

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580048277.0

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月12日

[11] 公开号 CN 101142233A

[22] 申请日 2005.12.16

[21] 申请号 200580048277.0

[30] 优先权

[32] 2004.12.22 [33] US [31] 60/637,759

[86] 国际申请 PCT/GB2005/004900 2005.12.16

[87] 国际公布 WO2006/067402 英 2006.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2007.8.21

[71] 申请人 利波佩普蒂德有限公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

[72] 发明人 莫娜·斯塔勒 约翰·海尔博恩

玛加丽塔·弗罗姆·尼尔松

冈特·韦博

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 吴小瑛

权利要求书 6 页 说明书 60 页 附图 14 页

[54] 发明名称

抑制 cathelin 样蛋白 hCAP18/LL-17 的试剂

[57] 摘要

本发明提供了抑制癌细胞增殖的试剂，其中该试剂抑制 hCAP18/LL-17 的生物活性。在优选实施例中，该试剂改变 hCAP18/LL-17 的转录、翻译和/或者结合活性。优选地，该试剂选自短干扰 RNA (siRNA) 分子、反义寡核苷酸和具有 hCAP18/LL-37 结合亲和力的化合物。本发明进一步提供了抑制患者癌细胞增殖的方法，以及用于癌症诊断的方法和试剂盒。

1. 一种抑制癌细胞增殖的试剂，其中该试剂抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。
2. 根据权利要求 1 所述的试剂，其中该试剂通过改变 hCAP18/LL-37 的转录、翻译和/或结合活性来抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂，其中该试剂是 hCAP18/LL-37 转录的抑制剂。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂，其中该试剂是 hCAP18/LL-37 翻译的抑制剂。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂，其中该试剂是 hCAP18/LL-37 的结合活性的抑制剂。
6. 根据权利要求 1 所述的试剂，其中该试剂是 hCAP18/LL-37 的受体拮抗剂。
7. 根据权利要求 6 所述的试剂，其中 hCAP18/LL-37 的受体是 FPRL1。
8. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中该试剂能够选择性地抑制癌细胞中 hCAP18/LL-37 的生物活性。
9. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中与没有接触该试剂的癌细胞中 hCAP18/LL-37 的生物活性相比较，该试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 的 50% 或者更多的生物活性。
10. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中该试剂选自由短干扰 RNA (siRNA) 分子、反义寡核苷酸、具有 hCAP18/LL-37 结合亲和力的化合物和小分子抑制剂化合物组成的组。
11. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中该试剂是一种短干扰 RNA (siRNA) 分子。
12. 根据权利要求 11 所述的试剂，其中 siRNA 分子包括 SEQ ID NO:1 的核酸序列的片段或其突变体。
13. 根据权利要求 11 或 12 所述的试剂，其中所述 siRNA 分子的长度为 19-23 个核苷酸。
14. 根据 1 至 10 任一权利要求所述的试剂，其中该试剂是一种反义寡

核苷酸。

15. 根据权利要求 14 所述的试剂, 其中所述反义寡核苷酸包括 SEQ ID NO:1 的核酸序列的片段或其突变体。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的试剂, 其中所述反义寡核苷酸的长度为 15-35 个核苷酸。

17. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的试剂, 其中该试剂是一种具有 hCAP18/LL-37 结合亲和力的化合物。

18. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的试剂, 其中该试剂是一种小分子抑制剂化合物。

19. 根据权利要求 17 所述的试剂, 其中所述化合物是一种多肽。

20. 根据权利要求 19 所述的试剂, 其中所述多肽是一种抗体或其抗原结合片段。

21. 根据权利要求 20 所述的试剂, 其中所述抗体或其抗原结合片段选自 Fv 片段、Fab 样片段、单个可变区和功能域抗体组成的组。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的试剂, 其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

23. 根据权利要求 17 所述的试剂, 其中所述化合物具有 hCAP18/LL-37 的配体结合能力。

24. 根据以上任一权利要求所述的试剂, 其中该试剂能够被选择性地递送到癌细胞, 或者被癌细胞选择性地激活。

25. 根据权利要求 24 所述的试剂, 其中该试剂包含靶细胞特异部分。

26. 根据权利要求 25 所述的试剂, 其中所述靶细胞特异部分是一种抗体或其抗原结合片段。

27. 根据权利要求 26 所述的试剂, 其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的试剂, 其中所述抗体或其抗原结合片段对癌细胞表面表达的抗原具有特异性。

29. 根据权利要求 28 所述的试剂, 其中在癌细胞表面表达的抗原选自 C46、85A12、H17E2、NR-LU-10、HMFG1、SM-3(IgG1)、W14、L6 (IgG2a)、1F5 (IgG2a)、 α 甲胎蛋白、Ca-125、前列腺特异抗原和表皮

生长因子受体家族成员组成的组。

30. 根据权利要求 24 所述的试剂，其中该试剂是一种癌细胞选择激活的前体药物。

31. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中所述癌细胞是上皮细胞。

32. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中所述癌细胞是鳞状上皮细胞。

33. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中所述癌细胞选自由乳腺、胆管、脑、结肠、胃、生殖器、肺和导气管、皮肤、胆囊、肝、鼻咽、神经细胞、肾、前列腺、淋巴腺和胃肠道的癌细胞组成的组。

34. 根据权利要求 33 所述的试剂，其中所述癌细胞是乳腺癌细胞。

35. 根据权利要求 34 所述的试剂，其中所述乳腺癌细胞是 Elston III 级细胞。

36. 根据以上任一权利要求所述的试剂，其中所述乳腺癌细胞是转移的癌细胞。

37. 一种药用组合物，其包括权利要求 1 至 36 任一所述的试剂以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或者载体。

38. 根据权利要求 37 所述的药用组合物，其适合非消化道给药。

39. 根据权利要求 37 或 38 所述的药用组合物，其中该制剂能够靶向递送该试剂到癌细胞。

40. 一种抑制患者体内癌细胞增殖的方法，该方法包括向患者施用权利要求 1 至 36 任一所述的试剂，或者权利要求 37 至 39 任一所述的药用组合物。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述患者是人。

42. 根据权利要求 40 或 41 所述的方法，其中该试剂选择性地被递送到癌细胞或者被癌细胞选择性地激活。

43. 权利要求 1 至 36 任一所述的试剂在医学领域中的应用。

44. 权利要求 43 所述的试剂在癌症治疗中的应用。

45. 权利要求 1 至 36 任一所述的试剂在制备抑制癌细胞增殖的药物中的应用。

46. 根据权利要求 40 至 42 所述的方法或者根据权利要求 45 所述的应用，其中癌细胞是上皮细胞。

47. 根据权利要求 40 至 42 所述的方法或者根据权利要求 45 所述的应用，其中癌细胞是鳞状上皮细胞。

48. 根据权利要求 40 至 42 所述的方法或者根据权利要求 45 所述的应用，其中所述癌细胞选自由乳腺、胆管、脑、结肠、胃、生殖器、肺和导气管、皮肤、胆囊、肝、鼻咽、神经细胞、肾、前列腺、淋巴腺和胃肠道的癌细胞组成的组。

49. 根据权利要求 48 所述的方法或者应用，其中所述癌细胞是乳腺癌细胞。

50. 根据权利要求 49 所述的方法或者应用，其中所述乳腺癌细胞是 Elston III 级细胞。

51. 根据权利要求 49 或 50 所述的方法或者应用，其中所述乳腺癌细胞是转移的癌细胞。

52. 一种检测患者体内癌细胞的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 提供待检测的患者细胞样品；

(b) 测定细胞所产生的 hCAP18/LL-37 的量；和

(c) 比较步骤 (b) 中测定的 hCAP18/LL-37 的量与健康细胞产生的 hCAP18/LL-37 的量；

其中与健康细胞中 hCAP18/LL-37 的水平相比，患者细胞样品产生的 hCAP18/LL-37 水平的提高表明该细胞是癌细胞。

53. 根据权利要求 52 所述的方法，其中步骤 (a) 中的细胞选自由乳腺、胆管、脑、结肠、胃、生殖器、肺和导气管、皮肤、胆囊、肝、鼻咽、神经细胞、肾、前列腺、淋巴腺和胃肠道的细胞组成的组。

54. 根据权利要求 52 或 53 所述的方法，其中步骤 (a) 中的细胞样品来自肿瘤或者来自疑似肿瘤的组织。

55. 根据权利要求 52 至 54 任一所述的方法，其中步骤 (b) 包括使细胞样品与结合 hCAP18/LL-37 的试剂相接触，然后检测其结合的 hCAP18/LL-37 的量。

56. 根据权利要求 55 所述的方法，其中结合 hCAP18/LL-37 的试剂

是一种抗体或其抗原结合片段。

57. 根据权利要求 55 或 56 所述的方法，其中步骤 (b) 包括 (i) 使细胞与结合 hCAP18/LL-37 的试剂相接触，和 (ii) 用抗体或其抗原结合片段检测与该试剂结合的 hCAP18/LL-37 的量。

58. 根据权利要求 55 至 57 任一所述的方法，其中步骤 (b) 通过 ELISA 进行。

59. 根据权利要求 52 至 54 任一所述的方法，其中步骤 (b) 包括测定细胞中 hCAP18/LL-37 mRNA 的量。

60. 根据权利要求 59 所述的方法，其中步骤 (b) 通过 Southern 印迹或者 RT-PCR 进行。

61. 一种监测患者癌症发展的方法，该方法包括：

(a) 提供第一时间点收集的患者细胞样品并且采用权利要求 52 至 60 任一所述的方法检测其中的癌细胞；

(b) 提供第二时间点收集的患者细胞样品并且采用权利要求 52 至 60 任一所述的方法检测其中的癌细胞；以及

(c) 比较步骤 (a) 和 (b) 中测定的癌细胞数；

其中与步骤 (a) 相比，步骤 (b) 中测定的癌细胞数增加是癌症发展的指示。

62. 施行权利要求 52 至 61 任一所述方法的诊断试剂盒，其包含结合 hCAP18/LL-37 或者结合编码 hCAP18/LL-37 的 mRNA 的试剂。

63. 根据权利要求 62 所述的诊断试剂盒，其包括能够结合 hCAP18/LL-37 的抗体或其抗原结合片段。

64. 根据权利要求 63 所述的诊断试剂盒，其进一步包括能够结合该抗体或其抗原结合片段的二抗，其中该抗体或其抗原结合片段能够结合 hCAP18/LL-37。

65. 根据权利要求 62 所述的诊断试剂盒，其中该试剂是能够与 hCAP18/LL-37 mRNA 选择性杂交的寡核苷酸。

66. 根据权利要求 65 所述的诊断试剂盒，其中所述寡核苷酸包括或者由 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的片段或其突变体组成。

67. 根据权利要求 66 所述的诊断试剂盒，其中所述寡核苷酸包括可

检测部分。

68. 根据权利要求 67 所述的诊断试剂盒，其中可检测部分选自由放射性同位素、放射性核素、荧光标记、酶标记物、化学发光的生物素基团和二级报告子识别的预先确定的多肽表位。

抑制 cathelin 样蛋白 hCAP18/LL-17 的试剂

技术领域

本发明涉及用于癌症治疗和诊断的试剂，尤其涉及能够抑制癌细胞增殖的试剂。

背景技术

抗菌蛋白是天然免疫系统的关键效应分子。唯一已知的人类 cathelicidin，人 cathelicidin 抗菌蛋白 hCAP18，包含一个保守的 cathelin 结构域和一个可变的被称为 LL-37(Gudmundsson et al.,1996,Eur J Biochemn 1238:325-32; Zanetti et al., 1995, FEBS Lett 374:1-5)的 C 末端。该全蛋白经胞外蛋白酶解加工释放 LL-37 多肽，其具有广泛的抗菌活性(Gudmundsson et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:7085-9; Agerberth et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:195-99)以及对宿主细胞的效应，其中一些效应受 G 蛋白偶联受体，甲酰肽样受体 1(FPR1)(Yang et al., 2000, J Exp Med 192:1069-74; Koczulla et al., 2003, J Clin Invest 111:1665-72)的调节。hCAP18 存在于白细胞(Cowland et al., 1995, FEBS Lett 368:173-76)，并且在皮肤和其他上皮细胞中有表达，其表达与炎症(Cowland et al., 1995, FEBS Lett 368:173-76; Frohm et al., 1997, J Biol Chem 272:15258-63)和损伤(Dorschner et al., 2001, J Invest Dermatol 117:91-97; Heilborn et al., 2003, J Invest Dermatol 120:379-89)相关呈正调节，这与其在天然屏障保护中的作用一致。最近，有研究表明抗菌蛋白包括 cathelicidin 在对肿瘤的非特异性宿主防御中也发挥了作用(Winder et al., 1998, Biochem Biophys Res Commun 242:608-12; Ohtake et al., 1999, Br J Cancer 181:393-403.)。

发明概要

本发明的第一方面提供了一种抑制癌细胞增殖的试剂，其中该试剂抑制（即能够体内抑制）hCAP18/LL-37 的生物活性。

对于“试剂”，我们包括所有的化学实体，例如，寡核苷酸、多聚核苷酸、多肽、拟肽类和小分子化合物。

因此，本发明提供一种试剂，其能够直接（例如，通过降低该蛋白的生物活性）或者间接（例如，通过减少 hCAP18/LL-37 的表达）抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。

在优选实施例中，该试剂通过改变 hCAP18/LL-37 的转录、翻译和/或者改变其结合性，从而抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。

上述试剂可以采用本领域所公知的方法进行鉴别，例如：

(a) 通过测定试验试剂对 hCAP18/LL-37 mRNA 表达水平的影响，例如通过 Southern 印迹或者相关的杂交技术；

(b) 通过测定试验试剂对 hCAP18/LL-37 蛋白水平的影响，例如通过应用抗 hCAP18/LL-37 抗体的免疫测定；和

(c) 通过测定试验试剂对 hCAP18/LL-37 活性的功能性标志物的影响，例如 ErbB2 的磷酸化。

在本发明的一个优选实施例中，该试剂是 hCAP18/LL-37 的转录抑制剂。

在本发明的另一个实施例中，该试剂是 hCAP18/LL-37 的翻译抑制剂。

在本发明的另一个实施例中，该试剂是 hCAP18/LL-37 结合活性的抑制剂。例如，该试剂可以改变 hCAP18/LL-37 的构象，使其不能与其受体相结合。

上述试剂也可以通过直接封闭 hCAP18/LL-37 受体的功能来抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性，即其作为 hCAP18/LL-37 的受体拮抗剂发挥作用。优选地，hCAP18/LL-37 受体是 FPRL1。这是本领域技术人员所公知的。

在本发明的其他的实施例中，该试剂通过调节（例如，减弱）hCAP18/LL-37 或者其 mRNA 的稳定性，从而抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。

有利地是，该试剂能够选择性的抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。

对于“选择性”，我们是指，与该试剂调节癌细胞其他蛋白活性相比较，其能够在更大程度上抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性。优选地，该试剂只抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性，尽管应认识到 hCAP18/LL-37 选择性抑制的后续结果可能会改变癌细胞内其他蛋白的表达和活性。因此，我们排除对于

基因表达和/或者癌细胞生长有非特异性效应的试剂。

本领域技术人员应认识到：本发明的试剂对于 hCAP18/LL-37 生物活性的抑制可以是全部的或者是部分的。例如，与没有暴露于该试剂的癌细胞内 hCAP18/LL-37 的生物活性相比较该试剂可以抑制 hCAP18/LL-37 至少 10% 的生物活性，优选地至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或者 90%，最优选地为 100%。在优选实施例中，与没有暴露于该试剂的癌细胞内 hCAP18/LL-37 的生物活性相比较，该试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 50% 或者更高的生物活性

优选地，该试剂选自下列类型的试剂：

- (a) 短干扰 RNA(siRNA) 分子；
- (b) 反义寡核苷酸；和
- (c) 有 hCAP18/LL-37 结合亲和力的化合物，例如多肽。

可选择性地，该试剂是小分子抑制剂化合物，例如维生素 D 拮抗剂，如 ZK159222(Schering AG) 和 TEI-9647(Tejin Institute for Medical Research, Tokyo)，和维生素 A 的拮抗剂，如 AGN193109 (Allergen Pharmaceuticals)。

