ata gag ctg tcc aag ggc gac atc tcc tat ser lys ile pro val lys ile glu leu tyr lys ala asp ile ser tyr 290 295 300	912
aac tat gag ttc aag ggc gat gtc aac tat gac ctg aac ctg aac ggc pro tyr glu phe lys ala asp val ser tyr asp leu thr leu ser gly 305 310 315 320	960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac ggc tgg tat aac aac aag gac aac cgt phe leu arg trp gly gly asn ala trp tyr thr his pro asp asn arg 325 330 335	1008
cag aac tgg aac aac aac ttc gtc ata ggt cag tcc aag gac aag gag 1056	

续前

```

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

```

图12

```

<210> SEQ ID NO 7
<211> LENGTH: 470
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Proserolysin with a PSA sequence substituted
for the furin site

<400> SEQUENCE: 7
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

```

续前

```

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
    165                      170                      175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
    180                      185                      190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
    195                      200                      205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
    210                      215                      220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
    225                      230                      235                      240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Gln Thr Gln Leu Ser
    245                      250                      255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
    260                      265                      270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
    275                      280                      285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
    290                      295                      300
Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
    305                      310                      315                      320
Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
    325                      330                      335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
    340                      345                      350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
    355                      360                      365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
    370                      375                      380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
    385                      390                      395                      400
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
    405                      410                      415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
    420                      425                      430
Ser Ala Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
    435                      440                      445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
    450                      455                      460
Thr Pro Ala Ala Asn Gln
    465                      470

```

图13

```

<210> SEQ ID NO: 8
<211> LENGTH: 8
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: PSA cleavage site

<400> SEQUENCE: 8
His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Ala
1                      5

```

图14

```

<210> SEQ ID NO 9
<211> LENGTH: 1419
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Proserolysin with a PSA sequence substituted
      for the furin site.
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: CDS
<222> LOCATION: (1)..(1419)
<223> OTHER INFORMATION:
<400> SEQUENCE: 9

gca gag ccc gtc tat cca gac cag att cgc ttg ttt tca ttg ggc caa      46
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1      5      10      15

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

agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggc caa tgg caa ata agc      146
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35     40     45

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

ata aaa cca ggc acm gag tcc aat acc tgg tgt tat ccc acc aat cat      240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65     70     75     80

gtt acc ggt gaa ata ccc acc atg tat ggc atg gat att cca gat ggt      288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85     90     95

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

ata aaa cca acc aga tat atg gac cat taa ata ggt tat gac tgg gtg      384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115    120    125

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

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

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

tat aac atg gat ccc gac aga tta aag cat ggc gat gtc acc cag taa      576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180    185    190

gac cgc cag atg gtc aag aat gtg gtg ggc tgg ggc gtc aac gac aga      624
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195    200    205

gac acc ccc aac tcc ggc tat gac gtc aac atg cgc taa gac aca gac      672
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210    215    220

```

续前

acc aac tgg too aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gty acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240	720
acc aag aac aag tto aag tgg oca ctg gty ggg gaa acc caa cto too Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255	768
atc gag att got gac ant cag too tgg ggc too cag aac ggg ggc toq Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc aac acc too ctg tot cag too tgg ggc aac act gtg aag gac cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
too aag atc ccg gty aag ata gag cto too aag gac gac atc too tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
acc tat gag tto aag gac gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
tto ctg cgc tgg ggc ggc aac gac tgg tat acc aac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
ccg aac tgg aac aac acc tto gtc ata ggt ccg tac aag gac aag ggc Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056
agc aac att ccg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gac gty Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tot acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152
atg cag aac aac ctg gac aga gty ctg cgc ccg gty cgc ggc ggc atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200
acc ggt gat tto agt gac gag agc cag ttt gac ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248
ggt got ccc gty ccg cto ggc gct gac too cag tto tat agc agc aat Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn 420 425 430	1296
agt gty gac ggc got ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg cto gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435 440 445	1344
gcg caa gag cto too ggg ctt ggc tto aac aac gtc agc cto agc gty Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450 455 460	1392
acc aat got gac aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465 470	1440

图15

```

<210> SEQ ID NO 10
<211> LENGTH: 470
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Procarboxylase with a PSA sequence substituted
for the furin site.

<400> SEQUENCE: 10
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1          5          10          15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20          25          30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35          40          45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50          55          60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65          70          75          80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85          90          95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100         105         110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115         120         125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130         135         140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145         150         155         160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165         170         175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180         185         190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195         200         205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210         215         220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225         230         235         240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
245         250         255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260         265         270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275         280         285
Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290         295         300

```

续前

```

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305          310          315          320
The Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325          330          335
Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340          345          350
Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355          360          365
Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
370          375          380
Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
385          390          395          400
Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
405          410          415
Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
420          425          430
Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
435          440          445
Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
450          455          460
Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465          470

```

图16

```

<210> SEQ ID NO 11
<211> LENGTH: 6
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: PSA cleavage site
<400> SEQUENCE: 11
Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
1          5

