(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111447940 A
(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 201880060319.X

(22)申请日 2018.07.17

(30)优先权数据
62/533,272 2017.07.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/042569 2018.07.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/018451 EN 2019.01.24

(71)申请人 科罗拉多大学评议会
地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 D·薛 Y·彭 M·张 L·J·郑 Q·梁 H·Z·李 J-S·于 J-T·陈

(74)专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所（普通合伙）33239
代理人 周积德

(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)

权利要求书15页 说明书64页 附图20页

(54)发明名称

预防或治疗由辐射或放射疗法引起的辐射诱发的旁观者效应的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供用于治疗由辐射暴露引起的辐射诱发的旁观者效应(RIBE)的新颖的组合物和方法。在一个优选的实施方案中，本发明包括新颖的治疗剂，包含但不限于槲皮素和槲皮素的类似物、以及干扰组织蛋白酶B活性的E64、CA074、CA074Me。

CN 111447940 A

1.一种用于治疗由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合。

2.根据权利要求1所述的方法，并且还包括以下步骤：在药学上可接受的载体中向所述受试者施用治疗有效量的槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

3.根据权利要求2所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

4.根据权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

5.根据权利要求2所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合与抗癌疗法联合施用。

6.根据权利要求5所述的方法，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

7.根据权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

8.根据权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合在受试者中减少和/或预防RIBE。

9.根据权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

10.根据权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

11.根据权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、或其组合增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

12.一种改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的抑制蛋白质组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性或表达的试剂。

13.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂选自：组织蛋白酶B(CTSB)合成抑制剂、核酸分子、抗体或其生物活性片段、和适配体。

14.根据权利要求13所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述核酸分子选自：反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶、和特异性抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的表达或活性的核酶。

15.根据权利要求13所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的抗体或其生物活性片段。

16.根据权利要求13所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述适配体包括特异性结合组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的适配体。

17.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂选自：槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me和/或其组合。

18.根据权利要求17所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

19.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，并且还包括其中提供抗癌疗法的步骤。

20.根据权利要求19所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

21.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

22.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

23.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

24.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法治疗和/或预防受试者中的RIBE。

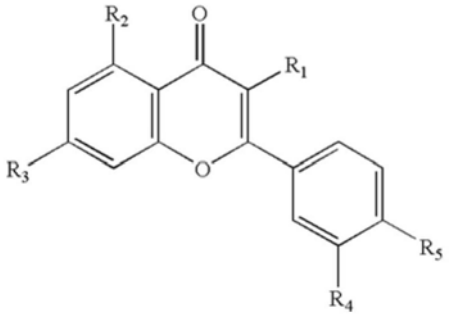
25.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述治疗有效量的试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法的有效性。

26.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述治疗有效量的试剂在受试者的癌症受试者中增加化学疗法的有效性。

27.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述治疗有效量的试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

28.根据权利要求12所述的改善由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述治疗有效量的试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

29.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，包含由以下通式(I)表示的槲皮素衍生物的活性成分和药学上可接受的载体：



R1是gentiotriose、吡喃葡萄糖、O-阿拉伯呋喃糖、O-二吡喃葡萄糖、O-吡喃半乳糖、O-半乳糖苷-没食子酸酯、O-龙胆二糖、O-吡喃葡萄糖、O-葡萄糖醛酸苷、O-新橙皮糖、O-吡喃鼠李糖、O-芸香糖、O-槐糖、O-吡喃木糖、OCH3、OH、鼠李龙胆二糖、鼠李葡萄糖或硫酸酯；

R2是OH或O-吡喃葡萄糖；

R3是OCH3、OH、O-glucopyrariose、O-吡喃葡萄糖醛酸或吡喃葡萄糖；

R4是OCH3或OH；和

R5是OCH3、OH、O-吡喃葡萄糖或O-葡萄糖。

30.权利要求29所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述槲皮素衍生物是下列由其中R_2、R_3、R_4和R_5是-OH的通式(I)表示的化合物：槲皮素、萹蓄苷、guiajaverin、金丝桃苷、异金丝桃苷、异槲皮苷、营实糖苷A、营实糖苷A乙酸酯、槲皮苷，芸香苷、槲皮素-3-O-(2″-O-β-D-吡喃葡萄糖基)-α-L鼠李吡喃糖苷、槲皮素-3-O-(6″-O-没食子酰基)-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-(6′″Op-香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-2)-α-L-鼠李吡喃糖苷)、槲皮素-3-O-D吡喃葡萄糖基-(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-4)-α-L-鼠李吡喃糖苷、槲皮素-3-O[2″-O-6′″-O-p-(7″″-O-β-D-吡喃葡萄糖基)香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L鼠李吡喃糖苷、槲皮素-3-O-[6′″-p-香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基-β-(1-4)鼠李吡喃糖苷]、槲皮素-3-O-[α-L-吡喃鼠李糖基(1-2)-α-L-吡喃鼠李糖基(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖苷]、槲皮素-3-O-[α-吡喃鼠李糖基(1-4)αL-吡喃鼠李糖基(1-6)β-D-半乳糖苷]、槲皮素-3-O-[α-吡喃鼠李糖基(1-2)]-[β-吡喃葡萄糖基-(1-6)]-β-D-半乳糖苷、槲皮素-3-O[α-吡喃鼠李糖基-(1-4)-α-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-半乳糖苷]、槲皮素-30-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-2)-β-D-半乳糖苷、槲皮素-3-O-β-D二吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-β-D-半乳糖苷-2″-没食子酸酯、槲皮素-3-O-β-D吡喃葡萄糖苷-(1-6)-β-D-半乳糖苷、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(13)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-D-半乳糖苷、槲皮素-3-O-β-D葡萄糖醛酸苷、槲皮素-3-O-β-D-木吡喃糖苷、槲皮素-3-Odiglucospyranoside、槲皮素-3-O-栀子苷、槲皮素-3-O吡喃葡萄糖基半乳糖苷、槲皮素-3-O-新橘皮糖苷、槲皮素-3gentiotrioside、槲皮素-3-甲基醚、槲皮素-3-鼠李龙胆二糖苷、槲皮素-3鼠李葡萄糖苷或槲皮素-3。

31.根据权利要求29所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述槲皮素衍生物是下列由其中R_1是-OH并且R_2、R_3、R_4和R_5中的三个官能团是-OH的通式(I)表示的化合物：异鼠李素、槲皮黄苷、鼠李素、槲皮素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-7-O-β-D glucuronopyranoside或绣线菊糖苷。

32.根据权利要求29所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述槲皮素衍生物是下列由其中R_1、R_2、R_3、R_4和R_5中的三个官能团是-OH的通式(I)表示的化合物：甲基鼠李素、槲皮素-3′,4′-二-甲基醚、槲皮素-3,3′-二甲基醚、槲皮素-3,7-二甲基醚、槲皮素-3-O-[2″-O-(6′″-O-p-香豆酰基)-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-吡喃鼠李糖基-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-[2″-O-6′″-O-p-(7″″-O-β-D-吡喃葡萄糖基)香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-鼠李吡喃糖苷-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-芸香苷-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-α-L-阿拉伯吡喃糖基-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷-3-O-槐糖苷、槲皮素-3-O-半乳吡喃糖基-7-O-二吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖基-7-二吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3,7-二吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-龙胆二糖基-7-吡喃葡萄糖苷或槲皮素-3,4′-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷。

33.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

34.根据权利要求29所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

35.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

36.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

37.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

38.根据权利要求37所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

39.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

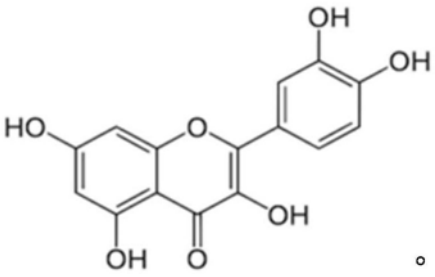
40.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

41.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

42.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

43.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

44.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，包含由以下通式(II)表示的槲皮素的活性成分和药学上可接受的载体：



。

45.根据权利要求44所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

46.根据权利要求44所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中槲皮素包括槲皮素的类似物。

47.根据权利要求44所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

48.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其

中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

49.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

50.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

51.根据权利要求50所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

52.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡、细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

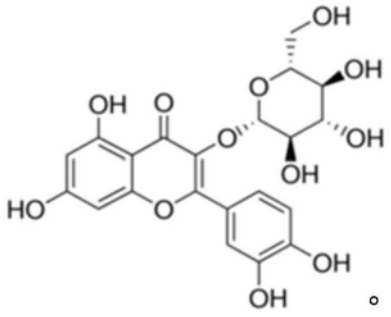
53.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

54.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

55.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

56.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

57.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,包含由以下通式(III)表示的异槲皮素的活性成分和药学上可接受的载体:



。

58.根据权利要求57所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

59.根据权利要求57所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述异槲皮素包括异槲皮素的类似物。

60.根据权利要求57所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

61.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

62.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其

中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

63.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

64.根据权利要求63所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

65.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

66.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

67.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

68.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

69.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

70.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，包含槲皮素的类似物的活性成分和药学上可接受的载体。

71.根据权利要求70所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

72.根据权利要求70所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述槲皮素的类似物包括槲皮素糖苷。

73.根据权利要求70所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

74.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

75.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

76.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

77.根据权利要求76所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

78.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

79.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

80.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

81.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

82.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

83.一种用于治疗由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的金丝桃苷、芸香苷、鼠李素、异鼠李素、多酚D、乌拉尔醇、淫羊藿素、甲基鼠李素、和槲皮素3,7,3',4'四硫酸酯、或其类似物。

84.根据前述权利要求中任一项所述的方法或治疗剂，其中所述槲皮素的类似物或衍生物包括选自下列的槲皮素的类似物或衍生物：异槲皮素、金丝桃苷、芸香苷、鼠李素、异鼠李素、多酚D、乌拉尔醇、淫羊藿素、甲基鼠李素和槲皮素3,7,3',4'四硫酸酯。

85.一种用于治疗由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的E64或其类似物。

86.根据权利要求85所述的方法，并且还包括以下步骤：在药学上可接受的载体中向所述受试者施用治疗有效量的E64或其类似物，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

87.根据权利要求86所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

88.根据权利要求87所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

89.根据权利要求86所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物与抗癌疗法联合施用。

90.根据权利要求89所述的方法，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

91.根据权利要求87所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

92.根据权利要求87所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物在受试者中减少和/或预防RIBE。

93.根据权利要求87所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

94.根据权利要求87所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

95.根据权利要求87所述的方法，其中所述治疗有效量的所述E64或其类似物增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

96.一种用于治疗由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包

括向所述受试者施用治疗有效量的CA074或其类似物。

97.根据权利要求96所述的方法，并且还包括以下步骤：在药学上可接受的载体中向所述受试者施用治疗有效量的CA074或其类似物，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

98.根据权利要求97所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

99.根据权利要求98所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

100.根据权利要求97所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物与抗癌疗法联合施用。

101.根据权利要求100所述的方法，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

102.根据权利要求98所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

103.根据权利要求98所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物在受试者中减少和/或预防RIBE。

104.根据权利要求98所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

105.根据权利要求98所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

106.根据权利要求98所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074或其类似物增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

107.一种用于治疗由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的CA074Me或其类似物。

108.根据权利要求107所述的方法，并且还包括以下步骤：在药学上可接受的载体中向所述受试者施用治疗有效量的CA074Me或其类似物，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

109.根据权利要求108所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

110.根据权利要求108所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

111.根据权利要求108所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物与抗癌疗法联合施用。

112.根据权利要求111所述的方法，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

113.根据权利要求109所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

114.根据权利要求109所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物在受试者中减少和/或预防RIBE。

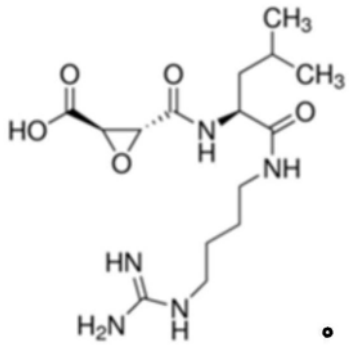
115.根据权利要求109所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

116.根据权利要求109所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

117.根据权利要求109所述的方法，其中所述治疗有效量的所述CA074Me或其类似物增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

118.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，包含由以下通式(IV)表示的E64的活性成分和药学上可接受的载体：

(IV)



119.根据权利要求118所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

120.根据权利要求118所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中E64包括E64的类似物。

121.根据权利要求118所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

122.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

123.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

124.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

125.根据权利要求124所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

126.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

127.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

128.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

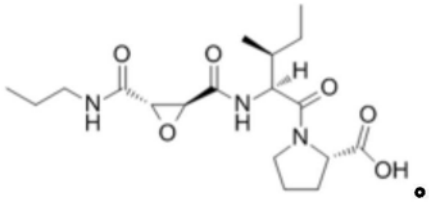
129.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗

力。

130.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

131.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,包含由以下通式(V)表示的CA074的活性成分和药学上可接受的载体:

(V)



132.根据权利要求131所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

133.根据权利要求131所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中CA074包括CA074的类似物。

134.根据权利要求131所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

135.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

136.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

137.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

138.根据权利要求137所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

139.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

140.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

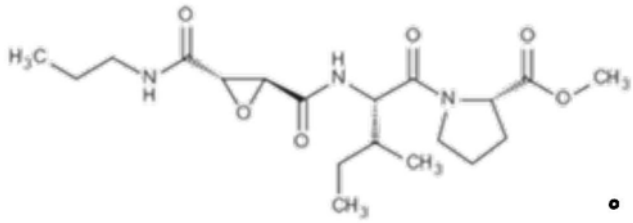
141.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

142.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

143.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

144.一种用于治疗受试者中的辐射诱发的旁观者效应的治疗剂,包含由以下通式(VI)

表示的CA074Me的活性成分和药学上可接受的载体：

(VI) 

145.根据权利要求144所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述辐射诱发的旁观者效应的治疗由组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的抑制来触发。

146.根据权利要求144所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中CA074Me包括CA074Me的类似物。

147.根据权利要求144所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

148.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述试剂抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

149.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

150.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂与抗癌疗法联合施用。

151.根据权利要求150所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

152.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

153.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中减少和/或预防RIBE。

154.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

155.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

156.根据前述权利要求中任一项所述的用于治疗辐射诱发的旁观者效应的治疗剂，其中所述治疗有效量的所述试剂增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

157.一种用于治疗由暴露于辐射引起的受试者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向所述受试者施用下列治疗有效量的一种或多种：槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合。

158.根据权利要求157所述的方法，并且还包括以下步骤：在药学上可接受的载体中向所述受试者施用治疗有效量的槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、

CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合，其中所述药学上可接受的载体是水性和/或非水性药学上可接受的载体。

159.根据权利要求158所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性。

160.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合在放射疗法施用之前、和放射疗法施用一起或在放射疗法施用之后来施用。

161.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合与抗癌疗法联合施用。

162.根据权利要求161所述的方法，其中所述抗癌疗法选自手术和化学疗法。

163.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合在所述受试者中改变细胞死亡或细胞增殖、减少DNA损伤或增加DNA修复。

164.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合在受试者中减少和/或预防RIBE。

165.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合在受试者的癌症受试者中增加放射疗法和/或化学疗法的有效性。

166.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

167.根据权利要求159所述的方法，其中所述治疗有效量的所述槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合增加所述受试者对放射疗法的耐受性。

168.一种用于治疗辐射暴露的试剂盒，包含有效量的抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的治疗剂和可接受的药学载体。

169.根据权利要求168所述的试剂盒，其中抑制组织蛋白酶B(CTSB)或其同源物的活性的治疗剂包括选自下列的治疗剂：槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物或衍生物、E64、CA074、CA074Me、和/或其任何类似物、和/或其组合。

170.根据权利要求169所述的试剂盒，其中所述试剂盒治疗受试者中的RIBE。

171.根据权利要求169所述的试剂盒，其中所述试剂盒在在受试者中增加放射疗法的有效性。

172.根据权利要求169所述的试剂盒，其中所述试剂盒在在受试者中增加化学疗法的有效性。

173.根据权利要求169所述的试剂盒，其中所述试剂盒在受试者中降低癌细胞对放射疗法和/或化学疗法的抵抗力。

174.根据前述权利要求中任一项所述的方法或治疗剂,其中所述方法或治疗剂包括用于治疗RIBE的试剂盒。

175.根据前述权利要求中任一项所述的方法或治疗剂,其中所述受试者是人。

176.根据前述权利要求中任一项所述的方法或治疗剂,其中所述方法或治疗剂治疗以下一种或多种:膀胱癌、肺癌、头颈部癌、神经胶细胞瘤、神经胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、髓母细胞瘤、肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、脊索瘤、喉癌、卡波西氏肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、软巢癌、乳癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、睾丸肿瘤、维尔姆斯瘤、尤因瘤、膀胱癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉瘤、乳头状肉瘤、乳头状腺肉瘤、囊腺肉瘤、支气管肺癌、甲状腺癌、肥大细胞瘤、间皮瘤、滑膜瘤、黑色素瘤、子宫平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、少树突胶质瘤、听神经瘤、成血管细胞瘤、血管瘤、松果体瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、上皮癌、胚胎性癌、鳞状細胞癌、基底细胞癌、纤维肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤和白血病。

177.根据前述权利要求中任一项所述的方法或治疗剂,其中所述治疗有效量包括选自以下的治疗有效量:50mg/kg体重、小于50mg/kg体重和大于50mg/kg体重。

178.一种确定癌症患者是否被预测对施用放射疗法响应的方法,该方法包括:

提供试剂盒,用于检测来自患者的细胞样品中的选自下列的标记基因的基因表达水平:

i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

ii.与i的所述标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸;或

iii.由i的所述标记基因编码的多肽;或

iv.i的多肽的片段,

其中所述标记的表达水平指示所述患者是否会响应放射疗法的施用。

179.根据权利要求178所述的方法,其中通过在放射疗法之前、放射疗法期间和/或放射疗法之后检测多肽的存在来确定一种或多种标记的存在。

180.根据权利要求178所述的方法,其中所述患者是人。

181.根据权利要求178所述的方法,其中所述细胞样品选自:非癌细胞,癌细胞,癌前细胞、组织和器官。

182.一种确定癌症患者是否被预测对施用放射疗法响应的方法,该方法包括:

提供试剂盒,用于检测来自患者的细胞样品中的选自下列的一种或多种标记基因的基因表达水平:

i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的

标记基因;或

vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸;或

ix.由i-vii的标记基因编码的多肽;或

x.ix的多肽的片段,

其中所述标记的表达水平指示所述患者是否易发展RIBE。

183.根据权利要求182所述的方法,其中通过在放射疗法之前、放射疗法期间和/或放射疗法之后检测多肽的存在来确定一种或多种标记的存在。

184.根据权利要求183所述的方法,其中所述患者是人。

185.根据权利要求183所述的方法,其中所述细胞样品选自:非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

186.一种评估对癌症患者施用放射治疗的功效的方法,该方法包括比较:

提供试剂盒,用于确定在时间t_0从受试者获得的第一样品中测量的标记的表达水平,其中所述标记选自:

i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸;或

ix.由i-vii的标记基因编码的多肽;或

x.ix的多肽的片段,

在时间t_1从受试者获得的第二样品中的标记的水平;和

其中相对于所述第一样品,所述第二样品中标记水平的变化指示所述放射治疗对于治疗所述受试者中的癌症是有效的。

187.根据权利要求186所述的方法,其中所述时间t_0是在已经对受试者施用治疗之前,并且所述时间t_1是在已经对受试者施用治疗之后。

188.根据权利要求186所述的方法,其中所述患者是人。

189.根据权利要求186所述的方法,其中所述细胞样品选自:非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

190.一种评估对癌症患者施用放射治疗的功效的方法,该方法包括比较:

提供试剂盒,用于确定在时间t_0从受试者获得的第一样品中测量的标记的表达水平,其中所述标记选自:

i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;或

ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因;或

iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因;或

iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因;或

v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因;或

vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因;或

vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因;或

viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸;或

ix.由i-vii的标记基因编码的多肽;或

x.ix的多肽的片段,

在时间t_1从受试者获得的第二样品中的标记的水平;和

其中相对于所述第一样品,所述第二样品中标记水平的变化指示所述患者是否易发展RIBE。

191.根据权利要求190所述的方法,其中所述时间t_0是在已经对受试者施用治疗之前,并且所述时间t_1是在已经对受试者施用治疗之后。

192.根据权利要求291所述的方法,并且还包括比较各自包含较高剂量辐射的连续放射疗法治疗。

193.根据权利要求192、186所述的方法,并且还包括向患者施用最佳辐射水平,所述最佳水平是将是治疗有效剂量并且在所述患者中不引起或限制RIBE效应的水平。

194.根据权利要求193所述的方法,其中所述患者是人。

195.根据权利要求190所述的方法,其中所述细胞样品选自:非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

预防或治疗由辐射或放射疗法引起的辐射诱发的旁观者效应的组合物和方法

[0001] 本国际PCT申请要求2017年7月17日提交的美国临时申请No.62/533,272的权益和优先权。上面引用的申请的整个说明书和附图在此全文引入作为参考。

[0002] 政府利益

[0003] 本发明是在美国国立卫生研究院(NIH)授予的授权号R35 GM118188的政府支持下完成的。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0004] 本发明技术通常涉及用于预防和减轻由暴露于辐射和放射疗法引起的副作用的组合物和方法。具体地,本发明包括人和动物中涉及辐射诱导的旁观者效应(RIBE)的新颖分子组分和途径的鉴定、分离和表征。本发明技术还包括用于开发和应用新型治疗组合物和治疗的方法和系统、以及用于治疗由辐射或放射疗法引起的RIBE的诊断方法。

背景技术

[0005] 辐射诱发的旁观者效应(RIBE)指一个独特的过程,其中受辐照的细胞或组织释放的因子对动物的其他未暴露于辐射的部分产生影响,从而除其他效果外导致基因组不稳定、应激反应以及凋亡或细胞增殖改变。RIBE还是决定放射疗法在癌症治疗中的功效和成功的主要因素,不仅因为它会影响并引起未照射的细胞和组织的损伤,从而导致各种有害的副作用(例如脱发、疲劳、皮肤问题)和低血细胞计数,还因为它可以通过旁分泌信号传导影响受照射的细胞,并导致癌细胞对放射疗法产生抵抗力。迄今为止,还没有有效的方法来减少或预防由辐射和放射疗法引起的副作用。

[0006] 尽管在放射防护、放射安全和放射疗法方面有重要意义,但是RIBE因子的分子身份及其作用机理仍然难以捉摸。识别RIBE因子并了解其作用是癌症放射疗法和放射防护的基本问题。因此,在本领域中仍然需要鉴定和表征RIBE中涉及的分子组分和信号传导途径,以及用于预防和/或减轻由暴露于辐射和放射疗法引起的RIBE的新的组合物和治疗方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明鉴定并表征CPR-4(组织蛋白酶B同源物),其为主要的RIBE因子,其诱导多种典型的RIBE作用,包括细胞凋亡抑制和增加的细胞增殖、致死性、应激反应和基因组DNA损伤。在一个实施方案中,本发明人证明辐射通过p53/CEP-1-依赖性机制增加cpr-4转录以及CPR-4蛋白的产生和分泌。然后,分泌的CPR-4通过调节DAF-2胰岛素/IGF受体(对于从衰老、应激反应、代谢到细胞凋亡的多个保守信号通路至关重要)的活性直接或间接诱导多种RIBE反应。

[0009] 在另外的实施方案中,本发明人证明人组织蛋白酶B(CTSB)的表达响应于辐射而被上调,并且它还参与人细胞中UV诱导的旁观者效应。在预选的实施方案中,本发明技术涉及预防和/或减轻由辐射暴露或放射疗法引起的人的RIBE的组合物、系统、方法和治疗方法以及诊断方法。另外的实施方案也通常可以针对其他动物系统中的组织蛋白酶B及其所有

同源物和变体。

[0010] 在另外的实施方案中，本发明的发明人证明人胰岛素/IGF受体(INSR)(秀丽隐杆线虫DAF-2蛋白的同源物)的表达涉及组织蛋白酶B(CTSB)诱导的人和其他细胞中的RIBE，并且秀丽隐杆线虫和人之间的RIBE信号传导途径是保守的。在预选的实施方案中，本发明技术包括通过改变INSR的表达或活性来预防和/或减轻由辐射暴露或放射疗法引起的人的RIBE的组合物、系统、方法和治疗方法以及诊断方法。额外的实施方案也通常可以涉及改变INSR在其他动物系统及其所有同源物和变体中的表达和/或活性。

[0011] 如下所述，本发明的特征在于用于改变一种或多种CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶肽或其片段，用于治疗或预防与放射线照射相关的疾病和病症，特别是RIBE。

[0012] 在一个方面，本发明提供一种改善包括RIBE在内的辐射暴露对细胞的影响的方法，该方法包括与已经过辐照的细胞接触，该药物可以选择性地改变一种或多种CPR-4，组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)的表达或活性、PDK-1和/或PDK1激酶相对于未经处理的对照细胞而言，从而改善辐射暴露或RIBE对细胞的影响。在另一方面，本发明提供一种改善包括RIBE在内的放射线照射对细胞的影响的方法，该方法包括使未被照射的细胞与选择性改变一种或多种表达或活性的试剂接触。相对于未经处理的对照细胞，细胞中CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶的表达，从而改善辐射暴露或RIBE对细胞的影响。

[0013] 在又一方面，本发明提供了一种改善放射线照射对受试者(例如，在哺乳动物受试者中的细胞、组织或器官中)的影响的方法，该方法包括向受试者施用相对于未处理的对照细胞选择性改变细胞中CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶的一种或多种受体的表达或活性的试剂，从而改善辐射暴露的影响，特别是RIBE对受试者的影响。

[0014] 在又一方面，本发明提供了一种改善放射线照射对受试者(例如，在哺乳动物受试者中的细胞、组织或器官中)的影响的方法，该方法包括向受试者施用相对于未经治疗的对照受试者有选择地改变一种或多种信号通路的表达或活性的试剂，所述信号通路涉及：CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶，从而减轻了辐射暴露的影响，特别是RIBE对受试者的影响。

[0015] 在另一方面，本发明提供了一种改善辐射暴露对受试者(例如，在哺乳动物受试者中的细胞、组织或器官中)的影响的方法，该方法包括向受试者施用相对于未经治疗的对照受试者选择性地改变受试者中CPR-4组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶中的一种或多种的表达或活性的试剂，从而改善放射线照射的效果，特别是RIBE对受试者的影响。

[0016] 本发明的另一方面提供了用于破坏、改变和/或抑制一个或多个CPR-4、CTSB、CEP-1、DAF-2、p53、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶基因或其同源物/直系同源物的表达的组合物和方法。本发明的另一方面提供了用于破坏、改变和/或抑制一个或多个CPR-4、CTSB、CEP-1、DAF-2、p53、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶基因或其同源物/直系同源物的表达的组合物和方法，用于治疗或预防与辐射照射有关的疾病和病症，尤其是RIBE。在各种实施方案中，可以通过CRISPR/Cas-9，转录激活因子样效应核酸酶(TALAN)或锌(Zn2+)

指核酸酶系统来改变一个或多个靶基因。

[0017] 在又一个实施例中，本发明技术可以包括一种或多种标记，其可以用于诊断目的，以及用于治疗、药物筛选和患者/肿瘤放射疗法的功效/敏感性以及本文所述的其他目的。在某些实施方案中，这些标记可以包括用于预测患者、细胞、组织、肿瘤等中的放射敏感性或放射抗性的标记。标记可能包括但不限于CPR-4;CTSB;CEP-1;DAF-2;p53、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶。

[0018] 本发明的另一方面可以包括使用特定的CTSB抑制剂来减轻和/或干扰由辐射暴露诱导的RIBE。在一个优选的实施方案中，此类抑制剂可包括:1)CA074[N-(1-3-反式-丙基氨基甲酰基环氧乙烷-2-羰基)-1-异亮氨酰基-1-脯氨酸]，一种CTSB的选择性抑制剂;2)CA074甲酯(CA074Me)，一种细胞内组织蛋白酶B的膜通透性抑制剂;3)E64，它是一种环氧化合物，可以不可逆地抑制各种半胱氨酸肽酶，包括组织蛋白酶B。在一个实施方案中，可以在放疗之前、期间或之后将有效量的一种或多种上述CTSB抑制剂或衍生物施用于患者。本发明的其他方面可以包括用于治疗药物筛选RIBE的新型抑制剂的方法和系统。本发明中包括的类似物和其他化合物包括但不限于:E-64、E-64a、E-64b、E-64c、E-64d、CA-074、CA-074Me、CA-030、CA-028、Z-Phe-Phe-FMK、H-Arg-Lys-Leu-Trp-NH2、N-(1-萘磺酰基)-Ile-Trp-醛、Z-Phe-Tyr(tBu)-重氮甲基酮、Z-Phe-Tyr-醛及其组合。

[0019] 一方面，本发明提供了用于治疗辐射暴露的药物组合物，特别是RIBE，所述组合物包含相对于参考细胞有效量的一种或多种试剂，所述试剂选择性地改变细胞中一种或多种CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶受体的表达或活性。

[0020] 在另一方面，本发明提供了一种用于治疗辐射暴露的药物组合物，特别是RIBE，所述组合物包含相对于参考细胞有效量的一种或多种试剂，所述试剂选择性地改变细胞中一种或多种CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶肽或其片段的表达或活性。

[0021] 在另一方面，本发明提供了用于治疗放射线暴露的试剂盒，特别是RIBE，其包含有效量的试剂，该试剂选择性地改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶受体;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶肽或其片段在细胞中的表达或活性，以及使用该试剂盒治疗放射线，特别是RIBE的说明。

[0022] 在本文描述的任何方面的各种实施方案中，该试剂是与CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶受体核酸分子;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶核酸分子的至少一部分互补的抑制性核酸分子。

[0023] 在本文描述的任何方面的各种实施方案中，该试剂是与CPR-4，组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶受体;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶肽选择性结合的抗体或其片段。在各种实施方案中，该抗体可以是单克隆或多克隆抗体。

[0024] 在本文描述的任何方面的各种实施方案中，该试剂是选择性结合CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶受体;或CPR-

4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1、和/或PDK1激酶肽的小分子。在各种实施方案中,小分子可以是合成的。

[0025] 本发明还提供了用于治疗辐射暴露的组合物和方法。如下所述,本发明的特征在于给予治疗有效量的化合物槲皮素或其类似物以抑制组织蛋白酶B(CTSB)肽或其片段的活性以治疗或预防与辐射照射有关的疾病和病症(特别是RIBE)的组合物和方法。

[0026] 在一个方面,本发明提供了一种改善包括RIBE在内的放射线照射对细胞的影响的方法,该方法包括,相对于未经处理的对照细胞,使已经用治疗有效量的化合物槲皮素或其类似物照射过的细胞接触以抑制组织蛋白酶B(CTSB)肽或其片段在细胞中的活性,从而改善辐射暴露或RIBE对细胞的影响。

[0027] 在另一方面,本发明提供了一种改善包括RIBE在内的辐射暴露对细胞的影响的方法,该方法包括,相对于未经处理的对照细胞,使未经辐照的细胞与治疗有效量的化合物槲皮素或其类似物接触,以抑制细胞中的组织蛋白酶B(CTSB)肽或其片段的活性,从而改善辐射暴露或RIBE对细胞的影响。

[0028] 在另一方面,本发明提供了一种改善放射线照射对受试者(例如,在哺乳动物受试者中的细胞、组织或器官中)的作用的方法,该方法包括,相对于未经治疗的对照受试者,向受试者施用治疗有效量的化合物槲皮素或其类似物以抑制组织蛋白酶B(CTSB)肽或其片段的活性,从而改善放射线照射的影响,尤其是RIBE对受试者的影响。

[0029] 在又一方面,本发明提供了一种改善辐射暴露对受试者(例如在哺乳动物受试者的细胞、组织或器官中)的影响的方法,该方法包括,在出于在受试者中治疗或诊断原因而给予一定剂量的辐射以抑制组织蛋白酶B(CTSB)肽或其片段的活性之前,向受试者施用治疗有效量的化合物槲皮素或其类似物,从而改善辐射暴露,尤其是RIBE对受试者的影响。

[0030] 在又一方面,本发明提供了一种改善辐射暴露对受试者(例如在哺乳动物受试者的细胞、组织或器官中)的影响的方法,该方法包括,在给予一定剂量的放射后或当出现RIBE症状时,向受试者服用治疗有效量的化合物槲皮素或其类似物,以抑制组织蛋白酶B(CTSB)肽或其片段的活性,从而改善了辐射暴露,尤其是RIBE对受试者的影响。

[0031] 一方面,本发明提供了用于治疗辐射暴露的药物组合物,特别是RIBE,该组合物包含相对于参考细胞有效量的一种或多种试剂,该试剂选择性地降低细胞中一种或多种组织蛋白酶B(CTSB)肽的表达或活性。在预选的实施方案中,所述药物组合物可以包含治疗有效量的化合物槲皮素、或其类似物、和/或药学上可接受的盐。

[0032] 在又一方面,本发明提供一种用于治疗放射暴露、特别是RIBE的试剂盒,包含相对于参照细胞有效量的试剂,该试剂选择性地降低细胞中一种或多种组织蛋白B(CTSB)肽的表达或活性。在预选的实施方案中,所述药物组合物可以包含治疗有效量的化合物槲皮素、或其类似物、和/或药学上可接受的盐。

[0033] 本发明技术的其他实施方案可以包括但不限于:

[0034] 1.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,包括向患者施用治疗有效量的抑制蛋白CPR-4的活性或表达的试剂。

[0035] 2.条款1所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂选自:CPR-4合成抑制剂、化学品、核酸分子、抗体或其生物活性片段和适配体。

[0036] 3.条款2所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述核酸分子选自:反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶和特异性抑制CPR-4表达或活性的核酶。

[0037] 4.条款2所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合CPR-4的抗体或其生物活性片段。

[0038] 5.条款2所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述适配体包括与CPR-4特异性结合的适配体。

[0039] 6.条款1-5所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

[0040] 7.条款1所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中放射疗法联合抗癌疗法。

[0041] 8.条款7所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中抗癌疗法选自手术和化学疗法。

[0042] 9.条款1所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

[0043] 10.条款1所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

[0044] 11.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,包括向患者施用治疗有效量的抑制细胞中蛋白CPR-4分泌的试剂。

[0045] 12.条款11所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂选自:CPR-4合成抑制剂、核酸分子、抗体或其生物活性片段和适配体。

[0046] 13.条款12所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述核酸分子选自:反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶和特异性抑制CPR-4表达或活性的核酶。

[0047] 14.条款12所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合CPR-4并抑制所述细胞分泌的抗体或其生物活性片段。

[0048] 15.条款12所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述适配体包括特异性结合CPR-4并抑制所述细胞分泌的适配体。

[0049] 16.条款11-15所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

[0050] 17.条款11所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中放射疗法联合抗癌疗法。

[0051] 18.条款17所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中抗癌疗法选自手术和化学疗法。

[0052] 19.条款11所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

[0053] 20.条款11所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应

的方法，其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

[0054] 21.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向患者施用治疗有效量的抑制蛋白质组织蛋白酶B(CTSB)的活性或表达的试剂。

[0055] 22.条款21所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂选自：组织蛋白酶B(CTSB)合成抑制剂、核酸分子、抗体或其生物活性片段、和适配体。

[0056] 23.条款22所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述核酸分子选自：反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶和特异性抑制组织蛋白酶B(CTSB)表达或活性的核酶。

[0057] 24.条款22所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合组织蛋白酶B(CTSB)的抗体或其生物活性片段。

[0058] 25.条款22所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述适配体包括特异性结合组织蛋白酶B(CTSB)的适配体。

[0059] 26.条款21-25所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

[0060] 27.条款21所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中放射疗法联合抗癌疗法。

[0061] 28.条款27所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中抗癌疗法选自手术和化学疗法。

[0062] 29.条款21所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

[0063] 30.条款21所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

[0064] 31.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向患者施用治疗有效量的抑制蛋白CEP-1的活性或表达的试剂。

[0065] 32.条款31所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂选自：CEP-1合成抑制剂、化学品、核酸分子、抗体或其生物活性片段和适配体。

[0066] 33.条款32所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述核酸分子选自：反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶和特异性抑制CEP-1表达或活性的核酶。

[0067] 34.条款32所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合CEP-1的抗体或其生物活性片段。

[0068] 35.条款32所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述适配体包括特异性结合CEP-1的适配体。

[0069] 36.条款31-35所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

[0070] 37.条款31所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应

的方法，其中放射疗法联合抗癌疗法。

[0071] 38.条款37所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中抗癌疗法选自手术和化学疗法。

[0072] 39.条款31所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

[0073] 40.条款31所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

[0074] 41.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向患者施用治疗有效量的抑制蛋白DAF-2的活性或表达的试剂。

[0075] 42.条款41所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂选自：DAF-2合成抑制剂、核酸分子、抗体或其生物活性片段、和适配体。

[0076] 43.条款42所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述核酸分子选自：反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶和特异性抑制DAF-2表达或活性的核酶。

[0077] 44.条款42所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合DAF-2的抗体或其生物活性片段。

[0078] 45.条款42所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述适配体包括特异性结合DAF-2的适配体。

[0079] 46.条款41-45所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

[0080] 47.条款41所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中放射疗法联合抗癌疗法。

[0081] 48.条款47所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中抗癌疗法选自手术和化学疗法。

[0082] 49.条款41所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

[0083] 50.条款41所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

[0084] 51.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，包括向患者施用治疗有效量的抑制蛋白PDK-1的活性或表达的试剂。

