



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103097397 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201180037346. 3

(22) 申请日 2011. 05. 27

(30) 优先权数据

61/349, 881 2010. 05. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 01. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2011/000610 2011. 05. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/150494 EN 2011. 12. 08

(73) 专利权人 多伦多大学管理委员会

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 莎娜·凯莉 马克·佩雷拉

索纳莉·丰塞卡

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C07K 5/10(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007108749 A1 , 2007. 09. 27,

WO 2009036092 A2 , 2009. 03. 19,

Kristin L. Horton

等. Mitochondria-Penetrating Peptides.

《Chemistry & Biology》. 2008,

审查员 酒向飞

权利要求书1页 说明书15页

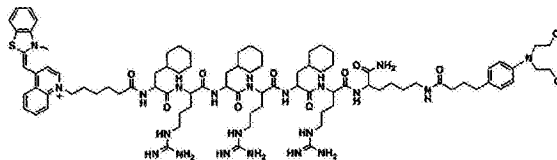
序列表4页 附图12页

(54) 发明名称

作为抗癌化合物载体的线粒体穿透肽

(57) 摘要

在发明描述了包含连接至抗癌化合物的线粒体穿透肽(MPP)的化合物, 以及它们的使用方法。



1. 一种包含连接至抗癌化合物的由 SEQ ID NO. 7 组成的线粒体穿透肽 (MPP) 的化合物, 其中所述抗癌化合物选自由以下组成的组: DNA 嵌入剂、烷化剂、转录抑制剂、DNA 酶抑制剂或 DNA 合成抑制剂。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述抗癌化合物是 DNA 嵌入剂异喹啉生物碱、吡啶、蒽环类或呋喃并香豆素。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述抗癌化合物是 DNA 嵌入剂黄连素、原黄素、道诺霉素、阿霉素、沙利度胺、补骨脂素或溴化乙锭。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述抗癌化合物是烷化剂氮芥、亚硝基脲、硫芥或铂化合物。

5. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述抗癌化合物是烷化剂美法仑、苯达莫司汀、卡莫司汀、二 2- 氯乙基硫醚、硫半芥、顺铂、赛特铂、丝裂霉素、达卡巴嗪、苯丁酸氮芥、米托唑胺或替莫唑胺。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述转录抑制剂是多肽抗生素。

7. 根据权利要求 6 所述的化合物, 其中所述转录抑制剂是放线菌素 D。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述 DNA 酶抑制剂是拓扑异构酶抑制剂。

9. 根据权利要求 8 所述的化合物, 其中所述 DNA 酶抑制剂是依托泊苷、米托蒽醌、安吡啶、替尼泊苷或依列替康。

10. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述 DNA 合成抑制剂是 DNA 类似物。

11. 根据权利要求 10 所述的化合物, 其中所述 DNA 合成抑制剂是氟达拉滨、巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁、克拉屈滨或氟尿苷。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的化合物, 其中所述抗癌化合物连接至所述 MPP 的 C 端。

13. 根据权利要求 1 所述的化合物, 是连接至苯丁酸氮芥的 SEQ ID NO. 7。

14. 一种药物组合物, 包含权利要求 1-13 中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

15. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的化合物在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

16. 一种由 SEQ ID NO:7 组成的肽。

作为抗癌化合物载体的线粒体穿透肽

技术领域

[0001] 本发明涉及定位至线粒体的可穿透细胞的肽和它们作为抗癌化合物载体的应用。

背景技术

[0002] 线粒体的产能能力取决于限制离子或其他小分子透过的屏障的保存。线粒体内膜的高疏水性、紧密堆积结构对大多数分子种类是不可透过的——对于指导氧化磷酸化的质子泵送关键的性质¹。内膜的不透过性已阻碍了可以靶向线粒体的其他重要生物学功能(凋亡触发)的药物分子的递送²。考虑到已在多种癌细胞中观察到了耐凋亡性³，能够通过将凋亡因子靶向线粒体来干涉可以使得新的抗癌剂策略能够发展。

发明内容

[0003] 根据一个方面，提供了包含连接至抗癌化合物的线粒体穿透肽(MPP)的化合物。

[0004] 根据另外的方面，提供了本文中描述的用于治疗癌症的化合物。

[0005] 根据另外的方面，提供了包括在本文中描述的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0006] 根据另外的方面，提供了包括在本文中描述的多种化合物的化合物库。

[0007] 根据另外的方面，提供了治疗癌症的方法，包括给予受试者治疗有效量的本文中描述的组合物。

[0008] 根据另外的方面，提供了在本文中描述的化合物在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

[0009] 根据另外的方面，提供了在本文中描述的组合物用于治疗癌症的应用。

[0010] 根据另外的方面，提供了在癌细胞中诱导凋亡的方法，包括给予治疗有效量的本文中描述的组合物。

附图说明

[0011] 参照以下描述和附图可以很好地理解本发明的实施方式。在描述和附图中，类似的数字指的是类似的结构或过程。在附图中：

[0012] 图1示出了mt-Cb1的线粒体定位和毒性。(A)用于研究线粒体药物定位的荧光标记的mt-Cb1结合物的结构。在所有其他测定中，乙酰基在肽N端取代噻唑橙(to)荧光基团。(B)如通过分离的线粒体的免疫金染色法和TEM成像观测的，MPP在线粒体基质中的定位。在分离的小鼠线粒体内观测到相应于生物素化肽的定位的金纳米颗粒(注意电子密集、较暗区表示在用于染色的条件下的线粒体基质)。(C)100s线粒体的结果的定量为主要的基质定位提供了定量证据。(D)与Mitotracker633相比，to-mt-Cb1在活的海拉细胞中的细胞内定位。(E)在温育24小时之后mt-Cb1对海拉细胞的毒性。(F)用在海拉细胞中Cb1靶向线粒体观察的提增加水平的超氧化物。MitoSOX染色以及通过流式细胞仪的评估与提高的超氧化物一致。(G)Cb1的线粒体递送使海拉细胞中的线粒体膜去极化。通过

JC-1 染色的流式细胞术分析线粒体膜电势。绘制平均值, $n=3$, 误差棒是平均数标准误差。双尾 t - 检验用于确定 P 值。

[0013] 图 2 示出了 Cb1 和 mt-Cb1 在不同的细胞器中引起 DNA 损伤。相对扩增 17.7kb 的核 DNA 区段, 和 8.9kb 的线粒体 DNA 区段。在 PCR 分析之前用 Cb1 (150 μ M) 或 mt-Cb1 (3 μ M) 处理 HL60 细胞 2 小时。损伤 /10kb 值包含在图示的条棒之上。

[0014] 图 3 示出了响应于由 Cb1 和 mt-Cb1 造成的 DNA 损伤不同的基因表达曲线。(A) 涉及检测 DNA 损伤和诱导凋亡的基因的定量 PCR 阵列用于评估用 LC25 剂量的 Cb1 或 mt-Cb1 处理 2 或 24 小时的 HL60 细胞的 RNA 表达曲线。为了评估连接酶 III 的表达, 用 LC50 剂量的 Cb1 或 mt-Cb1 处理细胞 1 小时。从 mt-Cb1 结果中减去 *MPP 表达改变。绘制平均值, $n=3$, 误差棒等于 SEM。(B) 具有大于 ≥ 4 倍表达改变的定量 PCR 阵列高亮击中(hit)的结果。(C) 定量 PCR 击中的蛋白表达水平。在用免疫印迹法评估蛋白水平之前用 LC25 剂量的 Cb1 (17 μ M) 或 mt-Cb1 (3 μ M) 处理 HL60 细胞。除了 DDIT3 水平以外, 在 2 小时处理之后进行所有印迹, 它们是在 Cb1 温浴 24 小时之后评估的。 β -肌动蛋白用作加载对照。(D) 涉及 mt-Cb1 毒性的 GADD45G 途径效应物蛋白的表达水平。用 Cb1、MPP、或 mt-Cb1 处理 HL60 细胞, 并且使用免疫印迹法来评估蛋白水平。 β -肌动蛋白用作加载对照。GADD45G 途径的下游蛋白, JNK 和 p38, 显示当 Cb1 和 mt-Cb1 处理时是上调的。此外, 当 mt-Cb1 活化 JNK 时, Cb1 似乎活化 p38。

[0015] 图 4 示出了 MPP-Cb1 活性的评估和初级 CLL 细胞的治疗窗。(A) 在 LC25 和 LC50 下, 在红细胞(RBC) (健康供体)、外周血干细胞(PBSC) (健康供体)、单核细胞(健康供体) 和 CLL 患者细胞中评估的 Cb1 和 MPP-Cb1 活性。与来源于健康供体的那些细胞相比较, Cb1 和 MPP-Cb1 两者对于 CLL 患者样品细胞具有较高选择性毒性。通过膜联蛋白 V/ 塞特克思红(Sytox red) 细胞染色来测定活力百分比。发现在本实验中使用的浓度下, 含有 Cb1 和 MPP-Cb1 的 RBC 的溶血活性是最小的。绘制平均值, $n>5$, 误差棒是平均数标准误差。双尾 t - 检验用于确定 P 值。(B) 外周血细胞、单核细胞、和 CLL 患者细胞的 MPP 吸收以及线粒体膜电势。通过流式细胞术测定的噻唑橙(to)-MPP 的吸收显示了 CLL 细胞中较高水平的肽吸收。如通过 JC-1 染色的 FACS 分析测定的线粒体膜电势(降低的 JC-1 比表示较低的线粒体膜电势) 表明与来自健康供体的 PBSC 和单核细胞相比, CLL 患者细胞较高的线粒体膜电势。绘制平均值, $n=3$, 误差棒是平均数标准误差。

[0016] 图 5 示出了在显示耐药性和耐凋亡的细胞系中 MPP-Cb1 的毒性。(A) MPP-Cb1 对白血病细胞系组(M2、K562、HL60、和 U937) 的毒性。绘制平均值, $n>3$, 误差棒是平均数标准误差。插图: 用 6 μ M 的 MPP-Cb1 处理后 HL60 膜联蛋白 V-FITC (A-FITC)/ 塞特克思红(Sytox Red) (SR) 细胞染色的 FACS 分析。示出了在各象限中的群体(population)百分数(A-FITC-/SR- : 活的; FITC+/SR- : 凋亡; A-FITC-/SR+ : 坏死; A-FITC+/SR+ : 死亡)。(B) Cb1 对白血病细胞系的毒性示出了两种不同的群体, HL60 和 U937 对 Cb1 敏感, K562 和 M2 耐 Cb1。插图与部分(a) 相同, 但是使用 34 μ M 的 Cb1。(C) 在耐 Cb1 细胞系中的耐凋亡性。如通过膜联蛋白 V/ 塞特克思红染色的细胞(黑色棒) 的 FACS 分析测定的白血病细胞系对星状孢子素的响应。图示了活细胞的百分率。与 HL60 和 U937 相比较, 在 K562 和 M2 细胞系中星状孢子素处理诱导较少的细胞死亡。K562 和 M2 细胞系显示较高水平的 Bcl-XL 表达(白色棒) (针对蛋白质印迹参见图 6)。(D) 在 WT 或耐 Cb1 细胞(Cb1R) 中 MPP-Cb1 的毒性。

细胞与(A)中的相同。单独的 Cb1 没有显示 Cb1R 中凋亡细胞群体的增加,然而,对于 WT 和 Cb1R 细胞系两者都检测到了用 MPP-Cb1 处理的凋亡响应。

[0017] 图 6 示出了在白血病细胞系中 Bcl_{XL} 和 β -肌动蛋白水平的蛋白质印迹。如上文描述的进行蛋白印迹分析。通过 BCA 测定法来测定总蛋白水平,并且如用 β -肌动蛋白加载对照所看到的,将相等的蛋白加入各孔中。

[0018] 图 7 示出了 Cb1 和 MPP-Cb1 之间在 A2780 野生型细胞中 LC50 的比较。如上所述,用 Cb1 (右侧曲线)和 MPP-Cb1 (左侧曲线)来处理 A2780 野生型细胞。用 CCK8 测定法来分析毒性。

