



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108289966 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680068791.9

(22)申请日 2016.09.15

(30) 优先权数据

62/232169 2015.09.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/051966 2016.09.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/053170 EN 2017.03.30

(71)申请人 北卡罗来纳—查佩尔山大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 L.黄 T.古德温 R.刘 L.苗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 彭昶 罗文锋

(51) Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书55页

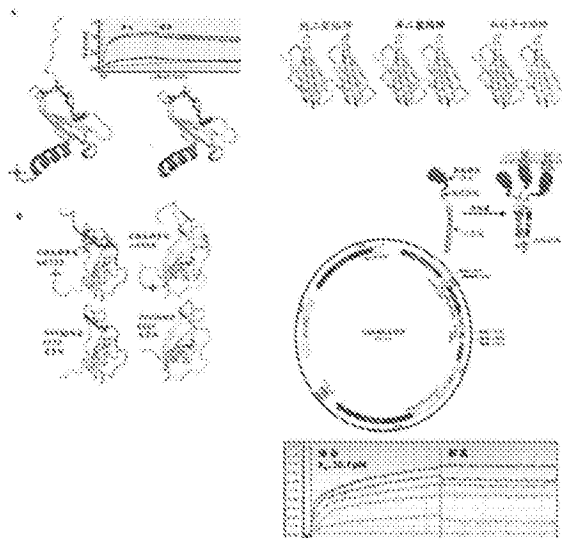
序列表57页 附图41页

(54)发明名称

用于减少转移的方法和组合物

(57)摘要

本文所描述的主题是针对改变靶细胞的微环境的方法。所述方法包括向受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于在靶细胞中表达陷阱的构建体,其中所述陷阱在靶细胞中表达,从而改变微环境。本文还描述了减少癌症的转移的方法,其包括向罹患癌症的受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于表达陷阱的构建体,其中所述陷阱递送至易感转移的组织并且然后在所述组织中表达,其中癌症至组织的转移得以减少。还描述了用于进行所述方法的组合物。



1. 一种治疗患者的癌症的方法,其包括向所述患者施用包含编码能够结合CXCL12的多肽的核酸序列的组合物,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与CXCL12相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,并且其中所述多肽瞬时表达。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、淋巴结癌、乳癌、骨癌、前列腺癌、脑癌、肝癌、结肠直肠癌以及胰腺癌组成的群组。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述癌症选自结肠直肠癌和骨癌。

4. 如权利要求2所述的方法,其中所述癌症选自胰腺癌。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述胰腺癌是内分泌癌。

6. 如权利要求4所述的方法,其中所述胰腺癌是外分泌癌。

7. 如权利要求4所述的方法,其中所述胰腺癌是腺癌、腺泡细胞癌、腺鳞癌、胶样癌、具有破骨细胞样巨细胞的未分化癌、肝样癌、导管内乳头状粘液性肿瘤、粘液性囊性肿瘤、胰母细胞瘤、浆液性囊腺瘤、印戒细胞癌、实体和假乳头状肿瘤、胰腺导管癌或未分化癌。

8. 如权利要求4所述的方法,其中所述胰腺癌是胰腺导管腺癌。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物呈脂质体、病毒载体、非病毒载体或细胞的形式。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述细胞是单核细胞或干细胞。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述组合物呈脂质体的形式。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述脂质体包含靶向配体。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述脂质体包含脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)偶联物。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述脂质-PEG偶联物包含介于总表面脂质的约12mol%至约50mol%之间的量的PEG。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述脂质-PEG偶联物包含具有在约2000至约5000g/mol的范围内的分子量的PEG分子。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述脂质-PEG偶联物包含1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-羧基-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物递送至肝组织。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物递送至胰腺组织。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述亲和或陷阱区是免疫球蛋白V_H域、免疫球蛋白V_L域、V_H和V_L融合蛋白、或非免疫球蛋白标靶结合域。

20. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽与选自SEQ ID NO:1、6、11以及16组成的群组的序列具有至少90%一致性。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述多肽是SEQ ID NO:1、6、11或16。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽结合至CXCL12上与由SEQ ID NO:1、6、11以及16编码的蛋白质相同的表位。

23. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽包含V_H区,其中所述V_H区与选自SEQ ID NO:2、7、12以及17组成的群组的序列具有至少90%一致性。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述V_H区是SEQ ID NO:2。

25. 如权利要求23所述的方法,其中所述V_H区是SEQ ID NO:7。
26. 如权利要求23所述的方法,其中所述V_H区是SEQ ID NO:12。
27. 如权利要求23所述的方法,其中所述V_H区是SEQ ID NO:17。
28. 如权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述组合物不包含V_L域或编码V_L域的核酸。
29. 如权利要求23至28中任一项所述的方法,其中所述组合物不包含重链恒定区。
30. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽进一步包含V_L区,其中所述V_L区与SEQ ID NO:18具有至少90%一致性。
31. 如权利要求30所述的方法,其中所述V_L区是SEQ ID NO:18。
32. 如权利要求30或31所述的方法,其中所述组合物不包含轻链恒定区。
33. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽包含V_L区和V_H区,其中所述V_H区与SEQ ID NO:17具有90%一致性并且所述V_L区与SEQ ID NO:18具有90%一致性。
34. 如权利要求33所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽包含V_L区和V_H区,其中所述V_H区是SEQ ID NO:17并且所述V_L区是SEQ ID NO:18。
35. 如权利要求33或34所述的方法,其中所述多肽不包含轻链或重链恒定区。
36. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽包含具有三个互补决定区(CDR)的V_H区,其中所述三个CDR(a)分别是SEQ ID NO:3-5; (b)所述三个CDR分别是SEQ ID NO:8-10; (c)所述三个CDR分别是SEQ ID NO:13-15;或(d)所述三个CDR分别是SEQ ID NO:19-21。
37. 如权利要求36所述的方法,其中所述三个CDR是SEQ ID NO:3、4以及5。
38. 如权利要求37所述的方法,其中所述V_H区与SEQ ID NO:2具有至少90%一致性。
39. 如权利要求36所述的方法,其中所述三个CDR是SEQ ID NO:8、9以及10。
40. 如权利要求39所述的方法,其中所述V_H区与SEQ ID NO:7具有至少90%一致性。
41. 如权利要求36所述的方法,其中所述三个CDR是SEQ ID NO:13、14以及15。
42. 如权利要求41所述的方法,其中所述V_H区与SEQ ID NO:12具有至少90%一致性。
43. 如权利要求36所述的方法,其中所述CDR是SEQ ID NO:19、20以及21。
44. 如权利要求43所述的方法,其中所述V_H区与SEQ ID NO:17具有至少90%一致性。
45. 如权利要求36至42中任一项所述的方法,其中所述多肽不包含V_L域。
46. 如权利要求36至45中任一项所述的方法,其中所述多肽不包含重链恒定区。
47. 如权利要求43所述的方法,其中所述多肽进一步包含具有三个互补决定区(CDR)的V_L区,其中所述CDR分别是SEQ ID NO:22、23以及24。
48. 如权利要求47所述的方法,其中所述V_L区与SEQ ID NO:18具有至少90%一致性。
49. 如权利要求47所述的方法,其中所述V_H区的所述三个CDR分别是SEQ ID NO:19、20以及21,并且所述V_L区的所述三个CDR分别是SEQ ID NO:22、23以及24。
50. 如权利要求47至49中任一项所述的方法,其中所述多肽不包含轻链或重链恒定区。
51. 如权利要求1所述的方法,其中所述核酸序列与SEQ ID NO:63具有至少70%一致性。
52. 如权利要求51所述的方法,其中所述核酸序列是SEQ ID NO:63。
53. 如权利要求1所述的方法,其中所述能够结合CXCL12的多肽结合至CXCL12上与由

SEQ ID NO:63编码的蛋白质相同的表位。

54. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括施用包含编码能够结合PD-L1的多肽的核酸的第二组合物,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与PD-L1相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,并且其中所述多肽瞬时表达。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述亲和或陷阱区是免疫球蛋白V_H域、免疫球蛋白V_L域、V_H和V_L融合蛋白、或非免疫球蛋白靶结合域。

56. 如权利要求54所述的方法,其中所述组合物和第二组合物呈脂质体、病毒载体、非病毒载体或细胞的形式。

57. 如权利要求56所述的方法,其中所述细胞是单核细胞或干细胞。

58. 如权利要求54所述的方法,其中所述组合物呈脂质体的形式并且所述第二组合物呈第二脂质体的形式,其中所述第一和第二脂质体依序施用。

59. 如权利要求54所述的方法,其中所述组合物呈脂质体的形式并且所述第二组合物呈第二脂质体的形式,其中所述第一和第二脂质体并行施用。

60. 如权利要求54所述的方法,其中所述亲和或陷阱区包含由三个融合多肽形成的三聚体,其中每个融合多肽包含PD-1胞外域、柔性连接子以及三聚域,所述三聚体能够结合PD-L1,并且其中所述癌症是胰腺癌。

61. 如权利要求60所述的方法,其中所述三聚体是同三聚体。

62. 如权利要求60所述的方法,其中所述三聚体是异三聚体。

63. 如权利要求60所述的方法,其中所述融合多肽与SEQ ID NO:26具有至少90%一致性。

64. 如权利要求60所述的方法,其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:25具有至少70%序列一致性的核酸序列编码。

65. 如权利要求60所述的方法,其中所述融合多肽是SEQ ID NO:26。

66. 如权利要求60所述的方法,其中所述融合多肽由SEQ ID NO:25编码。

67. 如权利要求60所述的方法,其中所述PD-1胞外域与选自由SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33以及34组成的群组的序列具有至少90%一致性。

68. 如权利要求60所述的方法,其中所述PD-1胞外域选自由SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33以及34组成的群组。

69. 如权利要求60所述的方法,其中所述三聚域选自由SEQ ID NO:41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56以及57组成的群组。

70. 如权利要求60所述的方法,其中所述柔性连接子选自由SEQ ID NO:58、59、60、61以及62组成的群组。

71. 如权利要求60所述的方法,其中所述三聚体能够以约16皮摩尔亲和力结合PD-L1。

72. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括施用包含编码能够结合PD-1的多肽的核酸的第二组合物,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与PD-1相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,并且其中所述多肽瞬时表达。

73. 如权利要求72所述的方法,其中所述亲和或陷阱区是免疫球蛋白V_H域、免疫球蛋白

V_L域、V_H和V_L融合蛋白、或非免疫球蛋白标靶结合域。

74. 如权利要求72所述的方法,其中所述组合物和第二组合物呈脂质体、病毒载体、非病毒载体或细胞的形式。

75. 如权利要求74所述的方法,其中所述细胞是单核细胞或干细胞。

76. 如权利要求72所述的方法,其中所述组合物呈脂质体的形式并且所述第二组合物呈第二脂质体的形式,其中所述第一和第二脂质体依序施用。

77. 如权利要求72所述的方法,其中所述亲和或陷阱区包含由三个融合多肽形成的三聚体,其中每个融合多肽包含PD-L1胞外域、柔性连接子以及三聚域,所述三聚体能够结合PD-1,并且其中所述癌症是胰腺癌。

78. 如权利要求77所述的方法,其中所述三聚体是同三聚体。

79. 如权利要求77所述的方法,其中所述三聚体是异三聚体。

80. 如权利要求77所述的方法,其中所述PD-L1胞外域与选自SEQ ID NO:35、36、37、38、39以及40组成的群组的序列具有至少90%一致性。

81. 如权利要求77所述的方法,其中所述PD-L1胞外域选自SEQ ID NO:35、36、37、38、39以及40组成的群组。

82. 如权利要求77所述的方法,其中所述三聚域选自SEQ ID NO:41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56以及57组成的群组。

83. 如权利要求77所述的方法,其中所述柔性连接子选自SEQ ID NO:58、59、60、61以及62组成的群组。

84. 如权利要求54或72所述的方法,其中所述组合物和所述第二组合物是协同的。

85. 一种改变靶细胞的微环境的方法,其包括向受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于在所述靶细胞中表达陷阱的构建体,其中所述陷阱在所述靶细胞中表达,其中所述靶细胞的所述微环境得以改变。

86. 如权利要求85所述的方法,其中所述改变微环境包括减少所述微环境中的靶分子的数量。

87. 如权利要求86所述的方法,其中所述靶分子选自蛋白质、蛋白质因子、趋化因子以及细胞因子或其组合组成的群组。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述蛋白质是免疫检查点相关蛋白。

89. 如权利要求88所述的方法,其中所述免疫检查点相关蛋白是PD-1、PD-L1、PD-L2或CTLA-4。

90. 如权利要求87所述的方法,其中所述靶分子是趋化因子。

91. 如权利要求90所述的方法,其中所述趋化因子是CXCL12。

92. 如权利要求85所述的方法,其中所述构建体包含编码多肽的核酸序列,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与CXCL12相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,其中所述多肽瞬时表达,并且其中所述亲和或陷阱区包含免疫球蛋白V_H域、免疫球蛋白V_L域、或V_H和V_L融合蛋白、或非免疫球蛋白标靶结合域。

93. 如权利要求85所述的方法,其中所述靶细胞是器官细胞。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述细胞选自肺、淋巴结、乳房、骨、前列腺、脑、

肝、结肠直肠以及胰腺组成的群组。

95. 如权利要求85所述的方法,其中所述陷阱的所述表达是瞬时的。

96. 如权利要求85所述的方法,其中所述微环境的所述改变是瞬时的。

97. 一种减少癌症的转移的方法,其包括向患有所述癌症的受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于表达陷阱的构建体,其中所述陷阱在易感转移的组织中表达,其中所述癌症至所述组织的转移得以减少。

98. 如权利要求97所述的方法,其中所述癌症是实体癌症。

99. 如权利要求98所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、淋巴结癌、乳癌、骨癌、前列腺癌、脑癌、肝癌、结肠直肠癌以及胰腺癌组成的群组。

100. 如权利要求97所述的方法,其中所述陷阱是CXCL12陷阱。

101. 如权利要求97所述的方法,其中所述构建体包含编码能够结合CXCL12的多肽的核酸序列,其中所述多肽包含免疫球蛋白V_H域、免疫球蛋白V_L域、V_H和V_L融合蛋白、或非免疫球蛋白靶结合域,并且其中所述多肽瞬时表达。

102. 一种能够结合CXCL12的多肽,其包含V_L区和V_H区,其中所述V_H区与SEQ ID NO:17具有90%一致性并且所述V_L区与SEQ ID NO:18具有90%一致性。

103. 如权利要求102所述的多肽,其中所述V_L区是SEQ ID NO:18。

104. 如权利要求102所述的多肽,其中所述V_H区是SEQ ID NO:17并且所述V_L区是SEQ ID NO:18。

105. 如权利要求102至104中任一项所述的多肽,其中所述多肽不包含轻链或重链恒定区。

106. 一种能够结合CXCL12的多肽,其包含具有三个互补决定区(CDR)的V_H区,其中所述三个CDR(a)分别是SEQ ID NO:3-5;(b)所述三个CDR分别是SEQ ID NO:8-10;(c)所述三个CDR分别是SEQ ID NO:13-15;或(d)所述三个CDR分别是SEQ ID NO:19-21,和具有三个互补决定区(CDR)的V_L区,其中所述CDR分别是SEQ ID NO:22、23以及24。

107. 如权利要求106所述的多肽,其中所述三个CDR是SEQ ID NO:3、4以及5。

108. 如权利要求107所述的多肽,其中所述V_H区与SEQ ID NO:2具有至少90%一致性。

109. 如权利要求106所述的多肽,其中所述三个CDR是SEQ ID NO:8、9以及10。

110. 如权利要求109所述的多肽,其中所述V_H区与SEQ ID NO:7具有至少90%一致性。

111. 如权利要求106所述的多肽,其中所述三个CDR是SEQ ID NO:13、14以及15。

112. 如权利要求111所述的多肽,其中所述V_H区与SEQ ID NO:12具有至少90%一致性。

113. 如权利要求106所述的多肽,其中所述CDR是SEQ ID NO:19、20以及21。

114. 如权利要求113所述的多肽,其中所述V_H区与SEQ ID NO:17具有至少90%一致性。

115. 如权利要求106所述的多肽,其中所述V_L区与SEQ ID NO:18具有至少90%一致性。

116. 如权利要求106所述的多肽,其中所述V_H区的所述三个CDR分别是SEQ ID NO:19、20以及21,并且所述V_L区的所述三个CDR分别是SEQ ID NO:22、23以及24。

117. 如权利要求106至116中任一项所述的多肽,其中所述多肽不包含轻链或重链恒定区。

118. 一种能够结合CXCL12的多肽,其由与SEQ ID NO:63具有至少70%一致性的核酸序列编码。

119. 如权利要求118所述的多肽,其中所述核酸序列是SEQ ID NO:63。
120. 一种能够结合CXCL12的多肽,其中所述多肽结合至CXCL12上与由SEQ ID NO:63的DNA编码的蛋白质相同的表位。
121. 一种由三个融合多肽形成的三聚体,其中每个融合多肽包含PD-1胞外域、柔性连接子以及三聚域,所述三聚体能够结合PD-L1。
122. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述三聚体是同三聚体。
123. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述三聚体是异三聚体。
124. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述融合多肽与SEQ ID NO:26具有至少90%一致性。
125. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:25具有至少70%序列一致性的核酸序列编码。
126. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述融合多肽是SEQ ID NO:26。
127. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述融合多肽由SEQ ID NO:25编码。
128. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述PD-1胞外域与选自由SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33以及34组成的群组的序列具有至少90%一致性。
129. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述PD-1胞外域选自由SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33以及34组成的群组。
130. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述三聚域选自由SEQ ID NO:41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56以及57组成的群组。
131. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述柔性连接子选自由SEQ ID NO:58、59、60、61以及62组成的群组。
132. 如权利要求121所述的三聚体,其中所述三聚体能够以约16皮摩尔亲和力结合PD-L1。
133. 一种由三个融合多肽形成的三聚体,其中每个融合多肽包含PD-L1胞外域、柔性连接子以及三聚域,所述三聚体能够结合PD-1。
134. 如权利要求133所述的三聚体,其中所述三聚体是同三聚体。
135. 如权利要求133所述的三聚体,其中所述三聚体是异三聚体。
136. 如权利要求133所述的三聚体,其中所述PD-L1胞外域与选自由SEQ ID NO:35、36、37、38、39以及40组成的群组的序列具有至少90%一致性。
137. 如权利要求133所述的三聚体,其中所述PD-L1胞外域选自由SEQ ID NO:35、36、37、38、39以及40组成的群组。
138. 如权利要求133所述的三聚体,其中所述三聚域选自由SEQ ID NO:41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56以及57组成的群组。
139. 如权利要求133所述的三聚体,其中所述柔性连接子选自由SEQ ID NO:58、59、60、61以及62组成的群组。
140. 一种核酸,其编码如权利要求102至139中任一项所述的多肽或融合蛋白。
141. 如权利要求140所述的核酸,其中所述多肽是SEQ ID NO:1、6、11或16。
142. 如权利要求140所述的核酸,其中所述融合蛋白是SEQ ID NO:26。
143. 一种表达载体,其包含如权利要求140至142中任一项所述的核酸。

144. 一种表达载体,其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%一致性的核酸序列。
145. 如权利要求144所述的表达载体,其中所述核酸序列是SEQ ID NO:63。

用于减少转移的方法和组合物

[0001] 政府支持的声明

[0002] 本发明是利用政府支持在由国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的授权号CA151652、CA149387、CA157738以及DK100664下取得。政府在本发明中具有某些权利。

[0003] 经由EFS-WEB以文本文件提交的序列表的引用

[0004] 文件482902_seqlisting.txt中写入的序列表是77,671字节,并且在2016年9月14日创建并且借此以引用的方式并入。

技术领域

[0005] 本文所描述的主题是针对通过改变易感转移的组织中的细胞微环境因子来防止或减少转移性癌症的發生的治疗。

背景技术

[0006] 在治疗癌症中,在转移之前的早期诊断和治疗是关键,这是因为一旦癌症已经转移,疗法的成功率大大降低。特别地,结肠直肠癌 (CRC) 是在世界范围内诊断的第三大常见癌症,导致第三大引证的死亡。单独在美国,诊断出约143,460名患者,每年引起51,690名患者死亡 (美国癌症协会 (American Cancer Society) .《2012年癌症事实和数据 (Cancer Facts and Figures 2012) 》.亚特兰大:美国癌症协会 (Atlanta:American Cancer Society); 2012. 第25-6页)。然而,死亡原因很少归因于原发性结肠癌负荷,其中原发性癌症所驻留的结肠的局部切除是相当有效的。不幸地,肝转移的发生是CRC患者死亡的主要原因 (美国癌症协会 (American Cancer Society) .《2012年癌症事实和数据 (Cancer Facts and Figures 2012) 》.亚特兰大:美国癌症协会 (Atlanta:American Cancer Society); 2012. 第25-6页)。

[0007] 在结肠直肠癌检测的早期阶段,五年存活率为约90%。不幸地,一旦肝转移已经发生,这个比率大幅下降至小于12%存活。研究还已经发现,一经诊断,20%的患者已经发展成肝转移,在死亡时这一数字高达60-70%的患者已经在肝中发展成转移病灶 (Schima W, Kulinna C, Langenberger H等,结肠直肠癌的肝转移:US、CT或MR? (Liver metastases of colorectal cancer:US,CT or MR?)《癌症成像 (Cancer imaging) 》.国际癌症成像协会 (International Cancer Imaging Society) .2005;5 (说明书号A):S149-56)。

[0008] 至今,用于诸如癌症的疾病的治療,其最终治疗目标是杀死患病细胞或防止或抑制其产生,包括施用细胞毒性药物。细胞毒性药物包括用于癌症治疗中的许多化学治疗剂,包括烷化剂、抗代谢物以及毒素。大多数细胞毒性药物是非选择性的,杀死健康细胞以及患病细胞,当这些药剂全身递送时导致不合需要的副作用。因此,对不依赖于毒性剂的全身施用的替代疗法存在需要。

[0009] 本文中的主题通过改变易感转移的组织的微环境而解决了已知疗法的缺点。在这种情况下,防止或减少转移并且可以避免细胞毒性剂的使用。

发明内容

[0010] 在一个实施方案中,本文所描述的主题是针对一种改变靶细胞的微环境的方法,其包括向受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于表达陷阱的构建体,其中所述陷阱在靶细胞中表达,从而改变微环境。

[0011] 在一个实施方案中,本文所描述的主题是针对一种减少癌症的转移的方法,其包括向患有癌症的受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于表达陷阱的构建体,其中所述陷阱在易感转移的组织中表达,从而改变组织的微环境并且减少癌症至组织的转移。

[0012] 在一个实施方案中,本文所描述的主题是针对一种治疗患者的癌症的方法,其包括向患者施用包含编码能够结合CXCL12的多肽的核酸序列的组合物,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与CXCL12相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,并且其中所述多肽瞬时表达。

[0013] 在另一个实施方案中,本文所描述的主题是针对一种方法,其进一步包括施用包含编码能够结合PD-L1的多肽的核酸的第二组合物,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与PD-L1相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,并且其中所述多肽瞬时表达。

[0014] 在另一个实施方案中,方法进一步包括施用包含编码能够结合PD-1的多肽的核酸的第二组合物,其中所述多肽包含用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导肽和与PD-1相互作用并且破坏其与其内源性受体的相互作用的亲和或陷阱区,并且其中所述多肽瞬时表达。

[0015] 这些和额外的实施方案在本文中完全公开。

附图说明

[0016] 图1描绘了用于建立针对作为用于阳性选择的标靶的具有C端生物素的野生型CXCL12的陷阱的趋化因子CXCL12的内源性蛋白质结构。(A) 用于阴性选择的CXCR4与N端基序的相互作用缺失的CXCL12突变体的结构。(B) 用于阳性和阴性选择的野生型CCL2和CCL5以及其非受体结合突变体的结构。(C) 可以用于单一或组合疗法的同二聚、异二聚以及双特异性趋化/细胞因子陷阱的示意图。(D) 三价PD-L1陷阱以及三价陷阱的自组装工艺。此外,使用Octet的三价PD-L1陷阱与PD-L1的结合动力学连同用于基于纳米粒子系统的基因递送的PD-L1陷阱的质粒图谱一起展示。

[0017] 图2描绘了工程改造的CXCL12陷阱蛋白对CT-26 FL3细胞迁移和侵入的发展和影响。(A) pCXCL12陷阱DNA序列的质粒载体图谱。CXCL12结合VH和VL域的编码序列用于陷阱基因的组装。CXCL12陷阱的最终序列分别编码信号传导肽、VH域、柔性连接子、VL域、E标签以及His (6×) 标签。使完整cDNA克隆至pCDNA3.1中介于Nhe I与Xho I位点之间并且通过DNA测序确认准确性。通过使用生物层干涉法在CXCL12陷阱与CXCL12之间的结合亲和力。将CXCL12固定于AR2G生物传感器上并且不同浓度的CXCL12陷阱用于测量结合动力学,其中发现CXCL12陷阱具有 $K_d=4\text{nM}$ 。(B) 发现工程改造的CXCL12陷阱在约120nM的浓度下对生物活性CXCL12 (100ng/ml) 具有半最大抑制[ND50]。在存在或不存在CXCL12陷阱 (分别2、4、8或12

$\mu\text{g/ml}$; 60、120、240或360nM) 或阳性对照CXCL12Ab (分别1、2或4 $\mu\text{g/ml}$; 6、12或24nM) 的情况下用CXCL12 (100ng/ml; 10nM) 刺激的CT-26 FL3细胞迁移的分析。(C) 在存在或不存在CXCL12陷阱 (4或12 $\mu\text{g/ml}$; 120或360nM) 或阳性对照CXCL12 Ab (4 $\mu\text{g/ml}$; 24nM) 的情况下用CXCL12 (100ng/ml; 10nM) 刺激之后CT-26FL3细胞侵入的分析。数据表示为平均值 $\pm$ s.d., 从一式三份运作的样品计算并且表示为未处理的(无CXCL12或处理蛋白) 对照的百分比。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, 与CXCL12 (100ng/ml, 10nM) 刺激细胞(无蛋白陷阱或Ab处理) 对照相比较。NS, 不显著。

[0018] 图3描绘了通过TEM和DLS的LCP纳米粒子表征。(A) 含有pDNA/mc-CR8C肽的LCP核心; (B) 含有pDNA/mc-CR8C的最终半乳糖-LCP, 具有负乙酸双氧铀染色; (C) 含有pDNA/mc-CR8C的最终半乳糖-LCP的动态光散射(DLS) 分析, 得到45纳米直径和+10.0的 ζ 电位。数目、体积以及强度加权的大小分布说明了二粒子分布。更小群体(约45nm) 是所需的LCP粒子, 并且更大群体(约350nm) 归因于在薄膜水合之后形成脂质体的过量DOTAP和胆固醇, 得到约 $236 \pm 32\text{nm}$ 的Z平均值; $n=6$ 。(D) 经由DLS测量10%血清溶液中LCP随着时间的稳定性。使LCP悬浮于10%血清溶液中并且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育。经过24小时记录z平均值以观测如由增加的z平均值指示的任何蛋白质/LCP聚集。数据表示为平均值 $\pm$ s.d., 从一式三份运作的样品计算。z平均值(约30nm) 经过24小时是一致的, 未得到z平均值的显著增加, 指示蛋白质/LCP聚集体的最小形成。(E) 囊封至LCP中的pCXCL12质粒的载体图谱。(F) pCXCL12基因的DNA序列。

[0019] 图4描绘了具有合并至LCP核心中的 ^{177}Lu 的半乳糖-LCP-pCXCL12陷阱/mcCR8C的药物代谢动力学和器官生物分布分析。通过尾静脉注射将约250,000个计数施用至小鼠中。(A) 收集经由尾静脉切割所收集的血液样品, 称重, 并且测量放射性计数以确定在循环中剩余的注射剂量的百分比(% ID)。观测两相分布, 得到分别20min和1,054min的 $T_{1/2\alpha}$ 和 $T_{1/2\beta}$ 。(B) 在尾静脉注射之后16小时(当血液放射计数达到背景信号时的时间) 测量LCP生物分布/器官累积。发现每克组织约40-50%的注射剂量在肝中累积。数据表示为平均值 $\pm$ s.d., 从一式三份运作的样品计算。

[0020] 图5描绘了内源性CXCL12的生物捕获和其对免疫细胞募集的作用以及pCXCL12陷阱的瞬时和肝特异性表达。(A) 来自在最后处理注射之后10天处死的结肠直肠癌的BALB/c小鼠模型的肝组织和对照健康肝[健康的(无CRC)]的石蜡包埋切片中的内源性CXCL12表达。CXCL12的免疫荧光染色(红色), 连同DAPI核染色(蓝色)。研究五个组, 包括健康的(无CRC)、未处理的(PBS)、pGFP LCP对照(10 μg 每隔一天 $\times$ 3)、p陷阱LCP(10 μg)、p陷阱LCP(10 μg 每隔一天 $\times$ 3)。所有数据表示为平均值 $\pm$ s.d., 从一式三份运作的样品计算并且以荧光强度报道。N.S.表示不显著, N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。比例尺: 250 μm 。(B) 将额外的切片染色以确定免疫细胞募集至肝, 包括免疫抑制性炎症性MDSC[CD11b+ (绿色)/GR1+ (红色)]和 T_{reg} [CD4+ (绿色)/Foxp3+ (红色)]以及CD8+T细胞群体(绿色)。研究四个组, 包括健康的(无CRC)、未处理的(肿瘤)、未处理的(间质)以及p陷阱LCP(10 μg 每隔一天 $\times$ 3)。还示出了三色染色以区分正常和患病的肝。白色箭头指示转移病灶。所有数据表示为平均值 $\pm$ s.d., 从一式三份运作的样品计算并且以荧光强度报道。N.S.表示不显著, N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。比例尺: 250 μm , 展现pGFP和工程改造的pCXCL12陷阱的瞬时肝特异性表达。(C) 主要LCP累积器官中的GFP表达的显微术分析。肝切片展现在最后注射(10 μg 每隔一天 $\times$

3) 之后历时至少4天的瞬时表达。比例尺:250 μ m。数据表示为平均值 $\pm$ s.d.,从至少一式三份的样品计算并且以由Image J软件定量的荧光强度报道。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下,p值表示对未处理的样品的显著性。比例尺250 μ m。(D)His (6 $\times$) 标签ELISA以及(E)进行西方墨点分析以确定所有主要LCP累积器官和血清中pCXCL12陷阱的器官分布/表达。剂量从2.0、10.0或20.0 μ g经由尾静脉施用的pDNA逐步升高。(F)器官的西方墨点分析示出了经由使用His (6 $\times$) mAb的CXCL12陷阱表达。表达是瞬时的并且在最后注射(10 μ g每隔一天 $\times$ 3)之后仅持续至少4天并且不长于8天。通过BCA确定总蛋白质浓度并且每孔/泳道加载50 μ g总蛋白质。检测到28.6kDa陷阱蛋白,如由蛋白质标准梯确认,这与理论值一致。GAPDH用作加载对照,但不存在GAPDH的血清样品除外。数据表示为平均值 $\pm$ s.d.,从一式三份运作的样品计算并且以与未处理的对照相比较的倍数增加示出。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。

[0021] 图6描绘了在pCXCL12陷阱LCP处理之后肝转移的减少的发生率。(A)将小鼠用 2×10^6 个CT-26 (FL3) RFP/Luc细胞接种至盲肠壁中。处理时程示于上方。第10天、第12天以及第14天经由尾静脉静脉内(IV)施用10 μ g (0.5mg/kg) pDNA处理。组包括PBS(未处理;n=7)和pGFP LCP (10 μ g每隔一天 $\times$ 3;n=6),以及pCXCL12陷阱LCP (10 μ g每隔一天 $\times$ 3;n=7)。通过腹膜内(IP)施用200 μ l荧光素(10mg/ml)追踪总体肿瘤质量的进展。在施用荧光素之后10分钟记录荧光素酶生物发光成像。记录整个小鼠和肝肿瘤负荷。所有数据表示为平均值 $\pm$ s.d.,并且以生物发光强度报道。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。(B)未处理的(n=3)和治疗性pCXCL12陷阱LCP(n=4)组的总器官肿瘤负荷。用IVIS/Kodak软件进行器官中的肿瘤负荷的定量。所有数据表示为平均值 $\pm$ s.d.,并且以生物发光强度报道。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。(C)将石蜡包埋肝切片用三色染色。大肿瘤负荷(由黑色箭头指示)和硬化/纤维化(染蓝色,胶原蛋白)在PBS(未处理)和pGFP LCP处理组中清楚可见。pCXCL12陷阱LCP处理的肝具有正常的健康肝形态并且没有可检测到的转移负荷。比例尺是250 μ m。记录肝切片中的胶原蛋白定量。所有数据表示为平均值 $\pm$ s.d.。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。

[0022] 图7描绘了在pCXCL12陷阱LCP疗法之后肝转移的减少的发生率和增强的T细胞杀死。将小鼠用 2×10^6 个CT-26 (FL3) RFP/Luc细胞接种至盲肠壁中。第10天、第12天以及第14天经由尾静脉静脉内施用10 μ g (0.5mg/kg) pDNA处理。组包括PBS(未处理;n=5)和pCXCL12陷阱LCP (10 μ g每隔一天 $\times$ 3;n=5)以及第8天和第10天腹膜内施用的抗Lyt2.2或同种型IgG对照(400 μ g,20mg/kg)。接种和处理时程/剂量以及第21天的肝肿瘤质量示于上方。向小鼠腹膜内施用200 μ l (10mg/ml) 荧光素。5分钟后,对小鼠施以无痛致死术并且摘取肝,在PBS中冲洗,并且置于荧光素(1mg/ml)的溶液中。使用IVIS动力学用Kodak相机记录生物发光图像。用IVIS/Kodak软件进行肝中的肿瘤负荷的定量。数据表示为对数变换平均值,正规化为 $\pm$ s.e.。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。ROI=关注区。

[0023] 图8描绘了在pCXCL12陷阱LCP处理之后4T1(乳癌)肝转移的减少的发生率和增加的存活期。(A)这个图示出了接种和处理时程与剂量,以及在接种之后7天的生物发光信号

检测和肿瘤负荷定量。处理组包括PBS(未处理;n=5)、pGFP LCP/抗CD8(n=5)、p陷阱LCP/抗CD8(n=5)、p陷阱LCP/同种型IgG(n=5)。数据表示为对数变换平均值,正规化为 $\pm s.e.$ 。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。ROI=关注区。(B)第10天肿瘤负荷和定量的流式细胞术分析(每组n=3)。门控由GFP阳性肿瘤细胞(P3)对比非GFP阳性细胞(P4)组成。数据表示为平均值,正规化为 $\pm s.d.$ 。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。(C)包括所有4个处理组(每组n=5)的卡普兰-梅尔存活曲线(Kaplan-Meier survival curve)。通过评估小鼠重量、活动性以及生活质量来确定存活。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。

[0024] 图9描绘了用于降低结肠直肠癌(HT-29)肝转移的发生率的治疗策略的比较。(A)顶部的时间轴示出了对于HT-29的接种和处理时程与给药。第0-16天每隔一天经由尾静脉静脉内施用处理。处理组包括PBS(未处理;n=5)、pGFP LCP(10 μ g,0.5mg/kg pDNA;n=5)、p陷阱LCP(10 μ g,0.5mg/kg pDNA;n=5)、游离CXCL12陷阱蛋白(10 μ g,0.5mg/kg蛋白质;n=5)以及AMD3100(100 μ g,5.0mg/kg;n=5)。(B)第36天的肿瘤负荷分析和定量(每组n=5)。通过肿瘤结节的切除和称重(mg)来定量肝转移负荷。示出了来自具有转移负荷的每个处理组的肝的图像,白色箭头指示转移病灶。通过评估小鼠重量、活动性以及生活质量来确定存活。数据以个别数据点用平均值 $\pm s.d.$ 表示。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。

[0025] 图10描绘了经由LCP递送的毒性的降低。(A)在用PBS(未处理)、10 μ gpGFP LCP(每隔一天 $\times 3$)、10 μ g pCXCL12陷阱LCP(每隔一天 $\times 3$)或游离CXCL12陷阱蛋白(20 μ g每隔一天 $\times 3$)最后处理之后24小时的ALT、AST、肌酐以及BUN测量和血液白细胞计数,其中在最后施用之后第1天、第7天以及第14天处死小鼠。所有数据表示为平均值 $\pm s.d.$,来自于一式三份运作的样品。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下。个别组与相应未处理的对照相比较的p值在图中展示。(B)在用PBS(未处理)、10 μ g pGFP LCP(每隔一天 $\times 3$)、10 μ g pCXCL12陷阱LCP(每隔一天 $\times 3$)或游离CXCL12陷阱蛋白(20 μ g每隔一天 $\times 3$)最后处理之后24小时不同器官的三色组织学切片,其中在最后施用之后第1天、第7天以及第14天处死小鼠。所有三色组织学切片在任何主要器官中都未显示出毒性,所述器官包括:心、肺、脾、肾以及肝。比例尺=100 μ m。

[0026] 图11描绘了用以评估小鼠和人类癌症细胞系中的内源性CXCR4表达的西方墨点分析。根据ATCC所推荐的条件培养细胞,裂解,并且通过BCA正规化用于准确的蛋白质加载。每个泳道接收30 μ g总蛋白质。所有样品在相同凝胶上运作以确保准确的暴露和相对表达。使用蛋白质标准梯鉴别42kDa蛋白质。数据表示为平均值 $\pm s.d.$,从一式三份运作的样品计算并且以对最高强度样品的相对强度[CT-26(FL3)和HT-29]报道并且由GAPDH强度正规化。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下,p值表示对图中第一细胞系的显著性。

[0027] 图12描绘了小鼠(无CRC)的主要器官中和CRC小鼠的肝中的内源性CXCL12。来自BALB/c小鼠的不同器官中的内源性CXCL12表达。图像示出了针对CXCL12的免疫荧光染色(红色),连同DAPI核染色(蓝色)。数据表示为平均值 $\pm s.d.$,从至少一式三份的样品计算并且以荧光强度报道。N.S.表示不显著,N.D.表示在检测限以下,p值表示对肝样品的显著性。比例尺250 μ m。

[0028] 图13描绘了在盲肠接种之后第24天的总小鼠肿瘤负荷。将小鼠用 2×10^6 个CT-26F3 RFP/Luc细胞接种至盲肠壁中。第10天、第12天以及第14天经由尾静脉静脉内施用由10 μ g pDNA组成的处理。组包括PBS(未处理;n=7)、pGFP DNA LCP(10 μ g每隔一天 $\times 3$;n=6)以及pCXCL12陷阱LCP(10 μ g每隔一天 $\times 3$;n=7)。通过腹膜内施用200 μ l荧光素(10mg/ml)追踪肿瘤质量的进展。在施用荧光素之后10分钟进行荧光素酶生物发光成像。

[0029] 图14描绘了(A)LPD NP(用于囊封质粒的载体)的TEM图像。(B)带有KPC原位肿瘤的小鼠中DiI标记的LPD NP的生物分布(注射后24小时)。(C)肝和肿瘤中DiI分布的荧光图像(白色数字指示器官中吸收DiI的细胞%)。将GFP LPD NP的两个日剂量静脉内注射至带有肿瘤的小鼠中。示出了肝和肿瘤中的GFP表达(绿色数字)。鬼笔环肽(phalloidin)标记细胞肌动蛋白。结果表明,尽管肝是吸收NP的主要器官,但质粒表达主要在肿瘤中(n=3)。(D)肿瘤内不同细胞群体中的GFP表达。定量每个细胞群体中的GFP阳性细胞%(白色数字)。 α SMA阳性成纤维细胞和RFP阳性肿瘤细胞是肿瘤微环境内的主要GFP产生细胞。(E)通过His标签ELISA定量His标签标记的陷阱质粒的瞬时表达。陷阱的表达在一周内是瞬时的。再一次地,肿瘤是主要产生器官。与陷阱蛋白相比较,质粒递送延长了肿瘤中的陷阱表达(n=4)。

[0030] 图15描绘了肿瘤生长抑制和宿主存活。(A)对带有KPC同种异体移植物的小鼠的不同处理的给药时程示于上图中。在不同处理(n=5-7)之后KPC肿瘤的IVIS图像示于下图中。(B)KPC的肿瘤抑制曲线(n=6-10)。(C)处理组的存活比例。数据示出了平均值 $\pm$ SD,n=5-8(D&E)。使用低剂量质粒处理(30 μ g/小鼠,4次),(D)和高剂量质粒处理(50 μ g/小鼠,4次,E)的带有KPC的小鼠的终末时间点肿瘤重量。n=4。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。如果未特定提及,那么通过与对照组相比较来计算统计分析。

[0031] 图16描绘了长期转移研究。(A)在不同处理(n=4-5)之后1个月主要器官中KPC细胞的转移。肝、肺以及脾是KPC转移的主要器官。(B)H&E染色示出了PBS对照组的主要器官中肿瘤转移的组织学。当小鼠用组合陷阱NP处理时转移显著受抑制。蓝色圆圈和箭头指示肺、脾以及肝中的转移性肿瘤生长。B中的尺条表示100 μ m。

[0032] 图17描绘了来自使用不同处理的带有原位KPC胰腺癌的小鼠的脾细胞的IFN- γ ELISpot试验。(A)从带有肿瘤的动物收集脾。用来自正常脾细胞(对照)、KPC细胞或用RFP和荧光素酶标志转导的KPC细胞的提取物再刺激脾细胞。将分泌IFN- γ 的细胞用抗IFN- γ 抗体染色。将结果定量并且示于右图中。ns:不显著, $***p < 0.001$ 。n=4。B.从使用不同处理的带有肿瘤的动物收集脾,所述处理是:PBS、CXCL12陷阱NP、PDL1陷阱NP以及组合陷阱NP。用来自KPC RFP/Luc的提取物再刺激脾细胞。将分泌IFN- γ 的细胞用抗IFN- γ 抗体染色。在不同处理(n=4)当中未发现显著差异。

[0033] 图18描绘了组合陷阱NP有助于T细胞浸润至肿瘤微环境中。(A)将来自使用不同处理的KPC同种异体移植物的组织切片针对CD3(绿色)、p53(红色)以及DAPI(蓝色)染色并且然后通过IF显微术分析。邻近的H&E染色示出了各区的间质架构。黄色虚线展现侵入正常胰腺中的肿瘤细胞的边缘。放大橙色长方形区域以供更好的显现。肿瘤区也以更低的放大率呈现。比例尺指示400 μ m。(B)用来自每个处理的5个代表性图像的Image J定量肿瘤区内CD3+细胞的百分比。(C)将在不同处理(n=5)之后KPC同种异体移植肿瘤(在肿瘤区内)的单细胞悬浮液用针对CD3和CD8的抗体染色。通过流式细胞术定量CD3 $^+$ CD8细胞的百分比。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。D和E.用CD8mAb(300 μ g/小鼠)的3次日注射来预处理带有KPC98027肿瘤的

小鼠以耗尽小鼠中的CD8⁺T细胞。同种型mAb用作对照。通过成像 (D) 比较有或没有CD8耗尽的小鼠中组合陷阱NP的功效并且定量 (E)。

[0034] 图19描绘了肿瘤微环境中肿瘤浸润免疫细胞的变化。将带有KPC鼠类肿瘤的小鼠分成四个组并且用PBS、CXCL12陷阱/对照NP、PDL1陷阱/对照NP或组合陷阱NP处理。在处理结束时,对小鼠施以无痛致死术并且收集肿瘤组织用于 (A) 免疫染色评估和 (B) 流式细胞术试验:第一个图示出了MDSC (黄色);第二个图示出了Treg细胞 (黄色);并且第三个图示出了巨噬细胞 (红色)。以白色示出的数字指示肿瘤中每种细胞类型的平均数%。A中的尺条表示200 μ m。 $*p<0.05$; $**p<0.01$ 。如果未特定提及,那么通过与未处理组相比较来计算统计分析。

[0035] 图20描绘了在陷阱质粒处理之后CXCL12和PD-L1覆盖率的变化。呈现荧光图像 (A) 与定量 (B) ($n=5$)。A中的尺条表示200 μ m。如果未特定提及,那么通过与对照组相比较来计算统计分析。所有数据示出了平均值 $\pm$ SEM ($n=4$), $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0036] 图21描绘了肿瘤微环境中细胞因子的变化。使用定量RT-PCR检测细胞因子水平。如果未特定提及,那么通过与对照组相比较来计算统计分析。所有数据示出了平均值 $\pm$ SEM ($n=4$), $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0037] 图22描绘了在各种处理之后肿瘤微环境的变化。(A) 将带有KPC的小鼠分成4个组并且用PBS、CXCL12陷阱/对照NP、PDL1陷阱/对照NP或组合陷阱NP处理。在处理结束时,对小鼠施以无痛致死术并且收集肿瘤组织用于CD31 (以绿色示出) 和 α SMA (成纤维细胞染色,以红色示出) 的双荧光染色。将代表性位置 (黄色虚线正方形) 放大 (黄色正方形)。在CXCL12陷阱或组合陷阱处理之后使血管减压并且正常化。黄色箭头指示正常化的血管。下图的图像从相应上图的图像中的加框区域放大。上图和下图中的尺条分别表示500和100 μ m。(B) 使用Image J从每个组的5个代表性图像定量 α SMA覆盖率、CD31密度以及正常化的血管的%。如果未特定提及,那么通过与对照组相比较来计算统计分析。所有数据示出了平均值 $\pm$ SD ($n=5$), $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0038] 图23描绘了分别来自用PBS或组合陷阱NP处理的带有KPC同种异体移植物的小鼠的不同器官和肿瘤中DiI标记的LPD NP的累积 (A) 和分布 (B)。

[0039] 图24描绘了分别来自用PBS、CXCL12陷阱/对照NP、PDL1陷阱/对照NP以及组合陷阱NP处理的小鼠的肿瘤内的胶原蛋白覆盖率。

[0040] 图25描绘了带有KPC的小鼠的H&E形态,将所述小鼠分成5个组并且每两天用PBS、对照NP、CXCL12陷阱/对照NP、PD-L1陷阱/对照NP以及组合陷阱NP的4个剂量处理。在处理结束时,对小鼠施以无痛致死术并且收集主要器官用于H&E病理学染色。蓝色长方形突出显示PBS和对照NP组的肝和肾,指示了严重的肝和肾毒性。在这些器官中观测到细胞液泡化、脱落的退化细胞以及局灶性坏死 (黄色箭头)。

具体实施方式

[0041] 如本文所公开,改善癌症患者的存活率和治疗在于防止或减少转移的发生。特别地,结肠直肠癌 (CRC) 患者倾向于发展成肝转移。研究已经显示,在结肠癌细胞上表达的趋化因子受体 (CXCR4) 与由肝星状细胞 (HSC) 分泌的趋化因子配体 (CXCL12) 之间的关系在CRC肝转移中起显著作用 (Zeelenberg I, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. 趋化因子受体CXCR4是

结肠癌微转移的外生所需要的(The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases).《癌症研究(Cancer Res.)》,63:3833-3839,2003)。这些肝星状细胞是驻留型窦周细胞,其已经显示产生高水平的内源性CXCL12以供淋巴细胞募集至发炎区域。迁移和侵入研究已经显示,在高水平的CXCL12存在下,结肠直肠癌细胞(CXCR4阳性)经由CXCL12浓度梯度迁移和侵入。人类结肠直肠癌样品的进一步研究还已经发现,肝转移的不良预后和更高速率与癌细胞上高水平的CXCR4表达相关联(Zeelenberg I,Ruuls-Van Stalle L,Roos E.趋化因子受体CXCR4是结肠癌微转移的外生所需要的(The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases).《癌症研究(Cancer Res.)》,63:3833-3839,2003)。如本文所描述,在未来转移部位(肝)处破坏这个CXCL12梯度(预防性地)的方法可以减少结肠直肠肝转移的发生。

[0042] 如本文所描述,本发明方法避免了已知疗法的问题。用小分子CXCR4拮抗剂AMD3100治疗动物已经证明,破坏CXCL12/CXCR4轴可以减少结肠直肠肝转移的发生(Matsusue R,Kubo H,Hisamori S,Okoshi K,Takagi H,Hida K,Nakano K,Itami A,Kawada K,Nagayama S,Sakai Y.肝星状细胞通过SDF-1/CXCR4轴的作用促进结肠癌细胞的肝转移(epatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4axis).《外科肿瘤学年鉴(Ann Surg Oncol.)》16(9):2645-53,2009)。随后,已经开发出许多CXCR4拮抗剂。然而,CXCL12和CXCR4在免疫系统中的作用对于正常动态平衡是至关重要的。因此,包括小分子和蛋白质疗法的这些传统治疗伴随有全身脱靶毒性问题。此外,据我们所知,尚未开发出或报道有靶向CXCL12的疗法来减少转移病灶的发生。

[0043] 如本文所公开,可以实现独特的抗癌策略,其中基因(编码CXCL12陷阱)至肝的递送可以改变肝微环境,例如,其中的蛋白质因子水平。本文所描述的方法引起微环境的局部和瞬时改变,由此使其它细胞免受不合需要的毒性。这类基因的递送可以达成诸如CXCL12的因子的浓度降低,引发肝抵抗结肠直肠癌细胞的迁移/侵入。CXCL12与CXCR4之间的关联在肝转移中起关键作用,其中CXCR4的过度表达是高度转移性人类结肠直肠肝转移病灶以及在肝中表达的高水平的CXCL12的特征(Shan-shan Zhang,Zhi-peng Han,Ying-ying Jing等,CD133+CXCR4+结肠癌细胞展现转移潜力并且预测患者的不良预后(CD133+CXCR4+ colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients).《BMC医学(BMC Med.)》10:85,2012)。

[0044] 本文所描述的主题不限于任何特定组织或靶细胞。如本文所公开,靶向微环境是独特的抗癌范例,其中不特异性地靶向转移病灶,而是引发环境不适合于转移形成或进展,最终使得转移的生长和发生减少。经由合并靶向部分,例如,用于治疗性蛋白质的局部肝表达的半乳糖靶向部分,有可能靶向不具有在脱靶器官或血清中发现的表达的所需组织。因为这种方法可以用于除肝以外的许多组织中并且与除CXCL12以外的其它陷阱一起使用,可以靶向其它转移性组织,诸如乳房、肺、淋巴结、前列腺、脑、胰腺以及骨。

[0045] 其它微环境因子可以在癌转移的迁移、侵入以及增殖中起作用。当诱导发炎时,这些因子在所关注的器官中变得更加显著。这种发炎可以与许多不同环境因子相关联,这些因子从来自原发性癌症的分泌蛋白至患者的饮食而变化。因此,靶向这些因子也涵盖于本

文所描述的主题中。因此,靶向高度转移性组织或易感转移的组织中的因子是用于减少许多器官中转移的发生/进展的有前景的疗法。

[0046] 大多数方法在治疗疾病中不足的标靶特异性已经限制了在临床中这些疾病的成功治疗的应用。此外,归因于众多细胞外和细胞内障碍的基因疗法的缺点已经真正阻碍了许多疾病的临床治疗。因此,为了克服这些障碍,我们已经开发出具有高度特异性、累积以及递送至靶细胞核中的用于临床应用的载体。本文所描述的主题克服了先前疗法的问题并且不仅可以治疗肝转移和原发性癌症,而且可以治疗众多其它肝病,诸如HBV、脂肪肝、肝硬化以及许多其它肝病。此外,除肝病之外,经由合并不同靶向部分,诸如靶向肺上皮细胞上高度表达的腺苷A2B受体的腺苷类似物,引发载体累积并且递送陷阱,诸如在易感转移的其它组织中起作用的针对CXCL12或其它微环境因子的pDNA陷阱。因此,本文所描述的方法和组合物可以用于引发已知具有高转移率的众多组织,诸如肺、淋巴结、乳房、骨以及其它微环境因子。

[0047] 另一种类型的顽固性癌症是胰腺肿瘤,据知这种肿瘤归因于其很强的免疫抑制性肿瘤微环境(TME)而对免疫疗法具抗性。CXCL12和PD-L1是控制抑制性TME的两个分子。制造以高亲和力(分别 $K_d=4\text{nM}$ 和 16pM)结合这两个分子之一的融合蛋白,在本文中也称作一种类型的陷阱,并且测试与标靶的特异性结合。在LPD纳米粒子中配制编码每个陷阱的质粒DNA并且静脉内注射至带有KPC原位胰腺癌的小鼠。陷阱的表达主要在肿瘤中并且其次在肝中。组合陷阱疗法使肿瘤缩小并且使宿主存活显著延长57%。单独的任一种陷阱仅带来部分治疗作用。我们也发现,CXCL12陷阱允许T细胞穿透至肿瘤中并且PD-L1陷阱允许浸润的T细胞杀死肿瘤细胞。组合陷阱疗法也显著减少肿瘤细胞转移至其它器官。在包括肝和肾的所有主要器官中未发现毒性。因此,组合陷阱疗法显著改变抑制性TME以允许宿主免疫系统杀死肿瘤细胞。