[0085] 52.条款51所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述试剂选自：PDK-1合成抑制剂、核酸分子、抗体或其生物活性片段、和适配体。

[0086] 53.条款52所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述核酸分子选自：反义寡核苷酸、RNAi构建体、DNA酶和特异性抑制PDK-1表达或活性的核酶。

[0087] 54.条款52所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法，其中所述抗体或其生物活性片段包括特异性结合PDK-1的抗体或其生物活性片段。

[0088] 55.条款52所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述适配体包括特异性结合PDK-1的适配体。

[0089] 56.条款51-55所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者。

[0090] 57.条款51所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中放射疗法联合抗癌疗法。

[0091] 58.条款57所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中抗癌疗法选自手术和化学疗法。

[0092] 59.条款51所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中在所述放射疗法施用之前来施用所述试剂。

[0093] 60.条款51所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中和所述放射疗法施用一起来施用所述试剂。

[0094] 61.一种改善辐射诱发的旁观者效应的方法,包括下列步骤:使至少一种细胞与在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体中的一种或多种的表达或活性的试剂接触,从而改善辐射暴露对细胞的影响。

[0095] 62.一种改善辐射诱发的旁观者效应的方法,包括下列步骤:使细胞与在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽中的一种或多种的表达或活性的试剂接触,从而改善辐射暴露对细胞的影响。

[0096] 63.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中辐射暴露的影响是直接的或间接的。

[0097] 64.条款63所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中细胞未暴露于辐射。

[0098] 65.条款63所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中细胞与已暴露于辐射的细胞或细胞产物接触。

[0099] 66.条款63所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中细胞位于已暴露于辐射的细胞附近或与其不直接接触的位置处。

[0100] 67.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中细胞和暴露于辐射的细胞存在于受试者中。

[0101] 68.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,还包括改善人的RIBE的步骤。

[0102] 69.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中试剂是与CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶核酸分子的至少一部分互补的抑制性核酸分子。

[0103] 70.条款69所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中抑制性核酸分子选自反义分子、siRNA、shRNA、其他RNAi构建体、核酶或DNA产物。

[0104] 71.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法,其中试剂是选择性结合CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的抗体或其片段。

[0105] 72.条款71所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中抗体是单克隆或多克隆抗体。

[0106] 73.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法降低RIBE。

[0107] 74.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法增强放射疗法在癌症受试者中的有效性。

[0108] 75.条款61所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法降低癌细胞对化学疗法的抵抗力。

[0109] 76.一种改善辐射诱发的旁观者效应的方法，包括下列步骤：使至少一种细胞与在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽中的一种或多种的表达或活性的试剂接触，从而改善辐射暴露对细胞的影响。

[0110] 77.一种改善辐射诱发的旁观者效应的方法，包括下列步骤：使细胞与在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体中的一种或多种的表达或活性的试剂接触，从而改善辐射暴露对细胞的影响。

[0111] 78.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中辐射暴露的影响是直接的或间接的。

[0112] 79.条款78所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中细胞未暴露于辐射。

[0113] 80.条款78所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中细胞与已暴露于辐射的细胞或细胞产物接触。

[0114] 81.条款78所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中细胞位于已暴露于辐射的细胞附近或与其不直接接触的位置处。

[0115] 82.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中细胞和暴露于辐射的细胞存在于受试者中。

[0116] 83.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中辐射暴露的影响包括RIBE。

[0117] 84.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中试剂是与CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶核酸分子的至少一部分互补的抑制性核酸分子。

[0118] 85.条款84所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中抑制性核酸分子选自反义分子、RNAi、siRNA、shRNA、核酶、其他RNAi构建体或DNA产物。

[0119] 86.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中试剂是选择性结合CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体；或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的抗体或其片段。

[0120] 87.条款86所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中抗体是单克隆或多克隆抗体。

[0121] 88.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法降低RIBE。

[0122] 89.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法增强放射疗法在癌症受试者中的有效性。

[0123] 90.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法增强化学疗法在癌症受试者中的有效性。

[0124] 91.条款76所述的改善辐射诱发的旁观者效应的方法，其中该方法降低癌细胞对化学疗法的抵抗力。

[0125] 92.一种改善受试者中的辐射暴露影响的方法，该方法包括向受试者施用在受试者中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽中的一种或多种的表达或活性的试剂，从而在受试者中改善辐射诱发的旁观者效应。

[0126] 93.一种改善受试者中的辐射暴露影响的方法，该方法包括向受试者施用在受试者中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体中的一种或多种的表达或活性的试剂，从而在受试者中改善辐射诱发的旁观者效应。

[0127] 94.一种改善受试者中的辐射暴露影响的方法，该方法包括向受试者施用在受试者中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1酶寡核苷酸中的一种或多种的表达或活性的试剂，从而在受试者中改善辐射诱发的旁观者效应。

[0128] 95.一种改善受试者中的辐射暴露影响的方法，该方法包括向受试者施用在受试者中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶核糖核苷酸中的一种或多种的表达或活性的试剂，从而在受试者中改善辐射诱发的旁观者效应。

[0129] 96.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中辐射暴露是直接的或间接的。

[0130] 97.条款96所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中细胞未暴露于辐射。

[0131] 98.条款96所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中细胞与已暴露于辐射的细胞接触。

[0132] 99.条款96所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中细胞位于已暴露于辐射的细胞附近或与其不直接接触的位置处。

[0133] 100.条款98所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中细胞和暴露于辐射的细胞存在于受试者中。

[0134] 101.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中辐射暴露的影响包括RIBE。

[0135] 102.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中试剂是与CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体核酸分子;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶核酸分子的至少一部分互补的抑制性核酸分子。

[0136] 103.条款102所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中抑制性核酸分子选自反义分子、RNAi、siRNA、shRNA、核酶、其他RNAi构建体或DNA产物。

[0137] 104.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中试剂是选择性结合CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受

体;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的抗体或其片段。

[0138] 105.条款104所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法,其中抗体是单克隆或多克隆抗体。

[0139] 106.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法,其中该方法降低RIBE。

[0140] 107.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法,其中该方法增强放射疗法在癌症受试者中的有效性。

[0141] 108.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法,其中该方法增强化学疗法在癌症受试者中的有效性。

[0142] 109.条款92所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法,其中该方法降低癌细胞对化学疗法的抵抗力。

[0143] 110.一种用于治疗辐射暴露的药物组合物,所述组合物包含治疗有效量的在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的表达或活性的一种或多种试剂,从而改善受试者中辐射诱发的旁观者效应。

[0144] 111.一种用于治疗辐射暴露的药物组合物,所述组合物包含治疗有效量的在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体的表达或活性的一种或多种试剂,从而改善受试者中辐射诱发的旁观者效应。

[0145] 112.条款110所述的药物组合物,其中至少一种试剂是与CPR-4、CTSB、CEP-1、p53、DAF-2、PDK-1和/或PDK1激酶受体核酸分子;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶核酸分子的至少一部分互补的抑制性核酸分子siRNA。

[0146] 113.条款112所述的药物组合物,其中抑制性核酸分子选自反义分子、siRNA、shRNA、核酶、其他RNAi构建体或DNA产物。

[0147] 114.条款111所述的药物组合物,其中至少一种试剂是选择性结合CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体;或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的抗体或其片段。

[0148] 115.条款114所述的药物组合物,其中抗体是单克隆或多克隆的。

[0149] 116.条款110所述的药物组合物,其中试剂在受试者中改变细胞死亡、减少DNA损伤或增加DNA修复。

[0150] 117.条款110所述的药物组合物,其中该方法在受试者中降低RIBE。

[0151] 118.条款110所述的药物组合物,其中组合物增强放射疗法对患者癌症受试者的有效性。

[0152] 119.条款110所述的药物组合物,其中组合物增强化学疗法对患者癌症受试者的有效性。

[0153] 120.条款110所述的药物组合物,其中组合物在患者中降低对癌细胞的化学疗法的抵抗力。

[0154] 121.一种用于治疗辐射暴露的试剂盒,包括有效量的试剂和使用试剂盒治疗辐射

暴露的说明书，所述试剂在细胞中选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体；或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的表达或活性。

[0155] 122.条款121所述的试剂盒，其中试剂是与CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体核酸分子；或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶核酸分子的至少一部分互补的抑制性核酸分子。

[0156] 123.条款122所述的试剂盒，其中抑制性核酸分子选自反义分子、siRNA、shRNA、核酶、其他RNAi构建体或DNA产物。

[0157] 124.条款121所述的试剂盒，其中试剂是选择性结合CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶受体；或CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶肽的抗体或其片段。

[0158] 125.条款124所述的试剂盒，其中抗体是单克隆或多克隆的。

[0159] 126.条款121所述的试剂盒，其中该方法在受试者中降低RIBE。

[0160] 127.条款121所述的试剂盒，其中试剂盒增强患者中放射疗法的有效性。

[0161] 128.条款121所述的试剂盒，其中试剂盒增强患者中化学疗法的有效性。

[0162] 129.条款121所述的试剂盒，其中试剂盒在患者中降低对癌细胞的化学疗法的抵抗力。

[0163] 130.一种改善受试者中的辐射暴露影响的方法，该方法包括选择性改变下列一种或多种的表达：CPR-4、组织蛋白酶B、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶。

[0164] 131.条款130所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中所述方法包括在患者中通过选自CRISPR/Cas-9系统、TALEN系统或锌指核酸酶系统的系统来选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶的表达。

[0165] 132.条款130所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中所述受试者是人。

[0166] 133.条款131所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中所述方法通过包括使受试者暴露于下列的步骤的CRISPR/Cas-9来选择性改变CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和/或PDK1激酶的表达：

[0167] 至少一种CRISPR相关的核酸内切酶和编码CRISPR相关的核酸内切酶的分离核酸；和

[0168] 指导RNA和编码指导RNA的分离的核酸中的至少一种，其中指导RNA与细胞中的靶核酸序列互补。

[0169] 134.条款133所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中所述CRISPR-相关的核酸内切酶是Cas-9核酸内切酶。

[0170] 135.条款134所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中所述靶核酸序列包括CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体PDK-1或PDK1激酶中的靶核酸序列。

[0171] 136.条款135所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法，其中所述CPR-4、组织

蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体PDK-1或PDK1激酶中的靶核酸序列包括与生物活性相关的靶序列。

[0172] 137.条款136所述的改善受试者中的辐射暴露影响的方法,其中所述生物活性包括诱导生物活性的RIBE。

[0173] 138.一种用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,包括向患者施用治疗有效量的改变RIBE诱导蛋白的活性或表达的试剂。

[0174] 139.条款138所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂是组织蛋白酶B(CTSB)的选择性抑制剂。

[0175] 140.条款139所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述组织蛋白酶B(CTSB)的选择性抑制剂是CA074[N-(1-3-反式-丙基氨基甲酰基环氧乙烷-2-羰基)-l-异亮氨酰基-1-脯氨酸]。

[0176] 141.条款138所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂是细胞内组织蛋白酶B(CTSB)的透膜前抑制剂。

[0177] 142.条款141所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述细胞内组织蛋白酶B(CTSB)的透膜前抑制剂是CA074甲酯。

[0178] 143.条款138所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述试剂是抑制半胱氨酸肽酶的环氧化物。

[0179] 144.条款143所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述抑制半胱氨酸肽酶的环氧化物是E64。

[0180] 145.条款138-144所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述患者是人。

[0181] 146.条款138-145所述的用于改善由暴露于辐射引起的患者中的辐射诱发的旁观者效应的方法,其中所述方法展现以下一种或多种:增强所述患者中放射疗法的有效性;增强所述患者中化学疗法的有效性;降低所述患者中癌细胞对放射疗法的抵抗力;降低癌细胞对患者化学疗法的抵抗力;增强患者对放射疗法的耐受性。

[0182] 147.一种用于治疗RIBE的药物组合物,该组合物包含有效量的选择性改变组织蛋白酶B(CTSB)的表达或活性的一种或多种试剂。

[0183] 148.条款147所述的用于治疗RIBE的药物组合物,其中所述一种或多种试剂选择性抑制和/或降低组织蛋白酶B(CTSB)的表达或活性。

[0184] 149.条款148所述的用于治疗RIBE的药物组合物,其中所述试剂选自:E64、CA074、CA074甲酯和它们的衍生物。

[0185] 150.一种确定癌症患者是否被预测对施用放射疗法响应的方法,该方法包括:

[0186] 检测来自患者的细胞样品中的选自下列的一种或多种标记基因的基因表达水平:

[0187] i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

[0188] ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

[0189] iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

[0190] iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

[0191] v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85%的序列鉴定性的标记基因;

[0192] vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0193] vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0194] viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸；

[0195] ix.由i-vii的标记基因编码的多肽；和

[0196] x.ix的多肽的片段，

[0197] 其中所述标记的表达水平指示所述患者是否会响应放射疗法的施用。

[0198] 151.条款150所述的方法，其中通过在放射疗法之前、放射疗法期间和/或放射疗法之后检测多肽的存在来确定一种或多种标记的存在。

[0199] 152.条款150所述的方法，其中所述患者是人。

[0200] 153.条款150所述的方法，其中所述细胞样品选自：非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

[0201] 154.一种确定癌症患者是否被预测对施用放射疗法响应的方法，该方法包括：

[0202] 检测来自患者的细胞样品中的选自下列的一种或多种标记基因的基因表达水平：

[0203] i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0204] ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0205] iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0206] iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0207] v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0208] vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0209] vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0210] viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸；

[0211] ix.由i-vii的标记基因编码的多肽；和

[0212] x.ix的多肽的片段，

[0213] 其中所述标记的表达水平指示所述患者是否易发展RIBE。

[0214] 155.条款153所述的方法，其中通过在放射疗法之前、放射疗法期间和/或放射疗法之后检测多肽的存在来确定一种或多种标记的存在。

[0215] 156.条款154所述的方法，其中所述患者是人。

[0216] 157.条款154所述的方法，其中所述细胞样品选自：非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

[0217] 158.一种评估对癌症患者施用放射治疗的功效的方法，该方法包括比较：

[0218] 确定在时间t_0从受试者获得的第一样品中测量的标记的表达水平，其中所述标记选自：

[0219] i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0220] ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0221] iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0222] iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0223] v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0224] vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0225] vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0226] viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸；

[0227] ix.由i-vii的标记基因编码的多肽；和

[0228] x.ix的多肽的片段，

[0229] 在时间t1从受试者获得的第二样品中的标记的水平；和

[0230] 其中相对于所述第一样品，所述第二样品中标记水平的变化指示所述放射治疗对于治疗所述受试者中的癌症是有效的。

[0231] 159.条款158所述的方法，其中所述时间to是在已经对受试者施用治疗之前，并且所述时间t1是在已经对受试者施用治疗之后。

[0232] 160.条款158所述的方法，其中所述患者是人。

[0233] 161.条款158所述的方法，其中所述细胞样品选自：非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

[0234] 162.一种评估对癌症患者施用放射治疗的功效的方法，该方法包括比较：

[0235] 在时间t_o从受试者获得的第一样品中测量的标记的表达水平，其中所述标记选自：

[0236] i.与组织蛋白酶B(CTSB)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0237] ii.与CPR-4基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0238] iii.与CEP-1基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0239] iv.与p53基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0240] v.与DAF-2基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0241] vi.与人胰岛素/IGF受体(INSR)基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0242] vii.与人PDK1激酶基因或其同源物或变体具有至少85％的序列鉴定性的标记基因；

[0243] viii.与i-vii的标记基因的至少一部分完全互补的多核苷酸；

[0244] ix.由i-vii的标记基因编码的多肽；和

[0245] x.ix的多肽的片段，

[0246] 在时间t1从受试者获得的第二样品中的标记的水平；和

[0247] 其中相对于所述第一样品，所述第二样品中标记水平的变化指示所述患者是否易发展RIBE。

[0248] 163.条款162所述的方法，其中所述时间to是在已经对受试者施用治疗之前，并且

所述时间t1是在已经对受试者施用治疗之后。

[0249] 164.条款163所述的方法，并且还包括比较各自包含较高剂量辐射的连续放射疗法治疗。

[0250] 165.条款164所述的方法，并且还包括向患者施用最佳辐射水平，所述最佳水平是将是治疗有效剂量并且在所述患者中不引起或限制RIBE效应的水平。

[0251] 166.条款165所述的方法，其中所述患者是人。

[0252] 167.条款162所述的方法，其中所述细胞样品选自：非癌细胞、癌细胞、癌前细胞、组织和器官。

[0253] 168.一种筛选新的RIBE治疗抑制剂的方法，包括：

[0254] 产生RIBE-诱导型转基因线虫；

[0255] 将所述转基因线虫置于含有一种或多种潜在治疗靶标化合物的生长培养基上；和

[0256] 通过选择降低所述转基因线虫子代中的胚胎致死率和/或幼虫停滞的靶标化合物来选择抑制RIBE的靶标化合物。

[0257] 169.条款168所述的方法，其中所述产生RIBE-诱导型转基因线虫的步骤包括下列步骤：产生Pmyo-2::CPR-4::mCherry转基因线虫或其等效物、或者在在秀丽隐杆线虫启动子的控制下表达CPR-4、CPR-4::mCherry或其等效物的转基因线虫。

[0258] 170.条款168所述的方法，其中通过局部辐射测试进一步证实所述选择的潜在治疗靶标化合物抑制RIBE。

[0259] 171.一种筛选新的RIBE治疗抑制剂的方法，包括：

[0260] 产生RIBE-诱导型转基因线虫；

[0261] 将一种或多种潜在的治疗靶标化合物引入所述转基因线虫；和

[0262] 对所述转基因线虫和/或其子代进行局部辐射测试。

[0263] 172.条款171所述的方法，其中所述产生RIBE-诱导型转基因线虫的步骤包括下列步骤：产生Pmyo-2::CPR-4::mCherry转基因线虫或其等效物。

[0264] 173.条款171所述的方法，并且还包括下列步骤：

[0265] 将所述转基因线虫和/或其后代置于含有一种或多种潜在治疗靶标化合物的生长培养基上；和

[0266] 通过选择降低所述转基因线虫后代中的胚胎致死率和/或幼虫停滞的目标化合物来选择抑制RIBE的目标化合物。

[0267] 174.如本文呈现的任何条款中所述的新颖组合物、方法和/或系统其中所述CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体PDK-1或PDK1激酶肽包含同源物和/或直系同源物和/或变体和/或片段。

[0268] 175.一种筛选新的RIBE治疗调节剂的方法，包括：

[0269] 在动物模型中产生RIBE诱导的转基因动物；

[0270] 将所述转基因动物置于含有一种或多种潜在治疗靶标化合物的生长培养基上；和

[0271] 通过选择影响所述转基因动物后代中某些表型的靶标化合物来选择影响RIBE的靶标化合物，包括胚胎致死率、幼虫停滞、基因组DNA损伤或其他可评分表型。

[0272] 176.条款175所述的筛选新的RIBE治疗调节剂的方法，其中所述动物模型选自：秀丽隐杆线虫、果蝇、斑马鱼或其他动物模型。

[0273] 通过附图、详细描述和权利要求，本发明的其他特征和优点将显而易见。

[0274] 附图简述

[0275] 该专利申请文件包含至少一个彩色附图。专利局将根据要求提供必要的费用，并提供带有彩色附图的本专利申请公开的副本。此外，结合附图，从下面的详细描述中，将更好地理解本公开的以上和其他方面，特征和优点，所有这些都仅以举例说明的方式给出，并且不限制当前公开的实施例，其中：

[0276] 图1:RIBE因子的识别。(1a)。秀丽隐杆线虫中RIBE测定的示意图。(1b-c)。在这里，将ced-1(e1735)L4幼虫在以指定剂量(b)或用胰蛋白酶蛋白酶(50ng/μL)(c)处理过的UV-CM(100J/m^2)照射的N2动物的UV-CM中培养。48小时后对生殖细胞尸体评分。数据为平均值±s.e.m.条形图内标出了性腺臂的得分数。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，“ns”，无显著性，两面，不成对t检验。(1d-e)。质谱分析。在SDS聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上分离出浓度大于10kD的UV-CM和UV-Ctrl馏分，并进行银染(d)。显示了UV-CM特有条带中的蛋白质身份(以数字标记)(e)。(1f)。CPR-4::Flag从Pcpr-4::cpr-4::flag动物分泌到UV-CM中。在SDS PAGE上解析UV-CM和UV-Ctrl(1μg/μL)，并通过免疫印迹(IB)检测。

[0277] 图2:将CPR-4识别为RIBE因子。(2a,2d-e).如图1b所示，使用来自指定菌株(a,e)的条件培养基(0.1μg/μL)或2.8μM重组tCPR-4蛋白(d)处理ced-1(e1735)动物。(2b-c,2f).来自所示菌株(b,f)或2.8μMtCPR-4蛋白(c)的条件培养基(0.1μg/μL)的蛋白酶活性。tCPR-4的免疫印迹图像低于c。(2g).CPR-4::Flag从Pcpr-4::cpr-4::flag动物分泌到IR-CM中。通过免疫印迹检测在SDS PAGE上分离的IR-CM和IR-Ctrl(1μg/μL)。(2h).与假辐照样品(Ctrl)相比，通过定量RT-PCR确定了指定菌株中的相对cpr-4mRNA水平(倍数变化)。数据为平均值±s.e.m.(a-f,h).得分的性腺臂数标在条形图(a,d,e)内，每组n＝6，用于其他测定(b,c,f,h)；***P<0.001，“ns”，无显著性，两面不配对t检验(a,d,e,h)。

[0278] 图3:CPR-4和DAF-2在局部UV辐射(LUI)模型中介导RIBE。(3a).用于分析RIBE的动物内模型的示意图。如图所示，辐照动物的咽部区域并在三个未暴露区域中分析RIBE。(3b-c).具有或不具有LUI的Phsp-4::gfp动物的代表性图片(至少20张)。动物的尾巴在右上方。比例尺，50μm。(3d).在不同发育阶段对LUI的Phsp-4::gfp反应的分析。(3e-g).LUI后24小时，分析了指示菌株的Phsp-4::gfp反应(e)，F1胚胎致死率(f)和后生殖腺中的生殖细胞尸体(g)。e和f中的所有实验都是在25℃下进行的。数据为平均值±s.e.m.条形图内标有动物(d,e)、带有胚胎的平板(f)或性腺臂(g)的数量。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，“ns”，无显著性，两面，非配对t检验(d-g)。

[0279] 图4:CPR-4通过DAF-2发挥RIBE作用。(4a-b).所示菌株的L4幼虫用2.8μMtCPR-4或缓冲液对照处理48小时。数据为平均值±s.e.m.条形图内标出了性腺臂的得分数。**P<0.01，***P<0.001，“ns”，无显著性，两面，不成对t检验。

[0280] 图5:紫外线或电离辐射(IR)产生的条件培养基以及纯化的tCPR-4蛋白会导致胚胎致死。(5a).与假手术对照组相比，在100J/m^2紫外线照射或500Gy红外线照射后，野生型(N2)或cep-1(gk138)动物的胚胎致死率。(5b).N2动物用于产生UV-CM、UV-对照、IR-CM和IR-对照，它们在胚胎致死率测定中用于治疗未暴露的N2动物。(5c).2.8μM重组tCPR-4蛋白(野生型或突变型)，0.27μM重组人组织蛋白酶B(rhCTSB)或缓冲液对照在胚胎致死率测定中用于治疗N2动物。评分的胚胎总数：从a中从左到右分别为1781、805、1249、2645、596和

1862个胚胎;b中从左到右分别为2721、2484、880和743个胚胎;在c中从左到右分别为979、875、929、939、907和777个胚胎。对每种条件进行六次独立测定(a,b中的UV-Ctrl和UV-CM)和三个独立测定(b,c中的IR-Ctrl和IR-CM)。数据为平均值±s.e.m.**P<0.01,***P<0.001,"ns"是不显著的,双边的,不成对的t检验。

[0281] 图6:RIBE因素的性质和来源的表征。(6a-b).用RNase(1μg/μL)或DNase(0.01Unit/μL)处理以100J/m^2辐照的N2动物收集的UV-CM和UV-Ctrl不会改变对ced-1(e1735)动物的细胞凋亡抑制作用。ced-1(e1735)L4幼虫处理48小时后,对生殖细胞的尸体进行评分。(6c,6e-g).在这里,对ced-1(e1735)L4幼虫进行UV-CM处理,并且UV对照(0.1μg/μL)分别从ced-3(n2433)动物(c)、在25℃下生长的glp-1(e2141ts)动物(e)、用甲醛处理的HB101细菌喂养的N2动物(f)和pcpr-4::cpr-4::flag;cpr-4(tm3718)具有或不具有抗标记耗竭的动物(g)制备。数据为平均值±s.e.m.条形图(a-c,e-g)内标出性腺臂的得分数。**P<0.01,***P<0.001,"ns",无显著性,两面,不成对t检验。(6d).在25℃下生长的N2和glp-1(e2141)成年动物的代表性差分干扰对比(DIC)图像(至少10张)。用虚线勾勒出具有多个卵母细胞和受精卵的N2动物的性腺。glp-1(e2141)动物没有可见的种系。比例尺指示100μm。(6h).从Pcpr-4::cpr-4::flag制备的UV-CM和UV-Ctrl中分泌的CPR-4::Flag的免疫印迹分析;cpr-4(tm3718)动物经过或未经过抗标记耗竭处理。

[0282] 图7:将CPR-4识别为RIBE因子。(7a).如图1b所示,使用N2动物衍生的UV-CM和UV-Ctrl的全培养基、>10kD分数和<10kD分数来处理ced-1(e1735)动物。数据为平均值±s.e.m.条形图内标出了性腺臂的得分数。(7b).通过RNAi筛选鉴定CPR-4为RIBE因子。由RNAi处理的动物制备的UV-Ctrl和UV-CM用于治疗ced-1(e1735)动物。通过从UV-CM处理中减去UV-Ctrl处理中的平均生殖细胞尸体数来计算生殖细胞尸体减少数(y轴)。在候选基因中,eft-3、ubq-2和act-1的RNAi引起强烈的胚胎致死性,并且本发明人无法获得其UV-CM。his-1、his-4和his-71的RNAi引起部分胚胎致死率。在每个RNAi实验中对20个性腺臂进行了评分。(7c).与携带相同Pcpr-4::cpr-4::flag转基因的N2辐照动物相比,在带有单拷贝整合Pcpr-4::cpr-4::flag的受辐射cep-1(gk138)动物中,CPR-4::Flag进入UV-CM的分泌大大减少了。使用Flag抗原决定簇的抗体对来自指定菌株的浓缩UV-CM或UV对照(1μg/μL)进行免疫印迹分析。(7d).如图2b所示,测量了0.27μM重组人组织蛋白酶B(rhCTSB)或2.8μM重组tCPR-4蛋白的蛋白酶活性。数据为平均值±s.e.m.(每个测定中n=6)。(7e).使用0.27μM rhCTSB或缓冲液对照治疗ced-1(e1735)动物。在rhCTSB缓冲液中培养的动物比在tCPR-4缓冲液中生长的动物生长缓慢,生殖细胞的尸体也更少。数据为平均值±s.e.m.(每个测定中n=21)。处理48小时后,对生殖细胞尸体进行评分(a,b,e)。***P<0.001,"ns",无显著性,两面不配对t检验(a,e)。

[0283] 图8:来自LTQ-Orbitrap的代表性MS/MS光谱,用于确认UV-CM中CPR-4的身份。(8a).使用LTQ-Orbitrap通过LC-MS/MS分析SDS PAGE凝胶中蛋白带6的胰蛋白酶肽(图1d)。用MS/MS分析鉴定并与CPR-4氨基酸序列匹配的肽的氨基酸序列用下划线标出并用红色标出。(8b).-显示了在a中鉴定的两种肽的MS/MS谱图。使用Scaffold 3搜索引擎将观察到的碎片离子分配给特定氨基酸残基,并且搜索结果显示在MS/MS谱图下方。小写字母"c"表示胰蛋白酶肽中的氨基甲酰氨基修饰的半胱氨酸残基。

[0284] 图9:人和小鼠组织蛋白酶B和CPR-4的cpr-4缺失突变和序列比对。(9a).cpr-4基

因结构和tm3718缺失的示意图。外显子被描绘为蓝框和内含子，非翻译区域被描绘为线。红色框表示通过406bp tm3718缺失删除的cpr-4区域。绿色框表示插入了12bp。(9b).人组织蛋白酶B、小鼠组织蛋白酶B和CPR-4的序列比对。在所有三种蛋白质中相同的残基用粉红色阴影表示。两个催化残基用绿色阴影表示，分别是充当亲核试剂的活性位点半胱氨酸残基和充当促进碱基水解的基本碱基的一般碱基的组氨酸残基。

[0285] 图10:其他基因在介导RIBE中的作用分析。(10a).局部紫外线照射试验。如图3所示，在头部局部照射后24小时，分析了指示基因型的动物的旁观者Phsp-4::gfp反应。数据为平均值±标准误差。得分的动物数显示在条内。(10b).tCPR-4处理后的生殖细胞尸体测定。如图4a所示，使用2.8μM重组tCPR-4蛋白或缓冲液对照来处理所示基因型的L4幼虫。数据为平均值±s.e.m.条形图内标出了性腺臂的得分数。(10c).来自Pcpr-4::cpr-4::flag的UV-CM和UV-Ctrl中分泌的CPR-4::Flag的免疫印迹分析;daf-2(e1730);如图1f所示完成cpr-4(tm3718)动物。(10d).生殖细胞尸体测定。ced-1(e1735)L4幼虫用UV-CM和由c制得的UV-对照(0.1μg/μL)处理。数据为平均值±s.e.m.条形图内标出了性腺臂的得分数。(10e).生殖细胞增殖测定。将N2和cep-1(gk138)L4幼虫在含有2.8μM重组tCPR-4或缓冲液对照的S-培养基中处理48小时。对种系的有丝分裂区中的核和中期核的数目进行评分。数据为平均值±s.e.m.在a、b、d、e中，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，“ns”，无显著性，两面，不成对t检验。

[0286] 图11:秀丽隐杆线虫中cpr-4的表达模式。(11a-g,和7i).N2只动物(a-g)或cep-1(gk138)动物(i)在指定的发育阶段携带Pcpr-4::nls::gfp单拷贝整合的代表性GFP和DIC图像(每张至少15张)。箭头指向胚胎和L1幼虫，它们没有或没有很暗的GFP(a,b)。比例尺，100μm。(11h).带有相同Pcpr-4::nls::gfp转基因的L4幼虫的代表性DIC，GFP和DIC/GFP合并图像(至少15张)和相应的10倍放大图像，显示了肠细胞中GFP的表达(右列)。GFP主要出现在细胞核中(如箭头所示)。比例尺分别为100μm(左)和10μm(右)。(11j).Pcpr-4::nls::gfp和cep-1(gk138)中的GFP荧光强度;使用Image J软件量化处于不同发育阶段的Pcpr-4::nls::gfp动物。数据为平均值±s.e.m.从左栏到右栏分别对n＝28、28、24、31、30、33、52、52、19、28、52、52、24和25只动物进行了评分。在两个发育阶段，两个不同品系之间差异的显著性通过双面非配对t检验确定。**P<0.01，***P<0.001，“ns”，无明显意义。(11k).定量检测N2和cep-1(gk138)动物的GFP强度，这些动物携带相同的单拷贝Pcpr-4::nls::gfp转基因，分别通过UV或经Image J进行假辐射。数据为平均值±s.e.m.从左栏到右栏分别对n＝38、37、32和30只动物进行了评分。不同条件之间差异的显著性由两面非配对t检验确定。***P<0.001，“ns”，不显著。

[0287] 图12:CPR-4的咽部表达导致胚胎致死率，幼虫停滞和生殖细胞死亡减少。(12a-b).具有CPR-4::mCherry(a)和tCPR-4::mCherry(b)咽表达的成年动物的代表性DIC和mCherry图像(至少10张)。白色虚线突出了咽的边缘。箭头指示已经吸收了CPR-4::mCherry(a)的细胞，包括腔肠细胞，该细胞是在咽中分泌的，并从咽中分泌出来，并可能通过伪腔(充满液体的体腔)运输到动物的其他部位。带有相应颜色的虚线框中显示了两对荧光较弱的后部细胞的放大图像(由彩色箭头指示)。比例尺，100μm。(12c).在携带Pmyo-2::CPR-4::mCherry(野生型或突变体)或Pmyo-2::tCPR-4::mCherry转基因的胚胎或幼虫中对胚胎致死率和幼虫停滞的百分比进行评分。对每个构建体评分三个独立的转基因系。括号中标出

了新孵化的转基因L1幼虫的数量和得分的转基因胚胎的数量。当用cpr-4RNAi处理转基因动物时，在Pmyo-2::CPR-4::mCherry转基因动物中看到的幼虫停滞增加被阻止(表6)，这表明减少cpr-4的表达可以防止幼虫停滞。所有动物均携带ced-1(e1735)和cpr-4(tm3718)突变(a-c)。(12d).转基因动物中生殖细胞尸体的定量。L4 ced-1(e1735)；携带指定转基因的cpr-4(tm3718)动物在常规NGM平板上生长24小时，然后检查。数据为平均值±s.e.m.条形图内标出了性腺臂的得分数。通过单向方差分析(ANOVA)确定转基因动物与非转基因动物之间差异的显著性。***P<0.001，“ns”，不显著。

[0288] 图13：组织蛋白酶B(CTSB)参与紫外线诱导的人细胞旁观者效应。(13a).组织蛋白酶B(CTSB)的表达不受紫外线照射的调节。以指定剂量用紫外线照射293T细胞。然后在24小时后收集细胞，并分别使用抗CTSB和抗GAPDH(上样对照)抗体进行免疫印迹分析。(13b).从照射的293T细胞收集的紫外线条件培养基(UV-CM)显示出比从组织蛋白酶B(CTSB)表达降低的293T细胞更强的促存活活性。从表达对照短发夹RNA(shRNA)或组织蛋白酶B(CTSB)shRNA的293T细胞收集的UV-CM用于培养未暴露的Huh7细胞。使用SRB测定法测量Huh7存活率。右侧的免疫印迹显示了组织蛋白酶B(CTSB)敲低的效率。

[0289] 图14：组织蛋白酶B(CTSB)参与紫外线诱导的人细胞旁观者效应。(14a).从表达组织蛋白酶B(CTSB)shRNA的辐射Huh7细胞收集的紫外线条件培养基(UV-CM)中，组织蛋白酶B(CTSB)的分泌大大减少。用紫外线(400J/m^2)照射表达所示shRNA的Huh7细胞。然后在48小时后收集UV-CM，并使用抗CTSB抗体进行免疫印迹分析。(14b).从辐照过的Huh7细胞收集的UV-CM同样可以促进细胞存活。从表达对照shRNA或CTSB shRNA的Huh7细胞收集的UV-CM用于培养未暴露的Huh7细胞。使用SRB分析(方法)测量了Huh7细胞存活的百分比。右侧的免疫印迹显示了CTSB shRNA敲低的效率。

[0290] 图15：人胰岛素受体对于介导人细胞中CTSB诱导的RIBE很重要。用紫外线(400J/m2)照射表达shCtrl和shCTSB的Huh7细胞。然后在48小时后收集UV-CM，并将其用于处理未表达表达shCtrl或shINSR的Huh7细胞。使用SRB分析测量了Huh7细胞存活的百分比。用PLKO.1-Ctrl(shCtrl)和PLKO.1-CTSB(shCTSB)质粒转染Huh7细胞48小时。洗涤细胞并将其置于新鲜培养基中并暴露于UV辐射(400J/m^2)。照射的细胞再培养48小时。收集上清液，即紫外线条件培养基，并用于培养表达shCtrl或shINSR的未暴露Huh7细胞48小时。进行了磺基罗丹明B(SRB)测定以测量Huh7细胞存活的百分比。

[0291] 图16：不同的人类细胞系显示出不同的基础组织蛋白酶B(CTSB)表达水平和对紫外线照射的不同敏感性。(a-d).用指示剂量的UV照射细胞，48小时后收集细胞，并分别使用抗CTSB和抗GAPDH(上样对照)抗体进行免疫印迹分析。将细胞接种在6cm平板中，并与完全培养基一起孵育过夜。贴壁细胞用PBS洗涤一次，补充1.5ml PBS(以防止细胞干燥)，并使用UV交联剂以指定的UV剂量照射。辐照后，弃去PBS，将新鲜的完全培养基加回到平板中。48小时后，收集所有细胞，包括贴壁细胞和漂浮细胞，将其裂解并进行免疫印迹分析。

[0292] 图17：在局部UV辐射动物模型中，人组织蛋白酶B的几种抑制剂阻断了RIBE。携带整合的Phsp-4::gfp转基因的zcIs4 L1幼虫分别用DMSO(模拟)、1mM的CA074、CA074Me或E64处理48小时。如上图3所述，对受辐照动物后未暴露区域中的局部UV辐射(LUI)进行Phsp-4::gfp旁观者反应的分析。数据为平均值±s.e.m.*P＜0.05.双面未配对t检验。

[0293] 图18：抑制局部UV辐射(LUI)诱导的染色体DNA损伤。染色体DNA损伤定量为有丝分

裂区域中包含DNA损伤指示剂HUS-1::NeoGreen病灶的生殖细胞的百分比。在每个实验中，至少对15只动物进行了评分。用该药物治疗幼虫第2阶段(L2)动物。数据为平均值±s.e.m.n.s.，不显著；**P<0.01，***P<0.001，双面未配对t检验。

[0294] 图19：局部紫外线辐射诱导的胚胎致死率的抑制。在每个实验中，对1500多个胚胎进行了评分。用该药物治疗L2动物。数据为平均值±s.e.m.n.s.表示不显著；***P<0.001，双面不配对t检验。