[0019] 图 8 示出了通过 mt-Cb1 的 DNA 烷基化。(A)在细胞固定之后 Cb1 保持线粒体中的 MPP。用活的海拉细胞温育荧光标记的 mt-Cb1 和对照肽(MPP),并在未固定的细胞中观察线粒体定位。在固定和穿透条件下,mt-Cb1 保持线粒体定位而 MPP 扩散至细胞核和细胞质。此后,用脱氧核糖核酸酶(10 单位)温育细胞以催化 DNA 的裂解。用脱氧核糖核酸酶处理致使 mt-Cb1 定位的扩散。(B)mt-Cb1 的烷基化活性。当用 Cb1 烷基化时通过测定 4-(4-硝基苄基)吡啶的吸光度来监测烷基化活性。与单独的 Cb1 相比,连接靶向线粒体的肽使结合的苯丁酸氮芥的烷基化能力降低了约 2 倍。(C)通过 mt-Cb1 和 Cb1 交联分离的 DNA。用不同浓度的 mt-Cb1 或 Cb1 (2-200 μ M) 处理 DNA 致使浓度依赖性交联形成(左)。通过 mt-Cb1 和 Cb1 (右)的时间依赖性 DNA 交联(从 5-60min 改变)。

具体实施方式

[0020] 在以下描述中,给出了许多详细描述以提供对本发明的透彻理解。然而,应理解的是可以在没有这些具体描述的情况下实施本发明。

[0021] 难以进入线粒体基质已限制了抗癌剂的治疗靶向该细胞器。在此,我们报道了使用合成肽载体将烷化剂苯丁酸氮芥成功递送至线粒体。该药剂的线粒体靶向性显著增强了其活性,并且促使多种癌细胞系以及具有保留活性的患者样品,甚至具有耐药性或不能触发凋亡的细胞中的凋亡细胞死亡。

[0022] 根据一个方面,提供了包含连接至抗癌化合物上的线粒体穿透肽(MPP)的化合物。

[0023] “抗癌化合物”包括用于治疗癌症所给予的任何物质。典型地,大多数化学治疗药物可以分为烷化剂、抗代谢物、蒽环类、植物碱、拓扑异构酶抑制剂、和其他抗肿瘤剂。根据公开的方面以及与 MPP 结合使用的优选抗癌剂包括以下。

[0024]

作用机制	药物种类	潜在药物的实例
DNA 嵌入剂	异喹啉生物碱	黄连素
	吖啶	原黄素(前黄素)
	蒽环类	道诺霉素
		阿霉素
		沙利度胺
	呋喃并香豆素	补骨脂素
	其他	溴化乙锭
烷化剂	氮芥	美法仑
		苯达莫司汀
		卡莫司汀
	亚硝基脲	二(2-氯乙基)硫醚
	硫芥	硫半芥
		顺铂
	铂化合物	赛特铂 (satraplatin)
		丝裂霉素
	包含吖丙啶的物质	达卡巴嗪
	其他	米托唑胺
转录抑制剂	多肽抗生素	替莫唑胺
DNA 酶抑制剂	拓扑异构酶抑制剂	放线菌素 D
		依托泊苷
		米托蒽醌
		安吖啶
		替尼泊苷
DNA 合成抑制剂	DNA 类似物	依列替康
		氟达拉滨
		巯嘌呤
		硫鸟嘌呤
		喷司他丁
		克拉屈滨
酶抑制剂	谷胱甘肽 S-转移酶抑制剂	氟尿苷
		依他尼酸
	ATP 合酶抑制剂	寡霉素

[0025] 在一些实施方式中,抗癌剂连接至 MPP 的 C 端。

[0026] 在其他实施方式中,抗癌剂连接至 MPP 的 N 端。

[0027] 在一个实施方式中,该化合物是 F_xr3-Cbl。

[0028] 优选本发明的 MPP 具有正电荷和亲脂性(在本文中确定的对于穿过质膜和线粒体膜重要的性质)。因此,MPP 含有阳离子和疏水性残基以提供带正电荷的亲脂性,这有助于通过质膜和线粒体膜。阳离子氨基酸如赖氨酸(K)、精氨酸(R)、氨基苯丙氨酸、和鸟氨酸可以结合到 MPP 中以提供正电荷,而疏水性残基如苯丙氨酸(F)、环己基丙氨酸(Fx)、氨基八精氨酸(animo-octaarginine) (Hex)、二苯基丙氨酸(F₂)、和 (1-萘基)-L-丙氨酸(Nap)可以结合到 MPP 中以赋予亲脂性。虽然在 MPP 内带电荷的和疏水性残基的排列没有特别限制,只要 MPP 具有适当的电荷和亲脂性以穿过质膜和线粒体膜即可,但是 MPP 可以包括交替的带电荷的和疏水性残基以增加 MPP 内的亲脂性水平。

[0029] 如本领域技术人员将理解的,可以使用已建立的肽合成技术(包括自动或手动技

术)来制备根据本发明的MPP,。

[0030] MPP 的长度没有具体限制,但是通常具有适合穿过质膜和线粒体膜的长度,单独地或连接至另一种物质上,如生物制剂(如将描述的)。通常,MPP 将由 4-20 个残基组成。

[0031] MPP 可以包括一个或多个改性以赋予 MPP 期望的性质的残基,例如,提高的细胞内稳定性。在这个方面,例如 MPP 可以包括 d- 立体异构体、和末端修饰如酰胺末端。

[0032] 在一些实施方式中,MPP 可以穿过线粒体的内膜,优选以电势依赖的方式。

[0033] 在一些实施方式中,MPP 包括 +3 的电荷和至少约 -1.7 的 logP 值。

[0034] 在其他实施方式中,MPP 包括 +5 的电荷和至少约 -2.5 的 logP 值。

[0035] 优选地,MPP 是 SEQ ID NO:1-7 中的任何一种。

[0036] 根据另外的方面,提供了在本文中描述的用于治疗癌症的化合物。

[0037] 根据另外的方面,提供了包括在本文中描述的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0038] 根据另外的方面,提供了包括多种在本文中描述的多种化合物的化合物库。

[0039] 根据另外的方面,提供了治疗癌症的方法,包括给予受试者治疗有效量的本文中描述的组合物。

[0040] 根据另外的方面,提供了在本文中描述的化合物在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

[0041] 根据另外的方面,提供了在本文中描述的组合物用于治疗癌症的应用。

[0042] 根据另外的方面,提供了在癌细胞中诱导凋亡的方法,包括给予治疗有效量的本文中描述的组合物。

[0043] 如在本文中使用的,“药学上可接受的载体”是指生理学相容的任何一种或全部的溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂,等等。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇,等等,以及其组合中的一种或多种。在很多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如,糖,多元醇如甘露醇、山梨糖醇,或氯化钠。药学上可接受的载体可以进一步包括少量的辅助性物质如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,它们增加药剂的货架期或效力。

[0044] 如在本文中使用的,“治疗有效量”是指在必要的剂量和特定的持续时间下实现期望的治疗结果的有效量。药剂的治疗有效量可以根据多种因素而改变,例如个体的病状、年龄、性别、和体重,以及药剂在个体体内引起期望的反应的能力。治疗有效量也是治疗有益效果超过药剂的任何毒性或有害效果的量。

[0045] 以下实施例是本发明各个方面的示例性说明,并不限制如在本文中披露的本发明的广泛的方面。

[0046] 实施例

[0047] 方法

[0048] 细胞培养条件。在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下,在用 10% (v/v) 的 FBS 补充的 MEM α (Invitrogen, Carlsbad) 中培养海拉细胞。在 RPMI1640+10% 的 FBS 中培养 U937 细胞,伊思考夫改良型杜尔贝可培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Media)+10% 的 FBS 用于 OCI-AML2、HL60、K562、OCI-M2、LY17 和 Daudi。在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下,在 RPMI1640+10% 的 FBS 中培养 A2780 野生型和耐 Cb1 系,并且一周一次地用 100 μ M 的 Cb1 处理耐 Cb1 系

持续 1 小时以保持耐受性。

[0049] 肽合成和表征。如前描述的^{25,26},使用 Prelude Protein Technologies 肽合成仪在 Rink amide MBHA 树脂(0.7mmol/g,100-200 目)(NovaBiochem)上进行固相合成。以 25 μmol 或 50 μmol 的规模合成肽。如前描述的²⁷,合成噻唑橙(to),并使用处于 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中的 HBTU (4 当量, Protein Technologies, Tucson) (HBTU=O-(苯并三唑-1-基)-N, N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸酯)和 DIPEA (8 当量, Sigma-Aldrich, St.Louis) (DIPEA=N, N-二异丙基乙胺)将其连接至肽上,过夜。使用处于 DMF 中的 HBTU (4 当量)和 DIPEA (4 当量)使苯丁酸氮芥(Sigma-Aldrich, St.Louis)连接至肽上。使用乙酸酐、吡啶、和 DCM (1:5:10, Sigma)使未标记的肽的 N 端加帽(cap)。使肽脱保护,并且使用 TFA: 三异丙基硅烷 :H₂O (95:2.5:2.5)从树脂上切割,并在冰冷的醚中沉淀。在 C18 柱上,处于在 0.1%TFA 中的 H₂O/MeCN 梯度通过 RP-HPLC 将全部肽纯化至 >95%,并通过电喷射离子化质谱证实身份(identity)。纯化后立即在液氮中快速冷冻包含苯丁酸氮芥的肽,并冻干至干燥。使用 63,000M⁻¹cm⁻¹的消光系数²,在 500nm 下定量噻唑橙标记的肽。使用 15200M⁻¹cm⁻¹的苯丁酸氮芥消光系数²⁸,在 258nm 下定量苯丁酸氮芥连接的肽。使用 BCA 测定法(Pierce, Rockford)来定量未标记的肽。

[0050] 表 1、肽结合物列表

[0051]

化合物	肽序列
to-mt-Cb1	TO-F _x rF _x rF _x rk-Cb1
mt-Cb1 或 MPP-Cb1	Ac-F _x rF _x rF _x rk-Cb1
MPP	Ac-F _x rF _x rF _x r
to-MPP	TO-F _x rF _x rF _x r
生物素-MPP	生物素-F _x rF _x rF _x r
生物素-mt-Cb1	Cb1-F _x rF _x rF _x rk-生物素

[0052] 共焦显微术——活细胞。在实验前一天,在 8 孔 μ -玻片(μ -slides)(iBidi, 德国)中以 25,000 个细胞/孔的密度接种细胞。在用 2% (v/v) 的 FBS 补充的 OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad) 中进行肽温育(5 μM)持续指定时间。当说明时,加入 Mitotracker633 (Invitrogen, Carlsbad)持续温育的最后 20min。然后洗涤细胞两次并使用倒置 Zeiss LSM510 共焦显微镜成像。

[0053] 共焦显微术——固定的细胞。如上平铺海拉细胞并在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下,用处于不含酚红的 MEM α 中的 5 μM 肽处理 5min。然后去除肽溶液并在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下,用新鲜培养基置换持续 25 分钟。用 PBS 洗涤细胞两次并在 -20° C 下用丙酮温育 10min。再次用 PBS 洗涤细胞两次,并在 4° C 下用 0.1% 的 Triton X-100 温育 5min,用 PBS 洗涤并如上成像。当说明时,在成像之前,在 37° C 下用处于 1x 脱氧核糖核酸酶缓冲液中的 10 个单位的脱氧核糖核酸酶温育细胞 2 小时。

[0054] TEM 成像。如前描述的¹,从新鲜小鼠肝脏中分离线粒体。使用呼吸测量法证实功能性。仅当在状态 III 呼吸(存在 ADP)下的氧消耗水平高于在状态 II 呼吸下的 >4 倍时(表明良好结合的线粒体),才使用分离的细胞器。通过 BCA 测定法(Sigma)来确定线粒体的蛋白质浓度。在 PBS 中将线粒体稀释至 0.5mg/mL,并在 25° C 下用生物素 -F_xrF_xrF_xr 温育 20 分钟。加入冰冷的 PBS 并且通过离心使线粒体成粒。在室温下将颗粒固定在处于 PBS 中的 1% 戊二醛中持续 90min,用 PBS 洗涤,然后在 4° C 下用 1% 的四氧化锇固定 2hr。使用分级的乙醇使颗粒脱水,随后用环氧丙烷和 Epon-Araldite 树脂逐步渗入。在 60° C 下在树脂中固化颗粒 48 小时。将这些块(block)分割成 60nm,并在 60° C 下将这些部分附着至镍格栅(grid)上持续 30min。在室温下使格栅漂浮在饱和的偏高碘酸钠水溶液中持续 1 小时,洗涤,然后用 1% 的 BSA 封闭,用抗生物素(Jackson Immunolabs)随后用蛋白 A-金(Aurion, 10nm)标记。用水清洗格栅并用 2% 的乙酸双氧铀染色 5 分钟。为了定量金标记,对于每个计数事件,对 200 个金颗粒(用于较高密度标记的样品)或 400 个线粒体(用于较低密度标记的样品)进行计数。每种样品进行最少三次计数事件。在不同的部分上进行计数。