[0048] 现在将在下文中更全面地描述本发明公开的主题。然而,本文所陈述的本发明公开的主题的许多修改和其它实施方案将为具有前述描述中所呈现的教义的权利的本发明公开的主题所属领域的技术者想到。因此,应了解,本发明公开的主题不限于所公开的特定实施方案并且修改和其它实施方案预期包括于所附权利要求书的范围内。换句话说,本文所描述的主题覆盖所有替代物、修改以及等效物。在所并入的文献、专利以及类似材料中的一者或多者不同于或有悖于本申请,包括(但不限于)所定义的术语、术语用法、所描述的技术等等的情况下,以本申请为准。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域的一般技术人员通常所理解的相同的含义。本文所提及的所有公布、专利申请、专利以及其它参考文献以全文引用的方式并入。

[0049] I. 定义

[0050] 术语“微环境”指的是靶细胞和其邻近的环境。

[0051] 术语“构建体”指的是将要在靶组织或细胞中表达的基因材料,诸如核酸序列的人工构建的区段。其可以含有基因插入物,并且任何必要的启动子等等也将存在于载体中。

[0052] 术语“易感”指的是组织或细胞由于其微环境,某些类型的癌症倾向于在这种组织或细胞中生长或转移。作为一个非限制性实例,结肠直肠癌由于肝细胞的微环境而倾向于在肝中转移和生长。据知其它癌症转移至体内的特定组织和细胞。在另一个非限制性实例中,乳癌倾向于在肝、脑和区域淋巴结以及骨中转移。因此,这些组织和细胞如本文所用是

易感的。

[0053] 如本文所用,“减少转移”指的是抑制或减轻转移至易感组织和细胞。可以使用确定转移减少的众多方式。作为一个非限制性实例,在治疗后显示极少或无转移的具有通常已知转移并且将预期转移的癌症类型的受试者将显示转移的减少。特别地,本文所描述的主题提供了减少任何癌症至肝的转移。

[0054] 如本文所用,术语“陷阱”指的是结合、抑制或降低微环境中靶分子的生物活性的表达产物。陷阱由载体递送,所述载体可以是病毒的、非病毒的、合成的(诸如纳米粒子)等等,其中每一者包含用于陷阱的亚克隆和表达的必需材料。陷阱也可以由脂质体或活细胞,包括单核细胞和干细胞递送。抑制可以由例如K_a测量,或通过显示标靶的活性降低1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多来测量。设计陷阱以对所需靶分子起作用,所述靶分子在许多情况下鉴于本文所描述的主题是如本领域中已知的可捕获的蛋白质。

[0055] 术语“瞬时”指的是非永久的效应。

[0056] 术语“受试者”指的是动物,诸如哺乳动物,包括(但不限于)灵长类动物(例如,人类)、乳牛、绵羊、山羊、马、犬、猫、兔、大鼠、小鼠等等。在某些实施方案中,受试者是人类。在实施方案中,受试者已经被诊断患有疾病,诸如癌症或肝病。

[0057] 术语“治疗(treat/treatment)”指的是治疗性处理和预防性或防御性措施,其中目的在于预防或减缓(减轻)非所需的生理变化或病症,诸如癌症的发展或扩散。出于本公开的目的,有益或所需的临床结果包括(但不限于)症状的缓和、疾病程度的减小、稳定(即,不恶化)的疾病病况、疾病进展的延迟或减缓、疾病病况的改善或减轻,以及缓解(部分抑或完全),无论是可检测的或不可检测的。“治疗”还可以意味着与如若不接受治疗的预期存活相比延长存活。需要治疗者包括已经患有病状或病症的那些以及易于患有病状或病症的那些或病状或病症有待预防的那些。

[0058] 短语“治疗有效量”意味着达成以下的陷阱的量:(i) 治疗或预防特定疾病、病状或病症,(ii) 削弱、改善或消除特定疾病、病状或病症的一种或多种症状,或(iii) 预防或延迟本文所描述的特定疾病、病状或病症的一种或多种症状的发作。在癌症的情况下,治疗有效量可以减少癌细胞的数目;减小肿瘤大小;抑制(即,一定程度上减缓并且优选地阻止)癌细胞浸润至外周器官;抑制(即,一定程度上减缓并且优选地阻止)肿瘤转移;一定程度上抑制肿瘤生长;和/或一定程度上减轻与癌症相关联的症状中的一者或多者。

[0059] 术语“癌症”指的是或描述了通常由不受调控的细胞生长表征的哺乳动物的生理病状。“肿瘤”包含一个或多个癌性细胞。

[0060] 术语“医药学上可接受的盐”表示生物学上或其它方面合乎需要的盐。医药学上可接受的盐包括酸加成盐与碱加成盐。短语“医药学上可接受的”指示物质或组合物必须化学上和/或毒理学上与构成配方的其它成分和/或其所治疗的哺乳动物相容。

[0061] 如本文所用,术语“递送”指的是物质或分子(例如,多核苷酸)传递至生理部位、组织或细胞。这涵盖递送至细胞的细胞内部分或递送至细胞外间隙。多核苷酸递送至细胞的细胞内部分中通常也称作“转染”。

[0062] 如本文所用,术语“细胞内”或“细胞内地”具有如本领域中所理解的其普通的含义。一般来说,由膜包围的细胞内部的间隙定义为“细胞内”间隙。类似地,如本文所用,术语

“细胞外”或“细胞外地”具有如本领域中所理解的其普通的含义。一般来说,细胞膜外部的间隙定义为“细胞外”间隙。

[0063] 成纤维细胞是合成细胞外基质和胶原蛋白的细胞,动物组织的结构框架(间质)。成纤维细胞的主要功能在于通过连续分泌细胞外基质的前体维持结缔组织的结构完整性。在实施方案中,成纤维细胞是本文所描述的载体的间质标靶。

[0064] 以下缩写可以用于本文中。在本文献的正文中出现的情况下定义一些缩写。

[0065]	ALT	丙氨酸转氨酶
[0066]	AST	天冬氨酸转氨酶
[0067]	BLI	生物层干涉法
[0068]	BUN	血尿素氮
[0069]	CMV	巨细胞病毒
[0070]	CRC	结肠直肠癌
[0071]	DLS	动态光散射
[0072]	DAPI	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
[0073]	DOPA	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸
[0074]	DOTAP	1,2-二油酰-3-三甲铵-丙烷
[0075]	DSPE	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
[0076]	ELISA	酶联免疫吸附试验
[0077]	GFP	绿色荧光蛋白
[0078]	LCP	脂质磷酸钙
[0079]	mc	单环
[0080]	NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
[0081]	PBS	磷酸盐缓冲盐水
[0082]	PEG	聚乙二醇
[0083]	PK	药物代谢动力学
[0084]	p陷阱	半乳糖-PEG-LCP w/pCXCL12陷阱/mc-CR8C
[0085]	TEM	透射电子显微术

[0086] 免疫球蛋白轻或重链可变区(本文中 also 分别称作“轻链可变域”(“VL域”)或“重链可变域”(“VH域”))由三个“互补决定区”或“CDR”中断的“框架”区组成。框架区用来对齐CDR用于特异性结合至抗原的表位。CDR包括主要负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。从氨基端至羧基端,VL与VH域包含以下框架(FR)和CDR区:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4。VL域的CDR 1、2以及3在本文中也分别称作CDR-L1、CDR-L2以及CDR-L3;VH域的CDR 1、2以及3在本文中也分别称作CDR-H1、CDR-H2以及CDR-H3。

[0087] 氨基酸指派给每个VL和VH域是根据CDR的任何常规定义。常规定义包括Kabat定义(Kabat,《免疫学重要性的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991); Chothia定义(Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》196:901-917, 1987; Chothia等,《自然(Nature)》342:878-883, 1989); Chothia Kabat CDR的复合,其中CDR-H1是Chothia和Kabat CDR的复合;由Oxford Molecular的抗体建模软件使用的AbM定义;以及Martin等

(bioinfo.org.uk/abs)的Contact定义(见表1)。Kabat提供了广泛使用的编号规定(Kabat编号),其中在不同重链之间或在不同轻链之间的相应残基指派为相同的编号。当抗体据称依据CDR的某个定义(例如,Kabat)包含CDR时,那个定义指定了存在于抗体中的CDR残基的最小数目(即,Kabat CDR)。不排除的是,属于另一个常规CDR定义内但在指定定义外的其它残基也存在。举例来说,包含由Kabat定义的CDR的抗体连同其它可能性包括CDR含有Kabat CDR残基并且不含其它CDR残基的抗体,和CDR H1是复合Chothia-Kabat CDR H1并且其它CDR基于其它定义含有Kabat CDR残基并且不含额外CDR残基的抗体。

[0088] 表1

[0089] 使用Kabat编号的CDR的常规定义

[0090]

环	Kabat	Chothia	Chothia 和 Kabat 的复合	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101
*依据 Chothia 的 CDR-H1 在 H32、H33 或 H34 处结束(取决于环的长度)。这是因为 Kabat 编号方案将额外残基的插入置于 35A 和 35B 处,而 Chothia 编号将其置于 31A 和 31B 处。如果 H35A 和 H35B (Kabat 编号)都不存在,那么 Chothia CDR-H1 环在 H32 处结束。如果仅 H35A 存在,那么其在 H33 处结束。如果 H35A 与 H35B 都存在,那么其在 H34 处结束。					

[0091] 术语“表位”指的是抗体所结合的抗原上的位点。表位可以由相连氨基酸或通过一个或多个蛋白质的三级折叠并置的非相连氨基酸形成。由相连氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在用变性溶剂处理时损失。表位通常包括至少3个,并且更常包括至少5个或8-10个在独特空间构象中的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如x射线晶体学和2维核磁共振。参看例如表位定位方案(Epitope Mapping Protocols),《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,第66卷,Glenn E.Morris编,(1996)。表位可以是线性的。表位也可以是构象表位。应注意,术语“一个”或“一种”实体指的是那个实体的一者或多者;例如,“一个阳离子脂质”应理解为表示一个或多个阳离子脂质。这样的话,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个”以及“至少一个”在本文中可以互换使用。

[0092] 在本说明书和权利要求书通篇,词语“包含”以非排他性意义使用,但上下文另有要求的情况除外。

[0093] 如本文所用,术语“约”当涉及值时意味着涵盖从指定量在一些实施方案中±50%、在一些实施方案中±20%、在一些实施方案中±10%、在一些实施方案中±5%、在一

些实施方案中 $\pm 1\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 0.5\%$ 以及在一些实施方案中 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这类变化适于进行所公开的方法或采用所公开的组合物。

[0094] 下文陈述了额外的定义。

[0095] II. 方法

[0096] 在一个实施方案中,本发明主题是针对一种改变靶细胞的微环境的方法,其包括向受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含用于在靶细胞中表达陷阱的构建体,其中所述陷阱在靶细胞中表达,其中靶细胞的微环境得以改变。

[0097] 如本文所描述,陷阱的表达使得有效量的所表达的陷阱存在以改变靶细胞的微环境。

[0098] 改变靶细胞的微环境包括减少通常存在于微环境中的靶分子的量。如本文所用,减少量指的是靶分子的量与不存在陷阱的情况下的量相比降低 1% 、 2% 、 3% 、 4% 、 5% 、 6% 、 7% 、 8% 、 9% 、 10% 、 11% 、 12% 、 13% 、 14% 、 15% 、 16% 、 17% 、 18% 、 19% 、 20% 、 25% 、 30% 、 35% 、 40% 、 45% 、 50% 、 55% 、 60% 、 65% 、 70% 、 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 或更多。

[0099] 有用的靶分子包括蛋白质,诸如酶、趋化因子、细胞因子、蛋白质因子以及其组合。适合的标靶包括下表2中的那些。

[0100] 表2

[0101]

CXC (α 趋化因子)

CXCL1	GRO- α /SCYB-1/MGSA/GRO-1/NAP-3 (MIP-2 α /KC)	CXCR1、CXCR2
CXCL2	GRO- β /SCYB-2/GRO-2/Mip-2 α (MIP-2 β /KC)	CXCR2
CXCL3	GRO- γ /SCYB-3/GRO-3/Mip-2 β (KC)	CXCR2
CXCL4	PF-4/SCYB-4	未知
CXCL5	ENA-78/SCYB-5 (LIX)	CXCR2
CXCL6	GCP-2/SCYB-6	CXCR1、CXCR2
CXCL7	NAP-2/SCYB-7/PBP/CTAP-III/ β -TG	CXCR1、CXCR2
CXCL8	SCYB-8/GCP-1/NAP-1/MDNCF	CXCR1、CXCR2
CXCL9	MIG/SCYB-9	CXCR3
CXCL10	IP-10/SCYB-10	CXCR3、KSHV-GPCR
CXCL11	I-TAC/SCYB-11/ β -R1/HI74/IP-9	CXCR3
CXCL12	SDF-1/SCYB-12/PBSF	CXCR4
CXCL13	BCA-1/SCYB-13	CXCR5

[0102]

CXCL14	BRAK/SCYB-14/博雷因子(Bolckine)	未知
CXCL16	小诱导性细胞因子B6	CXCR6

C (γ趋化因子)

XCL1	淋巴细胞趋化因子(Lymphotactin)/SCYCL/SCM-1α/淋巴细胞趋化因子α	XCR1
XCL2	SCM-1b/SCYC2/淋巴细胞趋化因子β	XCR1

CX₃C (δ趋化因子)

CX ₃ CL1	分形趋化因子(Fractalkine)/SCYD1	CX ₃ CR1
CCL1	I-309/SCYA1 (TCA-3)	CCR8
CCL2	MCP-1/SCYA2/MCAF/HC11 (JE)	CCR2, CCR5, CCR10
CCL3	MIP-1α/SCYA3/LD78α/SIS-α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1β/SCYA4/ACT-2/G-26/HC21/LAG-1/SIS-γ	CCR5, CCR10
CCL5	调节活化蛋白(RANTES)/SCYA5/SIS-δ	CCR1, CCR3, CCR5, CCR10
CCL7	MCP-3/SCYA7	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL8	MCP-2/SCYA8/HC14 (MARC)	CCR2, CCR3, CCR5, CCR1
CCL11	嗜酸粒细胞趋化因子(Eotaxin)/SCYA11	CCR3
CCL13	MCP-4/SCYA13/Ck β10/NCC-1	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL14	HCC-1/SCYA14/Ck β1/MCIF/NCC-2/CC-1	CCR1
CCL15	MIP-1δ/SCYA15/Lkn-1/HCC-2/MIP-5/NCC-3/CC-2	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/SCYA16/Ck β12/LEC/LCC-1/NCC-4/ILINCK/LMC/Mtn-1	CCR1
CCL17	TARC/SCYA17 (ABCD-2)	CCR4
CCL18	PARC/SCYA18/Ckβ7/DC-CK1/AMAC-1/MIP-4/DC趋化因子(DCtactin)	未知
CCL19	MIP-3β/SCYA19/Ckβ11/ELC/次级非淋巴组织趋化因子-3 (Exodus-3)	CCR7
CCL20	MIP-3α/SCYA20/LARC/次级非淋巴组织趋化因子-1	CCR6
CCL21	δC因子(δCkine)/SCYA21/Ckβ9/SLC/次级非淋巴组织趋化因子-2	CCR7
CCL22	MDC/SCYA22 (ABCD-1)	CCR4
CCL23	MPIF/SCYA23/Ckβ8/Ckβ8-1/MIP-3/MPIF-1	CCR1
CCL24	嗜酸粒细胞趋化因子-2/SCYA24/Ckβ6/MPIF-2	CCR3
CCL25	TECK/SCYA25/Ckβ15	CCR9
CCL26	嗜酸粒细胞趋化因子-3/SCYA26/MIP-4α/TSC-1/IMA	CCR3
CCL27	CTACK/SCYA27/ES因子(ESkine)/皮肤因子(Skinkine)	CCR3, CCR2, CCR10
CCL28	CCL28/SCYA28/MEC	CCR10, CCR3

[0103] 特别有用的靶分子是CXCL12。其它蛋白质因子包括：EGF、神经调节蛋白(Neuregulin)、FGF、HGF、VEGF、VEGFR和NRP-1、Ang1和Ang2、PDGF(BB-同二聚体)和PDGFR、TGF-β、内皮糖蛋白(endoglin)和TGF-β受体、MCP-1、组织胺、整合素α2β1、αVβ3、αVβ5、αVβ6、α6β4和α5β1、VE-钙粘蛋白(VE-cadherin)和CD31、肝配蛋白(ephra) 、纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制剂-1、eNOS和COX-2、AC133、ID1/ID3、LOX以及HIF。

[0104] 抑制性和阻断性陷阱以及其标靶：大分子标靶的抑制性陷阱包括可以是特异性地结合所关注的标靶并且进一步抑制或阻断其生物功能的蛋白质分子的陷阱。抑制性或阻断性陷阱的标靶可以是细胞/趋化因子和其相应受体，包括(但不限于) IL-1、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-15、IL-21 (和IL受体)、TNF-α (和TNF-α受体)、TGF-β (和TGF-β受体)、CSF-1 (和CSF-1受体)、CXCR1和其配体(CXCL5、CXCL6、CXCL8)、CXCR2和其配体(CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7和CXCL8)、CXCR3和其配体(CXCL4、CXCL9、CXCL10、CXCL11)、CXCR4和其

配体 (CXCL12)、CXCR5和其配体 (CXCL13)、CX3CR1和其配体 (CX3CL1)、CCR1和其配体 (CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL23)、CCR2和其配体 (CCL2、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL16)、CCR3和其配体 (CCL4、CCL5、CCL7、CCL11、CCL13、CCL15、CCL24、CCL26、CCL28)、CCR4和其配体 (CCL17、CCL22)、CCR5和其配体 (CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL14、CCL16)、CCR6和其配体 (CCL20)、CCR7和其配体 (CCL19、CCL21)、CCR9和其配体 (CCL25)、CCR10和其配体 (CCL27和CCL28)、ACKR3和其配体 (CCL11、CCL12)、ACKR6和其配体 (CCL18)。

[0105] 抑制性陷阱的标靶可以是免疫检查点相关蛋白,包括(但不限于)CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (CD270或TNFRSF14)、BTLA (CD272)、TIM-3、GAL9、TIGIT、A2aR、LAG-3、KIR以及MHC I或II类。

[0106] 标靶还包括那些标靶,其通过抑制性捕获的上调或下调将抑制氨基酸(即,色氨酸、精氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺以及苯丙氨酸)的分解代谢(由IDO、TDO、ARG1/2)、腺苷(由CD39、CD73,并且经由腺苷受体介导)、前列腺素E2(由COX2)、活性氧簇(ROS)和活性氮簇(RNS)(由iNOS)的产生中所涉及的IDO、TDO、精氨酸酶-1/2、腺苷受体、CD39、CD73、COX2、EP受体以及iNOS的表达或降低其生物活性,这全部引起TME的免疫抑制。

[0107] 小分子代谢物的抑制性陷阱:抑制性陷阱的标靶还可以是小分子,包括(但不限于)色氨酸代谢物(即,由IDO或TDO产生并且经由芳烃受体传导信号的犬尿氨酸)、cAMP以及腺苷,这些在T细胞的抑制、免疫抑制性细胞的募集和/或扩张并且因此在免疫抑制性肿瘤微环境中起关键作用。

[0108] 刺激性陷阱和其标靶:陷阱还可以是刺激性的,包括激动性地作用于免疫检查点标靶CD28、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137或TNFRSF9)、OX40 (CD134或TNFRSF4)、GITR (CD357或TNFRSF18)、CD27 (TNFRSF7)以及CD40 (TNFRSF5)的那些。刺激性陷阱还可以是具有或模拟上述受体的配体的激动作用的那些,包括(但不限于)B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、B7-H5 (VISTA或Gi24)、ICOSL (B7H2或CD275)、4-1BBL (CD137L)、OX40L (CD252)、GITRL、CD27L (CD70)以及CD40L (CD154)。激动性陷阱的标靶还包括一些to11样受体,包括(但不限于)在T细胞的活化中起关键作用的TLR4、TLR7、TLR8以及TLR9。陷阱可以基于抗体样域或片段。已经发现,趋化/细胞因子陷阱的局部和瞬时表达产生所需生物活性和低毒性。大多数标靶结合生物制剂依赖于具有长半衰期的全长单克隆抗体。的确,CXCL12陷阱的全身和长期施用可以导致瞬时的肝损伤和减少的白血细胞计数,如我们的体内数据所证明。另外,归因于大的尺寸、复杂的结构以及深奥的翻译后修饰,全长抗体在充当趋化/细胞因子陷阱中具有若干固有的缺点,包括组织穿透以接近TME的低效性,工程改造和优化标靶捕获特性,诸如受体结合的破坏、高稳定性、双特异性(如有必要)的困难,以及Fc诱导的副作用。我们应对挑战的策略是从蛋白质文库基于小蛋白质域开发具有所需特征的新颖捕获分子,所述蛋白质域包括(但不限于)免疫球蛋白VH域、免疫球蛋白VL域、VH和VL融合蛋白、scFv、来源于抗体的结合和/或框架区的肽或蛋白质、非免疫球蛋白标靶结合域,诸如基于非免疫球蛋白支架的单域抗体模拟物(诸如基于FN域的单抗体、基于Z域的亲本体、DARPIN),单独和以任何组合形式。

[0109] 可以改变和人工改造一些已知的标靶结合抗体以充当用于这项工作中所描述的局部和瞬时基因递送方法的陷阱。为了与天然受体有效地竞争,陷阱应对受体结合位点具有异常高的结合特异性和亲和力,这一特性更可能经由使用广泛用于体外蛋白质选择中的

蛋白质/肽展示和选择技术,诸如噬菌体展示、细胞表面展示、mRNA展示、DNA展示、核糖体展示从在与所关注的标靶的相互作用中可以利用的表面环或残基处具有高度多样性的蛋白质或抗体片段文库进行定向蛋白质选择来达成。

[0110] 如本文所描述,由某些关键的趋化/细胞因子,例如,在CXCR4阳性结肠直肠癌细胞至肝的迁移/侵入中起关键作用中已经牵涉到的趋化因子CXCL12介导的信号传导路径的局部和瞬时阻断可以显著防止CRC转移。我们首先通过使V_H和V_L域经由蛋白酶抗性柔性连接子融合来工程改造基于抗CXCL12抗体序列的CXCL12陷阱基因。为了达成在表达之后从肝的肝细胞有效分泌,将强信号肽合并至N端,而在C端引入亲和标签以有助于蛋白质纯化和检测。使所得CXCL12陷阱的编码序列克隆至由CMV启动子驱动的表达载体pCDNA3.1中。发现在293T细胞中表达并且从其纯化的所得CXCL12陷阱与CXCL12具有4nM的K_d(图2A),而其与CXCL1、CXCL8以及CXCL10的结合是不可检测的。这个CXCL12陷阱大大抑制用CXCL12刺激的CT-26FL3细胞的迁移和侵入(图2B-C)。使用基于脂质磷酸钙(LCP)纳米粒子的基因递送系统测试这个CXCL12陷阱的局部和瞬时表达(图5)。如下文所详述,用在LCP中配制的pCXCL12-陷阱pDNA的三个处理几乎完全解决了CT26-FL3结肠直肠肝转移的任何发生并且没有癌症扩散至其它器官的征象(图6)。

[0111] 为了产生具有更高得多的效力的CXCL12陷阱,我们基于V_H域文库开发出CXCL12陷阱。为了有助于体外蛋白质选择,我们表达和纯化含有C端生物素标签的野生型重组CXCL12(wtCXCL12-生物素,图1A),以及在CXCR4结合中牵涉到的N端8个残基(在图1A中以青色突出)缺失的CXCL12突变体(Δ CXCL12,图1A)。wtCXCL12-生物素用作阳性选择的标靶,而 Δ CXCL12用于经由竞争性洗涤去除结合至非所需的位点的序列。类似的策略用于开发针对其它趋化因子的单域陷阱,对于CCL2和CCL5如图1B中所说明。

[0112] 简单地说,将用抗生素蛋白链菌素-琼脂糖柱预清除的所展示的V_H域文库与适量的生物素化wtCXCL12在有助于形成二硫键的结合缓冲液中一起孵育。在室温下孵育混合物1小时,接着添加预洗涤的抗生素蛋白链菌素琼脂糖珠粒以捕捉V_H序列。首先用结合缓冲液洗涤所得珠粒以非特异性地去除所结合的序列,接着用大量过量的 Δ CXCL12竞争性洗涤以去除在远离CXCR4结合N端的位点处结合CXCL12的V_H序列。使富集的池再生用于新一轮选择。进行大量竞争性洗涤以有助于以极缓慢的解离速率结合至N端CXCL12的序列的富集。在五轮选择之后,我们成功地鉴别了紧密并且特异性地结合至wtCXCL12而不是 Δ CXCL12的6个V_H序列。如图1A中所示,这些序列具有极缓慢的解离速率,其中wtCXCL12结合亲和力在低纳摩尔至皮摩尔的范围内。

[0113] 具有协同趋化/细胞因子捕获作用的二价陷阱

[0114] 趋化因子在生理条件下作为单体和二聚体存在,并且有力证据表明两种形式调控体内功能。假定趋化因子二聚扰乱构象子态的分布,这继而差异性地影响各种下游信号传导路径的活化。已经报道了CXCL1、CXCL12、CCR2、CCR5以及IL-6全部采用二聚或寡聚结构以与其配对受体相互作用。

[0115] 一般来说,CXC趋化因子使用第一 β -股和 α -螺旋二聚,形成球状结构,其中二聚体界面定位于远离受体结合N端和N环区。CC趋化因子使用其N环残基二聚并且形成扩展结构,并且因此其二聚和受体结合域重叠。举例来说,CXCL12在生理条件下形成单体与二聚体,其对细胞信号传导和功能具有相异的作用(Ray P 2012 PMID22142194)。虽然单体CXCL12优

先活化经由Gai和Akt的CXCR4信号传导,但二聚形式更有效地促进 β -抑制蛋白2(β -arrestin 2)至CXCR4的募集和CXCR4表达癌细胞的趋化性。显著地,二聚CXCL12比CXCR7优先结合至CXCR4。这些发现指示,捕获二聚CXCL12可以更有效地阻断CXCR4介导的信号传导路径。同二聚或异二聚陷阱可以经由基因融合容易地产生(图1C)。为了产生同二聚趋化/细胞因子陷阱,每个单域陷阱可以经由柔性连接子与本身基因融合成重组融合蛋白。类似地,在两个独特位点处结合所关注的趋化因子的异二聚陷阱可以使用以类似亲和力结合至非重叠位点的两个陷阱产生。

[0116] 阻断由两个不同趋化/细胞因子介导的信号传导的双特异性陷阱

[0117] 肿瘤转移和TME免疫抑制中所涉及的趋化因子网络的冗余指示,作用于一个以上信号传导路径的捕获疗法应更加有效。可以同时阻断由两个不同趋化/细胞因子介导的信号传导路径的双特异性陷阱可以通过经由长度可调的柔性连接子基因连接具有独特特异性的两个陷阱来产生(图1C)。

[0118] 具有极有效力的标靶捕获效率的三价PD-L1陷阱

[0119] 开发结合至所关注的标靶的高质量配体的最有效方式之一是通过使标靶结合域转化成其多价形式,如在几乎所有类型的抗体和众多多聚相互作用蛋白质中所观测到的。为了使可能的免疫原性降至最低,来自小鼠、人类或其它生物体中的丰富细胞外蛋白质的高度稳定的三聚域或基于这类蛋白质的三聚域可以用于产生三价陷阱以供局部和瞬时基因递送的目的。我们选择使用来自人类CMP-1的三聚域。在小鼠或人类CMP-1的C端内的强疏水和离子相互作用得到具有高稳定性的平行、二硫键连接和棒状的三聚结构。我们开发出强大的技术平台,这允许来自内源性蛋白质(诸如PD-L1、PD-1)的标靶结合域或来自蛋白质选择的亲和域通过与三聚域基因融合轻易转化成其三价形式,得到具有高稳定性和显著增强的亲合力的三价陷阱。通常,以低纳摩尔至皮摩尔结合亲和力结合至所关注的标靶的三价陷阱可以从弱1,000倍的单体域容易地产生。这个三聚域的小鼠序列与人类CMP-1的序列是高度同源的,使得如果需要翻译应用的话,那么其容易转换成人类型式。因为三聚陷阱经由三个相同单体的自组装形成,所以其仅需要编码单体的cDNA,使得基因的递送短得多并且更容易递送。使用这个策略,我们通过使结合至PD-L1的PD-1的小鼠或人类胞外域与在小鼠和人类软骨中极丰富的稳定三聚域基因融合而开发出有效力的PD-L1陷阱(图1D)。所得三价蛋白质以约16皮摩尔的Kd结合PD-L1,这比内源性PD-1与PD-L1之间的结合高10,000(图1D)。此外,在胰腺癌的有免疫能力的KPC模型中,当与针对CXCL12的陷阱一起使用时,编码这个三聚陷阱的质粒DNA(图15)在静脉内施用NP之后有效地诱导肿瘤萎缩。

[0120] 在另一个实施方案中,由三个融合多肽形成三聚体,其中每个融合多肽包含PD-1胞外域、柔性连接子以及三聚域,所述三聚体能够结合PD-L1,其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:25具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列编码。

[0121] 在实施方案中,有用的陷阱包括受体。细胞因子受体存在于结构上相关的家族中并且包含有助于细胞因子介导的通信的高亲和力分子信号传导复合物。I型细胞因子受体在其细胞外氨基酸域中具有某些保守基序,并且缺乏固有的蛋白质酪氨酸激酶活性。这个家族包括IL2(β -亚单位)、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL9、IL11、IL12、GM-CSF、G-CSF、Epo、LIF、CNTF的受体,以及血小板生成素(Thrombopoietin,TPO)、泌乳素(Prolactin)和生长激素的

受体。I型细胞因子受体家族以家族成员与三种不同类型的受体信号传导组分(gp130、共同 β 以及共同 γ -IL2受体的 γ 链)之一形成复合物的能力为基础细分成三个子组。

[0122] II型细胞因子受体是由异源性亚单位组成的多聚受体,并且是主要对于干扰素的受体。这个家族包括IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL10、IL22以及组织因子的受体。II型细胞因子受体的胞外域在其配体结合域中共享结构类似性。已经描述了若干保守的细胞内序列基序,其可能充当细胞内效应蛋白JAK和STAT蛋白的结合位点。

[0123] 趋化因子受体是具有7次跨膜结构的G蛋白偶合受体并且偶合至G蛋白用于信号传导。趋化因子受体分成不同家族:CC趋化因子受体、CXC趋化因子受体、CX3C趋化因子受体以及XC趋化因子受体(XCR1)。

[0124] 肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族成员共享由围绕CXXCXXC的核心基序的三个二硫键形成的富半胱氨酸域(CRD),创造出延长的分子。TNFR与半胱天冬酶原经由衔接蛋白(FADD、TRADD等等)缔合,所述衔接蛋白可以使其它非活性半胱天冬酶原分解并且触发半胱天冬酶级联,这不可逆地将细胞置于凋亡。

[0125] TGF- β 受体是单程丝氨酸/苏氨酸激酶受体。TGF- β 受体包括TGFB1、TGFB2以及TGFB3,这些受体可以由其结构和功能特性加以区分。

[0126] 尽管方法包括全身施用,但方法是局部起作用的,这是在于对微环境的作用一般隔离在靶细胞中或周围。这可以通过将靶向配体合并至如本文别处所描述的载体上来实现。

[0127] 方法也是瞬时的。就是说,方法的作用持续约三(3)天或更短。在实施方案中,作用持续约20小时或更短。在实施方案中,作用持续约16小时或更短。在实施方案中,作用持续约12小时或更短。在实施方案中,作用持续约10小时或更短。在实施方案中,作用持续约8小时或更短。在实施方案中,作用持续约6小时或更短。在实施方案中,作用持续约4小时或更短。在实施方案中,作用持续约3小时或更短。在实施方案中,作用持续约3小时或更短。在实施方案中,作用持续约1小时或更短。

[0128] 在另一个实施方案中,本发明主题是针对一种减少癌症的转移的方法,其包括向罹患癌症的受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含陷阱,其中所述陷阱递送至易感转移的组织并且然后在所述组织中表达并释放出,其中癌症至组织的转移得以减少。

[0129] 在这个实施方案中,方法包括上文所描述的所有变量。

[0130] 另外,方法特别适用于如本文别处所描述的癌症。

[0131] 转移的减少可以来自完全抑制,即,不可检测,达到比考虑到癌症和/或肿瘤的类型和侵袭性所预期的更低的转移水平。这样的类型和肿瘤为本领域的技术人员所知。显示低于对照或比较者的转移的数据也证明了本文所描述的方法。减少可以是1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0132] 在另一个实施方案中,本发明主题是针对一种治疗癌症的方法,其包括向罹患癌症的受试者全身施用包含载体的组合物,其中所述载体包含陷阱。

[0133] 在另一个实施方案中,本发明主题是针对一种治疗癌症的方法,其包括向罹患癌

症的受试者全身施用组合,其中所述组合包含至少两种载体,其中载体之一包含细胞因子/趋化因子的陷阱,并且另一种载体包含与癌症相关联的标靶的陷阱。在一个特定方面,组合包含CXCL12趋化因子的陷阱和PD-L1的陷阱,并且癌症是胰腺癌,诸如胰腺导管腺癌。在另一个方面,组合包含CXCL12趋化因子的陷阱和PD-1的陷阱,并且癌症是胰腺癌,诸如胰腺导管腺癌。在另一个实施方案中,组合包括CXCL12陷阱与PD-1陷阱、CXCL12陷阱与PD-L1陷阱、CXCL12陷阱与PD-L2陷阱、CXCL12陷阱与激动性CD27陷阱、CXCL12陷阱与激动性CD28陷阱、CXCL12陷阱与激动性ICOS陷阱、CXCL12陷阱与激动性CD40陷阱、CXCL12陷阱与激动性OX40陷阱、CXCL12陷阱与激动性CD137陷阱、CXCL12陷阱与IDO陷阱、CXCL12陷阱与TDO陷阱、CXCL12陷阱与ARG1陷阱、CXCL12陷阱与NOS陷阱、CXCL12陷阱与TGF- β 陷阱、CXCL12陷阱与B7-H3陷阱、CXCL12陷阱与B7-H4陷阱、CXCL12陷阱与CTLA4陷阱、CXCL12陷阱与HVEM陷阱、CXCL12陷阱与BTLA陷阱、CXCL12陷阱与LAG3陷阱、CXCL12陷阱与KIR陷阱、CXCL12陷阱与TIM3陷阱、CXCL12陷阱与GAL9陷阱、CXCL12陷阱与A2aR陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCR1陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCR2陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCR4陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCR5陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCR7陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCR2陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCR4陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCR5陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCR7陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCR9陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCL1陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCL8陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CXCL10陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCL2陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCL5陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCL22陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与IL-6陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与IL-10陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与TGF- β 陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CSF1陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与B7-H3陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与B7-H4陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CTLA4陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与HVEM陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与BTLA陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与LAG3陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与KIR陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与TIM3陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与GAL9陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与A2aR陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与CCR4陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与IDO-1陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与TDO陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与ARG1陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与NOS陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与PI3K陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与激动性CD27陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与激动性CD28陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与激动性ICOS陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与激动性CD40陷阱、PD-1或PD-L1陷阱与激动性OX40陷阱,以及PD-1或PD-L1陷阱与激动性CD137陷阱。

[0134] 在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含来自抗人CXCL12抗体的VH区。在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含来自抗人CXCL12抗体的VL区。在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含融合蛋白,其包含来自抗人CXCL12抗体的VH和VL区。在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含模拟抗体的非免疫球蛋白域,包括(但不限于)基于FN域的单抗体、基于Z域的亲本体,以及DARPIN。

[0135] 在另一个实施方案中,人类CXCL12在GenBank入藏号AAH39893 (SEQ ID NO:64) 或GenBank入藏号AAV49999 (SEQ ID NO:65) 中展出。在另一个实施方案中,人类CXCL12的核酸序列在GenBank入藏号AY802782 (SEQ ID NO:66) 中展出。

[0136] 在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含VH区,其中所述VH区与选自SEQ ID NO:2、7、12以及17组成的群组的序列具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

[0137] 在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含VH区,其中所述VH区与SEQ ID NO:17具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性;和VL区,其中所述VL区与SEQ ID NO:18具

有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

[0138] 在另一个实施方案中,CXCL12陷阱基本上由VH区组成,其中所述VH区与SEQ ID NO:17的相应VH区具有至少90%一致性。在另一个实施方案中,CXCL12陷阱基本上由VL区组成,其中所述VL区与SEQ ID NO:18的相应VL区具有至少90%一致性。

[0139] 在另一个实施方案中,CXCL12陷阱包含具有三个互补决定区(CDR)的VH区,其中三个CDR(a)分别是SEQ ID NO:3-5;(b)三个CDR分别是SEQ ID NO:8-10;(c)三个CDR分别是SEQ ID NO:13-15;或(d)三个CDR分别是SEQ ID NO:19-21;和具有三个互补决定区(CDR)的VL区,其中CDR分别是SEQ ID NO:22、23以及24。

[0140] 在另一个实施方案中,能够结合CXCL12的多肽由与SEQ ID NO:63具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的核酸序列编码。

[0141] 胰腺导管腺癌是在全球每年杀死330,000人的致命疾病(美国癌症协会(American Cancer Society).《2012年癌症事实和数据(Cancer Facts and Figures 2012)》.亚特兰大:美国癌症协会(Atlanta:American Cancer Society);2012.第25-6页)。五年存活率仅为约12%。据知这种疾病对化学和放射疗法具抗性。其也对检查点抑制剂具抗性。高于90%的PDAC是KRas突变的并且大多数在p53基因中还含有额外突变。已经开发出含有KRas与p53突变的基因修饰的小鼠模型,即,KPC小鼠,其自发地发展成密切模拟临床疾病的PDAC。我们已经使用了来源于KPC肿瘤的细胞系,称为KPC98027,将其原位接种于同系C57BL6小鼠中的胰腺的尾部。使用慢病毒载体用荧光素酶和红色荧光蛋白稳定转导肿瘤细胞系。

[0142] 因为肿瘤对包括检查点抑制剂的免疫疗法具抗性,所以我们假定抑制性免疫TME可以通过局部表达靶向肿瘤中的关键分子的陷阱蛋白来改变。从Feig等的工作可见,CXCL12似乎是不允许T细胞浸润肿瘤的关键趋化因子(Feig等,靶向来自FAP表达癌瘤相关的成纤维细胞的CXCL12与抗PD-L1免疫疗法在胰腺癌中协同作用(Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer),《国家科学院院刊(PNAS)》,2013年12月10日;110(50):20212-7)。在肿瘤中局部表达的CXCL12陷阱应减轻这个问题。KPC肿瘤过度表达PD-L1,这是免疫系统中的检查点。肿瘤细胞中PD-L1的过度表达将使得经由PD-1/PD-L1轴相互作用杀死T细胞。因此,我们决定经由基因疗法将两个陷阱递送至肿瘤。良好建立的脂质-鱼精蛋白-DNA(LPD)纳米粒子(NP)用于将编码陷阱的质粒DNA递送至肿瘤。

[0143] 组合可以是协同的。术语“协同的”如本文所用指的是比两种或更多种单一治疗剂的相加作用更有效的治疗性组合。在例如细胞因子陷阱与PD-L1陷阱之间的协同相互作用的确定可以基于从本文所描述的试验获得的结果。举例来说,本文所公开的体内或体外方法。可以使用Chou和Talalay组合方法以及使用CalcuSyn软件的剂量-效应分析来分析这些试验的结果以获得组合指数(Chou和Talalay,1984,《酶调控研究进展(Adv.Enzyme Regul.)》22:27-55)。可以在一个或多个试验系统中评估所提供的组合,并且可以利用用于定量在抗癌剂当中的协同性、相加性以及拮抗性的标准程序来分析数据。示例程序是由Chou和Talalay,《发展癌症化学疗法的新途径(New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy)》,Academic Press,1987,第2章所描述的程序。小于0.8的组合指数值指示协同性,大于1.2的值指示拮抗性,并且在0.8至1.2之间的值指示相加作用。组合疗法可以提供“协同性”并且证实是“协同的”,即,当一起使用活性剂时达成的作用大于由独立使用

化合物产生的作用的总和。当活性剂：(1) 在组合的单位剂量配方中共同配制并且同时施用或递送；(2) 作为独立的配方交替或平行递送；或(3) 通过某种其它方案时，可以达成协同作用。当在交替疗法中递送时，当化合物依序施用或递送，例如，通过在独立注射器中的不同注射时，可以达成协同作用。一般来说，在交替疗法期间，依序(即，连续)施用有效剂量的每种活性剂，而在组合疗法中，一起施用有效剂量的两种或更多种活性剂。可以使用BLISS独立模型与最高单剂(HSA)模型来评估组合作用(Lehar等,《分子系统生物学(Molecular Systems Biology)》,3:80(2007))。BLISS得分定量来自单剂的增强程度并且正BLISS得分(大于0)表明大于简单的相加性。大于250的累积正BLISS得分被视为在所测试的浓度范围内观测到的强协同性。HAS得分(大于0)表明大于在相应浓度下单剂反应的最大值的组合作用。

[0144] 本文所描述的特定实施方案包括：

[0145] 1. 一种改变靶细胞的微环境的方法，其包括向受试者全身施用包含载体的组合物，其中所述载体包含用于在所述靶细胞中表达陷阱的构建体，其中所述陷阱在所述靶细胞中表达，其中所述靶细胞的所述微环境得以改变。

[0146] 2. 如实施方案1所述的方法，其中所述改变微环境包括减少所述微环境中的靶分子的量。

[0147] 3. 如实施方案1至2所述的方法，其中所述靶分子选自由蛋白质、蛋白质因子、趋化因子以及细胞因子或其组合组成的群组。

[0148] 4. 如实施方案1至3所述的方法，其中所述靶分子是趋化因子。

[0149] 5. 如实施方案1至4所述的方法，其中所述趋化因子是CXCL12。

[0150] 6. 如实施方案1至5所述的方法，其中所述构建体包含所关注的多核苷酸。

[0151] 7. 如实施方案1至6所述的方法，其中所述陷阱是CXCL12陷阱。

[0152] 8. 如实施方案1至7所述的方法，其中所述靶细胞是器官细胞。

[0153] 9. 如实施方案1至8所述的方法，其中所述细胞选自由肝、肺、脑以及乳房组成的群组。

[0154] 10. 如实施方案1至9所述的方法，其中所述陷阱的所述表达是瞬时的。

[0155] 11. 如实施方案1至10所述的方法，其中所述微环境的所述改变是瞬时的。

[0156] 12. 一种减少癌症的转移的方法，其包括向患有所述癌症的受试者全身施用包含载体的组合物，其中所述载体包含用于表达陷阱的构建体，其中所述陷阱在易感转移的组织中表达，其中所述癌症至所述组织的转移得以减少。

[0157] 13. 如实施方案12所述的方法，其中所述癌症是实体癌症。

[0158] 14. 如实施方案12至13所述的方法，其中所述癌症选自由肺癌、淋巴结癌、乳癌、骨癌以及结肠直肠癌组成的群组。

[0159] 15. 如实施方案12至14所述的方法，其中所述癌症是CRC并且所述组织是肝组织。

[0160] 16. 如实施方案12至15所述的方法，其中所述构建体包含所关注的多核苷酸。

[0161] 17. 如实施方案12至16所述的方法，其中所述陷阱是CXCL12陷阱。

[0162] 本发明方法克服了大多数方法在治疗疾病中不足的标靶特异性。此外，归因于众多细胞外和细胞内障碍的基因疗法的缺点已经真正阻碍了许多疾病的临床治疗。因此，为了克服这些障碍，本文公开了具有高度特异性、累积以及递送至靶细胞(诸如肝的肝细胞

核)中的可以用于临床应用中的载体。在一个实施方案中,这种载体得到能够达成pDNA的核递送的高度可再现的非病毒载体。本文所描述的LCP载体提供了容易地合并CMV启动子、细胞外信号传导肽、陷阱蛋白、靶向部分以及核穿透肽的能力。

[0163] 载体可以是脂质体。脂质体是自组装的实质上球形的囊泡,其包含包围可以是含水的核心的脂质双层,其中所述脂质双层包含具有亲水头基和疏水尾巴的两亲脂质,其中两亲脂质分子的亲水头基朝着核心或周围溶液定向,而疏水尾巴朝着双层的内部定向。脂质双层结构从而包含两个反向单层,称作“内叶”和“外叶”,其中疏水尾巴避免与周围介质接触。“内叶”是亲水头基朝着脂质体的核心定向的单层。“外叶”是包含两亲脂质的单层,其中亲水头基朝着脂质体的外表面定向。脂质体通常具有在约25nm至约1 μ m的范围内的直径。(参看例如Shah(编)(1998)《胶束、微乳液和单层:科学与技术(Micelles, Microemulsions, and Monolayers: Science and Technology)》, Marcel Dekker; Janoff(编)(1998)《脂质体:合理设计(Liposomes: Rational Design)》, Marcel Dekker)。术语“脂质体”涵盖由从两个至数百个的任何数目的与水相层交替的同心脂质双层组成的多室脂质体与由单脂质双层组成的单室囊泡。

[0164] 制造脂质体(LCP和LDP类型)的方法在本领域中是众所周知的,例如, PCT/US2010/044209,以全文引用的方式并入本文中。脂质体制备方法的评述可以在以下文献中找到:《脂质体技术(Liposome Technology)》(CFC Press NY 1984);《脂质体(Liposomes)》Ostro (Marcel Dekker, 1987); Lichtenberg和Barenholz (1988)《生物化学分析方法(Methods Biochem Anal.)》33:337-462;以及美国专利号5,283,185,其中每一者以全文引用的方式并入本文中。举例来说,可以通过使用均化器乳化阳离子脂质和任选的共脂质,冻干并融化以获得多室脂质体。或者,可以通过反相蒸发法产生单室脂质体(Szoka和Papahadjopoulos (1978)《美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》75:4194-4198,其以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施方案中,使用薄膜水合产生脂质体(Bangham等(1965)《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》13:238-252,其以全文引用的方式并入本文中)。在某些实施方案中,可以对脂质体配方短暂地进行超声处理并且在50℃下孵育一段短的时间(例如,约10分钟),随后定尺寸(参看Templeton等(1997)《自然生物技术(Nature Biotechnology)》15:647-652,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0165] 在一些实施方案中,如本文别处所描述制造靶向的脂质体或聚乙二醇化的脂质体,其中方法进一步包括在制备脂质体之后或在产生脂质体之后的后插入步骤,其中将脂质-靶向配体偶联物或聚乙二醇化的脂质后插入至脂质体中。包含脂质-靶向配体偶联物或脂质-PEG偶联物的脂质体可以遵循本领域中已知的技术来制备,包括(但不限于)本文所呈现的那些(参看实验部分; Ishida等(1999)《欧洲生物化学学会联合会快报(FEBS Lett.)》460:129-133; Perouzel等(2003)《生物偶联物化学(Bioconjug. Chem.)》14:884-898,其以全文引用的方式并入本文中)。后插入步骤可以包括混合脂质体与脂质-靶向配体偶联物或脂质-PEG偶联物以及将粒子在约50℃至约60℃下孵育一段短暂的时间(例如,约5分钟、约10分钟)。在一些实施方案中,将脂质体与以下浓度的脂质-PEG偶联物或脂质-PEG-靶向配体偶联物一起孵育:约5至约20mol%,包括(但不限于)约5mol%、约6mol%、约7mol%、约8mol%、约9mol%、约10mol%、约11mol%、约12mol%、约13mol%、约14mol%、约15mol%、约16mol%、约17mol%、约18mol%、约19mol%以及约20mol%,以形成隐形递送系统。在这

些实施方案的一些中,脂质-PEG偶联物的浓度为约10mol%。脂质-PEG偶联物的聚乙二醇部分可以具有在以下范围内的分子量:约100至约20,000g/mol,包括(但不限于)约100g/mol、约200g/mol、约300g/mol、约400g/mol、约500g/mol、约600g/mol、约700g/mol、约800g/mol、约900g/mol、约1000g/mol、约5000g/mol、约10,000g/mol、约15,000g/mol以及约20,000g/mol。在某些实施方案中,脂质-PEG偶联物包含具有约2000g/mol的分子量的PEG分子。在一些实施方案中,脂质-PEG偶联物包含DSPE-PEG₂₀₀₀。可以使用上文所描述的后插入方法也将脂质-PEG-靶向配体偶联物后插入至脂质体中。

[0166] 在一个实施方案中,脂质体含有编码经由可分解的2A肽连接的CXCL12陷阱和PD-1陷阱融合蛋白的载体,这允许施用只有一种组合物替代两种用于CXCL12/PD-L1组合陷阱疗法。

[0167] 靶向半乳糖部分经由偶联至DSPE-PEG而合并允许经由在肝的肝细胞上高度表达的去唾液酸糖蛋白受体在肝细胞中主动吸收。DOTAP和酸敏性磷酸钙核心的使用允许凝聚的pDNA/mc-CR8C结构的内涵体逃逸,其被释放至细胞质中。此外,用膜穿透阳离子mc-CR8C肽使pDNA凝聚允许改善核吸收和释放。CMV启动子在pDNA内的合并允许高度肝表达。

[0168] 经由合并如本文所描述的这些部分,提供了智能化设计的载体,其得到在所需靶向的细胞类型中高治疗水平的表达。这种p陷阱LCP载体提供了结肠直肠肝转移的发生的显著减少(80%),以及在肝内发现的肿瘤负荷的显著降低(10倍)。CXCL12陷阱的水平增加以及游离CXCL12蛋白质的水平降低在肝中以剂量依赖性方式发现,以及免疫细胞(CD8+)的募集减少,这证明了p陷阱LCP治疗的生物学特异性作用。

[0169] 因此,本文中显示,pDNA在半乳糖-LCP载体中的递送未显示脱靶效应的征象,在隔日一次(QOD)的三次注射之后具有最低乃至无免疫反应。在这些研究中,合并至pCXCL12陷阱的C末端端上的His标签对于经由西方墨点和ELISA试验确定表达水平是必需的。然而,对于进一步的临床应用,可能不需要His标签。这将帮助避开任何免疫反应,诸如中和抗体的诱导。

[0170] 此外,具有持续不长于8天的这种小CXCL12陷阱(约28kD)的瞬时表达的能力允许临床医师能够紧密控制/监测表达的水平和时间以限制免疫反应同时仍然达成治疗功效。

[0171] 本文公开了经由生物层干涉法(BLI)的工程改造的CXCL12陷阱(蛋白质)的亲力和产生以及迁移和侵入的体外抑制(图2)。经由BLI分析发现工程改造的CXCL12陷阱具有K_d=4nM(图2A)。此外,在约120nM的浓度下体外对生物活性CXCL12(100ng/ml)产生半最大抑制[ND50](图2B)。还已经报道,CT-26细胞用内源性CXCL12趋化因子处理使得迁移/侵入/增殖路径上调。因此,我们调查了我们的CXCL12陷阱和可商购的CXCL12抗体(Ab)抑制用内源性CXCL12刺激的CT-26 FL3细胞的迁移和侵入的能力(图2B和2C)。这些体外实验证明了CXCL12陷阱减少用CXCL12(100.0ng/ml)刺激的CT-26 FL3细胞的迁移和侵入的能力,使得分别在8.0μg/ml和12.0μg/ml下完全抑制(图2B和2C)。可商购的抗体(2-4μg/ml的ND50;12-24nM)也用作对照。

[0172] 适用的体内pDNA剂量(每单次注射0.5mg/kg)实质上低于先前显示具有体内表达的剂量。此外,这是首次治疗量的pDNA已经经由非病毒载体成功地递送至肝,而不是经由使用导致肝损伤并且临床上不适用的侵入性流体力学注射。这样的递送归因于智能化设计的LCP载体的使用。

[0173] 在2013Hu等中,首次报道了这种载体用于引出肝中高水平的荧光素酶表达(Hu,Y.等,高效合成载体:DNA至体内肝细胞核的非流体力学递送(A Highly Efficient Synthetic Vector:Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo).《美国化学会-纳米(ACS Nano)》,2013.7(6):第5376-5384页)。然而,这种表达水平是经由非病毒载体所获得的最高水平,仅次于流体力学注射技术。Hu等发现,Cy-3标记的pDNA经由这种Gal-LCP载体的递送在静脉内尾静脉注射之后6小时在肝细胞核中优先累积(Hu,Y.等,高效合成载体:DNA至体内肝细胞核的非流体力学递送(A Highly Efficient Synthetic Vector:Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo).《美国化学会-纳米(ACS Nano)》,2013.7(6):第5376-5384页)。放射性标记的Gal-LCP-pDNA/mcCR8C载体的器官分布证明了在小鼠肝中的突出吸收。此外,经由将CXCL12陷阱递送至肝,我们清楚证明了治疗作用是经由减少肝微环境中所发现的游离CXCL12(图5A)。这种疗法与未处理的患病肝相比使得肝肿瘤负荷降低,这随后减少肝发炎。

[0174] 未处理组产生更高水平的CXCL12并且进一步帮助肝转移累积。因此,用这种Gal-LCP-pDNA/mcCR8C载体对结肠直肠患者的预防性处理可以帮助减少肝的发炎,这在肝CXCL12表达和肝转移进展中起关键作用。

