



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107690437 A

(43)申请公布日 2018.02.13

(21)申请号 201680023485.3

(22)申请日 2016.03.23

(30)优先权数据

10-2015-0040164 2015.03.23 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2016/002942 2016.03.23

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/153276 KO 2016.09.29

(71)申请人 亚洲大学校产学协力团

地址 韩国京畿道

(72)发明人 金容星 金艺珍

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桢

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书29页

序列表3页 附图19页

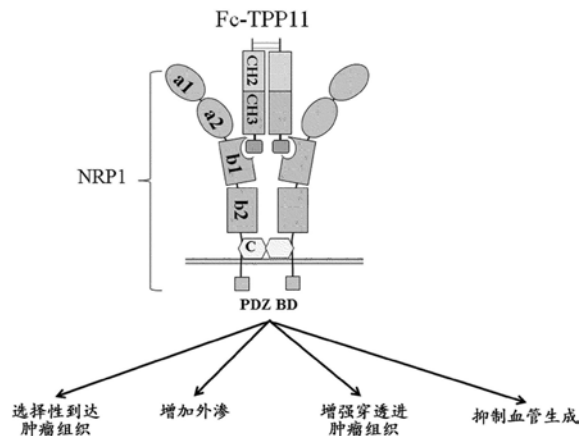
(54)发明名称

神经纤毛蛋白-1特异性结合的肽、与所述肽融合的融合蛋白以及它们的用途

(57)摘要

本发明涉及仅特异性结合神经纤毛蛋白1(NRP1)而不结合神经纤毛蛋白2(NRP2)的肽;与所述肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体;以及用于治疗或预防癌症或血管生成相关疾病的包含所述肽的药物组合物,和用于诊断癌症或血管生成相关疾病的包含所述肽的组合物。此外,本发明提供用于编码特异性结合NRP1的肽的多核苷酸。此外,本发明涉及用于筛选特异性结合NRP1的肽的方法。与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体重链恒定区具有特异性结合NRP1的特征,并且因此当在体内施用时,选择性地积聚在肿瘤组织上,加宽肿瘤血管内皮细胞之间的细胞间隙,促进外渗,并且增加肿瘤组织穿透。此外,所述与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体重链恒定区抑制血管内皮生长因子(VEGF)结合神经纤毛蛋白1,并且因此具有抑制肿瘤组织中血管生成的能力。因此,

所述与本发明的肽融合的抗体重链恒定区显示体内肿瘤抑制活性。



1. 一种特异性结合神经纤毛蛋白-1而不结合神经纤毛蛋白-2的肽,其中所述肽包含5至50个氨基酸,并且所述肽的C末端由X1-X2-X3-X4表示,其中X1是精氨酸、赖氨酸或任何氨基酸残基,X2和X3各自独立地是任何氨基酸残基,以及X4是精氨酸或赖氨酸。

2. 权利要求1的肽,其中从所述肽的N末端构成X3的氨基酸残基选自下组:组氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、精氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、丙氨酸和赖氨酸。

3. 权利要求1的肽,其中所述肽具有肿瘤组织穿透活性和/或抗血管生成活性。

4. 权利要求1的肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:3的任一个的氨基酸序列。

5. 权利要求1的肽,其中所述肽进一步包含接头肽。

6. 权利要求5的肽,其中所述接头肽由1至50个氨基酸组成。

7. 权利要求5的肽,其中所述接头肽包含(GGGGS)_n的氨基酸序列,其中n各自独立地是1至20的整数。

8. 权利要求7的肽,其中所述肽包含选自SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

9. 一种融合蛋白,其包含与其融合的权利要求1至8中任一项的肽。

10. 权利要求9的融合蛋白,其中所述蛋白选自下组:抗体、抗体片段、免疫球蛋白、肽、酶、生长因子、细胞因子、转录因子、毒素、抗原肽、激素、载体蛋白、运动功能蛋白、受体、信号传导蛋白、储存蛋白、膜蛋白、跨膜蛋白、内部蛋白、外部蛋白、分泌蛋白、病毒蛋白、糖蛋白、切割蛋白、蛋白质复合物和化学修饰的蛋白。

11. 权利要求9的融合蛋白,其中所述肽与神经纤毛蛋白-1二价或多价结合。

12. 权利要求9的融合蛋白,其中所述融合通过接头肽介导。

13. 权利要求10的融合蛋白,其中各抗体片段是重链恒定区片段(Fc)、重链恒定区结构域片段(CH1、CH2或CH3)、抗原结合片段(Fab)、单链可变区片段(scFv)、重链可变区片段(VH)、轻链恒定区片段(CL)或轻链可变区片段(VL)。

14. 权利要求10的融合蛋白,其中在所述蛋白是抗体的情况下,肽与抗体的重链恒定区(Fc)的C末端融合。

15. 权利要求14的融合蛋白,其中所述融合通过接头肽介导。

16. 权利要求14的融合蛋白,其中所述抗体是选自下组的任一种:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

17. 一种纳米颗粒,其包含与其融合的权利要求1至8中任一项的肽。

18. 一种脂质体,其包含与其融合的权利要求1至8中任一项的肽。

19. 一种小分子药物,其包含与其融合的权利要求1至8中任一项的肽。

20. 一种多核苷酸,其编码权利要求1至8中任一项的肽。

21. 一种用于治疗或预防癌症或血管生成相关疾病的药物组合物,其包含权利要求1至8中任一项的肽,包含与其融合的肽的融合蛋白,包含与其融合的肽的纳米颗粒,包含与其融合的肽的脂质体,或包含与其融合的肽的小分子药物。

22. 一种用于诊断癌症或血管生成相关疾病的组合物,其中所述组合物包含权利要求1至8中任一项的肽,包含与其融合的肽的融合蛋白,包含与其融合的肽的纳米颗粒,包含与其融合的肽的脂质体,或包含与其融合的肽的小分子药物。

23. 一种筛选权利要求1的肽的方法,其包括以下步骤:

(1) 设计能够与NRP1的b1结构域的VEGF结合位点(或精氨酸结合口袋)相互作用的肽文库;

(2) 使步骤(1)的肽文库与抗体重链恒定区Fc的C末端融合;

(3) 在大量作为竞争者NRP2-b1b2的存在下,使步骤(2)的Fc融合文库与NRP1-b1b2结合;以及

(4) 基于步骤(3)中结合的NRP1-b1b2与分离的Fc融合肽文库之间的结合亲和力,筛选所需Fc融合肽。

神经纤毛蛋白-1特异性结合的肽、与所述肽融合的融合蛋白 以及它们的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性结合神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1) (NRP1) 的肿瘤穿透肽(tumor-penetrating peptide) (TPP)。具体地,本发明的肽是以高亲和力仅特异性结合NRP1的肽,其从根据结合神经纤毛蛋白-1(NRP1)和神经纤毛蛋白-2(NRP2)两者的肽构建的文库中筛选。

[0002] 此外,本发明涉及融合蛋白、融合抗体、小分子药物、纳米颗粒或脂质体,其与上述特异性结合NRP1的肽融合。

[0003] 此外,本发明涉及编码上述特异性结合NRP1的肽的多核苷酸。

[0004] 此外,本发明涉及用于治疗或预防癌症或血管生成相关疾病的药物组合物,其包含:上述特异性结合NRP1的肽;或者融合蛋白、融合抗体、小分子药物、纳米颗粒或脂质体,其与上述特异性结合NRP1的肽融合。

[0005] 此外,本发明涉及用于诊断癌症或血管生成疾病的组合物,其包含:上述特异性结合NRP1的肽;或者融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体,其与上述特异性结合NRP1的肽融合。

[0006] 此外,本发明涉及用于筛选特异性结合NRP1的肽的方法,其包括构建酵母表面展示的免疫球蛋白Fc融合肽文库(peptide library)。

背景技术

[0007] 抗体是以高特异性和高亲和力结合抗原以中和抗原的蛋白。此外,抗体具有抗体依赖性细胞毒性和补体依赖性细胞毒性,它们是其重链恒定区的功能,并且通过结合FcRn(新生儿Fc受体)而具有长血清半衰期。由于以高特异性和高亲和力结合抗原的特性,可减少不良的副作用,并且由于抗体依赖性细胞毒性和补体依赖性细胞毒性,抗体可诱导导致疾病的细胞凋亡,并且抗体的长血清半衰期能够实现抗体的长效作用。由于抗体的这种特性,已经积极地进行研究以将抗体开发为治疗蛋白。

[0008] 迄今开发的癌症治疗性抗体被分为两种类型:治疗实体瘤的抗体;以及治疗血癌(白血病/淋巴瘤)的抗体。根据每种类型的抗体的单次施用,两种抗体显示不同响应率(response rate)。当提及几种市售抗体的统计时,在治疗血癌的抗体单次施用的情况下,响应率达到30至51%,而在治疗实体瘤的抗体单次施用的情况下,响应率为8至15%,这是相对较低的。这是因为治疗血癌的抗体靶向血液中的癌细胞,而治疗实体瘤的抗体应该经过以下过程以显示其治疗效果:1)在全身静脉注射或皮下注射(肿瘤归巢步骤)后,通过血管到达实体瘤组织中的肿瘤血管;2)从肿瘤血管向肿瘤组织流出(外渗(extravasation)步骤);3)甚至在肿瘤组织中也穿透入无血管组织(肿瘤组织穿透(penetration)步骤);以及4)结合在肿瘤细胞中表达的抗原并作用于该抗原(靶向抗原结合和效应子功能步骤)(Scott AM et al.2012)。在这样一系列的过程中,存在干扰肿瘤组织积聚(tumor tissue accumulation)和穿透至实体瘤治疗性抗体的肿瘤组织的各种因素,这导致抗体到达肿瘤

组织中的肿瘤细胞。因此,积聚至人体肿瘤组织的抗体的量非常小(每克肿瘤组织0.01至0.0001%的注射剂量),并且因此抗体显示低响应率(Thurber et al.2008)。因此,开发能够使抗体选择性地积聚在肿瘤组织中并且具有高穿透肿瘤组织的能力的抗体技术,使得可以增加实体瘤治疗性抗体的治疗效果,并且因此非常重要。

[0009] 抗体在穿透组织中存在缺陷有两个主要原因:1)抗体的内在特性(尺寸(~150kDa),抗原结合屏障等)(Thurber and Dane Wittrup,2012),以及2)肿瘤组织的微结构特性/生理特性(例如,不完全和异常的血管生成、极低的淋巴腺形成、高细胞密度、高细胞外密度等),这不同于正常组织的微结构特性/生理特性(Jain and Stylianopoulos, 2010)。因此,通过使用各种方法已经做出努力以增加抗体的肿瘤组织穿透性,其包括调节抗体的尺寸和抗体的抗原结合特异性的抗体工程技术,或组合施用抗体与促进抗体的肿瘤组织穿透的分子(即,促进剂)的方法。

[0010] 血液中的抗体通过扩散或传送(convection)难以递送至肿瘤组织,因为抗体是由12个结构域组成的150-kDa大分子(Baker et al.2008)。为了克服此困难,已经试图单独施用具有减小尺寸的抗体片段,诸如抗原结合片段(Fab)(50kDa)、单链可变区片段(scFv)(30kDa)和重链可变结构域(VH)(14kDa)。然而,抗体片段没有Fc片段并且尺寸小,并且因此,当其在体内施用,其通过肾脏大量释放减小其半衰期,这表明抗体的功效没有显著改善(Behr et al.1998)。

[0011] 为什么在组织中没有大量分布的抗体的另一个原因是抗体的抗原结合能力。治疗实体瘤的抗体在肿瘤相关抗原上或肿瘤中过表达,并且对肿瘤生长重要的靶标具有高亲和力。即使当抗体可到达存在特定抗原的组织时,在由具有大量抗原表达的细胞组成的肿瘤组织中,抗体由于其高亲和力,当与肿瘤组织表面的细胞中表达的抗原结合时,停留在肿瘤组织表面(Lee and Tannock,2010)。在与抗原结合后,抗体被内吞,即随抗原一同穿透进细胞并且在细胞中降解。换言之,抗体可位于肿瘤组织表面,但是在结合过表达的肿瘤抗原后被降解,并且因此没有有效地穿透肿瘤组织。因此,抗体不能到达远离肿瘤血管组织的肿瘤细胞抗原,并且因此抗体的抗肿瘤活性可能降低,并且可能诱导抗体抗性和肿瘤复发。为了克服此缺点,已经进行研究以调节抗体亲和力或增加抗体半衰期(Dennis et al.2007)。

[0012] 肿瘤组织的生理特性,其干扰抗体在肿瘤组织中的穿透和分布,主要可分为四种情况:内皮屏障(endothelial barrier);高肿瘤间质流体压力(high tumor interstitial fluid pressure);基质障碍(stromal impediment)和上皮屏障(epithelial barrier)。

[0013] 对于内皮屏障,肿瘤过表达并分泌促进位于血管周围的血管内皮细胞生长的促血管生成因子,以便由于其快速的生长速度而接受大量营养物。因此,不均匀地产生大量新血管以降低总体血流速度。为了克服此缺点,已经提出增加外渗以使治疗剂能够从血管流出使其被分布到组织中的方法。此外,已经报道了这样的案例,其中TNF- α 和IL-2(其为与外渗相关的促炎性细胞因子)、促进外渗的促进剂化学药物和治疗剂共同施用以促进药物到达肿瘤组织(Marcucci et al.2013)。然而,这些尝试难以商业化和临床实验化,因为其需要生产两种物质,诸如抗体和外渗促进剂。

[0014] 高肿瘤间质流体压力是由使药物从血管传送到组织的压力差小或组织的流体压力高于血液的流体压力导致的。不同于在正常组织中,高肿瘤间质流体压力主要是由于不存在淋巴管的肿瘤组织中间质流体压的积聚而引起的,并且也有助于异常血管生成。为了

克服此问题,已经提出了抑制促进血管内皮细胞生长的因子,特别是血管内皮细胞生长因子-A (VEGF165A) 的活性,以抑制血管生成使血管正常化的方法,或增加血管流体压力的方法。关于增加血管的流体压力的方法,已经报道了这样的情况,其中血浆蛋白白蛋白与抗体组合施用以增加血管的渗透压,从而增强抗体向肿瘤组织递送 (Hofmann et al.2009)。

[0015] 基质障碍是当从微血管流出后,抗体在被传送到组织时遇到的细胞外基质屏障。基质障碍主要由胶原蛋白和透明质酸组成。细胞外基质极大地影响肿瘤的形状。因此,药物分布良好的区域和药物分布不良的区域之间存在很大差异,并且因此药物分布变得不均匀。此外,随着细胞外基质的表达水平增加,肿瘤间质流体压力由于高细胞密度与实体瘤应激 (solid tumor stress) (实体应激) 而增加。为了克服这个限制,已经有诱导肿瘤组织细胞凋亡以减少肿瘤组织中的细胞密度的方法。此外,已经报道了通过使用降解肿瘤组织胶原蛋白的胶原酶处理来降低实体应激,从而与对照组相比增加了约两倍的药物递送的实例 (Eikenes et al.2004)。

[0016] 在上皮屏障中,肿瘤组织中间质上皮细胞的细胞内粘附因子密集地填充细胞间隙,并且因此它们防止治疗剂在细胞之间扩散和传送。E-钙粘蛋白是熟知的细胞间粘附的主要因子。由于在病毒 (腺病毒-3) 中发现了减少E-钙粘蛋白的物质,所以已经报道这样的情况,其中,在构成病毒的蛋白质中,仅具有还原细胞E-钙粘蛋白活性的部分 (JO-1) 与抗体共同施用,从而增加抗体的抗癌作用 (Beyer et al.2011)。

[0017] 此外,已经提出了方法,其中结合在肿瘤相关内皮细胞和肿瘤细胞中过表达的神经纤毛蛋白 (NRP) 的肽用于增强抗体穿透到肿瘤组织中。使用结合神经纤毛蛋白的肽的方法之一是共同施用iRGD肽与抗体 (Sugahara et al.2010)。然而,在共同施用肽的方法的情况下,向患者实际施用的肽的量和频率由于可归因于肽的小分子尺寸的药物动力学而应该非常大。此外,该方法的工业可行性低,因为由于不可避免的共同施用过程造成治疗剂和肿瘤穿透肽分开生产。在克服此限制的新技术中,已经有一个实例,其中结合神经纤毛蛋白的A22p肽与单克隆抗体的重链C末端融合,以便维持抗体的长半衰期,并且增强抗体的肿瘤组织穿透 (Shin et al.2014;Korean Patent Application No.10-2014-0061751;and PCT Patent Application No.PCT/KR2014/004571)。

[0018] 神经纤毛蛋白是一种跨膜糖蛋白,其被分为两类:神经纤毛蛋白-1 (NRP1) 和神经纤毛蛋白-2 (NRP2) (Kolodkin et al.1997)。神经纤毛蛋白-1和-2分别由923和931个氨基酸组成,并且显示出约44%的氨基酸序列同源性,并共享几个结构方面和生物活性。神经纤毛蛋白-1和-2通常由细胞外a1、a2、b1、b2和MAM结构域以及细胞内PDZ结合结构域组成 (Appleton et al.2007)。神经纤毛蛋白在正常细胞中表达非常弱,但在大多数肿瘤相关内皮细胞、实体瘤细胞和血液肿瘤细胞中过表达 (Grandclement,C.and C.Borg 2011)。神经纤毛蛋白通过结合VEGF家族配体用作VEGF受体 (VEGFR) 的共受体。具体地,NRP1用作VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3的共受体以结合各种VEGF配体,从而有助于血管生成、细胞迁移与粘附和侵袭。另一方面,NRP2用作VEGFR2和VEGFR3的共受体,从而有助于淋巴管生成和细胞粘附。此外,神经纤毛蛋白1和2用作丛状蛋白家族受体的共受体以结合分泌的第3类导向蛋白 (semaphorin) 配体 (Sema3A、Sema3B、Sema3C、Sema3D、Sema3E、Sema3F、Sema3G)。由于神经纤毛蛋白在功能性细胞中没有结构域,所以即使配体与其结合,其本身也不具有活性。已知神经纤毛蛋白信号转导通过作为共受体的VEGF受体或通过丛状蛋白共受体发生。Sema3与

神经纤毛蛋白和丛状蛋白受体以2:2:2的比例结合并起作用。然而,许多研究结果显示,单独的神经纤毛蛋白可进行信号转导,而不与VEGF受体或丛状蛋白共受体相互作用。然而,这种信号转导的确切分子机制尚不清楚。

[0019] 已经报道了这样的情况,其中即使仅靶向神经纤毛蛋白时,神经纤毛蛋白和共受体的活性也被抑制。例如,已经报道了抗神经纤毛蛋白-1抗体仅与已知结合VEGFR2和神经纤毛蛋白-1的VEGF-A竞争性地结合神经纤毛蛋白-1,并且起抑制血管生成、细胞存活、迁移与粘附和侵袭的作用,这是VEGFR2的作用(Pan Q et al.2007)。已经报道了抗神经纤毛蛋白-2抗体与已知结合VEGFR3和神经纤毛蛋白-2的VEGF-C竞争性地结合神经纤毛蛋白-2,并且起抑制淋巴管生成和细胞粘附的作用,这是VEGFR3的作用(Caunt M et al.2008)。

[0020] 与神经纤毛蛋白1和2结合的各VEGF配体家族和Sema3配体的C末端区域与通常存在于神经纤毛蛋白1和2的b1结构域中的VEGF结合位点(所谓的精氨酸结合口袋)结合(MW Parker et al.2012)。在此,通过R/K-x-x-R/K(R=精氨酸、K=赖氨酸和x=任何氨基酸)的基序发生与精氨酸结合口袋的结合,其通常存在于神经纤毛蛋白结合配体的C-末端区域。当用偏离基序的氨基酸序列诱导突变时,配体对神经纤毛蛋白具有降低的结合亲和力,或不结合神经纤毛蛋白,从而失去其生物活性。具体地,C-末端区域中的阳离子精氨酸(Arg)或赖氨酸(Lys)对于结合是必需的,并且因此当其被另一个氨基酸残基取代时,配体失去其对神经毡蛋白的结合亲和力,并失去其生物活性。因此,这种神经纤毛蛋白结合配体的C-末端区域中R/K-x-x-R/K基序的必要性称为“C末端规则(C-end rule)”(CendR)(Teesalu et al.2009)。含有C-末端规则序列的蛋白质或肽能够通过C-末端精氨酸(Arg)或赖氨酸(Lys)残基与神经纤毛蛋白结合(Zanuy et al,2013)。

[0021] VEGF配体和Sema3配体的C-末端区域通常具有R/K-x-x-R/K基序,并且因此大多数配体具有结合神经纤毛蛋白1和2两者的特性,而不是选择性地结合神经纤毛蛋白1和2中的任一种。

[0022] 除了结合神经纤毛蛋白1和2的配体之外,已经选择或设计和报道了许多与神经纤毛蛋白结合的肽。这些肽都具有R/K-x-x-R/K基序,并且因此似乎与神经纤毛蛋白1和2的b1结构域中的精氨酸结合口袋结合。此外,结合神经纤毛蛋白1和2以增加共同施用药物的肿瘤组织穿透的iRGD肽(Sugahara et al.2010),以及与抗体的重链末端融合以增加抗体的肿瘤组织穿透的A22p肽(Shin et al.2014)同样具有遵循CendR规则的氨基酸序列。

[0023] 关于结合神经纤毛蛋白的肽,尚未报道特异性结合神经纤毛蛋白1和2中的任一种的肽,并且这些肽具有CendR序列基序,并且因此与神经纤毛蛋白1和2两者的精氨酸结合口袋结合。

[0024] 如上所述,神经纤毛蛋白-1仅在新形成的血管中过表达,并在血管生成中起重要作用,并且神经纤毛蛋白-2在淋巴管中表达,并有助于淋巴管生成。因此,以高亲和力特异性结合神经纤毛蛋白-1或神经纤毛蛋白-2的肽可能具有特异性调节各神经纤毛蛋白的生物活性的能力,但尚未报道。此外,神经纤毛蛋白1和2被激活为同二聚体(homodimer)或异二聚体(heterodimer),并且已经开发了常规的肽作为具有非常弱的调节生物活性的能力的单体肽。因此,优选结合作为同二聚体的神经纤毛蛋白-1以调节神经纤毛蛋白-1的生物活性的肽。此外,神经纤毛蛋白-1在内皮细胞中过表达,并被VEGF配体刺激,并且因此在血管生成中起重要作用。因此,以高特异性和高亲和力与VEGF配体竞争性地仅结合神经纤毛

蛋白-1的肽可具有在肿瘤组织中归巢和积聚并抑制血管生成的能力。此外,神经纤毛蛋白-1在肿瘤组织血管和肿瘤细胞(上皮细胞)中过表达,并被VEGF配体刺激,并且因此在肿瘤生长和血管生成中起重要作用。因此,与VEGF配体竞争性地特异性结合神经纤毛蛋白-1的肽可能具有抑制肿瘤生长的活性。此外,当神经纤毛蛋白-1被激活时,其具有降低内皮屏障VE-钙粘蛋白和上皮屏障E-钙粘蛋白的活性。因此,特异性结合神经纤毛蛋白以降低血管内皮细胞中VE-钙粘蛋白和肿瘤细胞中E-钙粘蛋白的水平水平的肽可增加与肽融合或共同施用的蛋白质、抗体、纳米颗粒或小分子药物的肿瘤外渗和肿瘤组织穿透,并且还可增加肿瘤组织穿透。