```

图17

```

<210> SEQ ID NO 12
<211> LENGTH: 1410
<212> TYPE: CDS
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<221> OTHER INFORMATION: Proaerolysin with a PSA sequence substituted
      for the furin site.
<222> FEATURE:
<221> NAME/KEY: CDS
<222> LOCATION: (1)..(1410)
<223> OTHER INFORMATION:

<400> SEQUENCE: 12

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

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

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

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

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

gtt aac ggt gaa ata cag aca atg tat gcc atg gat att cca gat ggt     288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85         90         95

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

ata aaa cca aac agc tat atg gcc cat taa ctc ggt tat gcc tgg gtg     384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115        120        125

ggg ggc aat cag agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg aac agt     432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130        135        140

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

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

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

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

gac aac ccc caa tcc ggc tat gac gtc aac atg cgc taa gac aac gcc     672
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210        215        220

```

续前

acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 125 230 235 240	720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255	768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gag tcc cag aac ggg ggc tgg Ile Gln Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg aot gty ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tcc aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg aca gga Pro Thr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
tta ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc caa ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
ccg aac tgg aac caa acc ttc gtc ata ggt ccg tcc aag gcc aag gcy Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056
aga aga att ccg tcc ccg tgg gcc aag cgt tcc atc ccg ggt gaa gty Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104
aag tgg tgg gcc tgg aac tgg acc ata cag ccg aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aya gty ctg cgc ccg gty ccg gcc ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc gcc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248
ggt gct ccc gtg ccg ctc gag gct gcc ggt ata agt agt ttc cag agt Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser 420 425 430	1296
agt gty gcc ggc gct ggt caa gcc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435 440 445	1344
gag caa gag ctc tcc ggg att gcc ttc aac aac gtc agc ctc agc gty Ala Gln Gln Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450 455 460	1392
acc aot gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465 470	1440

图18

```

<10> SEQ ID NO 13
<11> LENGTH: 470
<12> TYPE: PRT
<13> ORGANISM: Artificial Sequence
<20> FEATURE:
<22> OTHER INFORMATION: Promerolysin with a NSA sequence substituted
for the furin site.

<400> SEQUENCE: 13
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1          5          10          15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20          25          30
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35          40          45
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50          55          60
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65          70          75          80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85          90          95
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100         105         110
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115         120         125
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130         135         140
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145         150         155         160
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165         170         175
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180         185         190
Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195         200         205
Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210         215         220
Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225         230         235         240
Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
245         250         255
Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260         265         270
Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275         280         285

```

续前

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465                470

```

图19

```

<210> SEQ ID NO 14
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<221> OTHER INFORMATION: PSA cleavage site

<400> SEQUENCE: 14
Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
1                5

```

图20

```

<210> SEQ ID NO 15
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 15
Lys Gly Ile Ser Ser Gln Tyr
1                5

```

图21

```

<210> SEQ ID NO 16
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 16
Ser Arg Lys Ser Gln Gln Tyr
1                5

```

图22

```

<210> SEQ ID NO 17
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 17
Ala Thr Lys Ser Lys Gln His
1                5

```

图23

```

<210> SEQ ID NO 18
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 18
Lys Gly Leu Ser Ser Gln Cys
1                5

```

图24

```

<210> SEQ ID NO 19
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 19
Leu Gly Gly Ser Ser Gln Leu
1           5

```

图25

```

<210> SEQ ID NO 20
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 20
Glu His Ser Ser Lys Leu Gln
1           5

```

图26

```

<210> SEQ ID NO 21
<211> LENGTH: 4
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 21
Ser Lys Leu Gln
1

```

图27

```

<210> SEQ ID NO 22
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

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

```

图28

```

<210> SEQ ID NO 23
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: LRRN variant sequence.
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (1)..(1)
<223> OTHER INFORMATION: Glu is a pyroglutamate
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (6)..(6)
<223> OTHER INFORMATION: Lys is a D-Lys

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

```

图29

```

<210> SEQ ID NO 24
<211> LENGTH: 197
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Variant proserolysin peptide.
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (1)..(1)
<223> OTHER INFORMATION: pyroglutamate
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (6)..(6)
<223> OTHER INFORMATION: D-Lys

<400> SEQUENCE: 24
Gln His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Gln Ile Pro Thr Leu Ser
1           5           10           15
Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
20           25           30
Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
35           40           45
Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
50           55           60
Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
65           70           75           80
Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
85           90           95
Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
100          105          110
His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
115          120          125
Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
130          135          140
Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
145          150          155          160

```

图30

续前

```

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

```

图30

```

<210> SEQ ID NO 25
<211> LENGTH: 397
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<221> OTHER INFORMATION: Variant proserolysin peptide.
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (1)..(1)
<223> OTHER INFORMATION: pyroglutamate
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (6)..(6)
<223> OTHER INFORMATION: D-Lys
<400> SEQUENCE: 25
Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
1          5          10          15

```

图31

续前

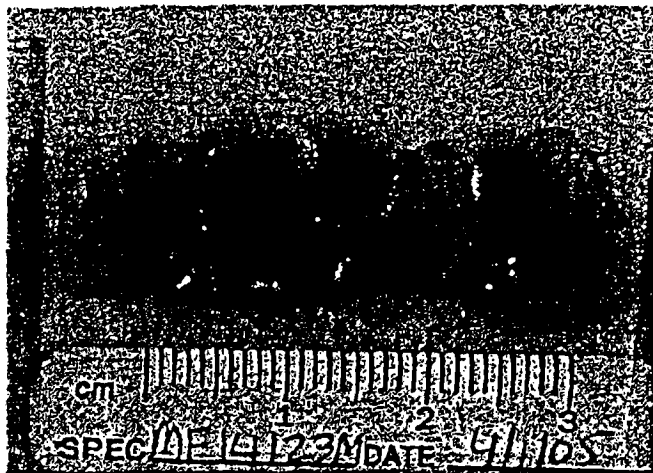
```