在本发明第一方面的一个优选实施例中，该试剂是短干扰 RNA(siRNA) 分子。

RNA 干扰是一个两步的过程。第一步被称为起始步骤，输入的 dsRNA 可能在 Dicer 酶的作用下被消化为含 21-23 个核苷酸(nt) 的小干扰性 RNA，Dicer 酶是 dsRNA 特异的核糖核酸酶 Rnase III 家族的成员，其采用 ATP 依赖的方式加工（切割）dsRNA（直接引入或者通过转基因或病毒）。连续的切割使 RNA 降解为 19-21bp 的双链体（siRNA），其中每个均带有 2 个核苷酸的 3' 突起（Hutvagner & Zamore, 2002, Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232; Bernstein, 2001, Nature 409:363- 366）。

在效应体步骤中，siRNA 双链体与核酸酶复合物结合形成 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)。RISC 的激活需要 ATP 依赖的 siRNA 双链体的解旋。活化的 RISC 通过碱基配对相互作用靶向同源转录本，然后从 siRNA 的 3' 端将 mRNA 切割为 12 个核苷酸的片段(Hutvagner & Zamore, 2002, supra.; Hammond et al, 2001, Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001); Sharp, 2001, Genes. Dev. 15:485-90)。尽管切割机制还有待阐明，但是研究表明每个 RISC 包含一

个单个 siRNA 和一个核糖核酸酶(Hutvagner & Zamore, 2002, supra.)。

考虑到 RNA 干扰的显著效应, 已提出了 RNA 干扰途径的扩增步骤。扩增可以通过对输入的 dsRNAs 进行复制产生更多 siRNA, 或者对已经形成的 siRNA 进行复制来实现。可选择性地, 或者另外地, RISC 的多次转换可以影响扩增(Hammond et al, 2001, supra.; Hutvagner & Zamore, 2002, supra.)。在下列综述中可以查到关于 RNAi 的其他信息, Tuschl, 2001, Chem. Biochem. 2:239-245, Cullen, 2002, Nat. Immunol. 3:597-599 and Brantl, 2002, Biochem. Biophys Act. 1575:15-25。

适合本发明应用的 RNAi 分子的合成可以受到如下影响。第一, 对 hCAP18/LL-37 的 mRNA 序列的 AUG 起始密码子的下游进行扫描搜寻 AA 二核苷酸序列。每个出现的 AA 和 3'临近的 19 个核苷酸作为潜在的 siRNA 靶位点。优选地, 由于非翻译区(UTRs)富含更多的调节蛋白结合位点, 因此 siRNA 靶位点选自开放阅读框架。UTR 结合蛋白和/或者翻译起始复合物可以干扰 siRNA 核酸内切酶复合物的结合(Tuschl, ChemBiochem. 2:239- 245)。然而应了解定向于非翻译区的 siRNAs 也可能是有效的。

第二, 应用序列比对软件, 例如 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), 对潜在的靶位点与合适的基因组数据库(例如, 人、小鼠、大鼠等等)进行比较, 筛除与其他编码序列有显著同源性的推定的靶位点。

选择经筛选合格的靶序列作为进行 siRNA 合成的模板。优选的序列 G/C 含量低, 已证明与 G/C 含量高于 55%的序列相比较, 其可以更有效地调节基因沉默。在靶基因上优选几个靶位点用于评估。为了更好地评估所选择的 siRNAs, 最好结合使用阴性对照。阴性对照 siRNA 优选地包括与 siRNAs 相同的核苷酸组成, 但是其与基因组缺乏显著的同源性。因此, 优选采用错义的 siRNA 的核苷酸序列, 其与任何其他基因没有显著的同源性。

优选地, siRNA 分子包含 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列片段, 或者该片段的突变体。

hCAP18/LL-37 mRNA (Accession No. MN 004345)

1 taaagcaaac cccagcccac accctggcag gcagccaggg atgggtggat
caggaaggct

61 cctggttggg ctttgcatc aggctcaggc tgggcataaa ggaggctcct gtgggctaga

```

121  gggaggcaga  catggggacc  atgaagacc  aaagggatgg  ccactccctg
gggcggtggt
181  cactggtgct  cctgctgctg  ggctggtga  tgcctctggc  catcattgcc  caggtcctca
241  gctacaagga  agctgtgctt  cgtgctatag  atggcatcaa  ccagcgggtcc  tcggatgcta
301  acctctaccg  cctcctggac  ctggacceca  ggcccacgat  ggatggggac
ccagacacgc
361  caaagcctgt  gagcttcaca  gtgaaggaga  cagtgtgccc  caggacgaca
cagcagtcac
421  cagaggattg  tgacttcaag  aaggacgggc  tggtgaagcg  gtgtatgggg
acagtgacct
481  tcaaccaggc  caggggctcc  tttgacatca  gttgtgataa  ggataacaag  agatttgccc
541  tgctgggtga  tttcttcgga  aaatctaaag  agaagattgg  caaagagttt  aaaagaattg
601  tccagagaat  caaggatttt  ttgcggaatc  ttgtaccag  gacagagtcc  tagtgtgtgc
661  cctaccctgg  ctcaggcttc  tgggctctga  gaaataaact  atgagagcaa  tttcaaaaaa
721  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  [SEQ ID NO:1]

```

选择性地，siRNA 分子包含来源于 ENSG00000164047（基因组序列）的核苷酸序列的片段。

对于“片段”，我们是指含有至少 10 个核苷酸，例如至少 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或者 25 个核苷酸。

对于“突变体”，我们是指与 SEQ ID NO:1 所示片段有至少 90% 序列一致性的核苷酸序列，例如至少 95%、96%、97%、98% 或者 99% 的序列一致性。

两条多核苷酸的百分比序列一致性可以采用合适的计算机程序进行确定，例如威斯康辛大学遗传计算小组的 GAP 程序，应当认识到百分比序列一致性的计算与多核苷酸的序列最佳排列相关。

也可以选择采用 Clustal W 程序（如 Thompson et al., 1994, *Nuc. Acid Res.* 22:4673-4680 所描述的）进行序列比对。

所采用的参数如下：

快速配对比对参数：K-tuple(word)size;1，窗口大小；5，空位罚分；

3, number of top diagonals; 5. 记分方法: x 百分比。

多重比对参数: 空位开放罚分; 10, 空位延伸罚分; 0.05。

记分矩阵: BLOSUM。

另外, BESTFIT 程序可以用于确定局部序列比对。

有利地, siRNA 分子长度为 19-23 个核苷酸。

在本发明第一方面的另一个优选实施例中, 该试剂是反义寡核苷酸。

反义分子可以用于有效减少 hCAP18/LL-37 的水平/活性, 其设计需要考虑对于反义方法重要的两个方面。第一方面是输送寡核苷酸进入癌细胞的胞质中, 而第二方面是设计能够在细胞内特异结合特定 mRNA 并抑制其翻译的寡核苷酸。

现有技术公开了许多运送策略, 可以用于有效运送寡核苷酸进入多种类型细胞 (例如, 参见 Luft, 1998, *J Mol Med* 76:75-6; Kronenwett et al, 1998, *Blood* 91:852-62; Rajur et al, 1997, *Bioconjug Chem* 8:935-40; Lavigne et al, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 237:566-71; Aoki et al, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 231:540-5)。

另外, 鉴定与靶 mRNA 有最高预测结合亲和力的序列的算法是已有的, 该算法是基于负责靶 mRNA 和寡核苷酸结构改变的能量学的热力学循环 (例如, 参见 Walton et al, 1999, *Biotechnol Bioeng* 65:1-9)。

一些应用体外系统设计和预测特定寡核苷酸功效的方法也是公知的 (例如, 参见 Matveeva et al, 1998, *Nature biotechnology* 16:1374-1375)。

一些临床研究已经证明了反义寡核苷酸的安全性、可行性及其活性。例如, 适用于癌症治疗的反义寡核苷酸已成功应用 (Hohnlund et al., 1999, *Curr Opin Mol Ther* 1:372-85; Gerwitz, 1999, *Curr Opin Mol Ther* 1:297-306)。最近, 已有通过反义调控抑制人类肝素酶基因在小鼠模型上的表达来抑制人癌细胞的胸膜扩散的报道 (Uno et al, 2001, *Cancer Res* 61:7855-60)。

因此, 本领域技术人员能够容易地设计和实施适合 hCAP18/LL-37 表达下调的反义方法。

优选地, 反义寡核苷酸包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸片段, 或者该片段的突变体。

有利地，反义寡核苷酸长度为 15 到 35 个碱基。例如，20 个碱基的寡核苷酸已经显示能够抑制表皮生长因子受体 mRNA 的翻译（Witters et al, *Breast Cancer Res Treat* 53:41-50 (1999)），25 个碱基的寡核苷酸能够减少促肾上腺皮质激素 90% 以上的表达（Frankel et al, *J Neurosurg* 91:261-7 (1999)）。然而，应认识到也可以采用长度上超出该范围的寡核苷酸，例如 10、11、12、13、或者 14 个碱基，或者是 36、37、38、39 或 40 个碱基。

本领域的技术人员应当了解因为细胞内源性的核酸酶，寡核苷酸易于降解或者失活。为了避免这个问题，可以采用经修饰的寡核苷酸，例如，改变核苷酸间连接，用其他连接替换天然存在的磷酸二酯连接。例如，Agrawal（(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85, 7079-7083）等证明应用寡核苷酸氨基磷酸酯和磷硫酰可以对 HIV-1 的组织培养产生增强的抑制作用。Sarin 等（(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85, 7448-7451）证明应用寡核苷酸甲基磷酸酯可以对 HIV-1 产生增强的抑制作用。Agrawal 等（(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 7790-7794）证明在 HIV-1 感染早期和慢性感染的细胞培养中，应用核苷酸序列特异的寡核苷酸磷硫酰可以抑制 HIV-1 的复制。Leither 等（(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87, 3430-3434）报道应用寡核苷酸磷硫酰可以抑制流感病毒在组织培养中的复制。

已证明含人工连接的寡核苷酸在体内可以抗降解。例如，Shaw 等（(1991) in *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750）报道其他未经修饰的寡核苷酸，其 3' 端采用特定的帽子结构进行封闭后，其在体内具有更好的核酸酶抗性，而且没有帽子结构的寡核苷酸磷硫酰在体内不会被降解。

Agrawal 和 Tang 对合成寡核苷酸磷硫酰的 H-碳磷酸盐化合物方法提供了详细的描述（(1990) *Tetrahedron Letters* 31, 7541-7544），其指导内容参考合并于此。在本领域中寡核苷酸甲基磷酸酯，二硫代磷酸酯，氨基磷酸酯，磷酸酯，桥联二硫代磷酸酯和桥联磷硫酰的合成都是公知的。参见例如，Agrawal and Goodchild (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3539; Nielsen et al (1988) *Tetrahedron Letters* 29, 2911; Jager et al (1988) *Biochemistry* 27, 7237; Uznanski et al (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3401;

Bannwarth (1988) *Helv. Chim. Acta.* 71, 1517; Crosstick and Vyle (1989) *Tetrahedron Letters* 30, 4693; Agrawal et al (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1401-1405, 其指导内容参考合并于此。也可以采用其他合成或者生产方法。在优选实施例中, 尽管核糖核酸 (RNA) 也可以合成和应用, 但是寡核苷酸是脱氧核糖核酸 (DNA)。

本发明中优选采用的寡核苷酸经过设计可以抗内源性核水解酶的降解。寡核苷酸体内降解产生长度减少的寡核苷酸分解产物。这些分解产物与它们全长寡核苷酸相比, 更有可能参与非特异的杂交, 因而更不可能有效。因此, 在体内需要采用可以抗降解的寡核苷酸, 其能够到达靶细胞。将天然的磷酸二酯连接替换一个或者多个内部人工核苷酸间连接, 现有寡核苷酸可在体内更好地抗降解, 例如, 在连接中用硫替换磷酸盐。采用的连接可以包括磷硫酰、甲基磷酸酯、砒、硫酸酯、羰基、二硫代磷酸酯、各种氨基磷酸酯、磷酸酯、桥联磷硫酰和桥联氨基磷酸酯。由于其他核苷酸间连接在本领域中是公知的, 因此这些例子是用于说明的, 而不是限制性的。有一个或者多个连锁被替换磷酸二酯核苷酸间连接的寡核苷酸的合成在本领域中是公知的, 包括生产含有混合的核苷酸间连接的寡核苷酸的合成途径。

寡核苷酸可以通过“加帽”或者在其 5' 或 3' 末端核苷酸引入相似的基团产生对内源性酶延伸的抗性。用于加帽的试剂 Amino-Link II™ 可以从 Applied BioSystems Inc, Foster City, CA 购买获得。加帽方法的描述, 例如 Shaw 等((1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750) 和 Agrawal 等((1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(17), 7595-7599)。

另一个使寡核苷酸抗核酸酶攻击的方法是使其“自身稳定”, 如 Tang 等所描述 ((1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 2729- 2735)。自身稳定的寡核苷酸在其 3' 端含有发夹环结构, 对蛇毒磷酸二酯酶, DNA 聚合酶 I 和胎牛血清的降解有增强的抑制作用。寡核苷酸自身稳定的区域不会干扰其与互补核苷酸的杂交, 小鼠的药物代谢动力学和稳定性研究表明与线性的寡核苷酸相比, 自身稳定的寡核苷酸在体内具有增强的持久性。

在本发明试剂的另一个的优选实施例中, 该试剂是具有 hCAP18/LL-37 结合亲和力的化合物, 例如蛋白质和碳水化合物。

对于“具有结合亲和力的化合物”，我们是指在体内，即癌细胞内 hCAP18/LL-37 存在的生理条件下，能够与 hCAP18/LL-37 结合的化合物。

例如，该化合物与 hCAP18/LL-37 的活性位点可以基本可逆或者不可逆的结合。在另一个的实例中，该化合物可以结合 hCAP18/LL-37 的非活性位点片段，从而干扰 hCAP18/LL-37 与配体或者受体的结合。在另一个的实例中，该化合物可以与 hCAP18/LL-37 的片段结合，从而通过别构效应减弱该蛋白的活性。该别构效应可以是在 hCAP18/LL-37 活性的天然调控中的别构效应，例如在通过“上游激活物”的 hCAP18/LL-37 的活化中。

用于检测测试化合物与 hCAP18/LL-37 的相互作用的方法在本领域是公知的。例如可以应用离子喷雾质谱分析法/高效液相色谱法进行超滤，或者采用其他的物理和分析方法。另外，可以采用荧光共振能量转移检测系统（FRET），该方法是通过测量荧光标记在彼此接近时的相互作用来测量两种荧光标记集团的结合。

用于检测多肽与大分子，例如 DNA、RNA、蛋白质和磷脂，结合的其他方法包括表面等离子共振分析，例如 Plant 等所描述的（1995, *Analyt Biochem* 226(2), 342-348）。在这些方法中可以利用标记的多肽，例如使用放射性或者荧光标记。

另一种鉴定与多肽结合的化合物的方法是将多肽与化合物相接触，检测和/或者测定化合物与上述多肽的结合。可以确定化合物与多肽结合的结合常数。适合检测和/或者测定（定量）化合物与多肽结合的方法是本领域技术人员所公知的，并且可以采用例如高通量操作的方法实施，例如基于芯片的方法，被称为 VISIPS™的新技术已经使得含成百上千或者更多不同分子探针的极小芯片的生产成为可能。这些生物芯片或者阵列上有排列的探针，每个探针分配一个特定的位置。生物芯片每个位置都有一个大小，例如 10 微米。芯片可以用于确定靶分子是否与芯片上任一探针相互作用。在选定的测试条件下，芯片与靶分子接触以后，扫描设备能够检查芯片上每一个位置，确定靶分子是否与该位置的探针相互作用。

鉴定有 hCAP18/LL-37 结合亲和力的化合物的另一个方法是酵母双杂交系统，在该系统中，本发明的多肽可以用于“捕获”结合

hCAP18/LL-37 的蛋白质。酵母双杂交系统的描述参见 Fields & Song, Nature 340:245-246 (1989)。

在本发明这一方面的优选实施例中,该试剂是有 hCAP18/LL-37 配体结合能力的化合物。

例如,该试剂可以是 hCAP18/LL-37 受体(例如 FPRL1)的可溶片段。另外,该试剂可以是模拟抗体的高亲和力分子(所谓的“亲和体”)(例如,参见 US 5,831,012 和 www.affibody.se)。这些配体是由三螺旋束组成的小的简单蛋白质,三螺旋束是基于蛋白 A(金黄色葡萄球菌的一个表面蛋白)的一个 IgG 结合域的支架。该支架具有作为亲和配体的优良特性,经设计可以高亲和力地结合任何给定的靶蛋白质。

