



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105451818 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201480043580. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 06. 05

A61P 3/14(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 3/08(2006. 01)

61/831, 515 2013. 06. 05 US

A61P 5/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 1/18(2006. 01)

2016. 02. 01

A61K 31/592(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/041063 2014. 06. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/197680 EN 2014. 12. 11

(71) 申请人 萨克生物研究学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·谢尔曼 M·道恩斯

R·M·埃文斯

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 曲蕾 张广育

权利要求书2页 说明书57页

序列表23页 附图35页

(54) 发明名称

治疗涉及CXCL12活性的疾病的维生素D受体激动剂

(57) 摘要

本文提供了通过给予维生素D受体激动剂(例如维生素D、维生素D类似物、维生素D前体和维生素D受体激动剂前体)来治疗和预防胰腺炎(例如胰高血糖素样肽(GLP)激动剂(例如GLP-1激动剂,例如Byetta®)诱导的胰腺炎)的方法。在一些实例中,所述受试者患有糖尿病,例如2型糖尿病。

1. 一种降低C-X-C基序配体12(CXCL12)的生物学活性的方法,包括:使表达CXCL12的星形细胞与治疗有效量的一种或多种维生素D受体(VDR)激动剂接触,从而降低CXCL12的生物学活性。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述CXCL12的生物学活性是以下中的一种或多种: CXCL12核酸表达、CXCL12蛋白表达、所述星形细胞的CXCL12蛋白分泌、CXCL12蛋白稳定性、CXCL12与肿瘤细胞的结合、肿瘤细胞中CXCR4信号转导通路的活化以及CXCL12阻止T细胞与肿瘤细胞的结合。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法是体外方法,并且使所述星形细胞与治疗有效量的所述一种或多种VDR激动剂接触包括使表达所述CXCL12的培养的星形细胞与所述一种或多种VDR激动剂接触。

4. 权利要求1或2所述的方法,其中所述方法是体内方法,并且使所述星形细胞与治疗有效量的所述一种或多种VDR激动剂接触包括对受试者给予所述一种或多种VDR激动剂。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述方法是治疗受试者中的肿瘤的方法,并且所述方法还包括对受试者给予治疗有效量的一种或多种化疗剂或生物学药剂。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中:

所述肿瘤是胰腺导管腺癌,并且所述一种或多种化疗剂包括氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼和蛋白结合的紫杉醇中的一种或多种;

所述肿瘤是肺癌,并且所述一种或多种化疗剂包括甲氨蝶呤、吉西他滨、紫杉醇、顺铂、阿扎胞苷、恩替诺特中的一种或多种;

所述肿瘤是肾细胞癌,并且所述一种或多种化疗剂或生物学药剂包括依维莫司、阿地白介素、阿伐单抗、阿昔替尼、贝伐单抗、甲苯磺酸索拉菲尼、盐酸帕唑帕尼、苹果酸舒尼替尼和替西罗莫司中的一种或多种;

所述肿瘤是前列腺癌,并且所述一种或多种化疗剂或生物学药剂包括乙酸阿比特龙、比卡鲁胺、卡巴他赛、地加瑞克、地诺单抗、艾西他奇、恩杂鲁胺、乙酸戈舍瑞林、乙酸亮丙瑞林、泼尼松、二氯化镭223、西普亮奇-T和多西他赛中的一种或多种;

所述肿瘤是胆管的癌症,并且所述一种或多种化疗剂或生物学药剂包括5-氟尿嘧啶、亚叶酸、吉西他滨、吉西他滨+顺铂、伊立替康、卡培他滨和埃罗替尼中的一种或多种;或

所述肿瘤是肝细胞癌,并且所述一种或多种化疗剂包括索拉菲尼、多柔比星、吉西他滨、顺铂、干扰素、多柔比星和氟尿嘧啶中的一种或多种。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述肿瘤是胰腺导管腺癌,并且所述一种或多种化疗剂包括(a)吉西他滨、(b)吉西他滨和埃罗替尼,或(c)吉西他滨和蛋白结合的紫杉醇。

8. 一种治疗胰腺导管腺癌的方法,包括:

给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂至患有胰腺导管腺癌的哺乳动物受试者;以及

对所述哺乳动物受试者给予治疗有效量的选自由氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼、蛋白结合的紫杉醇或其组合组成的组的化疗剂,从而治疗所述受试者中的胰腺导管腺癌。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中:

所述一种或多种VDR激动剂是卡泊三醇或帕立骨化醇;并且

所述化疗剂包括(a)吉西他滨、(b)吉西他滨和埃罗替尼,或(c)吉西他滨和蛋白结合的

紫杉醇。

10. 根据权利要求5至10中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种VDR激动剂在所述一种或多种化疗剂或生物学药剂之前给予或与其同时给予。

11. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述方法是治疗或预防胰腺炎的方法, 其中给予所述一种或多种VDR激动剂的所述受试者正在接受高血糖素肽样(GLP)激动剂。

12. 一种治疗或预防胰腺炎的方法, 包括:

给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂至哺乳动物受试者, 其中所述受试者正在接受高血糖素肽样(GLP)激动剂, 从而治疗或预防所述受试者中的胰腺炎。

13. 根据权利要求11或12所述的方法, 其中所述受试者患有2型糖尿病。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的方法, 其中所述受试者正在接受用于治疗2型糖尿病的所述GLP-1激动剂。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的方法, 其中所述GLP-1激动剂是艾塞那肽、他司鲁泰、甘精胰岛素、吡格列酮、阿必鲁肽、利西拉肽、沙格列汀、利拉鲁肽、利拉利汀、阿格列汀、西他列汀或二甲双胍/西他列汀。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法, 其中所述VDR激动剂是维生素D、维生素D前体、维生素D类似物、维生素D受体配体、维生素D受体激动剂前体或其组合。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述维生素D前体是25-羟基-D₃(25-OH-D₃)(骨化二醇); 维生素D₃(胆钙化醇); 维生素D₂(麦角钙化甾醇)或其组合。

18. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述维生素D受体配体是1, α 25-二羟基维生素D₃(骨化三醇)。

19. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 其中所述VDR激动剂是合成的VDR激动剂。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述合成的VDR激动剂是以下中的一种或多种: KH1060(来沙骨化醇)、BXL-628(艾洛骨化醇)、MC1288、CB966、B\CB 1093、GS 1558、TX527、ED-71(艾德骨化三醇)、BXL-01-0029、度骨化醇、EB1089、帕立骨化醇和卡泊三醇。

21. 根据权利要求4至20中任一项所述的方法, 其中给予所述一种或多种VDR激动剂包括经口、腹膜内或静脉内给予所述一种或多种VDR激动剂。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种VDR激动剂是卡泊三醇或帕立骨化醇。

23. 根据权利要求4至22中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人受试者。

治疗涉及CXCL12活性的疾病的维生素D受体激动剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年6月5日提交的美国临时申请号61/831,515的优先权,其通过引用整体纳入本文。

[0003] 政府支持的确认

[0004] 本发明由美国国立卫生研究院资助的HL105278、DK0577978、DK090962、CA014195和ES010337下以及国家研究基金资助的T32-CA009370下的政府支持完成。政府在本发明中享有一些权利。

技术领域

[0005] 本申请涉及通过给予一种或多种维生素D受体(VDR)激动剂来治疗或预防疾病的方法,所述疾病例如其中存在对并列星形细胞的活化的胰腺炎和癌症。

[0006] 政府支持的确认

[0007] 本发明在由国家研究基金资助的T32-CA009370和美国国立卫生研究院资助的HL105278、DK0577978、DK090962、CA014195和ES010337下的政府支持下完成。政府在本发明中享有一些权利。

背景技术

[0008] 肿瘤间质中的癌症相关的成纤维细胞样细胞(CAF)已经被示出在人癌症(cancer)的最常见形式上皮癌(carcinoma)的起始和进展上发挥了重要的影响(Bhowmick等,2004; Kalluri和Zeisberg,2006; Pietras和Ostman,2010; Rasanen和Vaheri,2010; Shimoda等,2010)。胰腺导管腺癌(PDA)特别地被显著的间质间隔限定,并且属于CAF的许多特征促进胰腺癌进展并且妨碍治疗效力(Mahadevan和Von Hoff,2007)。CAF部分地通过旁分泌活化肿瘤细胞中的促存活通路来增强同种异体移植模型中PDA生长,并且肿瘤间质相互作用的抑制限制了肿瘤进展(Hwang等,2008; Ijichi等,2011; Vonlaufen等,2008)。此外,与PDA有关的致密的细胞外基质(ECM)堵塞瘤内血管,阻止化疗剂递送(Olive等,2009),由此导致了克服该间质“路障”的新思路(Jacobetz等,2012; Provenzano等,2012)。除了药物递送外,最近的证据表明,肿瘤间质在许多肿瘤类型中的固有耐药性,并且针对PDA产生了靶向肿瘤细胞和间质组分的治疗范式。虽然这些发现提示,PDA微环境中的CAF表示潜在的治疗靶标,但是对胰腺星形细胞(PSC)的支持肿瘤的特征、胰腺的肿瘤微环境中的主要成纤维细胞类型的理解仍然贫乏。

[0009] PSC是巢蛋白阳性的,并且是胰腺的固有脂质储存细胞,在正常的ECM反转中起重要作用(Apte等,1998; Phillips等,2003)。在健康的情况下,PSC处于静止状态,其特征是丰富的富含维生素A的胞质脂滴,以及低水平的ECM组分产生(Apte等,2012)。在胰腺损伤期间,PSC被细胞因子、生长因子、氧化剂或代谢应力活化,并转分化成纤维细胞样细胞(Masamune和Shimosegawa,2009)。活化的PSC失去它们的胞质脂滴,表达成纤维细胞活化标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA),获得增殖能力并合成丰富的ECM蛋白质。活化的PSC还获得

了在静止状态下被严格压制的扩展的分泌组(Wehr等,2011)。在慢性损伤的状况下,持久的PSC活化导致病理学基质分泌,引起纤维化,制造对治疗的物理屏障。此外,活化PSC与胰腺癌细胞的相辅相成的作用已经得到了逐渐增加的理解:胰腺癌细胞产生促进PSC活化的促有丝分裂因子和促纤维化因子,例如血小板衍生的生长因子(PDGF)、转化生长因子 β (TGF β)和音猬因子(SHH)(Apte和Wilson,2012;Bailey等,2008)。反过来,活化的PSC产生PDGF、胰岛素样生长因子1(IGF1)、结缔组织生长因子(CTGF)以及可促进癌细胞增殖、存活和迁移的其他因子(Apte和Wilson,2012;Feig等,2012)。促进肿瘤的特征大大地受限于活化的PSC状态;如对肝星形细胞的最近工作所提示的,活化方法可为可逆的(Kisseleva等,2012)。但是,控制该方法的细胞因子和分子通路尚不明白。

发明内容

[0010] 发明人提出,可使用药理学方法将活化的癌相关PSC(CAPSC)恢复成静止状态,以阻止肿瘤-间质串扰和肿瘤生长,导致癌细胞定向的化学疗法的增强的临床效力。进行对小鼠PSC和人PSC的RNA-Seq分析,以确定PSC活化标记,以及鉴定治疗靶标。该分析揭示了在所检查的所有活化阶段中PSC中的高水平的维生素D受体(VDR)表达。本文提供的数据示出,VDR充当PSC活化状态的主基因组调控子。在鼠胰腺炎模型中,VDR配体降低纤维化和炎症,并且反过来,Vdr $^{-/-}$ 小鼠自发地发展出胰腺纤维化。此外,VDR配体同时逐渐破坏PDA中的多个支持肿瘤的信号转导通路,增强共给予的化学毒性剂的效力,尽管VDR配体作为单一药剂具有可忽略的作用。这些结果一起凸显了影响间质相关的病理学(包括炎症、纤维化和癌症)的可广泛适用的策略。

[0011] 基于这些观察,提供了降低C-X-C基序配体12(CXCL12)的生物学活性的方法。例如,这样的方法可包括使星形细胞(例如表达CXCL12的细胞)与治疗有效量的一种或多种维生素D受体(VDR)激动剂接触,从而降低CXCL12的产生和分泌。在一个实例中,所述VDR激动剂是合成激动剂,例如不具有显著的高钙血症效果的VDR激动剂(例如帕立骨化醇或卡泊三醇)。在一些实例中,所述VDR激动剂降低CXCL12核酸表达、CXCL12蛋白表达、CXCL12分泌(例如,由星形细胞分泌)、CXCL12与肿瘤细胞的结合以及CXCL12阻止T-细胞与肿瘤细胞的结合中的一种或多种。这样的方法可在体外或体内进行。

[0012] 在一个实例中,使用降低CXCL12活性来治疗受试者中的肿瘤。例如,可给予这样的治疗至受试者,所述治疗包括治疗有效量的一种或多种VDR激动剂和治疗有效量的一种或多种化疗剂或生物药剂。所述治疗剂无需同时给予。例如,所述治疗剂可进行顺序给药。在一个实例中,所述VDR激动剂在使用所述治疗有效量的所述化疗剂或生物药剂之前给予。

[0013] 因此,本公开内容提供了用于治疗癌症的方法,所述癌症例如胰腺癌、肝癌、肾癌、肺癌、胆管癌或前列腺癌。这样的方法可包括给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂至患有所述癌症的哺乳动物受试者,以及给予治疗有效量的针对所述癌症的化学治疗和生物治疗(例如,对于胰腺导管腺癌而言,氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼、蛋白结合的紫杉醇或其组合)至所述哺乳动物受试者。

[0014] 在一个实例中,使用降低CXCL12的产生和分泌来治疗或预防胰腺炎。例如,可对患有胰腺炎或具有发展出胰腺炎的风险的受试者给予治疗,所述治疗包括治疗有效量的一种或多种VDR激动剂二者。在一个实例中,所述受试者是摄取/接受或以前摄取过高血糖素样

肽GLP)激动剂——例如GLP-1激动剂——的受试者。因此,在一些实例中,待治疗的受试者患有糖尿病,例如2型糖尿病。GLP激动剂的实例包括但不限于:艾塞那肽、他司鲁肽、甘精胰岛素、吡格列酮、阿必鲁肽、利西拉肽、沙格列汀、利拉鲁肽、利拉利汀、阿格列汀、西他列汀和二甲双胍/西他列汀。

[0015] 因此,本公开内容提供了用于治疗或预防胰腺炎——例如由GLP-1激动剂治疗所导致的胰腺炎——的方法。这样的方法可包括对患有胰腺炎或具有发展出胰腺炎的风险的哺乳动物受试者给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂。在一个实例中,所述受试者是摄取/接受或以前摄取/接受过GLP激动剂——例如GLP-1激动剂——的受试者。因此,在一些实例中,待治疗的受试者患有糖尿病,例如2型糖尿病。

[0016] 本公开内容的前述目的和特征以及其他目的和特征将从以下通过参照附图进行的详细描述中变得更加明显。

附图说明

[0017] 说明图1A至1F.活化的和癌相关的PSC表现出促纤维化促炎性表型。(A)从对原代小鼠PSC进行RNA-Seq分析得到的表示所选基因的热图,显示在活化期间具有改变表达的基因类别。数据以 $\log_2$ 倍数变化示出,活化(第7天)对预活化(第3天), $n=3$ 每组。(B)从对原代人PSC的RNA-Seq分析得到的表示所选基因的热图,所述原代人PSC分离自PDA患者($n=5$)或无癌供体($n=4$),并且培养15天以达到充分的产率和纯度,以PDA对无癌的 $\log_2$ 倍数变化表示。(C)热图显示在预活化的和活化的原代小鼠PSC中血管发生的负调控子(顶图)和正调控子(底图)的相对丰度。(D)如通过qRT-PCR测量的,小鼠全胰腺匀浆中和分离的PSC中的Vdr表达,所述小鼠全胰腺匀浆和分离的PSC培养3天以扩增和纯化。(E)通过qRT-PCR得到的指定的胰腺群中的Vdr表达(归一化至36B4; $n=5$)。腺泡、导管和胰岛通过激光捕获显微切割(LCM)分离;PSC通过密度离心(DC)分离。(F)通过qRT-PCR确定的预活化的和活化的小鼠PSC(左图)中以及人非癌相关的和癌相关的PSC(右图)中的Vdr表达(归一化至36b4, $n=3$)。杠表示平均值;误差杠表示SD。

[0018] 图2A至2E.原代小鼠PSC在培养的第3天至第7天之间转分化成活化的表型,与图1有关。从8周龄的野生型C57BL6/J小鼠的胰腺分离PSC,并培养7天(参见补充的实验方法)。(A)明视场显微镜显示了在培养第3天的预活化PSC中的胞质脂滴(箭头标出),到培养第7天,产生成纤维细胞样活化的PSC。比例线=50 μ m。(B)在第3天和第7天收集RNA,并针对成纤维细胞活化标志物Acta2进行定量RT-PCR(qRT-PCR)。(C)在PSC分离后(第0天)立即收集RNA,并且在培养第3天和第7天收集RNA。针对 α -淀粉酶进行定量RT-PCR以确定腺泡细胞污染程度,在培养3天后腺泡细胞不再能检测到。(D)制备全细胞裂解物,并通过免疫蛋白印迹分析以确定全小鼠胰腺中和分离的PSC中Vdr的蛋白水平。肌动蛋白是负载对照。此处示出了来自2只代表性小鼠的裂解物。(E)分离的胰腺群的纯度,通过由qRT-PCR确定的细胞类型特异性基因的相对表达来评估。数据归一化至36b4。杠表示平均值+SD。

[0019] 图3A至3F.VDR调控的转录网络对抗PSC活化。(A)用媒介物(DMSO)或100nM卡泊三醇(Ca1)处理48h并用为检测中性脂质的BODIPY 493/503染色的原代人CAPSC的代表性图。下面是用DMSO或Ca1处理的3个患者样品中每个细胞的百分率BODIPY-阳性面积的定量,作图平均值为SD。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p<0.05$)。比例线=20 μ m。

(B)用媒介物或100nM Ca1处理48小时的27份原代人CAPSC中的ACTA2的表达。将值作图为DMSO/Ca1,并且归一化至36B4。(C)从对用DMSO(D)或Ca1(C)(n=3)处理的预活化(收集后培养3天)或活化(收集后培养7天)的原代小鼠PSC进行RNA-Seq分析得到的表示所选基因的热图。VDR靶基因Cyp24a1和Vdr作为对照示出。与表3相关。(D)显示在媒介物(DMSO)或Ca1的存在下培养的活化的原代小鼠PSC中血管发生的负调控子(顶图)和正调控子(底图)的相对丰度的热图。(E)用DMSO或100nM Ca1处理48小时的CAPSC中由PSC活化或癌特征导致的选择基因的表达水平。结果表示3个患者样品,并且作图为平均值+SD。qRT-PCR进行三次技术重复,并且值归一化至36B4。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p < 0.05$)。(F)CAPSC用针对VDR的siRNA集合(siVDR)或非靶向对照(siNT)转染。然后用DMSO或100nM Ca1处理细胞48小时,并通过qRT-PCR分析。将值归一化至36B4。结果表示3个患者样品,并且作图为平均值+SD。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p < 0.05$; n.s. = 不显著)。

[0020] 图4A至4C.VDR活化拮抗PSC中的TGF/SMAD通路,与图6相关。(A)将用媒介物(DMSO)或100nM卡泊三醇(Ca1)处理48h的原代人CAPSC固定,并用BODIPY 493/503染色以检测中性脂质。六个图像(表示19/27样品)表示Ca1处理的细胞,并且包括胞质脂滴,这是静止状态的标志。(B)用1ng/ml TGF快速活化hPSC细胞系4小时,并用100nM卡泊三醇(Ca1)预处理16小时。将细胞固定,并进行针对SMAD3和VDR的染色质免疫沉淀(ChIP),并且以兔IgG作为同种型对照。染色质免疫沉淀物通过QPCR分析,以评估VDR和SMAD3对HAS2和(C)COL1A1基因的启动子区的结合。兔IgG充当这两种抗体的同种型对照。杠表示平均值+SD。*根据Student's t检验 $p < 0.05$ 。

[0021] 图5A至5C.VDR活化降低蛙皮素诱导的胰腺炎期间的炎症和纤维化,与图6相关。对于慢性胰腺炎方法(n=10)和急性胰腺炎方法(n=5)的细节,参见实施例1。收集胰腺,切片,并立即在福尔马林中固定,或包埋于OCT中并冷冻。(A)来自指定的处理组的FFPE切片的H&E染色。比例线=100 μ m。(B)对来自指定的处理组的冷冻切片的胶原I和PSC标志物GFAP的共免疫荧光。比例线=100 μ m。(C)收集来自6月龄的野生型和Vdr^{-/-}同窝动物的胰腺,并用天狼星红染色胶原。每种基因型(n=8)示出两个代表性的样品。比例线=500 μ m。

[0022] 图6A至6H.VDR配体调节体内PSC活化。(A)从注射12周蛙皮素(Cer)或蛙皮素+Ca1的小鼠(n=10)中分离的PSC中的所选基因的表达水平。值归一化至36b4,并且作图为平均值+SD。(B)对来自用蛙皮素或蛙皮素+Ca1处理12周的野生型小鼠的冷冻切片的phospho-Stat3(p-Stat3)免疫荧光染色的定量。(C)从注射Cer或Cer+Ca1以诱导急性胰腺炎的小鼠(细节参见实施例1;n=5)中分离的PSC中的所选基因的表达水平。值归一化至36b4,并且作图为平均值+SD。(D)如通过CD45-阳性细胞测量的,患有急性胰腺炎的小鼠的白细胞募集(对冷冻切片的免疫荧光染色,200 $\times$ 视场中的阳性细胞,n=5)。(E)如通过天狼星红染色测量的,患有急性胰腺炎的小鼠的纤维化(每200 $\times$ 视场,n=5)。(F)从注射蛙皮素以诱导急性胰腺炎的Vdr^{+/+}和Vdr^{-/-}小鼠(n=5)中分离的PSC中的所选基因的表达水平。示出了平均值+SD;值归一化至B2M。(G)患有急性胰腺炎的Vdr^{+/+}和Vdr^{-/-}小鼠中的天狼星红阳性面积(每200 $\times$ 视场,n=5)。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p < 0.05$)。(H)用DMSO或100nM Ca1处理48小时后,从Vdr^{+/+}和Vdr^{-/-}小鼠中分离的PSC中的所选基因的表达水平。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p < 0.05$; n.s. = 不显著)。

[0023] 图7A至7C.VDR在PSC中始终表达,并且是配体应答性的,但是表达是可变的,并且

转录活性在胰腺癌细胞中更低,与图8相关。(A)通过qRT-PCR测量5种指定的胰腺癌细胞系中以及3个CAPSC样品(0051、0052和0056)中的VDR表达。(B)用媒介物或Ca1(100nM,16小时)孵育指定的细胞系或样品,并通过qRT-PCR测量VDR靶基因CYP24A1的表达。将值归一化至36B4。杠表示平均值+SD。(C)使用人PDA的切除的切片进行VDR和 α -SMA(活化的PSC的标志物)的双重免疫荧光染色。用DAPI对核进行复染。线:40 μ m。

[0024] 图8A至8I.间质VDR活化降低促致瘤旁分泌信号转导。(A)表示通过RNA-Seq检测的MiaPaCa-2细胞中的基因表达变化的火山图,所述MiaPaCa-2细胞经100nM Ca1处理48小时vs.仅培养基(左图),经CAPSC调节的培养基(CM)处理vs.仅培养基(中图),或者经来自Ca1处理的CAPSC(100nM,48小时)的CM处理vs.仅培养基。蓝色表示显著性变化;红色表示无显著性变化。(B)由(A)中描述的RNA-Seq分析得到的表示所选基因的热图,作图为倍数变化vs.仅培养基(DMEM)。(C至G)如上文描述的,将指定的细胞系用Ca1直接孵育,或用来自用Ca1处理或没用Ca1处理的CAPSC的CM孵育。候选基因CXCL1、CSF2和AURKB的表达水平通过qRT-PCR来确定。将值归一化至36B4;示出了平均值+SD。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p < 0.05$)。结果示出为与1个患者样品的重复,并且表示来自多个患者样品($n = 4$)的结果,尽管观察到样品-样品之间的变异性。(H)对来自MiaPaCa-2细胞的p-STAT3进行免疫印迹,所述MiaPaCa-2细胞经100nM Ca1、CAPSC CM、Ca1+CAPSC CM或Ca1+CAPSC(Ca1处理的)CM处理48小时。肌动蛋白充当负载对照。值表示密度计量比率(p-STAT3/肌动蛋白)。(I)MiaPaCa-2细胞的生存力,所述细胞如上文描述进行处理,用指定剂量的吉西他滨孵育48小时。结果表示3个CAPSC CM样品,并且作图为平均值+SD。通过Student's非配对t检验确定的统计显著性(* $p < 0.05$)。星号表示在指定剂量的吉西他滨下CM样品与CM(PSC+Ca1)样品之间的生存力的统计学显著性差异。

[0025] 图9A至9G.VDR配体降低了体内PDA中的间质活化,与图10相关。针对VDR表达和活性,将衍生自小鼠PDA的三种胰腺癌细胞系与小鼠PSC进行比较。(A)RNA分离自指定的细胞系和活化的小鼠PSC(培养第7天),并且Vdr表达通过qRT-PCR测量。(B)指定的细胞类型用媒介物(DMSO)或100nM卡泊三醇处理16小时。分离RNA,并且通过qRT-PCR测量Vdr靶基因Cyp24a1的表达。将值归一化至36b4。杠表示平均值+SD。(C)从模拟手术和同种异体移植物接受者中分离PSC。分离RNA,并进行qRT-PCR以测量PSC活化标志物的表达。将值归一化至36b4。杠表示平均值+SD。(D)收集来自模拟手术或同种异体移植物接受者的胰腺,并进行福尔马林固定。使用FFPE切片进行马松三色染色。示出了从KPC小鼠中的PDA的代表性的三色染色用于对比。比例线=100 μ m。(E)PDA同种异体移植物接受者每天接受腹膜内注射60 μ g/kg卡泊三醇或盐水,持续21天。收集胰腺,并在福尔马林中固定。FFPE切片用马松三色进行染色(以下每200 $\times$ 视场定量; $n = 5$,*通过Student's t检验 $p < 0.05$)。比例线=100 μ m。(F&G)PDA同种异体移植物接受者每天接受腹膜内注射60 μ g/kg卡泊三醇或盐水,持续21天,并在处理的最后12天进行腹膜内注射20mg/kg吉西他滨Q3DX4。收集胰腺,切片,并立即在福尔马林中固定,或冷冻于液氮中。(F)使用FFPE切片用于phospho-组蛋白H3的免疫组化染色以及后续定量(参见实验方法)。图显示了范围、中值和四分值。*根据Student's t检验 $p < 0.05$ 。(G)将快速冷冻的胰腺匀浆化,分离RNA,并通过qRT-PCR测量来自我们的基因标签的间质基因和上皮基因的表达。将值归一化至36b4。杠表示平均值+SD。*根据Student's t检验 $p < 0.05$ 。n.s.=不显著。

[0026] 图10A至10E.间质VDR活化示出了当与吉西他滨组合时体内对抗胰腺癌的效力。KPC小鼠用吉西他滨(Gem)、卡泊三醇(Ca1)或Gem+Ca1(除非另有说明,Gem:n=4;Ca1:n=7;Gem+Ca1:n=7)治疗9天。(A)在研究终点时肿瘤体积的百分率变化,通过高分辨率超声测量。图显示了范围、中值和四分值。 $p<0.02$;Kruskal-Wallis和Dunn's非参数对比检验。(B)苯胺蓝染色的胶原纤维量化为每200×视场的阳性像素。图显示了范围、中值和四分值。 $p<0.05$ 。(C)肿瘤匀浆中的基因表达通过qRT-PCR确定。将值归一化至36b4。杠表示平均值+SD。 $p<0.05$ (与仅Gem相比)。(D)给予最终剂量的吉西他滨后2小时,Gem治疗的小鼠和Gem+Ca1治疗的小鼠中的吉西他滨三磷酸盐的瘤内浓度(dFdCTP,通过LC-MS/MS测量的)(n分别等于4和7)。图显示了范围、中值和四分值。 $p<0.05$ 。(E)将针对切割的半胱天冬酶-3(CC3)的IHC量化为每200×视场的CC3阳性的肿瘤细胞。图显示了范围、中值和四分值。 $p<0.05$ 。

[0027] 图11A至11B.VDR配体提高了吉西他滨的体内效力,与图12相关。(A)带有PDA的KPC小鼠如所指示的进行治疗,并且在治疗开始前、治疗第4天和研究终点处通过高分辨率超声来成像(参见实施例1)。吉西他滨组群中的一只小鼠在第4天不进行成像,在终点前按照机构指南处死来自Ca1组群和Gem+Ca1组群的两只小鼠。瀑布图显示在治疗第4天(顶图)和研究终点(底图)时相对于治疗前肿瘤体积的%体积升高。(B)从用指定方案治疗的KPC小鼠中收集肿瘤,并且通过LC-MS/MS分析匀浆以确定吉西他滨的瘤内浓度(dFdC;左上)以及它的脱氨基代谢物(dFdU;右上)。dFdC/dFdU比率显示于底行中。线表示平均值+SD。鉴定了偏离值,并显示于红框中。

[0028] 图12A至12C.VDR配体增强了吉西他滨的递送和效力。KPC小鼠用吉西他滨(Gem)、卡泊三醇(Ca1)或Gem+Ca1(除非另有说明,Gem:n=4;Ca1:n=7;Gem+Ca1:n=7)治疗9天。(A)肿瘤匀浆中的Dck和Cda基因表达通过qRT-PCR确定。将值归一化至36b4。杠表示平均值+SD。(B)针对CD31的IHC量化为每200×视场的CD31(NovaRed)-阳性面积。图显示了范围、中值和四分值。 $p<0.05$ 。(C)来自Gem处理和Gem+Ca1处理的KPC肿瘤的代表性的CD31IHC。箭头标出了在吉西他滨处理的肿瘤中的塌陷的血管(顶图),以及Gem+Ca1处理的肿瘤中的具有明显管腔的血管(底图)。比例线=50μm。

[0029] 图13.描述VDR在信号依赖性的间质重构、限制胰腺肿瘤-间质串扰中的作用。PSC在活化期间渐进地获得支持肿瘤的功能,该过程受到胰腺损伤和肿瘤进展经来自上皮隔间(或者可能来自免疫/炎性细胞)的分泌因子的驱动。VDR活化驱动PSC恢复至更静止、对肿瘤支持更低的状态。因此,用吉西他滨共治疗胰腺肿瘤以靶向肿瘤细胞和VDR配体从而使PSC失活,导致对单独的吉西他滨的递送和效力造成重大障碍的肿瘤-间质串扰总体降低。

[0030] 序列表

[0031] 核酸序列和氨基酸序列使用如37C.F.R.1.822定义的核苷酸碱基的标准字母缩写来示出。示出了各核酸序列的仅一条链,但是可理解为通过对所展示的链的任何引用包括互补链。

[0032] SEQ ID NO:1至106示出了示例性的引物序列。

具体实施方式

[0033] 提供对术语和方法的以下解释以更好地描述本公开内容以及引导本领域技术人员实施本公开内容。除非上下文清楚说明,单数形式“一个(“a”,“an”)”和“该(“the”)”是指一个或多个。例如,术语“包含VDR激动剂”包括单个种类的VDR激动剂或复数个种类的VDR激动剂,并且被视为等同于短语“包含至少一种VDR激动剂”。除非另有明确说明,术语“或”是指所述可选要素中的单个要素或者两个或更多个要素的组合。如本文所用,“包含(comprises)”意为“包含(includes)”。因此,“包含A或B”意为“包含A、B或者A和B”,不排除其他要素。本文引用的所有Genbank登录号都通过引用的方式纳入可在2014年6月5日得到的序列。本文引用的所有文献,包括专利和专利申请,以及GenBank®登录号都通过引用的方式纳入。

[0034] 除非另有解释,本公开内容所用的所有技术术语和科学术语都具有与由本发明所属领域的技术人员所通常理解的相同的含义。虽然在实施或测试本公开内容中可使用与本文描述的方法和材料相似或相同的方法和材料,但是下文描述了合适的方法和材料。这些材料、方法和实例仅仅是举例说明性的,而非意图限制。

[0035] 以下描述了用于实施或测试本公开内容的合适的方法和材料。但是,所提供的材料、方法和实例仅仅是举例说明性的,而非意图限制。因此,除非另有说明,本公开内容的方法和技术可根据与所描述的方法和材料相似或相同的方法和材料来进行,和/或根据本领域公知的以及在遍及本说明书中引用和描述的许多综合文献和更专业的文献中描述的常规方法来进行。

[0036] 术语

[0037] 为了便于浏览本公开内容的多种实施方案,提供了特定术语的以下解释。

[0038] 给予:包含经口、直肠、阴道、经皮和肠胃外给药。一般而言,肠胃外制剂是通过除了摄食外的任何可能方式给予的制剂。该术语还涉及注射(无论是静脉内、鞘内、肌内、腹膜内、关节内、瘤内还是皮下)和多种表面应用,包括例如鼻内、吸入、皮内和局部应用。因此,VDR激动剂以及化疗剂和生物学药剂可通过本领域已知的任何方法来给予。

[0039] 接触:使一种试剂靠近另一种试剂,从而允许这些试剂相互作用。例如,可将包含VDR激动剂的组合物应用于细胞(例如组织培养中的细胞),或给予至受试者,由此使该VDR激动剂与细胞(例如星形细胞或癌细胞)进行体外或体内相互作用。

[0040] C-X-C基序配体12(CXCL12):OMIM 600835。也称为间质细胞衍生因子1(SDF1)。intercrine家族的间质细胞衍生的 α 趋化因子成员。编码的蛋白功能为G蛋白偶联受体趋化因子(C-X-C基序)受体4的配体,并且在许多不同的细胞功能中起作用,包括胚胎发生、免疫监视、炎症应答、组织稳态以及肿瘤生长和转移。CXCL12序列可公开获得,例如从GenBank®序列数据库(例如,登录号NP_001171605.1、AAV49999.1、AAT76437.1、CR450283.1、NM_001009580.1和AY802782.1)。本领域技术人员可鉴定其他CXCL12核酸序列和蛋白质序列,包括CXCL12变体(例如,具有CXCL12活性并保持与如上文提供的天然CXCL12序列具有至少98%、至少95%、至少90%、至少85%或至少80%的序列同一性的变体)。

[0041] 分离:“分离的”生物组分(例如核酸分子、肽或细胞)已经从混合的样品(例如细胞提取物)中的其他生物组分中纯化出来。例如,“分离的”肽或核酸分子是已经与该肽或核酸分子所存在的细胞(例如重组肽或核酸分子的表达宿主细胞)的其他组分分离的肽或核酸分子。

[0042] 胰腺癌：胰腺内的恶性肿瘤。其预后一般是不良的。约95%的胰腺癌是腺癌。剩下的5%是外分泌胰腺的肿瘤（例如，浆液性囊腺瘤）、腺泡细胞癌和胰腺神经内分泌肿瘤（例如胰岛素瘤）。“胰岛素瘤”是保持分泌胰岛素的能力的 β 细胞的癌。患有胰岛素瘤的患者常常发展出神经低糖症状。这些症状包括复发性头痛、嗜睡、复视和视力模糊，特别在运动或空腹时出现。严重的低血糖症可导致癫痫、昏迷和永久性神经学损坏。症状由对低血糖症的儿茶酚胺能响应导致（例如，颤抖、心悸、心动过速、出汗、饥饿、焦虑、恶心）。胰腺腺癌发生于腺组织中。症状包括腹痛、食欲不振、体重减轻、黄疸以及胆囊的无痛延长。

[0043] 对胰腺癌（包括腺癌和胰岛素瘤）的经典治疗包括手术切除（例如Whipple法）以及用药剂的化疗，所述药剂例如氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼和蛋白质结合的紫杉醇（Abraxane®）中的一种或多种，例如吉西他滨/Abraxane®的组合。

[0044] 胰腺炎：胰腺的炎症。在一些实例中，胰腺炎由GLP-1激动剂引起，例如用于治疗或控制II型糖尿病的GLP-1激动剂。在一个实例中，使用所公开的方法来治疗患有由GLP-1激动剂引起的胰腺炎的受试者。在另一实例中，使用所公开的方法治疗正在用GLP-1激动剂（或以前用过GLP-1激动剂）治疗的受试者，以预防未来发展出胰腺炎。

[0045] 药学上可接受的载体：可用于本公开内容中的药学上可接受的载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第17版(1975)描述了适于对本文公开的组合物进行药物递送的组合物和制剂。例如，可在一种或多种药学可接受的载体的存在下给予VDR激动剂、化疗剂或生物学药剂。

[0046] 一般而言，所述载体的性质将取决于待采用的具体给药模式。例如，肠胃外制剂通常包含可注射流体作为媒介物，可注射流体包括药学上可接受的流体和生理学上可接受的流体，例如，水、生理盐水、平衡盐溶液、水性右旋糖、甘油等。对于固体组合物（例如，粉剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式）而言，常规的无毒固体载体可包括例如，药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性的载体外，待给予的药物组合物可包含较少量的无毒辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂（例如，醋酸钠或脱水山梨醇单月桂酸酯）等。如本领域技术人员公知的，其他药物组合物的实施方案可用常规的药学上可接受的载体、佐剂和抗衡离子来制备。一些实施方案中的组合物是固体、半固体和液体剂型的单位剂量形式，例如片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、粉剂、液体溶液剂或混悬剂。

[0047] 受试者：活的多细胞脊椎动物，该类别既包括人和非人哺乳动物。本文公开的方法和组合物等同地适用于医药和兽医背景中。因此，一般性术语“受试者”应理解为包括所有动物，包括但不限于人或兽医受试者，例如其他灵长类（包括猴）、狗、猫、马和牛。在一个实例中，所述受试者是患有或者可能发展出糖尿病——例如2型糖尿病——的受试者。在一个实例中，所述受试者是患有胰腺疾病或可能发展出胰腺疾病的受试者，所述胰腺疾病例如胰腺炎（例如，因摄取GLP-1激动剂导致的胰腺炎）或胰腺癌（例如胰腺导管腺癌）。在一个实例中，受试者是患有癌症的受试者，所述癌症例如肺癌（例如，NSCLC）、肾癌（例如，肾细胞癌）、前列腺癌、肝（例如，肝细胞癌、胆管癌、血管肉瘤或血管内皮瘤）或胰腺癌（例如，PDA）。