[0175] 经由使用这种载体,可以实施许多应用和疗法,诸如肝病的治疗。本文中显示,这种载体具有将高水平的治疗性pDNA递送至肝的肝细胞的能力。因此,本文提供了不仅治疗肝转移和原发性癌症,而且治疗众多其它肝病,诸如HBV、脂肪肝、肝硬化以及许多其它肝病的能力。除肝病之外,不同靶向部分,诸如靶向肺上皮细胞上高度表达的腺苷A2B受体的腺苷类似物的合并将引发这种载体累积并且递送已知在其它高度转移性组织中起作用的针对CXCL12或其它微环境因子的pDNA陷阱。这样的策略可以提供已知具有高转移率的众多组织,诸如肺、淋巴结、乳房以及骨的微环境因子的改变。

[0176] III.组合物

[0177] 提供了适合于全身施用的组合物。

[0178] 本文所描述的组合物包含载体。如本文所用,载体包括病毒载体、非病毒载体、合成载体等等。参考美国公布申请号2012-0201872、2011-0117026以及2011-0117141,其中每一者以全文引用的方式并入本文中。载体还包括脂质体载体或活细胞载体,诸如单核细胞或干细胞。

[0179] 递送载体

[0180] 递送本发明的陷阱的适合方法包括病毒载体和非病毒载体,诸如质粒载体、脂质体载体或活细胞载体,诸如单核细胞或干细胞。

[0181] 术语“载体”如本文所用指的是设计用于在不同宿主细胞之间传递的核酸构建体。“表达载体”或“基因疗法载体”指的是具有合并和表达外来细胞中的异源性DNA片段的能力的载体。克隆或表达载体可以包含额外的元件,例如,表达载体可以含有用于表达陷阱基因的器官特异性启动子,并且含有用于所需细胞外或细胞内定位的信号传导序列。表达载体可以具有两个复制系统,由此允许其维持在两个生物体中,例如,在用于表达的人类细胞中和用于克隆和扩增的原核宿主中。术语载体还可以用于描述重组病毒,例如,经过修饰以含有治疗性化合物或因子的编码序列的病毒。如本文所用,载体可以具有病毒或非病毒起源,或是脂质体或细胞的,诸如单核细胞或干细胞。

[0182] 术语“病毒”、“病毒粒子”、“载体粒子”、“病毒载体粒子”以及“病毒体”可互换使用并且应广泛理解为意味着当例如使本发明的病毒载体转导至适当细胞或细胞系中时形成的感染性病毒粒子。可以利用根据本发明的病毒粒子用于体外或体内将DNA传递至细胞中的目的。如本领域的技术人员所了解,术语“载体”、“多核苷酸载体”、“多核苷酸载体构建体”、“核酸载体构建体”以及“载体构建体”在本文中可互换使用以意味着用于基因传递的任何核酸构建体。

[0183] 如本文所用,术语“病毒载体”根据其技术公认的含义使用。这指的是包括病毒起源的至少一个元件并且可以包装至病毒载体粒子中的核酸载体构建体。可以利用载体和/或粒子用于体外或体内将DNA、RNA或其它核酸传递至细胞中的目的。众多形式的病毒载体在本领域中是已知的,其来源包括(但不限于)腺病毒、逆转录病毒以及腺相关病毒(AAV)。

[0184] 本发明涵盖任何载体用于将所关注的陷阱引入哺乳动物细胞中的用途。例示性载体包括(但不限于)病毒和非病毒载体,诸如逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒(Ad)载体(包括其有复制能力的、有复制缺陷的以及无活力的形式)、腺相关病毒(AAV)载体、猿猴病毒40(SV-40)载体、牛乳头状瘤病毒载体、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)载体、疱疹病毒载体、牛痘病毒载体、莫洛尼鼠白血病毒(Moloney murine leukemia virus)载体、哈维鼠肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus)载体、鼠乳腺肿瘤病毒载体、劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)载体以及非病毒质粒载体。在一个实施方案中,载体是病毒载体。病毒可以有效地转导细胞并且将其自身的DNA引入宿主细胞中。在产生重组病毒载体中,将非必需基因用异源性(或非原生)蛋白质的基因或编码序列置换。

[0185] 在构建病毒载体中,将非必需基因用编码一种或多种治疗性化合物或因子的一个或多个基因置换。通常,载体包含复制起点并且载体可能还包含或可能不包含“标志”或“选择性标志”功能,由此可以鉴别并选择载体。虽然可以使用任何选择性标志,但用于这类表达载体中的选择性标志一般在本领域中是已知的并且适当选择性标志的选择将取决于宿主细胞。编码赋予对抗生素或其它毒素的抗性的蛋白质的选择性标志基因的实例包括氨苄青霉素(ampicillin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、四环素(tetracycline)、新霉素(neomycin)(Southern等,J.,《分子应用遗传学杂志(J Mol Appl Genet.)》1982;1(4):327-41(1982))、霉酚酸(mycophenolic acid)(Mulligan等,《科学(Science)》209:1422-7(1980))、嘌呤霉素(puromycin)、泽霉素(zeomycin)、潮霉素(hygromycin)(Sugden等,《分子细胞生物学(Mol Cell Biol.)》5(2):410-3(1985))或G418。

[0186] 将载体或其它DNA序列称作“重组的”仅仅是承认以分离的形式或在自然界中发现通常不是可操作地连接的DNA序列的可操作性连接。当表达/控制序列调控核酸序列的转录并且适当时调控核酸序列的翻译时,调控(表达/控制)序列操作性地连接至核酸编码序列。因此,表达/控制序列可以包括启动子、增强子、转录终止子、在编码序列之前的起始密码子(即,ATG)、内含子的剪接信号以及终止密码子。

[0187] 据知腺病毒基因疗法载体展现强的体外表达、极佳的效价以及体内转导分裂和非分裂细胞的能力(Hitt等,《病毒研究进展(Adv in Virus Res)》55:479-505(2000))。当体内使用时,这些载体导致强的但瞬时的基因表达,这归因于对载体骨架所引出的免疫反应。用于本发明中的重组Ad载体包含:(1)使载体能够合并至复制缺陷性Ad病毒体中的包装位点;以及(2)所关注的多核苷酸,诸如编码所关注的陷阱的多核苷酸。对于合并至感染性病

毒体中所必需或有帮助的有关原件包括5'和3'Ad ITR、E2和E3基因,等等。

[0188] 囊封本发明的重组Ad载体的复制缺陷性Ad病毒体是通过本领域中已知的标准技术使用Ad包装细胞和包装技术来制造。这些方法的实例可以在例如美国专利号5,872,005中找到,其以全文引用的方式并入本文中。将所关注的多核苷酸通常插入腺病毒中病毒基因组的缺失的E1A、E1B或E3区中。用于实施本发明的优选的腺病毒载体并不表达一种或多种野生型Ad基因产物,例如,E1a、E1b、E2、E3、E4。优选的实施方案是通常与补充E1、E2A、E4以及任选的E3基因区的功能的包装细胞系一起使用的病毒体。参看例如美国专利号5,872,005、5,994,106、6,133,028以及6,127,175,其以全文引用的方式明确并入本文中。使用本领域中已知的标准技术纯化和配制腺病毒载体。

[0189] 重组AAV载体的特征在于其能够引导靶向的细胞中所选转基因产物的表达和产生。因此,重组载体包含对于包壳所必需的AAV的至少所有序列和用于靶细胞感染的物理结构。

[0190] 用于实施本发明的重组AAV(rAAV)病毒体可以使用本领域的技术人员所知的标准方法产生并且经过构建以使得其在转录的方向上作为可操作地连接的组分包括以下:包括转录起始和终止序列的控制序列,以及所关注的陷阱的编码序列。这些组分由功能性AAV ITR序列结合于5'和3'末端上。“功能性AAV ITR序列”意味着ITR序列发挥预期用于AAV病毒体的拯救、复制和包装的功能。因此,用于本发明的载体中的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列,并且可以通过核苷酸的插入、缺失或取代而改变或AAV ITR可以来源于若干AAV血清型中的任一者。AAV载体是来源于腺相关病毒血清型的载体,包括(但不限于)AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8,等等。优选的AAV载体具有全部或部分缺失的野生型REP和CAP基因,但保留功能性侧接ITR序列。

[0191] 通常,将AAV表达载体引入生产细胞中,接着引入AAV辅助构建体,其中所述辅助构建体包括能够在生产细胞中表达并且补充AAV载体中不存在的AAV辅助功能的AAV编码区。可以设计辅助构建体以下调大REP蛋白质(Rep78和Rep68)的表达,通常是通过使在p5之后的起始密码子从ATG突变成ACG,如美国专利号6,548,286中所描述,其以引用的方式明确并入本文中。接着将辅助病毒和/或额外载体引入生产细胞中,其中所述辅助病毒和/或额外载体提供了能够支持有效的rAAV病毒产生的附属功能。然后培养生产细胞以产生rAAV。这些步骤使用标准方法进行。囊封本发明的重组AAV载体的复制缺陷性AAV病毒体是通过本领域中已知的标准技术使用AAV包装细胞和包装技术来制造。这些方法的实例可以在例如美国专利号5,436,146、5,753,500、6,040,183、6,093,570以及6,548,286中找到,其以全文引用的方式明确并入本文中。用于包装的更多组合和方法描述于Wang等(US 2002/0168342)中,其也以全文引用的方式并入本文中,并且包括在本领域的技术人员知识范围内的技术。

[0192] 当前已知AAV的约40种血清型,然而,新的血清型和现有血清型的变体当今仍在鉴别中并且被视为在本发明的范围内。参看Gao等(2002),《国家科学院院刊(PNAS)》99(18):11854-6;Gao等(2003),《国家科学院院刊(PNAS)》100(10):6081-6;Bossis和Chiorini(2003),《病毒学杂志(J.Virol.)》77(12):6799-810。不同AAV血清型用于优化特定靶细胞的转导或用于靶向特定靶组织内的特异性细胞类型。不同AAV血清型的使用可以有助于靶向恶性组织。已经显示包括1、2、4、5以及6的AAV血清型转导脑组织。参看例如Davidson等

(2000),《国家科学院院刊(PNAS)》97(7)3428-32;Passini等(2003),《病毒学杂志(J.Virol)》77(12):7034-40)。特定AAV血清型可以在靶组织或细胞中更有效地靶向和/或复制。单一自互补的AAV载体可以用于实施本发明以增加转导效率并且使得转基因表达更快开始(McCarty等,《基因疗法(Gene Ther.)》2001年8月;8(16):1248-54)。

[0193] 逆转录病毒载体是用于基因递送的常用工具(Miller,1992,《自然(Nature)》357:455-460)。逆转录病毒载体并且更特别是慢病毒载体可以用于实施本发明。已经测试了逆转录病毒载体并且发现其为用于将多种所关注的基因稳定引入大范围的靶细胞的基因组DNA中的适合的递送运载体。逆转录病毒载体将未重排的单拷贝转基因引入细胞中的能力使得逆转录病毒载体充分适于将基因传递至细胞中。此外,逆转录病毒通过逆转录病毒包膜糖蛋白结合至宿主细胞上的特异性细胞表面受体而进入宿主细胞。因此,所编码的原生包膜蛋白由具有与原生包膜蛋白不同的细胞特异性(例如,与原生包膜蛋白相比结合至不同细胞表面受体)的异源性包膜蛋白置换的假型逆转录病毒载体也可以用于实施本发明。引导编码转基因的逆转录病毒载体递送至特定类型的靶细胞的能力对于基因疗法应用是非常需要的。

[0194] 本发明提供了逆转录病毒载体,其包括例如包含一个或多个所关注的多核苷酸的逆转录病毒传递载体和包含一个或多个包装元件的逆转录病毒包装载体。特别地,本发明提供了用于产生假型逆转录病毒的编码异源性或功能上修饰的包膜蛋白的假型逆转录病毒载体。

[0195] 本发明的逆转录病毒载体的核心序列可以容易地来源于多种逆转录病毒,包括例如B、C和D型逆转录病毒以及泡沫病毒和慢病毒(参看《RNA肿瘤病毒(RNA Tumor Viruses)》,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory,1985)。适合用于本发明的组合物和方法中的逆转录病毒的一个实例包括(但不限于)慢病毒。适合用于本发明的组合物和方法中的其它逆转录病毒包括(但不限于)禽白血病病毒、牛白血病病毒、鼠白血病病毒、水貂细胞病灶诱发病毒、鼠肉瘤病毒、网状内皮增生症病毒以及劳氏肉瘤病毒。特别优选的鼠白血病病毒包括4070A和1504A(Hartley和Rowe,《病毒学杂志(J.Virol.)》19:19-25,1976)、艾贝尔森(Abelson)(ATCC编号VR-999)、弗兰德(Friend)(ATCC编号VR-245)、格拉夫(Graffi)、格罗斯(Gross)(ATCC编号VR-590)、柯斯顿(Kirsten)、哈佛肉瘤病毒和劳舍尔(Rauscher)(ATCC编号VR-998)以及莫洛尼鼠白血病病毒(ATCC编号VR-190)。这类逆转录病毒可以容易地获自贮藏所或保藏所,诸如美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection) (“ATCC”;Rockville,Md.),或使用通常可用的技术从已知来源分离。

[0196] 优选地,本发明的逆转录病毒载体序列来源于慢病毒。优选的慢病毒是人免疫缺陷病毒,例如,1型或2型(即,HIV-1或HIV-2,其中HIV-1原称为淋巴结病相关病毒3(HTLV-IE)和获得性免疫缺陷综合症(AIDS)相关病毒(ARV)),或已经鉴别并且与AIDS或类AIDS疾病相关联的与HIV-1或HIV-2有关的另一种病毒。其它慢病毒载体包括绵羊维斯那/梅迪病毒(Visna/maedi virus)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛慢病毒、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)以及山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

[0197] 适合用于组合物和方法中的逆转录病毒的各种属和株在本领域中是众所周知的(参看例如《病毒学领域(Fields Virology)》,第三版,B.N.Fields等编,Lippincott-Raven Publishers(1996),参看例如第58章,逆转录病毒:病毒和其复制、分类(Retroviridae:The

Viruses and Their Replication, Classification), 第1768-1771页, 包括表1, 其以引用的方式并入本文中)。

[0198] 本发明可应用于多种逆转录病毒系统, 并且本领域的技术人员将了解跨越逆转录病毒的不同组所共享的共同元件。所有逆转录病毒共享具有表面突起并且含有线性正义单股RNA的一个分子的有包膜病毒体的特征、由二聚体组成的基因组以及共同蛋白质gag、pol和env。

[0199] 慢病毒共同共享若干结构病毒体蛋白, 包括包膜糖蛋白SU (gp120) 和TM (gp41), 其由env基因编码; CA (p24)、MA (p117) 和NC (p7-11), 其由gag基因编码; 以及RT、PR和IN, 其由pol基因编码。HIV-1和HIV-2含有病毒RNA的合成和加工以及其它复制功能的调控中所涉及的附属和其它蛋白。由vif、vpr、vpu/vpx以及nef基因编码的附属蛋白可以从重组系统略去(或灭活)。另外, tat和rev可以略去或灭活, 例如, 通过突变或缺失。

[0200] 第一代慢病毒载体包装系统提供了用于gag/pol和env的独立包装构建体, 并且出于安全原因通常采用异源性或功能上修饰的包膜蛋白。在第二代慢病毒载体系统中, 附属基因vif、vpr、vpu以及nef缺失或灭活。第三代慢病毒载体系统是tat基因已经缺失或以其它方式灭活(例如, 经由突变)的那些。

[0201] 对通常由tat提供的转录的调控的补充可以通过使用强组成性启动子, 诸如人巨细胞病毒即刻早期(HCMV-IE) 增强子/启动子来提供。如本领域中所了解, 其它启动子/增强子可以基于组成性启动子活性的强度、对靶组织的特异性(例如, 肝特异性启动子) 或与所需控制过度表达有关的其它因子来选择。举例来说, 在一些实施方案中, 需要采用诸如tet的诱导性启动子以达成受控的表达。编码rev的基因优选地在独立表达构建体上提供, 以使得典型的第三代慢病毒载体系统将涉及四种质粒: gagpol、rev、包膜以及传递载体各一者。与所采用的包装系统的产生无关, gag和pol可以在单一构建体上或在独立构建体上提供。

[0202] 合成性非病毒递送剂

[0203] 能够促进所关注的多核苷酸的传递和表达的合成性非病毒剂也适合用于本发明的方法中。这类试剂包括(但不限于) 阳离子脂质和聚合物。作为阳离子脂质的非病毒递送剂结合至聚阴离子DNA。在胞吞之后, 核酸必须从递送剂以及内涵体区室逃逸, 以使得基因材料合并于新的宿主内。参看Felgner, P.L. 用于基因疗法的非病毒策略 (Nonviral Strategies for Gene Therapy) 《科学美国人 (Sci. Am.)》1997, 276, 102-106; Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringgold, G.M.; Danielsen, M. 转化脂: 高效的脂质介导的DNA转染程序 (Lipofectin: A highly efficient, lipid mediated DNA-transfection procedure) 《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》1987, 84, 7413-7417; Felgner, P.L.; Kumar, R.; Basava, C.; Border, R.C.; Hwang-Felgner, J. In; Vical, Inc. San Diego, Calif.: 美国专利号5,264,618, 1993; Felgner, J.H.; Kumar, R.; Sridhar, C.N.; Wheeler, C.J.; Tsai, Y.J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P.L. 使用一系列新颖的阳离子配方的增强基因递送和机理研究 (Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Formulations) 《生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)》1994, 269, 2550-2561; Freidmann, T. 《科学美国人 (Sci. Am.)》1997, 276, 96-101; Behr, J.P. 使用合成性阳离子两亲物的基因传递: 用于基因递送的前景 (Gene Transfer with Synthetic Cationic

Amphiphiles:Prospects for Gene Delivery)《生物偶联物化学(Bioconjugate Chem.)》1994,5,382-389;Cotton,M.;Wagner,B.针对基因疗法的非病毒方法(Non-viral Approaches to Gene Therapy)《生物技术新观点(Curr.Op.Biotech.)》1993,4,705-710;Miller,A.D.用于基因疗法的阳离子脂质体(Cationic Liposomes for Gene Therapy)Angew.Chem.Int.1998,37,1768-1785;Scherman,D.;Bessodes,M.;Cameron,B.;Herscovici,J.;Hofland,H.;Pitard,B.;Soubrier,F.;Wils,P.;Crouzet,J.用于基因递送至哺乳动物细胞的脂质和质粒设计的应用(Application of Lipids and Plasmid Design for Gene Delivery to Mammalian Cells)《生物技术新观点(Curr.Op.Biotech.)》1989,9,480;Lasic,D.D.《化妆品中的表面活性剂(Surfactants in Cosmetics)》;第2版;Rieger,M.M.,Rhein,L.D.编;Marcel Dekker,Inc.:New York,1997;第68卷,第263-283页;Rolland,A.P.从基因到基因医学:非病毒基因递送中的最新进展(From Genes to Gene Medicines:Recent Advances in Nonviral Gene Delivery)《治疗性药物的关键性评论(Crit.Rev.Ther.Drug)》1998,15,143-198;de Lima,M.C.P.;Simoës,S.;Pires,P.;Faneca,H.;Duzgunes,N.从生物物理学到生物应用的基因递送中的阳离子脂质-DNA复合物(Cationic Lipid-DNA Complexes in Gene Delivery from Biophysics to Biological Applications)《先进药物递送评论(Adv.Drug.Del.Rev.)》2001,47,277-294。

[0204] 这些合成性非病毒递送剂具有两种主要功能,使有待转染的DNA凝聚和促进其细胞结合和横穿质膜,并且适当时横穿两个核膜。归因于DNA的聚阴离子性质,DNA天然地对也是聚阴离子的细胞质膜具有不良亲和力。若干小组已经报道了用于在动物与人类中体内转染的两亲阳离子脂质-核酸复合物的用途。因此,合成性非病毒递送剂具有阳离子或聚阳离子电荷。参看Gao,X;Huang,L.阳离子脂质体介导的基因传递基因疗法(Cationic Liposome-mediated Gene Transfer Gene Therapy)1995,2,710-722;Zhu,N.;Liggott,D.;Liu,Y.;Debs,R.在静脉内DNA递送至成年小鼠中之后的全身基因表达(Systemic Gene Expression After Intravenous DNA Delivery into Adult Mice)《科学(Science)》1993,261,209-211;Thierry,A.R.;Lunardiiskandar,Y.;Bryant,J.L.;Rabinovich,P.;Gallo,R.C.;Mahan,L.C.小鼠中转基因的全身基因疗法生物分布和长期表达(Systemic Gene-Therapy-Biodistribution and Long-Term Expression of a Transgene in Mice)《国家科学院院刊(Proc.Nat.Acad.Sci.)》1995,92,9742-9746。具有阳离子域与疏水域的阳离子两亲化合物先前已经用于基因信息的递送。事实上,这类化合物广泛用于基因的细胞内递送。这类阳离子化合物可以形成阳离子脂质体,其为用于基因转染研究的最通用的合成性非病毒递送剂。

[0205] 阳离子脂质体发挥两种功能。第一,其保护DNA免于降解。第二,其增加进入细胞的DNA的量。这类脂质体已经证实适用于体外与体内研究。Safinya,C.R.描述了阳离子两亲物-DNA复合物的结构。参看Radler,J.O.;Koltover,I.;Salditt,T.;Safinya,C.R.《科学(Science)》1997,275,810-814;Templeton,N.S.;Lasic,D.D.;Frederik,P.M.;Strey,H.H.;Roberts,D.D.;Pavlakakis,G.N.《自然生物技术(Nature Biotech.)》1997,15,647-652;Koltover,I.;Salditt,T.;Radler,J.O.;Safinya,C.R.《科学(Science)》1998,281,78-81;以及Koltover,I.;Salditt,T.;Safinya,C.R.《生物物理学杂志(Biophys.J.)》1999,77,915-924。用于体外和体内基因递送的这些系统中许多在最近的文章中评述。参看

Remy, J.; Sirlin, C.; Vierling, P.; Behr, J.《生物偶联物化学 (Bioconj. Chem.)》1994, 5, 647-654; Crystal, R. G.《科学 (Science)》1995, 270, 404-410; Blaese, X. 等;《癌症基因疗法 (Cancer Gene Ther.)》1995, 2, 291-297; 以及 Behr, J. P. 和 Gao, X, 上文所引用。不同于病毒载体, 脂质-核酸复合物可以用于传递基本上不限尺寸的表达盒。因为这些合成性递送系统缺乏蛋白质, 所以其可以引起更少的免疫原性和发炎性反应。

[0206] Behr 公开了用于基因递送的众多两亲物, 包括双十八烷基酰胺甘氨酸精胺 (“DOGS”)。这种材料作为 TRANSFECTAM™ 可商购。Vigneron 描述了用于真核细胞转染的胍-胆固醇阳离子脂质。Felgner 公开了带正电荷的合成性阳离子脂质, 包括氯化 N-1-(2,3-二油烯基氧基) 丙基-N,N,N-三甲铵 (“DOTMA”) 的用途, 其用于形成适合于转染的脂质/DNA 复合物。Byk 描述了用于基因转染的阳离子脂质, 其中两亲物的阳离子部分是线性、分支或球状的。Blessing 和合作者描述了基于精胺的阳离子合成载体。Safinya 描述了用于基因递送的含有聚(乙二醇)区段的阳离子脂质。Bessodes 和合作者描述了用于基因递送的含有糖苷连接子的阳离子脂质。Ren 和 Liu 描述了基于 1,2,4-丁三醇的阳离子脂质。Tang 和 Scherman 描述了用于基因递送的含有二硫键联的阳离子脂质。Vierling 描述了作为基因载体和递送系统的高度氟化阳离子两亲物。Jacopin 描述了含有靶向配体的用于基因递送的阳离子两亲物。Wang 和合作者描述了用于基因递送的基于肉毒碱的阳离子酯。Zhu 描述了阳离子脂质氯化 N[1-(2,3-二油烯基氧基) 丙基]-N,N,N-三甲铵用于 DNA 的静脉内递送的用途。参看 Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J. 用脂多胺包覆的 DNA 有效基因传递至哺乳动物初级内分泌细胞中 (Efficient Gene Transfer into Mammalian Primary Endocrine Cells with Lipopolyamine Coated DNA)《国家科学院院刊 (Proc. Nat. Acad. Sci.)》1989, 86, 6982-6986; Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, M.; Vergely, L.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J. M.《国家科学院院刊 (Proc. Nat. Acad. Sci.)》1996, 93, 9682-9686; Byk, G.; Dubertret, C.; Escriou, V.; Frederic, M.; Jaslin, G.; Rangara, R.; Pitard, B.; Wils, P.; Schwartz, B.; Scherman, D.《医药化学杂志 (J. Med. Chem.)》1998, 41, 224-235; Blessing, T.; Remy, J. S.; Behr, J. P.《美国化学会志 (J. Am. Chem. Soc.)》1998, 120, 8519-8520; Blessing, T.; Remy, J. S.; Behr, J. P.《国家科学院院刊 (Proc. Nat. Acad. Sci.)》1998, 95, 1427-1431; Schulze, U.; Schmidt, H.; Safinya, C. R.《生物偶联物化学 (Bioconj. Chem.)》1999, 10, 548-552; Bessodes, M.; Dubertret, C.; Jaslin, G.; Scherman, D.《生物有机与医药化学快报 (Bioorg. Med. Chem. Lett.)》2000, 10, 1393-1395; Herscovici, J.; Egron, M. J.; Quenot, A.; Leclercq, F.; Leforestier, N.; Mignet, N.; Wetzter, B.; Scherman, D.《有机快报 (Org. Lett.)》2001; Ren, T.; Liu, D.《四面体快报 (Tetrahedron Lett.)》1999, 40, 7621-7625; Tang, F.; Hughes, J. A.《生物化学与生物物理研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.)》1998, 242, 141-145; Tang, F.; Hughes, J. A.《生物偶联物化学 (Bioconjugate Chem.)》1999, 10, 791-796; Wetzter, B.; Byk, G.; Frederic, M.; Airiau, M.; Blanche, F.; Pitard, B.; Scherman, D.《生物化学杂志 (Biochemical J.)》2001, 356, 747-756; Vierling, P.; Santaella, C.; Greiner, J.《氟化学杂志 (J. Fluorine Chem.)》2001, 107, 337-354; Jacopin, J.; Hofland, H.; Scherman, D.; Herscovici, J. J.《生物医药化学快报 (Biomed. Chem. Lett.)》2001, 11, 419-422; 以及 Wang, J.; Guo, X.; Xu, Y.; Barron, L.;

Szoka, F.C.《医药化学杂志 (J. Med. Chem.)》1998, 41, 2207-2215。

[0207] 在Erand等的美国专利号5,283,185中,发明者描述了两亲物的额外实例,包括阳离子胆固醇合成载体,称为“DC-cho1”。发明者在美国专利号5,264,618中描述了有助于生物活性分子转运至细胞中的更多阳离子化合物。Hughes等的美国专利号6,169,078和6,153,434公开了用于基因递送的含有二硫键的阳离子脂质。Gebeyehu等的美国专利号5,334,761描述了适合于生物活性分子的细胞内递送的额外阳离子两亲物。Thierry的美国专利号6,110,490描述了用于基因递送的额外阳离子脂质。Unger等的美国专利号6,056,938公开了含有至少两个阳离子基团的阳离子脂质化合物。

[0208] 用于基因递送的聚合系统在本领域中是已知的。在Han的评述中,论述了常用阳离子聚合物系统中的大多数,包括PLL,聚(L-赖氨酸);PEI,聚乙烯亚胺;pDMEAMA,聚甲基丙烯酸(2-二甲氨基)乙酯;PLGA,聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯);以及PVP(聚乙烯吡咯烷酮)。参看Garnett, M.C.《治疗性药物载体系统的关键性评论 (Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.)》1999, 16, 147-207; Han, S.; Mahato, R. I.; Sung, Y. K.; Kim, S. W.《分子疗法 (Molecular Therapy)》2000, 2, 302-317; Zauner, W.; Ogris, M.; Wagner, E.《先进药物递送评论 (Adv. Drug. Del. Rev.)》1998, 30, 97-113; Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A.《生物偶联物化学 (Bioconj. Chem.)》1995, 6, 7-20; Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putman, D.; Langer, R.《美国化学会志 (J. Am. Chem. Soc.)》2001, 123, 8155-8156; Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P.《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》1995, 92, 7297-7301; Choi, J. S.; Joo, D. K.; Kim, C. H.; Kim, K.; Park, J. S.《美国化学会志 (J. Am. Chem. Soc.)》2000, 122, 474-480; Putnam, D.; Langer, R.《大分子 (Macromolecules)》1999, 32, 3658-3662; Gonzalez, M. F.; Ruseckaite, R. A.; Cuadrado, T. R.《应用聚合物科学杂志 (Journal of Applied Polymer Science)》1999, 71, 1223-1230; Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C. 由降解的聚酰胺胺树状大分子的体外基因递送 (In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers)《生物偶联物化学 (Bioconjugate Chem.)》1996, 7, 703-714; Kukowska-latallo, J. F.; Bielinska, A. U.; Johnson, J.; Spinder, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R.《国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.)》1996, 93, 4897-4902; 以及 Lim, Y.; Kim, S.; Lee, Y.; Lee, W.; Yang, T.; Lee, M.; Suh, M.; Park, J.《美国化学会志 (J. Am. Chem. Soc.)》2001, 123, 2460-2461。

[0209] 在调查中的阳离子聚合物的一些代表性实例描述于下文。举例来说,已经探索了聚(β -氨基酯)并且显示使质粒DNA凝聚成用于基因递送的可溶性DNA/聚合物粒子。为了加快合成性转染载体的发现,阳离子聚合物文库的平行合成和筛选由Langer报道。Wolfert描述了通过DNA与合成性嵌段阳离子共聚物的自组装形成的用于基因疗法的阳离子载体。Haensler和Szoka描述了阳离子树状大分子聚合物(聚酰胺胺(PAMAM)树状大分子)用于基因递送的用途。Wang描述了用于基因递送的阳离子聚磷酸酯。Putnam描述了用于DNA递送的含有咪唑的阳离子聚合物。参看Lynn, D. M.; Langer, R.《美国化学会志 (J. Am. Chem. Soc.)》2000, 122, 10761-10768; Wolfert, M. A.; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; Seymour, L. W.《人类基因疗法 (Hum. Gene Ther.)》1996, 7, 2123-2133; Haensler, J.; Szoka, F.《生物偶联物化学 (Bioconj. Chem.)》1993, 4, 372; 以及 Wang, J.; Mao, H. Q.; Leong, K. W.《美国化学会志 (J. Am. Chem. Soc.)》2001; Putnam, D.; Gentry, C. A.;

Pack, D.W.; Langer, R.《国家科学院院刊 (Proc. Nat. Acad. Sci.)》2001, 98, 1200-1205。

[0210] 还已知描述用于基因递送的阳离子聚合物的许多专利。举例来说, Goldenberg等的美国专利号5,629,184描述了用于寡核苷酸递送的乙烯胺和乙烯醇的阳离子共聚物。Tomalia等的美国专利号5,714,166公开了用于基因递送的树状阳离子胺封端聚合物。Yin等的美国专利号5,919,442描述了用于基因递送的阳离子超梳状分支聚合物偶联物。Burgess等的美国专利号5,948,878描述了用于核酸转染和生物活性剂递送的额外阳离子聚合物。Park等的美国专利号6,177,274公开了用于靶向基因递送的化合物,其由聚乙二醇(PEG)接枝的聚(L-赖氨酸)(PLL)和靶向部分组成,其中PLL的至少一个游离氨基官能团被靶向部分取代,并且接枝的PLL含有至少50%未取代的游离氨基官能团。Choi等的美国专利号6,210,717描述了用于将所选核酸递送至靶向的宿主细胞中的可生物降解的混合聚合胶束,其含有两亲聚酯-聚阳离子共聚物和两亲聚酯-糖共聚物。Park等的美国专利号6,267,987公开了用于经由组织和细胞吸收递送生物活性剂的带正电荷的聚[α -(ω -氨基烷基)乙醇酸]。Scherman等的美国专利号6,200,956描述了适用于转染含有阳离子多肽的核酸的医药组合物。

[0211] 适合用于递送本文所描述的陷阱的纳米粒子递送系统在PCT/US2010/044209中公开。

[0212] 靶向配体

[0213] 组合物可以进一步包含与载体物理缔合的靶向配体。

[0214] “靶向配体”预期是靶向载体的分子或与靶向的细胞或组织物理缔合的分子。靶向配体可以包括(但不限于)小分子、肽、脂质、糖、寡核苷酸、激素、维生素、抗原、抗体或其片段、特异性膜受体配体、能够与抗配体反应的配体、促融合肽、核定位肽,或这类化合物的组合。靶向配体的非限制性实例包括去唾液酸糖蛋白、胰岛素、低密度脂蛋白(LDL)、叶酸、苯甲酰胺衍生物,以及针对细胞表面分子的单克隆和多克隆抗体。在一些实施方案中,小分子包含苯甲酰胺衍生物。在这些实施方案的一些中,苯甲酰胺衍生物包含大茴香酰胺。

[0215] “靶向的细胞”预期是靶向配体将物理缔合的分子所募集到的细胞。靶向配体可以与靶细胞的一种或多种成分相互作用。靶向的细胞可以是任何细胞类型或在任何发育阶段,展现各种表型,并且可以处于各种病理状态(即,异常和正常状态)。举例来说,靶向配体可以与微生物(即,原核细胞(细菌)、病毒、真菌、原生动物或寄生虫)上或真核细胞(例如,上皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、感觉细胞、癌性细胞、分泌细胞、恶性细胞、红系和淋巴样细胞、干细胞)上的正常、异常和/或独特成分缔合。因此,靶向配体可以与靶细胞上的成分缔合,所述成分是疾病相关抗原,包括例如肿瘤相关抗原和自体免疫疾病相关抗原。这类疾病相关抗原包括例如生长因子受体、细胞周期调控子、血管生成因子以及信号传导因子。

[0216] 在一些实施方案中,靶向配体与靶向的细胞上的细胞表面蛋白相互作用。在这些实施方案的一些中,能够结合至靶向配体的细胞表面蛋白的表达水平在靶向的细胞中相对于其它细胞更高。举例来说,癌细胞过度表达某些细胞表面分子,诸如HER2受体(乳癌)或 σ 受体。在靶向配体包含苯甲酰胺衍生物,诸如大茴香酰胺的某些实施方案中,靶向配体将所缔合的分子靶向 σ 受体过度表达细胞,其可以包括(但不限于)癌细胞,诸如小细胞肺癌和非小细胞肺癌、肾癌、结肠癌、肉瘤、乳癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤以及前列腺癌(Aydar, Palmer和Djamgoz (2004)《癌症研究 (Cancer Res.)》64:5029-5035)。

[0217] 术语“癌症”或“癌性”指的是或描述了通常由不受调控的细胞生长表征的哺乳动物的生理病状。如本文所用，“癌细胞”或“肿瘤细胞”指的是由这种不受调控的细胞生长表征的细胞。术语“癌症”涵盖所有类型的癌症，包括（但不限于）所有形式的癌瘤、黑素瘤、肉瘤、淋巴瘤以及白血病，包括（但不限于）膀胱癌、脑肿瘤、乳癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、子宫内膜癌、肝细胞癌、喉癌、肺癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌以及甲状腺癌。

[0218] 靶向的细胞是易感远端癌症的转移的细胞。这样的话，靶向的细胞可以在任何器官中。在一个特定实施方案中，靶向的细胞是肝细胞。

[0219] 靶向配体可以物理缔合载体。如本文所用，术语“物理缔合”指的是两个分子之间的共价或非共价相互作用。如本文所用，术语“共价键”或“共价相互作用”指的是化学键，其中一对电子在两个原子之间共享。当两个分子在构成分子的原子之间具有至少一个化学键时，所述分子被称为化学键合至彼此。两个分子之间的一个化学键因此由一个分子中的原子与另一个分子中的原子之间共享一对电子所组成。举例来说，靶向配体可以经由氮原子之一或阳离子脂质的R基团之一共价键合至本发明的脂质。“偶联物”指的是共价键合至彼此的分子的复合物。举例来说，共价键合至靶向配体的脂质的复合物可以称作脂质-靶向配体偶联物。

[0220] 或者，靶向配体可以非共价键合至式(I)的脂质或其活性衍生物。“非共价键”或“非共价相互作用”不涉及电子对的共享，而是涉及电磁相互作用的更分散的变化，并且可以包括氢键结、离子相互作用、范德华相互作用(Van der Waals interaction)以及疏水键。这类脂质-靶向配体偶联物可以根据文献中广泛描述的技术容易地获得。

[0221] 所关注的多核苷酸

[0222] 术语“多核苷酸”预期涵盖单个核酸以及多个核酸，并且指的是核酸分组或构建体，例如，信使RNA(mRNA)、质粒DNA(pDNA)或短干扰RNA(siRNA)。多核苷酸可以是单股或双股的、线性或环状的。多核苷酸可以包含常规磷酸二酯键或非常规键(例如，酰胺键，诸如肽核酸(PNA)中所发现的)。术语“核酸”指的是存在于多核苷酸中的任何一种或多种核酸区段，例如，DNA或RNA片段。术语“多核苷酸”可以指的是分离的核酸或多核苷酸，其中“分离的”核酸或多核苷酸预期是已经从原生环境中去除的核酸分子DNA或RNA。分离的多核苷酸的实例包括维持在异源性宿主细胞中的重组多核苷酸或在溶液中(部分地或实质上)纯化的多核苷酸。根据本发明的分离的多核苷酸或核酸进一步包括合成产生的这类分子。分离的多核苷酸还可以包括分离的表达载体、表达构建体或其群体。“多核苷酸”还可以指的是如在聚合酶链反应中自身扩增的产物。“多核苷酸”可以含有修饰的核酸，诸如硫代磷酸酯、磷酸酯、环原子修饰的衍生物，等等。“多核苷酸”可以是天然存在的多核苷酸(即，存在于自然界中而没有人类干预)，或重组多核苷酸(即，仅在人类干预下存在)。虽然术语“多核苷酸”与“寡核苷酸”都指的是核苷酸的聚合物，但如本文所用，寡核苷酸长度通常小于100个核苷酸。

[0223] 如本文所用，术语“所关注的多核苷酸”指的是将要递送至细胞以在细胞中引出所需作用(例如，治疗作用、基因表达的变化)的多核苷酸。所关注的多核苷酸可以具有任何长度并且可以包括(但不限于)包含所关注的多肽的编码序列的多核苷酸。在某些实施方案中，当表达多核苷酸或将其引入细胞中时，所关注的多核苷酸或由其编码的多肽具有治疗

活性。

[0224] i. 编码多肽的多核苷酸

[0225] 在一些实施方案中,多核苷酸递送系统包含有包含所关注的多肽的编码序列的多核苷酸。

[0226] 出于本发明的目的,“所关注的多肽的编码序列”或“所关注的多肽的编码区”指的是编码那个多肽的多核苷酸序列。如本文所用,术语“编码”或“编码的”当在指定核酸的情形中使用意味着核酸包含用以引导核苷酸序列翻译成指定多肽的必要信息。编码多肽的信息通过使用密码子来指定。“编码区”或“编码序列”是由可以翻译成氨基酸的密码子组成的核酸部分。尽管“终止密码子”或“翻译终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但其可以被视为编码区的一部分。同样地,转录起始密码子(ATG)可能或可能不被视为编码区的一部分。然而,侧接编码区的任何序列,例如,启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等等,不被视为编码区的一部分。然而,在一些实施方案中,虽然不被视为编码区本身的一部分,但这些调控序列和任何其它调控序列,特别是信号序列或编码肽标签的序列,可以是编码所关注的多肽的多核苷酸序列的一部分。因此,编码所关注的多肽的多核苷酸序列包含编码序列和任选的有助于所关注的多肽的表达、分泌和/或分离的侧接编码区的任何序列。

[0227] 术语“表达”具有如本领域中所理解的其含义并且指的是将在基因或编码序列中编码的基因信息通过多核苷酸的“转录”(例如,经由RNA聚合酶的酶促作用)转化成RNA(例如,mRNA、rRNA、tRNA或snRNA),并且对于多肽编码多核苷酸是通过mRNA的“翻译”转化成多肽的过程。因此,“表达产物”一般是从基因转录的RNA(例如,加工前或加工后)或由从基因转录的RNA编码的多核苷酸或多肽(例如,修饰前或修饰后)。

[0228] 如本文所用,术语“多肽”或“蛋白质”预期涵盖单个“多肽”以及多个“多肽”,并且指的是由经酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。术语“多肽”指的是两个或更多个氨基酸的任何链,并且不是指特定长度的产物。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或更多个氨基酸的链的任何其它术语包括在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可以替代这些术语中的任一者使用或与其可互换使用。

[0229] 术语“所关注的多肽”指的是将要递送至细胞或由将要递送至细胞以在细胞中引出所需作用(例如,治疗作用)的多核苷酸编码的多肽。所关注的多肽可以是任何种类和任何尺寸。

[0230] 分子遗传学和基因工程改造技术所需要的大量序列信息广泛公开可用。对哺乳动物以及人类的完整核苷酸序列、基因、cDNA序列、氨基酸序列和基因组的获取可以从GenBank在网站www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez上获得。额外的信息也可以从来自魏茨曼科学研究所基因组和生物信息学(Weizmann Institute of Science Genome and Bioinformatics)(bioinformatics.weizmann.ac.il/cards)的关于基因和其产物以及生物医学应用的电子百科全书集成信息GeneCards获得,核苷酸序列信息也可以从EMBL核苷酸序列数据库(www.ebi.ac.uk/embl)或DNA数据库或日本(DDBJ,www.ddbj.nig.ac.jp)获得。关于氨基酸序列的信息的额外站点包括乔治敦的蛋白质信息资源网站(www.pir.georgetown.edu)和Swiss-Prot(au.expasy.org/sprot/sprot-top.html)。

[0231] 如上文所论述,本发明的组合物可以包含基因材料,诸如所关注的多核苷酸,例如

pDNA (质粒DNA), 其在转录时产生陷阱。在这类实施方案中, 基因材料可以是表达盒的一部分。另外, 多核苷酸包含表达盒中所发现的编码序列。

[0232] 术语“引入 (introduction/introduce)”当涉及多核苷酸时指的是以使得多核苷酸能接近细胞的细胞内区的方式将多核苷酸呈现给细胞。

[0233] 表达盒包含基于将要用于表达的细胞而选择的一个或多个调控序列, 其可操作地连接至所关注的多肽。“可操作地连接”预期意味着所关注的核苷酸序列 (即, 所关注的多肽的编码序列) 以允许核苷酸序列表达 (例如, 在体外转录/翻译系统中或当将表达盒或载体引入细胞中时在细胞中) 的方式连接至调控序列。“调控序列”包括启动子、增强子以及其它表达控制元件 (例如, 多腺苷酸化信号)。参看例如Goeddel (1990)《基因表达技术: 酶学方法 (Gene Expression Technology: Methods in Enzymology)》185 (Academic Press, San Diego, California)。调控序列包括引导核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中组成性表达的那些和引导核苷酸序列仅在某些宿主细胞中表达的那些 (例如, 组织特异性调控序列)。本领域的技术人员将了解, 表达盒的设计可以取决于以下因素, 诸如有待转化的宿主细胞的选择、所需的沉默元件或所关注的多肽的表达水平, 等等。这类表达盒通常包括一个或多个适当定位的限制酶位点, 以有助于将核酸引入载体中。

[0234] 将进一步了解, 可以容易地选择适当的启动子和/或调控元件以允许相关转录单元/沉默元件在所关注的细胞中表达。在某些实施方案中, 引导沉默元件的细胞内表达所利用的启动子是RNA聚合酶III (Pol III) 的启动子。论述各种Pol III启动子的参考文献包括例如Yu等 (2002)《国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.)》99 (9), 6047-6052; Sui等 (2002)《国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.)》99 (8), 5515-5520 (2002); Paddison等 (2002)《基因与发育 (Genes and Dev.)》16, 948-958; Brummelkamp等 (2002)《科学 (Science)》296, 550-553; Miyagashi (2002)《生物技术 (Biotech.)》20, 497-500; Paul等 (2002)《自然生物技术 (Nat. Biotech.)》20, 505-508; Tuschl等 (2002)《自然生物技术 (Nat. Biotech.)》20, 446-448。根据其它实施方案, 可以使用RNA聚合酶I的启动子, 例如, tRNA启动子。参看McCown等 (2003)《病毒学 (Virology)》313 (2): 514-24; Kawasaki (2003)《核酸研究 (Nucleic Acids Res.)》31 (2): 700-7。在多核苷酸包含所关注的多肽的编码序列的一些实施方案中, 可以使用RNA聚合酶II的启动子。

[0235] 调控序列也可以由病毒调控元件提供。举例来说, 通常使用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒以及猿猴病毒40。对于用于原核与真核细胞的其它适合的表达系统, 参看Sambrook等 (1989) 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) 的第16和17章。参看Goeddel (1990)《基因表达技术: 酶学方法 (Gene Expression Technology: Methods in Enzymology)》185 (Academic Press, San Diego, California)。

[0236] 体外转录可以使用多种可用的系统进行, 包括T7、SP6以及T3启动子/聚合酶系统 (例如, 从Promega、Clontech、New England Biolabs等等可商购的那些)。包括T7、SP6或T3启动子的载体在本领域中是众所周知的并且可以容易地修饰以引导沉默元件的转录。

[0237] 聚乙二醇化

[0238] 载体的聚乙二醇化通过减少载体由网状内皮 (RES) 系统清除而提高递送系统的循环半衰期。在不受任何特定理论或作用机理约束的情况下, 据信聚乙二醇化的载体可以通

过空间上阻断粒子的调理作用而避开RES系统 (Owens和Peppas (2006)《国际制药学杂志 (Int J Pharm)》307:93-102)。为了提供足够的空间位阻以避免调理作用,载体的外表面必须由PEG分子以“刷状”构造完全覆盖。在低表面覆盖率下,PEG链将通常具有“蘑菇状”构造,其中PEG分子将定位于更接近脂质运载体的表面。在“刷状”构造中,PEG分子进一步远离粒子表面扩展,增强空间位阻效应。然而,表面上PEG的过度拥挤可以减少聚合物链的活动性并且由此减少空间位阻效应 (Owens和Peppas (2006)《国际制药学杂志 (Int J Pharm)》307:93-102)。PEG的构象取决于载体表面上PEG的表面密度和分子质量。控制因子是运载体表面上的PEG链之间的距离(D)相对于其弗洛里尺寸(Flory dimension) R_F , R_F 定义为 $aN^{3/5}$, 其中a是单体的持续长度,并且N是PEG中单体单元的数目 (Nicholas等 (2000)《生物化学与生物物理学报 (Biochim Biophys Acta)》1463:167-178)。可以定义三种状况:(1) 当 $D > 2R_F$ 时(相互交错的蘑菇状);(2) 当 $D < 2R_F$ 时(蘑菇状);以及(3) 当 $D < R_F$ 时(刷状) (Nicholas等)。

[0239] 医药组合物

[0240] 本发明的脂质和递送系统适用于哺乳动物组织培养系统中、动物研究中以及用于治疗目的。在治疗应用中可以使用式(I)的细胞毒性阳离子脂质;和包含式(I)的阳离子脂质的递送系统,其中式(I)的阳离子脂质具有细胞毒性活性;包含式(I)的阳离子脂质的递送系统,其中生物活性化合物具有治疗活性;以及包含式(I)的细胞毒性阳离子脂质和具有治疗活性的生物活性化合物的递送系统。本发明公开的主题因此提供了包括式(I)的细胞毒性阳离子脂质或包含式(I)的阳离子脂质的递送系统的医药组合物。

[0241] 可以配制本发明公开的组合物用于通过任何可用的途径递送,即,施用于受试者,所述途径包括(但不限于)肠道外(例如,静脉内)、皮内、皮下、经口、经鼻、经支气管、经眼、透皮(局部)、透粘膜、经直肠以及经阴道途径。在一些实施方案中,递送途径是静脉内、肠道外、透粘膜、经鼻、经支气管、经阴道以及经口。

[0242] 组合物可以配制成医药学上可接受的盐。短语“医药学上可接受的盐”如本文所用意味着对于在受试者中使用是安全和有效的并且具有所需生物活性的本发明公开的化合物的那些盐。医药学上可接受的盐包括存在于本发明的化合物中的酸性或碱性基团的盐。医药学上可接受的酸加成盐包括(但不限于)盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、硼酸盐、异烟酸盐、乙酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即,1,1'-亚甲基-双(2-羟基-3-萘甲酸盐))、甲磺酸盐。本发明公开的化合物中的某些可以与各种氨基酸形成医药学上可接受的盐。适合的碱盐包括(但不限于)铝、钙、锂、镁、钾、钠、锌以及二乙醇胺盐。对于医药学上可接受的盐的评述,参看Berge等(1977)《药物科学杂志 (J. Pharm. Sci.)》66:1-19,其以引用的方式并入本文中。本文所描述的脂质的盐可以例如通过使适当当量的化合物与所需的酸或碱在溶液中反应来制备。反应完成之后,通过添加盐不可溶的适量的溶剂使盐从溶液中结晶。

[0243] 如本文所用,术语“医药学上可接受的载剂”包括与医药或化妆施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂,等等。补充的活性化合物也可以合并至组合物中。

[0244] 如本领域的一般技术人员将了解,配制本发明公开的医药组合物以与其预期施用

途径相容。用于肠道外(例如,静脉内)、肌肉内、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及张力调节剂,诸如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱调节,诸如盐酸或氢氧化钠。肠道外制剂可以封装于由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0245] 适合于注射使用的医药组合物通常包括无菌水溶液(在可溶于水的情况下)或分散体以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。组合物应是无菌的并且应是流体达到易于注射的程度。在一些实施方案中,医药组合物在制造和储存条件下稳定并且应防腐以对抗微生物,诸如细菌和真菌的污染作用。一般来说,相关载剂可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇,等等),以及其适合的混合物。适当的流动性可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣,在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂来维持。防止微生物的作用可以由各种抗菌剂和抗真菌剂达成,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞(thimerosal),等等。在一些实施方案中,配方中包括等张剂,例如,糖、多元醇(诸如甘露糖醇或山梨糖醇)或氯化钠。可注射配方的延长吸收可以通过在配方中包括延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0246] 可以通过将活性化合物(例如,式(I)的细胞毒性阳离子脂质或包含式(I)的阳离子脂质的递送系统)以所需量与上文列举的成分之一或组合一起合并于适当的溶剂中,需要时继之以过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。在某些实施方案中,注射用溶液不含内毒素。一般来说,通过将活性化合物合并至含有基础分散介质和来自上文列举的那些的所需其它成分的无菌媒剂中来制备分散体。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的那些实施方案中,可以通过真空干燥和冷冻干燥,得到活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何额外所需成分的粉末来制备溶液。

[0247] 经口组合物一般包括惰性稀释剂或可食用载剂。出于经口治疗性施用的目的,活性化合物可以与赋形剂一起合并并且以片剂、糖锭或胶囊,例如明胶胶囊的形式使用。经口组合物还可以使用流体载剂制备用于作为漱口剂使用。可以包括医药学上或化妆学上相容的粘合剂和/或辅助材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、糖锭等等可以含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一者:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄耆胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、羧甲基淀粉钠(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotes);助流剂,诸如胶质二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。用于经口递送的组合物可以有利地合并试剂以改善在胃肠道内的稳定性和/或增强吸收。

[0248] 对于通过吸入施用,本发明公开的组合物可以从含有适合的推进剂(例如气体,诸如二氧化碳)的加压容器或分配器或者雾化器以气溶胶喷雾的形式递送。还可以使用液体气溶胶、干粉,等等。

[0249] 本发明公开的组合物的全身施用还可以通过透粘膜或透皮方式。对于透粘膜或透皮施用,适于有待渗透的屏障的穿透剂用于配方中。这类穿透剂在本领域中一般是已知的,

并且对于透粘膜施用包括例如清洁剂、胆汁盐以及梭链孢酸衍生物。透粘膜施用可以经由使用鼻喷雾或栓剂来实现。对于透皮施用,活性化合物配制成如本领域中一般已知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

[0250] 本文所描述的组合物还可以按栓剂(例如,具有常规栓剂基体,诸如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂的形式制备用于经直肠递送。

[0251] 对于施用简易性和剂量均匀性有利的是将经口或肠道外组合物配制成剂量单位形式。剂量单位形式如本文所用指的是适合作为用于有待治疗的受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有经过计算以与所需要的医药或化妆载剂联合产生所需治疗作用的预定量的活性化合物。对于本发明的剂量单位形式的规格由以下决定并且直接取决于以下:(a)活性化合物的独特特征和有待达成的特定治疗作用,以及(b)混配这种活性化合物用于治疗个体的领域中所固有限制。关于给药的指导在本文别处提供。

[0252] 如本文所用,“治疗活性”当涉及本文所描述的组合物时预期是当施用于有需要的受试者时能够引出所需药理和/或生理作用的活性。

[0253] 如本文所用,术语“治疗”或“预防”指的是获得所需药理和/或生理作用。这种作用就完全或部分预防特定感染或疾病或其征象或症状来说可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈感染或疾病和/或因感染或疾病所致不利作用来说可以是治疗性的。因此,方法“预防”(即,延迟或抑制)和/或“减少”(即,降低、减缓或改善)接受本发明的组合物的受试者的疾病或病症的有害作用。受试者可以是任何动物,包括哺乳动物,诸如人类,并且包括(但决不限于)家畜,诸如猫或犬受试者;农畜,诸如(但不限于)牛、马、山羊、绵羊和猪受试者;野生动物(无论在野外还是在动物园);研究动物,诸如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猪、犬、猫等等;禽类,诸如家鸡、火鸡、鸣鸟等等,即,用于兽医医学使用。