[0025] 因此,本发明的发明人试图克服与神经纤毛蛋白1和2结合的常规肽的限制,并且鉴定以高亲和力特异性结合神经纤毛蛋白1而不结合神经纤毛蛋白2的新型肽。此外,本发明的发明人试图鉴定与神经纤毛蛋白-1的b1结构域的VEGF结合口袋(精氨酸结合口袋)二价结合以诱导信号传导来激活神经纤毛蛋白-1被内吞入细胞的新型肽,从而增加融合或共同施用的蛋白质、抗体等的肿瘤组织分布和积聚,并促进该蛋白质或抗体外渗至肿瘤组织,并且具有穿透肿瘤组织的能力。因此,本发明的发明人试图开发出始终作为同二聚体存在,并与抗体重链恒定区的C末端融合,同时保持其活性的新型肽。

[0026] 为此,本发明的发明人试图构建酵母表面展示的免疫球蛋白Fc-融合肽文库,然后选择与神经纤毛蛋白-1的b1结构域结合的克隆。为了选择仅与神经纤毛蛋白-1结合的肽,在选择过程中使用神经纤毛蛋白-2作为竞争者。在所选克隆中,鉴定出具有穿透肿瘤组织并结合神经纤毛蛋白-1的b1结构域的能力的克隆,并将该肽与抗体重链的C末端二价结合,以构建保留抗体内在功能的抗体-肽融合蛋白。根据该融合抗体技术,抗体选择性地积聚在过表达神经纤毛蛋白-1的肿瘤组织中,并且具有增加穿透肿瘤组织的能力。此外,本发明的发明人开发了融合抗体技术,其干扰血管内皮生长因子-A(VEGF165A)与神经纤毛蛋白-1的结合,从而抑制血管生成。

发明内容

[0027] 技术问题

[0028] 本发明的一方面是提供肽,具体是肿瘤穿透肽(TPP),其不同于结合神经纤毛蛋白-1(NRP1)和神经纤毛蛋白-2(NRP2)两者的常规配体和肽,以高特异性和高亲和力仅结合神经纤毛蛋白-1。具体地,本发明的一方面提供肽,其以高特异性和高亲和力仅结合神经纤毛蛋白-1,与结合神经纤毛蛋白-1的VEGF配体等竞争性地结合,以具有抑制肿瘤的血管生成和穿透肿瘤两者的活性。

[0029] 本发明的另一方面提供与上述特异性结合NRP1的肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体。

[0030] 并且,本发明的另一方面提供编码上述特异性结合NRP1的肽的多核苷酸。

[0031] 并且,本发明的另一方面提供用于治疗或预防癌症或血管生成相关疾病的药物组合物,其包含:上述特异性结合NRP1的肽;或者与上述特异性结合NRP1的肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体。

[0032] 本发明的又一方面提供用于诊断癌症或血管生成相关疾病的组合物,其包含:上述特异性结合NRP1的肽;或者与上述特异性结合NRP1的肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳

米颗粒或脂质体。

[0033] 本发明的再一方面提供筛选上述异性结合NRP1的肽的方法。

[0034] 技术方案

[0035] 本发明的一方面提供肽,具体是肿瘤穿透肽(TPP),其以高特异性和高亲和力仅结合神经纤毛蛋白-1。这种神经纤毛蛋白-1特异性肽具有不同于结合神经纤毛蛋白-1(NRP1)和神经纤毛蛋白-2(NRP2)两者的常规配体和肽的序列。

[0036] 将在下文中详细描述本发明。

[0037] 本发明的肽包含5至50个氨基酸,并且所述肽的C末端由X1-X2-X3-X4表示,其中,X1是精氨酸、赖氨酸或任何氨基酸残基,X2和X3各自独立地是任何氨基酸残基,以及X4是精氨酸或赖氨酸。

[0038] 在本发明的一个实例中,设计与抗体重链恒定区(Fc)的羧基(C)末端融合的肽文库以通过在酵母细胞表面展示设计的肽文库而构建Fc-融合肽文库,然后选择特异性结合神经纤毛蛋白-2的b1结构域的克隆以分离并鉴定所获得的肽。

[0039] 为了从Fc肽文库中分离以高亲和力特异性结合神经纤毛蛋白-1的肽,使用神经纤毛蛋白-1的b1b2结构域蛋白进行选择,并且神经纤毛蛋白-2的b1b2结构域蛋白在选择过程中用作竞争者。

[0040] 在本发明的另一个实例中,为了使以高特异性和高亲和力仅结合神经纤毛蛋白-1的肽通过与神经纤毛蛋白-1二价结合展现出生物活性,构建包含重链恒定区(Fc)和与重链恒定区(Fc)羧基(C)末端融合的由15个氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)X3组成的接头的Fc-融合肽,以分离并鉴定显示穿透肿瘤和抑制肿瘤的血管生成两者的活性的肽。

[0041] 本发明使用的术语“肿瘤穿透性”指具有以下特性的一种或多种,例如,1)特异性识别肿瘤,具体是肿瘤特异性血管内皮细胞、肿瘤细胞或肿瘤组织,以在其中积聚,或2)加宽肿瘤相关内皮细胞之间的细胞间隙以促进外渗(extravasation),或3)在肿瘤中调节肿瘤细胞之间的细胞间隙以促进深入穿透至肿瘤。

[0042] 本发明使用的术语“抑制血管生成”指以下特性,例如,与结合神经纤毛蛋白-1以促进血管生成的VEGF配体等竞争性地结合神经纤毛蛋白-1,以抑制配体活性,从而在肿瘤组织中展现抗血管生成。

[0043] 本发明的肽可包含5至50个、优选7至30个氨基酸,或由5至50个氨基酸、优选7至30个氨基酸组成。

[0044] 在本发明的肽中,从N末端构成X3的氨基酸残基可以是任何氨基酸残基,但是优选地可以是丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或终止密码子,更优选地可选自下组:组氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、精氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、丙氨酸和赖氨酸。此外,在本发明的肽中,N末端可优选包含组氨酸-苏氨酸-脯氨酸-甘氨酸(H-T-P-G)。

[0045] 在本发明的实施方案中,所述肽可包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:3的任一个的氨基酸序列,并且有关SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:3的具体序列信息如下。

[0046]

TPP的名称	靶向NRP1的肽序列(N-至-C末端方向)	SEQ ID NO:
--------	-----------------------	------------

TPP1	HTPGNSNQFVLTSTRPPR	SEQ ID NO:1
TPP8	HTPGIATRTPR	SEQ ID NO:2
TPP11	HTPGNSKPTRTPRR	SEQ ID NO:3

[0047] 本发明的肽的最优选实例是SEQ ID NO:3的TPP11。

[0048] 本发明的一方面的特异性结合NRP1的肽可进一步包含接头肽。接头肽可包含1至50个氨基酸,优选4至20个氨基酸,更优选4至15个氨基酸,或由1至50个氨基酸,优选4至20个氨基酸,更优选4至15个氨基酸组成。此外,接头肽可包含甘氨酸或丝氨酸,或由甘氨酸或丝氨酸组成,并且可优选包含(GGGGS)_n的氨基酸序列,或由(GGGGS)_n的氨基酸序列组成(其中,n各自独立地是1~20之间的整数),更优选可包含(GGGGS)₃的氨基酸序列,或由(GGGGS)₃的氨基酸序列组成。

[0049] 在本发明的实施方案中,具有与其结合的接头肽的肽可包含SEQ ID NO:4至6的任一个的氨基酸序列。

[0050] 有关SEQ ID NO:4至6的具体序列信息如下。

[0051]

TPP 的名称	接头连接的、靶向NRP1的肽序列(N-至-C末端方向)		SEQ ID NO:
	接头序列	NRP1-靶向肽序列	
TPP1	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGNSNQFVLTSTRPPR	SEQ ID NO: 4
TPP8	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGIATRTPR	SEQ ID NO: 5
TPP11	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGNSKPTRTPRR	SEQ ID NO: 6

[0052] 本发明的另一方面提供融合肽、小分子药物、纳米颗粒或脂质体,其各自与特异性结合NRP1的肽(SEQ ID NO:1至6选择性地)融合。

[0053] 蛋白质可以是抗体、抗体片段、免疫球蛋白、肽、酶、生长因子、细胞因子、转录因子、毒素、抗原肽、激素、载体蛋白、运动功能蛋白、受体、信号传导蛋白、储存蛋白、膜蛋白、跨膜蛋白、内部蛋白、外部蛋白、分泌蛋白、病毒蛋白、糖蛋白、切割蛋白、蛋白质复合物、化学修饰的蛋白等。

[0054] 本发明使用的术语“小分子药物”指有机化合物、无机化合物或有机金属化合物,它们具有小于约1000Da的分子量并且作为针对疾病的治疗剂起作用。术语在本发明中以广泛的含义使用。在本发明中小分子药物包括寡肽和具有分子量小于约1000Da的其他生物分子。

[0055] 在本发明中,纳米颗粒指包括直径的范围在1~1,000nm的颗粒。纳米颗粒可以是金属颗粒、由金属纳米颗粒核和包围所述核的金属壳组成的金属/金属核壳复合物、由金属纳米颗粒核和包围所述核的非金属壳组成的金属/非金属核壳,或由非金属纳米颗粒核和包围所述核的金属壳组成的非金属/金属核壳复合物。根据实施方案,金属可选自下组:金、银、铜、铝、镍、钯、铂、磁铁以及它们的氧化物,但不限于此,并且非金属可选自下组:二氧化硅、聚苯乙烯、胶乳和丙烯酸酯类物质,但不限于此。

[0056] 根据本发明,脂质体包括至少一种包围内部水性隔室的脂质双层,其能够自我关联。脂质体的特征可在于其膜的类型和尺寸。小单层脂囊(unilamellar vesicle) (SUV)可

具有单个膜并且直径范围可在20~50nm之间。大单层脂囊(LUV)的直径可以是至少50nm。寡层大脂囊(Oliglamellar large vesicle)和多层大脂囊(multilamellar large vesicle)可具有多个、通常同心的膜层,并且直径可以是至少100nm。具有几个非同心的脂质体,即包含在一个较大脂囊中的几个小脂囊,被称为多泡脂囊。

[0057] 此外,肽可以二价或多价结合神经纤毛蛋白-1。

[0058] 本发明使用的术语“融合”指联合两个具有相同或不同功能或结构的分子,并且融合的方法可包括能够使肽与蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体结合的任何物理、化学或生物方法。优选地,融合可由接头肽介导,并且例如,接头肽可与抗体轻链可变区(Fc)的片段的C末端融合。

[0059] 在本发明的实施方案中,融合蛋白可以是肽结合的完整抗体。

[0060] 在本发明中,完整抗体具有两个全长轻链和两个全长重链的结构,并且各轻链通过二硫键(SS键)连接各重链。抗体的恒定区被分为重链恒定区和轻链恒定区,并且重链恒定区具有 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ 型,以及 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚类。轻链恒定区具有 κ 和 λ 型。

[0061] 本发明使用的术语“重链”可被解释为包括全长重链,其包括重链可变区结构域VH,所述VH包括具有足以赋予抗原特异性的可变区序列的氨基酸序列,和三个重链恒定区结构域CH1、CH2和CH3,以及它们的片段。并且,本发明使用的术语“轻链”可被解释为包括全长轻链,其包括轻链可变区结构域VL,所述VL包括具有足以赋予抗原特异性的可变区序列的氨基酸序列,和轻链恒定区结构域CL,以及它们的片段。

[0062] 在本发明中,术语“抗体片段”指抗体的重链结构域或轻链结构域,或它们的片段。例如,抗体片段可以是重链恒定区片段(CH1、CH2或CH3)、重链可变区片段(VH)、轻链恒定区片段(CL)、轻链可变区片段(VL)、抗原结合片段(Fab)、单链可变区片段(scFv),或它们的片段。优选地,抗体片段可以是包含抗体的铰链-CH2-CH3的重链恒定区可结晶片段(Fc)。

[0063] 此外,抗体片段可以是单体、二聚体或多聚体。

[0064] 抗体包括单克隆抗体、非特异性抗体、非人抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)和抗独特型(抗Id)抗体,以及这些抗体的表位结合片段,但不限于此。

[0065] 单克隆抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。例如,单克隆抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE、IgA1、IgA5或IgD型,并且可以是IgG1型。此外,抗体的轻链恒定区可以是 λ 或 κ 型。

[0066] 肽可结合抗体的重链恒定区(Fc)片段,优选地结合抗体重链恒定区(Fc)片段的C末端。结合可通过接头肽进行。

[0067] 此外,本发明的另一方面提供编码上述肽的多核苷酸。

[0068] 本发明使用的术语“多核苷酸”指以单链或双链形式存在的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。其包括RNA基因组序列、DNA(gDNA和cDNA)和由此转录的RNA序列。除非另有说明,否则其还可包括天然多核苷酸的类似物。

[0069] 多核苷酸不但包含编码上述肽的核苷酸序列,还包含与其互补的序列。互补序列包括与核苷酸序列完全互补的序列和与核苷酸序列基本互补的序列。例如,这指在相关领域中已知的严格条件下,可与编码SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:6的任一个的氨基酸序列的核苷酸序列杂交的序列。

[0070] 并且,多核苷酸可被修饰。修饰包括核苷酸的增加、删除或非保守替换或保守替换。编码氨基酸序列的多核苷酸被解释为包括与核苷酸序列具有基本同一性的核苷酸序列。基本同一性可指,当比对核苷酸序列以尽可能多对应于任何其他序列,并使用相关领域中通常使用的算法分析比对序列时,具有至少80%同源性、至少90%同源性或至少95%同源性的序列。

[0071] 本发明的另一方面提供了包含多核苷酸的重组载体。

[0072] 本发明使用的术语“载体”指在宿主细胞中表达目标基因的工具(means)。例如,载体可包括质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体和病毒载体诸如腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。用作重组载体的载体可通过操作在相关领域中通常使用的质粒(例如,pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19等)、噬菌体(例如, λ gt4 λ B、 λ -Charon、 λ Δ z1和M13等)或病毒(例如,CMV、SV40等)而产生。

[0073] 在重组载体中编码SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:6的任一个的氨基酸序列的多核苷酸可以可操作地连接至启动子。本发明使用的术语“可操作地连接”指核苷酸表达控制序列(诸如启动子序列)和第二个核苷酸序列之间的功能性连接。因此,调控序列可控制第二个核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0074] 重组载体通常可被构建为用于克隆的载体或用于表达的载体。作为用于表达的载体,可使用相关领域中通常用于从植物、动物或微生物表达外源蛋白的载体。重组载体可通过相关领域中已知的各种方法构建。

[0075] 重组蛋白可被构建为使用原核细胞或真核细胞作为宿主的载体。例如,当使用的载体是表达载体,并且使用原核细胞作为宿主时,载体通常包含可促进转录的强启动子(例如,p λ 启动子、trp启动子、lac启动子、tac启动子、T7启动子等),翻译起始的核糖体结合位点,以及转录/翻译的终止序列。当载体使用真核细胞作为宿主时,包括在载体中的真核细胞的复制起点操作可包括f1复制起点、SV40复制起点、pMB1复制起点、adeno复制起点、AAV复制起点、CMV复制起点和BBV复制起点等,但不限于此。此外,可使用来源于哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子(metallothioneine promoter))或来源于哺乳动物细胞的病毒的启动子(例如,腺病毒后期启动子、疫苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子或HSV的tk启动子),并且启动子通常具有多聚腺苷酸化序列作为转录终止序列。

[0076] 与此同时,载体不但可表达本发明的特异性结合NRP1的肽,还可表达具有与其融合的肽的抗体或其片段。在抗体具有与其融合的肽或其片段的情况下,载体可使用在一种载体中表达肽和抗体或其片段的载体系统,以及在不同(separate)载体中表达肽和抗体或其片段的载体系统。对于后者,可通过共转化和靶向转化(targeted transformation)在宿主细胞中引入两种载体。

[0077] 本发明的重组载体可具有示于例如图6或图20的酶切图谱(cleavage map)。

[0078] 本发明的另一方面提供使用重组载体转化的宿主细胞。

[0079] 在相关领域中已知的任何种类的宿主细胞可用作宿主细胞。原核细胞的实例包括以下菌株:诸如E.coli JM109、E.coli BL21、E.coli RR1、E.coli LE392、E.coli B、E.coli X 1776、E.coli W3110或属于杆菌属的菌株,诸如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)和

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和肠道菌群,以及诸如各种假单胞菌 (*Pseudomonas Spp.*) 等的菌株。此外,当在真核细胞中转化载体时,可使用宿主细胞,诸如酵母菌(酿酒酵母 (*Saccharomyce cerevisiae*))、昆虫细胞、植物细胞和哺乳动物细胞,例如SP2/0、CHO(中华仓鼠卵巢)K1、CHO DG44、PER.C6、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、Huh7、3T3、RN和MDCK细胞系等。

[0080] 本发明的另一方面提供用于制备特异性结合NRP1的肽的方法,其包括培养上述宿主细胞。

[0081] 多核苷酸和包含多核苷酸的重组载体可使用相关领域中已知的插入方法插入至宿主细胞。例如,当宿主细胞是原核细胞时,转化可根据CaCl₂法或电穿孔法等进行,并且当宿主是真核细胞时,载体可根据显微镜注射法、磷酸钙沉淀法、电穿孔法、脂质体介导转化法和基因轰击法等转化至宿主细胞,但是转化方法不限于此。当使用微生物,如大肠杆菌 (*E. coli*) 等时,生产率比使用哺乳动物更高。然而,虽然其由于糖基化不适合于生产抗体的完整Ig形式,但是其可用于生产抗原结合片段,诸如Fab和Fv。

[0082] 用于选择转化宿主细胞的方法可根据相关领域中熟知的方法使用由选择标记表达的表型轻而易举地进行。例如,当所选标记是特定的抗生素抗性基因时,转化体 (transformant) 可通过在含有抗生素的培养基中培养转化体而轻而易举地选择。

[0083] 该方面是包括制备特异性结合NRP1的肿瘤穿透肽 (TPP) 以及具有与其融合的肽的抗体或其片段的概念。

[0084] 用于制备与特异性结合NRP1的肽,具体为肿瘤穿透肽 (TPP),融合的抗体重链恒定区 (Fc) 片段的方法的实例包括以下步骤:

[0085] 1) 通过克隆编码抗体重链恒定区铰链-CH₂-CH₃-接头-TPP的核酸来构建用于表达 TPP-融合重链恒定区 (其为抗体重链恒定区和所选的特异性结合NRP1的肽的融合蛋白) 的重组表达载体;

[0086] 2) 将构建的表达载体转化至细胞以表达抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白;以及

[0087] 3) 纯化并回收表达的抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白。

[0088] 用于制备与本发明的肽融合的抗体的方法的另一个实例包括以下步骤:

[0089] 1) 通过克隆编码VH-CH₁-铰链-CH₂-CH₃-接头-TPP的核酸来构建用于表达IgG-TPP的重组TPP融合IgG重链恒定区的重组表达载体,和通过克隆编码VL-CL的核酸来构建重组表达载体;

[0090] 2) 将构建的重链和轻链表达载体共同转化至细胞以表达重组IgG-TPP蛋白;以及

[0091] 3) 纯化并回收表达的重组IgG-TPP蛋白。

[0092] 本发明的一方面提供用于治疗或预防癌症的药物组合物,其包含上述特异性结合NRP1的肽;与上述肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体。

[0093] 本发明的特异性结合NRP1的肽特异性地结合NRP1,并且因此特异性地分布在肿瘤中并展现出穿透肿瘤的能力。

[0094] 此外,特异性结合NRP1的肽特异性地结合神经纤毛蛋白-1,使得肽在结合神经纤毛蛋白-1中与VEGF165A竞争。因此,除了癌症治疗作用之外,肽可抑制由VEGF165A结合神经

纤毛蛋白-1造成的血管生成以展现针对血管生成相关疾病的治疗作用。

[0095] 与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体显示出与野生型抗体类似的产率,并且具有能够同时靶向两种抗原(即抗体结合的抗原和肽结合的神经纤毛蛋白-1)的双特异性抗体的特性。因此,融合抗体具有以高效率到达肿瘤组织的能力,并且因此可展现出对癌症治疗的高效性。

[0096] 癌症可选自下组:鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、皮肤癌、皮肤或眼部黑色素瘤、直肠癌、肛门癌、食管癌、小肠癌、内分泌腺体癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴瘤、肝细胞瘤、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝肿瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和头颈癌。

[0097] 血管生成相关疾病可选自下组:糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性、早产儿视网膜病变、角膜移植排斥、新生血管性青光眼、晶体后纤维增生症、流行性角膜结膜炎、维生素A缺乏症、隐形眼镜过度磨损、特应性角膜炎、上角膜缘角膜炎、翼状胬肉干燥角膜炎、干燥综合征(sjogren's syndrome)、酒糟痤疮(acne rosacea)、小水泡病(phlyctenulosis)、梅毒、分枝杆菌感染、脂质变性、化学灼伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯疱疹感染、带状疱疹感染、原生动物感染、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、蚕食性角膜溃疡(Mooren ulcer)、特芮安氏角膜边缘变性(Terrien's marginal degeneration)、边缘角质层分离(marginal keratolysis)、创伤、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多动脉炎、韦格纳氏结节病(Wegener's sarcoidosis)、巩膜炎、史蒂文森强生症(Stevens-Johnson disease)、类天疱疮、放射状角膜切开术和角膜移植排斥反应。

[0098] 当组合物被制备为用于预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的药物组合物时,组合物可包括药学上可接受的载体。包含在组合物中的药学上可接受的载体通常用于制剂。包含在组合物中的药学上可接受的载体的实例可包括,但不限于,乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油等,但不限于此。除了上述成分之外,药物组合物可进一步包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0099] 用于预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的药物组合物可口服或肠胃外施用。所述肠胃外施用包括静脉内注射、皮下注射、肌内注射、腹膜内注射、内皮施用、局部施用、鼻腔施用、肺内施用、直肠内施用等。因为当口服施用时,蛋白质或肽被消化,优选的是将用于口服施用的组合物配制成包衣活性物质或免于胃中的降解。并且,药物组合物可通过可将活性物质输送至靶细胞的任何装置来施用。

[0100] 用于预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的药物组合物的适当剂量可根据各种因素变化,诸如用于配制的方法,施用方法,患者的年龄、体重、性别、病理状态,食物,施用时间,施用途径,排泄速率和反应敏感性等。优选地,基于成人,组合物的适当剂量在0.001~100mg/kg的范围内。本发明使用的术语“药物有效剂量”指足以预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的量。