[0295] 图20：使用特异性抗体抑制局部紫外线照射诱导的胚胎致死率。在每个实验中，对700多个胚胎进行了评分。用靶向CPR-4::Flag蛋白的抗Flag抗体治疗L2动物。数据为平均值±s.e.m.n.s.，不显著；**P<0.01，双面不配对t检验。

[0296] 图21：局部紫外线辐射诱导的应激反应(Phsp-4::gfp)的抑制。通过测量来自应激反应报告基因Phsp-4::gfp整合转基因的GFP荧光强度来量化受辐照动物后部区域的应激反应。在每个实验中，至少对15只动物进行了评分。用该药物治疗L2动物。数据为平均值±s.e.m.n.s.，不显著；*P<0.05，双面不配对t检验。

[0297] 图22：筛选化合物的化学结构。

[0298] 图23：槲皮素和多种槲皮素类似物的化学结构。

[0299] 发明详述

[0300] 在一个优选的实施方案中，本发明人已经鉴定出新颖且高度保守的半胱氨酸蛋白酶CPR-4(人组织蛋白酶B同源物)，其是诱导多种典型的RIBE作用的第一个RIBE因子，所述RIBE作用包括细胞凋亡抑制和增加的细胞增殖、致死性和应激反应。例如，在哺乳动物中，已经观察到组织蛋白酶B是从溶酶体分泌的，以发挥细胞外活性，包括细胞凋亡的调节，并在赘生性和炎性疾病状态中起作用。最近的研究还表明，细胞外组织蛋白酶B增强了乳腺癌对化疗期间药物诱导的细胞凋亡的抵抗力。因此，CPR-4和人组织蛋白酶B(CTSB)，尤其是下文讨论的，既是放射治疗之前或之后的新型结局生物标记，也是改善放射治疗效果的潜在治疗靶标。

[0301] 本发明人还证实了辐射通过p53/CEP-1依赖性机制引起的cpr-4转录以及CPR-4蛋白产生和分泌的增加。然后，分泌的CPR-4通过调节DAF-2胰岛素/IGF受体的活性，直接或间接诱导多种RIBE反应，该活性对于从衰老、应激反应、新陈代谢到细胞凋亡的多个保守信号通路至关重要。更具体地，本发明人已经表明，CPR-4是从用紫外线(UV)或电离γ射线(IR)照射的动物或细胞中分泌的，并且是条件培养基中导致细胞死亡抑制和未辐照动物胚胎致死率增加的主要因素。

[0302] 本发明人描述了新颖的机制，由此CPR-4在照射组织远端的未暴露部位引起这些作用和应激反应。更具体地，本发明人描述了响应于放射，由cep-1(一种p53肿瘤抑制基因同源物)调节CPR-4的途径活性。本发明人进一步描述了CPR-4通过DAF-2、胰岛素样生长因子受体及其下游PDK激酶发挥RIBE作用的活性。本发明人还描述了人组织蛋白酶B(CTSB)半胱氨酸蛋白酶，其也参与人细胞中的RIBE反应。具体地，已经证明组织蛋白酶B(CTSB)的表达响应于辐射而被上调，并且它还与人细胞中UV诱导的旁观者效应有关。

[0303] 组织蛋白酶B的鉴定；CPR-4；p53；cep-1；DAF-2；其他胰岛素样生长因子受体；PDK-1激酶，其他PDK激酶以及相关的信号转导途径作为人和动物系统中RIBE的新型介导物，可为治疗性开发的方法提供新的靶标和/或标记，可以增强靶向杀伤细胞的功效并减少或预

防由放射和放射疗法引起的副作用。

[0304] 这样，本发明技术还涉及抑制在人和其他动物中引起RIBE的靶分子和分子途径的新型组合物和治疗方法的产生。具体地，本发明技术包括鉴定和抑制以下一种或多种RIBE介体：组织蛋白酶B(CTSB)；和CPR-4；p53；CEP-1；DAF-2；其他胰岛素样生长因子受体；PDK-1激酶，其他PDK激酶；及其相关的信号转导途径，包括此类RIBE调解人的前任和后任(在本文中通常称为：靶标、靶标肽、靶标多核苷酸、靶标寡核苷酸、靶标多肽、靶标分子、标记、生物标记、靶标标记)。另外的实施方案可以进一步包括，鉴定和抑制以上鉴定的RIBE介体的一种或多种同源物或变体。在一个优选的实施方案中，本发明通过槲皮素、异槲皮素和/或其他槲皮素类似物或衍生物鉴定和抑制组织蛋白酶B(CTSB)和/或其同系物CPR-4。

[0305] 这些临床和药学应用，特别是槲皮素、异槲皮素和/或其他槲皮素类似物或衍生物作为治疗和/或预防RIBE的治疗剂的用途，可以增强靶向细胞杀伤的功效，并可以减少或预防由放射线和放射疗法引起的有害副作用。本发明的某些其他实施方案可以包括诊断应用，以快速有效地筛选新药，所述新药可以增强靶向细胞杀伤的功效并减少或预防由放射和放射疗法引起并用于放射防护的副作用。这样的应用对于正在接受放射治疗的可能有RIBE风险的癌症患者尤其有利。另外，这样的治疗方法可以用于在计划放射治疗事件之前进行预防性地或者在放射线暴露的风险可能很高的情况下，直接在放射线照射的患者中治疗RIBE。

[0306] 在一个优选的实施方案中，本发明进一步涉及用于治疗和/或预防RIBE的治疗剂，其包含槲皮素和/或槲皮素类似物/衍生物的活性成分，更具体地，涉及RIBE的治疗剂，其包含以下所示的以下通式(I)表示的槲皮素和/或槲皮素类似物的活性成分，和/或药学上可接受的盐或载体，其中，

[0307] R1是龙胆三糖、吡喃葡萄糖、O-阿拉伯呋喃糖、O-二吡喃葡萄糖、O-吡喃半乳糖、O-半乳糖苷-没食子酸酯、O-龙胆二糖、O-吡喃葡萄糖、O-葡萄糖醛酸苷、O-新橙皮糖、O-吡喃鼠李糖、O-芸香糖、O-槐糖、O-吡喃木糖、OCH3、OH、鼠李龙胆二糖、鼠李葡萄糖或硫酸酯；

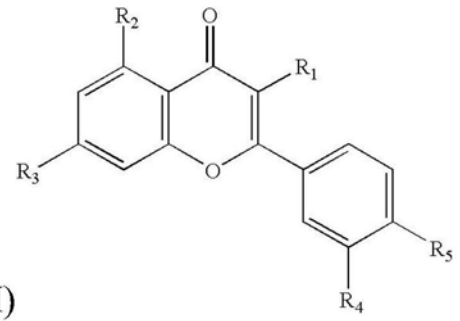
[0308] R2是OH或O-吡喃葡萄糖；

[0309] R3是OCH3、OH、O-吡喃葡萄糖、O-吡喃葡萄糖醛酸或吡喃葡萄糖；

[0310] R4是OCH3或OH；以及

[0311] R5是OCH3、OH、O-吡喃葡萄糖或O-葡萄糖。

[0312]



(I)

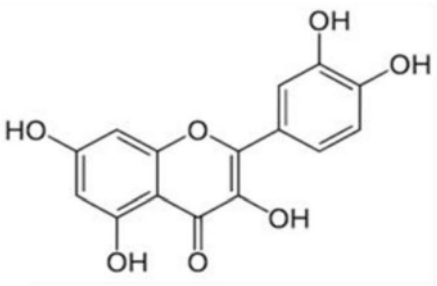
[0313] 在由通式(I)表示的本发明中包括的槲皮素类似物/衍生物中，众所周知的化合物分类如下：(i)其中R2至R5为OH且R1不同的式I的衍生物基团，包括，槲皮素，其中R1是OH，蒴蓄苷，其中R1是O--L-阿拉伯呋喃糖，瓜加维林，其中R1是O-阿拉伯吡喃糖，金丝桃苷，其中R1是O-β-D-吡喃半乳糖，异金丝桃苷，其中R1是O-β-D-吡喃半乳糖，异槲皮苷，其中R1是O-

吡喃葡萄糖，营实糖苷A，其中Rx是O-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1-4)-α-L-吡喃鼠李糖]，营实糖苷A乙酸酯，其中Rx是(6-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-4)-α-L-吡喃鼠李糖，槲皮苷，其中R1是O--L-吡喃鼠李糖，芸香苷，其中R1是O-β-D-芸香糖，槲皮素-3-O-(2”-O-β-D-吡喃葡萄糖基)-α-L-鼠李吡喃糖苷，其中R1是O-(2”-O-β-D-吡喃葡萄糖基)-α-L-吡喃鼠李糖，槲皮素-3-O-(6”-O-没食子酰基)-吡喃葡萄糖苷，其中R1是O-(6”-O-没食子酰基)-吡喃葡萄糖，槲皮素-3-O-(6’“-O-p-香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-2)-α-L-鼠李吡喃糖苷)，其中R1是O-(6’“-O-p-香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-2)-α-L-吡喃鼠李糖，槲皮素-3-O-D-吡喃葡萄糖基-(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-4)-α-L-鼠李吡喃糖苷，其中Rx是O-D-吡喃葡萄糖基-(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-4)-α-L-吡喃鼠李糖，槲皮素-3-O-[2”-O-6’“-O-p-(7““-O-β-D-吡喃葡萄糖基)香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-鼠李吡喃糖苷，其中Rx是O-[2”-O-6’“-O-p-(7”“-O-β-D-吡喃葡萄糖基)香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-吡喃鼠李糖，槲皮素-3-O-[6’“-p-香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基-β-(1-4)-鼠李吡喃糖苷]，其中R1是O-[6’“-p-香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基-β-(1-4)-吡喃鼠李糖]，槲皮素-3-O-[α-L-吡喃鼠李糖基(1-2)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖苷]，其中Rx是O-[α-L-吡喃鼠李糖基(1-2)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖]，槲皮素-3-O-[α-吡喃鼠李糖基(1-4)-L-吡喃鼠李糖基(1-6)β-D-半乳糖苷]，其中R1是O-[α-吡喃鼠李糖基(1-4)α-L-吡喃鼠李糖基(1-6)β-D-吡喃半乳糖]，槲皮素-3-O-[α-吡喃鼠李糖基-(1-2)]-[β-吡喃葡萄糖基-(1-6)]-β-D-半乳糖苷，其中R1是O-[α-吡喃鼠李糖基-(1-2)]-[β-吡喃葡萄糖基-(1-6)]-β-D-吡喃半乳糖，槲皮素-3-O-[α-吡喃鼠李糖基-(1-4)-α-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-半乳糖苷]，其中Rx是O-[α-吡喃鼠李糖基-(1-4)-α-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-吡喃半乳糖]，槲皮素-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-2)-β-D-半乳糖苷，其中R1是O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-2)-β-D-吡喃半乳糖，槲皮素-3-O-β-D-二吡喃葡萄糖苷，其中R__是O-β-D-二吡喃葡萄糖，槲皮素-3-O-β-D-半乳糖苷-2”-没食子酸酯，其中R1是O-β-D-半乳糖苷-2”-没食子酸酯，槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷-(1-6)-β-D-半乳糖苷，其中R1是O-β-D-吡喃葡萄糖苷-(1-6)-β-D-吡喃半乳糖，槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-D-半乳糖苷，其中Rx是O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1-3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1-6)-β-D-吡喃半乳糖，槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷，其中R1是O-β-D-葡萄糖醛酸苷，槲皮素-3-O-β-D-木吡喃糖苷，其中R1是O-β-D-吡喃吡喃糖，槲皮素-3-O-二葡萄糖吡喃糖苷，其中R1是O-二葡萄糖吡喃糖，槲皮素-3-O-栀子苷，其中R1是O-龙胆二糖，槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖吡喃半乳糖苷，其中R1是O-吡喃葡萄糖基吡喃半乳糖，槲皮素-3-O-新橘皮糖苷，其中R1是O-新橙皮糖，槲皮素-3-O-槐糖苷，其中Rx是O-槐糖，槲皮素-3-龙胆苷，其中R1是龙胆三糖，槲皮素-3-甲基醚，其中Rx是OCH3，槲皮素-3-鼠李龙胆二糖苷，其中R1是鼠李龙胆二糖，槲皮素-3-鼠李葡萄糖苷，其中Rx是鼠李葡萄糖，槲皮素-3-硫酸酯，其中Rx是硫酸酯；(ii)式I的衍生基团，其中Rx是-OH，R2至R5中的三个官能团为-OH，其余一个官能团不同，包括，异鼠李素，其中R4是OCH3，槲皮黄苷，其中R3是O-β-D-吡喃葡萄糖，鼠李素，其中R3是OCH3，槲皮素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷，其中R2是O-β-D-吡喃葡萄糖，槲皮素-7-O-β-D-葡糖醛酸吡喃糖苷，其中R3是O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸，绣线菊糖苷，其中R5是O-葡萄糖；(iii)式I的衍生基团，其中，Rx至R5中的三个官能团是OH，其余两个官能团有所不同，包括，甲基鼠李素，其中R3和R4是OCH3槲皮素-3’,4’-二-甲基醚，其中R4和R5是OCH3槲皮素-3,3’-二甲基醚，其中Rx和

R4是OCH3,槲皮素-3,7-二甲基醚,其中Rx和R3是OCH3,槲皮素-3-O-[2”-O-(6’“-O-p-香豆酰基)-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-吡喃鼠李糖基-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,其中Rx是O-[2”-O-(6’“-O-p-香豆酰基)-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-吡喃鼠李糖并且R3是O-β-D-吡喃葡萄糖,槲皮素-3-O-[2”-O-6’“-O-p-(7”“-O-β-D-吡喃葡萄糖基)香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-鼠李吡喃糖苷-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,其中Rx是O-[2”-O-6’“-O-p-(7”“-O-β-D-吡喃葡萄糖基)香豆酰基-β-D-吡喃葡萄糖基]-α-L-吡喃鼠李糖并且R3是O-β-D-吡喃葡萄糖,槲皮素-3-O-芸香苷-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,其中Rx是O-芸香糖并且R3是O-β-D-吡喃葡萄糖,槲皮素-3-O-α-L-阿拉伯吡喃糖基-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,其中R是O-α-L-阿拉伯吡喃糖基并且R3是”O-β-D-吡喃葡萄糖,槲皮素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷-3-O-槐糖苷,其中R1是O-槐糖并且R3是O-β-D-吡喃葡萄糖,槲皮素-3-O-半乳吡喃糖基-7-O-二吡喃葡萄糖苷,其中R是O-吡喃半乳糖并且R3是O-吡喃葡萄糖,槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖基-7-二吡喃葡萄糖苷,其中Rx是O-吡喃葡萄糖并且R3是O-吡喃葡萄糖,槲皮素-3,7-二吡喃葡萄糖苷,其中Rx是吡喃葡萄糖并且R3是吡喃葡萄糖,槲皮素-3-龙胆二糖基-7-吡喃葡萄糖苷,其中R是龙胆二糖并且R3是吡喃葡萄糖,槲皮素-3,4’-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,其中R和R5是O-β-D-吡喃葡萄糖;(iv)式I的衍生基团,其中三个以上的官能团不同,包括,槲皮素-3,4’,7-三甲醚,其中Rx,R3和R5为OCH3;并且R2和R4是OH,槲皮素-3,3’,4’,7-四甲醚,其中Rx,R3,R4和R5是OCH3,并且R2是OH。

[0314] 在一个优选的实施方案中,本发明进一步涉及包含槲皮素活性成分的RIBE治疗剂,更具体地,涉及包含由下式(II)表示的槲皮素活性成分的RIBE治疗剂,其有效抑制人组织蛋白酶B(CTSB)的活性。

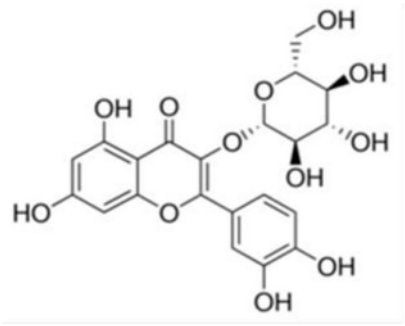
[0315]



Quercetin

(II) 。

[0316] 在另一个优选的实施方案中,本发明进一步涉及包含异槲皮素活性成分的RIBE治疗剂,更具体地,涉及用于RIBE的治疗剂,其包含由下式(III)表示的异槲皮素化合物的活性成分,该活性成分有效抑制人组织蛋白酶B(CTSB)的活性。

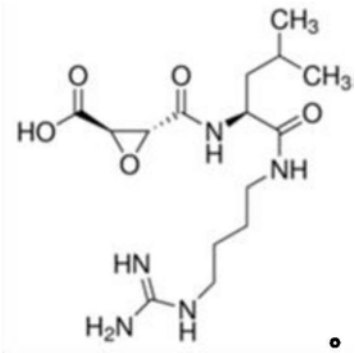
[0317] 

Isoquercitrin

(III) 。

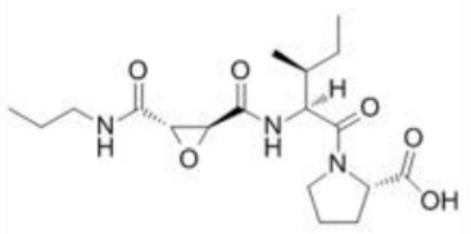
[0318] 在上述通式(I)的Rx至R5中具有相同的OH基的槲皮素是在自然界中超过4000种植物中发现的酚类化合物，并且被称为植物雌激素之一。它的分子式为CX5HXOO7，具有共振结构，分子量为302.33g/mol，在1936年化学结构鉴定后也称为维生素P。槲皮素是芸香苷，一种糖苷，其中的糖通过β-键连接，并广泛分布于三叶草花、豚草花粉以及各种植物的壳和茎，以及洋葱，羽衣甘蓝，西兰花，生菜，番茄和苹果等植物中。槲皮素已被证实不仅在维持毛细血管壁完整性和毛细血管阻力方面起着重要作用(参见Gabor e tal.,Plant Flavonoids in Biology and Medicine II:Biochemical,Cellular,and Medical Properties,280:1-15,1988;Havsteen et al.,Biochemical Pharmacology,32:1141-1148,1983;通过引用将其全部内容全部合并于此)，而且还具有抗氧化活性，维生素P活性，紫外线吸收活性，降压活性，抗心律不齐活性，抗炎活性，抗过敏活性，抗胆固醇活性，对肝脏毒性的抑制活性，以及对不孕症的治疗作用，因此，可以预期在食品，医疗和药物产品以及化妆品中广泛使用槲皮素。但是，尚未有关于槲皮素用于预防和治疗RIBE的报道。本文举例说明了包含槲皮素衍生物的活性成分的本发明的RIBE治疗剂。

[0319] 可以抑制组织蛋白酶B的活性和/或抑制或调节人的RIBE的其他化合物可以包括图22或23所示的化合物。例如，在另一个优选的实施方案中，本发明还涉及用于RIBE的治疗剂，其包括：RIBE的治疗剂，特别是涉及包含下述式(IV)表示的E64化合物的活性成分的RIBE治疗剂，该E64化合物的活性成分可以有效抑制人组织蛋白酶B(CTSB)的活性。

[0320] 

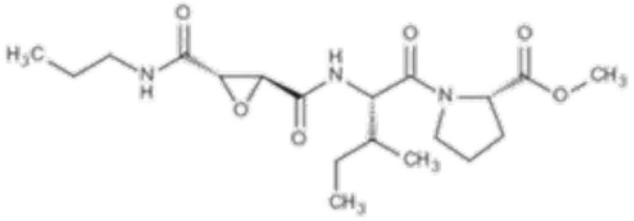
(IV) 。

[0321] 在另一个优选的实施方案中，本发明进一步涉及包含CA074的活性成分的RIBE治疗剂，更具体地，涉及用于RIBE的治疗剂，其包含可有效抑制人组织蛋白酶B(CTSB)活性的下式(V)表示的CA074化合物的活性成分。

[0322] 

(V)。

[0323] 在另外优选的实施方案中，本发明还涉及用于RIBE的治疗剂，其包含CA074的活性成分，更具体地，还涉及RIBE的治疗剂，其包含由下式(VI)表示的CA074化合物的活性成分，其可以有效抑制人组织蛋白酶B(CTSB)的活性。

[0324] 

(VI)。

[0325] 如上所述，没有任何关于本文所鉴定的化合物或化合物的类似物用于预防和治疗RIBE的报道。本文举例说明了包含槲皮素衍生物的活性成分的本发明的RIBE治疗剂。术语通常可互换的类似物和/或派生词也具体包括在本发明技术中。

[0326] 为了评估槲皮素及其类似物/衍生物对人组织蛋白酶B(CTSB)活性的作用，本发明人比较了槲皮素及其类似物异槲皮素的作用，并发现槲皮素和异槲皮素均抑制CTSB的活性；结果，抑制和/或破坏RIBE的传播以响应辐射暴露。

[0327] 在预选的实施方案中，作为用于治疗、预防或改善RIBE的治疗方法和/或组合物的一部分，一种或多种本文所述的槲皮素、异槲皮素和/或其他槲皮素类似物/衍生物可以与药学上可接受的赋形剂混合，所述赋形剂包括粘合剂，例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素等，崩解剂，如羧甲基纤维素钙、乙醇酸钠淀粉等，稀释剂，如玉米淀粉、乳糖、大豆油、结晶纤维素、甘露醇等，润滑剂，例如硬脂酸镁、滑石粉等；甜味剂，例如蔗糖、果糖、山梨糖醇、阿斯巴甜等；稳定剂，例如羧甲基纤维素钠，α-或β-环糊精，维生素C，柠檬酸，白蜡等，防腐剂(如对氧甲基苯甲酸酯、对氧丙基苯甲酸酯、苯甲酸钠等)和芳族化合物(如乙基香兰素、掩盖香料、黄酮薄荷醇、草药香料等)，以制备用于口服或肠胃外给药的药物制剂，如片剂、胶囊剂、软胶囊、液体、软膏剂、丸剂、散剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂、栓剂或注射剂。为了肠胃外施用本发明的药物制剂，可以采用皮下、静脉内、肌内或腹膜内注射。对于肠胃外给药，可以将槲皮素衍生物与稳定剂或缓冲剂在水中混合以制备溶液或悬浮液，其可以作为安瓿或小瓶的单剂量制剂生产。

[0328] 在一个实施方案中，作为治疗RIBE的治疗剂，槲皮素、异槲皮素或其类似物的治疗有效量可以为2至20mg/kg，优选为8至12mg/kg，根据患者的年龄、性别、严重程度、给药方式或预防目的，可以每天多次对患者给药。但是，替代实施方案可以包括0.01至1000mg/kg，低于1mg/kg或高于100mg/kg。应当注意，术语槲皮素，如本文所指，并且具体地在讨论作为用于治疗RIBE或RIBE相关症状/效应等的治疗剂/化合物时，可以指槲皮素、异槲皮素、槲皮素的类似物/衍生物或槲皮素、异槲皮素和/或槲皮素的类似物/衍生物或本文确定的其他化

合物的混合物或组合。

[0329] 作为本发明的组合物中包含的RIBE的治疗剂的槲皮素、异槲皮素或其类似物的治疗有效量，可以以每人每天0.1至20克，优选0.3至10克的酶处理芸香苷摄入量为指导确定。还可以确定上述量以使每kg体重摄入例如0.002至400mg/kg，更优选0.006至200mg/kg。或者，可以将前述量确定为基于组合物的总重量在0.001至95重量％，优选0.01至80重量％的范围内。

[0330] 本文所使用的术语是用于描述实施例，而不是要进行限制。如本文所使用的，单数形式“一个”、“和”和“该”包括复数指示物，除非内容和上下文另外明确规定。因此，例如，对“靶分子”的提及可以包括两个或更多个这样的靶分子的组合。除非另有定义，否则所有科学和技术术语应理解为与它们所属领域中通常使用的含义相同。

[0331] 如本文所用，生物学标记(“biomarker”或“marker”)是一种客观测量和评估的特征，可作为正常生物学过程、病原过程或对治疗干预的药理反应的指标，与NIH Biomarker Definitions工作组一致(1998)。标记还可以包括指示特定生物学过程的特征的模式或集合。生物标记测量值可以增加或减少以指示特定的生物事件或过程。另外，如果生物标记测量值通常在不存在特定生物过程的情况下发生变化，则恒定的测量值可以指示该过程的发生。

[0332] 本发明的靶分子或标记可用于诊断和预后目的，以及用于治疗、药物筛选和患者分层目的(例如，将患者分组为多个“亚组”以进行评估)，以及本文所述的其他目的。

[0333] 本发明包括依赖于报道的标记与癌细胞的放射敏感性或放射抗性之间的相关性的所有组合物和方法。这样的方法包括用于确定是否预测癌症患者或肿瘤会响应于放射治疗的方法，以及用于评估放射治疗的功效的方法。其他方法可能包括通过显示患者中的RIBE介导的作用以及可能与照射的位置、数量和类型有关的RIBE介导的作用的水平或严重性，确定是否预测癌症患者或肿瘤会响应放射治疗。此类诊断信息可用于更有效地治疗或杀死例如癌细胞，同时将RIBE降低或改善为预计对放射疗法的给药有反应的正常未暴露细胞。该诊断活性可以在体内或离体完成。

[0334] 还包括通过向受试者施用治疗有效量的改变生物标记的活性或表达的试剂例如CTSB来改善放射疗法的功效的方法。在此上下文中，术语“有效”应被广泛地理解为包括减轻或减轻RIBE的体征或症状、改善RIBE的临床过程、增强癌细胞的杀伤力或减少RIBE的任何其他客观或主观标记。通过使用不同的药物施用条件执行该方法，可以评估不同的药物、剂量和递送途径。标记也可以用作药物组合物或试剂盒。标记还可以用于筛选调节其表达的候选化合物。

[0335] 在一个实施方案中，本发明可以包括用于一种新的RIBE诊断测定的方法和系统，其利用一种或多种标记的表达来响应辐照。在该优选实施例中，可以例如通过活检来提取来自患者的细胞和/或组织。这些细胞/组织本质上可以是癌性的或非癌性的，并且可以取自患者的多个不同位置。这些细胞可能会暴露于变化的辐射水平。可以测量和定量响应于辐射的一种或多种标记例如CTSB的表达水平。该测量可以证明对RIBE敏感的细胞和/或患者，以及开始表达RIBE介导的标记/靶标的阈值，开始表达以及它们的表达水平。如图16所示，在该示例中，响应于治疗中的辐射，CTSB表达水平显示出基于放射线暴露水平以及细胞类型的差异表达。在该实施方案中，可以在放射治疗之前、期间和之后对患者的细胞或组织

进行诊断测定，以优化放射治疗以实现最大程度的癌细胞杀伤并最小化副作用，例如RIBE。例如，对RIBE标记/介体表现出高阈值的患者或癌细胞可能耐受放射治疗的更高和更长的暴露时间，反之亦然。通过这种方式，可以定制放射治疗程序，以适应患者对RIBE和/或其他副作用的可持续性。

[0336] 在本发明技术的某些实施方案中，靶标或市场蛋白，例如CPR-4或CTSB，可以包含“完整蛋白”或一个或多个蛋白片段。本发明的方法可用于评估所列分子的片段以及包含整个所列分子或其至少显著部分(例如，测定的独特表位)的分子以及蛋白质的修饰形式。因此，这些片段、较大分子和修饰形式包括在本发明的范围内。例如，靶分子CTSB;CPR-4;p53;CEP-1;DAF-2;其他胰岛素样生长因子受体;PDK-1激酶，其他PDK激酶;它们相关的信号转导途径可以包括靶蛋白，蛋白片段，表位，催化位点，信号位点，定位位点等。

[0337] 本发明包括所有组合物和方法，其依赖于报道的靶分子如CPR-4和CTSB与癌细胞的放射敏感性(或放射抗性)之间的相关性。本发明包括所有组合物和方法，这些组合物和方法依赖于报道的靶分子如CPR-4和CTSB与癌细胞的放射敏感性(或放射抗性)之间的相关性以及槲皮素或其类似物作为治疗剂的给药RIBE。这样的方法包括用于确定是否预测癌症患者对放射疗法的施用有反应的方法，以及用于评估放射疗法的功效的方法。另一个实施方案包括确定癌症患者是否被预测对槲皮素和/或槲皮素类似物的反应的方法，以及评估槲皮素和/或槲皮素类似物作为用于治疗RIBE的功效的方法。在一个实施方案中，可以测量和/或表征CTSB的表达，使得其可以是接受放射治疗之前的患者或具有严重RIBE的患者可能导致对化学疗法的抵抗的临床结果的预测指标。还包括通过向受试者施用治疗有效量的槲皮素、异槲皮素和/或槲皮素类似物来抑制一种或多种靶分子例如CTSB的活性或表达来改善放射疗法的功效的方法。

[0338] 还包括通过向受试者施用治疗有效量的试剂来改变放射治疗功效的方法，所述试剂改变一种或多种靶分子的活性或表达，例如CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶。在这种情况下，术语“有效”或“治疗有效”应广义地理解为包括减轻或减轻RIBE的体征或症状，改善RIBE的临床过程，或减少RIBE的任何其他客观或主观标记。它还包括减少或减轻癌症的体征或症状，改善疾病的临床病程，或减少疾病的任何其他客观或主观指标，降低癌细胞对化疗的抵抗力，提高正常的非靶向细胞对化学疗法或放射疗法的耐受性，或提高化学疗法和/或放射疗法的有效性。通过使用不同的药物施用条件执行该方法，可以评估不同的药物、剂量和递送途径。分子靶标也可以用作药物组合物或试剂盒。靶还可用于筛选调节其表达的候选化合物。

[0339] 本发明的另外的实施方案包括通过向受试者施用治疗有效量的改变一种或多种靶分子的活性或表达的试剂来改善化学疗法功效的方法，所述试剂例如CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体(INSR)、PDK-1和/或PDK1激酶。在此上下文中，术语“有效”应被广泛地理解为包括降低患者对化学治疗剂的抵抗力，减少或减轻癌症的体征或症状，改善疾病的临床过程或减少疾病的任何其他客观或主观指标。通过使用不同的药物施用条件执行该方法，可以评估不同的药物、剂量和递送途径。分子靶标也可以用作药物组合物或试剂盒。靶还可用于筛选调节其表达的候选化合物。

[0340] 如在本申请中使用的，术语改变或改变一个或多个靶标的表达或活性可以包括降低靶标如CTSB或CPR-4的表达或生物学活性。在另外的实施方案中，术语改变或改变一个或

多个靶标的表达或活性可以包括靶标例如CTSB或CPR-4或信号途径中的其他组分的表达或生物学活性的增加。在这些实施方案中，活性或生物活性可以包括例如改变靶蛋白或mRNA的酶促活性。另外的实施方案可以包括改变靶蛋白的形状或构象，以使其活性降低或增加。在其他实施例中，术语改变或改变一个或多个靶标的表达或活性可以包括减少或增加上游或下游靶标或信号途径中涉及的其他受体或分子。在该实施方案中，改变靶标的表达或活性可以扩增和/或抑制一个或多个相应的信号途径及其组成成分。在其他实施例中，术语改变或改变一个或多个靶标的表达或活性可以包括增加或降低与其他分子或受体的结合亲和力，以及靶标分泌能力的变化或其在细胞、组织、器官或生物体内的移动。分泌的这种改变也可以通过选择性地或普遍地阻断依赖分泌的分子和/或信号途径和/或细胞/膜转运蛋白来实现。

[0341] 预期本文所述的靶分子将与癌症的其他体征、症状和临床检查，例如皮肤检查、皮肤镜检查、淋巴结检查、胸部X光检查、胸部、头部、腹部或骨盆的CT扫描、磁共振成像(MRI)和/或血清乳酸脱氢酶血液检查结合起来进行测量和/或使用。本发明的靶分子以及本领域已知的任何其他靶的测量和/或使用，包括本文中未具体列出的那些，均落入本发明的范围内。

[0342] 如本文所用，短语“基因表达”或“蛋白质表达”，例如“ctsb基因表达的水平”或“CTSB蛋白表达的水平”，包括有关样本中、细胞中、患者中基因转录物或蛋白质数量的任何信息，分泌到样品中，并从细胞中分泌出来，以及有关基因或蛋白质的产生、积累或降解速率的信息(例如，报告基因数据、来自核径流实验的数据、脉冲追踪数据等)。某些类型的数据可能被认为与基因和蛋白质表达有关。例如，细胞中的蛋白质水平反映了蛋白质水平以及转录水平，并且此类数据旨在包含在短语“基因或蛋白质表达信息”中。此类信息可以以以下形式给出：每单位细胞的数量、相对于对照基因或蛋白质的数量、无单位度量等；术语“信息”不限于任何特定的表示方式，并且旨在表示提供相关信息的任何表示。术语“表达水平”是指反映在基因或蛋白质表达数据中或可从基因或蛋白质表达数据得出的量，无论该数据是针对基因转录本积累还是蛋白质积累或蛋白质合成速率等。

[0343] 如本文所用，当化合物已经与与之天然缔合的至少一种组分分离时，该化合物被称为“分离的”。例如，如果代谢物与包括多肽、多核苷酸和其他代谢物的污染物分离，则可以认为是分离的。分离的分子可以合成制备或从其自然环境中纯化。可以采用本领域已知的标准定量方法来获得和分离本发明的分子。

[0344] 可以通过常规技术鉴定本发明的靶分子或蛋白质的同源物和等位基因。如本文所用，与多肽的同源物是来自人或其他动物的与所鉴定的多肽具有高度结构相似性的多肽。本文中鉴定的多肽靶标的人和其他生物同源物的鉴定对于本领域技术人员将是熟悉的。

[0345] 由本文鉴定的靶分子基因编码的多肽可以反映单个多肽或复合物或多肽。因此，在另一个实施方案中，本发明提供了一种多肽，该多肽是本文所述的蛋白质靶分子的片段、前体、后继或修饰形式。在另一个实施方案中，本发明包括蛋白质靶分子，其包含前述片段、前体、后继体或修饰的多肽。如本文所用，多肽的“片段”是指包含具有该多肽序列的至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基或至少30个连续氨基酸残基的氨基酸序列的单个氨基酸或多个氨基酸残基。如本文所用，多核苷酸或寡核苷酸的“片段”是指单个核酸或核酸残基的聚合物，其包含具有多核苷酸序列的至少15个连

续核酸残基、至少30个连续核酸残基、至少60个连续核酸残基或至少90％的核酸序列。在一些实施方案中，片段是抗原性片段，并且片段的大小将取决于诸如抗体识别的表位是线性表位还是构象性表位的因素。因此，一些抗原片段将由更长的片段组成，而另一些抗原片段将由更短的片段组成(例如5、6、7、8、9、10、11或12个或更多的氨基酸长，包括直至多肽全长的每个整数)。本领域技术人员精通选择蛋白质的抗原片段的方法。

[0346] 在一些实施方案中，诸如CPR-4、组织蛋白酶B、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和PDK1激酶等的靶分子是一种或多种生物途径的成员。如本文所用，术语“前体”或“前体”是指在生物途径中在靶多肽或多核苷酸之前或之后的分子。因此，一旦多肽靶标或多核苷酸靶标被鉴定为一个或多个生物途径的成员，则本发明可包括该生物途径的另外的前体或后继成员。生物途径及其成员的这种鉴定在本领域技术人员的能力范围内。

[0347] 另外，本发明包括与本发明的靶多肽分子具有基本相似的序列同一性的多肽。如本文所用，当存在至少约70％的序列同一性、至少约80％的序列同一性、至少约90％的序列同一性、至少约95％的序列同一性、至少约99％的序列同一性，并且它们的氨基酸序列之间最好具有100％的序列同一性时，或在严格杂交条件下编码多肽的多核苷酸能够彼此形成稳定的双链体时，两个多肽具有“基本序列同一性”。例如，可以在多肽中进行保守的氨基酸取代以提供前述靶多肽的功能上等同的变体，即，所述变体可以保留或可以不保留多肽的功能能力。如本文所用，“保守氨基酸取代”是指不改变进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。可以根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体，例如在汇编此类方法的参考文献中可以找到。

[0348] 如本文所用，术语“基因”或“多核苷酸”是指任意长度的单核苷酸或核酸残基的聚合物。多核苷酸可以包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或其类似物，并且可以是双链或单链的。多核苷酸可以包含修饰的核酸(例如，甲基化的)、核酸类似物或非天然存在的核酸，并且可以被非核酸残基中断。例如，多核苷酸包括基因、基因片段、cDNA、分离的DNA、mRNA、tRNA、rRNA、任何序列的分离的RNA、重组多核苷酸、引物、探针、质粒和载体。该定义包括天然或通过干预已修饰的核酸聚合物。

[0349] 在另外的实施方案中，本发明提供了与本文所述的靶多核苷酸分子具有基本序列相似性的多核苷酸。当它们的氨基酸序列之间存在至少约70％的序列同一性、至少约80％的序列同一性、至少约90％的序列同一性、至少约95％的序列同一性或至少99％的序列同一性时，或当多核苷酸在严格杂交条件下能够彼此形成稳定的双链体时，两个多核苷酸具有“基本序列同一性”。这样的条件是本领域众所周知的。如上文关于多肽所述，本发明包括多核苷酸，其是等位基因变体、SNP的结果、或作为遗传密码简并性中固有的天然材料中存在的那些的替代密码子。