[0254] 任何类型的不当病状或疾病可以用本发明公开的组合物治疗性处理。在一些实施方案中,有待治疗的疾病或不当病状是癌症。如本文别处所描述,术语“癌症”涵盖任何类型的不受调控的细胞生长并且包括所有形式的癌症。在一些实施方案中,有待治疗的癌症是结肠直肠癌。用以检测癌症生长或进展的抑制的方法在本领域中是已知的并且包括(但不限于)测量原发性肿瘤的尺寸以检测其尺寸的减小、继发性肿瘤的延迟出现、继发性肿瘤的减缓发展、继发性肿瘤的减少发生以及疾病的继发作用的减缓或降低的严重性。

[0255] 本领域的技术人员将了解,本文所描述的组合物施用可以单独或与其它治疗模态联合使用,所述模态包括(但不限于)手术疗法、放射疗法或用任何类型的治疗剂,诸如药物治疗。在受试者罹患癌症的那些实施方案中,本文所描述的组合物可以与本领域中熟知的任何化学治疗剂组合递送。

[0256] 在一些实施方案中,细胞毒性生物活性化合物和本文所描述的组合物可以同时施用于受试者,其中细胞毒性生物活性化合物与本文所描述的组合物都存在于施用于受试者的单一组合物内。或者,在其它实施方案中,细胞毒性生物活性化合物和本文所描述的组合物在独立的组合物中依序施用。“依序”预期是两种组合物以两种相异组合物的两个独立施用,一个接一个地施用于受试者,其中一种组合物包含细胞毒性生物活性化合物并且另一种组合物包含本文所描述的组合物。

[0257] 当施用于有需要的受试者时,本文所描述的组合物可以进一步包含如本文别处所论述的靶向配体。在这些实施方案中,靶向配体将使物理缔合的配体或复合物靶向受试者

内靶向的细胞或组织。在一些实施方案中,靶向的递送系统是细胞毒性的。在某些实施方案中,靶向的细胞或组织将是患病的或由不当的病状表征。

[0258] 给药

[0259] 本文所描述的组合物治疗有效量的递送可以经由施用包含治疗有效剂量的这种药剂的医药组合物而获得。“治疗有效量”或“剂量”意味着足以引出所需治疗作用的本文所描述的组合物浓度。

[0260] 如本文所用,“有效量”是足以实现有益或所需的临床或生物化学结果的量。有效量可以一次或多次施用。

[0261] 本文所描述的组合物有效量将根据受试者的重量、性别、年龄以及医学病史而变化。影响有效量的其它因素可以包括(但不限于)受试者病状的严重性、所治疗的病症以及必要时连同脂质或包含脂质的复合物一起施用的辅助治疗剂。用以确定功效和剂量的方法为本领域的技术人员所知。参看例如Isselbacher等(1996)《哈里森内科原理(Harrison's Principles of Internal Medicine)》第13版,1814-1882,其以引用的方式并入本文中。

[0262] 医药组合物可以在各种时间间隔下并且按需要经过不同的时间段施用,例如,每天多次、每天一次、每隔一天一次、每周一次历时约1至10周之间、2至8周之间、约3至7周之间、约4、5或6周,等等。技术人员将了解,某些因素可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时序,包括(但不限于)疾病、病症或不当病状的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄,以及所存在的其它疾病或不当病状。一般来说,受试者的治疗可以包括单一治疗,或在许多情况下可以包括一系列治疗。

[0263] 应了解,本文所描述的组合物适当剂量取决于其效力并且可以任选地针对特定接受者作调整,例如,经由施用渐增的剂量直至达成预选的所需反应。应了解,对于任何特定动物受试者的特定剂量水平可以取决于多种因素,包括所采用的本文所描述的特定组合物的活性、受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、任何药物组合,以及有待调节的表达或活性的程度。

[0264] 在本发明的另一个实施方案中,间歇地施用治疗有效剂量的本文所描述的组合物。“间歇施用”预期是施用治疗有效剂量的本文所描述的组合物,继之以中止的时间段,然后继之以治疗有效剂量的另一次施用,等等。治疗有效剂量的施用可以按连续方式达成,例如用持续释放配方,或可以根据所需每日给药方案达成,例如用每天一次、两次、三次或更多次施用。“中止的时间段”预期是本文所描述的组合物连续持续释放或每日施用的中止。中止的时间段可以比连续持续释放或每日施用的时段更长或更短。在中止的时间段期间,本文所描述的组合物在相关组织中的作用水平实质上低于在治疗期间所获得的最大水平。在一些实施方案中,中止时段取决于有效剂量的浓度。中止时段可以是至少2天、至少4天或至少1周。在其它实施方案中,中止时段是至少1个月、2个月、3个月、4个月或更长。当使用持续释放配方时,考虑到本文所描述的组合物在治疗部位处更长的驻留时间,中止时段必须延长。或者,可以相应地减少持续释放配方的有效剂量的施用频率。本文所描述的组合物间歇施用时程可以继续直至达成所需治疗作用,并且最终达成疾病或不当病状的治疗。

[0265] 本领域的一般技术人员在回顾本发明公开的主题后将了解,本发明公开的组合物,包括其医药学上可接受的盐和医药组合物,可以直接施用于细胞、细胞培养物、细胞培

培养基、组织、组织培养物、组织培养基,等等。当涉及本文所描述的组合物时,术语“施用”和其派生词包含允许化合物接触细胞的任何方法。本发明公开的组合物或其医药学上可接受的盐或医药组合物可以体外或离体施用于(或接触)细胞或组织。本发明公开的组合物或其医药学上可接受的盐或医药组合物也可以体内施用于(或接触)细胞或组织,这是通过施用于个别受试者(例如,患者),例如,通过全身施用(例如,静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下或颅内施用)或局部应用,如本文别处所描述。

[0266] IV. 制品

[0267] 制品可以包括小瓶或其它容器,其含有适用于本发明方法的组合物连同任何载剂,经过干燥或呈液体形式。制品进一步包括呈容器上的标签形式和/或呈包装容器的盒中所包括的插页形式的说明书,用于执行本发明的方法。说明书还可以印刷在包装小瓶的盒上。说明书含有信息,诸如足够的剂量和施用信息以允许受试者或本领域中的工作人员施用医药组合物。预期本领域中的工作人员涵盖可能施用组合物的任何医生、护士、技师、配偶或其它护理者。医药组合物也可以由受试者自己施用。

[0268] 提供以下实施例以作说明并且不作限制。

[0269] 实施例

[0270] 可靠的同系原位结肠直肠肝转移动物模型的开发和使用已经允许进一步调查CXCL12在驱动结肠直肠肝转移形成中的作用。由Zhang等首次报道的这种模型涉及将CT-26FL3细胞(2.0×10^6 个)接种至盲肠壁中并且得到肝转移的高发生率(约90%) (Zhang, Y. 等, 结肠直肠癌转移至肝的可靠的小鼠模型的开发和表征 (Development and Characterization of a Reliable Mouse Model of Colorectal Cancer Metastasis to the Liver).《临床和实验性转移 (Clin Exp Metastasis)》,30 (7),2013)。经由CT-26FL3 (稳定表达RFP/Luc标志基因) 细胞系的建立,荧光素酶生物发光分析用于证明递送编码小的工程改造的抗体结合域CXCL12/SDF-1-陷阱蛋白 (28.6kD) 的pDNA的半乳糖-PEG-LCP纳米粒子的静脉内 (IV) 注射引发肝抵抗转移病灶。

[0271] 材料和方法

[0272] 1. 材料

[0273] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[琥珀酰基(聚乙二醇)-2000]-N-羟基琥珀酰亚胺 (DSPE-PEG2000-N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)) 购自NOF Corporation (Tokyo, Japan)。含放射性 $^{177}\text{LuCl}_3$ 的0.05N HCl购自PerkinElmer, Inc. 并且在收到后立即利用。DSPE-PEG2000-半乳糖经由10当量的4-氨基苯基 β -D-吡喃半乳糖苷和1当量的DSPE-PEG2000-NHS在PBS缓冲液中偶联来合成,接着用氯仿萃取并且使用MWCO 1000透析管针对水透析。所有其它脂质购自Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)。肽购自Elim Biopharmaceuticals, Inc. (Hayward, CA); 单环缩写为mc。赫斯特 (Hoechst) 核酸染料3342购自ThermoFischer Scientific (Grand Island, NY)。荧光Cy3 cDNA标记试剂盒经由 (Mirus LabelIT试剂盒; Mirus Bio, Madison, WI) 获取。荧光素购自Promega Corporation (Madison, WI)。编码由巨细胞病毒 (CMV) 启动子驱动的绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒由Bayou Biolabs (Harahan, LA) 定制。ELISA、IF和IHC试剂盒以及包括抗His标签、抗CXCL12和抗CD8以及二级抗体的所有抗体经由Abcam (Cambridge, MA) 购得。侵入和迁移试验试剂盒经由EMD Millipore (Billerica, MA) 购得。所有其它化学品获自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 并且

未经进一步纯化即使用。六周龄的BALB/c雌性小鼠(每只约18g)购自Charles River Laboratories(Wilmington,MA)。

[0274] 2.方法

[0275] 经由CXCL12陷阱蛋白对迁移和侵入的体外抑制:测试工程改造的蛋白质(CXCL12陷阱)以确定其抑制CT-26FL3迁移和侵入的能力。使用趋化性96孔细胞迁移和24孔细胞侵入试验(EMD Millipore,Billerica,MA)。使细胞饥饿24小时并且在跨孔(trans-well)板上以 0.5×10^6 个细胞/毫升的密度接种于无血清培养基中。一组细胞保留于无血清培养基中,而所有其它组允许添加给料盘中的趋化因子(化学引诱物)CXCL12(100ng/ml)。此外,存在CXCL12的三个组允许添加无血清培养基(无处理)、CXCL12陷阱(2、4、8、12 μ g/ml)或可商购的CXCL12 mAb(Abcam)(1、2、4 μ g/ml)。在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂环境中孵育4和24小时(迁移),并且孵育24小时(侵入)。使细胞从迁移/侵入板的下侧脱落,收集,并且裂解。添加裂解缓冲液连同荧光素(荧光素酶试验溶液),经由生物发光板读取器分析。扣除背景孔并且定量相对于未处理(无CXCL12化学引诱物)来报道。

[0276] 加载有DNA的LCP的制备和表征:使用修改过的方案制备LCP。由Igepal 520和环己烷(3:7v/v)制备两种独立的微乳液(各60mL)并且置于搅拌下。制备DNA(180 μ g)溶液,其中添加1,800 μ L 2.5M CaCl₂。向这种溶液中以2:1的N:P比率(约200 μ g)添加八精氨酸肽(mc-CR8C)并且立即添加至微乳液中。还制备Na₂HPO₄溶液(1,800 μ L,50mM)并且添加至另一种微乳液中。使每种微乳液搅拌20分钟。将含有Na₂HPO₄的微乳液添加至含有DNA/肽/CaCl₂的微乳液中。使这种溶液搅拌5分钟,随后添加1,200 μ L 20mM DOPA(于CHCl₃中)。添加DOPA之后,使微乳液再搅拌30分钟。添加等体积的100%EtOH(120ml)以破坏乳液。将混合物传递至50ml尖底离心管中并且以10,000g离心20分钟。倾析上清液之后,此后用100%EtOH洗涤沉淀物两次以去除痕量的Igepal和/或环己烷。然后在N₂下干燥沉淀物并且再悬浮于CHCl₃中。使这种溶液以10,000rpm离心5分钟用于去除大的聚集体,并且回收含有LCP“核心”(包封于磷酸钙纳米沉淀物内的DNA和肽,支持并且由DOPA的脂质单层包围)的上清液。

[0277] 为了表征DNA包封效率,根据制造商的说明书用Cy3(Mirus LabelIT试剂盒;Mirus Bio,Madison,WI)标记cDNA。将这种Cy3-DNA配制于LCP核心中,此后经由荧光光谱法评价回收率。进一步的研究使用赫斯特核酸染料以确认囊封pDNA/肽的DNA包封效率,使核心在乙酸缓冲液中裂解,经由添加蛋白酶K使肽/DNA解离,并且添加赫斯特染料并且经由荧光光谱法评价。如上文所描述制备¹⁷⁷Lu标记的LCP核心,其中pDNA/肽连同¹⁷⁷LuCl₃一起合并至钙乳液的CaCl₂溶液中。两种乳液共沉淀后,如上文所描述收集¹⁷⁷Lu标记的LCP核心,其中在CHCl₃中离心去除含有¹⁷⁷Lu的聚集体。最终LCP核心囊封80%的¹⁷⁷Lu。通过干燥游离脂质和核心的混合物并且经由5%蔗糖水溶液再水合来产生最终Gal-LCP-pDNA/mc-CR8C。发现对于最佳的最终粒子配方的核心与外叶脂质的比率是11mg核心:600 μ L DOTAP(20mM):600 μ L胆固醇(20mM):500 μ L DSPE-PEG2000(20mM)。其中,利用35mol%DOTAP、35mol%胆固醇以及30mol%DSPE-PEG2000(或25mol%DSPE-PEG和5mol%DSPE-PEG-Gal)作为外叶脂质。使用Malvern ZetaSizer Nano系列(Westborough,MA)测量LCP的 ζ 电位和粒度。使用JEOL100CX II TEM(JEOL,Japan)获取LCP的TEM图像。

[0278] Gal-LCP-pDNA/mc-CR8C的药物代谢动力学、生物分布和细胞分布:如上文所描述,经由pDNA与¹⁷⁷Lu的共囊封来确定药物代谢动力学和定量生物分布。先前已经利用这类方法

来准确地确定LCP生物分布。用0.5mg pDNA/kg的LCP个别地注射(0.2mL,通过添加蔗糖平衡渗透性)8周龄的BALB/c雌性小鼠(每组利用6只小鼠),对应于 1×10^8 cpm/kg ^{177}Lu 的剂量。对于药物代谢动力学分析,在各种时间点(0.5、1、2、4、8、12以及16小时)经由尾部切口放血回收血液。对于生物分布分析,在施用LCP之后16小时,收集血液和主要器官(每个时间点利用6只小鼠)。使用 γ -计数器测量两个研究中血液和组织中的放射性。在两区室模型下利用Phoenix WinNonlin(6.3版,Pharsight Corporation;Mountain View,CA)进行分析。

[0279] 体内基因剂量递增和表达时间:将含有pCXCL12陷阱DNA(其在C末端含有His标签)的半乳糖靶向的LCP的配方经由尾静脉注射(0.2mL,通过添加蔗糖平衡渗透性)至8周龄的BALB/c雌性小鼠中(0.1、0.5或1mg DNA/kg,每组利用3只小鼠)。在尾静脉静脉内施用递增浓度的pCXCL12陷阱DNA LCP之后进行西方墨点分析和定量以确定表达是否是剂量依赖性的。在施用之后24小时使小鼠安眠。收集肝、脾、肺、肾、心和血液并且在RIPA缓冲液中均化。经由二喹啉甲酸蛋白质试验试剂盒(BCA蛋白质试验试剂盒;Pierce, Rockford, IL)确定裂解物中的总蛋白质浓度。随后,加载50 μg 总蛋白质用于西方分析。所需CXCL12陷阱蛋白具有28.6kD的分子量。GAPDH用作加载对照。His(6 $\times$)标签小鼠抗体用作一级抗体。以超过PBS处理组的相对HRP强度增加来定量pCXCL12陷阱的表达。

[0280] 还使用His标签ELISA试剂盒,其中加载5 μg 总蛋白质用于进一步表达分析。试剂盒提供含有His标签的标准蛋白质以用作标准校准对照。因此,可以经由ELISA分析测量蛋白质表达的定量。在剂量递增和表达研究之后,选择0.5mg DNA/kg剂量用于体内治疗性研究。

[0281] 将含有编码pCXCL12陷阱的pDNA(其在C末端含有His标签)的半乳糖靶向的LCP的配方经由尾静脉注射(0.2mL,通过添加蔗糖平衡渗透性)至8周龄的BALB/c雌性小鼠中(0.5mg DNA/kg $\times$ 3,隔日一次,每组利用3只小鼠)。在尾静脉静脉内施用pCXCL12陷阱DNA LCP之后进行西方墨点分析和定量以确定瞬时表达时间。在施用之后1、2、4或8天使小鼠安眠。收集肝、脾、肺、肾、心和血液并且在RIPA缓冲液中均化。使用BCA测量蛋白质含量。随后,加载50 μg 总蛋白质用于西方分析。所有凝胶加载有特定器官和标准肝样品以分析器官对比肝的表达水平并且维持器官和肝表达的定量的一致性。以超过PBS处理组的相对HRP强度增加来定量pCXCL12陷阱的表达。

[0282] 毒性和病理学研究:用pCXCL12陷阱、pGFP、空白加载的LCP(0.5mg DNA/kg $\times$ 3,隔日一次)处理小鼠(每组利用三只小鼠)。此外,向另一个处理组施用游离CXCL12陷阱蛋白(1.0mg蛋白质/kg $\times$ 3,隔日一次)。在最后尾静脉注射之后24小时使小鼠安眠。经由心脏穿刺和离心从小鼠获得血清。通过测量血清样品中AST、ALT和BUN的水平来评价肝和肾损伤。用全血分析来测量血细胞水平,包括白血细胞、淋巴细胞、粒细胞以及单核细胞。由UNC Chapel Hill的动物临床化学和基因表达实验室(Animal Clinical Chemistry and Gene Expression Laboratories)定量这些测量。此外,收集每只小鼠的主要器官,固定,并且此后加工用于三色染色。使用具有10 $\times$ 物镜的Nikon光学显微镜收集组织切片的图像。

[0283] 体内肝转移抑制:将小鼠用 2×10^6 个CT-26FL3 RFP/Luc细胞接种至盲肠壁中。第10天、第12天以及第14天经由尾静脉静脉内施用10 μg (pDNA)Gal-LCP-pCXCL12陷阱/mc-CR8C的处理($n=7$)。对照组包括PBS/未处理($n=7$)和Gal-LCP-GFP/mc-CR8C($n=6$)。通过腹腔内施用200 μl 荧光素(10mg/ml)追踪肿瘤质量的进展。在施用荧光素之后10分钟记录荧光素酶生物发光成像。使用具有Kodak相机的IVIS在生物发光图像中上方示出第24天的小鼠

肿瘤质量。24天后,使小鼠安眠并且提取肝。使用Image J软件定量肝上肿瘤负荷的定量。上方示出了定量,其中发现肿瘤负荷与对照组相比减少超过85%。研究处理后其它器官转移负荷的进一步分析。第24天评价小鼠转移,其中用200 μ l荧光素(10mg/ml)处理小鼠。使小鼠成像,安眠,然后提取器官并且置于荧光素(1mg/ml)的溶液中并且针对生物发光成像。

[0284] **统计分析:**数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)。当仅比较两个值集时通过史蒂特氏t检验(Students't-test)并且当数据涉及三个或更多个组时通过单因子变异数分析(ANOVA)继之以邓尼特氏检验(Dunnett's test)来进行统计分析。*、**、***分别表示 $p < 0.05$ 、 0.01 以及 0.001 并且被视为显著的并且在图或图例上记载。在所有统计中,将组与未处理的对照相比较。

[0285] 实施例1

[0286] 半乳糖-LCP pDNA/mc-CR8C纳米粒子的配制

[0287] Hu等首次报道了具有pDNA/mc-CR8C货物的半乳糖-LCP的配制和递送至小鼠的肝(肝细胞)(Hu, Y.等, 高效合成载体:DNA至体内肝细胞核的非流体力学递送(A Highly Efficient Synthetic Vector:Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo).《美国化学会-纳米(ACS Nano)》,2013.7(6):第5376-5384页)。如报道,反相微乳液用于制备1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸(DOPA)包覆的磷酸钙(CaP)纳米粒子(LCP“非晶核心”)。这些核心可以囊封DNA(60%效率)与阳离子肽,得到直径在15至25nm范围内的核心尺寸。可以在透射电子显微术(TEM)下显现中空核心结构(图3A/B)。随后,包围CaP核心的DOPA单层允许添加阳离子外叶脂质(1,2-二油酰-3-三甲铵-丙烷(DOTAP)、辅助脂质胆固醇以及1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[琥珀酰基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG2000))以帮助避开RES,产生60nm以下的粒子(“最终”LCP,直径40-60nm,示于图3A-C中,其可以容易地穿透肝窦状隙窗口)。

[0288] 实施例2

[0289] LCP纳米粒子尺寸的确定

[0290] 经由动态光散射发现LCP粒子的流体力学直径和表面电荷为约45nm和10mV(图3C)。动态光散射指示LCP的直径窄分散于45nm左右,归因于DOTAP的阳离子电荷连同DSPE-PEG2000的阳离子屏蔽能力而具有正 ζ 电位(+10mV左右)。LCP和脂质体混合物得到 236 ± 32 nm的z平均值; $n=6$ 。发现溶液在37 $^{\circ}$ C下在10%胎牛血清中稳定至少24小时,其中未观测到z平均值的显著增加(图3D)。

[0291] 实施例3

[0292] LCP核心中的pDNA囊封效率

[0293] 经由使核心在乙酸缓冲液环境(pH=4)中裂解来实现半乳糖-LCPpDNA/mc-CR8C的pDNA加载的确定。经由添加蛋白酶K溶液使DNA从肽解离。赫斯特染料的添加允许定量荧光读取以确定DNA囊封效率。发现DNA囊封效率为约50-60%,这密切对应于Hu等的配方(Hu, Y.等, 高效合成载体:DNA至体内肝细胞核的非流体力学递送(A Highly Efficient Synthetic Vector:Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo).《美国化学会-纳米(ACS Nano)》,2013.7(6):第5376-5384页)。

[0294] 实施例4

[0295] 半乳糖-LCP-pDNA/mc-CR8C纳米粒子PK和器官/肝累积

[0296] 经由 Lu^{177} 放射性同位素合并至pDNA/mcCR8C LCP核心中来确定肝特异性、药物代谢动力学以及器官分布。将含有 Lu^{177} 的半乳糖-LCP pCXCL12陷阱/mc-CR8C (p陷阱LCP) 粒子经由尾静脉注射至正常BALB/c小鼠中。PK和器官分布型态发现,半乳糖-LCP纳米粒子展现 $T^{1/2\alpha}$ 和 $T^{1/2\beta}$ 分别是20分钟和1054分钟的两相分布,以及在静脉内注射后16小时约50%的LCP在肝中累积(图4)。在没有半乳糖靶向的情况下p陷阱LCP粒子的尾静脉注射显示肝累积的显著减少,约10-15%累积,这与Hu等所报道的值是可比的。

[0297] 实施例5

[0298] 内源性CXCL12的体内肝表达型态

[0299] 为了验证患病(结肠直肠肝转移模型)BALB/C小鼠的肝中内源性CXCL12的表达水平,我们提取,福尔马林固定,石蜡切片并且经由用一级CXCL12抗体和荧光标记(Alexa Fluor 594)的二级抗体进行免疫荧光染色来评价CXCL12的量。我们进一步评价p陷阱LCP的递送是否将得到归因于CXCL12捕获而减少的荧光信号以及归因于减少的转移病灶而减少的炎症。因此,在p陷阱LCP (10 μg pDNA隔日一次 $\times 3$)的最后静脉内施用后10天,我们收集肝,将肝福尔马林固定,石蜡切片并且使用针对CXCL12的免疫荧光染色(红色)。研究五个组(其中四个含有CRC),包括未处理的(无CRC)、未处理的(PBS)、半乳糖-LCP pGFP/mc-CR8C (pGFP LCP)、p陷阱LCP (10 μg)、p陷阱LCP (10 μg 隔日一次 $\times 3$)。结果示于图5a中,其中未处理的和pGFP的荧光强度不具有显著差异,并且CXCL12表达与来自无CRC的小鼠的未处理的肝相比具有约5至6倍增加。然而,两个p陷阱LCP (10 $\mu\text{g} \times 1$ 和10 μg 隔日一次 $\times 3$)组与未处理的相比荧光强度分别显示2.5和5倍减少,最终达到来自无CRC的小鼠的未处理的肝中所发现的CXCL12的基线水平($p < 0.05$) (图5A)。归因于在p陷阱LCP处理 (10 $\mu\text{g} \times 1$ 和10 μg 隔日一次 $\times 3$)之后肝中所发现的CXCL12的减少,我们进一步将切片染色以确定对据信由内源性CXCL12募集的肝CD8T细胞群体(绿色)、MDSC以及T调控细胞的影响。研究四个组,包括健康的(无CRC)、未处理的(肿瘤)、未处理的(间质)以及p陷阱LCP (10 μg 每隔一天 $\times 3$)。结果示于图5B中,其中p陷阱LCP (10 μg 隔日一次 $\times 3$)组显示与未处理的相比减小的荧光强度($p < 0.05$) (图5B)。

[0300] 实施例6

[0301] p陷阱LCP施用后CXCL12陷阱的体内器官表达/分布

[0302] p陷阱LCP经由静脉内尾静脉施用递送于BALB/c小鼠中使得接近50%的注射剂量在肝中累积(图4B)。Hu等报道了大多数LCP在肝细胞中吸收并表达。Hu等还显示了减小的PEG密度和半乳糖靶向配体的缺乏使吸收优先转向库普弗细胞(Kupffer cell)中,降低pDNA的表达水平。因此,为了确保肝细胞吸收和表达,我们反映出Hu等的配方中使用的PEG密度(30mol%输入)和半乳糖靶向配体。我们进一步调查了pCXCL12陷阱在肝对比其它器官/血清中的优先表达以确保我们具有这种CXCL12陷阱的优先肝特异性表达。为了确定pCXCL12陷阱的器官表达,我们已经在C端合并His标签,这允许经由His标签mAb进行ELISA和西方墨点分析(图5D、5E和5F)。用渐增剂量的p陷阱LCP (0.1mg/kg、0.5mg/kg以及1.0mg/kg)处理小鼠。经由ELISA和西方墨点分析,我们在24小时后观察到肝表达的剂量依赖性增加,而在其它脱靶器官或血清中未发现表达(图5D和5E)。进行进一步研究,其中施用p陷阱LCP (0.5mg/kg隔日一次 $\times 3$)并且第1天、第2天、第4天以及第8天使小鼠安眠。收集器官并且经由西方墨点通过使用抗His标签mAb来分析(图5F)。这些结果明确证明半乳糖-LCP载体允

许在肝中优先瞬时表达,而在任何其它器官或血清中具有最小表达(图5D、5E和5F)。随后,我们报道了肝表达保持瞬时特性,其中发现表达在最后注射($10\mu\text{g}$ pDNA; 0.5mg/kg 隔日一次 $\times 3$)后持续至多8天(图5F)。

[0303] 绿色荧光蛋白质粒(pGFP)和CXCL12陷阱质粒(p陷阱)在肝对比其它器官/血清中的优先表达示于图5A中。经由在最后pGFP LCP注射之后第2天、第4天以及第8天器官切片的荧光显微术分析,我们能够证明持续至多4天的瞬时肝特异性表达。在任何其它主要器官切片中未发现GFP信号。此外,发现GFP的表达主要是在肝内的肝细胞群体中(图5A)。

[0304] 实施例7

[0305] p陷阱LCP施用后小鼠中结肠直肠肝转移的减少的发生和肿瘤负荷

[0306] 我们检查了p陷阱LCP对小鼠中所发现的发生率和转移负荷的影响。将小鼠用 2.0×10^6 个CT-26FL3(RFP/Luc)细胞原位接种至盲肠壁中。在这一系列实验中,处理在盲肠接种之后10天开始。探索三个处理组,包括PBS(未处理)、由pGFP LCP组成的载体对照以及p陷阱LCP。在接种之后第10天起始三个处理组的施用,其中第10天、第12天以及第14天进行静脉内尾静脉注射($10\mu\text{g}$ pDNA)。经由腹膜内施用 $200\mu\text{l}$ 荧光素(10mg/ml)追踪总小鼠肿瘤负荷,继之以生物发光分析。每周记录整个小鼠肿瘤负荷,并且用于在第10天之前将小鼠分类至处理组中,在接种之后第24天的整个小鼠肿瘤负荷示于图13中。第24天,腹膜内施用 $200\mu\text{l}$ 荧光素(10mg/ml),归因于盲肠中重的原发性肿瘤负荷使小鼠安眠。收集器官并且在PBS中冲洗,随后置于稀释的荧光素溶液(1mg/ml)中。通过生物发光成像分析肝和其它器官以确定转移性肿瘤负荷(图6A和6B)。在生物发光分析之后,在PBS中冲洗肝,固定于福尔马林溶液中,切片,并且三色染色用于进一步形态分析(图6C)。从荧光素酶(生物发光强度)明显可见,PBS和pGFP LCP在肝上具有大的转移性肿瘤负荷(图6A和6B),其随后导致硬化并且纤维化组织变得更加突出(图6C)。相比之下,用p陷阱LCP($10\mu\text{g}$ pDNA)三次(隔日一次)处理的小鼠显示肝转移形成的发生率显著(肝转移负荷降低10倍)和约70–80%的减少。经由三色染色的肝切片的显微镜分析检测的纤维化区域在来自pGFP LCP小鼠的样本中比对照样本中显著更小($p < 0.01$)(图6C)。凭借我们的知识首次报道了经由pDNA在肝特异性非病毒载体中的递送已经成功地表达治疗性蛋白质,得到治疗功效。此外,我们观测到转移不仅是负荷和发生率的降低,而且未发现转移迁移和侵入其它器官(图6B)。

[0307] 实施例8

[0308] 癌症特异性T细胞增强p陷阱LCP疗法的抗转移功效

[0309] 在p陷阱LCP处理之后肝中减少的MDSC和Treg群体连同CD8+淋巴细胞的存在暗示肝内从促肿瘤(免疫抑制)转向抗肿瘤环境。因此,我们检查了细胞毒性T淋巴细胞(CTL)在p陷阱LCP疗法之后减少肝中转移建立的能力。为了调查p陷阱LCP增强癌症特异性CD8T细胞杀死的能力,我们研究了p陷阱LCP在CD8+T细胞群体耗尽的小鼠中的抗癌功效。我们遵循类似于Harimoto等所报道的方案,其中在两次腹膜内注射 $400\mu\text{g}$ 抗Lyt2.2(2.43;大鼠IgG2b)(14)之后 $\geq 95\%$ 的CD8+T细胞群体耗尽。根据早先所描述的原位同系模型将小鼠用CRC接种,继之以在处理之前T细胞耗尽。在这一系列实验中,处理在盲肠接种之后10天开始。将动物分成三个处理组:未处理的(PBS)、p陷阱LCP与抗CD8(抗Lyt2.2)以及p陷阱LCP与抗体同种型对照(大鼠IgG2b同种型对照)。为了维持CD8+T细胞群体的耗尽,第8天和第10天施用抗Lyt2.2或同种型对照IgG($400\mu\text{g}$)的腹膜内注射。在接种之后第10天起始处理,其中第10天、

第12天以及第14天进行静脉内尾静脉注射 (10 μ g pDNA)。由于第21天盲肠中重的原发性肿瘤负荷对小鼠施以无痛致死术,并且经由生物发光成像确定肝肿瘤负荷(图7)。用PBS处理的所有小鼠在肝中发展成大的转移性肿瘤病灶(图7)。用抗Lyt2.2继之以三个剂量的p陷阱LCP (10 μ g pDNA) 处理的T细胞耗尽的小鼠显示与未处理的小鼠类似的肝肿瘤负荷。相比之下,用同种型对照IgG2b抗体继之以p陷阱LCP处理的小鼠与未处理的动物相比显示肝转移负荷降低5倍和肝转移发生率减少约80%。这些结果显示,CTL的存在连同CXCL12的减少降低了在肝中建立转移病灶的风险。

[0310] 实施例9

[0311] 降低的转移负荷与乳癌肝转移模型的增加的存活期相关联

[0312] 我们检查了p陷阱LCP对侵袭性小鼠乳癌肝转移模型的中位存活期和肝肿瘤负荷的影响。乳癌肝转移模型由高度转移性鼠类乳癌细胞系4T1的半脾植入组成。这些研究模型将临床照护标准建模,其中原发性肿瘤被切除并且死亡通常由转移负荷引起。将BALB/c小鼠用 1.0×10^6 个 (0.1mL) 4T1 (GFP/Luc) 细胞接种至一半脾中,所述脾在肿瘤接种之前已经结扎并且分成两半。在接种之后10分钟切除接受细胞的半脾以减少原发性肿瘤生长。在这一系列实验中,由于细胞快速迁移至肝,常常在接种之后5分钟内 (15),因此处理在接种当天开始。我们研究了乳癌肝转移模型的四个处理组:未处理的 (PBS)、pGFP LCP与抗CD8 (10 μ g, 0.5mg/kg pDNA和400 μ g, 20mg/kg抗Lyt2.2)、p陷阱LCP与抗CD8 (10 μ g, 0.5mg/kg pDNA和400 μ g, 20mg/kg抗Lyt2.2) 以及p陷阱LCP与同种型IgG (10 μ g, 0.5mg/kg pDNA和400 μ g, 20mg/kg同种型IgG)。从第0天开始并且第6天结束,每隔一天经由尾静脉注射静脉内施用PBS、pGFP LCP或p陷阱LCP。抗Lyt2.2或同种型IgG对照的施用涉及第0天和第2天的两次腹膜内注射。通过生物发光成像监测肿瘤进展(图8A)。当应用以下条件之一时,对小鼠施以无痛致死术:在一周内大于10%的急剧重量增加或损失,或明显的窘迫征象,诸如脱水、不活动或呼吸短促/呼吸微弱。在接种之后10天对来自每个组的三只小鼠施以无痛致死术,收集其器官并且在PBS中冲洗,并且通过流式细胞术分析来分析肝的肿瘤负荷(图8B)。不接受p陷阱LCP处理的小鼠在接种之后的第一周内肝中发展成大的转移性肿瘤病灶(图8A和8B)。相比之下,用p陷阱LCP处理的小鼠显示肝转移负荷的降低和肝转移形成的发生率的减少,以及中位存活期对比所有其它处理组的近乎2倍增加(14天对比25天)(图8C)。

[0313] 实施例10

[0314] 由p陷阱LCP、陷阱蛋白以及CXCR4拮抗剂减少肝转移的建立

[0315] 我们在免疫缺陷性无胸腺小鼠中使用使用人类结肠直肠癌细胞系 (HT-29) 比较了不同治疗模态[抗CXCL12陷阱蛋白、CXCR4小分子拮抗剂 (AMD3100) 以及p陷阱LCP]减少肝转移的建立的功效。根据与上述相同的半脾植入程序使用具有CXCR4的高表达的结肠直肠癌细胞系HT-29建立人类结肠直肠癌肝转移模型(图11)。在这一系列实验中,由于细胞在接种之后5分钟内快速迁移至肝 (15),因此处理再次在接种当天开始。对于结肠直肠癌肝转移模型所研究的五个处理组是未处理的 (PBS)、pGFP LCP (10 μ g, 0.5mg/kg pDNA)、p陷阱LCP (10 μ g, 0.5mg/kg pDNA)、游离CXCL12陷阱蛋白 (10 μ g, 0.5mg/kg蛋白质) 以及AMD3100 (100 μ g, 5.0mg/kg)。第0天起始并且第16天终止,每隔一天通过尾静脉注射静脉内施用处理(图9A)。第36天对小鼠施以无痛致死术,收集其肝并且在PBS中冲洗,并且从肝切除肿瘤结节并称重(图9B)。不接受p陷阱LCP或AMD3100处理的小鼠在肝中发展成众多转移性肿瘤病灶(图9B)。

相比之下,用p陷阱LCP或AMD3100处理的小鼠在处理期间与所有其它处理组相比显示肝转移负荷的降低和肝转移形成的发生率的减少。

[0316] 实施例11

[0317] p陷阱LCP对肝、肾以及血液功能的影响(毒性分析)

[0318] p陷阱LCP的施用(10 μ g隔日一次 $\times$ 3)在最后静脉内尾静脉注射之后24小时分析任何器官的三色组织学切片中显示ALT、AST、肌酐或BUN水平无显著变化以及无毒性征象(图10A和10B)。血液/免疫细胞水平的进一步分析显示与未处理的小鼠相比无变化征象(图10A)。毒理学分析也在组织学三色器官切片中得到确认,其中所有处理显示正常的组织/细胞形态(图10B)。

[0319] 实施例12

[0320] 组合疗法

[0321] 材料和方法

[0322] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇-2000)]铵盐(DSPE-PEG)购自NOF(Ebisu Shibuya-ku,Tokyo)。二油酰磷脂酸(DOPA)和1,2-二油酰-3-三甲铵-丙烷氯化物盐(DOTAP)购自Avanti Polar Lipids(Alabaster,AL,USA)。胆固醇和鱼精蛋白购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)。如果未特定提及,那么所有其它化学品购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)。

[0323] CXCL12陷阱基因构建: CXCL12结合VH和VL域的编码序列用于陷阱基因的组装。CXCL12陷阱的最终序列分别编码信号传导肽、VH域、柔性连接子、VL域、E标签以及His(6 $\times$)标签。使完整cDNA克隆至pCDNA3.1中介于NheI与XhoI位点之间并且通过DNA测序确认准确性。

[0324] PDL1陷阱基因构建: 小鼠或人类PD-1的胞外域和小鼠或人类CMP1的三聚域的编码序列用于PD-L1陷阱基因的组装。PD-L1陷阱的最终序列分别编码信号传导肽、PD-1的PD-L1结合域、柔性连接子、三聚域、E标签以及His(6 $\times$)标签。使完整cDNA克隆至pCDNA3.1中介于NheI与XhoI位点之间并且通过DNA测序确认准确性。

[0325] 细胞系: 来源于KPC胰腺导管腺癌小鼠模型(LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre,在C57Bl/6背景上)的原发性肿瘤细胞系KPC98027由Serguei Kozlov博士(国家癌症研究所(National Cancer Institute),先进临床前研究中心(Center for Advanced Preclinical Research))提供并且在达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium):补充有10%胎牛血清(FBS)(Gibco)和1%青霉素/链霉素的营养混合物F-12(DMEM/F12)中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下在潮湿气氛中培养。进行细胞系的慢病毒转染,其中用携带mCherry红色荧光蛋白(RFP)、萤火虫荧光素酶(Luc)以及嘌呤霉素抗性的载体稳定转染KPC98027细胞。在嘌呤霉素存在下选择稳定转染的KPC98027细胞(KPC98027RFP/Luc)。

[0326] 小鼠中的原位同种异体移植KPC模型: 收集亚汇合KPC98027(有或没有RFP/Luc)细胞并且在即将植入之前在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤。通过将1 $\times$ 10⁶个细胞原位注射至胰腺的尾部来建立原位同种异体移植KPC模型。简单地说,通过腹膜内注射氯胺酮/甲苯噻嗪(ketamine/xylazine)溶液麻醉八周龄的C57Bl/6小鼠并且置于仰卧位。制造中线切口以使脾和胰腺外置。使用胰岛素计量注射器,将40 μ L中的1 $\times$ 10⁶个细胞注射至胰腺的尾部。并且,用6-0聚乙醇酸缝合线闭合腹壁和皮肤。用组织粘合剂(3M,St.Paul,MN)密封注射部位

并且用70%酒精灭菌以杀死可能已经漏出的癌细胞。

[0327] 抗体：用于免疫染色 (IF) 和流式细胞术 (flow cyt) 的一级抗体、荧光偶联的一级和二级抗体列于下表3中。

[0328] 表3. 用于研究中的抗体

[0329]

抗体	公司	目录	应用
抗 α SMA	Abcam	Ab5694	IF
抗 CD31	Abcam	Ab28364	IF
抗 SDF1 (CXCL12)	Abcam	Ab9797	IF
抗 PDL1	Abcam	Ab80276	IF
抗 CD8 α (FITC 偶联)	BD	553031	flow cyt
抗 CD4 (FITC 偶联)	BD	561828	flow cyt
抗 FOXP3 (PE 偶联)	BD	560408	flow cyt
抗 CD11b (FITC 偶联)	BD	553310	flow cyt
抗 Gr1 (Ly-6G 和 Ly-6C) (PE 偶联)	BD Pharmingen™	553128	flow cyt
抗 CD206 (PE 偶联)	BD		flow cyt
抗 CCR7	BD		flow cyt

[0330]

(APC 偶联)			
APC 大鼠 IgG2b, κ 同种型对照	BD Pharmingen™	553991	flow cyt
抗兔 IgG (Alex Fluor® 647 偶联物)	Cell Signaling	4414	IF、flow cyt
山羊抗兔 IgG-HRP	Santa Cruz	Sc-2030	WB
抗 RFP	Invitrogen	R10367	WB

[0331] LPD的制备和表征：经由逐步自组装工艺基于本领域中完善建立的方案制备LPD。简单地说，将DOTAP和胆固醇 (1:1, mol/mol) 溶解于氯仿中，并且去除溶剂。然后使脂质薄膜与蒸馏水水合以获得10mmol/L胆固醇和DOTAP的最终浓度。然后，经由200nm和100nm聚碳酸酯膜 (Millipore, MA) 依序挤压脂质体以形成70-100nm单室脂质体。通过将140 μ L含36 μ g鱼精蛋白的5%葡萄糖与等体积的含50 μ g质粒 (作为对照质粒的pcDNA 3.1, 或编码CXCL12或

PDL1陷阱的质粒)的5%葡萄糖混合来配制LPD多聚复合物(polyplex)核心。在室温下孵育混合物10分钟并且然后添加60 μ l胆固醇/DOTAP脂质体(各10mmol/L)。在60℃下进一步进行15%DSPE-PEG的后插入持续15分钟。由Malvern ZetaSizer Nano系列(Westborough,MA)确定NP的尺寸和表面电荷。获取TEM图像,其中使用JEOL 100CX II TEM(JEOL,Japan)将NP负染色。

[0332] LPD NP的生物分布和细胞分布:将约0.1%的疏水染料DiI合并至DOTAP脂质体中以配制DiI标记的LPD NP。在静脉内注射DiI标记的LPDNP之后24小时,对小鼠施以无痛致死术,收集主要器官和肿瘤。用IVIS[®]动力学光学系统(Perkin Elmer,CA)定量显现主要器官中LPD NP的分布。激发波长设定于520nm,而发射波长设定于560nm。由低温恒温器(H/I Hacker Instruments & Industries,Winnboro,SC)将肝和肿瘤进一步切片以定量组织内LPD NP的分布。进一步比较和定量在组合陷阱LPD NP处理之前或之后肿瘤中NP的累积和分布(n=4)。

[0333] 陷阱蛋白的瞬时、局部和肿瘤内细胞分布:将囊封pCXCL12陷阱DNA、pPD-L1陷阱DNA的LPD NP的配方静脉内注射(50 μ g质粒/小鼠)至带有KPC98027 RFP/Luc同种异体移植物的鼠中(每日注射,总共两次)。pCXCL12陷阱DNA与pPD-L1陷阱DNA在C末端末端都含有His标签,其可以用作陷阱蛋白表达的示踪物。在最后注射之后第1天、第3天、第5天,处死小鼠,收集主要器官和肿瘤并且在RIPA缓冲液中均化。经由二喹啉甲酸蛋白质试验试剂盒(BCA蛋白质试验试剂盒;Pierce,Rockford,IL)确定裂解物中的总蛋白质浓度。使用ELISA(Cell Biolabs,INC.;n=4)定量不同时间点的器官和肿瘤中His标签蛋白的转染和表达效率。将CXCL12陷阱蛋白也直接静脉内注射至小鼠中并且与质粒配对物比较在所监测的时间点的生物分布和累积水平。向带有KPC98027 RFP/Luc的小鼠也给与囊封pGFP DNA的LPD NP的两个剂量的每日注射。在最后注射之后三天,将肿瘤组织冷冻切片并且用成纤维细胞标志 α SMA、白细胞标志CD45以及内皮细胞标志CD31的染色来加工。用RFP预转染肿瘤细胞。使用Nikon光学显微镜(Nikon Corp.,Tokyo)观测肿瘤组织内不同细胞群体中的GFP蛋白质表达。使用Image J从来自每种类型染色的5个代表性图像定量每个细胞群体中的GFP阳性细胞%。此处是计算的实例:

$$[0334] \quad CD45^+ GFP \text{ 细胞} \% = \frac{CD45^+ GFP^+ \text{ 细胞} \%}{GFP^+ \text{ 细胞} \%}$$

[0335] 肿瘤生长抑制、转移抑制和存活分析:

[0336] 如上文所提及建立带有KPC98027 RFP/Luc同种异体移植物的鼠。第13天起始处理。然后将鼠随机分成如下6个组(n=5-7):未处理组(PBS)、对照LPD NP(用pcDNA3.1骨架囊封)、CXCL12陷阱/对照NP、PD-L1陷阱/对照NP、组合陷阱NP以及游离组合陷阱蛋白。每两天进行静脉内注射,总共50 μ g每个质粒/鼠的4个剂量。每五天使用IVIS[®]动力学光学系统(Perkin Elmer,CA)监测肿瘤生长。以强度的辐射率计算肿瘤体积的增大并且用初始肿瘤体积标准化(Vt/V0)。对带有KPC98027 RFP/Luc同种异体移植物的鼠用不同处理(n=7,在每个处理组中)也监测长期存活。监测鼠超过两个月。定量卡普兰-梅尔曲线和中位存活期并且使用Image J计算。对于转移的研究,用PBS(n=5)、CXCL12陷阱NP(n=4)、PD-L1陷阱NP(n=4)以及组合陷阱(n=5)处理带有肿瘤的小鼠。在接种之后一个月,向鼠注射10mg/mL荧光素并且处死。然后提取主要器官和肿瘤并且置于荧光素(5m/mL)的溶液中并

且针对生物发光成像。然后固定主要器官并且用H&E染色来加工以观测每个器官中肿瘤转移的病理学。

[0337] 对于IFN- γ 产生的ELISpot试验:如先前所描述进行带有KPC98027或KPC98027 RFP/Luc同种异体移植物的鼠的脾细胞的再刺激。简单地说,在肿瘤接种之后13天,收集健康小鼠、带有KPC98027和KPC98027RFP/Luc的小鼠的脾并且在无菌条件下分离至单细胞悬浮液中。遵循BD™ELISPOT试验说明书,将细胞以 2×10^5 /孔接种于捕捉抗体包覆的96孔板中。然后将单细胞悬浮液与灭活的KPC98027、KPC98027RFP/Luc细胞裂解物或健康的小鼠脾细胞裂解物一起在37℃下共培养40小时。在适当的时间,由数个洗涤步骤去除细胞。通过检测抗体添加继之以酶偶联物放大来测量INF- γ 的产生。用BD ELISpot底物组使红点信号显色并且手动计算。

[0338] 定量实时PCR (qPCR) 试验:使用RNeasy试剂盒 (Qiagen,Valencia,CA) 从肿瘤组织提取总RNA。使用用于RT-PCR的第一股合成系统 (Invitrogen,Grand Island,NY) 逆转录cDNA。用Taqman通用探针超混合物系统 (Bio-rad,Hercules,CA) 扩增100ng cDNA。用于RT-PCR反应的所有小鼠特异性引物列于表4中 (Life Technologies,Grand Island,NY)。GAPDH用作内源性对照。使用7500实时PCR系统进行反应并且用7500软件分析数据。

[0339] 表4

	引物	Applied Biosystems/Ref
	小鼠 IFN- γ	Mm01178820_m1
	小鼠 IL12 α	Mm00446190_m1
[0340]	小鼠 TNF- α	Mm00443260_g1
	小鼠 IL4	Mm00441242_m1
	小鼠 IL10	Mm00441242_m1
	小鼠 GAPDH	Mm99999915_g1

[0341] 流式细胞术试验:通过流式细胞术分析肿瘤浸润免疫淋巴细胞。简单地说,收集组织并且在37℃下用胶原蛋白酶A和DNA酶消化40-50分钟。在红血细胞裂解之后,用1mL PBS使细胞分散。对于细胞内细胞因子染色,遵循制造商的说明书用穿透缓冲液 (BD) 穿透来自组织的细胞。用先前章节中提及的荧光素偶联的抗体将不同免疫淋巴细胞 (5×10^6 /mL) 染色。

[0342] 免疫荧光染色:在脱石蜡步骤、抗原修复以及渗透之后,将组织切片在室温下在1%牛血清白蛋白 (BSA) 中阻断1小时。将与荧光团偶联的一级抗体 (BD,Franklin Lakes,NJ) 在4℃下孵育过夜并且用含有DAPI的封闭介质 (Vector Laboratories Inc.,Burlingame,CA) 将核复染色。根据制造商的手册稀释所有抗体。使用荧光显微术 (Nikon,Tokyo,Japan) 获取图像。使用Image J软件定量分析三个随机选择的显微场。

[0343] TUNEL试验:根据制造商的说明书使用DeadEnd荧光测定TUNEL系统 (Promega,Madison,WI) 进行TUNEL试验。用FITC (绿色) 荧光染色的细胞核定义为TUNEL阳性核。将载玻片用4,6-二脒基-2-苯基-吡啶 (DAPI) Vectashield (Vector laboratories,Burlingame,CA) 加盖玻片。使用荧光显微术 (Nikon,Tokyo,Japan) 监测TUNEL阳性核。使用Image J定量分析三个随机选择的显微场。

[0344] H&E形态评估和血液化学分析:在肿瘤抑制研究的最后处理之后四天,使用不同处理的小鼠全部经受毒性试验。收集全血与血清。将全血细胞组分计数并且比较。化验血清中的肌酐、血尿素氮(BUN)、血清天冬氨酸转氨酶(AST)以及丙氨酸转氨酶(ALT)作为肾和肝功能的指示物。收集包括心、肝、脾、肺以及肾的器官并且固定用于由UNC组织学设施进行H&E染色以评估器官特异性毒性。

[0345] 统计分析:当比较两个组或大于两个组时分别进行双尾史蒂特氏t检验或单因子变异数分析(ANOVA)。使用Prism 5.0软件进行统计分析。如果P值小于0.05,那么差异被视为统计上显著的。

[0346] pDNA LPD施用后肿瘤微环境内pDNA(陷阱或GFP)的瞬时和局部分布以及表达

[0347] LPD将大分子,包括质粒DNA、siRNA、mRNA优先递送至肿瘤用于抗癌疗法。为了制备LPD,用阳离子鱼精蛋白使质粒DNA(pDNA)凝聚以形成略带阴离子性的复合物核心。用预配制的阳离子脂质体(DOTAP、胆固醇以及DSPE-PEG)进一步包覆核心。TEM图像确认了LPD的尺寸(约70nm)并且指示其球形形状和均匀分布(图14A)。将约0.1%的DiI合并至LPD的脂质膜中作为体内示踪物用于评估DiI标记的LPD的生物分布。

[0348] 从初级KPC98027细胞至胰腺尾部的原位注射来产生促结缔组织增生性KPC胰腺肿瘤模型。将DiI标记的LPD NP静脉内注射至小鼠中。在注射之后24小时,分析主要器官中的NP累积。与类似尺寸的其它NP一致,肝是吸收LPD NP的主要器官(图14B)。除肝以外,肿瘤是另一个主要的NP累积部位(图14B)。组织冷冻切片数据表明DiI标记的NP遍及所有肝组织的零散分布,其中多于40%的肝细胞被标记(图14C)。相比之下,只有少于25%的肿瘤细胞吸收DiI NP,并且肿瘤内NP的分布是异质的和不均匀的,这主要归因于胰腺肿瘤微环境内的高间隙流体压力(IFP)和厚细胞外基质。进一步比较肝和肿瘤中GFP蛋白质的分布作为LPD递送的质粒(pGFP)的转染效率的指示。尽管肝中NP的更高累积,但GFP的表达与肿瘤相比极低(图14C)。这可以归因于位于血管附近的库普弗细胞非特异性地吞噬LPD NP。库普弗细胞中质粒的转染效率是相对低的。因此,我们的结果证明,可以局部递送囊封质粒的LPD并且在KPC胰腺癌内表达。

[0349] 进行免疫荧光染色以确定大块肿瘤质量内各种细胞群体中的LPD累积(图14D)。针对小鼠 α SMA、CD45以及CD31的RFP和荧光团偶联抗体的稳定转基因表达分别界定肿瘤细胞、成纤维细胞、白细胞以及内皮细胞群体。结果显示,肿瘤细胞是吸收NP的主要细胞群体之一;多于60%的肿瘤细胞表达GFP。另外,在静脉内注射LPD pGFP(两个剂量,每日)之后四天多于约30%的成纤维细胞吸收LPD,占总GFP阳性细胞的约30%。相比之下,白细胞和内皮细胞中GFP的表达是可忽略的,确认了成纤维细胞是NP分布和质粒表达的主要间质脱靶位点。归因于成纤维细胞对肿瘤细胞的邻近分布,分泌的陷阱的成纤维细胞表达将有益于其对肿瘤细胞胜过脱靶位点的邻位效应,这减小了接近肿瘤细胞的药物的治疗浓度。