[0048] 治疗有效量：单独的或与其他药剂组合的，足以预防疾病进展、引起疾病消退或能够缓解由疾病引起的症状的治疗剂（例如，VDR激动剂、化疗剂或生物学药剂）的量。在一个实例中，使用治疗有效量的维生素D受体激动剂来预防或治疗与由GLP-1激动剂诱导的胰腺炎相关的症状，例如呕吐、内出血、血压升高、疼痛以及胰腺的炎症或肿胀。在一个实例中，

使用治疗有效量的VDR激动剂与治疗有效量的化疗剂或生物学药剂组合来预防或治疗与癌症——例如肝癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌或肺癌——相关的症状,例如减小肿瘤的尺寸或体积,降低肿瘤转移,降低肿瘤中肿瘤细胞的数量,降低肿瘤的生长速率以及提高肿瘤中化疗剂或生物学药剂的量。在一个实例中,治疗有效量是本文提供的包含维生素D受体激动剂的组合物足以减轻胰腺炎或肝癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌或肺癌的症状的量,例如减轻至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未给予VDR激动剂相比)。

[0049] 治疗或预防疾病:治疗是指在已经开始发展出疾病或病理学病症(例如,由GLP-1激动剂诱导的胰腺炎,或肝癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌或肺癌)后改善所述疾病或病理学病症的征兆或症状的治疗性干预。预防是指抑制疾病的完全发展,例如在已知具有疾病倾向的人中进行抑制,例如已经发展出胰腺炎或具有发展出胰腺炎的风险的人,例如接受一种或多种GLP-1激动剂的受试者。

[0050] 维生素D:一组脂溶性的开环甾类激素原和激素,其两种主要形式是维生素D₂(麦角钙化甾醇)和维生素D₃(胆钙化醇),其被转化成1 α ,25-二羟基维生素D₃(1 α ,25-(OH)₂-D₃),也称为骨化三醇——维生素D的生理学活性形式。

[0051] 维生素D激动剂或类似物:结合并活化维生素D受体的任何化合物,无论是合成的还是天然的,例如VDR配体(例如,骨化三醇)、VDR激动剂前体、维生素D类似物、维生素D前体。特别地,天然和合成的维生素D激动剂和类似物的非限制性实例包括1 α ,25-(OH)₂-D₃、LG190090、LG9190119、LG190155、LG190176和LG190178(参见例如,Boehm等,(1999) *Chemistry&Biology*,6:265-275);LY2108491和LY2109866(Ma等,(2006) *J Clin. Invest.*,116:892-904);2 β -(3-羟基丙氧基)1 α ,25-二羟基维生素D₃(ED-71)(Tsurukami等,(1994) *Calcif.Tiss.Int.*54:142-149);EB1089(Pepper等,(2003) *Blood*,101:2454-2460);OCT(22-氧杂-骨化三醇)(Makibayashi等,(2001) *Am.J.Path.*,158:1733-1741);(1 α OH-2,19-去甲-25-羟基维生素D₃)和(1,3-脱氧-2-CHCH₂OH-19-去甲-25-羟基维生素D₃)(Posner等,(2005) *Bioorganic&Medicinal Chemistry*,13:2959-2966)以及Rey等(1999) *J.Organic Chem.*,64:3196-3206中公开的任何维生素D类似物;以及胆汁酸衍生物例如石胆酸(LCA)和熊去氧胆酸(UDCA)(参见例如,Nehring等,(2007) *PNAS*,104:10006-10009;Makishima等,(2002) *Science*,296:1313-1316;Copaci等,(2005) *Rom.J.Gastroenterol.*,14:259-266)。这些文献中的每一篇都通过引用的方式全文纳入本文。

[0052] 维生素D前体:能够被酶转化成维生素D受体的激动剂的任何化合物。在某些非限制性的实例中,该酶是CYP27B1。维生素D前体的具体的非限制性实例包括维生素D₃(胆钙化醇)、25-羟基-维生素D₃(25-OH-D₃)(骨化二醇)以及维生素D₂(麦角钙化甾醇)和其前体。

[0053] 维生素D受体(VDR):核受体的类固醇激素家族成员。VDR具有常见的核受体结构,例如,其包含N端活化结构域、具有两个锌指结构域的DNA结合区(DBD)、铰链区和配体结合结构域(LBD)。VDR活化的基因转录需要经过输入蛋白- α 、与RXR的异二聚化以及与靶基因中存在的应答元件结合而进行的初始核易位。已知VDR调控与维持肠和肾内的钙和磷酸盐稳态相关的基因。由VDR/RXR异二聚体引发的信号受到共活化蛋白或共抑制蛋白质的结合的调节,并且还依赖于核间隔中的其他信号伴侣。VDR/RXR异二聚物是不允许的,因为未知RXR配体的存在或不存在是否影响VDR应答。

[0054] 直至最近,唯一已知的用于VDR的生理学配体是 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (骨化三醇)。然而,特定的胆汁酸例如LCA和一些衍生物(LCA-乙酸盐、LCA-甲酸盐、3-酮基LCA)也可活化VDR。

[0055] 治疗或预防因CXCL-12活性导致的病症的方法

[0056] A. 概述

[0057] 胰腺导管腺癌(PDA)中的不良的临床结果已经被归因于对化疗剂的固有耐药性以及允许肿瘤生长的微环境。静止胰腺星形细胞(PSC)至活化胰腺星形细胞的转化被认为是驱动作为PDA的特征的严重间质反应的关键开关。在本文中示出,维生素D受体(VDR)表达于活化的人胰腺肿瘤间质中以及胰腺炎的体内模型中,它是已知的PDA的危险因子。显然,用VDR配体卡泊三醇的治疗显著减轻了胰腺炎期间的炎症和纤维化,并且在VDR敲除的小鼠中发展出了该疾病的更严重的形式。显示出,VDR充当PSC的主转录调控子以恢复静止状态,使得配体诱导的间质重构使体内瘤内吉西他滨水平提高5倍,并使肿瘤体积减小。因此,间质VDR活化降低了化疗剂耐药性。本公开内容描述了分子策略,通过该分子策略,肿瘤间质的转录重编程恢复/促进化疗剂应答,本公开内容还提出重新评估维生素D作为用于PDA的辅助治疗。

[0058] 肿瘤间质作为癌症的“燃料供给线”的新兴作用使得从聚焦于癌细胞本身进行了重要推进。事实上,本文公开的靶向VDR的方法转录重编程间质,同时影响多个通路,包括炎性细胞因子、生长因子和血管发生,提高了吉西他滨治疗在PDA中的效力。此外,VDR配体在急性和慢性鼠胰腺炎二者中都降低纤维化和炎症。这是有重要意义的,因为胰腺炎缺乏任何基于机制的治疗,并且胰腺炎是已知的胰腺癌的风险因子。最近,已经证明了“cistromic拮抗”,其中VDR活化通过阻断TGF β /SMAD信号转导来抑制活化的星形细胞中的纤维发生程序(Ding等,2013)。这些结果,与本文提供的数据一起,证明在胰腺星形细胞中,参与TGF β /SMAD通路的创伤修复应答通过来自癌细胞、炎症或其他细胞应激物的旁分泌信号转导活化,并受基因组水平的VDR信号转导限制。这些相反通路之间的平衡可因慢性组织损坏或因维生素D不足而不利地倾斜,这可部分地解释血浆维生素D水平或维生素D摄取与胰腺癌风险之间的反相关性(Skinner等,2006;Wolpin等,2012),以及维生素D不足与慢性胰腺炎之间的联系(Mann等,2003)。

[0059] 胰腺肿瘤间质通过VDR活化的转录重构广泛地削弱了PSC支持肿瘤生长的能力。受到VDR负调控的肿瘤-间质相互作用的关键特征包括细胞外间质(Jacobetz等,2013;Provenzano等,2012)、Shh通路(Olive等,2009)、细胞因子/趋化因子例如IL6及其他(Fukuda等,2011;Ijichi等,2011;Lesina等,2011)和生长因子例如CTGF(Aikawa等,2006)。在近期的工作的启发下,这获益显著,所述工作证明对间质衍生的生存因子CTGF的抑制增强了对吉西他滨的抗肿瘤应答(Neesse等,2013)。间质去除治疗策略与间质重构治疗策略之间存在差异。以前已经讨论了这样的理念,即,“正常”微环境的细胞组分和结构组分发挥了肿瘤抑制性的力量和信号(Bissell和Hines,2011),虽然在胰腺中,这仍然有待证实。由于VDR配体将活化的PSC推向更静止更“正常”的表型,所以可设想,重构的PSC发挥这样的内稳态控制以负调控肿瘤生长或促进分化,该益处将完全不受间质去除的约束。

[0060] PDA间质还通过阻断药物递送来限制化疗效力,严重低血管化的结果可部分地归因于致密的细胞外间质。VDR配体显著降低肿瘤的纤维化部分,并且提高瘤内血管。本文中示出,活化的PSC表达抗血管生成因子例如血小板反应蛋白-1,预测所述因子促进PDA的低

血管化特征。PSC活化标签基因的抗血管生成亚组在体外受到VDR配体的抑制,并且重要的是,组合治疗诱导肿瘤血管化以及体内药物递送的改善。提高瘤内血流和吉西他滨递送的间质降解策略,已示出改善了PDA的存活(Jacobetz等,2012;Provenzano等,2012)。但是,VDR介导的间质重构以及提高的血管化对长期肿瘤生长和转移潜能的重要性目前正在研究中。事实上,最近探索Shh通路抑制与吉西他滨组合在胰腺癌中的治疗潜能的临床试验的失败揭示了在当前治疗策略的环境中间质去除治疗的潜在限制。从概念上讲,肿瘤间质开放以及功能性血管增加提示了创造用于治疗性递送的窗口以及增强通过血流进行扩散的潜在性的双重作用。虽然有这些警示,但是本文提供的数据显示,当与快速杀伤癌细胞的强效靶向治疗配对时,间质药剂将示出改善的临床结果。

[0061] 将VDR活化作为胰腺炎和胰腺癌中间质的信号依赖性转录重构的机制的考虑是重要的,因为这些疾病的治疗选择非常有限。在急性和慢性胰腺炎模型中VDR活化诱导的纤维化和炎症的显著降低,结合在PDA模型中卡泊三醇+吉西他滨治疗的升高的治疗效力,鉴定该通路用于开发非常需要的治疗选择。虽然癌细胞对当前的化疗剂的固有耐药性仍然是重大的障碍,但是当与直接靶向瘤形成本身的新治疗组合时,本文示出了VDR介导的间质重构范式可为有利的。同时,对肿瘤组分和非肿瘤组分同时靶向是简单的且潜在地可广泛应用的策略,用于克服胰腺中或其他间质相关的癌症中的化疗剂耐药性。

[0062] 基于本文提供的数据,提供了用于降低C-X-C基序配体12(CXCL12)的生物学活性的方法。在一些实例中,这样的方法包括使星形细胞(例如表达和分泌CXCL12的星形细胞)与治疗有效量的一种或多种VDR激动剂接触,从而降低CXCL12的生物学活性(例如其产生和/或分泌)。这样的方法可在体外(例如通过使表达CXCL12的培养细胞与一种或多种VDR激动剂接触)或在体内(例如通过给予一种或多种VDR激动剂至受试者)进行。在一些实例中,所治疗的受试者是哺乳动物受试者,例如人受试者。

[0063] 所述生物学活性可包括以下中的一种或多种: CXCL12核酸表达(例如, mRNA或cDNA表达)、CXCL12蛋白表达、细胞(例如星形细胞)的CXCL12分泌、CXCL12蛋白稳定性、CXCL12与肿瘤细胞的结合、肿瘤细胞中的CXCR4信号转导以及CXCL12阻止T细胞与肿瘤细胞的结合。降低CXCL12蛋白的生物学活性的VDR激动剂不需要完全抑制CXCL12蛋白活性。在一些实例中,这样的化合物将CXCL12蛋白活性降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0064] 因此,在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12的生物学活性的VDR激动剂可将CXCL12核酸表达(例如星形细胞的mRNA或cDNA表达)降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12的生物学活性的VDR激动剂可将CXCL12蛋白表达(例如星形细胞的蛋白表达)降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12的生物学活性的VDR激动剂可将细胞(例如星形细胞)的CXCL12分泌降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12的生物学活性的VDR激动剂可使CXCL12蛋白的稳定性降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12蛋白的生物学活性的VDR激动

剂可使CXCL12与肿瘤细胞(例如肝、胰、肺、前列腺、胆管或肾的癌细胞)的结合降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12的生物学活性的VDR激动剂可使肿瘤细胞(例如肝、胰、肺、前列腺、胆管或肾的癌细胞)中的CXCR4信号转导降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12蛋白的生物学活性的VDR激动剂可使CXCL12从T细胞“遮蔽”或“屏蔽”肿瘤细胞(例如肝、胰、肺、前列腺、胆管或肾的癌细胞)的能力降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。因此,在一些实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低CXCL12蛋白的生物学活性的VDR激动剂可使T细胞结合或识别肿瘤细胞的能力提高至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%。

[0065] 提供了治疗受试者中的肿瘤——例如具有相关的星形细胞的癌——的方法。这样的方法可包括给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂以及治疗有效量的一种或多种化疗剂或生物学药剂(例如单克隆抗体)至所述受试者。所使用的一种或多种化疗剂或生物学药剂可根据常规知识基于所述受试者患有的肿瘤来确定。例如,如果所述肿瘤是胰腺癌(例如,胰腺导管腺癌,PDA)则所述一种或多种化疗剂可包括氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼和蛋白结合的紫杉醇(例如Nab-紫杉醇,Abraxane®)中的一种或多种;如果所述肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),则所述一种或多种化疗剂可包括甲氨蝶呤、吉西他滨、紫杉醇、顺铂、阿扎胞苷和恩替诺特中的一种或多种;如果所述肿瘤是肾癌(例如,肾细胞癌),则所述一种或多种化疗剂或生物学药剂可包括依维莫司、阿地白介素、阿伐单抗(evacizumab)、阿昔替尼、贝伐单抗、甲苯磺酸索拉菲尼、盐酸帕唑帕尼、苹果酸舒尼替尼和替西罗莫司中的一种或多种;如果所述肿瘤是前列腺癌,则所述一种或多种化疗剂或生物学药剂可包括乙酸阿比特龙、比卡鲁胺、卡巴他赛、地加瑞克、地诺单抗、艾西他奇(eocetaxel)、恩杂鲁胺、乙酸戈舍瑞林、乙酸亮丙瑞林、泼尼松、二氯化镭223、西普亮奇-T(sipuleucel-T)和多西他赛中的一种或多种;并且如果所述肿瘤是肝癌(例如肝细胞癌),则所述一种或多种化疗剂包括索拉菲尼、多柔比星、吉西他滨、顺铂、干扰素、多柔比星和氟尿嘧啶(例如PIAF:顺铂、干扰素、多柔比星和氟尿嘧啶)中的一种或多种。在一个实例中,所述一种或多种VDR激动剂可在所述一种或多种化疗剂或生物学药剂之前给予。在另一实例中,所述一种或多种VDR激动剂与所述一种或多种化疗剂或生物学药剂同时给予。

[0066] 在一个具体实例中,所述肿瘤是PDA,并且所述一种或多种化疗剂包括(a)吉西他滨、(b)吉西他滨和埃罗替尼,或(c)吉西他滨和蛋白结合的紫杉醇。因此,本公开内容提供了一种通过包括以下的方法来治疗胰腺导管腺癌的方法:(1)给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂至患有PDA的哺乳动物受试者,以及(2)给予治疗有效量的选自氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼、蛋白结合的紫杉醇或其组合组成的组的化疗剂,从而治疗所述受试者中的胰腺导管腺癌。在一个具体实例中,所述一种或多种VDR激动剂是卡泊三醇或帕立骨化醇,并且所述化疗剂包括(a)吉西他滨(例如,经30分钟给予1000mg吉西他滨/m²,每周一次,持续最多7周,然后在每四周中,停药一周接着每周一次持续三周),(b)吉西他滨和埃罗替尼,或(c)吉西他滨和蛋白结合的紫杉醇。

[0067] 本文还提供了使用治疗有效量的一种或多种维生素D受体(VDR)激动剂(包括骨化三醇或卡泊三醇或者其前体或类似物,以及其他VDR配体、维生素D前体、维生素D类似物、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ 、VDR配体以及VDR激动剂的前体)用于治疗胰腺炎——例如高血糖素样肽(GLP)激动剂(例如GLP-1激动剂)诱导的胰腺炎——的方法。所述胰腺炎可为急性的或慢性的。因此,本文描述了治疗受试者中GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的方法,所述受试者例如接受一种或多种GLP-1激动剂用于治疗糖尿病——例如2型糖尿病——的受试者。在一些实例中,所述方法包括选择患有2型糖尿病的当前正在用或以前用过GLP-1激动剂治疗的受试者。在一些情况下,这样的受试者将患有胰腺炎,或具有发展出胰腺炎的风险。在一个具体实例中,本公开内容提供了一种治疗方法,所述方法包括向具有因GLP-1激动剂给予而导致的胰腺炎的特征或症状的人患者提供包含VDR激动剂的治疗组合物,以及在使所述特征或症状(例如呕吐、内出血、血压升高、疼痛或肿胀)减轻的条件下将所述治疗组合物给予至所述患者。在一些实例中,所述受试者因GLP-1激动剂给予而具有发展出胰腺炎的风险,并且预防性地给予所述治疗组合物。在一个实施方案中,所述VDR激动剂的预防给予延迟了GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的症状的发作。例如,VDR激动剂的预防性给予预防GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的一种或多种症状或特征的发作。

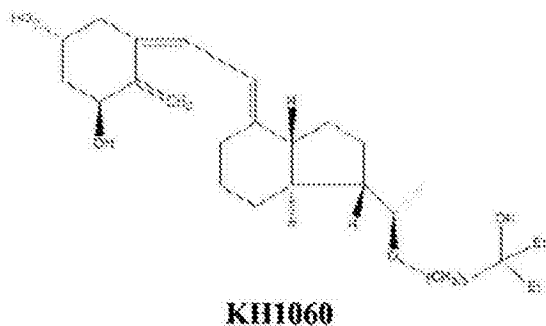
[0068] GLP-1激动剂(在文献中也称为GLP-1模拟物和肠降血糖素模拟物)是一类降低血糖浓度的药物,并且因此被用于治疗或控制2型糖尿病。与更早的胰岛素促分泌素例如磺基脲类或氯茴苯酸类相比,GLP-1激动剂具有更低的引起低血糖症的风险。但是,这样的化合物也有不良反应,包括胰腺炎。示例性的GLP激动剂包括但不限于:艾塞那肽、他司鲁泰、甘精胰岛素、吡格列酮、阿必鲁肽、利西拉肽、沙格列汀、利拉鲁肽、利拉利汀、阿格列汀、西他列汀和二甲双胍/西他列汀。**Byetta®**(艾塞那肽,Merck)常常经皮下给予,每日两次;他司鲁泰(Roche)常常每周一次经皮下给予;甘精胰岛素(**Lantus®**, Sanofi-Aventis)常常每日一次经皮下给予;吡格列酮(**Actos®**, Takeda)常常每日一次经口给予(例如,15mg、30mg或45mg);阿必鲁肽(**Tanzeum®**, GlaxoSmithKline)常常经皮下给予,每周一次;利西拉肽(**Lyxumia®** Sanofi-Aventis)常常每日一次通过注射给予(例如,10 μg 每天持续14天,然后20 μg /天);**Bydureon®**(艾塞那肽,Bristol-Myers Squibb)常常每周一次通过注射给予;**Onglyza®**(沙格列汀,AstraZeneca)常常每日一次经口给予(例如,2.5mg或5mg);**Victoza®**(利拉鲁肽,Novo Nordisk)常常每日一次经皮下给予(例如,0.6mg、1.2mg或1.8mg);**Tradjenta®**(利拉利汀,Eli Lilly and Boehringer Ingelheim)常常每日一次经口给予(例如,5mg);**Nesina®**(阿格列汀,Takeda)常常每日一次经口给予(例如,25mg);**Januvia®**(西他列汀)以及相关的**Janumet®**(二甲双胍与西他列汀的混合物,Merck)常常每日一次经口给予(例如,对于**Januvia®**,25mg、50mg或100mg,对于**Janumet®**或**Janumet XR®**,50mg或100mg西他列汀和1000mg或2000mg盐酸二甲双胍)。在一些实例中,GLP-1激动剂(例如,上文所列的GLP-1激动剂)以每日一次、每日两次、隔周一次或每周一次的基础经皮下或经口给予。

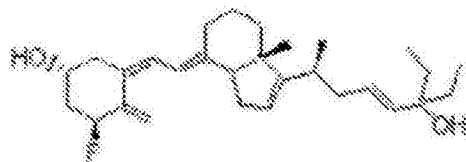
[0069] 在一些具体实例中,所述方法包括给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂至患

有由GLP-1激动剂诱导的胰腺炎或具有发展出由GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的风险的受试者,从而治疗或预防所述胰腺炎。

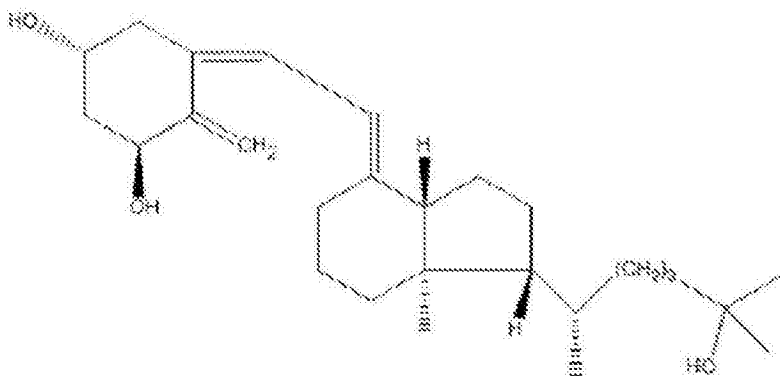
[0070] 体外与细胞接触或给予至受试者的所述VDR激动剂可存在于药学可接受的载体中。在一些实例中,所述VDR激动剂是非天然存在的激动剂。非天然存在的VDR激动剂的实例包括但不限于:KH1060(来沙骨化醇)、BXL-628(艾洛骨化醇)、MC1288、CB966、B/CB 1093、GS 1558、TX527([19-去甲-14,20-双表-23-炔-1,25(OH)2D3)、ED-71(艾德骨化三醇)、BXL-01-0029、度骨化醇、EB1089(西奥骨化醇)、帕立骨化醇、卡泊三醇及其组合。其他实例包括马沙骨化醇(OCT)、他卡西醇、阿法骨化醇、SM-10193、EB1072、EB1129、EB1133、EB1155、EB1270、MC1288、EB1213、CB1093、VD2656、VD2668、VD2708、VD2716、VD2728、VD2736、GS1500、GS1558、KH1060、ZK161422及其组合。以下示出了一些结构。

[0071]

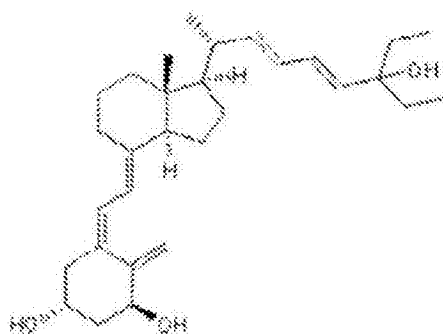




BXL-628



MC1288

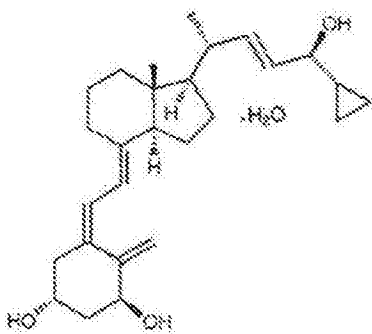


EB1089

[0073] 示例性的VDR激动剂包括但不限于维生素D、维生素D前体、维生素D类似物、维生素D受体配体、维生素D受体激动剂前体或其组合。在某些实施方案中,所述治疗是VDR激动剂前体,例如25-羟基-维生素D₃(25-OH-D₃)(骨化二醇);维生素D₃(胆沉钙醇);维生素D₂(麦角钙化甾醇)或其组合。在某些实施方案中,所述治疗是VDR的激动剂配体,例如1 α ,25-二羟基维生素D₃(骨化三醇)。因此,在一些实例中,选择患有由GLP-1激动剂诱导的胰腺炎或具有发展出由GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的风险的受试者,以所公开的方法进行治疗(例如,治疗存在的胰腺炎或者预防或延迟胰腺炎的发展)。在另一些实例中,选择患有具有相关星形细胞的肿瘤的患者,以所公开的方法进行治疗(例如,治疗肝癌、肾癌、胰腺癌、肺癌、胆管癌或前列腺癌)。

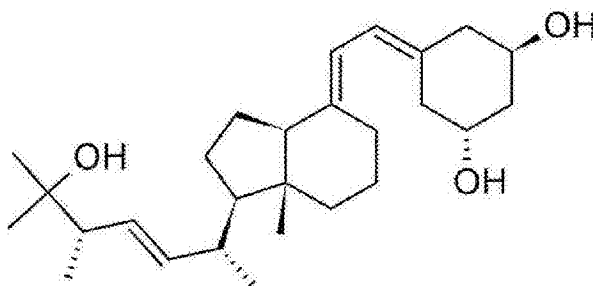
[0074] 在一个实例中,所述VDR激动剂是卡泊三醇,其为骨化三醇或维生素D的合成衍生物。卡泊三醇具有对钙稳态的最小影响。卡泊三醇可溶于DMSO至100mM,并且可溶于乙醇中至100mM。在一个实例中,卡泊三醇具有以下结构:

[0075]



[0076] 在一个实例中,所述VDR激动剂是帕立骨化醇(19-去甲-1,25-(OH)₂-维生素D₂)。帕立骨化醇具有以下结构:

[0077]



[0078] 在一些实例中,使用1 α ,25(OH)₂D₃或者维生素D前体或类似物作为VDR激动剂。无需使用维生素D的最具生物学活性的形式以实现有益的治疗效果。维生素D受体的天然存在的配体是骨化三醇。在一个实施方案中,给予骨化三醇的前体(例如骨化二醇)至受试者,然后其在靶细胞群内被转化成骨化三醇。该方法具有这样的优点,即可显著避免骨化三醇对钙稳态的局部肠作用以及全身作用,即使在给予大剂量的前体时亦如此。

[0079] 在一个实施方案中,使用对CYP24A1的失活具有抗性的VDR配体或者其他VDR激动剂或激动剂前体以实现在靶细胞群中更有效和更持久的VDR活化。在一些具体实例中,所述VDR配体是可被CYP27B1活化同时对CYP24A1的失活具有抗性的VDR配体。这允许胰腺中靶细胞群中的VDR活化,同时使对钙稳态的不期望的全身性作用最小化。

[0080] 在一个实施方案中,使用可结合并活化VDR的VDR配体或其他VDR激动剂来预防或减轻因GLP-1给予所导致的胰腺中的损伤过程。在一些实施方案中,单独使用VDR的配体,而在另一些实施方案中,VDR的配体与常规用于治疗胰腺炎的其他组合物组合使用。

[0081] 在一些实施方案中,VDR激动剂对胰腺炎或癌的作用通过血液、血清、血浆淀粉酶或脂肪酶以及器官功能(例如,胰腺外分泌功能和内分泌功能)检验来监测。在另一些实施方案中,胰腺炎或癌通过成像技术来监测,包括但不限于放射学、核医学、超声和磁共振。

[0082] 在某些实例中,所述给予包括经口或经肠胃外(例如,经口、腹膜内或静脉内)给予所述VDR激动剂。在具体实例中,所述VDR激动剂是维生素D前体,其以至少1国际单位(IU)的剂量给予,例如,至少5IU、至少10IU、至少10IU、至少100IU、至少1000IU、至少5000IU、至少10,000IU、至少50,000IU、至少100,000IU、或至少500,000IU,例如5IU约50,000IU、5IU至10,000IU、10IU至1000IU,或50,000IU至500,000IU。一般而言,IU是物质——例如维生素D前体——的量的度量单位,其基于根据国际机构定义的并且国际上所接受的特定的生物学活性或效果。在一些实例中,对于维生素D而言,1IU是0.025 μ g胆沉钙醇/麦角钙化甾醇的生物学当量。

[0083] 在某些实例中,所述受试者是哺乳动物受试者,例如人或其他灵长类,或者马、狗或猫。例如,所述受试者可为患有2型糖尿病的受试者,例如接受GLP-1激动剂用于治疗或控制他们的糖尿病的受试者,或者以前用GLP-1激动剂治疗过的受试者。在一个实例中,所述受试者是患有肿瘤的受试者,例如患有肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌或肺癌。在一些实例中,在至少1天、至少7天、至少14天、至少30天、至少60天、至少6个月、至少1年、至少2年或至少5年内对这样的受试者例如哺乳动物给予一种或多种VDR激动剂。

[0084] 在另一实例中,可对所述受试者(例如人或实验室动物,例如大鼠、小鼠或非人灵长类)以足以提高VDR的表达的浓度和时间给予VDR激动剂。在一个实例中,在至少1天、至少7天、至少14天、至少30天、至少60天、至少6个月、至少1年、至少2年或至少5年内对哺乳动物给予一种或多种VDR激动剂。在一些实例中,对哺乳动物给予至少1国际单位(IU)的一种或多种VDR激动剂,例如至少5IU、至少10IU、至少10IU、至少100IU、至少1000IU、至少5000IU、至少10,000IU、至少50,000IU、至少100,000IU、至少500,000IU,例如5IU至50,000IU、5IU至10,000IU、10IU至1000IU、1000IU至500,000IU或50,000IU至500,000IU。

[0085] B. 治疗具有相关星形细胞的肿瘤的方法

[0086] 本文提供了降低CXCL12活性——例如星形细胞中或由星形细胞进行的CXCL12产生和/或分泌——的方法,所述方法可用于治疗具有相关星形细胞的肿瘤和癌。可用本文提供的方法治疗的癌的实例包括肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌和肺癌。在一些实施方案中,所述方法可用于治疗胰腺癌。在一个实例中,所述癌是胰腺导管腺癌。这样的方法可包括给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂(例如卡泊三醇或帕立骨化醇)以及治疗有效量的一种或多种化疗剂或生物学药剂(例如单克隆抗体)至所述受试者。所公开的方法可与用于治疗癌症的手术切除组合,例如在用所公开的方法治疗所述肿瘤后进行手术,或在用所公开的方法治疗之前进行手术。

[0087] 所使用的一种或多种化疗剂或生物学药剂可根据常规知识基于所述受试者患有的肿瘤来确定。例如,如果所述肿瘤是胰腺癌(例如,胰腺导管腺癌,PDA)则所述一种或多种化疗剂可包括氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼和蛋白结合的紫杉醇(例如Nab-紫杉醇, **Abbraxane®**)中的一种或多种;如果所述肿瘤是肺癌(例如,NSCLC),则所述一种或多种化疗剂可包括甲氨蝶呤、吉西他滨、紫杉醇、顺铂、阿扎胞苷和恩替诺特中的一种或多种;如果所述肿瘤是肾癌(例如,肾细胞癌),则所述一种或多种化疗剂或生物学药剂可包括依维莫司、阿地白介素、阿伐单抗、阿昔替尼、贝伐单抗、甲苯磺酸索拉菲尼、盐酸帕唑帕尼、苹果酸舒尼替尼和替西罗莫司中的一种或多种;如果所述肿瘤是前列腺癌,则所述一种或多种化疗剂或生物学药剂可包括乙酸阿比特龙、比卡鲁胺、卡巴他赛、地加瑞克、地诺单抗、艾西他奇、恩杂鲁胺、乙酸戈舍瑞林、乙酸亮丙瑞林、泼尼松、二氯化镭223、西普亮奇-T和多西他赛中的一种或多种;如果所述肿瘤是胆管的癌症(胆管癌),则所述一种或多种化疗剂或生物学药剂可包括5-氟尿嘧啶、亚叶酸、吉西他滨、吉西他滨+顺铂、伊立替康、卡培他滨和埃罗替尼(例如5-氟尿嘧啶+亚叶酸或吉西他滨+顺铂)中的一种或多种;并且如果所述肿瘤是肝癌(例如肝细胞癌),则所述一种或多种化疗剂包括索拉菲尼、多柔比星、吉西他滨、顺铂、干扰素、多柔比星和氟尿嘧啶(例如PIAF:顺铂、干扰素、多柔比星和氟尿嘧啶)中的一种或多种。在一个具体实例中,所述肿瘤是PDA,并且所述一种或多种化疗剂包括(a)吉西他滨、(b)吉西他滨和埃罗替尼,或(c)吉西他滨和蛋白结合的紫杉醇。因此,本公开内容提供了一种

通过包括以下的方法来治疗胰腺导管腺癌的方法：(1)给予治疗有效量的一种或多种VDR激动剂至患有PDA的哺乳动物受试者，以及(2)给予治疗有效量的选自氟尿嘧啶、吉西他滨、埃罗替尼、蛋白结合的紫杉醇或其组合组成的组的化疗剂，从而治疗所述受试者中的胰腺导管腺癌。

[0088] 在一个实施方案中，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂以及一种或多种化疗剂或生物学药剂(例如单克隆抗体)二者的组合协同地增强所述一种或多种化疗剂或生物学药剂的作用。不希望囿于特定理论，提出，所述VDR激动剂的使用降低了星形细胞的CXCL12产生，从而降低了CXCL12从T细胞“遮蔽”肿瘤细胞。此外，所述VDR激动剂降低星形细胞的促存活因子(例如CTGF或PDGF)、血管发生的负调控子以及细胞外基质组分的产生，使得肿瘤可更容易地被化疗剂或生物学药剂接近，从而使得肿瘤更易受这样的药剂的攻击。

[0089] 因此，在一些实例中，治疗有效量有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的组合还抑制肾癌(例如，RCC)、肝癌(例如，HCC)、胰腺癌(例如，PDA)、前列腺癌、胆管癌和肺癌(例如，NSCLC)的生长、减小所述癌的体积或尺寸，降低所述癌的转移，减轻所述癌的征兆或症状，减少所述癌的肿瘤细胞数量或降低所述癌的生长速率。在一些实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予使这样的癌的生长或生长速率降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予使这样的癌的体积减少至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予使这样的癌的尺寸减少至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予使这样的癌的转移降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予使这样的癌的征兆或症状减轻至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予使这样的癌细胞的数量减少至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0090] 在一个实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予可使CXCL12从T细胞“遮蔽”或“屏蔽”肿瘤细胞(例如肝、胰腺、肺、前列腺、胆管或肾的癌细胞)的能力降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。因此，在一些实例中，与不存在VDR激动剂相比，治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的给予可使T细胞结合或识别肿瘤细胞的能力提高至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%。

[0091] 在一些实例中,与不存在VDR激动剂相比,治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的组合使肾癌(例如,RCC)、肝癌(例如,HCC)、胰腺癌(例如,PDA)、前列腺癌、胆管癌和肺癌(例如,NSCLC)中的化疗剂或生物学药剂的量提高至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%。

[0092] 测量这样的肿瘤生长和化疗剂/生物学药剂浓度的参数的方法是已知的以及在本文中有提供,并且这样的测定可用于确定是否是治疗有效量的一种或多种VDR激动剂与一种或多种化疗剂或生物学药剂二者的组合。用于测量或监测肿瘤的示例性方法包括但不限于,诊断成像(例如CT扫描、x-射线、超声等)、显微成像(例如光学显微镜、免疫荧光显微镜、流式细胞术等)、肿瘤的组织活检以及血液诊断学(例如,测量AFP作为HCC的标志物、CA19-9作为PDA的生物标志物、作为前列腺癌的生物标志物等)。在下文的实施例中提供了其他示例性的诊断方法。

[0093] 可使用所述VDR激动剂和所述化疗剂/生物学药剂的任何给药方式。在一些实例中,可针对所述VDR激动剂以及针对所述化疗剂/生物学药剂使用不同的给药方式。在一个实例中,所述VDR激动剂经口、腹膜内或静脉内给予,并且所述化疗剂或生物学药剂经静脉内给予。在一个实例中,可使用所述VDR激动剂和所述化疗剂/生物学药剂的位点特异性给药,例如通过将所述化合物应用于肿瘤所处的区域或已经将肿瘤去除的区域,或者应用于怀疑倾向于肿瘤发展的区域来进行。在一些实施方案中,使用持续的瘤内给药(或近瘤给药)。

[0094] C. 治疗或预防GLP激动剂诱导的胰腺炎的方法

[0095] 本文提供了通过降低从活化的星形细胞的炎性细胞因子和纤维化蛋白质的产生来降低慢性和急性胰腺炎中诱导的炎性和纤维化应答的方法,所述方法可用于治疗或预防胰腺炎。此外,活化的星形细胞的治疗还将降低CXCL12的产生和/或分泌。例如,可使用治疗有效量的一种或多种VDR激动剂(例如骨化三醇或卡泊三醇或其他非天然存在的VDR激动剂)来治疗胰腺炎,例如由GLP激动剂(例如GLP-1激动剂)诱导的胰腺炎。这样的受试者可为接受一种或多种GLP-1激动剂用于治疗糖尿病——例如2型糖尿病——的受试者。在一个具体实例中,所述治疗包括在使所述特征或症状(例如腹上区或右上区中的向背部辐射的疼痛、轻度黄疸、呕吐、内出血、血压升高、疼痛或肿胀)减轻的条件下给予包含VDR激动剂的治疗组合物至具有因GLP-1激动剂而导致的胰腺炎的特征或症状的人患者。

[0096] 在一些实例中,所公开的方法是预防性的。因此,所治疗的受试者可为因GLP激动剂给予(例如,GLP-1激动剂))而具有发展出胰腺炎的风险的受试者,并且预防性地给予所述治疗组合物。在一个实施方案中,所述VDR激动剂的预防性给予延迟了GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的症状的发作。