[0101] 组合物可根据可由本领域技术人员容易进行的方法使用药学上可接受的载体和/

或赋形剂配制,并且可以单位剂量的形式提供,或封闭在多剂量小瓶中。这里,药物组合物的制剂可以是油性或水性介质中的溶液、悬浮液、糖浆或乳液的形式,或者可以是浸膏剂、粉末、颗粒、片剂或胶囊,并且可进一步包含分散剂或稳定剂。并且,组合物可单独施用或与其他治疗剂组合施用,并且可与常规治疗剂顺序或同时施用。与此同时,组合物包括抗体或抗原结合片段,并且因此可配制成免疫脂质体。包含抗体的脂质体可根据相关领域中熟知的方法来制备。免疫脂质体是包含磷脂酰胆碱、胆固醇和聚乙二醇衍生的磷脂酰乙醇胺的脂质体组合物,并且可通过逆相蒸发法(reverse phase evaporation method)来制备。例如,抗体的Fab'片段可通过二硫化物交换反应与脂质体缀合。脂质体可进一步包含化学治疗剂,诸如多柔比星(Doxorubicin)。

[0102] 本发明的组合物可作为单独的治疗剂施用或与通常用于治疗或预防癌症的疗法组合施用。组合物可与其他疗法组合施用,并且可与常规疗法顺序或同时施用。

[0103] 常规疗法的实例包括,但不限于,外科手术、化学疗法、放射疗法、激素疗法、生物疗法和免疫疗法。此外,本发明的组合物可用于预防或治疗除癌症之外的疾病或病症,其与不期望的血管生成相关或特征在于不期望的血管。本发明的治疗方法包括向需要这种治疗或预防的患者施用治疗或预防有效量的特定药物或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物、空间异构体(steric isomer)、包合物(inclusion complex)或前药。在本发明的一个实施方案中,组合物与用于治愈、治疗或预防癌症的其他药物(“第二药物”)或方法组合施用。第二药物的实例包括,但不限于,蛋白质、抗体、小分子药物、脂质体、纳米颗粒、干细胞等。

[0104] 本发明的一方面还提供用于治疗或预防癌症的药物组合物,其包括:上述特异性结合NRP1的肽;或与所述肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体。

[0105] 本发明使用的术语“诊断”指证明病理生理状况的存在或特征。本发明的诊断指证明癌症的发生和发展。

[0106] 特异性结合NRP1的肽可结合用于分子成像的荧光物质,以便通过图像诊断癌症。

[0107] 用于分子成像的荧光物质指产生荧光的所有物质。优选发射红色或近红外荧光,并且更优选发射具有高量子产率的荧光。然而,荧光不限于此。

[0108] 优选地,用于分子成像的荧光物质是荧光物质、荧光蛋白或用于成像的其他物质,其可结合特异性结合NRP1的肽,但不限于此。

[0109] 荧光物质优选为,例如荧光素、BODIPY、四甲基罗丹明、Alexa、花菁(cyanine)、异花菁(allophycocyanine),或它们的衍生物,但不限于此。

[0110] 荧光蛋白优选为,例如Dronpa蛋白、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(DsRFP)、Cy5.5,即呈现近红外荧光的花菁荧光物质,或其他荧光蛋白,但不限于此。

[0111] 用于成像的其他荧光物质优选为例如,氧化铁、放射性同位素等,但不限于此,并且他们可用于成像设备,诸如MR、PET。

[0112] 本发明还提供用于筛选上述肽的方法。

[0113] 具体地,筛选肽的方法包括以下步骤:(1)设计能够与NRP1-b1结构域的精氨酸结合口袋相互作用的肽文库;(2)使步骤(1)的肽文库与抗体重链恒定Fc区的C末端融合;(3)在大量作为竞争者NRP2-b1b2的存在下,结合步骤(2)的Fc融合肽文库;以及(4)基于步骤(3)中结合的NRP1-b1b2与分离的Fc融合肽文库之间的结合亲和力,筛选所需Fc融合肽。

[0114] 在本发明的实施方案中,构建步骤(1)中的文库是使用常规抗体重链恒定区(Fc)

片段和导向蛋白3衍生序列作为模板,通过进行使用引物的PCR而设计具有在自然界中不存在的氨基酸序列的肽文库。

[0115] 使用导向蛋白3衍生序列作为模板的引物可具有以下序列。

[0116] 用于构建与抗体重链恒定区 (Fc) 融合的肽文库的寡核苷酸序列

[0117]

引物的名称	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:
正向引物	5'- CAT CGA GAA AAC CAT CTC CAA AGC CA - 3'	SEQ ID NO: 7
反向引物	5'- AAAG TCG ATT TTG TTA CAT CTA CAC TGT TGT TAT CAG ATC TCG AGA AGC TTA TCA VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN TCC AGG AGT ATG TGA TCC - 3'	SEQ ID NO: 8

[0118] 在本发明的实施方案中,在步骤(2)中,步骤(1)中构建的文库与抗体重链恒定区融合。在步骤(3)中,与重链恒定区融合的文库在酵母细胞表面展示,然后结合至靶分子NRP1-b1b2。此时,它与NRP2-b1b2蛋白竞争性结合,并且选择仅结合NRP1而不结合NRP2的肽。

[0119] 有益效果

[0120] 本发明的特异性结合NRP1而不结合NRP2的肽包含能够特异性结合NRP1的氨基酸序列。本发明的特异性结合NRP1的肽,和与所述肽融合的蛋白,具有特异性结合NRP1的特性,并且因此特异性积聚在肿瘤组织中,加宽肿瘤相关内皮细胞之间的细胞间隙以促进外渗,并且调节肿瘤组织的细胞间隙以增加其在肿瘤组织中的穿透。此外,与特异性结合NRP1的肽融合的抗体或抗体片段,当以与不与所述肽融合的对照抗体相同的剂量施用,特异性积聚在肿瘤组织中,并且其在肿瘤组织中的穿透增加,从而展现显著增加的体内抗肿瘤活性。

[0121] 与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体或其片段,可以高效率积聚在肿瘤组织中,同时保留原始抗体的抗原结合能力,并且具有增加的穿透肿瘤组织的能力,从而展现对肿瘤治疗和诊断的高效性。此外,与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体片段具有抑制VEGF165A结合NRP1的特性,以抑制由VEGF165A导致的血管生成,并且因此可用于治疗 and 诊断各种疾病,其包括肿瘤生长和转移、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、类风湿性关节炎等。

[0122] 与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体或其片段,显示出与不与所述肽结合的野生型抗体类似的产率。此外,融合抗体或其片段保留原始野生型抗体的抗原结合能力,以及A蛋白和G蛋白重链恒定区 (Fc) 的结合亲和力。因此,不同于常规抗体,其不需要额外的

生产成本,并且具有保留抗体的抗癌活性的特性。

附图说明

[0123] 图1示意性显示神经纤毛蛋白1和2的结构。

[0124] 在图1 (A) 和1 (B) 中,神经纤毛蛋白包括5个主要结构域,其中,将从N末端起的a1和a2结构域归为CUB结构域,导向蛋白Ig样C2型结构域与其结合。具体地,该结构域与丛状蛋白形成复合物以增加导向蛋白-丛状蛋白结合亲和力。将b1和b2结构域归为FV/VIII结构域,并且其与VEGF或第3类导向蛋白配体的C末端结合。具体地,在这部分中,存在肝素可结合的位点,并且它促进含有许多带正电荷的残基的配体结合。此外,MAM诱导低聚反应,跨膜结构域(TM)能够神经纤毛蛋白被固定至细胞表面,并且在细胞溶质结构域中,存在能够结合95盘状突触后密度大带状疱疹闭合区-1 (Postsynaptic density 95, Disk large, Zona occludens 1) (PDZ) 结构域的位点。

[0125] 图2显示神经纤毛蛋白-1 (NRP1) 与抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白,以及抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白的结合复合物。获得二聚体克隆,其特异性结合NRP1b1结构域的精氨酸结合口袋而不结合NRP2。

[0126] 图3是通过从结合NRP1和NRP2两者的A22p肽(N末端-H T P G N S N K W K H L Q E N K K G R P R R-C末端)的C末端向18-残基部分(残基5至22)添加简并密码子NHB(ATGC/ACT/TCG)而构建的文库的示意图。Fc-融合肽文库通过将包含15-氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) X3的接头与抗体重链恒定区(Fc)的羧基(C)末端融合而构建。将构建的Fc-融合肽文库与酵母细胞表面上的Aga1p-Aga2p融合,并且如在图3底部所示在酵母细胞表面上展示,并且肽文库存在于抗体重链恒定区(Fc)片段的C末端。

[0127] 图4显示用来选择特异性结合NRP1的肽的蛋白,以及MACS和FACS分析的结果。

[0128] 图4 (A) 示意性显示用来选择特异性结合NRP1的肽的生物素化神经纤毛蛋白-1b1b2蛋白和生物素化神经纤毛蛋白-2b1b2蛋白的结构,并且还显示具有表达和纯化的神经纤毛蛋白的SDS-PAGE的结果。

[0129] 图4 (B) 显示通过使用生物素化NRP1-b1b2作为结合抗原和浓度高10倍的NRP2-b1b2作为竞争抗原进行构建文库的MACS和FACS,并在各选择回合中分析与NRP1-b1b2结合的库(pool)而获得的FACS分析结果。可分析抗体重链恒定区(Fc)的表达水平和与生物素化NRP1-b1b2的结合,并且进行与在酵母细胞表面上展示的包含Fc-A22p的细胞的比较。当重复MACS和FACS时,结合生物素化NRP1-b1b2而不影响抗体重链恒定区(Fc)表达的克隆的数量增加。

[0130] 图5 (A) 和5 (B) 显示为了鉴定所选单个克隆与生物素化NRP1-b1b2结合而进行的FACS的结果。

[0131] 在图5 (A) 中,用A22p竞争性分析总共50个单个克隆,并且各克隆与100nM生物素化NRP1-b1b2的结合亲和力通过在FACS中显示的平均荧光强度鉴定。在这些克隆中,选择显示更高平均荧光强度的名称为TPP1、TPP8和TPP11的克隆。

[0132] 图5 (B) 显示为了分析在酵母细胞表面上展示的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11与100nM NRP1-b1b2结合而进行的FACS分析的结果。

[0133] 图6是用于在哺乳动物细胞HEK293F中表达Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白(其

为通过使抗体重链恒定区与所选特异性结合NRP1的肽融合而获得的Fc融合肽)的载体酶切图谱的实例。

[0134] 图7显示抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白的示意图,并且还显示表达和纯化的SDS-PAGE的结果。

[0135] 在图7(A)中,抗体重链恒定区从N末端铰链开始构建,以便保留两个二硫键以容易地形成二聚体。特异性结合NRP1的肽通过包含15个氨基酸((G₄S)₃)的肽接头与抗体重链恒定区的CH3末端融合。

[0136] 在图7(B)中,各克隆的二聚体形成和提纯纯度在SDS-PAGE上可见。此外,可见通过引入接头和特异性结合NRP1的肽而造成尺寸的差异。

[0137] 图8显示为了测量Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11(其为各自为从哺乳动物细胞表达和纯化的抗体重链恒定区和特异性结合NRP1的肽的融合蛋白)的NRP1结合亲和力而进行的ELISA分析的结果。

[0138] 在图8(A)中,浓度依赖性ELISA的结果表明Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11具有比NRP1-b1b2结构域的Fc-A22p高约10倍至60倍的亲和力。

[0139] 在图8(B)中,不同于Fc-A22p,Fc-TPP11特异性结合NRP1-b1b2而不结合NRP2-b1b2。此外,它不与对照VEGFR2结合。不与Fc融合的合成肽TPP11显示比NRP1-b1b2蛋白的Fc-TPP11低至少100倍的亲和力。这表明Fc-TPP11由于亲和力(avidity)作用而具有高亲和力。

[0140] 图9显示观察与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)表面上展示的NRP1共定位的共焦显微镜分析的结果,以便确定Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白是否特异性结合细胞表面上展示的NRP1。Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11使用对照(PBS缓冲液)、Fc或Fc-A22p以相同方式处理,并且通过染色观察它们与细胞表面结合的程度。结果是,不同于Fc,与细胞表面上的NRP1共定位的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11表明抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白特异性结合NRP1。

[0141] 图10显示为了确定Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11是否特异性结合细胞表面上展示的NRP1以激活NRP1并且被内吞入细胞而进行的共焦显微镜分析的结果。在相同条件下使用对照(PBS缓冲液)、Fc、Fc-A22p、Fc-TPP1、Fc-TPP8或Fc-TPP11处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC),并且内吞作用的程度通过染色而染色。结果是,观察到不同于Fc,当与NRP1共定位时,Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11内吞入细胞。这表明Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11特异性结合NRP1并激活NRP1。

[0142] 图11显示分析HUVEC中的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白的生物学机制的结果。

[0143] 图11(A)显示为了检查HUVEC中的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白的生物学机制而进行的蛋白印迹分析(Western blot analysis)的结果。不同于Fc,通过VE-钙粘蛋白的减少可以看出,VEGF165A作为对照组显示改善的穿透HUVEC的能力。对照组VEGF165A减少VE-钙粘蛋白,并且在所选特异性结合NRP1的单个克隆中,Fc-TPP11最有效地减少VE-钙粘蛋白。此外,显示与Fc-A22p蛋白相比,Fc-TPP11以浓度低十倍更有效地减少VE-钙粘蛋白。图11(B)显示为了确证Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白是否具有改善的穿透人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的能力而进行的Transwell测定的结果。结果表明VEGF165A、Fc-TPP8和Fc-TPP11具有增加的有效穿透细胞的能力。然而,没有减少VE-钙粘蛋白能力的Fc-TPP1没有增

加的穿透能力。这样的结果与图11 (A) 中显示的结果紧密相关。

[0144] 图12显示为了鉴别Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白是否在肿瘤组织中积聚并且穿透组织而进行的免疫组织化学的结果。移植人表皮癌A431细胞并在裸鼠中生长,之后将Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白注射至尾静脉,然后通过血管双重染色(CD31)分析Fc融合蛋白的分布。结果是,显示不同于对照Fc, Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白选择性地到达肿瘤组织,并且有效地穿透肿瘤组织。具体地,显示与Fc-A22p蛋白相比, Fc-TPP1和Fc-TPP11更有效地穿透肿瘤组织。右侧的柱状图显示定量肿瘤组织中的积聚的结果。

[0145] 图13显示在来自上皮癌症的肿瘤细胞和组织中测量Fc-TPP11活性的结果。

[0146] 图13 (A) 显示为了观察Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白在人头颈癌FaDu细胞中E-钙粘蛋白的变化而进行的蛋白印迹分析的结果。结果是,在所选特异性结合NRP1的单个克隆中,不同于Fc, Fc-TPP11最有效地诱导E-钙粘蛋白的减少,并且与Fc-A22p相比,以浓度低10倍减少E-钙粘蛋白。图13 (B) 显示为了确定Fc-TPP11是否结合NRP1以调节上皮组织中的细胞间隙并且具有穿透肿瘤组织的能力而进行的离体肿瘤穿透测定的结果。显示对照组Fc没有穿透肿瘤组织,而Fc-TPP11通过调节源自VE-钙粘蛋白和E-钙粘蛋白减少的细胞间隙,而即使在没有血管的情况下仍具有穿透肿瘤组织的能力,其通过NRP1起细胞粘附因子作用。

[0147] 图14显示评价TPP11肽是否与VEGF165A竞争性结合NRP1-b1b2的结果。

[0148] 图14 (A) 显示与Fc-A22p相比,甚至在极低浓度下,表明Fc-TPP1和Fc-TPP11与VEGF165A竞争性结合NRP1以抑制VEGF165A结合NRP1的结果。这表明Fc-TPP1和Fc-TPP11结合NRP1-b1b2的位置是与VEGF165A结合的相同的精氨酸结合口袋。

[0149] 图14 (B) 显示为了检查合成的TPP11肽是否与RPARPAR肽(Teesalu et al. 2009)和VEGF165A配体竞争性结合NRP1而进行的竞争结合ELISA的结果。显示合成的TPP11肽与RPARPAR肽和已知与NRP1-b1的精氨酸结合口袋结合的VEGF165A竞争性结合NRP1。这证明TPP11结合NRP1-b1的精氨酸结合口袋。

[0150] 图15显示测量Fc-TPP11的抗血管生成活性的结果。

[0151] 图15 (A) 显示为了检查Fc-TPP11在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中是否抑制VEGF165A诱导的血管形成而进行的血管形成测定(tube formation assay)的结果。结果是,显示Fc-TPP11在上皮细胞中有效地抑制VEGF165A诱导的血管形成。

[0152] 图15 (B) 和15 (C) 显示为检查Fc-TPP11在活体小鼠中是否可抑制VEGF165A诱导的血管生成而进行的体内基质胶塞测定(matrigel plug assay)的结果。在图15 (B) 中,血管生成通过用抗CD31抗体的免疫组织化学以血管的密度来测量。图15 (C) 的右侧显示图像量化的结果。结果是, Fc-A22p和Fc-TPP11在活体小鼠中抑制VEGF165A诱导的血管生成。具体地,显示与Fc-A22p相比, Fc-TPP11更有效地抑制血管生成。

[0153] 图16显示测量Fc-TPP11对VEGF165A介导的血管内皮细胞迁移和侵袭的抑制活性。

[0154] 图16 (A) 显示为了检查Fc-TPP11是否抑制VEGF165A诱导的血管内皮细胞迁移而进行的伤口愈合测定的结果。不同于Fc,对照VEGF165A增加血管内皮细胞的迁移活性,并且Fc-TPP11抑制血管内皮细胞的迁移活性。

[0155] 图16 (B) 显示为了检查Fc-TPP11是否抑制VEGF165A诱导的HUVEC细胞侵袭而进行的Transwell测定的结果。不同于对照VEGF165A, Fc-TPP11抑制血管内皮细胞的侵袭活性。

[0156] 图17显示测量在活体小鼠中Fc-TPP11的肿瘤生长抑制活性和在肿瘤组织中Fc-TPP11的抗血管生成活性的结果。

[0157] 图17(A)显示为了检查Fc-TPP11的抗血管生成活性实际上是否影响抑制体内肿瘤细胞生长而进行的裸鼠模型中肿瘤生长抑制实验的结果。将FaDu细胞移植至裸鼠,然后将Fc或Fc-TPP11注射至裸鼠。结果是,与PBS或Fc相比,显示Fc-TPP11有效地抑制肿瘤细胞生长。

[0158] 图17(B)显示测量实验中小鼠重量的结果。在使用Fc-TPP11注射的小鼠和使用PBS或Fc注射的小鼠之间没有显著重量差异。这间接证明Fc-TPP11对于小鼠无毒。

[0159] 图17(C)显示为了检查实验中Fc-TPP11的肿瘤抑制活性是否将有助于抗血管生成活性而进行的提取的肿瘤免疫组织化学的结果。结果是,与使用对照PBS或Fc注射的小鼠相比,在使用Fc-TPP11注射的小鼠中,肿瘤组织的血管密度降低,并且血管和周细胞的共定位也降低。

[0160] 图18(A)显示为了分析与Fc-TPP11共同施用的多柔比星的肿瘤穿透能力而进行的免疫组织化学的结果。结果是,当多柔比星与Fc-TPP11共同施用,与共同施用对照Fc相比,多柔比星的肿瘤组织穿透增加。

[0161] 图18(B)显示定量分析组织中的多柔比星积聚的结果。

[0162] 图19是显示Fc-TPP11的整体效果的示意图。Fc-TPP11以高亲和力和高特异性结合NRP1-b1结构域的精氨酸结合口袋,而不结合NRP2。由于这种特性,当体内注射用于结合NRP1时,Fc-TPP11可选择性地到达肿瘤组织,其外渗到肿瘤组织中增加,并且其肿瘤组织穿透增加。此外,Fc-TPP11与血管内皮生长因子VEGF竞争性地结合NRP1,从而抑制VEGF诱导的血管生成。

[0163] 图20是用于表达IgG重链-TPP11的载体的酶切图谱的实例。

[0164] 图21是用于表达IgG轻链的载体的酶切图谱的实例。

[0165] 图22(A)是通过将TPP11引入至常规抗EGFR抗体西妥昔单抗(Cetuximab)的重链C末端而构建的抗体的示意图。

[0166] 图22(B)显示通过将抗体共转化至HEK293F细胞,瞬时表达并纯化抗体,然后在还原和非还原条件下,在SDS-PAGE上分析抗体的尺寸和纯度而获得的结果。

[0167] 图22(C)显示为了确定西妥昔单抗-TPP11之间的结合与西妥昔单抗和原始抗原EGFR的结合没有差异而进行的ELISA的结果,并且显示TPP11融合不影响现有抗体的抗原结合能力。

[0168] 图23显示为了检查西妥昔单抗-TPP11穿透肿瘤组织的能力而进行的免疫组织化学的结果。表达EGFR的人表皮癌A431细胞被移植至裸鼠,之后将西妥昔单抗、西妥昔单抗-A22p或西妥昔单抗-TPP11静脉注射至裸鼠,然后通过血管双重染色(CD31)分析它们的组织穿透。结果是,显示西妥昔单抗仅穿透血管的外周,而西妥昔单抗-A22p或西妥昔单抗-TPP11穿透至远离血管的组织(左图)。具体地,与西妥昔单抗-A22p相比,西妥昔单抗-TPP11更有效地穿透至组织。穿透使用Image J程序(右图)量化。这表明TPP11具有增加全长IgG抗体的肿瘤组织积聚和穿透的能力。

具体实施方式

[0169] 实施例

[0170] 在下文中将参考实施例详细地描述本发明。对本领域普通技术人员显而易见的是,这些实施例仅用作说明目的,并且不被解释为限制本发明的范围。

[0171] 实施例1:构建特异性结合NRP1-b1的精氨酸结合口袋的肽文库

[0172] 如图1(A)和1(B)所示,神经纤毛蛋白包括5个主要结构域,其中,将从N末端起的a1和a2结构域归为CUB结构域,导向蛋白Ig样C2型结构域与其结合。具体地,该结构域与丛状蛋白形成复合物以增加导向蛋白-丛状蛋白结合亲和力。将b1和b2结构域归为FV/VIII结构域,并且其与VEGF或第3类导向蛋白配体的C末端结合。就一定,在这部分中,存在肝素可结合的位点,并且它促进含有许多带正电荷的残基的配体结合。此外,MAM诱导低聚反应,跨膜结构域(TM)能够使神经纤毛蛋白被固定至细胞表面,并且在细胞溶质结构域中,存在能够结合95盘状突触后密度大带状疱疹闭合区-1(PDZ)结构域的位点。在这些结构域中,具体是b1结构域具有C末端规则(CendR)可结合的口袋形结构。事实上,当分析如图2所示与神经纤毛蛋白b1的精氨酸口袋结合的配体Sema3s和VEGF家族的C末端时,它们都具有与C末端规则-R/K-X-X-R/K相应的序列。

[0173] 已知,在通过与神经纤毛蛋白相互作用而增加肿瘤组织穿透的天然配体中,VEGF165A或Sema3A比NRP2更优先结合NRP1。因此,本发明的发明人预期NRP1与肿瘤组织穿透的关系比NRP2更紧密,并且预期NRP1将为更优选的目标。因此,如图2所示,本发明的发明人试图选择Fc-TPP,其中特异性结合NRP1-b1的精氨酸口袋而不结合NRP2的肿瘤组织穿透肽(TPP)被融合到抗体的重链恒定区(Fc)。

[0174] 为此,如图3所示,使用常规的A22p序列(HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR)作为模板,合成包含简并密码子NHB(ATGC/ACT/TCG)的反向引物,其中,对应于自C末端起的18个残基(5至22)的部分包含丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸。此外,合成对应于抗体重链恒定区(Fc)片段的CH3区的正向引物。正向引物和反向引物包括与50bp载体的序列相同的部分,以便能够在酵母细胞中同源重组。用于构建融合至抗体重链恒定区(Fc)的肽文库引物的核苷酸序列示于下表1。

