(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119677528 A
(43)申请公布日 2025.03.21

(21)申请号 202380033790.0
(22)申请日 2023.04.12
(30)优先权数据
63/330,553 2022.04.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/018289 2023.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/200842 EN 2023.10.19
(71)申请人 埃欧艾米斯公司
地址 美国
(72)发明人 R·C·爱伦 J·T·小斯蒂芬斯
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 于巧玲
(51)Int.Cl.
A61K 38/44(2006.01)
A61K 33/40(2006.01)
A61K 33/16(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书22页 附图2页

(54)发明名称

用于治疗实体癌的组合物和方法

(57)摘要

提供了用于治疗实体癌的组合物和方法。具体地,本公开提供了用于治疗实体癌的包含卤素过氧化物酶的组合物和包括施用这种组合物的方法。

CN 119677528 A

1.一种治疗患者中实体癌的方法,所述方法包括:向所述患者施用有效量的包含髓过氧化物酶、过氧化氢或过氧化氢源、和卤化物的药物组合物。

2.权利要求1的方法,其中所述过氧化氢源是产生过氧化物的氧化酶,其在所述氧化酶底物的存在下产生过氧化氢。

3.权利要求2的方法,其中所述产生过氧化物的氧化酶是葡萄糖氧化酶,并且所述底物是葡萄糖。

4.权利要求1的方法,其中所述卤化物是氯化钠。

5.权利要求1的方法,其中所述组合物还包含一种或多种氨基酸。

6.权利要求5的方法,其中所述一种或多种氨基酸选自以下组:甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-缬氨酸、β-氨基酸,如β-丙氨酸、L-β-高亮氨酸、D-β-高亮氨酸、3-氨基丁酸、L-2,3-二氨基丙酸单盐酸盐、D-2,3-二氨基丙酸单盐酸盐、L-3-氨基异丁酸、D-3-氨基异丁酸、3-氨基丁酸乙酯、肌氨酸甲酯盐酸盐和3-哌啶甲酸、或其烷基酯或可药用盐。

7.权利要求6的方法,其中所述氨基酸是甘氨酸和L-脯氨酸。

8.权利要求1的方法,其中所述实体癌选自以下组:乳腺癌、肺和支气管癌、前列腺癌、结肠和直肠癌、皮肤黑色素瘤、膀胱癌、宫颈癌、肾脏和肾盂癌、子宫内膜癌、胰腺癌、甲状腺癌、肝癌、脑癌和脊髓癌。

9.权利要求8的方法,其中所述实体癌为膀胱癌。

10.一种治疗患者中实体癌的方法,所述方法包括:施用有效量的包含髓过氧化物酶、氯化钠、甘氨酸、L-脯氨酸和过氧化氢的药物组合物。

11.权利要求1的方法,其中所述药物组合物包含(a)第一组合物,其包含髓过氧化物酶、卤化物和氨基酸;和(b)第二组合物,其包含过氧化物。

12.权利要求11的方法,其中所述第一组合物和所述第二组合物在施用前预混合。

13.权利要求11的方法,其中所述第一组合物和所述第二组合物同时或顺序施用。

14.一种治疗患者中膀胱癌的方法,所述方法包括以下步骤:通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的pH;应用具有中性离子强度的合适的膀胱洗涤溶液;预混合包含髓过氧化物酶、氯化钠、甘氨酸和L-脯氨酸的组合物与过氧化氢溶液,得到处理溶液;使处理溶液温育3至5分钟;通过导尿管将所述处理溶液滴注膀胱中。

15.权利要求12的方法,其中所述处理溶液包含浓度为20nM-100nM的髓过氧化物酶、浓度为100mM的氯化钠、浓度为0.21mM的甘氨酸、浓度为0.21mM的L-脯氨酸和浓度为10mM-100mM的过氧化氢。

16.一种治疗患者中膀胱癌的方法,所述方法包括以下步骤:通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的pH;应用具有中性离子强度的合适的膀胱洗涤溶液;预混合包含髓过氧化物酶、氯化钠、甘氨酸和L-脯氨酸的组合物;通过导尿管将所述组合物滴注膀胱中;使所述组合物在膀胱中停留约10分钟;和通过导尿管将过氧化氢滴注到膀胱中以激活髓过氧化物酶组合物。

17.权利要求16的方法,其中所述组合物包含浓度为20nM-100nM的髓过氧化物酶、浓度

为100mM的氯化钠、浓度为0.21mM的甘氨酸和浓度为0.21mM的L-脯氨酸。

18.权利要求16的方法,其中所述过氧化氢的浓度为10mM-100mM。

19.一种用于治疗患者中实体癌的药物组合物,所述组合物包含髓过氧化物酶、卤化物和过氧化氢。

20.权利要求19的药物组合物,其还包含一种或多种氨基酸。

21.一种用于治疗患者中膀胱癌的药物组合物,所述组合物包含髓过氧化物酶、氯化钠、甘氨酸、L-脯氨酸、过氧化氢和可药用载体。

22.一种用于治疗患者中膀胱癌的药物组合物,所述组合物包含髓过氧化物酶、氯化钠、甘氨酸、L-脯氨酸、葡萄糖氧化酶、葡萄糖和可药用载体。

用于治疗实体癌的组合物和方法

背景技术

[0001] 本公开通常涉及用于治疗实体癌的组合物和方法。具体地,本公开提供了用于治疗实体癌的包含卤素过氧化物酶(haloperoxidases)的组合物和使用此类组合物的方法。

[0002] 毫无疑问,癌症现在和将来都将对全球社会产生重大影响。根据美国国家卫生研究院(the United States National Institutes ofHealth)目前的统计,在2020年,美国将诊断出估计1806590例新的癌症病例,并且606520人将死于该疾病(https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics)。

[0003] 癌症是一种以不受控制的细胞生长为特征的疾病,几乎发生在身体的任何部位。肿瘤形成是指在实体组织如器官、肌肉或骨骼中发生不受控制的细胞生长。就这一点而言,大部分的最常见癌症是实体性肿瘤形成癌症,例如乳腺癌、肺和支气管癌、前列腺癌、结肠和直肠癌、皮肤黑色素瘤、膀胱癌、肾脏和肾盂癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胰腺癌、甲状腺癌和肝癌。实体癌包括肉瘤、癌瘤和淋巴瘤。

[0004] 随着治疗方法改进的发展,癌症存活率不断提高,但是癌症死亡率仍然很高—在美国,每10万名男性和女性中每年有158.3人死亡(基于2013-2017年的死亡人数)。因此,改进的癌症治疗是科学界正在进行的研究和开发的主题。

[0005] 对于大多数实体癌,通过对异常组织的活检进行诊断。尽可能多地去除肿瘤的手术(通常称为减积(debulking))的手术可能是一种治疗选择。减积还可提高随后施用的抗癌治疗(例如,免疫治疗、化疗和/或放疗)的有效性。然而,癌症治疗中的手术干预(无论是活检还是减积)并非没有风险。除了无法控制的再生外,癌细胞还会失去正常组织的内聚性和组织性,并可能在活检或手术过程中从原发肿瘤中脱离出来,通过循环系统和淋巴系统转移到身体的其他地方。因此,在活组织检查或手术干预期间,癌症扩散(即转移)对癌症患者具有重大风险。

[0006] 一些实体癌,比如膀胱癌、脑癌或脊髓癌,由于无法接近肿瘤生长部位,难以进行活检和/或治疗(无论是否通过手术)。因此,此类癌症可能导致患者死亡率高。

[0007] 对于在活检或手术过程中最小化实体癌转移和/或改进“难以触及”的实体癌的治疗,存在需求。

[0008] 在控制非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)中特别需要新的治疗剂。目前用于控制NMIBC的方案通常涉及内窥镜切除肿瘤,接着用细胞毒性化学治疗剂(例如吉西他滨、丝裂霉素、多西他赛)或充当局部免疫应答的激活剂的BCG(卡介苗)进行膀胱内治疗。这些药剂活性的必要条件是治疗剂与残留癌细胞之间的直接表面接触。然而,这些治疗存在若干缺点,包括如由相对高的复发率所表现的效力限制、非选择性作用机制(其可导致对正常上皮的细胞毒性和相关发病率)以及全身性副作用的可能性。此外,由于这些药剂的特殊处理要求,施用通常在临床环境中进行,并且需要重复的诊所就诊,导致患者和临床提供者的财务和其他负担。这些限制突出了在NMIBC治疗中的新治疗剂的需要,所述新治疗剂不仅增强治疗功效并降低发病率,而且具有可能潜在地允许家庭施用的安全性特征。

[0009] 髓过氧化物酶(MPO)是由粒细胞性白细胞分泌的阳离子酶,其具有过氧化物酶和

卤素过氧化物酶活性,因此能够产生高反应性氧化剂。在过氧化氢(H_2O_2)和卤氯化物(Cl^-)的存在下,MPO催化氯化物的氧化以产生高活性次氯酸(OCl^-)。次氯酸可以与第二个H_2O_2反应,产生电子激发的单线态分子氧($^1O_2$*)。OCl^-和$^1O_2$*具有显著的细胞毒性活性(不涉及自由基活性)。在膀胱癌中使用MPO作为抗肿瘤剂的吸引力主要在于其选择性结合能力及其局部作用机制。由于其阳离子表面性质,MPO对具有阴离子特征的靶标具有强亲和力,如已经针对膀胱癌细胞证实的。再次由于它们的阴离子表面特征,联合$^1O_2$*的毫秒半衰期,MPO贪婪地(avidly)和选择性地结合膀胱癌细胞的能力将“杀伤区”限制为小于半微米的小半径,从而使得能够实现针对与酶结合的膀胱肿瘤细胞的选择性细胞毒性活性,同时不伤害正常的邻近泌尿道上皮细胞,其具有更中性的静电分布。此外,膀胱内施用MPO和相关试剂将造成最小的全身毒性,这是由于MPO的大分子量(144kDa)以及在循环内被过氧化氢酶和在网状内皮系统内的快速失活。