[0097] VDR激动剂——降低星形细胞的活化并因此降低炎性细胞因子以及CXCL12的产生——无需完全抑制和/或反转星形细胞活化以治疗或预防胰腺炎而。在一些实例中,这样的化合物使星形细胞活化降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。因此,在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低星形细胞活化的VDR激动剂可使患有胰腺炎或具有胰腺炎风险的受试者中的呕吐降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少

95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低星形细胞活化的VDR激动剂可使患有胰腺炎或具有胰腺炎风险的受试者中的内出血降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低星形细胞活化的VDR激动剂可使患有胰腺炎或具有胰腺炎风险的受试者中的血压降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低星形细胞活化的VDR激动剂可使患有胰腺炎或具有胰腺炎风险的受试者中胰腺的肿胀或炎症降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实例中,与不存在VDR激动剂相比,降低星形细胞活化的VDR激动剂可使患有胰腺炎或具有胰腺炎风险的受试者中胰腺的纤维化降低至少10%、至少20%、至少25%、至少40%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0098] 测量胰腺炎的这样的症状和特征的方法是已知的以及在本文中有提供,并且这样的测定可用于确定所述VDR激动剂是否减轻这样的症状或特征。示例性的方法包括但不限于,诊断成像(例如,放射学、核医学、超声和磁共振,例如CT扫描或x-射线),以及对血液、血清、血浆淀粉酶或脂肪酶的检验,以及对胰腺外分泌和内分泌功能(例如,白细胞计数、葡萄糖水平)的检验。例如,证据可为改善的胰腺功能、减轻的疼痛、胰腺功能的保留,或所述受试者的胰腺中的结构变化。因此,例如,医生可在所述治疗之前、或所述治疗开始,并在治疗期间和之后立即测量GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的一种或多种指标。在某些实施方案中,持续治疗直至已经实现对GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的减轻、治愈或预防的证据。在其他实施方案中,在已经获得GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的减轻、治愈或预防的证据后继续治疗。在一些实例中,这样的治疗在受试者中持续GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的治疗时期,或持续受试者的整个生命时期。

[0099] 可使用测量胰腺内分泌和/或外分泌功能的检验来监测GLP-1激动剂诱导的胰腺炎。在一些实施方案中,通过存在胰腺钙化、糖尿病和脂肪泻的临床三联症来诊断胰腺功能不全。胰腺外分泌功能的检验包括但不限于CCK/肠促胰液素刺激检验、Lundh餐检验、ERCP和胰腺抽吸、粪便脂肪和氮或粪便胰酶和胰凝乳蛋白酶的测量,以及苯替酪胺检验和胰十二酯检验,以及血液中的胰蛋白酶原、脂肪酶或胰腺淀粉酶的测量。

[0100] 诊断和测量GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的严重程度的其他方法是本领域技术人员已知的,并且设想,这些方法中的任一种可用于评估对GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的治疗效力。

[0101] D. 维生素D受体(VDR)

[0102] VDR具有常见的核受体结构,例如,其包含N端活化结构域、具有两个锌指结构域的DNA结合区(DBD)、铰链区和配体结合结构域(LBD)。VDR活化的基因转录需要经过输入蛋白- α 、与RXR的异二聚化(Yasmin等,2005.J Biol Chem.,280(48):40152-60)以及与靶基因中存在的应答元件结合来进行初始核易位。VDR调控与维持肠和肾内的钙和磷酸盐稳态相关的基因。由VDR/RXR异二聚体引发的信号受到共活化蛋白或共抑制蛋白质的结合的调节,并且还依赖于核间隔中的其他信号传导伴侣(Ebert等,2006.Mol Cell Endocrinol,248(1-2):149-59)。VDR/RXR异二聚物是不允许的,因为RXR配体的存在或不存在都不影响VDR应答(Shulman等,2004.Cell,116(3):417-29)。直至最近,唯一已知的用于VDR的生理学配

体是骨化三醇。然而,特定的胆汁酸例如LCA和一些衍生物(LCA-乙酸盐、LCA-甲酸盐、3-酮基LCA)可活化VDR。这些胆汁酸VDR激动剂已经示出诱导SULT2A1表达,SULT2A1是肠粘膜中的磺基缀合的II相酶,可提供肠对胆汁酸的毒性效应和致癌效应的关键防御应答(Chatterjee等,2005.Methods Enzymol,400:165-91)。

[0103] E. 示例性的VDR激动剂

[0104] 如上文所述,VDR激动剂的给予可用于治疗具有活性星形细胞的癌症,并且可用于治疗或预防GLP-1诱导的胰腺炎。示例性的VDR激动剂包括可活化VDR的那些分子。确定药剂是否是VDR激动剂的方法是常规的。例如,CYP24A1表达的诱导可在与该药剂接触的表达VDR的细胞中测量,其中CYP24A1表达的提高(例如,表达提高10倍至20倍)表示该试剂是VDR激动剂。其他方法包括转染的报告基因构建体和FRET测定。在一些实例中,激动剂与纯化的LBD的结合通过测量对辅活化肽(例如,LXXLL)的诱导招募来检测。例如,与不存在所述激动剂相比,VDR激动剂可使表达VDR的细胞中的CYP24A1表达提高至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%至少100%、至少200%或甚至至少1000%。

[0105] VDR激动剂包括可结合并活化VDR的分子,例如 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ 及其前体和类似物、VDR配体和VDR激动剂前体。本公开内容不限于特定的维生素D激动剂。设想了各种生物学活性的维生素D激动剂。示例性药剂是本领域已知的。在一个实例中,所述VDR激动剂是非天然存在的VDR激动剂。

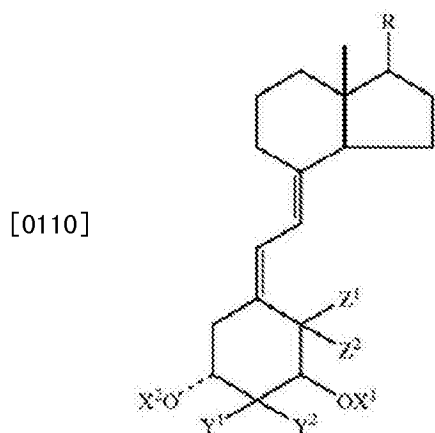
[0106] VDR激动剂包括维生素D化合物、其前体和类似物。可用于本文提供的方法的维生素D化合物包括但不限于具有以下特征中的至少一个特征的化合物:通过维生素D的5,7二烯双键体系与连接至D-环的任何侧链一起相互连接的维生素D的C-环、D-环和 3β -羟基环己烷A-环(例如,具有通过维生素D的典型5,7二烯双键系统与连接至D-环的侧链一起相互连接的“维生素D核”以及经取代的或未经取代的A-环、C-环和D-环的化合物)。

[0107] 维生素D类似物包括能够模拟开环甾醇骨化三醇的多种活性的非开环甾醇类化合物。这样的化合物的实例包括但不限于LG190090、LG190119、LG190155、LG190176和LG1900178(参见Boehm等,Chemistry&Biology6:265-275,1999)。

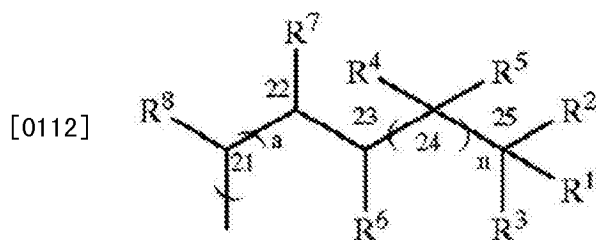
[0108] 维生素D化合物包括这样的化合物,其包括在体内具有生物学活性或者经在哺乳动物受试者中作用使化合物变为体内有活性的那些维生素D化合物和维生素D类似物。这样的化合物的实例包括但不限于:维生素D、骨化三醇及其类似物[例如, 1α -羟基维生素 D_3 ($1\alpha\text{-OH-D}_3$)、 $1, 25$ -二羟基维生素 D_2 ($1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$)、 1α -羟基维生素 D_2 ($1\alpha\text{-OH-D}_2$)、 $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-16-烯-D}_3$ 、 $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-24-氧代-16-烯-D}_3$ 、 $1\alpha, 24\text{R(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-22-氧杂-D}_3$ 、 $20\text{-表-22-氧杂-24a, 24b, -二高-}1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $20\text{-表-22-氧杂-24a, 26a, 27a, -三高-}1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $20\text{-表-22-氧杂-24高-}1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $1, 25\text{-(OH)}_2\text{-16, 23E-二烯-26-三氟-19-去甲-D}_3$ 以及非开环甾醇类维生素D模拟物。

[0109] 在一个实例中,所述VDR激动剂是以下中的一种或多种:维生素D、 $1\alpha, 25$ 二羟基维生素 D_3 、 1α -羟基维生素 D_3 、 $1, 25$ -二羟基维生素 D_2 、 1α -羟基维生素 D_2 、 $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-16-烯-D}$ 、 $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-24-氧代-16-烯-D}$ 、 $1\alpha, 24\text{R(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-22-氧杂-D}_3$ 、 $20\text{-表-22-氧杂-24a, 24b, -二高-}1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $20\text{-表-22-氧杂-24a, 26a, 27a, -三高-}1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-D}_3$ 、 $20\text{-表-22-氧杂-24高-}1\alpha, 25\text{(OH)}_2\text{-D}_3$ 以及 $1, 25\text{-(OH)}_2\text{-16, 23E-二烯-26-三氟-19-去甲-D}_3$ 。在一个优选实施方案中,所述生物学活性维生素D化合物选自 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 、 19-去

甲-1,25-二羟基维生素D₂、19-去甲-1,25-二羟基-21-表-维生素D₃、1,25-二羟基-24-高-22-去氢-22E-维生素D₃以及19-去甲-1,25-二羟基-24-高-22-去氢-22E-维生素D₃和非开环甾醇类维生素D模拟物。在一个另外的实例中,所述生物学活性VDR激动剂选自由下式表示的类似物:



[0111] 其中X¹和X²各自选自自由氢和酰基组成的组;其中Y¹和Y²可为H,或者其中之一可为O-芳基或O-烷基同时另一个为氢并且可具有β或α构型,Z¹和Z²二者都是H,或者Z¹和Z²一起为CH₂;并且其中R是烷基、羟基烷基或氟烷基基团,或者R可表示以下侧链:



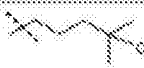
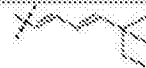
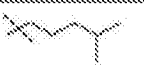
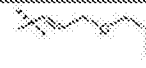
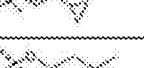
[0113] 其中(a)可具有S构型或R构型,其中R¹表示氢、羟基或O-酰基,R²和R³各自选自自由烷基、羟基烷基和氟烷基组成的组,或者一起表示基团--(CH₂)_m--,其中m是具有2至5的值的整数,R⁴选自自由氢、羟基、氟、O-酰基、烷基、羟基烷基和氟烷基组成的组,R⁵选自自由氢、羟基、氟、烷基、羟基烷基和氟烷基组成的组,或者R⁴和R⁵一起表示双键键合的氧,R⁶和R⁷一起形成碳-碳双键,并且R⁸可为H或CH₃,并且其中n是具有1至5的值的整数,并且其中侧链中的20、22或23位中任一位置的碳可被O、S或N原子替代。

[0114] 在一个实例中,当给予至受试者时,用于本文提供的方法中的VDR激动剂不引起高钙血症的症状。在另一实例中,当给予至受试者时,所述VDR激动剂与骨化三醇相比不产生那么多(即,更低程度)的血钙应答。在一个实例中,与骨化三醇相比,VDR激动剂具有低血钙应答特征。在另一个实施方案中,这些化合物选自1α,25-(OH)₂-24-表-D₂、1α,25-(OH)₂-24a-高-D₃、1α,25-(OH)₂-24a-二高-D₃、1α,25-(OH)₂-19-去甲-D₃和20-表-24-高-1α,25-(OH)₂-D₃。在另一个实施方案中,所述VDR激动剂是卡泊三醇或帕立骨化醇。

[0115] 表1中提供了可用于本文提供的方法中的其他示例性的VDR激动剂。

[0116] 表1. 1,25-(OH)₂D₃及其合成类似物(得自Nagpal等,Endocr.Rev.2005;26:662-687)。

[0117]

维生素 D 类似物			
			
化合物	R	化合物	R
1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ (骨化三醇)		1 α ,25-(OH) $_2$ -22,24-二烯-24a,26a,27a-三醇-D $_3$ (EB1089)	
1 α -(OH)D $_3$ (阿法骨化醇)		1 α ,25-(OH) $_2$ -22-烯-25-氧杂-D $_3$ (ZK156718)	
1 α ,24-(OH) $_2$ -24-环丙基-D $_3$ (卡泊三醇)		25-(4-甲基噻唑-2-基)-卡泊三醇(ZK191732)	
1 α ,25-(OH) $_2$ -22-氧杂-D $_3$ (帕立骨化醇)		1 α ,24R-(OH) $_2$ D $_3$ (依卡西醇)	
 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ (骨化三醇)		 ED-71(1 α ,25-(OH) $_2$ -28-(3-苯硫基)D $_3$)	
26-表维生素 D 类似物			
			
化合物	R	化合物	R
26-表-22-乙氧基-23-烯-24a,26a,27a-三醇-1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ (CB1093)		26-表-1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ (KH1060)	
 1 α -取代-25-(OH)-16,26E-二烯-26,27-二醇-26-表-20-羟化衍生物(R=26-6228, BXL-628, RS-980409)		 2-甲基-19-去甲-(20S)-1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ (2M/D)	

[0118] 在一些实例中,所述VDR激动剂用于与其他治疗剂组合来进行治疗,所述其他治疗剂例如一种或多种核受体配体,包括但不限于以下物质的配体:过氧化物酶体增生物活化的受体- γ (PPAR- γ , NR1C3)、过氧化物酶体增生物活化的受体- α (PPAR- α , NR1C1)和过氧化物酶体增生物活化的受体- δ (PPAR- δ , NR1C2)、法尼酯x受体(FXR, NR1H4)、干扰素- γ (IFN- γ)、血管紧张肽转换酶抑制剂、血管紧张肽II受体拮抗剂、胆烷酸(UDCA)、姜黄素、抗氧化剂(包括但不限于维生素E)、类视黄醇例如维生素A,以及将蛋白酶递送至肝以降解病理学ECM的治疗剂。

[0119] F. 维生素D受体激动剂包含于药物中

[0120] 所公开的治疗癌症或治疗/阻止胰腺炎的方法包括将一种或多种VDR激动剂,例如1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 、卡泊三醇、帕立骨化醇、维生素D前体(例如,25-羟基-D $_3$ (25-OH-D $_3$))(骨化二

醇);维生素D₃(胆沉钙醇);或维生素D₂(麦角钙化甾醇)、维生素D类似物和VDR激动剂前体在药学上可接受的载体中并且以有效抑制(例如,减轻、治愈、改善或预防)所述受试者中的胰腺炎的发展、进展或表现的量给予至受试者。本公开内容还设想了包含多于一种的VDR激动剂以及与其他治疗(例如,如本文提供的治疗癌症的化疗剂和/或生物学治疗剂)组合的VDR激动剂的治疗组合物的给予。

[0121] 所述VDR激动剂在其中递送的媒介物可包括所述化合物的药学上可接受的组合物,通过使用本领域技术人员公知的方法来得到。可采用任何常用的载体,例如无菌盐水或葡萄糖溶液。所述媒介物还可包括常规的药物辅助材料,例如调节渗透压的药学上可接受的盐、脂质载体例如环糊精、蛋白质例如血清白蛋白、亲水剂例如甲基纤维素、洗涤剂、缓冲剂、防腐剂等。对肠胃外药物载体的更完全的描述可在Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第19版,1995)的95章中找到。

[0122] 如本领域技术人员公知的,其他药物组合物的实施方案可用常规的药学上可接受的载体、佐剂和抗衡离子来制备。一些实施方案中的组合物是固体、半固体和液体剂型的单位剂量形式,例如片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、粉剂、液体溶液剂或混悬剂。

[0123] 在一些实施方案中,包含有效量的VDR激动剂的药物制剂的持续释放是有益的。对本领域技术人员而言,缓释制剂是已知的。通过示例的方式,持续释放的片剂可被配制成将活性成分包埋于不溶性物质的基质中,从而通过所述基质中的孔逐渐进行药物溶解。在一些制剂中,所述基质物理性地溶胀以形成凝胶,从而使所述药物首先溶解于基质中,然后通过外表面离开。

[0124] 在一个实例中,对于本方法的VDR激动剂的优选剂量是患者可耐受并且不发展出严重高钙血症的最大剂量。在一个实施方案中,所述VDR激动剂化合物的治疗性给予仅引起轻度的高钙血症。在另一实例中,所述VDR激动剂不引起高钙血症的症状。

[0125] 在一些实施方案中,维生素D₂和D₃的治疗有效剂量介于约50IU至约50,000IU的范围。在一些实施方案中,例如,维生素D₂和/或D₃以例如以下的口服剂量给予:小于约75IU、约100IU、约250IU、约500IU、约750IU、约1,000IU、约1,500IU、约2,000IU、约2,500IU、约5,000IU、约7,500IU、约10,000IU、约15,000IU、约20,000IU、约25,000IU、约40,000IU、或约50,000IU或更高。在其他实施方案中,骨化三醇以0.001微克至10微克的剂量来给予。例如,在一些实施方案中,骨化三醇以以下剂量来给予:约0.01μg、约0.05μg、约0.1μg、约0.25μg、约0.5μg、约1μg、约5μg或约10μg。在一个实施方案中,所述VDR激动剂是以以下剂量给予的卡泊三醇:至少1μg/kg、至少10μg/kg、至少25μg/kg、至少50μg/kg、至少60μg/kg、或至少100μg/kg,例如1μg/kg至1000μg/kg、1μg/kg至100μg/kg、1μg/kg至75μg/kg、10μg/kg至80μg/kg、30μg/kg至75μg/kg,或50μg/kg至70μg/kg,例如10μg/kg、20μg/kg、30μg/kg、40μg/kg、50μg/kg、60μg/kg、70μg/kg、80μg/kg、90μg/kg、100μg/kg、110μg/kg或120μg/kg。在一些实例中,这样剂量的卡泊三醇通过腹膜内或静脉内注射来给予。在一个实施方案中,所述VDR激动剂是以以下剂量给予的帕立骨化醇:至少0.1μg、至少1μg、至少5μg至少10μg、至少20μg、至少50μg或至少100μg,例如1μg至20μg、5μg至15μg,或8μg至12μg,例如1μg、2μg、3μg、4μg、5μg、6μg、7μg、8μg、9μg、10μg、11μg、12μg、13μg、14μg、15μg、16μg、17μg、18μg、19μg或20μg。在一些实例中,这样剂量的卡泊三醇通过静脉内注射来给予,每周3次。在一些实施方案中,较大剂量的VDR激动剂通过靶向感兴趣的器官(例如胰腺、肝、肾、肺或前列腺)的递送途径来

给予。在下文中更充分地描述了这样的靶向方法。

[0126] 在某些实施方案中,所述VDR激动剂经口给予,例如,以单一剂量或分开的剂量来给予。对于经口给予,所述组合物例如以包含1.0mg至1000mg活性成分的片剂的形式提供,例如至少75IU、至少100IU、至少250IU、至少500IU、至少750IU、至少800IU、至少1,000IU、至少1,500IU、至少2,000IU、至少2,500IU、至少5,000IU、至少7,500IU、至少10,000IU、至少15,000IU、至少20,000IU、至少25,000IU、至少40,000IU或至少50,000IU/天,例如50IU至2000IU/天、100IU至1000IU/天,例如800IU/天,或更多的活性成分,根据症状来调节对正在治疗的受试者的剂量。

[0127] 可期望有效的肠胃外剂量更低,例如介于约0.001 μ g至约10 μ g的范围,这取决于所述化合物。因为在每个受试者的情况下,剂量和剂量方案必须根据专业判断单独考虑,考虑例如年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药方式和给药时间、排泄速率、药物组合以及经历治疗的宿主的病症的严重程度,在一些实例中,更低的剂量将是期望的,而在其他实例中将需要更大的剂量。

[0128] 在另一个实施方案中,如果所述VDR激动剂不是1 α -羟基化合物,则给予1.0 μ g至100 μ g/天/160磅患者的日剂量,例如5.0 μ g至50 μ g/天/160磅患者。在一个不同的实施方案中,如果生物活性的维生素D化合物是1 α -羟基化合物,则给予0.1 μ g至20 μ g/天/160磅患者的日剂量,而优选剂量为0.5 μ g至10 μ g/天/160磅患者。在一个具体实例中,所述剂量为3 μ g至10 μ g/天。

[0129] 在一个实例中,所述VDR激动剂是胆沉钙醇或骨化二醇。在一些实例中,给予比常用剂量更高的剂量,但是以更低频率来给予,例如每周50,000单位至500,000单位。

[0130] 本公开内容还包括维生素D受体激动剂与可用于治疗GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的一种或多种其他药剂的组合。例如,在一些实施方案中,VDR激动剂与有效剂量的其他医用和药用的药剂组合给予。在一些实施方案中,将一种或多种已知的抗胰腺炎药物与所述维生素D受体激动剂包含在一起。

[0131] 本公开内容还包括VDR激动剂与可用于治疗癌症的一种或多种其他药剂——例如化疗剂和/或生物学药剂——的组合。例如,在一些实施方案中,VDR激动剂与有效剂量的其他医用和药用的化疗剂和/或生物学药剂组合给予(例如同时给予、一起给予或一个在另一个之前给予)。在一些实施方案中,将一种或多种化疗剂和/或生物学药剂与所述VDR激动剂包含在一起。

[0132] G. 示例性的化疗剂和生物学治疗剂

[0133] 所公开的治疗具有活化星形细胞(例如具有CXCL12活性的星形细胞)的癌症的方法可使用VDR激动剂与其他治疗剂(例如化疗剂和生物学治疗剂)的组合。化疗剂和生物学治疗剂可包括抗肿瘤性化疗剂、抗生素、烷基化剂和抗氧化剂、激酶抑制剂,以及其他药剂例如抗体。这样的药剂的方法和治疗剂量对本领域技术人员而言是已知的,并且可由具有相关知识的临床医师来确定。可处于或可不处于以下一个或多个分类下的其他治疗剂例如抗肿瘤剂还适用于与所描述的VDR激动剂组合给予。这样的药剂的选择和治疗剂量对本领域技术人员而言是已知的,并且可由具有相关知识的临床医师来确定。例如,用于与一种或多种VDR激动剂组合治疗的化疗剂和/或生物学药剂可基于待治疗的癌症来选择。

[0134] 在一个实例中,化疗剂或生物学药剂提高对癌细胞的杀伤(或降低癌细胞的生存

力)。这样的杀伤无需导致癌症细胞减少100%；例如导致有活力的癌症细胞数量减少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少75%、至少90%或至少95%(例如与没有用癌症化疗剂或生物治疗剂治疗相比)的癌症化疗剂可用于本文提供的方法。例如,所述癌症化疗剂或生物治疗剂可使癌症细胞的生长降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少75%、至少90%或至少95%(例如与没有化疗剂或生物治疗剂相比)。

[0135] 可使用的化疗剂的具体实例包括烷基化剂(例如氮芥(例如苯丁酸氮芥、氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑))、亚硝基脲(例如,卡莫司汀、福莫司汀、洛莫司汀和链佐星)、铂化物(例如,卡铂、顺铂、奥沙利铂和BBR3464)、白消安、达卡巴嗪、二氯甲基二乙胺、丙卡巴肼、替莫唑胺、噻替派和乌拉莫司汀;叶酸(例如,甲氨蝶呤、培美曲塞和雷替曲塞)、嘌呤(例如,克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨、巯基嘌呤和硫鸟嘌呤)、嘧啶(例如,卡培他滨)、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和吉西他滨;植物生物碱,例如鬼臼根(例如,依托泊苷和替尼泊苷);微管结合剂(例如紫杉醇、多西他赛、长春碱、长春地辛、长春瑞滨(诺维本)长春新碱、埃博霉素、秋水仙碱、尾海兔素15、诺考达唑、鬼臼毒素、根霉素及其衍生物和类似物)、DNA嵌入剂或交联剂(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、丝裂霉素例如丝裂霉素C、博来霉素、苯丁酸氮芥、环磷酰胺及其衍生物和类似物、DNA合成抑制剂(例如甲氨蝶呤、5-氟-5'-脱氧尿嘧啶、5-氟尿嘧啶及其类似物);蒽环霉素家族成员(例如,柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星);抗代谢药物,例如细胞毒性/抗肿瘤抗生素、博来霉素、利福平、羟基脲和丝裂霉素;拓扑异构酶抑制剂,例如拓扑替康和伊立替康;光敏剂,例如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠和维替泊芬、酶、酶抑制剂(例如喜树碱、依托泊苷、福美坦、曲古抑菌素及其衍生物和类似物)、激酶抑制剂(例如伊马替尼、吉非替尼和erolitinib)、基因调控剂(例如雷洛昔芬、5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、他莫昔芬、4-羟基他莫昔芬、米非司酮及其衍生物和类似物);以及其他药剂,例如阿利维甲酸、六甲蜜胺、安吡啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿昔替尼、贝沙罗汀、贝伐单抗、硼替佐米、塞来昔布、denileukin diftitox、雌莫司汀、羟基尿素、拉帕替尼、帕唑帕尼、喷司他汀、马索罗酚、米托坦、培门冬酶、他莫昔芬、索拉菲尼、舒尼替尼、维罗非尼、凡德他尼和维甲酸。

[0136] 在一个实例中,生物学治疗剂包括抗体或由抗体组成,所述抗体例如人源化抗体。这样的抗体可为多克隆、单克隆或嵌合抗体。如上文所述,对特定靶靶具有特异性的抗体的制备方法是常规的。在一些实例中,将所述治疗性抗体缀合至毒素。示例性的生物学治疗剂包括阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、吉妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、培妥珠单抗和曲妥珠单抗。

[0137] 生物学治疗剂的其他实例包括抑制性核酸分子,例如反义寡核苷酸、siRNA、microRNA(miRNA)、shRNA或核酶。设想了使用特异性靶向或调控靶核酸的表达的任何类型的反义化合物。反义化合物是特异性地与靶核酸分子杂交并调节靶核酸分子表达的化合物。这些化合物可作为单链、双链、环状、支链或发卡状化合物引入,并且可包含结构元件例如内部或端部突出物或环。双链反义化合物可为杂交形成双链化合物的两条链,或者具有足够的自身互补性以允许杂交并形成完全或部分双链的化合物的一条链。在一些实例中,反义寡核苷酸是单链反义化合物,使得当该反义寡核苷酸与靶mRNA杂交时,该二聚体被RNaseH识别,导致该mRNA的切割。在其他实例中,miRNA是至少部分地与通过RNAi通路调控基因表达的mRNA分子互补的约21至23个核苷酸的单链RNA分子。在另一些实例中,shRNA是

形成紧密发卡的RNA寡核苷酸,所述发卡被切割成siRNA。siRNA分子一般为约20至25个核苷酸长度,并且可在3'端上具有两个核苷酸悬突体,或者可具有平末端。一般而言,siRNA的一条链至少部分地与靶核酸互补。特异性地靶向基因的反义化合物可通过设计与靶核苷酸序列——例如mRNA序列——互补的化合物来制备。反义化合物无需与所述靶核酸分子100%互补以特异性地结合靶标并调控靶标的表达。例如,所述反义化合物或所述化合物的反义链(如果是双链化合物的话)可与靶核酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%互补。筛选反义化合物的特异性的方法是公知的(参见例如美国公布号2003-0228689)。此外,设计、制备和使用抑制性核酸分子的方法在本领域技术人员的能力内。

[0138] H. 给药路线

[0139] 本公开内容不旨在限于给予所述VDR激动剂、化疗剂或生物学治疗剂的具体方式。设想了各种给药方式,包括经静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内、胸腔内、鞘内、经口、直肠、经皮、通过吸入以及局部给药。在某些实施方案中,通过栓剂或以用于经口递送的片剂或胶囊制剂来给予所述治疗组合物。在一个实施方案中,所述治疗组合物的给予在晚上进行。在另一个实施方案中,在24小时周期内提供多个剂量(例如,3个或4个)。在另一个实施方案中,所述治疗组合物的给予通过静脉内推注治疗来进行。在一个实例中,所述治疗组合物通过经皮贴剂(皮肤贴剂)来给予。

[0140] 例如,在一个实施方案中,VDR激动剂、化疗剂和/或生物学治疗剂在用于静脉注射的任何常规介质(例如,水性盐水介质或血浆介质)中经静脉内给予。在其他实施方案中,给予是经口给予,例如作为液体或丸剂经口给予。在其他实施方案中,给予是直肠给予,例如通过包含所述VDR激动剂、化疗剂和/或生物学治疗剂的栓剂来进行。在其他实施方案中,给予通过将包含VDR激动剂、化疗剂和/或生物治疗剂的药物组合物直接输注至肺、肾、胰腺、前列腺或肝的动脉中来进行。在其他实施方案,使用靶向递送技术来将所述组合物递送至靶组织,例如肺、肾、胰腺、前列腺或肝。在一个具体的非限制性实例中,所述VDR激动剂、化疗剂和/或生物治疗剂被设计成由靶组织摄取,或与靶标特异性载体分子连接从而促进靶细胞的摄取。例如,对于星形细胞而言,可将所述VDR激动剂缀合至低密度和/或高密度脂蛋白的受体(LDL和/或HDL受体)。

[0141] 本公开内容还提供了包含含有VDR激动剂、化疗剂和/或生物治疗剂的治疗组合物的经皮贴剂。在一个实施方案中,所述经皮贴剂包含治疗有效量的VDR激动剂、化疗剂和/或生物治疗剂。在另一个实施方案中,所述经皮贴剂还包含单个聚合物或多个聚合物。在一个实例中,所述经皮贴剂还包含聚氨酯丙烯酸共聚物。在一个实施方案中,所述经皮贴剂还包含硅酮或聚异丁烯或二者。在一个实施方案中,所述经皮贴剂由具有发展出GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的风险的受试者佩戴。在另一个实施方案中,所述经皮贴剂由具有GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的症状的受试者佩戴。在另一个实施方案中,所述经皮贴剂在使得GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的症状减轻的条件下以连续的方式将VDR激动剂递送至受试者。在一个实施方案中,所述经皮贴剂由患有肺癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌或肝癌的受试者佩戴。

[0142] 本公开内容的VDR激动剂、化疗剂和/或生物治疗剂的药物组合物可在整个治疗期间以约相同的剂量给予,以逐渐提高的剂量方案给予,或以负荷剂量方案给予(例如,其中负荷剂量为维持剂量的约两倍至五倍)。在一些实施方案中,所述剂量在治疗过程中基于正

在治疗的受试者的病症、疾病或病症的严重程度、对该治疗的表观应答和/或本领域技术人员判断的其他因素而变化。在一些实施方案中,设想了用所述药物的长期治疗,例如以预防或减少受试者中GLP-1激动剂诱导的胰腺炎的复发。

[0143] 实施例1

[0144] 实验方法

[0145] 细胞系

[0146] 所述人胰腺癌细胞系MiaPaCa-2(CRL-1420)、BxPC-3(CRL-1687)、HPAC(CRL-2119)、Panc1(CRL-1469)和AsPC1(CRL-1682)得自ATCC,并根据提供者的指导进行培养。小鼠胰腺癌细胞系p532.1.1、p534.4和Ink2.2衍生自以下小鼠中的PDA:LSL-Kras^{G12D/+}; Trp53^{lox/lox};Pdx1-Cre小鼠或LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox};Pdx1-Cre小鼠(Bardeesy等, 2006; Collisson等, 2011),并且如以前描述的进行培养(Collisson等, 2011; Collisson等, 2012)。如以前描述的,自发永生化的胰腺星形细胞系hPSC分离并建立自手术切除后的胰腺癌患者(Mantoni等, 2011)。

[0147] 原代胰腺星形细胞的分离和培养

[0148] 小鼠PSC分离

[0149] 胰腺星形细胞(PSC)分离自8周龄的野生型C57BL6/J小鼠的胰腺,通过Apte等描述的方法(Apte等, 1998)的变形来进行。简略而言,用剪刀将胰腺组织切碎,并用0.02%链霉蛋白酶(Roche, Indianapolis, IN)、0.05%胶原酶P(Roche)和0.1%DNA酶(Roche)于Gey's平衡盐溶液(GBSS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO)中在37°C下消化20分钟。然后将经消化的组织通过100 μ m的尼龙筛过滤。细胞用GBSS洗涤一次,沉淀,并重悬于9.5ml包含0.3%牛血清白蛋白(BSA)的GBSS以及8ml 28.7%Nycodenz溶液(Sigma Aldrich; 溶液的近似密度为1.070)中。细胞混悬液分层于包含0.3%BSA的GBSS下,并在1400 $\times$ g下于4°C离心20分钟。从Nycodenz溶液底部与水性溶液顶部的界面收集感兴趣的细胞。分离的PSC用GBSS洗涤,并重悬于包含10%的具有优级FBS(HyClone)和抗生素(青霉素100U/ml和链霉素100 μ g/ml, Invitrogen)的DMEM(Invitrogen)中。将细胞维持于37°C下7%CO₂的潮湿气氛中。在达到80%汇合后,将细胞短暂地用胰蛋白酶(0.25%胰蛋白酶-EDTA, Invitrogen)消化,并进行亚培养。

[0150] 人PSC分离

[0151] 胰腺星形细胞通过Schafer等描述的方法的变形在肝中进行分离(Schafer等, 1987)。简略而言,用剪刀将来自人胰腺癌的胰腺组织切碎,并用0.02%链霉蛋白酶、0.05%胶原酶P和0.1%DNA酶在37°C下消化20分钟。将组织片洗涤并重悬于9.5ml Gey's平衡盐溶液(GBSS)中。在第二次洗涤后,将组织片重悬于包含10%胎牛血清、4mM谷氨酰胺和抗生素(青霉素100单位/ml;链霉素100 μ g/ml)的Iscove's改良的杜氏培养基中,接种于塑料六孔培养板中的具有如上详述的胎牛血清、谷氨酰胺和抗生素的杜氏培养基中,并使其粘附过夜。将组织维持于37°C, 5%CO₂/95%空气的潮湿气氛中,并维持到直至星形细胞产生(三至五周达到60%至80%汇合)。当PSC为约20%汇合时,移除组织片。培养基每周更换一次,并且使细胞生长至80%汇合,然后收集并冷冻于液氮中。

[0152] 动物

[0153] LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx1-Cre(KPC)小鼠如之前所述(Hingorani等,

2005), $Vdr^{-/-}$ 小鼠亦如此(Yoshizawa等,1997)。

[0154] RNA-Seq

[0155] 根据制造商的指导,使用Trizol(Invitrogen)和RNeasy mini试剂盒进行柱上DNA酶消化(Qiagen),从人和小鼠PSC分离总RNA。对人样品进行生物学四次重复,并对小鼠样品进行生物学三次重复。为了用VDR活化进行转录组研究,PSC用媒介物(DMSO)或100nM卡泊三醇(Tocris)处理,并在指定的时间点收集。测序文库通过使用TruSeq RNA Sample Preparation试剂盒v2(Illumina)根据制造商的方案从100ng至500ng总RNA制备。用于RNA-Seq数据的基因表达综合登录号(Gene Expression Omnibus accession number)是GSE43770。

[0156] 定量RT-PCR

[0157] 根据制造商的指导在Trizol提取后纯化总RNA。cDNA合成使用iScript试剂(Bio-Rad)进行,并且qRT-PCR使用SsoAdvanced SYBR Green试剂在CFX384检测系统(Bio-Rad)上进行。使用标准曲线法来确定相对表达值。引物序列可在表2中找到。

[0158] 表2:引物序列

[0159]

	基因	正向引物序列	SEQ ID NO:	反向引物序列	SEQ ID NO:
小鼠 / 人	<i>36b4</i>	GTGCTGATGGGC AAGAAC	1	AGGTCCTCCTTG GTGAAC	34
小鼠	<i>Vdr</i>	GCTGAACCTCCAT GAGGAAG	2	GGATCATCTTGGC GTAGAGC	35
	<i>Ccl2</i>	CCCAATGAGTAG GCTGGAGA	3	TCTGGACCCATTC CTTCTTG	36
	<i>Colla1</i>	ACGCATGGCCAA GAAGAC	4	GGTTTCCACGTCT CACCATT	37
	<i>Cxcl13</i>	CAGAATGAGGCT CAGCACAG	5	TTGTGTAATGGGC TTCCAGA	38
	<i>Il6</i>	TTCTCTGGGAAAT CGTGGAAA	6	TGCAAGTGCATC ATCGTTGT	39
	<i>Wnt2b</i>	GCTGCTGCTGCTA CTCCTGA	7	GCTCCCAGAGCC CCTATGTA	40
	<i>Wnt9a</i>	CGAGTGGACTTC CACAACAA	8	GCAAGTGGTTTC CACTCCAG	41
	<i>Mmp2</i>	GATGTCGCCCCTA AAACAGA	9	GGGCAGCCATAG AAAGTGTT	42
	<i>Idi1</i>	TTGGGAATACCCT TGGAAGA	10	CATGTTCACCCCA GATACCA	43
	<i>Nsdhl</i>	GCAAGCTGAGGT CGATCATT	11	TGGCTCAAAGTA TGGTTTCGT	44

[0160]