有利地,与 hCAP18/LL-37 有结合亲和力的化合物是或者包括多肽。

例如,该化合物可以是抗体,如单抗或者多抗,或者是其抗原结合片段。

对于“抗体”,基本上我们包括天然抗体分子,以及嵌合抗体、人源化抗体、人抗体(其中与天然人抗体相比,至少有一个氨基酸发生突变)、单链抗体、双特异抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或者轻链的同源二聚体和异源二聚体、抗原结合片段及其衍生物。

对于“抗原结合片段”,我们是指能够与 hCAP18/LL-37 结合的抗体的功能片段。

优选地,抗原结合片段选自 Fv 片段(例如单链 Fv 片段和二硫键连接的 Fv 片段)、Fab 样片段(例如 Fab 片段, Fab'片段和 F(ab)₂ 片段)、单个可变区(例如重链和轻链可变区)和功能域抗体(dAbs,包括单体和双体的形式[即 dAb-linker-dAb])。

应用抗体片段而不是整个抗体分子具有多重优势。较小片段可以提高药理性质,例如对固体组织有更好的渗透。而且,抗原结合片段,如 Fab、Fv、ScFv 和 dAb 抗体片段能够在大肠杆菌表达并且分泌,易于上述片段的大量生产。

本发明也包括修饰的抗体及其抗原结合片段,例如通过聚乙二醇或者其他适合的聚合物进行共价结合修饰。

抗体和抗体片段的生产方法在本领域是公知的。例如,抗体可以通

过下列任一方法产生，通过诱导抗体分子的体内表达、免疫球蛋白文库的筛选（Orlandi. et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Set U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al, 1991, Nature 349:293-299）或者通过细胞系培养制备单克隆抗体分子。这些包括，但不限于杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和 EB 病毒（EBV）杂交瘤技术（Kohler et al, 1975. Nature 256:4950497; Kozbor et al, 1985. J Immunol. Methods 81:31-42; Coxe et al, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al, 1984. Mol. Cell Biol. 62:109-120）。

应用现有技术可以制备针对所选抗原的合适的单克隆抗体，例如在“Monoclonal Antibodies: A manual of techniques”，H Zola (CRC Press, 1988) 和“Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications”，J G R Hurrell (CRC Press, 1982)中所公开的。

抗体片段可以通过本领域公知的方法获得（参见，例如，Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York）。例如，根据本发明，抗体片段可以通过抗体的蛋白水解或者在大肠杆菌或者哺乳动物细胞（例如中国仓鼠卵巢细胞或者其他蛋白表达系统）中表达编码该片段的 DNA 产生。另外，可以通过传统方法采用胃蛋白酶或者木瓜蛋白酶消化全分子抗体获得抗体片段。

优选人源化抗体用于人的治疗或者诊断，是本领域技术人员公知的。人源化的非人（例如鼠）抗体是基因工程嵌合抗体或者是优选地含非人抗体来源的最小片段的抗体片段。人源化抗体包括人抗体（受体抗体）互补决定区被非人物种抗体（供体抗体）互补决定区残基替换的抗体，非人物种例如小鼠和具有所要求功能的大鼠或兔。在一些实例中，人抗体的 Fv 框架残基被相应的非人残基所替换。人源化抗体也可以包括在受赠抗体或者输入的互补决定区或框架序列中均不存在的残基。通常，人源化抗体基本上包括至少一个可变区，典型地包括两个可变区，它们是所有或者基本上所有与非人抗体相应的互补决定区，和所有或者基本上所有与相关的人共有序列相应的框架区。人源化抗体最好也包含至少一部分典型的人抗体来源的抗体恒定区，例如 Fc 区（参见，例如，Jones et al, 1986. Nature 321:522-525; Riechmann et al, 1988, Nature 332:323-329;

Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol* 2:593-596)。

非人抗体人源化的方法在本领域是公知的。通常，人源化抗体中有一个或多个插入氨基酸残基是非人来源的。这些非人氨基酸残基，通常被称为输入残基，典型地来自输入的可变区。人源化可以通过相应的啮齿目动物的互补决定区替换人互补决定区。(参见，例如，Jones et al, 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al, 1988. *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al, 1988, *Science* 239:1534- 15361; US 4,816,567)。因此，这些人源化抗体是嵌合抗体，其中基本上至多一个天然人可变区被相应的非人序列所替换。实际上，人源化抗体可以是典型的人抗体，其中一些互补决定区残基，或许还有一些框架区残基被啮齿目动物抗体类似位点的残基所替换。

人抗体也可以应用本领域公知的各种技术进行鉴别，包括噬菌体展示文库(参见，例如，Hoogenboom & Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Cole et al, 1985, In: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner et al, 1991. *J. Immunol.* 147:86-95)。

一旦获得合适的抗体，可以测定其活性，例如通过 ELISA。

在本发明第一方面的特定优选实施例中，可以选择性地传递该试剂到癌细胞或者选择性地通过癌细胞激活该试剂。

对于“选择性”，我们是指癌细胞或者是在癌细胞内，该试剂优先发挥对 hCAP18/LL-37 生物活性的抑制作用(与在癌细胞位点局部使用该试剂不同)。

靶向该试剂于特定细胞类型(例如癌细胞)的方法在本领域是公知的(例如，参见 Vasir & Labhassetwar, 2005, *Technol Cancer Res Treat.* 4(4):363-74; Brannon-Peppas & Blanchette, 2004, *Adv Drug Deliv Rev.* 56(11):1649-59 and Zhao & Lee, 2004, *Adv Drug Deliv Rev.* S6(8):1193-204)。

例如，该试剂可以包含靶细胞特异的部分。

对于“靶细胞特异的”部分，我们是指该试剂的部分包括一个或者多个识别和结合靶细胞实体的结合位点。一旦接触靶细胞，靶细胞特异

的部分可以与抑制剂部分一同内化。

靶细胞特异部分所识别的实体大部分并且优选地特定表达在靶向癌细胞上。靶细胞特异部分可以包含一个或者多个表达于同样类型靶细胞的不同实体的结合位点，或者包含一个或者多个表达于两个或多个不同类型靶细胞的不同实体的结合位点。

优选地，靶细胞特异部分高亲和力识别靶细胞。

对于“高亲和力”，我们是指靶细胞特异部分识别靶细胞，其结合常数 K_d 至少是 10^{-6} M，优选地至少 10^{-9} M， 10^{-10} M 适当，更合适地是 10^{-11} M，还要更合适地是 10^{-12} M，更优选地是 10^{-15} M 或者甚至是 10^{-18} M。

所识别的实体可以是肿瘤细胞表达的任何适合的实体。通常所识别的实体是一种抗原。

抗原实例包括表 1 所列的。

表 1 肿瘤相关抗原

抗原	抗体	当前用途
癌胚抗原	C46 (Amersham) 85A1 2 (Unipath)	结肠/直肠肿瘤的成像和 治疗
胎盘碱性磷酸酶	H17E2(ICRP, Travers & Bodmer)	睾丸癌和卵巢癌的成像 和治疗
胰腺癌	NR-LU-10(NeoRx Corporation)	各种癌症包括小细胞肺 癌的 成像和治疗
多形上皮细胞粘蛋白 (人乳脂肪球)	HMF61(Taylor- Papadimitriou,ICRF) (Antisoma plc)	卵巢癌,胸腔积液,乳腺, 肺以及其他共同的上皮 细胞癌的成像 和治疗
人乳粘蛋白核心蛋白	SM-3(IgG1) ¹	乳腺癌的诊断,成像和治 疗
β 人体绒毛膜促性腺	W14	靶向酶 (CPG2) 于人异

激素		种 移 植 物 绒毛膜癌裸鼠 (Searle et al (1981) Br. J. Cancer 44, 137-144)
人癌碳水化合物	L6 (IgG2a) ²	靶向碱性磷酸酶 ((Senter 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85, 4842-4846)
B 淋巴瘤 CD20 抗原 (正常或者肿瘤的)	1F5 (IgG2a) ³	靶向碱性磷酸酶 (Senter 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sd. USA 85, 4842-4846)

¹ Burchell et al (1987) Cancer Res. 47, 5476-5482

² Hellström et al (1986) Cancer Res. 46, 3917-3923

³ Clarke et al (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1766-1770

其他抗原包括 α 甲胎蛋白、Ca-125、前列腺特异性抗原和表皮生长因子家族成员，即 EGFR, erb B3 和 erb B4。

有利地，靶细胞特异部分是一种抗体（例如，单克隆抗体）或者其抗原结合片段。优选地，该抗体是人源化抗体。

方便地，靶细胞特异部分包括靶细胞的两个或者多个结合位点，其中靶细胞特异部分是一种抗体，或者是其双价片段。该靶细胞特异部分可以有各自的“臂”，用于识别同样的实体或者识别不同的实体。

在本发明的试剂的一个实施例中，靶细胞特异部分有两个“臂”，可以识别同一靶细胞上的不同分子，其中同一靶细胞上的分子不局限于该类型的细胞，可以发生在一些其他类型的细胞。例如，靶细胞特异部分的一个“臂”可以识别 I, II 和 III 型细胞上的分子，而另一个“臂”可以识别 I, IV 和 V 上的分子。因此，与 II, III 和 IV 型细胞相比较，本发明中包含该靶细胞特异部分的试剂对 I 型细胞有更好的特异性。由于

被发现的完全的靶细胞特异分子数量非常少，因此本发明这部分将非常有用，然而在本发明这部分有用的少数类型细胞的分子是众所周知的。这些分子通常是细胞表面抗原，其交叉反应抗体是公知的。

与表 1 所列的一些抗原结合的单克隆抗体是公知的，但是无论如何，应用目前单克隆抗体的相关技术，大部分抗原的抗体都可以制备（参见上面）。

所识别的实体可以是或者不是抗原，但是可以通过一些其他方式被识别并且选择性的结合。例如，可以是一种特有的细胞表面受体，例如黑色素瘤细胞高表达的促黑素细胞激素（MSH）受体。另外，该实体可以是在靶细胞中诱导的。细胞特异部分可以通过非免疫方式特异结合该实体的一种化合物或者是其部分，例如是细胞表面酶的底物或其类似物，或者似一种信使。

优选地，高亲和力的靶细胞特异部分包括两个或者更多靶细胞的不同结合位点。

靶细胞的不同结合位点可以是，或者不是定向与靶细胞表达的不同实体的两个或多个不同抗体，或者是其片段。另外，靶细胞的不同结合位点可以通过一些其他的非免疫方式识别和选择性结合该细胞。

靶向部分可以通过合适的任一方式与本发明的抑制剂相结合，并保持两部分的功能活性。例如，靶向部分和抑制剂部分都是多肽，他们彼此融合产生融合多肽。这种融合的实例是本领域技术人员所公知的。

在本发明选择性抑制性试剂的另一个实施例中，该试剂是被癌细胞选择性活化的前体药物。

在此应用中所使用的术语“前体药物”是指药物活性底物的前体或者衍生物，与母体药物相比较，对癌细胞具有较小的细胞毒性，并且其能够被酶活化或者转化成更有效的母体形式（参见，例如，D. E. V. Wilman "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions* 14, 375-382 (615th Meeting, Belfast 1986) and VJ. Stella et al "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" *Directed Drug Delivery* R. Borchardt et al (ed.) pages 247-267 (Humana Press 1985)）。

适于生产上述前体药物的方式在本领域是公知的（例如，参见 Denny,

2004, *Cancer Invest.* 22(4):604-19; Rooseboom et al, 2004, *Pharmacol Rev.* 2004 56(1):53-102; WO 03/106491)。

前体药物活化中酶的选择需要考虑一些因素。这些因素包括酶的分子量和物理性质, 生理条件下酶的活性和稳定性, 以及酶产生的药物的性质。

该策略适合各种酶的应用, 这些酶能够释放多种机制不同的抗癌剂。单独的单抗-酶结合物能够产生具有协同活性的机制不同的抗癌剂的有效治疗剂量, 这一事实是特别有意义的。这应当证实对免疫原性的重要性。许多 β -内酰胺酶具有良好的动力学和宽的底物特异性, 以及影响头孢菌素作用底物 3'位置的取代基消除的能力, 因此在这些方面有许多潜力(参见 Svensson et al (1992) "Mab- β -lactamase conjugates for the activation of a cephalosporin mustard prodrug" *Bioconjugate Chem.* 3, 176-181)。

哺乳动物和非哺乳动物来源的酶已经被用于范围很广的前体药物的活化(Senter et al, 1993. *Generation of cytotoxic agents by targeted enzymes.* *Bioconjugate* 4, 3-9; Senter et al, 1991. *Activation of prodrugs by antibody-enzyme conjugates.* In *Immunobiology of Proteins and Peptides VI*, ed. M.Z. Atassi. Plenum Press, New York, pp 97-105)。虽然哺乳动物来源的酶由于减少了免疫原性可能更有益, 但是它们作用的前体药物可以是相应的内源性酶的底物。

本发明的试剂可以用于抑制不同类型癌细胞的增殖, 这是本领域技术人员公知的。然而在一个优选实施例中, 癌细胞是上皮细胞或者鳞状上皮细胞。

有利地, 癌细胞选自乳腺, 胆管, 脑, 结肠, 胃, 生殖器, 肺和导气管, 皮肤, 胆囊, 肝, 鼻咽, 神经细胞, 肾, 前列腺, 淋巴腺和胃肠道的癌细胞。

优选地, 癌细胞是乳腺癌。更优选地, 乳腺癌细胞是 Elston grade III 细胞。最优选地, 乳腺癌细胞是转移性的。

本发明第二方面提供了一种药物组合物, 其包括本发明第一方面的试剂和药物学上可接受的赋形剂、稀释剂或者载体。因此, 本发明进一

步提供了抑制癌细胞增殖的药剂。

在此使用的“药物制剂”是指根据本发明有效的治疗组成。

在此使用的“治疗有效剂量”，或者“有效剂量”，或者“治疗上有效”是指对于给定的条件和用药方法能够产生治疗效果的剂量。该剂量是活性物质与需要的添加剂和稀释剂（即载体或者给药载体）结合产生需达到的治疗效果的预计量。该剂量进一步是指足以减少和最优选地是阻断宿主的活性，功能和反应的临床显著缺陷的剂量。另外，有效治疗剂量足以提高宿主的临床显著状况。化合物剂量可以根据其特定活性而变动，这是本领域技术人员所公知的。合适的给药剂量可以包含活性组分与需要的稀释剂结合产生需达到的治疗效果的预计量。本发明组分的方法和制造使用中提供了活性成分的治疗有效剂量。普通熟练的医务或者兽医工作者可以根据患者如年龄、体重、性别、身体状况、并发症、其他疾病等特征，确定治疗有效剂量，这是本领域公知的。

因此，在本发明的优选实施例中提供了药物制剂，其包含本发明试剂足够抑制癌细胞 hCAP18/LL-37 活性的剂量和药用的载体。

本领域技术人员已知，该试剂或者其组成的有效剂量可以单一推注剂量（即急性给药）施用或者更优选地一段时间内施用一系列剂量（即长期用药）。

本发明试剂可以根据使用的化合物有效性/毒性及其使用的适应症来配制不同的浓度。优选地，该组分包含的试剂浓度在 0.1 μM —1 mM 之间，更优选的在 1 μM —100 μM 、5 μM —50 μM 、10 μM —50 μM 和 20 μM —40 μM 之间，最优选的约 30 μM 。对于体外应用，该组分包含的本发明试剂的浓度较低，例如在 0.0025 μM —1 μM 之间。

本领域技术人员已知，本发明试剂通常与根据给药途径和标准用药所选择的合适的药用赋形剂、稀释剂或者载体混合给药（例如，参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA）。

例如，本发明试剂可以通过口服、口腔给药或者舌下给药，药物可以是片剂、胶囊、胚珠、酞剂、溶液或者悬浮液的形式，可以包括增香剂或者着色剂，可以是立即给药、延迟给药或者控制释放给药。本发明

试剂也可以通过海绵体内注射给药。

这种片剂可以包括赋形剂，例如微晶纤维素、乳糖、枸橼酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和甘氨酸，分解剂例如淀粉（优选地玉米、土豆或者木薯淀粉），淀粉羟乙酸钠、交联羧甲基纤维素钠和确定的复合硅酸盐，和颗粒化粘合剂例如聚乙烯吡咯酮、羟丙基甲基纤维素（HPMC）、羟丙纤维素（HPC）、蔗糖、明胶和阿拉伯胶。另外，可以包括润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸、甘油二十二烷酸酯和滑石粉。