[0010] 发明简述

[0011] 提供该发明简述是为了以简化形式介绍一些构思的选择,这些构思将在下面的发明详述中进一步描述。该发明简述不旨在用于确认所要求保护的主题的关键特征,也不旨在用于帮助确定所要求保护的主题的范围。

[0012] 本公开是基于含有卤素过氧化物酶的组合物(包括髓过氧化物酶组合物)表现出抗癌特性并且对正常细胞具有较小的毒性作用的令人惊讶和出乎意料的发现。

[0013] 根据本公开的一个方面,提供了一种治疗患者中实体癌的方法,该方法包括向所述患者施用有效量的包含卤素过氧化物酶的药物组合物。

[0014] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗患者中实体癌的方法,该方法包括向所述患者施用有效量的包含卤素过氧化物酶、卤化物、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和用于该氧化酶的底物和可药用载体的组合物。

[0015] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗患者中实体癌的方法,该方法包括向所述患者施用有效量的包含卤素过氧化物酶、卤化物、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和用于该氧化酶的底物、一种或多种氨基酸和可药用载体的组合物。

[0016] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗患者中实体癌的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的第一组合物和第二组合物,所述第一组合物包含卤素过氧化物酶、卤化物、一种或多种氨基酸和可药用载体,所述第二组合物包含过氧化氢。所述第一组合物和第二组合物可以同时或顺序施用。

[0017] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗患者中实体癌的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的第一组合物和第二组合物,所述第一组合物包含卤素过氧化物酶、卤化物、一种或多种氨基酸、产生过氧化物的氧化酶和可药用载体,所述第二组合物包含用于所述产生过氧化物的氧化酶的底物。所述第一组合物和第二组合物可以同时或顺序施用。

[0018] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合物,所述组合物包含卤素过氧化物酶、卤化物、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和用于所述氧化酶的底物、以及可药用载体。

[0019] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合物,所述组合物包含卤素过氧化物酶、卤化物、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和用于所述氧化酶的底物、一种或多种氨基酸和可药用载体。

[0020] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合物,所述组合物基本上由卤素过氧化物酶、卤化物、过氧化物、一种或多种氨基酸和可药用载体组成。

[0021] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合,所述组合包含卤素过氧化物酶、卤化物、过氧化物、一种或多种氨基酸和可药用载体。

[0022] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合,所述组合包含卤素过氧化物酶、卤化物、产生过氧化物的氧化酶和用于所述氧化酶的底物、一种或多种氨基酸和可药用载体。

[0023] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合物,所述组合物包含卤素过氧化物酶、和任选的卤化物、乙醇胺、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和用于所述氧化酶的底物中的一种或多种、以及可药用载体。

[0024] 在又另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患者中实体癌的组合物,所述组合物基本上由卤素过氧化物酶、和任选的卤化物、乙醇胺、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和用于所述氧化酶的底物中的一种或多种、以及可药用载体组成。

[0025] 在实施方案中,卤代过氧化物酶选自:髓过氧化物酶(MPO)、嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)、乳过氧化物酶(LPO)、氯过氧化物酶(CPO)、其功能衍生物及其组合。

[0026] 在某些实施方案中,卤素过氧化物酶是嗜酸性粒细胞过氧化物酶。

[0027] 在某些实施方案中,卤素过氧化物酶是髓过氧化物酶。

[0028] 在实施方案中,卤素过氧化物酶催化卤化物氧化和过氧化物的歧化,产生单线态分子氧,导致一种或多种以下效果:抑制癌细胞生长、抑制细胞转移、和/或癌细胞死亡。

[0029] 在实施方案中,实体癌选自以下组:乳腺癌、肺和支气管癌、前列腺癌、结肠和直肠癌、皮肤黑色素瘤、膀胱癌、肾脏和肾盂癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胰腺癌、甲状腺癌、肝癌、脑癌和脊髓癌。

[0030] 在某些实施方案中,实体癌是膀胱癌。

[0031] 通过以下对本发明各个方面的详细描述,本发明的其他实施方案将显而易见。

[0032] 详细说明

[0033] 定义

[0034] 除非本文中另有指示或明显与上下文矛盾,否则在描述本发明构思的上下文中(特别是在下述权利要求的上下文中)使用的术语“一个(种)(a)”,“一个(种)(an)”、“所述”或类似所指对象应当被解释为涵盖单数和复数。

[0035] 除非本文另有说明或明显与上下文矛盾,否则本文所述的所有方法都可以以任何适当的顺序执行。

[0036] 使用本文提供的任何和所有示例或示例性语言(例如,“例如”)仅旨在提供更好的说明,不构成对本公开范围的限制。说明书中的任何语言都不应解释为表明任何未保护的要素是必不可少的。

[0037] 除非另有说明,否则说明书和权利要求书中使用的表示成分数量、反应条件等的所有数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,除非有相反指示,否则以下说明书和权利要求中所述的数字参数是近似值,其可根据本公开寻求获得的期望特性而变化。至少,每个数字参数应当根据有效数字的数值和普通舍入惯例进行解释。术语“约”可理解为指+/-10%的范围,例如+/-5%或+/-1%或+/-0.1%的范围。

[0038] 本文中对数值范围的列举仅意在用作单独引用该范围内的每个单独数值的速记方法。除非本文另有说明,否则每个单独的数值都被并入本说明书中,如同其在本文中被单独列举一样。例如,如果范围是从约1到约50,则认为其包括例如1、7、34、46.1、23.7或该范围内的任何其它数值或范围。

[0039] 术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。在本公开中使用符合IUPAC-IUB生化命名联合委员会定义的氨基酸的3-字母代码。还应理解,由于遗传密码的简并性,多肽可由一个以上的核苷酸序列编码。

[0040] 本文中提及“酶”,如卤素过氧化物酶或葡萄糖氧化酶。在本文上下文中,酶是作为催化剂产生特定生化反应的蛋白质/多肽。包括在本公开范围内的酶包括从天然来源分离的酶(具有与自然界中发现的氨基酸序列相同的未经修饰的氨基酸序列)以及其“功能衍生物”。

[0041] 术语“卤素过氧化物酶”指对卤化物的过氧化氢依赖性氧化产生次卤酸进行催化的酶;这种次卤酸可以与额外的过氧化氢反应生成单线态分子氧。根据本公开的卤素过氧化物酶也可被称为卤化物:过氧化氢氧化还原酶(例如,国际生物化学联合会ECNo.1.11.1.7和EC No.1.11.1.10),对于该酶卤化物(例如氯化物或溴化物)是电子供体或还原剂,过氧化氢是电子受体或氧化剂。合适的卤素过氧化物酶包括髓过氧化物酶(MPO)、嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)、乳过氧化物酶(LPO)、氯过氧化物酶(CPO)、其功能衍生物及其组合。卤素过氧化物酶可以从任何来源(包括人类和非人类动物来源)或细胞培养物获得。

[0042] 本公开的酶的“衍生物”通常以所述衍生物对于与其野生型、天然型或亲本形式的类似目的有效的程度保留在野生型、天然型或亲本形式中观察到的特征酶活性。

[0043] 在用于本公开的酶的情况中时,术语“功能片段”或“功能衍生物”包括天然存在的、合成或重组产生的核酸或片段,并且编码本公开的具有天然的、未经修饰的亲本酶的功能特性的酶。“功能性衍生物”可包括“置换变体”,其是其中天然序列中的至少一个氨基酸残基被移除并由不同氨基酸插入到相同位置的变体。所述置换可以是单置换,其中所述分子中只有一个氨基酸被置换;或者可以是多重置换,其中同一分子具有两个以上的氨基酸被置换。多重置换可以位于连续的位置。类似地,氨基酸可以被多个残基置换,包括置换和插入。“插入变体”是其中一个或多个氨基酸被插入到天然序列中紧邻特定位置的氨基酸中的变体。紧邻某氨基酸指通过该氨基酸的α-羧基或α-氨基官能团与之连接。“删除变体”是其中天然氨基酸序列中的一个或多个氨基酸被去除的变体。典型地,删除变体在其分子的特定区域中有一个或两个氨基酸被删除。

[0044] 术语“分离”或“纯化”指物质从原始环境(例如自然环境,如果是天然存在的)中移除。例如,当某物质以比天然存在的或野生型的生物体中更高的浓度存在于特定组合物中、或与从天然存在或野生型生物体表达时通常不存在的组分组合时,称该物质为“纯化”的。例如,存在于活生物体中的天然存在的蛋白质/多肽没有被“分离”,但相同蛋白质/多肽从天然系统中的一些或全部共存物质分开时,则是“分离”的。例如,此类蛋白质/多肽可以是组合物的一部分,并且在这种组合物不是该蛋白质/多肽的自然环境的一部分时仍是分离的。

[0045] 如本文使用的术语“可药用”是指当向患者施用时不会引起实质性不良过敏或免

疫反应的物质。“可药用载体”包括但不限于溶剂、包衣剂、分散剂、润湿剂、等渗和吸收延迟剂以及崩解剂。

[0046] 如本文使用的,疾病、病症或障碍的“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指实现以下一项或多项:(a)降低严重程度和/或缩短持续时间;(b)限制或防止特征性症状的发展;(c)抑制症状恶化;(d)限制或防止复发;和(e)限制或防止症状复发。也就是说,该术语包括预防性或预备性治疗(其防止和/或减缓目标病理性疾病、病症或障碍的发展)和治愈性治疗、治疗性治疗或疾病改良性治疗,包括所述疾病、病症或障碍的治愈、减缓、减轻症状和/或阻遏进展的治疗措施;以及对有患病风险或疑似患病的患者以及患病或已被诊断患有疾病、病症或障碍的患者的治疗。这些术语并不一定意味着患者被治疗直到完全康复。这些术语还可以指在未患疾病但可能容易影响发展为不健康状态的个体中维持和/或促进健康。这些术语还可以包括强化或以其他方式增强一种或多种初级预防或治疗措施。作为非限制性实例,治疗可由患者、照顾者、医生、护士或其他保健专业人员执行。