[0350] 随后,通过ELISA经由合并至陷阱C端的可靶向His标签来评价陷阱蛋白(PDL1或CXCL12)的分布和表达(图14E)。还注射纯的陷阱蛋白(CXCL12陷阱)并且比较。在陷阱质粒NP和陷阱蛋白的两个日剂量之后,第2天、第4天、第6天处死小鼠,并且证明在肿瘤(图14E)胜过其它器官中的瞬时质粒转染和表达。相比之下,蛋白陷阱快速地清除,在所监测的时间在所有器官中的浓度显著更低。

[0351] 这些结果证明,LPD载体允许陷阱质粒在肿瘤(特别是成纤维细胞和肿瘤细胞)内

的优先瞬时表达,在任何其它器官中具有最低表达。我们报道了肿瘤表达保持瞬时特性,其中发现表达在陷阱质粒注射后持续至多4天(图14E)。

[0352] 使用囊封pCXCL12陷阱DNA的LPD NP和囊封pPD-L1陷阱DNA的LPD NP的组合疗法改善对KPC同种异体移植物的抗肿瘤反应并且抑制转移

[0353] Feig等的先前研究表明,抑制CXCL12与CXCR4的相互作用揭露抗PD-L1的抗肿瘤活性(Feig等,靶向来自FAP表达癌瘤相关的成纤维细胞的CXCL12与抗PD-L1免疫疗法在胰腺癌中协同作用(Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer),《国家科学院院刊(PNAS)》,2013年12月10日;110(50):20212-7)。归因于由LPD载体递送的质粒的局部和瞬时表达特征,将编码PD-L1陷阱和CXCL12陷阱的质粒独立地囊封至LPD载体中,并且作为组合方案施用以供治疗KPC胰腺癌。将KPC98027RFP/Luc原位接种至胰腺的尾部。LPD NP的给药时程呈现于图15A中。PBS、囊封pcDNA3.1骨架的LPD NP(对照NP)、游离组合陷阱蛋白设定为对照。评价与从肿瘤发射的光子数目相关的肿瘤体积A)并且定量B)。结果证明,CXCL12陷阱NP与PDL1陷阱NP单一疗法在低剂量下都显示最小的抗肿瘤功效(图15D)。在增加剂量的同时单一疗法的抗肿瘤功效稍有增加,但仅部分有效(图15E)。相反,组合陷阱NP组与PBS组相比显著抑制肿瘤生长($P < 0.01$)。组合组的肿瘤重量在低和高剂量下都大幅降低(图15E)。与此同时,游离组合陷阱蛋白仅显示轻微而不显著的抗癌作用,表明使用质粒而非蛋白质的优点(图15A和15B)。此外,在处理最后一天之后的总体存活分析中,中位存活期与其它处理组(对于PBS、对照NP、CXCL12陷阱NP以及PDL1陷阱NP组分别是40.5、49、47、50天;图15C)相比在组合陷阱NP疗法(63.5天)中提高,不仅传达有效力的治疗作用而且传达持久的总体反应。这与Feig等的观测一致,其已经使用CXCR4拮抗剂和抗PD-L1抗体的组合来抑制KPC肿瘤生长(Feig等,靶向来自FAP表达癌瘤相关的成纤维细胞的CXCL12与抗PD-L1免疫疗法在胰腺癌中协同作用(Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer),《国家科学院院刊(PNAS)》,2013年12月10日;110(50):20212-7)。图15中的数据表明,组合的CXCL12陷阱NP与PD-L1陷阱NP在带有促结缔组织增生性KPC肿瘤的小鼠模型中确实展现优越的抗肿瘤功效。

[0354] 此外,在接种KPC同种异体移植物之后一个月监测主要器官中肿瘤的转移。与带有胰腺导管腺癌(PDAC)的患者一致,肝和肺是原位KPC模型的主要转移部位(图16A)。归因于侵入腹膜腔内,在脾和肾中也观测到肿瘤。在对照组的肺、脾以及肝中组织学显示大的转移结节(图16B)。单一疗法可以轻微抑制肿瘤转移,只有组合疗法能够显著抑制或甚至消除转移(图16A和16B)。因此,显而易见的是组合陷阱NP策略能够减少肿瘤转移。

[0355] 增强的T细胞浸润至肿瘤微环境中解释了组合陷阱NP的优越的抗肿瘤作用

[0356] 癌细胞特异性T细胞反应先前在KPC模型中有报道,并且在本文中通过ELISpot试验进一步确认(图17A)。图17A示出了使用来自带有肿瘤的动物的脾细胞的INF- γ ELISpot试验数据。在有或没有转染的RFP/Luc标志的情况下来自KPC细胞的提取物可以刺激脾细胞分泌INF- γ ,但来自正常脾细胞的提取物并不如此。数据指示,KPC肿瘤可以诱导肿瘤特异性T细胞反应。带有肿瘤的小鼠中所见的免疫反应并不是针对荧光素酶或红色荧光标志,而是针对有待鉴别的肿瘤相关抗原。然而,来自PD-L1陷阱NP和CXCL12陷阱NP(单一或组合疗

法)处理的小鼠的脾的IFN- γ 分泌CD8⁺T细胞的任何显著增加的缺乏指示,组合陷阱NP的抗肿瘤作用并不是通过癌症特异性CD8⁺T细胞的增强的全身引发来实现(图17B)。因为ELISpot活性是相对弱的(图17A和17B),所以可以加强癌症特异性细胞毒性T淋巴细胞活性的疫苗将进一步增强陷阱的治疗活性。

[0357] 为了确定免疫治疗作用是否由在癌细胞当中增强的T细胞累积引起,T细胞(CD3⁺) 在胰腺中的分布由免疫荧光显示(图18A)。显示T细胞在PBS对照中主要位于肿瘤与正常胰腺组织之间的边界中。少量的T细胞在肿瘤区中发现,但其位于间质区域中。来自用PD-L1陷阱处理的动物的胰腺显示T细胞有一些穿透至肿瘤区中,但用CXCL12陷阱NP(有或没有PD-L1陷阱NP)处理显示大量的T细胞浸润至肿瘤区中。T细胞在肿瘤区中的定位在图18B中定量。进一步收集肿瘤并且分散成单细胞。用流式细胞术分析CD3⁺CD8⁺细胞(图18C)。结果再次确认了CD8⁺T细胞在组合陷阱NP处理的小鼠的肿瘤中显著增加。因此,我们得出结论,CXCL12而非PD-L1陷阱是增强T细胞浸润的主要因子。此外,通过使用针对CD8的单克隆抗体耗尽CD8⁺T细胞来评估CD8⁺T细胞在组合陷阱NP疗法中的作用(图18D和18E)。显示组合陷阱NP显著减缓肿瘤生长,但当去除CD8T细胞时并不如此。总的来说,增强的T细胞浸润至肿瘤微环境中是促成组合陷阱NP的优越的抗肿瘤作用的一个主要原因。

[0358] 肿瘤微环境中肿瘤浸润免疫细胞和细胞因子水平的变化

[0359] 为了进一步阐明为什么组合陷阱NP策略可以有效地改善肿瘤细胞周围的T细胞浸润和累积,我们然后评估了在不同陷阱NP处理之后肿瘤微环境中有关相异的髓样细胞和细胞因子的变化,这参与到复杂的互动网络中以遮蔽CD8⁺T细胞抗肿瘤活性。

[0360] 因为免疫抑制性子组,诸如调控T细胞(Treg)、骨髓来源的抑制细胞(MDSC)以及肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)是促结缔组织增生性PDAC模型内占主导的髓样浸润物,所以我们通过肿瘤切片的流式细胞术与免疫染色来检查肿瘤微环境内这些免疫抑制性细胞的累积。作为第一个调控子组检查MDSC。如图19A和19B中所示,仅陷阱组(CXCL12陷阱和PDL1陷阱中任一者)和组合组中MDSC的百分比相比对照组低得多。因为MDSC通过诱导Treg发育可以建立免疫耐受性,所以MDSC的阻断可以引起Treg的抑制。我们因此检测肿瘤组织中Treg的百分比,如图19A和19B中所示。与MDSC的趋势一致,CXCL12陷阱NP处理的组和组合组展现比对照组更少的Treg细胞。然而,PD-L1陷阱NP轻微增加T细胞浸润,这也由Feig等使用PD-L1检查点抑制剂观测到(Feig等,靶向来自FAP表达癌瘤相关的成纤维细胞的CXCL12与抗PD-L1免疫疗法在胰腺癌中协同作用(Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer),《国家科学院院刊(PNAS)》,2013年12月10日;110(50):20212-7)。这最有可能归因于以下实情:PD-L1/PD1相互作用通过控制STAT-5磷酸化来负向调控Treg增殖和活化。巨噬细胞是抑制性肿瘤免疫微环境的另一个重要的组分。如图19A中所示,PD-L1单一疗法与组合疗法都可以显著减少累积的巨噬细胞,并且有效地将巨噬细胞转变成有利于M1状态(图19B)。因此,存在由支持疗法的陷阱对抑制性TME的显著重塑。

[0361] 为了使免疫抑制性子组的观测与CXCL12和PD-L1的水平相关联,我们接下来测试了静脉内递送的陷阱NP的中和效率(图20A和20B)。显示CXCL12陷阱NP而非PD-L1陷阱NP可以有效地中和肿瘤内分泌的CXCL12,引起由抗CXCL12一级抗体检测的蛋白质的实质性减少,并且随后经由CXCL12/CXCR4介导的相互作用抑制MDSC和Treg浸润。然而,总体PD-L1水

平不仅通过应用PD-L1陷阱NP而减少,而且受CXCL12陷阱处理部分地影响。这可能归因于以下实情:髓样细胞以表皮生长因子受体(EGFR)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)依赖性方式可以诱导肿瘤细胞中PD-L1的表达。因此,CXCL12对髓样细胞减少的募集降低PD-L1的水平。MDSC和Treg细胞的有效耗尽随后有助于肿瘤微环境内效应T细胞的浸润,这解释了优越的抗肿瘤功效。

[0362] 我们然后监测局部肿瘤组织中的细胞因子水平以观察组合组是否可以逆转如由细胞因子水平显示的抑制性微环境(图21)。IL-4和IL-10被称为Th-2细胞因子,其对于免疫抑制是关键以促进癌症转移。与此同时,IFN- γ 、IL-12 α 以及TNF- α (视为Th-1细胞因子)是由细胞毒性T细胞分泌的细胞因子,其有助于T细胞杀死并且对抗肿瘤进展。在CXCL12陷阱NP单一疗法组中,尽管IL-12 α 和IFN- γ 增加并且IL-4实质上减少,但IL-10仍然增加,这表明轻微抑制性微环境。类似地,在PD-L1陷阱NP组中,尽管总体Th1细胞因子的水平增加,但抑制性细胞因子始终保持很高。然而,在组合组中,IL-4与IL-10都显著减少。与此同时,IL-12 α 、TNF- α 以及IFN- γ 大幅增加,这指示M2至M1表型转换成免疫刺激性微环境。这将因此活化淋巴细胞的募集以充当清除剂,有助于肿瘤抗原呈递并且引起强化的细胞毒性T细胞介导的肿瘤特异性杀死。

[0363] 肿瘤血管和肿瘤相关的成纤维细胞的变化

[0364] 肿瘤相关的成纤维细胞(TAF)和血管生成阻止细胞毒性T淋巴细胞浸润至肿瘤组织。通过针对TAF的标志 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA)和血管结构的标志CD31染色来调查陷阱NP对TAF的影响。通过荧光显微术检测密度和平均荧光。随机选择五个显微场用于分析。如图22A中所示,单一与组合组中CD31的密度都低于对照组的密度。组合组特别展示实质性血管正常化(图22B)。在多个组合陷阱处理之后血管显著减压,并且随后增加NP灌注并扩展分布(图23)。正常化的血管是IFP释放的结果,这主要归因于减少的间质和细胞密度。

[0365] 因此,我们接下来评估了成纤维细胞的密度。显示组合陷阱NP组展现 α SMA的最低密度。有趣的是,我们发现仅CXCL12陷阱而非PD-L1陷阱在单一疗法与组合疗法中都引起 α SMA的减少(图22A和22B)。一致地,我们注意到胶原蛋白,由成纤维细胞分泌的主要细胞外基质之一,在CXCL12陷阱NP处理的组与组合陷阱NP中都大幅减少(图24)。因此,我们得出结论,CXCL12陷阱NP不仅通过调节抑制性免疫微环境而且通过耗尽成纤维细胞和胶原蛋白含量来增加T细胞浸润,揭露了PD-L1陷阱的抗肿瘤功效。因为成纤维细胞被视为KPC肿瘤微环境中CXCL12的主要来源,所以CXCR4介导的自分泌环可以解释成纤维细胞的减少和间质的重塑。

[0366] 对于不同处理的毒性评估和血液化学分析

[0367] 毒理病理学评估的结果证明,对于单一疗法和组合陷阱NP在心、肝、脾、肺以及肾中不存在任何明显的形态变化(图25)。然而,在PBS和对照NP组中在小鼠的肝和肾组织中检测到细胞液泡化、脱落的退化细胞以及局灶性坏死,表明严重的肝和肾损伤,这最有可能归因于肿瘤的负荷。一致地,血清生物化学值分析证明,肝(AST和ALT)或肾(肌酐和BUN)毒性由这两个组而不是组合陷阱NP处理的小鼠中的肿瘤进展引起(表6)。另外,全血细胞计数(表5)对于所有组在正常范围内保持恒定,表明在处理之后不发生全身性贫血或发炎。

[0368] 表5. 用不同组处理的小鼠的全细胞计数

[0369]

样品#	WBC	LYMF	GRAN	MONO	HCT	RBC	HGB	PLT
健康	5.8±0.1	3.8±0.6	1.1±0.3	0.8±0.3	46.2±3.1	9.8±1.0	14.9±1.3	1036.0±92.7
PBS	5.5±0.7	3.7±0.4	1.3±0.2	0.6±0.1	42.7±0.8	9.5±0.2	14.0±0.4	1159.5±34.7

[0370]

蛋白陷阱	6.3±0.2	4.0±0.6	1.6±0.4	0.7±0.1	46.8±0.3	10.2±0.1	14.9±0.3	1220.5±46.7
组合陷阱NP	5.8±1.2	3.1±0.7	2.1±0.3	0.6±0.2	41.7±0.7	9.2±0.2	13.6±0.3	1182.3±25.8
对照NP	5.8±1.2	1.4±0.2	1.8±0.9	0.6±0.3	38.1±1.9	8.6±0.3	12.5±0.6	951.0±13.1

[0371] *粗体的数字指示值超过正常范围

[0372] 表6. 血清生物化学值分析

[0373]

样品#	BUN mg/dL	肌酐 mg/dL	AST U/L	ALT U/L
健康	22.0±2.5	0.2±0.0	186.7±30.2	24.7±10.6
PBS	24.0±4.8	0.4±0.1	360.0±58.8	68.0±3.6
蛋白陷阱	33.0±2.5	0.2±0.0	134.0±8.2	21.0±8.9
组合陷阱NP	26.0±2.5	0.2±0.0	173.3±23.1	28.0±8.6
对照NP	30.0±0.2	0.4±0.0	406.0±124.1	74.0±4.8

[0374] *粗体的数字指示值超过正常范围

[0375] 本说明书中提及的所有公布和专利申请指示本发明所属领域的技术人员的技能水平。所有公布和专利申请以引用的方式并入本文中，程度如同每个个别的公布或专利申请特定并个别地指示以引用的方式并入一样。

[0376] 尽管前述发明已经出于理解清楚的目的经由说明和实施例相当详细地描述，但将显而易见的是，可以在所附权利要求书的范围内实施某些变化和修改。

序列表

<110> The University of North Carolina at Chapel Hill
Huang, Leaf
Goodwin, Tyler
Liu, Rihe
Miao, Lei

<120> 用于减少转移的方法和组合物

<130> 035052/482902

<150> PCT/US2016/051966

<151> 2016-09-15

<150> 62/232,169

<151> 2015-09-24

<160> 66

<170> PatentIn 版本 3.5

[0001]

<210> 1
<211> 175
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CXCL12-陷阱-hSDA-1

<400> 1

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Lys
35 40 45

Val Ser Ala Lys Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Arg Arg Arg Arg Thr Ala Asn Phe Arg Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro
145 150 155 160

[0002]

Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His His
165 170 175

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-1 的 VH 域

<400> 2

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Lys Val Ser Ala Lys
20 25 30

```

Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35                40                45

Ser Ser Ile Asn Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                55                60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                70                75                80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95

Ala Gly Arg Arg Arg Arg Thr Ala Asn Phe Arg Tyr Trp Gly Gln Gly
    100                105                110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115

```

[0003]

```

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CXCL12-陷阱-hSDA-1 的 CDR-H1

<400> 3

```

```

Gly Val Lys Val Ser Ala Lys Asn Met Ala
1                5                10

```

```

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CXCL12-陷阱-hSDA-1 的 CDR-H2

<400> 4

```

Ser Ile Asn Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-1 的 CDR-H3

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Thr Ala Asn Phe Arg Tyr
1 5 10

[0004]

<210> 6

<211> 176

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-2

<400> 6

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys
35 40 45

Ile Asn Asn Lys Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Gln Lys Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Ala Arg Thr Ala Asp Lys Leu Gly
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr
145 150 155 160

[0005]

Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His His
165 170 175

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-2 的 VH 域

<400> 7

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Asn Asn Lys
20 25 30

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Gln Lys Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Ala Arg Thr Ala Asp Lys Leu Gly Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0006]

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-2 的 CDR1-H1

<400> 8

Gly Phe Lys Ile Asn Asn Lys Val Met Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-2 的 CDR1-H2

<400> 9

Thr Ile Gln Lys Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-2 的 CDR3-H3

<400> 10

Glu Ser Ala Arg Thr Ala Asp Lys Leu Gly Tyr
1 5 10

[0007]

<210> 11

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-3

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Ser
35 40 45

Phe Thr Thr Lys Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50

55

60

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Lys Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Leu Thr Gln Arg His Gly His Ala Lys Leu
115 120 125

Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140

[0008] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
145 150 155 160

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His
165 170 175

His

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-3 的 VH 域

<400> 12

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Ser Phe Thr Thr Lys
20 25 30

Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Lys Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Leu Thr Gln Arg His Gly His Ala Lys Leu Lys Tyr Trp Gly
100 105 110

[0009]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-3 的 CDR-H1

<400> 13

Gly Asp Ser Phe Thr Thr Lys Asn Met Ala
1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-3 的 CDR-H2

<400> 14

Ala Ile Ser Lys Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-hSDA-3 的 CDR-H3

[0010]

<400> 15

Leu Thr Gln Arg His Gly His Ala Lys Leu Lys Tyr
1 5 10

<210> 16

<211> 288

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4

<400> 16

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Thr Val Tyr Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Gly Ala Leu Trp Gly Ser Gly Gly Thr Glu Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Asn Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Leu Phe Asp
115 120 125

[0011]

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
165 170 175

Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Tyr Ser Leu Ser Trp Tyr Gln
180 185 190

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Val Lys
195 200 205

Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
210 215 220

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr
260 265 270

Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His His
275 280 285

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 VH 域

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Val Tyr
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ala Leu Trp Gly Ser Gly Gly Thr Glu Tyr Asn Ser Asn Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gln Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 VL 域

<400> 18

[0013] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Tyr Ser
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Val Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 CDR-H1

<400> 19

Gly Phe Ser Leu Thr Val Tyr Ser Val His

1 5 10

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0014] <223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 CDR-H2

<400> 20

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

1 5 10 15

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 CDR-H3

<400> 21

Asp Gln Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 CDR-L1

<400> 22

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Tyr Ser Leu Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 CDR-L2

<400> 23

Asn Ala Val Lys Leu Glu Ser

[0015] 1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12-陷阱-VH/VL-4 的 CDR-L3

<400> 24

Lys Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 25

<211> 690

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-L1 陷阱

<400> 25	
atgaaatggg tcacettiat cagcctgctg ttccgttca gcagcgcta cagcgatcc	60
ggtcgccta ccttagtcc ggcactgctg gtgtttaccg aaggtgataa tgcaaccttt	120
acatgcagct ttagcaatac cagcgaaagc ttgtttctga attggtatcg tatgagcccc	180
agcaatcaga ccgataaact ggcagcatit ccggaagatc gtagccagcc tggtcaggat	240
agccgttttc gtgttaccca gctgccgaat ggtcgtgatt ttcatatgag cgttggtcgt	300
gcacgtctga atgatagcgg cacciatctg tgtggtgcaa ttagcctggc accgaaagca	360
cagattaaag aaagccctgcg tgcagaacig cgtgtgaccg aacgtctgc agaagcccc	420
caaccgcac cgaaccgca gccgaaccg gaaccggaac cgaaccgca aggcggtct	480
gaggaagacc cctgtgccig tgagtcata ctgaaatttg aggccaaggt ggagggctc	540
ctgcaggccc tgaccaggaa gctggaagct gtgagcgggc ggctggctgt cctggagaac	600
agaalcatcg cggccgctgg cgcctcig cttatccig atccccigga acctagagcc	660
[0016] ggcagccacc accaccatca ccactgatga	690

<210> 26

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-L1 陷阱

<400> 26

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gly Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val
 20 25 30

Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser
 35 40 45

Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr
50 55 60

Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp
65 70 75 80

Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met
85 90 95

Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly
100 105 110

Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala
115 120 125

Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Pro Gln Pro Gln Pro
130 135 140

[0017]

Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu Pro Gln Pro Gln Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Leu Lys Phe Glu Ala Lys
165 170 175

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
180 185 190

Gly Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Ile Ala Ala Ala Gly Ala
195 200 205

Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His
210 215 220

His His His His

225

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn
1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
35 40 45

[0018]

Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val
50 55 60

Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala
85 90 95

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
100 105 110

Glu Arg Arg Ala Glu
115

<210> 28

<211> 130

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80

[0019] Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu
 130

<210> 29

<211> 143

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln
50 55 60

Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg
65 70 75 80

Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

[0020]

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln
130 135 140

<210> 30

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 30

Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn
1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu
20 25 30

Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala
35 40 45

Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile
50 55 60

Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr
65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His
85 90 95

Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr
100 105 110

Glu Arg Ile Leu Glu
115

[0021]

<210> 31

<211> 147

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 31

Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr
1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu Asn Trp Asn
35 40 45

Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn
50 55 60

Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His Pro Lys Ala
100 105 110

Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile
115 120 125

Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly
130 135 140

Arg Phe Gln
145

[0022]

<210> 32
<211> 143
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 32

Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala
1 5 10 15

Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu
20 25 30

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln
50 55 60

Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His
65 70 75 80

Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu
100 105 110

Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser
115 120 125

Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln
130 135 140

<210> 33

<211> 117

[0023] <212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 33

Pro Leu Thr Phe Ser Pro Thr Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn
1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Leu
20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala
35 40 45

Phe Cys Asn Gly Tyr Ser Gln Pro Val Arg Asp Ala Arg Phe Gln Ile
50 55 60

Val Gln Leu Pro Asn Gly His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Ala
65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Pro
85 90 95

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr
100 105 110

Glu Arg Ile Leu Glu
115

<210> 34

<211> 143

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 34

Leu Glu Val Leu Asn Lys Pro Trp Arg Pro Leu Thr Phe Ser Pro Thr
1 5 10 15

[0024]

Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Leu Asn Trp Tyr Arg Leu Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn Gly Tyr Ser Gln
50 55 60

Pro Val Arg Asp Ala Arg Phe Gln Ile Val Gln Leu Pro Asn Gly His
65 70 75 80

Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Pro Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Pro
115 120 125

Thr Arg Tyr Pro Arg Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly Gln Phe Gln
130 135 140

<210> 35

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

[0025]

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg
210 215 220

[0026]

<210> 36
<211> 200
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

[0027]

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro
195 200

<210> 37

<211> 219

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 37

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

[0028]

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro

	195	200	205
	Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg		
	210	215	
<210>	38		
<211>	200		
<212>	PRT		
<213>	小家鼠		
<400>	38		
	Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu		
	20 25 30		
[0029]	Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser		
	35 40 45		
	Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly		
	50 55 60		
	Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln		
	65 70 75 80		
	Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
	85 90 95		
	Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu		
	100 105 110		
	Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly		
	115 120 125		
	Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		

130

135

140

Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
165 170 175

Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser
180 185 190

Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg
195 200

<210> 39

<211> 219

<212> PRT

<213> 褐家鼠

[0030]

<400> 39

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Gln Lys Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Lys Glu Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Glu Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Ser Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Phe Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Val
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys

85

90

95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Met Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Met Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Ser Leu Ser Gly Glu Thr
145 150 155 160

Thr Val Thr Thr Ser Gln Thr Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

[0031] Val Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe His Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Val His Ser Gly Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Val Pro Arg Leu Pro His Asn Arg
210 215

<210> 40

<211> 200

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 40

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Phe Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu

20	25	30
Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser		
35	40	45
Ser Gln Ser Gln Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Leu Leu Pro Leu Gly		
50	55	60
Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln		
65	70	75 80
Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
85	90	95
Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Val Arg Ile Asp Thr Gly Ile Leu		
100	105	110
[0032]		
Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Ile Cys Gln Ala Arg Gly		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		
130	135	140
Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val		
145	150	155 160
Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Asn Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp		
165	170	175
Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser		
180	185	190
Trp Met Glu Pro Lys Val Pro Arg		
195	200	

<210> 41
<211> 43
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val Lys Phe Gln Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
35 40

<210> 42
<211> 43
<212> PRT
<213> 智人

[0033]

<400> 42

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val Thr Phe Gln Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
35 40

<210> 43
<211> 43
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val Lys Phe Gln Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Ser Pro Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
35 40

<210> 44
<211> 46
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Leu Arg Ser Pro Cys Glu Cys Glu Ser Leu Val Glu Phe Gln Gly Arg
1 5 10 15

Thr Leu Gly Ala Leu Glu Ser Leu Thr Leu Asn Leu Ala Gln Leu Thr
20 25 30

[0034]

Ala Arg Leu Glu Asp Leu Glu Asn Gln Leu Ala Asn Gln Lys
35 40 45

<210> 45
<211> 44
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

His Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Met Phe Gln Asn Leu Ala
1 5 10 15

Asn Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met Thr Gln
20 25 30

Arg Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg
35 40

<210> 46
<211> 45
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Thr Glu Asp Ala Cys Gly Cys Glu Ala Thr Leu Ala Phe Gln Asp Lys
1 5 10 15

Val Ser Ser Tyr Leu Gln Arg Leu Asn Thr Lys Leu Asp Asp Ile Leu
20 25 30

Glu Lys Leu Lys Ile Asn Glu Tyr Gly Gln Ile His Arg
35 40 45

<210> 47
<211> 43
<212> PRT
<213> 小家鼠

[0035]

<400> 47

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Leu Lys Phe Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Gly Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Ile
35 40

<210> 48
<211> 46
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 48

Leu Arg Ser Pro Cys Glu Cys Glu Ser Leu Val Glu Phe Gln Gly Arg

1	5	10	15
Thr Leu Gly Ala Leu Glu Ser Leu Thr Gln Asn Leu Ala Arg Leu Thr			
20	25	30	

Glu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Asn Gln Leu Ala Ser Arg Lys
35
40
45

<210> 49
<211> 45
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 49

Thr Gln Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Gln Phe Gln Asn Leu
1
5
10
15

[0036]

Ala Asn Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met Thr
20
25
30

Gln Arg Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg
35
40
45

<210> 50
<211> 43
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 50

Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Leu Phe Gln Asn Val Ala Asn
1
5
10
15

Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met Thr Gln Arg
20
25
30

Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Lys Tyr Arg
35
40

<210> 51

<211> 44

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 51

Glu Asp Ala Cys Gly Cys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Gln Glu Lys Val

1 5 10 15

Ser Ser His Leu Gln Lys Leu Asn Thr Lys Leu Asp Asn Ile Leu Lys

20 25 30

Lys Leu Lys Val Thr Glu Tyr Gly Gln Val His Arg

35 40

<210> 52

<211> 43

<212> PRT

[0037]

<213> 白犀牛

<400> 52

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Lys Phe Gln Ala Lys

1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser

20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Val

35 40

<210> 53

<211> 43

<212> PRT

<213> 伽利尔小鼯形鼠

<400> 53

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Arg Phe Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Val
35 40

<210> 54

<211> 43

<212> PRT

<213> 美洲野牛

<400> 54

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Lys Phe Gln Thr Lys
1 5 10 15

[0038] Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Val
35 40

<210> 55

<211> 43

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 55

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Arg Phe Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Asp Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Val Ile

35

40

<210> 56

<211> 46

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 56

Glu Thr Gln Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Gln Phe Gln Asn

1 5 10 15

Leu Ala Asn Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met

20 25 30

Thr Gln Arg Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg

35 40 45

[0039]

<210> 57

<211> 26

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 57

Glu Asp Ala Cys Ser Cys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Gln Glu Lys Val

1 5 10 15

Ser Ser His Leu Gln Lys Leu Asn Thr Thr

20 25

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接子序列

<220>

<221> 重复
<222> (1)..(11)
<223> 连接子序列可以重复 n 次, 其中 n=1-20

<400> 58

Gly Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys
1 5 10

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 连接子序列

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(5)
<223> 连接子序列可以重复 n 次, 其中 n=1-20

[0040]

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
1 5 10 15

<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 61

Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro
1 5 10 15

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> 单峰驼

<400> 62

Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu
1 5 10 15

<210> 63

<211> 1543

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CXCL12 陷阱

[0041]

<400> 63

```

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggcca ttagttcata      60
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggeccgcct ggctgaccgc      120
ccaacgaccc ccgccattg acgtaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag      180
ggactttcca ttgaagtcga tgggtggact attiacggta aactgccac tiggcagtac      240
atcaagtgtg tcatatgcca agtaagcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc      300
ccggcatta tgcccagtae atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg      360
tattagtcac cgtattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat      420
agcggtttga ctacgggga ttccaagtc tccacccat tgacgtcaat gggagtttgt      480
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc      540
aaatgggcgg taggcgtgta cggtagggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta      600
gagaaccacg tgcttactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcaatatagg gagacccaag      660

```

	ctggctagcc accatgaaat gggtcacott tatcagcctg ctgttcctgt tcagcagcgc	720
	ctacagcggg tccgaggtgc agctgggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcgg	780
	ctctctgaga ctgtcttctg cegccagcgg cttcagcctg accgtgtact ctgtgcactg	840
	ggtagcgcag gccccaggca aaggacigga atgggiggga gccctgtggg gccttgccgg	900
	aaccgagtac aacagcaacc tgaagtcctg gttcaccatc agccgggaca ccagcaagaa	960
	caccgtgtac ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actattgcgc	1020
	cagagatcag ggcttgaact accgcagcct gttcgactat tggggccagg gcacactcgt	1080
	gaccgtgtct agcggaggcg gaggaagtgg cggaggggga tctggcggcg gaggcagcga	1140
	tattcagatg acccagtcct ccagcagcct gagcgccctt gtgggcgaca gactgacat	1200
	cacctgtcgg gccagcgaga gcacagcta cagcctgtcc tggatcagc agaagcccgg	1260
	caaggccccc aagctgtctg tctacaacgc cgtgaagctg gaaagcggcg tgcccagcag	1320
	attttccggc agcggctctg gcaccgactt caccctgacc atcagctccc tgcagcccca	1380
[0042]	ggacttcgcc acctactact geaagcagta ctggaacacc ccttcacct tcggacaggg	1440
	caccaagggt gaaatcaaga gageggccgc tggegccect gtgccttate ctgatccctt	1500
	ggaacctaga ggcggcagcc accaccacca tcaccactga tga	1543

<210> 64

<211> 89

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys

35

40

45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 65

<211> 93

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

[0043]

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
85 90

<210> 66

<211> 18818

<212> DNA

<213> 智人

<400> 66

ctttcaggct tctgggacag atcctaggte cagctgccca cctgatittg tggcaaaaga 60

aaaaagaaga agaagaagcg agaggcgatg gcgtttgcit tggccagatt taagggaag 120

cgaggctgcg cgggctccc gcagggtcgg atctccgagc tccagggcgc cctccaccc 180

gggtgtagat tccccgcga ccccttcgcc ctcccggtt tcatcagctg cgcaggaatg 240

gagctgccca gagctctggg agcggggagg gaggcgcgc caccagaggg cgcgggagcc 300

ccagcgcgc ggccggcgag cggccaggct ccccgccca gccacgaaa ggccgggga 360

cgcccgacgg ctgccttctt cactggacct cactgccttc agttctitaa gagcagggcc 420

aagtcagtgg ggttcccgcg tccaagccca gtgccaggg tgggtgggtg ggtgggtggg 480

tgggtggatg gatggatgga tggatggatg gagtgcgcgc ccacagccat ctaacggcca 540

[0044]

aagtgtttt gaaaaaaaaa tgcacagaag acacctactc ccaccagcgg agttccggag 600

ccctcgcgc cctctgttga ccgtccgcgc ctaatgcgc cgcgcgcgc ccactccccg 660

acggccagga ctccccaggg acagggacgt gtccccaggg caggccccctg gatggacgcg 720

gcgactgacc ccacttcgct ggacgctgtg ctgggaagga cacagagagg tggctggggc 780

agcctgcggt cacaagcga ggcacaaagg ggcgtctctc tcaccccccac gcctcctggg 840

tgccgacctg caccctccct tgcacacgg actggggcca tctgggatgt ctcgggggta 900

tcgggagggc taagcacgcg cgagggacgg ctccgtggga agagtittct ggaccagaa 960

ggcagacgcc agtagtacig tcttaggagt cggaggtcgg ggtgggggag ttctcagctc 1020

tttgggtcgc acggagcttt tcttgggtaa ggcagtaagt acttaggttt aaaggactta 1080

cttacagcta ccatitatig agtaetgtct gcttgcaga cagatgcag agaatttcgc 1140

ggcgtggggc ggtctcatt gaatctccc tccactccg cggggtgggc ctgtgattag 1200

ctcatttcac cattgagagg tcggaagtae aaaggctaca ttgcctttta ctgagagccg 1260

[0045]

ccggcgccctt ctgctttgtt tgtacaggcg aggaanctga ggctcggctg gtggcgccgt 1320
 gggcttgagg tccgagccac gctgactgca aagacgggtc tcattcccgc agatcgagct 1380
 ctgccggcgg ctgcgcgcga agccgggcag gtggcgagct tgagccccc cgcacagaaa 1440
 gcaggacccc ctgggtgccc ttgggcgcgc accgccagca ggcctccgc ccgggactaa 1500
 cttgtttgct tticattggt tctattcag ttccgccat cgaaggccc cgtccgcag 1560
 ctttccagc gcgcccact ttacgcctaa ggtcctcagt ctctccagt ggccctgtc 1620
 acagggacaa taaggcgccc tccagcggc gtcgctcagg ctgcggacct cactgcagac 1680
 cgggccagcg gtgcggggcc cagcggagcc tgagaaggtc aaaggccgga gcgcactgcg 1740
 cctcgggagc acagaggag cgaggaggg gcgaaggga taggtgggg gtgcccgga 1800
 gggagtcgag cgtcagagac ccggccacg gccagcctc ggctccggc ccgccctca 1860
 ccgcgcgcc cgcgccccc cgcctggctc tccctctaa agcgcgcgc gcgcgcctc 1920
 caccgcgca ctttactct ccgtcagcc cattgccgc tcggcgctcg gccccgacc 1980
 cgcgtcgtc cgcgcgccg ccgcgcgc cgcgcctga acgccaagg cglggctcg 2040
 ctggtctcgt tctgaccgc gctctgcctc agcagcgta agtgcgtcg gcggggagcg 2100
 cctggcgagg cggccctggc gagctctgg gcttcggctc ccgccggcg cagagccgcg 2160
 gctcctctgc ctgcgcgcgc agttlgecc gccgacaca ggggggagg aggcagctc 2220
 cttagctggg cgtctggtg cgggtgcgc tcaaaagcc tacttttgc ccgagggtt 2280
 gtgacctgca gagagcgacc gccgacctc aagctggctg cagagcgagg tcagccggga 2340
 caactgggca ggaacgccc aagagagct tgggactgg caggggaagg cgcgagggtg 2400
 gggagccgcg gacccagac ccctgcctgc ccacctcca ccaactgcct tcccgtcgcg 2460
 ggctcggttt ccacaggcg atgggctcc aggtcctgct gcgcacagt ctggaggtcg 2520
 ggcggtgcat ggagagagc cgtttgcaa agtgcctc atgccgcgc ttgaggtgt 2580
 gaggtccgat gcagccgcgc agctccgct cctgcgaag ccgctctct cccacaccc 2640
 tcgcggggct cttggccagg cgcggcgagg ctgcgcgcg cagctgtcgg gcttgtgcca 2700

	cccgccaggc cgcgcttctg cacagctccg cggtcgcag cgacgggac ctgggcgcgc	2760
	gtccagccgc tgtcttctg tctcttctg ggttcacctg agagaggccc agggaccctc	2820
	cgagctcac acgccccctc ccagctccc caaacacacc tgcagacagg ctcttttgc	2880
	accagctggc caagcgttt gccccagaat gagagctgca gcaaagtca atctccaagg	2940
	ccctgggcca ctgggaaccg tgggtgccc tttcactggg agagggttt tttctttct	3000
	ttcgctgaag agaaactgc tgcgtgtca caggacacc atgcaacca aaataaactg	3060
	ttgcctctga acacacaaaa caaacccctg tggtcagc cgctgagctt ccttggtgt	3120
	gaagtttct gcaaagatt gaaggacact ctgagtgtc ttgcagccc gggctgtgca	3180
	ggcccagcgc gctcgagcc cttggctggg ttggtgcaga cgtggcccgc gcgtcctagc	3240
	tggtctggac tgtgcgtgg tgtgagcagg accagcgcag ctgagtcggg ctggagaagc	3300
	tgggcagcct ggggtctgg cggactgcct aagtgttaag gacacagact gaaggcaatt	3360
[0046]	gggaatgtt gtcgtgatg aaaagtcct gagcgtgtgt ctgcacactg acccccccc	3420
	cccccgcaa gtcattgggc atgtttctag tttttatgc tggatattct tctgttctg	3480
	taaggtctct ggtttgggca gttattgact gattggtgg atgagcggg aggtgtcaca	3540
	gtgcgcgct ctgggaaatg gtgtgcccc ctccccgag ggttgagag aggattggaa	3600
	tgaggaacct cggcttttga gttatgggtg caactgacct gggggaagca cagagacgtg	3660
	gggttcatcc cagactctc ctggcctggg aagggtgaca tggeccctag agttgcccc	3720
	ttggcagcca agtaaccagg gcaggagcct gggtccagg cagatctgt ccttacacac	3780
	atgccagaa tgttttgtt tgttttgtt tccccacc tcacagtgc talgtcccc	3840
	ctatccccac acttagtct caagctgcac tacagagaga gcttgcccag ggtcctgce	3900
	ctcccccat tggctgaatt ccgtcaggca gctgggccct tgggttccc gggttaaac	3960
	tcagggtggg cccccctcc aagctgtct ggaggggcca gctgggtcc tgtctctgca	4020
	ttagactgga gggctttctg aaaactctg gagccaagct caccgggtcc caaatccggg	4080

	gtaccatcag agccagtcag gactottgcc ggtacacgga ttatcatcca gaacggttgg	4140
	gaaagttagt ctacttgaca aaaagctgga ggaaggagca catgaggtae acacgagacc	4200
	atgttctttt ggtaagcaca cctgggggct ctgtcacttt aaaaagacct gttgaaattc	4260
	gctgcttgac aggcgggacct taggtcctgg gactagaagc aagaattgct ttggaaggaa	4320
	atggataatc ccagggggtg gagggggaga ggagagagag cctgtgtgtt gagctctgna	4380
	taggtcttga ttcttgacct catcaccact gcttggttgg ggggccagag gagcttctct	4440
	cctctggggc ctggagagtc acagccccac ccatcccage gggggcggct gcagcacttg	4500
	cccttggttg catacttcca agctcactgt tgcggggagg gggtttgtgc ctactaccg	4560
	gcctcttatt ctctgtctcc acccccaccc cccccctgc ctacagcttg aaggcccca	4620
	aagaaatcca gggaacctg gaggcacaac actcaggagc gtttagctcc tcagttaccc	4680
	aggctgcagg ccccgacctt ggggggtgct tcccagggtg atctggttac agtgcagtgc	4740
	tgacttcccc tgcagggtcc cagtgcagct gctggaagct ggcgccagag gtgcctttct	4800
[0047]	ggagttagat cagggtgaac tgtgaagget gcttaggtc tctccagtgc catgagtcac	4860
	cagcaccctg atgcttggtt ttttctggtt ttcaggag ttgcatttgg tctggggac	4920
	aaggaaagg ggggacaagt ggtccactll tctgcaact tgggtgctga atacacaatg	4980
	caattcttag tccacatcat cctcaattg attgcagtct gtagaaaaaa taaaataaaa	5040
	tgagccctt actcaagatt tctcctact tcccagcat tctttccaa aggtgcagaa	5100
	tttcagaacc acagaggtct ctgagaactt tgtaaacagg caaacttaa aaaaaagaaa	5160
	aaagaaaaaa aatctctgga ccaaatattc ttagacatat atttaatctc tgatgaanag	5220
	atccacaagt tcaataaatt tgggtatta agtggggctt ggataaaatc ttcaaggaaa	5280
	aaagaaaaac aaaaagcaca cacaateccc agccctccag gcttgcaat cctatattta	5340
	aagggtgagc agtgggttct gcaggagccc ctgtetaatt tacactaatg agtgcaatt	5400
	atggcatttt gtaaatgggt gattttgcaa agatettaat acaattctg aggtacagc	5460
	atccctgect aggcaatgaa aaccacattt aactccagct ccaetaatct ctaagccttg	5520

	gggaaagtgc tgggcagaag gtgggtcctt ggccctgctct caggggactc acaggttagga	5580
	agccagccag gattcttttg tgccttcag agctttaggt gaatgtgagg aggggtctct	5640
	ggggggggg agggcagcat tctgagtac tactgtgctt cctggctaga ggccgtgccc	5700
	agaggagaga ggccaggag cctggagcct cttgtccccc tttctttcc ctgagtaggg	5760
	agatctttct cagttgtccc ttgaggaatt ttttttaca agagtaactg gaaatttcag	5820
	taccttgga c tgaaccgtt atctactata attactacct ttatcttgag aactgagca	5880
	ggtggcttct aatttaatct ccccccctat ctaggtccg gctctccca ggccgttgg	5940
	gcctcttgc clgtagaagc tgagcctgag ctcagccagc actcactgtg ttgctgagg	6000
	agatggcctt tcccaacata caccagtaac ctggaactta cccagtgat gccgtctctt	6060
	gatccttaat cgtgcacca actgtgcag cccagacaca cattacaaa atctggcagg	6120
	gtagtaaagt gcttgttgt cttacctct tctaggaag cccgtcagcc tgagctacag	6180
[0048]	atgcccagtc cgatctctcg aaagccatgt tgcagagcc aacgtcaagc atctcaaat	6240
	tctcaacct ccaaactgtg ccttcagat tgtgtaagtc ttgaaattga acatcatcta	6300
	acgaacatag ttgcattctaa cgaacatagt aacatctaac ccgagtctta ttaaagggtg	6360
	agaggtgaca agccaagtgt ccaaccttga acttggcata attagtggca gctattctta	6420
	tcatgaggac ctttagtatg ccaccaggca ttaattttta aagccgctct tgccctgggc	6480
	acctgtctgt gctcgtagta gttctctctt ctttccaaac ctgtgtctt cagcacagca	6540
	cagctggatg ctggagaaac tatgggttc accaaggttt tggtgaagc ctagtaaatt	6600
	agccagccct tagctaataa cagtataac tggcctgcca gtttcgggga tetgatccc	6660
	tacattaact cacaagacc aaatgcagt taagtctct ttaaccattg ggtgaaactt	6720
	caacatttgc agtcacttg cctgtatttt ctcaagtaca acatatgagg ttttgggtgt	6780
	atttgggtgt gatggcagcc actaacattt gattttattt atttgggaaa caaagaccaa	6840
	aatcacacat ccacaagaca ggaagatctc agctgggtac agaagaccgg gagaaatgcg	6900

	ggaagaaagc catgtgcttg aaagccctct catgetcaag aggtccctgtg tctgaacacg	6960
	gggaagcgag ggctcaggga gtctccctgga gaggatttga ttgctcagaa gttctagtgc	7020
	taaaaatggg gtggggagac agcagtttga accaaagcta caactttccc aagaattttc	7080
	cacccaacac caaatgtttt taactttgat tttagaaaac tgtttttagt tttagattaa	7140
	ccctttactg ccttgaatgt gtttgttatt tacagtatgt tttagggccc tagaaaatga	7200
	atgttttttc agtactttgc ctacaacatg ataactttatc tcttggaag agtatittaa	7260
	agatgetcaa tttagctagc ttggacctgc ttacagcac tgatcatgct ggtttactgg	7320
	cctggaaatg caccitgaag ttgaagatgc caaatacaat tctcaggtct gacgagacac	7380
	taaattaaca aagaatagge cccagatttg gacccaatg tgggttgctc cgagccacac	7440
	ccatctctgc accctctctc acctaatgga caggttgcct gaagactccc tgggtgcccc	7500
	tgaaccactg ttctggggct tagctgtcct caagacctt aagtacttgg gctgcatgag	7560
	attacctggc accaaagggc tttctggcaa gagatccaga gagatgaaat caggccttcc	7620
[0049]	ccaggagtgt gcatttaggg aagcttttaa gactgtgaac ttttaaaaaa caaatgagac	7680
	caagaaacat tcagtgaact tgtaaaatct ttctagaaac taattttctgg taagccacct	7740
	gcaactgccc tcccctccct ggetggtcac cctcccggtc agaccgggt gaattctggc	7800
	aggcctccct cctccaggt tctcatgcc catccttaag tcggccctat atctatcaag	7860
	atgaccatc caaataaacc tctgtctgtg tgctctccat tctcccctcc ccagtgctt	7920
	agagcatcct gtcttcccct tctcagttt cctctgtatg ctttgatgac cccctggcg	7980
	taattgtctc tgattttccc ttccgttta ttactctcc aagctctac ttatcttca	8040
	aaggcagctc aaatgtctcc ttacatgaat tccctgcac tgccccgaa agactttgt	8100
	tcacatttcc atgtctctgc aatggaactt cctgcactgc cagcgtgag ctttcccag	8160
	cacaccgca gcacctctgg agcctgagcg taccaagtgg agcacgggt gccagcgagg	8220
	gccctagatg ggtgttgggg gagcggatgc acacgttgca gccgcgctt cctctgtgc	8280
	agccgcacac tgttgccatt ctgttttcac agagcccgcc tgaagaacaa caacagacaa	8340

	gtgtgcattg acccgaagct aaagtggatt caggagtacc tggagaaagc ttttaacaag	8400
	taagcacaac agccaaaaag gactttccgc tagacccact cgaggaaaac taaaaccttg	8460
	tgagagatga aagggc aaag acgtggggga gagggggcct taaccaigag gaccaggtgt	8520
	gtgtgtgggg tgggcacatt gatctgggat cgggcctgag gtttgcagc atttagacc	8580
	tgcatttata gcatacggta tgatattgca gcttatattc atccatgcc tgtacctgtg	8640
	cacgttgga cttttattac tggggttttt ctaagaaaga aattgtatta tcaacagcat	8700
	tttcaagcag ttagttcctt catgatcatc acaatcatca tcattctcat tctcattttt	8760
	taaatcaacg agtacttcaa gatctgaatt tggcttggtt ggagcactc cctctgctcc	8820
	ctggggagtc tgggcacagt caggctgggtg cttaacaggg agctggaaaa agtgtccttt	8880
	cttcagacac tgaggctccc gcagcagcgc cctcccacag aggaaggcct ctgtggcact	8940
	cagataccga ctggggctgg gcgcgcacac tgccttcacc tctctttca acctcagtga	9000
[0050]	ttggctctgt gggctccatg tagaagccac tattactggg actgtgtca gagaccctc	9060
	teccagctat tctactctc tcccagactc cgagagcatg cttaattctg cttctgttc	9120
	tcatttctgt agccgatca gcgcgcacc agccgggaag agggtgattg ctggggctcg	9180
	tgccttgcac cctctctc caggggctg cccacagct cgggcctct gtgagatccg	9240
	tctttggcct cctccagaat ggagctggcc cctcctggg gatgtgtaat ggccccctg	9300
	cttaccgca aaagacaagt cttacagaa tcaaatgcaa ttttaaatct gagagctgc	9360
	tttgagtga c tgggttttgt gattgcctct gaagcctatg tatgccatgg aggcactaac	9420
	aaactctgag gtttccgaaa tcagaagcga aaaaatcagt gaataaacca tcctctgcc	9480
	actacccct cctgaagcca cagcagggtt tcaggttcca atcagaactg ttggcaaggt	9540
	gacatttcca tgcataaatg cgatecacag aaggctcctg tggtatttgt aactttttgc	9600
	aaggcatttt ttatataata tttttgtgca ctttttttt tacgtttctt tagaaaacaa	9660
	atgtatttca aaataatatt atagtcgaac aattcatata tttgaagtgg agccatatga	9720

	atgtcagtag tttatacttc tctattatct caaactactg gcaatttgta aagaaatata	9780
	tatgatatai aaatgtgatt gcagcttttc aatgttagcc acagtgtatt ttttcacttg	9840
	tactaaaatt gtatcaaatg tgacattata tgcactagca ataaaaatgct aattgtttca	9900
	tggatataac gtcctactgt atgtgggaal ttatttacct gaaataaaal tcattagttg	9960
	ttagtgatgg agcttataga cgtttciggt ttatatagtt aagcctgcct gcagtcaggi	10020
	gtctgagacc ccttcacaca gcccatgtgt gacagtgtat gggcttttct cagcagcaga	10080
	ttagatctgc agctcaagtt ttggatctt ttttttttt tttaacccg attgaaatag	10140
	cagtgcctgt tttctgaaga ataattttg actcactaat tcgtcttccc tcectctccc	10200
	tccttggctc tcctaacttc cccatgtaat cccagagac tcaacctag taatatcaac	10260
	cttttacatt tcccattgta aaaatcccat gactccaggc catggttaat atgaagcttt	10320
	cacagggaca ggtggcctca cccataaat cattaaatac cattcagctt gaatcatttt	10380
	aatgtgacag tcacgagcca gttgctctaa taaaattctg ctaaccagct ctctcccttg	10440
[0051]	ctctccagaa caatcgcatt cattcccagg agtgttcaca ggcgtctaga aaggggaagg	10500
	tgggaccact gccttttttc tcctcttctg aatggcagtc tgaacctggg gcctgcagcc	10560
	tcaaaaacgt tattcaattt gaaatgcaga catttcttag agaaagctaa gagttcagcc	10620
	ctgcattgag aagaagaaaa agtcccatga gagcagggca gggtggggtg acaaggacca	10680
	cgatggccag cctggccctg ggtgtacct gagatgtgga ttcttgttcc ccagtgggaa	10740
	tcaggttcag gttggcagat tggcagtcgc tgtaacccat tcacaaaggt gttctaggag	10800
	cccattgaac atttgtttga atggaaggaa atgtccaatt tatttttaag aattactgat	10860
	aaacagtgtc ttgaccaggg gcctccaggc ctgagactga aggcacagtt taaccagtac	10920
	acgggccagt gttaaatctt atgcagactg agacgaactt ttgtttattt ccacattatt	10980
	aatggttcta ctaattttat ctaagggggc gcagagaaga aaaagtggg aaaaaagaaa	11040
	agataggaaa aaagaagcga cagaagaaga gaaaggctgc ccagaaaagg aaaaactagt	11100
	tatctgccac ctcgagatgg accacagtc acttgctctc ggcgctttgt aaatttgctc	11160

	gatactcctc caggacagac ccccatgcag actgggcagg ggctcagact tccgtggggg	11220
	agcagtgcctt tgetgcectg ccagccacac aggettctgt atttatgtgc tttttaaggc	11280
	ccttgtttgt ctgctaagtt atgaagaaag tagttgtgca gagactgggg cgggggtctg	11340
	tgaacgggag cctgtgtgct caggactctg tccagaatag cctgggagct ccaggaatgc	11400
	ccaggttget gagccccca gcccgcectc caattcctct cttagaaggc ctgcgtcac	11460
	tggggagctc accagctcca cacacttgca gtctgcattc ctgtggagac caggctgtgg	11520
	ccacctggcc agtgtgcagg gcaacctgct agcccagcag aggtggcctc gccaggaagg	11580
	gggtgtgcca cccclctgtg gccctcagga aaggtagaaa ctgactgacc cttaggaatg	11640
	ggccctgget ttttccaaat acccattgcc ttctccacca gcactctgcc acctgggaag	11700
	gggtctcttc agccctctct tcttgggttg tgggagtggc ttatcccca agcccggtg	11760
	ggtttctgca aactgtgtgg ggtgagcccg agggaatgct gcattctcag agagcagatg	11820
[0052]	tggaaacact tctcaggag ctctctttg ggcaattctc tttagagtct ttaaacgggt	11880
	ccccacgtg gaggacagat gtgctatgga actttgcaag ggtectgaat ccttgggat	11940
	cccagctgt cccctccgc ctctgcgtg atggcgtgtg ctccagctgc agggcacagc	12000
	tgcctctgtc ctcaattcatg gaaataacct tatctgcta aagcaaatac cacttaagct	12060
	ctaggaactt tctgcaccc tcttccctg cccatgtaga tgtatgtgtg agatttttg	12120
	gcaagtttct ctaatctgga ccgggaggat ggaagagcaa ggacccatt tcagtagtgc	12180
	tgggaaaaag gatgcttga atttctcagc cttctecac ctacataaa caccgceca	12240
	ccctgcacc gccatctggg tcataatttt aataaatgca gaaagagaaa gtggttgag	12300
	gatggagcac atggaattca ggagaaaacc cacaagacc cctgcattgc agacacacc	12360
	tgtcccgag cgtggtgtcc ccttgagctt taatgagctc cctgtgatca cagccatgcc	12420
	ttctctctgt tggggaggig tcttaggatg cttcagccaa agacctttgt ttcccgtgc	12480
	tatctctttt acctggacaa ctctcttggc ccacgttctt cttgccagca ctgggggtca	12540