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Glu Trp Arg Leu
 20                      25                      30
Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
 35                      40                      45
Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Glu Tyr Val Gly
 50                      55                      60
Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
 65                      70                      75                      80
Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
 85                      90                      95
Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
100                      105                      110
His Gly Asp Val Thr Glu Ser Asp Arg Glu Leu Val Lys Thr Val Val
115                      120                      125
Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Glu Ser Gly Tyr Asp Val
130                      135                      140
Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
145                      150                      155                      160
Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
165                      170                      175
Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Glu Ser Trp
180                      185                      190
Ala Ser Glu Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Glu Ser Val
195                      200                      205
Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
210                      215                      220
Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
225                      230                      235                      240
Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
245                      250                      255
Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
260                      265                      270
Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Glu Trp Asp Lys
275                      280                      285
Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Tyr Asn Trp Thr Ile
290                      295                      300
Glu Glu Asn Gly Leu Ser Thr Met Glu Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
305                      310                      315                      320
Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Glu
325                      330                      335
Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp
340                      345                      350
Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg Ser Val Asp Gly Ala Gly Glu Gly Leu
355                      360                      365
Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Glu Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
370                      375                      380
Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Glu
385                      390                      395

```

图31

组 1,0 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 5002



组 3, 5 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 6006

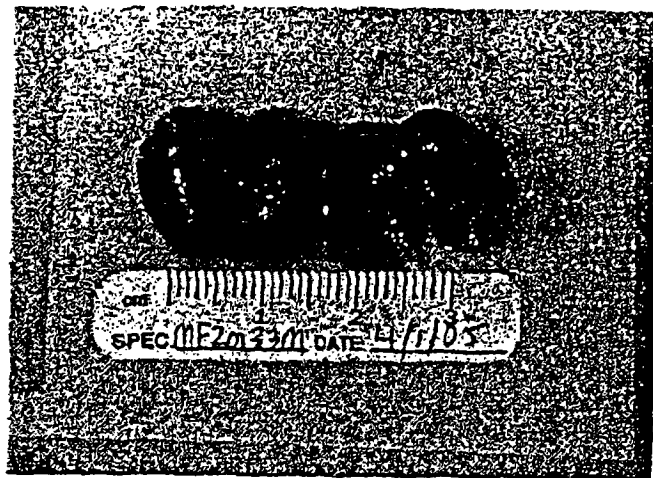


图32E

组 3, 5 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 7003

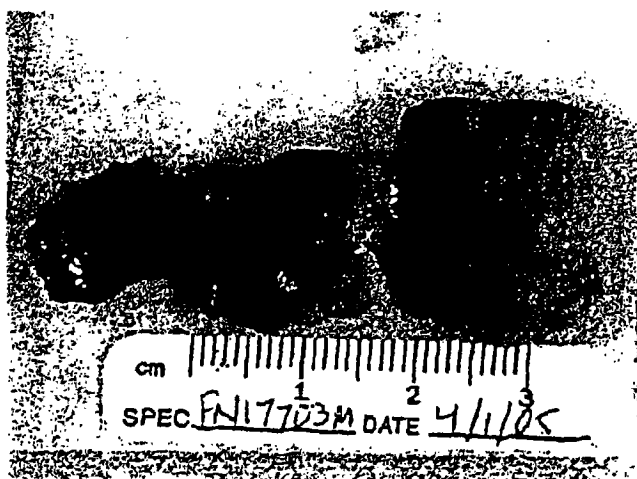


图32F

组 4, 25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 6008



图32G

组 4, 25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 7004

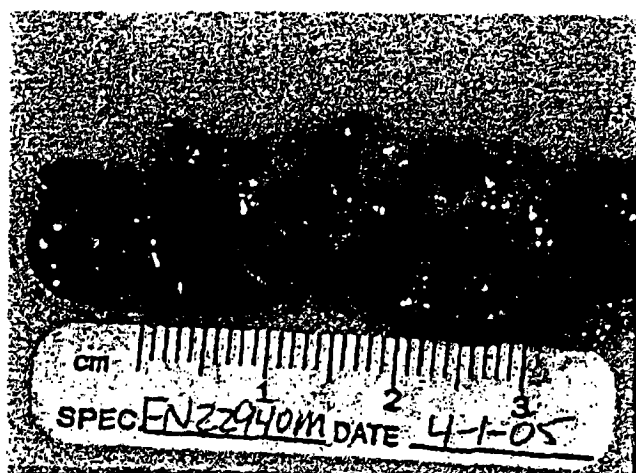


图32H

组 1,0 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 6001, 第15天

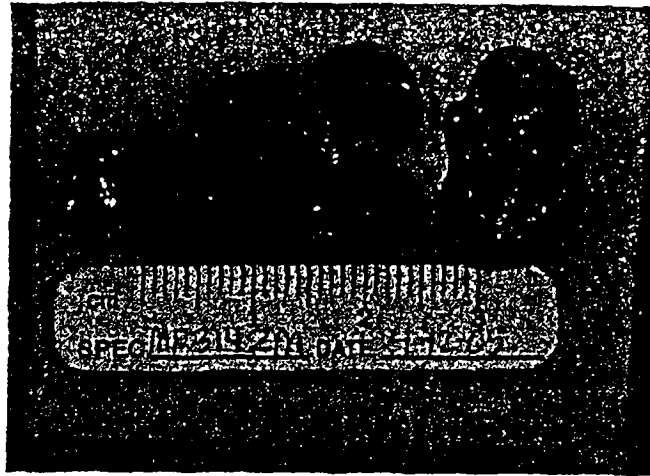