	<i>Insig1</i>	ATCTTCTCCTCCG CCTGGT	12	TGGTTCTCCCAG GTGACTGT	45
	<i>Acta2</i>	TGACAGGATGCA GAAGGAGA	13	CCACCGATCCAG ACAGAGTA	46
	<i>Prss3</i>	TCTGTCCCCTACC AGGTGTC	14	GTTGGGGTGCTT GATGATCT	47
	<i>Ins2</i>	TTTGTCAAGCAG CACCTTTG	15	TCTACAATGCCAC GCTTCTG	48
	<i>Krt19</i>	ACCCTCCCGAGAT TACAACC	16	GGCGAGCATTGT CAATCTGT	49
	<i>Cdkn1a</i>	ACTACCAGCTGTG GGGTGAG	17	GGACATCACCAG GATTGGAC	50
	<i>Has2</i>	CGGAGGACGAGT CTATGAGC	18	CTGTGATTCCGA GGAGGAGA	51
	<i>Cyp24a1</i>	CCAGCGGCTAGA GATCAAAC	19	CACGGGCTTCAT GAGTTTCT	52
	<i>Colla2</i>	CCGTGCTTCTCAG AACATCA	20	CTTGCCCCATTCA TTTGTCT	53
	<i>Shh</i>	CTGGCCAGATGTT TTCTGGT	21	CTCGGCTACGTT GGGAATAA	54
	<i>Pkm2</i>	TGTCTGGAGAAA CAGCCAAG	22	TCCTCGAATAGCT GCAAGTG	55
	<i>Ccnb1</i>	ATCGGGGAACCT CTGATTTT	23	GGCTTGGAAGCA GCAGTAAC	56
	<i>Tnfa</i>	CGAGTGACAAGC CTGTAGCC	24	AGCTGCTCCTCC ACTTGGT	57
	<i>B2M</i>	GGTCTTTCTGGTG CTTGTCT	25	TATGTTCGGCTTC CCATTCT	58
	<i>Des</i>	CGAGCTCTACGA GGAGGAGA	26	GAAGGCAGCCAA GTTGTTCT	59

[0161]

	<i>Thbs1</i>	GACTCGGGACCC ATCTATGA	27	GGGGTTTCTCTA GCCCTTGT	60
	<i>Ctgf</i>	AGAGTGGAGCGC CTGTTCTA	28	GACAGGCTTGGC GATTTTAG	61
	<i>Postn</i>	CCTGCAAATGCC AACAGTTA	29	TTTCTTCCCGCAG ATAGCAC	62
	<i>Fabp4</i>	GATGGTGACAAG CTGGTGGT	30	AATTTCATCCAG GCCTCTT	63
	<i>Cda</i>	TCAGCCTACTGCC CCTACAG	31	GAGATGGCAATA GCCCTGAA	64
	<i>Dck</i>	GACAAACACGAA AGCCTGGT	32	TCAAGCAATGGC AGTACACA	65
	<i>Amy2a</i>	CATCTGTTTGAAT GGCGATG	33	TTCCCACCAAGG TCTGAAAG	66
	基因	正向引物序列	SEQ ID NO:	反向引物序列	SEQ ID NO:
人	<i>ACTA2</i>	CGATGCTCCCAG GGCTGTTT	67	TTCGTCACCCAC GTAGCTGTCTTT	87
	<i>CXCL1</i>	GAAAGCTTGCCT CAATCCTG	68	CACCAGTGAGCT TCCTCCTC	88
	<i>CSF2</i>	CAGCCACTACAA GCAGCACT	69	AAGGGGATGACA AGCAGAAA	89
	<i>AURKB</i>	GGGAGAGCTGAA GATTGCTG	70	GCACCACAGATC CACCTTCT	90
	<i>WNT2B</i>	ACATAATAACCGC TGTGGTCGCAC	71	TGGCACTTACAC TCCAGCTTCAGA	91
	<i>JAG1</i>	CCCCTAAGCCTC CTGCTC	72	GCATGGACAGGA TCTCCAAC	92

[0162]

	<i>MMP2</i>	CCAAGTGGGACA AGAACCAGATCA	73	GTCCAGATCAGG TGTGTAGCCAAT	93
	<i>COL1A1</i>	ACAGCCGCTTCA CCTACAGC	74	CGGTGTGACTCG TGCAGC	94
	<i>COL3A1</i>	AGAGGGGCTCCT GGTGAG	75	GCAGTTCCAGGA GGACCAG	95
	<i>ID11</i>	TGATCACCATTGG CTGGGAAGGAA	76	GCTGCCACAAAC CTCCACTTTGTA	96
	<i>NSDHL</i>	TTGCGAGCTGAG GCCAGACA	77	AAACTCCTGTGA CTCTGCTGATGA GG	97
	<i>INSIG1</i>	TTTCCTCCGCCTG GTGGGT	78	GTTCTCCGAGGT GACTGTGATAC A	98
	<i>IL6</i>	AAAGAGGCACTG GCAGAAAA	79	AGCTCTGGCTTG TTCCTCAC	99
	<i>CCL2</i>	GCCTCCAGCATG AAAGTCTC	80	CACTTGCTGCTG GTGATTCT	100
	<i>HAS2</i>	ACAGACAGGCTG AGGACGAC	81	GCTGTGATTCCA AGGAGGAG	101
	<i>HAS2</i> 启动子	ACGTCGGAATTG GCTCTG	82	CAGATAGGAGCG GGAGGAG	102
	<i>COL1A1</i> 启动子	ACATGGAAAAGC CTTGATGG	83	GCAGCAGTCTGG AAGGTAGG	103
	<i>VDR</i>	ACTTGCATGAGG AGGAGCAT	84	TCGGCTAGCTTCT GGATCAT	104
	<i>CYP24A1</i>	CCAGCGATAATAC GCCTCA	85	ACCCTGTAGAAT GCCTTGGA	105

[0163]

	<i>THBS1</i>	GGGAAGAAAATC ATGGCTGA	86	CAGAAGGTGCAA TACCAGCA	106
--	--------------	--------------------------	----	--------------------------	-----

[0164] 脂滴积累测定

[0165] 将原代人CAPSC接种于盖玻片上。在过夜附着后,用媒介物(DMSO)或100nM卡泊三醇处理细胞48小时。吸取培养基,细胞用PBS(Gibco)洗涤两次,并于室温下在10%缓冲的福尔马林中固定15分钟。去除固定剂,并且细胞用PBS洗涤三次。然后在室温和避光下用1 μ g/ml 4,4-二氟-1,3,5,7,8-五甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茚烯(BODIPY 493/503, Molecular Probes)对细胞染色1小时。去除染料,并且细胞用PBS洗涤三次,然后使用Vectastain封片剂(Vector Labs)进行封片。在Leica DM5000B荧光显微镜上通过GFP过滤器显示荧光,并使用ImageJ进行定量。

[0166] 条件培养基实验

[0167] 使原代CAPSC生长至100%汇合。将新鲜介质添加至培养物,并在此时,用100nM卡泊三醇处理CAPSC。48小时后,收集条件培养基,通过0.45 μ m孔进行无菌过滤,并将其添加至50%至60%汇合的胰腺癌细胞(PCC)。在条件培养基孵育开始时,用100nM卡泊三醇直接处理PCC。48小时后,收集PCC,并分离RNA和蛋白质用于分析。

[0168] 体外生存力测定

[0169] 将MiaPaCa-2细胞接种于96-孔板(1 $\times$ 10⁴细胞/孔)的DMEM+10%FBS中。在孵育过夜后,洗涤细胞,并将培养基更换为具有或没有100nM卡泊三醇的DMEM+10%FBS;或者更换为CAPSC条件培养基(CM),所述CM来自用100nM卡泊三醇孵育CAPSC持续48小时,然后收集CM。将细胞孵育24小时,然后用指定剂量的吉西他滨(Sigma)或仅媒介物进行处理。48小时后,根据制造商的指导使用基于CellTiter-Glo发光的生存力测定(Promega)测量生存力。实验进行三次重复。

[0170] 原位移植/同种异体移植物模型

[0171] 所用的原位移植模型在以前有描述(Collisson等,2012)。简略而言,将50% Matrigel中的1 $\times$ 10³p53 2.1.1细胞原位注入6至8周大的FVB/n小鼠中。在第7天进行生物发光成像后,将小鼠随机化至四个治疗组中的一组中:盐水、卡泊三醇(60 μ g/kg i.p., QDX20)、吉西他滨(20mg/kg i.p., Q3DX4)或卡泊三醇+吉西他滨。对于组合治疗的小鼠,在第7天开始卡泊三醇治疗并在第14天开始吉西他滨治疗。第26天或当小鼠痛苦时麻醉小鼠,并收集胰腺,切片,并快速冷冻于液氮中,或立即固定于福尔马林中。

[0172] PH3定量

[0173] 胰腺在包含锌的中性缓冲的福尔马林(Anatech Ltd.)中固定过夜,包埋于石蜡中,切成5 μ m切片,并放置于Superfrost+玻片(Fisher Scientific)上。在压力锅中进行柠檬酸盐介导的抗原修复后,将内源过氧化物酶在3%H₂O₂/PBS中淬灭15分钟。然后通过二甲苯/乙醇系列将切片脱蜡和水化。剩余的步骤使用Vectastain Elite ABC染色试剂盒(载体 Labs)进行。初级抗体以1:100使用(Cell Signaling Technology)。玻片用苏木精复染。在Zeiss Axio Imager.M2显微镜上每个肿瘤(n=5)捕捉六个200 $\times$ 的图像,并进行评分。使用Nuance3.0.1.2多谱成像软件获取图像,并使用inForm 1.4.0Advanced Image Analysis软件(PerkinElmer)鉴定阳性细胞并进行评分。

[0174] KPC研究设计

[0175] 如以前描述的,基于肿瘤尺寸使用患有胰腺导管腺癌的KPC小鼠(Olive等,2009)。在该研究中,注册限制于患有平均直径在6mm至9mm之间的肿瘤的小鼠,所述直径通过高分辨率超声成像来确定。将合适的小鼠分配于治疗组:吉西他滨;卡泊三醇;或吉西他滨与卡泊三醇组合。吉西他滨作为盐水溶液以100/kg通过腹膜内注射来给予,每三天一次;在适当的时候,给予最终剂量,在两个小时后进行安乐死。卡泊三醇作为盐水溶液以60 μ g/kg通过腹膜内注射进行每日给予。在九天的治疗后或在出现例如腹水、重度恶病质、大幅体重损失或不活跃等临床症状时,对小鼠进行安乐死。在九天的治疗研究期间,通过高分辨率超声对肿瘤进行成像最多两次。

[0176] KPC肿瘤的成像和定量

[0177] 如以前描述的,对小鼠胰腺的高分辨率超声成像使用具有35MHz RMV扫描头的Vevo 770系统(Visual Sonics, Inc.)来进行((Dowell和Tofts, 2007)。以0.25mm的区间采集系列3D图像。使用集成的Vevo 770软件包,在每个2D图像上描绘肿瘤轮廓并进行重构,以测量3D体积。

[0178] 通过LC-MS/MS对瘤内dFdC、dFdU和dFdCTP进行定量

[0179] LC-MS/MS如Bapiro等描述的进行(Bapiro等,2011)。称取肿瘤样品(10mg)并在包含25 μ g/ml四氢尿苷(Millipore)的200 μ l冰冷的50%乙腈(v/v)中进行匀浆化。匀浆化在PowerLyzer 24(MO BIO Laboratories, Inc.)中在陶瓷珠中于3000rpm下在2次30秒脉冲进行。在短暂地储存于-80 $^{\circ}$ C下后,将样品在冰上融化,并在功率水平设置为2的Sonic Dismembrator 550超声匀浆机(Fisher Scientific)中用单次3秒脉冲进一步匀浆化。然后,将50 μ l组织匀浆与包含内部标准[$^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}_3\text{CTP}$ (50ng/ml;Sigma); $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2\text{dFdC}$ (25ng/ml; Toronto Research Chemicals); $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2\text{dFdU}$ (50ng/ml;Toronto Research Chemicals)]的200 μ l冰冷乙腈(50%, v/v)合并,涡旋,并在15,000rpm下离心25分钟。将200 μ l上清液干燥,重悬于100 μ l水中,并将15 μ l注射于配有Hypercarb保护柱(10 $\times$ 2.1, 5 μ m; Thermo Fisher Scientific Scientific)的Hypercarb柱(100 $\times$ 2.1ID, 5 μ m; Thermo Fisher Scientific)上。分析物使用10mM pH 10的乙酸铵中的梯度乙腈分离,并使用Thermo LTQ-XL质谱仪进行检测(Thermo Fisher Scientific)。如描述的,药物回收使用内部标准归一化,并使用从未经处理的组织生成的校准标准进行定量(Bapiro等,2011)。

[0180] 免疫组织化学

[0181] 将从经处理的KPC小鼠收集的肿瘤立即在缓冲的福尔马林中固定。将固定的组织包埋于石蜡中,并切成5 μ m切片。抗原修复使用10mM柠檬酸,pH 6.0在压力锅中进行,以暴露CC3,或者使用10mM EDTA,pH 8.0在压力锅中进行,以暴露CD31。使用甲醇中的3%H₂O₂将内源过氧化物酶淬灭。对CC3(初级抗体1:100, Cell Signaling Technology)或对CD31(初级抗体1:100, Santa Cruz Biotechnology)的免疫组织化学染色使用如上文描述的Vectastain ABC试剂盒进行。在Zeiss Axio Imager.M2显微镜上每个肿瘤捕捉六个400 $\times$ 视场(吉西他滨:n=4,卡泊三醇:n=7,吉西他滨+卡泊三醇:n=7),使用Nuance 3.0.1.2多谱分析软件来分析。在每张切片中,CD31阳性区域使用Nuance软件进行定量。对于CC3定量,使用以仅苏木精染色的切片来训练inForm 1.4.0Advanced Image Analysis,以区分肿瘤与间质。对每个视场定量总肿瘤细胞,并且对每个视场定量总CC3阳性肿瘤细胞和百分率

CC3阳性肿瘤细胞。将数据作图为每视场随着总肿瘤细胞数量变化的百分率CC3阳性细胞。

[0182] 免疫染色

[0183] 小鼠胰腺

[0184] 将组织包埋于O.C.T.中,并将冷冻切片于-20℃下在冰冷的甲醇中固定20分钟。切片在PBS+0.2BSA+0.05Triton X-100(封闭溶液)中于室温下封闭1小时。封闭溶液中的初级抗体稀释液如下:抗phospho-STAT3(Tyr705),1:100(Cell Signaling Technology);抗胶原I,1:500(Abeam),抗GFAP,1:100(Abeam);抗CD45,1:100(BD Pharmingen)。初级抗体孵育在湿盒中进行,于4℃下过夜。切片用PBS+0.05Triton X-100洗涤3次,然后在室温下于次级抗体中避光孵育1小时。所使用的次级抗体包括Fluor 594山羊抗兔IgG、Alexa Fluor 488山羊抗兔IgG、Alexa Fluor 594山羊抗大鼠IgG以及Alexa Fluor 488山羊抗小鼠IgG(Molecular Probes),并且以1:250将次级抗体用于封闭溶液中。切片用PBS洗涤3次,并使用具有或不具有DAPI的Vectastain封片介质进行封片。在Leica DM5000B荧光显微镜上显示荧光,并使用ImageJ进行定量。

[0185] 人PDA

[0186] 1)免疫组织化学染色

[0187] 从经历PDA手术的患者移除胰腺组织,并通过在4℃下浸没于4%多聚甲醛中过夜来固定。将样本包埋于常规石蜡中,并切成4μm切片。对VDR的免疫化学染色使用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物检测试剂盒(VECTASTAIN Elite ABC Rat IgG试剂盒;Vector Laboratories)来进行。简略而言,将组织切片脱蜡,并在PBS中水化。在用靶修复溶液(Dako,Glostrup,Denmark)进行抗原修复后,通过用0.3%过氧化氢孵育来封闭内源过氧化物酶活性。在浸没于稀释的正常兔血清后,将切片于4℃下用大鼠抗VDR抗体(以1:100稀释度;Abeam)孵育过夜。用生物素化的兔抗大鼠IgG抗体孵育玻片,接着用生物素化的酶缀合的抗生物素蛋白进行孵育。最后,通过用二氨基联苯胺(Dojindo,Kumamoto,Japan)孵育玻片以产生颜色。

[0188] 2)免疫荧光染色

[0189] 将组织切片脱蜡,并在PBS中水化。在用靶修复溶液进行抗原修复后,玻片用3%BSA封闭,并于4℃下用兔抗α-SMA抗体(以1:200稀释度;Abeam)和大鼠抗VDR抗体(以1:100稀释度)孵育过夜。在洗涤后,玻片用Alexa Fluor546标记的驴抗兔IgG抗体(以1:200稀释度;Invitrogen)和Alexa Fluor488标记的山羊抗大鼠IgG抗体(以1:200稀释度;Invitrogen)孵育1小时。在洗涤后,使用一体式荧光显微镜(BioZero BZ-9000;Keyence,Osaka,Japan)分析玻片的荧光。核复染使用DAPI进行。

[0190] siRNA

[0191] VDR敲除在CAPSC中使用ON-TARGETplus VDR siRNA SMARTpool(Dharmacon)进行,旁置非靶向对照。用siRNA库使用DharmaFECT1试剂根据制造商的指导转染细胞。在转染后24小时开始卡泊三醇处理,并在处理48小时后(转染后72小时)收集细胞。

[0192] 胰腺组织亚型中的基因表达分析

[0193] 激光捕获显微切割

[0194] 从8周龄的野生型C57BL/6J小鼠收集胰腺,并立即包埋于O.C.T.中并冷冻。将各胰腺的一片保留用于PSC分离(见下文)。以5μm厚度切割组织,并通过乙醇系列固定和水化,用

H&E染色,然后通过乙醇系列和二甲苯脱色。使切片完全干燥,然后使用MMI CellCut Laser Capture Microdissection系统成像和显微切割。每只动物(n=5)对~10至20张切片鉴定和显微切割腺泡、导管和胰岛。

[0195] 基因表达分析

[0196] 从如上文描述的激光捕获的样品以及从通过密度离心来源于相同动物的PSC(因为对这些细胞进行干净的激光捕获被证明是困难的)提取qRNA。RNA样品(20ng)使用ABI High-Capacity RT试剂盒进行反转录。由于低产率,然后使用Taqman PreAmp Master Mix试剂盒(Life Technologies)根据制造商的指导,使用合适的引物对,然后用Exo1(NEB)消化引物寡核苷酸来预扩增cDNA样品。然后将预扩增的cDNA用于针对Vdr以及合适的对照基因的qRT-PCR。

[0197] RNA-Seq

[0198] 样品制备

[0199] 简略而言,将mRNA纯化,碎片化,并用于第一链cDNA合成,然后用于第二链cDNA链合成,接着进行3'端的腺苷酸化。将样品与独特的接头连接,并经历PCR扩增。然后,将库使用2100BioAnalyzer(Agilent)验证,归一化,并合并用于测序。人正常PSC和癌相关的PSC在Illumina GAII平台上以41bp的读长进行测序,而小鼠PSC和人MiaPaCa-2细胞在Illumina HiSeq 2000上使用条形编码的多路技术以及51bp读长进行测序。

[0200] 数据分析

[0201] 使用TopHat2v2.0.4使用用于初始映射的25bp的5'片段种子来完成读数对齐和连接映射,然后使用Cuffdiff v2.0.2进行差异基因表达分析,以将读数映射至参照基因组注释、NCBI小鼠构建37.2和人构建37.2中(Trapnell等,2012)。每个重复样品的中值测序读数为,MiaPaCa-2细胞49.2M、小鼠PSC 25.4M以及人PSC 53.8M。数据表示为每百万映射的片段每千碱基的片段(FPKM)。使用CummeRbund v2.0.0从Cuffdiff输出生成火山图(Trapnell等,2012)。

[0202] 药物制备

[0203] 蛙皮素购自Sigma-Aldrich,并且以10 μ g/ml重悬于无菌标准盐水中,于-20 $^{\circ}$ C储存最多6个月。卡泊三醇(Tocris)重悬为DMSO中的100mM浓缩储液,然后于标准无菌盐水中稀释至20 μ M。稀释的卡泊三醇份于-20 $^{\circ}$ C下避光储存最多6个月。吉西他滨(Gemzar, Eli Lilly)以5mg/ml dFdc重悬于标准无菌盐水中,并储存于室温下。

[0204] 慢性胰腺炎模型

[0205] 在8周龄时,在野生型C57BL6/J小鼠中诱导慢性胰腺炎。每组群十只动物接受腹膜内注射盐水、50 μ g/kg蛙皮素或蛙皮素+40 μ g/kg卡泊三醇。蛙皮素注射以每周两次每6小时的注射给予,持续12周,并在最终蛙皮素注射后一周进行分析,改编自以前的研究(Sah等, 2013;Treiber等,2011;Yoo等,2005)。在慢性胰腺炎研究的持续时间内,卡泊三醇注射每周给予3次。对于急性胰腺炎研究,8周大的野生型或Vdr-/-小鼠在第1、3和5天接受每6小时的50 μ g/kg蛙皮素腹腔内注射,进行或不进行单次的每日40 μ g/kg卡泊三醇注射。在第6天处死小鼠。在尸检中,收集胰腺,并进行消化用于如上文所述的PSC分离,或制备用于如上文所述的组织学分析。

[0206] 马松三色染色

[0207] 将福尔马林固定的石蜡包埋的组织切成5 μ m切片,并使用马松三色染色试剂盒(IMED Inc.)根据制造商的方案进行染色。为了定量纤维化面积,进行多谱成像,并使用Nuance 3.0.1.2软件确定并定量苯胺蓝阳性面积。每个样品捕获六个独立的视场。

[0208] 天狼星红染色

[0209] 从福尔马林固定的组织切取7 μ m厚度的组织学切片,根据制造商的指导进行天狼星红/快绿染色(Chondrex)。得到图像,并使用Nuance 3.0.1.2软件进行天狼星红阳性面积的定量。每个样品捕获六个独立的视场。

[0210] 免疫印迹

[0211] 将全细胞提取物制备于包含1%Triton X-100、蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和PhosSTOP磷酸酶抑制剂混合物(Roche)的裂解缓冲剂中。免疫印迹如以前描述的来进行(Sherman等,2010)。所用的初级抗体包括phospho-STAT3(Tyr705)1:1000(Cell Signaling Technology)、VDR D-61:1000(Santa Cruz Biotechnology)和肌动蛋白1:5000(Sigma)。抗兔IgG-HRP用作次级抗体1:5000(Jackson Immunoresearch)。

[0212] 染色质免疫沉淀

[0213] 将hPSC细胞系用于染色质免疫沉淀,如以前描述(Barish等,2010)。简略而言,将细胞固定于1%甲醛中,分离核,并将核裂解于包含1%SDS、10mM EDTA、50mM Tris-HCl pH8.0和蛋白酶抑制剂的缓冲剂中,用Diagenode Bioruptor剪切至200至1000碱基对的染色质片段大小。将染色质与VDR的抗体(C-20,Santa Cruz Biotechnology)、SMAD3(Abeam)或兔IgG(Santa Cruz Biotechnology)进行免疫沉淀。

[0214] 实施例2

[0215] PSC中癌相关基因标签的鉴定

[0216] 为了表征PSC中的癌相关变化,在各活化阶段对PSC转录组进行大规模平行测序(RNA-Seq)。培养的原代PSC的进行性活化(Omary等,2007)以大写标注(capitalized),并且分析预活化(3天培养)和活化的(7天培养)的分离自健康小鼠胰腺的PSC的转录组(图1A和图2A至2C)。该分析揭示,在活化期间,PSC降低涉及脂质储存和脂质代谢的基因表达,这与和静止期相关的脂滴表型的损失一致。活化还导致一系列之前与肿瘤支持潜在性有关的基因的升高表达,包括细胞因子、生长因子、ECM组分和信号转导分子例如Wnts。并发的炎性基因的诱导是特别令人感兴趣的,因为间质对细胞因子的诱导已经示出以旁分泌的方式促进胰腺癌的引发和进展(Fukuda等,2011;Lesina等,2011)。

[0217] 除了由培养中的转分化导致的PSC“活化标签”外,还分析了PSC“癌标签”以进一步定义癌症相关的PSC表型。分离自患有PDA(CAPSC)的患者或经历了对良性病症的切除的患者的人PSC还经历转录组分析(图1B)。将这些人PSC培养(并因此培养活化)15天,以达到充分的产率和纯度。活化的非癌相关的PSC与癌相关的PSC的该比较揭示了由暴露于肿瘤微环境导致的活化表型的变化。活化标签和癌标签二者都包括来自之前鉴定的间质标签的基因种类,所述间质标签预示着PDA中不良存活以及化疗耐药性(Garrido-Laguna等,2011)。此外,脂质储存基因例如脂肪酸结合蛋白在这两种标签中都下调,并且伴随着涉及胆固醇生物合成和摄取通路的基因的提高表达,这与升高的增殖能力一致。由于PDA特别是间质区内的贫乏的血液供应以及严格无血管性质,负血管生成性调控子的相互诱导以及血管生成性诱导子的抑制是普遍的(auspicious)(图1C)。特别地,观察到充分描述的并且强效的内源

血管发生抑制剂和固体肿瘤标志物血小板反应蛋白-1(Lawler,2002)的诱导。这两种基因标签都包括ECM组分、细胞粘附分子、炎性介质、旁分泌生长因子和生存因子、涉及脂质/胆固醇代谢的基因以及信号转导调节子。

[0218] 实施例3

[0219] VDR调控PSC活化网络

[0220] 这些分析还揭示,PSCs意想不到地表达高水平的维生素D受体(VDR),其在以前被认为不在外分泌胰腺中表达(Zeitz等,2003)(图1D、1E、2D和2E)。在癌相关的PSC中维持VDR的表达(图1F)。鉴于以前的工作表明VDR作为在紧密相关的肝星形细胞中纤维发生基因网络的关键调控子(Ding等,2013),并且由于 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及其类似物的确定的抗炎性(Cantorna等,1996,1998;Cantorna等,2000;Ma等,2006;Nagpal等,2005;Deeb等,2007)作用,检查了该可药用受体。与该研究密切相关的还有血浆维生素D水平与胰腺癌风险的强烈的负相关性(Wolpin等,2012),该关系仍然未得到解释。此外,维生素D不足已经与慢性胰腺炎联系起来(Mann等,2003)。

[0221] 卡泊三醇(Ca1)是强效的非高血钙的维生素D类似物,其被用于控制VDR诱导(Naveh-Many和Silver,1993)。虽然不存在于任何手术后CAPSC中,但是意想不到的是,Ca1处理在19/27例原代患者样品中诱导脂滴形成(图3A和4A),并且在24/27例患者样品中降低 $\alpha\text{SMA}(\text{ACTA2})$ 的表达(图3B),这与回归静止期一致。

[0222] 为了评估PSC中VDR活化的基因组范围影响,在存在或不存在VDR配体的情况下生长的预活化的PSC和活化的PSC进行转录组分析。虽然在预活化的PSC中Ca1处理影响基因表达(分别有307个基因表达显著升高,并且431个基因表达显著降低),VDR活化具有在活化的PSC中更普遍的转录应答(分别有664个基因表达显著升高,并且1616个基因表达显著降低)。观察到PSC中对活化标签和癌症标签的Ca1依赖性抑制(图3C,表3),包括对血管发生的负调控子例如Thbs 1的抑制以及血管发生的正调控子如Mmp9的诱导(Bergers等,2000)(图3D)。

[0223] 表3:图3C热图中展示的基因的同一致性和相对表达

[0224]

基因	第 3 天, 对照	第 3 天, Cal	第 7 天, 对照	第 7 天, Cal
<i>Ccl12</i>	16.9948	13.3834	58.2957	40.9571
<i>Ccl2</i>	366.439	333.506	252.69	100.24
<i>Ccl7</i>	221.806	181.021	175.22	58.6016
<i>Ccr3</i>	0.415907	0.072491	0.092766	0.103886
<i>Ccr11</i>	2.9583	0.589842	4.62141	0.409244
<i>Coll2a1</i>	140.814	115.39	275.661	132.257
<i>Coll5a1</i>	42.408	8.16068	16.5464	0.701157
<i>Coll6a1</i>	17.4914	10.6773	21.9624	11.8557
<i>Coll8a1</i>	8.72832	4.37402	10.2631	3.05216
<i>Colla1</i>	613.367	413.35	1918.31	868.766
<i>Colla2</i>	904.514	635.492	1759.65	1001.73
<i>Col3a1</i>	1304.26	489.804	1399.98	453.127
<i>Col4a1</i>	169.341	73.1517	355.835	56.1611
<i>Col4a2</i>	108.476	53.1738	267.076	45.2753
<i>Col4a6</i>	1.45562	1.0448	4.6817	1.49136
<i>Col5a1</i>	82.0461	32.308	178.049	33.0804
<i>Col5a2</i>	263.412	130.308	528.559	159.263
<i>Col6a1</i>	123.801	33.8934	121.164	19.1727
<i>Col6a2</i>	90.0004	21.6395	64.456	4.21871
<i>Col6a3</i>	43.4765	8.13687	47.6343	0.171989

[0225]

<i>Col8a1</i>	26.3985	16.6737	67.3703	31.9871
<i>Col8a2</i>	0.835173	0.414594	2.0817	0.998107
<i>Coll1a1</i>	5.6209	1.13347	12.2119	4.92214
<i>Ctgf</i>	234.261	59.7465	713.016	42.1781
<i>Cx3cr1</i>	0.009934	0.01077	1.11327	0.147291
<i>Cxcl12</i>	211.644	172.155	251.048	202.677
<i>Cxcl13</i>	1.29477	1.00293	2.91399	0.413939
<i>Cxcl14</i>	2.43062	1.02379	2.9176	0.685428
<i>Cxcr7</i>	10.3703	10.7976	11.3594	4.38706
<i>Fgf10</i>	7.94396	3.2629	6.70396	1.42587
<i>Fgf18</i>	15.3986	14.5143	24.8602	0.598877
<i>Fgf2</i>	119.673	63.0183	82.197	51.3796
<i>Figf</i>	385.683	212.818	496.112	371.873
<i>Gli2</i>	2.47507	1.03512	2.7476	0.579735
<i>Igf1</i>	1.59133	1.8811	28.2601	14.46
<i>Igfbp2</i>	5.85068	4.14298	79.7814	121.9
<i>Igfbp3</i>	407.298	77.1041	1854.91	71.9932
<i>Igfbp4</i>	751.247	711.902	617.533	864.825
<i>Igfbp6</i>	34.5017	36.7414	31.8129	135.16
<i>Igfbp7</i>	386.784	223.35	897.296	431.085
<i>Il18</i>	3.16248	2.85743	5.09757	2.07638
<i>Il1r1</i>	62.9344	44.222	40.9406	34.7225
<i>Il6</i>	11.9258	4.37981	33.6427	2.4147
<i>Jag1</i>	9.48772	3.61568	13.0127	2.73067
<i>Jag2</i>	0.050902	0.068209	0.222199	0.062845
<i>Mmp2</i>	125.748	52.4985	108.486	23.0001
<i>Nfib</i>	26.1479	25.3524	19.8548	21.0298
<i>Pdgfc</i>	8.23967	4.70026	8.48986	1.18999
<i>Pgf</i>	0.775123	0.464103	0.761592	0.547427
<i>Postn</i>	205.001	18.8806	273.757	2.07276

[0226]

<i>Serpine1</i>	679.572	390.829	1029.43	363.168
<i>Smo</i>	32.4758	30.5639	27.6884	24.9848
<i>Tgfb3</i>	15.1534	11.3445	34.2448	18.1723
<i>Timp1</i>	591.947	685.894	447.617	974.12
<i>Timp2</i>	163.712	144.858	358.136	212.664
<i>Timp3</i>	60.7974	27.9158	200.794	52.971
<i>Tlr2</i>	5.3732	6.86588	5.73998	5.67479
<i>Tlr8</i>	4.11176	2.55335	2.7055	3.30651
<i>Tnfaip1</i>	37.0789	32.9495	44.4728	24.6246
<i>Tnfrsf11b</i>	7.10046	1.36394	22.1842	0.815075
<i>Tnfrsf12a</i>	52.7738	68.2134	95.4918	122.576
<i>Vgf</i>	0.32529	0.28662	1.50623	0.462996
<i>Wnt2b</i>	5.28217	3.34356	6.36536	4.6132
<i>Wnt7a</i>	1.09498	0.613477	0.102948	0.107783
<i>Wnt9a</i>	1.22649	0.856486	2.27415	0.482617
<i>Vdr</i>	6.77742	12.8055	9.05893	26.6317
<i>Cyp24a1</i>	0.743448	132.874	0.328976	402.257

[0227] 在人CAPSC中观察到Ca1治疗对所选择的候选基因的类似作用(图3E)。此外,这些作用依赖于VDR,因为siRNA介导的受体敲减消除了Ca1诱导的表达变化(图3F)。部分地为了解释VDR对PSC活化程序的广泛影响,评估了VDR与TGFp/SMAD通路之间的基因组串扰(Schneider等,2001;Yanagisawa等,1999),所述串扰以前在肝星形细胞中证明(Ding等,2013)。与对TGFp/SMAD信号转导的抑制作用一致,Ca1提高VDR结合同时降低纤维发生基因的启动子区中的SMAD3结合。

[0228] 为了确定VDR活化是否降低体内PSC活化,我们使用胆囊收缩素类似物蛙皮素并且在遍及疾病进展中共给予Ca1从而在野生型小鼠中诱导实验慢性胰腺炎(Willemer等,1992)。与接受仅蛙皮素的小鼠相比,Ca1治疗的动物显示出减轻的炎症和纤维化,这与降低的PSC活化(图5A和5B)一致。与对照相比,在来自用Ca1治疗的小鼠的分离PSC中,活化标签基因和癌标签基因的表达降低(图6)。观察到对肿瘤微环境有功能重要性的活化标签基因的降低,包括ECM组分、炎性细胞因子和生长因子。此外,与细胞运动性相关的Acta2表达倾向于下调。此外,在Ca1治疗的小鼠中观察到phospho-Stat3诱导的降低(图6B),这与来自间质的炎性信号转导降低一致。显然,已经建立了Stat3活化作为炎性损坏与PDA起始之间的机械连接(Fukuda等,2011;Lesina等,2011)。

[0229] 野生型小鼠中在急性胰腺炎期间的Ca1治疗类似地损害PSC基因表达中的活化相

关的变化(图3C),并降低白细胞浸润和纤维化(图3D和3E)。考虑到基于Ca1治疗的PSC活化的明显抑制,在缺乏功能性的VDR的小鼠中确定PSC状态。明显地,来自Vdr^{-/-}小鼠的胰腺显示出自发的腺泡周围纤维化和导管周围纤维化(图5C),并且还支持VDR与PSC活化相反的作用。与该概念一致,在Vdr^{-/-}小鼠中蛙皮素诱导的急性胰腺炎中,PSC基因表达的活化相关的变化放大,并且伴随着纤维化升高(图6G)。此外,对培养活化的来自Vdr^{-/-}小鼠的PSC的Ca1治疗显示出观察到的基因表达变化的VDR依赖性。

[0230] 这些结果一起说明,VDR充当PSC活化程序的主基因组调控子,并且由配体进行的VDR诱导在体外和体内都恢复和促进静止PSC状态。

[0231] 实施例4

[0232] 间质VDR活化抑制支持肿瘤的信号转导事件

[0233] 确定了PSC中VDR活化对与肿瘤细胞的串扰的影响。当CAPSC持续地表达VDR和应答配体时,胰腺癌细胞系显示出变化的VDR表达,和通常低的VDR活性(图7A和7B)。在人PDA样品中也观察到该现象(图7C)。

[0234] 为了具体评估间质VDR活化对上皮间隔的贡献,检查了CAPSC衍生的分泌因子对MiaPaCa-2细胞系的作用,所述MiaPaCa-2细胞系具有极其低的VDR表达并且没有明显的对VDR配体的应答(图7A和7B)。使原代CAPSC生长至汇合,并且培养的最后48小时在存在或不存在Ca1下培养。然后从这些培养物中收集CAPSC条件培养基(CM),并将CM转移至MiaPaCa-2,保持48小时。对CAPSC CM中孵育的MiaPaCa-2细胞中的基因表达的火山图分析显示出宽的变化(中间图),当使用来自Ca1处理的CAPSC的CM时,所述变化被大大地消除(右图)。上皮细胞中CAPSC CM诱导的基因表达变化涉及增殖(表4)、生存、上皮-间充质转变和化学耐药性。

[0235] 表4.PSC中的VDR活化广泛影响间质→肿瘤串扰。

[0236]

#	通路	总基因	数据中的基因	p-值	FDR
1	细胞周期、APC在细胞周期调控中的作用	32	18	8.840E-20	1.833E+01
2	细胞周期、G2/M期中DNA复制起始	32	15	4.186E-15	1.185E+01
3	细胞周期、细胞粘附点	36	14	8.511E-13	9.820E+00
4	细胞周期、有丝分裂中染色体分离	21	11	4.487E-12	9.223E+00
5	细胞周期、DNA复制的启动和终止	28	11	2.281E-10	7.817E+00
6	细胞周期、细胞分裂和染色体分离	33	11	1.780E-09	8.800E+00
7	细胞周期、细胞周期（一般模式）	21	9	4.135E-09	8.501E+00
8	细胞周期、G1/S转变调控	28	9	3.845E-08	5.591E+00
9	细胞周期、有丝分裂起始	25	8	4.532E-07	4.570E+00
10	细胞周期、SCF及介导在细胞周期调控中的作用	29	8	1.818E-06	4.064E+00

[0237] 这些变化将广泛地受到间质VDR活化的抑制，而不是受到上皮VDR活化的抑制(图8B)，尽管在其他实验系统中已经报道了胰腺癌细胞中VDR活化的直接抗增殖和促凋亡作用(Persons等,2010;Yu等,2010)。在具有可变的VDR表达的胰腺癌细胞系中重复了对间质VDR活化——而不是上皮VDR活化——的该灵敏度(图8C至8G)。间质VDR活化显著降低了CSF2表达，最近，CSF2表达涉及胰腺肿瘤进展和对抗肿瘤免疫的逃避(Bayne等,2012;Pylayeva-Gupta等,2012)。基因表达变化伴随phospho-STAT3的诱导的降低(图8H)，以及体外对化疗剂的耐药性的降低(图8I)。

[0238] 这些结果显示，PSC中的VDR活化负调控支持肿瘤的PSC分泌组。

[0239] 实施例5

[0240] VDR配体+吉西他滨示出体内对抗PDA的效力

[0241] 上述结果说明，单一药剂“维生素D治疗剂”在治疗人PDA的明显失效可反映，仅间质的治疗可能不足以实现治疗益处。此外，直接靶向肿瘤的药剂可具有因与肿瘤低血管化相关的固有化学耐药性导致的限制影响。PSC靶向治疗的主要目的是探索肿瘤-间质串扰的抑制以增强细胞毒剂(或免疫学药剂)的效力，在吉西他滨的情况下(虽然是治疗标准)，所述药剂提供了对PDA患者的最小(1.5个月)益处(Burris等,1997)。