	caggcctgag cccctgggtac aggggtgccc tagtctcttg cccctccccc acctttaaggc	12600
	acagagctgt tgggtgggct gcctggggct gccatccttc ccgtggaagc cagtagccac	12660
	tctagtccat gggactcttg acaaaagcgc cccgagaggg caaacctgtg cccccatact	12720
	cgcctgcatt ctctggactc cacatgcagc agggctttgt gcctggggag gggtagccag	12780
	tctgtcctgg tcagtatgaa aagctgttgg ccccttaggg acagaggggc cagctaaggc	12840
	tgcttgagga tacaaactgc ttgctatccc actcctgggg agcagggtct gcagggactg	12900
	agagtgggtc ccacctgag aacgcattga aggtccgtcc tctcttgatg tcttgatgtg	12960
	actgtatgtg cccctgggggc tcaatgttgt ttacaagtgg ctgttgaagc tcctgggagc	13020
	aggtggtaca cccagtgtct aagacagggt cgcctgggaa gagcgaagag cctgaccggg	13080
	attcctgggt ggttgaact aggaagtgtc cacaccagtc agagccaaat gaggggtgcg	13140
	ctatggtcac tctctgtcc agcatgcgtt cctcctggga ggtcctggcc acctgtgcac	13200
[0053]	ccacccctgt gccacctcca gcagtccac ctggggccac ctaeggtgga atggccctg	13260
	gctgagaggc cccgagggcg aagggttact ggaagccacg aaagtgcctc ttgggacagc	13320
	cgaggecagg atgcagggca gcagcatcct gacccacgc cccacgcgg tgcgggtaa	13380
	gcagtgtgcc ctgtccctgt cgtatgacca ctctgatggg cctctctgtg ccttcgtgcg	13440
	tctgccaagc ccagtgttg ccacgtgtct gtctctgtct ttctgccate catgggtccc	13500
	tccgttcag cctggtgcg tctgcactc cctcccgtc tgttgtagca ggccctctga	13560
	aggagatgc atggccaagg tggcaacttg gaagtaggga ttggccccag ggccctccgc	13620
	caggccgtg tctgtctgga gctggttggg tgtgggggga acctgcctta atggtgttc	13680
	cctctgttct tgtcaacagg aggttcaaga tgtgagaggg tcagacgcct gaggaacct	13740
	tacagtagga gccagctct gaaaccagt ttagggaagg gcctgccaca gcctccctg	13800
	ccagggcagg gcccaggca ttgccaaggg cttgttttg cacacttgc catattttca	13860
	ccatttgatt atgtagcaa atacatgaca ttatttttc atttagttg attatteagt	13920
	gtcactggcg acacgtagca gcttagacta aggccattat tgtacttgc ttattagagt	13980

	gtctttccac ggagccactc ctctgactca gggctcctgg gttttgiatt ctctgagctg	14040
	tgcaggtggg gagactgggc tgaggagacc tggcccatg gtcagcccta gggaggagag	14100
	ccaccaagag ggacgccggg ggggtccagg accagtcac cttggcaaag cctagtgaag	14160
	gcttctctct gtgggatggg atggaggagg gccacatggg aggtcaccc cttctccat	14220
	ccacatggga gccgggtctg cctctctctg gagggcagca gggctacct gactgagggc	14280
	agcagtgtga ggccagggca gactgagacc cagccctcat cccagacc cccacatcct	14340
	ccacgttctg ctcacatc cttgtctcat ccatcatcat gtgtgtccac gactgtctcc	14400
	atggcccccgc aaaaggactc tcaggaccaa agctttcatg taaactgtgc accaagcagg	14460
	aaatgaaaat gtcttgtgtt acctgaaaac actgtgcaca tctgtgtctt gtttgggaata	14520
	ttgtccattg tccaatccta tgtttttgtt caaagccagc gtctctctct gtgaccaatg	14580
	tcttgatgca tgcactgttc cccctgtgca gccgtgagc gaggagatgc tccctgggcc	14640
[0054]	ctttgagtgc agtctgac agagccgtgg tctttgggg tgaactacct tggttccccc	14700
	actgacaca aaaacatggt ggggccatgg gcagagccca agggaaattc gtgtgcacca	14760
	gggttgacc cagaggattg ctgcccac agtgcctcc cacaatgcag taccttcaaa	14820
	ctagggccaa gccagcact gcttgaggaa aacaagcatt cacaactgt ttttggtttt	14880
	taaaaccag tccacaaaat aaccaatcct ggacatgaag attcttccc aattcacatc	14940
	taacctcacc ttcttcacca tttggcaatg ccatcatctc ctgccttcc cctgggccct	15000
	ctctgtctct ggtgtccct gtgttctgg ccttcccac aggcatttc tctaaagaa	15060
	caatgtgcta tgtgaagagt aagtcacct gccagacatt tggagtgtc ccttccact	15120
	gagggcagtc gatagagctg tattaagcca cttaaaatgt tcaatttga caaaggcaag	15180
	cacttggtgg ttttgtttt gttttcatt cagtcttacc aatactttg cctttgatt	15240
	aaagactcca gttaaaaaaa attttaatga agaaagtga aaacaaggaa gtcaaagcaa	15300
	ggaaactatg taacatgtag gaagtaggaa gttaaattata gtgatgtaat cttgaattgt	15360

aactgttctt gaatttaata atctgtaggg taattagtaa catgtgttaa gtatttcat	15420
aagtatttca aattggagct tcatggcaga aggcacaccc atcaacaaaa attgtccctt	15480
aaacaaaaat taaaatctct aatccagcta tgttatattg aaaaaataga gcctgaggga	15540
tctttactag ttataaagat acagaactct ttcaaaaacct ttigaaatta acctctcact	15600
ataccagtat aattgagttt tcagtggggc agtcattatc caggtaatcc aagatatttt	15660
aaaatctgtc acgtagaact tggatgtacc tgcceccaat ceatgaacca agaccattga	15720
attcttggtt gaggaacaa acatgacctt aaatcttgac tacagtcagg aaaggaaaca	15780
ttctatttc tectccatgg gagaaaatag ataagagtag aaactgcagg gaaaattatt	15840
tgcataacaa ttctcttact aacaatcagc tcttctctgg agactgcca gctaaagcaa	15900
tatgcattta aatacagctt tccatttgca agggaaaagt ctcttgtaat ccgaatctct	15960
ttttgcttgc gaactgctag tcaagtgcgt ccacgagctg ttactaggg atccctcate	16020
tgccctccg ggacctgggtg ctgcctctac ctgacactcc ctggggctcc ctgtaacctc	16080
ttcagaggcc ctgcctgcca gctctgtatc aggaccacga ggaaggggcc agaggctcgt	16140
tgaactggctg tgtgttgga ttgagctgt gccacgtgt tgtgtgtgg tgtgtccccc	16200
tctgtccagg cactgagata ccagcgagga ggctccagag ggcactctgc ttgttattag	16260
agattacctc ctgagaaaaa aggttccgct tggagcagag gggctgaata gcagaaggtt	16320
gcacctcccc caaccttaga tgttctaagt ctctccattg gatctcattg gaccttcca	16380
tggtgtgac gtctgactgg tgttateacc gtgggctccc tgactgggag ttgatcgcct	16440
ttcccagggtg ctacacctt ttccagctgg atgagaattt gagtgcctc atccctctac	16500
agagcttccc tgactcattc tgaaggagcc ccattctgg gaaatatcc ctagaaactt	16560
ccaaatcccc taagcagacc actgataaaa ccattgtaga aatttgttat ttgcaacct	16620
cgttggaactc tcagctctc agcagtgaat gatcagtg taaatgtgat gaatactgta	16680
tttgtattg ttcaattgc atctcccaga taatgtgaaa atggctcagg agaaggccaa	16740
ttcctatcag cagcgtgctt taaaaataa ataagaaaca actctttgag aaacaacaat	16800

[0055]

	tctactttg aagtcatacc aatgaaaaaa tgtatatgca cttataattt tectaataaa	16860
	gttctgtact caaatgtagc caccaacagt ttgaaattag tgttactact tggaattttc	16920
	tggaagtgtc ttttttccc acaaacccaa aactgagggc tgtgttaalec tggctacagt	16980
	ggttcattga aaacagggca ttgtaatcat gctaatcaca gctgagaatt ctggaggcat	17040
	actgcctct tctggacagc tgatccttag cagggaaggg tgcctccctt tctctgagtg	17100
	tctttgattt tgctagaatt gcttctgaaa ggccagcctg tctccactc cacaagggat	17160
	ggttttgtgc aagggtctca ggtatttctt gacagctgtg aggagggaag ctccactct	17220
	gcccttctca gtctgggag aatgcaacag aggtctggcc ctgatggtaa ttgctgagga	17280
	ccagcactct gtgtgtttcc tgcactgcac agagacctg ctggaagcca gacacgattc	17340
	tctcaectag caatggctag ccagcactgt cctggacatg gggcatagga gatgagccca	17400
	gcagacaggt tctggctctc acagaggtea gcccttaaca ctctctagca cattctctgt	17460
[0056]	catccacagt caactttgtt agaaaggaga gtcagcacia aagtccgaa tgtctgagtc	17520
	agattgtccg gtctctcaag cctctctccc cattggctca gatgtgatca cateatecca	17580
	tgccaaatct tcccatgact taatgggatg gccgtcatgt ggggtctaaag ctgcagatgg	17640
	actggggaag gaagaagggt tagagcaggc cgggaagggc agcgtggtgt caggggacct	17700
	gtgcaggtgt gaagatcagt agactggggc ttgcgtccca ttactctct gctccctctg	17760
	tgatttgaga tgcctccctt gatctctctg agttccagtc tcccagctgc aacctgaag	17820
	cttattactg ccaacggtea agaggattag actgggagag tgtgtggaag aagctagctt	17880
	ttgagggaca ggacaaagcc cgcctctcca cctgaaagt tccccattt gctccctctc	17940
	tccacctcct gtttctgag gtccacagag ctagaataag acccactct gctctctg	18000
	agccccctaa caaagctcag agaccaaggg agcaggaagt gacctggaag ctgagcctgc	18060
	ccctcagcta aaggatgggg agaagtcact gggctgcctc cctgtatct ccggcacacc	18120
	acaactctat cctagcactg ggaatcgaca atgggccaac cttcaaaat gacctggcat	18180

	cagaaagaaa gctgagccc tggcatgctt gcattctccc ctcatcttact tggccaacaa	18240
	cagctgtgat gcctctcctg caccgcagga gtgtggggag caagacacac tcaactctaat	18300
	tccatgaagc ctgcagtctg gcggtgccg tgtgagaagt gggatatttc atagattgtg	18360
	gtgcattcag gcatcaggga agcgtaaaac agaaaagacc cctaacttag gcatcagtaa	18420
	ggatttgctt aaaaagcgct ggtgaagggt agacctgaga aaagtggatt ctttggggag	18480
[0057]	gtggctctact gagcccatga gggctggcat ggagagccca ggtgggtatcc tectgtgaat	18540
	tggaaagggg gcttattcta gaagccggag gtgtagctca cacagggagt ctggcatggg	18600
	gggcacaggg caetgggttt cagcttctt attcccatca ctgtgggag gcacaaacac	18660
	agctgagaaa gctggacccc cacggtgatg gggteccctc agcacggctg attgcatgga	18720
	gtggacaetg gatgcatatt gcaggccgat ctgattttct gtcacaggag tacaaggctg	18780
	tgattcaaca gcatcgggct ttgctccctt tctctgtg	18818

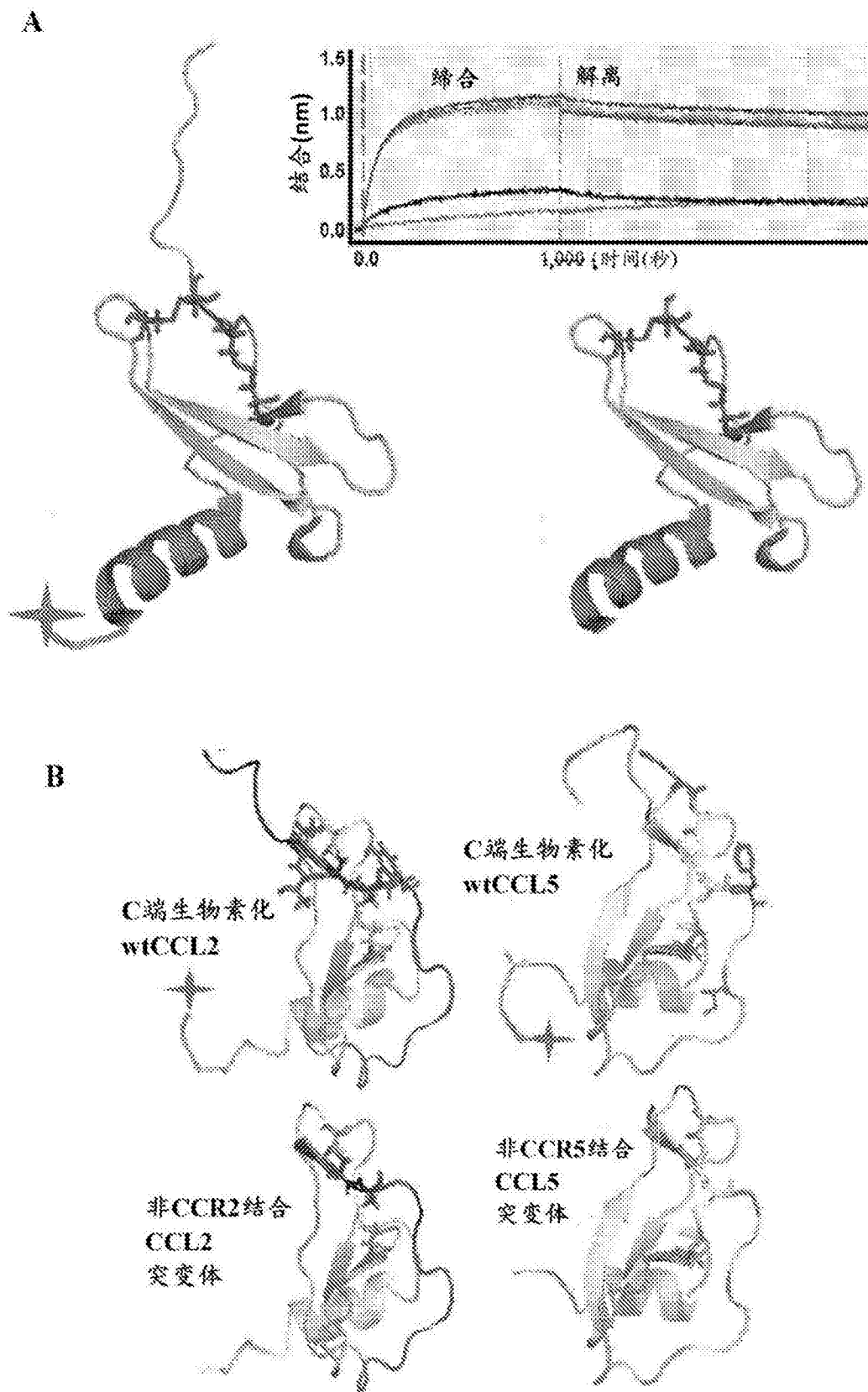


图1A-B

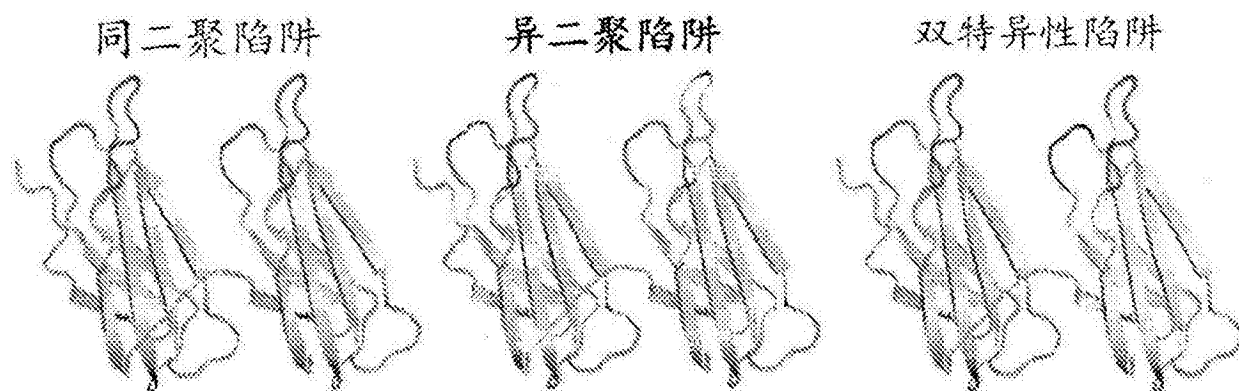


图1C

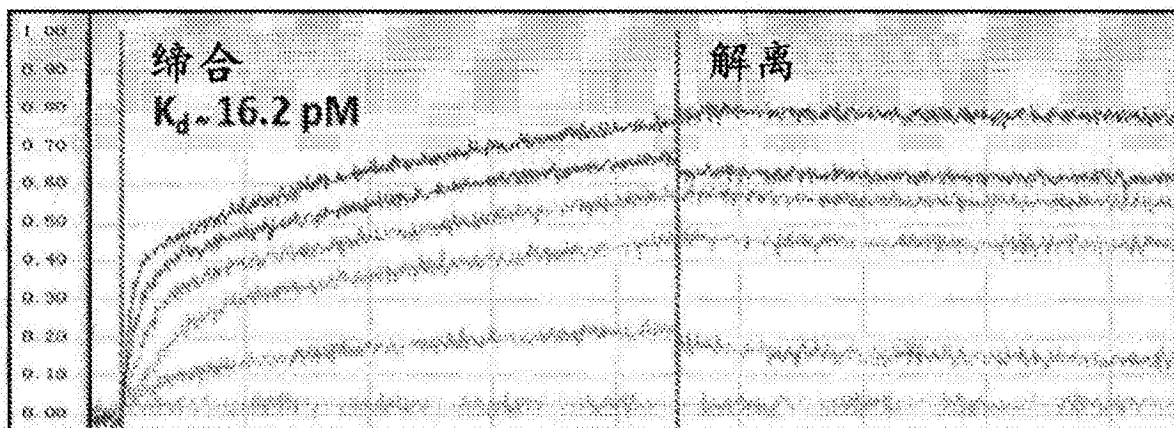
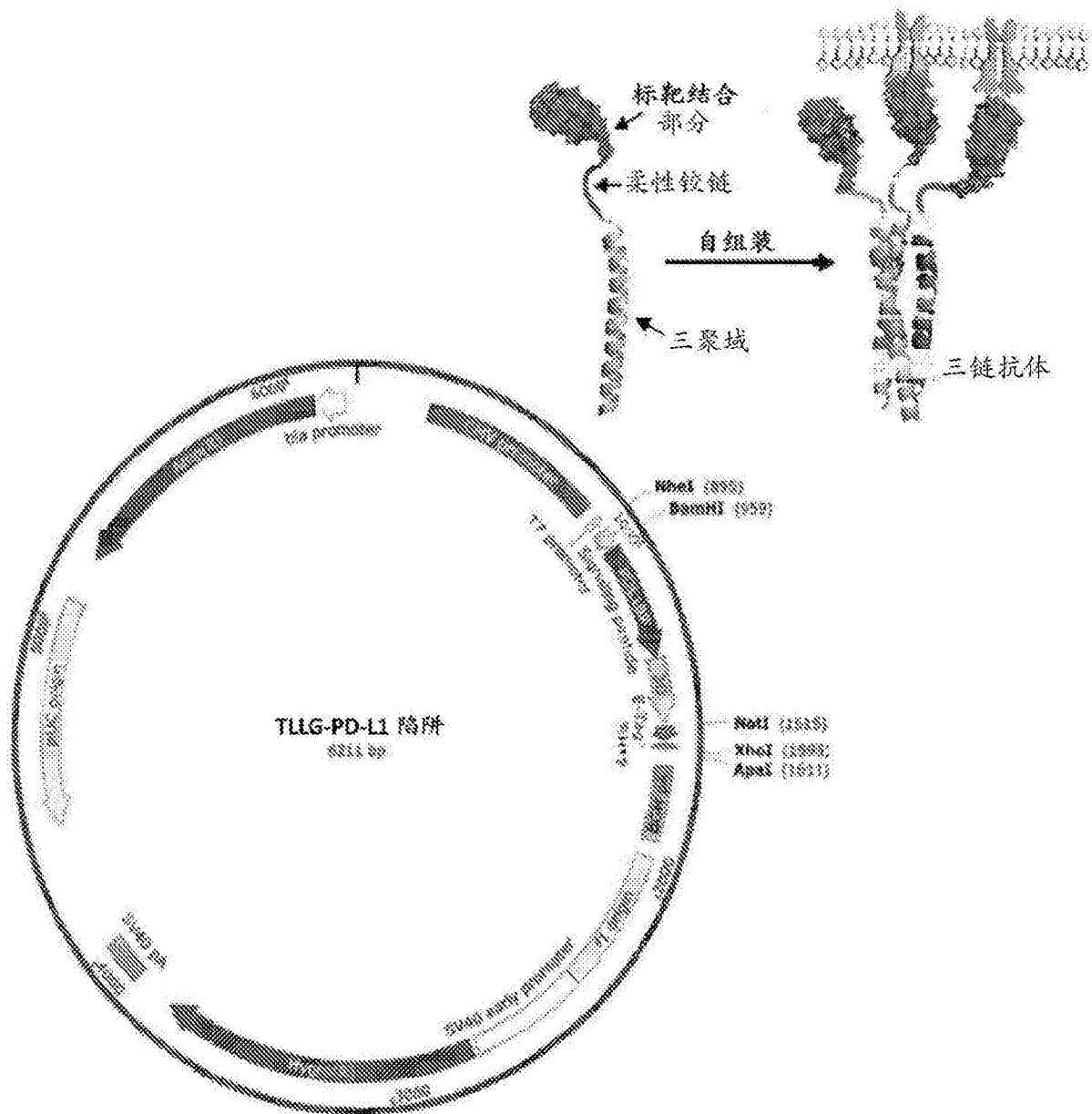


图1D

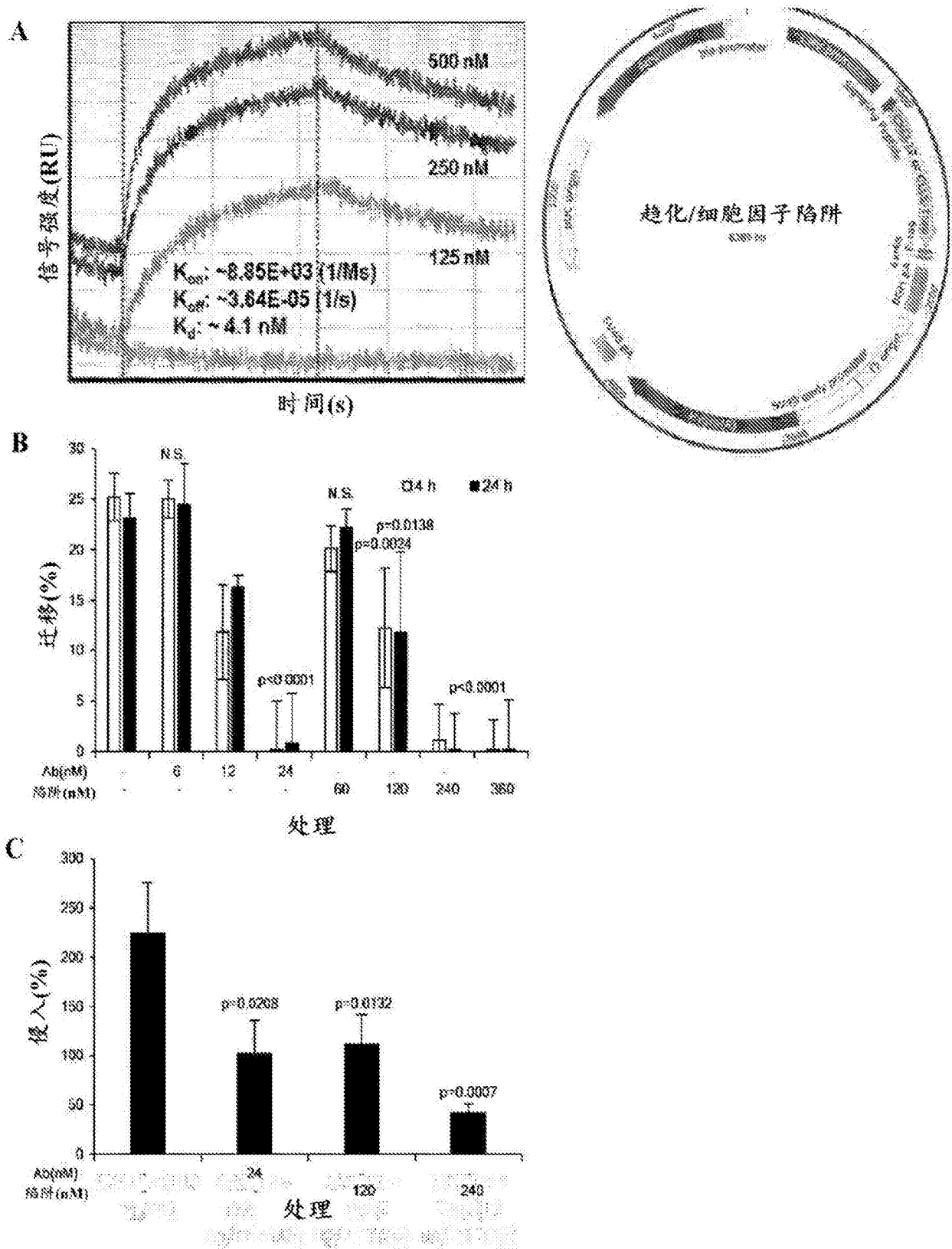


图2A-C

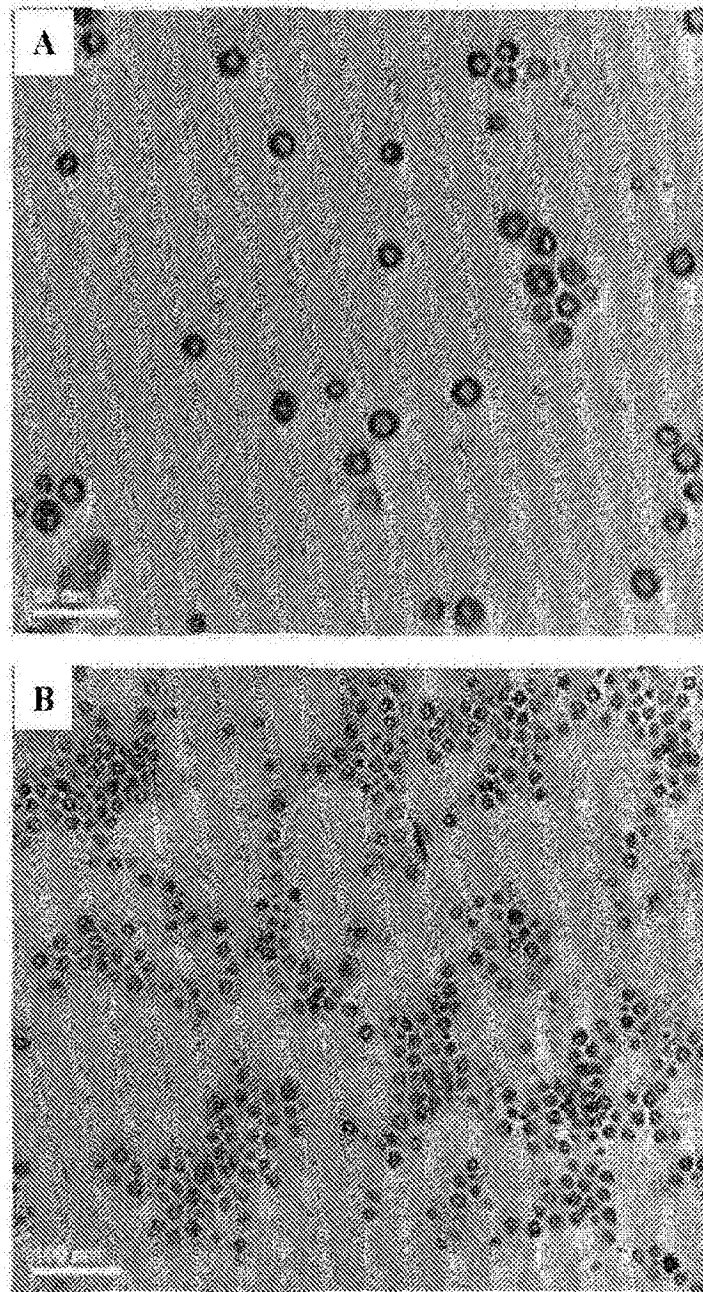


图3A-B

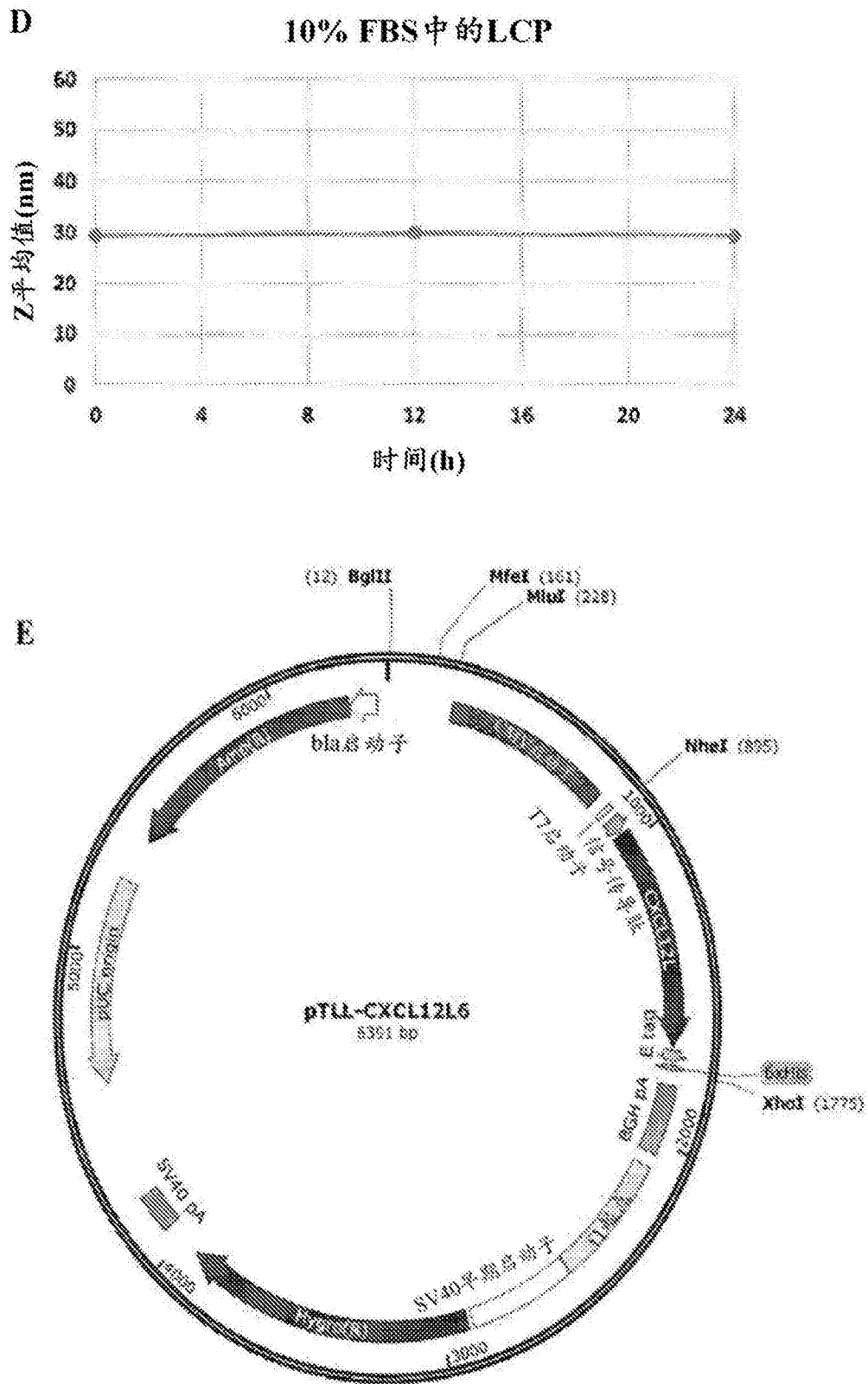


图3D-E

GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC
ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA
CCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT
TGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA
TGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC
CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCC
AAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT
CTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAAT
ACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCACCATGAAATGGGTCACCTTTATCAGCC
TGCTGTTCTGTTTTCAGCAGCGCCTACAGCGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAG
GACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCAGCCTGACCGT
GTA CTCTGTGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGGAGCCCTGTG
GGGCTCTGGCGGAACCGAGTACAACAGCAACCTGAAGTCCCGGTTACCATCAGCCGGGACA
CCAGCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCAGAGATCAGGGCCTGAACTACGGCAGCCTGTTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACA
CTCGTGACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGCAG
CGATATTCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCCTGAGCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCAT
CACCTGTCGGGCCAGCGAGAGCATCAGCTACAGCCTGTCCTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAA
GGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAACGCCGTGAAGCTGGAAAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTC
CGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGC
CACCTACTACTGCAAGCAGTACTGGAACACCCCCCTTACCTTCGGACAGGGCACCAAGGTGGA
AATCAAGAGAGCGGCGCGCTGGCGCCCCCTGTGCCTTATCCTGATCCCCTGGAACCTAGAGGCGG
CAGCCACCACCACCATCACCCTGATGA (SEQ ID NO: 63)

图3F

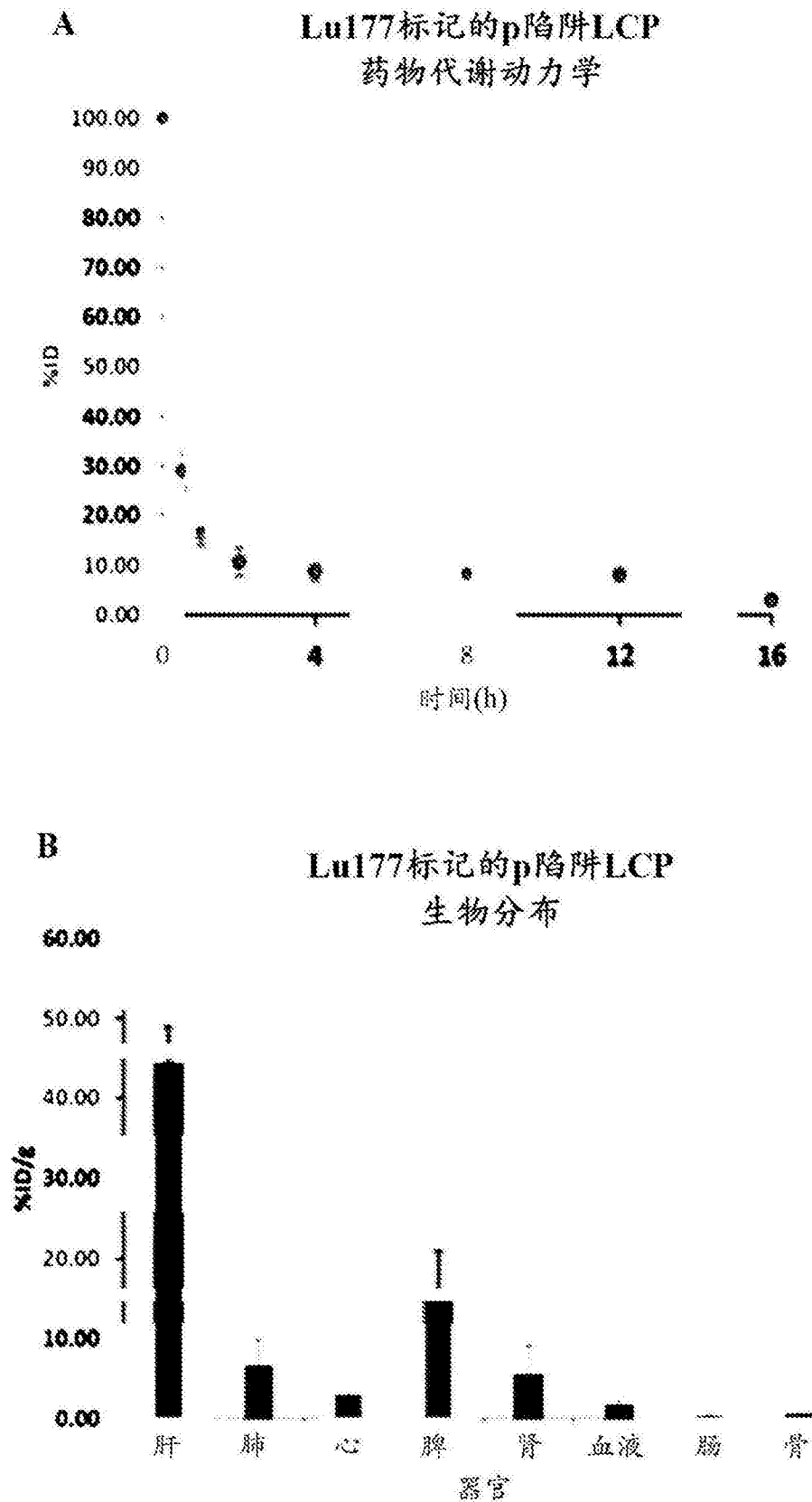


图4A-B

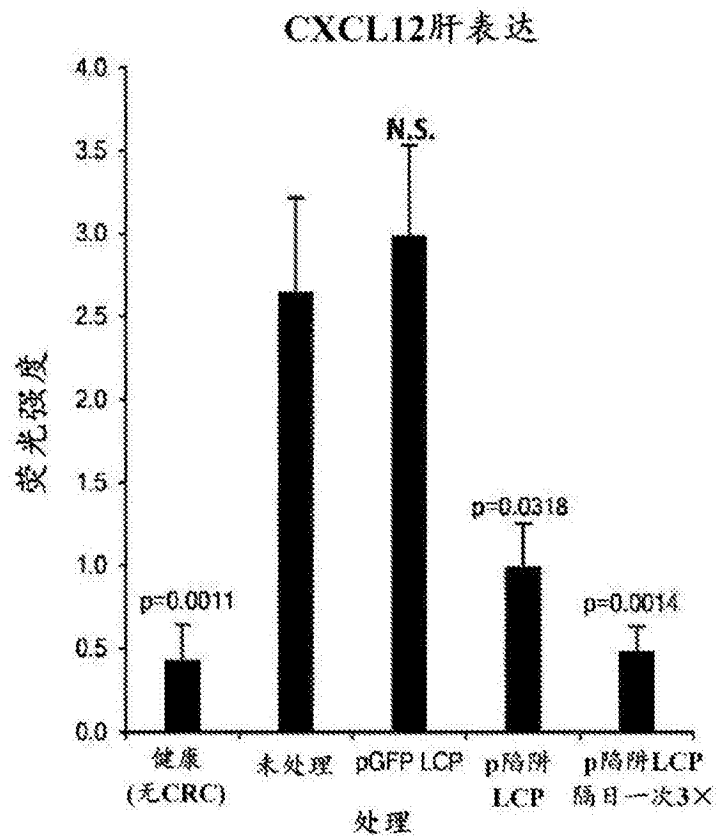
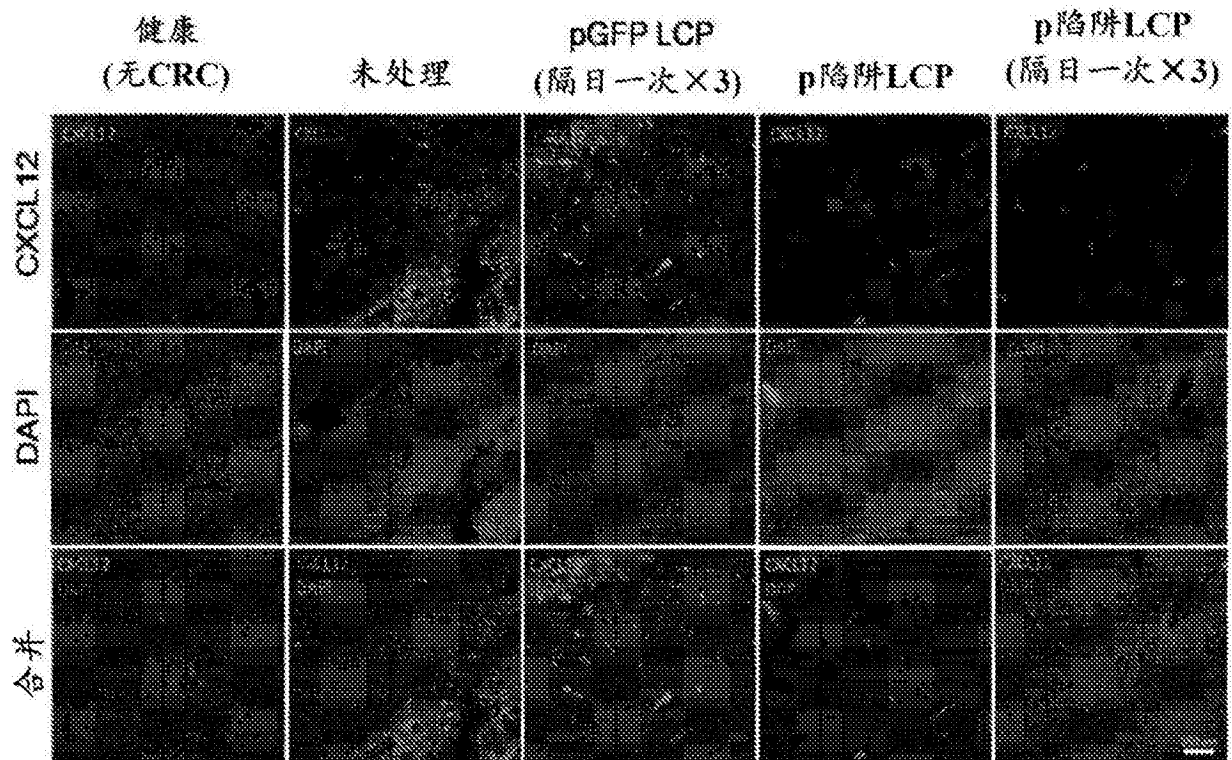


图5A

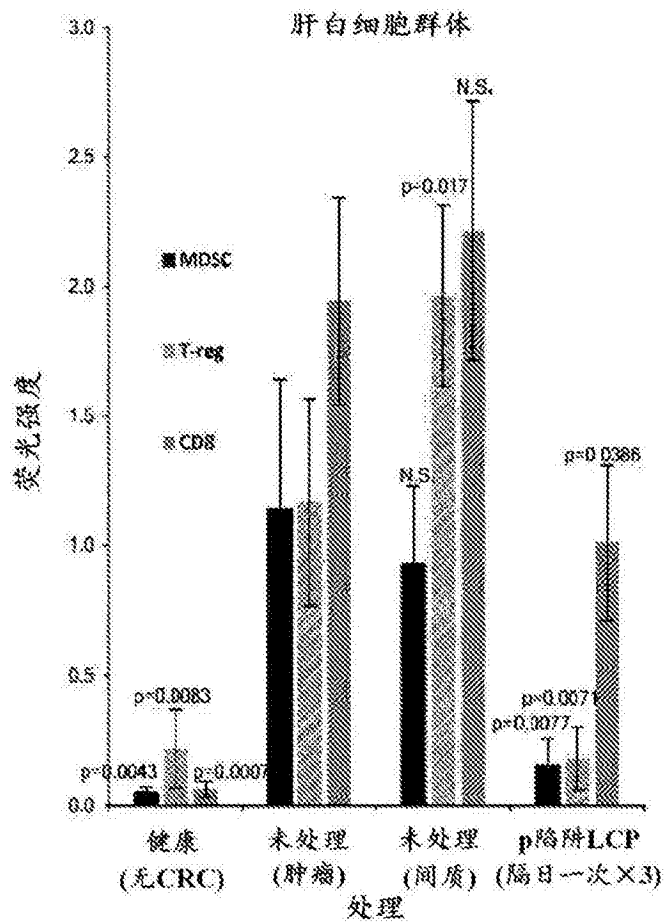
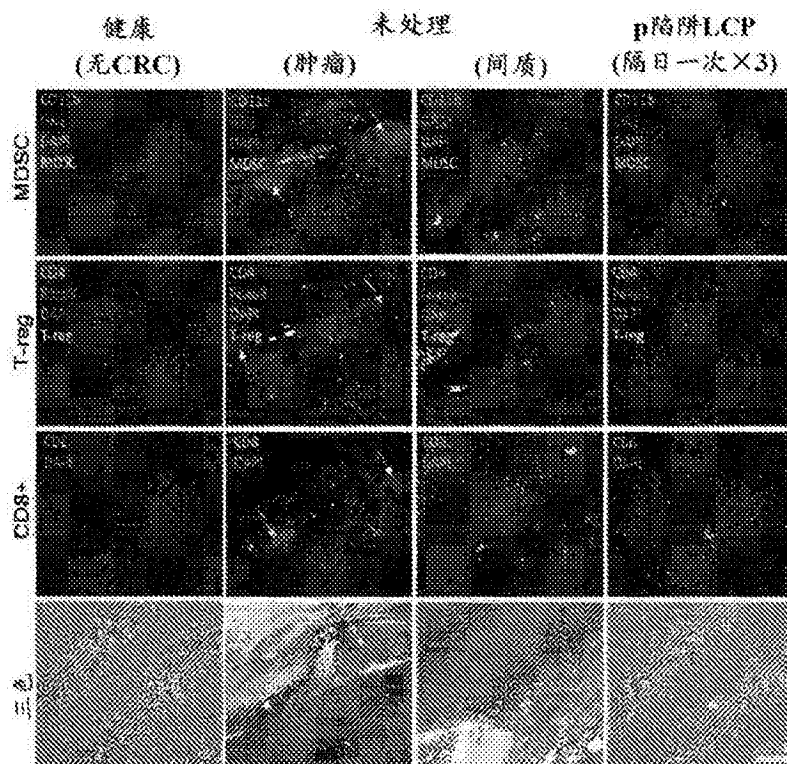


图5B

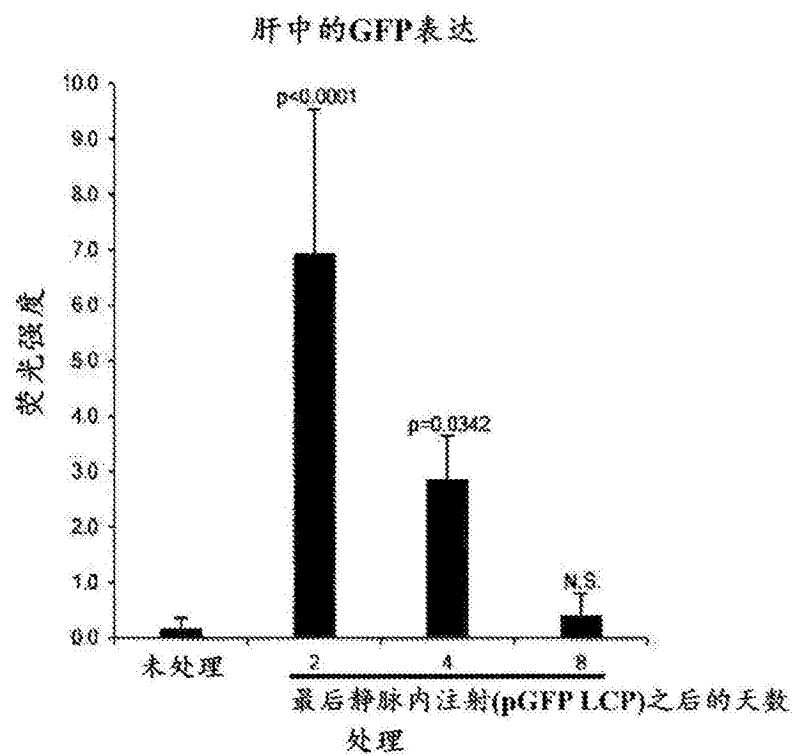
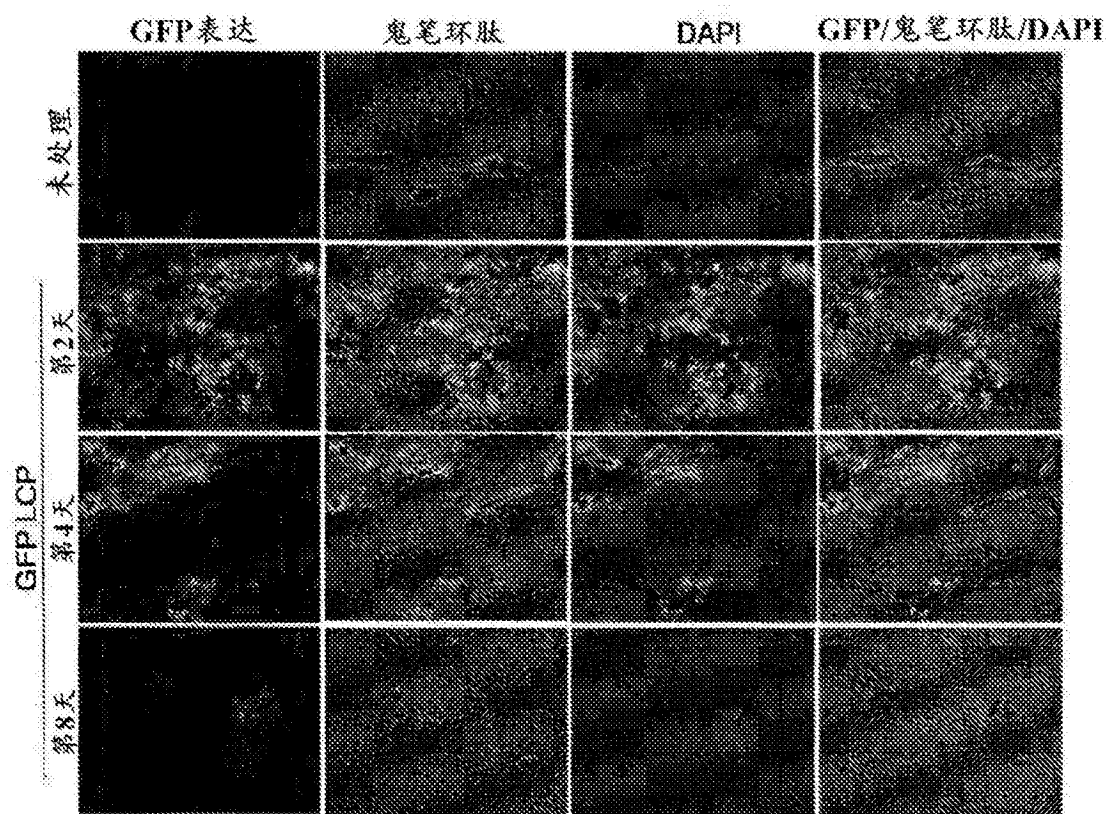