相似类型的固体组合物也可以在胶囊中用作填料。关于这一点，优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、乳糖或者高分子量聚乙烯乙二醇。对于水混悬液和/或者酞剂，本发明试剂可以与不同的甜味剂或者增香剂，色素或者染料组合，可以与乳化剂和/或者助悬剂组合，可以与稀释剂例如水、乙醇、丙二醇和甘油组合，以及它们的组合。

本发明试剂也可以经注射途径给药，例如，静脉内、关节内、动脉内、向腹膜内、向鞘内、心室内、胸骨内、颅内的、肌内注射或者皮下注射，或者通过输液给药。最好采用包含其他物质的无菌水溶液，例如充足的盐或者葡萄糖，可以使溶液与血液等渗。如果有必要，水溶液应当具有合适的缓冲（优选地 pH 从 3—9）。通过采用本领域技术人员公知的标准制药技术，在无菌条件下配制合适的注射组分是易于实现的。

适合注射途径给药的形式包括水和非水的无菌注射溶液，以及水和非水的无菌悬浮液，水和非水的无菌注射溶液可以包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使该组分与受试者血液等渗的溶质；水和非水的无菌悬浮液可以包括助悬剂和增稠剂。该形式可以采用单剂量或者多剂量包装，例如密封的安瓿和管形瓶，也可以采用冷冻干燥（冻干）条件储存，仅仅需要在使用前加入无菌的液相载体，例如，注射用水。临时注射溶液和悬浮液可以由以前所描述的该类无菌粉剂、颗粒和片剂来制备。

对于人类患者的口服和注射给药，本发明试剂的每日剂量水平通常为 1—1000mg/每个成年人（即大约 0.015—15mg/kg），采用单一或者分份剂量。

本发明试剂也可以经鼻内或者通过吸入途径给药，可以采用干粉吸入剂或者喷雾剂的形式给药，它们是应用合适的推进剂（例如二氯二氟

甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、一种氢氟烷烃例如 1, 1, 1, 2-四氟乙烯 (HFA 134A3 或七氟丙烷(HFA 227EA3)、二氧化碳或者其他合适的气体) 通过加压容器、泵、喷雾器来制备的。关于加压气雾剂, 可以通过提供定剂量传递的泵来确定剂量单位。加压容器、泵、喷雾器包括含活性物质的溶液或者悬浮液, 例如采用乙醇和推进剂的混合物作为溶剂, 可以包含润滑剂, 例如去水山梨糖醇三油酸酯。在吸入器或者吹入器中使用的胶囊和药包(例如, 由明胶构成的) 可以包含本发明试剂的干粉混合物和合适的干粉基质, 例如乳糖或者淀粉。

优先安排气雾剂或者干粉形式, 以至于每个定剂量或者“喷”包含至少 1mg 的本发明试剂可以传递给患者。气雾剂总的每日剂量因不同的患者而不同, 可以单一剂量给药, 或者更普遍地采用整天分份剂量给药。

另外, 本发明试剂可以采用栓剂或者阴道栓剂的形式给药, 或者在局部应用洗液、溶液、乳剂、软膏或扑粉的形式。本发明试剂也可以经皮肤给药, 例如, 通过使用皮肤贴。也可以通过眼睛给药。

对于眼睛给药, 本发明试剂可以制成微粒化的等渗、可调 pH 值、无菌盐水的悬浮液, 或者优选地制成等渗、可调 pH 值、无菌盐水的溶液, 可以与防腐剂任意组合, 例如苯扎氯铵。另外, 可以制成软膏, 例如凡士林油。

对于皮肤的局部应用, 本发明试剂可以制成包含悬浮或者溶化的活性化合物的合适软膏, 例如与下列一个或者多个的混合物: 液状石蜡、液体石蜡、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯化合物、乳化蜡和水。另外, 可以制成包含悬浮或者溶化的活性化合物的合适的洗液或者乳剂, 例如, 与下列一个或者多个的混合物: 液状石蜡、硬脂山梨坦、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、泛醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

适合口腔局部给药的组分包括增香基质中含活性成分的锭剂, 通常是蔗糖和阿拉伯胶或者一种树液; 和惰性基质中含活性成分的锭剂, 例如明胶和甘油, 或者蔗糖和阿拉伯胶; 以及液相载体中含活性成分的口腔洗液。

在此, 该试剂是一种多肽, 可以优选地采用持续释放的药物传递系

统，例如微球。这些设计可以明确地减少注射的频率。该系统的一个实例是重组生长激素缓释剂，其采用胶囊包裹重组人生长激素（rhGH）形成可生物降解的微球，一旦注射之后，能够在持续时间内缓慢释放 rhGH。

另外，本发明多肽试剂可以通过外科手术植入设备来给药，可以直接释放药物到需要的位点。

蛋白质和多肽的给药也可以采用电穿孔治疗（EPT）系统。该设备可以通过向细胞传递脉冲电场来增加细胞膜对于药物的通透性，显著增强胞内药物的传递。

蛋白质和多肽的传递也可以采用电导入(EI)。当皮肤表面上直径达到 30 微米的小颗粒经受与电穿孔所使用的相同或者相似的电脉冲时产生 EI。在 EI 中，这些颗粒经驱动通过角质层，进入皮肤深层。这些颗粒可以装载或者包被药物或基因，可以作为“子弹”在皮肤上产生药物进入的孔。

蛋白质和多肽传递的另一个方法是温度敏感的可以注射的 ReGe1。ReGe1 在低于体温时是可以注射的液体，而在体温时它立即形成凝胶库，缓慢侵蚀并且溶解成为已知的、安全的、可生物降解的聚合物。随着生物多聚物的溶解，可以在一段时间内传递活性药物。

药用蛋白质和多肽也可以经口服施用。该系统应用体内维生素 B12 经口摄取的自然途径，共同传递蛋白质和多肽。蛋白质或者多肽可以利用维生素 B12 的摄取系统通过肠壁。可以产生维生素 B12 类似物和药物的合成物，该合成物保留其维生素 B12 部分对内因子（IF）的显著亲和力以及其药物部分的显著生物活性。

本发明中寡核苷酸或者多核苷酸试剂的施用方法在本领域也是公知的（参见 see Dass, 2002, J Pharm Pharmacol 54(1):3-27; Dass, 2001, Drug Deliv. 8(4):191-213; Lebedeva et al., 2000, Eur J Pharm Biopharm. 50(1):101-19; Pierce et al, 2005, Mini Rev Med Chem. 5(1):41-55; Lysik & Wu-Pong, 2003, J Pharm Sci. 2003 2(8):1559-73; Dass, 2004, Biotechnol Appl Biochem. 40(Pt 2): 113-22; Medina, 2004, Curr Pharm Des. 10(24):2981-9）。

例如，本发明的构建体可以采用包括逆转录病毒在内的方法导入到

细胞中,以便该构建可以插入到细胞基因组中。例如, Kuriyama et al (1991) Cell Struc. and Func. 16, 503- 510 中采用了逆转录病毒。含上述多核苷酸的逆转录病毒 DNA 构建体可以采用本领域公知的方法进行制备。为了应用该构建体产生具有活性的逆转录病毒,通常采用 psi2 嗜性包装细胞系,该细胞系生长在含 10% 小牛血清(FCS)的 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基(DMEM)。该细胞系的转染可以方便地采用磷酸钙共沉淀,通过添加 G418 到终浓度 1mg/ml (假设逆转录病毒构建体含 neo^R 基因) 来筛选稳定的转染细胞。对独立的菌落进行分离并且扩大培养,去除培养上清,用孔径 0.45 μ m 的滤器进行过滤并于 -70 $^{\circ}$ C 储存。对于将逆转录病毒导入到肿瘤细胞中,便于直接注射添加 10 μ g/ml 聚凝胺的逆转录病毒上清。对于直径超过 10mm 的肿瘤,适合注射 0.1ml-1ml 之间的逆转录病毒上清;优选地是 0.5ml。

另外,如 Culver et al (1992) Science 256, 1550-1552 所公开的,注射可以产生逆转录病毒的细胞。导入的产逆转录病毒的细胞经处理可以产生活性的逆转录病毒载体颗粒,在肿块原位不断产生该载体。因此,如果与产逆转录病毒载体的细胞在体内混合,可以成功转导增殖细胞。

本发明也可以采用靶向逆转录病毒;例如,可以将有特定结合亲和力的序列设计到预先存在的病毒 env 基因中(参见 Miller & Vile (1995) Faseb J. 9, 190-199 for a review of this and other targeted vectors for gene therapy)。

其它方法包括将构建体简单地导入表达细胞,其即可以是短暂的,也可以长期整合到基因组中。后者的实例包括脂质体(Nassander et al (1992) Cancer Res. 52, 646-653)

对于免疫脂质体的制备,根据 Martin & Papahadjopoulos (1982) J Biol. Chem. 257, 286-288 的方法合成 MPB-PE(N-[4-(p- maleimidophenyl) 丁酰]-磷脂酰乙醇胺)。MPB-PE 整合到脂质体双层中,允许抗体或者抗体片段共价耦联到脂质体表面。脂质体可以方便地装载本发明的试剂(例如 DNA 或者其它基因构建体)并导入到靶细胞,例如,通过在该试剂的溶液中形成上述脂质体,然后在 0.8 MPa 的氮气压力下连续挤压通过 0.6 μ m 和 0.2 μ m 的聚碳酸酯膜滤器。挤压过后,80 000 x g 超速离心 45min 从

游离的 DNA 构建体中分离捕获的 DNA 构建体。去氧缓冲液中新鲜制备的 MPB-PE-脂质体与新鲜制备的抗体（或者抗体片段）混合，4°C 氮气条件下过夜颠倒旋转进行耦联反应。通过 80 000 x g 超速离心 45min 分离免疫脂质体与未结合的抗体。免疫脂质体可以腹膜内注射或者直接注射到肿瘤。

其它传递方法包括携带外源 DNA 的腺病毒（参见 Curiel Prog. Med. Virol. 40, 1-18），它通过抗体-多聚赖氨酸桥和转铁蛋白-多聚阳离子偶联物作为载体（Wagner et al (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414）。在这些方法中首先形成多聚阳离子-抗体与本发明寡核苷酸试剂的复合物，其中抗体是野生型腺病毒或者引入与抗体结合的新表位的变异腺病毒所特异的。

多聚阳离子成分通过与磷酸主链的静电相互作用结合寡核苷酸试剂。因为腺病毒含有不变的纤维和五邻体蛋白，它能够内化进入细胞并且携带本发明的寡核苷酸试剂进入细胞。优选地多聚阳离子是多聚赖氨酸。

寡核苷酸试剂也可以通过腺病毒进行传递，其中寡核苷酸试剂存在于腺病毒颗粒内，例如下面所描述的。

一种替代方法采用了高效核酸传递系统，该系统利用受体介导的胞吞作用携带大分子进入细胞。通过转铁蛋白与结合核酸的多聚阳离子结合来完成。人转铁蛋白、或者鸡同系物伴清蛋白、或者是它们的组合与小的 DNA 结合蛋白精蛋白或者各种尺寸的多聚赖氨酸共价耦联。这些修饰的转铁蛋白分子保持其结合同种受体以及调节有效的铁转运到细胞的能力。不论核酸大小（从短的寡核苷酸到 21 千碱基对的 DNA），转铁蛋白-多聚阳离子与 DNA 构建体或者本发明其它基因构建体形成电泳条件下稳定的复合物。当转铁蛋白-多聚阳离子和 DNA 构建体或者本发明其它基因构建体的复合物被提供给肿瘤细胞，预期在细胞内该构建体产生高水平的表达。

受体介导的 DNA 构建体或者本发明其它基因构建体的高效传递也可以应用 Cotten et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 6094-6098 方法所生产的有内体分裂活性缺陷的或者通过化学方法灭活的腺病毒颗粒。

该方法依据的是腺病毒允许其 DNA 从内体中释放，该过程不需要经过溶酶体，需要例如结合 DNA 构建体或者本发明其它基因构建体的转铁蛋白的存在，该构建体通过与腺病毒颗粒相似途径被细胞吸收。

该方法具有优势：其不需要复杂的逆转录病毒的构建；没有逆转录病毒感染所产生的基因组永久修饰；靶向表达系统与靶向传递系统耦联，因此减少了对其它细胞类型的毒性。

“裸露 DNA”和与阳离子和中性脂类复合的 DNA 也可以用于将本发明 DNA 引入待治疗个体的细胞中。在 Ledley (1995) *Human Gene Therapy* 6, 1129-1144 中描述了基因治疗的非病毒方法。

可选择的靶向传递系统，例如 WO 94/10323 所公开的修饰腺病毒系统也是公知的，其中典型地，DNA 装载于腺病毒或者腺病毒样颗粒中。Michael et al (1995) *Gene Therapy* 2, 660-668 公开了修饰腺病毒在纤维蛋白中添加细胞选择性成分。突变体腺病毒在 p53 缺失的人肿瘤细胞中选择性地复制，例如在 Bischoff et al (1996) *Science* 274, 373-376 中所公开的，其可以用于将本发明基因构建体导入细胞。因此，本发明另一方面提供了包含本发明基因构建体的病毒或者病毒样颗粒。其它适合的病毒或者病毒样颗粒包括单纯疱疹病毒、腺病毒相关病毒、牛痘和细小病毒。

在另一个的实施例中，选择性阻断 hCAP18/LL-37 功能的试剂是一种核酶，它能够切割靶定 hCAP18/LL-37 的 mRNA 或者 DNA。采用与反义分子基本相同的方式和载体用于表达该核酶的基因。

在此对病毒或者病毒样颗粒基因组中编码的核酶进行了公开，在 US 5,180,818, US 5,168,053, US 5,149,796, US 5,116,742, US 5,093,246 和 US 4,987,071 中对其进行了描述。

反义分子或者核酶的表达需要细胞特异的启动子元件。

在本发明组分的特别优选实施例中，该组分能够将本发明试剂靶向传递到癌细胞。

本发明技术人员能够进一步了解该试剂和本发明的药用组成可以应用于医疗和兽医领域。因此，本发明试剂可以用于治疗人和非人类的动物（例如马、狗和猫）。然而优选地，患者是人。

本发明第三方面提供了抑制患者癌细胞增殖的方法，该方法包括对

患者施用本发明第一方面的试剂或者本发明第二方面的药用组分。

优选地，患者是人。

有利地，该试剂选择性地导入癌细胞或者选择性地被癌细胞活化。

因此，根据本发明第一方面，本发明进一步提供了一种用作药物的试剂。

优选地，该试剂用于治疗癌症。

对于“治疗”，我们包括患者的治疗性和预防性治疗。术语“预防性”用来包括多肽或者在此描述的组分的使用，其阻断或者减少患者或者受试者患癌症的可能性。

正如上面所讨论的，术语“有效剂量”在此用来描述根据本发明化合物的浓度或者数量，它们可以对治疗的疾病或者状况产生良性改变，该改变是否是减轻、良性的生理结果、逆转或者是治疗的疾病状况的减弱、预防或者减少疾病状况发生的可能性，这些都依赖于所治疗的疾病或者状况。本发明试剂可以组合使用，每种试剂都可以采用其有效剂量，其中有效剂量可以包括协同剂量。

根据本发明第一方面，本发明另一方面提供了制备抑制癌细胞增殖的药物的试剂。

有利地，癌细胞是上皮细胞。另外，癌细胞可以是鳞状上皮细胞。

方便地，癌细胞选自乳腺、胆管、脑、结肠、胃、生殖器、肺和导气管、皮肤、胆囊、肝、鼻咽、神经细胞、肾、前列腺、淋巴腺和胃肠道的癌细胞。

优选地，癌细胞是乳腺癌细胞。更优选地，乳腺癌细胞是 Elston III 级细胞。最优选地，乳腺癌细胞是转移性的。

本发明第六方面提供了检测患者癌细胞的方法，该方法包括以下步骤：

- (a) 提供待测病人的细胞样品。
- (b) 测量细胞产生的 hCAP18/LL-37 量（直接或者间接）：和
- (c) 比较步骤 (b) 测量的 hCAP18/LL-37 量和正常细胞产生的 hCAP18/LL-37 量。