[0350] 在本发明的实施方案中，所述方法包括在来自患者的样品中检测一种或多种靶分子的基因表达水平，其中所述靶标的表达水平指示患者是否将响应放射治疗的实施和/或对RIBE过程具有或多或少的抗性。在另一个实施例中，所述方法包括检测患者样品中的蛋白质活性水平，例如CTSB活性，其中靶标的活性水平指示患者是否会对放射疗法的实施产生响应和/或对RIBE进程产生或多或少的抵抗力。在另一个实施方案中，所述方法包括在来自患者的样品中检测基因序列，例如CTSB基因，其中靶基因的序列指示患者是否会对放射疗法的实施产生响应和/或对RIBE进程产生或多或少的耐药性。

[0351] 例如,在一个实施方案中,CTSB蛋白可包括SEQ ID NO.1:

[0352] MWQLWASLCCLLVLANARSRPSFHPLSDELVNYVNKRNTTWQAGHNFYNVDMSYLKRLCGTFLGGPKPPQRVMFTEDLKLPASFDAREQWPQCPTIKEIRDQGSCGSCWAFGAVEAISDRICIHTNAHVSVEVSAEDLLTCCGSMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLYESHVGCRPYSIPPCEHHVNGSRPPCTGEGDTPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSNSEKDIMAEIYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNTDWGDNGFFKILRGQDHCGIESEVVAGIPRTDQYWEKI

[0353] SEQ ID NO.1也包括相同的所有同源物,包括可以产生该蛋白质序列的核酸序列以及具有至少80%同源性的核酸序列。

[0354] 如本文所用,术语“样品”包括来自任何体液或组织(例如,血清、血浆、血液、脑脊髓液、尿液、唾液、癌组织、健康组织)的样品。如本文所用,术语“患者”、“受试者”包括“患有癌症的受试者或患者”和“癌症患者或受试者”、“放射敏感性患者”、“需要放射疗法的患者”、“暴露于放射线的人”,并且“可能受到放射线照射的人”是指已被诊断出患有癌症、已经接受放射治疗、当前正在接受放射治疗、将来可能接受放射治疗、或者已经或将来可能接受某种程度的放射线照射的受试者。“受试者”是任何感兴趣的生物,通常是哺乳动物受试者,例如小鼠、线虫,优选是人类受试者。

[0355] 本发明的靶分子和治疗组合物可用于预测由辐射暴露和/或放射疗法引起的RIBE过程。本发明的靶分子和治疗组合物还可用于确定放射疗法是否可以是针对癌症或其他疾病状况的有效治疗。本发明的靶分子和治疗组合物可用于预测多种癌症类型中的放射结果,包括但不限于,膀胱癌、肺癌、头颈部癌、神经胶细胞瘤、神经胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、髓母细胞瘤、肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、脊索瘤、喉癌、卡波西氏肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、软巢癌、乳癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、睾丸肿瘤、维尔姆斯瘤、尤因瘤、膀胱癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉瘤、乳头状肉瘤、乳头状腺肉瘤、囊腺肉瘤、支气管肺癌、甲状腺癌、肥大细胞瘤、间皮瘤、滑膜瘤、黑色素瘤、子宫平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、少树突胶质瘤、听神经瘤、成血管细胞瘤、血管瘤、松果体瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、上皮癌、胚胎性癌、鳞状細胞癌、基底细胞癌、纤维肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤和白血病。

[0356] 本发明还涵盖与靶分子例如CTSB特异性结合的试剂、化合物、试剂或分子,无论它们是多肽还是多核苷酸。如本文所用,术语“特异性结合”是指结合对(例如抗体和抗原或适配体及其靶标)之间的相互作用。在一些实施方案中,相互作用具有至多10-6摩尔/升、至多10-7摩尔/升或至多10-8摩尔/升的亲和常数。在其他实施方案中,短语“特异性结合”是指一种蛋白质与另一种蛋白质(例如,抗体,其片段或与抗原的结合伴侣)的特异性结合,其中通过任何标准测定法(例如免疫测定法)测量的结合水平在统计学上显著高于该测定法的背景对照。例如,当进行免疫测定时,对照通常包括仅含有抗体或抗原结合片段的反应孔/管(即,在没有抗原的情况下),其中在没有抗原的情况下抗体或其抗原结合片段的一定量的反应性(例如与孔的非特异性结合)被认为是背景。可以使用本领域标准的多种方法来测量结合,包括酶免疫测定法(例如,ELISA)、免疫印迹测定法等。

[0357] 可以结合一个或多个本发明靶标的分子包括抗体、适配体和抗体衍生物或片段。如本文所用,术语“抗体”是指能够结合抗原上存在的表位的免疫球蛋白分子。该术语不仅

涵盖完整的免疫球蛋白分子(例如单克隆和多克隆抗体),而且还涵盖双特异性抗体、人源化抗体、嵌合抗体、特发性(抗-ID)抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab′)片段、融合蛋白和前述的任何修饰,其包含所需特异性的抗原识别位点。

[0358] 如本文所用,适配体是对靶具有期望作用的非天然存在的核酸分子或肽,包括但不限于靶的结合、催化改变靶、与靶标反应以改变/改变靶标或靶标的功能活性的方式、在自杀抑制剂中共价结合到靶标上、促进靶标与另一种分子之间的反应。在一个实施方案中,抗体、抗体衍生物或片段或适配体特异性结合作为一种或多种靶分子的片段、修饰、前体或后继物的组分。

[0359] 本发明的另一方面提供了组合物,其包含靶分子、对靶具有特异性的结合分子(例如抗体或适配体)、靶的抑制剂或通过施用槲皮素、异槲皮素或其类似物可增加或降低靶分子水平或活性的其他分子,例如CTSB。这样的组合物可以是配制成用作治疗剂的药物组合物。或者,本发明提供了一种组合物,其包含一种组分,该组分为包含前述组分的靶分子的片段、修饰、前体或后继。在另一个实施方案中,本发明提供了包含与靶多肽特异性结合的抗体或适配体或包含前述抗体或适配体的分子的组合物。在一些实施方案中,可以使用标准免疫测定法,例如使用匹配的抗体对和化学发光检测的夹心ELISA,来确定靶分子的水平。

[0360] 在本发明的可选择的实施方案中,提供了一种用于评估施用于患者,优选癌症患者的放射治疗的功效的方法。该方法通过在一定时间(t0)从受试者获得第一样品,例如血清或组织来进行;测量生物样品中至少一种靶分子或前体或后继物的水平;将测量的水平与在稍后的时间(t1)对从受试者获得的样品的测量水平进行比较。取决于测量水平之间的差异,可以看出目标水平在时间间隔(trto)中是增加、减少还是保持恒定。随后的样本采集和测量可以在时间t2到tn的范围内根据需要执行多次。如果靶分子保持一致的活性水平或水平,或仅升高到已表明可指示RIBE的预定阈值内,则表明放射疗法未导致RIBE或显著的RIBE过程,并且可以增加或修改辐射暴露的数量和/或持续时间。另一方面,靶分子水平(例如CTSB)的增加超过已表明可指示RIBE的预定阈值,则表明放射治疗已或将导致RIBE或显著的RIBE过程,并且可以减少或修改辐射暴露的数量和/或持续时间。

[0361] 在另一方面,本发明提供了用于改善癌症患者对放射治疗的反应、预防放射治疗或放射暴露后的RIBE或减轻RIBE的方法。所述方法包括给予治疗有效量的至少一种抑制CTSB及其任何同系物或变体活性的药物,例如槲皮素、异槲皮素或其类似物和/或E64、CA074或CA074Me及其类似物。在一些实施方案中,可以在施用放射疗法之前,即在施用或开始放射疗法之前,预防性地施用药剂。在一些实施方案中,可以在可检测的RIBE发作时与放射疗法的施用同时或同时地或在放射疗法之后给予药剂。

[0362] 如本文所用,术语“试剂”是指化学或生物分子,例如简单或复杂的有机分子、肽、多肽或蛋白质或可以抑制靶分子的表达或活性的核酸分子,例如CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1和PDK1激酶以及任何同源或变异蛋白以及任何同源或变异蛋白。此类分子可以商业购买或使用本领域已知的方法合成。用作试剂的合适有机分子可以包括能够抑制靶分子活性的合成或天然药物。术语“试剂”还可以指槲皮素、异槲皮素或其类似物/衍生物的化合物。

[0363] 在一些实施方案中,所述试剂可以是多肽或蛋白质。一方面,蛋白质是与靶蛋白质

或多肽特异性反应的抗体，例如CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1、PDK1激酶和任何同源或变异蛋白，其可有效降低目标蛋白或多肽的生物学活性。例如，通过使用衍生自靶蛋白或多肽的免疫原，例如基于cDNA序列，可以通过标准方案制备抗蛋白/抗肽抗血清或单克隆抗体。

[0364] 可以用免疫原性形式的靶标免疫哺乳动物，例如小鼠、仓鼠或兔子(例如，CPR-4、组织蛋白酶B(CTSB)、CEP-1、p53、DAF-2、胰岛素/IGF受体、PDK-1、PDK1激酶和任何能够引起抗体应答的同源或变异蛋白或多肽或抗原片段，或融合蛋白)。赋予蛋白质或肽免疫原性的技术包括缀合至载体或本领域熟知的其他技术。可以在佐剂存在下施用靶蛋白或多肽的免疫原性部分，例如CPR-4。可以通过检测血浆或血清中的抗体滴度来监测免疫进程。可将标准ELISA或其他免疫测定与免疫原作为抗原一起使用，以评估抗体水平。

[0365] 在预选的实施方案中，所述抗体对哺乳动物的靶蛋白或多肽(例如组织蛋白酶B(CTSB))的抗原决定簇具有免疫特异性。在一实例中，在用CPR-4或CTSB蛋白或多肽的抗原制剂免疫动物后，可获得抗CPR-4或抗CTSB抗血清，并且如果需要，可以从血清中分离出多克隆抗CPR-4或抗CTSB抗体。为了产生单克隆抗体，可以从被免疫的动物中收获产生抗体的细胞(淋巴细胞)，并通过标准的体细胞融合程序与永生化细胞(如骨髓瘤细胞)融合以产生杂交瘤细胞。同样，这样的技术在本领域中是众所周知的。可以通过免疫化学方法筛选杂交瘤细胞，以产生与哺乳动物CPR-4或CTSB蛋白或多肽特异性反应的抗体，以及从包含此类杂交瘤细胞的培养物中分离得到的单克隆抗体。

[0366] 在某些优选的实施方案中，本发明的抗体是单克隆抗体，并且在某些实施方案中，本发明提供了用于产生新抗体的方法。例如，用于产生特异性结合CPR-4或CTSB蛋白或多肽的单克隆抗体的方法可以包括给小鼠施用一定量的免疫原性组合物，其包含有效刺激可检测的免疫反应的CPR-4或CTSB蛋白或多肽，从小鼠获得抗体产生细胞(例如，来自脾脏的细胞)并将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合以获得抗体产生杂交瘤，并测试产生抗体的杂交瘤以鉴定产生与CPR-4或CTSB蛋白或多肽特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。一旦获得杂交瘤，就可以在细胞培养物中繁殖，可选地在培养条件下繁殖，在该培养条件下，杂交瘤来源的细胞会产生与CPR-4或CTSB蛋白或多肽特异性结合的单克隆抗体。单克隆抗体可以从细胞培养物中纯化。影响抗体:抗原相互作用的特异性的一个特征是抗体对抗原的亲和力。尽管可以通过一系列不同的亲和力实现所需的特异性，但是通常优选的抗体将具有约10-6、10-7、10-8、10-9或更小的亲和力(解离常数)。

[0367] 在一些实施方案中，试剂可以是核酸分子。在某些方面，核酸分子可以是RNAi、核酶、反义、DNA酶或其他用于操纵(通常降低)靶标表达或活性的核酸相关组合物。这可以包括单独地或组合地改变诸如CPR-4、CTSB或任何其他靶分子的靶的表达。(应当注意，尽管优选的实施方案可以使用CPR-4或CTSB作为示例性模型，但这并不是对构成本发明的许多靶分子的限制。)本发明的一些实施方案利用了通过RNA干扰(RNAi)影响靶基因如CPR-4和/或CTSB基因的材料和方法。RNAi是在真核细胞中发生的序列特异性转录后基因阻抑的过程。通常，此过程涉及由与该序列同源的双链RNA(dsRNA)诱导的特定序列的mRNA降解。可以通过引入与该基因的mRNA的全部或大部分相对应的dsRNA来抑制任何选择的基因。似乎当表达长的dsRNA时，它最初被核糖核酸酶III加工成长度短至21至22个碱基对的较短的dsRNA寡核苷酸。

[0368] 因此,RNAi可以通过引入或表达相对较短的同源dsRNA来实现。用于影响RNAi的双链寡核苷酸的长度优选小于30个碱基对,更优选包含约25、24、23、22、21、20、19、18或17个核糖核酸碱基对。任选地,本发明的dsRNA寡核苷酸可包括3'突出端。示例性的2-核苷酸3'突出端可以由任何类型的核糖核苷酸残基组成,甚至可以由2'-脱氧胸苷残基组成,这降低了RNA合成的成本,并且可以增强细胞培养基中和转染细胞内siRNA的核酸酶抗性(参见Elbashi等人(2001)Nature 411:494-8)。

[0369] 50、75、100或什至500个碱基对或更长的更长的dsRNA也可用于本发明的某些实施方案中。用于影响RNAi的dsRNA的示例浓度约为0.05nM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、1.5nM、25nM或100nM,尽管可以根据治疗细胞的性质、患者、患者的放射线暴露水平、基因靶标和其他因素容易采用其他浓度,但本领域技术人员可以容易地辨别。示例性dsRNA可以化学合成或使用合适的表达载体在体外或体内产生。示例性合成RNA包括使用本领域已知方法化学合成的21个核苷酸RNA(例如Expedite RNA phophoramidites andthymidine phosphoramidite (Proligo,Germany))。

[0370] 合成的寡核苷酸优选使用本领域已知的方法脱保护并凝胶纯化(参见,例如Elbashir et al.(2001)Genes Dev.15:188-200)。更长的RNA可以从本领域已知的启动子例如T7 RNA聚合酶启动子转录。放置在体外启动子下游两个可能方向上的单个RNA靶标将转录靶标的两条链,以创建所需靶标序列的dsRNA寡核苷酸。任何上述RNA物种都将被设计为包括靶基因中代表的一部分核酸序列,例如在某些实施方案中,在严格和/或生理条件下与CPR-4mRNA或CTSB mRNA及其补体杂交的核酸。

[0371] 在寡核苷酸的设计中使用的特定序列可以是靶标的表达的基因信息内包含的核苷酸的任何连续序列。本领域已知的程序和算法可用于选择适当的靶序列。另外,可以利用设计用于预测特定单链核酸序列的二级结构并允许选择可能发生在折叠的mRNA的暴露单链区域中的那些序列的程序来选择最佳序列。用于设计合适的寡核苷酸的方法和组合物可以在例如美国专利No.6,251,588找到,其内容通过引用并入本文。

[0372] Messenger RNA(mRNA)通常被认为是一种线性分子,其中包含在核糖核苷酸序列内指导蛋白质合成的信息,但是研究表明大多数mRNA中都存在许多二级和三级结构。RNA中的二级结构元件主要由同一RNA分子不同区域之间的Watson-Crick型相互作用形成。重要的二级结构元件包括分子内双链区、发夹环、双链体RNA中的凸起和内部环。当二级结构元件彼此接触或与单链区域接触以产生更复杂的三维结构时,形成三级结构元件。许多研究人员已经测量了许多RNA双链体结构的结合能,并得出了一套可用于预测RNA二级结构的规则(参见,例如Jaeger et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:7706(1989);and Turner et al.(1988)Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chern.17:167)。该规则可用于鉴定RNA结构元件,特别是用于鉴定单链RNA区域,其可代表mRNA的优选区段以靶向沉默RNAi、核酶或反义技术。因此,可以鉴定mRNA靶标的优选区段,以用于设计介导RNAi的dsRNA寡核苷酸以及用于设计与本发明的靶标有关的合适的核酶和锤头状核酶组合物。

[0373] 可以使用载体组合物如脂质体,通过异源靶基因的转染将dsRNA寡核苷酸引入细胞中,这是本领域已知的,如粘附细胞系的制造商所述。用于靶向内源基因的dsRNA寡核苷酸的转染可以使用Oligofectamine进行。共编码hGFP的pAD3转染后,可以使用荧光显微镜检查哺乳动物细胞系的转染效率(Kehlenback et al.(1998)J Cell BioI 141:863-74)。

引入dsRNA后，可通过多种检测方法评估RNAi的有效性。这些方法包括蛋白质印迹分析，使用的抗体可识别CPR-4或CTSB基因产物，经过足够的时间在新蛋白合成被抑制后内源池的更新，逆转录酶聚合酶链反应和Northern印迹分析以确定现有靶标mRNA的水平，例如CPR-4或CTSB。RNAi技术的其他组合物、方法和应用在美国专利申请号6,278,039、5,723,750和5,244,805中提供，其通过引用并入本文。

[0374] 设计用于催化裂解的核酶分子，例如CPR-4或CTSB mRNA转录物，也可用于防止多种动物系统中受试者mRNA的翻译和/或CPR-4或CTSB的表达。(例如，参见PCT国际申请WO90111364，1990年10月4日公开；Sarver等人(1990)Science 247:1222-1225，美国专利申请No.5,093,246)。核酶是能够催化RNA特异性切割的酶促RNA分子。(有关评论，请参阅Rossi(1994)Current Biology 4:469-471)。核酶作用的机制涉及核酶分子与互补靶RNA的序列特异性杂交，然后发生内切核酸酶裂解事件。核酶分子的组成优选包含一个或多个与CPR-4或CTSB mRNA互补的序列，以及负责mRNA切割的众所周知的催化序列或功能等效的序列(参见，例如，美国专利No.5,093,246，其通过引用整体并入本文)。

[0375] 除了在位点特异性识别序列上切割mRNA的核酶外，锤头状核酶也可用于破坏靶mRNA。锤头状核酶在由与靶mRNA形成互补碱基对的侧翼区域所决定的位置切割mRNA。优选地，靶mRNA具有以下两个碱基的序列：5'-mUG-3'。锤头状核酶的构建和生产在本领域中是众所周知的，在Haseloff和Gerlach中有更全面的描述((1988)Nature 334:585-591；PCT申请No.WO89/05852，其内容通过引用并入本文)。锤头状核酶序列可嵌入稳定的RNA中，例如转移RNm(tRNA)，以提高体内裂解效率(Perriman等人(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.mUSA,92:6175-79；de Feyter,和Gaudron,Methods in Molecular Biology,Vol.74,Chapter 43,"Expressing Ribozymes in Plants",Edited by Turner,P.C,Humana Press Inc.,Totowa,N.J.)。特别地，RNA聚合酶HI介导的tRNA融合核酶的表达是本领域众所周知的(参见Kawasaki et al.(1998)Nature 393:284-9；Kuwabara et al.(1998)Nature Biotechnol.16:961-5；and Kuwabara et al.(1998)Mol.Cell 2:61727；Koseki et al.(1999)J Virol 73:1868-77；Kuwabara et al.(1999)Proc Natl Acad Sci USA 96:m1886-91；Tanabe et al.(2000)Nature 406:473-4)。在给定的目标cDNA序列中，通常有许多潜在的锤头状核酶切割位点。优选地，对核酶进行工程改造，使得切割识别位点位于靶mRNA的5'端附近，以提高效率并使非功能性mRNA转录本的细胞内积累最小化。此外，使用位于靶序列中的任何切割识别位点，其编码例如靶标的长和短形式的C末端氨基酸结构域的不同部分，将允许选择性靶向一种或另一种形式的靶标，因此对一种形式的靶标基因产物具有选择性作用。基因靶向核酶必须包含一个与两个区域互补的杂交区域，每个区域至少为5个，最好CPR-4或CTSB mRNA的长度为6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核苷酸。另外，核酶具有高度特异性的核糖核酸内切酶活性，可自动催化切割靶标有义mRNA。

[0376] 本发明扩展到核酶，其与编码CPR-4或CTSB基因的正义mRNA杂交，从而与正义mRNA杂交并对其进行切割，从而使其不再能够被翻译以合成功能性多肽产物。核酶可以由修饰的寡核苷酸组成(例如，用于改善的稳定性、靶向性等)，并且应该被递送到体内表达靶基因的细胞中。一种优选的递送方法包括在强组成型pol III或pol II启动子的控制下使用"编码"核酶的DNA构建体，这样转染的细胞将产生足够量的核酶，以破坏内源性靶标信息并抑

制翻译。

[0377] 由于核酶与反义分子不同,具有催化作用,因此需要较低的细胞内浓度才能有效发挥作用。本发明的另一方面涉及分离的“反义”核酸在抑制表达中的用途,例如通过抑制受试者的CPR-4或CTSB核酸的转录和/或翻译。反义核酸可以通过常规碱基对互补性,或者例如在与DNA双链体结合的情况下,通过双螺旋的主要凹槽中的特异性相互作用,与潜在的药物靶标结合。通常,这些方法涉及本领域通常采用的技术范围,并且包括依赖于与寡核苷酸序列的特异性结合的任何方法。

[0378] 本发明的反义构建体可以例如作为表达质粒递送,当在细胞中转录时,该表达质粒产生RNA,该RNA至少与编码CPR-4或CTSB多肽的细胞mRNA的独特部分互补。备选地,反义构建体是寡核苷酸探针,其是离体产生的,并且当引入细胞中时通过与CPR-4或CTSB核酸的mRNA和/或基因组序列杂交而引起表达的抑制。这样的寡核苷酸探针优选是修饰的寡核苷酸,其对内源核酸酶例如核酸外切酶和/或核酸内切酶具有抗性,因此在体内是稳定的。用作反义寡核苷酸的示例性核酸分子是DNA的氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和甲基膦酸酯类似物(也参见美国专利5,176,996、5,264,564和5,256,775)。另外,例如,Van derKrol等人(1988)BioTechniques6:958-976;以及Stein等人(1988)CancerRes 48:2659-2668综述了构建可用于反义疗法的低聚物的一般方法。

[0379] 反义方法涉及与编码CPR-4或CTSB多肽的mRNA互补的寡核苷酸(DNA或RNA)的设计。反义寡核苷酸可与mRNA转录物结合并阻止翻译。尽管首选,但绝对不需要互补。在双链反义核酸的情况下,因此可以测试双链DNA的单链,或者可以测定三链体的形成。杂交的能力将取决于互补程度和反义核酸的长度。通常,杂交核酸越长,它可能包含的RNA与碱基的错配越多,并且仍会形成稳定的双链体(视情况而定)。本领域技术人员可以通过使用标准程序确定杂交复合物的熔点来确定可容许的错配程度。与mRNA的5’端互补的寡核苷酸,例如直至并包括AUG起始密码子的5’]非翻译序列,应在抑制翻译方面最有效。然而,已经显示出与mRNA的3’非翻译序列互补的序列也有效抑制mRNA的翻译。

[0380] 因此,可以在反义方法中使用与基因的5’或3’非翻译非编码区互补的寡核苷酸,以抑制该mRNA的翻译。与mRNA 5’非翻译区互补的寡核苷酸应包括AUG起始密码子的补体。与mRNA编码区互补的反义寡核苷酸是效率较低的翻译抑制剂,但是也可以根据本发明使用。无论设计成与mRNA的5’、3’或编码区杂交,反义核酸的长度应至少为六个核苷酸,并且优选小于约100个核苷酸,更优选长度小于约50、25、17或10个核苷酸。

[0381] 反义寡核苷酸可以是单链或双链的DNA或RNA或其嵌合混合物或衍生物或修饰形式。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸骨架上被修饰,例如,以改善分子的稳定性、杂交等。寡核苷酸可以包括其他附加基团,例如肽(例如,用于靶向宿主细胞受体)、或促进跨细胞膜(参见例如Letsinger et al.,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:6553-6556;Lemaitre et al.,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.84:648-652;PCT公开No.W088/09810,1988年12月15日公开)或血脑屏障(参见例如PCT公开No.W089110134,1988年4月25日公开)运输的化合物、杂交触发的裂解剂(参见,例如,Krol et al.,1988,BioTechniques 6:958-976)或嵌入剂(参见,例如,Zon,1988,Pharm.Res.5:539-549)。为此,寡核苷酸可以与另一种分子例如肽、杂交触发的交联剂、转运剂、杂交触发的裂解剂等缀合。

[0382] 反义寡核苷酸可包含至少一个选自以下的组的修饰的碱基部分,该组包括但不限

于:5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟乙基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基肌苷、肌苷、N 6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、III甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟乙酸(v)、Wybutoxosine、拟尿嘧啶、奎宁、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫脲嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、5-甲基-2-硫脲嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w和2,6-二氨基嘌呤。

[0383] 反义寡核苷酸还可以包含选自以下的至少一个修饰的糖部分,该组包括但不限于:阿拉伯糖、2-氟阿拉伯糖、木酮糖和己糖。反义寡核苷酸还可包含中性肽样主链。这样的分子被称为肽核酸(PNA)-低聚物,并且描述于例如Perry-O'Keefe等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:14670和Eglom等人(1993)Nature 365:566。PNA寡聚物的一个优点是由于DNA的中性主链,它们基本上独立于培养基的离子强度而与互补DNA结合的能力。在又一个实施方案中,反义寡核苷酸包含至少一个选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、烷基磷酸三酯及其甲缩醛或类似物的修饰的磷酸骨架。

[0384] 本发明的另一方面涉及DNA酶抑制CPR-4基因或CTSB基因表达的用途。DNA酶融合了反义和核酶技术的某些机械特性。对DNA酶进行设计,使其能够识别特定的靶核酸序列,非常类似于反义寡核苷酸,然而,就像核酶一样,它们具有催化作用并特异性切割靶核酸。目前存在两种基本类型的DNA酶,并且这两种类型均由Santoro和Joyce鉴定(参见,例如,美国专利号6,110,462)。10-23DNA酶包含连接两个臂的环结构。两条臂通过识别特定的靶核酸序列提供特异性,而环结构在生理条件下提供催化功能。简而言之,为了设计特异性识别和切割靶核酸的理想DNA酶,本领域技术人员必须首先鉴定独特的靶序列。可以使用与反义寡核苷酸概述的方法相同的方法来完成此操作。优选地,独特或基本序列是富含G/C的约18至22个核苷酸。高的G/C含量有助于确保DNA酶与靶序列之间更强的相互作用。合成DNA酶时,将以该酶为目标的特定反义识别序列分开,这样它就包含了DNA酶的两个臂,而DNA酶环位于两个特定臂之间。制备和施用DNA酶的方法可以在例如美国专利No.6,110,462找到。类似地,体外或体内递送DNA核酶的方法包括上文详细概述的RNA核酶的递送方法。另外,本领域技术人员将认识到,与反义寡核苷酸一样,DNA酶可任选地被修饰以提高稳定性并提高抗降解性。

[0385] 可以通过本领域已知的用于合成DNA和RNA分子的任何方法来制备本发明的反义RNA和DNA、核酶,RNAi构建体,包括本领域熟知的化学合成寡脱氧核糖核苷酸和寡核糖核苷酸的技术,例如固相亚磷酰胺化学合成。或者,可以通过在体外和体内转录编码反义RNA分子的DNA序列来产生RNA分子。可以将此类DNA序列掺入多种载体中,所述多种载体掺入合适的RNA聚合酶启动子,例如T7或SP6聚合酶启动子。或者,可以将取决于使用的启动子组成性或诱导性合成反义RNA的反义cDNA构建体稳定地引入细胞系中。此外,可以引入对核酸分子的各种众所周知的修饰作为增加细胞内稳定性和半衰期的手段。可能的修饰包括但不限于将核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的侧翼序列添加至分子的5'和/或3'末端,或在寡脱氧核

糖核苷酸主链内使用硫代磷酸酯或2'O-甲基而不是磷酸二酯酶键。

[0386] 在一些实施方案中,所述试剂是适配体。适配体是与特定靶分子结合的核酸或肽分子。适配体可以通过与靶分子结合而抑制其活性。

[0387] 本发明的另一方面涉及DNA编辑组合物和方法在抑制、改变、破坏表达和/或替换一个或多个靶基因中的用途。在各种实施方案中,可以通过CRISPR/Cas-9、TALAN或锌(Zn2+)指核酸酶系统改变一个或多个靶基因。

[0388] 在一些实施方案中,用于改变基因表达的试剂是CRISPR-Cas9或其功能等同物,以及安排用于靶向一个或多个靶基因的合适的RNA分子,例如cpr-4、ctsb或其任何同源/直系同源物。例如,本发明的一个实施方案可包括引入一种或多种由CRISPR/Cas9系统利用的指导RNA(gRNA),以破坏、替代或改变一种或多种靶基因的表达或活性。

[0389] 在这种情况下,基因编辑CRISPR/cas-9技术是一种RNA指导的基因编辑平台,该平台利用细菌衍生的蛋白质(Cas9)和合成的指导RNA在基因组内的特定位置引入双链断裂。通过用Cas9蛋白和专门设计的指导RNA(gRNA)转染细胞或受试者来实现编辑,该指导RNA通过与其匹配的基因组序列杂交来指导切割。通过使用这项技术,可以在一个或多个目标基因中引入特定的遗传改变。在一些实施方案中,该CRISPR/cas-9可以用于以修饰版本替代一个或多个现有野生型基因,而其他实施方案可以包括添加改变、减少、增加或敲除诸如cpr-4或ctsb等靶基因表达的遗传元件。

[0390] 在一些实施方案中,用于改变基因表达的试剂是锌指或锌指核酸酶或其他等同物。如本文所用,术语"锌指核酸酶"或"锌指核酸酶"是指包含与包含锌指阵列的结合域缀合的核酸裂解域的核酸酶。在一些实施方案中,切割结构域是II型限制性核酸内切酶FokI的切割结构域。锌指核酸酶可以设计成靶向给定核酸分子中的几乎任何所需序列进行切割,并且设计锌指结合结构域以结合复杂基因组背景下的独特位点的可能性允许在活细胞中靶向切割单个基因组位点,例如实现治疗价值的目标基因组改变。由于非同源DNA修复途径的易错性质,将双链断裂靶向期望的基因组基因座可用于将移码突变引入基因的编码序列。

[0391] 可以通过本领域技术人员众所周知的方法产生锌指核酸酶以靶向感兴趣的位点。例如,可以通过结合已知特异性的各个锌指基序来设计具有期望特异性的锌指结合结构域。与DNA结合的锌指蛋白Zif268的结构已为该领域的许多工作提供了信息,并且为64种可能的碱基对三联体中的每一个获得锌指,然后已经描述了混合和匹配这些模块化锌指以设计具有任何所需序列特异性的蛋白质(Pavletich NP,Pabo Colo.(May 1991)."Zinc finger-DNA recognition:crystal structure ofa Zif268-DNA complex at 2.1A".Science 252(5007):809-17,其全部内容结合在此)。

[0392] 在一些实施方案中,分别识别3个碱基对的DNA序列的不同锌指结合在一起,生成3个、4个、5个或6个手指的阵列,这些阵列可以识别长度从9个碱基对到18个碱基对的目标位点。在一些实施方案中,考虑更长的阵列。在其他实施方案中,将识别6-8个核苷酸的2指模块组合以产生4、6或8锌指阵列。在一些实施方案中,细菌或噬菌体展示被用于发展锌指结构域,该锌指结构域识别所需的核酸序列,例如长度为3-30bp的所需的核酸酶靶位点。

[0393] 在一些实施方案中,锌指核酸酶包含通过接头例如多肽接头彼此融合或以其他方式缀合的锌指结合结构域和切割结构域。接头的长度决定了与由锌指结构域结合的核酸序

列的切割距离。如果使用较短的接头,则切割结构域将使核酸更靠近结合的核酸序列切割,而较长的接头将导致切割与结合的核酸序列之间的距离更大。在一些实施方案中,锌指核酸酶的切割结构域必须二聚化以切割结合的核酸。在某些此类实施例中,二聚体是两个单体的异二聚体,每个单体包含不同的锌指结合结构域。例如,在一些实施方案中,二聚体可包含一种包含与FokI切割结构域缀合的锌指结构域A的单体,和一种包含与FokI切割结构域缀合的锌指结构域B的单体。在该非限制性实例中,锌指结构域A结合在靶位点的一侧上的核酸序列,锌指结构域B结合在靶位点的另一侧上的核酸序列,并且二聚化的FokI结构域切割了锌指结构域结合位点之间的核酸。

[0394] 如本文所用,术语“锌指”是指小核酸结合蛋白的结构基序,其特征在于折叠以及稳定该折叠的一个或多个锌离子的配位。锌指包含多种不同的蛋白质结构(例如Klug A,Rhodes D(1987).“Zinc fingers:a novel protein fold for nucleic acid recognition”.Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.52:473-82,其全部内容通过引用合并于此)。锌指可被设计为结合特定的核苷酸序列,而包含一系列锌指的融合体的锌指阵列可被设计为实际上结合任何期望的靶序列。这样的锌指阵列可以形成蛋白质(例如核酸酶)的结合域,例如,如果缀合至核酸切割结构域。锌指图案的不同类型是本领域技术人员已知的,包括但不限于,Cys2His2、Gag knuckle、Treble clef、锌带、Zn2/Cys6和TAZ2类域基序(参见例如Krishna S S,Majumdar I,GrishinN V(January 2003).“Structural classification of zinc fingers:survey and summary”.NucleicAcids Res.31(2):532-50)。通常,单个锌指基序结合一个核酸分子的3个或4个核苷酸。因此,包含2个锌指基序的锌指结构域可以结合6-8个核苷酸,包含3个锌指基序的锌指结构域可以结合9-12个核苷酸,包含4个锌指基序的锌指结构域可以结合12-16个核苷酸,等等。可以采用任何合适的蛋白质工程技术来改变锌指的DNA结合特异性和/或设计新颖的锌指融合体,以结合3至30个核苷酸的几乎任何所需靶序列(参见例如Pabo C O,Peisach E,Grant RA(2001).“Design and selection of novel cys2H is2 Zinc finger proteins”.Annual Review of Biochemistry 70:313-340;Jamieson A C,Miller J C,Pabo C O(2003).“Drug discovery with engineered zinc-finger proteins”.Nature Reviews Drug Discovery 2(5):361-368;and Liu Q,Segal D J,Ghiara J B,Barbas C F(May 1997).“Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes”.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94(11);通过引用将其全部内容并入本文)。

[0395] 工程化的锌指阵列与切割核酸的蛋白质结构域之间的融合可用于产生“锌指核酸酶”。锌指核酸酶通常包含结合核酸分子内特定靶位点的锌指结构域,以及核酸切割结构域,其切割由结合结构域结合的靶位点内或附近的核酸分子。典型的工程化锌指核酸酶包含结合结构域,该结合结构域具有3至6个单独的锌指基序和结合靶位点,其长度范围为9个碱基对至18个碱基对。在需要结合和切割给定基因组中唯一的靶位的情况下,更长的靶位特别有吸引力。

[0396] 在一些实施方案中,用于改变靶基因的试剂是TALEN系统或其等同物。如本文所用,术语TALEN或“转录激活因子样元件核酸酶”或“TALE核酸酶”是指人工核酸酶,其包含与DNA切割域例如FokI结构域的转录激活子如效应子DNA结合结构域。已经报告了许多用于生成工程TALE构建体的模块化组装方案(Zhang,Feng;et.al.(2011年2月).“Efficient

construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription".Nature Biotechnology 29(2):149-53;Geibler,R.;Scholze,H.;Hahn,S.;Streubel,J.;Bonas,U.;Behrens,S.E.;Boch,J.(2011),Shiu,Shin-Han.ed."Transcriptional Activators ofHuman Genes with Programmable DNA-Specificity".PLoS ONE 6(5):e19509;Cermak,T.;Doyle,E.L.;Christian,M.;Wang,L.;Zhang,Y.;Schmidt,C.;Baller,J.A.;Somia,N.V.et al.(2011)."Efficient design and assembly ofcustom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting".Nucleic Acids Research;Morbitzer,R.;Elsaesser,J.;Hausner,J.;Lahaye,T.(2011)."Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning".Nucleic Acids Research;Li,T.;Huang,S.;Zhao,X.;Wright,D.A.;Carpenter,S.;Spalding,M.H.;Weeks,D.P.;Yang,B.(2011)."Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes".Nucleic Acids Research.;Weber,E.;Gruetzner,R.;Werner,S.;Engler,C.;Marillonnet,S.(2011).Bendahmane,Mohammed.ed."Assembly of Designer TAL Effectors by Golden Gate Cloning".PLoS ONE 6(5):e19722;上述每个文献都通过引用并入本文)。

[0397] 本领域技术人员将理解,可以对TALE核酸酶进行工程改造以实际上以高特异性靶向任何基因组序列,并且此类工程化的核酸酶可用于本技术的实施方案中,以在适于TALEN结合并切割其靶序列在细胞基因组内的情况下,例如通过本文公开的方法或策略递送各自的TALEN来操纵细胞的基因组。在一些实施方案中,所递送的TALEN靶向与疾病或病症或生物过程相关的基因或等位基因,例如RIBE,或一个或多个靶基因。在一些实施方案中,将TALEN递送给受试者赋予该受试者治疗上的益处,例如减少、改善或消除患者中的RIBE。

[0398] 在一些实施方案中,细胞、组织、器官或生物体的靶基因是通过本文公开的策略或方法通过传递给细胞的核酸酶来改变的,例如CRISPR/cas-9、TALEN或锌-指核酸酶、或多种或多种此类核酸酶的组合。在一些实施方案中,通过核酸酶将单链或双链断裂引入基因组内的特定位点,导致靶基因组序列的破坏。