[0175] 表1:用于构建Fc融合肽文库的寡核苷酸序列

[0176]

引物的名称	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:
正向引物	5'- CAT CGA GAA AAC CAT CTC CAA AGC CA - 3'	SEQ ID NO: 7
反向引物	5'- A AAG TCG ATT TTG TTA CAT CTA CAC TGT TGT TAT CAG ATC TCG AGA AGC TTA TCA VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN VDN TCC AGG AGT ATG TGA TCC - 3'	SEQ ID NO: 8

[0177] 通过进行PCR制备文库DNA。使用Fc-A22p酵母表面展示载体 (pCTCON, Colby et al. 2004) 作为模板和上述正向与反向引物, 扩增DNA。将扩增的DNA (总共300 μ g; 10 μ g/转化) 与通过使用BsrGI和XhoI限制性内切酶处理Fc酵母表面展示载体而制备的载体DNA (1 μ g/转化) 在酵母中电穿孔30次, 从而构建文库。此后, 如图3所示, 文库和载体在酵母细胞中通过同源重组连接。在连续稀释后, 根据存在于载体中的选择性标志物, 通过测量选择培养基中生长菌落的数量, 发现融合至抗体重链恒定区 (Fc) 的肽文库的大小为 2×10^7 。

[0178] 实施例2: 从通过融合至抗体重链恒定区 (Fc) 而获得的构建的Fc-肽文库中选择仅特异性结合NRP1的单个克隆

[0179] 根据常规方法 (BA Appleton et al., 2007) 制备纯度90%以上的靶蛋白NRP1-b1b2 (273-586) 和竞争蛋白NRP2-b1b2 (275-595)。靶蛋白NRP1-b1b2如图4所示被生物素化 (EZ-LINK™ 硫代-NHS-LC-生物素化试剂盒 (Pierce Inc., USA))。

[0180] 图4 (A) 示意性显示用来选择特异性结合NRP1的肽的生物素化神经纤毛蛋白-1b1b2蛋白和生物素化神经纤毛蛋白-2b1b2蛋白的结构, 并且还显示表达和纯化的SDS-PAGE的结果。

[0181] 图4 (B) 显示在构建文库的MACS和FACS之后, 为了分析在各选择回合中的库而进行的FACS分析结果。这可分析抗体重链恒定区 (Fc) 的表达水平和与生物素化NRP1-b1b2的结合, 并且进行与在酵母细胞表面上展示的包含Fc-A22p的细胞的比较。当重复MACS和FACS时, 结合生物素化NRP1-b1b2而不影响抗体重链恒定区 (Fc) 表达的克隆的数量增加。

[0182] 将1 μ M生物素化NRP1-b1b2与在酵母细胞表面上展示的抗体重链恒定区 (Fc)-融合肽文库在37 $^{\circ}$ C结合1小时。与生物素化NRP1-b1b2结合并在酵母细胞表面上展示的抗体重链恒定区 (Fc)-融合肽文库, 在4 $^{\circ}$ C与链霉亲和素微珠 (Miltenyi Biotec Inc., Germany) 结合10分钟, 然后使用MACS (磁性活化细胞分选) 选择与生物素化NRP1-b1b2结合的克隆。接着, 将1 μ M生物素化NRP1-b1b2与在酵母细胞表面上展示的抗体重链恒定区 (Fc)-融合肽文库在37 $^{\circ}$ C结合1小时, 然后, PE缀合的链霉亲和素 (链霉亲和素-R-藻红蛋白缀合物 (SA-PE), Invitrogen) 和FITC缀合的抗Fc抗体 (抗Fc抗体FITC缀合的, 山羊, (SIGMA-ALDRICH co.,

USA) 在4℃与文库结合20分钟,之后使用FACS (荧光活化细胞分选) 选择克隆,其表达高水平Fc并且具有生物素化NRP1-b1b2的结合亲和力。除了使用浓度为0.5μM的生物素化NRP1-b1b2之外,第二FACS回合以与上述相同的方式进行。此外,在MACS和FACS过程中,非生物素化NRP2-b1b2以浓度高10倍用作生物素化NRP1-b1b2的竞争蛋白,并且选择与NRP1-b1b2结合的单个克隆。

[0183] 另外,如图5 (A) 和5 (B) 所示,通过FACS分析,根据PE信号对100nM生物素化NRP1-b1b2具有高结合亲和力的单个克隆进行分类,并且选择名称为TPP1、TPP8和TPP11的克隆。

[0184] 从酵母细胞中回收选择的单个克隆,并且分析其DNA序列和氨基酸序列。

[0185] 下表2显示所选特异性结合NRP1而不结合NRP2的肽的序列。

[0186] 表2:选自融合至抗体重链恒定区 (Fc) 的肽文库的单个克隆的氨基酸序列和pI

[0187]

TPP的名称	靶向NRP1的肽序列(N-至-C末端方向)	SEQ ID NO:
TPP1	HTPGNSNQFVLTSTRPPR	SEQ ID NO: 1
TPP8	HTPGIATRTPR	SEQ ID NO: 2

[0188]

TPP11	HTPGNSKPTRTPRR	SEQ ID NO: 3
-------	----------------	--------------

[0189] 下表3显示将所选肽与抗体重链恒定区融合时使用的包含接头的序列。

[0190] 表3:接头连接的、靶向NRP1的序列

[0191]

TPP 的名称	接头连接的、靶向NRP1的序列(N-至-C末端方向)		SEQ ID NO:
	接头序列	靶向NRP1的肽序列	
TPP1	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGNSNQFVLTSTRPPR	SEQ ID NO: 4
TPP8	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGIATRTPR	SEQ ID NO: 5
TPP11	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGNSKPTRTPRR	SEQ ID NO: 6

[0192] 实施例3:构建和表达/纯化与特异性结合NRP1的肽融合的抗体重链恒定区

[0193] 为了在哺乳动物细胞中表达在实施例2中选择的单个克隆,将从酵母细胞中回收的DNA用BsrGI和HindII限制性内切酶处理,以获得抗体重链恒定区的CH3和特异性结合NRP1的肽部分。如图6所示,将获得的DNA片段克隆至pcDNA3.4载体中。

[0194] 使用HEK293-F系统 (Invitrogen),将编码抗体重链恒定Fc区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白的质粒瞬时转染以表达蛋白。在摇瓶中使用质粒和聚乙烯亚胺 (PEI) (Polyscience) 的混合物转染悬浮在无血清FreeStyle 293表达培养基 (Invitrogen) 中的HEK293-F细胞。对于摇瓶 (Corning) 中的200mL转染,在100ml的培养基中以 2.0×10^6 个细胞/ml的密度接种HEK293-F细胞,并且在8%CO₂以120rpm温育。接着,将编码抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白的质粒在10ml的FreeStyle 293表达培养基

(Invitrogen)中稀释成250 μ g (2.5 μ g/ml),并且与10ml其中稀释了750 μ g PEI (7.5 μ g/ml)的培养基混合。将培养基混合物在室温温育10分钟。接着,将温育的培养基混合物添加至100ml含有接种细胞的培养基中,并且在8%CO₂以120rpm温育4小时,之后向其中添加剩余的100ml的FreeStyle 293表达培养基并温育7天。7天后收集上清液。

[0195] 参考标准实验方案,从收集的细胞培养上清液中纯化蛋白。将抗体应用于蛋白A琼脂糖凝胶柱(GE Healthcare),并用PBS (pH 7.4)洗涤。使用0.1M pH3.0的甘氨酸缓冲液洗脱,然后立即使用1M Tris缓冲液中和样本。洗脱的抗体级分使用Pierce葡聚糖脱盐柱(5K MWC0)用PBS (pH7.4)替换,然后使用MILLIPORE Amicon Ultra (10MWC0)离心浓缩机浓缩。纯化的抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白基于280nm的吸光度和消光系数进行定量。纯化的抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白在还原和非还原条件下在SDS-PAGE上进行分析。

[0196] 图7 (A) 示意性显示Fc-TPP蛋白,其中所选特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定区(Fc)融合。在图7 (A) 中,抗体重链恒定区从N末端铰链开始构建,以便保留两个二硫键以容易地形成二聚体。Fc-TPP蛋白具有特异性结合NRP1的肽通过(GGGGS) X3的接头肽与抗体重链恒定区CH3的末端融合的结构。

[0197] 图7 (B) 显示在还原和非还原条件下纯化的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的SDS-PAGE分析的结果。在图7 (B) 中,各克隆的二聚体形成和纯度在SDS-PAGE上可见。

[0198] 表4显示每升培养物产生纯化的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11蛋白的产率。将一式三份获得的结果进行统计学处理,并且 \pm 表示标准偏差值。产生的蛋白的产率与野生型Fc蛋白和对照Fc-A22p融合蛋白的产率没有显著差异。

[0199] 表4:HEK293细胞中Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的生产产率

[0200]

克隆的名称	产率 (mg/L)
Fc	34.2 \pm 4.8
Fc-A22p	36.1 \pm 5.6
Fc-TPP1	34.2 \pm 3.6
Fc-TPP8	32.5 \pm 3.2
Fc-TPP11	37.6 \pm 2.2

[0201] 实施例4:评价Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白对NRP1和NRP2的b1b2结构域的结合亲和力

[0202] Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白对NRP1和NRP2的b1b2结构域的结合亲和力通过ELISA (酶联免疫吸附测定) 来分析。

[0203] 图8显示为了测量对照Fc-A22p与Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的NRP1结合亲和力而进行的ELISA的结果,其中所选特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定区融合并且其为选自文库的NRP1特异性单个克隆。显示选自文库的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白具有比Fc-A22p高约10倍至60倍的亲和力。

[0204] 为了检查NRP1的特异性,使用NHS-生物素试剂盒 (SIGMA-ALDRICHco., USA) 生物素化对照VEGF165A和Fc-A22p,以及各融合蛋白,其中所选特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定Fc区融合。

[0205] NRP1-b1b2 (273-586) 蛋白、NRP2-b1b2 (275-595) 蛋白和对照组 VEGFR2 (46-753) 各 1 μ g 在室温固定在 96 孔 EIA/RIA 板 (COSTAR Corning In., USA) 的各孔中 1 小时, 然后使用 0.1% PBST (0.1% Tween20, pH 7.4, 137mM NaCl, 10mM 磷酸盐, 2.7mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA) 洗涤 3 次 10 分钟。在使用 5% 脱脂牛奶 (5% 脱脂牛奶, pH 7.4, 137mM NaCl, 10mM 磷酸盐, 2.7mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA) 结合 1 小时后, 各孔使用 0.1% PBST (0.1% Tween20, pH 7.4, 137mM NaCl, 10mM 磷酸盐, 2.7mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA) 洗涤 3 次 10 分钟。生物素化 VEGF165A 和 Fc 各自作为对照, A22p 以及特异性结合神经纤毛蛋白-1 的 TPP11 肽和 Fc-TPP11 作为测试组, 以 10nM (或对于肽为 100nM) 结合, 然后使用 0.1% PBST 洗涤 3 次 10 分钟。将各孔与 AP-缀合的抗生物素抗体结合, 然后与 pNPP (对硝基苯基棕榈酸酯, SIGMA-ALDRICH co., USA) 反应, 然后测量在 405nm 的吸光度。基于与 AP-pNPP 反应 30 分钟而获得的 ELISA 结果, 评价表达和纯化的 Fc-TPP 对 NRP1 和 NRP2 的 b1b2 结构域的结合亲和力。

[0206] 如图 8 (B) 可见, 显示 Fc-TPP11 以高亲和力和高特异性结合 NRP1。

[0207] 此外, 为了进一步定量分析 Fc-TPP1、Fc-TPP8 和 Fc-TPP11 对 NRP1 和 NRP2b1b2 蛋白的结合亲和力, 使用 Biacore 2000 仪器 (GE healthcare) 进行 SPR (表面电浆共振)。

[0208] 具体地, 各 NRP1 和 NRP2b1b2 蛋白在 10mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4.0) 中稀释, 并且固定在约 1000 个响应单位 (RU) 的 CM5 传感器芯片上 (GE healthcare, USA)。为了分析, 以 30 μ l/min 的速率使用 HBS-EP 缓冲液 [10mM Hepes, 3mM 乙二胺四乙酸和 0.005% 表面活性剂 P20 (pH 7.4), GE Healthcare], 并且各 Fc-TPP1、Fc-TPP8 和 Fc-TPP11 融合蛋白以 100nM 至 0.4nM 的浓度使用。使用 Fc-A22p 作为对照。在结合和解离分析后, CM5 芯片的再生通过以 30 μ l/min 的流速冲洗缓冲液 (20mM NaOH, 1M NaCl, pH 10.0) 1 小时来进行。与空白单元相比, 通过 3 分钟结合和 3 分钟解离而获得的各传感图是正常的并减少的。

[0209] 下表 5 显示通过 SPR (表面等离子共振, BIACORE 2000, GE healthcare, USA) 分析 Fc-TPP 蛋白对 NRP1-b1b2 和 NRP2-b1b2 蛋白的亲和力。

[0210] 表 5: 分析融合蛋白的 NRP1-b1b2 和 NRP2-b1b2 亲和力和特异性, 其中所选特异性结合 NRP1 的肽与抗体重链恒定 Fc 区融合

[0211]

	NRP1-b1b2 结合亲和力 (nM)	NRP2-b1b2 结合亲和力 (nM)	结合亲和力比 [(NRP2 的 K_D)/NRP1 的 K_D]
Fc-A22p	63.0 \pm 2.1	62.0 \pm 1.4	0.98
Fc-TPP1	1.81 \pm 0.19	1126 \pm 51	624.8
Fc-TPP8	3.85 \pm 0.52	253.5 \pm 33	65.8
Fc-TPP11	1.65 \pm 0.18	1555 \pm 205	945.3

[0212] 如上表 5 所示, 当特异性结合神经纤毛蛋白-1 的 Fc-TPP1、Fc-TPP8 和 Fc-TPP11 与结合 NRP1 和 NRP2b1b2 蛋白的 Fc-A22p 比较时, 在对 NRP1 的亲和力方面有约 60 倍的差异, 并且对

NRP1的亲合力比对NRP2的亲合力高约60倍至1000倍。在分析中,分析至少5个传感图,并且将一式三份获得的结果进行统计学处理。 \pm 表示独立实验结果的标准偏差值。

[0213] 实施例5:评价Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白与在细胞表面上展示的NRP1的特异性结合以及NRP1介导的内吞作用

[0214] 在特异性结合NRP1的肽的生物鉴定实验中,使用人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 过表达的NRP1。

[0215] 图9显示观察与人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 表面上展示的NRP1共定位的共焦显微镜分析的结果,以便确定Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白是否特异性结合细胞表面上展示的NRP1。

[0216] 具体地,将 5×10^4 个HUVEC细胞添加至24孔板的各孔,并且在5%CO₂和37°C的条件下,在0.5ml的EGM2 (内皮生长培养基, Promocell) 培养基中温育24小时,然后在EBM2 (内皮基础培养基, Promocell) 培养基中温育4小时,之后将Fc、Fc-A22p、Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11各自在0.5ml的1 μ M的EBM2培养基中稀释,并且在4°C温育30分钟。接着,移除培养基,并且使用冷PBS洗涤各孔。然后,其中所选特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定区融合的融合蛋白使用特异性识别Fc的FITC (绿色荧光) -标记的抗体 (Sigma) 染色,并且NRP1使用识别NRP1的一级抗体 (Abcam) 并使用TRITC (红色荧光) 标记的二级抗体染色。细胞核使用DAPI染色 (蓝色荧光) 并通过共焦显微镜分析。

[0217] 如图9所示,不同于Fc, Fc-A22p、Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11结合HUVEC细胞表面上的NRP1。

[0218] 此外,为了检查抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白是否可像其他神经纤毛蛋白配体一样通过NRP1被内吞,通过共焦显微镜观察融合蛋白的内吞作用和融合蛋白的共定位。将Fc、Fc-A22p、Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11各自稀释成1 μ M并且在37°C和5%CO₂的条件下温育10分钟,然后,如上所述,将Fc以及抗体重链恒定区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白染色并通过共焦显微镜分析。

[0219] 图10显示为了观察融合蛋白 (其中所选特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定Fc区融合) 与NRP1的共定位,以便确认Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白是否可通过NRP1被内吞而进行的共焦显微镜的结果。如图10所示,对照Fc没有被内吞,并且特异性结合NRP1的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11比结合NRP1和NRP2的Fc-A22p更多被内吞,表明这些融合蛋白与NRP1更多共定位。这表明Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11可被NRP1特异性内吞。

[0220] 实施例6:评价增强的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的细胞穿透能力

[0221] (1) 检查HUVEC中Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的生物学机制的蛋白质印迹分析

[0222] 已知导向蛋白3A或VEGF165A使用NRP1作为共受体增强血管穿透性。在该操作中,发生变化,诸如血管内皮 (VD) 钙粘蛋白、磷酸化等的降低。即,VE-钙粘蛋白或上皮 (E) -钙粘蛋白是形成内皮细胞之间或上皮细胞之间细胞间隙的粘附因子,并且这种分子的减少使细胞间隙致密以干扰物质移动。

[0223] 在可间接证明血管穿透性增加的实验方法中,VE-钙粘蛋白的变化通过蛋白质印迹分析来分析。具体地,将 5×10^5 个HUVEC细胞接种至6孔板的各孔中并温育24小时,然后使用0.1 μ M抗体重链恒定Fc区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白处理10分钟,接着进行

蛋白质印迹分析。在SDS-PAGE之后,凝胶被转移至PVDF膜,并且使用识别VE-钙粘蛋白和 β -肌动蛋白的一级抗体(SantaCruz)并使用HRP缀合的二级抗体(SantaCruz)进行检测,并且使用ImageQuant LAS4000mini(GE Healthcare)进行分析。

[0224] 图11(A)显示为了检查HUVEC中Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的生物学机制而进行的蛋白质印迹分析的结果。如图11(A)所示,不同于Fc的情况,在对照VEGF165A和Fc-A22p的情况下,观察到VE-钙粘蛋白的减少。在对NRP1特异的Fc-TPP8和Fc-TPP11的情况下,也观察到VE-钙粘蛋白的减少。然而,在Fc-TPP1的情况下,VE-钙粘蛋白的减少不显著。在Fc-A22p的情况下,在使用 $1\mu\text{M}$ 的Fc-A22p处理时,VE-钙粘蛋白显著减少。在以高亲和力特异性结合NRP1的Fc-TPP8和Fc-TPP11的情况下,即使在 $0.1\mu\text{M}$ 也观察到VE-钙粘蛋白的显著减少,其比Fc-A22p的低10倍。其中,观察到Fc-TPP11最有效地诱导VE-钙粘蛋白的减少。

[0225] (2) 检查Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白穿透血管内皮细胞的能力的Transwell测定

[0226] 基于上述实验结果,为了检查融合蛋白是否具有改善穿透血管内皮细胞的能力,使Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白进行Transwell测定。

[0227] 具体地,将 5×10^4 个人脐静脉内皮细胞(HUVEC)接种至transwell板(Corning)的上室(upper chamber)并且在 37°C 和 $5\%\text{CO}_2$ 的条件下在EGM2中温育3天。接着,使用EBM培养基替换该培养基,并且使用各约 1.3nM 的对照VEGF165A和各 $1\mu\text{M}$ 的Fc-A22p、Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11处理细胞。然后,将 $50\mu\text{l}$ 的葡萄糖-FITC(Sigma)添加至上室。在30分钟后,基于当增加穿透入血管内皮细胞时会观察到荧光物质的原理,将培养基从下室中取样并测量它的荧光性。

[0228] 图11(B)显示为了确证特异性结合NRP1的肽是否具有改善的穿透人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的能力而进行的Transwell测定的结果。如图11(B)所示,VEGF165A和Fc-A22p具有增加的穿透血管内皮细胞的能力,并且不同于Fc,对NRP1特异性的Fc-TPP8和Fc-TPP11具有增加的穿透血管内皮细胞的能力。另一方面,Fc-TPP1具有极低的穿透血管内皮细胞的能力。将结果结合在一起,确证图11(A)和11(B)所示的结果彼此紧密相连,并且在这些其中所选特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定Fc区融合的融合肽中,,Fc-TPP11是最有效的肿瘤穿透肽(TPP),其通过NRP1穿透肿瘤组织。

[0229] (3) 检查小鼠模型中增强的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白穿透的免疫组织化学(IHC)实验

[0230] 在以上实施例6(1)和6(2)中,在体外发现抗体重链恒定Fc区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白具有增强的穿透血管内皮细胞的能力。因此,为了确证小鼠模型中增强的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白穿透,进行免疫组织化学(IHC)实验。

[0231] 为了确证Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白具有增强的穿透肿瘤组织的能力,将表达神经纤毛蛋白-1的 5×10^6 个A431细胞皮下注射至Balb/c裸鼠,并且在约9天后,当肿瘤体积达到约 300 至 400mm^3 时,将各PBS、Fc、Fc-A22p、Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11以 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的量静脉注射至小鼠。在注射后15小时,从小鼠中提取肿瘤并进行免疫组织化学。将提取的肿瘤组织通过冷冻切片法切成 $20\mu\text{m}$ 厚度的片,并且使用一级抗体CD31抗体(BDPharmingen)和识别相同物的TRITC(红色荧光)标记的二级抗体将血管染色。此外,为了观察组织中Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白的分布,使用识别Fc的FITC(绿色荧光)

标记的抗体。

[0232] 图12显示为了确证特异性结合NRP1的肽的实际肿瘤组织穿透而进行的免疫组织化学的结果。如图12所示,不同于对照PBS和Fc,Fc-A22p选择性地到达肿瘤组织,并且对NRP1特异性的Fc-TPP1和Fc-TPP11也穿透肿瘤组织。此外,显示对NRP1具有更高选择性和亲和力的Fc-TPP1和Fc-TPP11比Fc-A22p更有效地穿透组织。然而,Fc-TPP8没有穿透肿瘤组织。因为Fc-TPP1和Fc-TPP11对NRP1具有高亲和力,它们选择性地到达表达NRP1的肿瘤组织。此外,因为Fc-TPP11具有比Fc-TPP1更高的穿透肿瘤组织的能力,所以其更广泛地分布于肿瘤组织。

[0233] (4) 检查增强的Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11穿透癌细胞的能力

[0234] 为了检查Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11融合蛋白是否也具有增强的穿透癌细胞的能力,通过蛋白质印迹分析在与上述相同的条件下分析表达NRP1的人头颈癌FaDu细胞中E-钙粘蛋白的变化。

[0235] 图13(A)显示为了检查在人头颈癌FaDu细胞中E-钙粘蛋白的变化而进行的蛋白质印迹分析的结果。如图13(A)所示,Fc-A22p诱导E-钙粘蛋白的减少。此外,在NRP1-特异性Fc-TPP1、Fc-TPP8和Fc-TPP11的情况下,也观察到E-钙粘蛋白的减少。如在实施例6(1)和6(2)获得的体外结果,Fc-TPP11最有效地诱导E-钙粘蛋白的减少。