其中与健康细胞水平相比较，患者细胞样品的 hCAP18/LL-37 水平提

高表明这些细胞是癌细胞。

因此，该方法提供了用于患者诊断癌症的方法。

在优选实施例中，步骤（a）中细胞选自乳腺、胆管、脑、结肠、胃、生殖器、肺和导气管、皮肤、胆囊、肝、鼻咽、神经细胞、肾、前列腺、淋巴腺和胃肠道组织细胞。

例如，步骤（a）中细胞样品来自肿瘤或者疑是肿瘤的组织。

优选地，步骤（b）包括细胞样品与结合 hCAP18/LL-37 的试剂相接触，然后检测结合的 hCAP18/LL-37 量。

样品中蛋白质的检测方法在本领域是公知的，例如放射免疫分析法和酶联免疫吸附试验。

有利地，结合 hCAP18/LL-37 的试剂是抗体或者其抗原结合片段。

在一个实施例中，步骤（b）包括(i) 细胞与结合 hCAP18/LL-37 的试剂相接触；(ii) 用抗体或者其抗原结合片段检测与该试剂结合的 hCAP18/LL-37 的量。例如，步骤（b）可以采用酶联免疫吸附试验。

在另一个实施例中，步骤（b）包括测量细胞内 hCAP18/LL-37 的 mRNA 量。所适用的方法在本领域是公知的（例如，参见 *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press）。

方便地，步骤（b）可以采用 DNA 印迹法或者逆转录 PCR。

本发明第七方面提供了监测患者癌细胞进展的方法，该方法包括：

（a）提供第一时间点收集自患者的细胞样品并且依据本发明第六方面的方法检测其中癌细胞。

（b）提供第二时间点收集自患者的细胞样品并且依据本发明第六方面的方法检测其中癌细胞。

（c）比较步骤（a）和（b）测量的癌细胞数。

其中与步骤（a）相比较，步骤（b）中测量的癌细胞数增加表明癌症的进展。

本发明另一方面提供了一种诊断试剂盒，它采用本发明第六方面的方法，其包含结合 hCAP18/LL-37 或者 hCAP18/LL-37 mRNA 的试剂。

在优选实施例中，该试剂盒包含能够结合 hCAP18/LL-37 的抗体或者

其抗原结合片段（参见上）。该试剂盒另外包含能够结合第一抗体的第二抗体，例如在 ELISA 中所使用的。

在另一个实施例中，该试剂盒包含能够与 hCAP18/LL-37 mRNA 选择性杂交的寡核苷酸。优选地，寡核苷酸包括或者由 SEQ ID NO:1 核苷酸序列的片段或者是其突变体组成。探针应该能够在高严谨度条件下与 hCAP18/LL-37 mRNA 选择性杂交。有利地，该试剂盒包含一对适合 hCAP18/LL-37 mRNA PCR 扩增的引物。

PCR 引物和其它能够与目标 mRNA 选择性杂交的杂交探针的设计，以及其应用方法在本领域是公知的，例如参见 Sambrook & Russell, *supra*。

在优选实施例中，结合 hCAP18/LL-37 和/或者能够与 hCAP18/LL-37 mRNA 选择性杂交的试剂包括可以检测的部分。

对于“可以检测”，我们包括单原子和分子，它们直接或者间接涉及可检测的种类的产物。合适的检测部分在药物化学中是公知的，并且这些部分与多肽或者蛋白相结合在本领域中也是公知的。可检测部分包括，但不限于下列：放射性同位素（例如 $^3\text{H}_5$ 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 $^{90}\text{Y}_5$ 、 ^{188}Re ），放射性核素（例如 $^{11}\text{C}_5$ 、 $^{18}\text{F}_5$ 、 ^{64}Cu ），荧光标记（例如异硫氰酸荧光素、罗丹明、lanthanide phosphors、羰花青），酶标记物（例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶），化学发光，生物素基和可以为二级报告子识别的预先确定的多肽表位（例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体结合位点、金属结合位点、表位标签）。在一些实施例中，可以通过各种长度的间隔臂来添加标签以减少潜在的空间位阻。

优选地，该诊断试剂盒（至少足够进行一次分析的量）包含独立包装的诊断试剂。典型地也包括该包装试剂的使用说明书。该说明书典型地包含明确表述该试剂地浓度和/或者至少一种分析方法的参数，例如需要混合的试剂和样品的相对量、试剂/样品混合物的保存期、温度、缓冲条件等等。

附图说明

关于下列附图的非限制性实例用于进一步描述本发明：

图 1 hCAP18/LL-37 在乳腺癌中高表达。

(a) III 级乳腺导管癌切片 (患者 no 7, 表 2), 表明在基质岛周围 (st) 肿瘤细胞 (红色沉淀) 对蛋白 hCAP18 具有强免疫反应。(b) 原位杂交表明在同样组织的切片中与 hCAP18 mRNA 的匹配信号。在暗视野照明法中出现白色颗粒, 表明出现强烈的放射自显影信号。(c) 癌细胞的高倍镜视图表明肿瘤细胞没有免疫反应性, 其相邻细胞具有强的免疫反应性。(d) 血管内乳腺癌细胞具有 hCAP18 免疫反应性。(e) 与 cathelin 重组多肽的免疫吸附完全破坏了 hCAP18 的免疫反应性 (与图 1a 相同组织)。(f) 在免疫吸附中, hCAP18 免疫染色作为阳性对照 (与图 1a 相同组织)。(g) 正常乳腺上皮组织对 hCAP18 有弱免疫反应性。显微照片 (a, c-g) 显示的是采用 1: 500 稀释的 hCAP18 抗体的结果。刻度线 (a, b) =100um; (c, d) =25um; (e, f, g) =10um。

图 2 免疫印迹法检测乳腺癌的 hCAP-18/LL-37。

患者临床资料见表 2 (样品 1-10)。采用重组 cathelin (C) 和 LL-37 肽 (L) 作为参考大小。正常乳腺组织见泳道 1。Elston I 级肿瘤见泳道 2, 4 和 5。II 级肿瘤见泳道 3, III 级见泳道 6-10。在所有组织中都有与天然未处理的 18kDa 全蛋白相对应的免疫反应条带。在 5 个 III 级肿瘤中的 4 个 (no 7-10) 都可以看到经处理的 LL-37 肽 (4kD)。

图 3 上皮细胞中 hCAP-18 的转基因表达加快细胞的增殖。

(a) 上部, 左泳道; HEK293 提取物免疫印迹 (抗 LL37 抗血清)。双顺反子载体 hCAP18 + EGFP (hCAP18/E) 转染细胞并且蛋白 hCAP18 获得表达。图上部, 右泳道; 只有 EGFP 转染 HEK293 细胞 (E)。图下部; 与对照细胞 (E) 相比较, HEK293 细胞 (hCAP18/E) 具有显著地高增殖率 (通过流式细胞仪确定)。丽春红染色作为上样对照。(b) 图上部, 左泳道; (a) 描述的 HaCaT 细胞转染。图下部; 与对照细胞相比较, hCAP18 转染细胞具有显著地高增殖率 (通过掺入的 ³H-脱氧胸腺嘧啶苷来确定)。

图 4 合成 LL-37 多肽处理增加上皮细胞的细胞增殖。

HaCaT 细胞血清饥饿培养 72 小时同步化, 然后用 10μg/ml 的 LL-37

生物活性合成肽处理 36 小时 (DMEM + 5% FCS + PEST), 与未处理 (对照) HaCaT 细胞相比较, 显著增加细胞增殖。增值率通过掺入的 [^3H] - 脱氧胸腺嘧啶苷确定。

图 5 LL-37 受体 FPRL1 在乳腺癌和正常乳腺上皮组织中表达。

(a) Elston 2 级乳腺导管癌切片 (患者 no 12, 表 2) 与肿瘤细胞 FPRL1 受体具有显著的免疫反应性 (红色沉淀)。(b) 正常乳腺上皮组织切片显示对导管区 FPRL1 有免疫反应性 (红色沉淀)。显微照片显示的是采用 1:400 稀释的 FPRL1 抗血清获得的结果。刻度线 (a)=50 μm ; (b)=10 μm ;(c) 免疫印迹显示在正常组织 (N) 和乳腺癌 (T) 组织中 LL-37 受体 FPRL1 都有表达。(d) 实时 PCR 结果显示转染双顺反子载体 hCAP18 + EGFP (hCAP18/E) 的 HaCaT 细胞显著增加 FPRL1 受体 mRNA 的表达, 只转染 EGFP 的 HaCaT 细胞作为对照 (E)。

图 6 雌激素受体 (ER) 和淋巴结 (N) 阳性的乳腺肿瘤中, hCAP18/LL-37 的表达增加 (对数刻度显示)。

从 140 份乳腺肿瘤和 4 份未感染的乳腺组织样品中提取 RNA, 采用随机六聚体作为引物进行反转录。根据标准规程, 通过实时 PCR 采用 10ng 的 cDNA 测定 hCAP18 转录物的表达。通过 18S-RNA 定量使样品标准化。未感染样品的平均表达值设定为 1。通过方差分析统计评价平均值和偏差。

图 7 LL-37 抑制 HEK 细胞和 HaCaT 细胞的喜树碱诱导的凋亡。

A. 亚融合状态细胞用不同浓度 LL-37 (1, 2 和 4 μm) 处理 24 小时。单用培养液处理的细胞作为对照细胞 (a) 然后细胞在不含 (a 到 d) 或者含 (e 到 h) 6 μm 喜树碱条件下进一步培养 24 小时。收集细胞并进行双色凋亡分析和流式细胞分析, 并根据荧光强度进行四分之一扇面分析将收集的细胞分为活的 (没有或者少许荧光), 凋亡的 (FL-1 YOPRO 染色阳性) 和坏死的 (FL-1 和 PI 荧光阳性)。该图表示 3 个独立的试验, 每个都进行了三次重复。

B. 凋亡细胞的定量分析。

图 8 HEK_n 细胞的流式分析表明 HEK_n 细胞经 LL-37 预处理可以保护其免于喜树碱诱导的凋亡。

经 1 或者 2 μ m LL-37 处理 24 小时的细胞 (b, c, e, f) 和未处理的细胞, 分别用喜树碱处理 24 小时 (d-f) 诱导其凋亡。然后通过流式细胞分析检测未凋亡的细胞群落 (2N-4N) 和凋亡的细胞群落 (小于 2N)。图显示的是 3 次实验的代表结果, 其中每个都进行了三次重复。

图 9 LL-37 减少 HEK_n 细胞中半胱天冬酶-3 的喜树碱活化。

细胞在含或者不含 LL-37 和喜树碱条件下培养, 然后收集细胞并且通过 VDVAD-AMC 的体外水解分析半胱天冬酶-3 活性。与喜树碱孵育 24 小时诱导半胱天冬酶的活化, 可以通过 LL-37 处理细胞减少半胱天冬酶的活化。数值是三次不同实验的平均值, 每个都进行了三次重复。

图 10 LL-37 处理增加 IAP2 的表达

用 2 μ m LL-37 处理 HEK_n 细胞, 刺激后不同时间点收集细胞。对这些细胞的 RNA 进行反转录, 通过实时 PCR 确定 IAP-2 的表达。每个时间点的 IAP-2 转录水平以 18S-RNA 标准化并相对于未处理细胞来显示 (每个时间点的对照设为 1)。

图 11 LL-37 增加 HEK 细胞前列腺素内过氧化物合酶-2 (COX-2) 的表达

用 2 μ m LL-37 处理 HEK_n 细胞, 刺激后 6, 12 和 24 小时收集细胞。在每个时间点未处理细胞作为对照 (淡灰柱图)。对这些细胞的 RNA 进行反转录, 通过上面的定量 PCR 确定与对照相比 COX-2 的相对表达。

图 12 COX-2 的抑制抵消 LL-37 诱导的 IAP-2 的增加。

用 (或者不用) 特异的 COX-2 抑制剂 SC-791 (25nM) 处理 HEK_n 细胞, 然后进一步与 LL-37 (2 μ m) 孵育 6 小时 (或者不含 LL-37)。IAP-2 mRNA 的水平通过 RT-PCR 分析并相对未处理的对照样品来显示。

具体实施方式

例 A: 抗菌蛋白 hCAP18/LL-37 是推测的上皮细胞生长因子, 其在乳腺癌中高表达。

背景技术

在此实例中, 调查研究了一系列乳腺癌 hCAP18/LL-37 的表达模式, 证实在肿瘤细胞中 hCAP18 mRNA 和蛋白显著上调, 而在临近基质中没

有显著上调。有趣的是，在最高组织等级的肿瘤中检测到 hCAP18 蛋白的最高水平，而在一些低等级肿瘤中 hCAP18 的水平与正常乳腺组织中检测的相当。这些发现与假设的抗菌肽的抗肿瘤效应明显不同，但是与最近的发现一致，其提出了 hCAP18/LL-37 在上皮细胞修复和血管发生中的作用^{5,10}。进一步支持 hCAP18/LL-37 作为生长促进因子，在此我们证明上皮细胞的增殖可以显著增强，其既可以通过用合成的生物活性 LL-37 肽处理，也可以通过 hCAP18 的转基因表达。

材料和方法

组织

28个乳腺癌患者的冷冻肿瘤组织从瑞典斯德哥尔摩 Danderyd 医院病理科获得（表 2）。根据 Elston 和 Ellis I-III 并且遵循确定的准则对这些组织进行打分¹³。细胞周期蛋白 A 被用作增殖标记（Nova-Castra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK）。通过常规处理的石蜡切片分析雌激素受体状况。8个乳腺癌患者和2个进行还原性胸外科手术的健康个体的未处理乳腺组织作为对照。所有样品都经同一病理学家（B. S.）检查并按常规归类（表 2）。所有患者都做出书面知情同意。该研究经地方伦理委员会批准。

hCAP18 的原位杂交

435bp 的 hCAP18 全长 cDNA 亚克隆到载体 pBluescript，用于体外转录^[35S]标记的反义探针和有义探针，对样品 0-17（表 2）进行如 8 所描述的原位杂交。

免疫组织化学

对样品 0-17（表 2）进行免疫组织化学。采用 Vectastain 试剂盒（Vector Laboratories, Burlingame, USA）并且根据间接过氧化物酶法，针对重组 hCAP18 的 cathelin 亲和纯化的兔抗血清¹⁴如以前所描述¹⁰的 1:500 稀释使用。为了确定染色的特异性，如以前报道的进行免疫吸附¹⁰。对于 FPRL1 受体的检测，根据间接过氧化物酶法，亲和纯化的羊多克隆抗体 1:400

稀释使用 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。

蛋白提取和蛋白印迹分析

采用电匀浆器于赖氨酸缓冲液中匀浆冷冻肿瘤组织 (16-60mg)。根据标准规程¹⁵, 从肿瘤组织和细胞系中提取蛋白质并悬于含 SDS 的样品缓冲液。通过分光光度计测量分析确定蛋白浓度, 并且用含 SDS 的样品缓冲液调整到相同的蛋白浓度¹⁶。对于 hCAP18/LL-37 的检测, 提取物通过 16.5% 的 Tris-Tricine Ready 凝胶进行分离 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。重组 cathelin¹⁷ 和合成的 LL-37 肽用作大小参照。对于 ERK1/2 和 FPRL1 的检测, 蛋白分别通过 12% 和 8% 的 Tris-Glycine 凝胶进行分离。为了保证每个样品进行印迹的蛋白量大致相等, 在滤膜与一抗孵育之前, 用溶于 30% 三氯乙酸的 3% 的丽春红 S 溶液对滤膜进行可逆染色 (Sigma Aldrich, USA)。亲和纯化的抗 cathelin 抗血清¹⁷、亲和纯化的抗 LL-37 抗血清¹⁰、抗 FPRL1 抗血清 (scl8191, Santa Cruz Biotechnology, CA) 和抗 ERK1/2 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly MA) 均采用 1:1000 稀释。电转印到硝酸纤维素膜 (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 上后, 相继与一抗和辣根过氧化物酶耦联的 IgG 孵育 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 采用 CCD 照相机 (LAS 1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) 捕获增强型化学发光信号 (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

酶联免疫吸附测定

夹心酶联免疫分析可以用于对正常乳腺和肿瘤组织蛋白提取物中 hCAP18 进行定量, 见参考文献 17 所描述的。

实时 PCR 分析 hCAP18 的表达

采用 Qiagen RNeasy 试剂盒 (Operon Biotechnologies, Cologne, Germany) 提取 4 个正常样品和 4 个肿瘤样品的 RNA, 并采用第一链合成试剂盒 (Amersham Biosciences, Norwalk, CT) 进行反转录。根据标准规程, 使用 10ng cDNA 在 ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) 上通