[0047] 如本文使用的,疾病或障碍的“预防/防止(prevent)”,“预防/防止(preventing)”,“预防/防止(prevention)”或“预防(prophylaxis)”是指预防/防止障碍在患者中发生。“预防/防止”包括降低疾病、病症或障碍的风险、发病率和/或严重程度。

[0048] 如本文使用的,表达“用于施用/给药(is for administration)”和“用于施用/给药(is to be administered)”具有与“准备用于施用/给药”相同的含义。换言之,活性化合物“用于施用/给药”的表述应该理解为已经将所述活性化合物配制并形成剂量形式,使得所述活性化合物处于能够发挥其治疗活性的状态。

[0049] 术语“有效量”或“治疗量”意指引起组织、系统、动物或人的期望生物学或医学响应的物质量。术语“预防有效量”意指防止在组织、系统、动物或人中生物学或医学事件发生或降低其风险的药物量。

[0050] 在本说明书和权利要求书中的术语“包括/包含/(comprise)”、“包括/包含(comprises)”或“包括/包含(comprising)”,“包含(including)””或“具有”等以开放性意义使用,即,用于指定所述特征的存在,但不排除附加或另外特征的存在。

[0051] 本文所公开的具体实施方案可在权利要求中使用表述“由…组(构)成”或“基本上由…组(构)成”的语言而被进一步限制。当在权利要求中使用时,无论是直接提交的或通过修改添加的,过渡性术语“由…组(构成)成”排除了权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡性术语“基本上由…组(构)成”将权利要求的范围限制为特定物质或步骤以及对基本特性和新颖特性没有实质性影响的那些物质或步骤。以如此方式要求保护的本公开实施方案固有地或明确地在本文中描述和能够实现。

[0052] 含卤素过氧化物酶的组合物

[0053] 卤素过氧化物酶广泛存在于自然界中,由哺乳动物、藻类和真菌产生。US 6,294,168公开了卤素过氧化物酶可以用作抗菌剂(尤其对细菌和真菌有效),因为它们选择性地结合目标微生物,并且在过氧化物和卤化物的存在下抑制目标微生物生长。使用低浓度的卤素过氧化物使选择性结合目标微生物最大化,而不清除所需微生物或对宿主细胞造成重大损害。卤素过氧化物酶结合的选择性性质使其可用于人类或非人类患者的治疗性或预防性抗菌治疗。

[0054] 本公开基于含有卤素过氧化物酶的组合物表现出抗癌特性的令人惊讶和出乎意料的发现。在一个方面,本公开提供了通过使实体癌接触包含卤素过氧化物酶的组合物来治疗实体癌的方法。在另一个方面,本公开提供用于治疗实体癌的组合物,所述组合物包含卤素过氧化物酶。在又另一个方面,本公开提供一种用于治疗实体癌的组合,所述组合包含卤素过氧化物酶,以及卤化物、或过氧化物、或产生过氧化物的氧化酶中的至少一种。

[0055] 在某些实施方案中,卤素过氧化物酶催化卤化物氧化和过氧化物歧化为单线态分子氧,通过抑制癌细胞生长、转移和/或通过癌细胞杀伤治疗所述癌症。在实施方案中,根据本公开的合适卤素过氧化物酶包括嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)、髓过氧化物酶(MPO)、乳过氧化物酶(LPO)、氯过氧化物酶(CPO)、其功能衍生物及其组合。

[0056] 在其他实施方案中,本公开的治疗方法还包括施用有效量的过氧化物或产生过氧化物的氧化酶。可任选地施用所述氧化酶的底物。优选地,所述产生过氧化物的氧化酶为葡萄糖氧化酶且所述底物为葡萄糖。在进一步的实施方案中,所述方法进一步包括将所述卤素过氧化物酶与卤化物(优选氯化物或溴化物)一起施用。

[0057] 在进一步的其它实施方案中,将所述卤素过氧化物酶在第一组合物中与至少一种另外的组合物一起施用,所述另外的组合物包含卤化物、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶加上所述产生过氧化物的氧化酶的底物中的一种或多种。作为替代,可以将所述卤素过氧化物酶配制在组合物中用于施用,所述组合物还包括卤化物、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶、以及产生过氧化物的氧化酶的底物中的一种或多种。

[0058] 在进一步的其它实施方案中,将所述卤素过氧化物酶在第一组合物中与至少一种另外的组合物一起施用,所述另外的组合物包含卤化物、乙醇胺、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶加上所述产生过氧化物的氧化酶的底物中的一种或多种。作为替代,可以将所述卤素过氧化物酶配制在组合物中用于施用,所述组合物还包括卤化物、乙醇胺、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶、以及产生过氧化物的氧化酶的底物中的一种或多种。作为替代,可以将所述卤素过氧化物酶配制在组合物中用于施用,所述组合物还包括卤化物、一种或多种氨基酸、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶、以及产生过氧化物的氧化酶的底物中的一种或多种。

[0059] 在特定实施方案中,嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)和髓过氧化物酶(MPO)是在本公开组合物、组合和治疗方法中使用的优选的卤素过氧化物酶。在进一步的实施方案中,MPO和EPO为猪来源的。优选地,经纯化的卤素过氧化物酶(猪MPO和EPO)是由Exoxemis,Inc.生产的那些。

[0060] 所述猪MPO优选具有由超高效液相色谱(RP-UPLC)测定的98.9%的纯度和由分子尺寸排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)测定的100%的纯度。所述猪MPO的愈创木酚单位(GU)活性优选为404GU/mg,1.0GU的活性每分钟消耗1.0μmol H_2O_2。

[0061] 猪EPO优选具有由反相高效液相色谱法测定的99.2%的纯度。所述猪EPO的愈创木酚单位(GU)活性优选为80GU/mg。

[0062] MPO和EPO都是阳离子蛋白。不受理论约束,据信这些卤素过氧化物酶的阳离子性质使它们特别粘附于癌细胞的阴离子表面。因此,在合适的pH下,卤代过氧化物酶与癌细胞的阴离子表面的静电吸引和结合(不与正常细胞表面结合或与正常细胞表面的结合最小)导致卤素过氧化物酶与癌细胞的选择性结合,并且在过氧化物存在下,选择性杀死癌细胞,

对周围的正常细胞几乎没有或没有损伤。

[0063] 卤素过氧化物酶的物理性质和酶活性的最佳条件可能不同(例如,参见US9782459)。例如,MPO为约150kDa且在酸性pH(4.0-6.5)下具有活性,而EPO为约70kDa且在酸性至中性pH(即,5.0-7.4)下具有活性。在实施方案中,本公开的组合物可包含一种或多种卤素过氧化物酶,其中所述卤素过氧化物酶的特性可匹配癌症治疗部位的条件。在实施方案中,卤素过氧化物酶的选择由治疗部位的pH值决定。在其它实施方案中,卤素过氧化物酶的选择由治疗部位的可接近性决定。

[0064] 在本公开的组合物、组合或治疗方法中使用的卤素过氧化物酶的有效量可根据所述组合物的使用条件、使用环境和期望结果而广泛变化。在某些实施方案中,本公开的组合物将包含约1至约100000μg/ml的卤素过氧化物酶,更优选约5至约50000μg/ml,甚至更优选约10至约5000μg/ml的卤素过氧化物酶。

[0065] 在本公开中有效的产生过氧化物的氧化酶包括例如氧化酶,例如葡萄糖氧化酶、胆固醇氧化酶和半乳糖氧化酶。作为代表性实例,当氧化酶为葡萄糖氧化酶且其底物为葡萄糖时,本公开的组合物可包含约0.05至约3000U/ml、更优选约0.1至约1000U/ml、甚至更优选约1至约500U/ml的葡萄糖氧化酶,以及约0.1至约100mM、更优选约0.5至约80mM、甚至更优选从约1至约50mM的葡萄糖。优选地,本公开组合物中使用的葡萄糖氧化酶衍生自黑曲霉(Aspergillus Niger)。更优选地,葡萄糖氧化酶由Exoxemis,Inc生产,其是从黑曲霉中分离的、纯化至由RP-HPLC测定的99.8%纯度和由SECHPLC测定的99.9%纯度,且任选地其中GO的单位(U)活性为309U/mg(其中1.0U在35℃下在pH 5.1下氧化1.0μmol的β-D-葡萄糖为D-葡萄糖酸内酯及H_2O_2/分钟)。

[0066] 如上所述,在本公开的组合物、组合或治疗方法中有用的卤素过氧化物酶,如果不与产生过氧化物的氧化酶组合使用,则可与过氧化物组合施用。过氧化物的施用,与产生过氧化物的氧化酶一样,可与卤素过氧化物酶的施用同时或顺序进行。在实施方案中,可以将过氧化物以包括但不限于约1μM至约100mM、优选约1mM至约50mM、更优选约9mM的浓度施用至治疗部位。施用可取决于治疗部位的可接近性。在实施方案中,可施用约1ml至1000ml、优选100ml至800ml、最优选500ml的大剂量的过氧化物。