[0399] 在一些实施方案中,靶基因组序列是靶基因编码区内的核酸序列。在一些实施方案中,核酸酶引入的链断裂导致靶基因内的突变,从而削弱了编码基因产物的表达。在一些实施方案中,核酸与核酸酶共同递送至细胞。在一些实施方案中,该核酸包含与邻近核酸酶靶位点的序列相同或同源的序列。在某些此类实施例中,受核酸酶影响的链断裂被细胞DNA修复机制修复,以在断裂位点将全部或部分共同递送的核酸引入细胞DNA,导致共递送的核酸或其部分的靶向插入。在一些实施方案中,插入导致不需要的等位基因的破坏或修复。在一些实施方案中,核酸通过与超负荷蛋白质缔合而共同递送。在一些实施方案中,增压的蛋白质还与功能性效应蛋白例如核酸酶相关。在一些实施方案中,核酸酶向靶细胞的递送导致基因功能的临床或治疗上有益的改变。

[0400] 在一些实施方案中,通过来自体外的本文提供的系统或方法,获得了来自受试者的细胞,并且核酸酶或其他效应蛋白被递送至细胞。在一些实施方案中,对于其中期望的核酸酶介导的基因组编辑事件已受影响的那些细胞,选择经处理的细胞。在一些实施方案中,携带期望的基因组突变或改变的经处理的细胞返回到其来源。

[0401] 本发明的术语"治疗有效量"是指有效改善患者对具有癌症或其他疾病状况的放

射疗法的反应、降低放射疗法或放射线照射后的RIBE、降低癌症对放射线或化学疗法的抵抗力、提高放射线和化学疗法的功效、增强耐受更高剂量放射治疗的能力的量。每施用组合物的受试者的体重，这样的量可包含约0.001至约500mg或甚至1000mg或更多的化合物。可以根据本领域普通技术人员满意的任何给药方案来给予治疗有效量。

[0402] 例如，对人的有效剂量包括约50mg/kg体重的剂量，对于75kg的人而言，这将转化为每天约3750mg。有效量的槲皮素包括约100毫克/天(0.1克/天)至约50000毫克/天(50克/天)之间，优选在约1000mg/天至30000mg/天之间，更优选在约1000mg/天至约15000mg/天之间，还更优选在1000mg/天至约5000mg/天。在一个示例性实施例中，槲皮素以100mg至2000mg/天的剂量提供给人类受试者。剂量与体重、健康状况、年龄和相对于个人的期望效果有关。因此，剂量可以根据给药方案、体重、年龄等而变化。即使对于体重低的成年人，例如一个100磅的成年人，本文所述的剂量也是安全的。在本文所述的最高剂量下没有毒性作用。但是，本文所述的剂量优选以较低的剂量用于体重较小的受试者，而以较高的剂量给予体重较大的受试者。

[0403] 在一些实施方案中，试剂以药物组合物的形式施用给所述受试者，例如，槲皮素、异槲皮素，在一个优选的实施方案中，或其类似物/衍生物和/或E64、CA074或CA074Me及其类似物。因此，本文还提供了包含本发明的试剂和药学上可接受的载体的药物组合物，其在本领域中通常被接受用于将生物活性剂递送给动物，特别是人。本文所用短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症，且具有合理的获益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0404] 在一个优选的实施方案中，该试剂可以药学上可接受的盐或前药的形式给药，该试剂在优选的实施方案中可以包括槲皮素、异槲皮素或其类似物/衍生物。术语“药学上可接受的盐”是指所公开的试剂或化合物的衍生物，其中所述试剂或母体化合物通过制备其酸式或碱式盐而被修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基(例如胺)的无机或有机酸盐，或酸性残基(例如羧酸)的碱或有机盐。药学上可接受的盐包括例如由无毒的无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐或季铵盐。这样的常规无毒盐包括衍生自无机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等)的那些；由有机酸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、pamolc、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺酰苯胺、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸等制备的盐。药学上可接受的盐是那些形式的试剂，适合与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、变态反应或其他问题或并发症，且具有合理的获益/风险比。

[0405] 药学上可接受的盐形式可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的试剂合成。通常，这样的盐例如是通过使这些试剂的游离酸或碱形式与化学计量的合适的碱或酸在水或有机溶剂中，或在两者的混合物中反应而制备的。通常，非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的清单可见于Remington's Pharmaceutical Sciences，第17版，MackPublishing Company，Easton，PA，1985年的第1418页。

[0406] “前药”旨在包括当将这种前药施用于哺乳动物受试者时在体内释放本发明的活性母体药物或试剂的任何共价键合的载体。由于已知前药可增强许多期望的药物品质(即

溶解度、生物利用度、半衰期、制造等)，因此本发明的药剂可以前药形式递送。因此，本发明旨在涵盖目前要求保护的化合物的前药，其递送方法以及包含该药物的组合物。

[0407] 通过以这样的方式修饰试剂中存在的官能团来制备本发明的前药，所述修饰在常规操作中或在体内被裂解为活性剂。前药包括本发明的药剂，其中酰基、羟基、氨基或巯基分别键合至当将本发明的前药给予哺乳动物受试者时被裂解形成游离的乙酰基、羟基、游离氨基或游离巯基的任何基团。前药的实例包括但不限于本发明试剂中的醇和胺官能团的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物。本领域技术人员将理解，一些具有手性中心的试剂可以以旋光和外消旋形式存在，并且可以以旋光和外消旋形式分离。

[0408] 在一个优选的实施方案中，本发明可以包括例如槲皮素类似物的药物制剂，该槲皮素类似物能够充当前药，在将其给药至需要治疗的患者后，其可以被生物降解或分解以在体内释放槲皮素。因此，本发明还包括药物组合物，该药物组合物包含或包含槲皮素类似物或衍生物，其提供制成或配制用于在医学或兽医治疗过程中以任何合适的方式施用的前药，例如在胃肠外(包括静脉内、肌肉内和皮下)或口服。这样的组合物以单位剂型方便地包含或掺入治疗有效的无毒量的前药化合物，或治疗有效的无毒量的活性药物化合物的等价物，其可能与至少一种其他成分一起提供可相容的药学上可接受的添加剂、载体、稀释剂或赋形剂，可以通过本文一般描述的药学领域中众所周知的任何方法来制备。

[0409] 应当理解，本发明的术语“试剂”涵盖具有本文所述的治疗有用性质的任何外消旋、旋光、区域异构或立体异构形式或其混合物。在本领域中众所周知如何制备旋光形式(例如，通过重结晶技术拆分外消旋形式，通过旋光起始原料进行合成，通过手性合成或通过使用手性固定相进行色谱分离)。

[0410] 还应该理解，本发明的范围不仅包括可能存在的各种异构体，而且包括可能形成的各种异构体混合物。例如，如果本发明的化合物包含一个或多个手性中心，则该化合物可以对映选择性地合成，或者可以制备和分离对映异构体和/或非对映异构体的混合物。本发明化合物，其起始原料和/或中间体的拆分可通过已知方法进行，例如，如关于化学化合物的四卷本光学分辨率程序所述:Optical Resolution Information Center,Manhattan College,Riverdale,N.Y.,以及Enantiomers,Racemates和Resolutions,Jean Jacques,Andre Collet和Samuel H.Wilen;John Wiley&Sons,Inc.,New York,1981，通过引用将其全部内容并入。

[0411] 药剂的拆分通常基于非对映异构体的物理性质的差异，所述非对映异构体的物理性质是通过化学或酶促连接对映体纯净的部分，从而形成可通过分步结晶、蒸馏或色谱分离的形式。本发明的试剂，包括这些试剂的盐和前药，可以商购或也可以以有机合成领域的技术人员众所周知的方式制备。有机合成领域的技术人员应理解，存在于分子各个部分上的官能团必须与所提出的试剂和反应相容。与反应条件相容的对取代基的这种限制对本领域技术人员而言是显而易见的，然后必须使用替代方法。

[0412] 根据本领域普通技术人员能力范围内的许多因素配制药学上可接受的载体以确定和适应。这些包括但不限于:药剂的类型和性质;含药剂的组合物要施予的对象;组合物的预期给药途径;并且，治疗适应症是针对性的。药学上可接受的载体包括水性和非水性液体介质，以及各种固体和半固体剂型。除了活性剂例如槲皮素、和/或E64，CA074或CA074Me及其类似物之外，此类载体还可以包括多种不同的成分和添加剂，由于多种原因，例如本领

域普通技术人员众所周知的稳定化活性剂，将这种另外的成分包括在制剂中。合适的药学上可接受的载体及其选择所涉及的因素的描述可在各种容易获得的来源中找到，例如Remington's Pharmaceutical Sciences，第17版，MackPublishing Company，Easton，Pa，1985。例如，通过各种肠胃外手段。适用于肠胃外给药的药物组合物包括各种水性介质，例如葡萄糖水溶液和盐溶液；乙二醇溶液也是有用的载体，并且优选包含活性剂的水溶性盐、合适的稳定化合物以及必要时的缓冲化合物。单独或组合使用的抗氧化化合物，例如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸，是合适的稳定化化合物。还使用柠檬酸及其盐和EDTA。另外，肠胃外溶液可包含防腐剂，例如苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯和氯丁醇。

[0413] 或者，组合物可以固体剂型例如胶囊、片剂和散剂口服给药；或以液体剂型例如elixirs、糖浆和/或悬浮液口服给药。明胶胶囊可用于包含活性成分和合适的载体，例如但不限于乳糖、淀粉、硬脂酸镁、硬脂酸或纤维素衍生物。类似的稀释剂可用于制备压制片剂。片剂和胶囊剂均可制成缓释产品，以在一段时间内连续释放药物。压制的片剂可以涂糖衣或薄膜衣以掩盖任何不愉快的味道，或用于保护活性成分不受大气影响，或允许片剂在胃肠道中选择性崩解。

[0414] 本发明的优选制剂是适合于肠胃外或口服给药的单相药物组合物，其基本上由治疗有效量的本发明的试剂和药学上可接受的载体组成。本发明的另一优选制剂是单相药物组合物，其基本上由治疗有效量的本发明药物的前药和药学上可接受的载体组成。可以在本发明的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物，植物油，例如橄榄油，和可注射的有机酯，例如油酸乙酯。例如，通过使用包衣材料，例如卵磷脂，在分散液的情况下，通过保持所需的粒径，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。这些组合物还可包含佐剂，例如润湿剂、乳化剂和分散剂。还可能希望在组合物中包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。另外，可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0415] 在某些情况下，为了延长诸如雾皮素之类的药剂的作用，希望减慢该药剂从皮下或肌肉内注射的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。然后，试剂的吸收速率取决于其溶解速率，其溶解度可能取决于晶体尺寸和晶体形式。或者，通过将药物溶解或悬浮在油性载体中来实现肠胃外给药药物的延迟吸收。

[0416] 通过在可生物降解的聚合物(例如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成试剂的微囊包封基质来制备可注射的储库形式。取决于试剂与聚合物的比例以及所用特定聚合物的性质，可以控制试剂的释放速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还可以通过将药剂截留在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备可注射储库的制剂。可注射材料可以例如通过细菌保留过滤器过滤而灭菌。

[0417] 为了制备固体组合物，例如片剂，将主要活性成分与药物赋形剂混合以形成固体预制剂组合物，该组合物包含药剂的均质混合物，例如槲皮素、异槲皮素或类似物和/或E64、CA074或CA074Me及其类似物。当将这些预制剂组合物称为均相时，是指将活性成分均匀地分散在整个组合物中，从而可以容易地将组合物细分为等效单位剂量的形式，例如片剂、丸剂和胶囊剂。然后将该固体预制剂细分为上述类型的单位剂型，其包含例如0.1至约500mg或更多的本发明的治疗化合物。适合口服的制剂可以是胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、

粉剂、颗粒剂的形式，或者是在水性或非水性液体、或水包油或水包水形式的溶液或悬浮液的形式。油性液体乳状液，或作为elixir或糖浆，或锭剂(使用惰性基质，例如明胶和甘油，或蔗糖和阿拉伯胶)等，每种都包含预定量的本发明药物作为有效成分。本发明的一种或多种药剂也可以大丸剂、栓剂或糊剂的形式给药。

[0418] 在口服剂的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中，将活性成分与一种或多种药学上可接受的载体混合，其是例如柠檬酸钠或磷酸二钙，和/或以下任何一项：(1)填充剂或增量剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；(2)粘合剂，例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；(3)保湿剂，如甘油；(4)崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；(5)缓溶剂，如石蜡；(6)吸收促进剂，例如季铵化合物；(7)润湿剂，例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯；(8)吸收剂，如高岭土和膨润土；(9)润滑剂，例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物；(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，药物组合物还可包含缓冲剂。相似类型的固体组合物可用作乳糖和乳糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂在软和硬填充明胶胶囊中用作填充剂。

[0419] 片剂可以通过任选地与一种或多种辅助成分一起压制或模制来制备。可以使用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如淀粉羟乙酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备压制的片剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物来制备。片剂和药物组合物的其他固体剂型，例如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂，可以任选地被刻痕或制备有包衣和外壳，例如肠溶衣和药物配制领域众所周知的其他包衣。它们还可以被配制为使用例如可变比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放特性，其他聚合物基质、脂质体和/或微球体来提供活性成分在其中的缓慢或受控释放。它们可以通过例如通过保留细菌的过滤器过滤来灭菌。这些组合物还可以任选地包含遮光剂，并且可以是仅或优选在胃肠道的特定部分中任选地以延迟的方式释放活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。活性成分也可以是微囊形式。可以将片剂或丸剂包衣或以其他方式混合以提供剂型，该剂型具有延长作用的优点。例如，片剂或丸剂可包含内部剂量和外部剂量组分，后者为前者上的包封形式。这两种成分可以由肠溶层分开，该肠溶层用于抵抗胃中的崩解并允许内部成分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于此类肠溶层或包衣，此类材料包括多种聚合酸以及聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的材料的混合物。

[0420] 用于口服施用药剂的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和elixirs。除活性成分外，液体剂型还可包含本领域常用的惰性稀释剂，例如水或其他溶剂，增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂外，口服组合物还可包含佐剂，例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、加香剂和防腐剂。除活性化合物外，悬浮液还可含有悬浮剂，例如乙氧基化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和tragacanth及其混合物。

[0421] 用于局部或透皮给药的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶

剂、溶液剂、贴剂、滴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将活性成分与药学上可接受的载体，以及可能需要的任何缓冲剂或推进剂混合。除活性成分外、软膏、糊剂、乳膏和凝胶剂还可包含赋形剂，例如动植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、tragacanth、纤维素衍生物、聚乙二醇、聚硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌、或其混合物。除活性成分外，粉剂和喷雾剂还可包含赋形剂，例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉或这些物质的混合物。喷雾剂还可包含常规推进剂，例如氯氟烃和挥发性未取代的烃，例如丁烷和丙烷。透皮贴剂具有提供本发明化合物向身体的受控递送的附加优点。这样的剂型可以通过将一种或多种试剂溶解，分散或以其他方式掺入适当的介质(例如弹性体基质材料)中来制备。

[0422] 吸收促进剂也可用于增加化合物穿过皮肤的通量。这种通量的速率可以通过提供速率控制膜或将化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制。药物制剂还包括适合通过吸入或吹入或鼻腔或眼内给药的制剂。为了通过吸入给药至上(鼻)或下呼吸道，可以方便地从吹入器、喷雾器或加压包装中递送药剂，或通过其他方便的方式来递送气雾剂。加压包装可包含合适的推进剂，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体。在加压气雾剂的情况下，剂量单位可以通过提供阀门以递送计量的量来确定。

[0423] 或者，对于通过吸入或吹入给药，组合物可以采取干粉的形式，例如，一种或多种试剂与合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。粉末组合物可以以单位剂型的形式存在于例如胶囊或药筒、或例如明胶或泡罩包装中，可以借助于吸入器、吹入器或定量吸入器从中给予粉末。对于鼻内给药，本发明化合物可通过滴鼻剂或液体喷雾剂给药，例如通过塑料瓶雾化器或定量吸入器给药。

[0424] 滴眼剂，例如滴眼剂或滴鼻剂，可以用还包含一种或多种分散剂，增溶剂或悬浮剂的水性或非水性基质配制。液体喷雾剂可从加压包装中方便地输送。滴剂可以通过一个简单的带滴眼剂的瓶子来输送，也可以通过一个塑料瓶来输送，该塑料瓶可以通过一个特殊形状的封闭物逐滴输送液体内容物。任何制剂可以存在于单位剂量或多剂量密封的容器中，例如安瓿和小瓶，并且可以在即将使用前以仅需添加无菌液体载体(例如注射用水)的冻干条件保存。临时注射溶液和悬浮液可以由上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0425] 本发明提供的剂型可以单独或与其他治疗活性成分组合地包含本发明的治疗化合物，以及药学上可接受的惰性赋形剂。剂型可包含抗氧化剂、螯合剂、稀释剂、粘合剂、润滑剂/助流剂、崩解剂、着色剂和释放调节聚合物中的一种或多种。合适的抗氧化剂可以选自本领域已知的一种或多种药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括丁基化羟基茴香醚(BHA)、抗坏血酸钠、丁基化羟基甲苯(BHT)、亚硫酸钠、柠檬酸、苹果酸和抗坏血酸。抗氧化剂可以按剂量制剂的重量计在约0.001％至约5％之间的浓度存在于本发明的剂量制剂中。

[0426] 合适的螯合剂可以选自本领域已知的一种或多种螯合剂。合适的螯合剂的实例包括乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、乙二酸、柠檬酸及其组合。螯合剂可以以剂量制剂的约0.001重量％至约5重量％的浓度存在。合适的稀释剂例如乳糖、糖、玉米淀粉、改性的玉米淀粉、甘露醇、山梨糖醇和/或纤维素衍生物例如木纤维素和微晶纤维素，其量通常为约20重量％至约80重量％。

[0427] 合适的粘合剂的实例包括甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、eudragits、乙基纤维素、明胶、阿拉伯树胶、聚乙烯醇、支链淀粉、卡波姆、预胶化

淀粉、琼脂、tragacanth、藻酸钠、微晶纤维素等。合适的崩解剂的实例包括淀粉羟乙酸钠、交联羧甲基纤维素钠、交联维酮、低取代羟丙基纤维素等。浓度可以为剂型的0.1重量％至15重量％。

[0428] 润滑剂/助流剂的实例包括胶体二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸钙、滑石粉、氢化蓖麻油、脂肪酸的蔗糖酯、微晶蜡、黄蜂蜡、白蜂蜡等。浓度可以为剂型的0.1重量％至15重量％。释放调节聚合物可用于形成含有本发明治疗化合物的延长释放制剂。调节释放的聚合物可以是水溶性聚合物或水不溶性聚合物。水溶性聚合物的实例包括聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙酸乙烯酯共聚物、聚环氧乙烷、多糖(例如藻酸盐、黄原胶等)、甲基纤维素及其混合物。水不溶性聚合物的实例包括丙烯酸酯,例如甲基丙烯酸酯、丙烯酸共聚物;纤维素衍生物,例如乙基纤维素或乙酸纤维素;聚乙烯和高分子量聚乙烯醇。

[0429] 任选地,本发明的治疗方法和组合物,例如槲皮素和/或E64、CA074或CA074Me及其类似物,可以与其他抗癌治疗和RIBE治疗组合。抗癌疗法的例子包括传统的癌症疗法,例如手术和化学疗法,以及其他新疗法。预期此类其他抗癌疗法将与放射疗法相加或协同作用。通过减少RIBE,这可以导致更好地控制癌症以及减少对高剂量的需要和/或允许更高剂量的治疗性放射。例如,已显示出多种常规化合物具有抗癌活性。这些化合物已在化学疗法中用作药物,以缩小实体瘤,防止转移和进一步生长,或减少白血病或骨髓恶性肿瘤中恶性细胞的数量。

[0430] 尽管化学疗法已经有效地治疗了各种类型的恶性肿瘤,但是许多抗癌化合物诱导了不良的副作用。已经表明,当将两种或更多种不同的治疗剂组合时,这些治疗剂可以协同作用,并允许减少每种治疗剂的剂量,从而减少每种化合物在较高剂量下产生的有害副作用。在其他情况下,对治疗难治的恶性肿瘤可对两种或更多种不同治疗的联合治疗有反应。本发明的另一个实施方案涉及所描述的任何组合物,例如槲皮素、异槲皮素或其类似物在制备用于改善癌症患者对放射疗法的反应和/或降低RIBE作用的药物中的用途。

[0431] 术语“包括”在本文中用来表示短语“包括但不限于”并与其互换使用。术语“或”在本文中用来表示术语“和/或”并与其互换使用,除非上下文另有明确说明。

[0432] 现在参考以下实施例将更容易理解一般描述的本发明,这些实施例仅出于说明本发明实施方案的某些方面的目的而包括在内。实例并非旨在限制本发明,如本领域技术人员将从以上教导和以下实例中认识到的那样,其他技术和方法可以满足权利要求并且可以在不脱离要求保护的本发明的范围的情况下采用。

[0433] 在以下实施例中进一步举例说明本发明,这些实施例不应视为限制本发明的范围。

实施例

[0434] 实施例1:该实施例说明了响应辐照的一种或多种RIBE因子的产生和排泄。

[0435] 本发明人测试了秀丽隐杆线虫是否可以作为使用紫外线辐射研究RIBE的动物模型,因为很好地表征了紫外线引起的秀丽隐杆线虫的损害。在液体S培养基中培养的野生型(N2)动物用100J/m^2的紫外线照射或进行假照射。此紫外线剂量可诱导显著的胚胎致死力(图5a),这种缺陷在与DNA损伤修复相关的秀丽隐杆线虫p53同系物CEP-1缺陷的cep-1

(gk138)动物中加剧。用于培养经辐照和经假辐照的动物的培养基分别称为“紫外线条件培养基”(UV-CM)和“紫外线对照”(UV-Ctrl),用于治疗未暴露的动物(图1a)。与UV-Ctrl(图5b)处理相比,经UV-CM处理的N2动物显示出更高的胚胎致死率,表明UV-CM含有能够在未暴露的动物中引起伤害的物质。UV-CM还可以以取决于UV剂量的方式(图1b)降低ced-1(e1735)动物的生殖细胞死亡,而ced-1(e1735)动物具有许多未吞噬的凋亡细胞,在100J/m^2时达到最大的死亡抑制活性。这些结果与已发表的报道一致,即未暴露细胞的凋亡减少或存活率提高是RIBE的终点之一。

[0436] 实施例2:该实施例说明了将RIBE因子鉴定为受辐照的细胞生成的蛋白质,而不是其他因子。

[0437] 本发明人通过用破坏DNA、RNA或蛋白质的酶处理UV-CM来探究RIBE因子的性质。UV-CM中的细胞凋亡抑制活性对DNase或RNase的治疗具有抗性(图6a、b),但被胰蛋白酶抑制(图1c),这表明RIBE因子是蛋白质。从细胞死亡缺陷的ced-3(n2433)动物、种系缺陷的glp-1(e2141)动物或用死细菌饲喂的N2动物中收集的UV-CM保留了死亡抑制活性(图6c-f),表明RIBE因子不太可能是细菌或辐射诱导的细胞死亡副产物产生的因子,可以在没有种系的情况下进行构建。

[0438] 使用10kD分子量截止滤光器单元,本发明人将UV-CM分成两部分,一部分包含可能大于10kD的蛋白质,另一部分包含小于10kD的蛋白质。RIBE活性以>10kD的分数出现(图7a),并在SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离(图1d)。UV-CM特有的蛋白条带通过质谱分析,从中鉴定出19种蛋白(图1e;图8和表5)。

[0439] 实施例3:该实施例说明了将CPR-4识别为RIBE因子。

[0440] 本发明人使用RNA干扰(RNAi)来检查19种基因之一是否对RIBE负责。cpr-4RNAi处理的动物的UV-CM表现出大大降低的RIBE活性,而其他基因RNAi处理的动物的UV-CM保留了RIBE活性(图7b)。cpr-4编码哺乳动物组织蛋白酶B溶酶体蛋白酶的同系物,被分泌为细胞外蛋白酶。因为cpr-4中的缺失突变(tm3718)去除了CPR-4蛋白的三分之一(图9a),消除了RIBE活性,携带带有羧基末端Flag标签的cpr-4基因组片段的单拷贝整合转基因(Pcpr-4::cpr-4::flag)将RIBE还原为cpr-4(tm3718)动物(图2a),在UV-CM中,此RIBE活性需要cpr-4。

[0441] 实施例4:该实施例说明了CPR-4的分泌,以及通过cep-1依赖性机制诱导了CPR-4介导的RIBE。

[0442] 本发明人研究了在紫外线照射下CPR-4是否分泌到培养基中。在Pcpr-4::cpr-4::flag动物中,在UV-CM中检测到了CPR-4::Flag,但在UV-Ctrl中未检测到(图1f)。来自Cp-4::cpr-4::flag的UV-CM的CPR-4::标记的免疫耗竭;cpr-4(tm3718)动物取消了其RIBE活性(图6g,h),证实分泌的CPR-4是UV-CM中的RIBE因子。因为来自cep-1(gk138)动物的UV-CM失去了RIBE活性(图2a)和来自cep-1(gk138)的UV-CM;Pcpr-4::cpr-4::flag动物显示出CPR-4::Flag的分泌大大减少(图7c),CPR-4介导的RIBE是通过cep-1依赖性机制诱导的,像一些报道的哺乳动物中p53依赖的RIBE。

[0443] 实施例5:该实施例示出了在动物的一个位置处的局部UV辐射(LUI)在未暴露于辐射的动物的其他区域中引起旁观者效应,并且该效应取决于CPR-4和CEP-1。

[0444] 如上所述,RIBE通常是指动物体内的旁观者效应。本发明人测试了在动物头部的

局部UV辐射(LUI)是否可能在动物的其他未暴露于辐射的区域中引起旁观者效应(图3a)。使用也对辐射起反应的应激反应报告基因Phsp-4::gfp(zcIs4),本发明人观察到在辐射后24小时,经LUI治疗的zcIs4动物的多个未暴露区域中GFP表达增加,包括在后区的强GFP表达(图3b,c)。这种旁观者反应在L4幼虫中最强(图3d),但在cpr-4(tm3718)和cep-1(gk138)突变体中消失(图3e;图10a),表明动物体内RIBE需要cpr-4和cep-1。LUI还导致未暴露后代的胚胎致死率增加(图3a,f),以cpr-4依赖性方式降低未照射的后性腺中生殖细胞的死亡(图3a,g),这表明LUI诱导的动物内RIBE与UV-CM诱导的动物间RIBE相似,并且CPR-4是真正的RIBE因子。

[0445] 实施例6:该实施例说明了CPR-4中组织蛋白酶B样蛋白酶活性的鉴定及其参与介导RIBE活性的过程。

[0446] 本发明人已经观察到CPR-4和组织蛋白酶B是高度保守的并且具有相同的催化残基(图9b),包括活性位点的半胱氨酸和组氨酸残基充当一般的碱基16。本发明人使用组织蛋白酶B特异性的荧光底物z-Arg-Arg-AMC,从N2动物中在UV-CM中检测到组织蛋白酶B样蛋白酶活性,但在UV-Ctrl中未检测到(图2b)。这种活性在cpr-4(tm3718)动物的UV-CM中不存在,在cep-1(gk138)动物的UV-CM中大大降低,但在Pcpr-4::cpr-4::flag;cpr-4(tm3718)动物中恢复,证实CPR-4通过cep-1依赖性机制赋予UV-CM中这种组织蛋白酶B样的活性。

[0447] 本发明人进一步测试以查看重组CPR-4是否重现了RIBE活性。缺少其信号肽(残基1-15)tCPR-4的截短的CPR-4具有与重组人组织蛋白酶B(rhCTSB)相似的蛋白酶活性(图7d)。改变保守的催化残基C109A和H281A的突变消除了tCPR-4的蛋白酶活性(图2c),而改变非催化残基的突变(N301A)不影响tCPR-4蛋白酶的活性。像来自N2动物的UV-CM一样,tCPR-4、tCPR-4(N301A)和rhCTSB减少了生殖细胞的尸体(图2d;图7e)并增加了胚胎致死率(图5c),而tCPR-4(H281A)和tCPR-4(C109A)未能做到这一点,表明CPR-4蛋白酶活性对其RIBE活性至关重要。

[0448] 实施例7:该实施例说明CPR-4是由不同辐射源诱导的共享RIBE因子。

[0449] 本发明人测试了来自被不同辐射源、电离辐射(IR-CM)以及其伪辐射对照(IR-Ctrl)辐射的动物的条件培养基。来自N2或Pcpr-4::cpr-4::flag;cpr-4(tm3718)动物的IR-CM减少了ced-1(e1735)动物中的生殖细胞尸体,而来自cpr-4(tm3718)或cep-1(gk138)动物的IR-CM没有这种活性(图2e)。同样,来自N2动物的IR-CM(而非IR-Ctrl)引起的胚胎致死率增加(图4b),并包含组织蛋白酶B样活性,该活性在cpr-4(tm3718)或cep-1(gk138)动物的IR-CM中消失了,但已在Pcpr-4::cpr-4::flag;cpr-4(tm3718)动物中恢复(图2f)。此外,从Pcpr-4::cpr-4::flag动物中在IR-CM中检测到分泌的CPR-4::Flag,但在IR-Ctrl中未检测到(图2g)。因此,CPR-4是由不同辐射源诱导的共享RIBE因子。

[0450] 使用定量RT-PCR分析,本发明人发现,与假辐照对照相比,UV或IR辐照后,N2动物中cpr-4基因的转录提高了约1.6倍(图2h)。相比之下,cep-1(gk138)动物中的cpr-4转录不受任何一种辐射的影响。这些结果表明,电离和非电离辐射通过CEP-1依赖性机制增加cpr-4转录,从而导致更多CPR-4蛋白的合成和CPR-4分泌的增加。

[0451] 实施例8:该实施例说明了CPR-4是通过cep-1依赖性机制表达的。

[0452] 使用携带与绿色荧光蛋白(GFP)的cpr-4转录融合和核定位信号(Pcpr-4::nls::gfp)的单拷贝插入转基因,本发明人研究了何时和何处表达cpr-4。在N2动物中,未在胚胎

中检测到NLS::GFP的表达,在早期幼虫(L1至L3)的肠道中观察到了NLS::GFP的表达,在L4幼虫阶段达到了峰值,而当动物进入成年期则下降了(图7a-h,j)。在cep-1(gk138);Pcpr-4::nls::gfp动物中观察到类似的时空NLS::GFP表达模式(图11i,j)。当用紫外线照射时,携带Pcpr-4::nls::gfp的N2动物而非cep-1(gk138)动物表现出升高的NLS::GFP表达(图11k),这证实了辐射通过cep-1依赖性机制诱导cpr-4转录增加。

[0453] 实施例9:该实施例说明了体内分泌的CPR-4的远距离信号传导作用。

[0454] 为了研究体内分泌的CPR-4的作用,本发明人在myo-2基因启动子的控制下,产生了在秀丽隐杆线虫咽中特异性表达CPR-4::mCherry的转基因Pmyo-2::CPR-4::mCherry动物(图12a)。正如预期的分泌蛋白一样,CPR-4::mCherry是在咽部制造并从咽部分泌的,并被包括吞噬性白细胞在内的全身细胞吸收(箭头,图12a)。CPR-4信号肽的去除可阻止转基因动物的咽中的tCPR-4::mCherry分泌(图12b)。像UV-CM、IR-CM或LUI处理一样,CPR-4::mCherry的咽部表达增加了胚胎致死率,减少了生殖细胞的死亡,此外,还导致了幼虫的大量停滞(图12c,d),这种现象在表达tCPR-4::mCherry或催化失活的CPR-4::mCherry蛋白的动物中未见或未大大减弱。CPR-4异位表达的这些结果提供了进一步的证据来支持CPR-4作为RIBE因子的远程信号传导作用。

[0455] 实施例10:该实施例说明了CPR-4在未照射的细胞或动物中介导的各种RIBE作用。

[0456] 考虑到由CPR-4介导的各种RIBE作用,本发明人通过检查影响多种细胞过程的基因,研究了CPR-4如何影响未暴露的细胞或动物。由于减少的daf-2活性会延长寿命和抵抗力并减少了由遗传毒性和低氧胁迫引起的细菌、肌肉和神经元细胞死亡,因此对daf-2基因进行了检查,该基因编码人胰岛素/IGF受体的秀丽隐杆线虫直系同源基因并调节多种信号传导途径。同样,通过温度敏感突变(e1370)降低daf-2功能可减少生理生殖细胞死亡(图4a)。有趣的是,纯化的tCPR-4并未进一步降低ced-1(e1735);daf-2(e1370)突变体中的生殖细胞死亡(图4a),表明tCPR-4和daf-2以同一途径起作用,影响生殖细胞死亡。此外,tCPR-4不能降低ced-1(e1735)中的生殖细胞死亡,PDK-1激酶中有缺陷的pdk-1(sa680)动物是DAF-2的关键下游信令组件,但在缺乏DAF-16的daf-16(mu86)ced-1(e1735)动物中可以这样做,是DAF-2下游的主要转录因子之一(图10b)。本发明人使用LUI测定法观察到相似的结果,其中daf-2和pdk-1的失活而不是daf-16的失活阻止了在未暴露的后部区域中Phsp-4::gfp的GFP表达增加(图3e和图10a),而daf-2的丢失阻止了未暴露的组织中胚胎致死率的提高和生殖细胞死亡的减少(图3f,g)。由于daf-2的丢失似乎并不影响CPR-4向UV-CM的分泌或UV-CM的凋亡抑制活性(图10c,d),因此这些结果支持了一种模型,其中分泌的CPR-4通过DAF-2胰岛素/IGF受体和PDK-1激酶起作用,但不通过DAF-16转录因子起作用,从而在未暴露的细胞中发挥RIBE作用。

[0457] 实施例11:该实施例说明CPR-4(tCPR-4)通过DAF-2和CEP-1促进生殖细胞增殖。

[0458] 因为daf-2也影响生殖细胞增殖,所以本发明人检查了tCPR-4处理是否通过对种系有丝分裂区域中的核数进行评分来改变生殖细胞增殖。tCPR-4对N2动物的治疗在有丝分裂区产生了更多的生殖细胞核和更多的中期核(图4b),表明具有刺激作用。daf-2活性降低或cep-1缺失阻止了tCPR-4诱导的生殖细胞增殖增加(图4b和图10e),表明tCPR-4通过DAF-2和CEP-1促进生殖细胞增殖。

[0459] 实施例12:该实施例说明人组织蛋白酶B(CTSB)参与了人细胞中的RIBE效应。

[0460] 为了研究人组织蛋白酶B(CTSB)的半胱氨酸蛋白酶是否也参与辐射诱导的旁观者效应,本发明人首先检查了如在秀丽隐杆线虫中观察到的,CTSB的表达是否响应于紫外线辐射而被上调。如图13A所示,响应于UV辐射,CTSB的表达以剂量依赖性方式被上调,以400J/m^2达到最大响应。然后,本发明人产生了CTSB短发夹RNA(shCTSB)敲低的293T细胞,并以400J/m^2的紫外线照射了这些细胞和对照shRNA(shCtrl)293T细胞。然后从照射的细胞中收集UV条件培养基(UV-CM)(请参阅"方法"),并用于培养未暴露的Huh7细胞。本发明人发现,与从shCTSB 293T细胞收集的UV-CM相比,来自shCtrl 293T细胞的UV-CM在促进细胞存活方面显示出明显更强的活性,这表明CTSB表达的丧失降低了辐射诱导的旁观者效应在促进细胞存活中。本发明人用从shCtrl Huh7细胞和shCTSB Huh7细胞收集的UV-CM观察到相似的结果(图2)。这些结果共同表明,组织蛋白酶B半胱氨酸蛋白酶也与紫外线诱导的人体细胞旁观者效应有关。

[0461] 在该实施方案中,分别用PLKO.1-Ctrl(shCtrl)和PLKO.1-CTSB(shCTSB)质粒转染293T细胞48小时。洗涤细胞并将其置于新鲜培养基中并暴露于UV辐射(400J/m^2)。照射的细胞再培养48小时。收集上清液,即紫外线条件培养基,并用于培养未暴露的Huh7细胞48小时。进行了磺基罗丹明B(SRB)测定以测量Huh7细胞存活的百分比。此外,用PLKO.1-Ctrl(shCtrl)和PLKO.1-CTSB(shCTSB)质粒转染Huh7细胞48小时。洗涤细胞并将其置于新鲜培养基中并暴露于UV辐射(400J/m^2)。照射的细胞再培养48小时。收集上清液,即紫外线条件培养基,并用于培养未暴露的Huh7细胞48小时。进行了磺基罗丹明B(SRB)测定以测量Huh7细胞存活的百分比。

[0462] 实施例13:该实施例展示了筛选可在体外抑制组织蛋白酶B蛋白酶活性的化合物的筛选方法。

[0463] 为了鉴定可以抑制半胱氨酸蛋白酶活性的化合物组织蛋白酶B(CTSB),其为辐射诱导的旁观者效应(RIBE)的关键介质,本发明人筛选了已知为半胱氨酸蛋白酶抑制剂或具有潜在抗癌活性的生物活性小分子的集合(请参见下表1)。这包括三种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,E64[N-[N-(L-3-反式-甲硼烷-2-羰基)-L-亮基]-胍丁胺]、CA074[N-(1-3-反式-丙基氨基甲酰基环氧乙烷-2-羰基)-1-异亮氨酰基-1-脯氨酸]、CTSB的选择性抑制剂(1)、CA074甲基酯(CA074Me)、细胞内CTSB的透膜抑制剂。本发明人还测试了短链多肽,NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH(RLA),该多肽的硒螯合物,NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH-Se,据报道,还有一些抗癌化合物和维生素可以抑制癌细胞的增殖,并且对哺乳动物细胞的毒性低。

