(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120053481 A
(43)申请公布日 2025.05.30

(21)申请号 202510224683.7
(22)申请日 2019.09.25
(30)优先权数据
18196959.3 2018.09.26 EP
18196963.5 2018.09.26 EP
(62)分案原申请数据
201980063142.3 2019.09.25
(71)申请人 纳米隙亚纳米粉末有限公司
地址 西班牙
申请人 圣地亚哥德孔波斯特拉大学
(72)发明人 D·布塞塔费尔南德斯
F·多明格斯普恩特
M·A·罗培斯昆特拉
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张朔 黄革生
(51)Int.Cl.
A61K 33/24(2019.01)
A61K 33/34(2006.01)
A61K 33/00(2006.01)
A61K 33/28(2006.01)
A61K 33/38(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书26页 附图25页

(54)发明名称

原子量子簇的治疗用途

(57)摘要

提供了涉及原子量子簇(AQCs)的组合物和治疗用途的发明,特别是基本上由包含5个零价过渡金属原子的AQCs组成的组合物,用于治疗细胞增殖性病症。

CN 120053481 A

1.用于治疗细胞增殖性病症的组合物,其包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)。

2.根据权利要求1的用于所述用途的组合物,其与放射疗法组合。

3.根据权利要求2的用于所述用途的组合物,其用于与放射疗法同时或依次施用。

4.根据权利要求2或权利要求3的用于所述用途的组合物,其中所述放射疗法是外部射束放射疗法。

5.根据权利要求1至4中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述组合物不与抗肿瘤药组合使用。

6.根据权利要求1至5中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述AQCs是所述组合物的唯一活性成分。

7.根据权利要求1至6中任一项的用于所述用途的组合物,用作单一化学疗法。

8.根据权利要求1至4中任一项的组合物,用于与另外的治疗剂、例如抗肿瘤剂组合使用,所述抗肿瘤剂选自:烷化剂(例如氮芥类似物、亚硝基脲、烷基磺酸盐、含铂化合物、乙烯亚胺和咪唑并四嗪)、细胞毒性抗生素(例如蒽环霉素或放线菌素)、植物生物碱和其它天然产物(例如喜树碱衍生物、表鬼臼毒素、紫杉烷和长春花生物碱)、抗代谢物(例如胞苷类似物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、脲衍生物)和用于靶向疗法的药物(例如激酶抑制剂和单克隆抗体)。

9.根据权利要求1至8中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述金属原子选自Ag、Au、Cu、Pt、Fe、Cr、Pd、Ni、Rh、Pb、Ir、Ru、Os、Co、Ti、V或其任意组合。

10.根据权利要求9的用于所述用途的组合物,其中所述金属原子选自Ag、Au、Cu、Pt或其任意组合。

11.根据权利要求9或权利要求10的用于所述用途的组合物,其中所述金属原子为Ag。

12.根据权利要求1至11中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述组合物包含大于50%的由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。

13.根据权利要求1至12中任一项的用于所述用途的组合物,其中细胞增殖性病症是肿瘤和/或癌症。

14.根据权利要求13的用于所述用途的组合物,其中所述癌症选自脑癌、肺癌、乳癌或结肠癌。

15.根据权利要求14的用于所述用途的组合物,其中所述癌症选自脑癌。

16.根据权利要求1至15中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述细胞增殖性病症包含RAS突变。

17.根据权利要求16的用于所述用途的组合物,其中所述RAS突变是KRAS突变。

18.根据权利要求1至17中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述组合物包含可药用赋形剂、稀释剂或载体。

19.根据权利要求1至18中任一项的用于所述用途的组合物,其与由3个零价过渡金属原子组成的AQCs组合。

20.根据权利要求1至19中任一项的用于所述用途的组合物,其:(i)基本上不含由多于5个零价过渡金属原子组成的AQCs,(ii)基本上不含由少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs,和/或(iii)基本上不含金属离子。

21.根据权利要求20的用于所述用途的组合物,其中所述组合物中存在的AQCs有大于约95%由5个零价过渡金属原子组成。

22.根据权利要求1至21中任一项的组合物,用于预防和/或治疗癌症转移。

23.根据权利要求22的组合物,用于预防和/或治疗癌症的淋巴结转移。

24.根据权利要求22或权利要求23的组合物,用于预防和/或治疗肺癌转移。

25.根据权利要求1至24中任一项的用于所述用途的组合物,其经口服、静脉内或皮下施用。

26.根据权利要求1至25中任一项的组合物在制备用于治疗细胞增殖性病症的药物组合物中的用途。

27.包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物作为用于增殖性细胞的放射疗法增敏剂的用途。

原子量子簇的治疗用途

[0001] 本申请是申请日为2019年9月25日、优先权日为2018年9月26日、发明名称为“原子量子簇的治疗用途”的中国专利申请201980063142.3的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及原子量子簇(atomic quantum clusters)、特别是由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇的治疗用途。

背景技术

[0003] 氧化还原稳态对于细胞存活是必需的。硫醇在维持氧化还原平衡中起重要作用。氨基酸半胱氨酸侧链中的硫原子可以以多种不同的氧化态存在。在生理条件下,半胱氨酸的硫原子在硫醇和二硫化物状态(分别是还原的和氧化的)之间可逆地转变,但是向更高氧化态(除了磺酸之外)的转变是不可逆的,这意味着蛋白质仅可通过合成新的蛋白质来替代。在其不同隔室(仅除了内质网之外)中的细胞是持续减少的蛋白质,其在氧的存在下自发氧化。在细胞内,蛋白质功能取决于它们的硫氧化态。存在两个重叠的系统,谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统,它们在整个进化过程中被很好地保存下来,并且发挥功能使蛋白质半胱氨酸保持为功能性还原态。

[0004] 在细胞的正常代谢期间产生了活性氧类别(ROS),谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统通过保持还原态来保护细胞免于氧化损伤。如果ROS水平升高并超过谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统的缓冲能力,则可发生信号通路和基因表达的激活,诱导细胞凋亡。活性增殖性肿瘤细胞显示出呼吸增加和因而显示出较高的ROS水平。而且,人类肿瘤显示出血管形成不足,这促成葡萄糖饥饿和ROS增加(归因于氧化还原稳态失衡)。

[0005] WO2012/059572描述了至少一种AQC和至少一种抗肿瘤药的组合,用于预防和/或治疗细胞增殖性病症。该申请描述了由2至25个零价过渡金属原子组成的AQCs,其对癌细胞系具有细胞毒性和抗增殖作用,因此可用于与抗肿瘤剂组合以治疗细胞增殖性病症。

[0006] 本发明的一个目的是提供AQCs的改善的治疗组合物。

发明内容

[0007] 发明简述

[0008] 在第一个方面,本发明提供了用于治疗细胞增殖性病症的组合物,其包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)。在另一个方面,本发明提供了如本文定义的组合物在制备用于治疗细胞增殖性病症的药物组合物中的用途。在另一个方面,本发明提供了包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物作为用于增殖性细胞的放射疗法增敏剂的用途。在另一个方面,本发明提供了预防或治疗细胞增殖性病症的方法,该方法包括给需要其的患者施用治疗有效量的如本文定义的组合物。在另一个方面,本发明提供了预防或治疗细胞增殖性病症的方法,该方法包括给需要其的患者施用治疗有效量的包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物,其中所述方法不包括

用另外的抗肿瘤药治疗所述患者。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了预防或治疗细胞增殖性病症的方法,该方法包括给需要其的患者施用治疗有效量的包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物与放射疗法的组合。

[0010] 这些及其它方面更详细地描述在下述说明书中。

附图说明

[0011] 图1:Ag5-AQC与大肠杆菌(E.Coli)硫氧还蛋白的相互作用。如所看到的那样,Ag5-AQC(大的灰色五元分子)结合半胱氨酸(黑色箭头突出显示的分子)残基,形成活性位点。结合能量是有利的(-167kJ/mol)。

[0012] 图2:半胱氨酸(a)和谷胱甘肽(b)和相应的加入有Ag5-AQCs的那些(分别为c&d)的标准化硫K边缘X-射线吸收近边结构(S-K XANES)光谱。右图显示了左侧图的放大区域。垂直的实线和虚线指与不同S-氧化态相关的能量位点。

[0013] 图3:(a)半胱氨酸和用不同浓度Ag5-AQC处理的半胱氨酸、(b)相对于参考储备浓度(RSC)按1:106稀释、(c)相对于RSC按1:103稀释和(d)RSC的标准化S-K XANES光谱。竖线表示不同S-氧化态的相应能量。

[0014] 图4:用Ag5-AQC处理之前(a)和之后(b)的含有PBS的硫氧还蛋白水溶液的标准化S-KXANES光谱。竖线表示不同S-氧化态的相应能量。

[0015] 图5:用Ag5-AQCs、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(HO•)单独或以各种组合氧化的硫氧还蛋白(TRX)的百分比,如x-轴所示。

[0016] 图6:在各种处理后的硫氧还蛋白半胱氨酸的硫氧化数目。硫氧化受到Ag5-AQCs、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(HO•)的影响。与Ag5-AQC的组合极大增强了H_2O_2和HO•的作用。

[0017] 图7:在加入单独(对照)或与Ag5-AQC组合的不同浓度的二硫苏糖醇(DTT)后测量了大肠杆菌(E.Coli)存活。在不存在DTT(0mM)下,低浓度的Ag5-AQC杀死细菌。当与Ag5-AQC共同施用增加浓度的DTT(0.1mM)时,细菌生存力被部分地恢复,表明DTT拯救了E.Coli免受Ag5-AQC的作用。因此,10mM的DTT对细菌有毒性,然而与Ag5-AQC共同施用逆转了DTT的作用。

[0018] 图8:当加入Ag5-AQCs时对于各细胞系的剂量-响应(0.24-1.2mg/L)图。

[0019] 图9:结果显示了加入由铜制成的5个原子簇(Cu_5-AQCs)时与对照相比的A549细胞系的细胞生存力百分比。

[0020] 图10:蛋白质中巯基的Ag5-AQC氧化。用Premo Cellular Redox Sensor转导A549细胞。48小时后,使用Leica TCS SP5共焦显微镜进行延时成像。用405和488nm激光激发样品,计算绿色通道(500-530nm)中的发射比(405/488比例)。在10分钟期间,在加入Ag5-AQC(IC50)后每10秒拍摄一次图像。在指定时间点的细胞伪色比例图突出显示了氧化还原状态的变化。在每个实验中,定量了两种单独细胞的比率(箭头),并针对时间作图。

[0021] 图11:(a)通过间接免疫荧光检测了响应于Ag5-AQCs的MTF1位置。将A549细胞用Ag5-AQCs处理1小时和2小时,之后固定并用抗MTF1抗体和DAPI染色以复染细胞核。Ag5-AQCs显示,与对照细胞(左栏)相比,MTF-1明显易位到细胞核中(右栏)。(b)在HEK293细胞

中,Ag5-AQCs诱导Nrf2从细胞质易位到细胞核。使用抗Nrf2抗体(红色)和抗Keap1抗体(绿色)进行免疫荧光染色。细胞核用Hoechst复染(蓝色)。重叠图像显示了在用Ag5-AQCs(IC50)或N-乙基马来酰亚胺(NEM)(100μM,阳性对照)处理30分钟后Nrf2的核位置。

[0022] 图12:Ag5-AQC处理减小了A549多细胞肿瘤球体(MCTS)尺寸。(a)MCTS对照和用Ag5-AQCs处理的图像显示了MCTS尺寸和中央域细胞密度的差异。白色星号表示处理的天数,箭头指向由于Ag5-AQCs处理具有较低细胞密度的中央区。(b)MCTS对照或用Ag5-AQCs处理的生长动力学。数据表示平均值±SD。误差条表示标准偏差;n=8。Mann Whitney检验((*)$p<0.05$)。(c)使用低氧剂和Hoechst染色的图像显示了在用或没有用(对照)Ag5-AQC处理的类肿瘤(tumouroids)中的低氧水平。

[0023] 图13:增殖性细胞比非增殖性细胞对Ag5-AQCs的作用更敏感。将(A)增殖和非增殖A549细胞、(B)增殖和非增殖U251细胞和(C)血清剥夺的A549细胞暴露于不同浓度的Ag5-AQC达1小时,通过MTT分析测定细胞生存力。数据显示为三次独立实验的平均值±SD。将(D)血清剥夺的或血清融合的A549细胞用1.2mg/L Ag5-AQC单独或与H_2O_2组合处理。当共同施用Ag5-AQC和H_2O_2时,清楚地看到协同效应。

[0024] 图14:Ag5-AQC体内作用。(a)Ag5-AQCs导致患有原位脑癌的小鼠中肿瘤生长减少。实验组:Ag5-AQCs(0.25mg/kg)和对照(未经处理)。(b-d)Ag5-AQCs处理导致患有原位肺癌的小鼠中肿瘤生长减少。(b)通过发光(IVIS®光谱)体内测量肿瘤生长。黑色箭头表示研究中的处理施用时间。(c)离体测量的肺和纵隔淋巴结中荧光素酶活性定量。(d)肺肿瘤的免疫组织化学染色(箭头指示肿瘤结节)。实验组:CDDP(4mg/kg)、Ag5-AQCs(0.25mg/kg)和对照(未经处理)。(e)整个实验中的体重。实验组:CDDP(4mg/kg)、Ag5-AQCs(0.25mg/kg)和对照(未经处理)。数据表示平均值±SD。误差条表示标准偏差;n=5。Mann Whitney检验((*)$p<0.05$)。

[0025] 图15:Ag5-AQC处理导致来自患者的B-CLL细胞的细胞存活力降低。(a)在Ag5-AQC处理后,B-CLL原代细胞存活力的浓度依赖性降低。将细胞暴露于不同浓度的Ag5-AQC达30分钟,在24小时后通过MTT分析评估细胞存活力。(b)与对照相比,Ag5-AQC处理提高了DHE阳性细胞的百分比2.5倍。用Ag5-AQC处理B-CLL细胞1小时,4小时后通过流式细胞术定量DHE阳性细胞。(c)用Ag5-AQC处理的B-CLL细胞的TEM图像显示了细胞凋亡的明显迹象,例如染色质边缘化(黑色箭头)和线粒体破坏(黑色箭头)。

[0026] 图16:Ag5-AQC处理引起多发性骨髓瘤异种移植物模型中肿瘤体积减小。历经26天的过程测量三个不同处理组之间的肿瘤体积:对照(静脉内施用的盐水溶液,n=4)、Ag5-AQCs(静脉内施用0.0125mg/kg,n=4)和硼替佐米(腹膜内施用0.25mg/kg,n=4)。

[0027] 图17:将携带多西环素诱导的RasV12等位基因的W3T3细胞暴露于多西环素(白色条)或载体(对照-黑色条)24小时,然后用不同浓度的Ag5-AQCs处理。(a)当加入多西环素时通过Western印迹评价了RasV12表达,和(b)24小时后通过MTT分析测定了细胞存活力。数据显示为至少三次独立实验的平均值±SD。

[0028] 图18:Ag5-AQC处理增加了A549细胞对放射的敏感性。在A)克隆源性试验和B)使用抗pH2AX染色的DNA损伤试验中显示的在用Ag5-AQCs处理的A549细胞中放射作用的结果。

[0029] 图19:Ag5-AQC处理增加了U251细胞对放射的敏感性。在A)克隆源性试验和B)使用抗pH2AX染色的DNA损伤试验中显示的在用Ag5-AQCs处理的U251细胞中放射作用的结果。

具体实施方式

[0030] 发明详述

[0031] 定义

[0032] 说明书通篇中使用的所有技术和科学术语具有与本领域技术人员通常理解的那些相同的含义。

[0033] 在说明书通篇中,对于任何数量使用术语“约”被认为包括该数量。

[0034] 在说明书通篇中,除非上下文另外需要,否则措辞“包含”将理解为意味着包括所述整体、步骤、整体集合或步骤集合,但不排除任何其它整体、步骤、整体集合或步骤集合。

[0035] 在说明书通篇中,除非上下文另外需要,否则术语“基本上由...组成”将理解为意味着包括所述整体、步骤、整体集合或步骤集合,排除实质上影响所述整体、步骤、整体集合或步骤集合的基本特征的任何其它整体、步骤、整体集合或步骤集合。

[0036] 在说明书通篇中,除非上下文另外需要,否则术语“由...组成”将理解为意味着包括所述整体、步骤、整体集合或步骤集合,排除任何其它整体、步骤、整体集合或步骤集合。

[0037] 如本文所用的术语“原子量子簇”或“AQCs”指2至500个零价过渡金属原子、例如2至200、2至100、2至50或2至25个过渡金属原子的基团/簇,具有小于2nm、例如小于1nm的尺寸。AQCs可以包含相同(单核簇)或不同(异核簇)过渡金属的零价过渡金属原子。应该理解,该术语不包括金属离子。

[0038] 术语“过渡金属”将理解为指已知为过渡金属的元素周期表元素,但是它不是指所述元素的电行为。如EP1914196中所报道,AQCs中的电子限域(confinement of electrons)引起能级的量子分离,在这些材料的性质中产生重要变化。因此,本文所述的AQCs中的金属原子可以具有类似于半导体或甚至是类似于绝缘的行为。

[0039] 术语“基本上不含”可用于指这样的组合物:其基本上或完全不含其后具体提及的实体,或者至少是不含有使得实体影响组合物的功效、可储存性、针对必要安全顾虑的可用性、和/或稳定性的量的该实体。

[0040] 术语“治疗”可包括预防,意为改善症状、减轻症状、暂时或永久地消除症状的原因或者阻止或减缓所指定紊乱或病症的症状出现。本发明的化合物可用于治疗人和非人动物。

[0041] 术语“有效量”、“治疗有效量”或“有效剂量”指足以引起所期望的药理学或治疗作用、从而导致有效预防或治疗病症的量。病症的预防表现为以医学上显著的程度延迟病症症状的发作。病症的治疗表现为与病症相关的症状减轻或者病症症状复发的改善。

[0042] 组合物

[0043] 本发明人在此提供了如下证据:由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)影响谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统两者,从而影响细胞存活力。具有5个原子的AQCs对生物学系统的作用的基本特征是它们对两种底物——蛋白质和电子受体——的特异性。对于Ag5-AQC与半胱氨酸、谷胱甘肽和硫氧还蛋白的相互作用提供了理论和实验证据。并且,重要的是,本发明人还提供了Ag5-AQCs在生物学上依赖于电子受体的存在的证据,如通过以下事实所证明的那样:Ag5-AQC的活性在羟基自由基(HO•)时更大>H_2O_2>O_2(例如图5和6)。不受限于理论,本文提供的证据表明,具有5个原子的AQCs通过充当ROS和蛋白质中硫原子之间的催化桥以增加硫醇氧化水平而增加了ROS的作用。该作用机制与本领域目前已知

的其它化疗药物不同。在体外2D和3D细胞培养物、动物模型和从患者获得的肿瘤细胞的原代培养物中证实了5个原子的AQCs的作用机制。

[0044] 因此,根据本发明的第一方面,提供了用于治疗细胞增殖性病症的组合物,其包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQC)。

[0045] 本文将描述包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs的组合物的潜在治疗用途。已经令人惊奇地发现,该组合物自身具有对真核细胞的细胞毒性作用,不需要存在另外的抗肿瘤剂。本文提供的理论和实验证据证明:由5个原子组成的AQCs选择性地与蛋白质中存在的半胱氨酸残基相互作用,在活性氧类别(ROS)的存在下导致硫氧化。这种机制是这种尺寸的簇所独有的。因此,本申请首次提供了这样的动机:使用具有5个零价过渡金属原子的AQCs作为单一疗法来治疗细胞增殖性疾病如癌症。

[0046] 组合物可以基本上由原子量子簇(AQCs)组成用于治疗细胞增殖性病症,其中所述组合物包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。在一个实施方案中,所述AQCs是组合物的唯一活性成分,即,组合物中不存在其它活性成分。

[0047] 在一个实施方案中,组合物不包含抗肿瘤药物。在进一步的实施方案中,组合物不包含如WO2012/059572中所述的抗肿瘤药物,例如烷化剂(例如氮芥类似物、亚硝基脲、烷基磺酸盐、含铂化合物、乙烯亚胺和咪唑并四嗪)、细胞毒性抗生素(例如蒽环霉素、放线菌素)、植物生物碱和其它天然产物(例如喜树碱衍生物、表鬼臼毒素、紫杉烷和长春花生物碱)、抗代谢物(例如胞苷类似物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、脲衍生物)和用于靶向疗法的药物(例如激酶抑制剂和单克隆抗体)。

[0048] 在一个实施方案中,组合物不与抗肿瘤药物组合使用。在一个实施方案中,组合物不与如WO2012/059572中所述的抗肿瘤药物组合使用,所述抗肿瘤药物例如是烷化剂(例如氮芥类似物、亚硝基脲、烷基磺酸盐、含铂化合物、乙烯亚胺和咪唑并四嗪)、细胞毒性抗生素(例如蒽环霉素、放线菌素)、植物生物碱和其它天然产物(例如喜树碱衍生物、表鬼臼毒素、紫杉烷和长春花生物碱)、抗代谢物(例如胞苷类似物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、脲衍生物)和用于靶向疗法的药物(例如激酶抑制剂和单克隆抗体)。应当理解,如本文使用的术语“组合”指将组合物(包含AQCs)和抗肿瘤药物放在一起的作用。因此,该术语不排除在癌症治疗过程期间的另一个时间点使用抗肿瘤药物,如果所述用途不是为了使用抗肿瘤药物与要求保护的组合物的组合的话。

[0049] 在一个实施方案中,组合物用作单一化学疗法。对“单一化学疗法”的称谓指通过使用单一化学药物治疗细胞增殖性疾病如癌症。如本文所讨论的那样,本发明的组合物具有其自身的化学治疗作用,不需要与其它药物组合使用,因此可以在癌症治疗中用作单一疗法、特别是单一化学疗法。

[0050] “细胞增殖性病症”的称谓指不受生理学控制地导致细胞的新的异常生长或异常细胞的生长的病症。这可导致非结构化团块,即肿瘤。在一个实施方案中,细胞增殖性病症是肿瘤和/或癌症。本发明的组合物可用于治疗细胞增殖性疾病,包括但不限于原发性肿瘤、转移瘤和癌前状况(癌前阶段)。

[0051] 癌症可以包括但不限于:脾癌、结肠直肠和/或结肠癌、结肠癌、卵巢瘤、卵巢癌、子宫内膜癌、乳癌、子宫癌、肺癌、胃癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、骨癌、甲状腺癌、皮肤癌如黑素瘤、肉瘤、卡波西肉瘤、脑癌如神经胶质瘤、成神经管细胞

瘤或神经母细胞瘤、血癌如淋巴瘤和白血病、肌瘤和头颈癌。在一个实施方案中,癌症选自肺癌、乳癌、结肠癌或脑癌(特别是成胶质细胞瘤)。在进一步的实施方案中,癌症是脑癌,特别是选自神经胶质瘤(例如多形性恶性胶质瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、脑干神经胶质瘤)、颅咽管瘤、成血管细胞瘤、恶性脑膜瘤、松果体区肿瘤和前庭神经鞘瘤的脑癌。在仍然进一步的实施方案中,脑癌是神经胶质瘤,特别是成胶质细胞瘤。

[0052] 本发明可特别用于治疗具有RAS突变、例如KRAS、NRAS或HRAS突变、特别是KRAS突变的癌症/肿瘤。已经证明这类突变在肿瘤细胞中引起氧化应激,后者导致高水平的ROS,例如参见Shaw等人,(2011)PNAS108(21):8773-8778。如本文所述,由5个原子组成的AQCs在包含高水平ROS的细胞中是有效的。因此,在一个实施方案中,细胞增殖性病症(例如癌症和/或肿瘤)包含RAS突变。在进一步的实施方案中,RAS突变选自KRAS、NRAS或HRAS突变,特别是KRAS突变。应当理解,这类癌症/肿瘤也可以称为RAS突变型癌症,例如KRAS、HRAS或NRAS突变型癌症或肿瘤。在仍然进一步的实施方案中,RAS突变是激活突变,即,突变引起RAS蛋白的活性增加或组成型活性。需要指出,根据本发明的AQCs的作用机制,组合物可用于治疗RAS突变型癌细胞,不管突变如何。这与目前的疗法相反,目前的疗法是对RAS基因(特别是KRAS基因)的特定突变特异性的。

[0053] 蛋白质的RAS家族是GTP酶,后者将GTP水解成GDP,从而允许激活多个下游信号传导途径。例如,已经证明KRAS参与有丝分裂原活化激酶途径。KRAS中的常见突变降低了其固有的GTP酶功能,阻止了GTP水解成GDP,从而将KRAS锁定在其活性状态。这导致可驱动肿瘤发生的下游信号通路的组成型活化。