[0067] 在某些实施方案中,卤素过氧化物酶可任选地与至少两种氨基酸、或至少三种氨基酸一起供应至治疗部位,所述氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-缬氨酸、β-氨基酸(如β-丙氨酸、L-β-高亮氨酸、D-β-高亮氨酸、3-氨基丁酸、L-2,3-二氨基丙酸单盐酸盐、D-2,3-二氨基丙酸单盐酸盐、L-3-氨基异丁酸、D-3-氨基异丁酸、3-氨基丁酸乙酯、肌氨酸甲酯盐酸盐和3-哌啶甲酸)、或其烷基酯或可药用盐。在特定实施方案中,卤素过氧化物酶可与氨基酸一起配制,或者作为替代,可以将氨基酸作为单独组合物供应,以在施用前预混合、或同时或并行施用。

[0068] 在某些实施方案中,可以用两种氨基酸将卤素过氧化物酶提供给治疗部位,其中所述两种氨基酸是甘氨酸和L-脯氨酸。

[0069] 可任选地用于本公开的组合物/组合中的氨基酸的有效量将根据组合物/组合中

卤素过氧化物酶的量和使用环境中存在的条件而变化。在一个实例中,所述组合物通常可包含0.1至约500mM,更优选约0.2至约100mM,甚至更优选约0.3至约50mM的本公开的每种氨基酸。

[0070] 本公开的组合物/组合可任选地包含卤化物。当卤化物是氯化物时,本公开的组合物中使用的氯化物的量将优选落在约10μmol氯化物至约200μmol/ml溶液(即,10至200mEq氯化物/L)氯化物的范围内。血浆中氯化物的生理浓度为约105mEq/L。当包括时,本公开的组合物可包含约0.5μmol溴化物至约20μmol溴化物/ml液体组合物(即,0.5-20mEq溴化物/L),更优选约1μmol溴化物至约10μmol溴化物/ml液体组合物(即,1-10mEq溴化物/L),并且最优选约100nmol溴化物至约1μmol溴化物/ml液体组合物。在某些实施方案中,卤化物为氯化钠。

[0071] 本公开的组合物/组合可任选地包含乙醇胺。

[0072] 组合物/组合可任选地包含可药用载体。在某些实施方案中,组合物可以方便地在液体载体中提供。任何液体载体通常可用于此目的,条件是所述载体不显著干扰髓过氧化物酶的选择性结合能力或酶活性。作为替代,组合物可以以固体形式提供,在液体中溶解时活化。

[0073] 在包括产生过氧化物的氧化酶的底物的本公开组合物或组合的实施方案中,卤素过氧化物酶适于构建为二元制剂,其中组合物的活性剂被配制成在使用时合并的两个单独的部分。例如,二元制剂的第一组合物可包含同时含有卤素过氧化物酶和产生过氧化物的氧化酶的溶液,和任选的卤化物。在某些实施方案中,第一组合物可任选地包含两种或三种氨基酸。在某些实施方案中,所述两种氨基酸为氨酸和L-脯氨酸。在某些实施方案中,所述三种氨基酸为甘氨酸、L-丙氨酸和L-脯氨酸。二元制剂的第二组合物可包含氧化酶的底物,例如在葡糖氧化酶的情况下的葡萄糖(即,右旋糖)。所述底物可以例如以固体糯米囊(wafer)的形式提供。在某些实施方案中,卤素过氧化物酶组合物可另外包含醇以促进氧化酶底物的溶解和被氧化酶利用。

[0074] 在一个实施方案中,本公开的方法包括以预防性或治疗性方式向部位施用组合物的组合。例如,可施用包含卤素过氧化物酶和产生过氧化物的氧化酶的第一组合物。在某些实施方案中,第一组合物进一步包含两种氨基酸和卤化物。包含产生过氧化物的氧化酶的底物的第二组合物可以分开施用。在一些实施方案中,可以施用包含卤素过氧化物酶、卤化物和两种氨基酸的第一组合物。包含过氧化氢的第二组合物可以分开施用。在某些实施方案中,第一组合物和第二组合物在施用至感染部位之前混合。在某些实施方案中,将第一组合物和第二组合物同时施用至所述部位。在某些实施方案中,将所述第一组合物和所述第二组合物顺序施用至所述部位。第一组合物和第二组合物可按任何顺序施用。

[0075] 在一个实施方案中,本公开的方法包括预防性地或治疗性地向位点施用组合物的组合。例如,可以施用包含卤素过氧化物酶、乙醇胺和卤化物的第一组合物。可以分开施用包含过氧化氢的第二组合物。在一些实施方案中,第一组合物包含卤素过氧化物酶、两种氨基酸和卤化物。在某些实施方案中,第一组合物和第二组合物在施用至感染部位之前混合。在某些实施方案中,第一组合物和第二组合物同时施用至所述部位。在某些实施方案中,将第一组合物和第二组合物顺序施用至所述部位。第一组合物和第二组合物可按任何顺序施用。

[0076] 作为说明性示例,适合用作抗癌治疗的本公开组合物可包含约1至50000μg/ml的卤素过氧化物酶、0.01至500单位的葡萄糖氧化酶,以及任选的以下物质:0.1至500μmol/ml(即,0.1-500mM)的甘氨酸、0.1至500μmol/ml(即,0.1-500mM)的D-异亮氨酸、0至100μmol/mL(即,0-100mM)的L-丙氨酸和50至500mEq/L的氯化物。上述组合物可与1至500μmol/mL(即,1-500mM)的葡萄糖或右旋糖联合。

[0077] 作为说明性示例,适合用作抗癌治疗的本公开组合物可包含约1至50000μg/ml的卤素过氧化物酶、0.1至500μmol/ml(即,0.1-500mM)的甘氨酸、0.1至500μmol/ml(即,0.1-500mM)的L-脯氨酸、50至500mEq/L的氯化物和1mM至约50mM的过氧化氢。

[0078] 作为说明性示例,适合用作抗癌治疗的本公开组合物可包含嗜酸性粒细胞过氧化物酶、乙醇胺、溴化钠和过氧化氢。此类组合物可适合于治疗膀胱癌。

[0079] 作为说明性示例,适合用作抗癌治疗的本公开组合物可包含髓过氧化物酶(MPO)、甘氨酸、L-脯氨酸、氯化钠(NaCl)和过氧化氢(H_2O_2)。此类组合物的一个说明性实例包含20nM的MPO、10mM的H_2O_2、100mM的NaCl、0.21mM的甘氨酸和0.21mM的L-脯氨酸。此类组合物可适合于治疗膀胱癌。

[0080] 可治疗的癌症

[0081] 本发明靶向的癌症是实体癌,并且包括除血液学癌症(恶性淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤等)之外的各种癌症。实体癌的典型实例包括肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、舌癌、甲状腺癌、肾癌、前列腺癌、子宫癌、宫颈癌和卵巢癌。实体癌的优选具体实例包括例如膀胱癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌或乳腺癌。实体癌也可包括黑色素瘤或胶质瘤,但不限于此。

[0082] 在非手术抗癌治疗(例如局部应用)的情况中,可以将本公开的抗癌组合物以任何有效的可药用形式施用至温血动物,包括人类和非人类动物患者。在这种情况下,可以将本公开的组合物施用在任何粘膜或上皮表面。例如,可以将本公开的组合物以局部、灌洗、经口、阴道或直肠栓剂的剂型,作为局部、口腔、鼻喷雾剂,吸入用气溶胶,或以任何其他有效方式施用。

[0083] 对于局部应用,可药用载体可以采取液体、乳膏、泡沫、洗剂、软膏、悬剂、栓剂或凝胶的形式,并且还可以包括水性或有机溶剂、缓冲剂、乳化剂、胶凝剂、湿润剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、防腐剂、时间释放剂,以及少量的保湿剂、螯合剂、染料、香水和在局部施用的药物组合物中常用的其他组分。此外,本公开的组合物可浸渍在敷料或覆盖物中以应用于患者。

[0084] 在更侵略性的抗癌治疗(例如通过手术使肿瘤减积(通过切除减小尺寸或消除))的情况中,可在肿瘤外施用本公开的抗癌组合物或其组合。例如,肿瘤外治疗可包括将本公开的组合物/组合应用于手术部位和/或手术部位周围的区域。在这种情况下,可以将卤素过氧化物酶以溶液或任何其它剂型施用,例如皮下注射或储库(deposit)。

[0085] 在使用本公开的组合物、组合或方法的非手术或手术抗癌治疗中,有需要的患者可使用另外的抗癌治疗(例如,免疫治疗、化疗和/或放疗)进行治疗。可在使用本公开组合物/组合进行治疗之前、同时或之后向患者施用所述另外的抗癌治疗。

[0086] 下面描述本发明的其他实施例。然而,应当注意,本发明不应限于这些实施例,并且本发明可以进行与具体描述的那些不同的改变、修改和/或添加,并且应当理解,本发明

包括落入权利要求范围内的所有此类改变、修改和/或添加。

实施例

[0087] 实施例1-猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶(pEPO)的体内肿瘤减小活性

[0088] 进行实验来确定在小鼠皮下异种移植物中猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶(pEPO)的肿瘤减小活性。

[0089] 肿瘤细胞系描述:实验采用从美国典型培养物保藏中心(ATCC)购买的HT-1080细胞(Cat#_CCL-121)。如下所述使细胞在完全培养基中生长。将细胞接种于细胞培养瓶中,并在37℃和5%CO_2的充分加湿的气氛中培养。一旦细胞达到汇合,按如下所述进行增殖和/或保存:

[0090] 细胞增殖和保存程序:按标准方法进行:

[0091] • 传代培养比例:1:4至1:8

[0092] • 培养基更新:每周2至3次

[0093] • 增殖程序:去除培养基,用D-PBS(1X)洗涤两次。添加1X胰蛋白酶溶液,并将烧瓶在室温(RT)或37℃静置,直到细胞脱离。添加新鲜培养基,抽吸并分配到新的烧瓶中。记录传代数。