[0055] 毒性分析。在 96 孔平底组织培养板(Starstedt, 德国)中以 12,000 个细胞 / 孔的密度接种海拉细胞。在 96 孔平底板(CellStar, locato)中,以 50,000 个细胞 / 孔的密度接种白血病细胞系(K562、OCI-M2、U937、HL60、AML2、LY17、Daudi)。在 96 孔平底组织培养板(Starstedt, 德国)中,以 25,000 个细胞 / 孔平铺 A2780 野生型和 A2780 耐 Cb1 细胞。去除培养基并洗涤细胞。在细胞适当的培养基中进行肽温育,在 OPTI-MEM 培养基中进行海拉细胞的温育。在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下温育过夜之后,使用 CCK-8 活力染料(Dojindo, Rockville),在 450nm 的吸光度下分析细胞活力。使用 Graphpad Prism 软件(Graphpad, La Jolla)进行统计分析。

[0056] 线粒体的超氧化物水平分析。在实验前 24 小时,以 24 孔板的 100,000 个 / 孔平铺海拉细胞,并用处于 OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad) 中的 Cb1 或 MPP-Cb1 处理 1 小时。去除培养基并根据制造商的说明书用 MitoSox (Invitrogen, Carlsbad) 温育细胞。用 PBS 洗涤细胞,胰蛋白酶消化并用 FACSCanto (BD, Franklin Lakes) 通过流式细胞术进行分析。

[0057] 膜联蛋白 V 凋亡测定。以 24 孔板(Greiner Bio-one, 德国)的 200,000 个细胞 / 孔接种白血病细胞系(K562、OCI-M2、U937、HL60)。在 24 孔板中以 75,000 个细胞 / 孔(BD, Franklin Lakes)的密度平铺 A2780WT 和耐 Cb1 细胞。通过 Ficoll 分离从外周血获得健康供体的单核细胞。以 200,000 个 / 孔(Greiner Bio-one, 德国)平铺 CLL 患者样品、PBSC、和健康供体的单核细胞。一式三份地,用处于细胞适宜培养基中的指示浓度的肽温育细胞。随后在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下温育过夜,根据制造商的说明书,用膜联蛋白 V-FITC (BD Pharmingen, Franklin Lakes) 和塞特克思红(Invitrogen, Carlsbad)将细胞染色。使用 FACSCanto (BD, Franklin Lakes) 进行流式细胞术。通过加入 3 μM 的星状孢子素(Sigma-Aldrich, St. Louis) 并且温育过夜,来实现由星状孢子素诱导的凋亡。

[0058] 蛋白质印迹。如上培养白血病细胞,并在溶解(10mM 的 Tris、200mM 的 NaCl、1mM 的 EDTA (pH7.4)、1mM 的 PMSF、0.5% 的 NP-40、1% 的 Triton X-100、1X 蛋白酶抑制剂混合剂(cocktail) (Bioshop, Burlington, ON) 之前在 4° C 下用 PBS 洗涤两次,30min。然后在 1,200rcf、4° C 下使细胞离心 5min,使用双金鸡宁酸(BCA)测定法(Pierce, Rockford)来定量蛋白质水平。在加载到 15% 的凝胶上之前,在 8x 样品缓冲液中稀释 15 μg 的总

蛋白并且加热至 42° C 持续 5min。在 100V 下跑(run)凝胶 1 小时,然后将蛋白质转移至 100V 的硝酸纤维素膜上持续 40min。用 5% 的脱脂牛奶封闭膜 1 小时,然后根据制造商的说明书用一抗探测(1:500 的 Bcl_{xL} 抗体 [Abeam, Cambridge, Massachusetts]、1:2000 的 β -肌动蛋白抗体 [Abeam]、1:1000 的磷酸化 JNK [Abeam]、1:1000 磷酸化 p38 [Abeam]、1:1000 的 GADD45G [Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California]、1:1000 的 PPP1R15A [Santa Cruz Biotechnology]、1:1000 的 DNA 连接酶 III [Santa Cruz Biotechnology]、1:1000 的 p21 [Santa Cruz Biotechnology]、以及 1:1000 的 DDIT3 [Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts])。然后洗涤膜并在 ECL 化学发光检测 (GE Amersham) 之前用 1:5000 的驴抗小鼠或山羊抗兔 IgG-HRP 二抗温育 1 小时。

[0059] 溶血测定。在健康供体外周血的 Ficoll 分离期间获得的血红细胞用于该测定。用 PBS 洗涤细胞直至上清液澄清。在伊思考夫培养基中制备肽溶液,并横过 96 孔板制备 1:2 的稀释度。对于每个孔,加入 2 μ L 的血红细胞,混和然后在 37° C 和 5% 的 CO₂ 下温育 1 小时。对于 100% 溶解,向 3 个孔中加入 0.1% 的 Triton X-100,对于 0% 溶解,使用不含肽的 3 个孔中的细胞。在 1000x g 下使板旋转 10min,然后将 50 μ L 的上清液转移至新板,与 50 μ L 的 PBS 混和并在 415nm 下读数。

[0060] 肽吸收。一式三份地,在 24 孔板和在伊思考夫培养基中以 200,000 个细胞 / 孔接种 CLL 患者样品、PBSC 和健康供体 B 细胞。然后用 5 μ M 的标记有噻唑橙的肽温育细胞 15min,用 PBS 洗涤并在 FACSCanto (BD, Franklin Lakes) 上分析以测定细胞内肽的相对浓度。

[0061] 线粒体膜电势。在实验之前 24 小时,以 50,000 个细胞 / 孔接种海拉细胞。一式三份地,在 24 孔板中在伊思考夫培养基中以 200,000 个细胞 / 孔接种 CLL 患者样品、PBSC 和健康供体 B 细胞。然后在 37° C 下,用 2 μ M 的 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑基羰花青碘化物 (JC-1, Invitrogen, Carlsbad) 温育细胞持续 20 分钟。然后用 1mL 的 PBS 洗涤各样品两次,在 BD FACSC Canto 上读取之前在 300 μ L 的 PBS 中重悬。在 488nm 下激发样品,在 526nm (绿色) 和 595nm (红色) 下收集发射。为了获得线粒体膜电势 (红 / 绿),用来自红色通道的发射除以来自绿色通道的发射。对于膜去极化研究,在用 JC-1 温育之前在 OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad) 中用 Cb1 或 MPP-Cb1 处理海拉细胞 1 小时。用 PBS 洗涤细胞,胰蛋白酶消化并且分析(如上)。

[0062] 比色法烷基化化验。使用 4-(4-硝基苄基)吡啶 (4-NBP) (Thomas 等, 1992) 来测试烷基化。简言之,用处于包含 85mM 的三乙醇胺 (pH7.2) 和 43% 的丙酮的缓冲液中的 4-NBP (0.7%w/vol) 温育化合物 (200-450 μ M)。在 37° C 下温育反应 30-120min。通过在干冰 / 乙醇浴中冷冻来终止反应。为了使样品生长(develop),加入 100ml 的乙酸乙酯和 25 μ L 的 5N NaOH,随后涡旋。在 540nm 下读取有机乙酸乙酯的吸光度。

[0063] 分离 DNA 的交联。由公开方法的变型来确定经分离 pBR322DNA 的交联³⁰。简言之,用处于 25mM 的三乙醇胺 (pH7.2) 和 1mM 的 EDTA 中在指示的浓度和时间下的化合物温育 pBR322DNA。通过加入 50mM 的 EDTA 和 150 μ g/ml 的过量短寡核苷酸 DNA 来终止反应。在 95° C 下,在变性缓冲液 (30% 的 DMSO、1mM 的 EDTA、溴酚蓝、二甲苯蓝、和 0.4% 的 SDS) 中使样品变性 3min,并在干冰 / 乙醇浴中快速冷冻。在处于 TAE 缓冲液中的 0.8% 琼脂糖中进行电泳,并在运行之后用溴化乙锭染色。

[0064] 定量实时 PCR。如指示的,在含有 Cbl、mt-Cbl、或 MPP 的伊思考夫培养基 (Invitrogen) 中以 LC25 剂量(分别为 17、3、和 3 μ M) 温育 600,000 个 HL60 细胞持续 2 或 24 小时。对于 Lig3,以 LC50 剂量(分别为 34、6、和 6 μ M) 温育细胞 1 小时。然后根据制造商的说明书使用 Rneasy 迷你试剂盒(QIAGEN, Hilden, 德国)来分离 RNA。在 NanoDrop 上定量 RNA,使用 RT2 第一链试剂盒(RT2First Strand Kit) (SA Biosciences, Frederick, 马里兰) 将 1 μ g 转化成 cDNA。然后使用人类 DNA 损伤信号通路 PCR 阵列 (PAHS-029, SA Biosciences) 或用根据制造商的说明书购自 SA Biosciences 的选择的引物来进行定量 PCR。使用由 SA Biosciences 提供的基于网络的软件来进行数据分析。独立地设计 Lig3、p21、和 GAPDH 引物:LIG3,正向 GAAATGAAGCGAGTCACAAAAGC (SEQ ID NO:8) 和反向 GTACCCTTCACATCCTT CAGC (SEQ ID NO:9);p21, 正向 CCTCATCCCGTGTTCCTTT (SEQ ID NO:10) 和反向 GTACCA CCCAGCGACAAGT (SEQ ID NO:11); 和 GAPDH, 正向 CAACGGATTTGGTCGTATTGG (SEQ ID NO:12)和反向 GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA (SEQ ID NO:13)。与上述方法类似的方式进行所有其他步骤。如由 SA Biosciences 的制造商推荐的,相比于对照细胞,显示表达水平 ≥ 4 倍改变的基因被认为是击中(hits)的。使用购自 SA Biosciences 的引物,用 3 次生物学重复来证实所有击中。

[0065] 通过定量 PCR 测定 DNA 损伤率。使用 Cbl (150 μ M) 或 mt-Cbl (3 μ M) 处理总共 5×10^6 个 HL60 细胞持续 2 小时。用 QIAGEN Genomic Tip 和 Genomic DNA 缓冲液系列试剂盒(QIAGEN)从冷冻的细胞颗粒中分离 DNA,并使用 PicoGreen 染料(Invitrogen)进行定量。如之前描述的³¹,使用 GeneAmp XL PCR 试剂盒(Perkin-Elmer)来进行 8.9kb 线粒体区段和 17.7kb β -珠蛋白靶序列的定量扩增。在给定的剂量 D 下,以 $D = -\ln AD/AC$ 计算损伤率,其中 AD 是在该剂量下扩增的,AC 是未损伤对照中的扩增水平。患者样品的收集。按照研究伦理委员会(research ethics board) (REB) 批准的协议在书面知情同意之后,收集来自正常个体和患有 CLL 的病人的外周血细胞。通过 Ficoll-Hypaque 离心法分离单核细胞。细胞或者新鲜地使用或在 -150° C 下以有活力状态保存在 10% 的 DMSO、40% 的 FBS、和 α -培养基中。PBSC 是由根据 REB 批准的协议获得的干细胞移植供体体内获得的过量非格司亭移动细胞。

[0066] 结果和讨论

[0067] 为了提供用于线粒体递送生物活性物质(cargo)的载体,Horton, K. L., Stewart, K. M., Fonseca, S. B., Guo, Q. & Kelley, S. O. Chem Biol 15, 375-82 (2008) 描述了可以有效地使各种附连物质穿过质膜和线粒体膜的线粒体穿透肽(MPP)^{4,5}。

[0068] 通过引用整体合并入本文中的 Horton, K. L., Stewart, K. M., Fonseca, S. B., Guo, Q. & Kelley, S. O. Mitochondria-penetrating peptides. Chem Biol 15, 375-82 (2008), 包括以下 SEQ ID NO:1-6。

[0069] 表 2

[0070]

化合物	SEQ ID NO.
$F_x-r-F_x-K-F_x-r-F_x-K$	1
$F_x-r-F_x-K-F-r-F_x-K$	2
F_x-r-F_x-K	3
F_x-r-F_2-K	4
$F_x-r-Nap-K$	5
$F_x-r-Hex-K$	6
$F_x-r-F_x-r-F_x-r$	7
F_x = 环己基丙氨酸 F_2 = 联苯 Nap = 萘基 Hex = 己基	