图33A

组 1,0 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 8001, 第15天

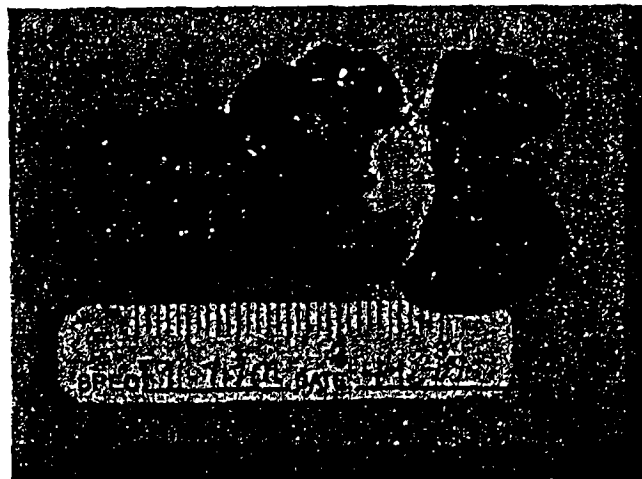


图33B

组 2, 1 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 6003, 第15天

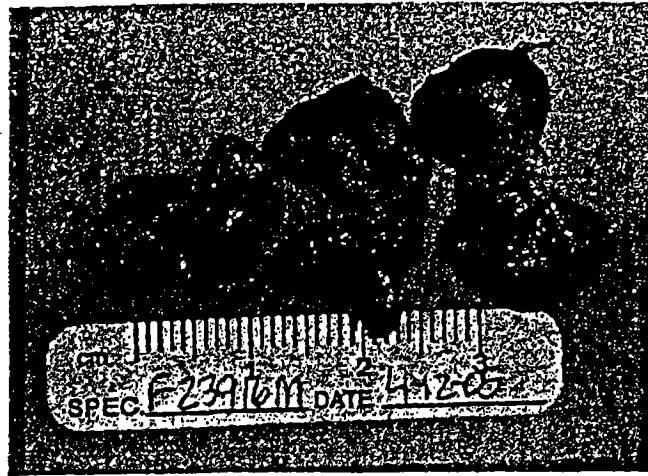


图33C

组 2, 1 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 7002, 第15天



图33D

组 3, 5 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 6005, 第15天

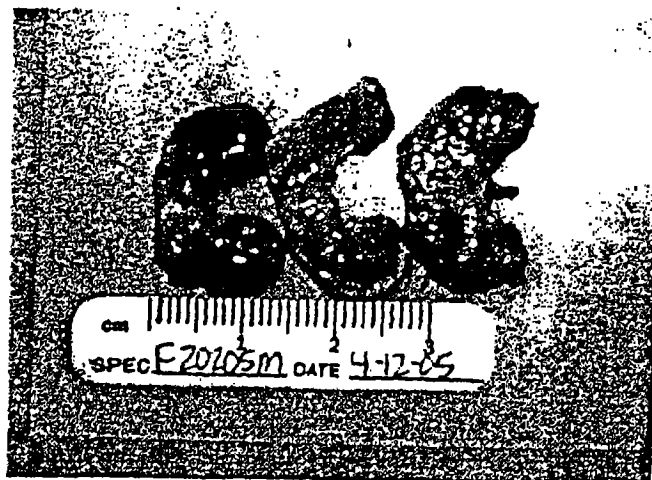


图33E

组 3, 5 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 8002, 第15天

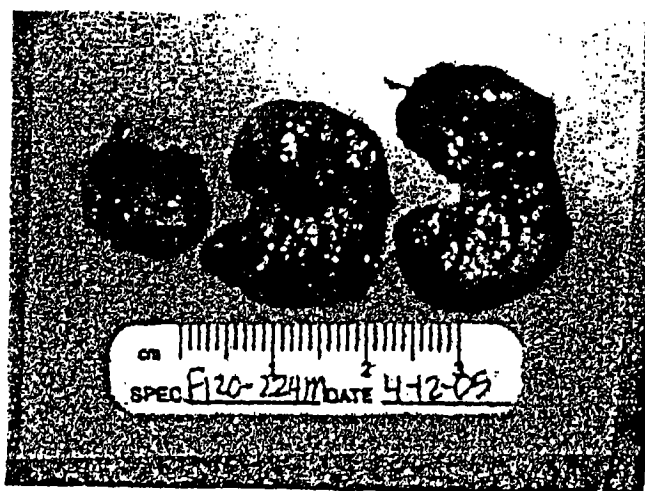


图33F

组 4, 25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 6007, 第15天

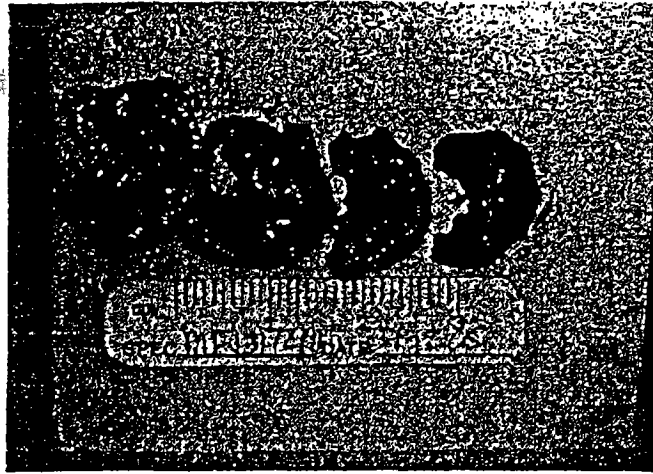


图33G

组 4, 25 $\mu\text{g/g}$ 前列腺, 动物 8003, 第15天

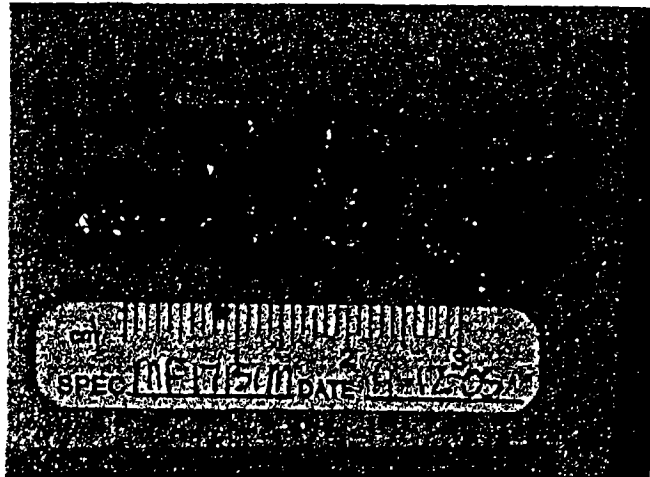


图33H

1 AAGCTTGCAT GCCTGCAGAA GAAGGAGATA TACATATGCA AAAAATAAAA CTAAGTGGCT TGTCATTAAT
71 CATATCCGGC CTGCTGATGG CACAGGCGCA AGCGGCAGAG CCCGTCTATC CAGACCAGCT TCGCTTGT
141 TCATTGGGCC AAGGGGTCTG TGGCACAAG TATCGCCCCG TCAATCGAGA AGAAGCCCAA AGCGTTAAAA
211 GCAATATTGT CGGCATGATG GGGCAATGGC AAATAAGCGG GCTGGCCAAC GGCTGGGTCA TTATGGGGCC
281 GGGTTATAAC GGTGAAATAA AACCAGGGAC AGCGTCCAAT ACCTGGTGT ATCCGACCAA TCCTGTTACC
351 GGTGAAATAC CGACACTGTC TGCCCTGGAT ATTCCAGATG GTGACGAAAGT CGATGTGCAG TGGCGACTGG
421 TACATGACAG TGCGAATTTC ATCAAACCAA CCAGCTATCT GGGCCATTAC CTCGGTTATG CCTGGGTGGG
491 CGGCAATCAC AGCCAATATG TCGGCGAAGA CATGGATGTG ACCCGTQATG GCGACGGGTG GGTGATCCGT
561 GGCAACAATG ACGGCGGCTG TGACGGCTAT CGTGTGGTG ACAAGACGGC CATCAAGGTC AGCAACTTCG
631 CCTATAACCT AGATCCCGAC AGCTTCAAGC ATGGCGATGT CACCCAGTCC GACCGCCAGC TGGTCAAGAC
701 TGTGGTGGGC TGGGCGGTCA ACGACAGCGA CACCCOCCAA TCCGGCTATG ACGTCACCCT GCGCTACGAC
771 ACAGCCACCA ACTGGTCCAA GACCAACACC TATGGCCTGA GCGAGAAGGT GACCACCAAG AACAAGTTCA