[0054] 多种RAS突变是本领域已知的,并且KRAS突变是人类癌症中最常见的致癌突变。如果癌症中的一个或多个细胞包含RAS突变,则癌症包含RAS突变。可以通过本领域已知的方法、例如PCR、核酸测序、等位基因特异性PCR方法、单链构象多态性分析、熔解曲线分析、探针杂交、焦磷酸测序(即核苷酸延伸测序)、基因分型和其它测序方法鉴别具有RAS突变的个体(例如参见Anderson(2011)Expert Rev Mol Diagn.11(6):635-642和Ogino等人,(2005)J.Mol.Diagn.7:413-421)。如本文所示,包含5个原子的AQCs对A549细胞系具有毒性作用,已经证明A549细胞系包含KRAS突变(例如KRAS G12S,其中位置12处的甘氨酸残基被突变)。而且,与对照细胞相比,包含HRAS突变(HRasV12,其中位置12处的缬氨酸残基的突变被突变)的细胞对包含5个原子的AQCs的毒性作用更敏感。

[0055] 据估计,所有人类癌症中的30%携带RAS突变。例如,据信88%的胰管腺癌、52%的结肠直肠癌、43%的多发性骨髓瘤、32%的肺腺癌、28%的黑素瘤、25%的子宫内膜癌、13%的甲状腺癌、12%的胃癌、11%的急性髓性白血病、11%的膀胱癌、6%的头颈鳞状细胞癌和2%的乳癌带有RAS突变(数据由Cancer Cell Line Encyclopedia(CCLE);the International Cancer Genome Consortium(ICGC);和The Cancer Genome Atlas Data Portal(TCGA)编辑)。因此,在一个实施方案中,细胞增殖性病症(特别是具有RAS突变的细胞增殖性病症)选自胰癌、结肠直肠癌、血癌、肺癌、皮肤癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌、头颈癌或乳癌。在进一步的实施方案中,细胞增殖性病症(特别是具有RAS突变的细胞增殖性病症)选自胰癌、结肠直肠癌、血癌、肺癌、皮肤癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌或头颈癌。

[0056] 在一个实施方案中,细胞增殖性病症是胰癌,例如胰管腺癌,特别是RAS突变型胰

癌,例如RAS突变型胰管腺癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是结肠直肠癌,特别是RAS突变型结肠直肠癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是血癌,例如多发性骨髓瘤或急性髓性白血病,特别是RAS突变型血癌,例如RAS突变型多发性骨髓瘤或RAS突变型急性髓性白血病。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是肺癌,例如非小细胞肺癌,例如肺腺癌,特别是RAS突变型肺癌,例如RAS突变型非小细胞肺癌,例如RAS突变型肺腺癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是皮肤癌,例如黑素瘤,特别是RAS突变型皮肤癌,例如RAS突变型黑素瘤。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是子宫内膜癌,特别是RAS突变型子宫内膜癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是甲状腺癌,特别是RAS突变型甲状腺癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是胃癌,特别是RAS突变型胃癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是膀胱癌,特别是RAS突变型膀胱癌。在供选的实施方案中,细胞增殖性病症是头颈癌,例如头颈鳞状细胞癌,特别是RAS突变型头颈癌,例如RAS突变型头颈鳞状细胞癌。

[0057] 本发明可特别用于治疗具有低药物可达性的癌症,例如具有低水平血管分布的大肿瘤或通过血脑屏障与循环系统分开的脑肿瘤。这归因于仅由5个原子组成的治疗性AQCs的中性电荷和小尺寸,允许它们到达肿瘤或癌症中传统抗肿瘤药物不易到达的区域。本文提供的证据显示了由5个原子组成的AQCs能够渗透到多细胞肿瘤球体的中心低氧区。

[0058] 预防和治疗癌症的转移是癌症治疗中预防继发性癌症和复发的关键部分。已经令人惊讶地发现,本发明的组合物具有治疗癌症转移以及原发性肿瘤的另外的有益作用(图14)。因此,根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物(特别是包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物),其用于预防和/或治疗转移、例如淋巴结转移,特别是治疗和/或预防肺癌转移。根据本发明的另一个方面,提供了如本文所述的组合物,其用于预防和/或治疗癌症的淋巴结转移。

[0059] 在进一步的实施方案中,淋巴结是纵隔结。所述纵隔结是位于身体胸腔中的一组淋巴结。

[0060] 组合疗法

[0061] 本文所述的组合物可以与由3个零价过渡金属原子组成的AQCs组合使用。已经发现,由3个零价过渡金属原子组成的AQCs的尺寸使得它们能够插入DNA中并导致染色质解压缩。因此,这可以用于增加经处理细胞对放射的敏感性和提高放射疗法的有效性。

[0062] 在一个实施方案中,组合物(即包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs)和由3个零价过渡金属原子组成的AQCs同时施用。在该实施方案中,两种药物同时或基本同时施用。它们也可以通过相同途径和任选地在相同组合物中施用。或者,它们可以通过不同的途径(即分开)、但同时或基本上同时施用。

[0063] 在供选的实施方案中,组合物和由3个零价过渡金属原子组成的AQCs是依次施用的。在该实施方案中,两种药物在不同时间施用,从而药物之一在第二种药物之前施用。例如,组合物可以在由3个零价过渡金属原子组成的AQCs之前或之后施用。它们可以通过相同或不同的途径施用。

[0064] 根据本发明的另一方面,提供了用于治疗细胞增殖性疾病的组合物,其包含与放射疗法组合的由3个和5个零价过渡金属原子组成的AQCs。在一个实施方案中,组合物由如下的AQCs组成:所述AQCs由2至5个零价过渡金属原子组成。在进一步的实施方案中,组合物

基本上由如下的AQCs组成:由3个和5个零价过渡金属原子组成的AQCs。

[0065] 本发明人已经惊奇地发现:由5个原子组成的AQCs对硫醇氧化具有催化作用,导致细胞死亡。因此,这些AQCs可以自身用作癌症疗法,因此在一个实施方案中,本文所述的组合物不包括另外的抗肿瘤药物。

[0066] 在一个实施方案中,本发明的组合物可以包括另外的治疗剂或者可以与另外的治疗剂组合使用。这类治疗剂可以是与癌症疗法结合使用的活性剂,例如用作姑息治疗以改善不期望的副作用的治疗剂。因此,在一个实施方案中,另外的治疗剂是用作姑息治疗的治疗剂。在进一步的实施方案中,姑息治疗选自:止吐药、意欲缓解疼痛的药物如阿片样物质、用于降低高血尿酸水平的药物如别嘌醇或拉布立酶(rasburicase)、抗抑郁药、镇静药、抗惊厥药、缓泻药、止泻药和/或抗酸药。

[0067] 在一个实施方案中,所述另外的治疗剂不是抗肿瘤药。在供选的实施方案中,所述另外的治疗剂是抗肿瘤剂。在一个实施方案中,抗肿瘤剂选自:烷化剂(例如氮芥类似物、亚硝基脲、烷基磺酸盐、含铂化合物、乙烯亚胺和咪唑并四嗪)、细胞毒性抗生素(例如蒽环霉素、放线菌素)、植物生物碱和其它天然产物(例如喜树碱衍生物、表鬼臼毒素、紫杉烷和长春花生物碱)、抗代谢物(例如胞苷类似物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、脲衍生物)和用于靶向疗法的药物(例如激酶抑制剂和单克隆抗体)。

[0068] 在一个实施方案中,组合物和另外的治疗剂同时施用。在该实施方案中,两种药物同时或基本同时施用。它们也可以通过相同途径和任选地在相同组合物中施用。或者,它们可以通过不同途径(即分开)、但同时或基本上同时施用。

[0069] 在供选的实施方案中,组合物和另外的治疗剂是依次施用的。在该实施方案中,两种药物在不同时间施用,从而药物之一在第二种药物之前施用。它们可以通过相同或不同的途径施用。

[0070] 在一个实施方案中,组合物在施用另外的治疗剂之前施用。在供选的实施方案中,组合物在另外的治疗剂之后施用。

[0071] 放射疗法

[0072] 放射疗法(还称为放疗法)使用高剂量的放射来损伤细胞DNA和因此杀死癌细胞和缩小肿瘤。这种疗法可以是外部射束的形式或者作为内放射疗法。放射疗法的选择可取决于癌症类型、肿瘤尺寸、肿瘤位置以及其它因素如患者的年龄、一般健康和医疗史以及所使用的其它类型的癌症治疗。

[0073] 放射疗法在世界范围内被施用到所有癌症的超过50%,在发展中和中等收入国家中特别重要。然而,放射疗法的有效性受到各种因素的限制,包括对健康周围组织的损伤、邻近器官的接近和产生放射抗性的肿瘤。因此,对于改善放射疗法功效的治疗剂存在显著未满足的需要。

[0074] 对癌细胞应用放射疗法导致ROS产生增加。如本文提供的证据所示,由5个原子组成的AQCs的作用在ROS的存在下增强。因此,本发明的组合物特别适合用作增强放射疗法有效性的治疗剂。

[0075] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物,其与放射疗法组合用于治疗细胞增殖性病症如癌症。

[0076] 放射疗法(还称为放疗法)使用高剂量的放射来损伤细胞DNA和因此杀死癌细胞和

缩小肿瘤。这种疗法可以是外部射束的形式或者作为内放射疗法。放射疗法的选择可取决于癌症类型、肿瘤尺寸、肿瘤位置以及其它因素如患者的年龄、一般健康和医疗史以及所使用的其它类型的癌症治疗。

[0077] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物作为放射疗法增敏剂的用途。根据本发明的另一个方面,提供了本文所述的组合物作为用于增殖性细胞的放射疗法增敏剂的用途。应当理解,术语“放射疗法增敏剂”,也称为“放射增敏剂”,指用于增强/增加放射疗法的细胞毒性作用的药物。受放射疗法影响的癌症或肿瘤称为“放射敏感的”。

[0078] 根据另一方面,本发明提供了用作非增殖性细胞的放射疗法脱敏剂的包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物。

[0079] 包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物可用于保护非增殖(例如非分裂)细胞免受放射疗法。应当理解,术语“放射疗法脱敏剂”,也称为"放射脱敏剂",指用于降低/减少放射疗法的细胞毒性作用的药物。

[0080] 因此,本发明的组合物当与放射疗法组合使用时是特别有利的,因为它们具有增强放射疗法对增殖性细胞(即癌细胞)的作用、同时还保护非增殖性细胞(即非患病细胞)免受有害放射的双重作用。

[0081] “增殖”的称谓是本领域技术人员理解的。如本文使用的“增殖性细胞”指经历细胞增殖如细胞生长和分裂的细胞。特别地,本发明用于靶向具有快速、异常和/或不受控制的细胞增殖的癌细胞。在一个实施方案中,增殖性细胞是个体中的癌细胞、癌前细胞或其它异常的快速分裂细胞。而且,如本文使用的“非增殖性细胞”指不进行细胞增殖的细胞。这些细胞也可以描述为“静止的”、“停滞的”、“静息的”、“非分裂的”、“非循环的”或“G_0细胞”。在一个实施方案中,非增殖性细胞是非癌性细胞。

[0082] 放射疗法可以是外部射束的形式或作为内放射疗法。

[0083] 在一个实施方案中,放射疗法包括外部射束照射。外部射束放射疗法使用在患者外部的放射源,通常是放射性同位素,例如钴-60(60Co)、铯-137(137Cs),或者是高能X射线源,例如线性加速器(LINAC)。外部源产生指向患者体内到达肿瘤部位的准直射束。通过将外部放射束以各种"扫描架"角度投影到患者体内,使得射束集中在肿瘤部位上,可以减小健康组织照射的不利作用,同时保持在肿瘤组织中有给定剂量的放射。

[0084] 外部放射疗法治疗的实例包括但不限于适形放射疗法、调强放射疗法(IMRT)、图像引导放射疗法(IGRT)、4维放射疗法(4D-RT)、立体定向放射疗法和放射外科、质子疗法、电子束放射疗法和适应性放射疗法。

[0085] 在供选的实施方案中,放射疗法包括内放射疗法。在该实施方案中,将放射性药物物质施用于患者并安置在待治疗区域。在一个实施方案中,放射性药物物质包括发出放射线的放射性同位素。放射性同位素是本领域技术人员熟知的,可以包括金属或非金属放射性同位素。

[0086] 适宜的金属放射性同位素包括但不限于:锕-225、锑-124、锑-125、砷-74、钡-103、钡-140、铍-7、铋-206、铋-207、铋-212、铋-213、镉-109、镉-115m、钙-45、铈-139、铈-141、铈-144、铯-137、铬-51、钴-55、钴-56、钴-57、钴-58、钴-60、钴-64、铜-60、铜-62、铜-64、铜-67、铒-169、铕-152、镓-64、镓-67、镓-68、钆-153、钆-157、金-195、金-199、铪-175、铪-175-181、钬-166、铟-110、铟-111、铱-192、铁-55、铁-59、氪-85、铅-203、铅-210、镥-177、锰-54、

汞-197、汞-203、钼-99、钕-147、镎-237、镍-63、铌-95、锇-185+191、钯-103、钯-109、铂-195m、镨-143、钷-147、钷-149、镁-233、镭-226、铼-186、铼-188、铑-86、钌-97、钌-103、钌-105、钌-106、钐-153、钪-44、钪-46、钪-47、硒-75、银-10m、银-111、钠-22、锶-85、锶-89、锶-90、硫-35、钽-182、锝-99m、碲-125、碲-132、铊-204、钍-228、钍-232、铊-170、锡-113、锡-114、锡-117m、钛-44、钨-185、钒-48、钒-49、镱-169、钇-86、钇-88、钇-90、钇-91、锌-65、锆-89和锆-95。

[0087] 适宜的非金属放射性同位素包括但不限于:碘-131、碘-125、碘-123、磷-32、砹-211、氟-18、碳-11、氧-15、溴-76和氮-13。

[0088] 适用于本发明的放射类型可以变化。在一个实施方案中,放射疗法包括电磁辐射或粒子辐射。电磁辐射包括但不限于X射线和γ射线。粒子辐射包括但不限于电子束(β粒子)、α粒子、质子束、中子束和负π介子。

[0089] 在一个实施方案中,放射疗法包括近程放射疗法。在近程放射疗法中,放射源被直接安置在癌症或肿瘤部位。这具有如下优点:照射仅影响非常局部的区域,从而使健康组织的放射暴露最小。而且,这允许用非常高剂量的局部放射来治疗肿瘤,同时降低了对周围健康组织的不必要损伤的可能性。

[0090] 在一个实施方案中,近程放射疗法包括腔内治疗或间质治疗。腔内治疗包括将容纳放射源的容器放置到其中存在肿瘤或接近肿瘤存在处的体腔中。间质治疗包括将容纳放射源的容器直接放置到肿瘤或身体组织内。这些放射源可以长久地留在患者体内。最通常地,放射源在数天后从患者体内取出。容器可以包括针、籽粒(seeds)、线或导管。

[0091] 在一个实施方案中,放射疗法包括全身放射性同位素疗法。在全身放射性同位素疗法中,通过输注或摄入来递送包含放射性同位素的放射性药物物质。所施用的放射性同位素由于同位素的化学性质可以是靶向的,例如放射性碘优先被甲状腺吸收。靶向也可以通过将放射性同位素缀合至靶向部分、例如结合靶组织的分子或抗体来实现。在一个实施方案中,放射性药物物质包括放射性缀合物。在进一步的实施方案中,放射性缀合物是放射标记的抗体。

[0092] 在一个实施方案中,放射性药物物质通过口服、肠胃外、腹膜内、静脉内、动脉内、透皮、舌下、肌内、直肠、经颊、鼻内、经由吸入、阴道、眼内、局部、皮下、脂肪内、关节内或鞘内施用。在一个实施方案中,放射性药物物质是缓释剂型。

[0093] 放射疗法的选择可取决于癌症类型、肿瘤尺寸、肿瘤位置和其它因素如患者的年龄、一般健康和医疗史以及所使用的其它类型的癌症治疗。

[0094] 在一个实施方案中,同时应用组合物和放射疗法。在供选的实施方案中,组合物和放射疗法依次应用,优选其中组合物在放射疗法之前应用。如果药物是分开施用的,则放射疗法可以在组合物仍然有效时施用,即,组合物和放射疗法在施用给患者时将发挥协同作用或至少是组合作用的时间框内施用。在一个实施方案中,组合物在放射疗法之前不超过6小时施用,例如在放射疗法之前1至6小时之间施用。在进一步的实施方案中,组合物在放射疗法之前约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时或约1小时施用。

[0095] 在一个实施方案中,组合物和放射疗法的治疗作用是协同的。在一个实施方案中,组合物使患者中的癌细胞对放射疗法敏感。

[0096] 在一个实施方案中,与单独治疗病症的放射疗法的功效相比,本发明的组合物能

够使放射疗法的功效提高至少两倍,例如三倍、四倍、五倍或更多倍。

[0097] 药物组合物

[0098] 根据本发明的一个方面,提供了包含如本文所述的组合物的药物组合物。

[0099] 组合物和组合(当合适时)可以配制成任选地包含可药用赋形剂、稀释剂或载体的药物组合物。载体、稀释剂和/或赋形剂在与组合物的其它成分相容并且对其接受者无害的意义上来说必须是"可接受的"。

[0100] 可药用载体的实例可以包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。适宜的药物载体、赋形剂或稀释剂记载在E.W.Martin的"Remington'sPharmaceutical Sciences"中。可药用载体可以进一步包含少量的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,它们增加本发明的组合物的架存期或有效性。药物组合物还可以包括抗粘剂、粘合剂、包衣、崩解剂、矫味剂、着色剂、润滑剂、吸附剂、防腐剂、甜味剂、冻干赋形剂(包括冻干保护剂)或压制助剂。

[0101] 本发明的药物组合物可以以多种药物施用形式进行施用,例如固体(例如片剂、丸剂、胶囊、颗粒剂等)或液体(例如溶液、混悬剂、糖浆剂、软膏剂、乳膏剂、凝胶剂或乳剂)。

[0102] 本发明的药物组合物可包含治疗有效量。可施用于个体的治疗有效量(即,产生帮助缓和或治愈待治疗病症的作用的量)将取决于多种因素,例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及药物组合物在个体中引起期望响应的能力。治疗有效量也是其中治疗有益效果超过本发明的药物组合物的任何毒性或有害作用的量。

[0103] 在一个实施方案中,AQCs存在于水性溶液中。在进一步的实施方案中,所述水性溶液包含溶解的氧,例如是存在于混合物中的AQCs的浓度(特别是包含5个零价过渡金属原子的AQCs的浓度)至少2倍或至少3倍。

[0104] 在一个实施方案中,组合物通过任意适宜的递送方式施用(或配制成用于通过任意适宜的递送方式的施用),例如静脉内、动脉内、心内、皮内、皮下、透皮、腹膜内、肌内、口服、舌上、舌下、经颊、直肠内或通过灌肠。

[0105] 本发明的组合物可以直接施用于靶部位(即,肿瘤部位)或全身施用(即,进入循环系统)。靶向施用的优点是将组合物的治疗效果集中在待治疗癌症或肿瘤上。这类施用还使得副作用最小。然而,本发明的组合物也适合于全身施用,因为作用模式确保了细胞凋亡仅发生在具有高水平ROS的细胞中。ROS水平在增殖性细胞如癌性细胞中是高的。但是,在正常的非增殖性细胞中,ROS的水平是相对低的,因此由5个原子组成的AQCs对正常细胞的作用较小,这有助于使不良副作用最小。

[0106] 在一个实施方案中,组合物是经口、静脉内或皮下施用的。在进一步的实施方案中,组合物是口服施用的。本发明组合物的优点是:它们可以相对快速地耗尽,因此可以使任何副作用最小,因为AQCs不会在体内存留延长的时间。

[0107] 局部应用也是可能的(例如,用于治疗黑素瘤)。局部应用的具体形式在于将组合物引入载体系统、特别是药物递送系统中和将所述载体系统植入癌性组织在,其中所述载体系统然后在癌性组织的部位特异性地释放所述组合物。通过这种方式可以避免副作用、如在全身施用时可能发生的副作用,即,减少对身体的总体负担。

[0108] 用途

[0109] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物用于治疗细胞增殖性病症的

用途。

[0110] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物用于治疗和/或预防癌症转移的用途。在一个实施方案中,组合物用于治疗和/或预防癌症的淋巴结转移。在进一步的实施方案中,组合物用于治疗和/或预防肺癌转移。

[0111] 根据本发明的一个方面,提供了包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物作为用于增殖性细胞的放射疗法增敏剂的用途。所述物质可以用于治疗细胞增殖性病症。

[0112] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物与放射疗法组合用于治疗细胞增殖性病症的用途。

[0113] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物在制造/制备用于增殖性细胞的放射疗法增敏剂中的用途。

[0114] 根据本发明的一个方面,提供了包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物作为用于非增殖性细胞的放射疗法脱敏剂的用途。

[0115] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物在制备用于治疗细胞增殖性病症的药物组合物中的用途。

[0116] 根据本发明的一个方面,提供了如本文所述的组合物在制备用于治疗细胞增殖性病症的药物中的用途。

[0117] 原子量子簇(AQCs)

[0118] 本文所述的AQCs是稳定的,即,它们随时间推移保留原子的数量并因此保留它们的性质,以便它们可以像任何其它化学化合物那样被分离和操作。AQCs可以保存数月、甚至数年,而不需要外部稳定剂。

[0119] 在一个实施方案中,金属原子选自银(Ag)、金(Au)、铜(Cu)、铂(Pt)、铁(Fe)、铬(Cr)、钯(Pd)、镍(Ni)、铑(Rh)、铅(Pb)、铱(Ir)、钌(Ru)、锇(Os)、钴(Co)、钛(Ti)、钒(V)或其任意组合。在进一步的实施方案中,金属原子选自Ag、Au、Cu、Pt或其任何组合。在进一步的实施方案中,金属原子选自Ag、Cu或Pt。在还进一步的实施方案中,金属原子是Ag。

[0120] AQCs的混合物可以通过本领域已知的多种方法合成,例如EP1914196中描述的那些,该文献通过援引并入本文。

[0121] 混合物也可以使用本文实施例1中所述的方法合成。更具体地,提供了合成银AQCs的方法,其包括在三电极电化学电池中实施该方法,所述三电极电化学电池包括作为参比电极的氢电极和作为对和工作电极的两个银电极,其中银电极包含大于5cm^2、例如大于10cm^2、例如约17cm^2的表面积。通过应用稳定递增的电流约5小时(300分钟)可以获得5个原子的簇。例如,递增的电流可以包括:步骤(i)约200-300μA(例如约250μA)的电流,步骤(ii)约430-530μA(例如约480μA)的电流,步骤(iii)约800-1200μA(例如约1000μA/1mA)的电流,步骤(iv)约2000-2400μA(例如约2200μA/2.2mA)的电流,和/或步骤(v)约3800-4200μA(例如约4000μA/4mA)的电流,或步骤(i)-(v)的任意组合。在一个实施方案中,每个步骤进行至少30分钟,例如约1小时。银电极可以在合成之前和/或期间进行抛光,例如用砂纸和/或氧化铝进行抛光。该方法可以在纯化的脱气水、例如脱气的MilliQ水中进行。任选地,任何过量的Ag+离子可以通过加入NaCl和随后沉淀和过滤而除去。

[0122] 本文使用的AQCs的称谓包括水合物形式的那些,即,它们具有经由非共价键连接

到簇上的水分子。

[0123] 如本文所述,增加硫氧化的机理是由5个金属原子组成的AQCs所特有的,因为这些簇的尺寸使得硫原子和ROS之间能够相互作用。因此,不受理论的约束,应当理解,本发明的组合物不需要完全不含由其它尺寸的簇(例如包含少于和/或多于5个金属原子的簇)组成的AQCs。在一个实施方案中,组合物包含大于约50%、例如大于约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约99%的由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。特别地,组合物中存在的AQCs有大于约95%由5个零价过渡金属原子组成。在一个实施方案中,组合物基本上由如下的AQCs组成:由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。在进一步的实施方案中,组合物由如下的AQCs组成:由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。

[0124] 在本发明的一个实施方案中,组合物基本上不含由多于5个零价过渡金属原子组成的AQCs,例如组合物可以含有少于约10mol%(基于组合物的总AQC含量的摩尔百分比)、例如少于约7mol%、少于约5mol%、少于约2mol%、少于约1mol%或者少于约0.5mol%的由多于5个零价过渡金属原子组成的AQCs。

[0125] 在本发明的一个实施方案中,组合物基本上不含由少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs,例如组合物可以含有少于约10mol%(基于组合物的总AQC含量的摩尔百分比)、例如少于约7mol%、少于约5mol%、少于约2mol%、少于约1mol%或者少于约0.5mol%的由少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs。由少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs包括由2、3或4个零价过渡金属原子组成的AQCs。

[0126] 在一个实施方案中,组合物基本上不含金属离子。在AQCs合成期间,金属离子经常是副产物。这些可以使用例如NaCl除去。应当理解,金属离子的称谓是就AQCs中所含的过渡金属的离子而言的。

[0127] 在一个实施方案中,组合物含有小于约20mol%、例如小于约15mol%、10mol%、5mol%、2mol%、1mol%或0.5mol%的金属离子(即,用于合成AQCs的过渡金属的游离离子)。