[0071] 在此,我们研究了具有临床相关抗癌活性的物质,氮芥苯丁酸氮芥(Cb1),的线粒体递送的影响。Cb1 是一种有效的烷化剂,其用于治疗白血病并且其活性与细胞核基因组的烷基化相关⁶。在此,我们报道了该药剂靶向线粒体,并且记载了该细胞器特异性药物避免使癌症治疗无效的两种常见耐受性机制的独特能力。

[0072] 选择 Cb1 作为线粒体递送的优选药物,因为其显示快速反应动力学并且不需要细胞活化。此外,羧酸部分提供了易于连接至 MPP 的理想官能团。为了产生 Cb1 的线粒体特异性形式,药物连接至具有序列 $F_xrF_xrF_xr$ (F_x = 环己基丙氨酸, r = d- 精氨酸) (图 1A, 表 1) 的 MPP。该肽进入线粒体基质(图 1B),因此是用于递送 Cb1 以进行线粒体 DNA 烷基化的适宜载体。该肽完全由使其耐受细胞内降解的人造氨基酸组成。该肽序列是基于之前的工作设计的,表明将环己基丙氨酸单元包括在序列内引入了足以能够穿透线粒体膜的疏水性,而阳离子单元驱动横过包围线粒体的能量屏障的吸收⁴。通过常规固相合成产生肽,然后通过连接至 C 端赖氨酸残基连接药物。在体外证实了在线粒体靶向的结合物中 Cb1 保留了烷基化活性和 DNA 交联活性(图 8B 和 8C)。还证实了将药物置于 N 端导致可比较的效应,而 MPP- 药物结合物的活性几乎没有改变(未显示数据)。

[0073] 为了测试这种 MPP 是否可以有效地将 Cb1 递送至线粒体,将荧光团噻唑橙(to)⁷ 连接至 N 端以跟踪细胞内的定位(图 1A)。用可以通过免疫金 TEM 可视化的生物素化的 MPP 来证实肽穿透进入到线粒体基质中(图 1B)。100s 线粒体的定量结果提供了主要基质定位的定量证据(图 1C)。在活的海拉细胞中的细胞内定位与线粒体特异性染料 Mitotracker 强烈地关联,表明 Cb1 成功地累积在线粒体内(图 1D)。

[0074] 通过温育海拉细胞和结合物,使得烷基化能够发生,然后固定细胞并穿透它们的膜,还评估了线粒体内 MPP-Cb1 的烷基化活性(图 8A)。MPP-Cb1 结合物保持其线粒体定位(甚至当膜穿透时),而当膜破裂时 MPP 对照肽从线粒体扩散至细胞质和细胞核。在固定和穿透之后,用脱氧核糖核酸酶处理细胞以使 DNA 片段化,这导致 MPP-Cb1 扩散(图 8A)。这些观测表明 MPP-Cb1 在线粒体内反应。

[0075] 将 MPP-Cb1 对海拉细胞的细胞毒性与母体肽和未结合的 Cb1 进行比较。使用细胞活力测定法,观察到与 Cb1 相比较, MPP-Cb1 的效力增加了 100 倍(图 1E)。在测试的浓度范围内母体肽没有显示显著的毒性,证实了细胞死亡是因为药物的活性,而不是载体。为了证实效力增加是由于干扰了线粒体功能,评估了细胞器膜电势和超氧化物水平。已显示线粒体 DNA 损伤增加了线粒体超氧化物水平并使该细胞器的膜去极化⁸。当 MPP-Cb1 处理而不是用 Cb1 (一种其活性与细胞核基因组的烷基化相关的药剂) 处理时(图 1F 和 1G) 显示

了这两种观察结果。这些数据支持我们的假设,即 MPP-Cb1 是特异性作用在线粒体靶标上的。为了评估 mt-Cb1 在白血病细胞中的活性和特异性,我们评估了其在白血病细胞系组中的毒性。观察到了类似水平的毒性。例如,在 HL60 细胞中,与 Cb1 相比,mt-Cb1 再次显示出效力增加(表 4),对于 Cb1 和 mt-Cb1 而言 EC50 分别为 34 和 6.8 μ M。

[0076] 通过比较两种基因组的 PCR 扩增的效力,定量评估了细胞核相对于(versus)线粒体 DNA 的烷基化。用 Cb1 或 mt-Cb1 处理 HL60 细胞,独立地评估细胞核和线粒体基因组的损伤。分析了 β -球蛋白基因上细胞核 DNA 的 17.7kb 区段和线粒体 DNA 的 8.8kb 片段。Cb1 主要破坏细胞核 DNA,很少损伤线粒体,然而 mt-Cb1 引起线粒体 DNA 扩增的显著减少,对细胞核基因组具有最小的影响(图 2)。

[0077] 之前的研究探索了用于 Cb1 的混和的细胞质和细胞核的细胞内递送的细胞穿透肽,仅记载了活性增加约 10 倍⁹,表明 Cb1 的线粒体递送导致活性进一步增加。如果增加的吸收是潜在因素,该增加超过预期的情况,因为相对于之前使用的细胞穿透肽⁴,在此处使用的 MPP 是可比的,而不是增加吸收。活性的提高很可能不是由于线粒体基因组和其核对应物之间的主要差异。线粒体基因组中缺乏内含子增加了损伤靶向实质性 DNA 序列的可能性¹⁰。此外,线粒体基因组并未如核基因组一样包装,使得其对于 DNA 损伤剂更加敏感 500 倍¹¹。此外,线粒体 DNA 修复途径不如细胞核中进行的那么复杂¹²。所有这些因素可以有助于观察到效力增加 100 倍。

[0078] 使用定量实时 PCR 阵列来评估 84 种基因的组,其中的 10 种具有线粒体活性(表 3)。已知这 10 种基因涉及 DNA 损伤信号传导、修复、凋亡、和细胞周期抑制。如果与未处理的细胞相比,基因显示 ≥ 4 倍的变化,认为它们是差异表达的(图 3B),并且使用单独合成的 PCR 引物,用 3 个生物学重复来证实击中。该分析显示,当细胞核相对于线粒体 DNA 的烷基化发生时,活化了不同的途径。DDIT3/GADD153 显示响应于 Cb1 表达增加了 5 倍,但是使用 mt-Cb1 则没有改变,表明该基因主要涉及对核 DNA 损伤做出响应。相对于单独的 Cb1,使用 mt-Cb1 将另外两种基因上调至较高程度:PPP1R15A/GADD34 (4 倍)和 GADD45G (15 倍)(图 3A 和 3B)。在 mt-Cb1 和 Cb1 两者存在下,p21 被过表达。证实了 mRNA 水平的这些改变导致蛋白质表达的相应改变(图 3C)。有趣地,已知线粒体靶向的上述基因则不受影响。

[0079] 已知基因的生长抑制和 DNA 可诱导损伤(GADD)的家族涉及凋亡和细胞周期抑制³²,并且也已知 p21 蛋白在 DNA 损伤信号传导中起重要作用。已显示 p21 与 GADD45G 相互作用³³,其可以活化 p38 或 INK 途径³⁴。在用 Cb1 或 mt-Cb1 处理之后,用免疫印迹法评估这些途径的活化,有趣地,观察到了不同的活化,其中 Cb1 活化了 p38 并且 mt-Cb1 活化了 JNK(图 3D)。这些结果显示当相同的化合物靶向不同的细胞内部位点时,出现了不同的细胞响应。

[0080] 也研究了在 Cb1 和 mt-Cb1 处理的细胞中连接酶 III 的水平。该连接酶,存在于细胞核和 mt 两者中,是后者细胞器中唯一的连接酶,并且涉及大多数形式 DNA 损伤的修复³⁵。因此,响应于线粒体基因组的 mt-Cb1 诱导型损伤,可以观察到该基因增加的表达。实际上,在用 mt-Cb1 处理的细胞中检测到了这种情况(图 3A;图 3C)。

[0081] 表 3、包含在定量 PCR 阵列中的靶向线粒体的蛋白列表

[0082]

基因符号	基因名称	细胞功能
OGG1	8- 羟鸟嘌呤 DNA 糖基化酶	损伤的 DNA 结合, 碱基切除修复
RAD18	RAD18 同系物(酿酒酵母)	损伤的 DNA 结合
APEX1	APEX 核酶	碱基切除修复
MUTYH	mutY 同系物(大肠杆菌)	碱基切除修复, 错配修复
NTHL1	nth 核酸内切酶 III 样 1 (大肠杆菌)	碱基切除修复
UNG	尿嘧啶 -DNA 糖基化酶	碱基切除修复
MRE11A	减数分裂重组 11 同系物 A (酿酒酵母)	双链断裂修复
RAD50	RAD50 同系物(酿酒酵母)	双链断裂修复
MLH1	mutL 同系物(大肠杆菌)	错配修复
AIFM1	凋亡诱导因子, 线粒体结合因子 1	凋亡

[0083] Cb1 是临床使用的治疗方法, 用于治疗白血病⁶。为了确定在原发性癌症细胞中 MPP-Cb1 结合物是否能够显示超过母体化合物的增加的活性, 我们评估了从慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者体内分离的 B 细胞的毒性曲线。为了评估正常细胞以及评估该化合物是否显示治疗窗, 使用来自健康供体的外周血干细胞 (PBSC) 和单核细胞来评估 MPP-Cb1 的治疗窗。使用 MPP-Cb1 处理, 我们观察到了针对 CLL 患者细胞的活性, 其在健康细胞中显著地较低, 表明肽结合物存在治疗窗 (图 4A)。此外, 在本研究使用的浓度下, MPP-Cb1 显示了极小的溶血水平 (图 4A), 表明在白血病细胞消融的浓度下对血红细胞没有毒性。

[0084] 为了研究治疗窗的来源, 我们评估了 MPP 在 CLL 细胞、单核细胞、和 PBSC 中的细胞吸收。MPP 在 CLL 细胞中的吸收高于在健康细胞中的吸收, 表明在这些细胞中可能达到较高的药物浓度 (图 4B)。此外, 用 CLL 细胞观察到了较高的相对线粒体膜电势 (图 4B), 表明在该细胞类型中存在线粒体积累的较大的驱动力。已广泛报道了癌细胞和健康细胞之间的线粒体膜电势的差异¹³, 之前也已观察到了由于该性质的不同药物毒性 (如在用罗丹明 123 和 MKT-077 的研究中^{14 16})。然而, 在此药物不是作为非定域的亲脂性阳离子递送的; 因此, 肽载体提供了特异性。因此, MPP 为线粒体药物递送提供了通用载体, 从而保留了治疗窗。

[0085] 考虑到已经在白血病中检测到了耐 Cb1 性^{17 18}, 我们研究了向线粒体递送 Cb1 是否能够改变耐药性机制的效力。我们测试了未改性药物在骨髓和淋巴细胞系组中的活性, 并观察到在两种细胞系 (K562 和 OCIM2) 中, 母体药物具有减弱的效力。这两种细胞系比同组的剩余部分的耐 Cb1 性高约 10 倍 (图 5B 和表 4)。

[0086] 表 4、在白血病细胞系组中的 LC₅₀ 值汇总

[0087]

细胞系	Cb1 LC ₅₀	MPP-Cb1 LC ₅₀
M2	311 ± 24 μ M	7.5 ± 1 μ M
K562	306 ± 26 μ M	8.7 ± 0.4 μ M
LY17	55 ± 7 μ M	8.3 ± 1 μ M
HL60	34 ± 6 μ M	6.8 ± 0.6 μ M
U937	34 ± 5 μ M	5.9 ± 0.7 μ M
AML2	28 ± 3 μ M	6.4 ± 0.4 μ M
DAUDI	27 ± 7 μ M	9.8 ± 0.8 μ M

[0088] 已知许多癌细胞类型通过改变凋亡前或抗凋亡因子的水平来提高凋亡诱导的阈值(threshold),从而导致化学治疗耐受性。为了确定耐 Cb1 细胞是否通常是耐凋亡的,我们测试了这些系对于凋亡诱导剂星状孢子素的敏感性。有趣地,这两种耐 Cb1 细胞系显示了降低的凋亡诱导率(图 5C)。因为抗凋亡因子的过表达是耐凋亡的一种机制^{19,20},我们研究了抗凋亡蛋白 Bcl_{XL}的表达水平。之前已显示 Bcl_{XL}在某些癌症中是过表达的,并且认为其抗凋亡活性造成耐药性²¹。实际上,在这两种耐 Cb1 系中,我们观察到了远高于敏感系的 Bcl_{XL}水平(图 5C,图 6)。这表明 Bcl_{XL}的过表达以及因而发生的凋亡抑制可以成为耐 Cb1 性的基础。当在该组中测试 MPP-Cb1 的活性时,在测试的所有系中都观察到了增强(图 5A)。此外,Cb1 和 MPP 结合物对细胞死亡的机制似乎相似,其中通过流式细胞术可以清楚早期凋亡的细胞(插图 5A 和 5B)。MPP-Cb1 结合物在这些耐凋亡细胞系中仍然显示高水平的细胞毒性的事实说明,将毒性药物递送至线粒体为克服癌细胞通常采用的抗药作用的机制提供了有效方法。