[0236] (5) 检查癌细胞中肿瘤穿透的离体肿瘤穿透测定

[0237] 此外,为了检查Fc-TPP是否减轻上皮细胞之间的细胞间隙,即使在没有血管的情况下仍穿透肿瘤组织,而进行离体肿瘤穿透测定。在实验方法中,将 5×10^6 个FaDu细胞皮下注射至Balb/c裸鼠(Nara Biotec,4周龄,雌性),并且在约10天后,当肿瘤体积达到约300至400mm³时,提取肿瘤组织。提取的肿瘤组织使用含有1%BSA的MEM培养基(Welgene)洗涤,然后在37°C和5%CO₂的条件下,使用对照PBS和Fc以及测试样本Fc-TPP11各3μM温育2小时30分钟。温育的组织使用含有1%BSA的MEM培养基洗涤两次每次10分钟,使用4%多聚甲醛固定,然后进行免疫组织化学。肿瘤组织通过冷冻切片法切割成20μm厚度的片,并且使用识别Fc的FITC(绿色荧光)标记的抗体染色以便观察Fc和Fc-TPP11。

[0238] 图13(B)显示由于NRP1介导的肿瘤组织穿透活性与由血液流动引起的传送无关,为了检查Fc-TPP11是否可穿透肿瘤组织而进行的离体肿瘤穿透测定的结果。如图13(B)所示,观察到对照Fc没有穿透肿瘤组织,而Fc-TPP11即使在没有血管的情况下仍结合肿瘤组织。这表明Fc-TPP11允许NRP1减少E-钙粘蛋白从而调节上皮组织的细胞间隙,使Fc-TPP11具有穿透肿瘤组织的能力。

[0239] 实施例7:评价TPP11肽和VEGF165A对NRP1-b1b2的竞争性结合

[0240] 为了评价特异性结合NRP1而不结合NRP2的TPP11肽,以及已知结合NRP1-b1结构域的精氨酸结合口袋的VEGF165A和RPARPAR肽的竞争结合,而进行竞争性ELISA。

[0241] 具体地,NRP1-b1b2(273-586)蛋白与96孔EIA/RIA板或96孔EIA/RIA黑色板(COSTAR Corning In.,USA)的各孔在室温结合1小时,接着使用0.1%PBST(0.1%Tween20,pH 7.4,137mM NaCl,10mM磷酸盐,2.7mM KCl,SIGMA-ALDRICH co.,USA)洗涤3次10分钟。在与5%脱脂牛奶(5%脱脂牛奶,pH 7.4,137mM NaCl,10mM磷酸盐,2.7mM KCl,SIGMA-ALDRICH co.,USA)结合1小时后,使用0.1%PBST(0.1%Tween20,pH 7.4,137mM NaCl,10mM磷酸盐,2.7mM KCl,SIGMA-ALDRICH co.,USA)洗涤各孔3次10分钟。制备Fc-A22p(50nM)和

Fc-TPP1的混合物,以及Fc-TPP11 (3nM) 和VEGF165A (25nM至0.02nM) 的混合物,使各混合物与NRP1-b1b2蛋白结合。然后,各混合物与AP缀合的抗人抗体(碱性磷酸酶缀合的抗人mAb, Sigma, USA) 温育,并且测量405nm的吸光度。ELISA结果表明Fc-TPP1和Fc-TPP11与VEGF165A竞争性结合NRP1-b1b2。

[0242] 图14 (A) 显示分析Fc-A22p、Fc-TPP1和Fc-TPP11与VEGF165A是否会竞争性结合NRP1的结果。显示了Fc-TPP1、Fc-TPP11和Fc-A22p结合的NRP1的部分与VEGF165A结合的NRP1的部分重叠。此外,显示Fc-TPP1和Fc-TPP11对NRP1具有高亲和力。这表明Fc-TPP1和Fc-TPP11结合NRP1-b1b2的位置是VEGF165A结合的精氨酸结合口袋。

[0243] 图14 (B) 显示评价已知与NRP1-b1结构域的精氨酸结合口袋结合的VEGF165A和RPARPAR肽的竞争性结合的结果。显示一种小肽TPP11肽抑制RPARPAR肽和VEGF165与NRP1结合。这证明TPP11结合NRP1-b1的精氨酸结合口袋。

[0244] 实施例8:评价抗Fc-TPP11的血管生成活性

[0245] (1) 检查Fc-TPP11在HUVEC中抑制血管形成的能力的血管形成测定

[0246] 已知VEGF165A使用NRP1作为共受体抑制血管生成。基于此,作为能够观察体外血管生成的方法,进行血管形成测定。在实验方法中,将50 μ l的ECMatrix添加至96孔板中并在37 $^{\circ}$ C聚合2小时。在2小时后,将HUVEC细胞悬浮于EBM2培养基,与VEGF165A (20ng/ml)、Fc或Fc-TPP11 (1 μ M) 混合,以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种在ECMatrix上,并且温育8小时。温育的细胞使用显微镜成像。

[0247] 图15 (A) 显示为了检查抑制血管形成的能力而进行的血管形成测定的结果。如图15 (A) 所示,血管形成在使用VEGF165A处理的细胞中增加,并且不同于Fc, Fc-TPP11抑制血管形成。

[0248] (2) 检查Fc-TPP11的抗血管生成活性的体内基质胶塞测定

[0249] 此外,为了检查体内抗血管生成活性,进行基质胶塞测定。在实验方法中,各6-8周龄Balb/c裸鼠皮下注射 7.5×10^6 个A431细胞、200 μ g的Fc、Fc-A22p或Fc-TPP11和0.4ml基质胶(BD Biosciences)。8天后,提取基质胶塞,成像(图15 (B)),然后通过冷冻切片法切割成20 μ m厚度的片,并且进行免疫组织化学。使用一级抗体CD31和识别相同物的TRITC(红色荧光)标记的二级抗体将血管染色,并且测量血管的密度。图15 (C) 显示表明Fc-TPP11在活体小鼠中可抑制VEGF165A诱导的血管生成的结果。

[0250] (3) 检查Fc-TPP11对血管内皮细胞迁移的抑制活性的伤口愈合测定

[0251] 除了在实施例8 (1) 和8 (2) 中获得的结果之外,为了检查Fc-TPP11对VEGF165A诱导的血管内皮细胞迁移的抑制活性,进行伤口愈合测定。在实验方法中,将 5×10^5 个HUVEC细胞接种至6孔板的各孔,然后在含有1 μ g/ml丝裂霉素c的0.5%血清EBM2培养基中温育1小时直到细胞在板中饱和(95%以上)。平皿底部使用黄色尖端直线摩擦使损伤线宽度一致。然后,使用PBS洗涤细胞,使细胞从底部分离。在除去PBS后,将培养基缓慢添加到HUVEC细胞中。使用0或20ng/ml的VEGF165A处理细胞,使用Fc和Fc-TPP11 (1 μ M) 的每个进行处理,然后在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下温育。细胞在0小时和18小时使用显微镜(Primo vert, Carl Zeiss co., Germany) 成像,并且将使用包括在显微镜中的计算机程序测量的两端之间的距离进行统计学处理。

[0252] 图16 (A) 显示为了检查Fc-TPP11是否抑制VEGF165A诱导的血管内皮细胞迁移而进

行的伤口愈合测定的结果。不同于Fc,对照VEGF165A增加血管内皮细胞的迁移活性,并且Fc-TPP11抑制血管内皮细胞的迁移活性。这表明Fc-TPP11特异性结合神经纤毛蛋白-1,以抑制VEGF165A与NRP1-b1的精氨酸结合口袋结合,从而通过VEGF165A抑制血管内皮细胞的迁移活性。

[0253] (4) 检查Fc-TPP11对血管内皮细胞的侵袭的抑制活性的Transwell测定

[0254] 此外,为了检查Fc-TPP11对VEGF165A诱导的血管内皮细胞的侵袭的抑制活性,进行transwell测定。使用具有8-mm孔径的聚碳酸酯膜的transwell (Corning Costar, USA)。以1:10的比例在过滤器的下层表面上涂布基质胶 (Corning Costar, USA),并且在37°C和5%CO₂的条件下聚合2小时,然后将5x10⁴个HUVEC细胞和Fc和Fc-TPP11 (1μM) 的每个接种在上层孔的EBM2培养基中。此外,将含有VEGF165A (20ng/ml) 的EBM2培养基添加至下层孔。接着,将细胞在37°C和5%CO₂的条件下温育12小时,然后使用棉花移除上层孔中未移动的细胞,并且使用4%多聚甲醛固定细胞。然后,细胞使用结晶紫染色。使用显微镜观察移动的细胞并计数。

[0255] 图16 (B) 显示transwell测定的结果,其表明Fc-TPP11抑制VEGF165A诱导的HUVEC细胞侵袭。对照VEGF165A增加血管内皮细胞的侵袭活性,而Fc-TPP11抑制血管内皮细胞的侵袭活性。这表明Fc-TPP11与NRP1-b1的精氨酸结合口袋特异性结合,以抑制VEGF165A与NRP1的结合,使Fc-TPP11通过VEGF165A抑制血管内皮细胞的侵袭活性。

[0256] 实施例9:Fc-TPP11对肿瘤生长和血管生成的抑制活性的体内评价

[0257] 在实施例8中,确证了Fc-TPP11的抗血管生成。因此,为了检查Fc-TPP11是否具有由小鼠模型中抗血管生成活性引起的肿瘤生长抑制活性,将各Balb/c裸鼠皮下注射5x10⁶个细胞,然后注射Fc-TPP11。具体地,在细胞移植后约5天,当肿瘤体积达到约60mm³时,Fc和Fc-TPP11各20mg/kg以3天间隔静脉注射至各小鼠六次 (N=6)。

[0258] 如图17 (A) 所示,不同于对照PBS和Fc,Fc-TPP11抑制癌细胞生长。此外,如图17 (B) 所示,Fc-TPP11显示小鼠体重与PBS和Fc的情况没有差异,这表明Fc-TPP11无毒。

[0259] 图17 (C) 显示进行在上述实验中提取的肿瘤的免疫组织化学 (IHC) 的结果,假设如图17 (A) 所示的Fc-TPP11的肿瘤生长抑制活性可归因于其抗血管生成活性。生成血管的血管使用CD31抗体染色,并且血管周围的周细胞使用α-SMA染色,接着使用共焦显微镜观察。结果是,与注射对照PBS或Fc的小鼠中的血管密度相比,注射Fc-TPP11的小鼠肿瘤组织中的血管密度减小,并且因此血管和周细胞之间的共定位减小。这表明Fc-TPP11抑制从肿瘤产生的VEGF165A诱导的血管生成。

[0260] 将上述实验结果结合在一起,如图19所示,确证融合蛋白 (Fc-TPP),其中所选特异性结合NRP1而不结合NRP2的肽与抗体重链恒定Fc区融合,即使当其特异性结合NRP1时,仍显示信号传导趋势,诸如VE-钙粘蛋白或E-钙粘蛋白的减少。此外,显示当特异性结合NRP1的肽单独存在时,它没有诱导显著的NRP1信号传导,但是当肽作为二价结合形式的Fc-TPP融合蛋白存在时,它有效地诱导信号传导。这表明融合蛋白,其中特异性结合NRP1的肽与抗体重链恒定Fc区融合,与NRP1二价结合以诱导NRP1信号传导,从而展现有效的生物活性。此外,特异性针对NRP1的Fc-TPP融合蛋白与VEGF165A竞争性结合NRP1,从而抑制VEGF165A诱导的血管生成,表明它具有抑制体内肿瘤生长的活性。此外,通过融合所选肽中的TPP11而获得的Fc-TPP11在肿瘤穿透中是最有效的。

[0261] 实施例10:评价与Fc-TPP11共同施用的小分子药物增强的肿瘤组织积聚和穿透

[0262] 为了检查与上述实验中构建的Fc-TPP11共同施用的小分子药物的肿瘤组织穿透,进行免疫组织化学。具体地,将各Ba1b/c裸鼠皮下注射 5×10^6 个FaDu细胞,并且在约15天后,当肿瘤体积达到大约300至400mm³时,将10mg/kg的抗癌药物多柔比星和各2.5mg/kg的PBS、Fc和Fc-TPP11静脉注射至各小鼠。在注射后1小时,小鼠心脏使用PBS灌注,并使用4%多聚甲醛灌注以固定组织。接着,提取肿瘤组织并进行免疫组织化学。提取的肿瘤通过冷冻切片法切成20 μ m厚度的片,并且使用一级抗体CD31(BD Pharmingen)和识别相同物的FITC(绿色荧光)标记的二级抗体将血管染色。观察到分布在组织中的多柔比星本身显示红色荧光。

[0263] 图18(A)显示为了检查与Fc-TPP11共同施用的多柔比星的肿瘤组织穿透而进行的免疫组织化学(IHC)的结果。从中可见,在FaDu癌细胞组织中,在多柔比星的情况下几乎没有或没有观察到红色荧光,而与只有多柔比星相比,与Fc-TPP11共同施用的多柔比星穿透距离血管更远的组织。此外,观察到多柔比星和对照Fc的共同施用对穿透没有影响。

[0264] 图18(B)显示通过均质化提取的肿瘤组织并测量肿瘤组织中多柔比星的荧光值以便定量测定组织中多柔比星的积聚而获得的结果。根据与用于图18(A)的方法相同的方法,将多柔比星和各PBS、Fc和Fc-TPP11静脉注射至小鼠,并且使用PBS灌注小鼠心脏,并且提取肿瘤组织。提取的组织在1ml的含有1%SDS(十二烷基硫酸钠)和1mM硫酸的裂解缓冲液中裂解。然后,氯仿和异丙醇1:1的混合物与裂解组织以2:1的比例混合,然后在-80 $^{\circ}$ C冷冻。然后,在37 $^{\circ}$ C解冻组织并离心,并且测量上清液的荧光(激发485nm/发射528nm)以定量穿透的多柔比星的量。

[0265] 上述结果表明特异性结合NRP1的肿瘤穿透肽通常可应用于各种小分子药物。

[0266] 实施例11:构建并生成TPP11融合的全长抗体(mAb-TPP11)

[0267] 在实施例7和8中,在体外和体内发现抗体重链恒定Fc区和所选特异性结合NRP1的肽的融合蛋白具有增强的穿透血管内皮细胞的能力。因此,为了在小鼠模型中证明特异性结合NRP1的肽的作用,选择抗EGFR抗体西妥昔单抗(其为一种治疗实体瘤的抗体)作为特异性结合mAb-NRP1的肽的模型抗体。为了构建西妥昔单抗-TPP11,在用于生成TPP11肽和如上述实施例3所述的抗体重链恒定区(Fc)的融合蛋白的载体中,通过使用BsrGI和HindII限制性内切酶而获得的抗体重链恒定区CH3的TPP11融合DNA被替换为编码野生型西妥昔单抗重链的载体。图20是构建的西妥昔单抗重链-TPP11的示意图,并且图21显示编码野生型西妥昔单抗的轻链的载体。

[0268] 图22(A)是西妥昔单抗-TPP11,即TPP11肽融合的全长IgG单克隆抗体的示意图。抗体的表达和纯化根据实施例3中所述的方法在HEK293F中进行,并且抗体的纯度通过SDS-PAGE进行分析。图22(B)显示通过将抗体共同转化至HEK293F细胞中,瞬时表达并纯化抗体,然后在还原和非还原的条件下在SDS-PAGE上分析抗体的尺寸和纯度而获得的结果。

[0269] 下表6显示每升培养物产生的纯化TPP11融合抗体的产率。碱一式三份获得的结果进行统计学处理,并且 \pm 表示标准偏差值。产生的蛋白(西妥昔单抗-TPP11)的产率与野生型蛋白(西妥昔单抗)的产率没有显著差异。

[0270] 表6:比较TPP11肽融合的抗体与野生型抗体的表达/纯化产率

[0271]

克隆的名称	产率 (mg/L)
西妥昔单抗	39.9±6.2
西妥昔单抗-TPP11	40.2±5.0

[0272] 图22(C)显示为了如上述实施例4所述比较TPP11融合的西妥昔单抗-TPP11的EGFR结合亲和力与野生型抗体(西妥昔单抗)的结合亲和力而进行的ELISA的结果。显示即使当TPP11与西妥昔单抗融合时,其也不影响西妥昔单抗与抗原EGFR的结合亲和力。

[0273] 实施例12:评价增强的西妥昔单抗-TPP11抗体的组织穿透能力

[0274] 为了评价在上述实验中构建的TPP11肽融合抗体的肿瘤组织穿透,将各Balb/c裸鼠皮下注射 5×10^6 个FaDu细胞,并且在约9天后,当肿瘤体积达到约300至400mm³时,将1.25mg/kg的PBS、西妥昔单抗和西妥昔单抗-TPP11静脉注射至各小鼠。注射后3小时,从小鼠中提取肿瘤并进行免疫组织化学。将组织染色并且以与实施例6中所述的相同方式观察。

[0275] 图23显示为了评价TPP11肽融合的西妥昔单抗的肿瘤组织穿透而进行的免疫组织化学(IHC)的结果。从中可见,在西妥昔单抗的情况下,在FaDu癌细胞组织的血管周围观察到绿色荧光,而与西妥昔单抗相比,TPP11融合的西妥昔单抗-TPP11穿透距离血管更远的组织。为了定量此穿透,使用ImageJ程序。具体地,与西妥昔单抗-A22p相比,对NRP1具有更高结合亲和力的TPP11融合的西妥昔单抗-TPP11更有效地穿透组织。上述结果表明特异性结合NRP1的肿瘤穿透肽通常可应用于识别各种抗原的各种单克隆抗体。

序列表

<110> 亚洲大学校产学协力团

<120> 神经纤毛蛋白-1特异性结合的肽、与所述肽融合的融合蛋白以及它们的用途

<130> PF-B1930

<140> PCT/KR2016/002942

<141> 2016-03-23

<150> 10-2015-0040164

<151> 2015-03-23

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TPP1

<400> 1

His	Thr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asn	Gln	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	Thr	Arg	Pro
1				5					10					15	

Pro Arg

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TPP8

<400> 2

His	Thr	Pro	Gly	Ile	Ala	Thr	Arg	Thr	Pro	Arg
1				5					10	

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TPP11

<400> 3

His	Thr	Pro	Gly	Asn	Ser	Lys	Pro	Thr	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg
1				5					10				

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接至接头的TPP1

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His

1 5 10 15

Thr Pro Gly Asn Ser Asn Gln Phe Val Leu Thr Ser Thr Arg Pro Pro

 20 25 30

Arg

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接至接头的TPP8

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His

1 5 10 15

Thr Pro Gly Ile Ala Thr Arg Thr Pro Arg

 20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接至接头的TPP11

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His

1 5 10 15

Thr Pro Gly Asn Ser Lys Pro Thr Arg Thr Pro Arg Arg

 20 25

<210> 7

<211> 26

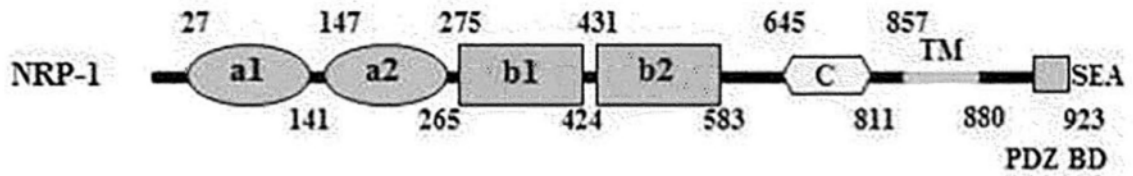
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物	
<400> 7	
catcgagaaa accatctcca aagcca	26
<210> 8	
<211> 127	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物	
<400> 8	
aaagtcgatt ttgttacatc tacactgttg ttatcagatc tcgagaagct taccavdnvd	60
nvdnvdnvdn vdnvdnvdn dnvdnvdnvd nvdnvdnvdn vdnvdnvdnt ccaggagtat	120
gtgatcc	127