841 AGTGGCCACT GGTGGGGGAA ACCGAACCTT CCATCGAGAT TGCTGCCAAT CAGTCCTGGG CGTCCAGAA
911 CGGGGGCTCG ACCACCACCT CCTGTCTCA GTCCGTGCGA CCGACTGTGC CGGCCCGCTC CAAGATCCCG
981 GTGAAGATAG AGCTCTACAA GCGCGACATC TCCTATCCCT ATGAGTTCAA GGCGGATGTC AGCTATGACC
1051 TGACCCTGAG CGGCTTCTG CGCTGGGGCG GCAACGCTG GTATACCCAC CCGGACAAACC GTCCGAAC
1121 GAACCAACCC TTCGTATAG GTCCGTACAA GGACAAGGCG AGCAGCATTG GGTACCAGTG GGACAAGCGT
1191 TACATCCCGG GTGAAGTGAA GTGGTGGGAC TGGAAGTGA CCATACAGCA GAACGGTCTG TCTACCATGC
1261 AGAACAACCT GGCCAGAGTG CTGCGCCCGG TGCGGGCGGG GATCACCAGT GATTTCAGTG CCGAGAGCCA
1331 GTTTGCCGGC AACATAGAGA TCGGTGCTCC CGTGCCGCTC GCGGCTGACA GCCATTCCTC CAAGCTGCAG
1401 AGTGTGGACG GCGCTGGTCA AGGCTGAGG CTGGAGATCC CGCTCGATGC GCAAGAGCTC TCCGGGCTTG
1471 GCTTCAACAA CGTCAGCCTC AGCGTGACCC CTGCTGCCAA TCAACATCAT CATCATCATC ATTAACGGCA
1541 GCGCTAACAA CATCATCATC ATCATCATT ACGGCAGCGC GTTGTAGTGA TGGAAACGGG CCTCTGGCCC
1611 GGTTTTGTG TCACTGGTC GGGCTTGTG AAGGCTTGT CTTTCCATT CCCTACTTAT ACTGGCGCCA
1681 TCTTGTGGA GTGCCAACCG TCGAACGACG CGAGGCTGAG ACCGTAAAT CCGGATCCGT GGAACCTGAT
1751 CCCCCGGAAT TC

图34

1 AEPVYPDQLRLFSLGQGVCGDKYRPVNREEAQSVKSNIVGMMGQWQISGLANGWVIMGPG
61 YNGEIKPGTASNTWCYPTNPVTGEIPTLSALDIPDGDEVQWRLVHDSANFIKPTSyla
121 HYLGYAWVGGNHSQYVGEDMDVTRDGDGWVIRGNNDGGCDGYRCGDKTAIKVSNFAYNLD
181 PDSFKHGDVTQSDRQLVKTVVGWAVNDSPTQSGYDVTLRyDTATNWSKTNTYGLSEKVT
241 TKNKFKWPLVGETELSIEIAANQSWASQNGGSTTTSLSQSVRPTVPARSKIPVKIELYKA
301 DISYPYEFKADVSyDLTLSGFLRWGGNAWYTHPDNRPNWNHTFVIGPYKDKASSIRYQWD
361 KRYIPGEVKWWDWNWTIQQGLSTMQNNLARVLRPVragITGDFSaesQFAGNIEIGAPV
421 PLAADSHSSKLQSVdGAGQGLRLEIPLdAQELSGLGfNNVSLSVTPAANQHhhhhh

图35

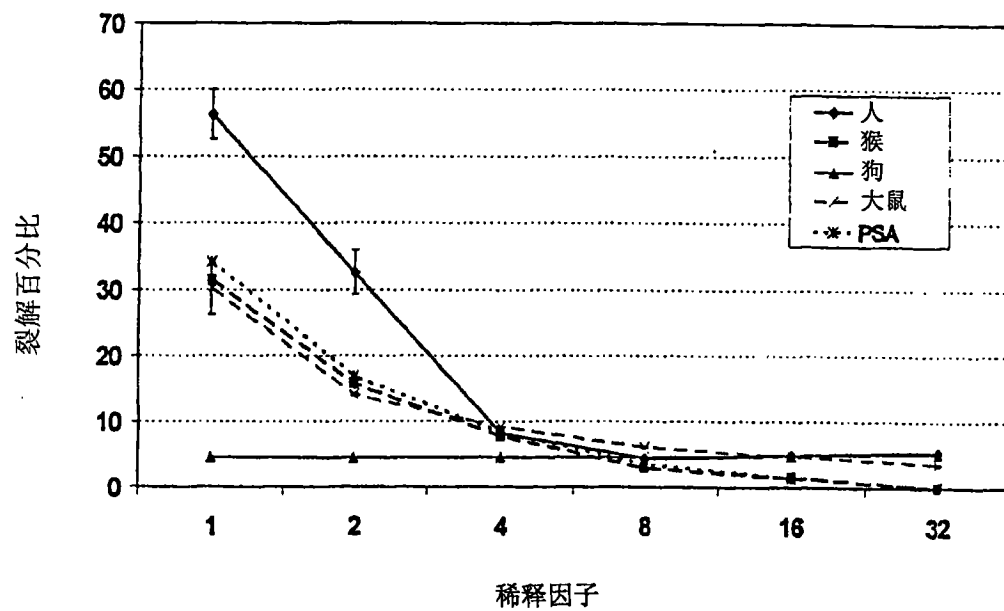


图36

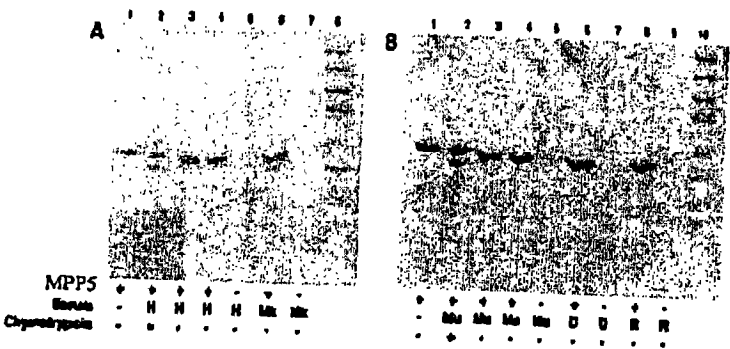


图37

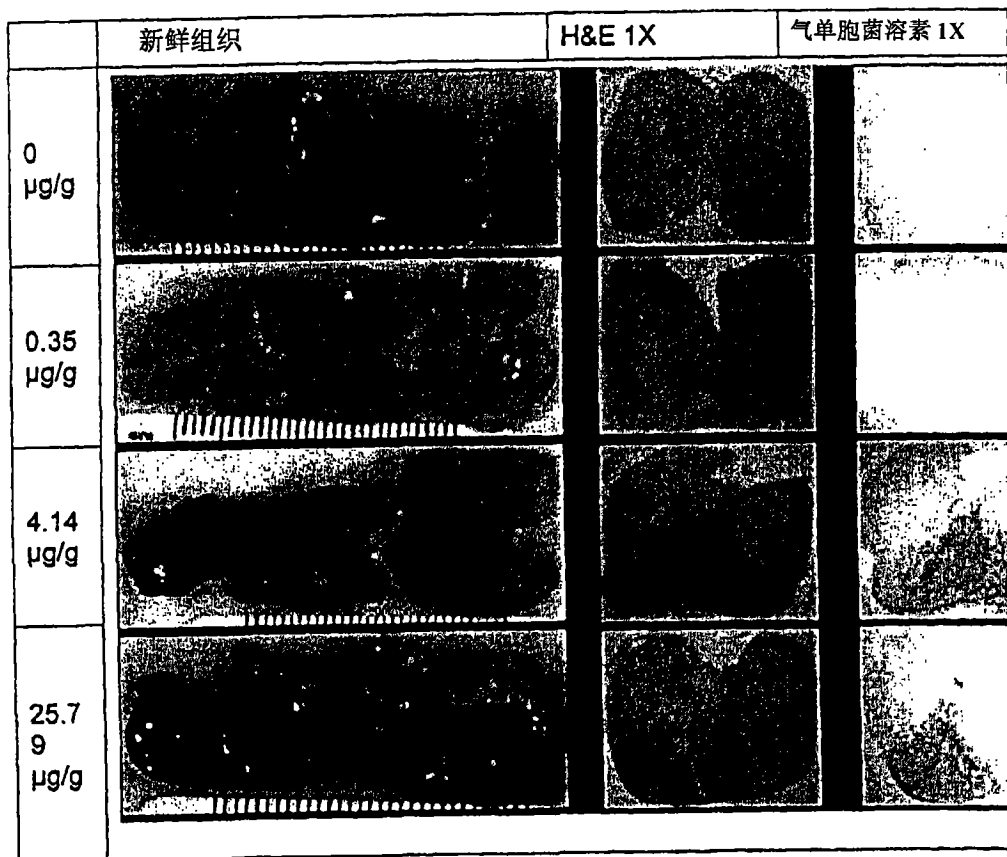


图38

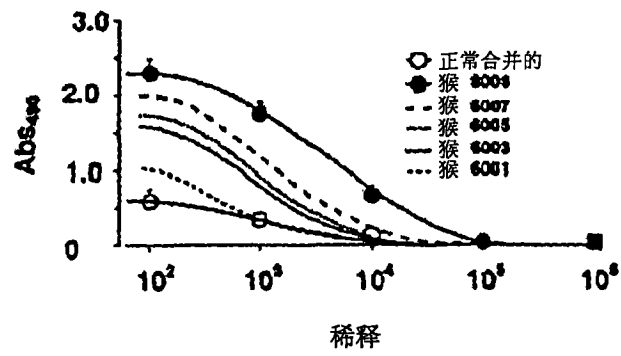


图39