过实时 PCR 对 RNA 进行定量。样品经过 3 次重复分析。引物序列是 5'-GTCACCAGAGGATTG TGA CTTCAA-3' [SEQ ID NO:2], 和 5'-TTGAGGGTCACTGTCCCCATA-3' [SEQ ID NO:3]。6-FAM-5'-CCGCTTCACCAGCCCGTCCTT-3'-BHQ1 [SEQ ID NO: 4]作为 fluorogenic 探针。样品通过 18S-RNA 定量标准化 (Assay on Demand, Applied Biosystems)。正常样品的平均表达任意地设为 1。

合成 LL-37 肽

合成 LL-37 肽并且通过高效液相层析进行纯化, 纯度达到 98% (Polypeptide Laboratories A/S, Hillerød, Denmark)。通过抗菌分析确定多肽的生物活性¹⁸。

上皮细胞的 LL-37 肽处理

自发无限增殖的人角质化细胞系 (HaCaT)¹⁹ 在添加有 10% 胎牛血清 (FCS, Hy-Clone, Boule Nordic AB Huddinge, Sweden) 和抗生素 (PEST=50U/I 青霉素和 50mg/ml 链霉素, Gibco BRL) 的 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM, Gibco BRL, Life Technologies, Scotland) 中培养。生长到 70% 汇合时, 收集细胞并接种于 96 孔板, 100 μ l 培养液 (DMEM + 10% FCS 和 PEST) 含 2000 个细胞。12 小时后, 换成不含血清的培养液 (DMEM + PEST), 通过血清饥饿 72 小时同步化细胞于 G0/G1 期, 然后用含 10 μ g/ml LL-37 生物活性合成多肽的 100 μ l 培养液 (DMEM + 5% FCS + PEST) 处理细胞。只用 DMEM + 5% FCS 和 PEST 处理的细胞作为对照。进行了四次重复实验。通过掺入的 [³H]-胸腺嘧啶核苷来评价细胞增殖。细胞用 1 μ Ci/孔 [³H]-胸腺嘧啶核苷 (20.00 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences Inc. Boston, MA) 处理 12 小时, 然后将细胞收集于玻璃纤维滤纸 (Wallac Oy Turku, Finland) 上。用液体闪烁计数器 (Microbeta Plus, Wallac Sveriges AB) 测定掺入的 [³H]-胸腺嘧啶核苷。实验进行 6 次平行测定, 重复两次。

HEK293 和 HaCaT 细胞中 hCAP18 的转基因表达

含完整编码序列包括 16bp 的 5'-非翻译区的 Image 克隆 3057931²⁰ 来源的 *Bfa1* 片段亚克隆到 bicistronic 载体 pIRES2-EGFP (BD Biosciences, Bedford) *Sma1* 位点。在标准条件下采用 Fugene (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 转染 HEK293 和 HaCaT 细胞, 然后用 400ng/ml G418 (Invitrogen, Paisley, UK) 筛选两周。通过 MoFlo® 高速细胞分选流式细胞仪 (DakoCytomation, Fort Collins, CO) 对 EGFP 表达细胞进行分选, 并且采用 Summit™ 软件进行资料分析, 通过免疫印迹对其 CAP18 的表达进行定量。通过转染只表达 EGFP 的载体, 相似地建立对照细胞系。细胞系在没有任何筛选条件下连续培养数月 CAP18 维持稳定表达。实验进行 30 次平行测定, 重复两次。

hCAP18 稳定转染的 HEK293 和 HaCaT 细胞的增殖分析

hCAP18 转染的 HEK293 细胞生长到 70% 汇合时, 收集细胞并接种于 24 孔板。24 小时后, 更换培养液, 细胞在 2ml 添加有 5% 胎牛血清和抗生素 PEST 的培养液 (Optimem, Gibco BRL, Life Technologies, Scotland) 中培养。于第 6 天收集细胞并且通过流式细胞仪 (Becton Dickinson, Bedford, MA) 计数。用台盼蓝确定细胞活性; 在所有条件下, 少于 5% 的细胞是台盼蓝阳性。所有条件均进行三次重复。只表达 EGFP 的载体转染的 HEK293 细胞作为对照。

hCAP18 转染的 HaCaT 细胞生长到 70% 汇合时, 收集细胞并接种于 96 孔板, 每孔 2000 个细胞, 采用含 10% FCS 和 PEST 的 DMEM 培养液。12 小时后, 换成添加有 5% FCS 和 PEST 的 DMEM 培养液。培养 24 小时后, 细胞用 1 μ Ci/孔 [³H]-胸腺嘧啶核苷处理 12 小时, 然后如上所描述的进行细胞收集和分析。只表达 EGFP 的载体转染的 HaCaT 细胞作为对照。

FPRL1 的表达分析

采用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 提取 HaCaT 细胞 RNA, 并采用第一链合成试剂盒 (Amersham-Pharmacia) 进行反转录。如上所描述的, 通过实时 PCR 对 FPRL1 RNA 进行定量分析, 并对 18S-RNA 标准化。引物

序列是 5'-TCTGCTGGCTACACTGTTCTGC-3'[SEQ ID:NO:2] 和 5'-GACCCCGAGGACAAAGGTG-3'[SEQ ID:NO:3] , 6-FAM-5'-CCCAAGCACCAATGGGAGGA-3'-BHQ1[SEQ ID:NO:4]作为荧光探针。

百日咳毒素分析

为了分析 FPRL1 在调节 hCAP18/LL-37 诱导的上皮细胞增殖刺激中的作用, 用 G 蛋白耦联受体的抑制剂百日咳毒素处理 HaCaT 细胞。在 LL-37 处理前, 细胞与百日咳毒素 (Sigma-Aldrich, Switzerland) 预先孵育 24 小时, 毒素终浓度为 20ng/ml。细胞接种 48 小时后更换培养液, 并且分别用含生物活性 LL-37 合成多肽 5 或者 10 μ g/ml 的 100 μ l 培养液 (DMEM + 5% FCS 和 PEST) 处理 HaCaT 细胞。只用 DMEM + 5% FCS 和 PEST 处理的细胞作为对照。

LL-37 处理的 HaCaT 细胞内磷酸化 ERK1/2 的分析

HaCaT 细胞生长到 10% 汇合时接种, 含 0.2% FCS 的 DMEM 培养液中培养 36 小时。然后细胞分别在含 1% 或者 5% FCS 而且含 10 μ g/ml 或者不含 LL-37 的 DMEM 培养液中再培养 48 小时, 每天更换培养液。10ng/ml EGF 作为阳性对照。采用鼠单克隆抗体通过蛋白印迹分析磷酸化 ERK1/2 的表达 (Cell Signaling Technology, Beverly MA)。

统计分析

在此提供的数值是细胞平均数或者是每分钟闪烁计数 (CPM) 加或者减标准差。通过双侧 t 检验分析组间差异。P 值小于 0.05 表明结果具有显著统计学意义。对肿瘤的表达进行了一尾 t 检验分析, hCAP18 蛋白水平在小于 0.05 的显著水平。

结果

hCAP18/LL-37 在乳腺癌中表达

病人详情见表 2。

原位杂交结果显示, 健康对照 (图 1g) 和非乳腺癌 (未显示) 来源

的乳腺组织中 hCAP18 mRNA 显示低信号（资料未显示）并且 hCAP18 蛋白弱免疫反应性。所有乳腺癌组织都显示肿瘤细胞中 hCAP18 的免疫反应性，而在基质中未显示（图 1a, c, d）。对于肿瘤细胞 hCAP18 的免疫反应性，肿瘤细胞种群是不均质的，强阳性细胞与没有检测到 hCAP18 的细胞相临近（图 1c）。cathelin 重组蛋白的免疫吸附破坏 hCAP18 的免疫反应性（图 1e, f）。通过原位杂交，在相同区域中可以检测到 hCAP18 mRNA 阳性信号与免疫组化获得的表达模式非常匹配（图 1b）。信号强度可变而且在高等级肿瘤中变化最显著。与有义 hCAP18 cRNA 探针杂交的对照切片没有 hCAP18 mRNA 特异信号（资料未显示）。

ELISA 定量分析乳腺癌组织提取物 hCAP18 蛋白，结果显示 Elston I 和 II 级肿瘤之间没有差别，而最高等级的恶性肿瘤中 hCAP18 水平明显要高（表 2）。Elston III 等级和其余肿瘤之间差别具有统计学意义（ $p < 0.01$ ）。13 个 Elston III 肿瘤中有 10 个 hCAP18 浓度达到或者超过 5ng/mg 总蛋白。其余 18 个肿瘤样品中只有 2 个达到该水平。我们也分析了 4 个健康乳腺组织样品，它们具有 Elston I 或者 II 肿瘤相似水平。为了证实 ELISA 获得的表达模式，我们对 4 个正常样品和 4 个肿瘤样品进行实时 PCR。转录定量结果与蛋白表达资料一致（表 2）。

免疫印迹结果表明所有被研究的肿瘤和正常乳腺组织都显示与天然非处理的 18kDa 全蛋白相应的免疫反应条带（图 2）。在 5 个被研究的 III 级肿瘤中有 4 个，我们也检测到 LL-37，处理的 hCAP18 蛋白的相应条带（表 2）。采用 hCAP18 全蛋白抗血清，尽管是通过 cathelin 多肽亲和纯化¹⁰，在高浓度条件下可以检测 LL-37。

hCAP18/LL-37 增加上皮细胞的增殖

转化 hCAP18 (hCAP18/E) 表达载体的 HEK293 和 HaCaT 细胞的增殖率明显高于转染只表达 EGFP 的载体的对照细胞 (E)（图 3A 和 B）。对转染的 HEK293 和 HaCaT 细胞的蛋白提取物进行免疫印迹，我们证实这些含 hCAP18 载体的细胞产生了全蛋白（图 3A 和 B）并且在细胞培养液中检测到 LL-37 相应的 4kD 的免疫反应条带（资料未显示）。另外，HaCaT 细胞经 5%胎牛血清培养，并且用 10 μ g/ml LL-37 生物活性合成多肽处理，细胞增殖显著增加（图 4）。

表 2

样品 ^a (序号)	年龄 (岁)	类型	等级 ^b	雌激素受体 ^c	细胞周期蛋白 A ^d	免疫组化和原位杂交	hCAP ^f (ng/mg)	实时 PCR ^e	治疗 ^h	腋窝淋巴结 ¹	临床状况 ^j
0	30	健康				•					
1	72	健康				•	0, 7				
2	53	小叶	I	+	低	•	2, 3	M, TAM		-	0
3	65	导管	II	+	高	•	1, 1	M, CT		-	CIS
3b		正常									
4	37	导管	I	+	高	•	2, 3	PM, Rx, TAM		-	0
5	69	胶体	I	+	低	•	1, 7	PM, Rx, TAM		-	0
6	84	导管	III	-	高	•	5, 4	M		-	†
7	53	导管	III	-	高	•	35, 8	M, Rx, CT		+	0
8	55	导管	III	-	高	•	5	PM, Rx, CT		+	转移
9	73	导管	III	-	高	•	11, 8	M, TAM		-	†
10	47	导管	III	-	高	•	5, 3	M, CT, Rx		-	†
11	64	导管	II	+	高	•	1, 6	M, Rx, TAM		-	0
12	52	导管	II	+	高	•	5	PM, Rx, CT		+	0
12b		正常				•					

13	69	导管	I	+	低	•	0.9		PM, Rx, TAM	+	0
14	31	导管	II	+	低	•	4		M, Rx, CT	+	0
14b		正常				•					
15	58	导管	I	+	低	•	3, 9		PM, Rx, TAM	-	0
16	70	导管	I	+	低	•	4, 12		PM, Rx, TAM	-	0
16	左	小叶	II	+	低	•	4, 56		M, TAM	-	0
16b		正常									
17	70	管状	I	+	低	•			M, Rx, TAM	-	0
18	76	导管	I	+	低		3, 9		M, Rx, CT	+	0
19	64	导管	III	+	高		3, 9		PM, Rx, CT	-	0
20	69	导管	I	+	低		4, 7		PM, Rx, TAM	-	0
21	78	小叶	III	+	高		38		M, CT	+	0
22	67	导管	III	+	高		4, 0		M, CT	nd	0
23	82	胶体	I	+	低		11, 7		M, CT	nd	0
24	76	导管	II	-	低		3, 7		M, Rx, CT	-	0
25	44	导管	III	+	高		7, 0	11	M, Rx, CT	+	0
26	79	髓质	III	+	高		4, 8	18	M, Rx, CT	+	0
27	66	导管	I	+	低		8, 7		PM, Rx, CT	-	+
28	58	导管	III	-	高		41	11	M, Rx, CT	+	+

29	65	转移	-	+	高	29, 5	CT	+	转移
30	54	小叶	III	+	高	5, 8	M, Rx, CT	+	0
31	81	正常				1.2	0.6		
32	60	正常				2.9	1.1		
33	65	正常				2.9	1.5		
34	55	正常					1.1		

^a28 个乳腺癌患者的组织, 8 个乳腺癌患者和 2 个进行整形胸外科手术的健康个体的正常乳腺组织 (样品 no 0 和 1)。

^b根据 Elston 和 Ellis 对肿瘤进行分级。

^c通过免疫组化分析雌激素受体 (ER) 状况。

^d表达增殖标记细胞周期蛋白 A 的细胞百分比。Low (L) <5%, High (H) \geq 5%。^e组织经免疫组化 (IH) 以及与 hCAP18 原位杂交研究。^f组织蛋白提取物, 通过 ELISA 测定 hCAP18 的水平, 表示为 ng hCAP18/每 mg 总蛋白。^g组织 RNA 提取物, 通过实时 PCR (TaqMan) 测定 hCAP18 mRNA 的水平, 正常平均值设为 1。^hM=乳房切除, PM=乳房部分切除, Rx=放射, CT=化疗, TAM=三苯氧胺。ⁱ手术腋前线淋巴结状况。nd=未作。^j诊断 1.5-2 年后确定的临床状况。[†]=死亡, 0=没有临床复发, CIS=原位癌。

乳腺癌中表达 LL-37 受体 FPRL1

G 蛋白耦联受体 FPRL1 调节真核细胞 LL-37 的诱导效应^{4,5}，为了评价在本条件下的潜在作用，我们对乳腺组织中 FPRL1 蛋白的表达进行了研究，结果发现在乳腺癌组织和正常腺上皮中 FPRL1 强免疫反应性(图 5a,b)。免疫印迹证明所有组织均表达 FPRL1 (图 5c)。另外，hCAP18 的转基因表达显著增强 HaCaT 细胞中 FPRL1 mRNA 的表达 (图 5d)，其进一步支持 hCAP18/LL-37 信号包括 FPRL1。然而，百日咳毒素预处理 HaCaT 细胞没有破坏而是抑制了约 50%的细胞的增殖(资料未显示)，表明在这些细胞中 FPRL1 不是唯一调节 hCAP18/LL-37 生长刺激效应。为了测试上皮细胞增殖活化是否包括 ERK1/2，我们用合成的生物活性 LL-37 处理 HaCaT 细胞，但是没有 ERK1/2 没有明显活化，表明在 LL-37 对 HaCaT 细胞增殖的刺激效应调节中不包括 EGFP。

讨论

在本研究中，我们证明在正常乳腺上皮组织中 hCAP18/LL-37 组成型表达。这与 LL-37 在人抗菌屏障保护中的作用一致，与早期报道关于正常静止上皮组织 LL-37 的低组成型表达一致，与损伤和炎症相关的显著表达相反⁷⁻¹⁰。以前在各种外分泌腺都检测到抗菌多肽的组成型表达，例如人汗腺的 cathelicidin LL-37、鼠唾液腺的 cathelicidin CRAMP 和人唾液腺的 β -防卫素²¹⁻²³。Bals 等于 1998 年报道了人乳腺中 β -防卫素-2 (hBD-2) mRNA 的表达，最近其它实验小组已经发现没有分泌乳汁的妇女其乳腺组织组成型表达 hBD-1，在哺乳期乳腺组织和母乳中也有同样发现²⁴⁻²⁶

我们对乳腺癌细胞表达 hCAP18/LL-37 的发现是新颖的。有意思的是与正常乳腺上皮组织或者低等级肿瘤相比，高等级肿瘤的乳腺上皮组织中 hCAP18 的表达显著增加。然而 hCAP18 的表达既不普遍的，也不一致，即不是所有癌细胞都是 hCAP18 阳性的，而在没有检测到 hCAP18 mRNA 和蛋白的细胞附近发现强阳性细胞 (图 1c)，在所有肿瘤类型细胞中表达程度不同。这反映了 hCAP18 的调控是复杂的严格控制的，如对人肾细胞癌中 α 防卫素所提出的²⁷。