图5C

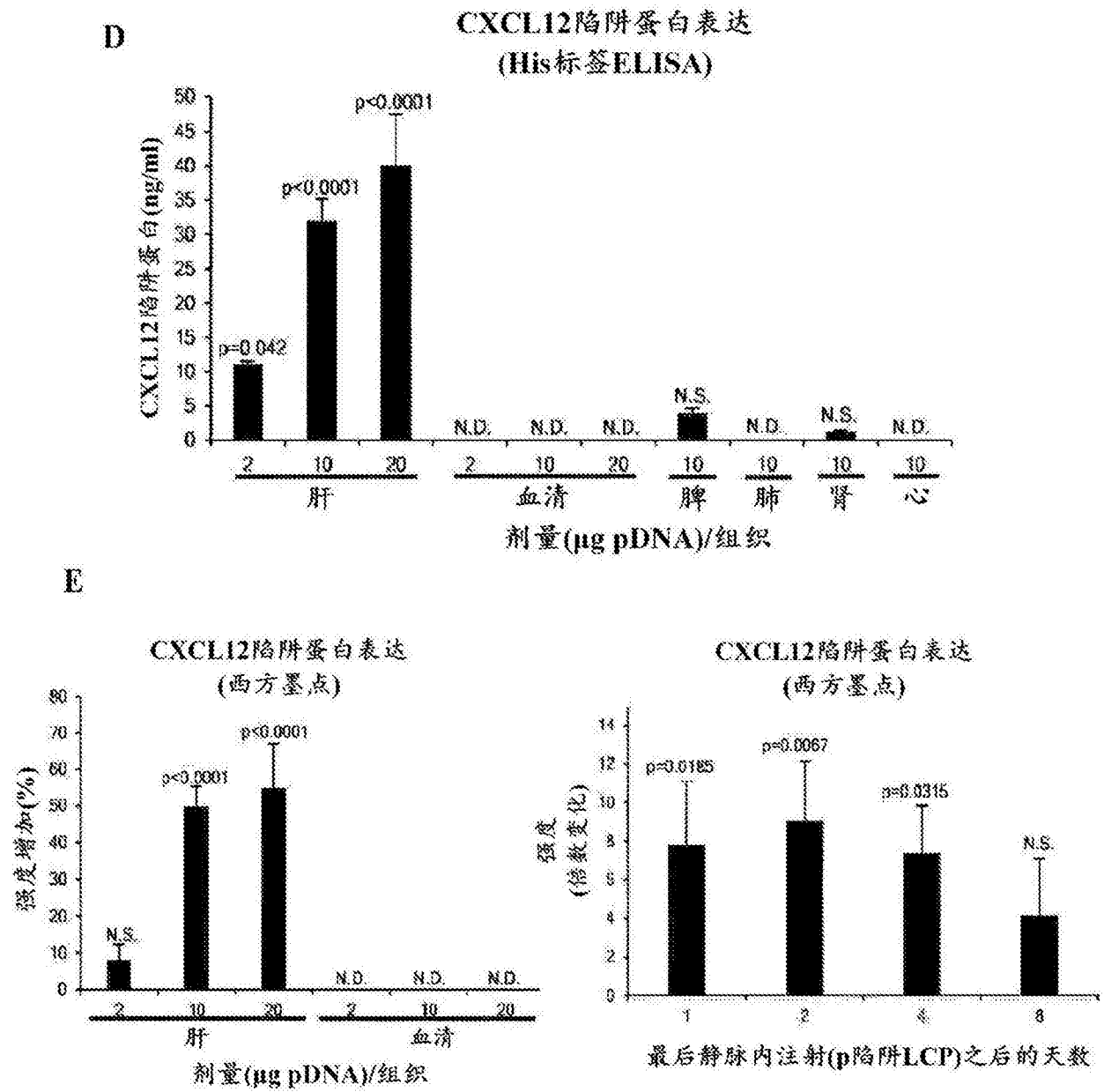


图5D-E

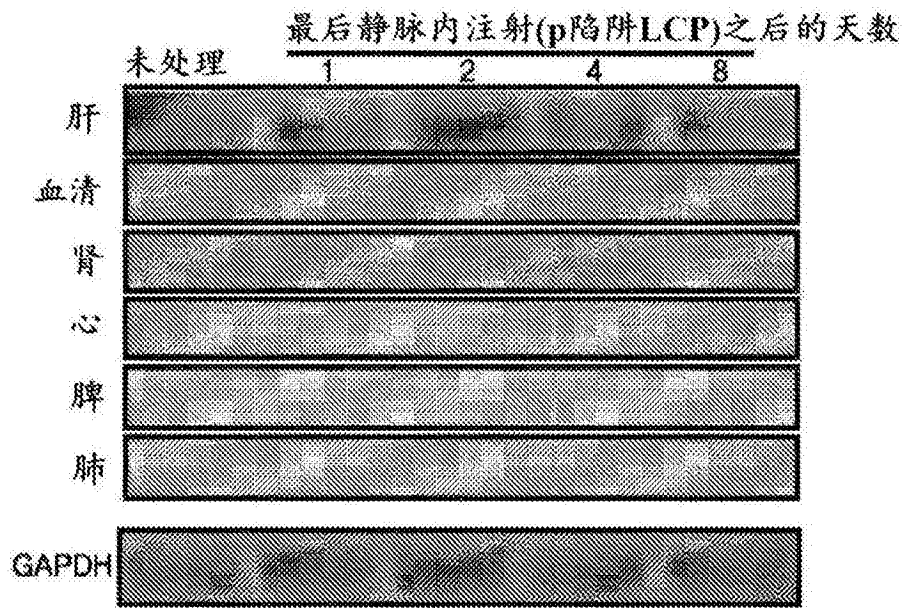


图5F

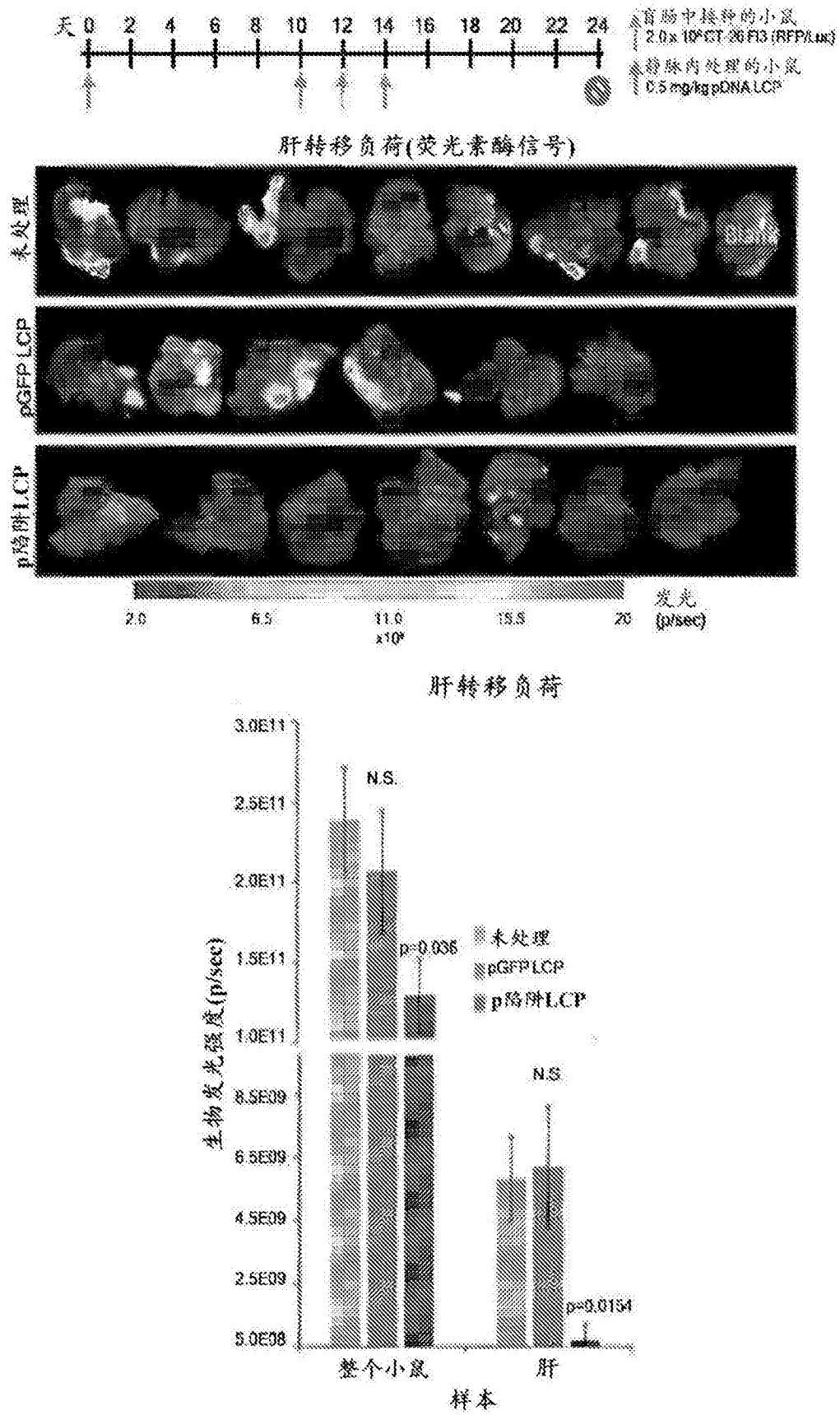


图6A

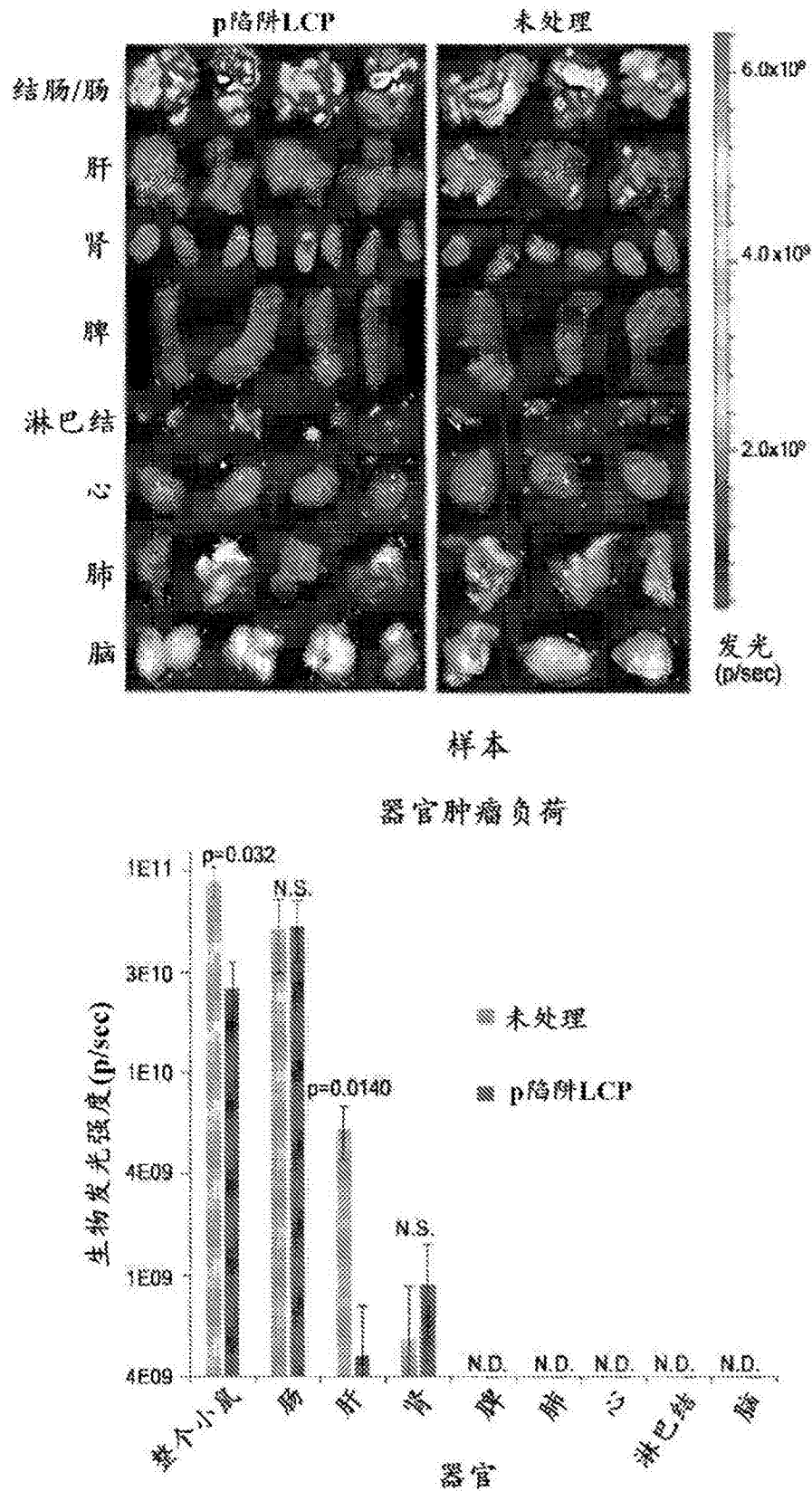


图6B

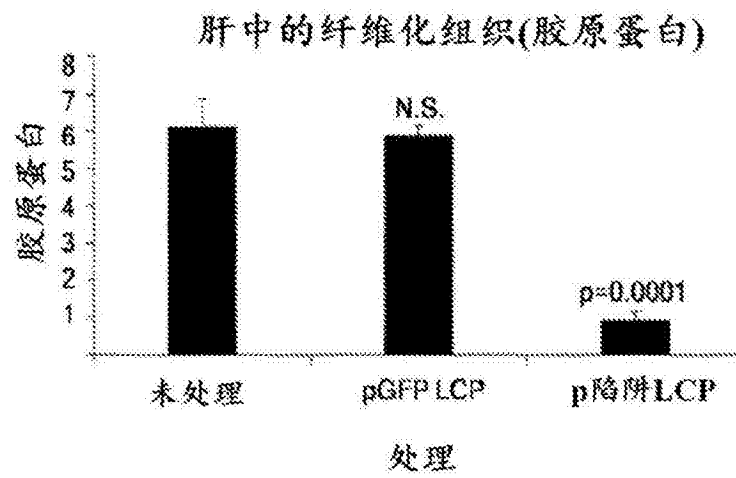
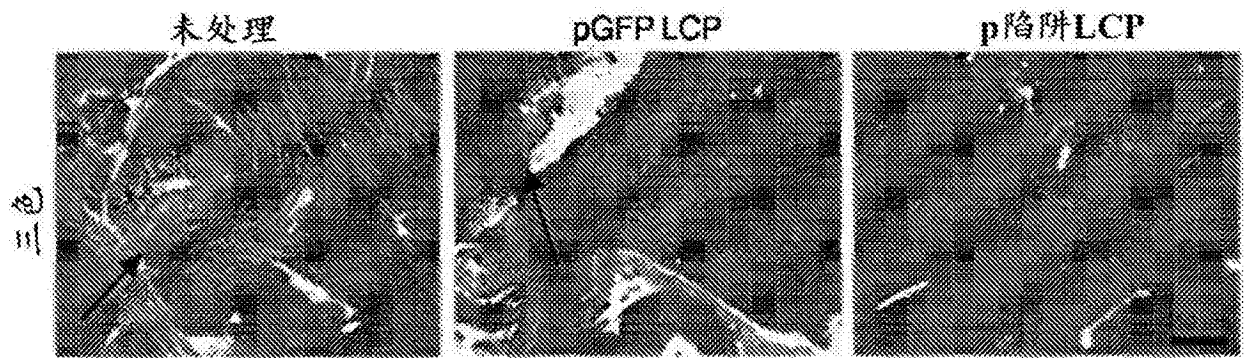


图6C

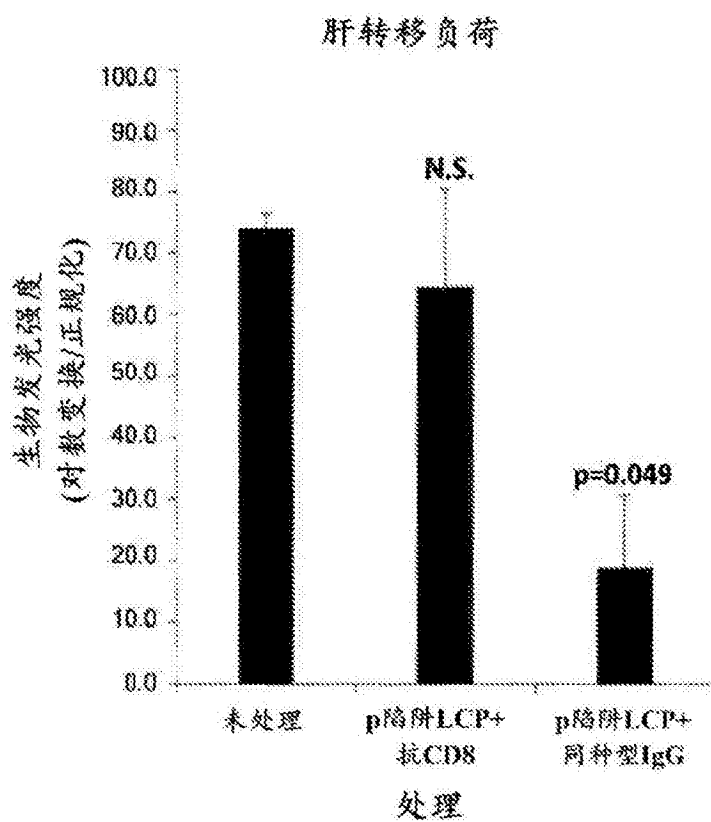
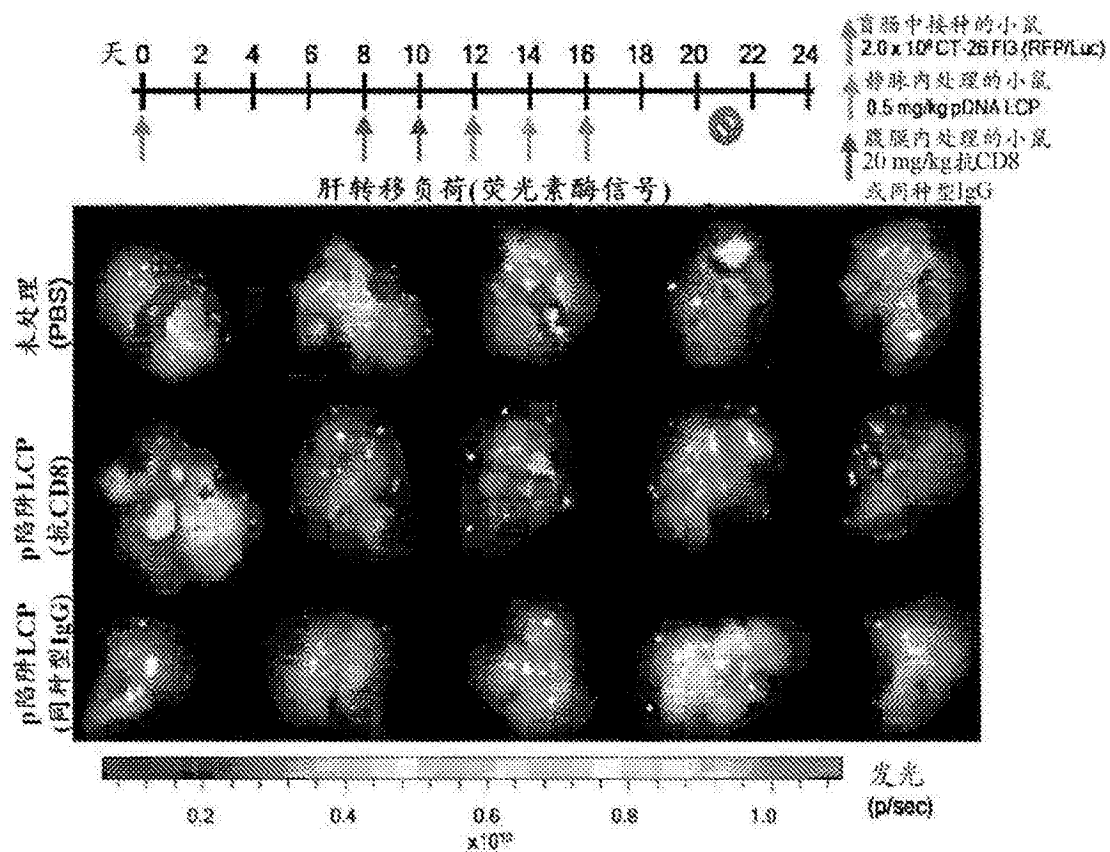