[0089] 癌细胞中耐药性的另一种主要形式是由于促进药效团化学失活的酶或其他因子的过表达。对于 Cb1,通过谷胱甘肽改性的失活是耐药性的常见机制。将谷胱甘肽三肽加入 Cb1 中(由谷胱甘肽-S-转移酶(GST)催化的反应),不仅导致 Cb1 失活²²,其也促进通过识别谷胱甘肽改性的异生物质的泵从细胞中的流出²³。为了分析 MPP-Cb1 是否能够避免由这种类型的化学失活引起的耐药性,我们测试了该结合物在已知过表达细胞质 GST-μ 亚型的耐 Cb1 性的卵巢癌细胞系中的活性²⁴。使用膜联蛋白-V 凋亡测定法,我们观察到 Cb1 能够在野生型细胞系中而不能在耐 Cb1 系中引起细胞死亡,毒性是不显著的(甚至在 100 μ M 下)(图 5D)。有趣地,MPP-Cb1 能够在低得多的浓度(9 μ M)下引起细胞死亡,该值可与野生型和耐性系两者比较。通过细胞活力测定法也证实了该发现(图 7)。MPP 结合至 Cb1 似乎限制了通过细胞质 GST-μ 的改性和失活。野生型和耐 Cb1 系之间可比较的活性支持以下观点:将药物靶向以及固定(sequester)至线粒体也能够避免耐药性的化学机制。

[0090] 我们已证明了靶向癌细胞的线粒体以对抗耐药性的优点,并且示出了 Cb1 的线粒体递送致使效力的显著增加。重要地,即使 MPP 将 Cb1 引导至新的靶点——线粒体基因组,由于 CLL 细胞和健康细胞之间膜电势的差别,也保持了治疗窗。这些研究也示出了 Cb1 的线

粒体区室化(compartmentalization)能够通过生物化学机制(干扰凋亡途径)和化学机制(药物失活)来避免耐药性。由于许多耐药性机制涉及定位在质膜以及细胞质内的因子(例如,流出泵和失活的酶),因此药物固定至线粒体中用作避免多种耐药性机制的方法。因此,线粒体递送作为目前临床上使用的“再利用”FDA 批准药物的方法,似乎是为用于开发新型抗癌剂的值得进行的策略。

[0091] 虽然在本文中已描述了本发明的优选实施方式,本领域技术人员应当理解的是,在没有偏离本发明的精神或随附权利要求的范围的情况下,可以对其做出改变。在本文中公开的所有参考文献通过引用整体结合在此。

[0092] 参考文献

[0093] 1. Muratovska, A., Lightowlers, R. N., Taylor, R. W., Wilce, J. A. & Murphy, M. P. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 189-98 (2001).

[0094] 2. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-41 (2008).

[0095] 3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. *Cell* 100, 57-70 (2000).

[0096] 4. Horton, K. L., Stewart, K. M., Fonseca, S. B., Guo, Q. & Kelley, S. O. *Chem Biol* 15, 375-82 (2008).

[0097] 5. Yousif, L. F., Stewart, K. M., Horton, K. L. & Kelley, S. O. *Chembiochem* 10, 2081-8 (2009).

[0098] 6. Begleiter, A., Mowat, M., Israels, L. G. & Johnston, J. B. *Leuk Lymphoma* 23, 187-201 (1996).

[0099] 7. Carreon, J. R., Stewart, K. M., Mahon, K. P., Jr., Shin, S. & Kelley, S. O. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 5182-5 (2007).

[0100] 8. Santos, J. H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C. & Van Houten, B. *J Biol Chem* 278, 1728-34 (2003).

[0101] 9. Myrberg, H., Zhang, L., Mae, M. & Langel, U. *Bioconjug Chem* 19, 70-5 (2008).

[0102] 10. Preston, T. J., Abadi, A., Wilson, L. & Singh, G. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 45-61 (2001).

[0103] 11. Allen, J. A. & Coombs, M. M. *Nature* 287, 244-5 (1980).

[0104] 12. Singh, G. & Maniccia-Bozzo, E. *Cancer Chemother Pharmacol* 26, 97-100 (1990).

[0105] 13. Davis, S., Weiss, M. J., Wong, J. R., Lampidis, T. J. & Chen, L. B. *J Biol Chem* 260, 13844-50 (1985).

[0106] 14. Modica-Napolitano, J. S. & Aprille, J. R. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 63-70 (2001).

[0107] 15. Modica-Napolitano, J. S. & Aprille, J. R. *Cancer Res* 47, 4361-5 (1987).

[0108] 16. Modica-Napolitano, J. S. et al. *Cancer Res* 56, 544-50 (1996).

[0109] 17. Petrini, M. et al. *Br J Haematol* 185, 409-10 (1993).

[0110] 18. Pepper, C., Thomas, A., Hoy, T. & Bentley, P. *Br J Haematol* 104, 581-8 (1999).

[0111] 19. Reed, J. C. *Oncogene* 17, 3225-36 (1998).

- [0112] 20. Lowe, S. W. & Lin, A. W. *Carcinogenesis* 21, 485-95 (2000).
- [0113] 21. Minn, A. J. , Rudin, C. M. , Boise, L. H. & Thompson, C. B. *Blood* 86, 1903-10 (1995)
- [0114] 22. Yang, W. Z. , Begleiter, A. , Johnston, J. B. , Israels, L. G. & Mowat, M. R. *Mol Pharmacol* 41, 625-30 (1992).
- [0115] 23. Bamouin, K. et al. *Br J Cancer* 77, 201-9 (1998).
- [0116] 24. Horton, J. K. et al. *Biochem Pharmacol* 58, 693-702 (1999).
- [0117] 25. Horton, K. L. ; Kelley, S. O. J. *Med. Chem.* 52, 3293-3299 (2009).
- [0118] 26. Horton, K. L. ; Stewart, K. M. ; Fonseca, S. B. ; Guo, Q. ; Kelley, S. O. *Chem. Biol.* 15, 375-382 (2008)
- [0119] 27. Carreon, J. R. ; Stewart, K. M. ; Mahon, K. P., Jr. ; Shin, S. ; Kelley, S. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 5182-5185 (2007).
- [0120] 28. Cullis, P. M. ; Green, R. E. ; Malone, M. E. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1503-1511 (1995).
- [0121] 29. Frezza, C. ; Cipolat, S. ; and Scorrano, L. *Nat. Protoc.* 2, 287-295 (2007).
- [0122] 30. Sunters, A. ; Springer, C. J. ; Bagshawe, K. D. ; Souhami, R. L. ; and Hartley, J. A. *Biochem. Pharmacol.* 59-64 (1992).
- [0123] 31. Santos, J. H. , Meyer, J. N. , Mandavili, , B. S. , and Van Houten, B. *Methods Mol. Biol.* , 183-199 (2006).
- [0124] 32. Smith, M. L. , and Fomace, A. J. , Jr. *Mutat. Res.* 340, 109-124 (1996).
- [0125] 33. Fan, W. , Richter, G. , Cereseto, A. , Beadling, C. , and Smith, K. A. *Oncogene* 18, 6573-6582 (1999).
- [0126] 34. Lu, B. , Yu, H. , Chow, C. , Li, B. , Zheng, W. , Davis, R. J. , and Flavell, R. A. *Immunity* 14, 583-590 (2001),
- [0127] 35. Lakshmipathy, U. , and Campbell, C. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3869-3876 (1999).

[0001]

<110> 多伦多大学管理委员会
<120> 作为抗癌化合物载体的线粒体穿透肽
<130> 05014971-10PCT
<150> US 61/349881
<151> 2010-05-30
<160> 13
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 线粒体穿透肽

<220>
<221> misc feature
<223> 残基1、3、5以及7是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc feature
<223> 残基2和6是d-精氨酸

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc feature
<222> (5)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 线粒体穿透肽

<220>
<221> misc feature
<223> 残基1、3以及7是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc feature
<223> 残基2和6是d-精氨酸

<220>
<221> misc feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc feature
<222> (6)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

[0002]

<400> 2
Xaa Xaa Xaa Lys Phe Xaa Xaa Lys
1 5

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 线粒体穿透肽

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基1和3是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基2是d-精氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 3
Xaa Xaa Xaa Lys
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 线粒体穿透肽

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基1是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基3是二苯基

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基2是d-精氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 4
Xaa Xaa Xaa Lys
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 线粒体穿透肽

[0003]

```

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基1是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基3是蔡基

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基2是d-精氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Lys
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 线粒体穿透肽

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基1是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基3是己基

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基2是d-精氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Lys
1

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 线粒体穿透肽

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基2、4以及6是d-精氨酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 残基1、3以及5是环己基丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)

```

[0004]

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 7

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 8

gaaatgaagc ggtcacaaa agc

23

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9

gtacccttca catccttcag c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

cctcctcccg tgttctcctt t

21

<210> 11

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11

cccagcggac aagt

14

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

caacggattt ggtcgtattg g

21

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

[0005]