在我们的研究中,在最高组织等级肿瘤中检测到 hCAP18/LL-37 最高水平。尽管在高等级肿瘤和低等级以及正常乳腺组织之间 hCAP18 的表达差异具有统计学意义,但是没有严格的关联。各组中,肿瘤 hCAP18 表达水平与健康样品表达水平相同,2 个 I 级肿瘤表现出只在 III 级肿瘤中观察到相对高表达。然而,考虑到样品数量的限制,我们的观察结果提出恶性肿瘤程度与 hCAP18/LL-37 的表达具有潜在相关性。也许有人会置疑,乳腺癌中 hCAP18 的过表达可能是由于影响 hCAP18 调节的胞内途径失效,hCAP18 的表达反映了这些改变,而没有提供肿瘤的生长优势。然而,与在此提出的其它研究相结合,我们相信这些资料表明 LL-37 在促进肿瘤生长中的潜在作用。

在癌中抗菌肽的生物活性是不明确的。在各种口腔癌均发现高浓度的 hBD-2 蛋白以及对人 α 和 β 防卫素均有显著的免疫反应性,表明这些抗菌肽水平的提高可能是由于感染和/或者是细胞因子的刺激²⁸⁻³⁰。其它研究提出从昆虫中分离的抗菌肽(例如蜂毒肽和天蚕抗菌肽等相关多肽)可以对哺乳动物肿瘤细胞发挥抗肿瘤效应³¹⁻³⁴。而且,人膀胱癌细胞系中调节天蚕抗菌肽和蜂毒肽编码序列的传递和表达的载体可以抑制在裸鼠中的致肿瘤性¹¹。同样地,猪 cathelicidin PR-39 的转基因表达可以减少人肝细胞癌的侵袭能力¹²。

尽管需要进一步研究阐明抗菌肽在癌中的功能,但是这些肽的多功能作用日益清楚。除了通过直接的膜效应使病原失活,LL-37 也可以在体外发挥趋化效应,包括人中性粒细胞、单核细胞、T 细胞和肥大细胞亚型的迁移^{4,35,36}。趋化活性依赖 LL-37 与百日咳毒素敏感的膜结合的 G 蛋白耦联受体 FPRL1 的结合⁴。hCAP18/LL-37 的其它功能包括通过促进皮肤创伤的表皮细胞再生和新生血管的形成对上皮组织修复和血管发生的作用^{5,10}。

因此,在此介绍的 hCAP18/LL-37 在乳腺癌细胞中显著表达反应出这些肿瘤细胞的生长优势。为了验证该假设,我们用 hCAP18 表达载体转染人上皮细胞系 HEK293 和 HaCaT 细胞,并且发现转染细胞的增殖明显增加。另外,LL-37 生物活性合成多肽显著增加 HaCaT 细胞的增殖。这些发现与提出的抗菌肽的抗肿瘤效应明显相反,但是与 Müller 等最近的

发现相一致，他们发现人 α 防卫素可以调节肾细胞癌（RCC）的进展。这些防卫素在 RCC 肿瘤细胞以及正常的肾管状上皮中均有发现，而且在生理浓度条件下刺激肿瘤细胞增殖²⁷。

我们的体外研究表明 LL-37 对上皮细胞增殖的刺激部分地通过该受体 FPRL1，因为用百日咳毒素封闭 FPRL1 减少约 50% 的外源性 LL-37 增殖效应，可能表明也包括其它的受体。在最近的研究中，LL-37 通过丝裂原活化蛋白激酶的活化/通过表皮生长因子受体（EGFR）³⁷ 反式激活的胞外信号调控激酶（MAPK/ERK 激酶=MEK）来激活支气管上皮细胞。然而，在我们的实验中没有检测到 ERK 1/2 的显著活化。

最后，在此提出的结果表明 LL-37 促进肿瘤的生长。

参考文献

1. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 1996;238:325-32. 2. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 1995;374:1-5.

3. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:195-99.

4. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000, 192:1069-74.

5. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin*

Invest 2003; 111:1665-72.

6. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. FEBS Lett - 1995, 368:173-76.

7. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem 1997,272: 15258-63.

8. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. Infect Immun 1999,67:2561-66.

9. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. J Invest Dermatol 2001.;117:91-97.

10. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in, chronic ulcer epithelium. J Invest Dermatol 2003,120:379-89.

11. Winder D, Gunzburg WH, Erfle V, Salmons B. Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 242:608-12.

12. Ohtake T, Fujimoto Y, Ikuta K, Saito H, Ohhira M, Ono M, Kohgo Y. Proline-rich antimicrobial peptide, PR-39 gene transduction altered invasive activity and actin structure in human hepatocellular carcinoma cells. Br J Cancer 1999, 81:393-403.

13. Pathology NCGfBS. Pathology reporting in breast cancer screening, second edition, NHSBSP Publication 1995.

14. Sørensen O, Bratt T, Johnsen AH, Madsen MT, Borregaard N. The

human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J Biol Chem* 1999, 274:22445-51.

15. Ausubel FM, Brent R, R.E. K, Moore DM, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*: Wiley & Sons, Hoboken, NJ.,2003.

16. Schaffner W, Weissmann C. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 1973, 56:502-14.

17. Sørensen O, Cowlaiid JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods* 1997, 206:53-59.

18. Frohm M, Gunne H, Bergman AC, Agerberth B, Bergman T, Boman A, Lidén S, Jörnvall H, Boman HG. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur J Biochem* 1996, 237:86-92.

19. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988,106:761 -71.

20. Lennon G, Auffray C, Polymeropoulos M, Soares MB. The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 1996, 33:151-2.

21. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 2002, 81:845-50.

22. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Schitteck B, Garbe C, Gallo RL. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 119:1090-5.

23. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin I₅ in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000; 79: 1669-74.

24. BaIs R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998; 102: 874-80.

25. Tunzi CR, Harper PA, Bar-Oz B, Valore EV, Semple JL, Watson-MacDonell J, Ganz T, Ito S. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatr Res* 2000;48:30-5.

26. Jia HP, Starner T, Ackermann M, Kirby P, Tack BF, McCray PB, Jr. Abundant human beta-defensin-1 expression in mük and mammary gland epithelium. *J Pediatr* 2001, 138:109-12.

27. Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmanñ S, Wessels JT, Becker V, Muller GA, et al. Human alpha-defensins HNPs-I, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumour cell proliferation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1311 -24

28. Mizukawa N, Sawaki K, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, Sugahara T. Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20:2005-7.

29. Mizukawa N, Sawaki K, Nagatsuka H, Kamio M, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, Sugahara T. Human alpha-and beta-defensin immunoreactivity in oral mucoepidermoid carcinomas. *Anticancer Res* 2001, 21:2171-4.

30. Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T. High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002, 22:2103-7.

31. Jaynes JM, Julian GR, Jeffers GW, White KX, Enright FM. In vitro cytotoxic effect of lytic peptides on several transformed mammalian cell lines. *Pept Res* 1989; 2: 157-60.

32. Sharma SV. Melittin-induced hyperactivation of phospholipase A2 activity and calcium influx in ras-transformed cells. *Oncogene* 1993, 8:939-47.

33. Moore AJ, Devine DA, Bibby MC. Preliminary experimental

anticancer activity of cecropins. *Pept Res* 1994; 7:265-9.

34. Hui L, Leung K, Chen HM. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. *Anticancer Res* 2002, 22:2811-6.

35. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000,96:3086-93.

36. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Oga.wa H, Nagaoka I. A camelidicin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 2002, 106:20-6.

37. Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sorensen OE, Borregaard N, Rabe KF, Hiemstra PS. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 2003; 171: 6690-6.

例 B: hCAP18/LL-37 在雌激素受体 (ER) 和淋巴结 (N) 阳性的乳腺肿瘤中的表达增加

材料和方法

从 140 个乳腺肿瘤和 4 个未感染的乳腺组织样品中提取 RNA, 然后用随机六聚体作为引物进行反转录。根据标准规程 (如上所述的) 采用 10ng cDNA 通过实时 PCR 确定 hCAP18 转录物的表达。

结果和讨论

结果见图 6。未感染样品的平均表达设为 1。通过方差统计分析评价平均值和偏差。

ER 阳性肿瘤当产生淋巴结时 hCAP18 的表达显著高于没有淋巴结。

例 C: 分离能够抑制 hCAP18/LL-37 活性的试剂

许多明确定义的体内外测定方法能够用于证明 hCAP18/LL-37 对肿瘤发展的不同方面的作用, 即已知的信号转导途径的诱导作用、细胞增殖的刺激和凋亡的抑制、集落生长和不依赖成长贴壁的刺激、通过基底膜浸润性刺激, 以及最后在小鼠中增强的肿瘤生长和转移形成。

上述特征以前认为是 hCAP18/LL-37 在原发角质和上皮细胞系中的作用, 现在在乳腺癌细胞系中也得到证明。合适的靶细胞系是 MCF-7, 一种低恶性的雌激素受体阳性细胞系, 其不表达 hCAP18。为了研究上述方面, 建立通过重组质粒表达 hCAP18 的 MCF-7 衍生物。由于 hCAP18 蛋白和 LL-37 的自分泌活性会有差别, 因此通过外源性添加 LL-37 进行体外分析, 如果实验性质允许, 可以通过细胞内源性生产。

上述实验涉及评价 hCAP18/LL-37 的全部致肿瘤可能性, 可以通过进一步实验证明具有抗 hCAP18/LL-37 活性的试剂对这些效应的抑制作用。例如, 认为合成的活性蛋白 LL-37 是抗体抑制作用的靶标。另外, 可以阻止该蛋白的产生, 这是通过启动子的阻断来抑制 hCAP18 基因的转录, 以及通过 RNA 干扰对转录本进行转录后下调来进行的。

因此, 既可以通过体外实验证明作用机制和靶标, 也可以对小鼠肿瘤进行体内实验证明其体内效应。可以对上述 MCF-7 衍生物进行体外实验。关于 hCAP18 基因的调控实验, 可以采用低水平表达 hCAP18 但可以明显检测到的乳腺癌细胞系 ZR75-lis。

对于下述实验, 如果没有另外说明, 均采用下列条件: 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基。转基因细胞系培养基含 150 μ g/ml 潮霉素和 400 μ g/ml Geneticin 来维持转基因。该实验持续不到 3 天, 在细胞使用前 24 小时去除抗生素, 并调节胎牛血清浓度满足每个特定实验的需要。LL-37 的添加浓度为 2 μ M。

细胞增殖的刺激 (参见 Heilborn 2005)

转基因细胞系和细胞系生长到 70% 汇合时, 收集细胞并接种于 96 孔板, 2000 个细胞/孔, 培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。24 小时后, 换成含 5% 胎牛血清的添加或不添加 LL-37 的培养液。培养 24 小时后,

细胞用 1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$ [3H]-胸腺嘧啶核苷 (20Ci/mmol) 处理 12 小时, 然后将细胞收集 (Harvester 96; Tomtec, Orage, CT) 到玻璃纤维滤纸 (Wallac Oy Turku, Finland) 上。用液体闪烁计数器 (Microbeta Plus, Wallac) 测定掺入的 [3H]-胸腺嘧啶核苷。为了确定该实验具有统计意义, 每个条件/细胞系采用 24 孔。

细胞生长分析 (参见 Lu 2005, Ludes-Meyers 2002)

该实验作为 [3H]-胸腺嘧啶核苷掺入法的补充, 目的是确定 hCAP18/LL-37 对细胞增殖的刺激。MCF-7 衍生物以 50 cells/mm² (约每个 6 孔板 50000 个细胞/孔,) 的密度涂布, 每个时间点三次平行重复。每两天用血细胞计数器对总细胞数进行定量。用台盼蓝确定细胞活性。

hCAP18/LL-37 对凋亡的抑制作用

为了诱导细胞凋亡, 细胞接种于 6 孔板, 25000 个细胞/孔, 培养液含 5% 的胎牛血清, 然后用 6 μM 的拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱 (CAM) (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO) 处理细胞 24 小时。

对两个细胞凋亡参数, DNA 含量和半胱天冬酶 3 进行评价确定 hCAP18/LL-37 对凋亡的抑制作用。所有实验均于做 6 组保证具有统计学意义。

流式细胞术分析 DNA 含量 (参见 Warburton 2005)

在该分析中采用碘化丙啶 (PI)/ 核糖核酸酶染色缓冲液 (Becton Dickinson, San Jose, CA)。胰蛋白酶消化的细胞经预冷的 70% (V/V) 的乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。通过将 PI 掺入到 DNA 中测定 DNA 含量。采用 FACScan 流式细胞仪 (Becton and Dickinson, Mountain View, CA, USA) 进行荧光分析。同时测量粒子的 FSC (前向光散射) 和 SSC (侧向光散射) 来确定细胞的大小和颗粒性。FL-4 窗口检测 PI 染色细胞核的红色荧光 (600 nm 带通滤波器和 35 nm 带宽)。荧光强度与细胞内 DNA 含量成比例。每个直方图分为两部分: (1) M1 区代表不同步的, 未凋亡的活细胞 (G1,S 和 G2 周期的细胞, 其 DNA 含量在 2 倍到 4 倍);

(2) M2 区代表的是与活细胞相比 DNA 含量较少的凋亡细胞。

半胱天冬酶 3 活性分析

采用荧光底物 VDVAD-AMC (100 μ M)和 DEVD-AMC (50 μ M)测定半胱天冬酶 3 酶活性。细胞溶胞产物用反应缓冲液(100 mM HEPES, 10% 蔗糖, 5 mM 二硫苏糖醇 (DTT), 10-6% NP-40, and 0.1% CHAPS, (pH 7.25)) 混合, 然后加入微孔板。在 Fluoroscan II 读板器 (Labsystems, Stockholm, Sweden)上通过 AMC 释放对荧光底物的裂解进行检测。通过采用游离的 AMC 产生的标准曲线将荧光单位转换成 AMC 的 pmol。通过线性回归分析数据。

集落形成实验 (参见 Ludes-Meyers 2002, Wang 2005)

该实验用于确定缺乏支持的临近细胞条件下细胞的持续增殖能力。认为该特性反应了细胞形成肿瘤的能力。

转基因细胞维持于半汇合条件, 最大生长到 70% 汇合时通过胰蛋白酶消化, 然后稀释到浓度 5、10 和 25 个细胞/ml 生长培养液。细胞生长 3-7 天 (主要满足 3-4 倍增), 确定每个集落的细胞数。如果重组质粒表达绿色荧光蛋白, 细胞和集落可以通过荧光显微镜计数。集落形成的结果表现为每个集落中荧光细胞的分布, Wilcoxon's 秩和检验用来比较不同转基因细胞系 (培养液中含有和不含 LL-37) 之间的分布。由于已知只有在 β -雌激素存在条件下, MCF-7 细胞形成肿瘤, 可以分析 1-5nM 雌激素对转基因细胞生长的效应。

贴壁不依赖性生长实验 (参见 Fiucci 2002)

该实验反应了细胞形成转移的能力。细胞通过 300 u/ml 胰岛素、20u/ml 弹性蛋白酶和 1mM 乙二胺四乙酸的混合物进行处理制备。弹性蛋白酶促进细胞解离成单细胞悬液。用生长培养液重悬细胞, 并且与含有熔化的 0.7% Seaplaque 低熔化温度琼脂糖的生长培养液 1:1 混合, 其终浓度为 500 个细胞/ml 和 0.35% 琼脂糖。1ml 混合物涂布于 6 孔板内 2ml 固体培养基/0.6% 琼脂糖层上。细胞每 3-4 天添加 100 μ l 生长培养液进行培

养。2 周后，用 0.2% p-iodonitrotetrazolium violet (Sigma) 对顶层培养物染色，对直径大于 100 μ M 的集落进行计数。三次平行重复分析，并且重复两次。

浸润的诱导 (参见 Fiucci 2002)

Matrigel 是 EHS 肉瘤所产生的基底膜。Matrigel 不仅包含基底膜成分 (胶原、层粘连蛋白和蛋白聚糖)，而且还包含间质降解酶/其抑制剂和生长因子。肿瘤细胞侵入 Matrigel 已经用于确定在肿瘤进展中发挥作用的胞外间质受体和间质降解酶的参与。