图7

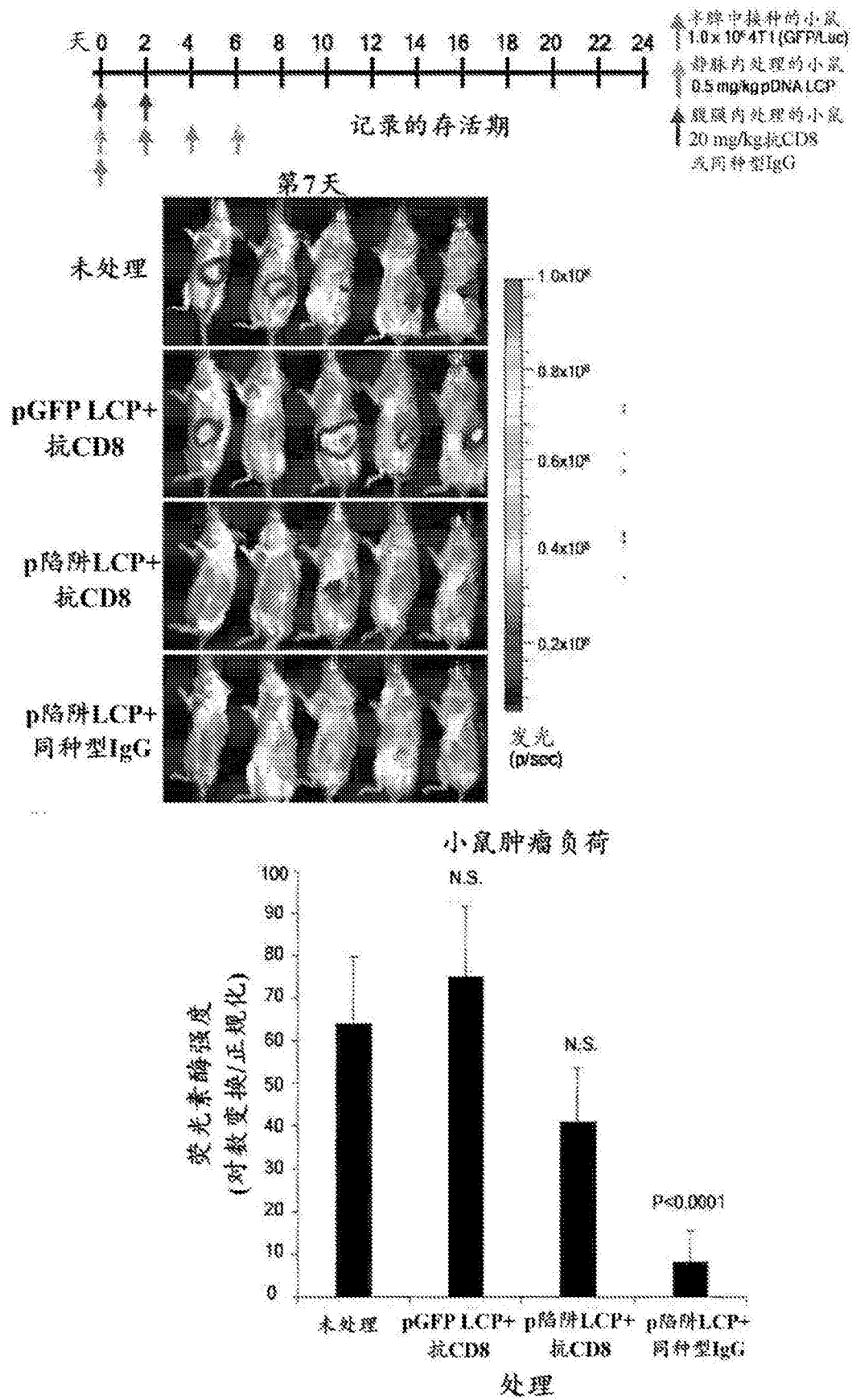


图8A

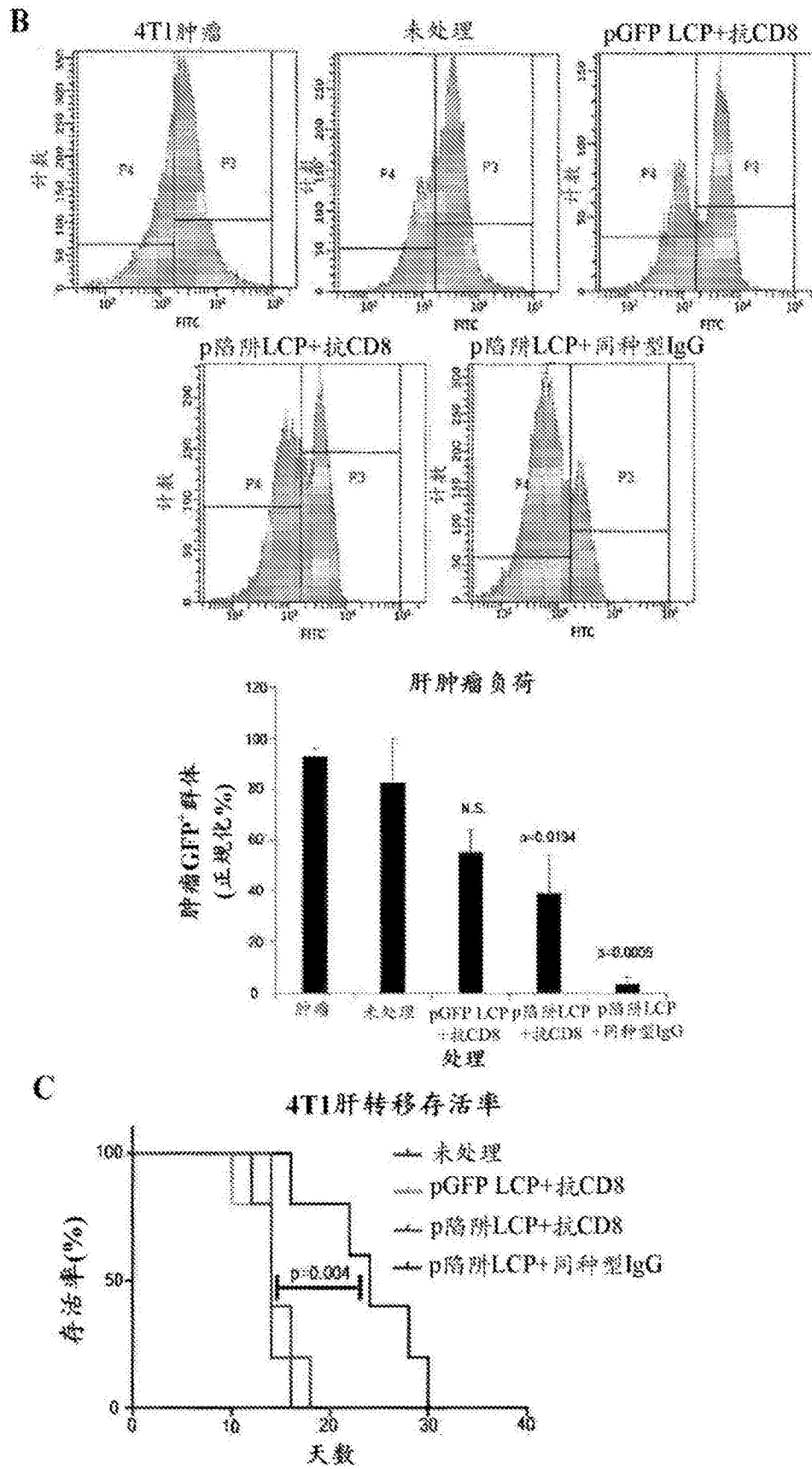


图8B-C

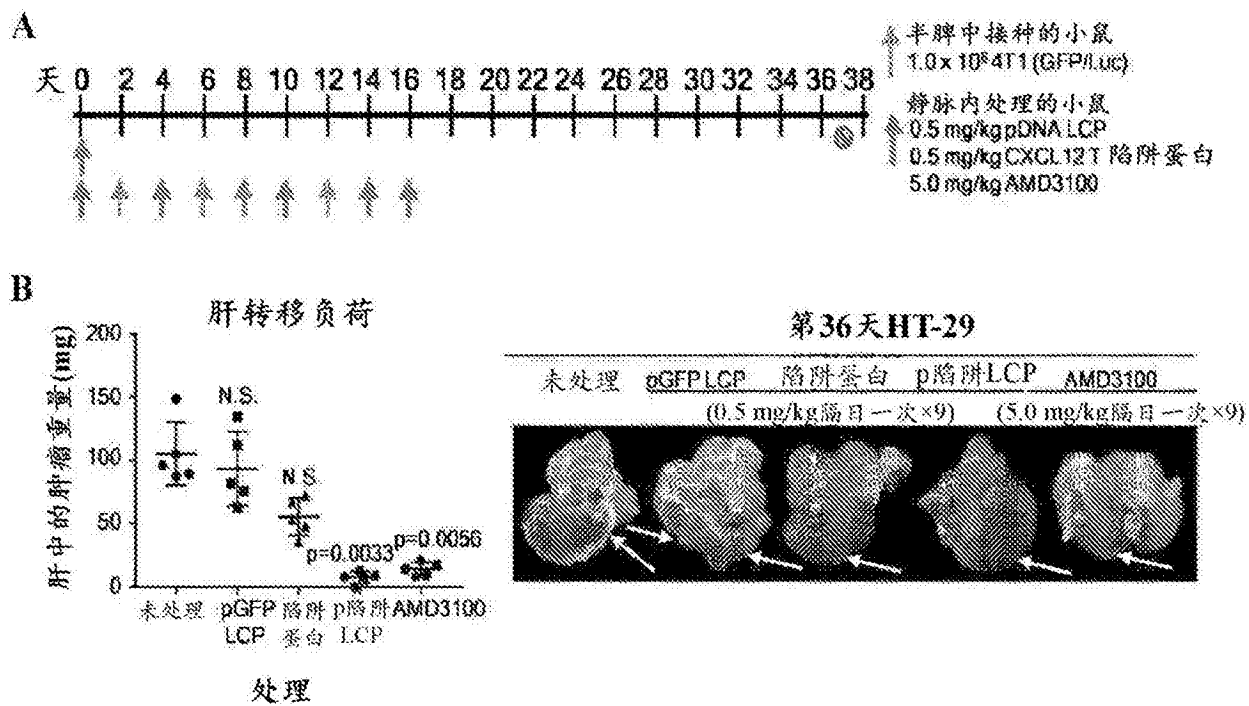


图9A-B

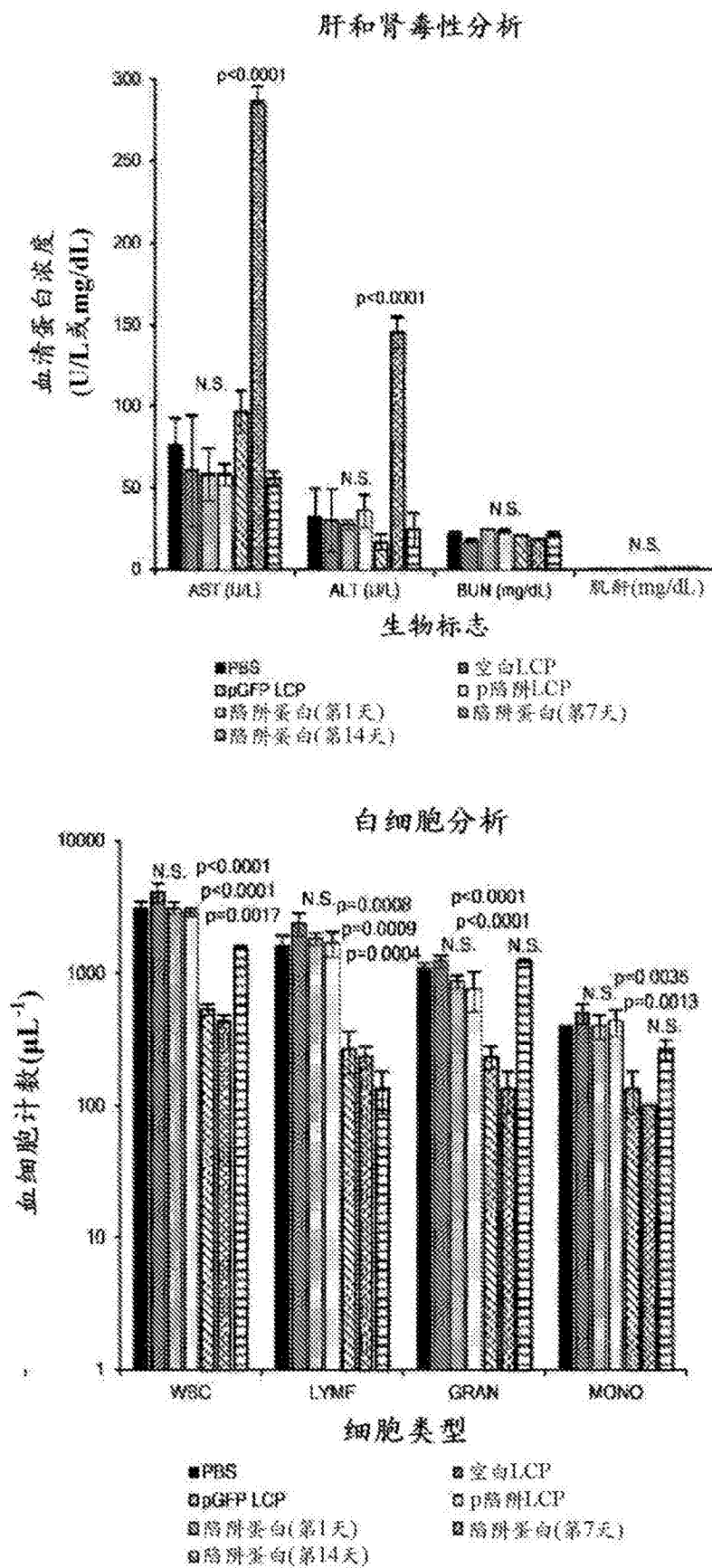


图10A

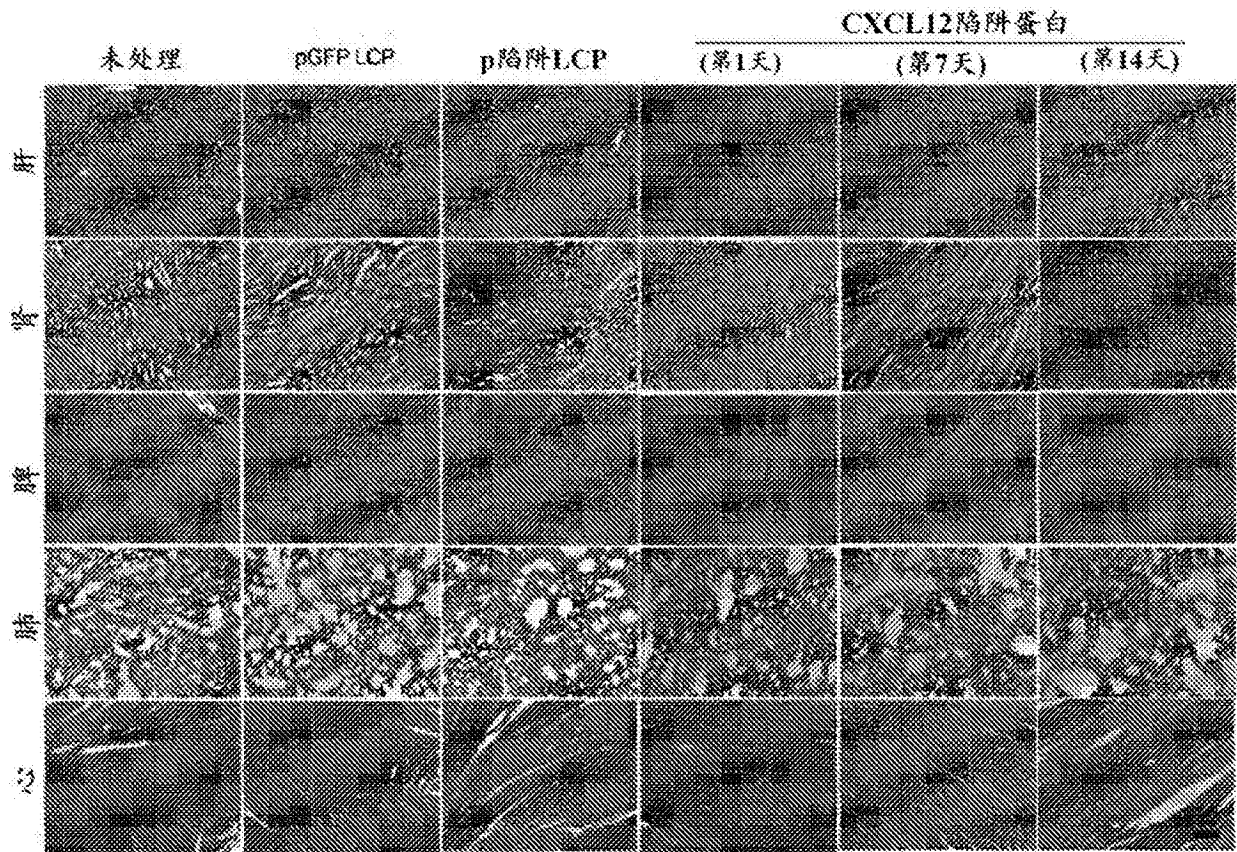


图10B

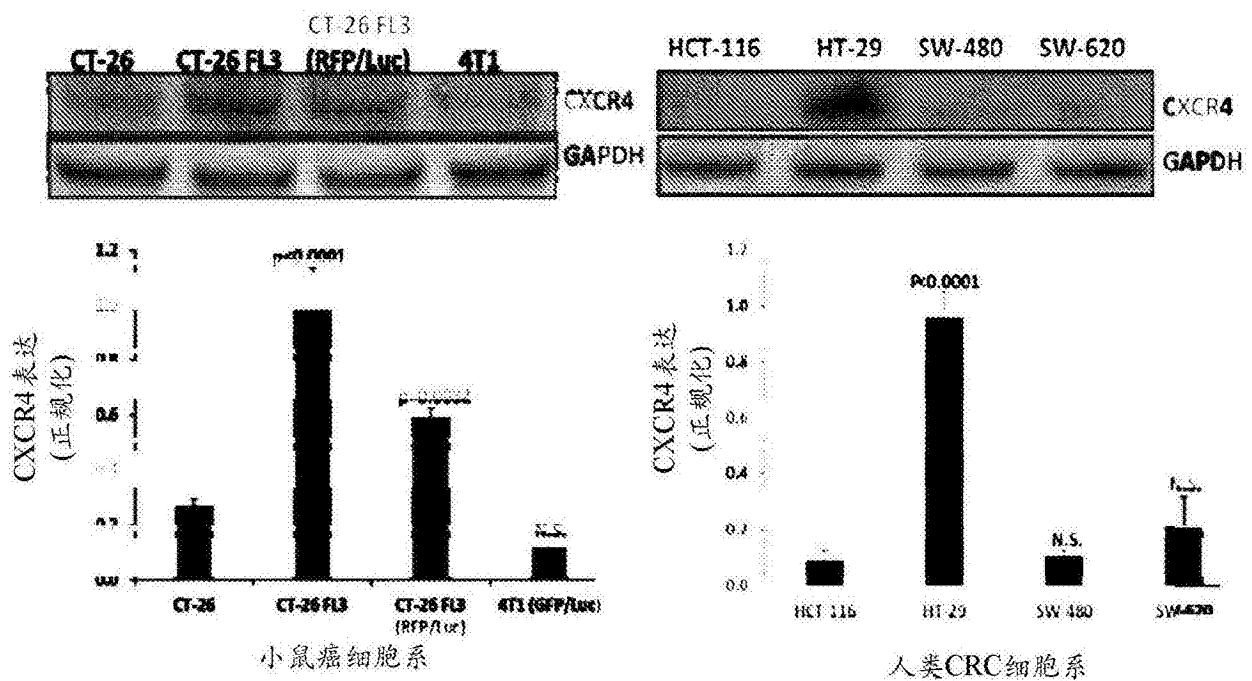


图11

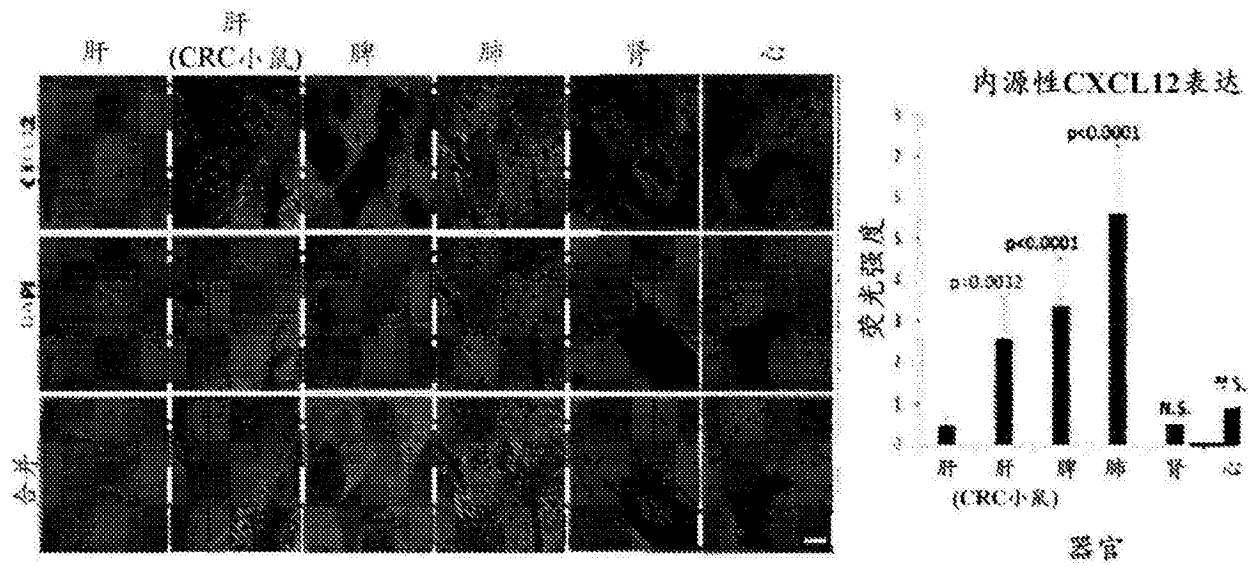


图12

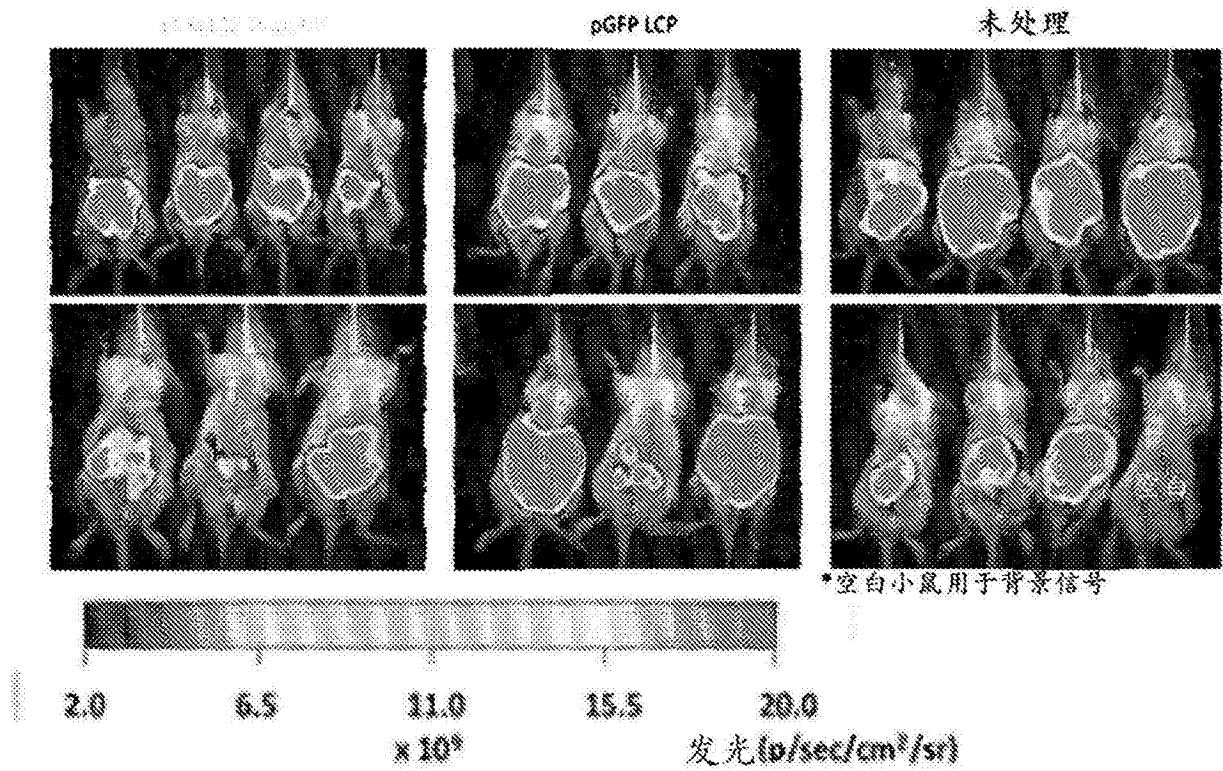


图13

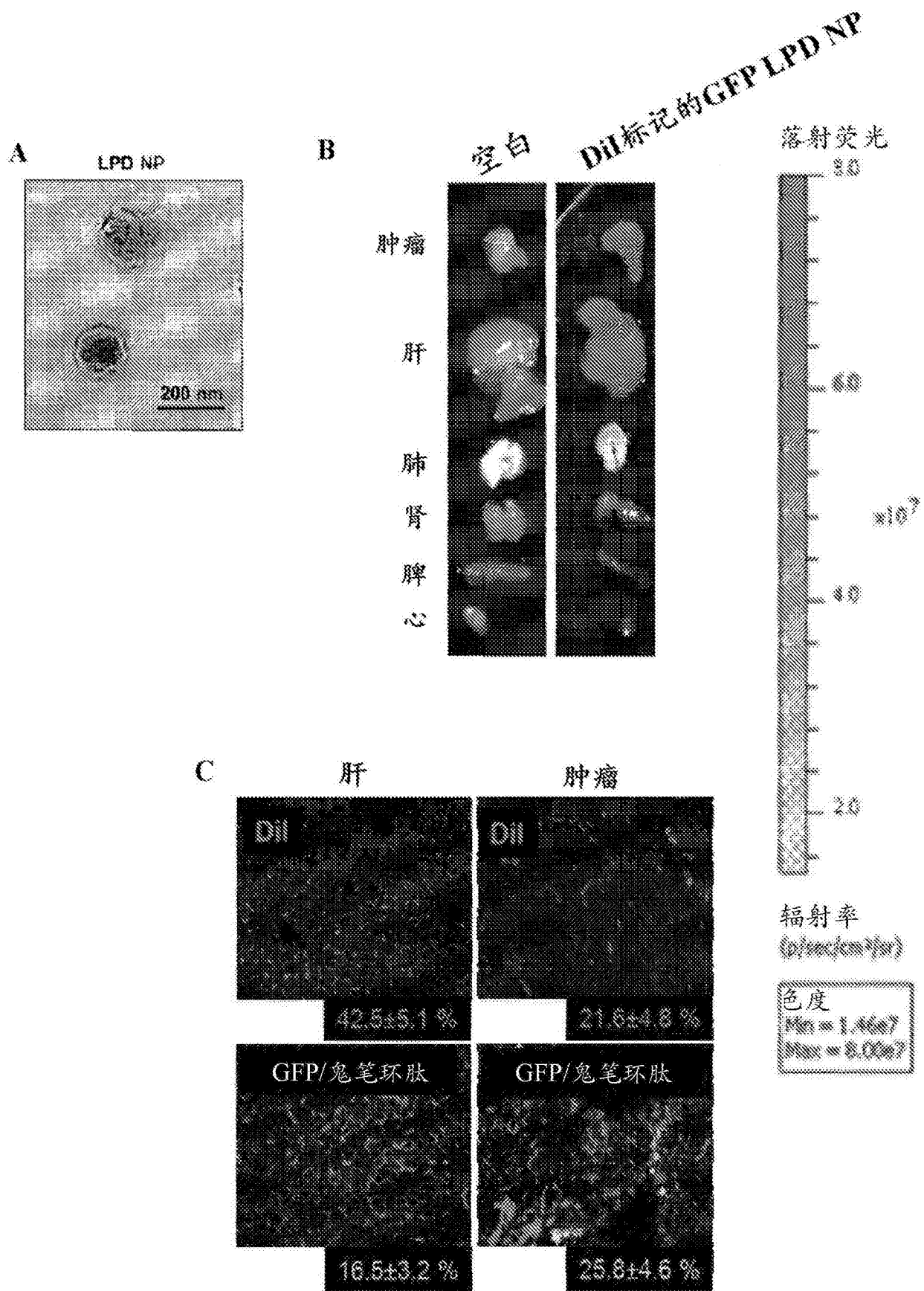


图14A-C

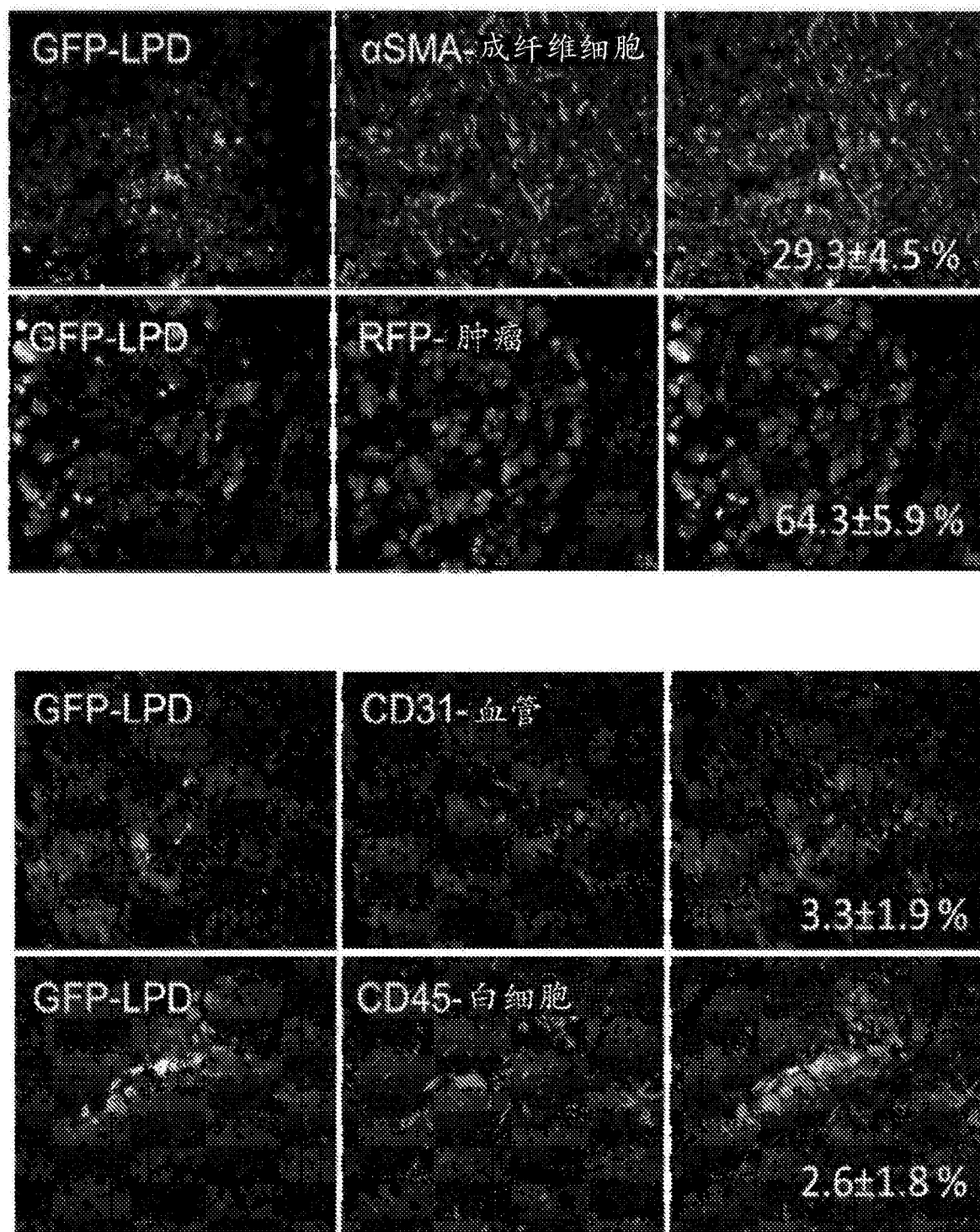


图14D

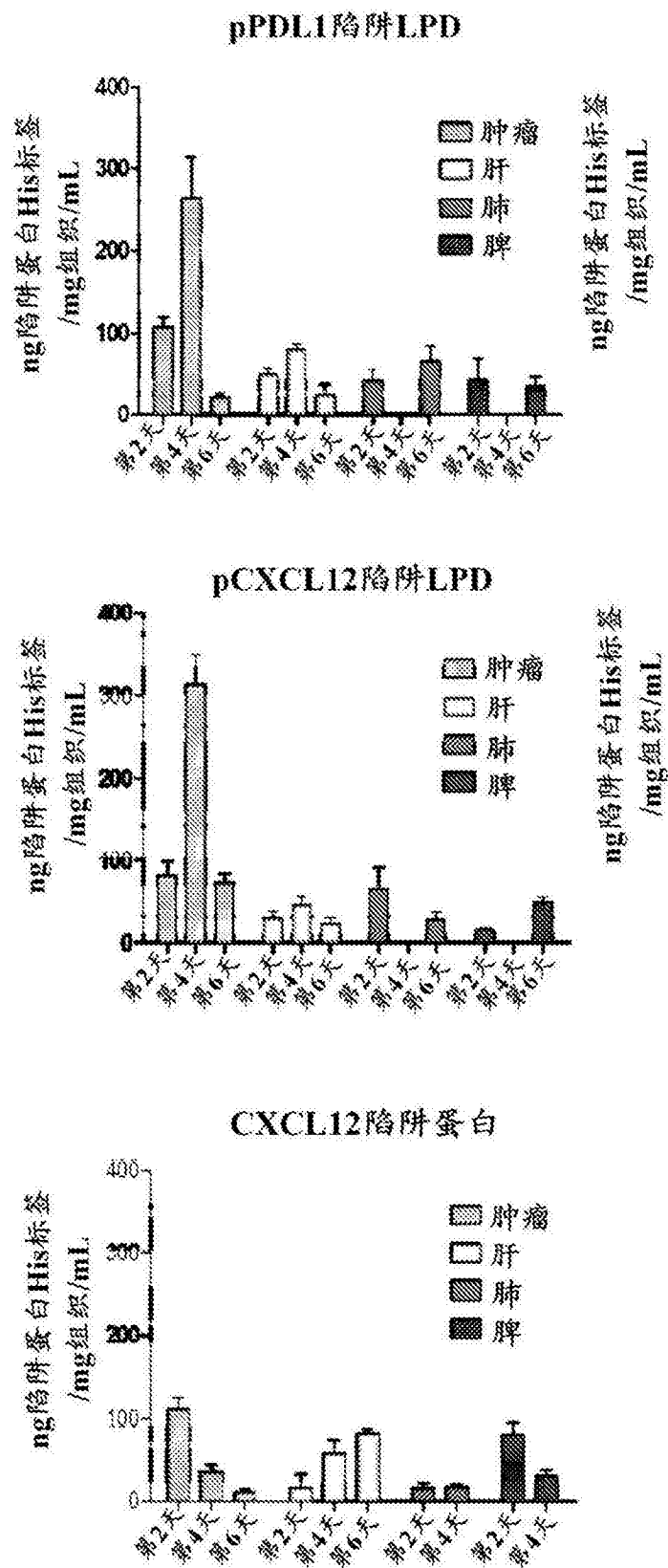


图14E

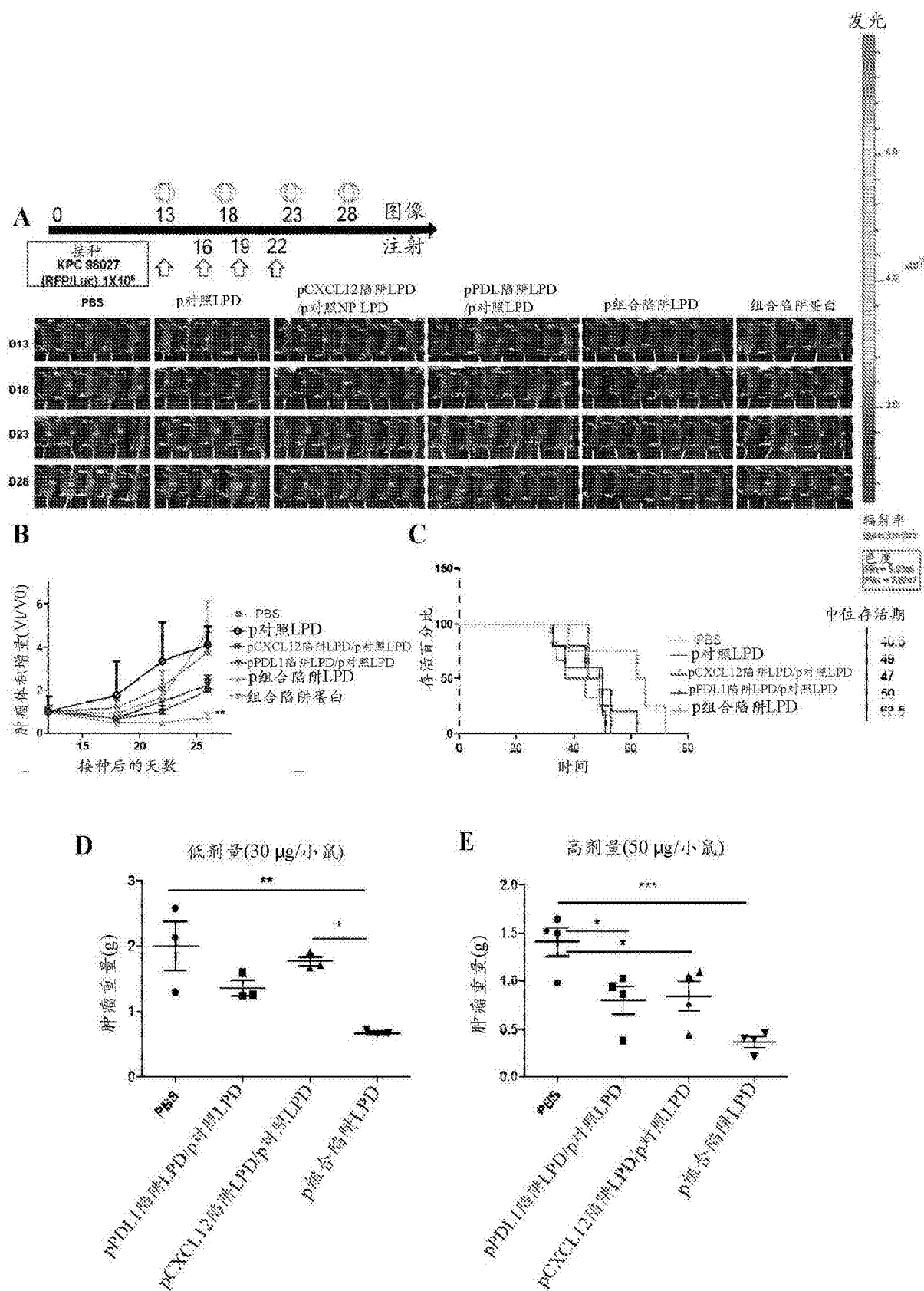
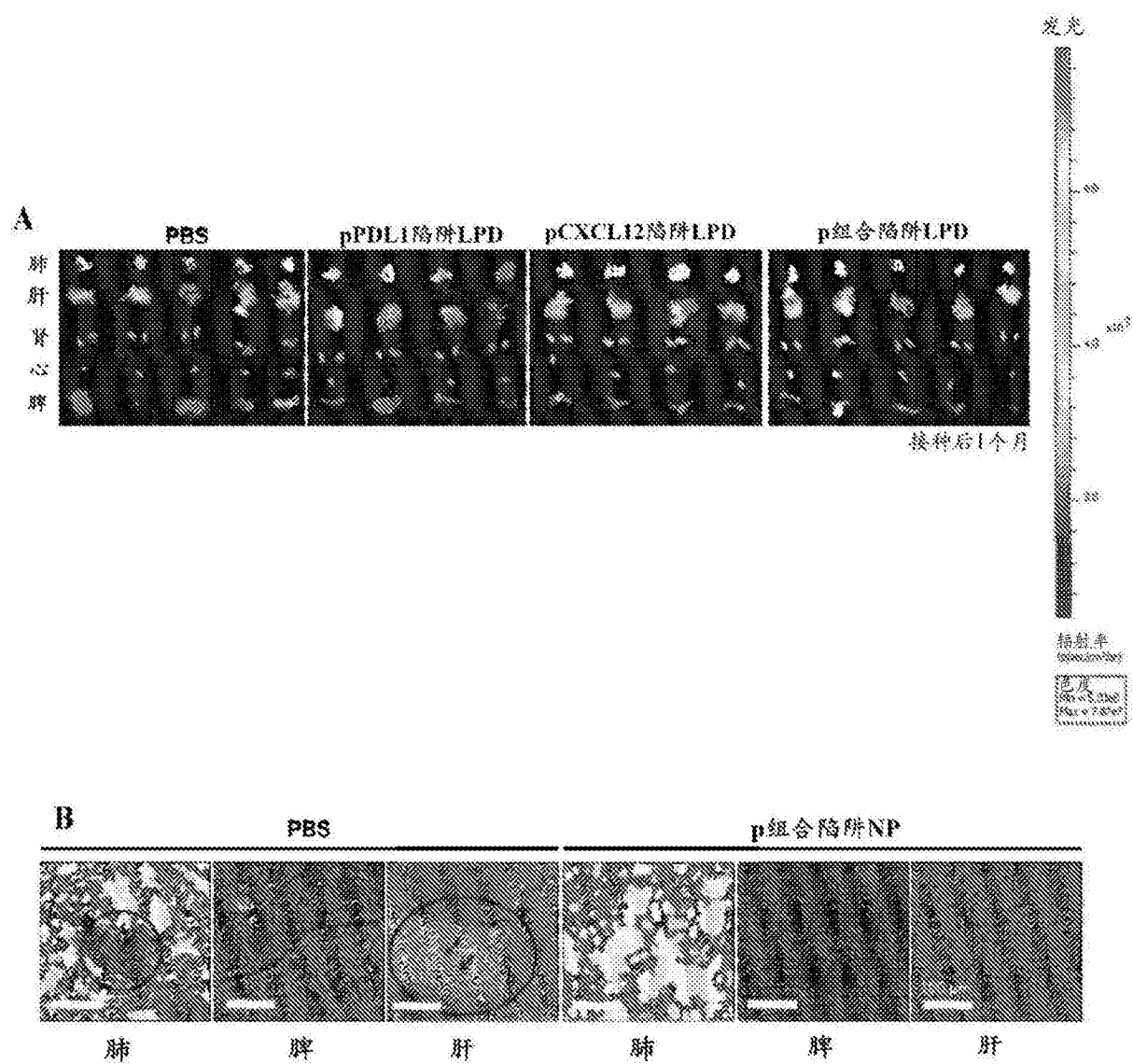


图15A-E



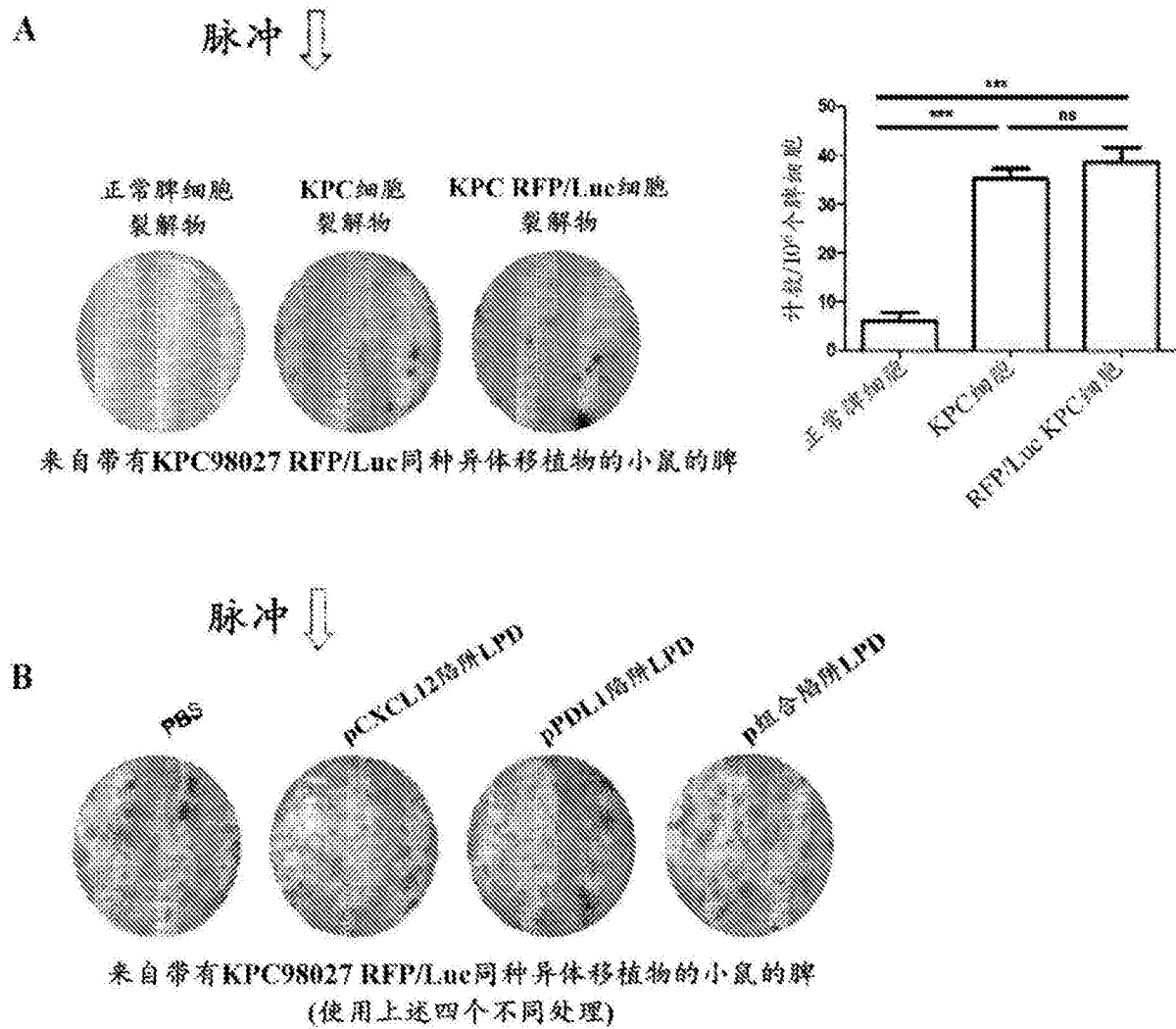


图17A-B

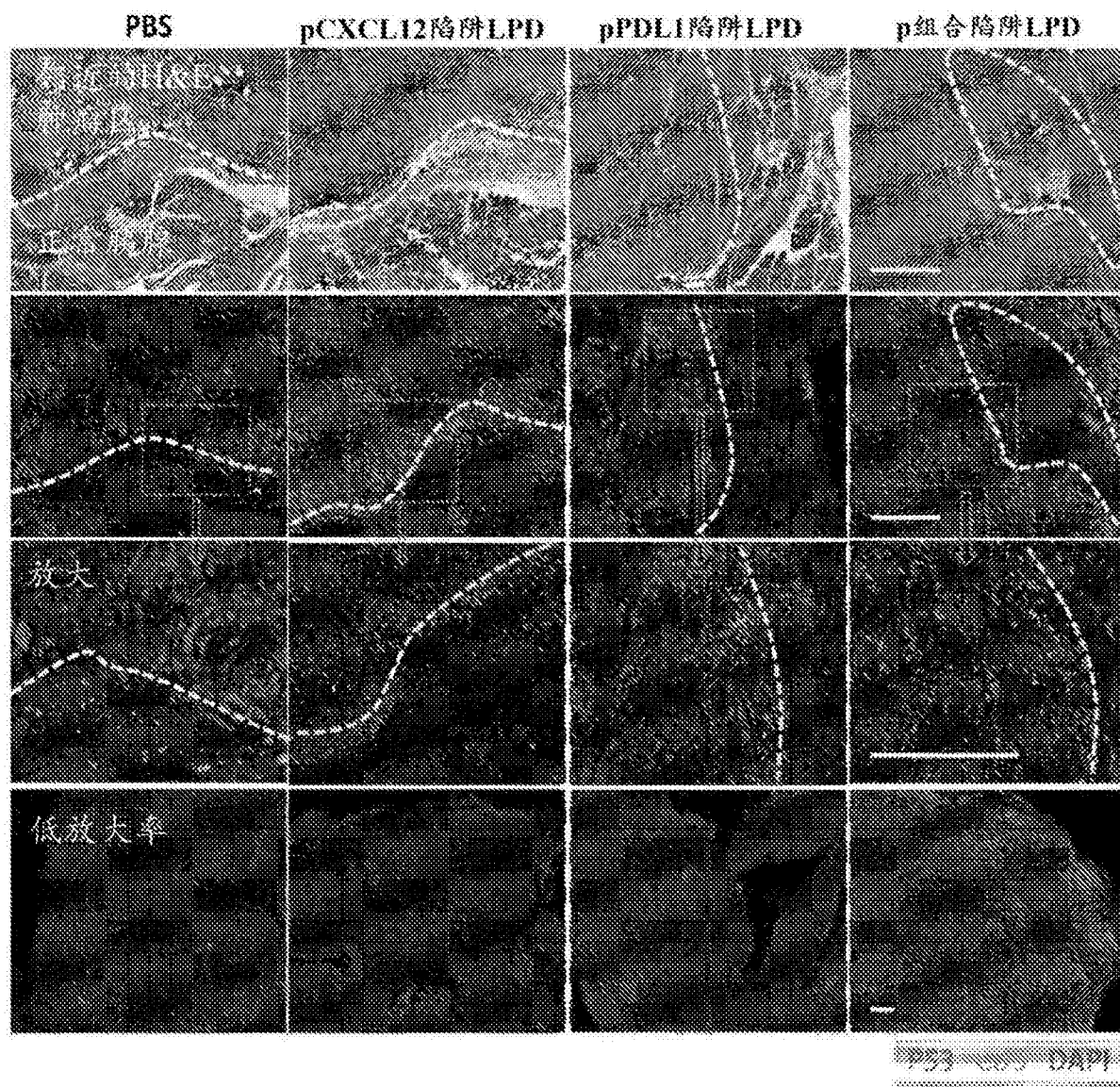


图18A

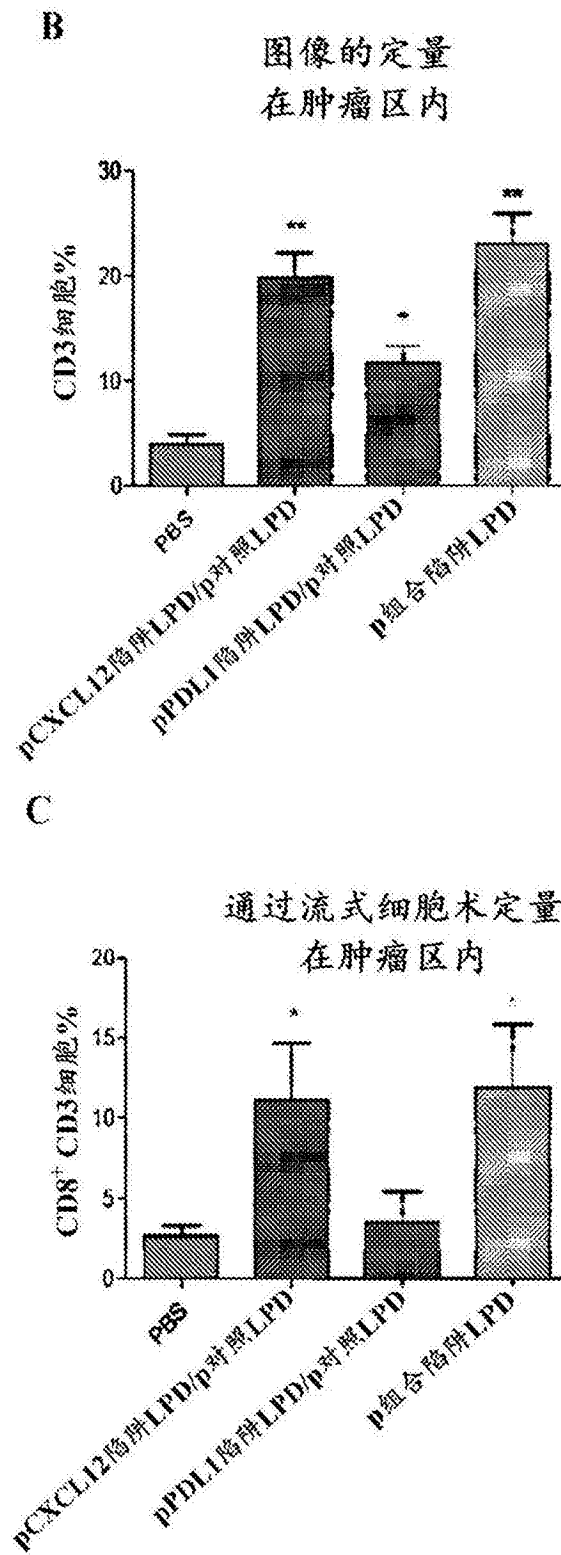


图18B-C

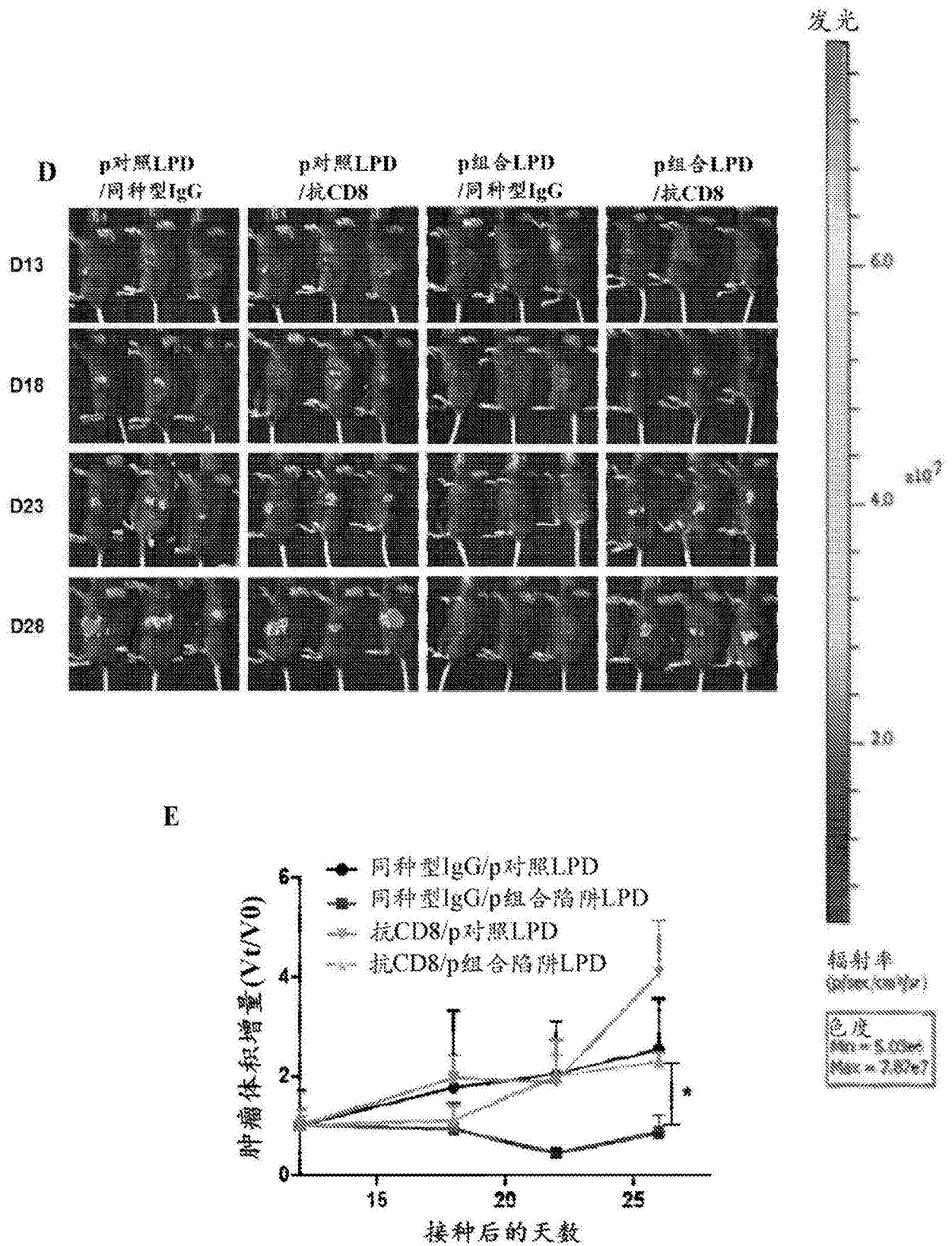


图18D-E

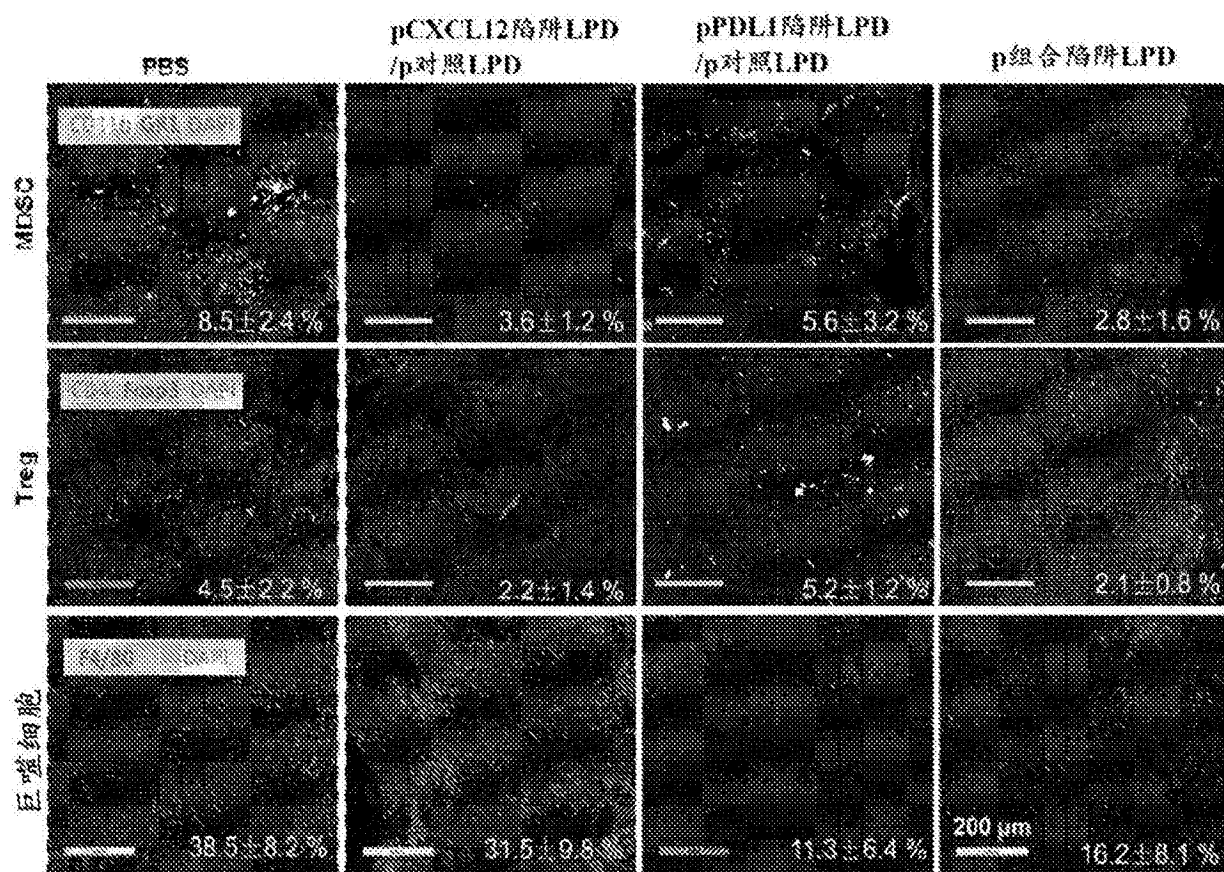


图19A

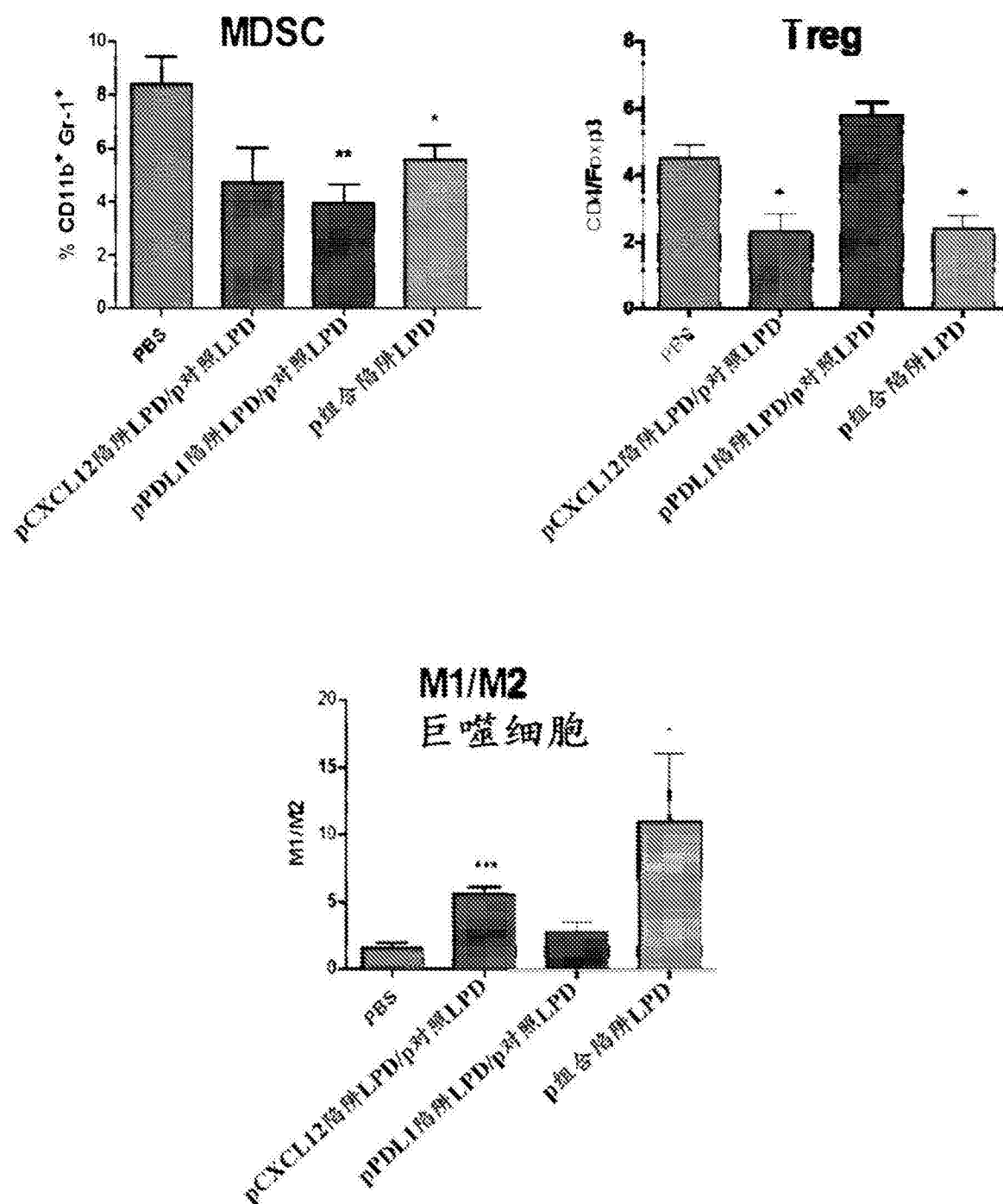


图19B

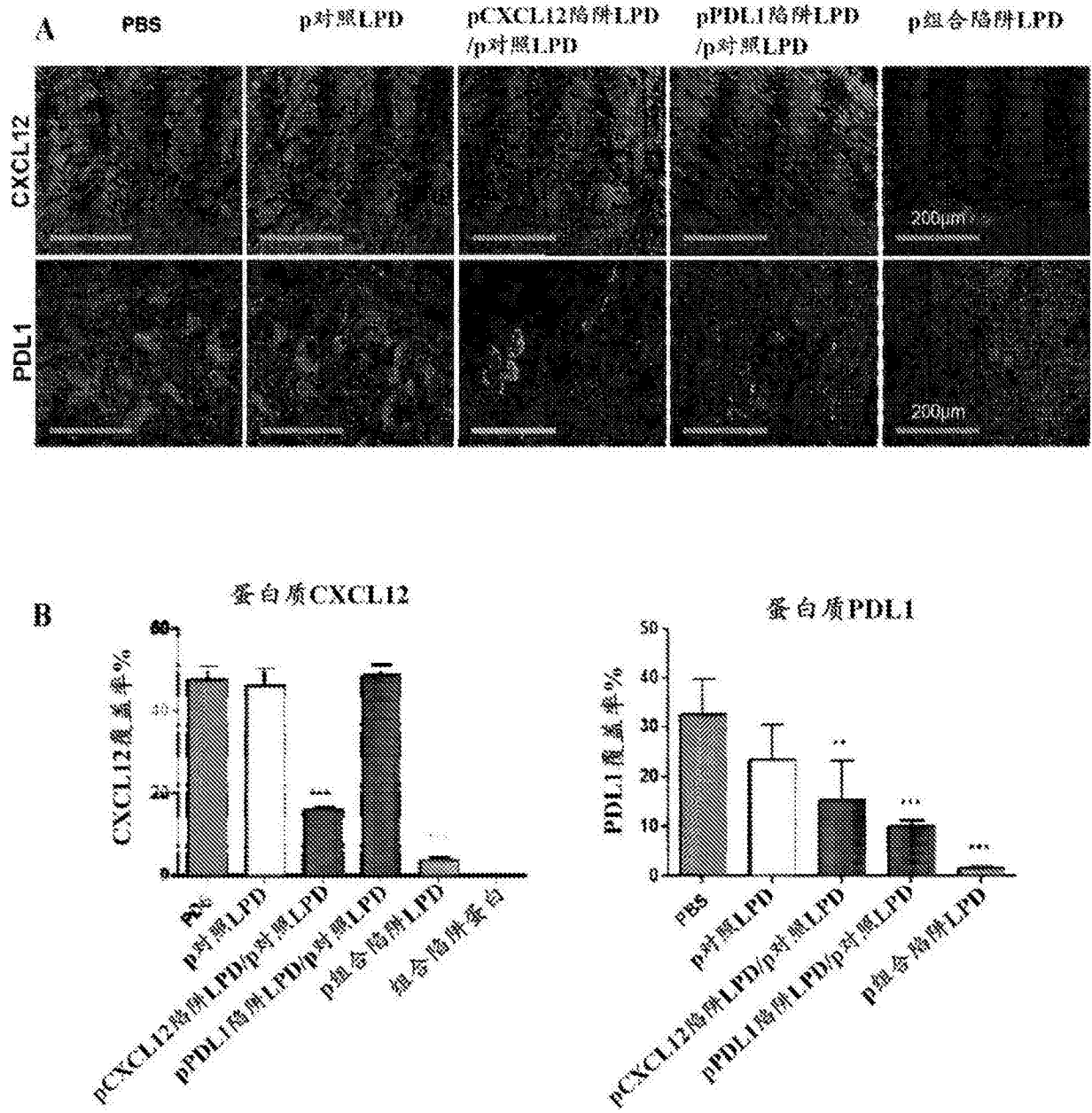


图20A-B

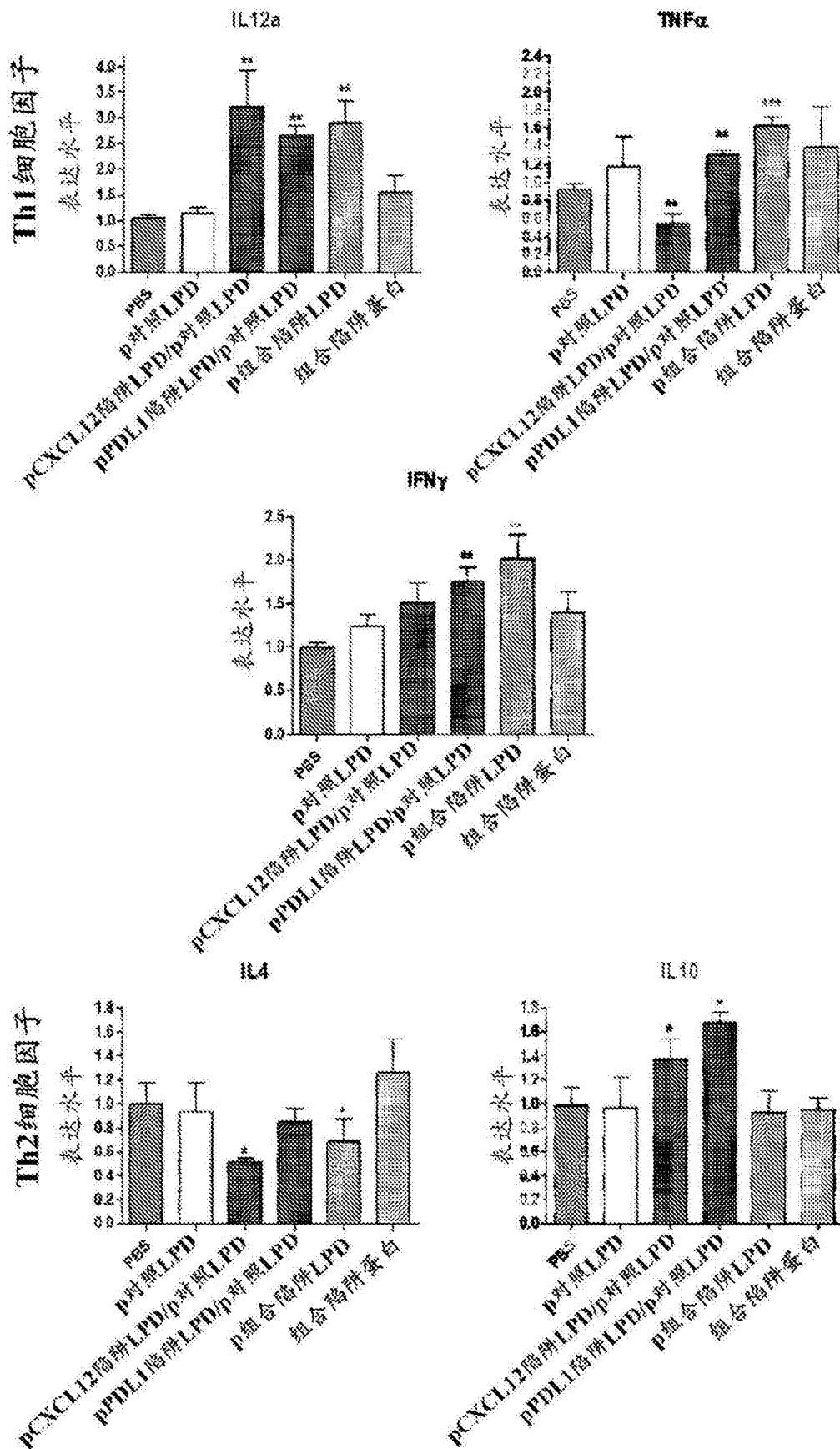


图21

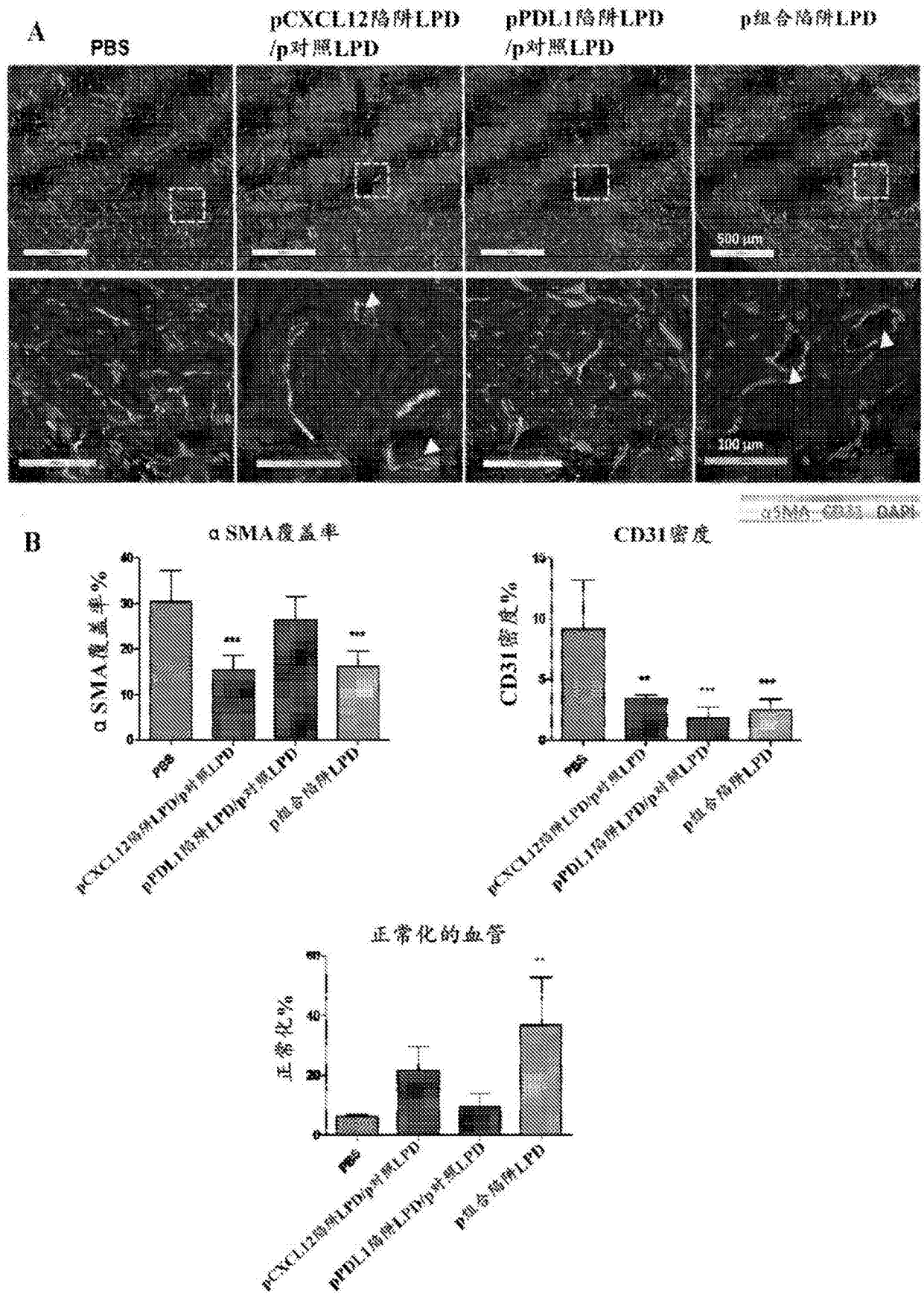


图22A-B

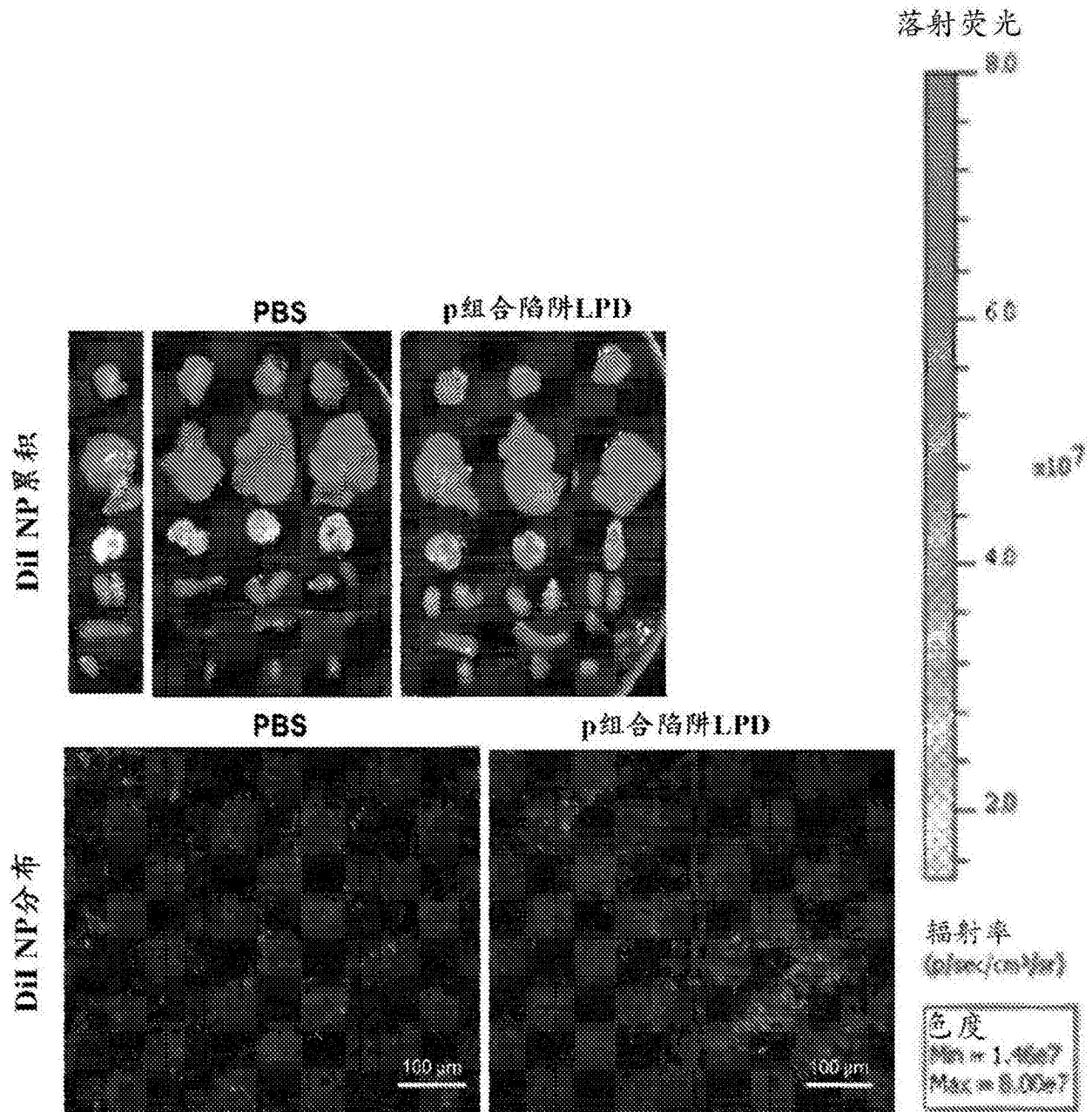


图23

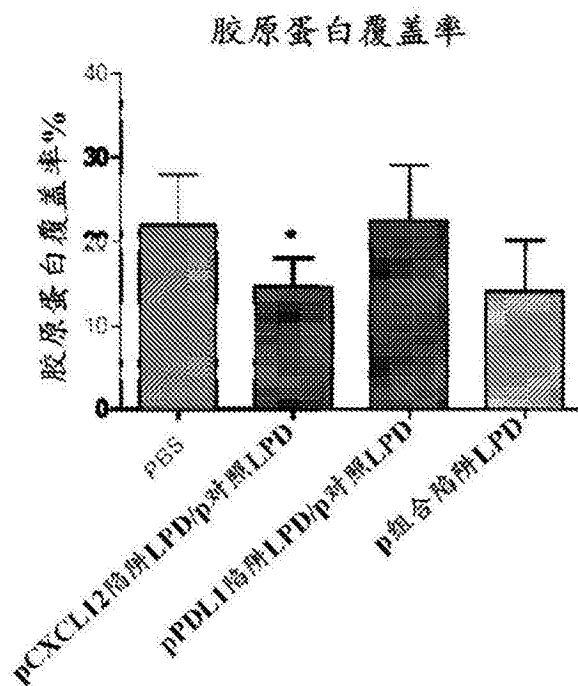
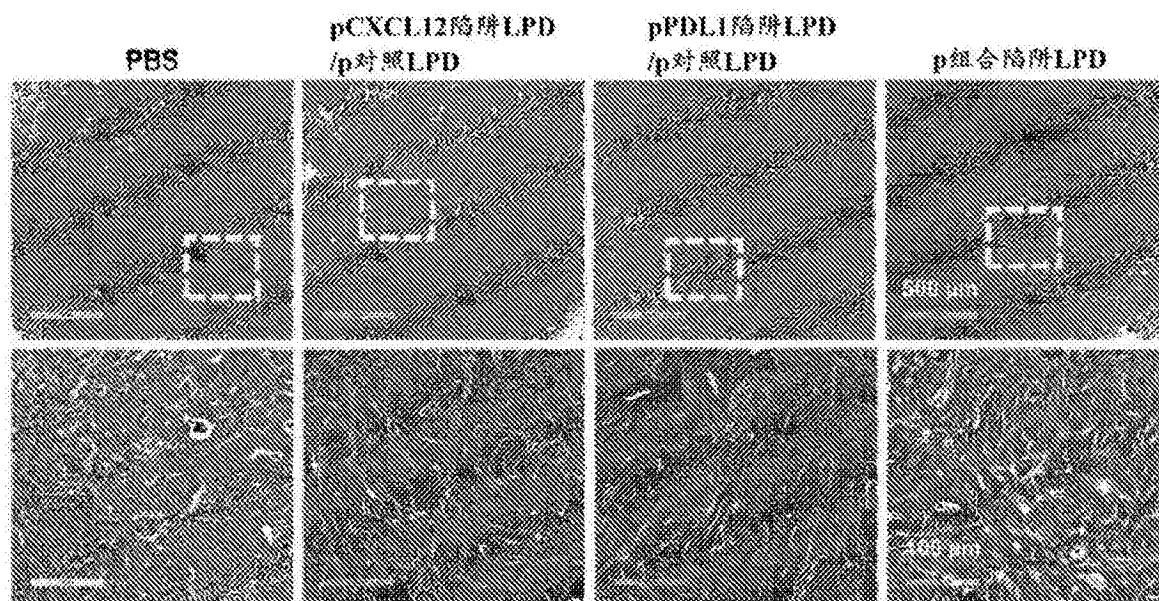


图24

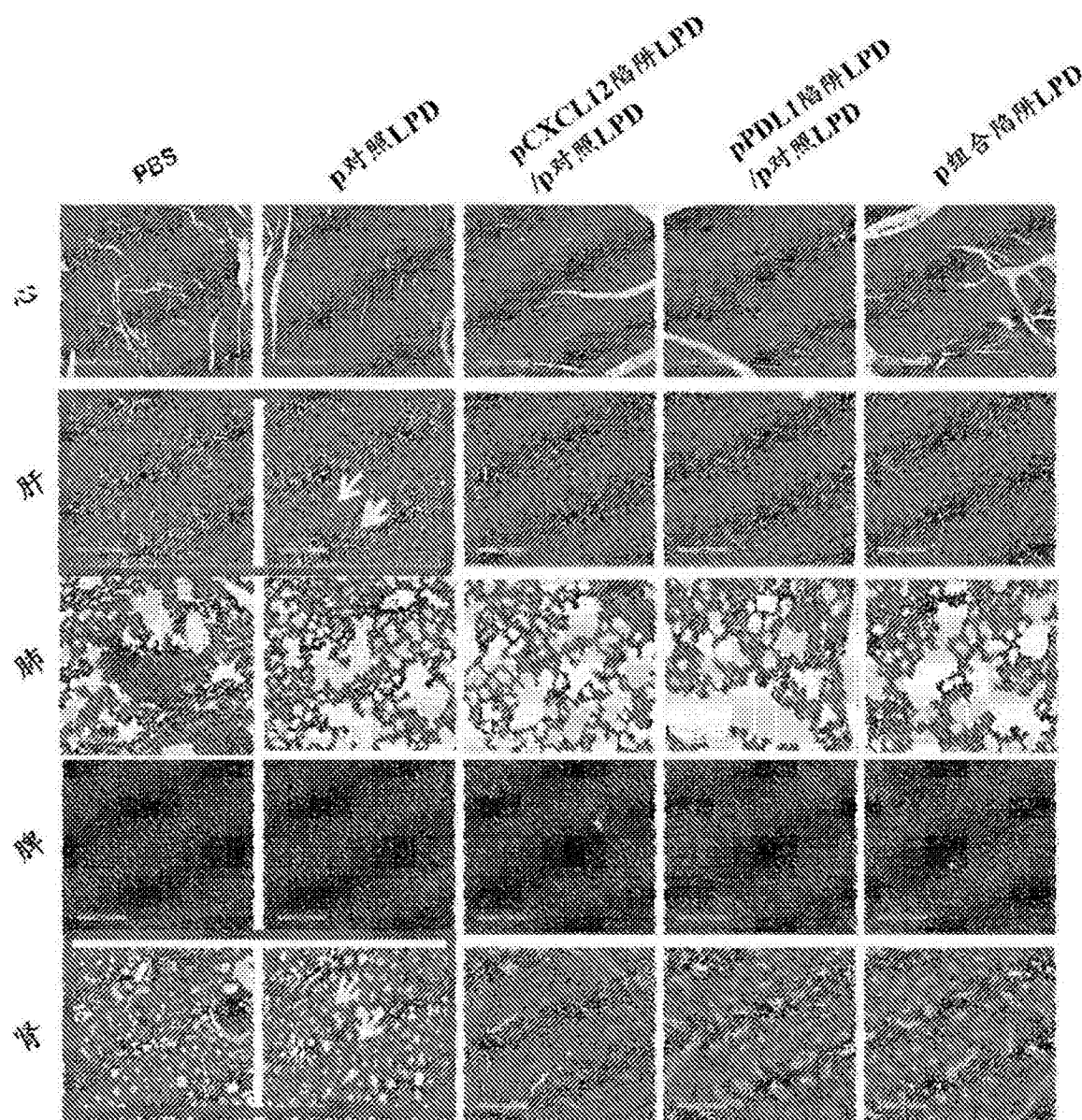


图25