[0242] 为了证明维生素D组合治疗的潜力，检查了使用免疫活性宿主的原位同种异体移植模型中的Cal治疗(Collisson等,2012)。用于移植的肿瘤细胞来源于条件性地表达内源突变体Kras、胰腺中缺乏p53(Bardeesy等,2006)，并且表达低水平的Vdr的小鼠(图9A和9B)。两种其他小鼠PDA衍生的细胞系也示出低的VDR表达和活性(图9A和9B)。这说明，任何观察到的治疗效果将可能由宿主来源的间质VDR活化产生，虽然不排除来自上皮间隔的一些贡献。尽管PDA移植模型中的间质反应弱于自发的KPC(LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};

Pdx-1-Cre)模型(Hingorani等,2005;Olive等,2009),但是在同种异体移植接受者中观察到可测量的Colla1、Colla2和Acta2的PSC活化,伴有纤维化(图9C和9D)。Ca1治疗降低移植的小鼠中的间质活化和纤维化(图9E)。虽然移植模型对吉西他滨有应答,但是将用吉西他滨治疗的小鼠与用吉西他滨和Ca1的组合同样治疗的小鼠进行比较。重要的是,在组合同样接受者中,针对来自所观察的PSC活化的标签的间质基因和上皮基因的增殖和表达的抑制,观察到吉西他滨应答性的明显提高(图9F和9G)。

[0243] 在KPC模型中检查吉西他滨+Ca1组合同样治疗的效力,所述KPC模型的要点是人PDA对吉西他滨的摄取和应答不良(Olive等,2009)。组合同样显著减小肿瘤体积,在~70%的小鼠中观察到短暂或持续的肿瘤退缩(图10A和11A)。与间质重构的诱导一致,与对照相比,在接受组合同样治疗的小鼠中观察到降低的肿瘤相关的纤维化(图10B)。此外,组合同样治疗的小鼠示出来自与PSC活化相关的间质基因标签和上皮基因标签的基因表达显著改变(图10C)。

[0244] PSC活化基因的降低表达以及静止标志物Fabp4的诱导表示,肿瘤相关的PSC从活化状态向静止状态切换。观察到的单个基因对药物治疗方案的差异灵敏度可能是对体内间质-肿瘤旁分泌信号转导的特异性干扰的结果。

[0245] 在组合同样还提高吉西他滨的瘤内浓度和效力(图10D和11B),与仅吉西他滨相比,在接受组合同样治疗的小鼠中,吉西他滨的一种活性代谢物dFdCTP的中值浓度提高~500%。在吉西他滨降解酶胞苷脱氨酶(Cda)或限速脱氧胞苷激酶(dCK)的表达水平上,未见药物诱导的变化(图12A),虽然别构效应是可能的。升高的dFdCTP伴随升高的凋亡标志物CC3的阳性,表示提高的化疗剂效力(图10E)。

[0246] 此外,瘤内血管显著地被组合同样提高,通过升高的CD31阳性和明显的血管通畅率证明(图12B和12C)。对肿瘤切片的免疫组织化学分析示出,在组合同样后表征PDA的塌陷的血管网络明显恢复,表示瘤内吉西他滨浓度因改进的药物递送而升高。虽然Ca1与吉西他滨的组合同样明显提高了治疗效力,但是Ca1作为单一药剂在KPC模型中未示出可检测的有益效果(图13)。

[0247] 实施例6

[0248] 对新辅助帕立骨化醇靶向可切除胰腺癌中的微环境的随机II期/药效动力学/基因组研究

[0249] 本实施例描述了用于证明将VDR激动剂与化疗剂组合以治疗传统上对化疗或免疫治疗具有抗性的癌症的协同作用。虽然公开了用于胰腺癌的具体的VDR激动剂和化疗剂,但是本领域技术人员应领会,其他VDR激动剂可与其他化疗剂或生物学治疗剂(例如,针对各药剂使用已知的给药剂量和方式)组合用于具体癌症,例如肺癌、肾癌、前列腺癌、胆管癌或肝癌。

[0250] 靶向VDR转录通路在肿瘤患者中的效果可通过评估细胞内标志物和成像标志物来确定,在针对可切除胰腺癌进行手术之前,所述肿瘤患者用在有或没有帕立骨化醇的情况下的一个吉西他滨/abraxane循环进行治疗。还进行该方法以确定在有或没有帕立骨化醇的情况下的吉西他滨/abraxane对可切除胰腺癌中的原代肿瘤中的新辅助化疗剂的肿瘤应答的作用;鉴定帕立骨化醇对VDR调控的胰腺星形细胞基因表达程序的作用;确定该新辅助方法的安全性;以及分析帕立骨化醇治疗的患者中的内皮细胞功能和氧化胁迫的循环标志物。

[0251] Abraxane(nab-紫杉醇)是用人血清白蛋白稳定化的不含克列莫佛的纳米颗粒紫杉醇制剂(130nm颗粒)。该药物实现了增强的通过gp60白蛋白受体介导的内皮转胞吞的肿瘤渗透,从而使得能够跨越血管内皮转运,并且使得活性紫杉醇可用于肿瘤。附加的药效动力学考虑是,白蛋白支架还结合肿瘤相关的蛋白SPARC,其可进一步增强该分子在肿瘤组织中的定位。初始数据提示,表达SPARC的肿瘤可具有对abraxane更佳的应答。在吉西他滨/abraxane的II期试验中,在58个可评价的患者中存在23例部分应答(40%),以及相等数量的患有4个月或更长的稳定疾病(SD)并且中值存活为10.3个月的患者(Von Hoff等,J Clin Oncol.2011;29:4548-54)。毒性一般得到良好耐受,虽然比仅用吉西他滨所预期的更大。剂量延迟主要由血液/骨髓治疗相关的AE(主要是嗜中性粒细胞)所致。不存在因治疗相关的AE所致的nab-紫杉醇剂量中断,并且吉西他滨出现2例剂量中断(皮肤病学/皮肤:注射部位反应)。此外,2个患者具有总共3例涉及血液/骨髓(嗜中性粒细胞和血小板)的导致剂量降低的治疗相关的AE并且2例治疗相关的AE导致剂量停止(胃肠:腹泻和感染:全身性)。存在3例导致死亡的治疗紧急AE(肺感染、全身性感染和胃肠阻塞),但是仅全身性感染被认为是治疗相关的。用nab-紫杉醇组合吉西他滨治疗的患者具有与在用紫杉烷治疗后预期的骨髓抑制水平一致的骨髓抑制水平(Von Hoff等,J Clin Oncol.2011;29:4548-54)。

[0252] 该新辅助设置提供了框架以组合临床结果和先进的组织生物标志物,从而克服靶向癌症治疗的关键问题。虽然靶向治疗在选择固体肿瘤中取得了进步,但是如在其他上皮癌中一样,在胰腺癌中,过去十年进展寥寥。一个进步是在手术之前而不是在手术之后应用系统性治疗和放射性治疗。该新辅助方法的优点很多,并且包括:对常常是全身性(即,非局部的)疾病进行更早的全身性治疗;比手术后设置中更好的对化疗和化放疗的耐受;允许更多患者接受完全剂量和完全的治疗持续时间;当组织面尚未被手术破坏时更小的辐射场;使原代肿瘤收缩以有助于手术切除;以及,不失去期望从手术收益的患者,即,在该阶段期间不发生使得潜在可手术的患者不能手术的进展。新辅助治疗现在广泛用于肺、乳腺、胃肠、头颈、泌尿和妇科起源的局部病灶晚期癌症中。

[0253] 在该试验中,将进行对胰腺癌初始治疗中星形细胞中的VDR活化的作用的分析。在经历肾透析的患者中,帕立骨化醇(25 μ g)剂量基于其在控制钙和维生素D稳态中的十多种宽泛的用途来选择。帕立骨化醇化学命名为19-去甲-1 α ,3 β ,25-三羟基-9,10-裂环麦角5(Z),7(E),22(E)-三烯,并且是非代谢化的维生素D类似物,其几乎不具有高血钙活性。因此,其为产生星形细胞中的期望转录变化的良好示例性化合物。帕立骨化醇的建议起始剂量为0.04g/kg(或约3 μ g每剂量),但是在文献中报道了15 μ g至30 μ g的总每周剂量而无安全隐患(Izquierdo等,BMC nephrology 13:159,2012;Ketteler等,Nephrol Dial Transplant.27(8):3270-8,2012;Tonbul等,Ren Fail.34(3):297-303,1 2012),并且与紫杉酚组合的在乳腺癌患者的试验中,给予多至7 μ g/天,持续12周(Lawrence等,Cancer Biol Ther 14:476-80,2013)。因此,提供了每周三次10 μ g的IV计划(关注胰腺癌患者中的经口吸收)。详述的群体药代动力学分析包括超过600个患者,示出1.75l/小时的平均血浆清除率,以及在治疗的前30天内稳定的磷水平和钙水平(Noertersheuser等,J Clin Pharmacol.52(8):1162-73,2012)。该分析支持此处选择的剂量和计划,并且支持每周电解质监测计划。

[0254] 在该研究中,将分析预治疗的仅化疗剂(1个循环,4周),或与每周三次的静脉内帕立骨化醇组合的化疗剂,持续给予维生素D制备物直至手术前一天。将在完成治疗时评估该

方法:将超过90%的患者进行手术定义为成功。主要的感兴趣的端点将是对肿瘤的影响作用:与之前所检查的肿瘤相比,是否存在证据显示在纤维化(定性的,通过免疫组织化学进行)、或肿瘤细胞的外形和比例、或浸润淋巴细胞方面有差异?将对星形细胞进行显微切割用于基因表达谱,以检测帕立骨化醇治疗的肿瘤中的VDR调控的标签。星形细胞将培养自肿瘤碎片,并且在基因组或功能上进行分析。可以以一定间隔进行免疫学和炎性评估。

[0255] 在没有进行明显治疗的情况下,患者以前具有可切除的胰腺腺癌的记录。意识到,被认为患有癌症并且指示其进行手术的一些患者可最终并未患有腺癌(这些患者将放入总获益目标,但是在可能的情况下,将得到原代肿瘤样品用于该研究的端点),或者所述患者可具有以前未识别的不可切除的标准(在没有进展的情况下,这些患者继续用吉西他滨/abraxane/帕立骨化醇治疗,并且记录他们的结果)。患者年龄为18岁或更大,并且具有0至2的ECOG性能状态。

[0256] 治疗将按如下给予:

[0257]

药剂	剂量	路线	治疗给予
Abraxane®	125mg/m ²	经 30 分钟 IV 输注	第 1、8、15 天
吉西他滨	1000 mg/m ²	经 30 至 100 分钟 IV 输注	第 1、8、15 天
帕立骨化醇	10 µg	每周三次	从治疗第 1 天至手术前一天

[0258] 在一些实例中,首先给予 Abraxane®。吉西他滨(2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷单盐酸盐)可经30分钟(如标签)给予,或以别处建议的10mg/m²/分钟速率给予(Tempero等,J Clin Oncol.21(18):3402-8,2003)。如果使用后一种方法,则剂量的改变可因此导致输注时间的变化。该循环将每四周重复两个循环(即,在手术治疗前总共8周)。手术将在(计划允许的)最后的化疗剂剂量的4周内。手术后的辅助化疗将由治疗医生来决断。在给予化疗前,患者将接受合适的抗催吐剂方案,常常包括地塞米松10mg至20mg IV和选择的5-HT₃药剂(即,昂丹司琼或格拉司琼),以减轻化疗相关的恶心和呕吐的发生和严重程度。如果临床有说明,则还可使用药物例如劳拉西泮。

[0259] 患者将以每周三次10µg的静脉内帕立骨化醇为治疗起始。将不存在剂量增加,但是可每周监测毒性以检测将需要50%剂量降低的钙或磷升高(对于钙>11.5,继续治疗直至恢复正常)。

[0260] 剂量限制毒性将通过该研究的前4周期间存在的毒性来定义。DLT将被视为3级或更高级的任何非血液学AE,该AE被研究人员判断为可能是治疗相关的,因没有用最优的抗催吐治疗剂进行治疗导致的恶心和呕吐除外。如果在第一个循环中发生,则以下血液学毒性将被视为DLT:

[0261] 1)4级中性白细胞增多持续多于7天,

[0262] 2)发热性中性白细胞增多,

[0263] 3)血小板计数小于 $10,000/\text{mm}^3$ 。

[0264] 该方案的耐受性将通过在每五位患者与该试验的研究人员会谈后分析毒性来确定。

[0265] 患者将通过两个循环的化疗继续接受吉西他滨/abraxane/帕立骨化醇,直至手术的前一天。手术后的治疗将由治疗医生来决断。

[0266] 在手术时,将在病理科解剖肿瘤,并且在诊断核验后,将部分肿瘤质量分配给各实验室。样品将被分配用于详细的对星形细胞分离物的免疫组化染色,以及用于CGH和测序。

[0267] 开始各循环化疗的2周内得到的常规检验的所有实验室测量值都将是可接受的。

[0268] 可通过在一个循环新辅助化疗后进行成像来评估患者,以确定对肿瘤尺寸以及治疗效果的常规标志物的总影响。第一年,腹/骨盆和胸(如果存在胸部疾病的话)的CT或MRI将在手术后每六个月得到,并且以后一年一次。

[0269] 毒性将使用可在NCI网站(www.ctep.cancer.gov)上得到的NCI常用毒性标准(NCI Common Toxicity Criteria)来分级。对吉西他滨/abraxane组合报道的主要毒性是中性白细胞增多、恶心/呕吐、可逆的肝酶提高和神经病。对维生素D制备物报道的主要毒性是高钙血症,在每个循环中都会对其进行检验。

[0270] 第二疗程和后续疗程的治疗之日的实验室异常将在治疗决策中纳入考虑。从对该研究合格标准偏离的值可引起最多三周的延迟用于进行恢复。如果届时异常没有解决,则患者通常应脱离研究。可有例外。

[0271] 如在下表中说明的,剂量改变应当基于所经历的最差毒性级别。在所有后续循环持续进行任何剂量降低;因此,不允许在剂量降低后进行剂量重新提高。因毒性而需要停止吉西他滨和abraxane二者的患者将停止方案治疗,并且将计划进行手术。

[0272] 吉西他滨和nab-紫杉醇

[0273] 用于剂量遗漏和修改方案的规定

[0274] 第1天剂量缺失:如果保持或缺失的剂量将在下一循环的第1天给予,则该下一循环将视为直至将第一剂量实际给予至患者才启动(即,1-2-3-休,X-1-2-3-休等)。

[0275] 第8天剂量缺失:循环按照方案继续,发生一次不给予剂量(即,1-2-3-休,1-X-3-休,1-2-3-休等)。如果计数和化学允许,根据循环日历第15天给予。

[0276] 第15天剂量缺失:该周变成休药周。下一次剂量(如果计数和化学允许)变成新循环的第1天,并且患者被视为具有x2q3(21-天)的循环(即,1-2-3-休,1-2-X,1-2-3-休等)。

[0277] 将为了血液学毒性和其他非血液学毒性降低剂量。将根据示出最大程度的毒性的系统来进行剂量调节。将使用4.0版本NCI CTCAE对毒性进行分级。

[0278] 表5. 吉西他滨和abraxane的剂量水平

[0279]

剂量水平	nab-紫杉醇 (mg/m ²)	吉西他滨 (mg/m ²) ^a
研究剂量	125	1000
-1	100	800
-2 ^b	75	600
^a 剂量降低可共同进行或不共同进行。关于剂量降低的建议参见表 6 至 8。		
^b 可容许额外 25%的剂量改变以建立针对个体患者的可耐受剂量		

[0280] 经历研究药物相关的毒性从而需要延迟预定的nab-紫杉醇和吉西他滨给药 ≥ 14 天的患者将停止进一步参与到该研究中。当任何循环的第1天需要剂量降低时,在研究治疗期间将不允许剂量重新提高。

[0281] 第1天的剂量改变

[0282] 在循环开始时因AE或血液学毒性而需要剂量改变的事件中,nab-紫杉醇和/或吉西他滨的剂量和方案可如下表6和7中详述地来调节:

[0283] 表6. 用于血液学毒性的剂量改变(每个循环的第1天)

[0284] 第1天的计数:

[0285]

绝对粒细胞		血小板	计时
≥ 1.5 x 10 ⁹ /L	和	≥ 100 x 10 ⁹ /L	按时治疗
	或		延迟一周的间隔直至
< 1.5 x 10 ⁹ /L		<100 x 10 ⁹ /L	恢复

[0286] 在延迟剂量以允许解析化疗相关的毒性的情况下,应当按计划继续HCQ给药。

[0287] 表7. 用于非血液学毒性的剂量改变(每个循环的第1天)

[0288] 非血液学毒性(神经病、脱发除外)通常应当在起始下一循环前已经解析为0级或1级。如果这样的毒性导致维持前一循环中的剂量,则以下将确定当前循环的给药:

[0289]

非血液学毒性（神经病除外）和/或根据前一循环的剂量保持	
在前一循环中引起剂量保持的毒性	该循环的吉西他滨+nab-紫杉醇剂量 ^a
0、1 或 2 级	与前一循环的第 1 天一样
3 级毒性	吉西他滨降低一个水平
4 级毒性	吉西他滨降低两个水平 ^b
前两个连续循环中的剂量保持	吉西他滨降低一个水平

[0290] ^a如果毒性仅影响神经病，则应当仅降低nab-紫杉醇。

[0291] ^b肺栓塞(CTCAE表中的4级毒性)如果是轻度的或无症状的，则将免除该要求。

[0292] 治疗循环内的剂量调节

[0293] 在患者因毒性而必须进行进行治疗循环内的治疗延迟的事件中，将不使用循环期间维持的剂量。治疗循环内因血液学毒性(如血液计数和毒性表示的，见下文)应当如表8中所概述的来调节。

[0294] 表8. 循环内用于血液学毒性的剂量改变(第8天、第15天)

[0295]

ANC		血小板	Nab-紫杉醇	吉西他滨
≥1500	和	≥100,000	100%	100%
1000-1499	或	75,000-99,000	100%	100%
500-999	或	50,000-74,000	降低一个剂量水平 ^a	降低一个剂量水平
<500	或	<50,000	保持	保持
发热性中性白细胞增多(3或4级)			在恢复给药后,降低至下一个更低水平,并且在整个治疗休药期不重新提高	在恢复给药后,降低至下一个更低水平,并且在整个治疗休药期不重新提高
复发发热性中性白细胞增多(3或4级)			降低至下一个更低的剂量水平,并且在整个治疗休药期不重新提高	降低2个剂量水平,并持续整个治疗休药期

[0296] ^a可遵从研究人员的嘱咐使用GCSF(以根据机构指南的剂量和方案),以维持‘nab-紫杉醇的剂量强度

[0297] 由于显著的非中性白细胞减少性败血症风险,初次发热>38.5摄氏度,所以无论嗜中性粒细胞计数是多少,应当给予环丙沙星(500mg,口服,每日两次)或阿莫西林/克拉维酸(Augmentin,500mg,口服,每日两次或三次)。在研究治疗开始时,应当对患者开具任一种抗生素,并且指导患者在首次观察到发热或38.5℃或更高时或者当他们感到他们发展出发热并且没有温度计时开始治疗。他们应当遵循清楚的计划,用于血液计数评价以及临床评估感染和/或住院需要。

[0298] 发热的患者将中断其治疗直至恢复(温度低于100F保持>3天),并且将根据该疾病的标准实践来进行管理。可在医生的决断下持续进行HCQ给药。基于对该病症的解析,可以以次最低剂量来恢复abraxane和吉西他滨治疗。还可针对表9中指定的循环内的非血液学毒性而进行剂量改变。

[0299] 表9.用于循环内非血液学毒性的剂量改变

[0300]

CTC 级别	第 1 天的百分率
0 至 2 （以及 3 级恶心/呕吐和脱发）	100%
3 （恶心/呕吐和脱发除外）	50%或保持 ^a
4	保持 ^a
a 应当改变哪个药物的该决定将取决于所见到的非血液学毒性的类型，以及根据医生/研究人员判断哪种疗程在医学上最合适。治疗可在下一循环的第 1 天恢复。	

[0301] 在经历 ≥ 3 级的外周神经病的患者中，可不进行 Nab-紫杉醇治疗。在这段时间，可在研究人员的决断下继续进行吉西他滨给药。在后续的循环中，当外周神经病改善至 ≤ 1 级后，可以以下一个较低剂量水平恢复 Nab-紫杉醇治疗。经历外周神经病的患者可需要预定 nab-紫杉醇给药上的延长的延迟，但是可保持继续给予吉西他滨/Hcq，并且只要神经病如上文改善即应当在后续循环重新引入‘nab-紫杉醇。接受降低剂量的 nab-紫杉醇且在该剂量水平下经历 ≥ 3 级外周神经病、需要剂量延迟 ≥ 21 天、仍然未恢复到 ≤ 1 级的患者，应当停止‘nab-紫杉醇。

[0302] 如在其他临床试验中观察到的，在治疗后期（第 6 个循环或更后）常常见到与 nab-紫杉醇有关的 ≥ 3 级神经病。如果 ≥ 3 级神经病发生于早期治疗循环中，则可能存在使患者倾向于神经病的其他因素（例如，糖尿病、饮酒、药物污染）。为了在前 6 个治疗循环期间维持剂量强度，当存在这些倾向性因素时，应当进行谨慎考虑。

[0303] 发展出 2 级或 3 级皮肤性毒性的患者应当将其剂量降低至这两种药物的下一个更低剂量水平。如果患者继续经历这些反应，则应当停止治疗。发展出 4 级皮肤性毒性的患者应当停止治疗。

[0304] 如果发生 3 级粘膜炎或腹泻，应当暂停研究药物直至恢复至 ≤ 1 级，然后以这两种药物的下一个更低剂量水平重新给予。发展出 4 级粘膜炎或腹泻的患者应当停止治疗。

[0305] 如果中性白细胞增多将以其他方式需要将 abraxane 剂量降至低于 $100\text{mg}/\text{m}^2$ ，则允许在第 1 循环后使用生长因子支持嗜中性粒细胞计数。还可考虑 GCSF 用于根据机构实践在如上文观察到的发热性中性白细胞增多事件中进行治疗给予。

[0306] 因此，在一些实例中，帕立骨化醇以 $5\mu\text{g}$ 或 $10\mu\text{g}$ 进行 IV 给予，每周三次，在手术前持续两至三周。可在手术前给予一个吉西他滨/abraxane 循环，并且可使用 1 至 2 周或更长的间隔以允许计数恢复。可在计划的手术之前约 28 天给予帕立骨化醇，并且可持续至多至手术前一天，因为不存在该微量营养素的相关毒性。最终剂量可为手术前 24 小时（如果手术延迟，则可给予额外的天数的治疗，直至手术前一天）。手术后，在手术后约 4 至 8 周开始，可用吉西他滨/abraxane。帕立骨化醇治疗患者，总共持续 3 至 5 循环。

[0307] 在手术前，患者用非血钙维生素 D 类似物（帕立骨化醇）治疗 28 天，并在手术前给予一个吉西他滨/abraxane 循环，间隔 1 至 2 周或更久，以允许计数恢复。在手术前未观察到有

害的临床影响(没有血钙水平提高)。显然,常用作胰腺肿瘤标志物的患者的血清CA 19-9水平从120U/mL降低至40U/mL(正常的非癌患者水平范围介于0U/mL至37U/mL的范围)。手术重切片显示,肿瘤比正常更轻。后续组织学分析显示出几乎没有癌细胞的肉芽肿。肉芽肿是被称为巨噬细胞的免疫细胞的集合物,它的存在表明,除了提高吉西他滨/abraxane细胞毒性的效力外,该治疗方法还实现了在胰腺癌中常常被阻断的免疫应答。这些结果描述了用于治疗胰腺癌的新的并且有效的治疗途径。

[0308] 参考文献

[0309] Aikawa et al.,(2006).Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth,metastasis,and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer.Mol.Cancer Ther.5,1108-1116.

[0310] Apte et al.,(1998).Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification,isolation,and culture.Gut 43,128-133.

[0311] Apte,M.V.,Pirola,R.C.,and Wilson,J.S.(2012).Pancreatic stellate cells:a starring role in normal and diseased pancreas.Front.Physiol.3,344.

[0312] Apte,M.V.,and Wilson,J.S.(2012).Dangerous liaisons:pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells.J.Gastroenterol.Hepatol.27Suppl 2, 69-74.

[0313] Bailey et al.,(2008).Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer.Clin Cancer Res.14,5995-6004.

[0314] Bapiro et al.,(2011).A novel method for quantification of gemcitabine and its metabolites2',2'-difluorodeoxyuridine and gemcitabine triphosphate in tumour tissue by LC-MS/MS:comparison with(19)F NMR spectroscopy.Cancer Chemother.Pharmacol.68,1243-1253.

[0315] Bardeesy et al.,(2006).Both p16(Ink4a)and the p19(Arf)-p53pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse.Proc.Natl.Acad.Sci.USA103,5947-5952.

[0316] Barish et al.,(2010).Bcl-6and NF-kappaB cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response.Genes&Development 24,2760-2765.

[0317] Bayne et al.,(2012).Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer.Cancer Cell 21,822-835.

[0318] Bergers et al.,(2000).Matrix metalloproteinase-9triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.Nat.Cell Biol.2,737-744.

[0319] Bhowmick et al.,(2004).Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression.Nature 432,332-337.

[0320] Bissell and Hines(2011).Why don't we get more cancer?A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression.Nat.Med.17,320-329.

[0321] Burris,H.A.,3rd,Moore,M.J.,Andersen,J.,Green,M.R.,Rothenberg,M.L., Modiano,M.R.,Cripps,M.C.,Portenoy,R.K.,Storniolo,A.M.,Tarassoff,P.,et al.

(1997).

[0322] Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer:a randomized trial.J.Clin.Oncol.15,2403-2413.

[0323] Cantorna,M.T.,Hayes,C.E.,and DeLuca,H.F.(1996).1,25-Dihydroxyvitamin D3reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis,a model of multiple sclerosis.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93,7861-7864.

[0324] Cantorna et al.,(1998).1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis.J.Nutr.128,68-72.

[0325] Cantorna et al.,(2000).1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease.J.Nutr.130,2648-2652.

[0326] Collisson et al.,(2011).Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy.Nat.Med.17,500-503.

[0327] Collisson et al.,(2012).A central role for RAF-->MEK-->ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma.Cancer Discov.2,685-693.

[0328] Deeb,K.K.,Trump,D.L.,and Johnson,C.S.(2007).Vitamin D signalling pathways in cancer:potential for anticancer therapeutics.Nat.Rev.Cancer 7, 684-700.

[0329] Ding et al.,(2013).A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response.Cell 153,601-613.

[0330] Dowell,N.G.,and Tofts,P.S.(2007).Fast,accurate,and precise mapping of the RF field in vivo using the 180 degrees signal null.Magn.Reson.Med.58,622-630.

[0331] Feig et al.,(2012).The pancreas cancer microenvironment.Clin.Cancer Res.18,4266-4276.

[0332] Fukuda et al.,(2011).Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression.Cancer Cell 19,441-455.

[0333] Garrido-Laguna et al.,(2011).Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer.Clin.Cancer Res.17,5793-5800.

[0334] Heinemann,V.,Haas,M.,and Boeck,S.(2012).Systemic treatment of advanced pancreatic cancer.Cancer Treat.Rev.38,843-853.

[0335] Hingorani et al.,(2005).Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.Cancer Cell 7,469-483.

[0336] Hwang et al.,(2008).Cancer-associated stromal fibroblasts promote

pancreatic tumor progression.Cancer Res.68,918-926.

[0337] Ijichi et al.,(2011).Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma.J.Clin.Invest.121,4106-4117.

[0338] Jacobetz et al.,(2013).Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer.Gut 62,112-120.

[0339] Kalluri and Zeisberg(2006).Fibroblasts in cancer.Nat.Rev.Cancer 6, 392-401.

[0340] Kisseleva et al.,(2012).Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 109, 9448-9453.

[0341] Lawler,J.(2002).Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.J.Cell.Mol.Med.6,1-12.

[0342] Lesina et al.,(2011).Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer.Cancer Cell19,456-469.

[0343] Ma et al.,(2006).Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective,nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators.J.Clin.Invest.116,892-904.

[0344] Mahadevan,D.,and Von Hoff,D.D.(2007).Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma.Mol.Cancer Ther.6,1186-1197.

[0345] Mantoni et al.,(2011).Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through betal-integrin signaling.Cancer Res.71,3453-3458.

[0346] Mann et al.,(2003).Vitamin D3 in patients with various grades of chronic pancreatitis,according to morphological and functional criteria of the pancreas.Dig Dis Sci.48,533-538.

[0347] Masamune,A.,and Shimosegawa,T.(2009).Signal transduction in pancreatic stellate cells.J.Gastroenterol.44,249-260.

[0348] Nagpal,S.,Na,S.,and Rathnachalam,R.(2005).Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands.Endocr.Rev.26,662-687.

[0349] Naveh-Many and Silver(1993).Effects of calcitriol,22-oxacalcitriol, and calcipotriol on serum calcium and parathyroid hormone gene expression.Endocrinology 133,2724-2728.

[0350] Neesse et al.,(2013).CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 110,12325-12330.

[0351] Olive et al.,(2009).Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.Science 324,

1457-1461.

[0352] Omary et al.,(2007).The pancreatic stellate cell:a star on the rise in pancreatic diseases.J.Clin.Invest.117,50-59.

[0353] Persons et al.,(2010).Anti-growth effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3-3-bromoacetate alone or in combination with 5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside in pancreatic cancer cells.Anticancer Res.30,1875-1880.

[0354] Phillips et al.,(2003).Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases:implications for extracellular matrix turnover.Gut 52,275-282.

[0355] Pietras and Ostman(2010).Hallmarks of cancer:interactions with the tumor stroma.Exp.Cell Res.316,1324-1331.

[0356] Provenzano et al.,(2012).Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma.Cancer Cell 21,418-429.

[0357] Pylayeva-Gupta et al.,(2012).Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia.Cancer Cell 21,836-847.

[0358] Rasanen and Vaheri(2010).Activation of fibroblasts in cancer stroma.Exp.Cell Res.316,2713-2722.

[0359] Sah et al.,(2013).Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice.Gastroenterology 144, 1076-1085 e1072.

[0360] Schafer et al.,(1987).The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver.Hepatology 7,680-687.

[0361] Schneider et al.,(2001).Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells.Am.J.Physiol.Cell Physiol.281,C532-543.

[0362] Sherman et al.,(2010).AID-induced genotoxic stress promotes B cell differentiation in the germinal center via ATM and LKB1 signaling.Molecular Cell 39,873-885.

[0363] Shimoda et al.,(2010).Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression.Semin.Cell Dev.Biol.21,19-25.

[0364] Skinner et al.,(2006).Vitamin D intake and the risk for pancreatic cancer in two cohort studies.Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.15,1688-1695.

[0365] Straussman et al.,(2012).Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion.Nature 487,500-504.

[0366] Trapnell et al.,(2012).Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks.Nature Protocols 7, 562-578.

[0367] Treiber et al.,(2011).Myeloid,but not pancreatic,RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis.Gastroenterology 141, 1473-1485,1485e1471-1477.

[0368] Vonlaufen et al.,(2008).Pancreatic stellate cells:partners in crime with pancreatic cancer cells.Cancer Res.68,2085-2093.

[0369] Wehr et al.,(2011).Analysis of the human pancreatic stellate cell secreted proteome.Pancreas 40,557-566.

[0370] Willemer,S.,Elsasser,H.P.,and Adler,G.(1992).Hormone-induced pancreatitis.Eur.Surg.Res.24 Suppl 1,29-39.

[0371] Wilson et al.,(2012).Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors.Nature 487,505-509.

[0372] Wolpin et al.,(2012).Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of pancreatic cancer.Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.21,82-91.

[0373] Yanagisawa et al.,(1999).Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators.Science 283,1317-1321.

[0374] Yoo et al.,(2005).Novel antioxidant ameliorates the fibrosis and inflammation of cerulein-induced chronic pancreatitis in a mouse model.Pancreatology 5,165-176.

[0375] Yoshizawa et al.,(1997).Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation,uterine hypoplasia and growth retardation after weaning.Nat.Genet.16,391-396.

[0376] Yu et al.,(2010).Calcitriol enhances gemcitabine anti-tumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system.Cell Cycle 9,3022-3029.

[0377] Zeitz et al.,(2003).Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor.FASEB J.17,509-511.

[0378] 从本公开内容的原理可应用到的许多可能的实施方案的角度来说,应认识到,所描述的实施方案仅仅是本公开内容的实例,并且不应作为对本发明范围的限制。相反,本公开内容的范围由以下的权利要求所限定。因此,我们要求将所有落在这些权利要求的范围和精神内的方案作为我们的发明。

序列表

	<110> 萨克生物研究院	
	<120> 治疗涉及CXCL12活性的疾病的维生素D受体激动剂	
	<130> 7158-91111-02	
	<150> US 61/831,515	
	<151> 2013-06-05	
	<160> 106	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 1	
	gtgctgatgg gcaagaac	18
[0001]	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 2	
	gctgaacctc catgaggaag	20
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 3	
	cccaatgagt aggctggaga	20
	<210> 4	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	

	<400> 4 acgcatggcc aagaagac	18
	<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 5 cagaatgagg ctcagcacag	20
	<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 6 ttctctggga aatcgtggaa a	21
[0002]	<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 7 gctgctgctg ctactcctga	20
	<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 8 cgagtggact tccacaacaa	20
	<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 9 gatgtcgccc ctaaaacaga	20
	<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 10 ttgggaatac ccttgaaga	20
	<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0003]	<400> 11 gcaagctgag gtcgacatt	20
	<210> 12 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 12 atcttctct cgcctggt	19
	<210> 13 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 13 tgacaggatg cagaaggaga	20
	<210> 14 <211> 20 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 14	
	tctgtccct accaggtgc	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 15	
	tttgtcaagc agcaccttg	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
[0004]	<400> 16	
	accctccga gattacaacc	20
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 17	
	actaccagct gtgggtgag	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 18	
	cggaggacga gtctatgac	20
	<210> 19	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 19	
	ccagcggcta gagatcaaac	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 20	
	ccgtgcttct cagaacatca	20
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 21	
	ctggccagat gtttctggt	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 22	
	tgtctggaga aacagccaag	20
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 23	
	atcggggaac ctctgatttt	20

[0006]	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 24	
	cgagtgacaa gcctgtagcc	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 25	
	ggtcttctg gtgctgtct	20
[0006]	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 26	
	cgagctctac gaggaggaga	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 27	
	gactcgggac ccatctatga	20
[0006]	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 28	

	agagtggagc gcctgttcta	20
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 29	
	cctgcaaatg ccaacagtta	20
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 30	
	gatggtgaca agctggtggt	20
[0007]	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 31	
	tcagectact gcccctacag	20
	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 32	
	gacaaacacg aaagcctggt	20
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	

	<400> 33 catctgtttg aatggcgatg	20
	<210> 34 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 34 aggtcctect tggagaac	18
	<210> 35 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 35 ggatcatctt ggcgtagagc	20
[0008]	<210> 36 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 36 tctggacceca ttccttcttg	20
	<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 37 ggtttcaag tctcaccatt	20
	<210> 38 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 38 ttgtgtaatg ggcttcaga	20
	<210> 39 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 39 tgcaagtgca tcacgttgt	20
	<210> 40 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0009]	<400> 40 gtctccagag cccctatgta	20
	<210> 41 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 41 gcaagtgggtt tccactccag	20
	<210> 42 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 42 gggcagccat agaaagtgtt	20
	<210> 43 <211> 20 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 43	
	catgttcacc ccagatacca	20
	<210> 44	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 44	
	tggtctcaaag tatggttfcg t	21
	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
[0010]	<400> 45	
	tggtctctccc aggtgactgt	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 46	
	ccaccgatcc agacagagta	20
	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 47	
	gttggggtgc ttgatgatct	20
	<210> 48	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 48	
	tctacaatgc cacgcttctg	20
	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 49	
	ggcgagcatt gtcaatctgt	20
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0011]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 50	
	ggacatcacc aggattggac	20
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 51	
	ctgtgattcc gaggaggaga	20
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 52	
	cacgggcttc atgagtttct	20

[0012]	<210> 53	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 53	
	ctgcccctat tcattgtgt	20
	<210> 54	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 54	
	ctcggctacg ttgggaataa	20
[0012]	<210> 55	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 55	
	tcctcgaata gctgcaagt	20
	<210> 56	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 56	
	ggcttggaag cagcagtaac	20
[0012]	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 57	

	agctgctcct ccacttggt	19
	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 58	
	tatgttcggc ttcccattct	20
	<210> 59	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 59	
	gaaggcagcc aagttgttct	20
[0013]	<210> 60	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 60	
	ggggtttctc tagcccttgt	20
	<210> 61	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 61	
	gacaggcttg gcgattttag	20
	<210> 62	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	

	<400> 62 ttcttcccg cagatagcac	20
	<210> 63 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 63 aatttccatc caggcctett	20
	<210> 64 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 64 gagatggcaa tagccctgaa	20
[0014]	<210> 65 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 65 tcaagcaatg gcagtacaca	20
	<210> 66 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 66 ttcccaccaa ggtctgaaag	20
	<210> 67 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 67 cgatgctccc agggctgttt	20
	<210> 68 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 68 gaaagcttgc ctcaatcctg	20
	<210> 69 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0015]	<400> 69 cagccactac aagcagcact	20
	<210> 70 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 70 gggagagctg aagattgctg	20
	<210> 71 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 71 acataataac cgctgtggtc gcac	24
	<210> 72 <211> 18 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 72	
	cccctaagcc tcctgctc	18
	<210> 73	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 73	
	ccaagtggga caagaaccag atca	24
	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
[0016]	<400> 74	
	acagccgctt cacctacagc	20
	<210> 75	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 75	
	agaggggctc ctggtgag	18
	<210> 76	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 76	
	tgatcaccat tggctgggaa ggaa	24
	<210> 77	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 77	
	ttgcgagctg aggccagaca	20
	<210> 78	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 78	
	tttctcgc ctggtgggt	19
	<210> 79	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0017]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 79	
	aaagaggcac tggcagaaaa	20
	<210> 80	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 80	
	gcctccagca tgaaagtctc	20
	<210> 81	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 81	
	acagacaggc tgaggacgac	20