[0094] • 保存程序:将细胞于补充有5% DMSO的95%完全生长培养基中冷冻。在解冻细胞后使用的第一种培养基是Eagle's MEM,该培养基中添加了足够浓度的葡萄糖(4500mg/l的D-葡萄糖)。

[0095] • 传代程序:去除培养基,用D-PBS(1X)洗涤两次。添加1X胰蛋白酶溶液,并将烧瓶在室温(RT)或37℃静置,直到细胞脱离。添加新鲜培养基,抽吸并分配到新的烧瓶中。记录传代数。

[0096] • 最终收获程序:如下收获6x T-150烧瓶:去除培养基,并用1X D-

[0097] PBS洗涤一次。添加1X胰蛋白酶溶液,将烧瓶于室温(RT)静置,直到细胞脱离。使用培养基(含牛血清)淬灭胰蛋白酶,并将细胞以1000rpm旋转10min。用1X D-PBS洗涤两次,并将沉淀物重新悬浮在1XD-PBS中至52×10^6个细胞/ml D-PBS的浓度。

[0098] 在注射到动物体内之前,对HT-1080细胞系的增殖、收获和活力进行评估,结果如下:细胞总数:78×10^6个细胞,注射前细胞活力:98%;活细胞/mL:51×10^6个活细胞/ml。

[0099] 肿瘤:对于皮下(SC)肿瘤生长模型,在研究第1天,以100μl体积将5.1×10^6个细胞/小鼠剂量的SC注射到每只小鼠的右腹侧。通过每周两次用卡尺测量确定长度、宽度和高度三个参数跟踪肿瘤生长情况。根据用于椭球体的公式计算肿瘤体积:4/3πx(La/2)x(Wa/2)x(Ha/2)。La、Wa和Ha是体内测量的肿瘤长度、宽度和高度减去皮肤厚度。从长度和宽度参数减去双倍皮肤厚度,并且从高度测量中减去单倍皮肤厚度,以确定La、Wa和Ha。

[0100] 动物描述:Charles River无胸腺裸鼠(Nu/Nu,雄性)购自Charles River实验室。在研究开始之前,允许动物适应5天。动物在注射前一天称重。起始体重在20到25克之间。动物被打耳孔以便辨认,在按肿瘤尺寸随机分组之前以每笼5只饲养。一旦将动物分组,每笼饲养1只。

[0101] 酶溶液:制备了pEPO酶溶液和激活剂溶液(过氧化物)的组合物。酶溶液包含终浓度为2.5μg/ml的pEPO、(L-丙氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸各0.8-0.05mM,终浓度)、乙醇胺(2.4-

0.15mM,终浓度)、溴化钠(2mM)和吐温-80(0.1%,v/v)。激活剂溶液包含在pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)中的过氧化氢浓度为0.003%,v/v,890μM。媒介物为PBS。

[0102] 向媒介物或酶溶液中加入15微升的激活剂溶液,并在给药前允许培养约3-5分钟。为每只动物激活给药溶液。在激活后,向手术腔内注入约1ml剂量溶液。将空腔填充至完全,直到观察到手术部位出现一些液体泄漏。

[0103] 实验设计

[0104] 在上述常规条件下培养和扩增HT-1080细胞纤维肉瘤细胞。在注射到小鼠体内的当日,收集细胞,用磷酸盐缓冲盐水洗涤,并以5×10^7个细胞/ml的浓度重新悬浮。13只无胸腺裸鼠(雄性13只)在右腹侧SC注射HT1080细胞(浓度为5.1×10^6个细胞/只,体积100μl/只)。在注射后,每周称量动物体重并监测肿瘤形成情况。一旦肿瘤可见并达到可测量的尺寸,每周使用外卡尺测量肿瘤两次。

[0105] 当肿瘤达到0.5-1cm^3时,将动物随机分为两组,每组5只小鼠。两组均手术切除肿瘤。在肿瘤切除之后,用手术胶封闭手术伤口,然后用给药溶液(约1mL/动物)填充空腔。第1组接受媒介物+激活剂治疗,第2组接受pEPO+激活剂治疗。手术后,动物单独饲养。第1组(媒介物+激活剂)有1只动物在术后次日死亡。用另一只携带肿瘤的动物替代这只动物。从替代动物体内取出肿瘤,封闭手术伤口,并用1ml媒介物+激活剂处理空腔。

[0106] 在治疗后,每日进行病死率检查和临床观察。每周和结束当日对动物称重。监测动物体内的肿瘤形成,并在适用的情况下,在肿瘤达到可测量的尺寸后使用外卡尺每周两次测量肿瘤。

[0107] 在4周结束时,用二氧化碳和随后的颈椎脱位对动物进行无痛处死。在结束前用卡尺测量肿瘤。结束后,将肿瘤切除,称重并固定在10%中性缓冲福尔马林中。

[0108] 结果和结论:pEPO的体内肿瘤减小活性

[0109] 2.肿瘤生长和临床观察记录在表1中。

[0110]

动物 ID(标签)	性别	结果	结果的研究天数
第一组：媒介物+激活剂			
G1M1	M	记录无异常结果	1-53
G1M2	M	记录无异常结果	1-29
		确认肿瘤再生长	30-39
		由于肿瘤尺寸过大被无痛处死，收集肿瘤	39
G1M3	M	记录无异常结果	1-15, 22-34,
		肿瘤顶部发红	16-21
		肿瘤上轻度坏死。在肿瘤去除时修剪。	21
		确认肿瘤再生长	35-43
		由于肿瘤尺寸过大被无痛处死，收集肿瘤	43

G1M4	M	记录无异常结果	1-21
		发现死亡(用动物 G1M4A 代替	22
G1M4A	M	记录无异常结果	1-53
G1M5	M	记录无异常结果	1-29
		确认肿瘤再生长	30-53

[0111]

第 2 组: 酶+激活剂

G2M1	M	记录无异常结果	1-27, 29-53
		开放性伤口(用伤口夹封闭)	28
G2M2	M	记录无异常结果	1-29
		肿瘤再生长	30-53
G2M3	M	记录无异常结果	1-53
G2M4	M	记录无异常结果	1-53
G2M5	M	记录无异常结果	1-53

[0112] 结果不包括手术去除和治疗之前的肿瘤形成的观察。

[0113] 注射HT-1080细胞的动物在第11天出现可见肿瘤。肿瘤肿块随时间增加,在研究第21天,在肿瘤达到平均体积约0.3cm^3并且某些动物的单个肿瘤达＞0.5cm^3时,通过手术切除肿瘤。

[0114] 在肿瘤切除和治疗后,第1组(媒介物+激活剂)的5只动物中有3只出现肿瘤再生长,尽管在动物G1M5中肿瘤并未广泛发展。第2组(酶+激活剂)的5只动物中只有1只具有确认的肿瘤再生长。动物G1M2和G1M3分别在研究的第39天和第43天因源于肿瘤存在的并发症(移动困难、没有可见的进食、没有粪便、总体倦怠)而结束。其余动物在研究第53天被无痛处死。

[0115] 一只动物在本研究过程中死亡。动物G1M4在肿瘤切除术和媒介物+激活剂治疗次日被发现死亡。将该动物替换为另外一只携带肿瘤的动物,并用媒介物+激活剂治疗(G1M4a)。

[0116] 除了肿瘤的存在之外,其他临床观察对研究动物的本质上影响较小。此外,在研究结束当日,记录两组间的体重没有明显差异。

[0117] 因此,本实验表明,与接受媒介物+激活剂治疗的5只动物中的3只相比,使用活化的pEPO处理肿瘤空腔导致表现出肿瘤再生长的动物数减少(1/5)。

[0118] 实施例2-pEPO体内肿瘤减小活性的精细评估

[0119] 遵循与实施例1中所述类似的规程,但略有变化。具体地,对一个38只无胸腺裸鼠(雄性38只)的更大实验组,在右腹侧SC注射HT-1080细胞(与实施例1中使用的5.0×10^6个

细胞/动物浓度相同,体积100μl/动物)。在注射后,每周称量动物体重并监测肿瘤形成情况。一旦肿瘤可见并达到可测量的尺寸,每周使用外卡尺测量肿瘤两次。

[0120] 虽然在实施例1中允许肿瘤达到0.5-1cm^3,但在此进一步实施方案中,允许肿瘤达到0.1-0.3cm^3。然后,将动物随机分为两组,每组15只小鼠。两组均手术切除肿瘤。在肿瘤切除后,用手术胶封闭手术伤口,然后用给药溶液(约1mL/动物)填充空腔。第1组接受磷酸盐缓冲盐水,第2组接受pEPO激活剂。在手术后,动物单独饲养。其他遵循根据实施例1的程序。

[0121] 结果和结论:pEPO的体内肿瘤减小活性

[0122] 来自进一步实施例中的肿瘤生长和临床观察记录在表2中。

[0123]

动物 ID	结果	结果的研究天数

[0124]

第 1 组：磷酸盐缓冲盐水		
G1M1	无异常结果	1-99
G1M2	无异常结果	1-42
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	43-56
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	56
G1M3	无异常结果	1-99
G1M4	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	21-23
G1M5	无异常结果	1-99
G1M6	无异常结果	1-49
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	50-88
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	88
G1M7	无异常结果	1-27
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	28-31
G1M8	无异常结果	1-49
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	50-62
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	63
G1M9	无异常结果	1-65
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	66-92
	驼背。出现脱水和体重减轻	91-92
	由于垂死状态被无痛处死	92
G1M10	无异常结果	1-99
G1M11	无异常结果	1-99
G1M12	无异常结果	1-49
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	50-66