[0464] 本发明人从收集的18种生物活性小分子中鉴定出11种显示CTSB抑制活性的化合物。(一般参见图22-23)三种半胱氨酸蛋白酶抑制剂CA074Me、CA074和E64对CTSB蛋白酶表现出最佳的抑制作用(参见下表2)。短链多肽(RLA)及其硒螯合物抑制CTSB蛋白酶活性的86%以上。几种黄酮、芹菜素[5,7-二羟基-2-(4-羟苯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮]、槲皮素[2-(3,4-二羟苯基)-3,5,7-三羟基-4H-色烯-4-酮]、异槲皮苷[2-(3,4-二羟苯基)-5,7-二羟基-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)噁烷-2-基]氧基色烯-4-酮],和baicalein(5,6,7-三羟基-2-苯基-色烯-4-酮),也可以达到65-85%的抑制率。单宁酸(一种多酚而不是类黄酮)显示出69.29%的抑制率。还如表2所示,有趣的是,叶酸,也称为维生素B9,被证明是CTSB活化剂,并且可以将CTSB蛋白酶的活性提高4倍以上。

[0465] 如表3所示,本发明人确定了其中一些化合物的最大半数抑制浓度(IC50)。E64、

CA074和CA074Me表现出最好的IC50值，约为或小于20nM。黄酮类化合物、槲皮素和baicalein的IC50分别为1.87μM和0.87μM。短链多肽RLA的IC50明显高于其他化合物。另一方面，叶酸的最大有效浓度的一半(EC50)为1.26μM。

[0466] 如上所述，秀丽隐杆线虫CTSB同源物CPR-4具有与人CTSB相似的蛋白酶活性和特性。本发明人测定了其中一些化合物在体外抑制CPR-4蛋白酶活性中的活性。如表4所示，半胱氨酸蛋白酶抑制剂E64对CPR-4蛋白酶具有最高的抑制活性(89.59％)，而短链多肽RLA抑制了CPR-4蛋白酶活性的85.03％。黄酮槲皮素显示出80.67％的抑制作用，黄酮baicalein显示出41.54％的抑制作用。

[0467] 实施例14:该实施例证实，组织蛋白酶B抑制剂阻断了辐射诱导的旁观者效应(RIBE)。

[0468] 使用上述的局部UV辐射(LUI)动物内RIBE模型，本发明人检查了所鉴定的CTSB抑制剂是否可以阻断RIBE或由LUI引起的副作用。在秀丽隐杆线虫中观察到的几个突出的RIBE效应是在性腺后部未暴露的生殖细胞中的染色体DNA损伤，未暴露的胚胎的致死率增加，以及在未暴露的后部区域(特别是在头部区域进行LUI的动物)的未暴露后应激反应的升高。在接受LUI治疗之前，首先分别用DMSO(模拟)、10μM的CA074、CA074Me或E64或250μM槲皮素、异槲皮苷(图19)或叶酸(图20)处理幼虫第2阶段(L2)动物48小时。

[0469] 在含有hus-1::NeoGreen敲入动物的动物上进行LUI动物后生殖腺未暴露生殖细胞中染色体DNA损伤的测定。DNA损伤诱导的细胞周期停滞和凋亡需要秀丽隐杆线虫基因hus-1。DNA损伤后，已显示HUS-1特异地定位于染色体断裂并在染色质上形成不同的病灶。因此，本发明人分析了未暴露的有丝分裂生殖细胞中LUI动物中HUS-1::NeoGreen病灶的数量，其作为由辐射诱导的染色体DNA损伤的指标。如图21所示，除叶酸(CTSB激活剂)或通过缺失对cpr-4基因的遗传失活(tm3718)之外，使用已鉴定的化合物进行处理可有效抑制HUS-1阳性阳性生殖细胞的数量，表明已鉴定的化合物或cpr-4基因失活可阻止LUI诱导的染色体DNA损伤的副作用。

[0470] 如先前所述，对LUI动物中未暴露的胚胎致死性增加的测定进行了测定。如图19所示，LUI处理后的野生型(WT)动物在其未暴露后代中显示出更高的胚胎致死率。但是，在用确定的化合物(叶酸，CTSB激活剂除外)进行预处理的动物中或缺乏cpr-4基因的动物中，LUI不会诱导增加的胚胎致死率。这些结果表明，确定的CTSB抑制剂化合物或cpr-4基因的遗传失活可以防止局部照射引起的秀丽隐杆线虫胚胎致死率增加的副作用。有趣的是，在LUI治疗之前，如果携带携带单拷贝cpr-4转基因的cpr-4(tm3718)动物在其羧基末端表达带有短肽标签(Flag标签)的修饰的CPR-4蛋白，则该动物需用抗Flag抗体进行预处理，该抗体(而非模拟疗法)有效地阻止了局部照射引起的增加的胚胎致死率的副作用，如图20所示，这表明秀丽隐杆线虫RIBE模型也可以用于筛选可减轻放射疗法引起的副作用的抗体药物。

[0471] 在携带hsp-4基因启动子(Phsp-4::gfp)启动子控制下表达GFP报告基因的整合转基因的动物中进行LUI动物未暴露后部区域应激反应升高的测定，其应对多种压力条件，包括辐射。如图21所示，除叶酸或cpr-4基因缺失外，使用已鉴定的化合物进行处理，可有效抑制应激反应的增加的副作用，该副作用由LUI动物后未暴露区域的GFP荧光强度增加表示。这些结果一起表明，所鉴定的CTSB抑制剂可以在示例性的真核生物中阻断由辐射诱导的各

种副作用。这些研究还表明，体外药物筛选和秀丽隐杆线虫RIBE模型中已鉴定化合物的测试相结合，是一种有效的方法，可用于鉴定可用于缓解或治疗放射疗法或其他人类疾病引起的副作用的有效小分子化合物或抗体药物。

[0472] 实施例15:该实施例表明人胰岛素受体对于介导CTSB诱导的RIBE很重要。

[0473] 研究了秀丽隐杆线虫DAF-2蛋白的同源物人胰岛素/IGF受体(INSR)与人细胞中的RIBE的关系。本发明人使用两个不同的INSR短发夹RNA慢病毒克隆(shINSR#1和#2)降低了人类Huh7细胞中的INSR表达，然后用从表达shCtrl或shCTSB的假辐射Huh7细胞(UV-Ctrl)或UV辐射(UV-CM)Huh7细胞收集的条件培养基中处理这些INSR敲低细胞(请参见图14)。INSR组合式(shINSR#1和#2)似乎会降低Huh7细胞的存活率，这不受从shCtrl或shCTSB Huh7细胞收集的UV-Ctrl的影响。与之前的观察结果一致(图13和14)，与从shCTSB Huh7细胞收集的UV-CM相比，来自shCtrl Huh7细胞的UV-CM在促进未暴露的shCtrl Huh 7细胞的细胞存活方面表现出明显更强的活性(图15)，确认CTSB促进细胞存活。然而，与来自shCTSB Huh7细胞的UV-CM相比，shINSR敲低阻止了来自shCtrl Huh7细胞的UV-CM诱导的增强的细胞存活(图15)。这些结果表明，胰岛素/IGF受体对于介导人细胞中CTSB诱导的RIBE也很重要，并且秀丽隐杆线虫和人之间的RIBE信号通路是保守的。

[0474] 实施例16:该实施例鉴定出不同的人类细胞系显示出不同的基础CTSB表达水平和对紫外线辐射的不同敏感性。

[0475] 在四种不同的人类永生化或癌细胞系(分别为293T、Hela、HepG2和HCT116)中检查了CTSB的表达水平，以及它们对紫外线照射的反应。在紫外线照射之前，293T(胚胎肾脏起源)和Hela(宫颈肿瘤起源)细胞显示很少的CTSB表达，HepG2(肝癌起源)细胞显示较低的CTSB表达，HCT116(结肠癌起源)细胞显示较高的CTSB表达(图15)。在用不同剂量的紫外线照射后，Hela和HepG2细胞显示出强烈的CTSB表达上调，达到约100J/m^2的饱和度，而HCT116细胞显示出CTSB表达没有明显变化(图16)。293T细胞还表现出响应紫外线照射的CTSB表达上调，但是CTSB表达水平很低(图16)。

[0476] 实施例17:该实施例鉴定了阻断RIBE的组织蛋白酶B抑制剂。

[0477] 本发明人使用局部UV辐射(LUI)动物内RIBE模型(参见以上图3)，检查了组织蛋白酶B(CTSB)的抑制剂是否可以干扰由LUI诱导的RIBE。本发明人首先测试了CA074[N-(l-3-反式-丙基氨基甲酰基环氧乙烷-2-羰基)-l-异亮氨酰基-l-脯氨酸]、CTSB的选择性抑制剂，和CA074甲基酯(CA074Me)，细胞内组织蛋白酶B的透膜前抑制剂。如图17所示，用CA074或CA74Me进行的治疗消除了头部经LUI治疗的动物后未暴露区域的旁观者Phsp-4::gfp反应。本发明人用E64观察到了相似的结果，E64是可以不可逆地抑制多种半胱氨酸肽酶，包括组织蛋白酶B的环氧化物。这些结果表明，人CTSB抑制剂可以阻断秀丽隐杆线虫中的RIBE，并且在某些实施方案中，可以抑制人中的RIBE。

[0478] 实施例18:该实施例确定秀丽隐杆线虫为用于RIBE新型抑制剂的治疗性药物筛选的动物模型。

[0479] 由于秀丽隐杆线虫中CPR-4::mCherry的异位咽表达导致明显的胚胎致死率和幼虫停滞(见图9)，并且由于人类CTSB抑制剂阻断了秀丽隐杆线虫中的RIBE(图17)，本发明人可以利用这一特征来筛选新型的RIBE抑制剂或调节剂。在一个实施方案中，可以将成年的Pmyo-2::CPR-4::mCherry转基因动物放在含有上述化合物或药物的线虫生长培养基(NGM)

板上(44、45)。可以选择能够显著抑制Pmyo-2::CPR-4::mCherry转基因动物后代中的胚胎致死率和幼虫停滞的化合物,并一式三份进行重新测试。可以使用如上所述的LUI测定法确认候选化合物的RIBE抑制作用。

[0480] 实施例19:该实施例标识与本发明的实施例有关的各种方法和装置。

[0481] 菌株和培养条件.除非另有说明,否则本发明人使用标准程序[31]在20℃下培养秀丽隐杆线虫菌株。本发明人将N2布里斯托尔菌株用作野生型菌株。在遗传分析中使用了以下染色剂:LGI,cep-1(gk138),daf-16(mu86),ced-1(e1735);LGII,Pcpr-4::cpr-4::flag单拷贝插入,Pcpr-4::nls::gfp单拷贝插入;LGIII,daf-2(e1370),glp-1(e2141);LGV,cpr-4(tm3718),zcIs4(Phsp-4::gfp);LGX,pdk-1(sa680)。使用前,将每个单拷贝插入转基因与N2动物回交至少四次。

[0482] 辐照.在室温下,使用紫外线交联剂或Co^{60}辐射源辐照在线虫生长培养基(NGM)板上或装有液体培养基的塑料管中生长的成年动物。紫外线照射的剂量为100J/m^2。Co^{60}辐射的剂量为500Gy,剂量率约为33.3Gy/分钟。辐射后立即将板放回20℃培养箱中。辐射后,将塑料管置于20℃的振荡器中以产生条件培养基。在所有照射实验中均使用了假照射的对照。

[0483] 从受辐照的动物中产生条件培养基.从三个NGM平板(直径6cm)洗净接近饥饿的秀丽隐杆线虫动物,并使用大量大肠杆菌菌株HB101作为食物来源在250mL S-培养基(100mM NaCl、5.8mM K_2HPO_4、44mM KH_2PO_4、0.013mM胆固醇、1mM一水柠檬酸、9mM柠檬酸三钾一水合物、0.05mM二钠EDTA、0.025mM $FeSO_4$、0.01mM $MnCl_2$、0.01mM $ZnSO_4$、0.001mM $CuSO_4$、1.5mM $CaCl_2$、3mM $MgSO_4$、0.13mM氨苄西林、0.007mM硫酸链霉素、0.16mM硫酸新霉素和0.02mM制霉菌素)中培养六天。通过在4℃下沉淀10分钟收获动物,这些动物大多成年,并用S-培养基洗涤3次。本发明人将S-培养基中的动物密度调节至大约2只动物/μL,将它们转移至石英板(带盖),并使用具有期望剂量的UV对其进行辐照或进行假辐照。对于红外辐射,将相同密度的动物转移到15mL康宁离心管中,并使用500Gy IR进行辐照或假辐照。用新鲜的S-培养基洗涤受辐照或假接受辐照的动物,将其转移到补充有HB101细菌的6mL S-培养基中的15mL康宁离心管中,并在20℃摇床上连续200rpm摇动生长24小时。之后,本发明人通过以3000rpm离心10分钟去除动物和细菌,并用0.22μm过滤器单元过滤培养基以获得条件培养基。然后将条件培养基通过10kD超滤管(Amicon Ultra-15,Millipore)进行浓缩,并使用S-Medium调节至总蛋白浓度为0.1μg/μL。从Pcpr-4::cpr-4::flag生成UV-CM和UV-Ctrl;daf-2(e1730);cpr-4(tm3718)动物,将装有动物的饥饿的盘子切成300个新的NGM盘子,将其在20℃下放置2天,然后再移至25℃下再放置一天。紫外线照射或假手术的动物在25℃摇床中生长24小时,以获得紫外线-CM和UV-Ctrl。

[0484] 秀丽隐杆线虫的局部照射.将秀丽隐杆线虫L4幼虫安装在含10nM叠氮化钠的琼脂糖垫(2%)上,并在带有40x/0.9NAPlanApo Lambda物镜的倒置Ti-E显微镜上使用尼康A1激光扫描共聚焦在头部区域进行辐照。在安装时,在光纤上测得的非常接近UV波长的405nm激光功率为23.32mW。使用512x512的60%405nm激光功率以0.58微米x 0.58微米的像素大小进行照射,持续时间为2.2微秒/像素。本发明人使用Thor实验室的功率计(PM100D)和光电传感器(S140C),在样品平面上测得的功率约为0.25-0.30mW。这相当于样品处大约0.75-0.89mW/$micron^2$。对于假辐射对照,在琼脂糖垫上辐照离动物稍远的区域。照射后,立即将

动物从琼脂糖垫中救出，并转移到常规NGM板上，在进行动物内旁观者效应分析之前，先在20℃下24小时或在25℃下20小时恢复(胚胎致死率测定)。进行了三种测定以监测未暴露区域的动物内旁观者效应。它们是后性腺中的生殖细胞尸体测定，辐照动物F1后代的胚胎致死率测定以及后部区域的Phsp-4::gfp应激反应测定。对于Phsp-4::gfp应力响应测定，在LUI后25℃下使用daf-2(e1370ts)菌株和相应的对照菌株进行了实验。为了进行胚胎致死性测定，在25℃恢复20小时后，将辐照或假辐照的动物放在NGM板上，在25℃下产卵4小时，然后转移到新的NGM板上。再转移两次后，将动物丢弃。对未孵化的卵的数量(记为死卵)和发展为幼虫的卵的数量进行评分，并用于确定胚胎致死率。

[0485] 甲醛处理过的细菌为食物来源.HB101细菌用3.7％甲醛处理10分钟，用S-培养基洗涤3次，并离心收集。将细菌散布在没有抗生素的平板上，也没有观察到细菌菌落，从而证实了细菌的死亡。将细菌沉淀添加到S-培养基中以生长蠕虫。

[0486] RNA干扰(RNAi)实验.使用细菌饲养方案进行RNAi实验。用pPD129.36-cpr-4或pPD129.36质粒转化的HT115细菌分别用于cpr-4RNAi和对照RNAi实验。其他RNAi实验中使用的细菌克隆来自购自ThermoFisher的RNAi库。为了在液体培养中进行RNAi实验，使用三个带有RNAi细菌的NGM平板喂养30只幼虫的第4阶段(L4)N2动物，直到平板几乎饿死为止。然后，本发明人将动物从平板上洗净，并将其转移到装有250mL含0.5mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)和RNAi细菌的S培养基的玻璃烧瓶中，并使它们再生长一代。获得条件培养基的过程与上述过程相似。

[0487] 在96孔板中培育秀丽隐杆线虫动物.将HB101细菌与100μL条件培养基(0.1μg/μL)或100μLS-培养基(含2.8μM重组tCPR-4蛋白(野生型或突变型)或0.27μM重组人组织蛋白酶B)混合在96孔平板中。将大约60只L4幼虫转移到平板的每个孔中。在液体培养基中培养48小时后，对这些动物的生殖细胞尸体和有丝分裂核的数量进行评分。

[0488] 酶处理条件培养基.通过用不同的酶处理条件培养基来分析RIBE因子的性质。1μL DNase(1Unit/μL,QIAGEN)、1μL RNase(100μg/μL,QIAGEN)或1μL胰蛋白酶(5μg/μL,Sigma)在30℃下与100μL条件培养基混合1小时。然后将处理过的或未处理过的条件培养基用于在96孔板中于20℃培养ced-1(e1735)动物48小时。

[0489] 生殖细胞尸体的定量.如上所述，在96孔板的液体培养基中培养L4动物。48小时后，将它们转移至NGM平板上，并在20℃恢复1小时。然后将动物用20mM NaN_3麻醉，固定在2％琼脂垫上，并在Nomarski光学镜下评分。对于在咽中表达CPR-4的转基因动物，L4动物在NGM平板上于20℃生长24小时，然后对它们进行生殖细胞尸体评分。仅对完整的性腺的后臂进行了评分。在所有生殖细胞尸体定量实验中进行盲测。

[0490] 有丝分裂核的定量.将在液体培养中用2.8μM纯化的tCPR-4蛋白处理48小时的L4动物转移到NGM平板上，使其在20℃恢复1小时。然后按照先前描述的方法解剖它们以暴露其性腺[24]。将解剖的性腺固定并用DAPI染色。使用具有DAPI滤镜的Zeiss Nomarski显微镜对每个性腺有丝分裂区的胚核数和中期核数进行评分。

[0491] 通过GFP报告基因定量cpr-4的表达水平.Pcpr-4::nls::gfp转基因的单拷贝插入用于确定照射前后cpr-4的表达水平。中级L4 Pcpr-4::nls::gfp和cep-1(gk138)；用100J/m^2的紫外线照射Pcpr-4::nls::gfp幼虫，并在成像前于20℃恢复2小时。通过在Nomarski光学系统下捕获图像来记录动物的GFP表达模式。所有图像的曝光时间固定为100毫秒。使用

Image J软件(NIH)量化每只动物中GFP荧光的强度。使用相同的方法测定在不照射的不同发育阶段(胚胎,L1,L2,L3,L4幼虫,成年后L4的24小时和48小时)中cpr-4的表达水平。

[0492] 胚胎致死率和幼虫逮捕试验.对于直接辐射引起的胚胎致死性测定,在用100J/m^2紫外线或500Gy伽马射线照射后,将妊娠的成虫放在NGM板上,在25℃下产卵4小时,然后从板上取出。为了在液体培养基中进行胚胎致死率测定,将L4幼虫在条件培养基或含有纯化蛋白的S培养基中于20℃培养48小时,从液体培养基转移到新鲜的NGM平板上,并在25℃下产卵4小时,然后将成年动物取出。为了在咽中表达CPR-4的转基因动物中进行胚胎致死率测定,将L4后24小时的转基因妊娠成虫放在NGM平板上,在25℃下产卵4小时,然后从平板上取出。在所有情况下,在NGM平板上于25℃放置24小时后,对未孵化的卵数(计为死卵)和发育为幼虫的卵数进行评分,并用于确定胚胎致死率。

[0493] 为了进行幼虫逮捕试验,将妊娠转基因的成年成年人放在NGM平板,对照RNAi平板或cpr-4RNAi平板上,在25℃下产卵4小时。在将平板放回20℃培养箱之前,在荧光立体镜下对孵出的转基因幼虫的数量进行评分。3天后,对未进入成年阶段的转基因动物的数量进行评分,并用于确定幼虫停滞率。

[0494] 分子生物学.通过聚合酶链反应(PCR)从秀丽隐杆线虫cDNA文库中扩增出全长cpr-4cDNA。使用SignalP 3.0服务器可以预测CPR-4的信号肽。为了构建pGEX4T-2-tCPR-4质粒,从全长cpr-4cDNA克隆中PCR扩增编码残基16-336的cpr-4cDNA片段,并通过其NdeI和XhoI位点亚克隆到修饰的pGEX4T-2载体中,其在GST编码序列后立即插入了一个PreScission Protease切割位点LEVLFQGP。为了得到pGEX4T-2-tCPR-4(C109A)、pGEX4T-2-tCPR-4(H281A)和pGEX4T-2-tCPR-4(N301A)载体,使用两步PCR产生带有所示突变的tCPR-4cDNA片段,该片段通过其NdeI和XhoI位点亚克隆到同一修饰的pGEX4T-2载体中。为了构造Pmyo-2::CPR-4::mCherry、Pmyo-2::tCPR-4::mCherry、Pmyo-2::CPR-4(C109A)::mCherry、Pmyo-2::CPR-4(H281A)::mCherry、和Pmyo-2::CPR-4(N301A)::mCherry表达载体,首先使用两步PCR方法生成编码全长CPR-4(C109A)、CPR-4(H281A)和CPR-4(N301A)的cDNA片段。DNA片段编码CPR-4::mCherry、tCPR-4::mCherry、CPR-4(C109A)::mCherry、CPR-4(H281A)::mCherry,类似地,PCR扩增CPR-4(N301A)::mCherry,并通过其NheI位点亚克隆到修饰的pCFJ90载体(Addgene)中。

[0495] 为了制备用于产生单拷贝整合转基因的质粒pCFJ151-Pcpr-4::cpr-4::flag,是一个cpr-4基因组片段(Pcpr-4::cpr-4::utr),其含有4018bp的cpr-4启动子序列、1196bp的cpr-4基因组编码序列和2267bp的cpr-43'非翻译区(UTR),通过用PmlI和BssHII消化从fosmid WRM0619bH11中切除,然后通过其BssHII位点和钝化的AvrII位点亚克隆到修饰的pCFJ151质粒中。然后通过AflII和NheI消化从质粒中切出该Pcpr-4::cpr-4::utr基因组片段,并通过其AflII和NheI位点亚克隆到质粒pSL1190中。通过QuickChange方法在cpr-4编码区域之后立即插入了一个Flag标签(DYKDDDDK)。通过其AflII和NheI位点将修饰的Pcpr-4::cpr-4::flag::utr基因组片段亚克隆回pCFJ151,以获得质粒pCFJ151-Pcpr-4::cpr-4::flag。

[0496] 为了构建用于单拷贝插入的质粒pSL1190-Pcpr-4::nls::gfp,一个包含cpr-4启动子的4114bp片段和一个cpr-4编码区的前58bp,一个包含NLS::GFP编码序列和unc-543'UTR的1767bp片段,LGII Mos I位点(ttTi5605)的1337bp上游同源重组片段和LGII MosI位

点的1418bp下游同源重组片段使用Gibson连接法通过其PstI和BamHI位点连接到pSL1190质粒主链。

[0497] 为了构建用于cpr-4RNAi的质粒,PCR扩增了全长cpr-4cDNA片段,并通过其Nhe I和Xho I位点亚克隆到pPD129.36载体中。通过DNA测序确认产生的所有克隆。

[0498] 转基因动物.使用标准方案产生转基因动物。Pmyo-2::CPR-4::mCherry、Pmyo-2::tCPR-4::mCherry、Pmyo-2::CPR-4(C109A)::mCherry、Pmyo-2::CPR-4(H281A)::mCherry或Pmyo-2::CPR-4(N301A)::mCherry被注入ced-1(e1735);cpr-4(tm3718)动物在20ng/μL(用于生殖细胞尸体定量)或2ng/μL(用于胚胎致死率和幼虫捕获试验)以及作为共同注入标记的pTG96质粒(以20ng/μL)。pTG96质粒包含在许多细胞中和大多数发育阶段表达的sur-5::gfp翻译融合体[37]。单拷贝插入Pcpr-4::cpr-4::flag转基因和Pcpr-4::nls::gfp转基因是使用前述方法生成的。

[0499] 免疫印迹检测分泌的CPR-4::Flag.来自辐照N2的条件培养基,Pcpr-4::cpr-4::flag,Pcpr-4::cpr-4::flag;cpr-4(tm3178),cep-1(gk138);Pcpr-4::cpr-4::flag或Pcpr-4::cpr-4::flag;daf-2(e1370);cpr-4(tm3178),使用10kD截留分子量(MWCO)离心过滤柱(终蛋白浓度为1μg/μL)浓缩动物。将浓缩的条件培养基溶解在12%SDS聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上,并转移到PVDF膜上。使用抗Flag标签的单克隆抗体(Sigma,目录号F3165,1:2000稀释)和与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠二抗(HRP,Bio-Rad,目录编号1705047,稀释度为1:5000)检测分泌的CPR-4::Flag。

[0500] CPR-4::Flag消耗.从Pcpr-4::cpr-4::flag派生的UV-CM或UV-Ctrl;将cpr-4(tm3718)动物与20μL床体积的抗Flag M2亲和力凝胶(Sigma,目录号A2220)在旋转摇床上于4℃孵育过夜。通过以10,000rpm离心2分钟使抗-Flag珠离心分离,并收集上清液并用作抗-Flag耗尽的条件培养基。

[0501] 蛋白质表达和纯化.tCPR-4或突变的tCPR-4蛋白(C109A,H281A或N301A)在具有N端GST标签和C端His_6-标签的大肠杆菌BL21(DE3)菌株中表达。使用谷胱甘肽琼脂糖凝胶柱(GE Healthcare,目录号17-0756-01)纯化细菌的可溶性级分,并在室温下通过PreScission蛋白酶裂解2小时,以除去GST标签。然后使用Ni^{2+}Sepharose色谱柱(GE Healthcare,目录号17-5268-01)亲和纯化蛋白质,并用250mM咪唑从色谱柱上洗脱。使用5kD MWCO离心过滤器将纯化的蛋白质浓缩至最终浓度约为200ng/μL,并使用含有25mM Tris-HCl(pH 8.0)、100mMNaCl、1mM DTT和10%(v/v)甘油的透析缓冲液在4℃下磁力搅拌两次透析4～6小时。透析后通过高速离心去除不溶性聚集体。然后用透析缓冲液将蛋白质稀释至最终浓度为100ng/μL,并等分保存在-80℃下。使用已知浓度的tCPR-4-His_6作为标准化对照,通过抗His6免疫印迹法测定纯化蛋白的浓度。

[0502] 质谱分析.从银染凝胶上切下的目的蛋白条带用1%铁氰化钾和1.6%硫代硫酸钠脱色,在25mM NH_4HCO_3中用10mM DTT和55mM碘乙酰胺进行还原和烷基化,然后在37℃下用胰蛋白酶(20μg/mL在25mM NH_4HCO_3中)进行凝胶内消化16小时。使用线性离子阱质谱仪(LTQ-Orbitrap,Thermo Fisher),通过液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)分析反应产物。样品跨过捕集柱(Zorbax 300SB-C18,0.3×5mm,安捷伦科技公司)上样,在75分钟内,使用2-95%HPLC缓冲液(99.9%乙腈,含0.1%甲酸)的梯度在分析柱(毛细管RP18色谱柱,Synergyhydro-RP,2.5μm,0.075x 100mm,装在室内)上分离多肽。对于MS分析,本发明人使

用了依赖数据的程序，该程序在一次MS扫描和六次MS/MS扫描之间的六个最丰富前体离子之间交替进行。假定消化酶为胰蛋白酶，将所得光谱用于搜索sprot_20140416数据库(针对秀丽隐杆线虫选择，条目3466)。使用了MASCOT搜索引擎(http://www.matrixscience.com;v.2.2.2Matrix Science)，允许两个缺失的裂解位点的电荷状态为2^+至3^+。对于固定修饰(半胱氨酸的氨基甲酰甲基化)和可变修饰(蛋白质N端的乙酰化，蛋氨酸的氧化和Gln转变为pyro-Glu)两者，母体离子质量公差设定为10ppm，碎片离子质量公差设定为0.5Da。使用Scaffold 3搜索引擎(v.3.06.01;http://www.proteomesoftware.com)对Mascot Daemon生成的DAT文件进行了搜索。如果蛋白质概率>95％，并且包含至少两个肽预言算法概率>95％的肽，则接受蛋白质鉴定。

[0503] 体外蛋白酶活性的测定.按照先前描述的方法进行了一些修改，然后进行了CPR-4酶促测定。将组织蛋白酶B特定的荧光底物Z-Arg-Arg-7-酰胺基-4-甲基香豆素盐酸盐(z-Arg-Arg-AMC;Peptanova，目录号88937-61-5)溶于2x反应缓冲液中，包含25mM Tris-HCl(pH 8.0)、100mM NaCl、10％(v/v)甘油、0.8mM乙酸钠(pH6.0)和8mM EDTA。为了进行测定，将10μL的蛋白质(100ng/μL)或10μL的条件培养基(100ng/μL)与10μL的20μMz-Arg-Arg-AMC在25℃温育10分钟，然后测量发光。在双波长荧光计EnVision(Perkin-Elmer)中以25℃的平均速度测定酶的活性，激发波长为380nm，发射波长为460nm，并表示为相对强度，单位为千相对荧光单位(kRFU)。将重组人组织蛋白酶B(rhCTSB;信和生物公司，目录号10483-H08H-10)溶解在制造商推荐的缓冲液中[25mM Tris-HCl(pH 8.0)、100mM NaCl、10％(v/v)甘油、5mM DTT和0.1％Triton-X]。还使用相同程序测量了CPR-4蛋白或rhCTSB蛋白所特有的缓冲液对照或经假辐射的条件培养基。在每个实验中，将S-Medium用作背景对照。

[0504] cpr-4转录水平的定量RT-PCR分析.将N2和cep-1(gk138)L4幼虫转移到新鲜的NGM平板中，并在20℃下培养24小时。在对其进行100J/m^2紫外线或500Gyγ射线辐照或假照射后两小时，使用RNAiso试剂盒(TaKaRa，目录号9108)将其裂解以提取总RNA。使用ImProm-IITM逆转录系统(Promega，目录号A3800)将分离的总RNA用作逆转录(RT)模板，根据制造商的说明获得第一条链cDNA。

[0505] 使用带有ROX的iTaq™SYBR®Green Supermix使用Bio-Rad CFX96Touch实时PCR检测系统进行定量PCR分析(Bio-Rad，目录号1725151)。每个PCR反应均含12.5μL的Bio-Rad超级混合溶液、50nM正向和反向引物以及5μLcDNA(150ng/μL)，最终体积为25μL。在放置在实时PCR检测系统96孔中的实时PCR管(Bio-Rad，目录号TLS0851)中进行扩增。循环条件如下：在95℃下变性3分钟，然后进行50个循环，在95℃下20秒，在60℃下30秒，在72℃下20秒。在最后循环之后进行熔解曲线分析，以检查每个反应中引物的特异性。PCR反应进行三次，并进行三个独立的实验。由于pmp-3在成年人中异常稳定的表达水平，因此其被用作内部参考。数据通过Livak方法分析。检测cpr-4的引物是：

[0506] 5'-TCGGAAAGAAGGTCTCCCAGAT-3'(正向引物)；和

[0507] 5'-GGTAGAAGTCCTCGTAGACAGTGAAT-3'(反向引物).

[0508] 检测pmp-3的引物是：

[0509] 5'-GTTCCCGTGTTCATCACTCAT-3'(正向引物)；和

[0510] 5'ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA-3'(反向引物).

[0511] 秀丽隐杆线虫中的局部辐射与筛选的化合物结合.将秀丽隐杆线虫L4幼虫安装在

含10nM叠氮化钠的琼脂糖垫(2%)上,并使用带有40×/0.9NAPlanApo Lambda物镜的倒置Ti-E显微镜在尼康A1激光扫描共聚焦光束照射到头部区域。在安装时,在光纤上测得的非常接近UV波长的405nm激光功率为23.32mW。使用512×512的60%405nm激光功率以2.2μs像素$^{-1}$的像素大小为0.58μm×0.58μm进行照射。本发明人使用Thor实验室的功率计(PM100D)和光电传感器(S140C)在样品平面测得的功率约为0.25-0.30mW。这相当于样品处大约0.75-0.89mWμm^{-2}。对于假辐射对照,在琼脂糖垫上辐照离动物稍远的区域。辐照后,立即将动物从琼脂糖垫中救出并转移至常规NGM板中,以便在分析动物内旁观者效应之前,在20℃下恢复24小时或在25℃下恢复20小时(胚胎致死率测定)。进行了三种测定以监测未暴露区域的动物内旁观者效应。它们是性腺中的hus-1::NeoGreen染色体DNA损伤检测、辐照动物F1后代的胚胎致死率检测以及后部区域的Phsp-4::gfp应激反应检测。

[0512] 体外CTSB或CPR-4蛋白酶活性的测定.将组织蛋白酶B特定的荧光底物Z-Arg-Arg-7-酰胺基-4-甲基香豆素盐酸盐(z-Arg-Arg-AMC;Peptanova,88937-61-5)溶解在2x反应缓冲液中,其中含有25mM Tris-HCl(pH 8.0)、100mM NaCl、10%(v/v)甘油、0.8mM乙酸钠(pH6.0)和8mM EDTA。对于测定,将5μL的蛋白质(100ngμl^{-1})和5μL的化合物与10μL的20μMz-Arg-Arg-AMC在37℃下孵育60分钟,然后测量发光。在荧光计Molecular Devices SpectraMAX M5中,在380nm的激发波长和460nm的发射波长下,在37℃下的平均速度被确定为酶活性。在每个实验中将蒸馏去离子水用作背景对照。抑制率=(对照OD-OD用化合物)/对照OD×100%。通过用至少六个不同抑制剂浓度的抑制率测量来确定IC50的值。通过使用GraphPad Prism 7.0(GraphPad Software,San Diego,CA)的非线性回归确定所有动力学参数。

[0513] 胚胎致死率测定.对于胚胎致死性测定,LUI处理后在25℃下恢复20小时后,将辐照或假辐照的动物放在NGM板上,在25℃下放置卵4小时,然后转移到新的NGM板上。再转移两次后,将动物丢弃。对未孵化的卵的数量(记为死卵)和发展为幼虫的卵的数量进行评分,并用于确定胚胎致死率。对于采用抗体处理的胚胎致死力测定,将L4幼虫放在NGM板上,在LUI处理后恢复6小时,然后在含有100倍稀释的抗Flag M2抗体(Sigma)的M9缓冲液中于20℃培养12小时,从液体培养基转移到新鲜的NGM平板中,并在25℃下产卵4小时。再转移两次后,将动物丢弃并按上述方法对胚胎致死率进行评分。

[0514] HUS-1::NeoGreen染色体DNA损伤测定.使用携带hus-1::neogreen敲入的野生型动物评估了秀丽隐杆线虫有丝分裂生殖细胞中的染色体DNA损伤。LUI处理后,将辐照的动物放在0.2mM Levamisole(Sigma)的显微镜载玻片上,并使用Nomarski显微镜(Zeiss,德国)对单个Z堆中的HUS-1::NeoGreen病灶进行评分。然后确定具有HUS-1::NeoGreen病灶的有丝分裂生殖细胞的百分比。

[0515] 基于上述实施例,本领域技术人员将理解或能够仅使用常规实验来确定本发明的其他特征和优点。因此,本发明不受限于已具体示出和描述的内容。所有出版物和参考文献均明确地全文引入本文作为参考。

[0516] 参考文献

[0517] 以下参考文献中的每一个均通过引用并入。

[0518] [1]Mothersill,C.&Seymour,C.Radiation-induced bystander effects:past history and future directions.Radiat.Res.155,759-767(2001).

[0519] [2]Prise,K.M.&O'Sullivan,J.M.Radiation-induced bystander signalling in cancertherapy.Nat.Rev.Cancer 9,351-360(2009).

[0520] [3]Rzeszowska-Wolny,J.,Przybyszewski,W.M.&Widel,M.Ionizing radiation-induced bystander effects,potential targets for modulation of radiotherapy.Eur.J.Pharmacol.625,156-164(2009).

[0521] [4]Stergiou,L.,Doukoumetzidis,K.,Sendoel,A.&Hengartner,M.O.The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in Caenorhabditis elegans.CellDeath Differ.14,1129-1138(2007).

[0522] [5]Derry,W.B.,Putzke,A.P.&Rothman,J.H.Caenorhabditis elegans p53:Role in apoptosis,meiosis,and stress resistance.Science 294,591-595(2001).

[0523] [6]Schumacher,B.,Hofmann,K.,Boulton,S.&Gartner,A.The C.elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis.Curr.Biol.11,1722-1727(2001).

[0524] [7]Klokov,D.et al.Low dose IR-induced IGF-1-sCLU expression:a p53-repressed expression cascade that interferes with TGFbeta1 signaling to confer apro-survival bystander effect.Oncogene 32,479-490(2013).

[0525] [8]Koturbash,I.et al.In vivo bystander effect:Cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage,altered cellular proliferation and apoptosis,and increased p53 levels in shielded spleen.Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.70,554-562(2008).

[0526] [9]Sun,Y.et al.,Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B.Nat.Med.18,1359-1368(2012).

[0527] [10]Buck,M.R.,Karustis,D.G.,Day,N.A.,Honn,K.V.&Sloane,B.F.Degradation of Extracellular-Matrix Proteins by Human Cathepsin-B from Normal andTumor-Tissues.Biochem.J.282,273-278(1992).

[0528] [11]Poole,A.R.,Tiltman,K.J.,Recklies,A.D.&Stoker,T.A.Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas.Nature 273,545-547(1978).