(A) 神经纤毛蛋白-1



(B) 神经纤毛蛋白-2

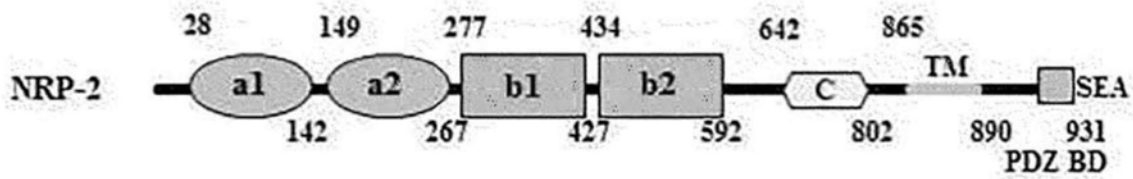


图1

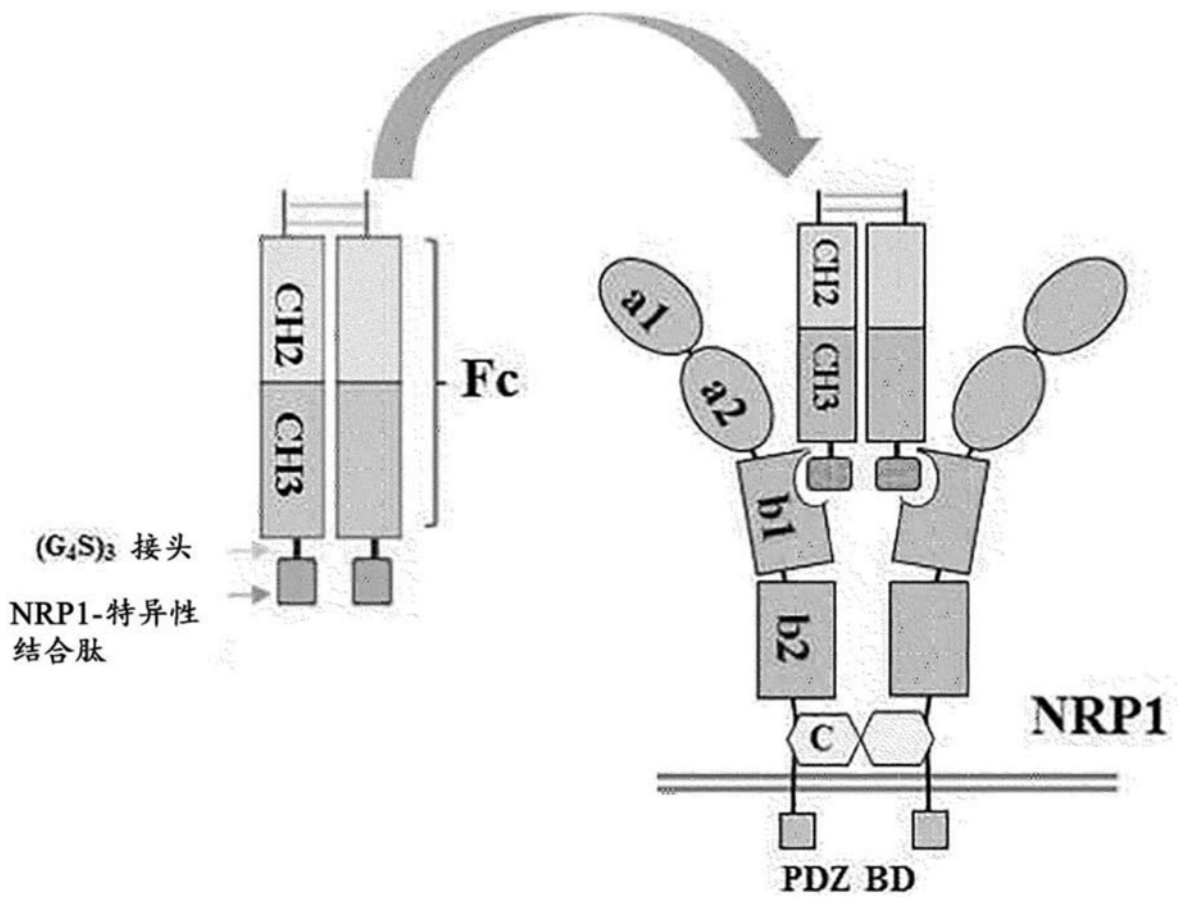


图2

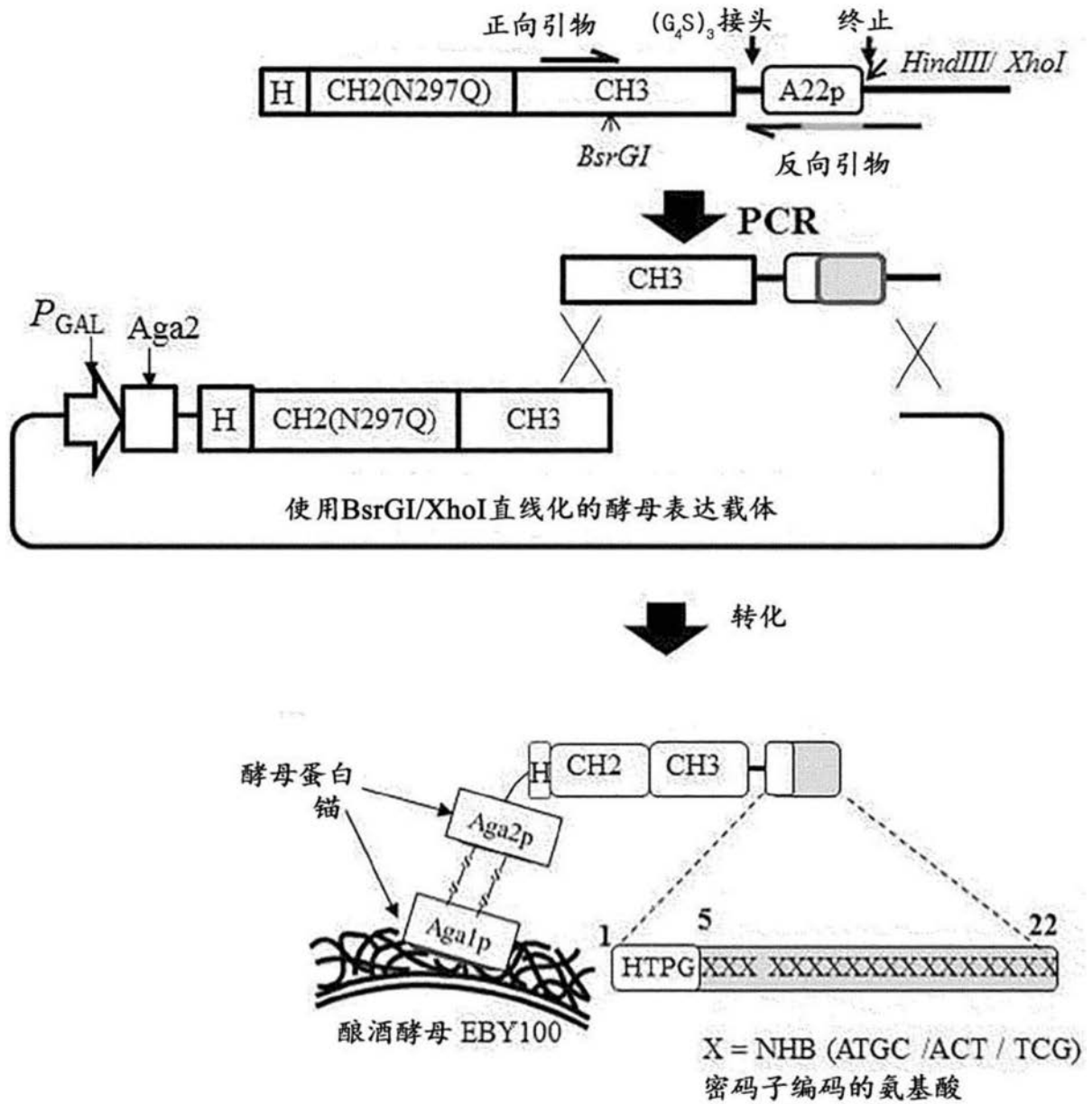


图3

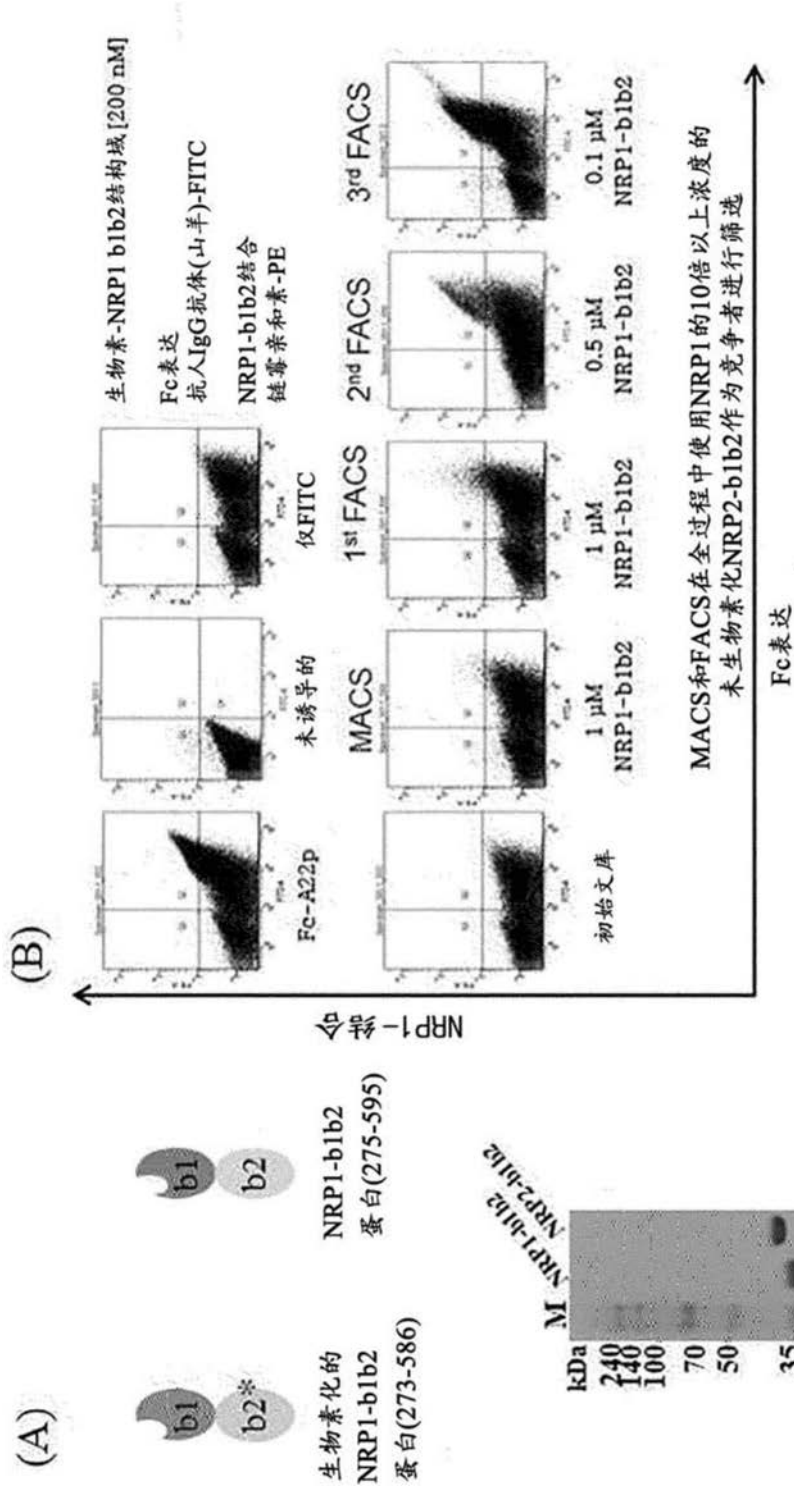


图4

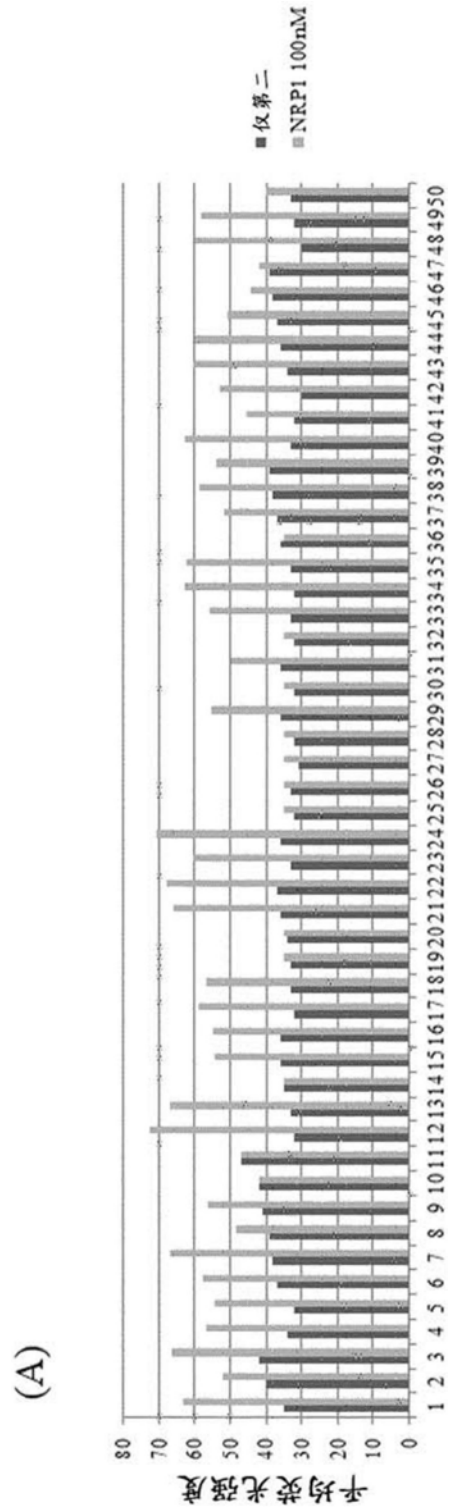


图5a

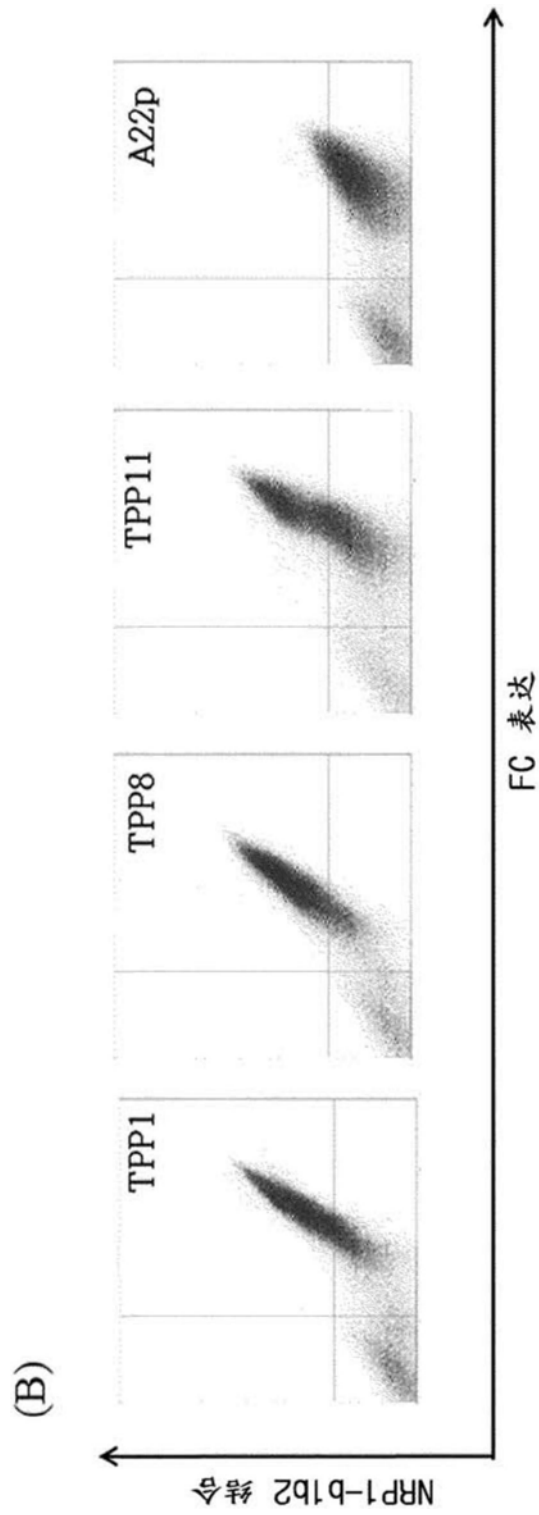


图5b

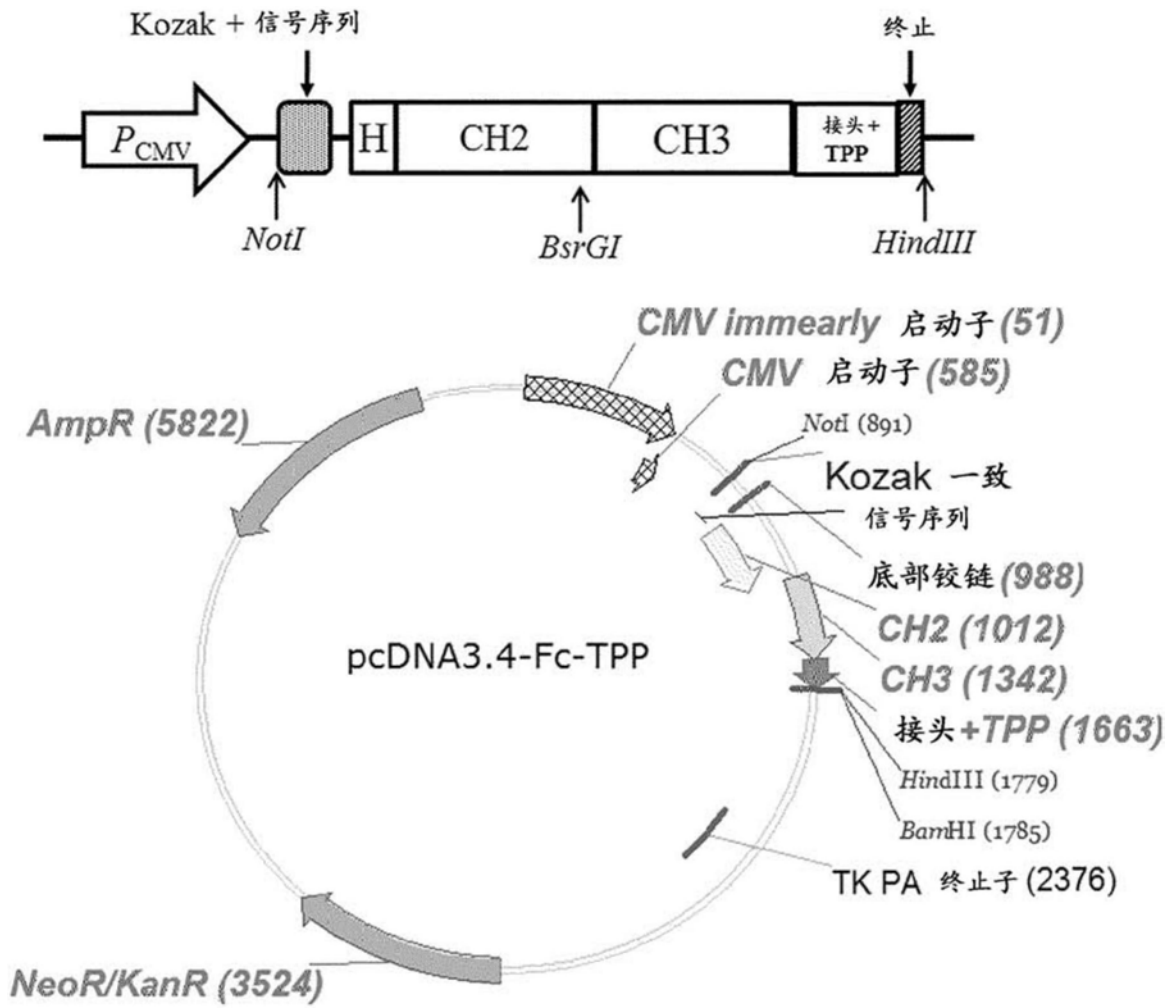


图6

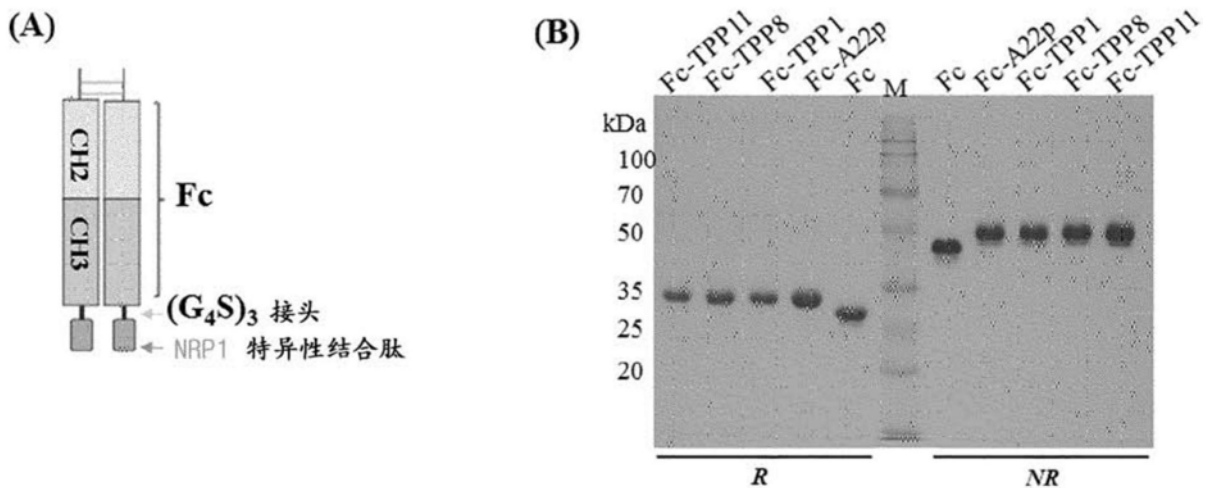
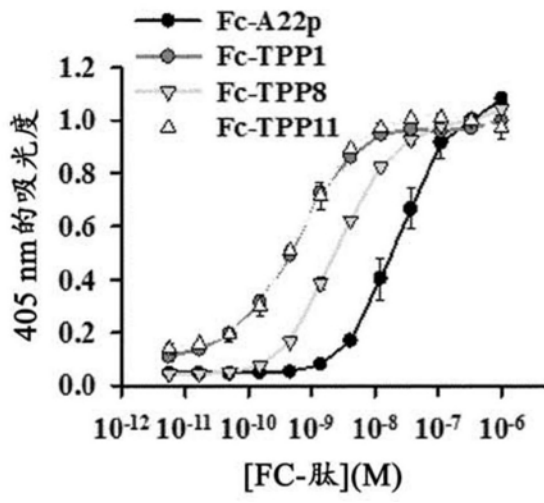


图7

(A)



(B)