[0128] 根据本发明的进一步的方面,提供了包含由2至5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物,其基本上不含(即少于20%、15%、10%、5%、2%、1%的)由多于5个零价过渡金属原子组成的AQCs和/或金属离子。根据本发明的进一步的方面,提供了包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物,其基本上不含(即少于20%、15%、10%、5%、2%、1%的)由多于5个零价过渡金属原子和/或少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs和/或金属离子。

[0129] 纯化组合物以除去由多于或少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs的方法是本领域已知的。例如,如Porto等人(2018)Adv Mater.30(33):e1801317中中所述。这类方法可以包括:(i)将包含AQCs的混合物的溶液应用于分离介质,其中所述分离介质结合或不结合由多于5个零价过渡金属原子组成的AQCs;和(ii)分离出由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。

[0130] 在一个实施方案中,分离介质用于色谱方法中。色谱法是用于通过使包含混合物的流动相通过固定相(例如包含本文所述的分离介质)来分离混合物的方法。基于流动相的成分如何与固定相相互作用来分离混合物。应当理解,级分是保留还是丢弃将取决于含量和是否存在5个零价过渡金属原子。例如,如果分离介质保留由多于5个零价过渡金属原子

组成的AQCs,则收集洗脱液(其包含由5个或更少的零价过渡金属原子组成的AQCs)。或者,如果分离介质保留由5个零价过渡金属原子组成的AQCs,则丢弃洗脱液(其包含由多于和/或少于5个零价过渡金属原子组成的AQCs)。在一个实施方案中,分离介质存在于色谱柱中。这类色谱柱是市售可获得的。

[0131] 分离介质可以包含例如与特定尺寸的AQCs结合的官能团,例如与由多于3个零价过渡金属原子组成的AQCs结合的巯基。或者,官能团可以包含芳族基团,例如环状或多环芳族基团。分离介质还可以包含例如基本上是双链的脱氧核糖核酸(DNA)。已经发现,三个金属原子的簇通过嵌入与DNA相互作用,这严格地取决于簇中的原子数目并且不依赖于双螺旋的碱基对(GC的AT)的类型。因此,DNA可用于分离由3个零价过渡金属原子组成的AQCs。

[0132] 在一个实施方案中,分离介质用于透析方法中。透析是一种基于分子通过半透膜的扩散速率来分离分子的方法。例如,可以将包含AQCs的混合物的溶液应用到分离介质,然后放置在透析装置(例如透析盒或透析管)中。这类透析盒、管或装置是市售可获得的。可以选择透析膜,其中可以根据分离的需要(例如根据分离介质中使用的DNA的分子量)选择分子量截止值。

[0133] 应当理解,本文公开的一种或多种纯化方法可以组合进行和/或重复一次或多次。多次进行纯化方法可以增加样品的纯化和允许实现期望的纯化。

[0134] 治疗方法

[0135] 根据本发明的一个方面,提供了预防和/或治疗细胞增殖性病症的方法,该方法包括给需要其的患者施用治疗有效量的包含由5个零价过渡金属原子组成的原子量子簇(AQCs)的组合物。在一个实施方案中,所述方法不包括用另外的抗肿瘤药治疗患者。

[0136] 根据本发明的一个方面,提供了预防和/或治疗细胞增殖性病症的方法,该方法包括给需要其的患者施用治疗有效量的本文所述的组合物。

[0137] 根据本发明的一个方面,提供了治疗患有细胞增殖性病症的患者的方法,该方法包括施用如本文所述的组合物。上文所述的组合物的实施方案可以应用于所述治疗方法(例如施用时间和方式、组合物的配制等)。

[0138] 根据本发明的一个方面,提供了预防和/或治疗癌症转移的方法,该方法包括施用如本文所述的组合物。在一个实施方案中,所述方法预防和/或治疗癌症的淋巴结转移。在进一步的实施方案中,所述方法预防和/或治疗肺癌转移。

[0139] 在一个实施方案中,本文所述的治疗方法另外包括用放射疗法治疗患者,例如在施用组合物之后用放射疗法治疗患者。如上所述,本发明的组合物可特别用作放射疗法增敏剂。

[0140] 在一个实施方案中,组合物经口服、静脉内或皮下施用。

[0141] 在一个实施方案中,组合物与放射疗法同时或在放射疗法之前施用。

[0142] 在一个实施方案中,所述方法另外包括施用治疗有效量的包含由3个零价过渡金属原子组成的AQCs的组合物。在一个实施方案中,包含由3个零价过渡金属原子组成的AQCs的组合物与包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs的组合物同时或依次施用。

[0143] 患者可以是患有病症的任何个体。在一个实施方案中,患者是哺乳动物。在进一步的实施方案中,哺乳动物选自人或小鼠。

[0144] 在一个实施方案中,组合物和放射疗法的治疗作用是协同的。在一个实施方案中,

组合物使患者的癌细胞对放射疗法敏感。

[0145] 所述方法包括施用治疗有效量的放射。放射疗法中使用的放射量以Gray(Gy)单位测量,并且根据所治疗癌症的类型和阶段而变化。此外,为了使不利副作用最小化,可以将放射总剂量分为历经数天时间段的多个称为“部分”的较小剂量。成人的典型分级方案是每天1.8至2Gy,每周五天。儿童的典型分级方案是每天1.5至1.8Gy,每周五天。

[0146] 在一个实施方案中,给需要其的患者施用总共至少约10Gy,例如15Gy、20Gy、25Gy、30Gy、35Gy、40Gy、45Gy、50Gy、55Gy、60Gy、65Gy、70Gy、75Gy、80G、85Gy、90Gy、95Gy或100Gy。患者可以每周接受放射三次、四次或五次。根据癌症类型和治疗目的,整个治疗过程可持续一至七周。在一个实施方案中,放射疗法历经至少2、3或4周的时间段发生,例如2-6周、例如2-4周或5-8周,特别是5-7周的时间段。例如,患者可以历经约30天(即4-5周)接受2Gy/天的剂量。

[0147] 在一个实施方案中,每周连续五天每天至少一次施用放射。例如,每天至少一次以至少约2Gy部分施用放射。在一个实施方案中,每隔一天施用放射,每周三次。例如,每隔一天以10Gy部分施用放射,每周三次。

[0148] 在一个实施方案中,放射疗法是低分割的(hypofractionated)。低分割是在较少的就诊中递送较高放射剂量的治疗方案。在供选的实施方案中,放射疗法是高分割的(hyperfractionated)。高分割是将总剂量分成更多次递送的治疗方案。应当理解,当选择剂量时考虑多个其它因素,包括患者是否接受化疗、患者并存病、放射疗法在手术之前或之后施用、以及手术成功的程度。

[0149] 根据另一个方面,本发明提供了在接受放射疗法的患者中防止非增殖性细胞损伤的方法,该方法包括在放射疗法之前给所述患者施用治疗有效量的包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs的组合物。

[0150] 根据本发明的一个方面,提供了治疗转移、例如淋巴结转移的方法,该方法包括给需要其的患者施用治疗有效量的包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs的组合物与放射疗法的组合。

[0151] 药盒

[0152] 根据本发明的一个方面,提供了成套药盒,其包含:如本文所述的组合物,任选地与可药用助剂、稀释剂或载体混合。本发明的这一方面的药盒可用于治疗细胞增殖性病症。

[0153] 在一个实施方案中,药盒可以与放射疗法组合使用,用于治疗细胞增殖性病症。

[0154] 其它方面

[0155] 根据本发明的一个方面,提供了细胞凋亡剂,其包含由5个零价过渡金属原子组成的AQCs。细胞凋亡剂可以包含如本文所述的组合物。

[0156] 根据本发明的另一个方面,提供了诱导硫醇氧化的方法,该方法包括施用如本文所述的组合物,任选地与活性氧类别(ROS)组合。如本文所述,由5个原子组成的AQCs在细胞中存在的ROS与蛋白质的半胱氨酸残基中的硫原子之间提供了催化桥。因此,本发明的组合物可用于增强硫醇氧化。ROS的添加将取决于靶是否已经含有ROS。

[0157] 本发明人还提供了由5个原子组成的AQCs具有强杀菌作用的证据。因此,根据本发明的另一个方面,提供了如本文所述的组合物,用于治疗由细菌引起的疾病。

[0158] 在此,在以下非限制性实施例中举例说明了本发明。

[0159] 缩写

[0160] 本文所用的所有单位应当用它们在本领域已知的标准定义来理解(另有说明除外)。

[0161] A549 人肺腺癌细胞系

[0162] Ag 银

[0163] Ag5 5个银原子

[0164] AQC 原子量子簇

[0165] ATCC 美国典型培养物保藏中心

[0166] BBB 血脑屏障

[0167] B-CLL B-慢性淋巴细胞白血病

[0168] CDDP 顺铂

[0169] Cul3 Cullin 3

[0170] Cys 半胱氨酸

[0171] DAPI 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚

[0172] DHE 二氢乙锭

[0173] DMEM Dulbecco's改良的Eagle培养基

[0174] DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT 二硫苏糖醇

[0175] FBS 胎牛血清

[0176] GBM 多形性恶性胶质瘤

[0177] GPx 谷胱甘肽过氧化物酶

[0178] GRX1 谷氧还蛋白1

[0179] GSH 谷胱甘肽

[0180] GSSG 谷胱甘肽二硫化物

[0181] H_2O_2 过氧化氢

[0182] HCT116 人结肠直肠癌细胞系

[0183] HEK293 人胚肾293细胞系

[0184] HMOX1 血红素加氧酶-1

[0185] Keap1 Kelch-样ECH相关蛋白1

[0186] Luc 北美荧光虫荧光素酶基因

[0187] MCF7 人乳腺癌细胞系

[0188] MCTS 多细胞肿瘤球体

[0189] MEC-1 人B-慢性淋巴细胞白血病细胞系

[0190] MM.1S 人多发性骨髓瘤细胞系

[0191] MRE 金属响应元件

[0192] MT 金属硫蛋白

[0193] MTT 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物

[0194] MTF-1 金属响应转录因子1(MTF-1

[0195] NaCl 氯化钠

[0196] NAD(P)H 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

[0197] Neh Nrf2-ECH同源结构域

[0198] NEM N-乙基马来酰亚胺

[0199] NQO-1 NAD(P)H醌氧化还原酶

[0200] Nrf2 核因子(红细胞衍生的2)-样2

[0201] O_2 氧气

[0202] PBS 磷酸盐缓冲盐水

[0203] PFA 低聚甲醛

[0204] RL 人非霍奇金淋巴瘤细胞系

[0205] roGFP 氧化还原敏感性绿色荧光蛋白质

[0206] ROS 活性氧类别

[0207] TEM 透射电子显微术

[0208] U87 人多形性恶性胶质瘤细胞系

[0209] XANES X-射线吸收近边结构

[0210] 材料和方法

[0211] 试剂和材料

[0212] 除非另有说明,否则所有试剂均购自Sigma Aldrich,Co.,西班牙。银薄片(99%)购自Goodfellow Cambridge Ltd.,Huntingdon,UK。氧化铝纳米粒(平均粒径≈50nm)和布垫购自Buehler,Düsseldorf,德国。

[0213] 砂纸(1,000砂砾)由Wolfcraft España S.L,马德里,西班牙提供。所有水性溶液均使用采用Millipore(Millipore Ibérica S.A.,马德里,西班牙)的Direct-Q8UV系统的MilliQ-等级水制备的。云母片(V-1级白云母)购自SPI Supplies,West Chester,PA,USA。

[0214] X射线吸收近边结构(XANES)

[0215] 在装配有狭缝为1mm的InSb(111)双晶单色仪的Laboratório Nacional de Luz Síncrotron(LNLS,Campinas,巴西)以de SXS光束线进行S K-边(2470eV)XANES实验,以在S K-边达到约0.5eV的分辨率。以荧光模式记录X射线吸收光谱,对于每个测量边收集来自S Kα1,2(分别在2309.5和2308.4eV)发射线所发射的X射线。吸收实验在10-8毫巴的真空中于室温和在专门设计用于活性氧类别实验的特殊液体样品持样器中于室温和大气压力下进行。根据Vairavamurthy(1998)Spectrochim.Acta.A.Mol.Biomol.Spectrosc.54:2009-2017之前报道的标准,通过将2481.5eV值归属给$Na_2S_2O_3$的最高最大值(对应于所谓的内部球)对光子能量进行了校准。按照别处记载的常规方法,在扣除背景和标准化为边缘后强度之后,获得了最终的XANES光谱。XANES定量采用Athena软件进行,随后用Origin Lab软件进行分析。对于谷胱甘肽的表征,通过滴铸将一部分溶液沉积在碳盘(Ted Pella,Inc)上,以具有可检测值的Ag或S浓度。对于硫氧还蛋白样品,将它们小心地安装在专门设计用于该实验的液体样品持样器中。PBS溶液在所有反应中用作溶剂,与硫氧还蛋白混合,目的是重现相同的细胞内pH和离子强度。羟基自由基溶液通过Fenton反应用H_2O_2和$FeCl_2$制备。

[0216] 细胞系

[0217] 用于开展该工作的细胞系包括:A549(人肺腺癌,DSMZ No:ACC 107)、A549 Luc-C8(Bioware®)、MCF7(人乳腺癌,DSMZ No:ACC 115)、HCT116(人结肠直肠癌,ATCC No:CCL-

247)、HEK293(肾,来自人类胚胎)、U87-luc(人多形性恶性胶质瘤,由Joan Seoane友情提供)、U251-Luc(人成胶质细胞瘤,由Joan Seoane友情提供)、MM.1S(人多发性骨髓瘤,ATCC No:CRL-2974)、RL(人非霍奇金淋巴瘤,ATCC No:CRL-2261)和MEC-1(人B-慢性淋巴细胞白血病,DSMZ,No:ACC 497)。A549、A549-Luc、MCF7、U87-Luc和HCT116都来源于实体肿瘤并作为单层粘附生长,而MM.1S、RL和MEC-1都来源于恶性血液病并悬浮生长。A549、A549-Luc、U251-Luc和HEK293细胞系保持在低葡萄糖DMEM(D6046,Sigma)中;MCF7和U87-Luc细胞系保持在高葡萄糖DMEM(D5671,Sigma)中;HCT116、MM.1S和RL保持在Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640培养基(R-5886,Sigma)中,MEC-1细胞系保持在DMEM/Nutrient Mixture F-12Ham混合物1:1中。培养基补充有10%胎牛血清和1%(v/v)L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素(Gibco)。改良的细胞系(A549-Luc和U87-Luc)补充有嘌罗霉素(puromycin)(对于A549-Luc为1.3μg/ml,对于U87-Luc为5μg/ml)以选择稳定转染的细胞。将所有细胞系在5% CO_2和95%空气的存在下在潮湿气氛中于37℃培养。

[0218] 动物

[0219] 在体内研究中使用8-12周龄的重约20-25克的雌性无胸腺裸小鼠,其由Janvier Laboratories提供。在实验之前,使动物适应至少1周;将它们圈养在平均温度为22℃的通风聚丙烯笼中,每天暴露于12小时光照和12小时黑暗。所有小鼠随意接受标准实验室食物饮食和水。实验根据Rules of the Santiago de Compostela University Bioethics Committee的规定并遵守根据西班牙国家法律(RD 53/2013)的实验动物护理原则(Principles of Laboratory Animal Care)来进行。

[0220] 体外细胞毒性分析

[0221] 通过MTT分析评价了毒性。增殖性细胞:将A549(4×10^3个细胞/孔)和U251(5×10^3个细胞/孔)接种在96孔板中。24小时后弃去培养基,用含有不同浓度Ag5-AQCs(1.2-0.24mg/L)的无血清培养基替换1小时,并使其在完全培养基中再生长24小时。将B-CLL原代培养物(4×10^4个细胞/孔)接种在无血清培养基中,向孔中立即加入不同浓度的Ag5-AQCs(1.2-0.24mg/L)保持30分钟。之后,加入完全培养基,使细胞生长24小时。非增殖性细胞(汇合或剥夺血清的):将A549细胞(4×10^3个细胞/孔)和U251(5×10^3个细胞/孔)接种在96孔板中。使汇合细胞在培养基-10% FBS中生长96小时达到汇合。对于剥夺血清的细胞,接种后24小时用培养基-0.05% FBS替换培养基72小时。在两种条件下,通过流式细胞术证实了细胞的非增殖状态。之后,在无血清培养基中用Ag5-AQCs(1.2-0.24mg/L)处理细胞1小时,在完全培养基中再培养24小时。

[0222] 然后,对于所有测试条件,将10μl MTT溶液(5mg/ml)加入到各孔中,于37℃在避光条件下温育。4小时后,加入100μl溶解溶液(SDS/0.1NHCl),将样品于37℃温育18小时。使用CLARIOstar®微板读数器在595nm测定吸光度。使用MTT分析法进行类似的方案,以测量其它细胞类型的细胞存活力。

[0223] 活细胞中GSH氧化的放射性测量

[0224] PREMO细胞氧化还原传感器Grx-1-roGFP(Molecular Probes,P36242)是用于检测活细胞中谷胱甘肽氧化还原状态变化的基因编码传感器。该传感器基于将两个半胱氨酸引入GFP蛋白质的β桶结构中。在氧化条件下,二硫键的形成改变了生物传感器的荧光性质,导致在两个不同波长(400和488nm)激发后发射强度的变化。发射强度的比率与roGFP的氧化

还原状态的变化相关。

[0225] 为了分析在Ag5-AQCs的存在下GSH氧化态的变化,将2.5×10^4个A549细胞接种在35mm平板培养皿(Mattek.P35GC-0-10-C)中,在细胞铺板后立即用PREMO细胞氧化还原传感器Grx-1-roGFP转导。传感器体积按照以下等式计算:

[0226] 传感器体积(ml)=(细胞数)x(MOI)/(1x10^8)

[0227] 其中"细胞数"是每个皿接种的细胞数;MOI是每个细胞的病毒颗粒数,1×10^8是每ml试剂的病毒颗粒数。

[0228] 根据从该方程获得的结果,每毫升培养基中加入60μl PREMO细胞氧化还原传感器。将样品培养48小时以获得传感器的最佳表达,使用Leica TCS SP5X共聚焦显微镜使活细胞中的氧化还原变化动力化(motorized)。将Ag5-AQCs(IC50)加入到培养皿中,在10分钟期间每10秒拍摄图像。将PREMO细胞氧化还原传感器在400和488nm处激发,在500-530nm处收集发射。在两种激发下测量每个细胞发射的荧光强度,计算400ex/488ex比率。使用ImageJ软件处理图像。

[0229] 免疫荧光

[0230] MTF-1:使A549(2.5×10^4)细胞在24孔板中在玻璃盖玻片上生长,在无血清培养基中用Ag5-AQCs(IC50)处理1小时,然后用完全培养基替换培养基2小时。使HEK293(8×10^4)细胞在24孔板中在玻璃盖玻片上生长,用Ag5-AQCs(IC50)、DTT(0.5mM)或两者的组合在无血清培养基中处理10或30分钟,然后在培养基中处理。然后,用PBS Ca2+/Mg2+洗涤细胞两次,于-20℃用甲醇/丙酮(1:1稀释)固定10分钟。然后,将它们用含10% FBS的PBS封闭1小时,用PBS洗涤两次,于4℃用针对MTF-1的一级抗体(稀释度1:200)(sc-48775,Santa Cruz Biotechnology)培养过夜。此后,洗涤细胞,与0.25μg/ml的Alexa Fluor-594山羊抗兔IgG二级抗体(稀释度1:500)(A11037,Life Technologies)和Hoechst(稀释度1:1000)(Molecular Probes)一起培养45分钟。将具有染色细胞的盖玻片用Fluoroshield Mounting Medium(F6182,Sigma)封固在载玻片上。使用Leica TCS SP8共聚焦显微镜拍摄图像,使用LasX软件分析。

[0231] Nrf2:将HEK293细胞(3×10^4)在24孔板中接种在玻璃盖玻片上过夜,用Ag5-AQCs(IC50)、DTT(0.5mM)或两者的组合在无血清培养基中处理10或30分钟。处理后,将细胞在福尔马林溶液(10%)中固定30分钟,用PBS Ca2+/Mg2+洗涤两次,并用0.5% Triton X-100透化处理5-10分钟。然后,再次洗涤细胞,用含有1% BSA的PBS封闭。随后,将细胞用抗Nrf2的一级抗体(1:100稀释)(sc-722,Santa Cruz Biotechnology)于室温培养2小时,用PBS洗涤两次,并用Alexa Fluor-594山羊抗兔IgG二级抗体(稀释度1:250)(A11037,Life Technologies)和Hoechst(稀释度1:1000)(Molecular Probes)培养45分钟。分析中包括了不含一级抗体的阴性对照(数据未显示)。将具有染色细胞的盖玻片用Fluoroshield Mounting Medium(F6182,Sigma)封固在载玻片上。使用Leica TCS SP8共聚焦显微镜拍摄图像,使用LasX软件分析。

[0232] ROS测量

[0233] 使用超氧化物指示剂二氢乙锭(DHE)(Molecular Probes,D11347)进行流式细胞术测量。将细胞接种在12孔板培养皿中,在无血清培养基中用Ag5-AQCs(IC50)处理。在处理后30分钟、1、2和3小时收集细胞,用冷PBS洗涤两次,用DHE(3.17mM)于室温培养20分钟,避

光。使用具有InCyte软件的Guava EasyCyte流式细胞仪分析染色的细胞。

[0234] 多细胞肿瘤球体

[0235] 通过悬滴法产生A549和U251多细胞肿瘤球体(MCTSs)。将20μl含有500个细胞的细胞悬浮液分配在60孔微型盘(Nunc)中。之后,将盘倒置并在标准条件下培养5天。在第5天,将盘直立,将球体转移至涂覆50μl 1%琼脂糖的96孔板。然后,用Ag5-AQCs每隔一天处理球体四次,每天使用装配有Olympus DP72照相机和CellSens成像软件的Olympus IX51显微镜拍摄球体图像直到处理结束。使用ImageJ处理图像以测量球体面积和灰度值差异作为细胞密度的间接指示。

[0236] 在实验结束时,用Image-iT Green低氧试剂5μM(Molecular Probes,I14834)和Hoechst(1μg/μl)对球体染色1小时。用Leica AOBS-SP5共聚焦显微镜拍摄对照和经处理球体的图像,使用ImageJ软件分析。

[0237] Ag5-AQCs的体内功效

[0238] 按照Borrajo等人(2016)J.Control Release 238:263-271中描述的方案开发了A549luc原位肺癌模型。将悬浮在50μl PBS中的1×10^6个A549Luc细胞通过肋间隙注射到无胸腺裸小鼠的左肺中。肿瘤发展后,在成像前约5分钟以150mg/kg体重的剂量将荧光素注射到腹膜内腔内。使用IVIS LIVING IMAGE系统(Caliper Life Sciences)在汽化异氟烷麻醉下对荧光素酶生物发光进行成像。

[0239] 对于Ag5-AQCs处理,将小鼠分成三组(每组5只动物):第一组(对照)未进行处理,第二组用顺铂(CDDP)(四个单一剂量,4mg/kg)处理,第三组用Ag5-AQCs(四个单一剂量,0.25mg/kg)处理。在接种肿瘤后第20、22、24和26天,通过尾静脉经静脉内施用药物。在第37天处死小鼠。取出肺和纵隔淋巴结,对体内每微克蛋白质的发光进行定量,如Borrajo等人(2016)所述。

[0240] 组织学分析

[0241] 将肺在10%中性缓冲福尔马林中固定24小时,包埋在石蜡中。将4mm厚的切片固定在FLEX IHC显微镜载玻片(Dako-Agilent,Glostrup,丹麦)上,于60℃加热1小时。采用AutostainerLink 48(Dako-Agilent)自动进行免疫组织化学技术。于97℃脱蜡和在EnVision FLEX靶修复溶液(高pH)中表位修复20分钟后,将载玻片在PT Link中冷却至65℃,然后在Dako洗涤缓冲液中于室温(RT)冷却5分钟。免疫染色方案包括于RT如下培养:(1)EnVision FLEX过氧化物酶封闭试剂(Dako-Agilent)5分钟;(2)即用型FLEX一级抗体(Dako-Agilent)抗CK7(克隆OV-TL12/30)抗体,20分钟;(3)EnVision FLEX/HRP(与辣根过氧化物酶和亲和分离的山羊抗小鼠和抗兔免疫球蛋白缀合的葡聚糖聚合物),20分钟;(4)底物工作溶液(混合物)(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐色原溶液)(Dako-Agilent),10分钟;和(5)EnVision FLEX苏木精(Dako-Agilent),9分钟。将切片用装配有Olympus DP70照相机的Olympus PROVIS AX70显微镜检查并拍照。