[0018]	<210> 82	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 82	
	acgtcggaat tggctctg	18
	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 83	
	acatggaaaa gccttgatgg	20
[0019]	<210> 84	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 84	
	acttgcataa ggaggagcat	20
	<210> 85	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 85	
	ccagcgataa tacgcctca	19
[0020]	<210> 86	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 86	

	gggaagaaaa tcattggctga	20
	<210> 87	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 87	
	ttcgtcaccc acgtagctgt cttt	24
	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 88	
	caccagttag cttctctctc	20
[0019]	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 89	
	aaggggatga caagcagaaa	20
	<210> 90	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 90	
	gcaccacaga tccaccttct	20
	<210> 91	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	

	<400> 91 tggcacttac actccagctt caga	24
	<210> 92 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 92 gcattggacag gatctccaac	20
	<210> 93 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 93 gtccagatca ggtgtgtagc caat	24
[0020]	<210> 94 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 94 cgggtgtgact cgtgcagc	18
	<210> 95 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 95 gcagttccag gaggaccag	19
	<210> 96 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 96 gctgccacaa accfecactt tgta	24
	<210> 97 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 97 aaactcctgt gactctgtg atgagg	26
	<210> 98 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0021]	<400> 98 gttctccgag gtgactgtcg ataca	25
	<210> 99 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 99 agctctgget tgttctcac	20
	<210> 100 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 100 cacttgctgc tgggtattct	20
	<210> 101 <211> 20 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 101	
	gctgtgattc caaggaggag	20
	<210> 102	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 102	
	cagataggag cgggaggag	19
	<210> 103	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
[0022]	<400> 103	
	gcagcagtct ggaaggtagg	20
	<210> 104	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 104	
	tcggctagct tctggatcat	20
	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 105	
	accctgtaga atgccttga	20
	<210> 106	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0023]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 106	
	cagaaggtgc aataccagca	20