	由于肿瘤尺寸被无痛处死	66
G1M13	无异常结果	1-99
G1M14	无异常结果	1-99
G1M15	无异常结果	1-62
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	63

动物 ID	结果	结果的研究天数

第 2 组：酶+激活剂

[0125]

G2M1	无异常结果	1-49
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	50-90
	动物出现脱水和虚弱	91-92
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	92
G2M2	无异常结果	1-20
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	21-23
G2M3	无异常结果	1-20, 24-88
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	21-23
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	88
G2M4	无异常结果	1-93
	腋窝淋巴结溶胀	94-99
G2M5	无异常结果	1-20
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	21-23
G2M6	无异常结果	1-99

G2M7	无异常结果	1-42
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	43-98
	驼背。出现脱水和体重减轻	98
	由于肿瘤尺寸/垂死状态被无痛处死	98
G2M8	无异常结果	1-99
G2M9	无异常结果	1-27, 32-99
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	28-31
G2M10	无异常结果	1-7, 14-20, 24-99
	动物上出现咬痕。攻击性同笼动物移除	8-13
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	21-23
G2M11	无异常结果	1-97
	腋窝淋巴结溶胀	98-99
G2M12	无异常结果	1-19, 36-41
	肿瘤上方皮肤损伤。用局部抗生素处理	20-35, 42-85
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	85
G2M13	无异常结果	1-99
G2M14	无异常结果	1-30, 32-70
	开放性伤口。用伤口夹封闭。	31
	由于肿瘤尺寸被无痛处死	70
G2M15	无异常结果	1-99

[0126]

[0127] 注射HT-1080细胞的动物在第10天出现可见肿瘤。肿瘤肿块随时间增加,一旦肿瘤达到平均体积约0.15cm^3,在研究第24天手术切除肿瘤。

[0128] 在肿瘤切除和肿瘤腔处理之后,第1组(磷酸盐缓冲盐水)的15只动物中有6只和第2组(酶+激活剂)的15只动物中有5只出现肿瘤再发展。虽然两组动物发生肿瘤的数量和肿瘤出现的时间相似,但是两组的肿瘤生长率似乎不同。第1组对照动物的肿瘤体积比第2组酶+激活剂治疗动物的肿瘤体积增加更快。平均而言,与第1组对照肿瘤相比,第2组动物的肿瘤需要额外15天才能达到类似的尺寸。

[0129] 在监测动物存活率时也观察到类似的结果。非存活定义为肿瘤达到最大肿瘤体积并对动物实施无痛处死的研究日。与肿瘤体积一样,酶/激活剂处理的动物存活时间长于对

照处理动物组。

[0130] 在手术切除HT-1080肿瘤并用活化酶溶液(猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶,pEPO)或作为对照的磷酸盐缓冲盐水处理肿瘤空腔后,磷酸盐缓冲盐水组的15只动物中有6只和酶+激活剂组的15只动物中有5只发生肿瘤。与磷酸盐缓冲盐水处理相比,用活化酶溶液处理肿瘤腔的动物导致更缓慢的肿瘤生长和延长的存活期。结果如图1所示。在图1A中,将肿瘤体积作为术后研究日的函数绘图,直至研究第42天(任何肿瘤达到最大尺寸1cm^3的第一天)。图1B中显示了相同的数据,不同之处在于肿瘤体积绘图直至结束的研究日。在计算随后研究日的平均肿瘤体积时,对于所有剩余研究日使用每只动物在无痛处死时获得的肿瘤体积。

[0131] 在监测动物存活率时也观察到类似的结果。非存活定义为肿瘤达到最大肿瘤体积并对动物实施无痛处死的研究日。存活研究曲线的结果如图2所示。在图2A中显示了存活曲线,其中使用所有研究动物计算存活百分比。在图2B中仅示出了肿瘤再发展的动物的存活曲线。与肿瘤体积一样,酶+激活剂处理的动物比对照处理的动物存活时间更长。

[0132] 实施例3-猪髓过氧化物酶(pMPO)对膀胱癌细胞的体外活性

[0133] 如下所述进行实验,以测定猪髓过氧化物酶(MPO)对人膀胱癌细胞系(T24和5637)和人正常膀胱上皮(SV-HUC-1)的活性。5637细胞系是高度侵袭性膀胱表面肿瘤细胞系,T24细胞系是中等侵袭性移行上皮细胞系。

[0134] 细胞系.在实验中使用两种膀胱癌细胞系,5637(ATCC HTB-9)和T24(ATCC HTB-4)及一种正常膀胱细胞系SV-HUC-1(ATCC CRL-9520)。

[0135] 试剂.在实验中使用以下储备溶液。MPO(2μM水溶液);H_2O_2(100mM水溶液);NaCl(6.2M水溶液);甘氨酸(21.5mM水溶液)和L-脯氨酸(21.5mM水溶液)。

[0136] 实验1.进行实验以评估各个试剂对膀胱癌细胞系和正常膀胱细胞系的体外细胞毒性。各个试剂为髓过氧化物酶(MPO)、NaCl、甘氨酸和L-脯氨酸。

[0137] 方法.使膀胱癌细胞系5637和T24以及正常膀胱细胞系SV-HUC-1复活到推荐的培养基中。在测定开始前24小时,将细胞系以2000个细胞/孔接种到96孔板中。为每个试剂测定制备六个重复孔。将每个细胞系接种在四个96孔板中以监测细胞活力四天。在处理前,使细胞恢复过夜。

[0138] 在处理当天,将每种储备溶液稀释在pH 5.6的McCoy's培养基(媒介物)中以产生以下处理溶液:

[0139] 测定1.NaCl,浓度如下:10mM、20mM、40mM、80mM、100mM、200mM、300mM、400mM、500mM和600mM。

[0140] 测定2.MPO,浓度如下:10mM、20mM、40mM、80mM、100mM、200mM、300mM、400mM、500mM和600mM。

[0141] 测定3.甘氨酸+L-脯氨酸的组合,各氨基酸的浓度如下:0.21mM、0.42mM、0.84mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM和7mM。

[0142] 对于每个测定,使用培养基作为对照。从各个细胞和孔中除去培养基。用如上所述的单独处理溶液处理各孔。在37℃、5%CO_2下进行处理45分钟。然后,除去处理溶液并用标准培养基替换。在处理后,将各板培养24、48或72小时。在每个后处理时间点,将Promega CellTiter Aqueous Reagent(MTS活力试剂)溶液加入到板的每个孔中,并在37℃,5%CO_2

下进行显色。每小时读取各板在490nm处的吸光度。

[0143] 结果.从实验1获得的数据显示,每种单独的试剂(即使在较高浓度下)对癌细胞或正常细胞的细胞毒性作用很小或没有细胞毒性作用。该结果表明单独的MPO对膀胱癌细胞没有细胞毒性。

[0144] 实验2.进行实验以评估MPO组合物对膀胱癌细胞系和正常膀胱细胞系的体外细胞毒性。所述组合物包含各种浓度的MPO、H_2O_2、NaCl、甘氨酸和L-脯氨酸。

[0145] 方法:使用的细胞系如实验1中所述。在开始测定前24小时,将细胞系以2000个细胞/孔或4000个细胞/孔接种到96孔板中。为每种处理溶液制备六个重复孔(a.-e.,如下所示)。将每个细胞系接种在四个96孔板中以监测细胞活力四天。在处理之前使细胞恢复过夜。

[0146] 在处理当天,将每种储备溶液在pH 5.6的McCoy's培养基中稀释,然后合并以产生以下处理溶液:组合物A-培养基pH 5.6(媒介物);组合物B-培养基pH 5.6+NaCl(100mM)+甘氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+MPO(20nM);组合物C-培养基pH 5.6+NaCl(100mM)+甘氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+H_2O_2(1mM);组合物D-培养基pH5.6+NaCl(10mM)+甘氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+MPO(20nM)+H_2O_2(1mM);和组合物E-培养基pH 5.6+NaCl(100mM)+甘氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+MPO(20nM)+H_2O_2(1mM)。

[0147] 从各个细胞和孔中除去培养基。如果适用的话,将处理溶液加入各孔中,并在37℃、5%CO_2下进行处理45分钟。然后,除去处理溶液并用标准培养基替换。在处理后,将各板培养24、48或72小时。在每个后处理时间点,将Promega CellTiter Aqueous Reagent(MTS活力试剂)溶液加入到板的每个孔中,并在37℃,5%CO_2下进行显色。每小时读取各板在490nm处的吸光度。

[0148] 结果.来自实验2的数据显示,单独的培养基(组合物A)和培养基、MPO、NaCl、甘氨酸和L-脯氨酸(组合物B)对膀胱癌细胞或正常膀胱细胞没有表现出细胞毒性。该结果与实验1一致。组合物C(培养基、H_2O_2、NaCl、甘氨酸和L-脯氨酸)对膀胱癌细胞和正常膀胱细胞均表现出一定的细胞毒性作用。组合物D和E(培养基、MPO、H_2O_2、NaCl、甘氨酸和L-脯氨酸)对膀胱癌细胞和正常膀胱细胞均表现出最强的细胞毒性作用。然而,该组合对癌细胞系的细胞毒性作用更大,对正常细胞系的细胞毒性作用较小。在氯化物的存在下,MPO和H_2O_2的组合对癌细胞具有细胞毒性作用,并且对正常细胞毒性较小。

[0149] 实验3.进行实验以评估在各种细胞密度下,MPO组合物对膀胱癌细胞系和正常膀胱细胞系的体外细胞毒性。所述组合物包含MPO(1nM)、H_2O_2(1mM)、NaCl(100mM)、甘氨酸(0.21mM)和L-脯氨酸(0.21mM)。