[0242] 放射处理

[0243] 将A549(3×10^4个细胞/孔)和U251(3.5×10^4个细胞/孔)细胞接种在24孔板上,培养96小时以达到汇合。然后,将培养基用不含FBS、含有Ag5-AQCs的不同稀释液(对于A549为1:50、1:75和1:100,对于U251为1:150、1:175和1:200)的培养基替换。用Ag5-AQCs预处理10分钟后,采用来自Universidade de Santiago的放射物理实验室的线性加速器、用0-10Gy

的剂量照射细胞。

[0244] 统计分析

[0245] 所有统计分析均采用GraphPad Prism 5.0版软件(GraphPad Software,Inc.,La Jolla,USA)进行。对*P＜0.05而言,差异被认为显著;对*P＜0.01而言,被认为非常显著。

[0246] 实施例1:Ag5-AQCs合成方法

[0247] 于25℃使用Biologic VMP3恒电位器(Seyssinet-Oarsetm France)进行Ag5-AQC簇的合成。使用具有氢电极作为参比电极和两个Ag箔(17.5cm^2表面积)作为对和工作电极的Methrom绝热三电极电化学电池。这些电极彼此相对并且以3cm距离分开。第一步是1小时的250μA,第二步是1小时的480μA,第三步是1小时的1mA,第四步是1小时的2.2mA,最后两步是各自在25℃下30分钟的4mA。在合成之前以及在合成之后4小时和4.5小时,用砂纸抛光两个银电极,然后用氧化铝(约50nm)抛光,用MilliQ水彻底冲洗并超声(5分钟的2个步骤,每步更换水)。在超声后和在合成之前,进行电化学清洗,其包括在水中以250mA进行5分钟的步骤。

[0248] 纯化:溶液中未反应离子的量通过Ag离子选择电极(Hanna)估计。使用其量为Ag离子浓度1.5倍的NaCl进行Ag离子的沉淀。将该系统于25℃静置过夜以完成沉淀。

[0249] 浓缩:将16份合成物收集在一起(总共8L),通过0.1μm膜过滤,在旋转蒸发器(Heidolphlaborota 20)中于35℃(真空≈30毫巴)浓缩至10mL体积。最后,将溶液通过0.22微米的膜过滤,在小瓶中进一步浓缩至2mL。通过火焰原子吸收光谱(用来自Perkin-Elmer(西班牙马德里)的具有银中空阴极灯Lumia(电流10mA)的Perkin-Elmer 3110进行)评估,在纯化和浓缩过程结束时Ag5-AQCs的浓度为约30mg/L。质谱分析显示主要存在Ag5-AQCs物质(约＞50%)。

[0250] 通过UV-Vis和荧光光谱法、AFM(原子力显微镜)、HRTEM(高分辨透射电子显微镜)、XANES和ESI-TOF(电喷雾电离飞行时间)质谱表征了簇样品,显示该组合物主要含有具有N＝5个原子的簇(Ag5-AQCs)。

[0251] 实施例2:与Ag5相互作用的模型

[0252] Ag5-AQCs与谷胱甘肽和硫氧还蛋白的相互作用的理论模型显示该反应在热力学上是可能的。此外,Ag5-AQCs选择性地与硫氧还蛋白的基础结构域相互作用,该基础结构域被称为"硫氧还蛋白折叠",并且在原核生物和真核生物蛋白质中都有发现。尽管折叠的很多区域中序列是可变的,但是硫氧还蛋白与两个反应性半胱氨酸残基享有共同的活性位点序列:Cys-X-Y-Cys,其中X和Y通常但不一定是疏水性氨基酸。不受理论的束缚,Ag5-AQCs显示与这两个半胱氨酸残基相互作用,如图1所示。

[0253] 实施例3:Ag5-AQCs促进硫氧化

[0254] Ag5-AQCs促进半胱氨酸和谷胱甘肽中的硫氧化,如使用X射线吸收近边结构(XANES)所见(图2)。此外,该反应是剂量依赖性的(图3)。还显示大肠杆菌(E.Coli)硫氧还蛋白在Ag5-AQCs的存在下被氧化(图4)。如所预期那样,纯的硫氧还蛋白分子仅在2474.3eV处显示峰,这与S(-2)氧化态一致,对应于它们的两个半胱氨酸基团。重要的是,注意到在用Ag5-AQCs催化处理之前可以证实该分子的还原形式,因为没有观察到在2473至2475eV范围的具有约1.5eV特征分裂的二硫化物的信号。在用AQCs处理后,清楚地看到与S+6相关的强峰。

[0255] XANES分析还显示了不同电子受体对Ag5-AQC介导的硫氧还蛋白氧化的作用(图5)。从生物学的观点来看,非常重要的是发现了Ag5-AQCs增强氧、H_2O_2和羟基自由基(HO•)对硫氧化的作用,达到了在生物系统中不可逆的氧化态。这将Ag5-AQC的作用与细胞代谢和肿瘤血管形成联系起来(图6)。

[0256] 实施例4:Ag5-AQC具有杀细菌作用

[0257] Ag5-AQCs对大肠杆菌(E.Coli)具有抑菌和杀菌作用。负责的机制被认为是硫醇氧化。实际上,二硫苏糖醇(DTT),一种硫醇还原剂,拯救了大肠杆菌免受Ag5-AQC作用。相反的情况亦如此,即,Ag5-AQCs拯救了大肠杆菌免受DTT作用,如从具有相反作用的氧化还原剂所预期的。由铜和铂制成的簇也具有杀细菌活性。

[0258] 在不存在DTT(0mM)时,低浓度(1.2mg/L)的Ag5-AQCs杀死细菌。当DTT升高到0.1mM时,细菌存活力部分恢复。10mM的DTT对细菌有毒性,然而Ag5-AQCs共同施用逆转了DTT的作用(图7)。

[0259] 实施例5:Ag5-AQCs对人细胞系的作用

[0260] 使用一组九个细胞系:A549(人肺腺癌,DSMZ No.:ACC 107)、A549 Luc-C8(BIOWARE®)、MCF7(人乳腺癌,DSMZ No.:ACC 115)、HCT116(人结肠直肠癌,ATCC No.:CCL-247)、HEK293:(肾,来自人类胚胎)、U87-luc(人多形性恶性胶质瘤,由Joan Seoane友情提供)、MM.1S(人多发性骨髓瘤,ATCC No.:CRL-2974)、RL(人非霍奇金淋巴瘤,ATCC No.:CRL-2261)和MEC-1(人B-慢性淋巴细胞白血病,DSMZ No.:ACC 497)。

[0261] 所有细胞系都对Ag5-AQCs敏感。在图8中,呈现了各种细胞系的剂量-响应(0.24-1.2mg/L)图。重要的是,当DTT与Ag5-AQCs共同施用时,毒性作用降低,表明Ag5-AQC作用是通过硫醇氧化介导的。

[0262] 采用A549细胞系还发现由铜制成的簇显示出细胞毒性效应,参见图9。

[0263] 氧化还原敏感性GFP分子的开发允许通过荧光显微术监测活细胞内的氧化还原状态。roGFP-Grx1嵌合体是用于测量经由引入到GFP蛋白质的β桶结构中的两个半胱氨酸的硫醇氧化的变化的遗传编码传感器。半胱氨酸之间的二硫键形成导致GFP的质子化,并以488nm激发光谱为代价增加400nm激发光谱。用传感器转导A549细胞48小时,在Ag5-AQC(IC50-约0.3mg/L)处理后通过共焦荧光显微镜监测荧光强度的变化10分钟。虽然对照细胞随时间推移不改变其氧化还原状态,但是向样品中添加Ag5-AQC导致了在处理6分钟后迅速氧化反应至最大信号。分析了总共34种随机选择的细胞(来自总共三个实验,每个实验至少10种细胞),其中20种细胞在暴露于Ag5-AQC后其氧化还原状态显示出清楚变化。另外,剩余细胞中的13种改变了它们的氧化态,尽管该作用不象上述20种细胞中那样显著。roGFP通过与谷氧还蛋白(GRX1)的电子交换响应于GSH/GSSG水平,从而证明了Ag5-AQC对GSH的作用(图10)。

[0264] 实施例6:Ag5-AQCs作用于蛋白质中存在的关键硫醇

[0265] 金属硫蛋白(MTs)是一组低分子量的富含半胱氨酸的细胞内金属结合蛋白,其在保护免受氧化剂的影响中起关键作用。MTs的表达受到金属响应转录因子1(MTF-1)的控制。在正常条件下,MTF-1在细胞质和细胞核之间走动,但是在各种应激时在细胞核中聚集并结合至金属响应元件(MRE),诱导在其它基因中MTs的表达。在生理条件下,MTs通过其半胱氨酸残基的巯基结合锌,形成两个锌/硫醇盐簇,但是在氧化应激条件下锌经由锌/硫醇盐簇

的氧化被释放,导致形成MT-二硫化物。该MT-二硫化物状态可以在还原环境中恢复,导致形成MT-硫醇,后者可以与锌离子缔合形成MTs。该过程构成MT氧化还原循环,其在MT的生物功能中起关键作用。

[0266] 据推理,Ag5-AQCs可以催化MT-硫醇向MT-二硫化物的转化,从而释放锌、MTF-1活化和易位至细胞核中。为了证实这一点,分析了Ag5-AQC处理后MTF-1的位置。用Ag5-AQCs(IC50-约0.3mg/L)处理A549细胞,2小时后固定细胞,并用针对MTF-1的抗体染色。免疫荧光图像显示:相对于对照细胞,经处理细胞中有清楚的MTF-1核聚集(图11a)。对于每种条件总共计数了300个细胞,其中在Ag5-AQC处理的细胞中242个细胞对于MTF-1核位置而言是阳性的,在对照中是9个细胞。此外,使用细胞系MM.1S获得的微阵列数据在用Ag5-AQCs处理4小时后显示,MTs基因响应于Ag5-AQC处理而上调,如从MTF-1活化所预期的那样。

[0267] Nrf2-Keap1途径通常被认为是主要的细胞防御途径,其控制细胞内具有抗氧化剂功能的基因表达。在基础条件下,Nrf2在细胞质中受到Keap1转录抑制,其转而促进Cul3介导的Nrf2多泛素化,导致其蛋白酶体降解。Keap1含有27个半胱氨酸,其中一些被报道是亲电子试剂和氧化剂的靶标,修饰它们促进Nrf2的去抑制。在暴露于应激时,Keap1通过半胱氨酸硫醇残基的直接修饰而失活,随后Nrf2被稳定化,避免了蛋白酶体降解,并易位到细胞核中以介导抗氧化剂响应中牵涉的多种基因的活化,如谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、NAD(P)H醌氧化还原酶(NQO-1)和血红素加氧酶-1(HMOX1)。存在与Keap1无关的调节Nfr2的其它机制,包括在Nrf2的Neh结构域中半胱氨酸的修饰,其导致Nrf2的核聚集。据推理,Ag5-AQCs可参与Keap1或Nrf2中巯基的氧化,导致Nrf2的释放和易位到细胞核中。使用间接免疫荧光评价了Nrf2蛋白质响应于N-乙基马来酰亚胺(NEM,阳性对照)和Ag5-AQCs的定位。NEM是对硫醇有反应活性的烯烃,通常用于修饰蛋白质和肽中的半胱氨酸残基。A549细胞系在Keap1基因中存在突变,导致Keap1活性改变,其停止发挥对Nrf2的抑制功能,导致在正常条件下Nrf2优势定位在细胞核中。因此,该细胞系不适于研究Nrf2细胞位置。相反,将人胚肾293(HEK293)细胞暴露于NEM(100μM)和Ag5-AQC(IC50-约0.3mg/L)30分钟,然后用针对Keap1和Nrf2的特异性抗体染色。与其中Nrf2优势定位于细胞质中的对照细胞相比,Ag5-AQC处理在30分钟后导致Nrf2蛋白质染色(红色染色)增加,表明蛋白质稳定化和核聚集(用蓝色Hoechst染色共定位)(图11b)。如所预期那样,NEM处理增加了Nrf2的核聚集。清楚的是,Ag5-AQCs和NEM享有相似的染色图案(由于降解减少和核定位增加而导致Nfr2表达增加),因此支持了Ag5-AQC对硫醇的作用。

[0268] 实施例7:Ag5-AQCs减少多细胞球体肿瘤生长

[0269] 多细胞肿瘤球体(MCTSs)与人肿瘤组织内病理生理学状况的多个方面类似,广泛用于药物测试。因此,开发了A549细胞的MCTSs作为评价Ag5-AQC活性的离体肿瘤模型。MCTS中细胞的生理状态取决于其尺寸;经常选择在4天培养后直径约400-500μm的单个MCTS用于药物测试。因此,根据这些标准选择MCTSs,并用Ag5-AQC(2.4mg/L)处理四次(第0、2、4和6天,将处理第一天看作0)。从第0天到第7天,每天拍摄对照和经处理MCTSs的图像。图像显示,Ag5-AQC处理降低了MCTSs生长(图12a),如通过采用ImageJ测量MCTSs面积所评估的那样。在处理的第一个剂量后,MCTS尺寸明显减小,并随时间推移保持减小,从第3天显著不同(图12b)。此外,值得注意的是,在用Ag5-AQC处理的MCTSs的中央部分中存在透亮区域,显示是较低细胞性的结果(图12a,箭头)。如前所述,大的MCTSs(即尺寸大于600μm)的特征在于

存在异质细胞亚群,外周是活跃增殖性细胞,内部区域是静止、低氧和坏死的细胞。在Ag5-AQC处理后在MCTSs中的这些透亮区域的存在被认为与Ag5-AQC依靠它们的小尺寸和中性电荷渗透到MCTSs中到达这些中心低氧区域的能力有关。

[0270] 为了验证这一假设,我们通过使用荧光探针评价了类肿瘤中的低氧水平。如图12c所示,1,000个细胞的类肿瘤内部的低氧水平增加。有趣的是,类肿瘤暴露于递增浓度的Ag5-AQCs导致低氧细胞剂量依赖性地减少。

[0271] 实施例8:H_2O_2增强Ag5-AQC的作用

[0272] 上述实施例提供了Ag5-AQC与O_2、H_2O_2和羟基自由基相互作用的重要性的证据。此处提供的证据表明在细胞培养物中同样如此。Ag5-AQC细胞毒性活性被证明当细胞呼吸降低和因此ROS水平降低时受到影响,由此改变细胞代谢。实际上,呼吸减弱的A549细胞和U251细胞(在允许它们达到汇合之后)对Ag5-AQC作用较不敏感(图13A和13B)。如所预期那样,血清饥饿的A549细胞对Ag5-AQCs的敏感性也比增殖性细胞低(图13C)。如果低剂量的H_2O_2与Ag5-AQCs共同施用,则灵敏性得到恢复(图13D)。

[0273] 实施例9:Ag5-AQC的体内作用

[0274] 在U87luc原位神经胶质瘤癌模型和A549luc原位肺癌模型(转移至纵隔淋巴结)中测试了Ag5-AQC的体内作用。

[0275] 高度恶性神经胶质瘤——多形性恶性胶质瘤(GBM)——是脑肿瘤最具侵袭性和致死性的形式,5年后存活率低于5%。GBMs治疗中的主要限制因素之一是递送治疗剂穿过血脑屏障(BBB)至脑。这种高度限制性的生理屏障阻止了98%的小分子药物和实际上100%的大分子药物从血液循环到达中枢神经系统。在生理pH与它们的中性电荷偶联的AQCs的小尺寸有利于(至少在理论上)其在生物组织中的扩散。考虑这些性质是否可允许Ag5-AQC自由扩散穿过BBB到达肿瘤。为此目的,开发了U87luc原位神经胶质瘤模型来测试Ag5-AQC穿过BBB和减小肿瘤的潜在能力。

[0276] 在原位移植U87luc细胞后,静脉内施用Ag5-AQC(0.5mg/kg)四次。通过采用IVIS®光谱系统测定14天期间脑中肿瘤细胞的生物发光跟踪了肿瘤生长。结果显示:在对照动物中肿瘤尺寸在整个实验中呈指数增加,而在用Ag5-AQC处理的动物中,肿瘤生长降低(图14a)。因此,这些结果表明,Ag5-AQC能够穿过BBB,到达肿瘤并减小其尺寸。

[0277] 癌症治疗的另一个限制因素是转移的发生。由于其全身性质和散布的肿瘤细胞对现有治疗剂的抗性,转移性疾病大部分是不可治愈的。这解释了为什么超过90%的癌症死亡率是由于转移,而不是由于产生这些恶性病变的原发肿瘤。使用之前描述的转移到纵隔淋巴结的A549luc原位肺癌模型(Porto等人(2018)Adv.Mater.e1801317)评价了Ag5-AQC减少或消除原发性肿瘤和转移两者的能力。已知A549细胞系是KRAS突变癌细胞系。在该模型中,已经很好地建立了向淋巴结转移的发生,在注射肿瘤细胞后13天可以检测到。因此,在植入A549luc细胞后第20天开始评价Ag5-AQC作用,此时淋巴结转移已经明显。建立了三组:未经处理的对照小鼠,作为阳性对照的用CDDP(4mg/kg)处理的小鼠,用Ag5-AQC(0.25mg/kg)处理的小鼠。静脉内施用处理四次(第20、22、24和26天),通过使用IVIS®光谱系统测量37天期间肺中肿瘤细胞的生物发光体内监测了肿瘤进展。结果显示:与其中肿瘤在整个实验中呈指数增长的对照动物相比,CDDP和Ag5-AQC处理的小鼠中肿瘤尺寸显著减小(图14b)。在第37天,处死动物,因为对照小鼠显示出明显的发病迹象,并且对荧光素酶活性进

行定量以测量癌细胞负荷。与对照小鼠相比,Ag5-AQC和CDDP处理的小鼠在原发肿瘤和纵隔淋巴结中显示出荧光素酶活性显著降低(图14c)。然后,比较用Ag5-AQC处理的小鼠和用CDDP处理的小鼠的荧光素酶活性。在Ag5-AQC处理的小鼠中,在原发肿瘤和纵隔淋巴结中的信号明显低于其它小鼠(图14b,c)。用特异性染色肿瘤细胞的抗人细胞角蛋白的单克隆抗体对肺切片进行的免疫组织化学染色也证实了这些结果(图14d)。而且,Ag5-AQC处理不影响动物的体重,排除了化合物的严重毒性(图14e)。

[0278] 总之,这些结果证明了Ag5-AQC能够到达原发肿瘤和转移两者,并且能够显著地减小尺寸而不引起额外的毒性作用。因此,由于它们能够穿过BBB并到达和减少转移,Ag5-AQC提供了可以改善人肿瘤治疗的新途径。

[0279] 实施例10:Ag5-AQC对人肿瘤的原代培养物的作用

[0280] 在诊断建立之后,在获自常规骨髓培养物的来自B-慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)患者的细胞中离体评价了Ag5-AQC敏感性。在来自3名患者的细胞中进行了与Ag5-AQC处理有关的细胞毒性作用和超结构形态学变化的评估。用不同剂量的Ag5-AQCs培养B-CLL细胞,通过MTT分析评价了细胞毒性。与以前从已建立的细胞系获得的结果一致,在24小时后观察到细胞存活力的浓度依赖性降低(图15a)。由于癌细胞系中Ag5-AQC增加O_2•-,我们通过流式细胞术测定DHE阳性细胞定量了暴露于Ag5-AQC的B-CLL细胞中O_2•-水平的变化。在处理后4小时观察到DHE阳性细胞中显著增加,超过2倍(图15b)。而且,TEM图像显示在Ag5-AQC处理后有明显的细胞凋亡形态学变化和存在被破坏的线粒体(图15c)。因此,这些结果证实了上述实施例中讨论的用细胞系和球体获得的结果。

[0281] 实施例11:Ag5-AQC对多发性骨髓瘤肿瘤模型的作用

[0282] 在多发性骨髓瘤异种移植MM.1S小鼠肿瘤模型中测试了Ag5-AQC的作用。用盐水溶液(对照)、0.125mg/kg Ag5-AQCs或0.25mg/kg硼替佐米(一种在美国和欧洲批准用于治疗多发性骨髓瘤的蛋白酶体抑制剂)处理小鼠(每个处理组n=4)。历经数天监测肿瘤体积,结果显示在图16中。结果显示,Ag5-AQC处理具有与硼替佐米等同的功效,即使没有优化剂量。

[0283] 实施例12:Ag5-AQCs优先在Ras转化细胞中引起细胞死亡

[0284] 已经广泛报道了活化的致癌基因引起活性氧类别的聚集(Irani等人(1997)Science)。据推理,转化细胞可以优先地被Ag5-AQCs处理所杀死。为了测试这一假说,将多西环素诱导的H-ras活化等位基因(RasV12)引入非转化的无限增殖化小鼠成纤维细胞(W3T3)中,分析Ag5-AQCs对致癌基因诱导的作用。如图17B所示,Ag5-AQCs以剂量-响应方式引起W3T3存活的减少。有趣的是,在AQCs的所有测试剂量中,与非诱导细胞(对照)相比,表达RasV12的细胞对Ag5-AQCs的毒性作用更敏感,并且存活力显著降低。

[0285] DTT处理逆转了这种选择性杀伤,提示Ras诱导的ROS聚集引起不同的作用。Ag5-AQCs对致癌基因转化细胞的这种优先作用为Ag5-AQCs作为抗肿瘤剂、特别是在RAS突变型癌症中作为抗肿瘤剂的用途提供了证据。

[0286] 实施例13:AQCs与放射疗法组合的作用

[0287] 测试了Ag5-AQC处理对用放射处理的细胞的作用。用不同稀释度的Ag5-AQCs处理A549细胞和U251细胞,立即用不同剂量的放射(0-10Gy)照射。

[0288] 使用如Franken等人(2006)Nat.Protocol.1(5):2315-2319所述的克隆源性分析测量了细胞存活。简言之,在照射后,用胰蛋白酶处理细胞,使用TC20自动细胞计数器

(Biorad)计数。将来自每个样品的100个细胞一式三份接种在6孔板中,在潮湿气氛中于37℃培养1周以允许形成肉眼可见的菌落。然后,固定细胞,用结晶紫染色。计数具有超过50个细胞的菌落。在校正对照细胞的铺板效率后,计算存活分数(SF)。结果显示在图18A和19A中。结果显示,施用Ag5-AQCs增加了放射疗法的细胞杀死作用。

[0289] 还测量了经照射细胞中的DNA损伤。在照射后,将细胞用胰蛋白酶处理,用PFA(0.04%)固定,用抗pH2AX抗体染色(Millipore,产品号:16-202A),如Muslimovic等人(2008)Nat.Protocol.3:1187-1193中所述。磷酸化组蛋白H2AX(pH2AX)表达是DNA损伤的标记物(Sharma等人,DNA Repair Protocols,(编辑:L.Bjergbæk),Springer Science,纽约,2012,第40章)。使用InCyte程序(Millipore)在Guava EasyCyte流式细胞仪上分析了染色细胞。结果显示在图18B和19B中。

[0290] 可以在两种不同模型中进一步测试由5个零价过渡金属原子组成的AQCs的作用,以确定与放射疗法的作用。A)使用多细胞肿瘤球体(MCTSs)的离体研究:U251-luc细胞的MCTSs可通过悬滴法获得。B)体内模型:可以通过将U251-luc细胞(携带荧光素酶基因以允许对生长中肿瘤体内成像的人成胶质细胞瘤细胞系)注射到无胸腺小鼠的脑中来开发原位成胶质细胞瘤癌症模型。

[0291] 结论

[0292] 本文描述了Ag5-AQCs在具有高半胱氨酸含量和易接近的巯基的蛋白质如金属硫蛋白或谷氧还蛋白的氧化中的作用。已经提出,由于Ag5-AQCs的小尺寸,Ag5-AQCs应当呈现出进入肿瘤组织的优异渗透性。在MTCSs中的实验显示了Ag5-AQCs如何穿透到内部区域,杀死这些区域中的低氧细胞。转移至纵隔淋巴结的原位肺癌模型揭示了Ag5-AQCs在体内到达肿瘤的能力。在肺原发肿瘤和纵隔淋巴结转移瘤两者中都观察到肿瘤尺寸减小。这些结果突显了Ag5-AQCs到达和减少转移灶的能力,构成了解决癌症治疗中两个主要问题的创新工具。