```

<210> 73
<211> 1542
<212> DNA
<213> Clostridium septicum

<400> 73
tggttaataat atgttaatat ttgtgataaca tttattatat aataaattat ttatttttaa 60
attaaagggga gggatattta tgtcaaaaaa atcttttgct aaaaaagtaa ttgtacatc 120
tatgattgca attcagtggt cggcagtagt accacatgta caagcttatg cacttacaaa 180
tcttgaagag gggggatatg caaatcataa taatgcttct tcaattaaaa ttttggata 240
tgaagacaat gaagatttaa aagctaaaat tattcaagat ccagagttaa taagaaattg 300
ggcaaatgta gctcattcat taggatttgg atggtgctgt ggaacggcta atccaaacgt 360
tggacaagggt tttgaattta aaagagaagt tggggcaggt ggaaaagtat cttattttatt 420
atctgctaga tacaatccaa atgatcctta tgcaagtgga tatcgtgcaa aagatagact 480
ttctatgaaa atatcaaagt ttagatttgt tattgataat gattctataa aattaggtag 540
acctaaagtg aaaaaattag cacctttaaa ctctgctagt tttgatttaa taaatgaaag 600
taaaactgag tctaaattat caaaaacatt taattataca acttctaaaa cagtttctaa 660
aacagataac tttaaatttg gagaaaaaat aggagtaaaa acatcattta aagtaggtct 720
tgaagctata gctgacagta aagttgagac aagctttgaa tttaatgcag aacaagggtg 780
gtcaaataca aatagtacta ctgaaactaa acaagaaagt actacatata ctgcaacagt 840
ttctccacaa actaaaaaga gattattcct agatgtgtta ggatcacaaa ttgatattcc 900
ttatgaagga aaaatatata tggaatacga catagaatta atgggatttt taagatatac 960
aggaaatgct cgtgaagatc atactgaaga tagaccaaca gttaaactta aatttggtta 1020
aaacgggatg agtgcagagg aacatcttaa agattttatat agtcataaga atattaatgg 1080
atattcagaa tgggatttga aatgggtaga tgagaaattt ggttatttat ttaaaaattc 1140
atacgtatgct cttactagta gaaaattagg aggaataata aaaggctcat ttactaacat 1200
taatggaaca aaaatagtaa ttagagaagg taaagaaatt ccacttcctg ataagaagag 1260
aagaggaaaa cgttcagtag attctttaga tgctagatta caaaatgaag gtattagaat 1320
agaaaatatt gaaacacaag atgttccagg atttagacta aatagcataa catacaatga 1380
taaaaaattg atattaatta ataatatata attataattt attaaaatat gcttctctat 1440
actttatatt aatattttaa gtataaaaac taacaaaatc tcacttagta ggtagaattg 1500
tataaaaaca aatctaccta ctattttttt attatttagt cg 1542

```

图40