[0150] 方法:使用的细胞系如实验1中所述。在测定开始前24小时,将细胞系以各种细胞密度接种到96孔板中。测试的膀胱癌细胞密度为:15,000个细胞/孔;30,000个细胞/孔;60,000个细胞/孔;90,000个细胞/孔;120,000个细胞/孔;和400,000个细胞/孔。测试的正常膀胱细胞密度为:4,000个细胞/孔;15,000个细胞/孔;30,000个细胞/孔;60,000个细胞/孔;90,000个细胞/孔;和120,000个细胞/孔。为每种处理溶液制备一式三份的孔。将每个细胞系接种在四个96孔板中以监测细胞活力四天。在处理前,使细胞恢复过夜。

[0151] 在处理当天,将每种储备溶液在pH 5.6的McCoy's培养基中稀释,然后合并以产生以下处理溶液:组合物A-培养基pH 5.6(媒介物);组合物B-培养基pH 5.6+NaCl(100mM)+甘

氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+H_2O_2(1mM);和组合物C-培养基pH 5.6+NaCl(100mM)+甘氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+MPO(1nM)+H_2O_2(1mM)。

[0152] 从各个细胞和孔中除去培养基。如果适用的话,将处理溶液加入各孔中,并在37℃、5%CO_2下进行处理45分钟。然后,除去处理溶液并用标准培养基替换。在处理后,将各板培养72小时。将Promega CellTiter Aqueous Reagent(MTS活力试剂)溶液加入到板的每个孔中,并在37℃,5%CO_2下进行显色。每小时读取各板在490nm处的吸光度。

[0153] 结果.来自实验3的数据显示,在测试的MPO(1nM)和H_2O_2(1mM)的浓度下,随着细胞密度增加,MPO组合物对癌细胞和正常细胞的细胞毒性作用逐渐降低。

[0154] 实验4.进行实验以评估在高细胞密度和较高浓度的MPO(≥20nM)和H_2O_2(10mM)下,MPO组合物对的膀胱癌细胞系和正常膀胱细胞系的体外细胞毒性。所述MPO组合物还包含NaCl(100mM)、甘氨酸(0.21mM)和L-脯氨酸(0.21mM)。

[0155] 方法:使用的细胞系如实验1中所述。在测定开始前24小时,将细胞系以各种细胞密度接种到96孔板中。测试的膀胱癌细胞密度为:120,000个细胞/孔和400,000个细胞/孔。测试的正常膀胱细胞密度为:50,000个细胞/孔和100,000个细胞/孔。为每种处理溶液制备六个重复孔。将每个细胞系接种在四个96孔板中以监测细胞活力四天。在处理前,使细胞恢复过夜。

[0156] 在处理当天,将每种储备溶液在pH 5.6的McCoy's培养基中稀释,然后合并以产生以下处理溶液:组合物A-培养基pH 5.6(媒介物);组合物B-培养基pH 5.6+NaCl(100mM)+甘氨酸(0.21mM)+L-脯氨酸(0.21mM)+MPO(20nM)+H_2O_2(10mM);和组合物C-J,其包含相同浓度的NaCl(100mM)、甘氨酸(0.21mM)、L-脯氨酸(0.21mM)和H_2O_2(10mM)。MPO的浓度分别为40nM、80nM、100nM、120nM、140nM、160nM、180nM和200nM。

[0157] 从各个细胞和孔中除去培养基。如果适用的话,将处理溶液加入各孔中,并在37℃、5%CO2下进行处理45分钟。然后,除去处理溶液并用标准培养基替换。在处理后,将各板培养72小时。将Promega CellTiter Aqueous Reagent(MTS活力试剂)溶液加入到板的每个孔中,并在37℃,5%CO2下进行显色。每小时读取各板在490nm处的吸光度。

[0158] 结果.来自实验4的数据显示在较高细胞密度下,测试的各浓度的MPO的(≥20nM)和H_2O_2(10mM)导致对人膀胱癌细胞的高选择性杀伤,而对正常的人膀胱细胞不受伤害。

[0159] 实施例4-猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶(pEPO)对膀胱癌细胞的体外活性

[0160] 计划实验以确定猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶(pEPO)对小鼠膀胱癌细胞的体外活性。还将研究pEPO对正常膀胱细胞的作用。将制备EPO、过氧化氢、溴化钠和乙醇胺的储备液和稀释溶液。在实验中将处理膀胱癌细胞系T24,如此处理作为对照的良性膀胱细胞系SV-HUC1。将用以下溶液处理细胞:(1)细胞培养基("培养基");(2)培养基+过氧化氢(H_2O_2);(3)培养基+溴化钠(NaBr);(4)培养基+pEPO;(5)培养基+乙醇胺;(6)培养基+H_2O_2+NaBr+乙醇胺;(7)培养基+H_2O_2+EPO+乙醇胺;(8)培养基+NaBr+pEPO+乙醇胺);(9)培养基+H_2O_2+NaBr+pEPO;(10)培养基+H_2O_2+NaBr+pEPO;+乙醇胺。将两种细胞系暴露于各种处理溶液中的每一种15分钟、30分钟和45分钟。在处理后0小时、24小时、48小时和72小时测量细胞生长。

[0161] 实施例5-猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶(pEPO)的体内膀胱肿瘤减小活性

[0162] 计划实验以确定猪嗜酸性粒细胞过氧化物酶(pEPO)在小鼠膀胱癌模型中的膀胱肿瘤减小活性,其中膀胱癌细胞在小鼠膀胱中生长。将包含嗜酸性粒细胞过氧化物酶、溴化

钠和乙醇胺的处理溶液与包含在磷酸盐缓冲盐水中的过氧化氢的激活剂溶液混合,并使其活化3至5分钟。在活化后,通过导管将酶溶液膀胱内施用到膀胱中。将随时间推移测量肿瘤生长的减小。

[0163] 实施例6-膀胱癌的治疗

[0164] 设想对患有膀胱癌的患者进行治疗,可能包括以下一项或多项:

[0165] • 通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的最佳pH。

[0166] • 用二甲基亚砜(DMSO)去除膀胱粘膜里层(任选的)。

[0167] • 预混合包含髓过氧化物酶、氯化钠、甘氨酸和L-脯氨酸的组合物与过氧化氢溶液,得到处理溶液。

[0168] • 使处理溶液温育3至5分钟。

[0169] • 通过导尿管将治疗溶液直接滴注/施用到膀胱中。

[0170] 实施例7-膀胱癌的治疗

[0171] 计划进行1期人类临床试验以治疗患有膀胱癌的患者,并且可能包括以下一项或多项:

[0172] • 通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的最佳pH。

[0173] • 用二甲基亚砜(DMSO)去除膀胱粘膜里层(任选的)。

[0174] • 用中性离子强度溶液(例如林格氏乳酸盐)洗涤合适的膀胱,其可以在不停止靶癌细胞代谢的情况下施用。

[0175] • 预混合包含髓过氧化物酶(20nM-100nM)、氯化钠(100mM)、甘氨酸(0.21mM)和L-脯氨酸(0.21mM)的组合物与过氧化氢溶液(10mM-100mM),得到处理溶液。

[0176] • 使处理溶液温育3至5分钟。

[0177] • 通过导尿管将治疗溶液直接滴注/施用到膀胱中。

[0178] 实施例8-膀胱癌的治疗

[0179] 计划进行1期人类临床试验以治疗患有膀胱癌的患者,并且可能包括以下一项或多项:

[0180] • 通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的最佳pH。

[0181] • 用二甲基亚砜(DMSO)去除膀胱粘膜里层(任选的)。

[0182] • 用中性离子强度溶液(例如林格氏乳酸盐)洗涤合适的膀胱,其可以在不停止靶癌细胞代谢的情况下施用。

[0183] • 预混合包含髓过氧化物酶(20nM-100nM)、氯化钠(100mM)、甘氨酸(0.21mM)和L-脯氨酸(0.21mM)的组合物。

[0184] • 通过导尿管将所述组合物直接滴注/施用到膀胱中。

[0185] • 使所述组合物在膀胱中停留约10分钟。

[0186] • 通过导尿管将过氧化氢(10mM-100mM)直接滴注/施用到膀胱中以激活髓过氧化物酶组合物。

[0187] 实施例9-膀胱癌的治疗

[0188] 设想对患有膀胱癌的患者进行治疗,可能包括以下一项或多项:

[0189] • 通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的最佳pH。

[0190] • 用二甲基亚砜(DMSO)去除膀胱粘膜里层(任选的)。

[0191] • 用中性离子强度溶液(例如林格氏乳酸盐)洗涤合适的膀胱,其可以在不停止靶癌细胞代谢的情况下施用。

[0192] • 通过导尿管直接滴注/施用包含卤素过氧化物酶、卤化物(例如溴化物或氯化物)、过氧化物或产生过氧化物的氧化酶和氧化酶底物的组合物。

[0193] 实施例10-膀胱癌的治疗

[0194] 设想对患有膀胱癌的患者进行治疗,可能包括以下一项或多项:

[0195] • 通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的最佳pH。

[0196] • 用二甲基亚砜(DMSO)去除膀胱粘膜里层(任选的)

[0197] • 用中性离子强度溶液(例如林格氏乳酸盐)洗涤合适的膀胱,其可以在不停止靶癌细胞代谢的情况下施用。

[0198] • 预混合包含嗜酸性粒细胞过氧化物酶、氯化钠和乙醇胺的组合物与过氧化氢溶液,得到处理溶液。

[0199] • 使处理溶液温育3至5分钟。

[0200] • 通过导尿管将治疗溶液直接滴注/施用到膀胱中。

[0201] 实施例11-膀胱癌的治疗

[0202] 设想对患有膀胱癌的患者进行治疗,可能包括以下一项或多项:

[0203] • 通过灌洗维持膀胱环境在约5.0至6.5的最佳pH。

[0204] • 用二甲基亚砜(DMSO)去除膀胱粘膜里层(任选的)。

[0205] • 用中性离子强度溶液(例如林格氏乳酸盐)洗涤合适的膀胱,其可以在不停止靶癌细胞代谢的情况下施用。

[0206] • 预混合包含嗜酸性粒细胞过氧化物酶、溴化钠和乙醇胺的组合物。

[0207] • 通过导尿管将所述组合物直接滴注/施用到膀胱中。

[0208] • 使所述组合物在膀胱中停留约10分钟。

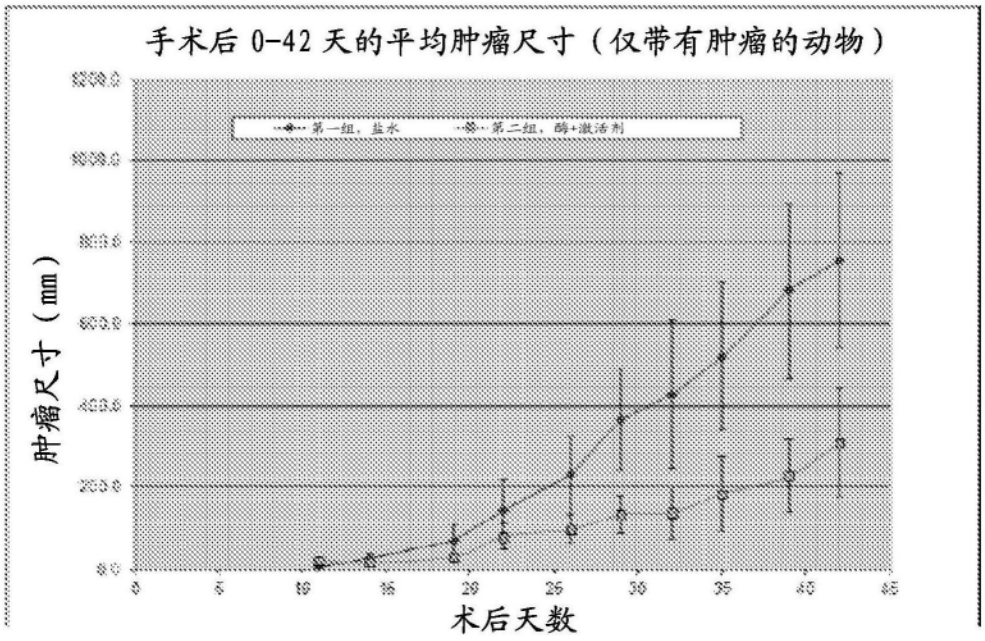
[0209] • 通过导尿管将过氧化氢直接滴注/施用到膀胱中以激活髓过氧化物酶组合物。

[0210] 虽然已经示出和描述了示例性实施方案,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式,但是本领域技术人员将认识到,可以通过对所公开的结构、材料、组合物和方法进行变更来实施本公开,并且这些变更被视为在本公开的范围内。

[0211] 本说明书中对任何现有技术的讨论或提及不应被视为承认该现有技术是接收本说明书的技术人员的公知常识的一部分。

[0212] 本申请中所引用的所有参考文件、已公布的专利和专利申请的内容都通过引用并入本文。

A


手术后 0-42 天的平均肿瘤尺寸（仅带有肿瘤的动物）
第一组，盐水
第二组，酶+激活剂
肿瘤尺寸（mm）
术后天数

B

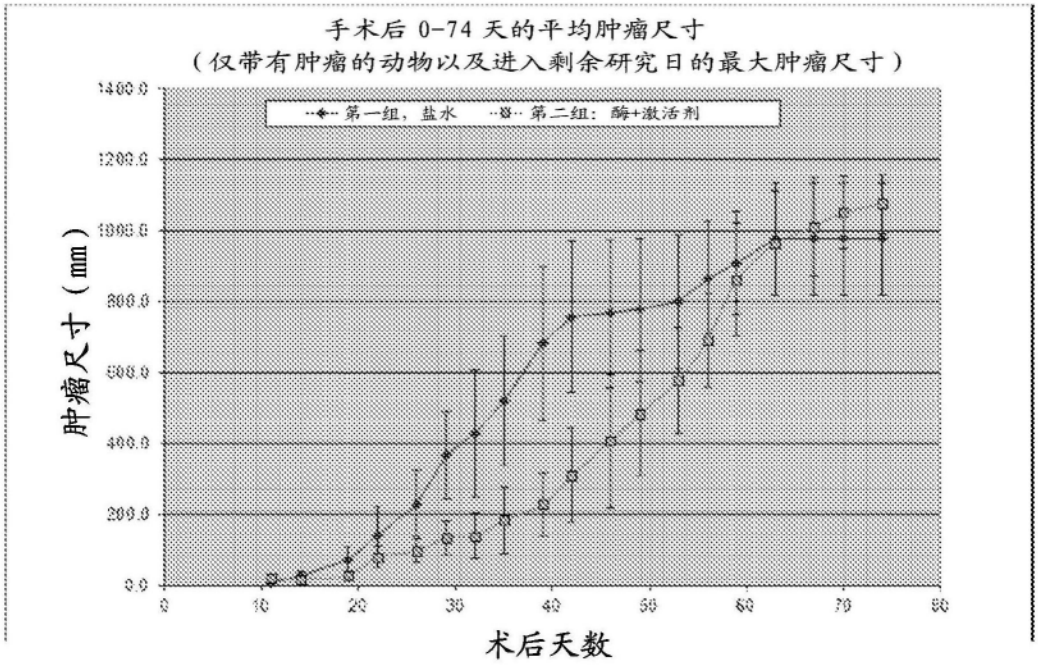
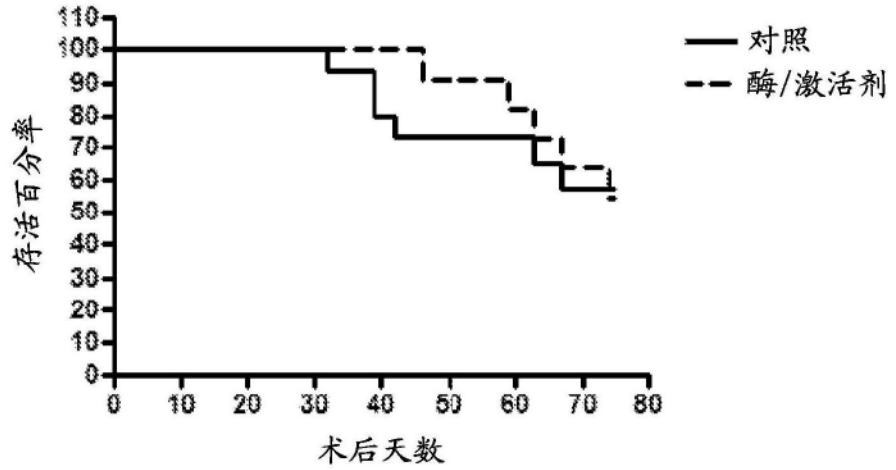

手术后 0-74 天的平均肿瘤尺寸
（仅带有肿瘤的动物以及进入剩余研究日的最大肿瘤尺寸）
第一组，盐水
第二组：酶+激活剂
肿瘤尺寸（mm）
术后天数

图1

A


所有动物的存活百分率
（没有达到最大肿瘤尺寸的百分率）
项目 131029-729
存活百分率
术后天数
对照
酶/激活剂

B

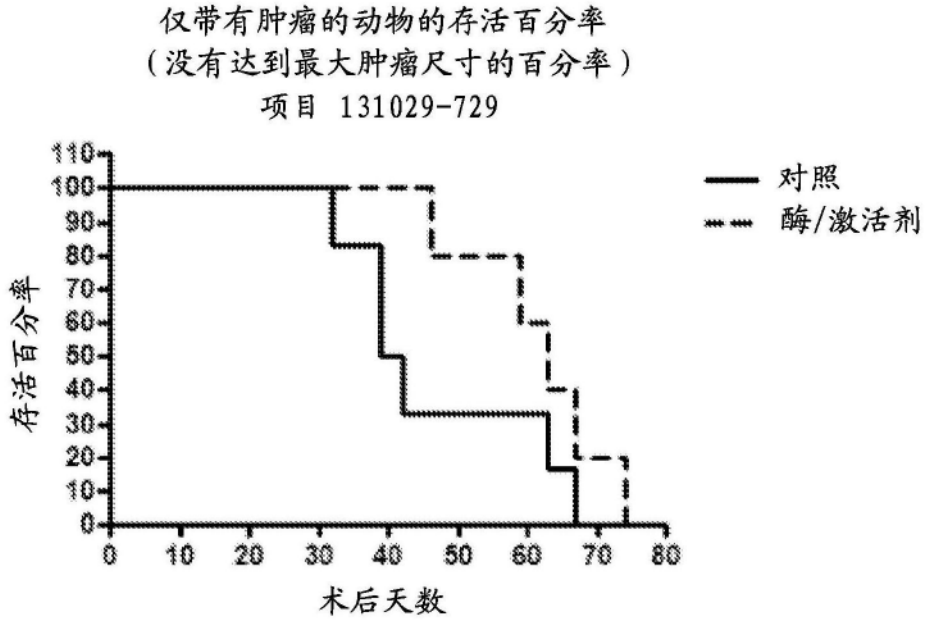

仅带有肿瘤的动物的存活百分率
（没有达到最大肿瘤尺寸的百分率）
项目 131029-729
存活百分率
术后天数
对照
酶/激活剂

图2