[0293] 将本文引用的所有专利和专利申请的全部内容通过引用整体并入本文。而且,本文所述的所有实施方案都可用于本发明的所有方面。

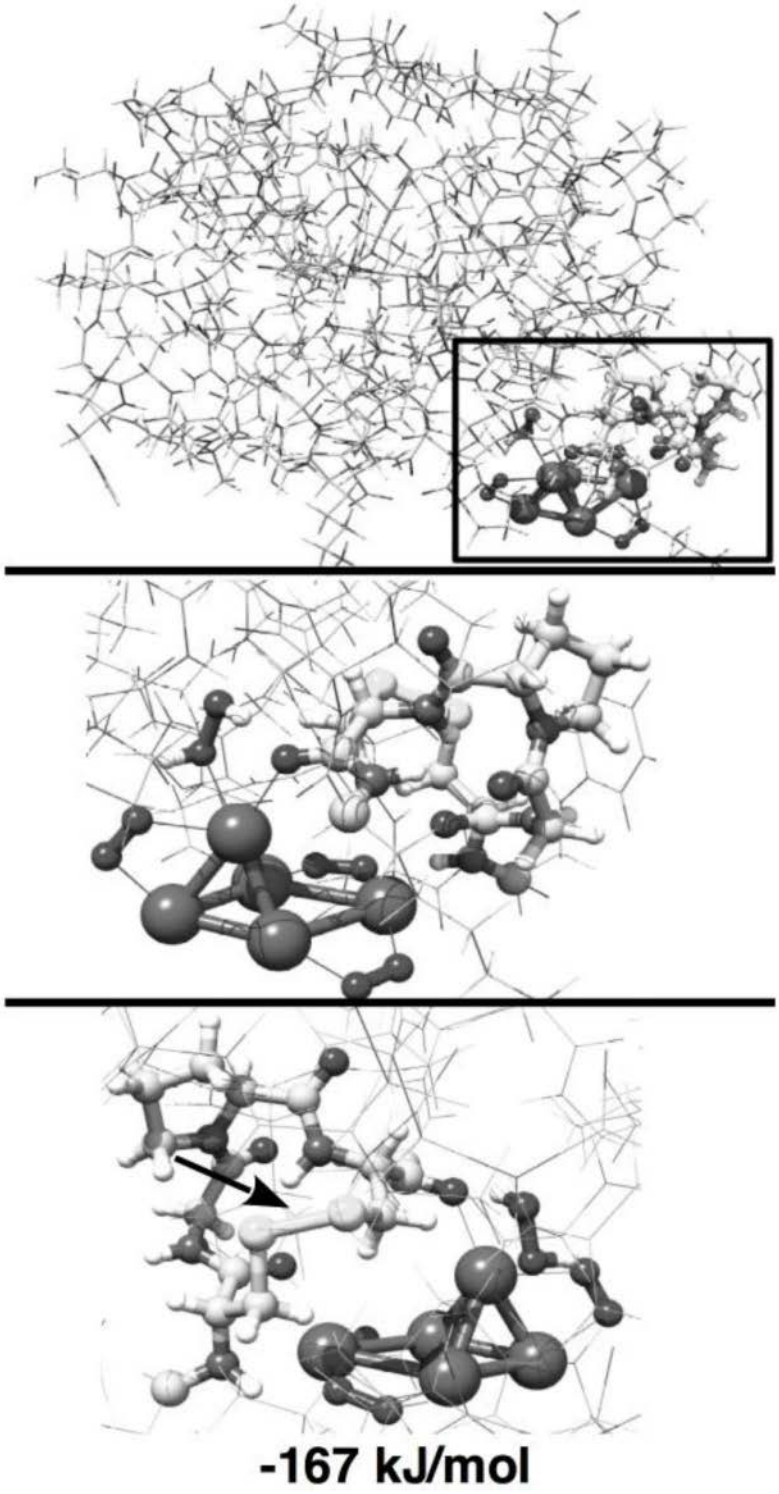


图1

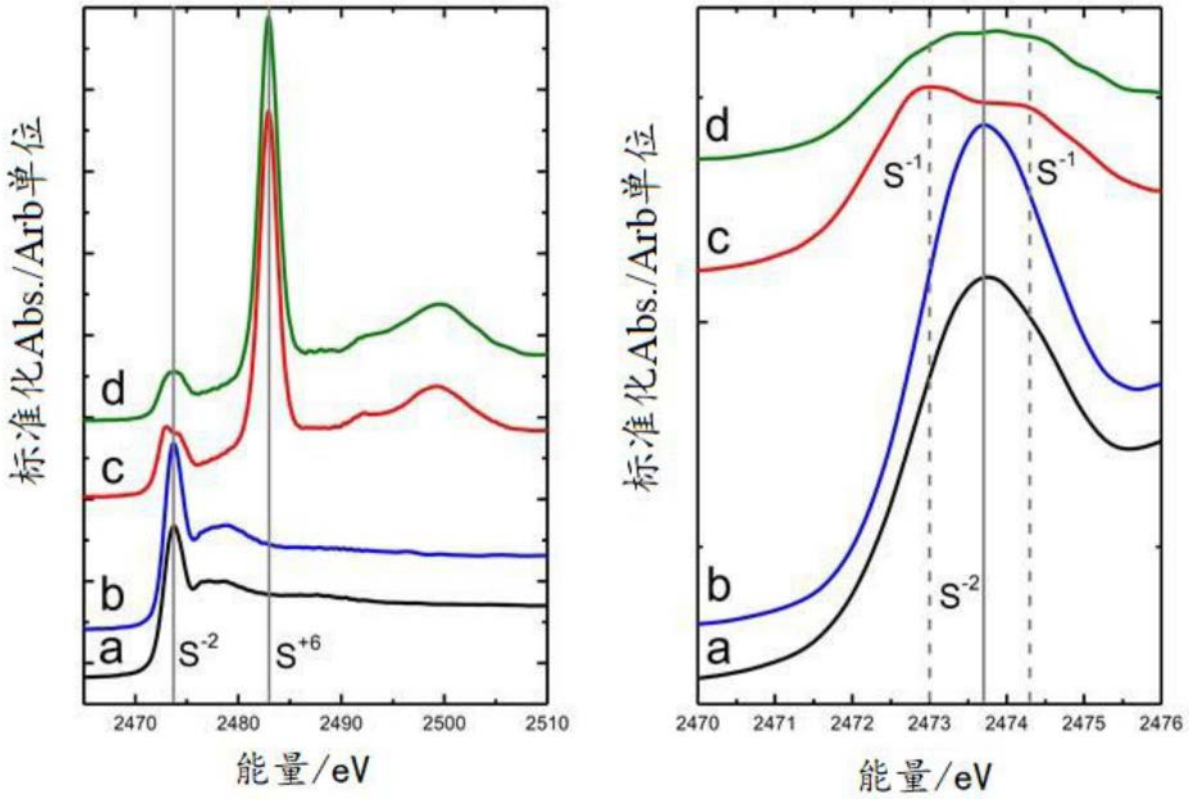

标准化Abs./Arb单位
d
c
b
a
S-2
S+6
2470
2480
2490
2500
2510
能量/eV
标准化Abs./Arb单位
d
c
b
a
S-1
S-1
S-2
2470
2471
2472
2473
2474
2475
2476
能量/eV

图2

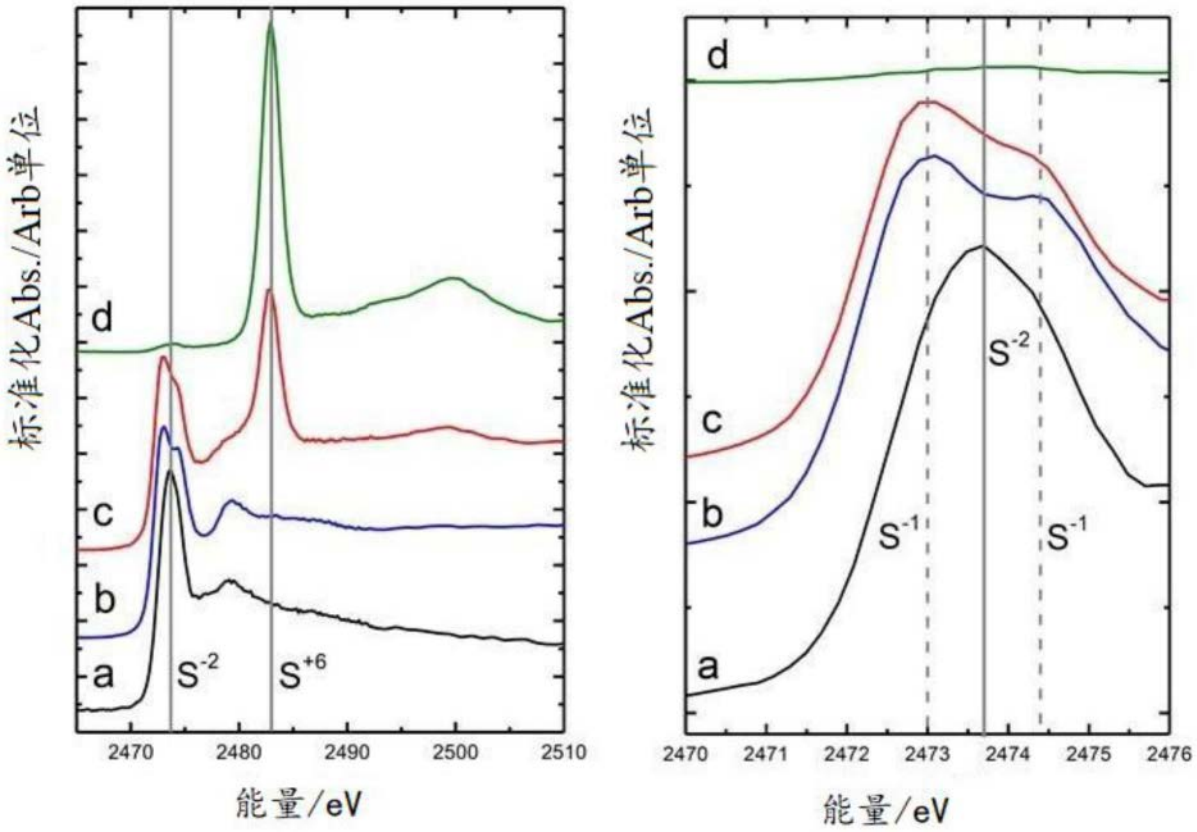

标准化Abs./Arb单位
d
c
b
a
S-2
S+6
2470
2480
2490
2500
2510
能量/eV
d
c
b
a
S-2
S-1
S-1
2470
2471
2472
2473
2474
2475
2476
能量/eV

图3

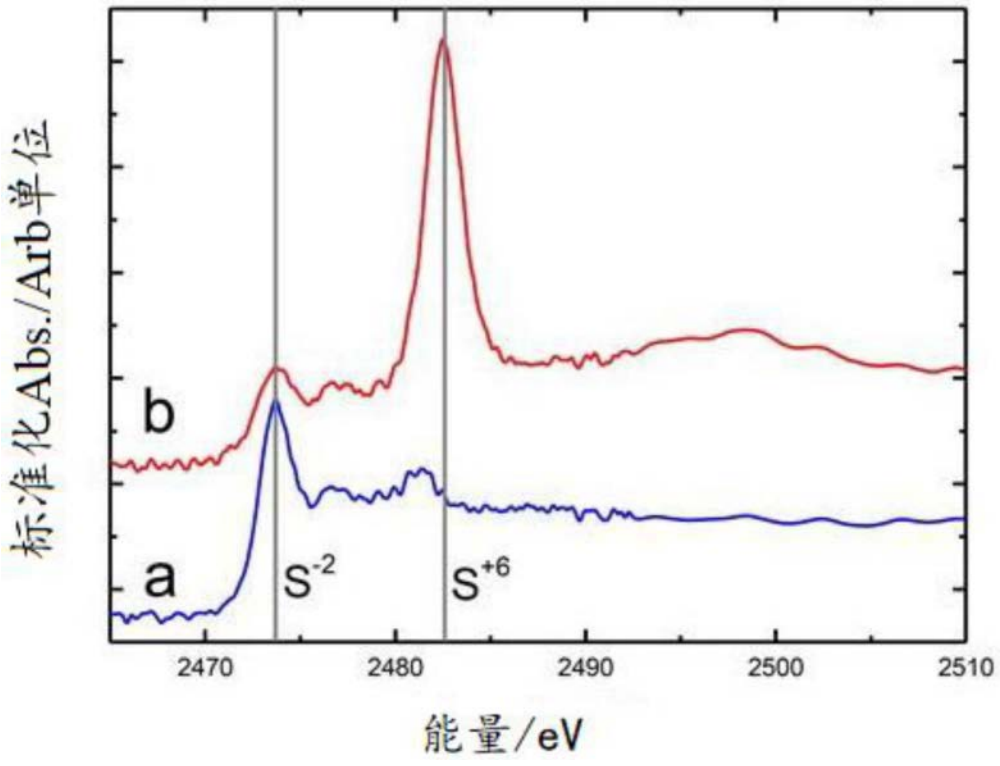

标准化Abs./Arb单位
b
a
S-2
S+6
2470
2480
2490
2500
2510
能量/eV

图4

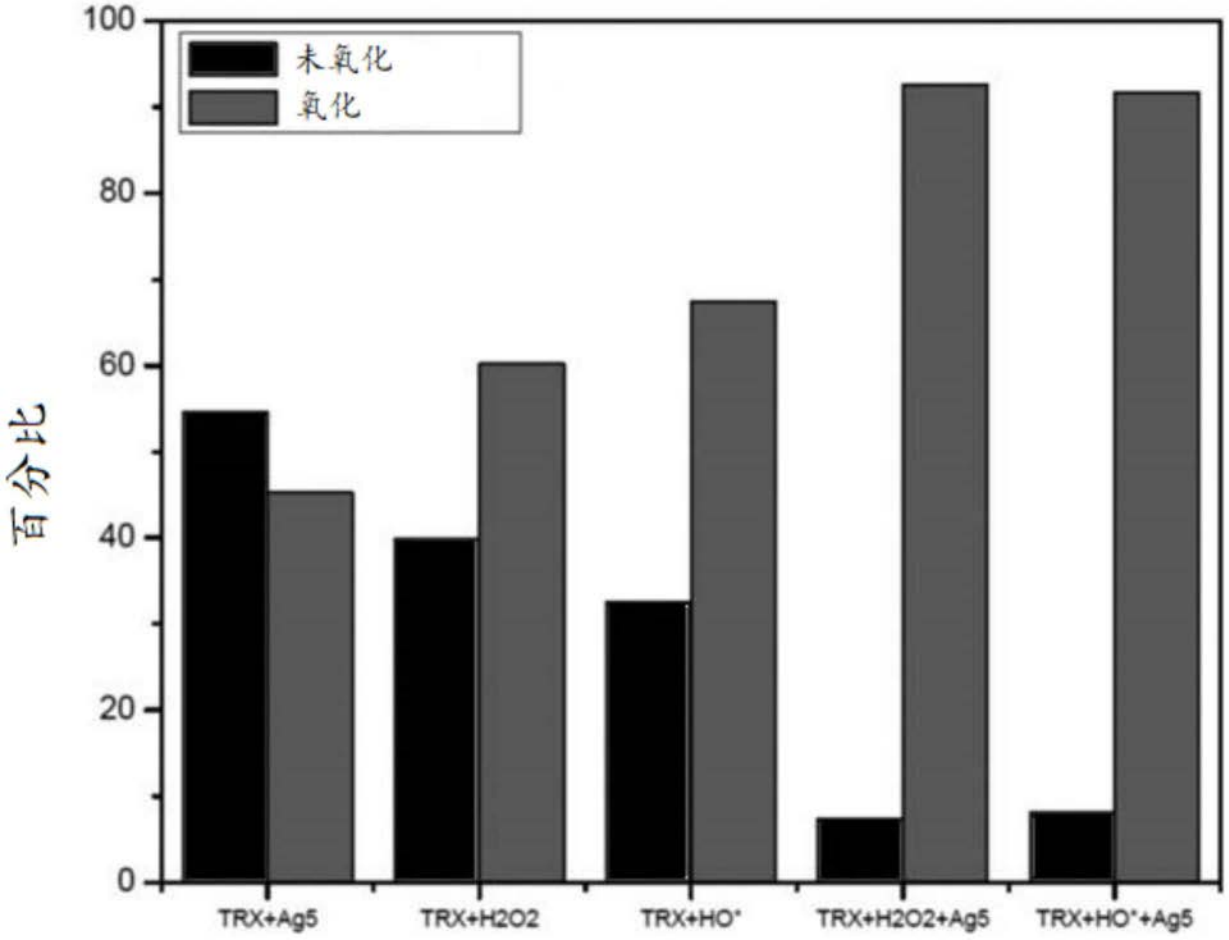

100
80
60
40
20
0
百分比
未氧化
氧化
TRX+Ag5
TRX+H2O2
TRX+HO·
TRX+H2O2+Ag5
TRX+HO·+Ag5

图5

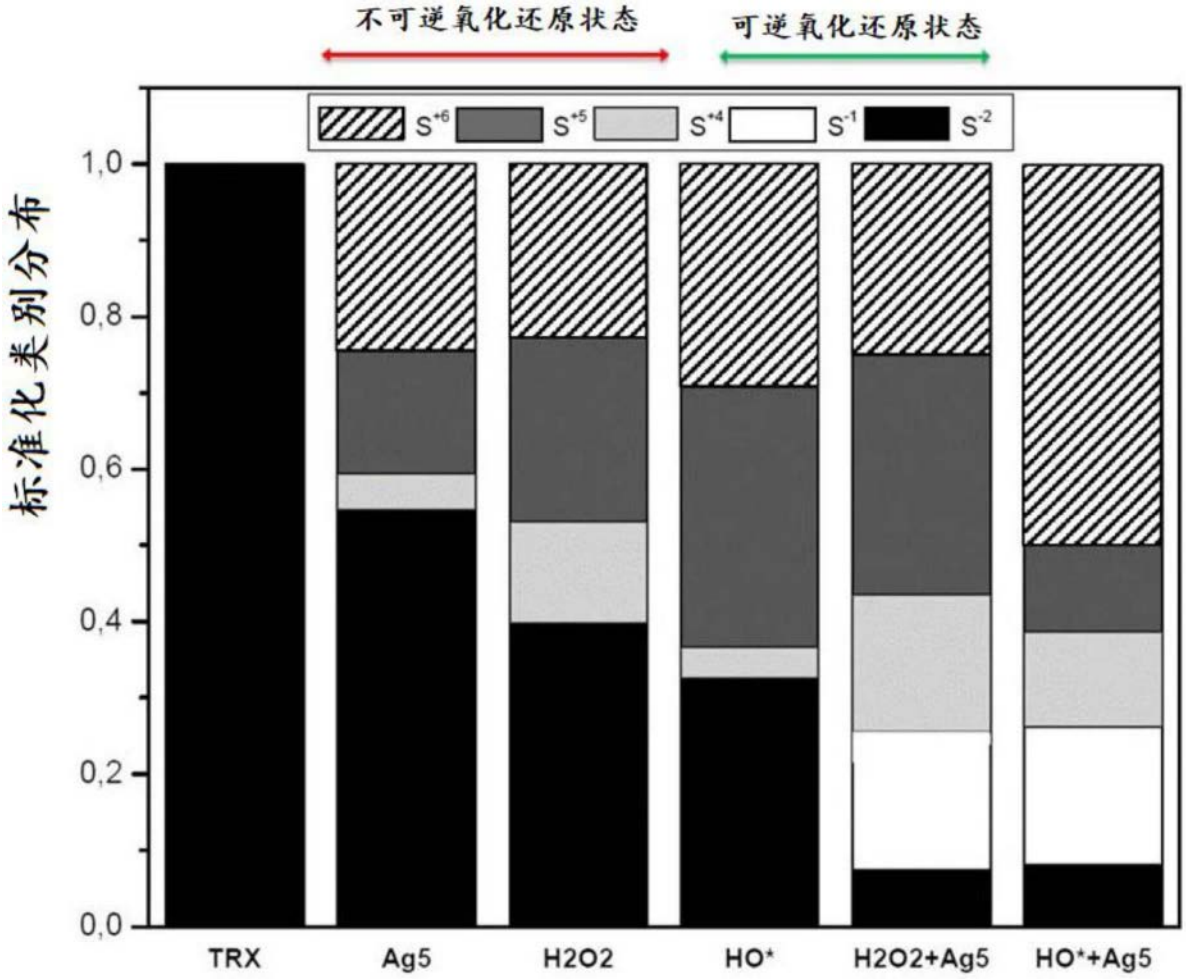

不可逆氧化还原状态
可逆氧化还原状态
S+6
S+5
S+4
S-1
S-2
标准化类别分布
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TRX
Ag5
H2O2
HO*
H2O2+Ag5
HO*+Ag5

图6

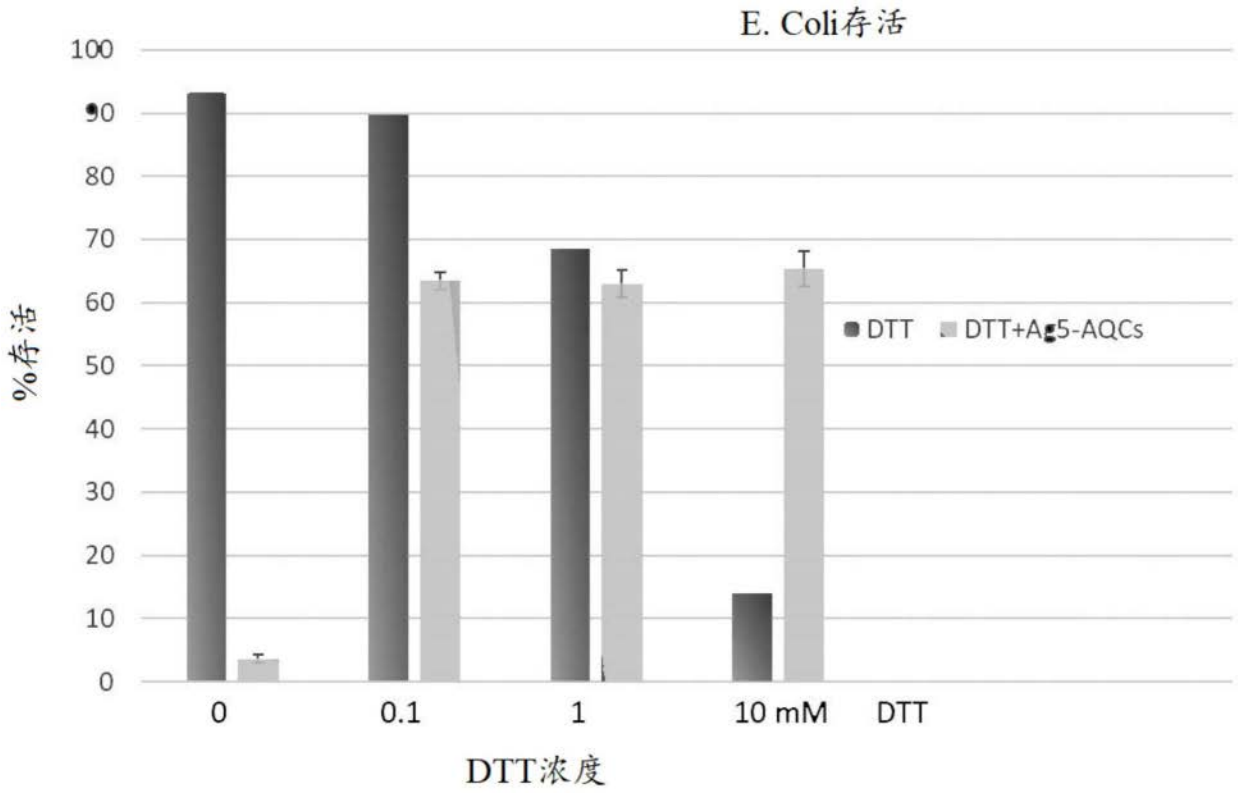

E. Coli存活
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%存活
DTT
DTT+Ag5-AQCs
0
0.1
1
10 mM
DTT
DTT浓度

图7

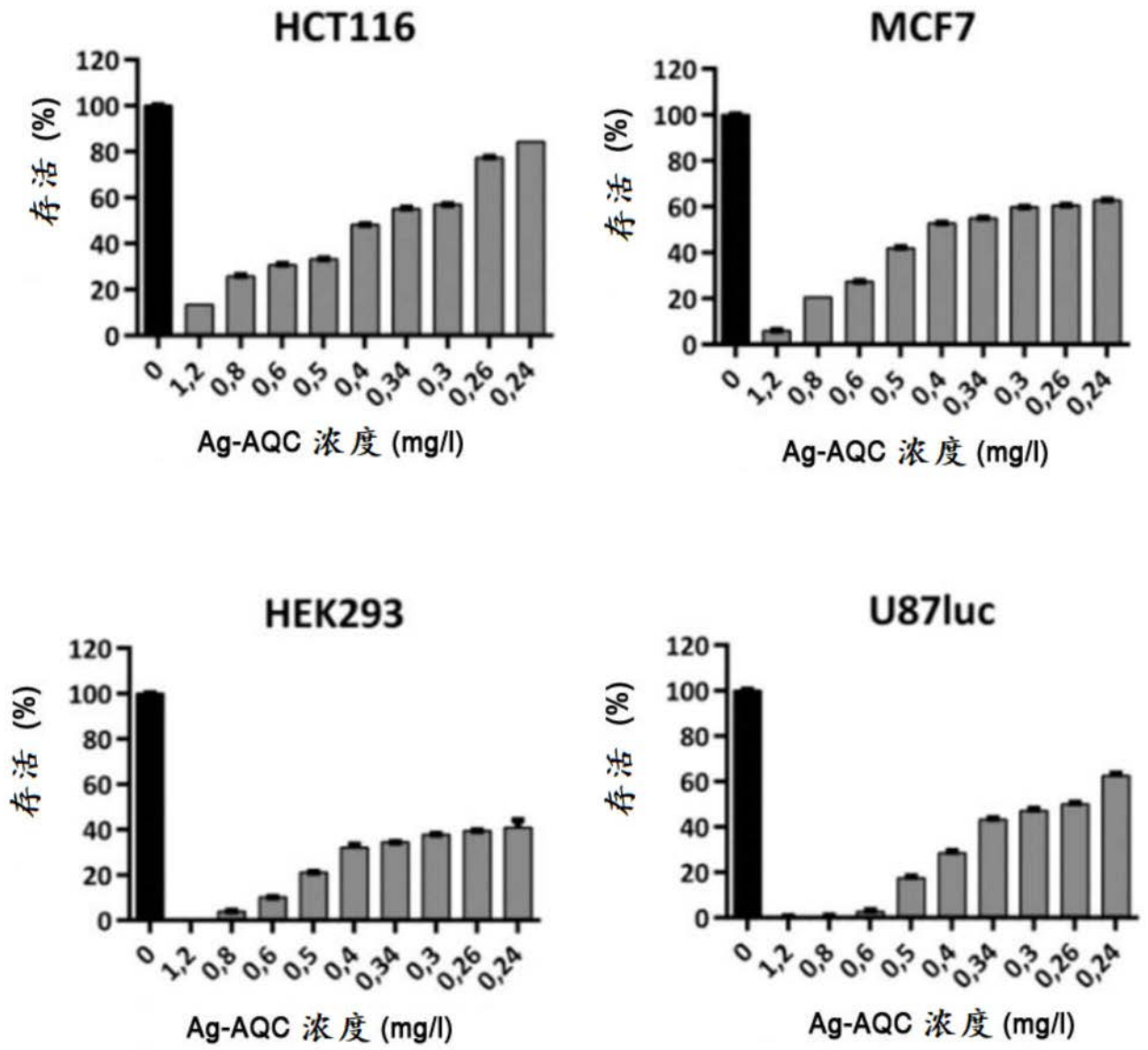

HCT116
MCF7
HEK293
U87luc
存活 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1,2
0,8
0,6
0,5
0,4
0,34
0,3
0,26
0,24
Ag-AQC 浓度 (mg/l)