```

<210> 74
<211> 443
<212> PRT
<213> Clostridium septicum

<400> 74
Met Ser Lys Lys Ser Phe Ala Lys Lys Val Ile Cys Thr Ser Met Ile
1      5      10      15
Ala Ile Gln Cys Ala Ala Val Val Pro His Val Gln Ala Tyr Ala Leu
20      25      30
Thr Asn Leu Glu Glu Gly Gly Tyr Ala Asn His Asn Asn Ala Ser Ser
35      40      45
Ile Lys Ile Phe Gly Tyr Glu Asp Asn Glu Asp Leu Lys Ala Lys Ile
50      55      60
Ile Gln Asp Pro Glu Phe Ile Arg Asn Trp Ala Asn Val Ala His Ser
65      70      75      80
Leu Gly Phe Gly Trp Cys Gly Gly Thr Ala Asn Pro Asn Val Gly Gln
85      90      95
Gly Phe Glu Phe Lys Ser Arg Glu Val Gly Ala Gly Gly Lys Val Ser Tyr
100     105     110
Leu Leu Ser Ala Arg Tyr Asn Pro Asn Asp Pro Tyr Ala Ser Gly Tyr
115     120     125
Arg Ala Lys Asp Arg Leu Ser Met Lys Ile Ser Asn Val Arg Phe Val
130     135     140
Ile Asp Asn Asp Ser Ile Lys Leu Gly Thr Pro Lys Val Lys Lys Leu
145     150     155     160
Ala Pro Leu Asn Ser Ala Ser Phe Asp Leu Ile Asn Glu Ser Lys Thr
165     170     175
Glu Ser Lys Leu Ser Lys Thr Phe Asn Tyr Thr Thr Ser Lys Thr Val
180     185     190
Ser Lys Thr Asp Asn Phe Lys Phe Gly Glu Lys Ile Gly Val Lys Thr
195     200     205
Ser Phe Lys Val Gly Leu Glu Ala Ile Ala Asp Ser Lys Val Glu Thr
210     215     220
Ser Phe Glu Phe Asn Ala Glu Gln Gly Trp Ser Asn Thr Asn Ser Thr
225     230     235     240
Thr Glu Thr Lys Gln Glu Ser Thr Thr Thr Thr Ala Thr Val Ser Pro
245     250     255
Gln Thr Lys Lys Arg Leu Phe Leu Asp Val Leu Gly Ser Gln Ile Asp
260     265     270
Ile Pro Tyr Glu Gly Lys Ile Tyr Met Glu Tyr Asp Ile Glu Leu Met
275     280     285
Gly Phe Leu Arg Tyr Thr Gly Asn Ala Arg Glu Asp His Thr Glu Asp
290     295     300
Arg Pro Thr Val Lys Leu Lys Phe Gly Lys Asn Gly Met Ser Ala Glu
305     310     315     320
Glu His Leu Lys Asp Leu Tyr Ser His Lys Asn Ile Asn Gly Tyr Ser
325     330     335
Glu Trp Asp Trp Lys Trp Val Asp Glu Lys Phe Gly Tyr Leu Phe Lys
340     345     350
Asn Ser Tyr Asp Ala Leu Thr Ser Arg Lys Leu Gly Gly Ile Ile Lys
355     360     365
Gly Ser Phe Thr Asn Ile Asn Gly Thr Lys Ile Val Ile Arg Glu Gly
370     375     380
Lys Glu Ile Pro Leu Pro Asp Lys Lys Arg Arg Gly Lys Arg Ser Val
385     390     395     400
Asp Ser Leu Asp Ala Arg Leu Gln Asn Glu Gly Ile Arg Ile Glu Asn
405     410     415
Ile Glu Thr Gln Asp Val Pro Gly Phe Arg Leu Asn Ser Ile Thr Tyr
420     425     430
Asn Asp Lys Lys Leu Ile Leu Ile Asn Asn Ile
435     440

```

图41