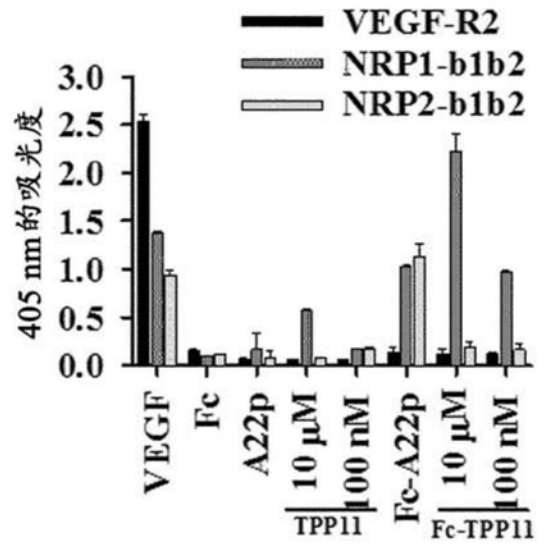


图8

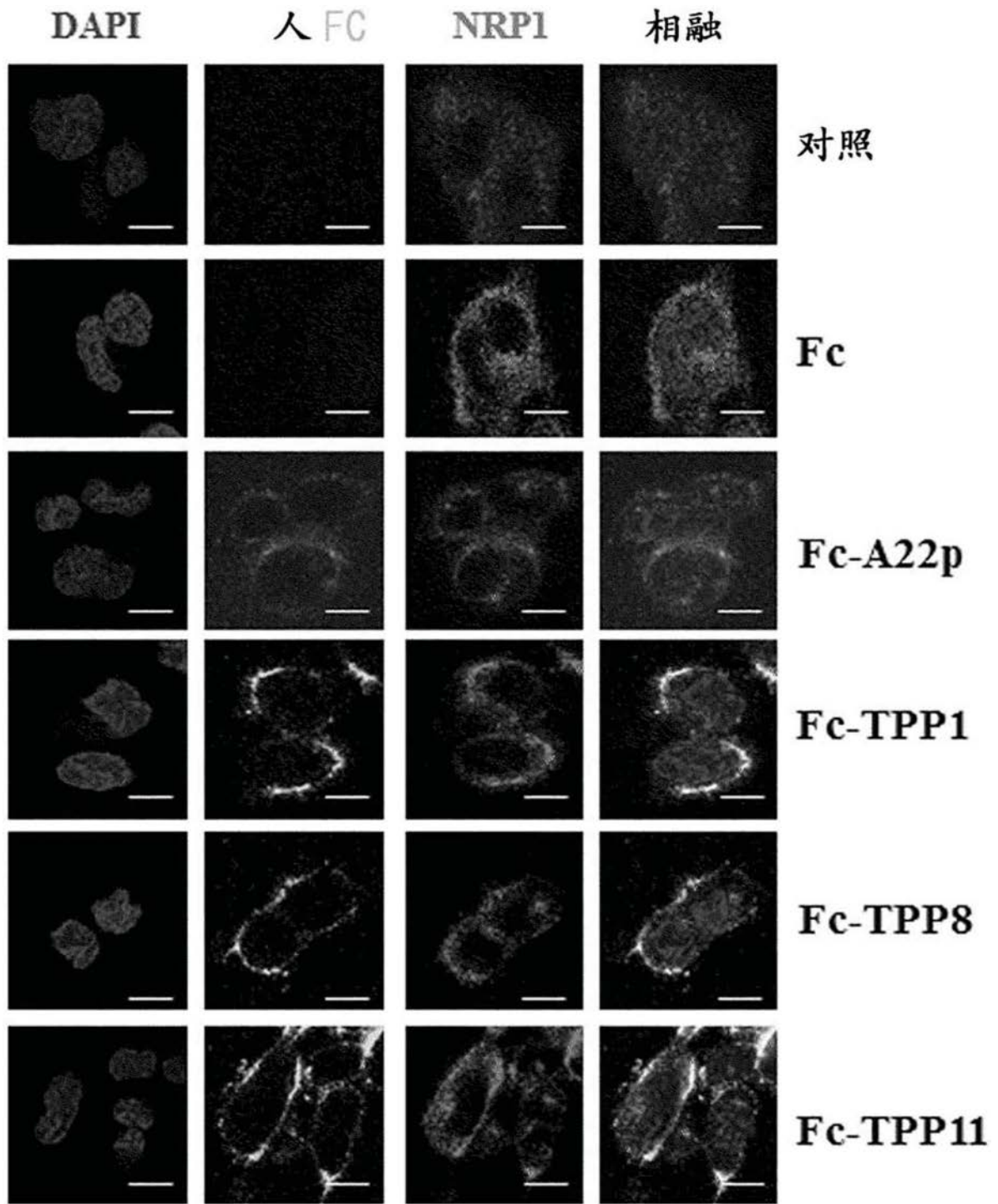


图9

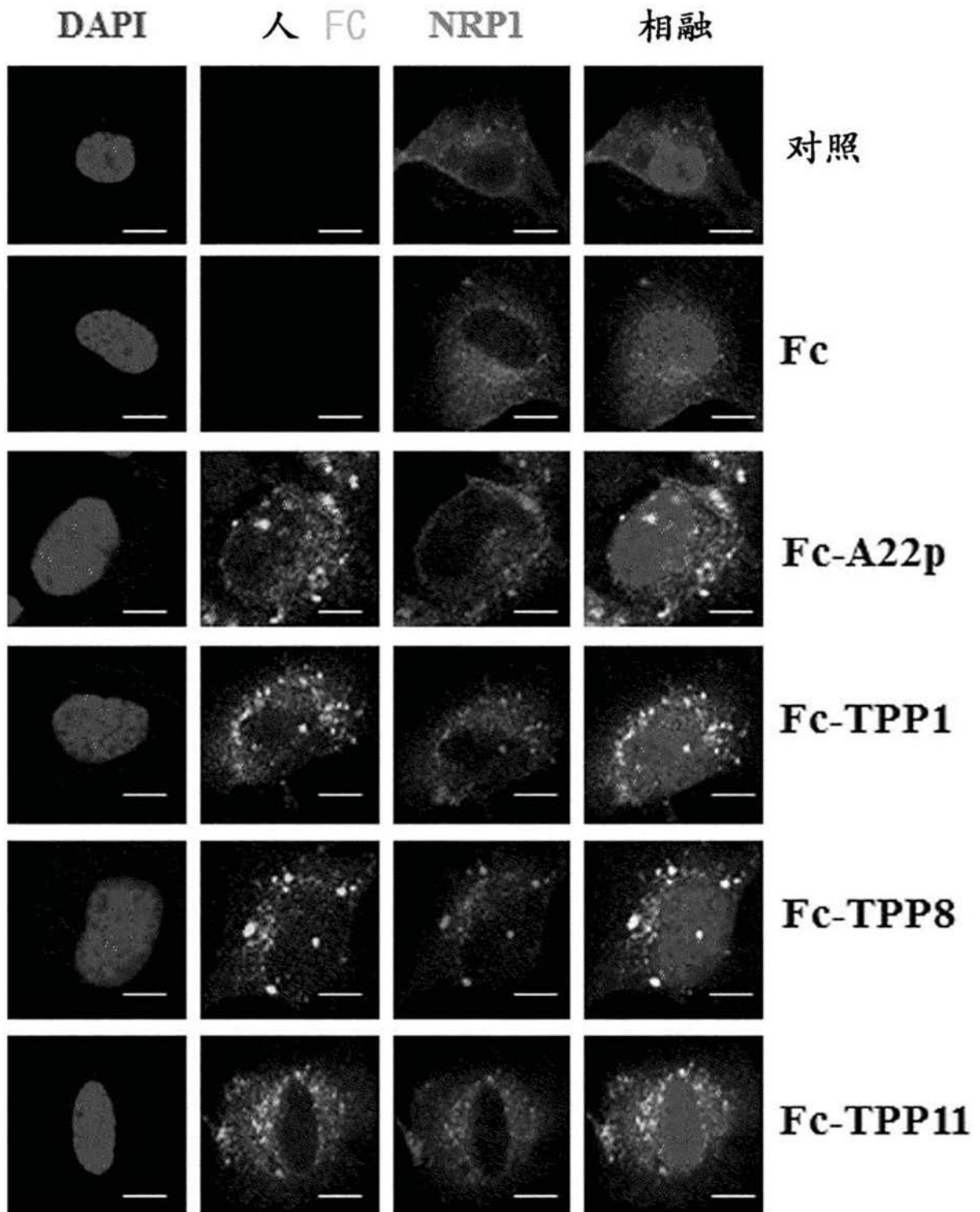


图10

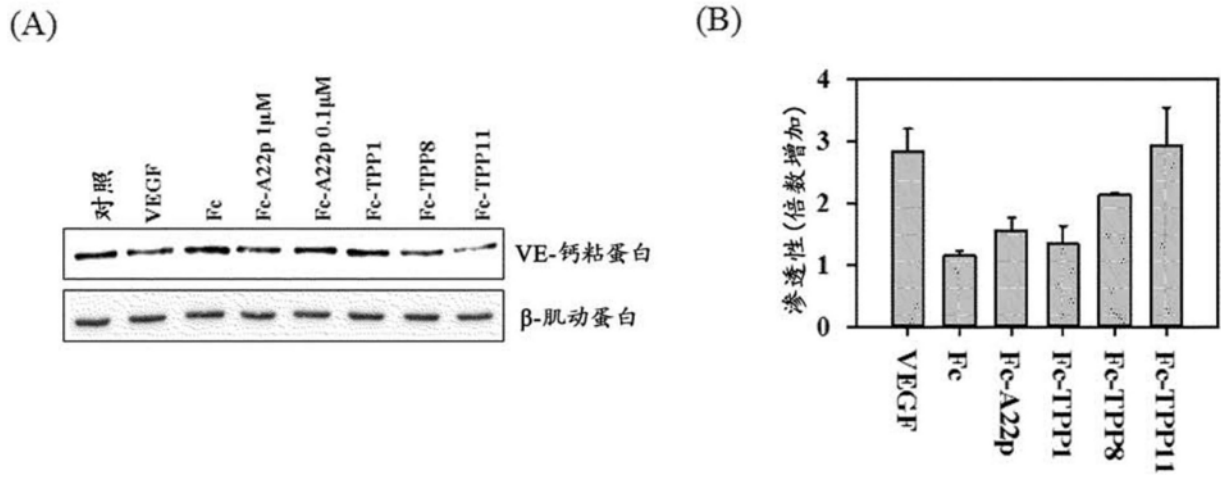


图11

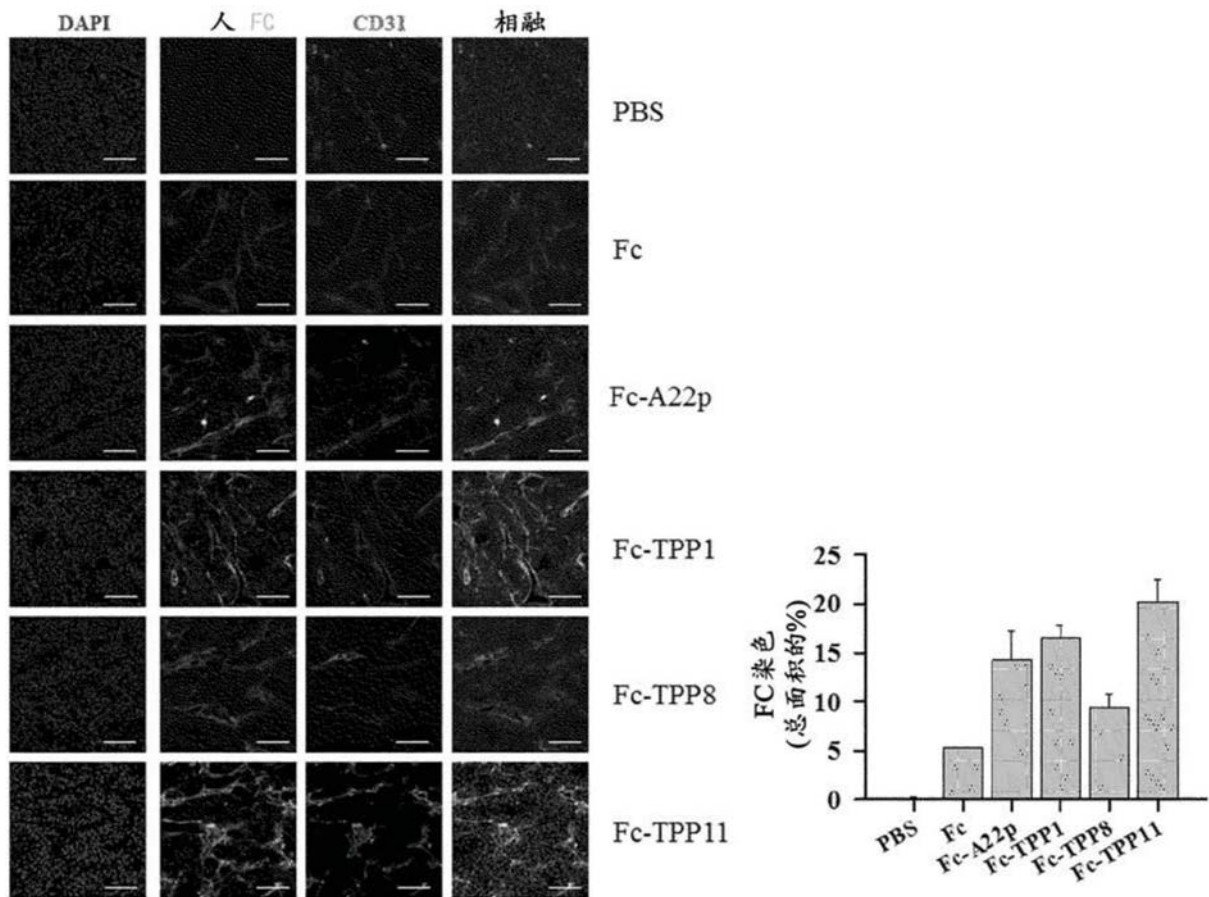


图12

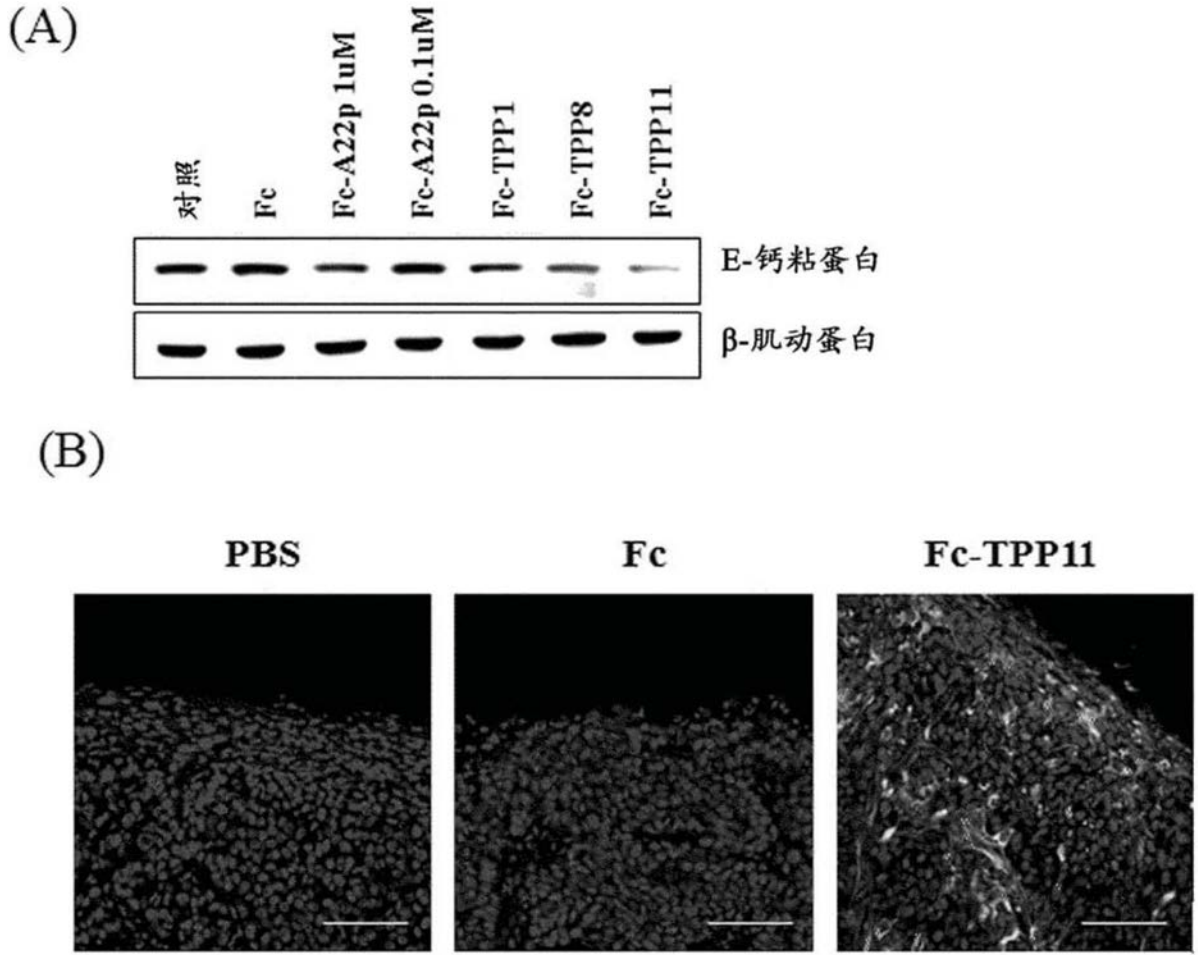


图13

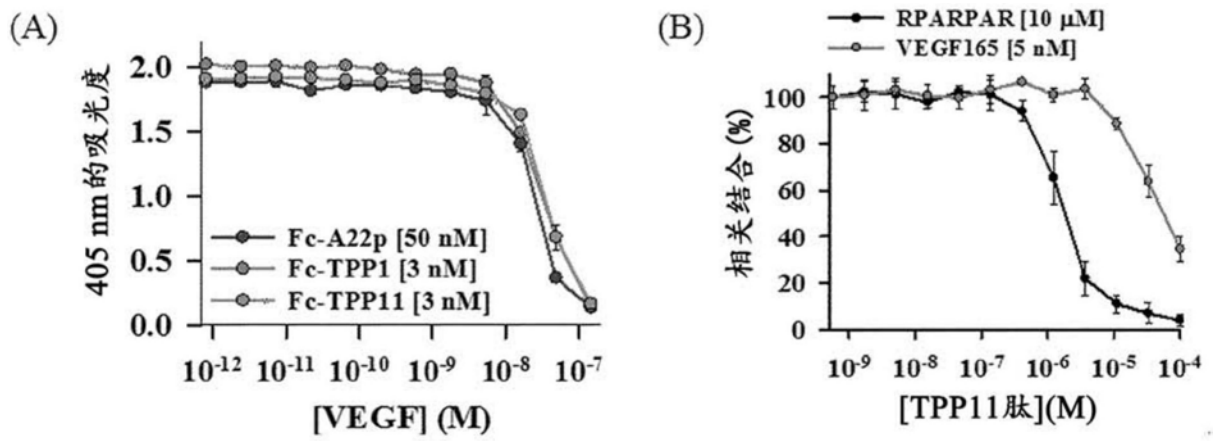


图14

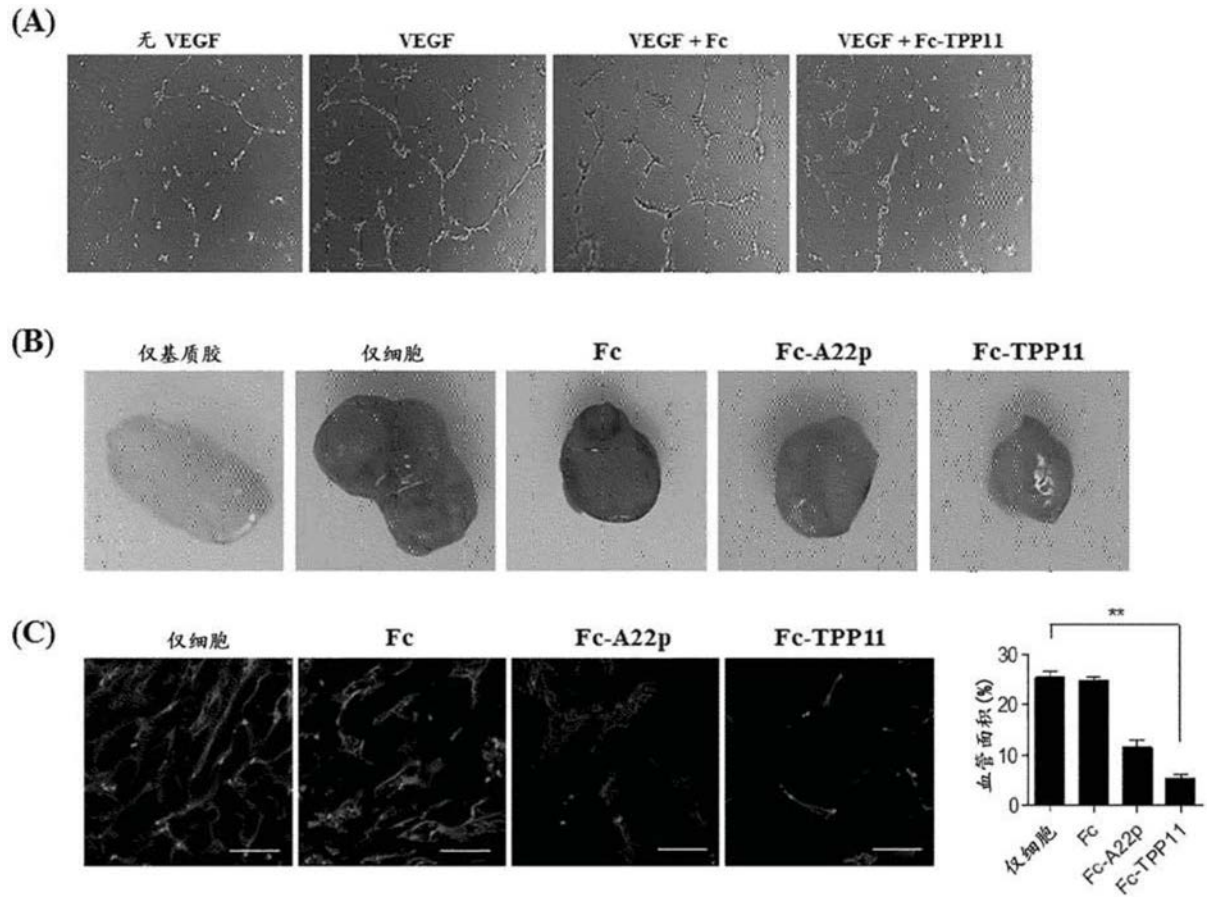


图15

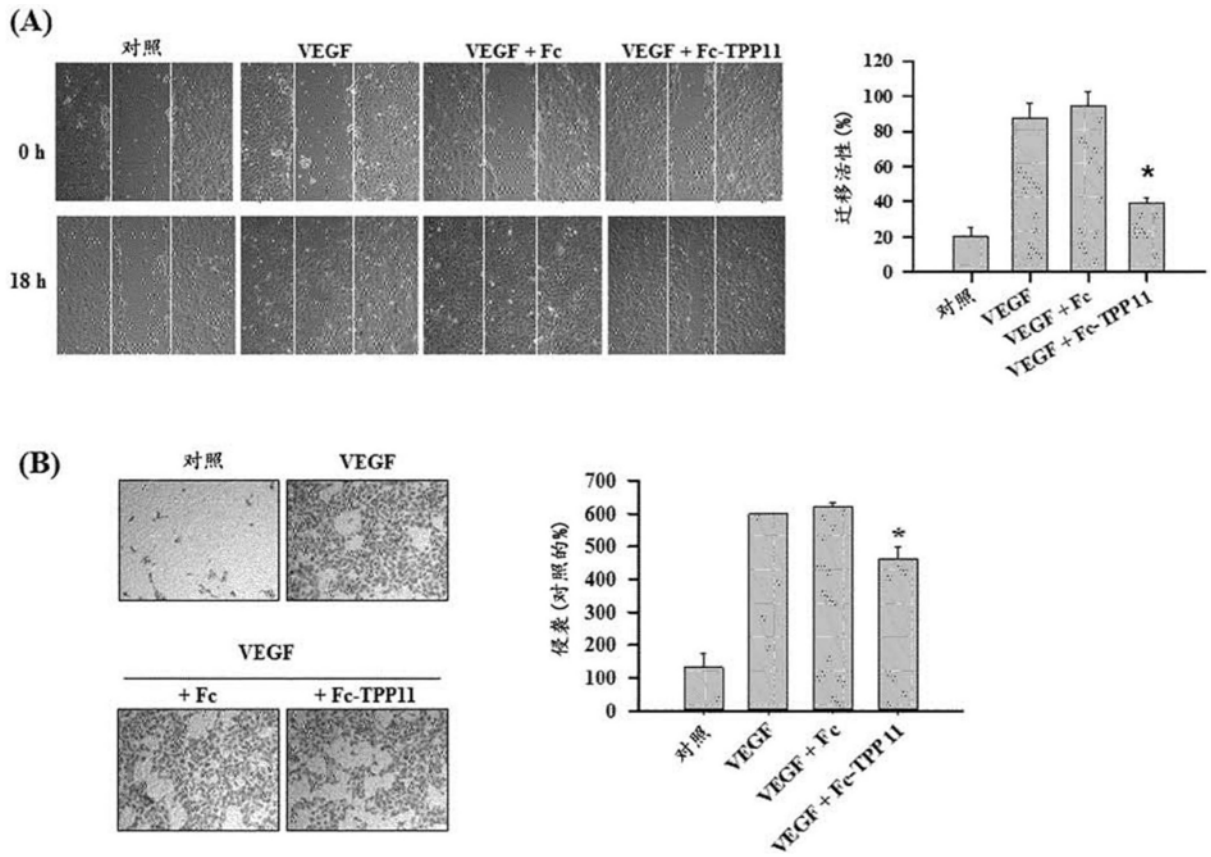


图16

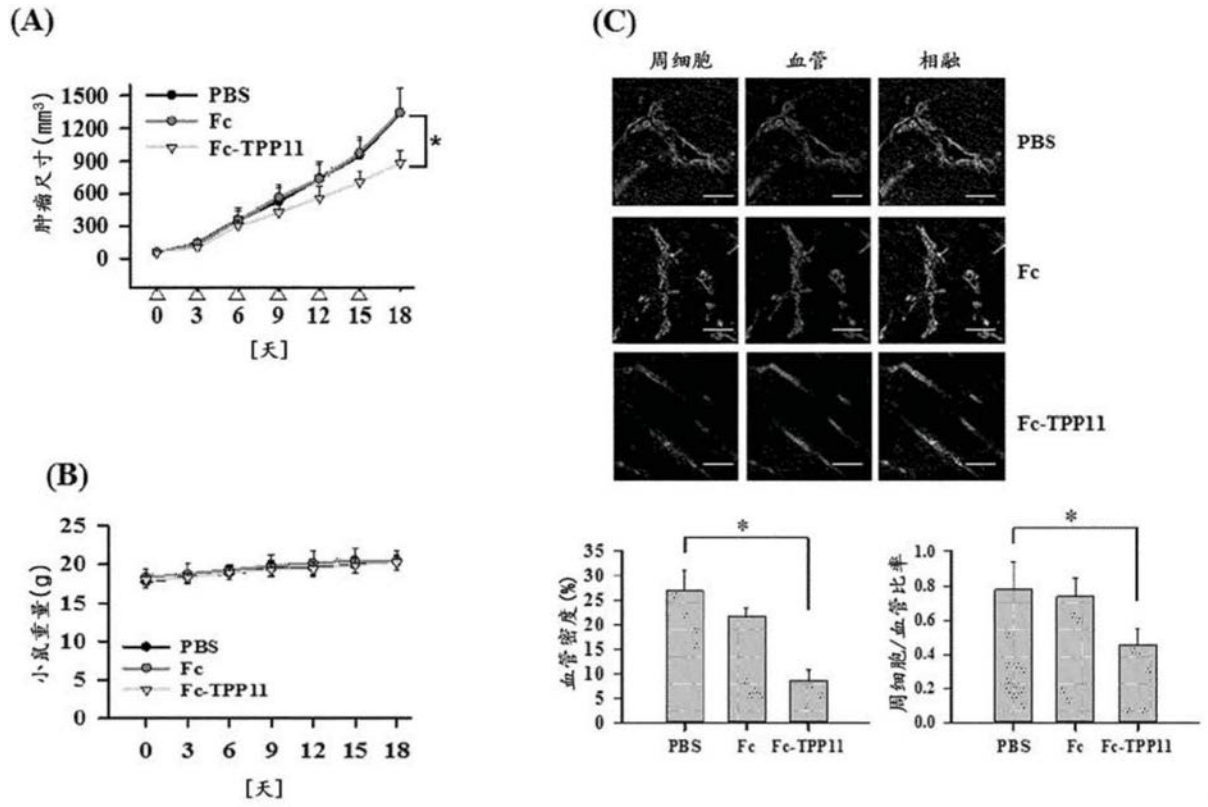


图17

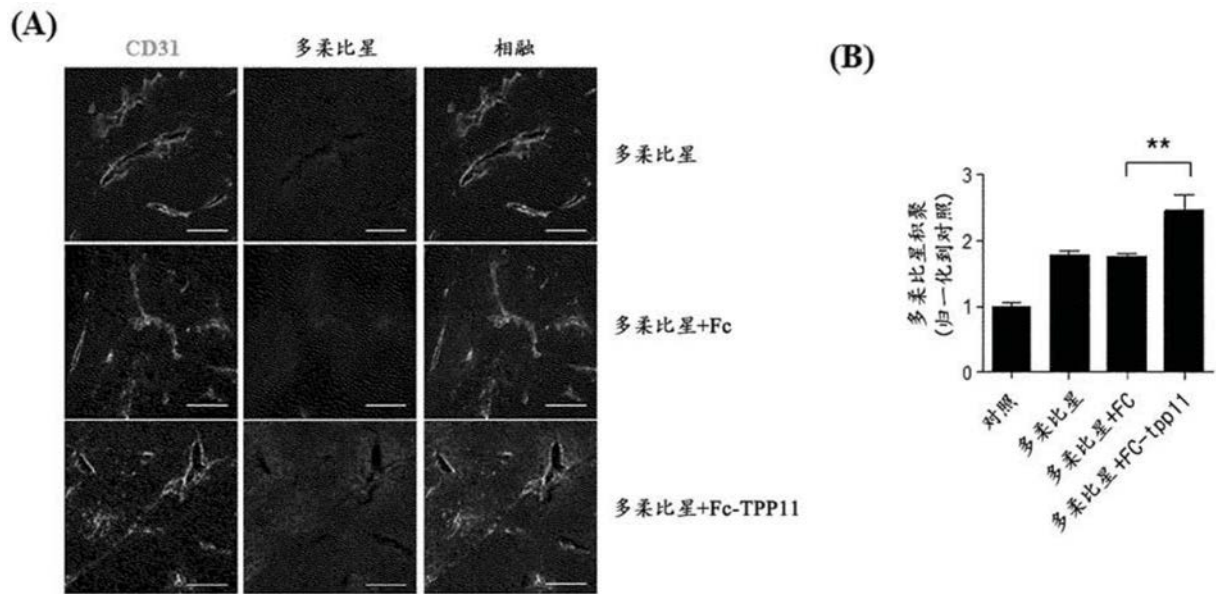


图18

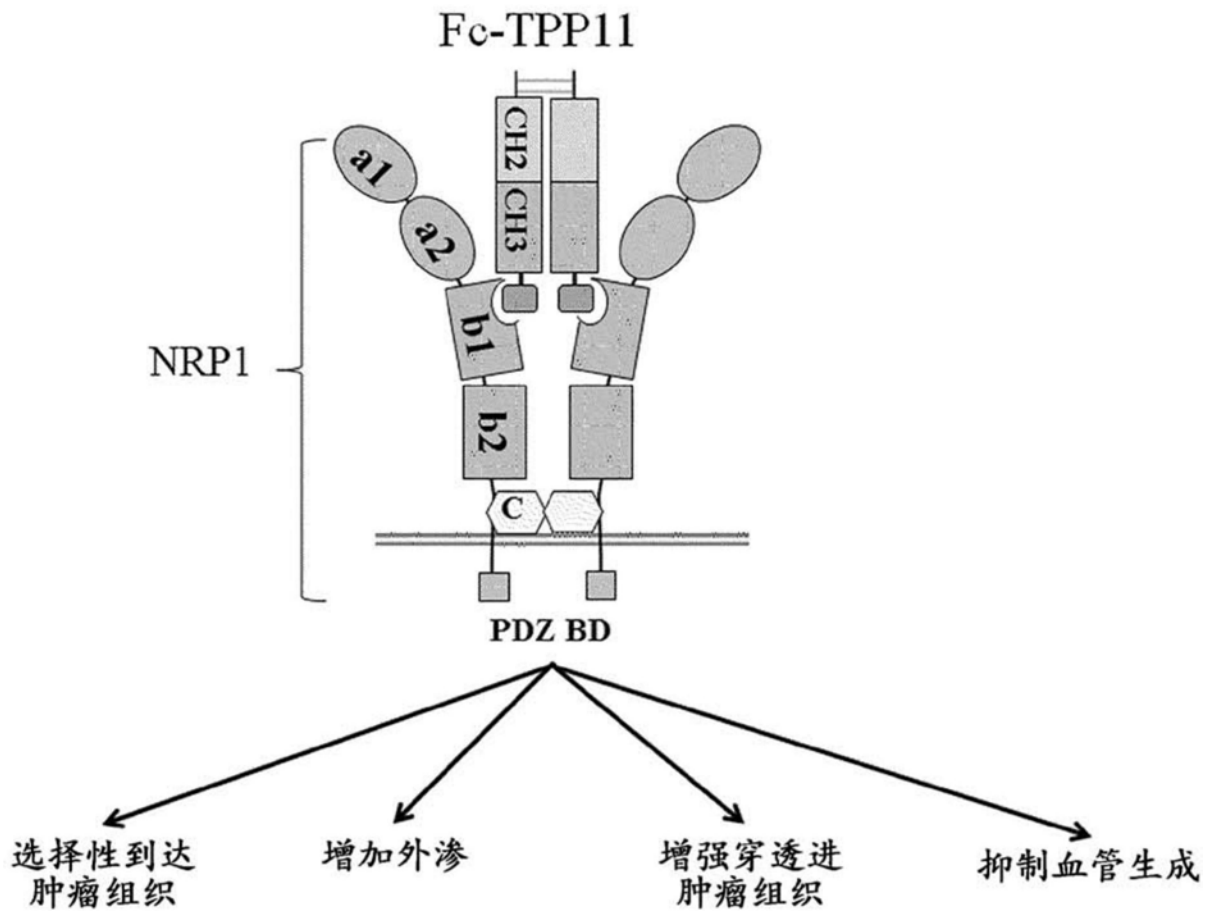


图19

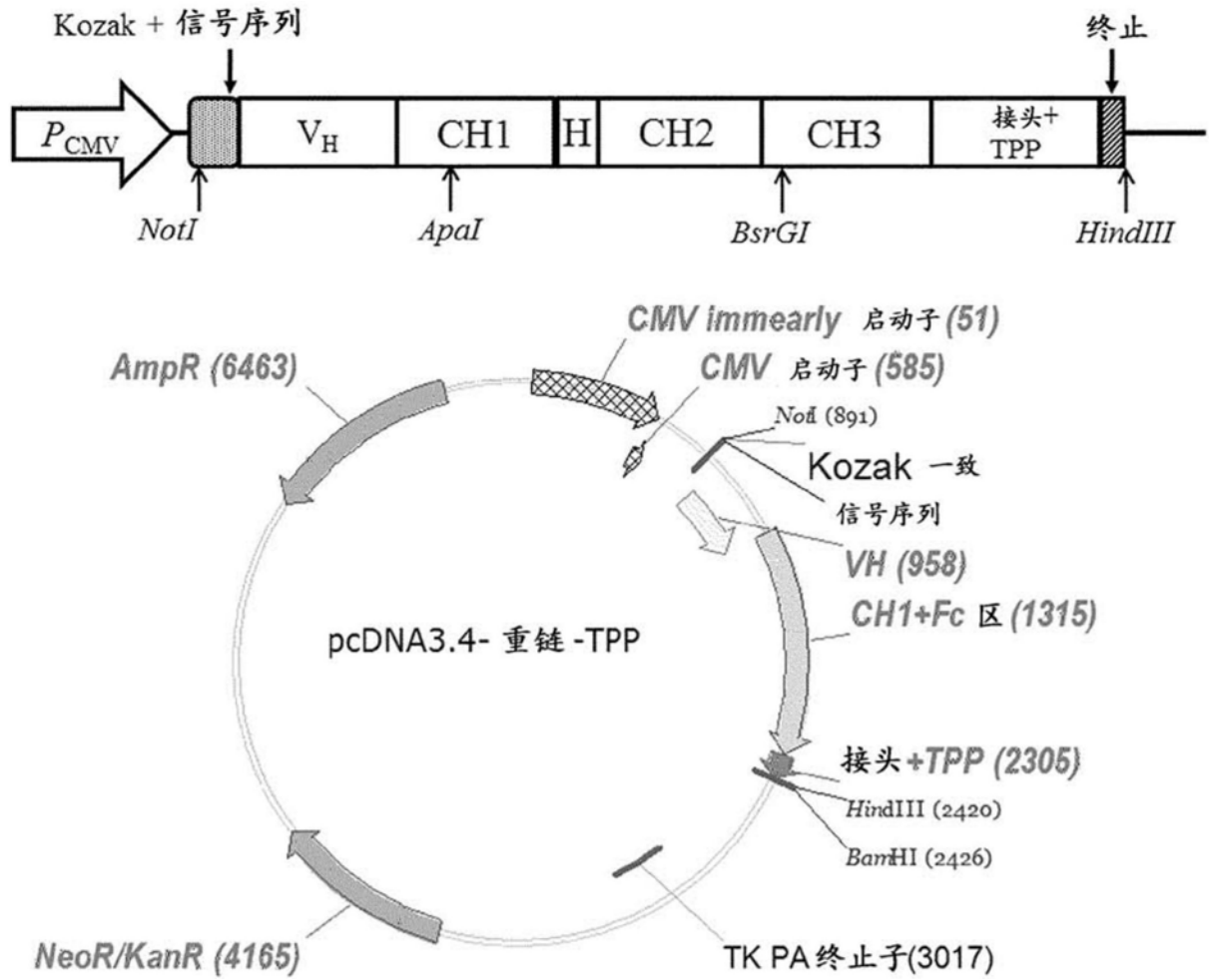


图20

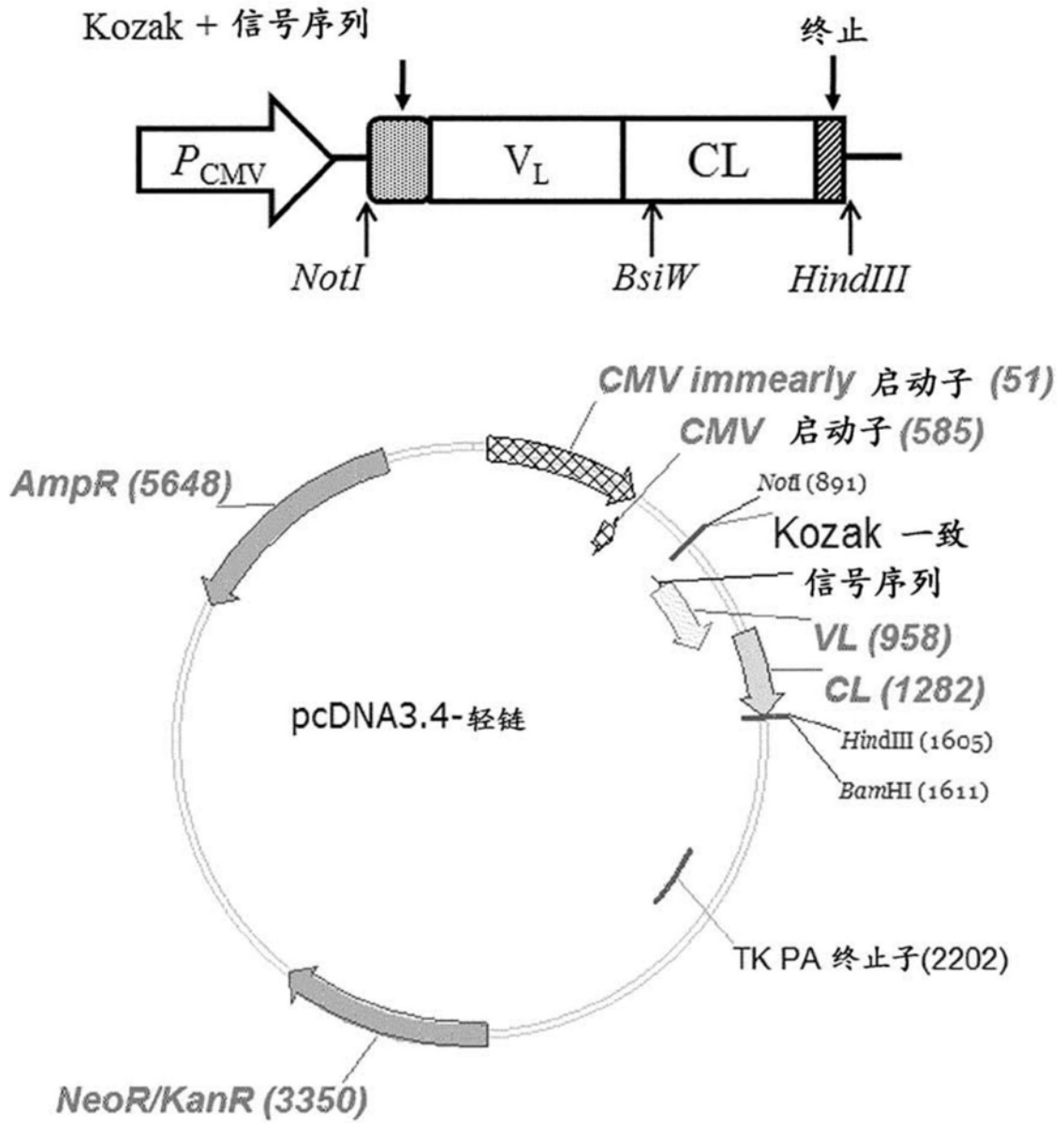
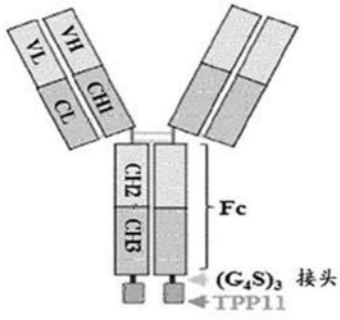
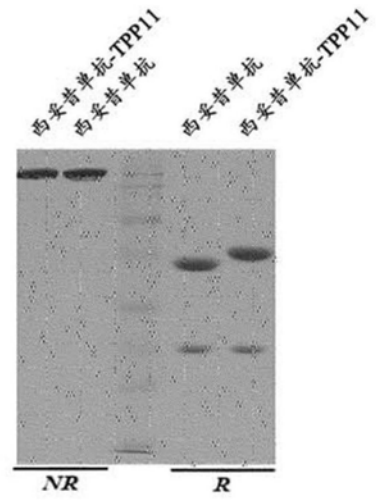


图21

(A) 西安昔单抗-TPP11



(B)



(C)

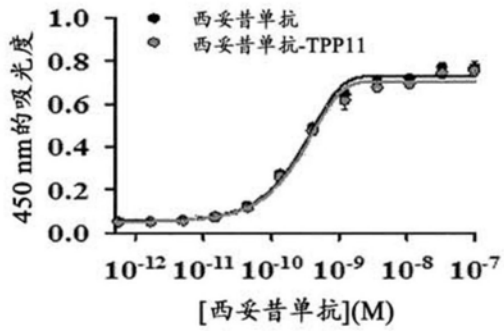


图22

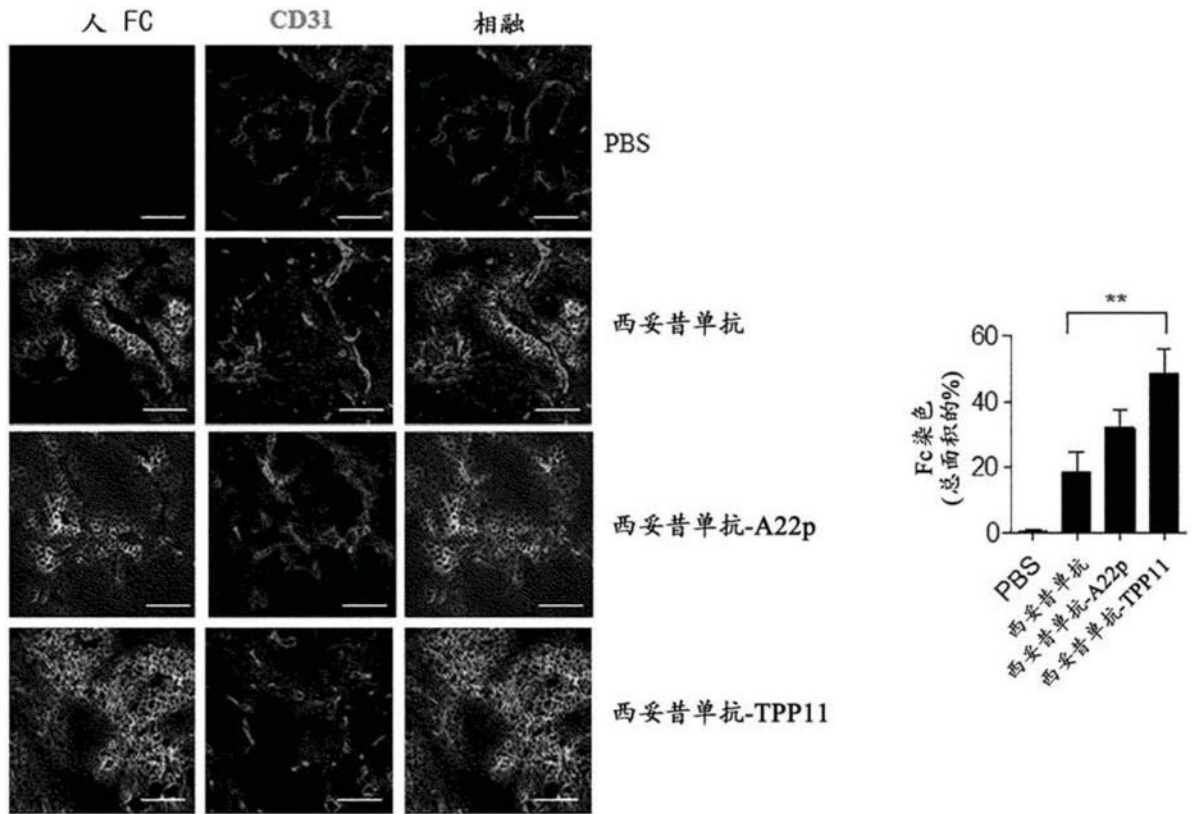


图23

专利名称(译)	神经纤毛蛋白-1特异性结合的肽、与所述肽融合的融合蛋白以及它们的用途		
公开(公告)号	CN107690437A	公开(公告)日	2018-02-13