[0529] [12]Larminie,C.G.&Johnstone,I.L.Isolation and characterization of four developmentally regulated cathepsin B-like cysteine protease genes from the nematode Caenorhabditis elegans.DNA CellBiol.15,75-82(1996).

[0530] [13]Lorimore,S.A.,Rastogi,S.,Mukherjee,D.,Coates,P.J.&Wright,E.G.The influence of p53 functions on radiation-induced inflammatory bystander-type signaling in murine bone marrow.Radiat.Res.179,406-415(2013).

[0531] [14]Calfon,M.et al.IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacitybyprocessing the XBP-1mRNA.Nature 415,92-96(2002).

[0532] [15]Bertucci,A.,Pocock,R.D.,Randers-Pehrson,G.&Brenner,D.J.Microbeam irradiation ofthe C.elegans nematode.JRadiat.Res.50Suppl A,A49-54(2009).

[0533] [16]Mort,J.S.&Buttle,D.J.Cathepsin B.Int.J.Biochem.Cell Biol.29,715-720(1997).

[0534] [17]Shore,D.E.&Ruvkun,G.A cytoprotective perspective on longevityregulation.Trends CellBiol.23,409-420(2013).

[0535] [18]Kenyon,C.J.The genetics ofageing.Nature464,504-512(2010).

[0536] [19]Perrin,A.J.et al.Noncanonical control of C.elegans germline apoptosis by the胰岛素/IGF-1and Ras/MAPK signaling pathways.Cell DeathDiffer.20,97-107(2013).

[0537] [20]Scott,B.A.,Avidan,M.S.&Crowder,C.M.Regulation ofhypoxic death in C.elegans by the胰岛素/IGF receptor homolog DAF-2.Science 296,2388-2391(2002).

[0538] [21]Paradis,S.,Ailion,M.,Toker,A.,Thomas,J.H.&Ruvkun,G.A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1PI3 kinase signals that regulate diapause in Caenorhabditis elegans.Genes Dev.13,1438-1452(1999).

[0539] [22]Lin,K.,Dorman,J.B.,Rodan,A.&Kenyon,C.daf-16:An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of Caenorhabditis elegans.Science 278,1319-1322(1997).

[0540] [23]Ogg,S.et al.The Fork head transcription factor DAF-16transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C.elegans.Nature 389,994-999(1997).

[0541] [24]Michaelson,D.,Korta,D.Z.,Capua,Y.&Hubbard,E.J.Insulin signaling promotes germline proliferation in C.elegans.Development 137,671-680(2010).

[0542] [25]Pinkston,J.M.,Garigan,D.,Hansen,M.&Kenyon,C.Mutations that increase the life span of C.elegans inhibit tumor growth.Science 313,971-975(2006).

[0543] [26]Nikjoo,H.&Khvostunov,I.K.A theoretical approach to the role and critical issues associated withbystander effect in risk estimation.Hum.Exp.Toxicol.23,81-86(2004).

[0544] [27]Mothersill,C.&Seymour,C.Radiation-induced bystander and other non-targeted effects:novel intervention points in cancer therapy? Curr.CancerDrug Targets 6,447-454(2006).

[0545] [28]Recklies,A.D.,Tiltman,K.J.,Stoker,T.A.&Poole,A.R.Secretion ofproteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue.CancerRes.40,550-556(1980).

[0546] [29]Barrett,A.J.&Kirschke,H.Cathepsin B,Cathepsin H,and cathepsin L.MethodsEnzymol.80Pt C,535-561(1981).

[0547] [30]Shree,T.et al.Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer.Genes Dev.25,2465-2479(2011).

[0548] [31]Brenner,S.The genetics of Caenorhabditis elegans.Genetics 77,71-

94(1974).

[0549] [32]Frokjaer-Jensen,C.et al.,Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans.Nat.Genet.40,1375-1383(2008).

[0550] [33]Timmons,L.,Court,D.L.&Fire,A.Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans.Gene 263,103-112(2001).

[0551] [34]Pepper,A.S.R.,Killian,D.J.&Hubbard,E.J.A.Genetic analysis of Caenorhabditis elegans glp-1 mutants suggests receptor interaction or competition.Genetics 163,115-132(2003).

[0552] [35]Bendtsen,J.D.,Nielsen,H.,von Heijne,G.,&Brunak,S.,Improved prediction ofsignal peptides:SignalP 3.0.J.Mol.Biol.340,783-795(2004).

[0553] [36]Mello,C.C.,Kramer,J.M.,Stinchcomb,D.,&Ambros,V.,Efficient Gene-Transfer in C-Elegans-Extrachromosomal Maintenance and Integration ofTransforming Sequences.EMBOJ.10,3959-3970(1991).

[0554] [37]Gu,T.,Orita,S.&Han,M.Caenorhabditis elegans SUR-5,a novel but conserved protein,negatively regulates LET-60 Ras activity during vulval induction.Mol.CellBiol.18,4556-4564(1998).

[0555] [38]Paquet,C.,Sane,A.T.,Beauchemin,M.&Bertrand,R.Caspase-and mitochondrial dysfunction-dependent mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation in DNA damage-induced apoptosis.Leukemia 19,784-791(2005).

[0556] [39]Hoogewijs,D.,Houthoofd,K.,Matthijssens,F.,Vandesompele,J.& Vanfleteren,J.R.Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in C.elegans.BMC Mol.Biol.9,9(2008).

[0557] [40]Timmons,L.,Court,D.L.&Fire,A.Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans.Gene 263,103-112(2001).

[0558] [41]Sumiya,S.,Yoneda,T.,Kitamura,K.,Murata,M.,Yokoo,C.,Tamai,M., Yamamoto,A.,Inoue,M.&Ishida,T.Molecular design ofpotent inhibitor specific for cathepsin B based on the tertiary structure prediction.Chem.Pharm.Bull.40,299-303(1992).

[0559] [42]Buttle,D.,Murata,M.,Knight,C.&Barrett,A.CA074 methyl ester:A proinhibitor for intracellular cathepsin B.Arch.Biochem.Biophys.299,377-380(1992).

[0560] [43]Gour-Salin,B.et al.E64[trans-epoxysuccinyl-l-leucylamido-(4-guanidino)butane]analogues as inhibitors of cysteine proteinases: investigation of S2 subsite interactions.Biochem.J.299,389-392(1994).

[0561] [44]Kokel,D.,Li,Y.H.,Qin,J.,and Xue,D.The non-genotoxic carcinogens

naphthalene and para-dichlorobenzene suppress apoptosis in C.elegans.Nature Chemical Biology 2,338-345(2006).

[0562] [45]Kokel,D.and Xue,D.(2006).A class of benzenoid chemicals suppresses apoptosis in C.elegans.ChemBioChem 7,2010-2015(2006).

[0563] [46]Hofmann E R,Milstein S,Boulton S J,et al.Caenorhabditis elegans HUS-1is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and induction ofEGL-1.Curr.Biol.12,1908-1918(2002).

[0564] [47]Peng Y,Zhang M,Zheng L,et al.Cysteine protease cathepsin B mediates radiation induced bystander effects.Nature.547,458-462(2017).

[0565] 表

[0566] 表1.筛选抑制CTSB活性和RIBE的化合物

[0567]

NO.	化合物名称	NO.	化合物名称
1	水合儿茶素	10	丹宁酸
2	芹菜素	11	灵芝酸B
3	黄芩素	12	叶酸
4	异槲皮苷	13	抗坏血酸
5	姜黄素	14	NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH
6	白藜芦醇	15	NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH-Se
7	槲皮素	16	CA074Me
8	芦丁	17	CA074
9	虾青素	18	E64

[0568] 表2.筛选抑制CTSB蛋白酶活性的化合物

[0569]

化合物名称	抑制率(%)
芹菜素	70.93
异槲皮苷	68.98
槲皮素	82.42
丹宁酸	69.29
Ca074Me	88.13
Ca074	91.81
E64	92.13
叶酸	-425.60
黄芩素	82.76
NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH	86.12
NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH-Se	86.93

[0570] 蛋白酶抑制试验中使用了每种化合物1mM

[0571] 表3.化合物在抑制CTSB蛋白酶活性中的IC 50。

[0572]

化合物名称	IC50(μM)	EC50(μM)
槲皮素	1.87	
E64	0.02	
叶酸		1.26
黄芩素	0.87	
NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH	12.21	
CA074	0.01	
CA074 Me	<0.01	

[0573] 表4.化合物抑制秀丽隐杆线虫CPR-4蛋白酶活性的活性

[0574]

化合物名称	抑制率 (%)
槲皮素	80.67
E64	89.59
黄芩素	41.54
NH_2-Arg-Leu-Ala-COOH	85.03

[0575] 每种化合物1mM用于CPR-4蛋白酶抑制试验

[0576] 表5:使用LTQ-ORBITRAP通过LC-MS/MS分析在1-10条带中的肽段识别信息的摘要

[0577]

条带 No.	蛋白名称	基因名称	蛋白 ID 概率	独特肽的No.	序列覆盖率
1	未测定				
2	假定丝氨酸蛋白酶 K12H4.7	K12H4.7	99.80%	2	5.29%
	延伸因子 1-alpha	*eft-3*	99.80%	2	4.10%
3	假定丝氨酸蛋白酶 K12H4.7	K12H4.7	100.00%	3	7.65%
	假定磷脂酶 B-样 1	Y37D8A.2	100.00%	2	5.78%
4	天冬氨酸蛋白酶6	*asp-6*	100.00%	4	19.00%
5	组织蛋白酶 B-样 半胱氨酸蛋白酶4	*cpr-4*	100.00%	3	11.30%
	肌肉M线装配蛋白 unc-89	*unc-89*	99.90%	2	0.24%
	未表征的丝氨酸羧肽酶 F13S12.6	F13D12.6	99.80%	2	4.41%
	天冬氨酸蛋白酶6	*asp-6*	99.80%	2	10.80%
6	天冬氨酸蛋白酶6	*asp-6*	100.00%	6	19.00%
	未表征的丝氨酸羧肽酶 K10B2.2	K10B2.2	100.00%	3	7.66%
	DNA 修复蛋白 rad-50	*rad-50*	99.80%	2	0.92%
	组织蛋白酶 B-样 半胱氨酸蛋白酶4	*cpr-4*	99.80%	2	8.36%
7	肌动蛋白-1	*act-1*	100.00%	7	18.40%
	组蛋白 H4	*his-1*	100.00%	5	41.70%
	延伸因子 1-alpha	*eft-3*	100.00%	3	6.26%
	超氧化物歧化酶 [Cu-Zn]	*sod-1*	100.00%	3	23.30%
	14-3-3-样 蛋白 1	*par-5*	99.80%	2	7.26%
	组蛋白 H3.3 1型	*his-71*	100.00%	2	10.30%
	泛素 60S 核糖体蛋白 L40	*ubq-2*	99.80%	2	11.70%
	组蛋白H2B 2	*his-4*	99.80%	2	13.00%
8	未表征的丝氨酸羧肽酶 F13S12.6	F13D12.6	100.00%	5	10.40%
	脂肪酸和视黄醇结合蛋白2	*far-2*	100.00%	3	17.00%
	UPF0375 蛋白 C08F11.11	C08F11.11	100.00%	3	36.00%
	肌动蛋白-1	*act-1*	99.90%	2	7.45%
	RutC 族蛋白 C23G10.2	C23G10.2	99.80%	2	13.50%
9	天冬氨酸蛋白酶 6	*asp-6*	100.00%	3	11.60%
	未表征的丝氨酸羧肽酶 F13S12.6	F13D12.6	99.70%	2	4.85%
	组织蛋白酶 B-样 半胱氨酸蛋白酶4	*cpr-4*	99.70%	2	8.36%
10	天冬氨酸蛋白酶 6	*asp-6*	100.00%	4	9.77%
	未表征的丝氨酸羧肽酶 F13S12.6	F13D12.6	99.80%	2	4.85%
	组织蛋白酶 B-样 半胱氨酸蛋白酶4	*cpr-4*	99.80%	2	10.40%
	组蛋白 H4	*his-1*	99.80%	2	17.50%

[0578] 表6:Pmyo-2::CPR-4::mCherry转基因动物的cpr-4RNAi治疗的总结。所有菌株均包含ced-1(e1735)和cpr-4(tm3718)突变。RNAi实验是使用细菌饲养方案进行的。

[0579]

基因型	幼虫滞育率 (%)	n
对照 RNAi	0%	150
cpr-4 RNAi	0%	150
Ex[P*myo*-2::CPR-4::mCherry]*#1*; 对照 RNAi	9%	135
Ex[P*myo*-2::CPR-4::mCherry]#2; 对照 RNAi	7%	172
Ex[P*myo*-2::CPR-4::mCherry] *#1*; *cpr-4* RNAi	1%	136
Ex[P*myo*-2::CPR-4::mCherry] *#2*; *cpr-4* RNAi	1%	163

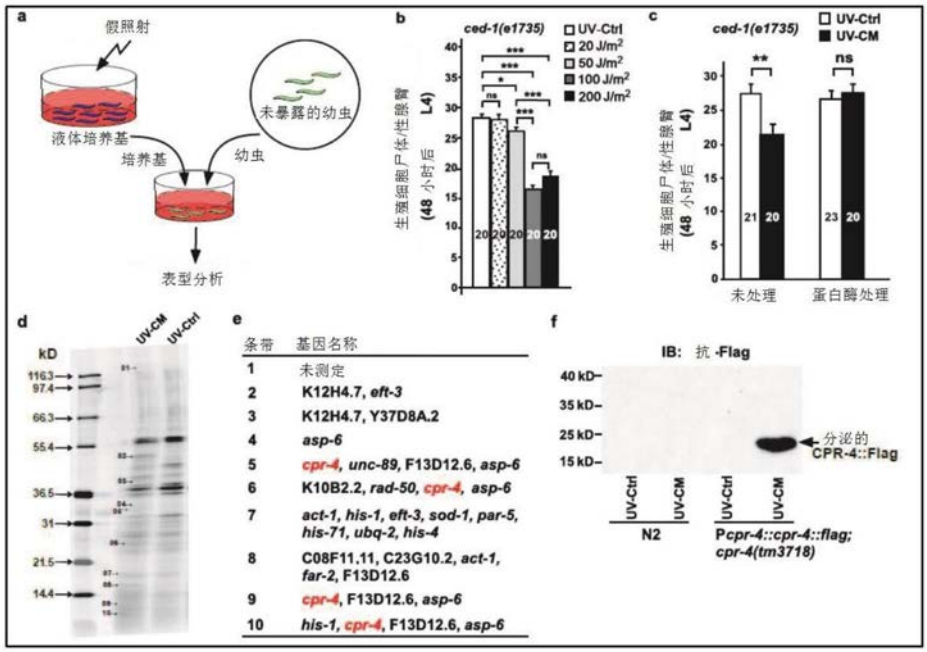

a
假照射
液体培养基
培养基
未暴露的幼虫
幼虫
表型分析
b
ced-1(e1735)
UV-Ctrl
20 J/m2
50 J/m2
100 J/m2
200 J/m2
生殖细胞尸体/性腺臂 (48 小时后 L4)
c
ced-1(e1735)
UV-Ctrl
UV-CM
ns
未处理
蛋白酶处理
d
kD
UV-CM
UV-Ctrl
116.3
97.4
66.3
55.4
36.5
31
21.5
14.4
e
条带 基因名称
1 未测定
2 K12H4.7, eft-3
3 K12H4.7, Y37D8A.2
4 asp-6
5 cpr-4, unc-89, F13D12.6, asp-6
6 K10B2.2, rad-50, cpr-4, asp-6
7 act-1, his-1, eft-3, sod-1, par-5, his-71, ubq-2, his-4
8 C08F11.11, C23G10.2, act-1, far-2, F13D12.6
9 cpr-4, F13D12.6, asp-6
10 his-1, cpr-4, F13D12.6, asp-6
f
IB: 抗 -Flag
40 kD
35 kD
25 kD
15 kD
分泌的 CPR-4::Flag
UV-Ctrl
UV-CM
N2
Pcpr-4::cpr-4::flag; cpr-4(tm3718)

图1

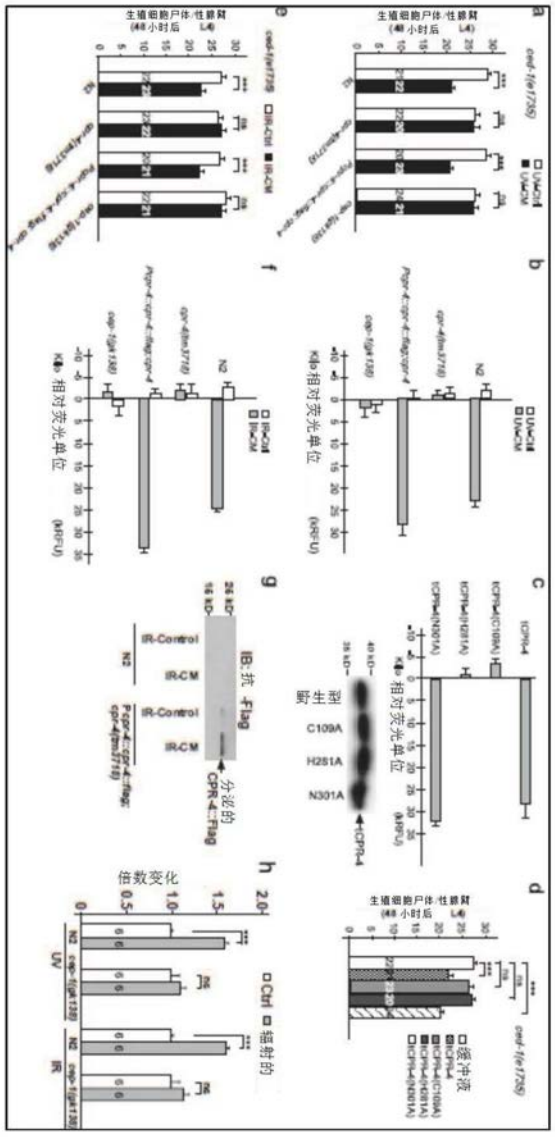


图2

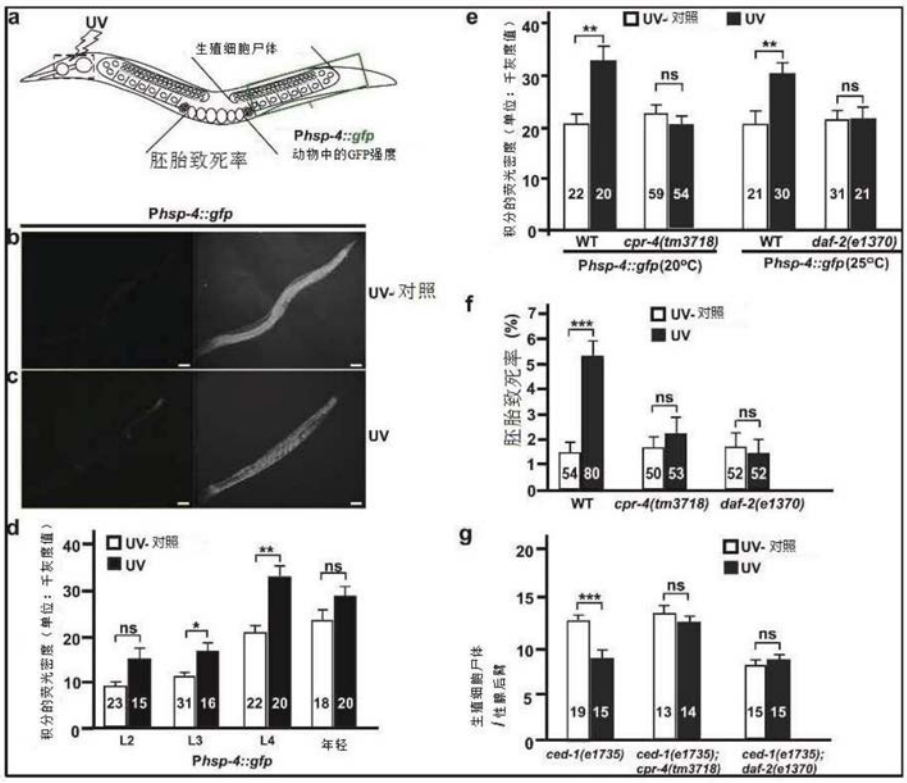

a
UV
生殖细胞尸体
胚胎致死率
Phsp-4::gfp
动物中的GFP强度
b
Phsp-4::gfp
UV- 对照
c
UV
d
积分的荧光密度（单位：千灰度值）
UV- 对照
UV
L2
L3
L4
年轻
Phsp-4::gfp
e
积分的荧光密度（单位：千灰度值）
UV- 对照
UV
WT
cpr-4(tm3718)
daf-2(e1370)
Phsp-4::gfp(20°C)
Phsp-4::gfp(25°C)
f
胚胎致死率 (%)
UV- 对照
UV
WT
cpr-4(tm3718)
daf-2(e1370)
g
生殖细胞尸体/性腺后臂
UV- 对照
UV
ced-1(e1735)
ced-1(e1735); cpr-4(tm3718)
ced-1(e1735); daf-2(e1370)

图3

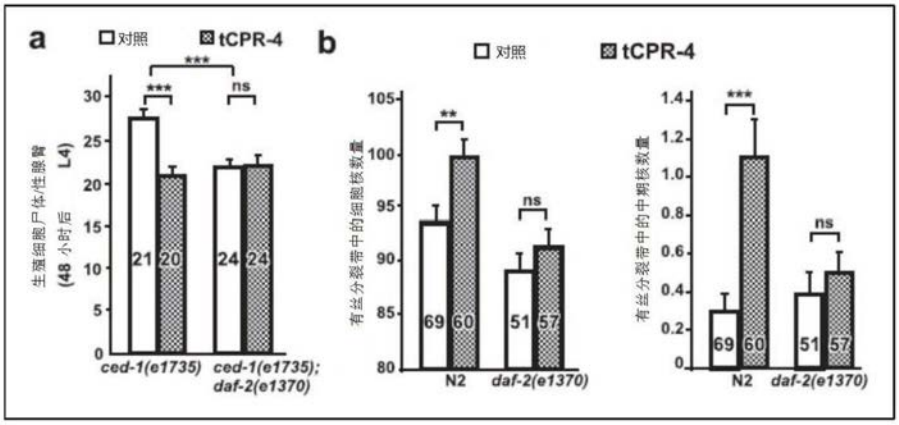

a
对照
tCPR-4
生殖细胞尸体性腺臂 (48 小时后 L4)
ced-1(e1735)
ced-1(e1735); daf-2(e1370)
b
对照
tCPR-4
有丝分裂带中的细胞核数量
N2
daf-2(e1370)
有丝分裂带中的中期核数量
N2
daf-2(e1370)

图4

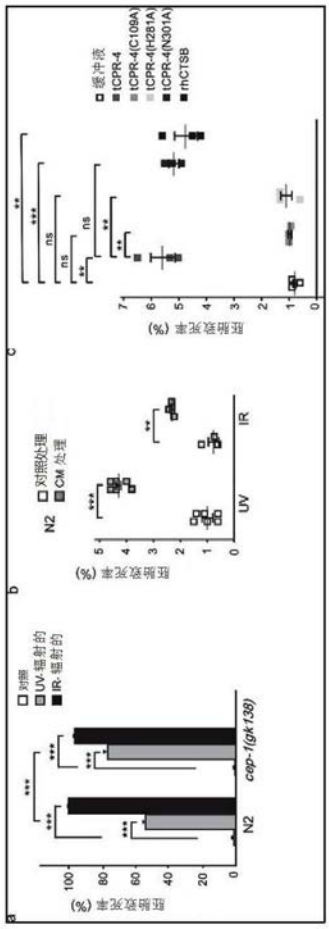

a
b
c
对照
UV-辐射的
IR-辐射的
压胁致死率 (%)
N2
cep-1(gk138)
对照处理
CM 处理
UV
IR
缓冲液
tCPR-4
tCPR-4(C108A)
tCPR-4(H281A)
tCPR-4(N301A)
rhCTSB

图5

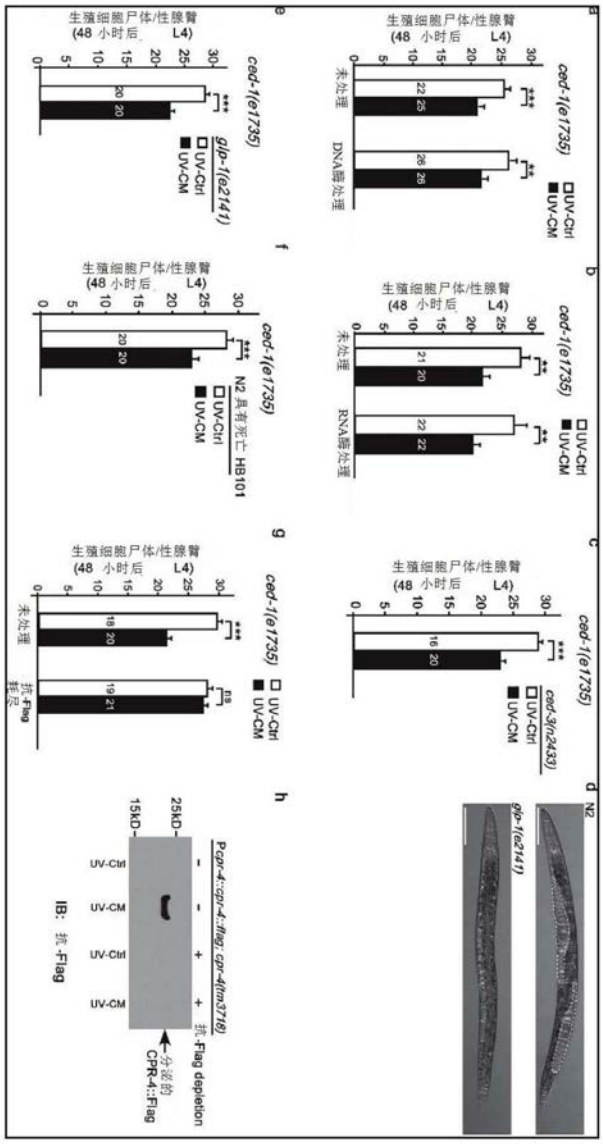

a
生殖细胞尸体/性腺臂
(48 小时后 L4)
ced-1(e1735)
UV-Ctrl
UV-CM
未处理
DNA损伤处理
b
RNA损伤处理
c
ced-3(n2433)
d
N2
glp-1(e2141)
e
glp-1(e2141)
f
N2 具有死亡 HB101
g
未处理
排空 Flag
h
25kD
15kD
Pcpr-4::cpr-4::flag; cpr-4(tm3718)
排空 Flag depletion
IB: 抗-Flag
分泌的 CPR-4::Flag

图6

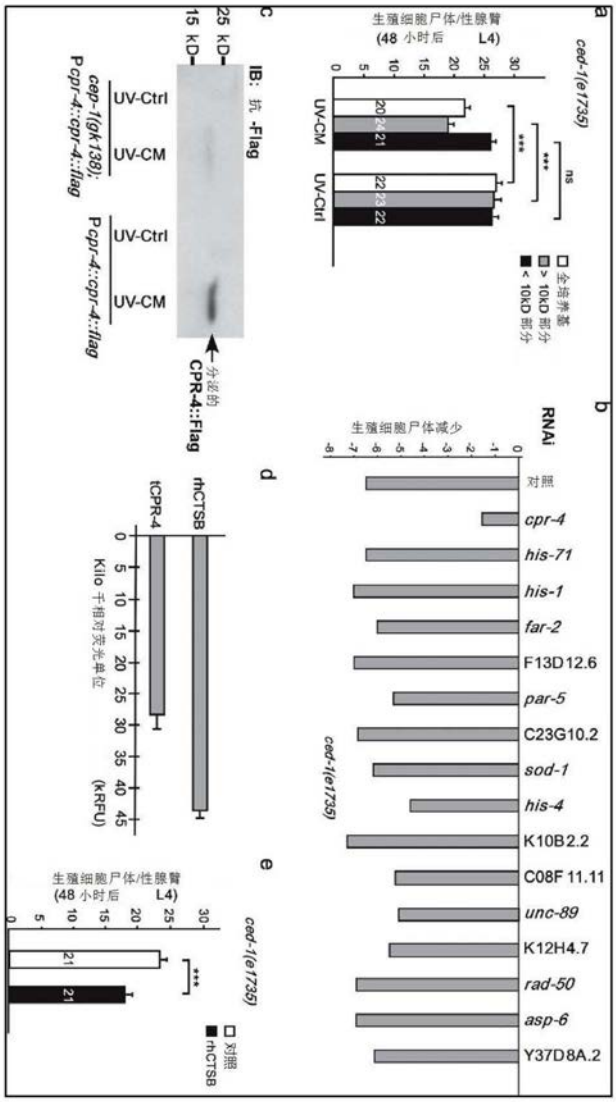

a
ced-1(e1735)
生殖细胞尸体/性腺臂
(48 小时后 L4)
UV-CM
UV-Ctrl
***
***
ns
全培养基
> 10kD 部分
< 10kD 部分
b
RNAi
生殖细胞尸体减少
对照
cpr-4
his-71
his-1
far-2
F13D12.6
par-5
C23G10.2
sod-1
his-4
K10B2.2
C08F 11.11
unc-89
K12H4.7
rad-50
asp-6
Y37D8A.2
c
IB: 抗 -Flag
25 kD
15 kD
cep-1(gk138);
Pcpr-4::cpr-4::flag
UV-Ctrl
UV-CM
Pcpr-4::cpr-4::flag
UV-Ctrl
UV-CM
分泌的
CPR-4::Flag
d
tCPR-4
rhCTSB
Kilo 干相对荧光单位
(kRFU)
e
生殖细胞尸体/性腺臂
(48 小时后 L4)
ced-1(e1735)
***
对照
rhCTSB

图7

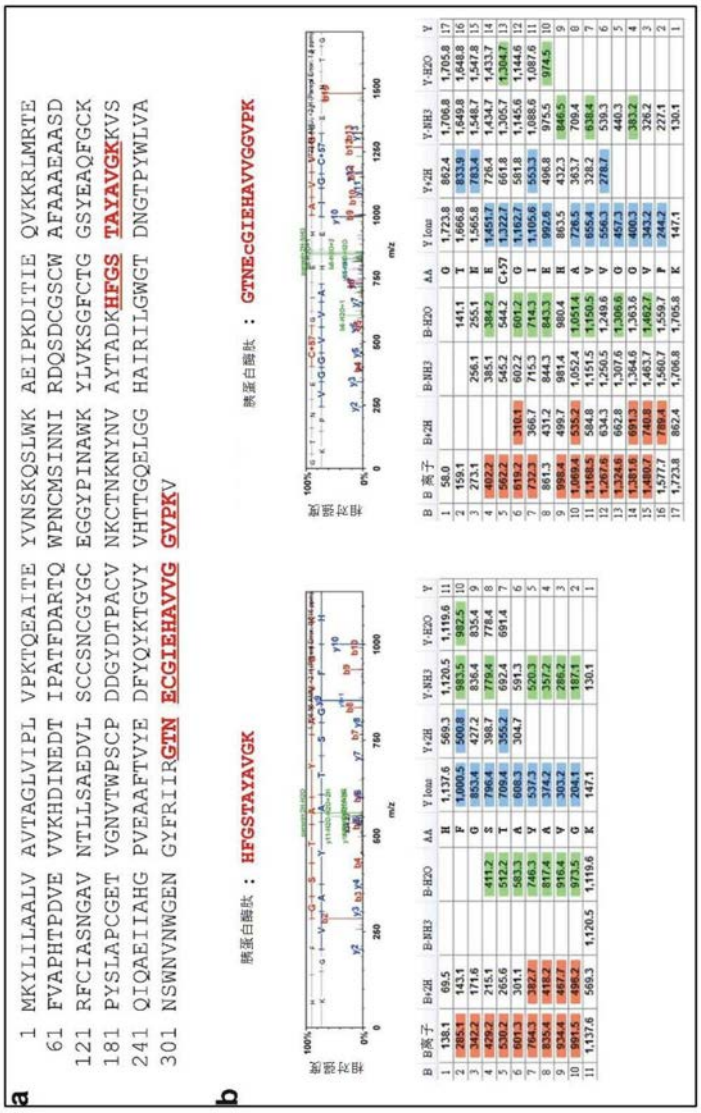

a
1 MKYLILAALV AVTAGLVIPL VPKTQEAITE YVNSKQSLWK AEIPKDITIE QVKKRLMRTE
61 FVAPHTPDVE VVKHDINEDT IPATFDARTQ WPNCMSINNI RDQSDCGSCW AFAAAEAASD
121 RFCIASNGAV NTLLSAEDVL SCCSNCGYGC EGGYPINAWK YLVKSGFCTG GSYEAQFGCK
181 PYSLAPCGET VGNVTWPSCP DDGYDTPACV NKCTNKNYNV AYTADKHFGS TAYAVGKKVS
241 QIQAEIIAHG PVEAAFTVYE DFYQYKTGVY VHTTGQELGG HAIRILGWGT DNGTPYWLVA
301 NSWNVNWGEN GYFRIIRGTN ECGIEHAVVG GVPKV
b
胰蛋白酶肽 : HFGSTAYAVGK
胰蛋白酶肽 : GTNEcGIEHAVVGGVPK

图8

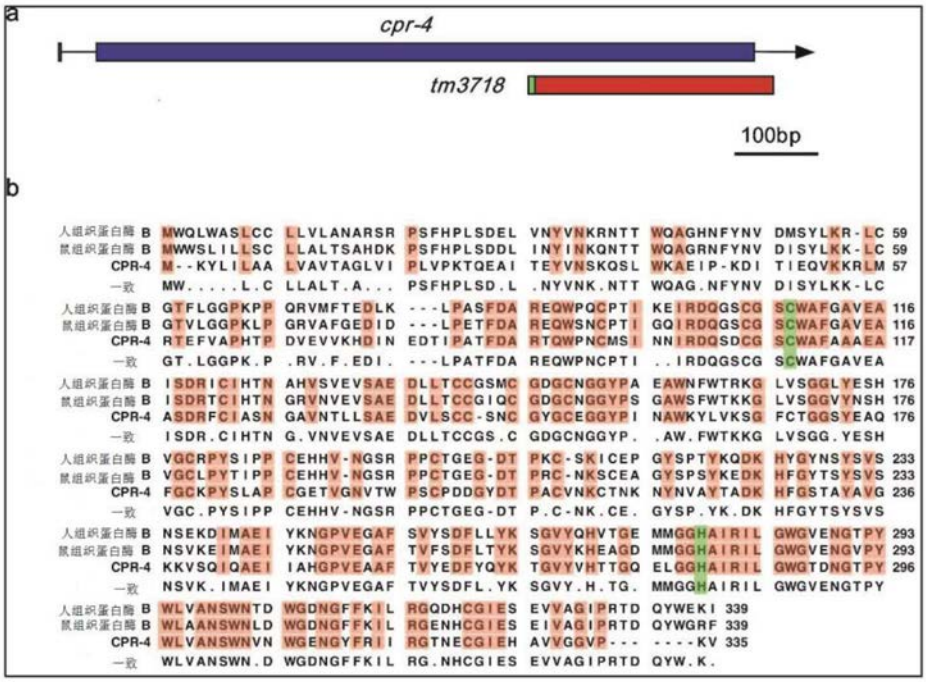
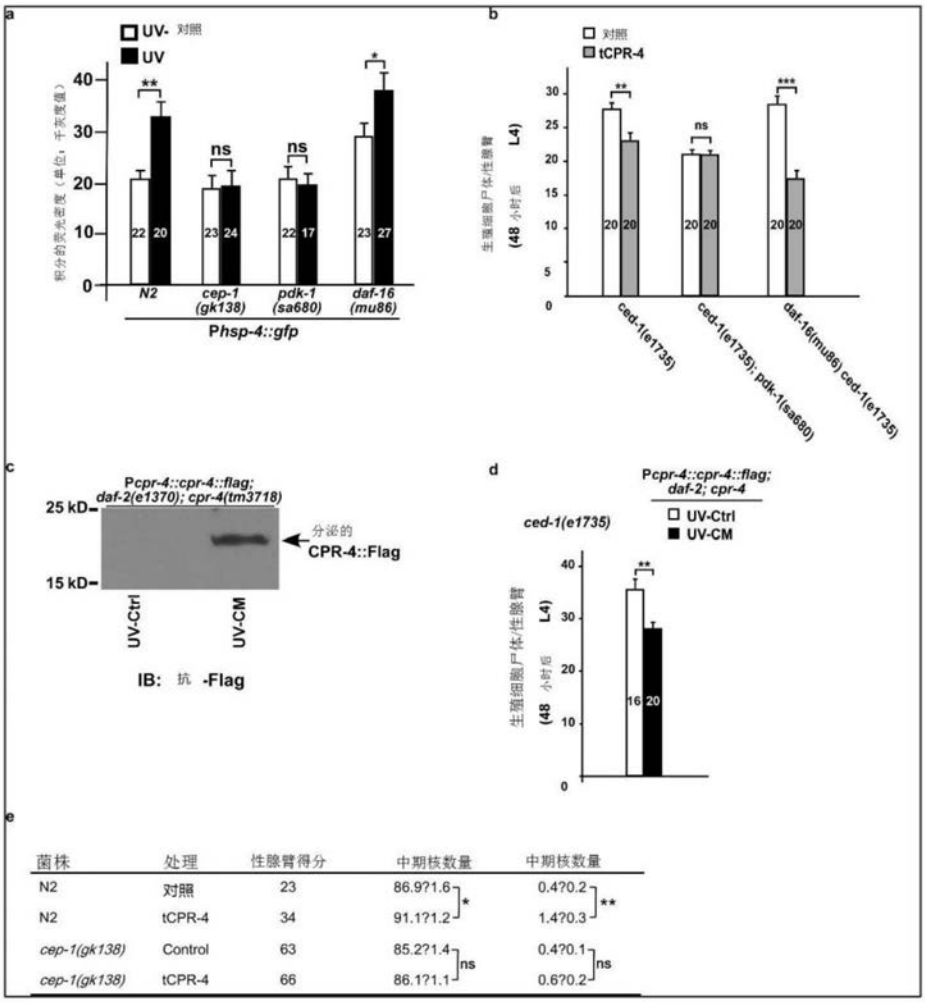

a
cpr-4
tm3718
100bp
b
人组织蛋白酶 B MWQLWASLCC LLVLANARSR PSFHPLSDEL VNYVNKRNTT WQAGHNFYNV DMSYLKR-LC 59
鼠组织蛋白酶 B MWWSLILLSC LLALTSAHDK PSFHPLSDDL INYINKQNTT WQAGRNFYNV DISYLKK-LC 59
CPR-4 M--KYLILAA LVAVTAGLVI PLVPKTQEAI TEYVNSKQSL WKAEIP-KDI TIEQVKKRLM 57
一致 MW.....L.C LLALT.A... PSFHPLSD.L .NYVNK.NTT WQAG.NFYNV DISYLKK-LC
人组织蛋白酶 B GTFLGGPKPP QRVMFTEDLK ---LPASFDA REQWPQCPTI KEIRDQGSCG SCWAFGAVEA 116
鼠组织蛋白酶 B GTVLGGPKLP GRVAFGEDID ---LPETFDA REQWSNCPTI GQIRDQGSCG SCWAFGAVEA 116
CPR-4 RTEFVAPHTP DVEVVKHDIN EDTIPATFDA RTQWPNCMSI NNIRDQSDCG SCWAFAAAEA 117
一致 GT.LGGPK.P .RV.F.EDI. ---LPATFDA REQWPNCPTI ..IRDQGSCG SCWAFGAVEA
人组织蛋白酶 B ISDRICIHTN AHVSVEVSAE DLLTCCGSMC GDGCNGGYPA EAWNFWTRKG LVSGGLYESH 176
鼠组织蛋白酶 B ISDRTCIHTN GRVNVEVSAE DLLTCCGIQC GDGCNGGYPS GAWSFWTKKG LVSGGVYNSH 176
CPR-4 ASDRFCIASN GAVNTLLSAE DVLSCC-SNC GYGCEGGYPI NAWKYLVKSG FCTGGSYEAQ 176
一致 ISDR.CIHTN G.VNVEVSAE DLLTCCGS.C GDGCNGGYP. .AW.FWTKKG LVSGG.YESH
人组织蛋白酶 B VGCRPYSIPP CEHHV-NGSR PPCTGEG-DT PKC-SKICEP GYSPTYKQDK HYGYNSYSVS 233
鼠组织蛋白酶 B VGCLPYTIPP CEHHV-NGSR PPCTGEG-DT PRC-NKSCEA GYSPSYKEDK HFGYTSYSVS 233
CPR-4 FGCKPYSLAP CGETVGNVTW PSCPDDGYDT PACVNKCTNK NYNVAYTADK HFGSTAYAVG 236
一致 VGC.PYSIPP CEHHV-NGSR PPCTGEG-DT P.C-NK.CE. GYSP.YK.DK HFGYTSYSVS
人组织蛋白酶 B NSEKDIMAEI YKNGPVEGAF SVYSDFLLYK SGVYQHVTGE MMGGHAIRIL GWGVENGTPY 293
鼠组织蛋白酶 B NSVKEIMAEI YKNGPVEGAF TVFSDFLTYK SGVYKHEAGD MMGGHAIRIL GWGVENGVPY 293
CPR-4 KKVSQIQAEI IAHGPVEAAF TVYEDFYQYK TGVYVHTTGQ ELGGHAIRIL GWGTDNGTPY 296
一致 NSVK.IMAEI YKNGPVEGAF TVYSDFL.YK SGVY.H.TG. MMGGHAIRIL GWGVENGTPY
人组织蛋白酶 B WLVANSWNTD WGDNGFFKIL RGQDHCGIES EVVAGIPRTD QYWEKI 339
鼠组织蛋白酶 B WLAANSWNLD WGDNGFFKIL RGENHCGIES EIVAGIPRTD QYWGRF 339
CPR-4 WLVANSWNVN WGENGYFRII RGTNECGIEH AVVGGVP--- ----KV 335
一致 WLVANSWN.D WGDNGFFKIL RG.NHCGIES EVVAGIPRTD QYW.K.