<400> 13

gcaacaatat ccactttacc agagitaa

28

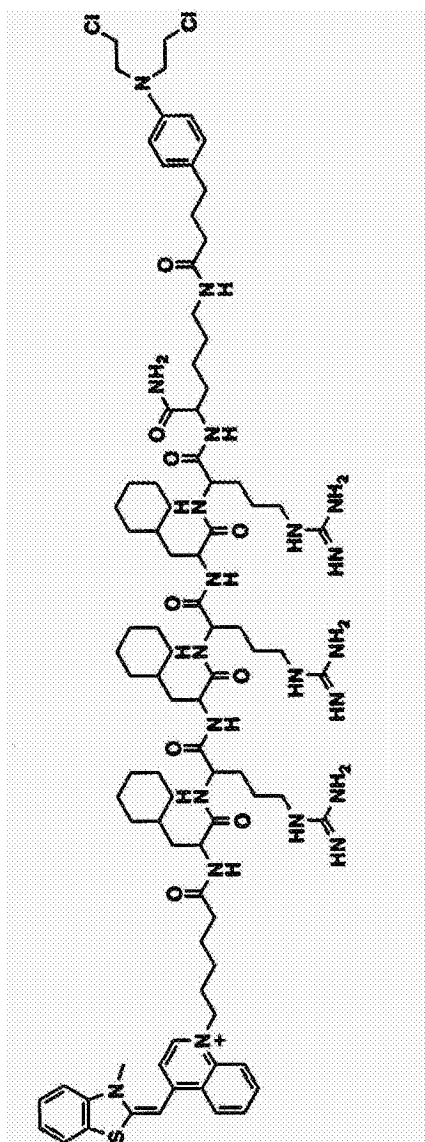


图 1A



图 1B

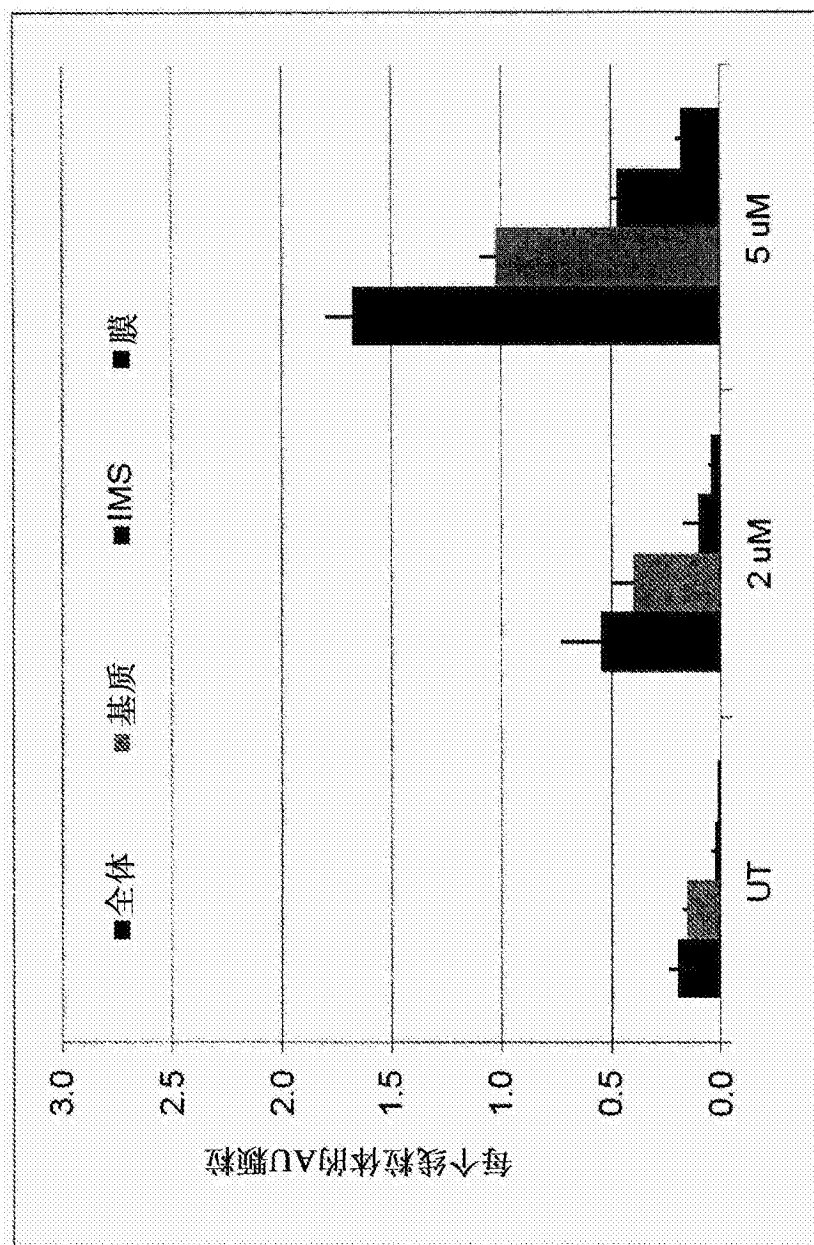


图 1C

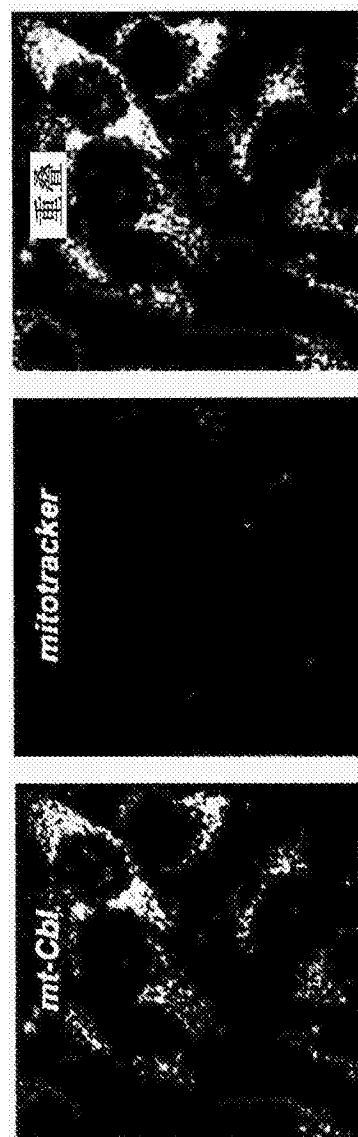


图 1D

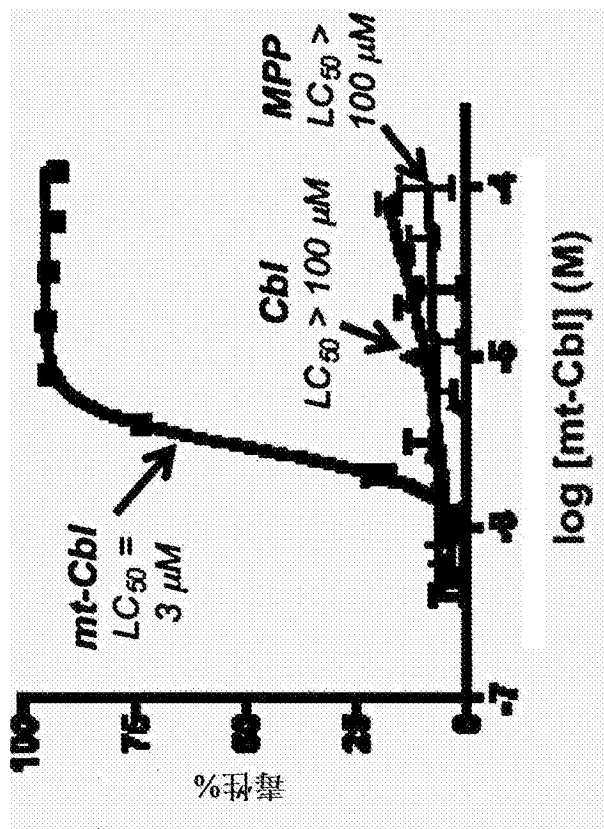


图 1E

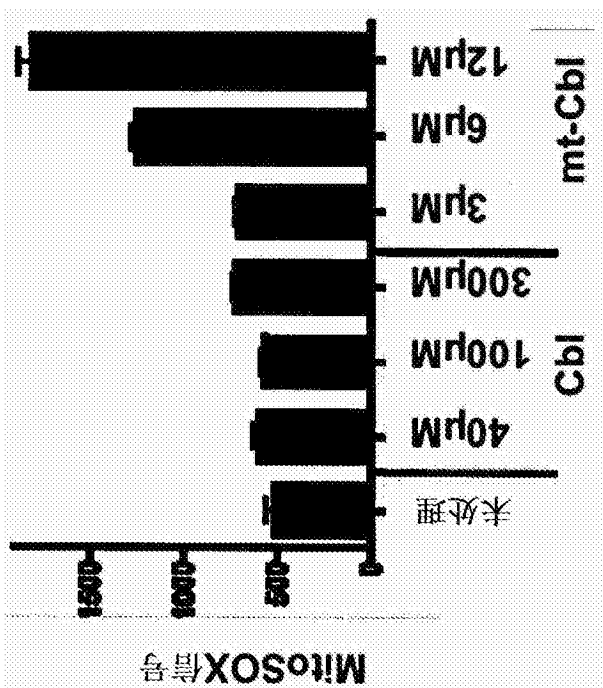


图 1F

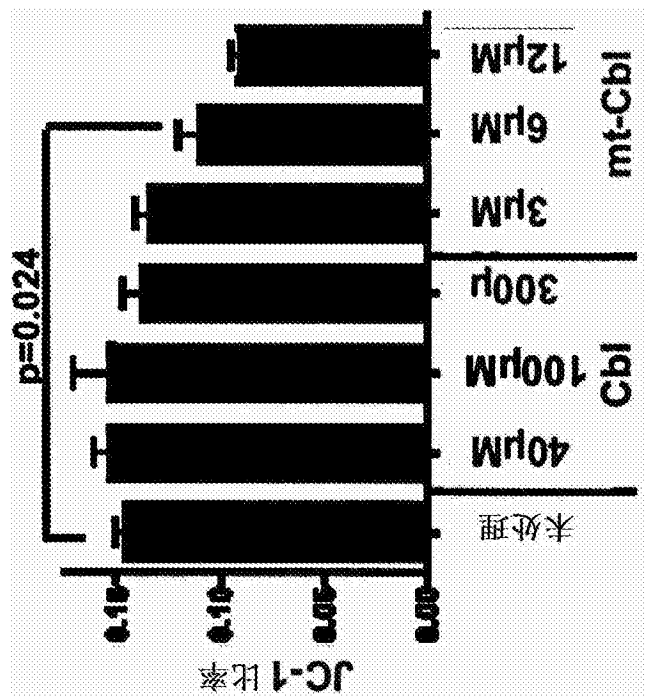