图8

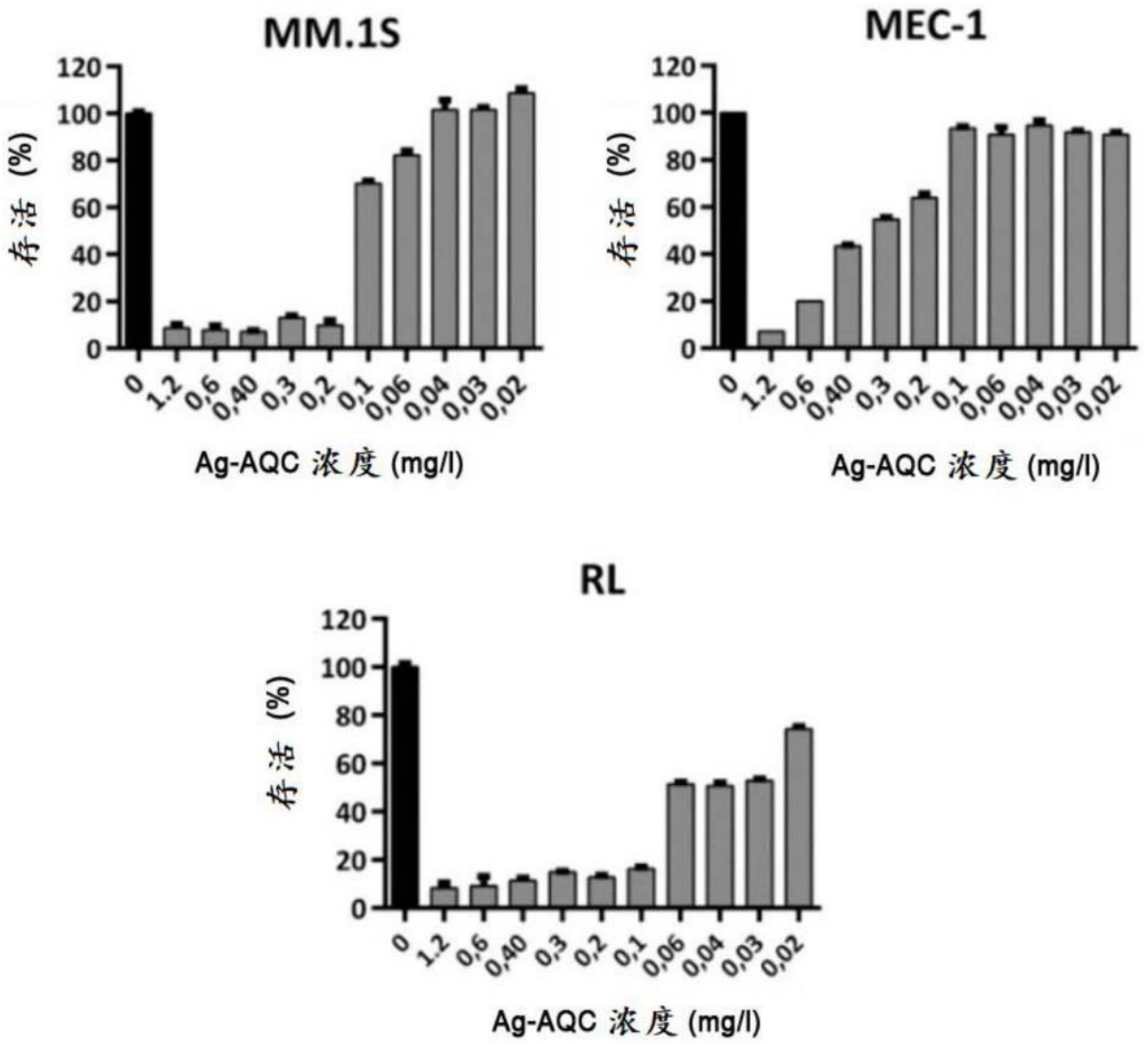

MM.1S
存活 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1,2
0,6
0,40
0,3
0,2
0,1
0,06
0,04
0,03
0,02
Ag-AQC 浓度 (mg/l)
MEC-1
存活 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1,2
0,6
0,40
0,3
0,2
0,1
0,06
0,04
0,03
0,02
Ag-AQC 浓度 (mg/l)
RL
存活 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1,2
0,6
0,40
0,3
0,2
0,1
0,06
0,04
0,03
0,02
Ag-AQC 浓度 (mg/l)

图8(续)

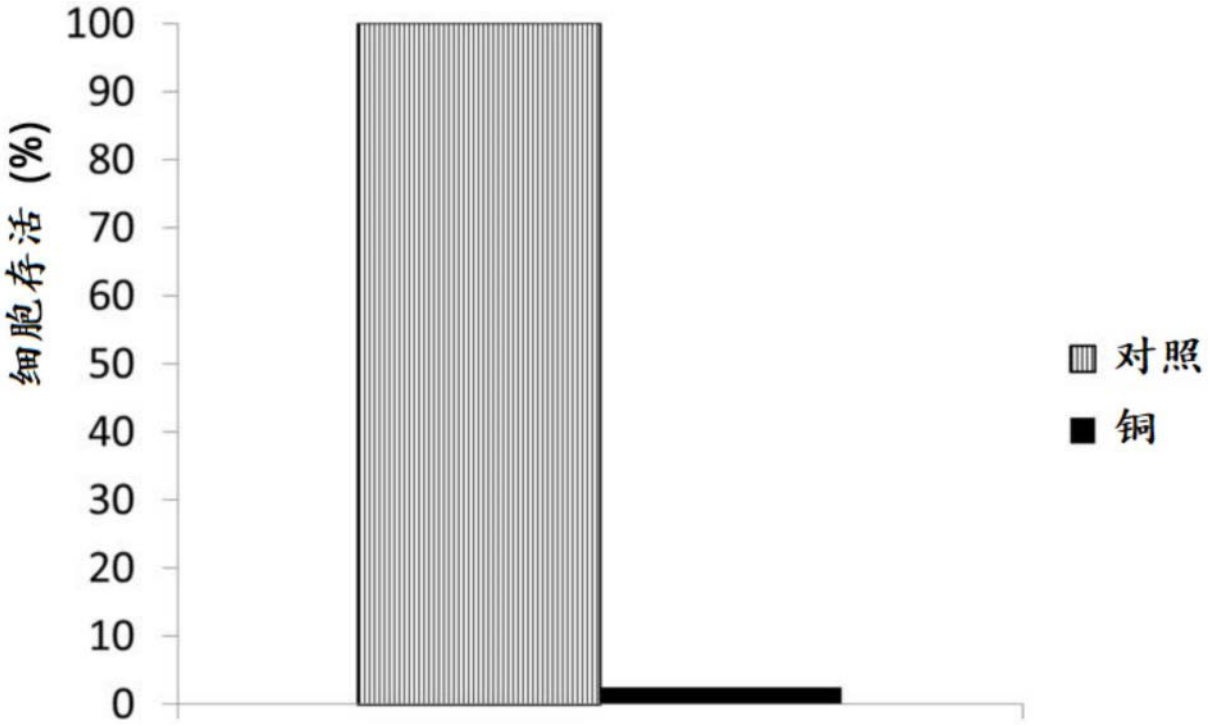


图9

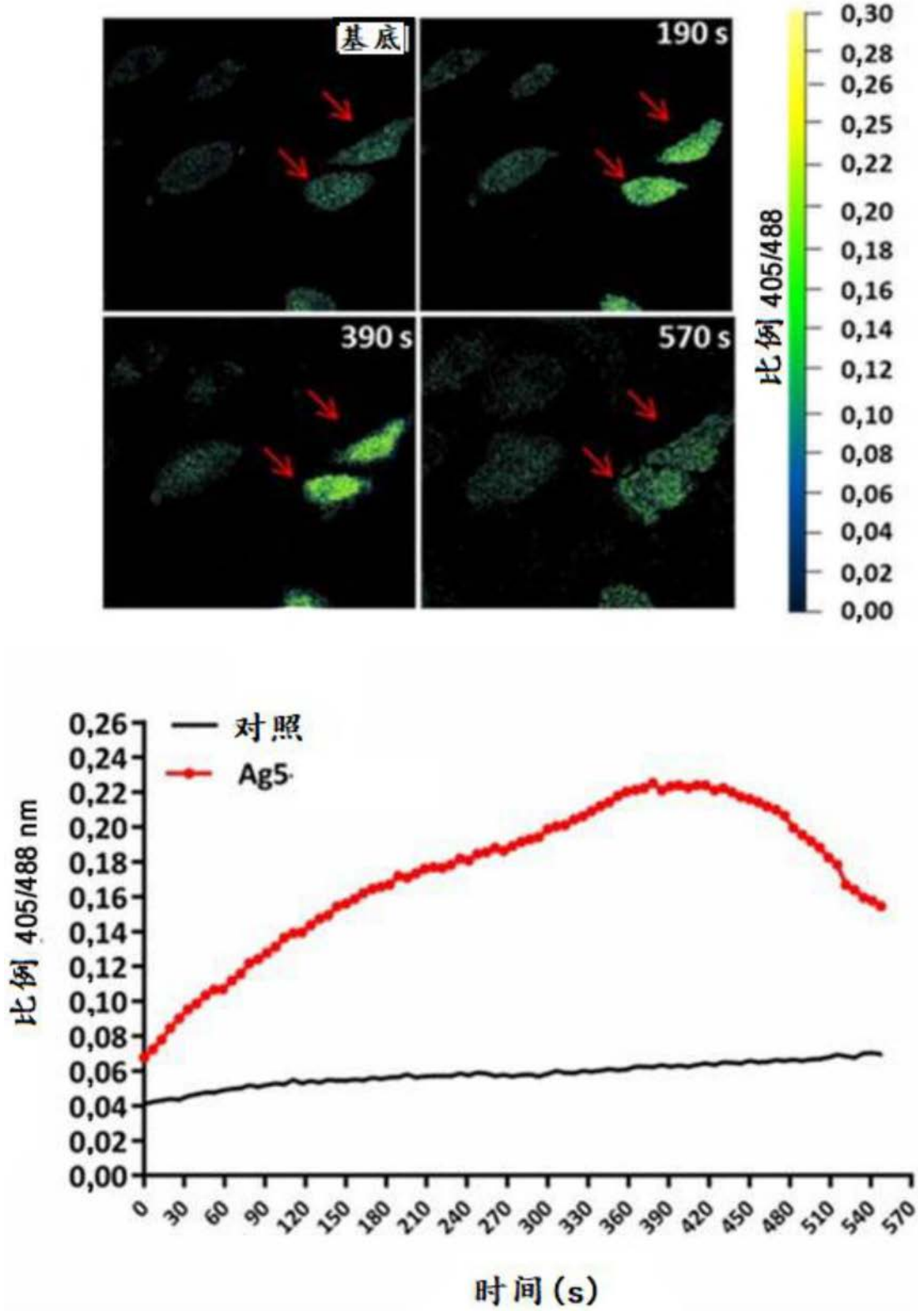

基底
190 s
390 s
570 s
比例 405/488
0,30
0,28
0,26
0,25
0,22
0,20
0,18
0,16
0,14
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
对照
Ag5
比例 405/488 nm
0,26
0,24
0,22
0,20
0,18
0,16
0,14
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
0 30 60 90 120 150 180 210 240 270 300 330 360 390 420 450 480 510 540 570
时间(s)

图10

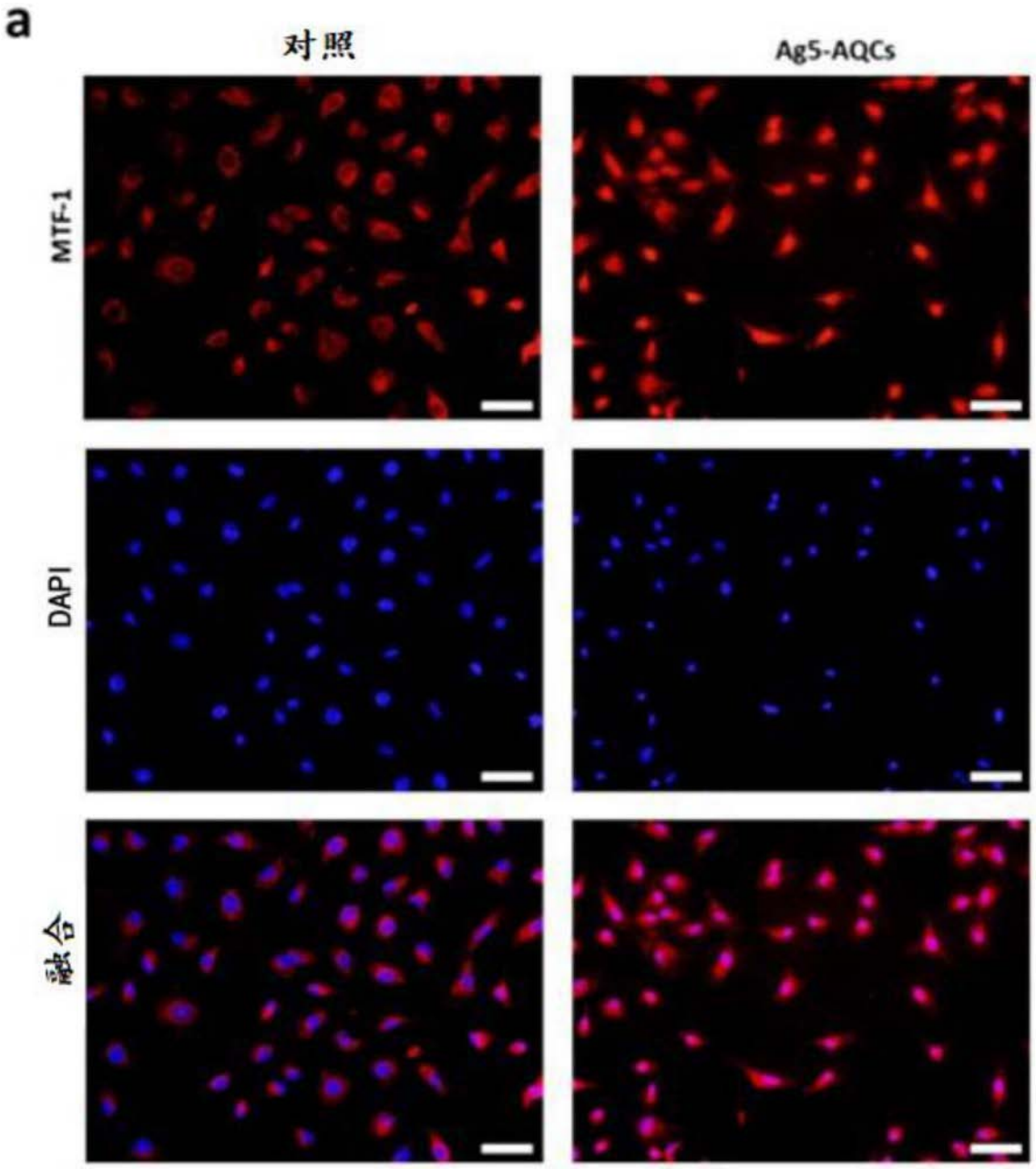


图11

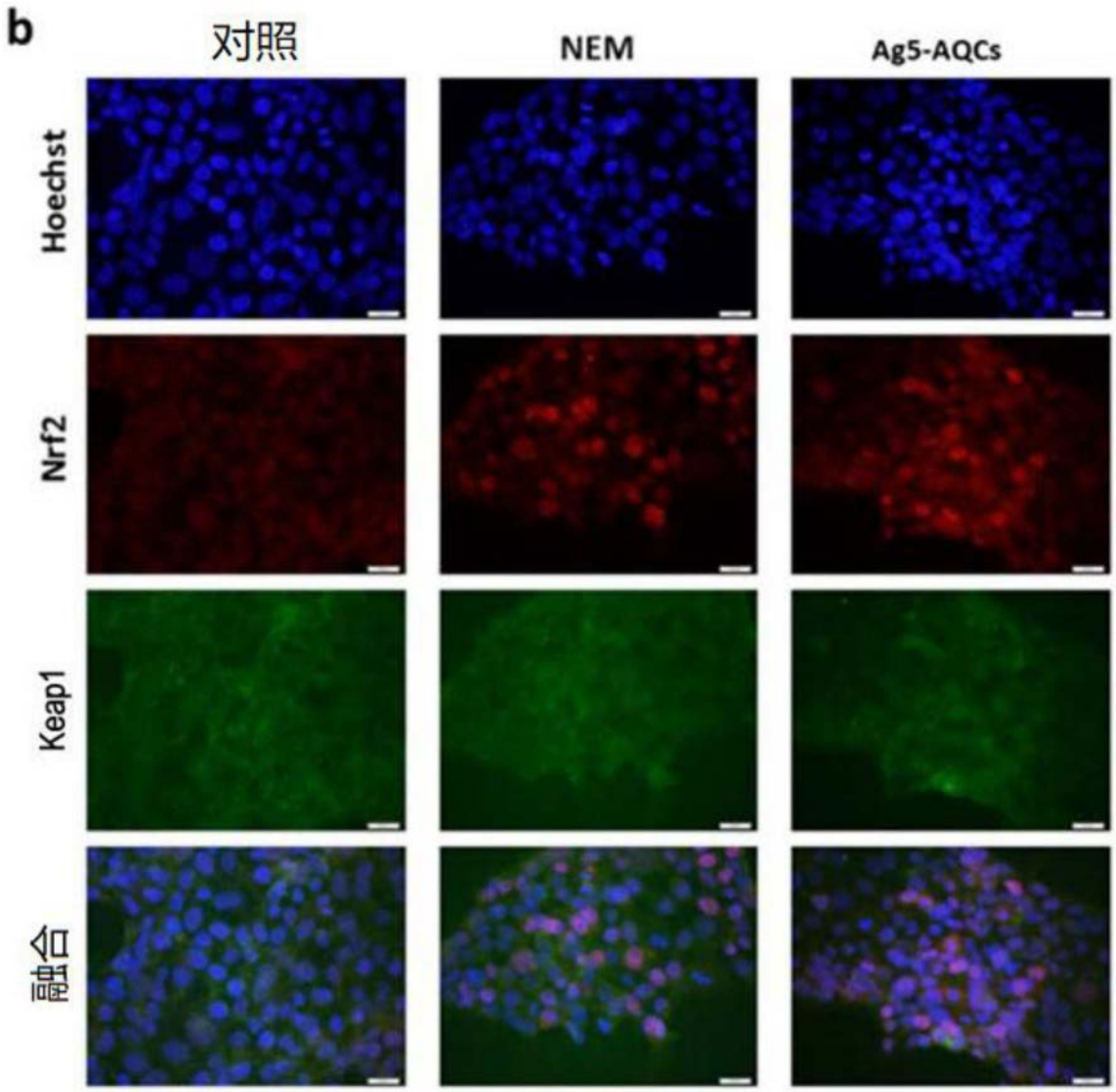


图11(续)

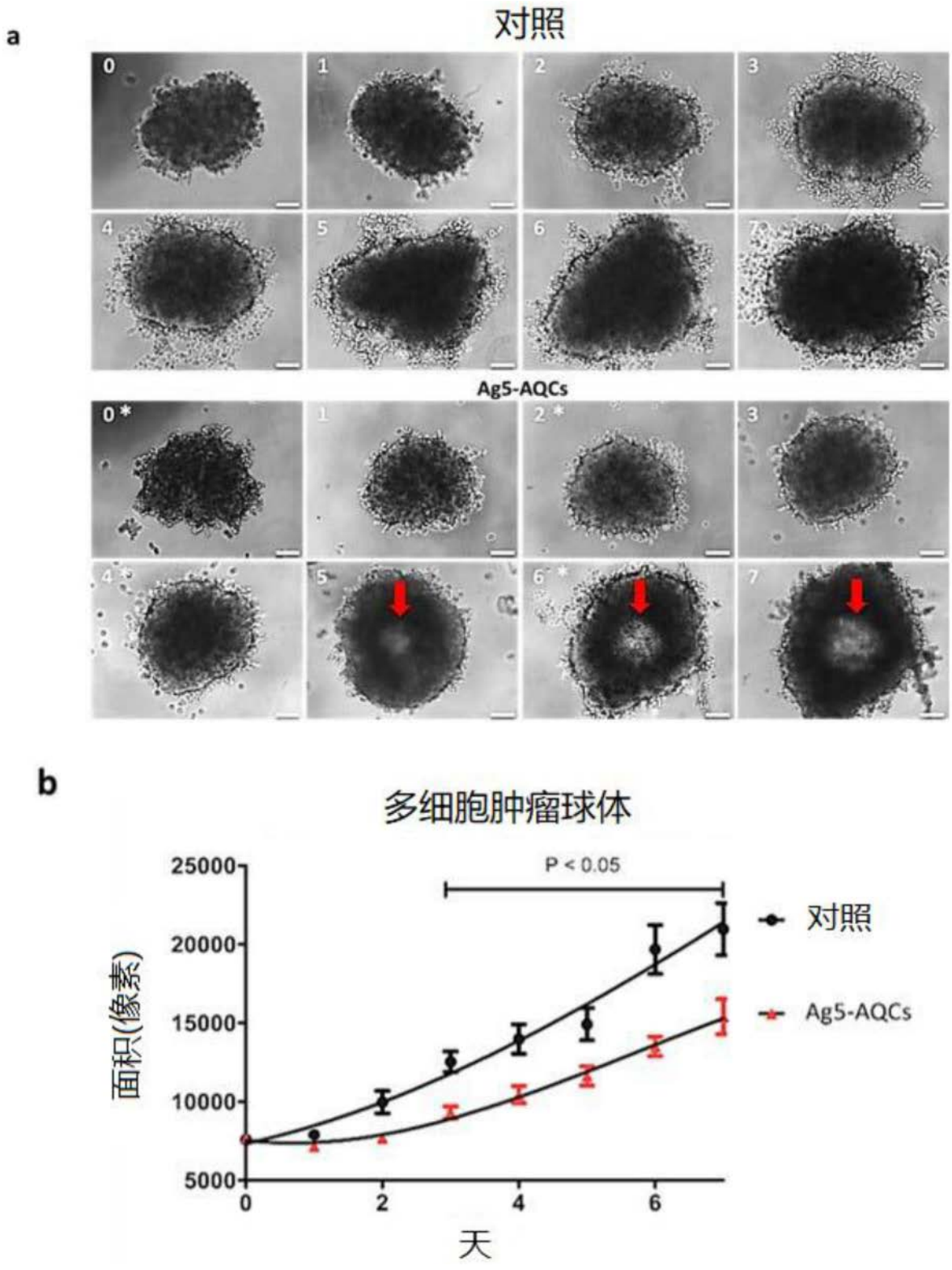

a
对照
0
1
2
3
4
5
6
7
Ag5-AQCs
0*
1
2*
3
4
5
6*
7
b
多细胞肿瘤球体
P < 0.05
25000
20000
15000
10000
5000
面积(像素)
0
2
4
6
天
对照
Ag5-AQCs