图9



e

菌株	处理	性腺臂得分	中期核数量		中期核数量	
N2	对照	23	86.9?1.6	*	0.4?0.2	**
N2	tCPR-4	34	91.1?1.2		1.4?0.3	
cep-1(gk138)	Control	63	85.2?1.4	ns	0.4?0.1	ns
cep-1(gk138)	tCPR-4	66	86.1?1.1		0.6?0.2	

图10

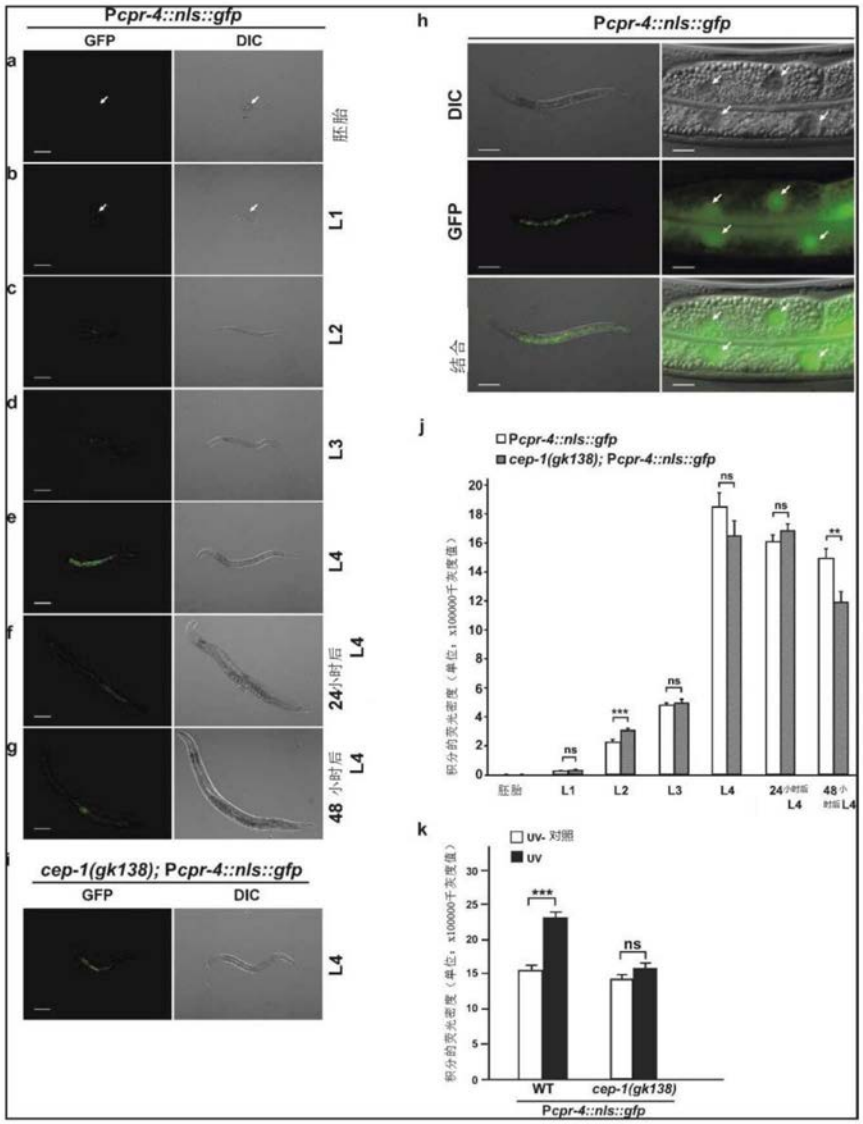
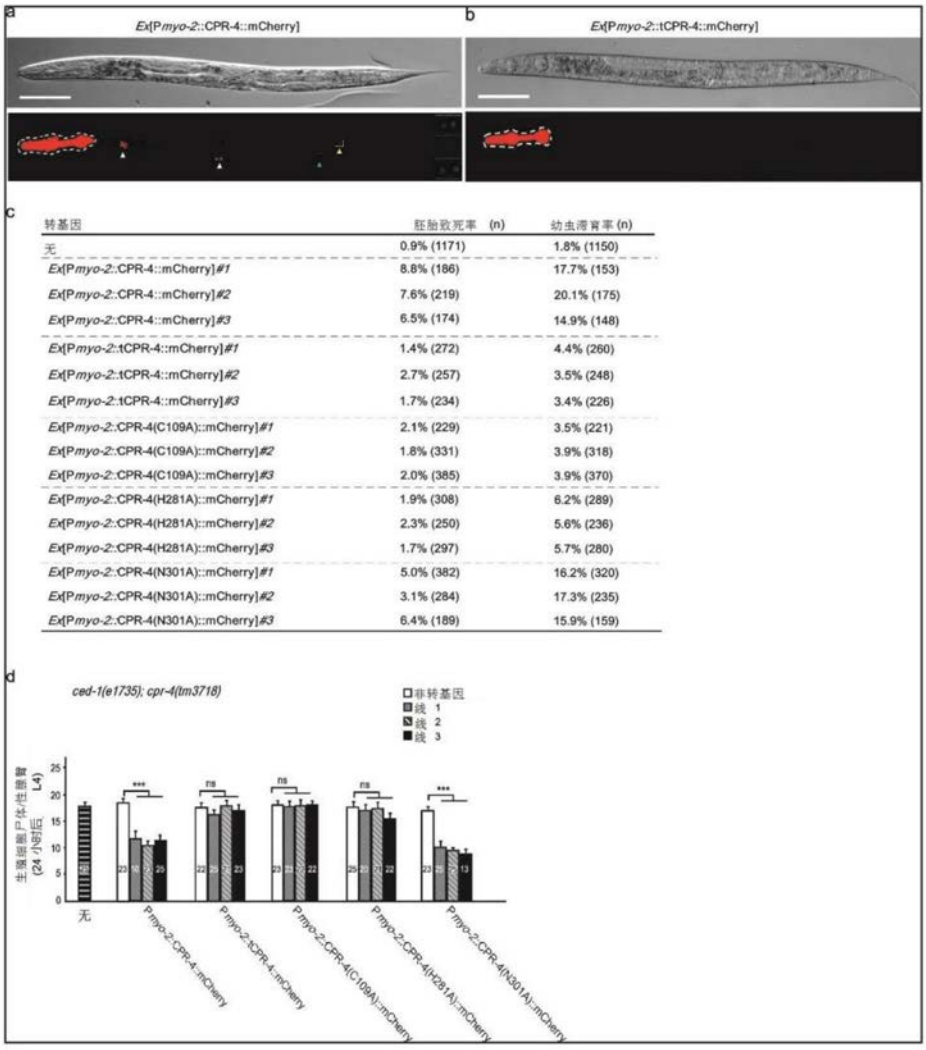

Pcpr-4::nls::gfp
GFP
DIC
胚胎
L1
L2
L3
L4
24小时后 L4
48 小时后 L4
cep-1(gk138); Pcpr-4::nls::gfp
GFP
DIC
L4
h
Pcpr-4::nls::gfp
DIC
GFP
结合
j
Pcpr-4::nls::gfp
cep-1(gk138); Pcpr-4::nls::gfp
积分的荧光密度（单位，x100000千灰度值）
胚胎
L1
L2
L3
L4
24小时后 L4
48小时后 L4
ns
**
k
UV- 对照
UV
积分的荧光密度（单位，x100000千灰度值）
***
ns
WT
cep-1(gk138)
Pcpr-4::nls::gfp

图11



转基因	胚胎致死率 (n)	幼虫滞育率 (n)
无	0.9% (1171)	1.8% (1150)
Ex[P*myo-2*::CPR-4::mCherry]*#1*	8.8% (186)	17.7% (153)
Ex[P*myo-2*::CPR-4::mCherry]*#2*	7.6% (219)	20.1% (175)
Ex[P*myo-2*::CPR-4::mCherry]*#3*	6.5% (174)	14.9% (148)
Ex[P*myo-2*::tCPR-4::mCherry]*#1*	1.4% (272)	4.4% (260)
Ex[P*myo-2*::tCPR-4::mCherry]*#2*	2.7% (257)	3.5% (248)
Ex[P*myo-2*::tCPR-4::mCherry]*#3*	1.7% (234)	3.4% (226)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(C109A)::mCherry]*#1*	2.1% (229)	3.5% (221)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(C109A)::mCherry]*#2*	1.8% (331)	3.9% (318)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(C109A)::mCherry]*#3*	2.0% (385)	3.9% (370)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(H281A)::mCherry]*#1*	1.9% (308)	6.2% (289)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(H281A)::mCherry]*#2*	2.3% (250)	5.6% (236)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(H281A)::mCherry]*#3*	1.7% (297)	5.7% (280)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(N301A)::mCherry]*#1*	5.0% (382)	16.2% (320)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(N301A)::mCherry]*#2*	3.1% (284)	17.3% (235)
Ex[P*myo-2*::CPR-4(N301A)::mCherry]*#3*	6.4% (189)	15.9% (159)

图12

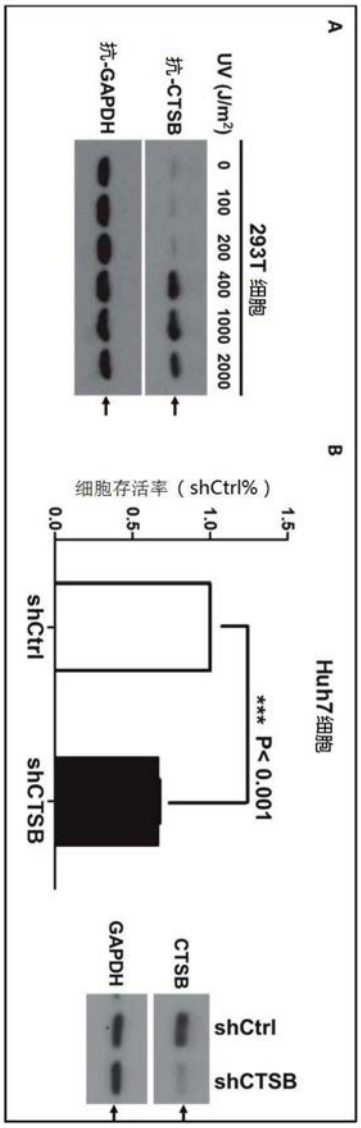

A
抗-GAPDH
抗-CTSB
UV (J/m²)
0 100 200 400 1000 2000
293T 细胞
B
细胞存活率（shCtrl%）
0.0 0.5 1.0 1.5
shCtrl
shCTSB
*** P< 0.001
Huh7细胞
GAPDH
CTSB
shCtrl
shCTSB

图13

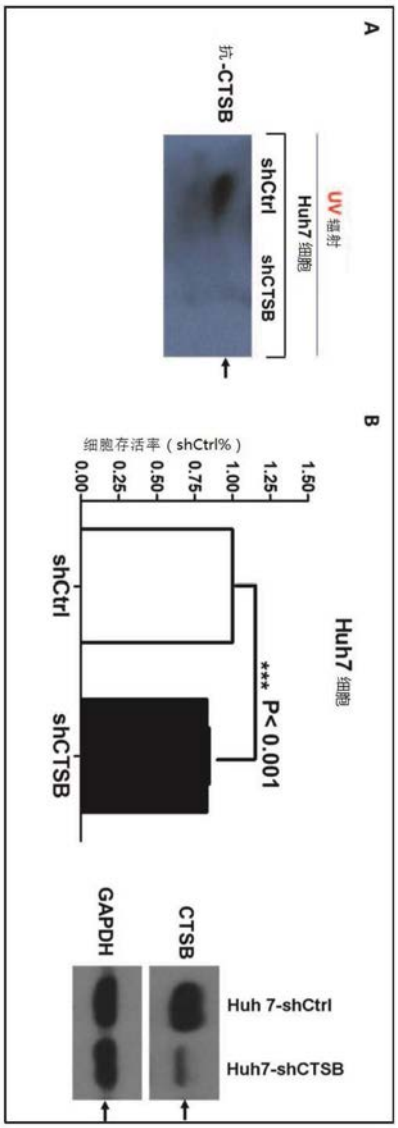

A
抗-CTSB
UV辐射
Huh7细胞
shCtrl
shCTSB
B
细胞存活率（shCtrl%）
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
1.50
shCtrl
shCTSB
*** P< 0.001
Huh7细胞
GAPDH
CTSB
Huh 7-shCtrl
Huh7-shCTSB

图14

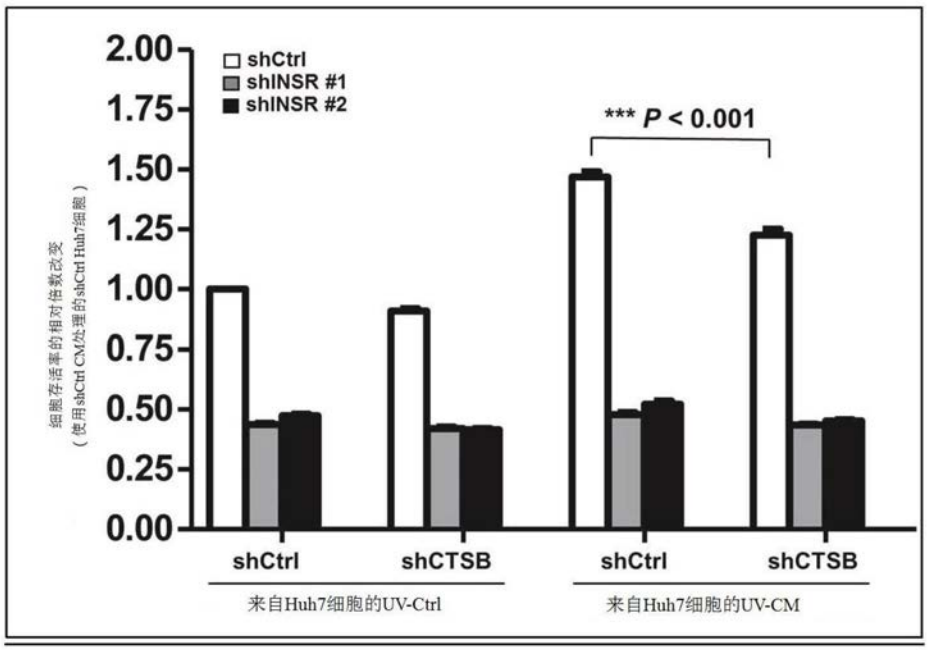

2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
shCtrl
shINSR #1
shINSR #2
*** P < 0.001
细胞存活率的相对倍数改变
（使用shCtrl CM处理的shCtrl Huh7细胞）
shCtrl
shCTSB
shCtrl
shCTSB
来自Huh7细胞的UV-Ctrl
来自Huh7细胞的UV-CM

图15

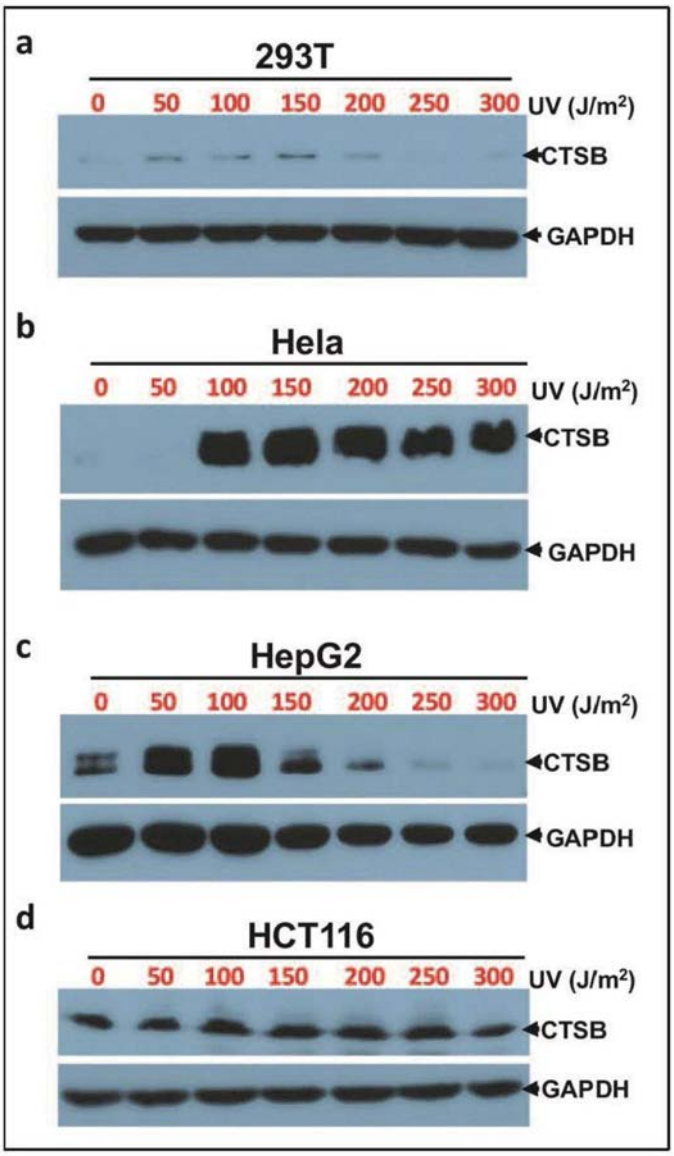

a
293T
0 50 100 150 200 250 300 UV (J/m²)
CTSB
GAPDH
b
Hela
0 50 100 150 200 250 300 UV (J/m²)
CTSB
GAPDH
c
HepG2
0 50 100 150 200 250 300 UV (J/m²)
CTSB
GAPDH
d
HCT116
0 50 100 150 200 250 300 UV (J/m²)
CTSB
GAPDH

图16

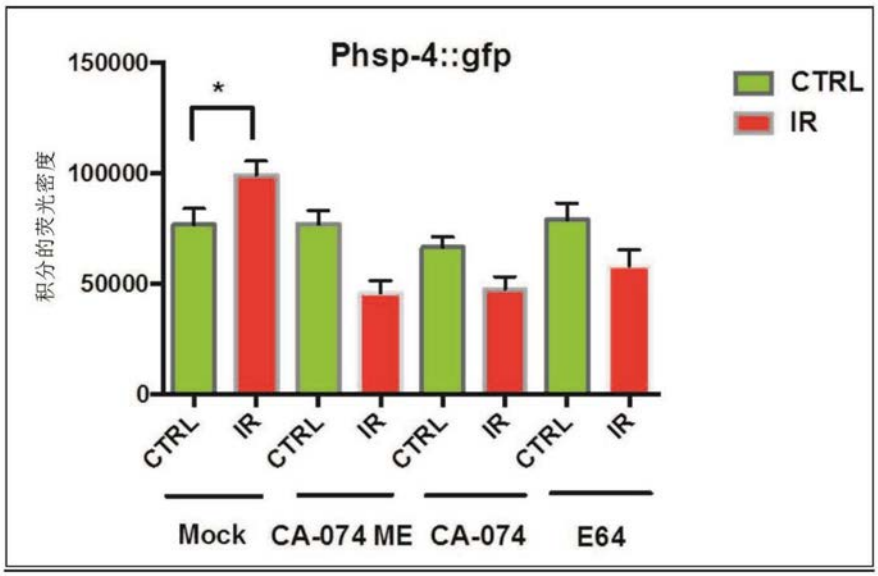

Phsp-4::gfp
CTRL
IR
积分的荧光密度
150000
100000
50000
0
*
CTRL
IR
CTRL
IR
CTRL
IR
CTRL
IR
Mock
CA-074 ME
CA-074
E64

图17

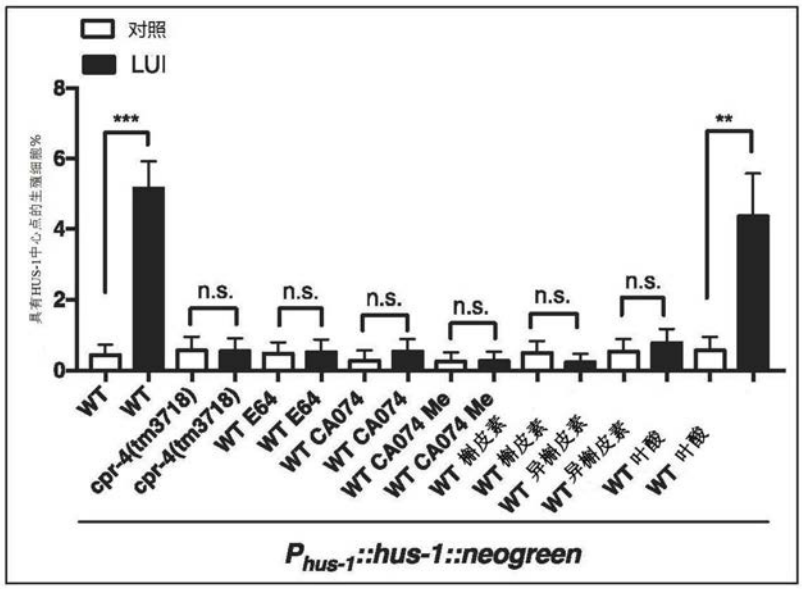

对照
LUI
具有HUS-1中心点的生殖细胞%
8
6
4
2
0
***
**
n.s.
WT
WT
cpr-4(tm3718)
cpr-4(tm3718)
WT E64
WT E64
WT CA074
WT CA074
WT CA074 Me
WT CA074 Me
WT 槲皮素
WT 槲皮素
WT 异槲皮素
WT 异槲皮素
WT 叶酸
WT 叶酸
Phus-1::hus-1::neogreen

图18

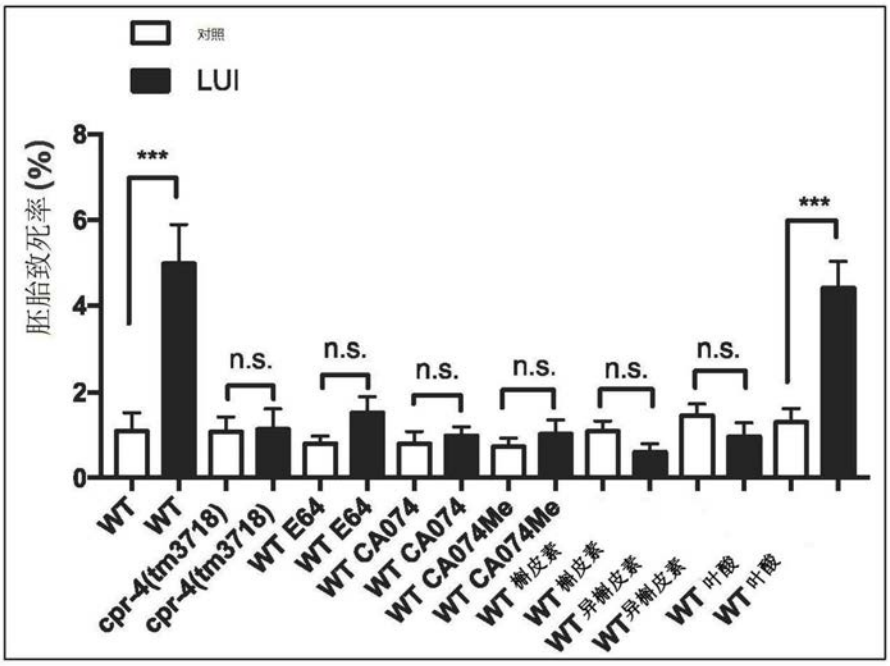

对照
LUI
胚胎致死率 (%)
8
6
4
2
0
***
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
***
WT
WT
cpr-4(tm3718)
cpr-4(tm3718)
WT E64
WT E64
WT CA074
WT CA074
WT CA074Me
WT CA074Me
WT 槲皮素
WT 槲皮素
WT 异槲皮素
WT 异槲皮素
WT 叶酸
WT 叶酸

图19

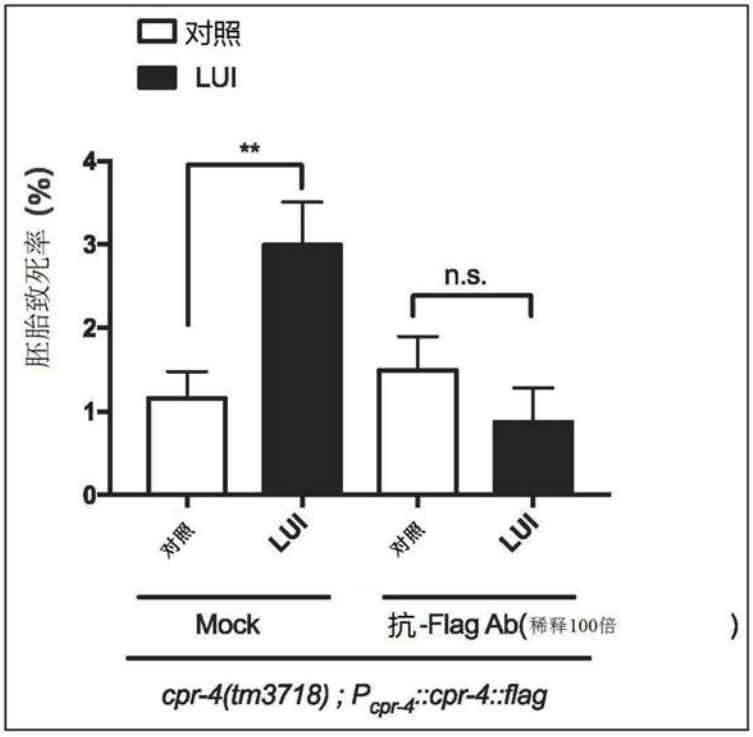

对照
LUI
胚胎致死率 (%)
4
3
2
1
0
**
n.s.
对照
LUI
对照
LUI
Mock
抗-Flag Ab(稀释100倍
)
cpr-4(tm3718) ; Pcpr-4::cpr-4::flag

图20

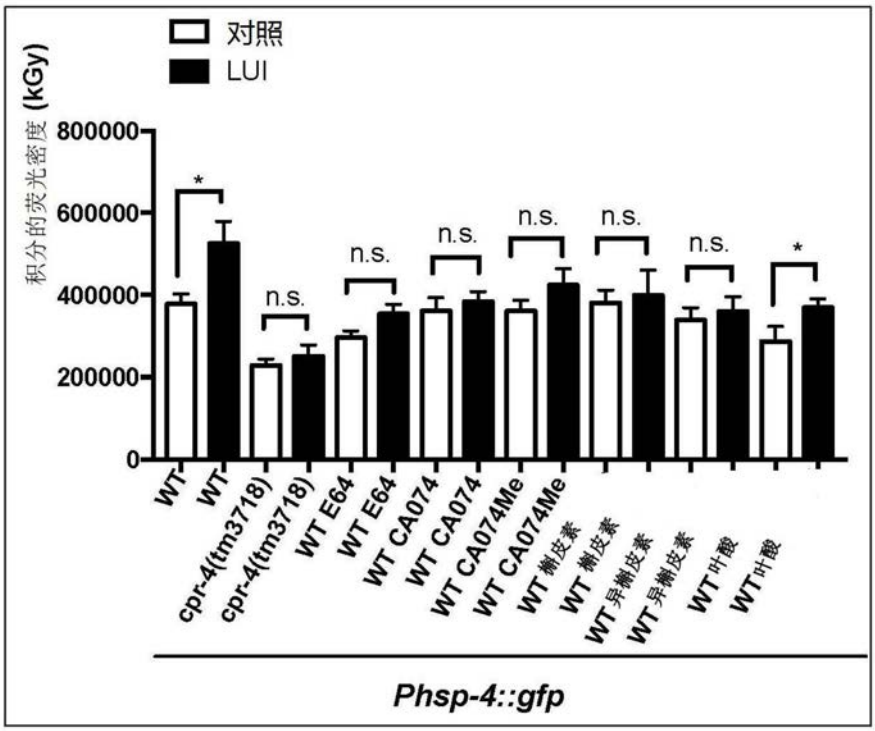

对照
LUI
积分的荧光密度 (kGy)
800000
600000
400000
200000
0
*
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
*
WT
WT
cpr-4(tm3718)
cpr-4(tm3718)
WT E64
WT E64
WT CA074
WT CA074
WT CA074Me
WT CA074Me
WT 褪皮素
WT 褪皮素
WT 异褪皮素
WT 异褪皮素
WT 叶酸
WT 叶酸
Phsp-4::gfp

图21

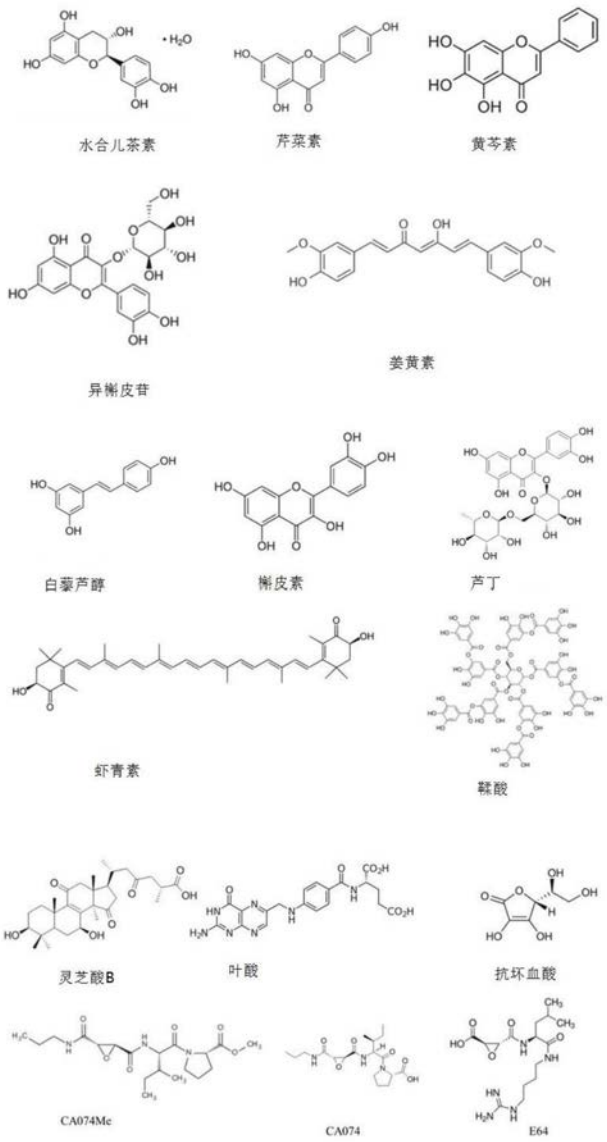

水合儿茶素
芹菜素
黄芩素
异槲皮苷
姜黄素
白藜芦醇
槲皮素
芦丁
虾青素
鞣酸
灵芝酸B
叶酸
抗坏血酸
CA074Me
CA074
E64

图22

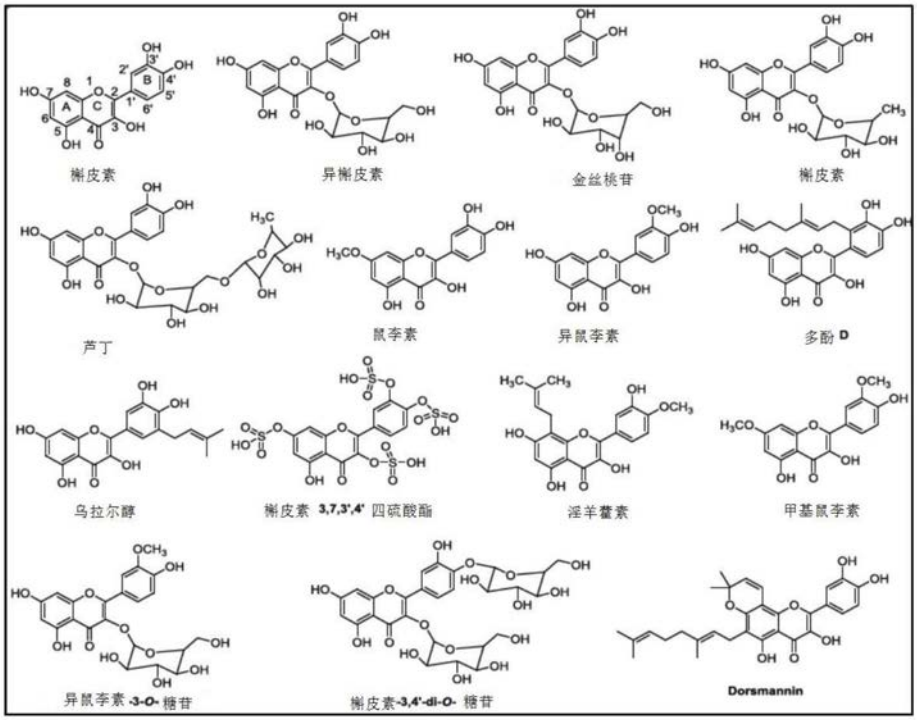

槲皮素
异槲皮素
金丝桃苷
槲皮素
芦丁
鼠李素
异鼠李素
多酚 D
乌拉尔醇
槲皮素 3,7,3',4' 四硫酸酯
淫羊藿素
甲基鼠李素
异鼠李素 -3-O- 糖苷
槲皮素-3,4'-di-O- 糖苷
Dorsmannin

图23