图 1G

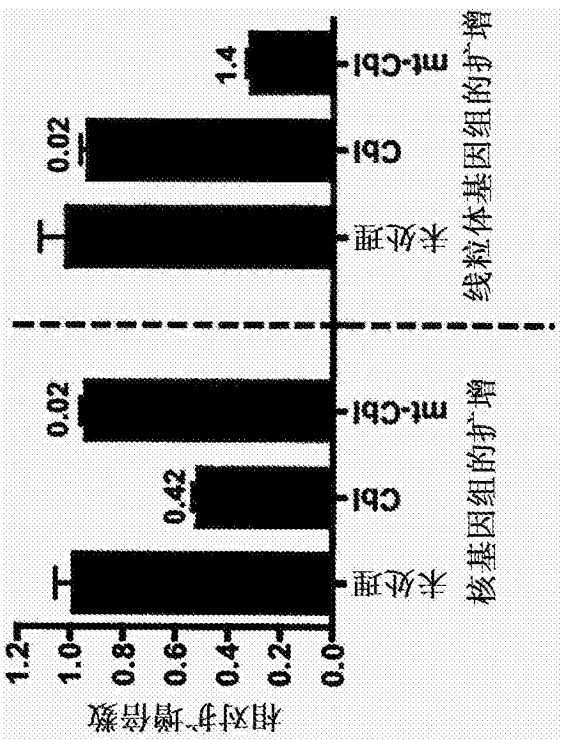


图 2

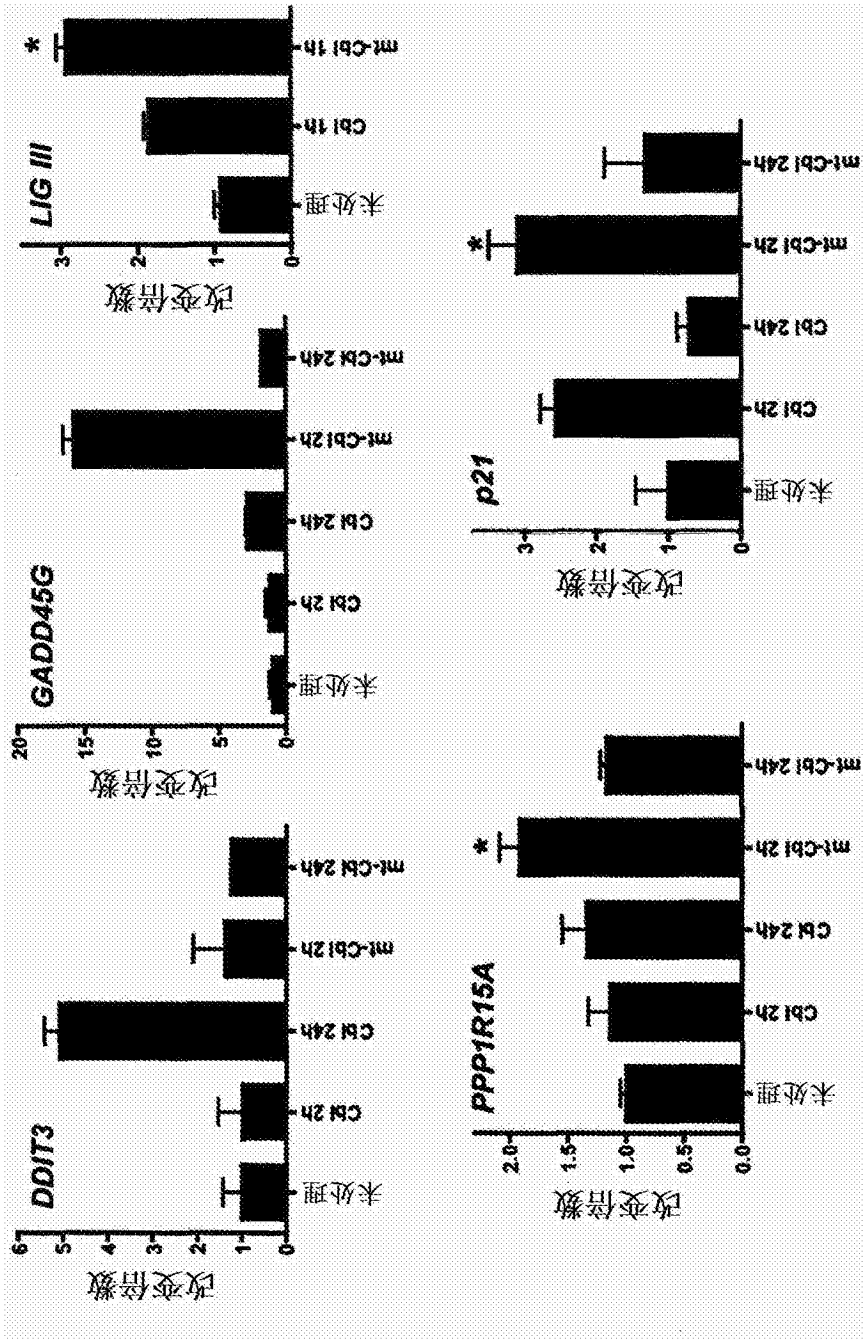


图 3A

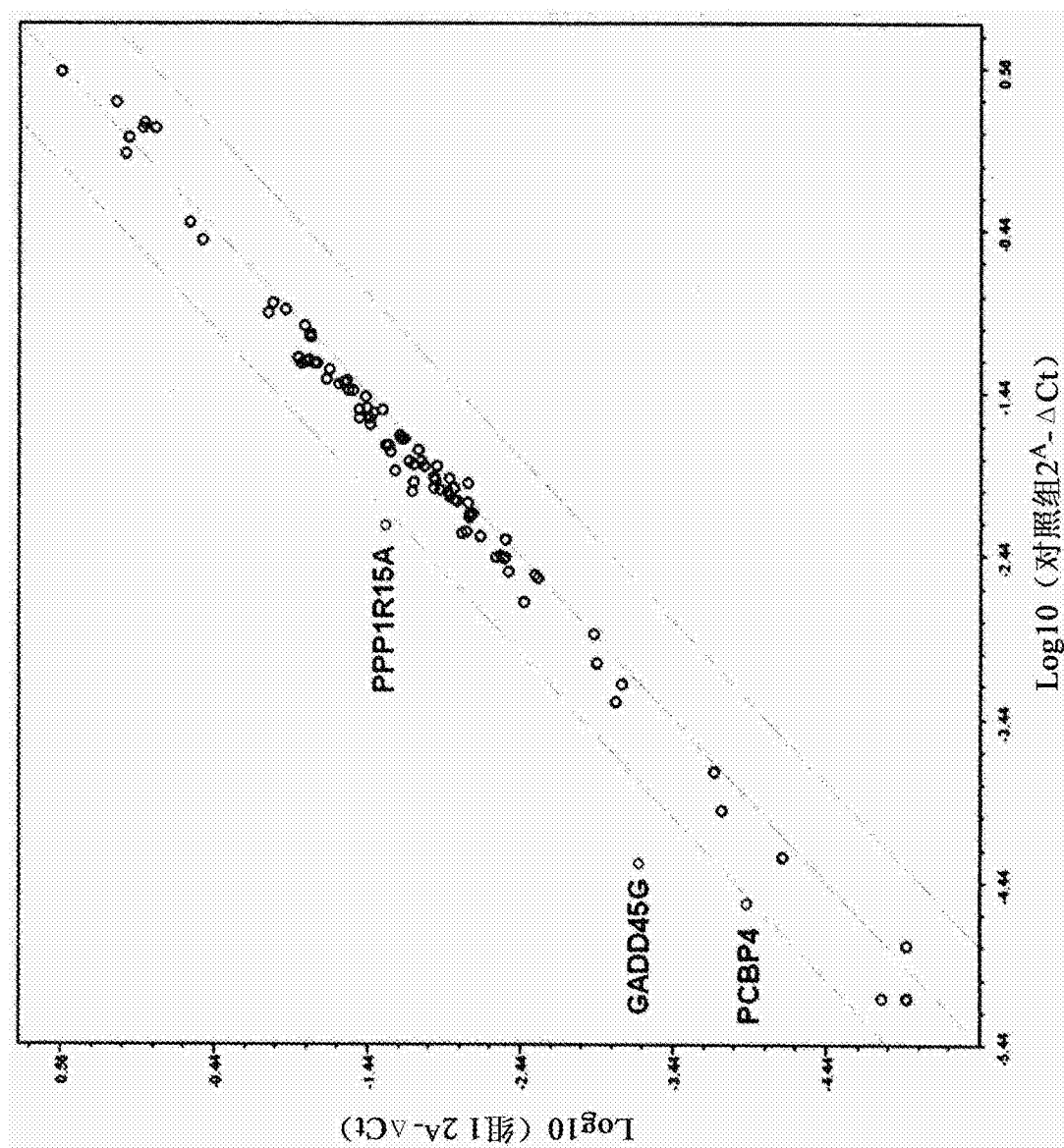


图 3B

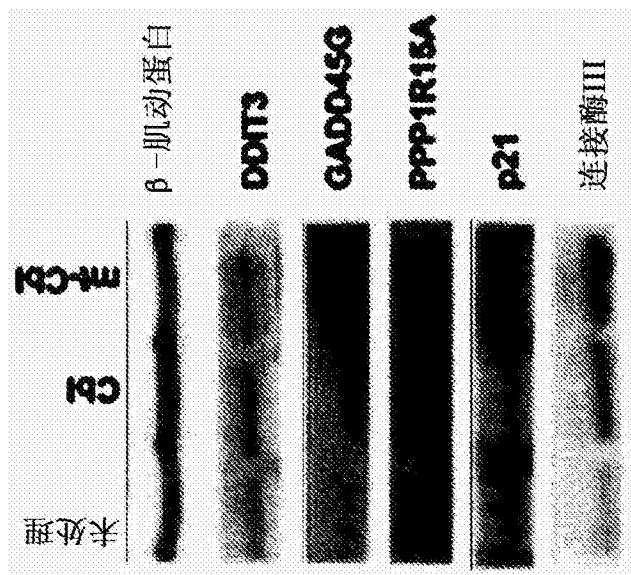


图 3C

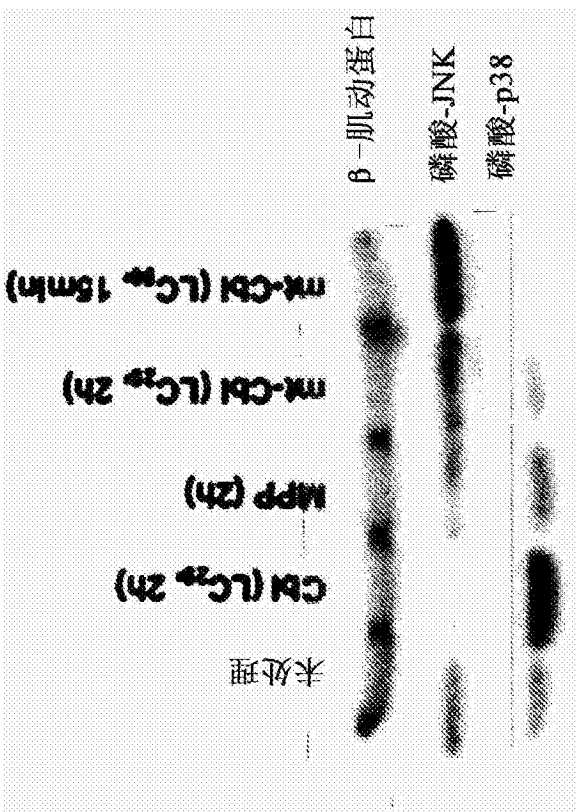


图 3D

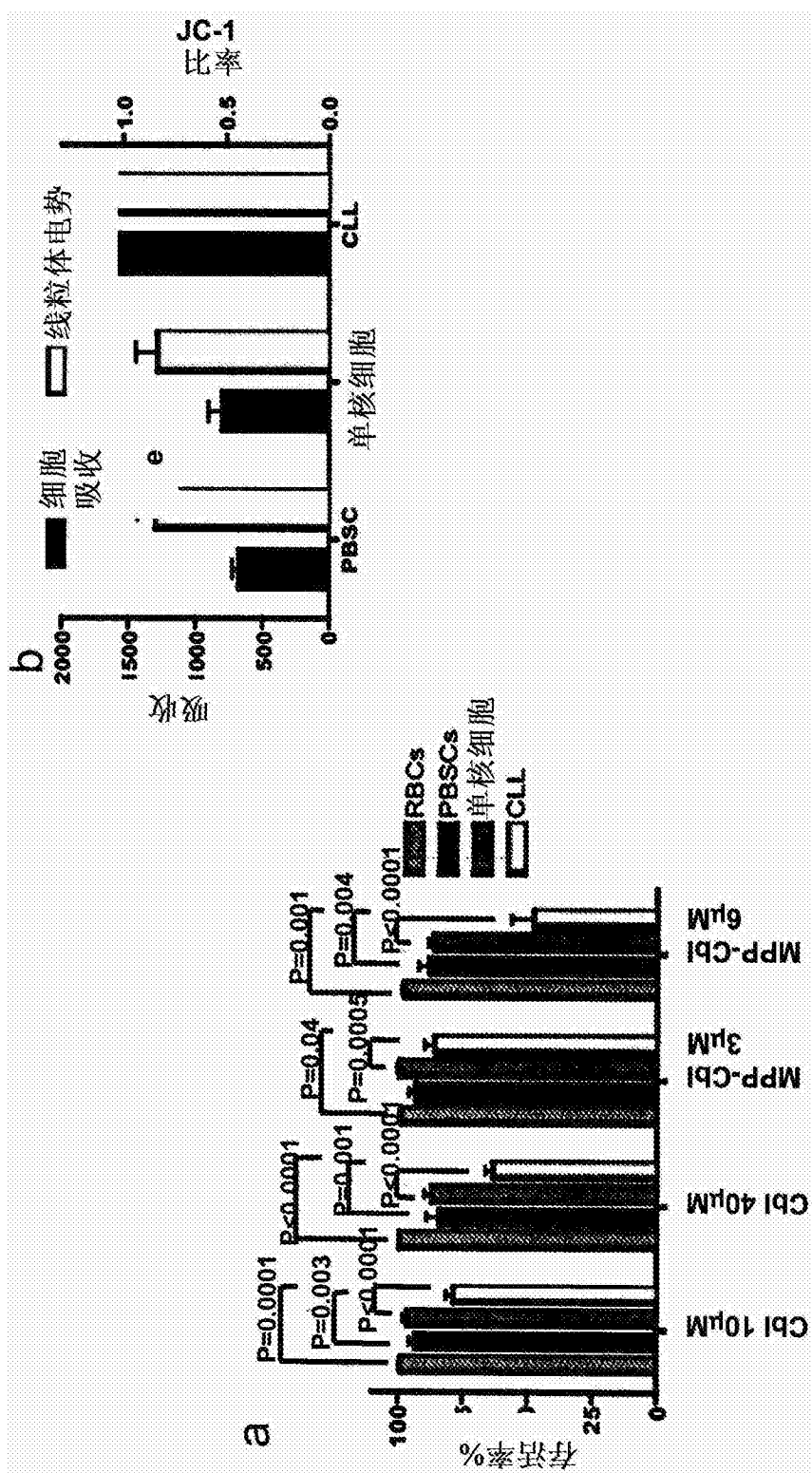


图 4