图12

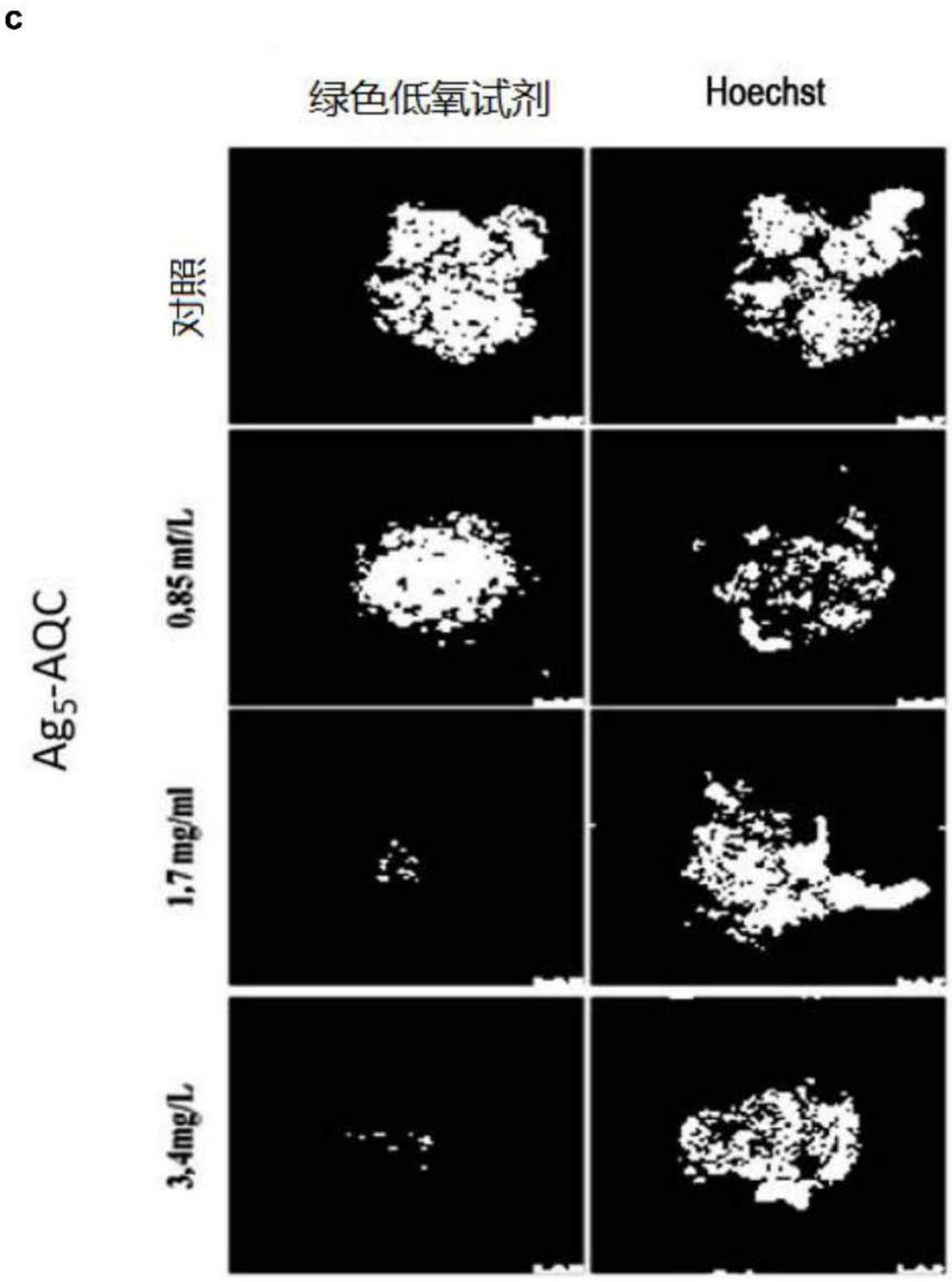


图12(续)

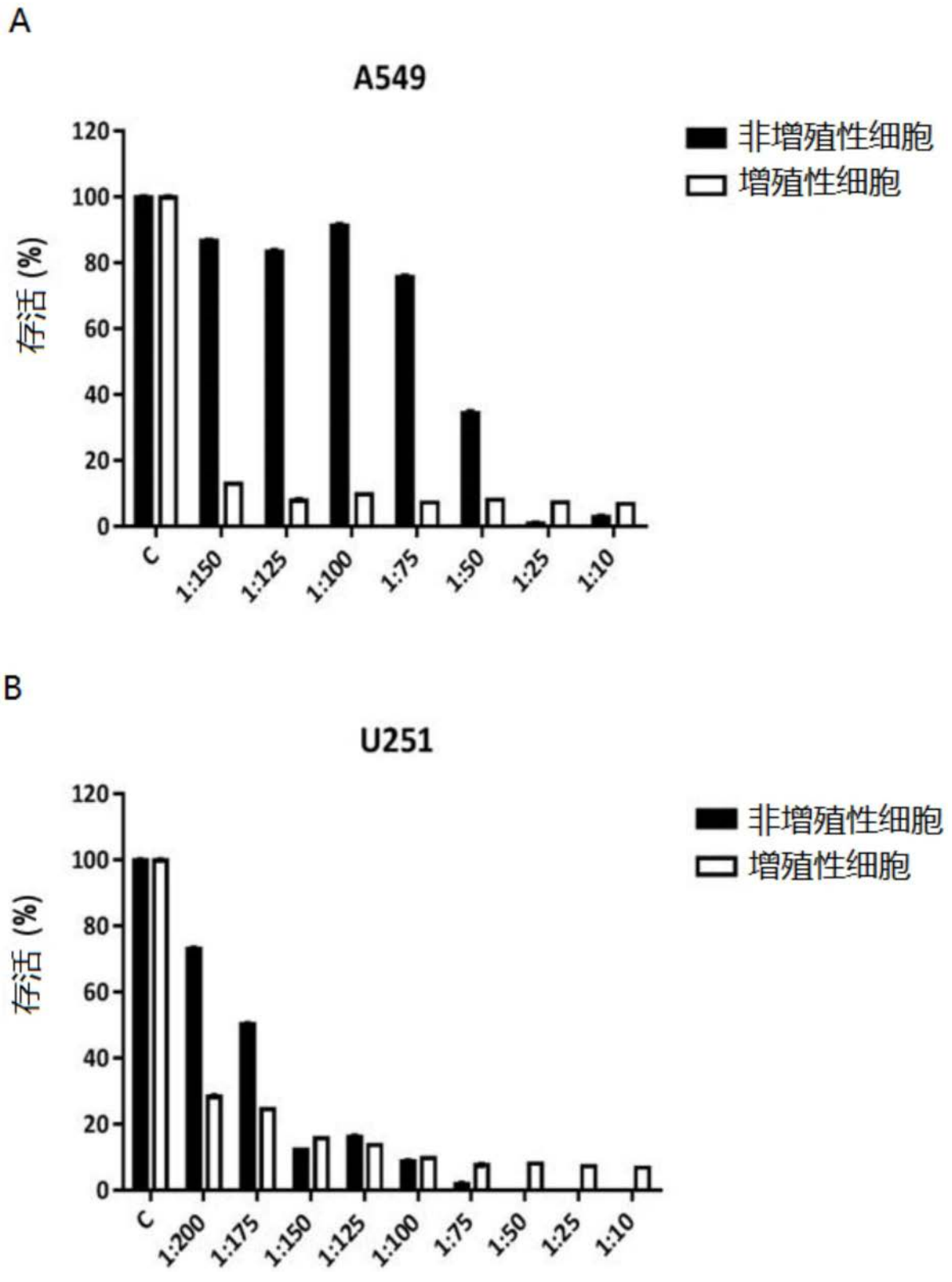
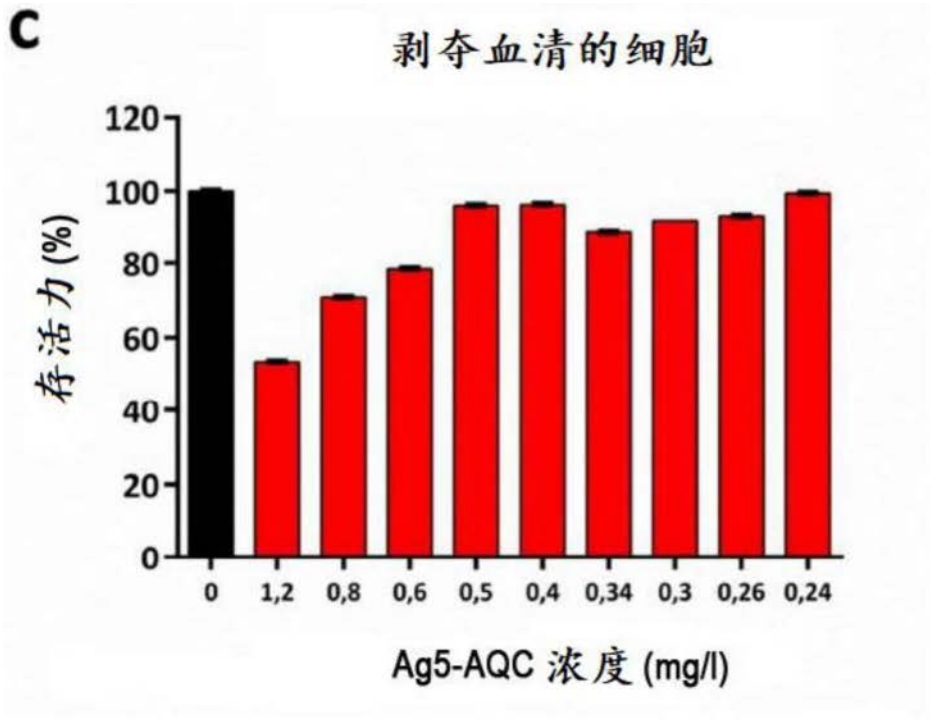

A
A549
非增殖性细胞
增殖性细胞
存活 (%)
120
100
80
60
40
20
0
C
1:150
1:125
1:100
1:75
1:50
1:25
1:10
B
U251
非增殖性细胞
增殖性细胞
存活 (%)
120
100
80
60
40
20
0
C
1:200
1:175
1:150
1:125
1:100
1:75
1:50
1:25
1:10

图13


C
剥夺血清的细胞
存活力(%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1,2
0,8
0,6
0,5
0,4
0,34
0,3
0,26
0,24
Ag5-AQC 浓度(mg/l)

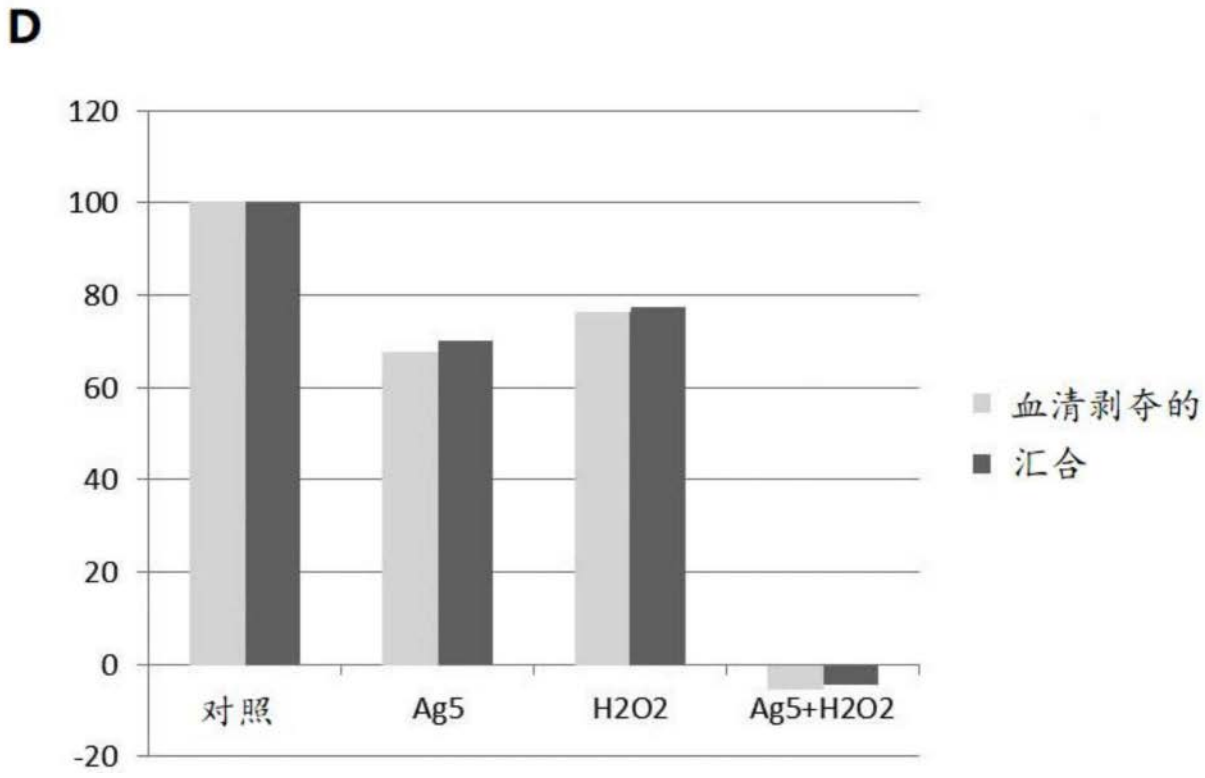

D
120
100
80
60
40
20
0
-20
对照
Ag5
H2O2
Ag5+H2O2
血清剥夺的
汇合

图13(续)

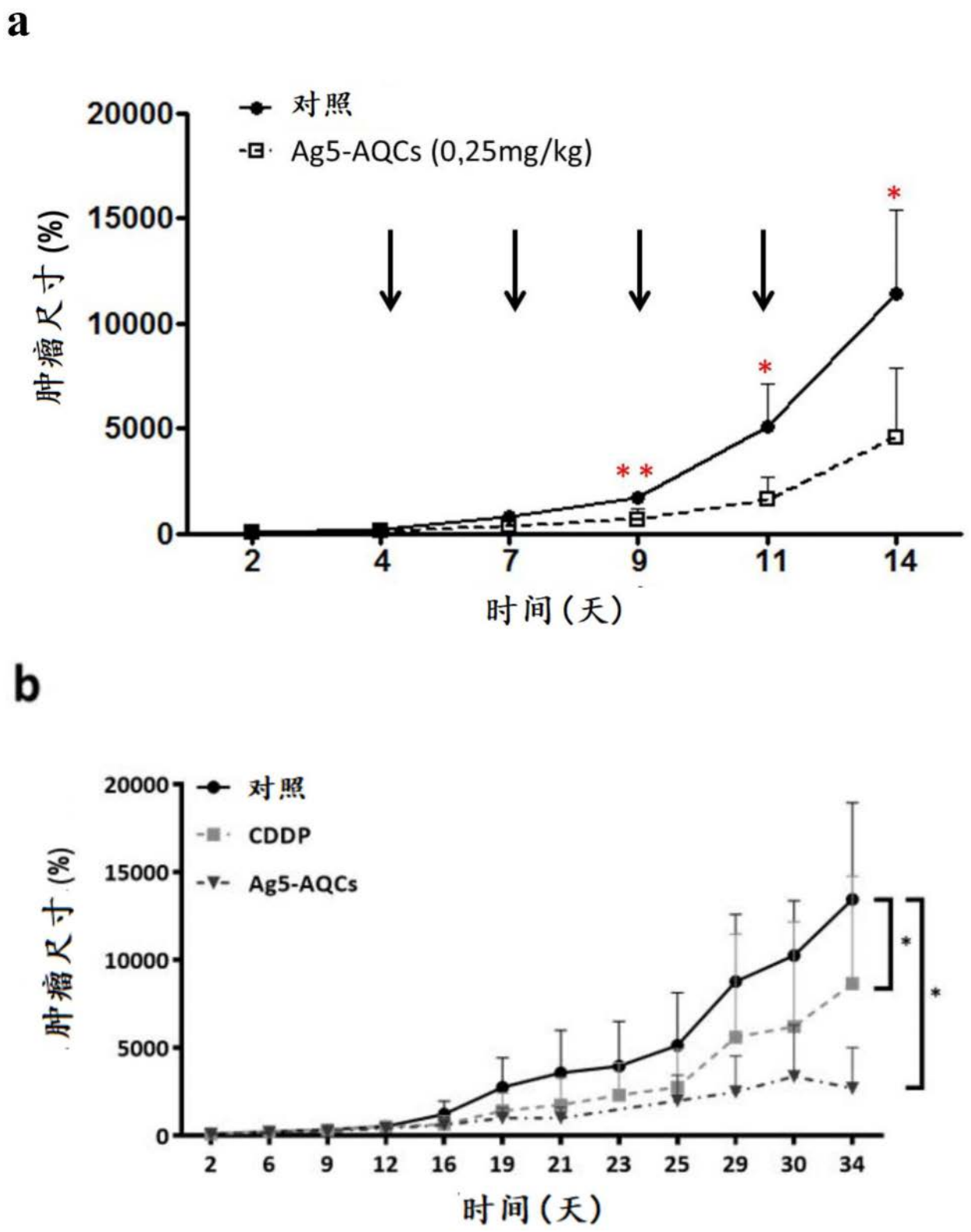
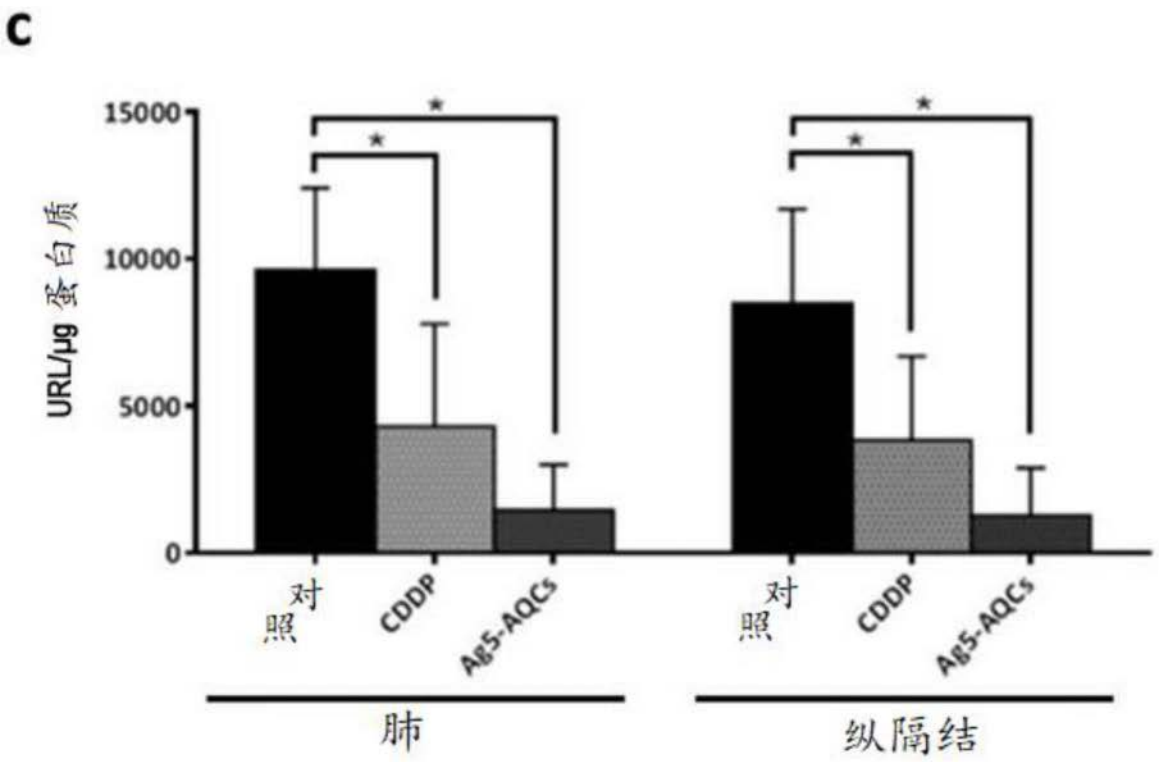

a
对照
Ag5-AQCs (0,25mg/kg)
肿瘤尺寸 (%)
20000
15000
10000
5000
0
2
4
7
9
11
14
时间 (天)
b
对照
CDDP
Ag5-AQCs
肿瘤尺寸 (%)
20000
15000
10000
5000
0
2
6
9
12
16
19
21
23
25
29
30
34
时间 (天)

图14


c
15000
10000
5000
0
URL/μg 蛋白质
对照
CDDP
Ag5-AQCs
肺
纵隔结

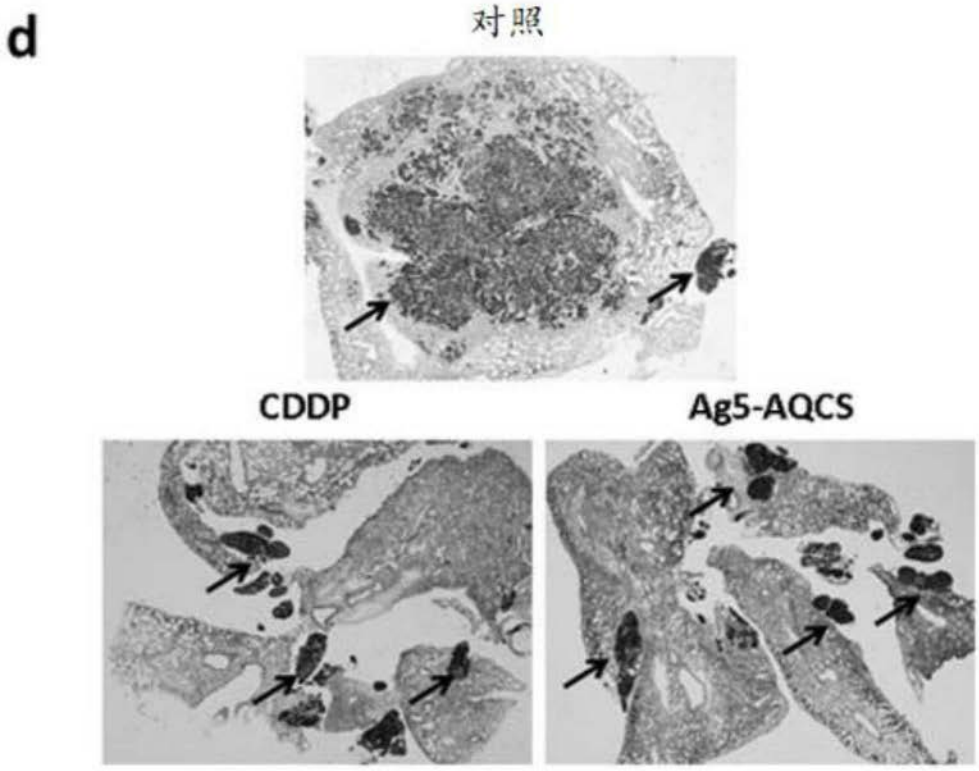

d
对照
CDDP
Ag5-AQCS

图14(续)

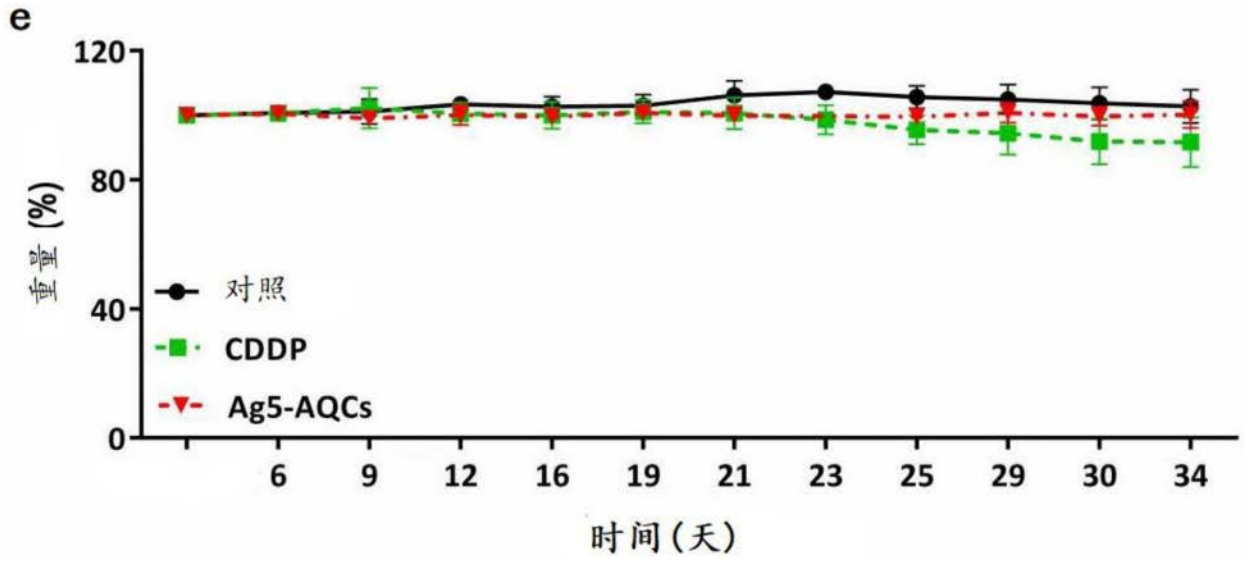

e
120
80
40
0
体重 (%)
对照
CDDP
Ag5-AQCs
6
9
12
16
19
21
23
25
29
30
34
时间(天)