申请号	CN201680023485.3	申请日	2016-03-23
申请(专利权)人(译)	亚洲大学校产学协力团		
当前申请(专利权)人(译)	亚洲大学校产学协力团		
[标]发明人	金容星 金艺珍		
发明人	金容星 金艺珍		
IPC分类号	C07K14/705 C07K19/00 G01N33/53 A61K9/127 A61P35/00		
CPC分类号	A61K9/127 C07K14/705 C07K19/00 C07K2317/50 C07K2319/00 G01N33/53 A61K38/00 A61K47/50 C07K2317/52 C07K2317/522 C07K2317/524 C07K2317/526 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/622 C07K2319/30 G01N33/57492 G01N33/6845 G01N33/6872 G01N33/6893 G01N2333/70596 G01N2800/7014		
优先权	1020150040164 2015-03-23 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及仅特异性结合神经纤毛蛋白1(NRP1)而不结合神经纤毛蛋白2(NRP2)的肽；与所述肽融合的融合蛋白、小分子药物、纳米颗粒或脂质体；以及用于治疗或预防癌症或血管生成相关疾病的包含所述肽的药物组合物，和用于诊断癌症或血管生成相关疾病的包含所述肽的组合物。此外，本发明提供用于编码特异性结合NRP1的肽的多核苷酸。此外，本发明涉及用于筛选特异性结合NRP1的肽的方法。与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体重链恒定区具有特异性结合NRP1的特征，并且因此当在体内施用，选择性地积聚在肿瘤组织上，加宽肿瘤血管内皮细胞之间的细胞间隙，促进外渗，并且增加肿瘤组织穿透。此外，所述与本发明的特异性结合NRP1的肽融合的抗体重链恒定区抑制血管内皮生长因子(VEGF)结合神经纤毛蛋白1，并且因此具有抑制肿瘤组织中血管生成的能力。因此，所述与本发明的肽融合的抗体重链恒定区显示体内肿瘤抑制活性。