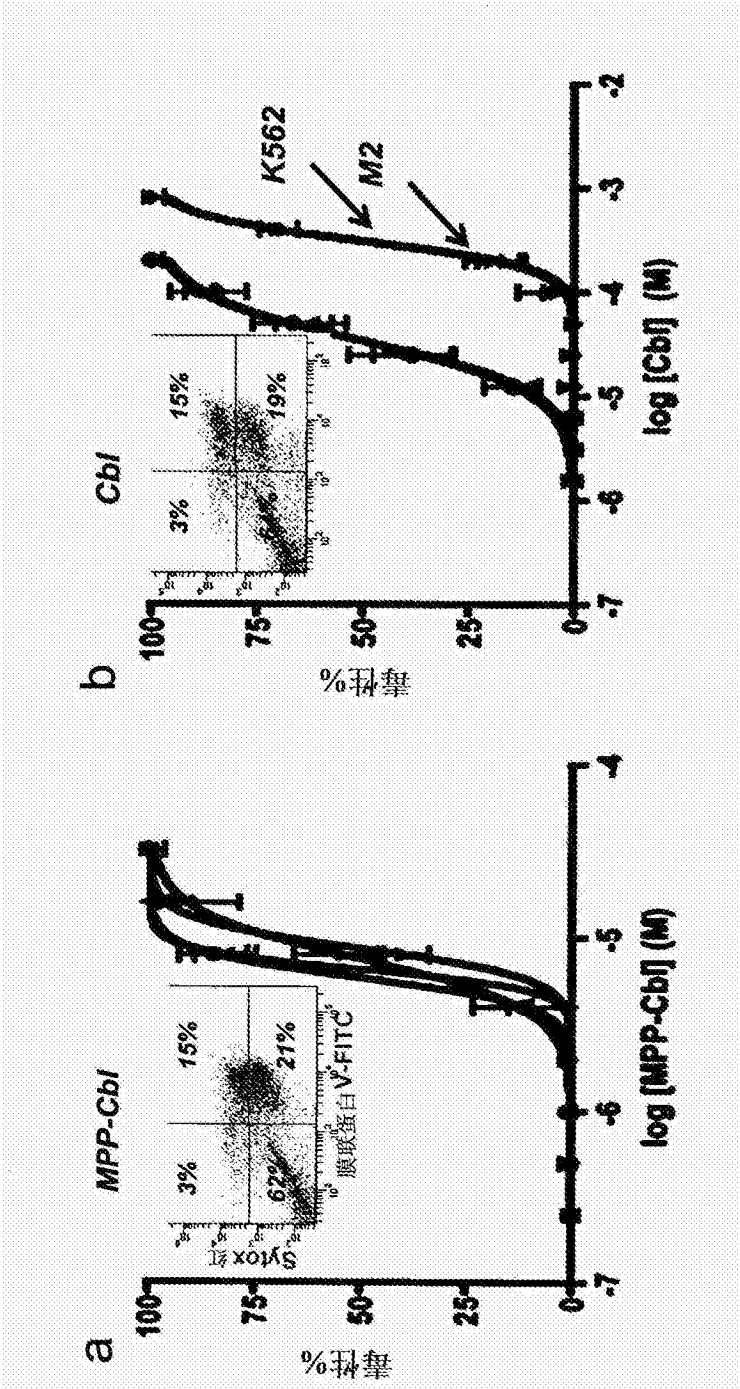


图 5

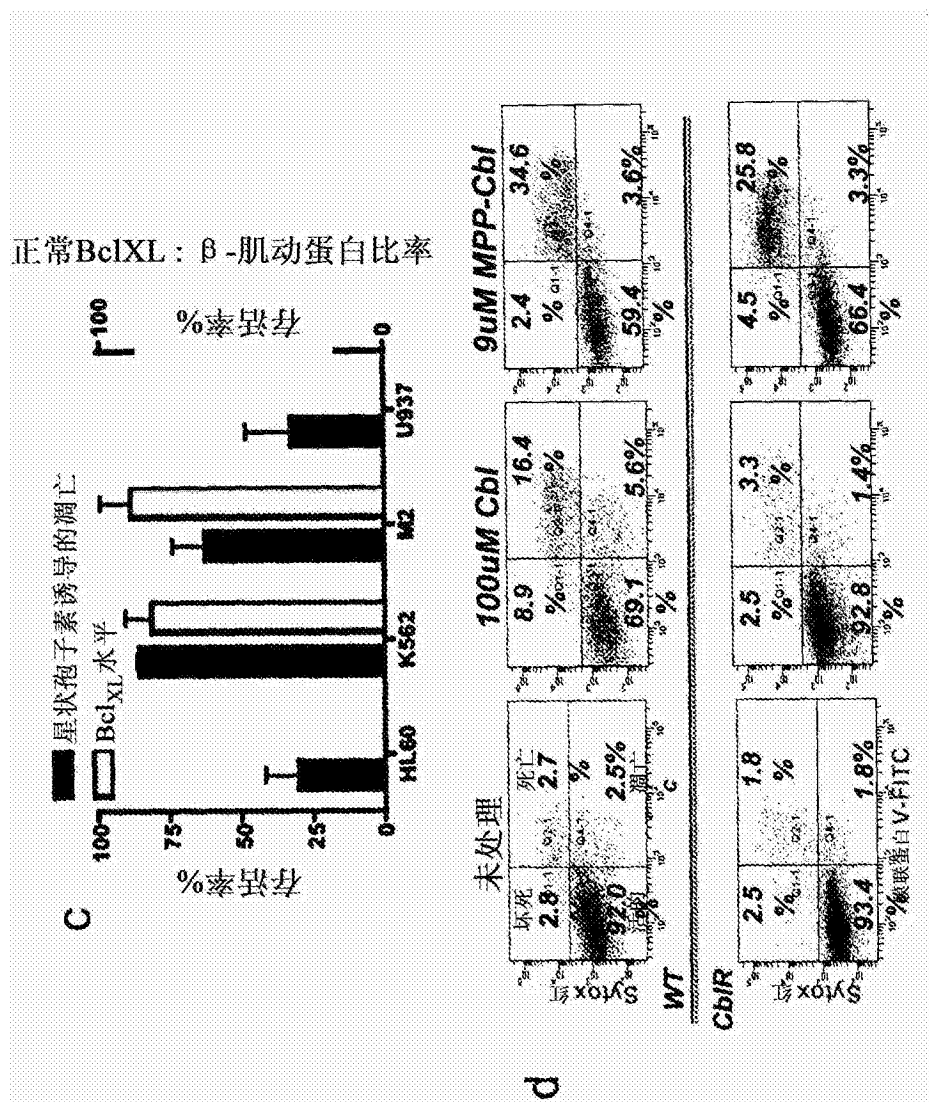


图 5 续

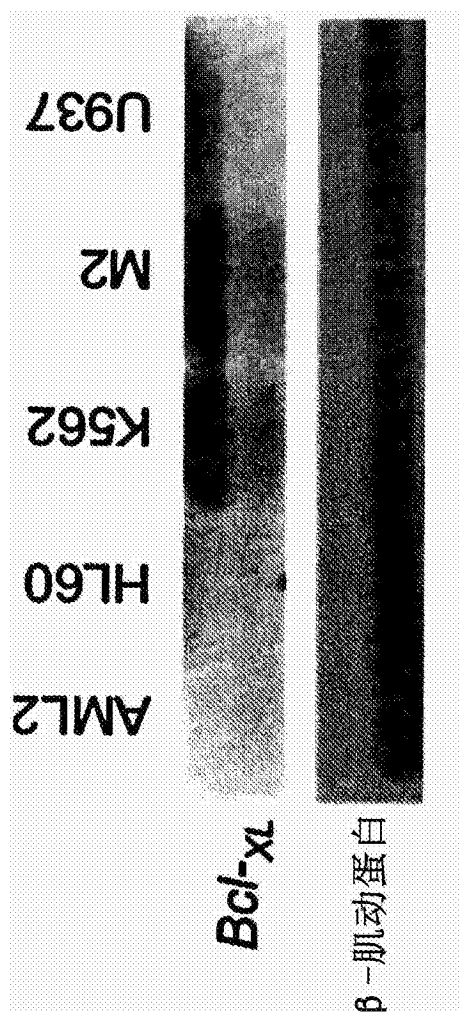


图 6

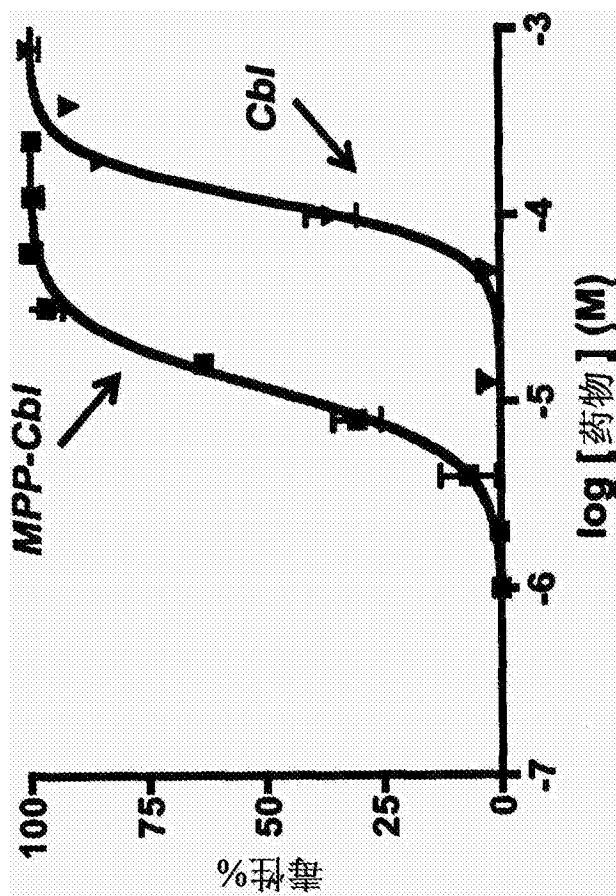


图 7

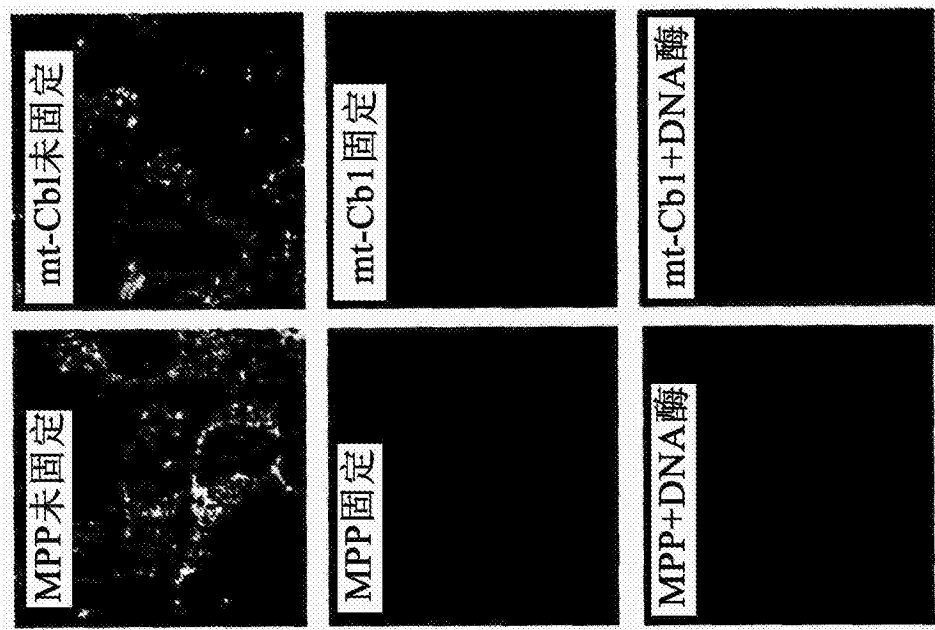


图 8A

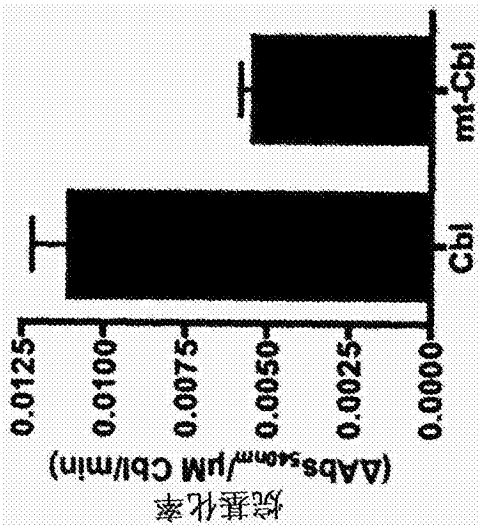


图 8B

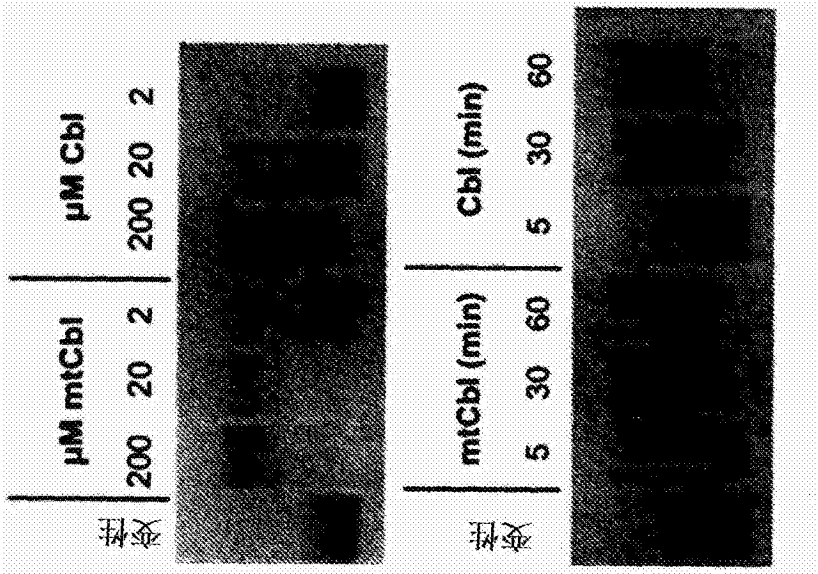


图 8C