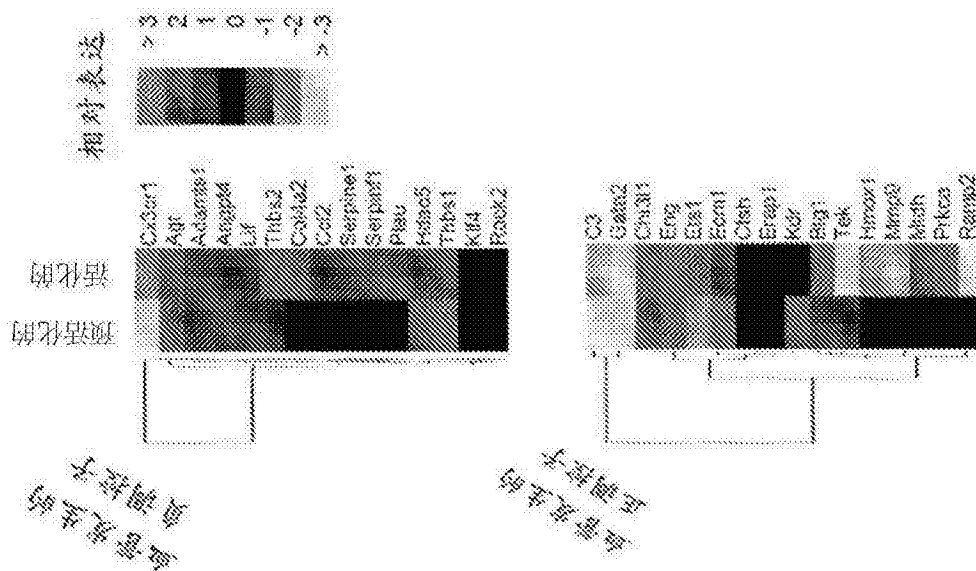


图1C

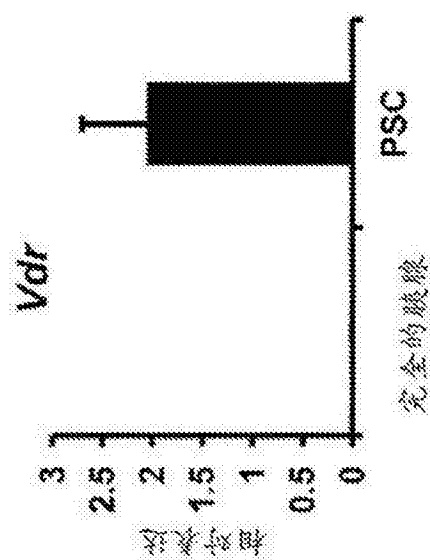


图1D

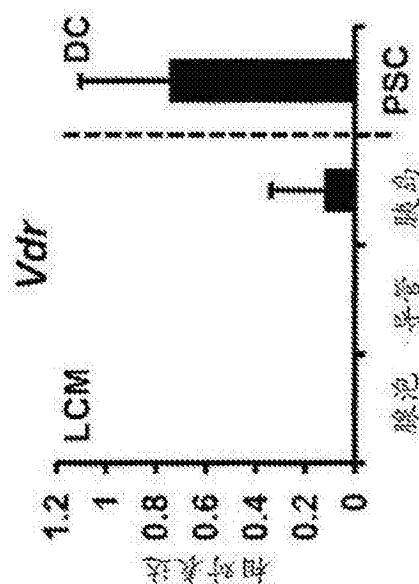


图1E

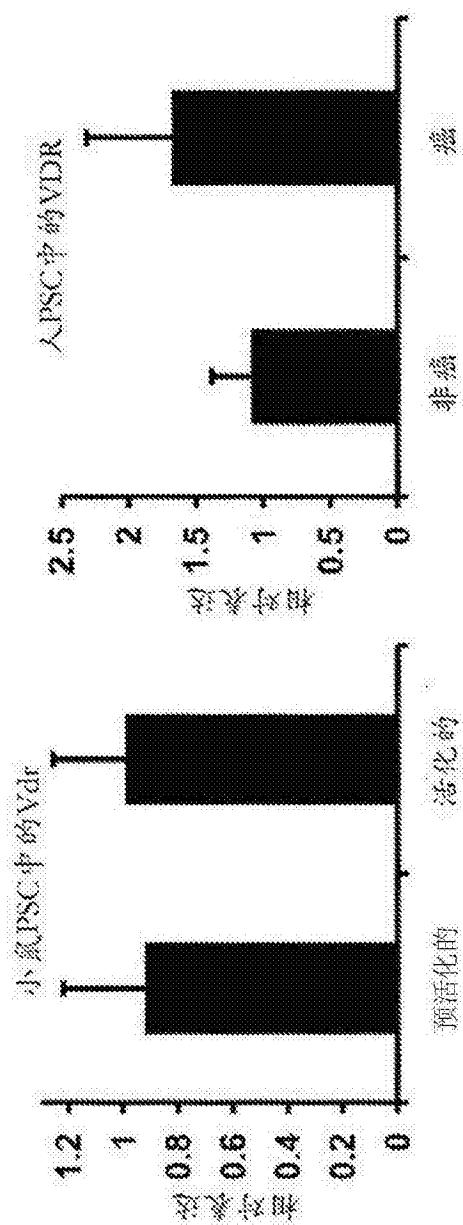


图1F

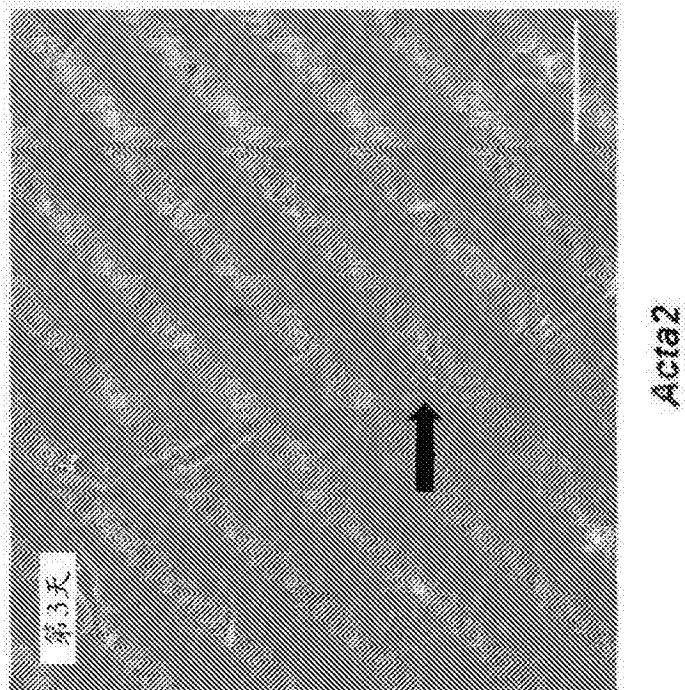


图2A

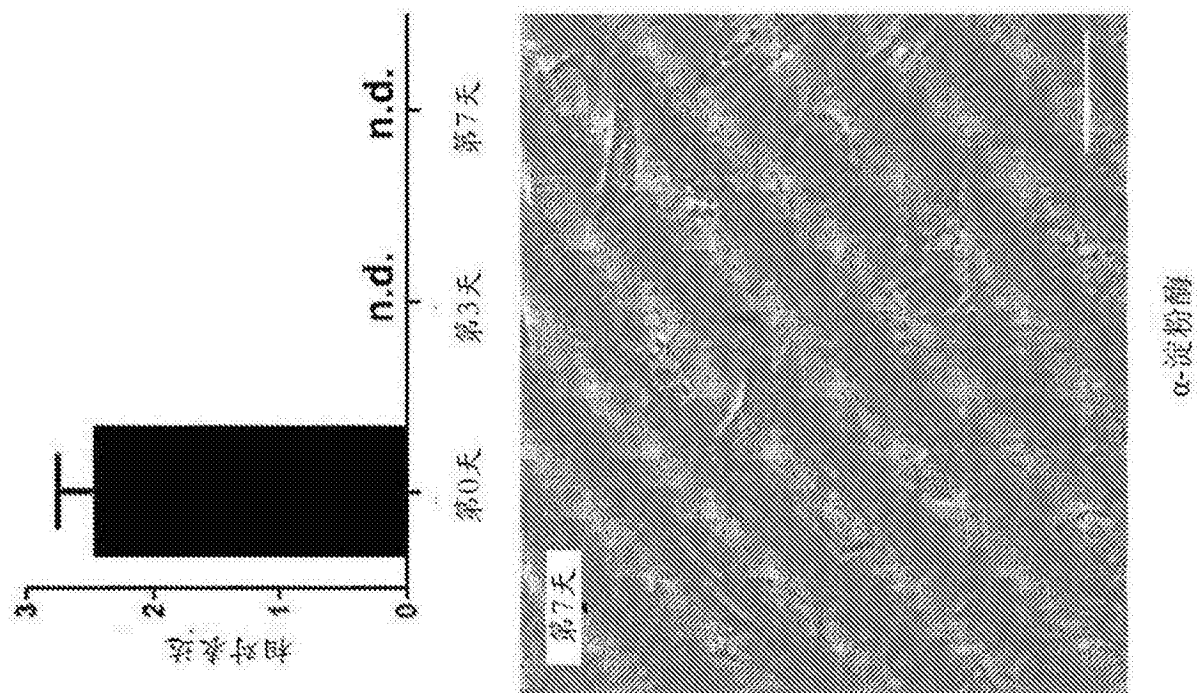


图2C

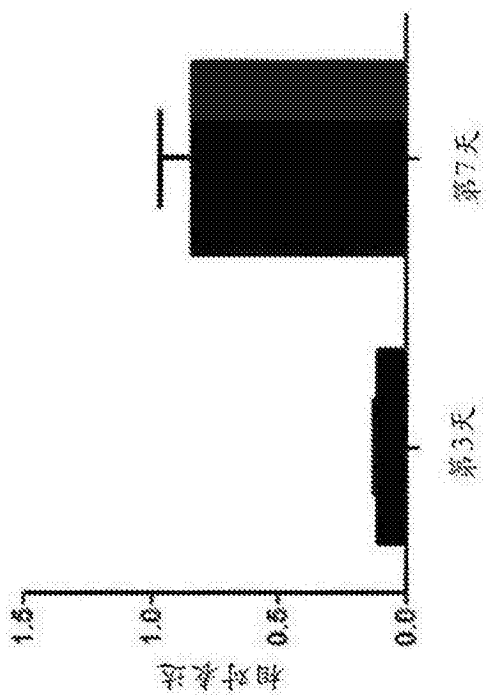


图2B

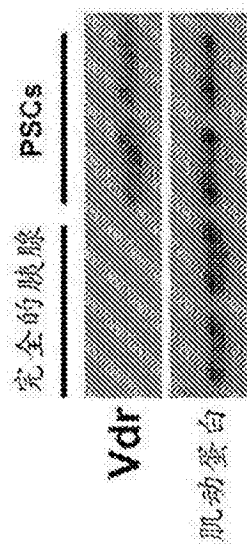


图2D

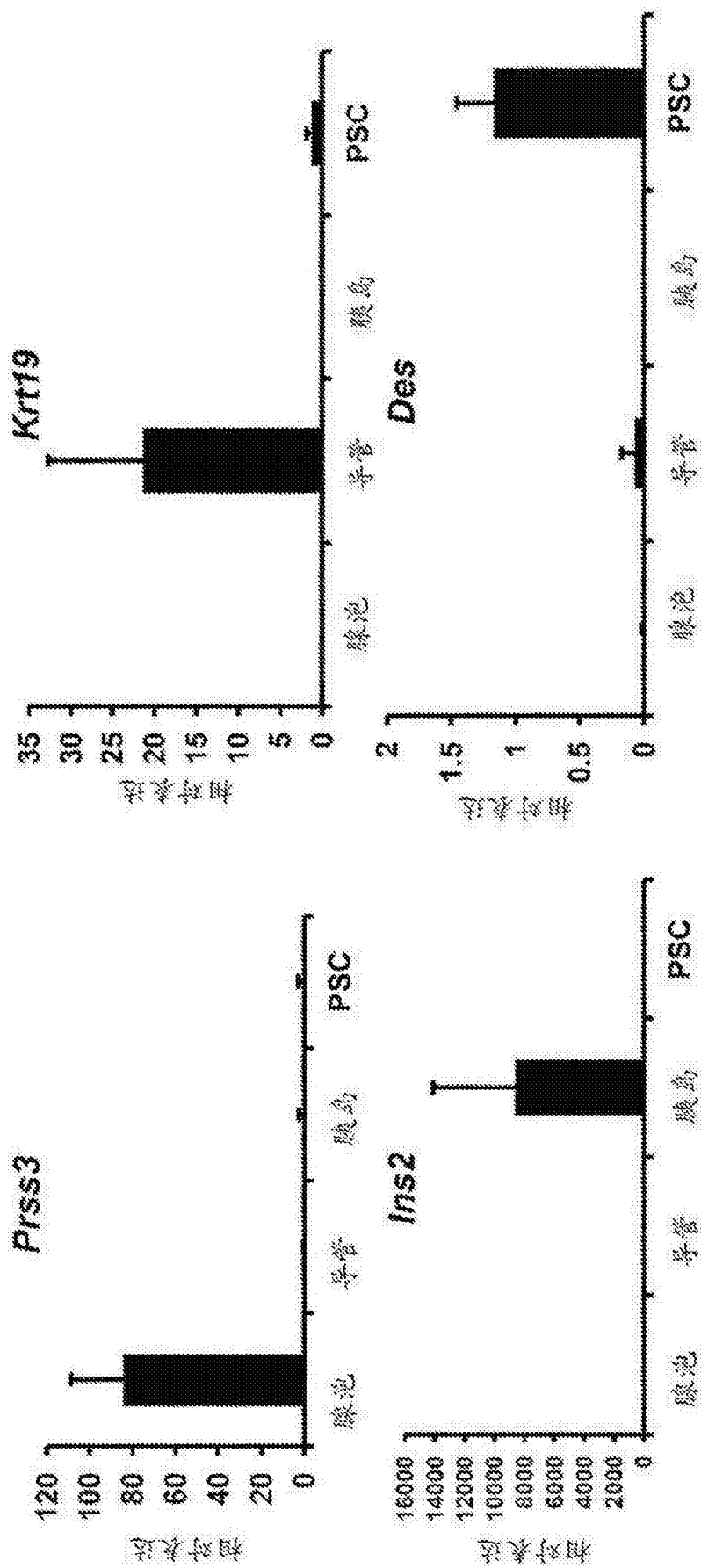


图2E

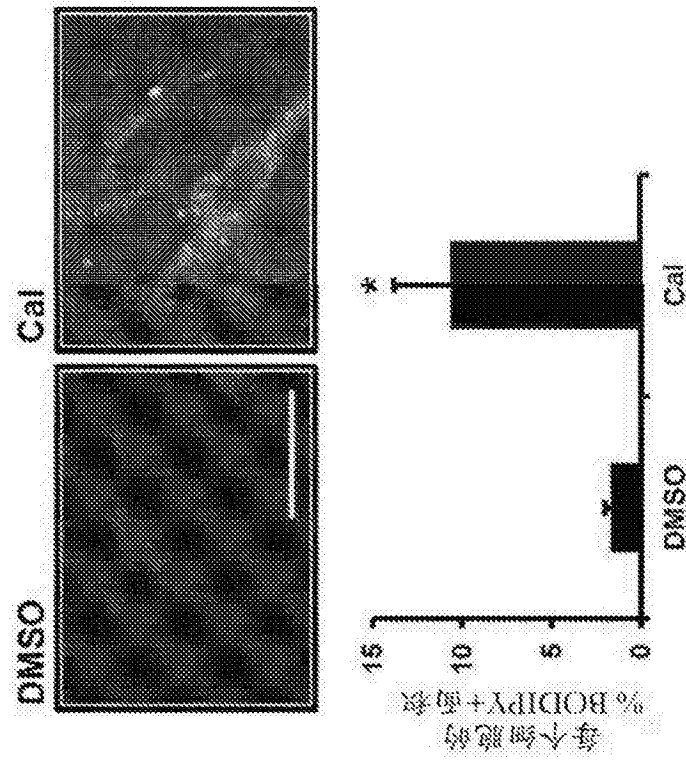


图3A

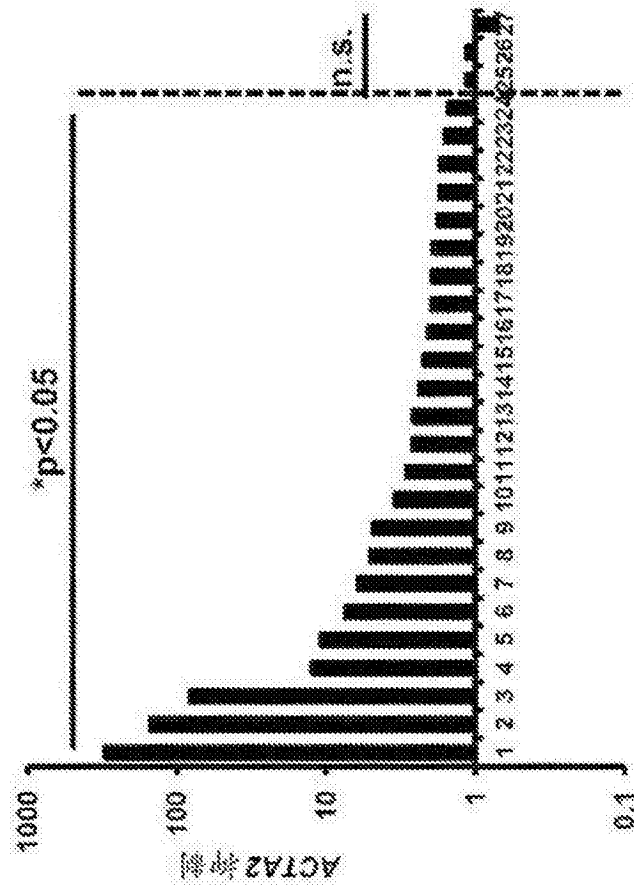


图3B

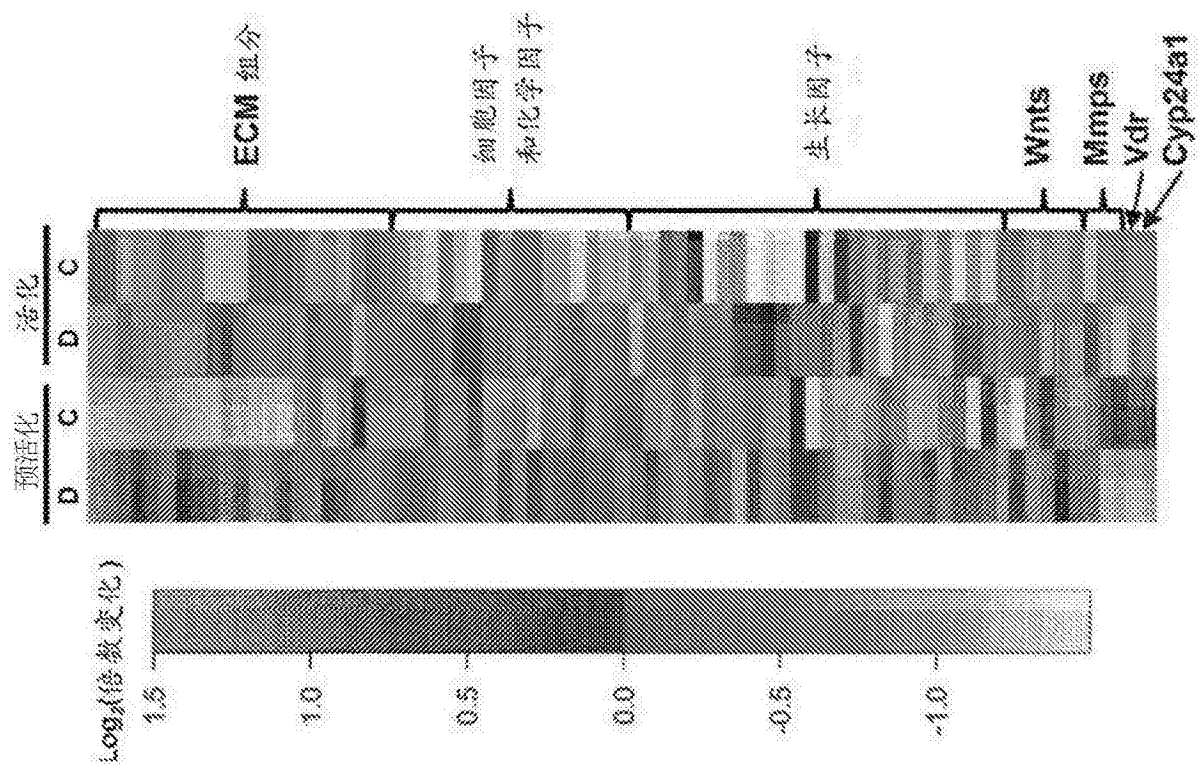


图3C

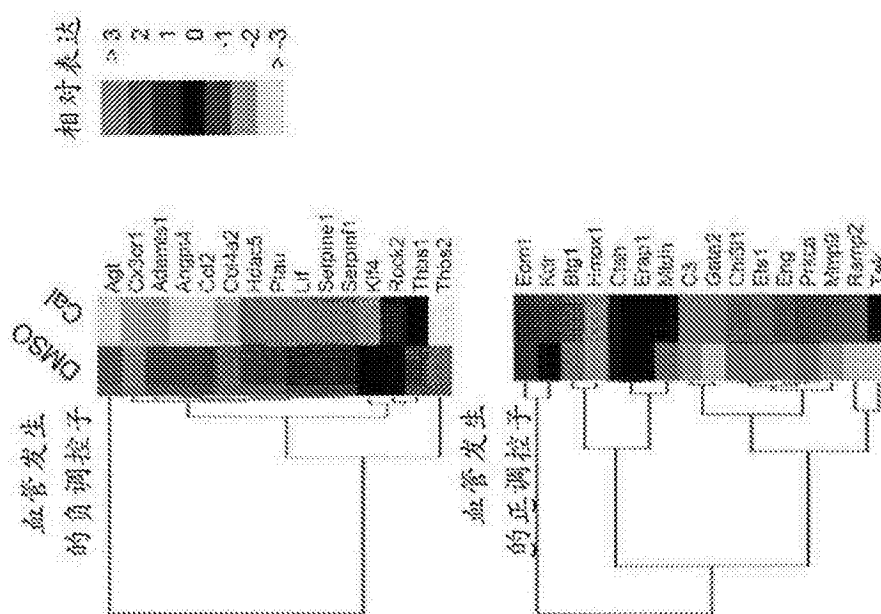


图3D

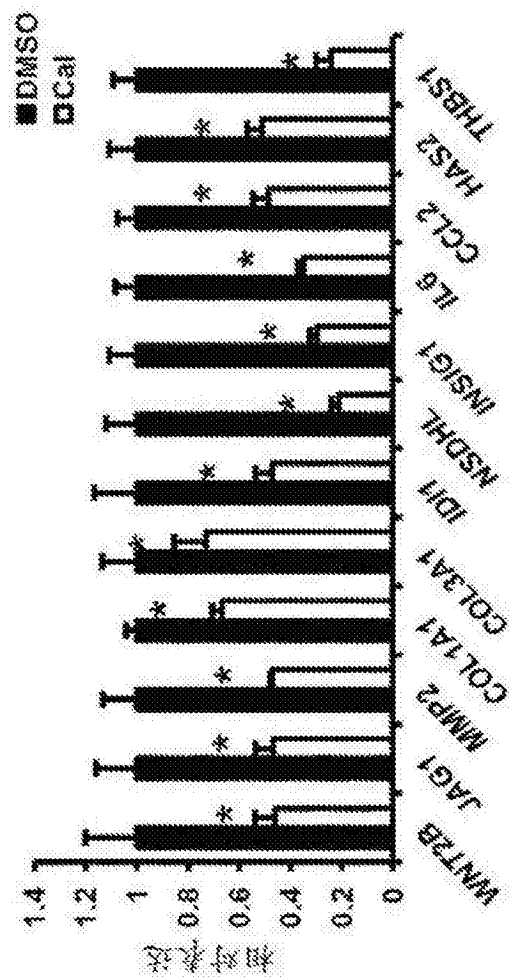


图3E

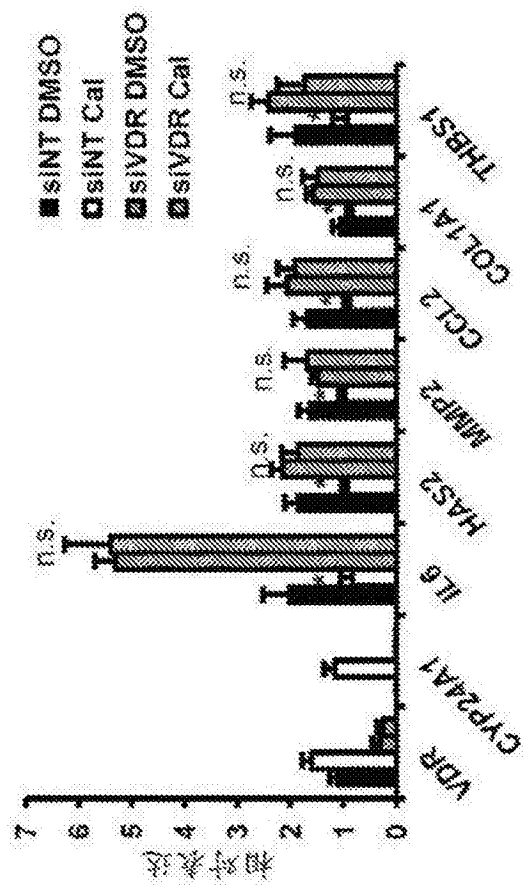


图3F

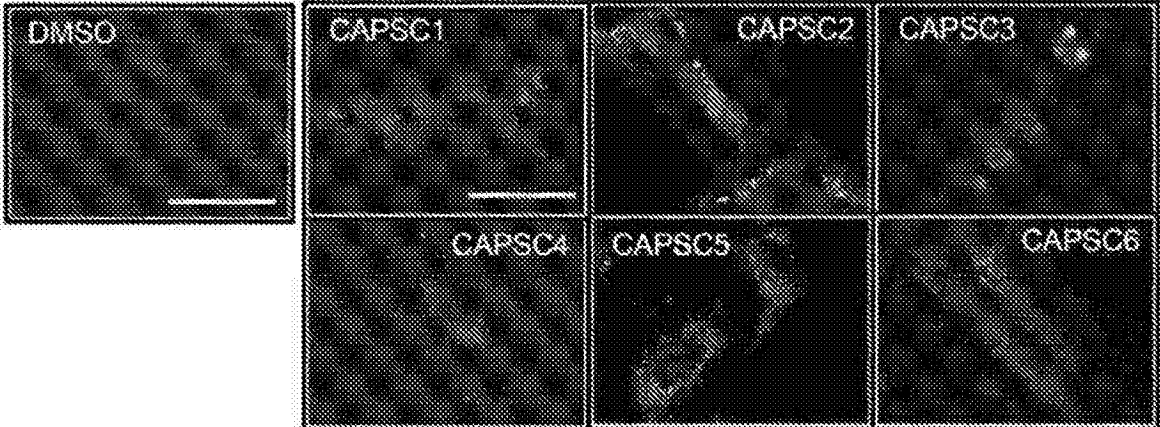


图4A

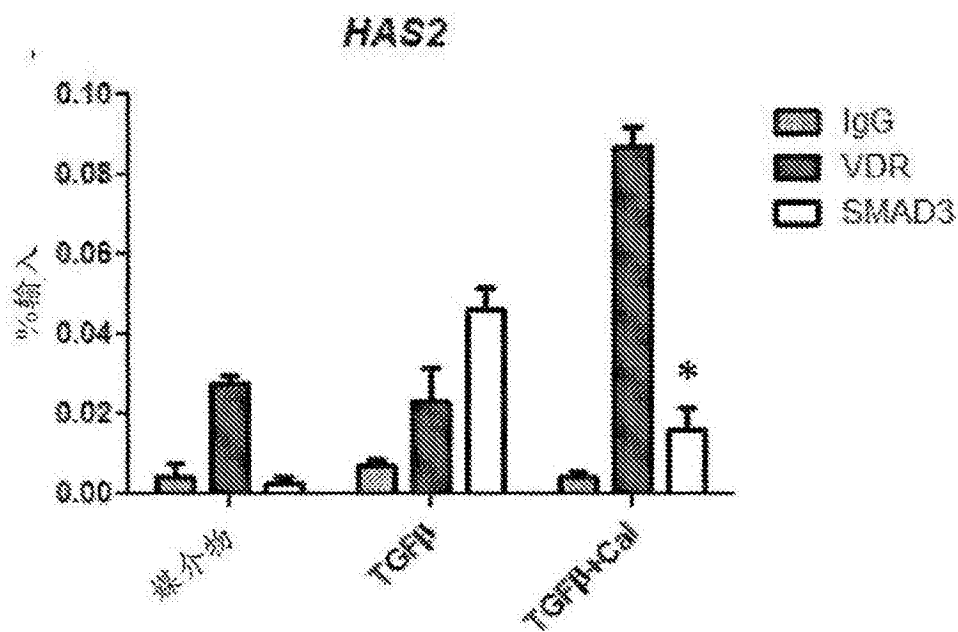


图4B

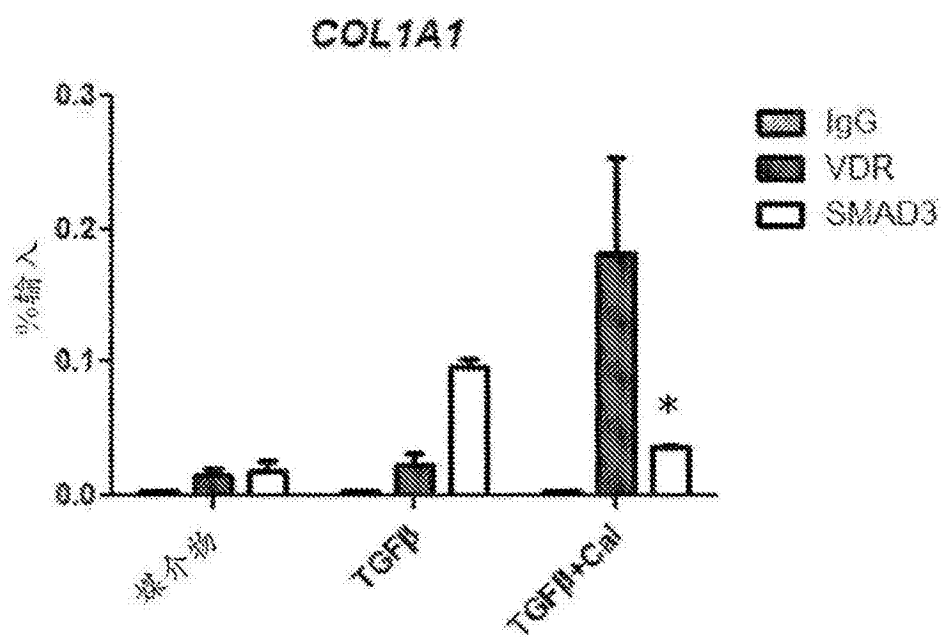


图4C

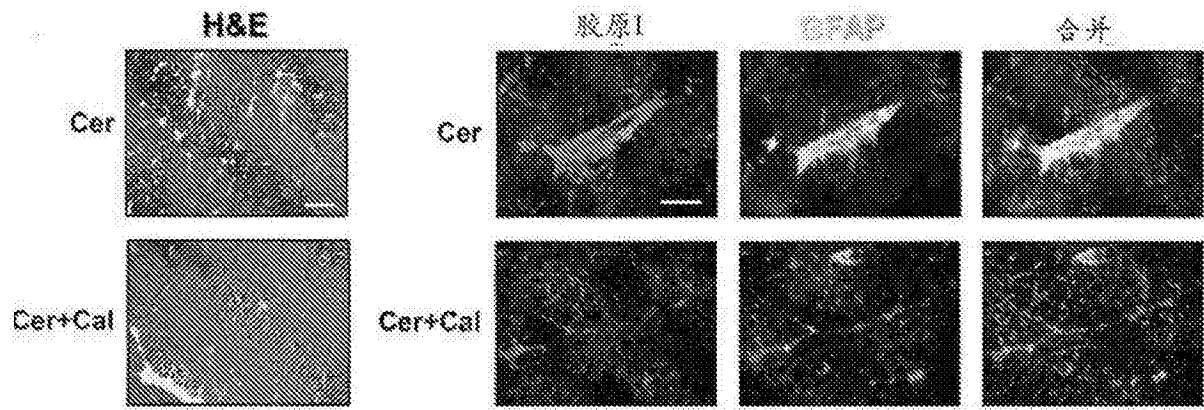


图5A

图5B

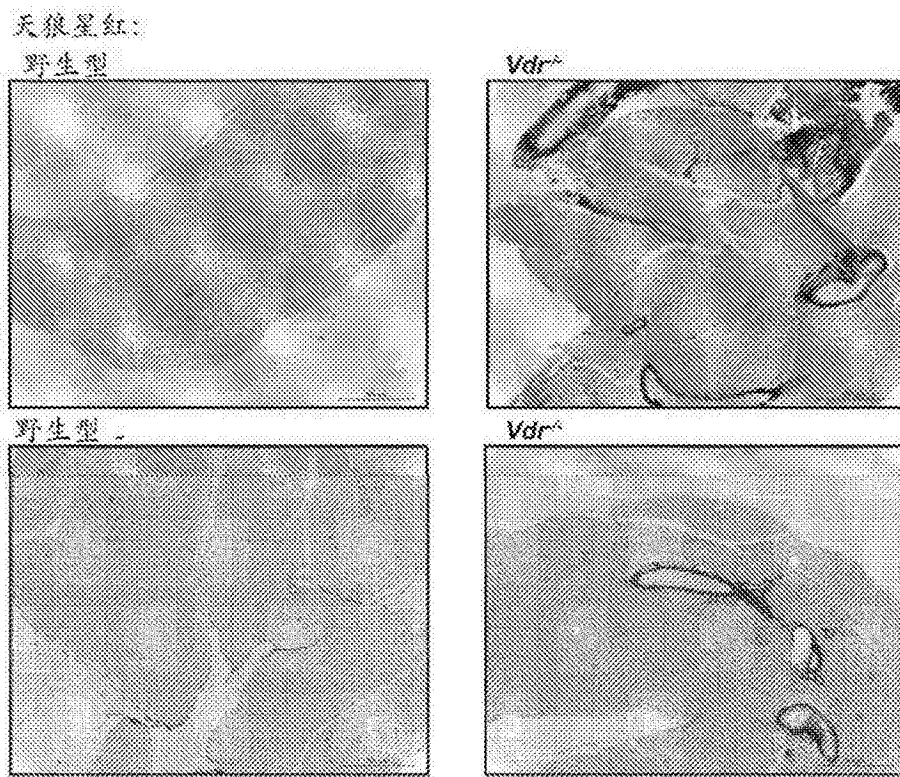


图5C

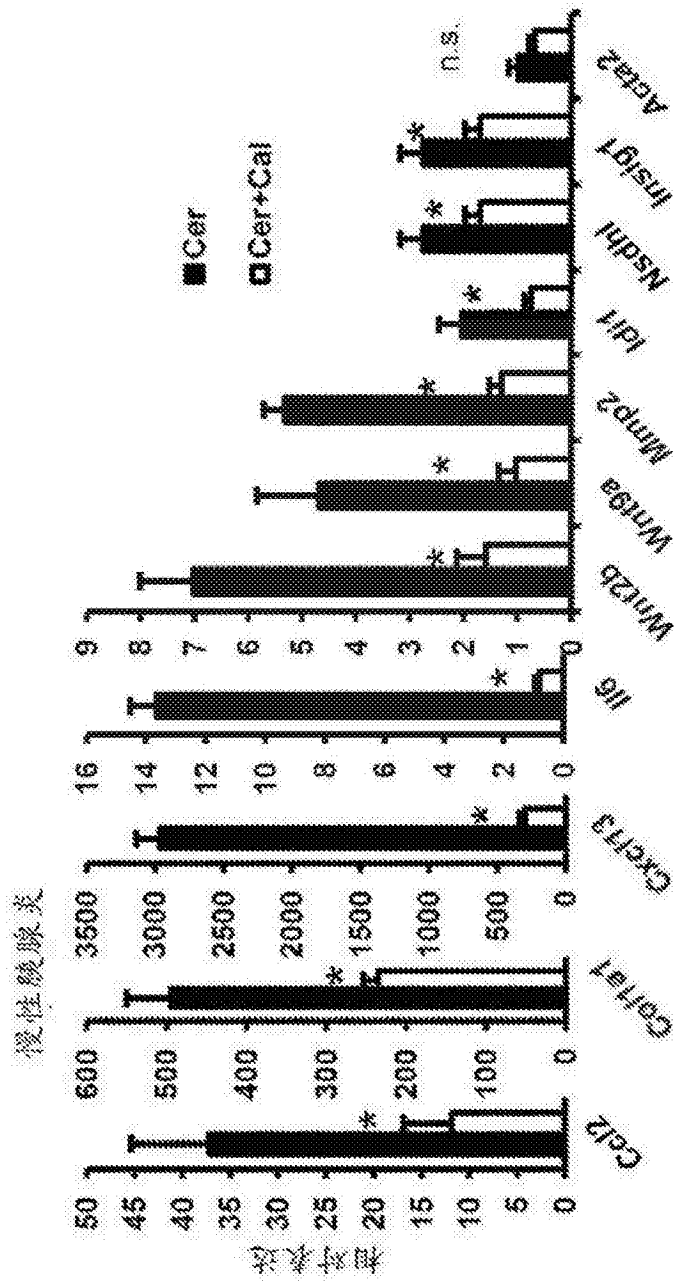


图6A

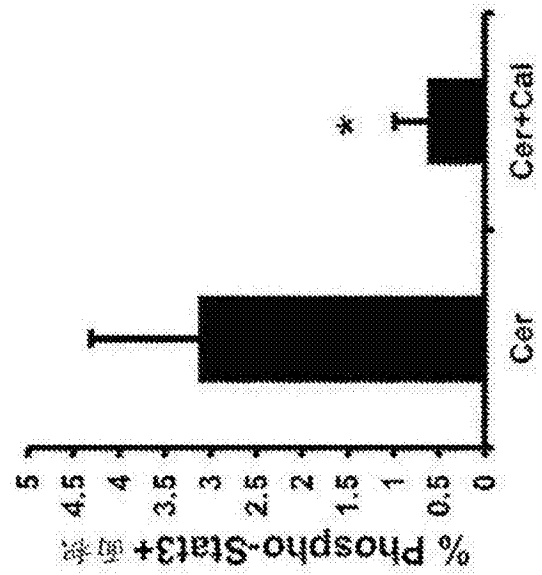


图6B

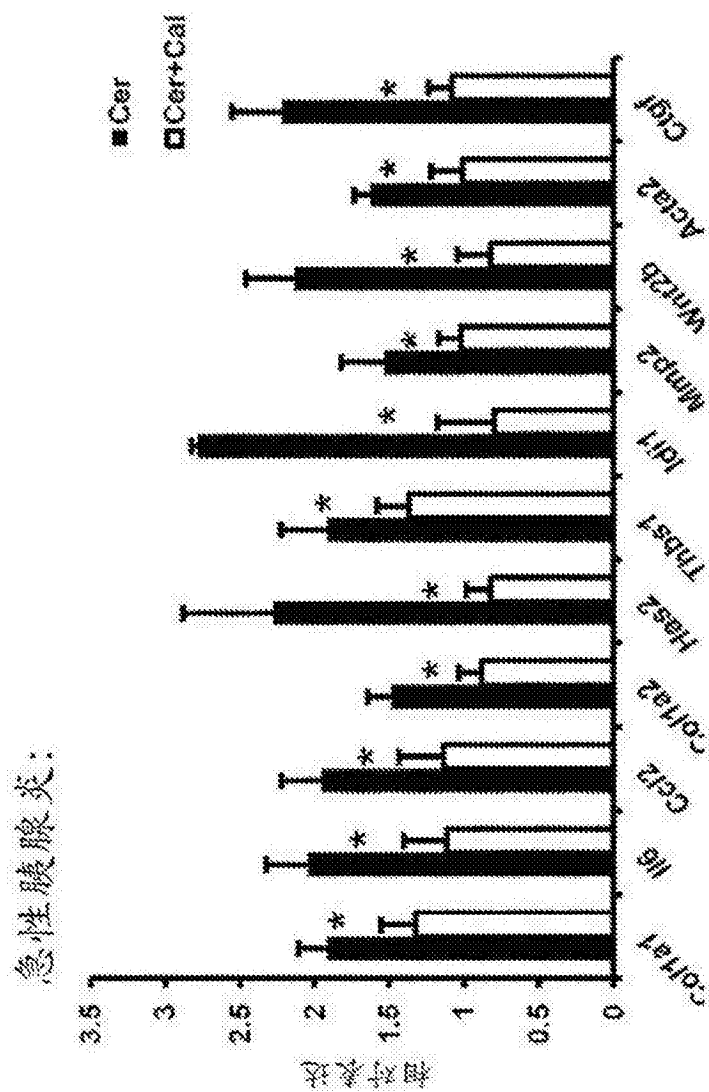


图6C

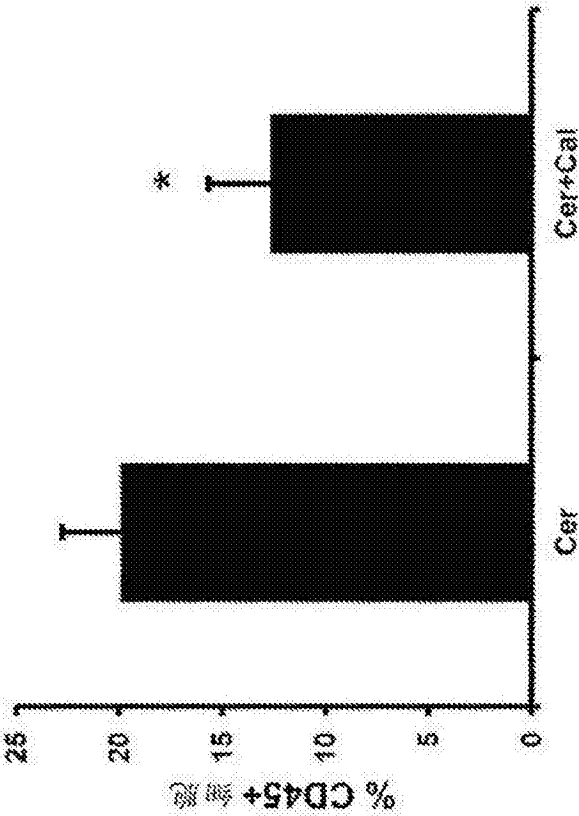


图6D

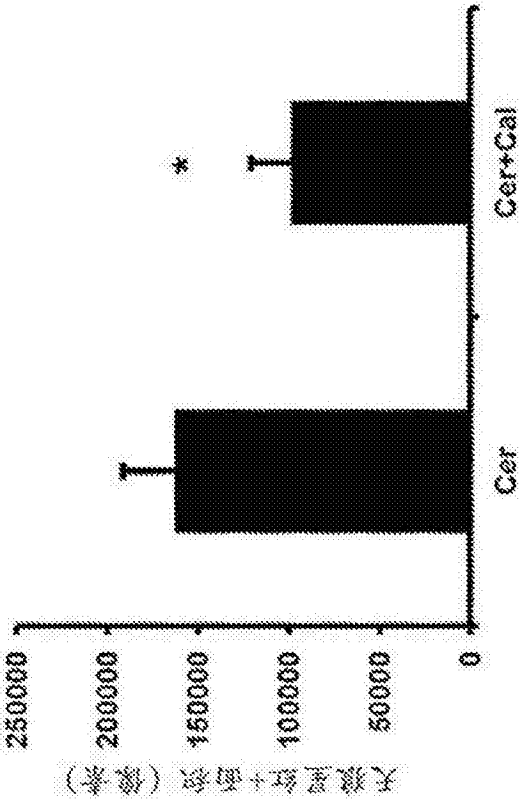


图6E

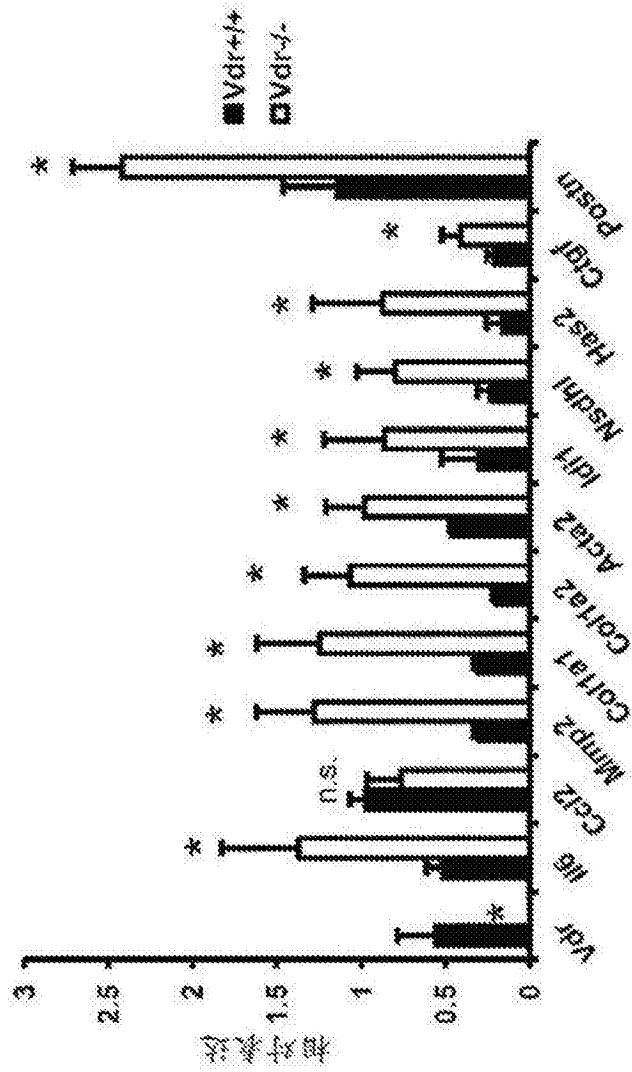


图6F

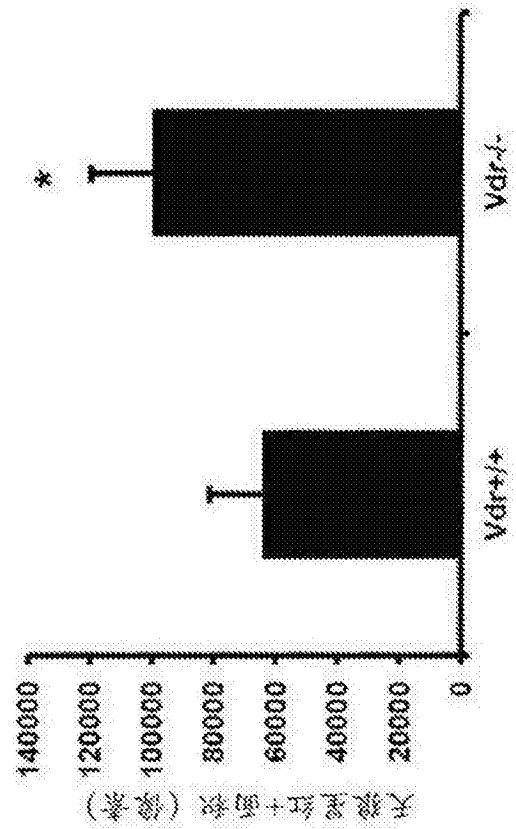


图6G

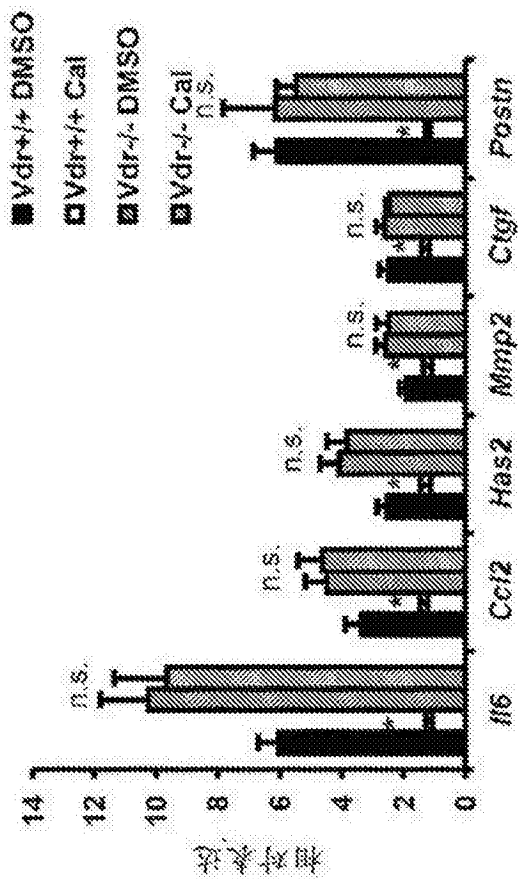


图6H

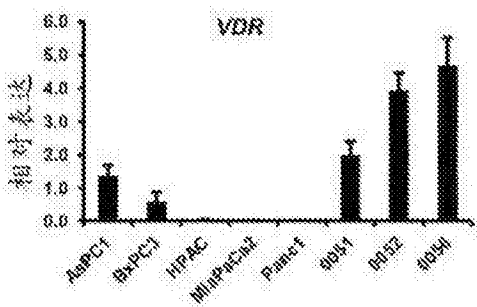


图7A

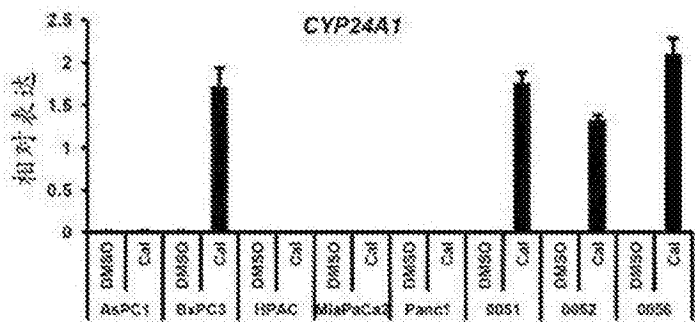


图7B

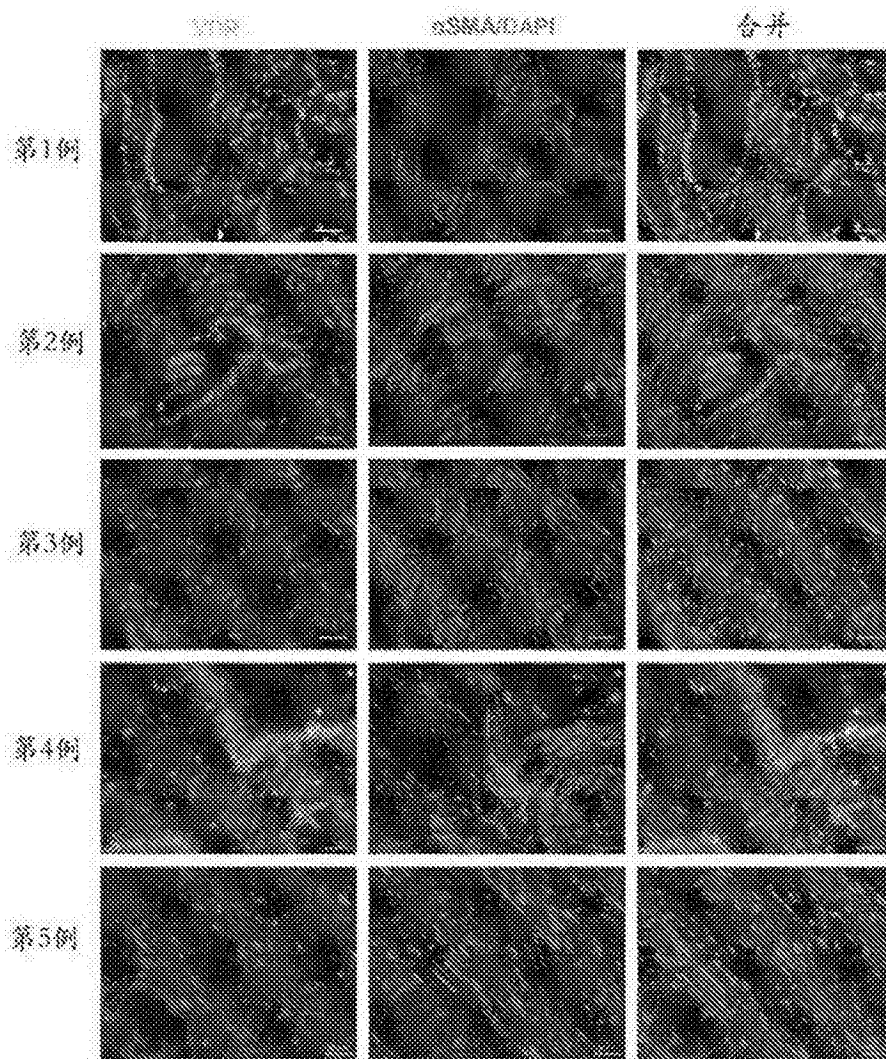


图7C

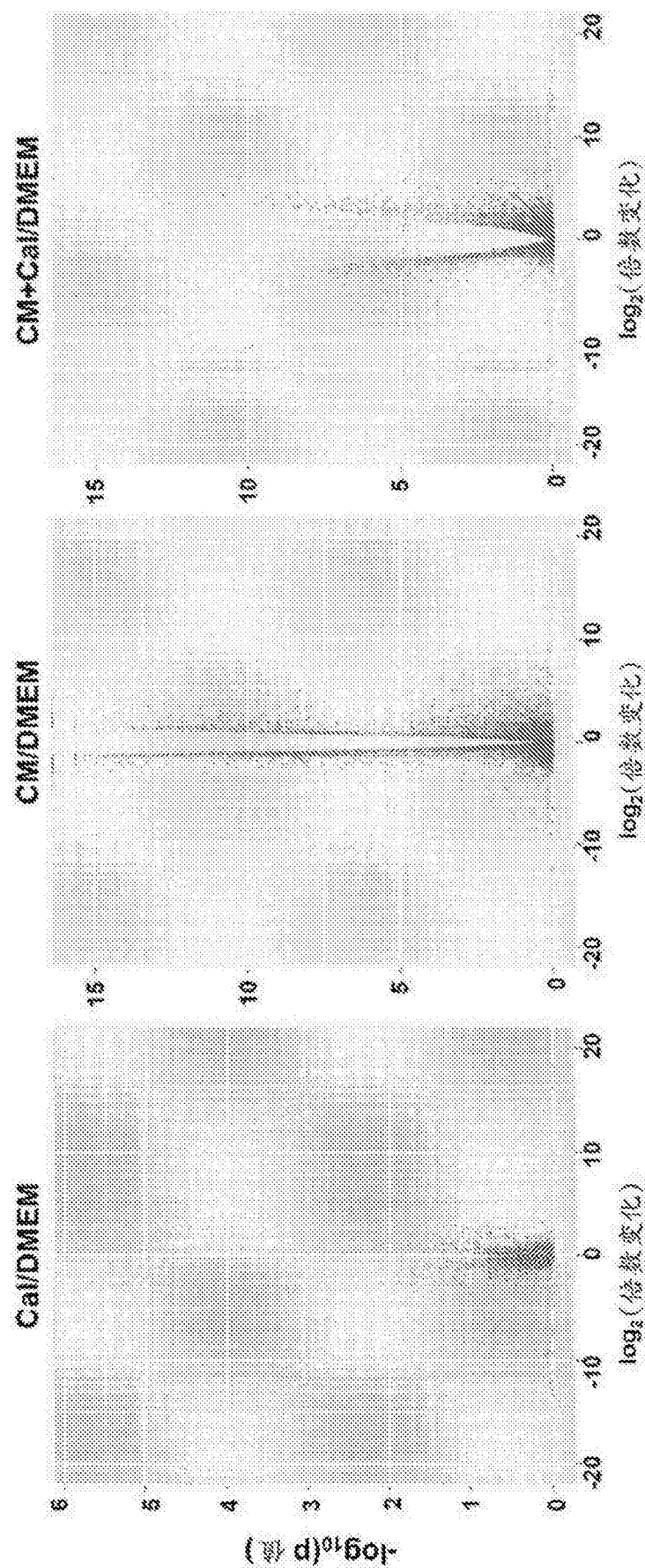


图8A

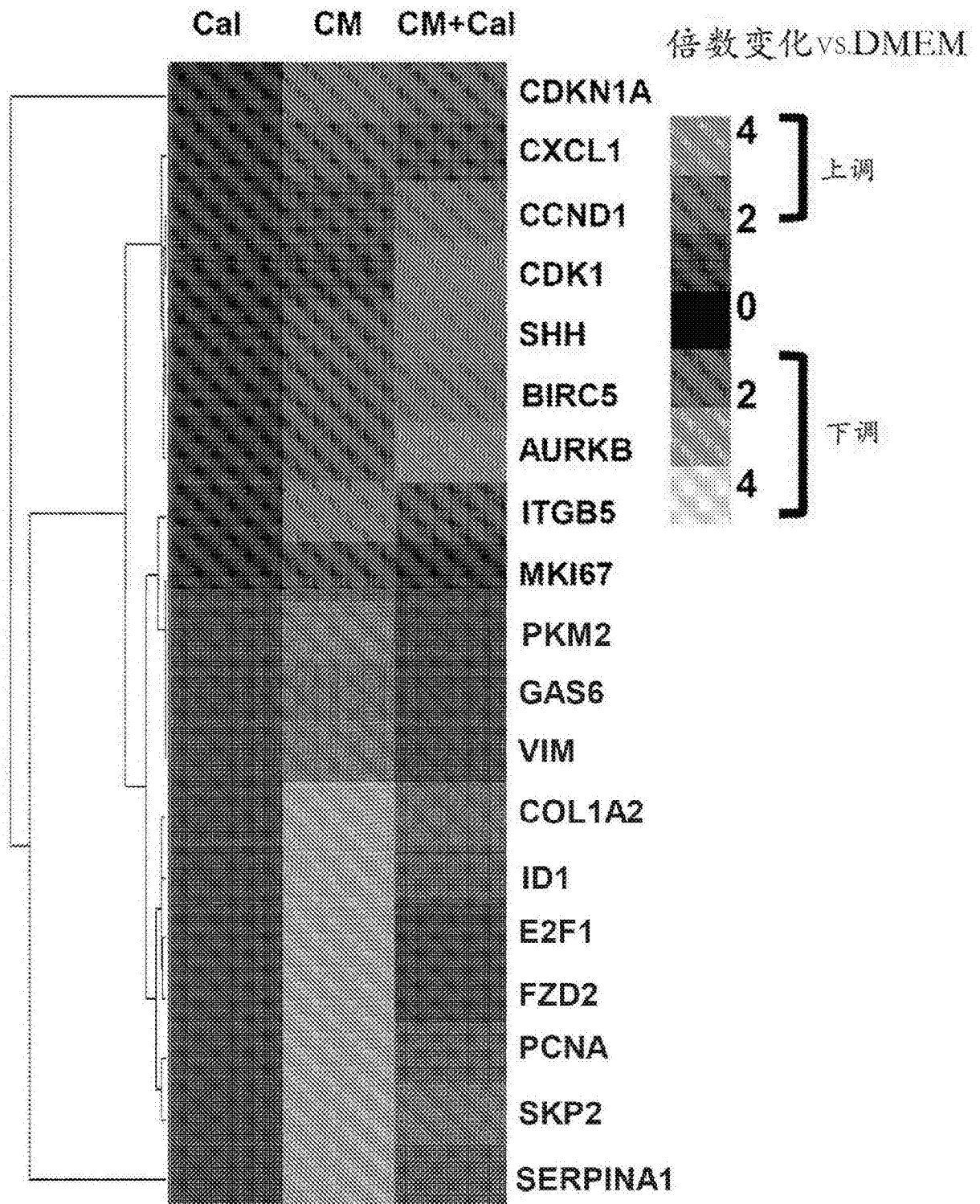


图8B

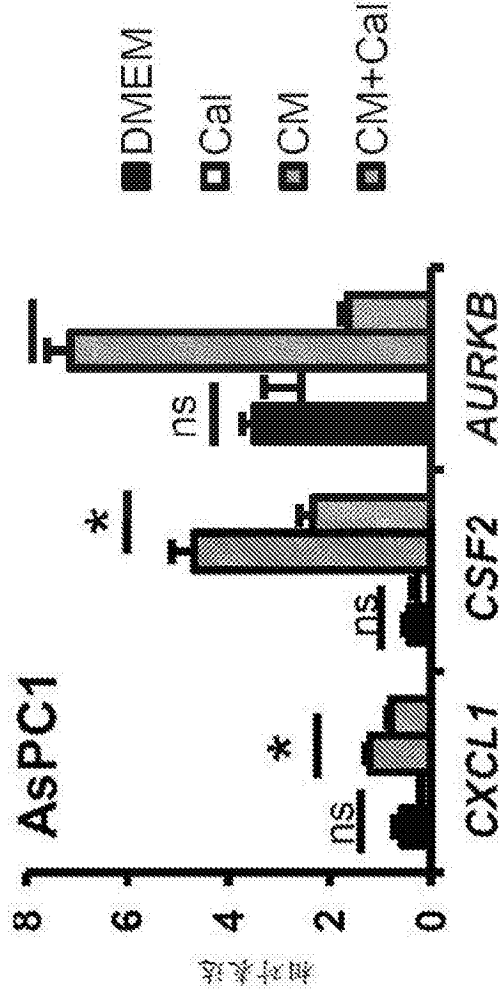


图8C

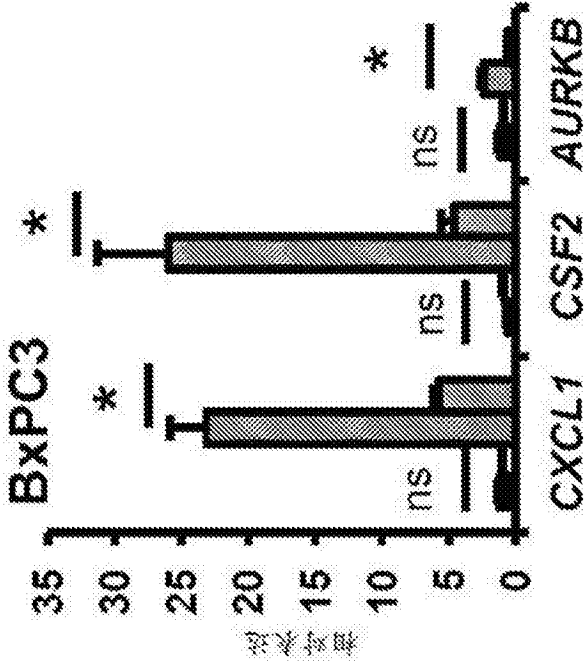


图8D

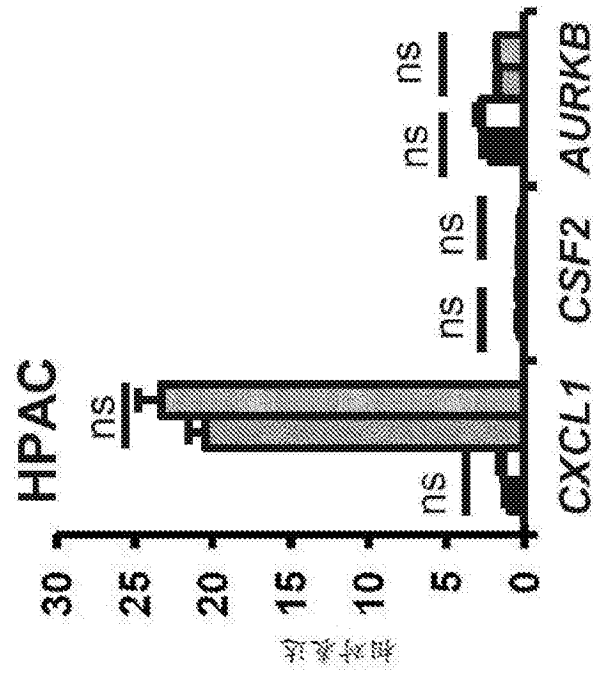


图8E

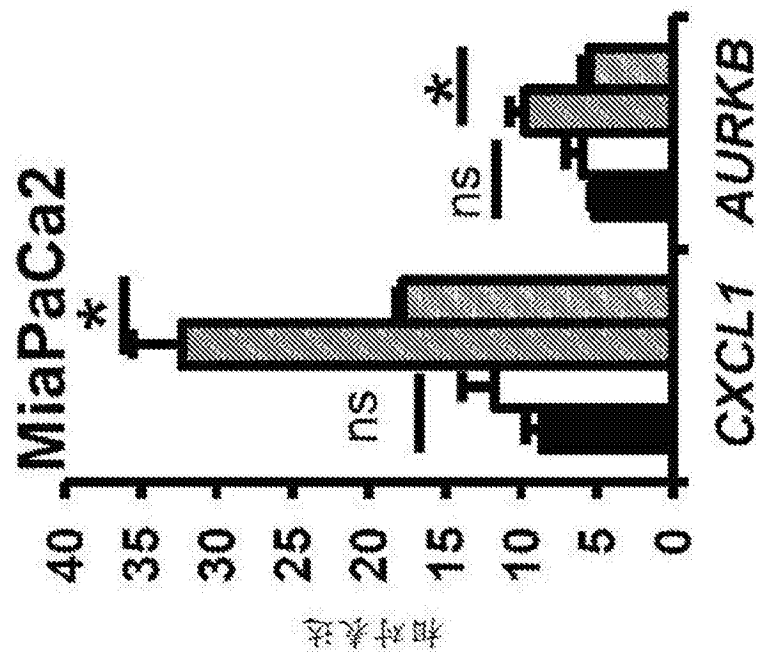


图8F

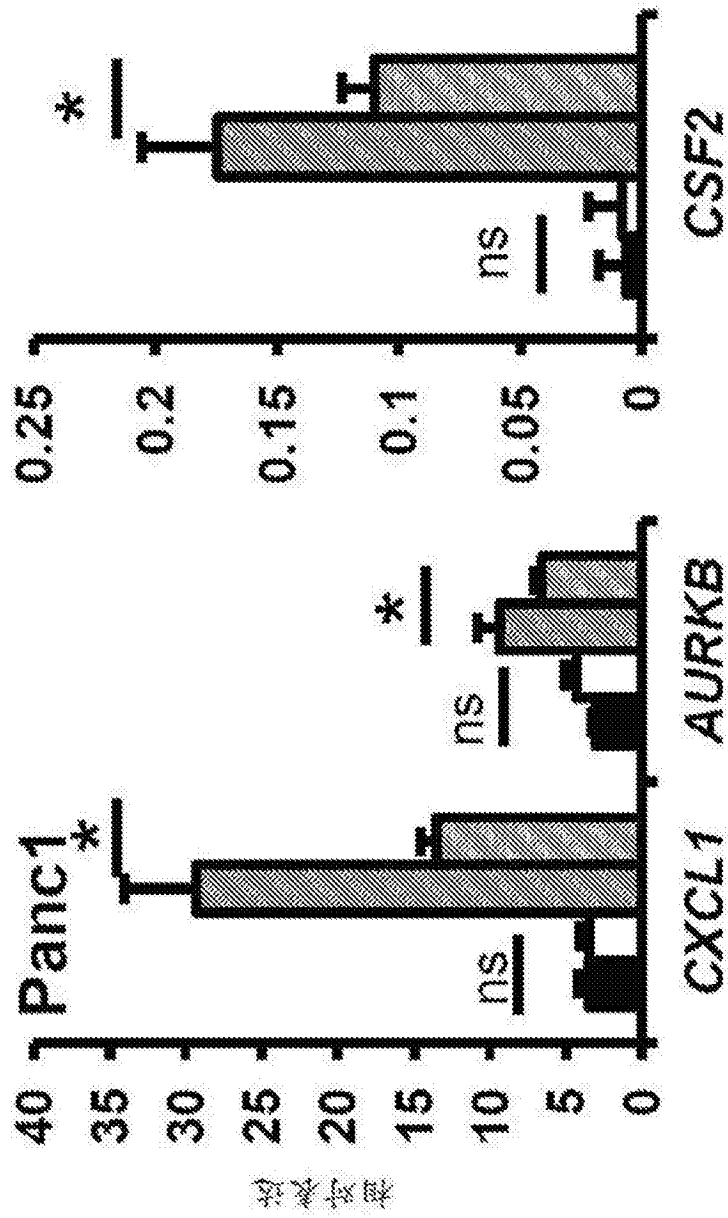


图8G

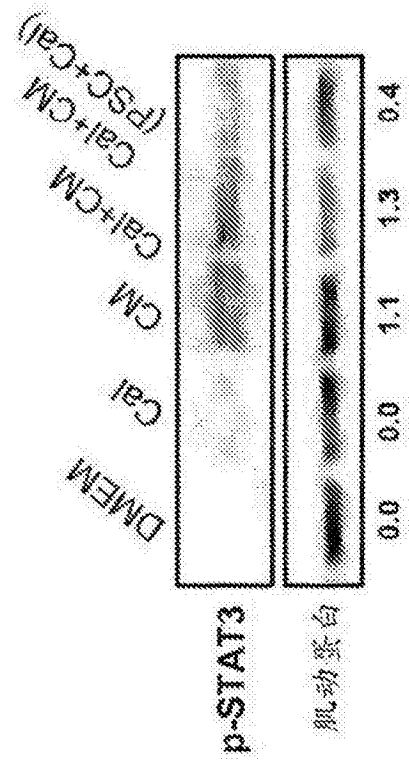


图8H

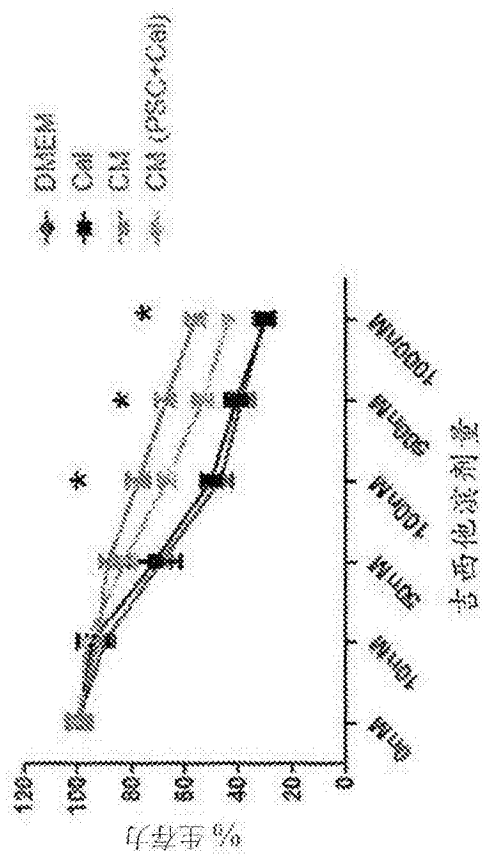


图8I

图9A

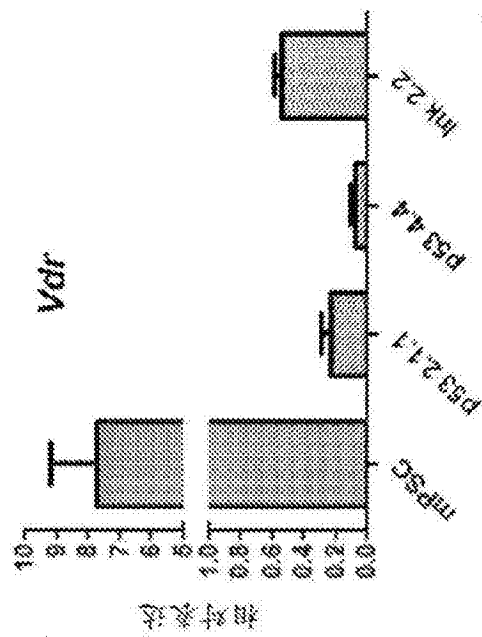


图9B

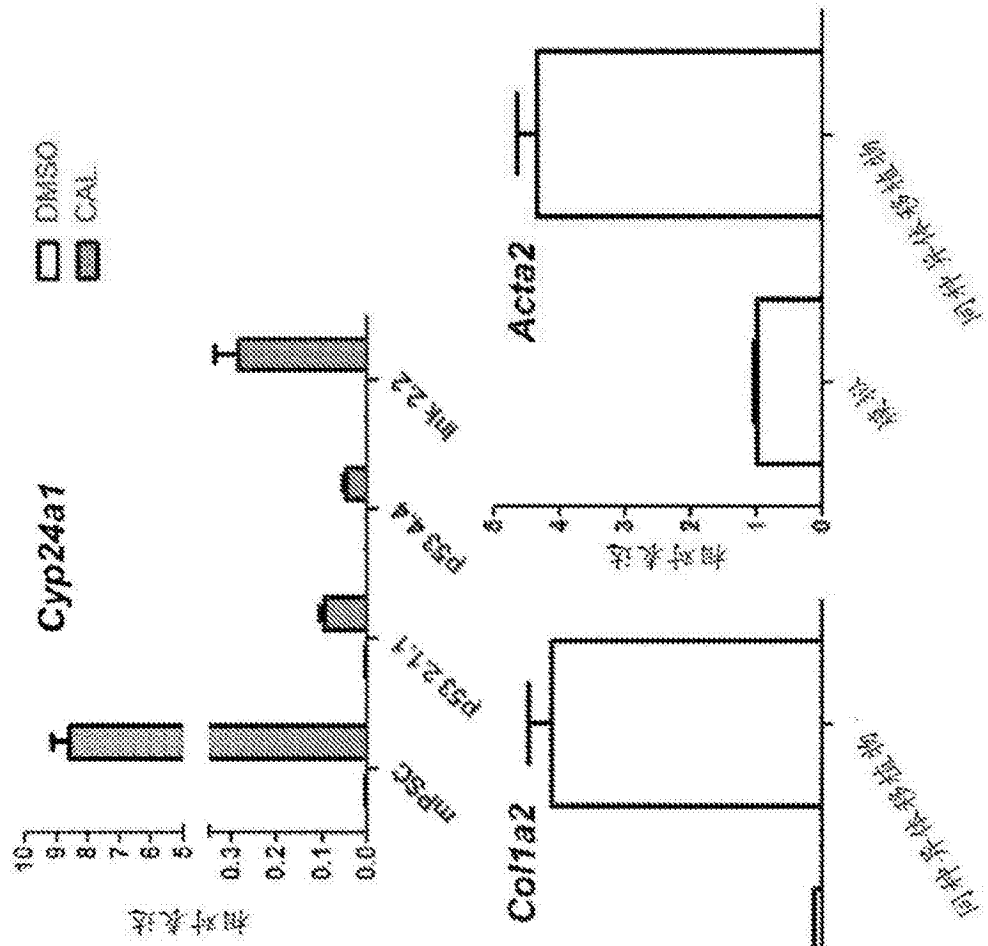
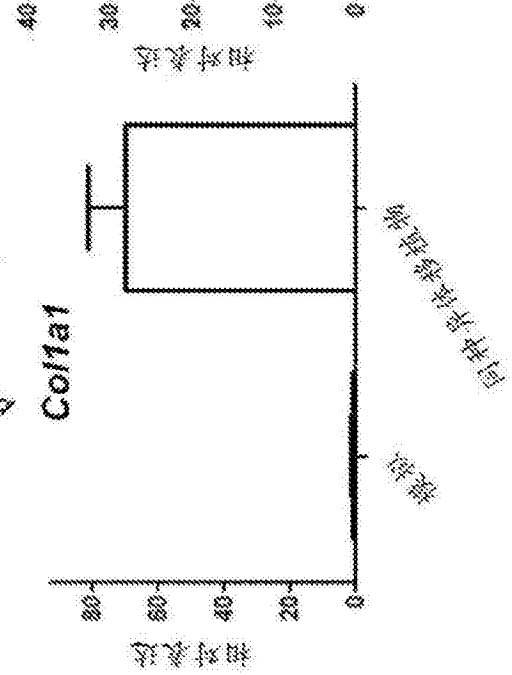