图14(续)

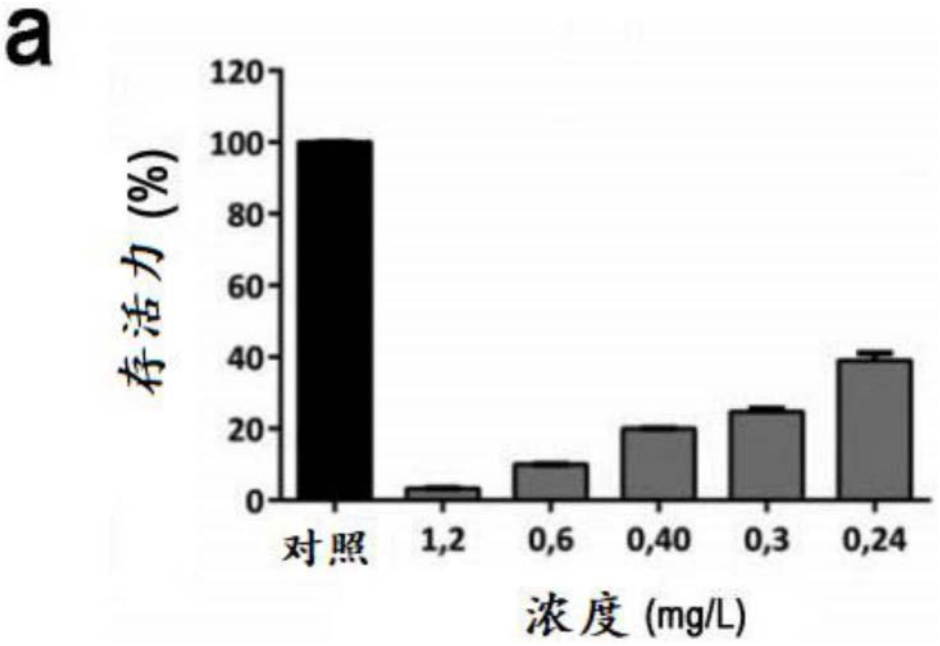

a
120
100
80
60
40
20
0
存活力 (%)
对照
1,2
0,6
0,40
0,3
0,24
浓度 (mg/L)

图15

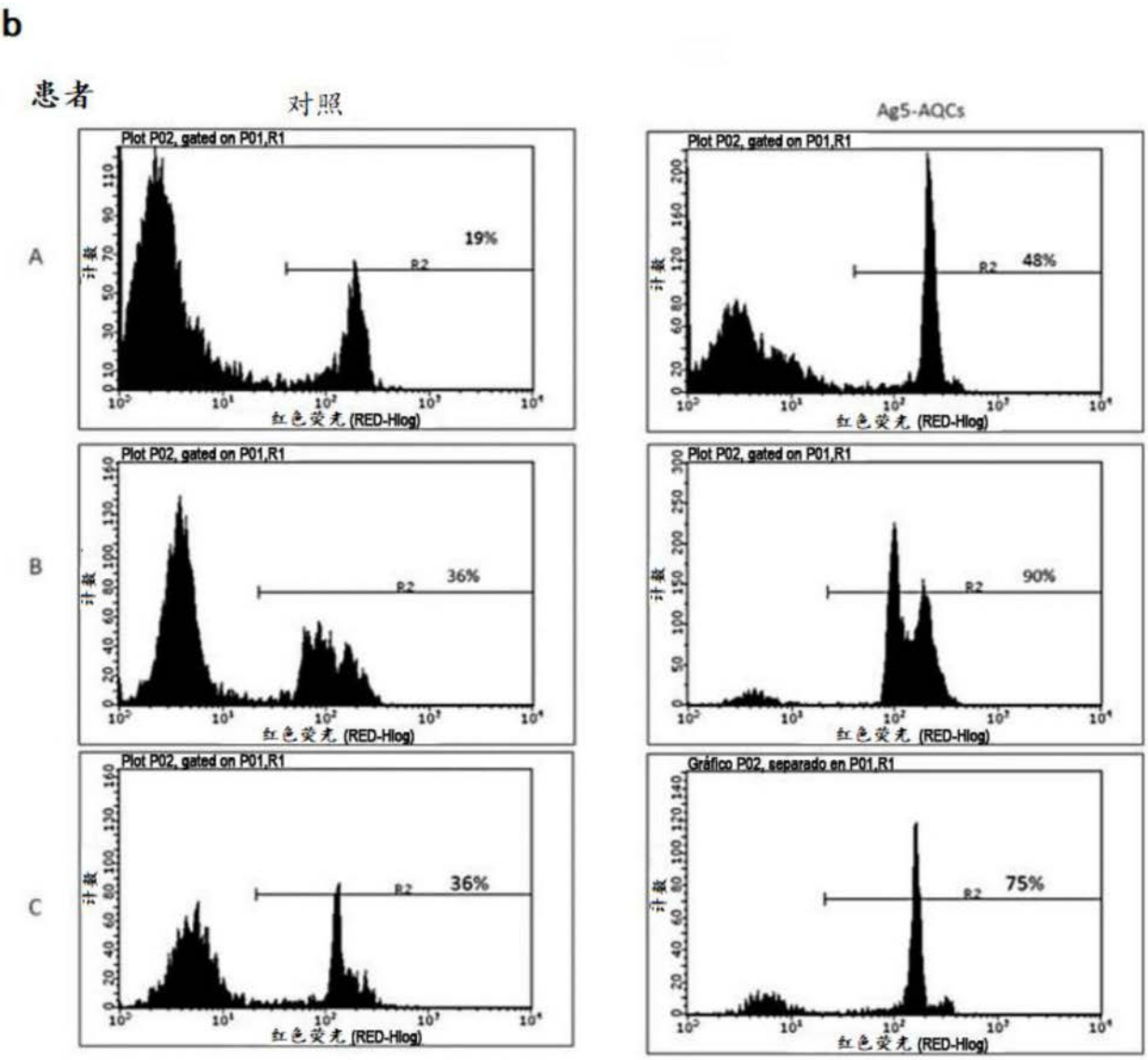

b
患者
对照
Ag5-AQCs
A
B
C
Plot P02, gated on P01,R1
Gráfico P02, separado en P01,R1
19%
48%
36%
90%
36%
75%
R2
计数
红色荧光 (RED-Hlog)

图15(续)

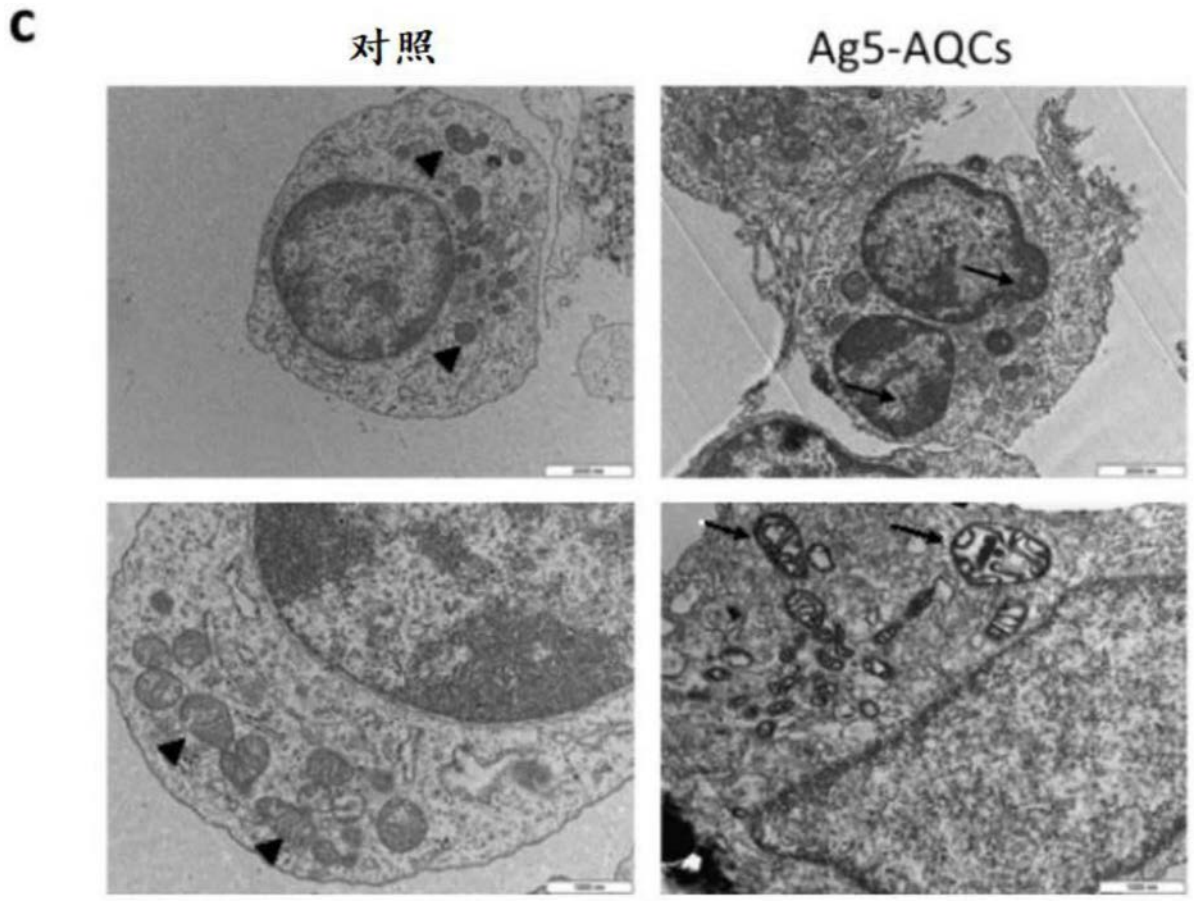


图15(续)

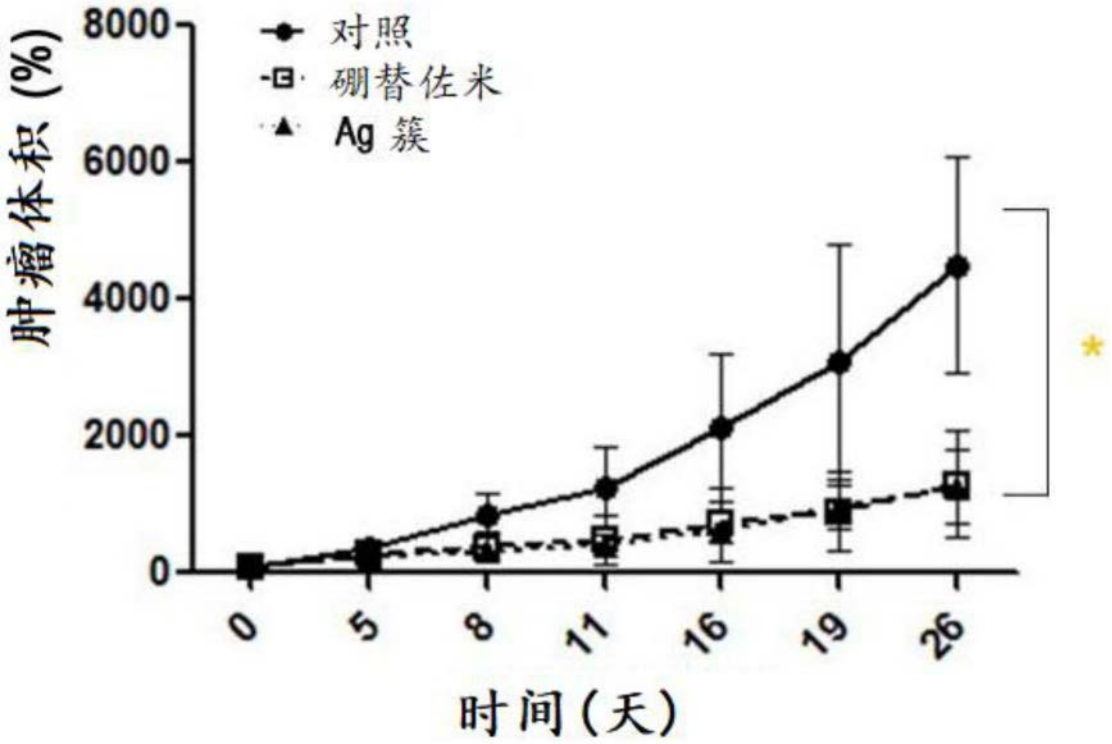


图16

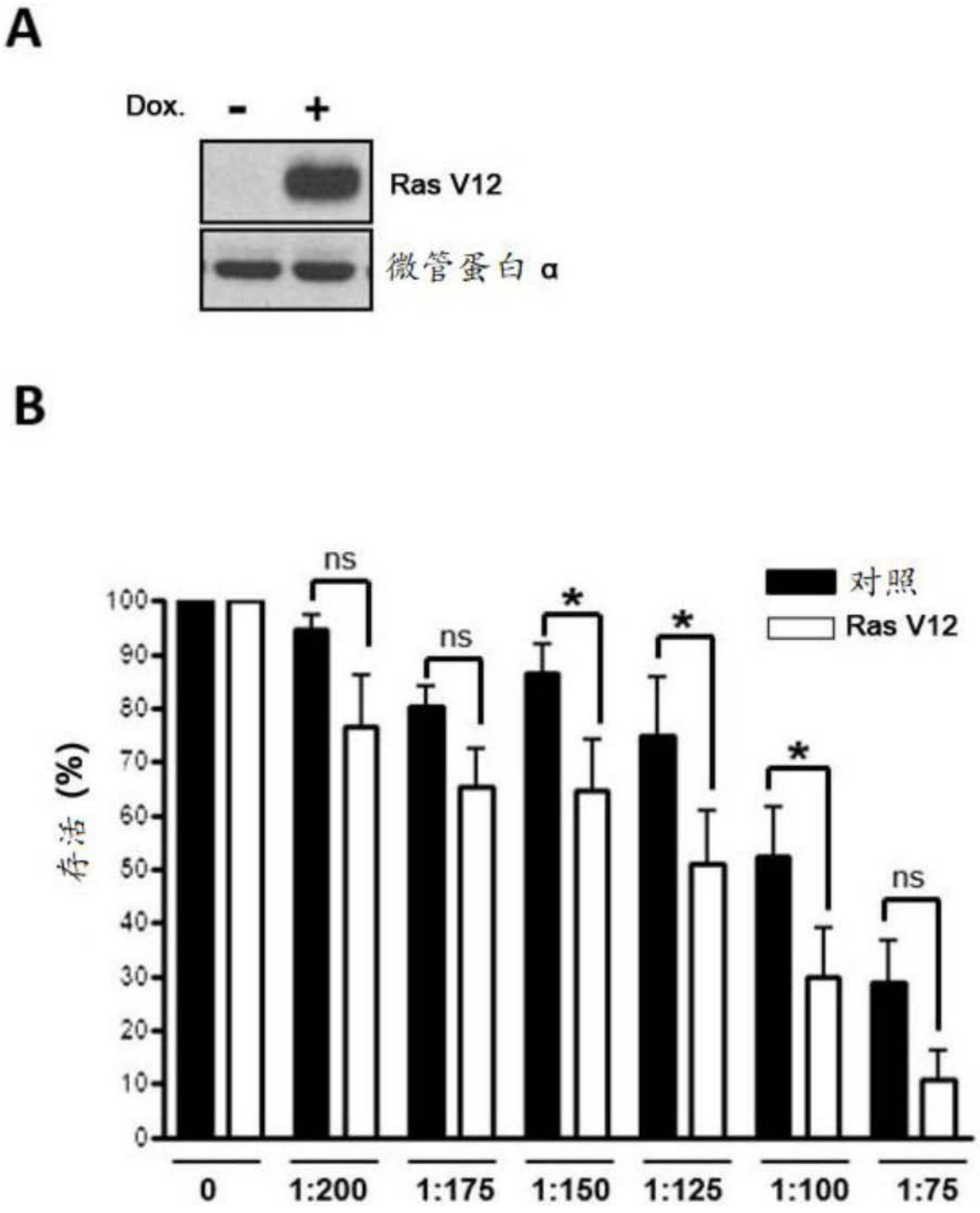

A
Dox.
-
+
Ras V12
微管蛋白 α
B
对照
Ras V12
存活 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ns
ns
*
*
*
ns
0
1:200
1:175
1:150
1:125
1:100
1:75

图17

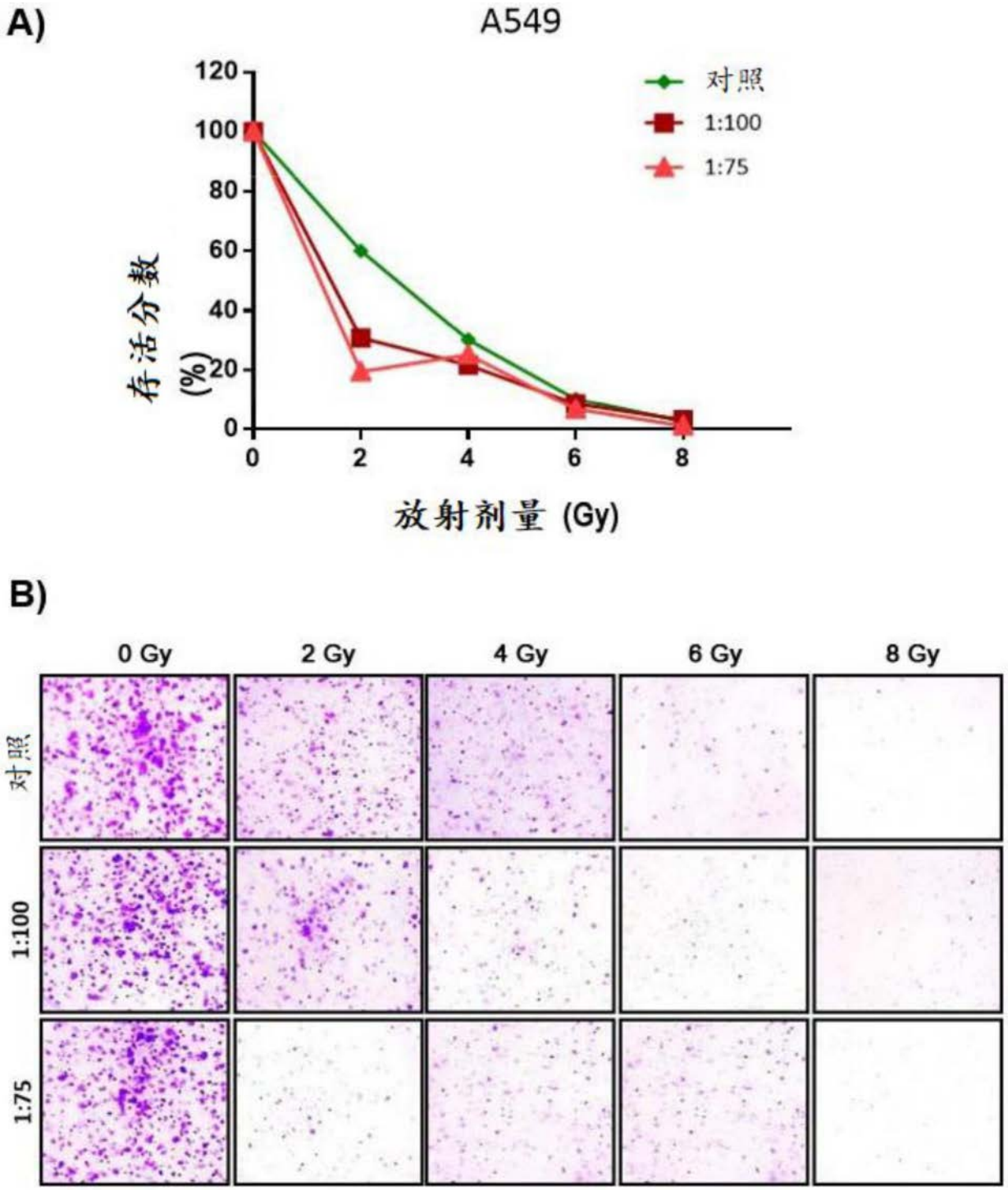

A)
A549
120
100
80
60
40
20
0
存活分数 (%)
0
2
4
6
8
放射剂量 (Gy)
对照
1:100
1:75
B)
0 Gy
2 Gy
4 Gy
6 Gy
8 Gy
对照
1:100
1:75

图18

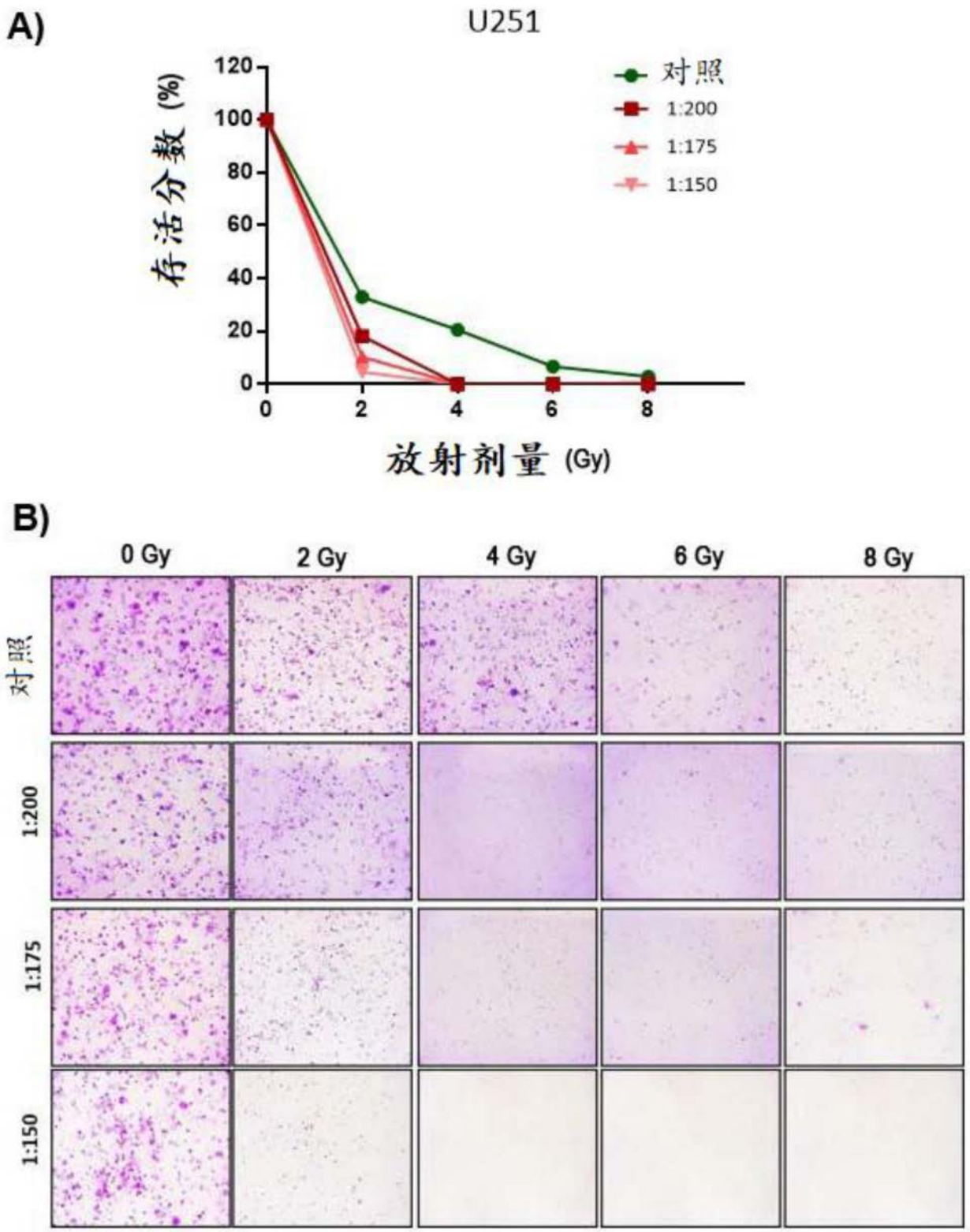

A)
U251
存活分数 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
放射剂量 (Gy)
对照
1:200
1:175
1:150
B)
0 Gy
2 Gy
4 Gy
6 Gy
8 Gy
对照
1:200
1:175
1:150

图19