图9C



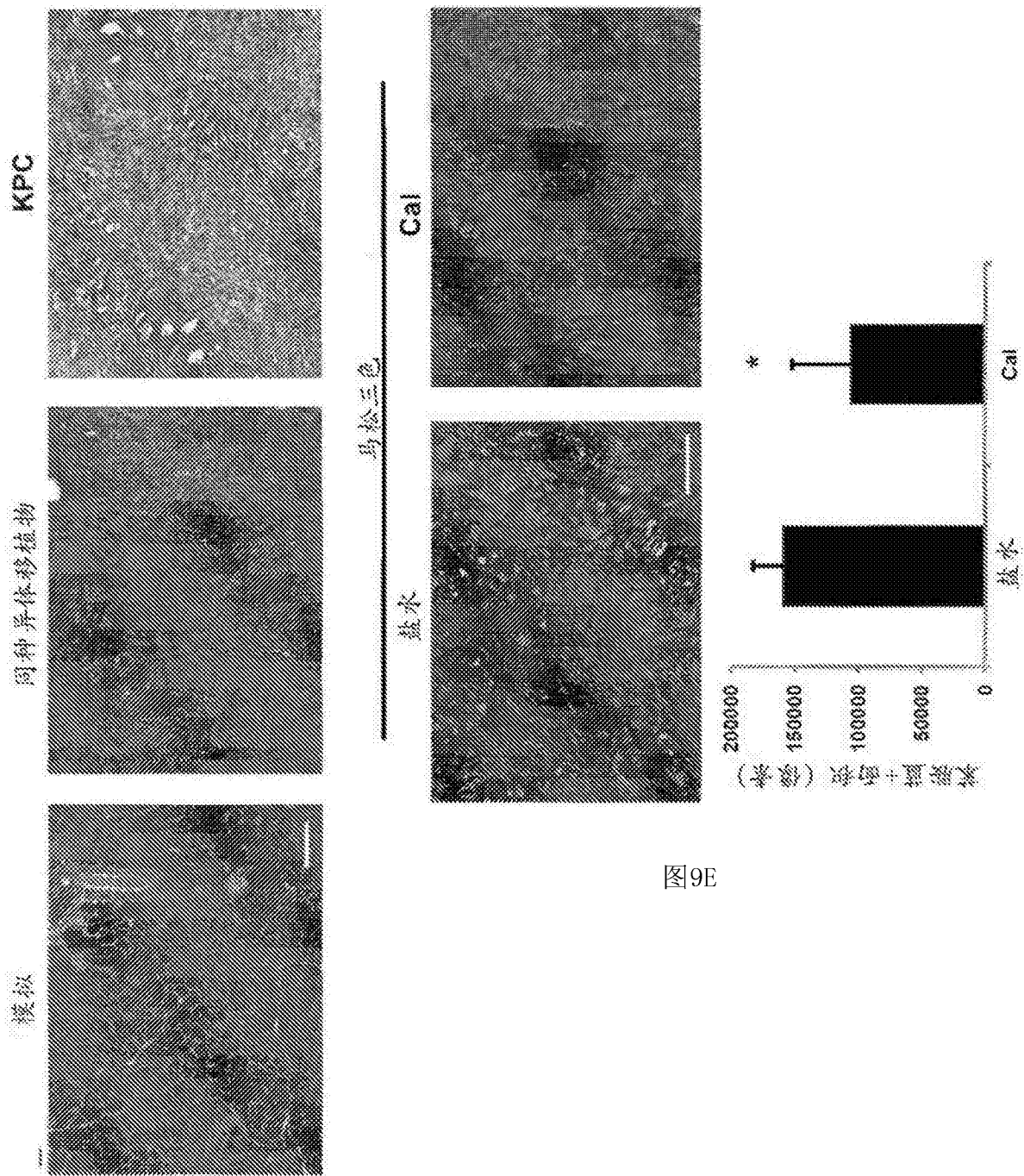


图9D

图9E

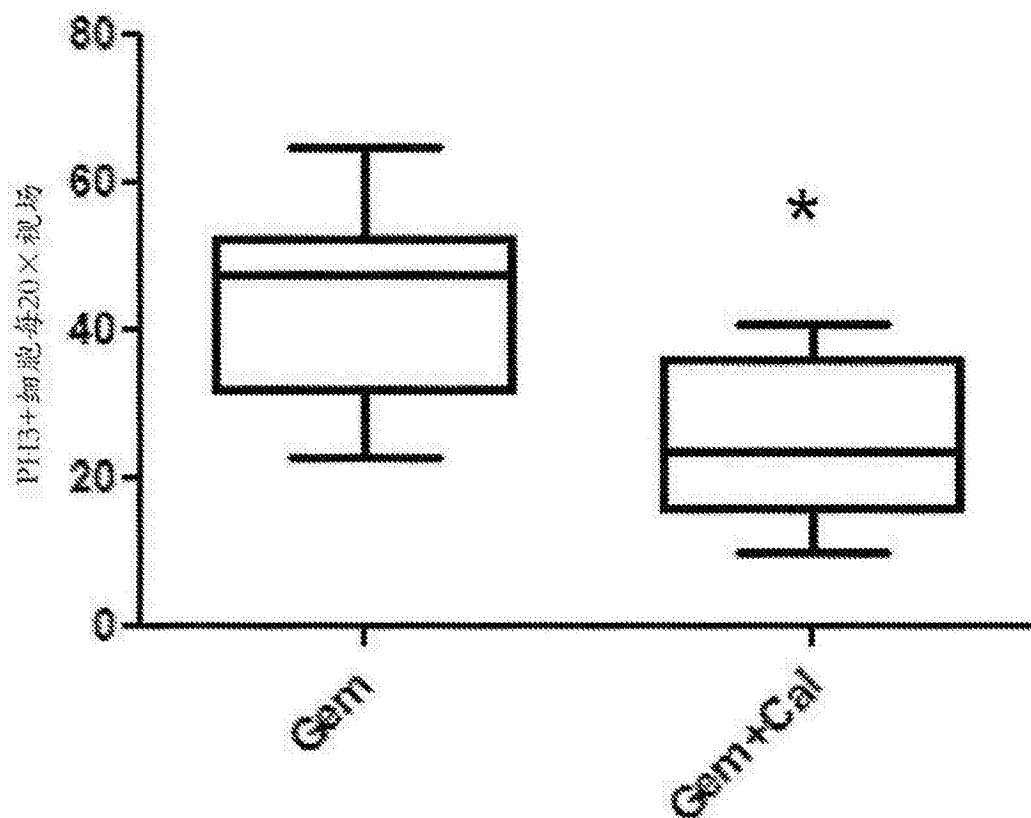


图9F

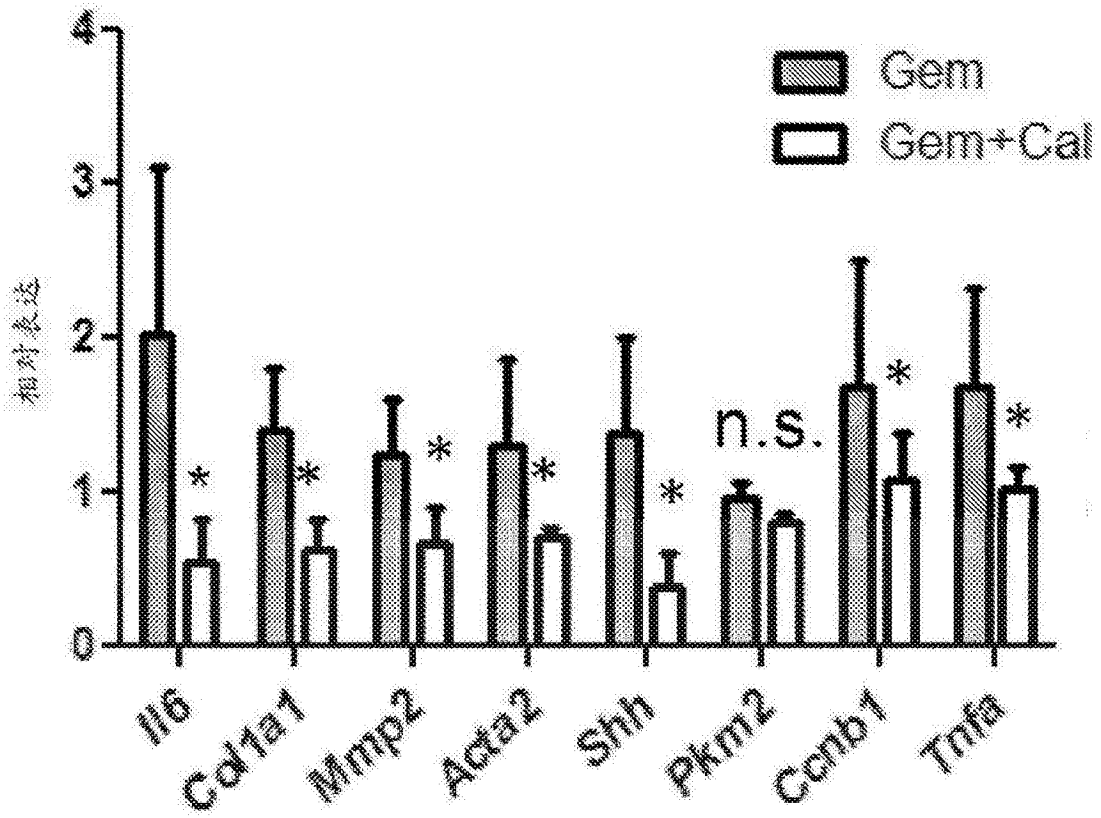


图9G

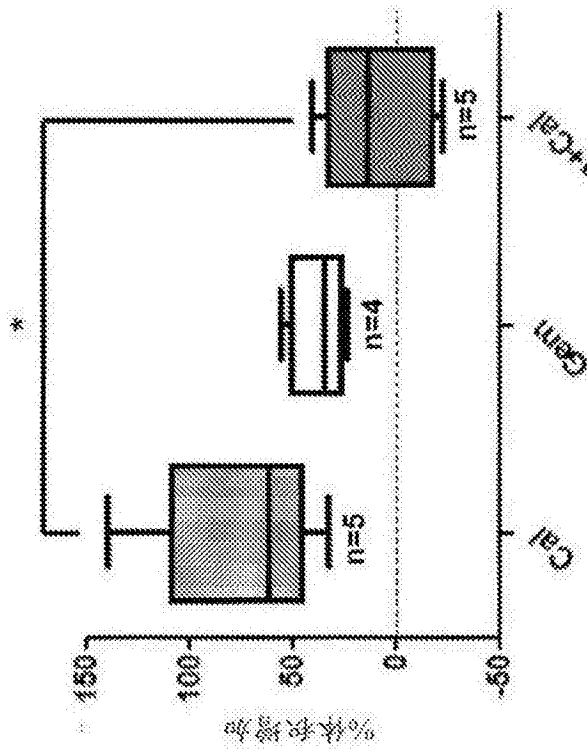


图10A

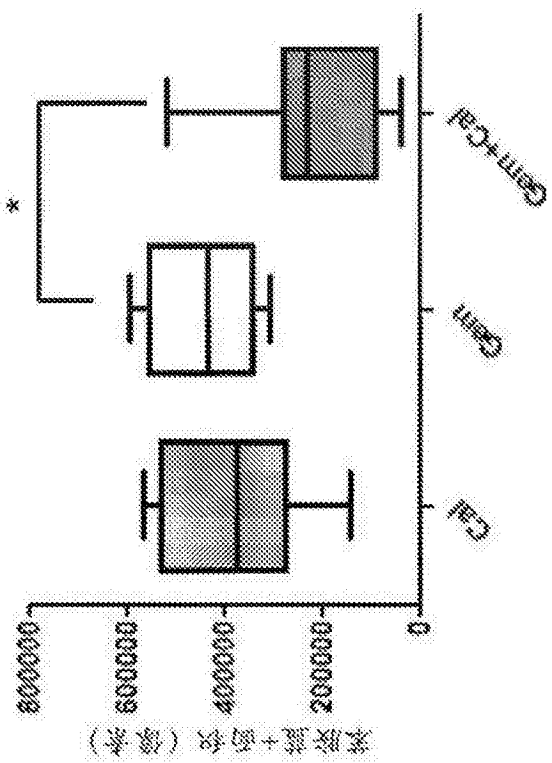


图10B

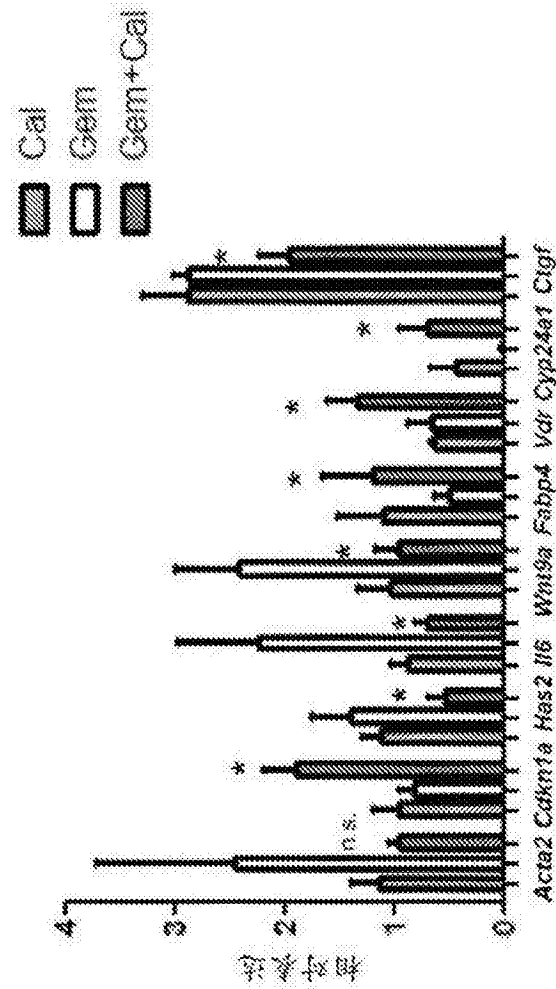


图10C

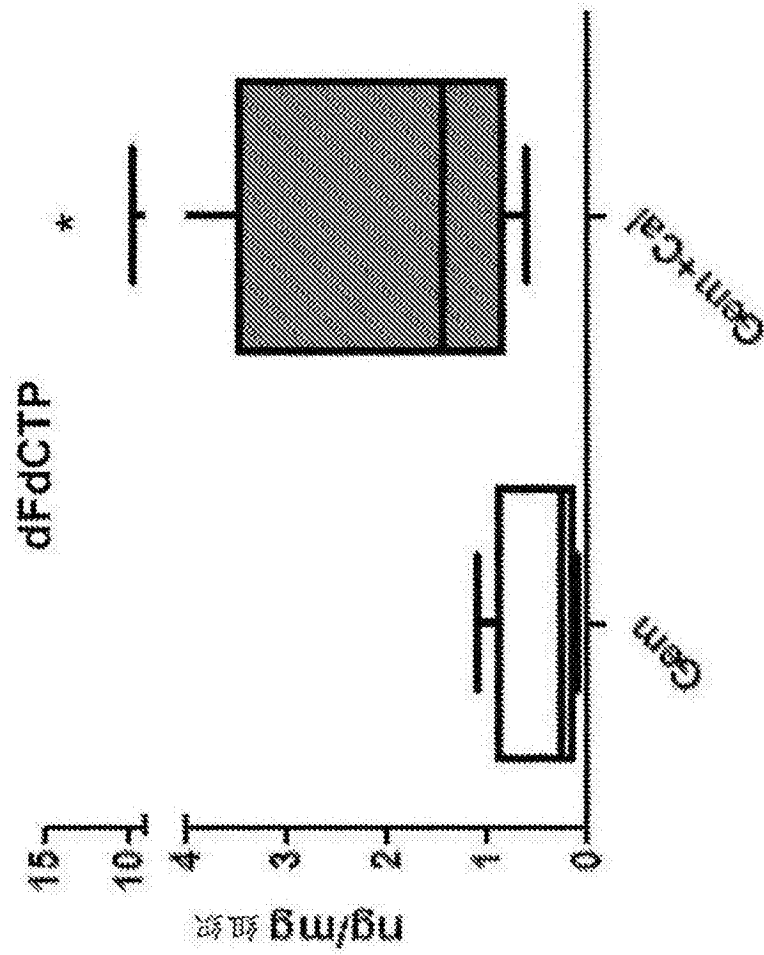


图10D

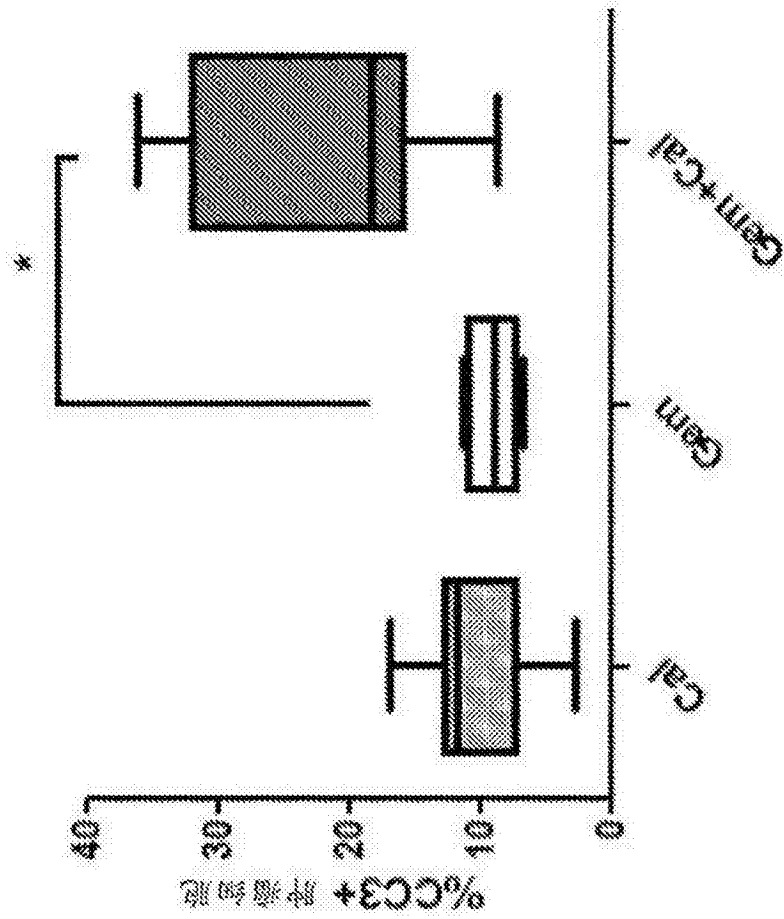


图10E

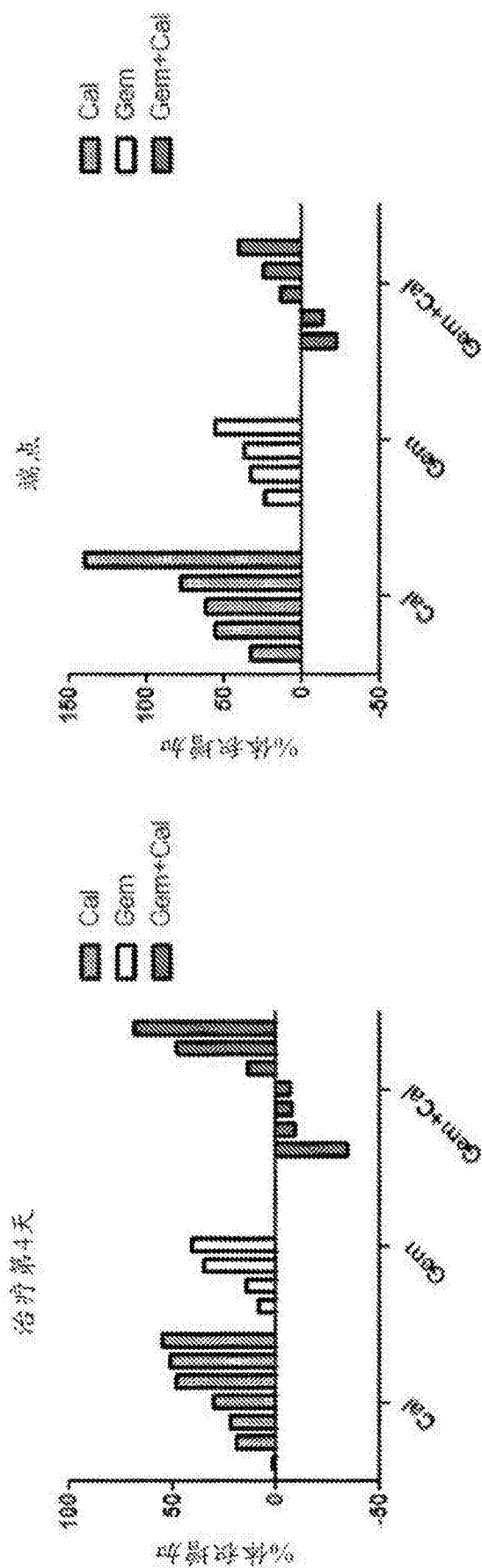


图11A

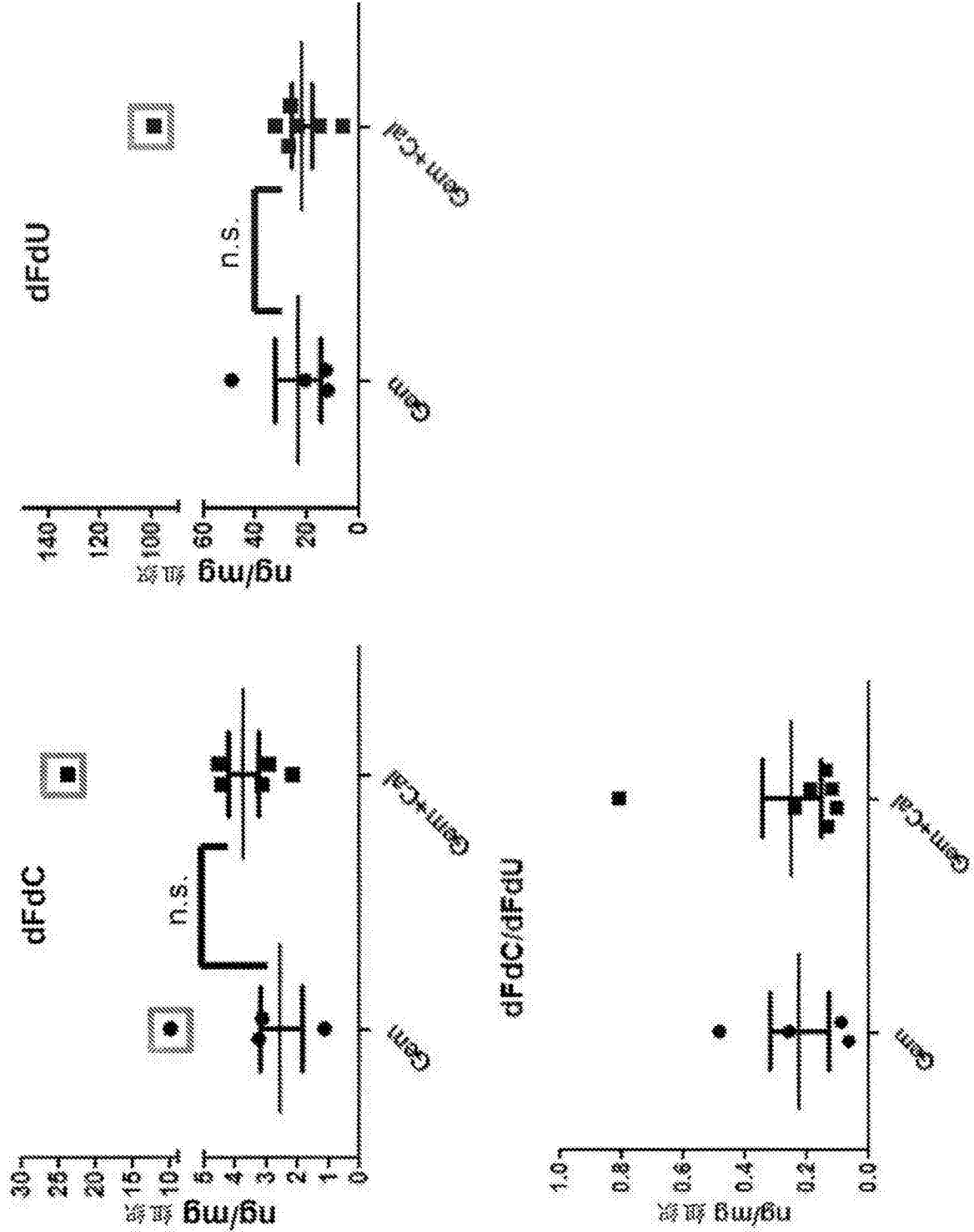


图11B

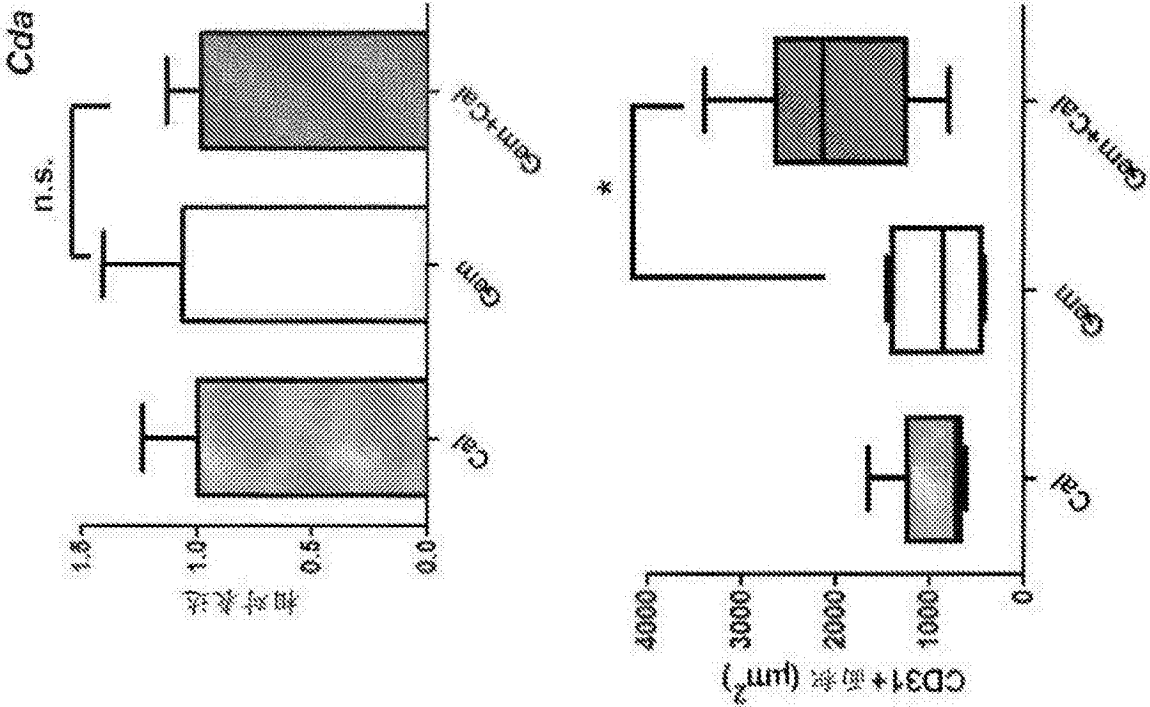


图12B

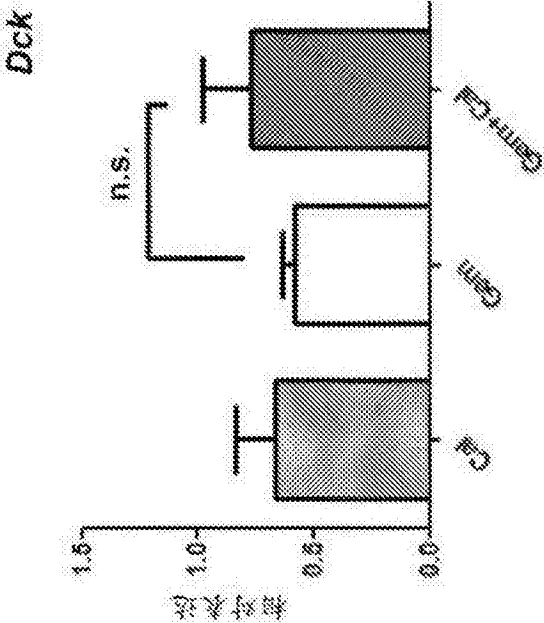


图12A

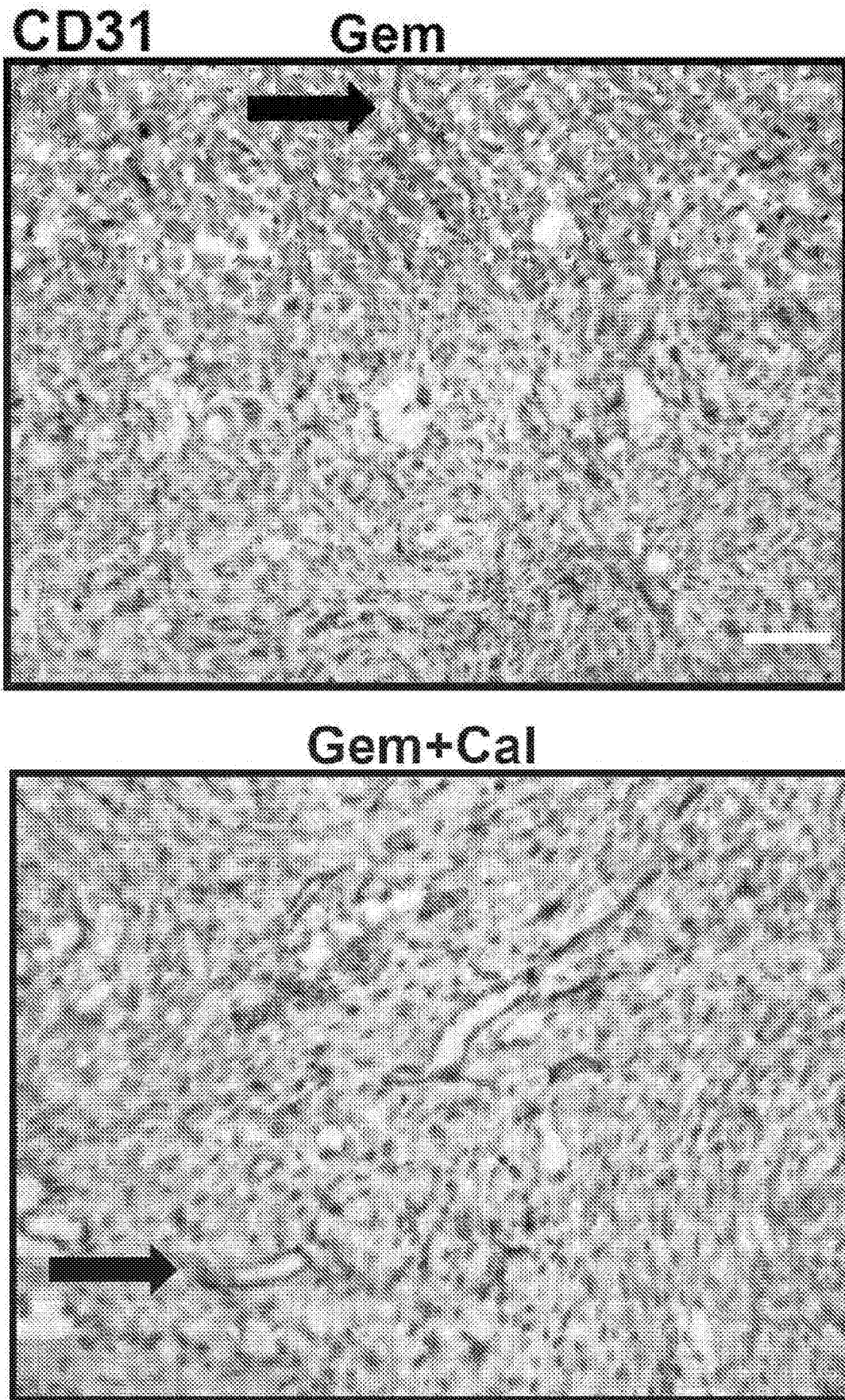


图12C

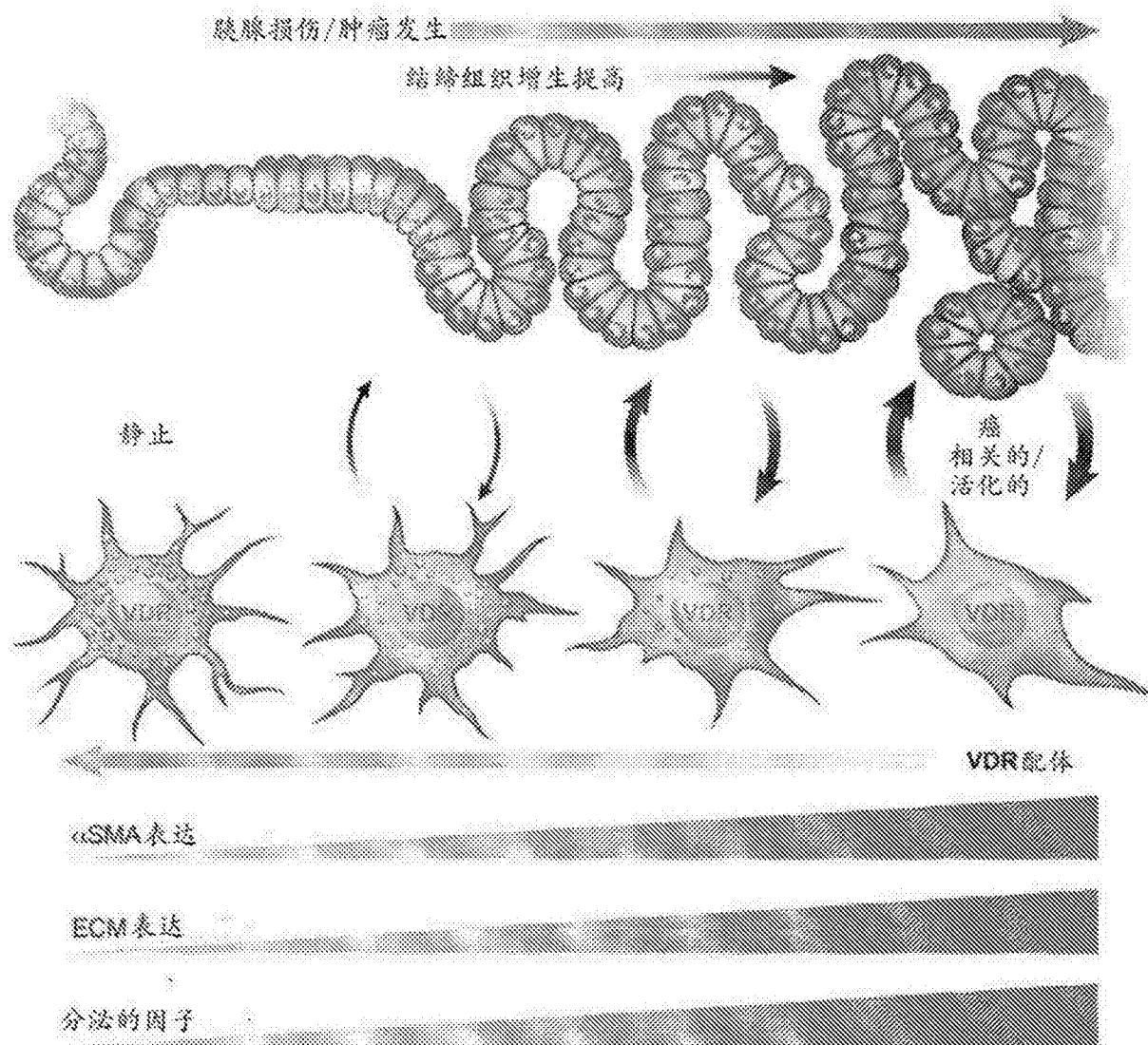


图13