用无血清预冷的生长培养液将 Matrigel 稀释到 2mg/ml，取 100 μ l 加入 24 孔 transwell 的上方小室，37 $^{\circ}$ C 过夜孵育胶凝。收集细胞并且用含 1% 胎牛血清的培养液重悬细胞，细胞密度为 10⁶/ml。用蠕虫无血清培养液漂洗细胞后，取 100 μ l 细胞重悬液加到顶部。下方小室充满 600 μ l 含条件培养基的生长培养液，作为趋化。小室在细胞培养箱中孵育 6-24 小时。对 transwell 进行染色 (Diff-Quick staining solution, Fisher Scientific)，并且用棉头拭子刮去未侵袭细胞，通过光学显微镜对侵袭细胞进行计数。

SCID 小鼠的肿瘤生长 (参见 Wang 2005 Warburton 2005)

收集半汇合生长细胞，并且用预冷的 PBS 重悬细胞于 2.5 X 10⁷ cells/ml。

取 200 μ l 皮下注射于 4-6 周龄雌性 SCID 小鼠的脂肪垫或者尾静脉。由于 MCF-7 细胞的肿瘤形成通常依赖雌激素，因此将片剂移植于皮下，60 天内每天释放 1.7mg 的 β -雌二醇。每周对小鼠触诊两次，并且记录下第一个可以摸到的肿瘤产生的日期。人工检测肿瘤生长，并且在肿瘤直径达到 1cm 时处死小鼠。记录肿瘤的数量、大小和分布。小的转移通过小鼠组织切片检测，并且扫描以诱导重组质粒来源的 GFP 表达所产生的荧光。另外，脾和肝胶原化，而且通过 FACS 分选对单细胞悬液进行分析确定荧光细胞数。

hCAP18 转录拮抗剂的抑制研究 (参见 Agarwal 1998, Andela 2004,

ToelUOOI, Ishizuka 2005, Weber 2005)

目前已知维生素 D 是 hCAP18 转录的最强诱导物。维生素 D 受体通过结合 hCAP18 启动子反应元件直接激活 hCAP18 转录。由于小分子能够调控 hCAP18 的表达, 因此系统地筛选抑制性化合物是有意义的。初步研究已经证明雌激素及其一些代谢产物没有效果。维生素 A 抑制皮肤角质形成细胞的转录, 但是刺激乳腺癌细胞系 ZR-75-1 的转录。基于这些发现, 维生素 D 拮抗剂, 如 ZK1 59222 (Schering AG) 和 TEI-9647 (Tejin Institute for Medical Research, Tokyo), 以及维生素 A 拮抗剂, 如 AGN193109 (Allergen Pharmaceuticals) 是在本发明的方法中可能应用到的试剂。

hCAP18 转录抑制剂的筛选 (参见 Weber 2005)

ZR75-1 细胞以 25% 汇合涂布并使用可能的抑制剂处理, 然后用溶于 100 μ M 异丙醇或者二甲基亚砜, 使之终浓度为 100nM。24 小时后, 用 Qiagen RNeasy 试剂盒 (Operon Biotechnologies, Cologne, Germany) 提取 RNA, 然后用第一链合成试剂盒 (Amersham Biosciences, Norwalk, CT) 进行反转录。根据标准规程, 使用 10ng cDNA 在 ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) 上通过实时 PCR 对 RNA 进行定量。样品经过 3 次重复分析。引物序列是 5'-GTCACCAGAGGATTGTGACTTCAA-3' [SEQID NO: 2] 和 5'-TTGAGGGTCACTGTCCCCATA-3'[SEQID NO: 3]。6-FAM-5'-CCGCTTACCAGCCCGTCCTT-3'-BHQ1 [SEQ ID NO: 4] 作为 fluorogenic 探针。样品通过 18S-RNA 定量标准化 (Assay on Demand, Applied Biosystems)。

为了研究抑制作用的调控机制, 应用 hCAP18 启动子调控萤光素酶报告基因的重组质粒来确定启动子的活性。ZR75-1 细胞在以 25% 汇合涂布于 6 孔板上, 然后每孔采用 3 μ g 报告子质粒与 6 μ l jetPEI (qBiogene) 的混合转染细胞。转染 14 小时后, 加入上述抑制剂。24 小时后, 裂解细胞并且通过分析系统 (Promega) 测量萤光素酶活性。200ng 共转染质粒 (pEF1/lacZ, Invitrogen) 表达的 β -半乳糖苷酶作为活性标准。每个实验至少重复两次, 每次进行三次平行测定。

转录后抑制研究（参见 Wang 2005, Zhang 2005, Roh 2000）

目前最有效的转录后抑制是 RNA 干扰，它主要是诱导靶 mRNA 序列特异的催化降解。在短干扰 RNA 转化的细胞系中，非常容易筛选转录本的最有效靶点。通过定量 PCR 和蛋白印迹分析对 RNA 干扰的效果进行检测。通过重组载体可以表达有效的靶点，达到在肿瘤特定位点表达靶分子的目的。

根据 hCAP18 的编码序列设计合成短干扰 RNA。它是 19-mer 的双链 RNA，其两端有 2 个碱基的 dTdT 尾。商业 siRNA 数据库含有预先选定的靶位点，可以用于 siRNA 的设计（对于 hCAP18，例如 Ambion 来源的 siRNAs no. 14586, 14402, 146365）。为了避免非特异反应，例如干扰素相关途径，ZR75-1 细胞或者转基因 MCF-7 细胞最高转染终浓度 10nM 的 siRNA。对照 siRNA 在靶序列上包含 2-3 个错配。转染 24 小时后收集细胞，通过上述实时 PCR 以及定量 Western 印迹分析确定 hCAP18 的表达。Western 印迹分析中，提取蛋白用含 SDS 样品缓冲液溶解，通过 15% Tris-Glycine 的凝胶分离，然后如上所述的电转到硝化纤维素滤膜上。在滤膜与 1:1000 稀释的亲纯化的抗 LL-37 抗血清孵育之前，用 3% 的丽春红 S 对滤膜进行可逆染色。对辣根过氧化物酶耦联的二抗 IgG 的增强型化学发光信号进行捕获并且按照上面所描述的进行评价。

建立体内实验对 hCAP18 表达的最有效转录抑制剂进行分析。用转基因表达 hCAP18 的 MCF-7 细胞注射 12 只小鼠。其中 6 只小鼠每天皮下注射 30mg 溶于 20 μ l 橄榄油（Sigma）的抑制剂。按照上面所描述的对肿瘤形成的发生，肿瘤的大小和分布进行分析。体内途径有效的 siRNA 可以下调至少 90% 的 hCAP18 表达。

为了干扰小鼠的肿瘤形成，需要保持数周的 hCAP18 表达下调。可以通过小鼠尾静脉每天注射高剂量的 siRNA，但是对于治疗途径好像不太现实。替代方法是在组织/肿瘤细胞中稳定表达 siRNA。已经设计了这样的质粒（例如 pSuper, OriGene Inc），其表达 RNA 形成发夹结构，然后在胞内转变为 siRNA。在初步研究中，我们将上述实验确定的靶 siRNA 序列克隆到 pSuper，肿瘤细胞用该构建体转染并植入小鼠。在肿瘤形成之后传递表达载体的治疗方法目前还没有产生，但是对于通过脂质体传

递质粒以及构建逆转录病毒和腺病毒表达载体来传递在全世界广泛研究。

RNAi 的替代方法是“经典的”反义方法。将长度 20-3bp，与目标转录本互补的单链寡核苷酸直接加入细胞培养液或者直接注射小鼠。通常对寡核苷酸主链进行修饰，来抑制其降解并且促进其在没有任何载体底物条件下的吸收。然而，由于抑制机制是非催化的，而且主链修饰可以增强其细胞毒性和非特异的副作用，所以该方法要求高的剂量。小鼠实验中，典型剂量施用范围是 100-500 μ g/动物/天。

抗体的 LL-37 活性抑制作用（参见 Warburton 2005）

鸡抗已经能够大规模生产并且亲和纯化，满足实验的需要。已经证明 LL-37 抗体能够抑制 LL-37 活性。因此不需要进行体外实验。

如上面所描述的通过体内实验在小鼠体内诱瘤。当肿瘤可以摸到时，每周注射两次抗体，开始时采用 1-100mg/kg 抗体。

然后分析抗体对于肿瘤发生的效应。

参考文献

1. Agarwal C et al.: AGN1 93109 is a highly effective antagonist of retinoid action in human ectocervical epithelial cells. *J Biol Chem* 271: 12209- 12212 (1996).
2. Andela VB, Rosier RN: The proteasome inhibitor MGI32 attenuates retinoic acid receptor trans-activation and enhances trans-repression of nuclear factor B. Potential relevance to chemo-preventive interventions with retinoids. *Molecular Cancer* 3: 8-19 (2004).
3. Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M: Caveolin-1 inhibits anchorage- independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21: 2365-2375 (2002).
4. Heilborn J et al.: Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int J Cancer* 114:713-9 (2005).

5. Ishizuka S et al.: (23S)-25-Dehydro-1 {alpha}-hydroxyvitamin D₃-26,23- lactone, a vitamin D receptor antagonist that inhibits osteoclast formation and bone resorption in bone marrow cultures from patients with Paget's disease. *Endocrinology*. 146:2023-2030 (2005).
6. Lu C, Shen Q et al.: cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Oncogene* 24: 6516-6524 (2005).
7. Ludes-Meyers JH et al.: AP-1 blockade inhibits the growth of normal and malignant breast cells. *Oncogene* 20: 2771-2780 (2001).
8. Roh H et al.:HER2/neu antisense targeting of human breast carcinoma. *Oncogene*. 2000 Dec 11; 19(53):6138-43.
9. Toell A et al.: Different molecular mechanisms of vitamin D₃ receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 59: 1478-1485 (2001).
10. Wang Y-h et al.: Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumour cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 7: R220- R228 (2005).
11. Warburton C et al.: Treatment of HER-2/neu overexpressing breast cancer xenograft models with trastuzumab (Herceptin) and gefitinib (ZD1839): drug combination effects on tumour growth, HER-2/neu and epidermal growth factor receptor expression, and viable hypoxic cell fraction. *Clin Cancer Res*. 10:2512-24 (2004).
12. Weber G et al.: Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *J Invest Dermatol*. 124: 1080-2 (2005).
13. Zhang M et al.: Silencing the epidermal growth factor receptor gene with RNAi may be developed as a potential therapy for non small cell lung cancer. *Genet Vaccines Ther*. 3:5-16 (2005).

例 D: 人抗菌肽 LL-37 培养的人角质形成细胞中抑制细胞凋亡并且上调凋亡蛋白 (IAP-2) 抑制剂的表达

背景技术

Cathelicidin 属于抗菌肽家族，它在许多哺乳动物中都有发现。它们包含一个高度保守的氨基末端结构域，cathelin 和一个可变的羧基末端结构域，它们可以通过蛋白水解被释放从而产生抗菌活性 (1,2)。18kD 的人阳离子抗菌蛋白 (hCAP18) 是该家族中唯一属于人源的，它主要是通过嗜中性粒细胞、一些上皮细胞和粘膜细胞 (皮肤、支气管、颊粘膜、sophagous、宫颈、阴道、epidimus 和唾液腺) 产生 (3-8)。羧基末端 37 个氨基酸的结构域 LL-37 通过破坏膜稳定性 (11,12)，显示出广谱的抗菌活性 (9,10)。

除了抗菌功能，该肽也参与其它生物活性，例如血液和上皮细胞中的趋化性以及细胞因子的释放 (8,13)，上皮细胞增殖 (14) 和血管发生的诱导 (15)。最近有研究表明 LL-37 在伤口愈合过程中高表达，并且影响人角质形成细胞的体外增殖以及涉及伤口上皮的再生 (16,17)。

材料和方法

细胞培养

包皮表皮角质形成细胞从 Cascade Biologics (Cascade Biologics, Eugene, OR) 获得，在 37°C，5% CO₂ Epilife basal 培养液(Cascade Biologics,.)培养，该培养液添加有 0.06mM 钙、0.2%V/V BPE、5μg/ml 牛胰岛素、0.18μg/ml 氢化可的松、5μg/ml 牛转铁蛋白、0.2ng/ml 人上皮生长因子、100U/ml 青霉素 G、100μg/ml 硫酸链霉素和 0.25μg/ml Amphotericin B (all Cascade Biologics)。细胞用 0.025% (W/V) 胰岛素和 0.01% (W/V) EDTA (Cascade Biologics) 每周传代一次。

HaCaT 角质形成细胞采用 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基(DMEM; Gibco-BRL Technology, Paisley, UK)培养，该培养基添加有 10%胎牛血清 (hyClone, Boule Nordic AB Huddinge, Sweden)、2mM 谷氨酰胺、青霉素 (50U/L Gibco-BRL) 和链霉素 (50 mg/ml, Gibco-BRL)。

细胞处理

25,000 细胞/孔涂布到 6 孔板培养皿上培养。涂布 48 小时后，用 0、

0.23、0.16、0.69、0.9、1.15、2.3、4.6 和 11.5 μ M LL-37 处理细胞。每个处理都进行重复三次。多肽用培养液稀释（HaCaT 细胞用 DMEM 5%胎牛血清，HEK293 细胞用添加 0.1%胎牛血清的 Epilife basal 培养液）。这些细胞 24 小时内处理完成。LL-37 刺激后，溶于二甲基亚砜的拓扑异构酶 I 抑制剂 camptothecin (CAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 被加入到细胞中，终浓度为 6 μ M。细胞进一步孵育 24 小时后进行分析。

细胞凋亡的流式细胞分析

通过流式细胞对两个细胞凋亡参数进行分析，分别是膜丧失完整性和 DNA 减少。

膜完整性分析：LL-37 刺激后，用 CAM 处理细胞，然后通过胰蛋白酶消化收集细胞。用预冷的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 漂洗细胞，然后用血细胞计数器 (Hausser Scientific, Horsham, PA) 进行细胞计数。用 PBS 调节细胞密度达到 1×10^6 细胞/ml。用 propidium iodide 和 YO-PRO-1 染料 (Molecular Probes, Eugene, OR) 对细胞凋亡进行检测。染色细胞通过 FACSscan (Beckton-Dickinson, San Jose, CA) 分析。基于 FSC (前向光散射) 和 SSC (侧向光散射) 来分析细胞。应用 Cell Quest 软件 (Becton Dickinson) 对表达 YO-PRO 和 propidium iodide (PI) 的细胞进行分析，该分析可以获得 YO-PRO 和 PI 阳性细胞的比例。YO-PRO 染色呈绿色的细胞被认为细胞凋亡。propidium iodide 染色呈红色的细胞是坏死细胞。活细胞吸收少量染料或者不吸收染料。

流式细胞术分析 DNA 含量：在该分析中采用 PI/ 核糖核酸酶染色缓冲液 (Becton Dickinson)。胰蛋白酶消化的细胞经预冷的 70% (V/V) 的乙醇固定，4 $^{\circ}$ C 储存备用。通过将 propidium iodide 掺入到 DNA 中测定 DNA 含量。采用 FACSscan 流式细胞仪 (Becton and Dickinson, Mountain View, CA, USA) 进行荧光分析。同时测量粒子的 FSC (前向光散射) 和 SSC (侧向光散射) 以确定细胞的大小和颗粒性。FL-4 窗口检测 PI 染色的细胞核的红色荧光 (600 nm 带通滤波器和 35 nm 带宽)。荧光强度与细胞内 DNA 含量成比例。每个直方图分为两部分：(1) M1 区代表不同步的，未凋亡的活细胞 (G1,S 和 G2 周期的细胞，其 DNA 含量在 2 倍到

4 倍)；(2) M2 区代表的是与活细胞相比 DNA 含量较少的凋亡细胞。

半胱天冬酶 3 活性分析

采用以前所描述的荧光底物 VDVAD-AMC (100 μ M)和 DEVD-AMC (50 μ M)测定半胱天冬酶 3 酶活性。简而言之,细胞裂解液用反应缓冲液(100 mM HEPES、10% 蔗糖、5mM 二硫苏糖醇 (DTT)、10-6% NP-40 和 0.1% CHAPS, (pH 7.25))混合,然后加入微孔板。在 Fluoroscan II 读板器(Labsystems, Stockholm, Sweden)上通过 AMC 释放对荧光底物的裂解进行检测。通过采用游离 AMC 产生的标准曲线将荧光单位转换成 AMC 的 pmol。通过线性回归对数据进行分析并且表示为 pmol AMC 释放/min。

反转录 PCR

细胞经过不同的处理后,根据制造商的说明书采用 Quiagen RNasy 试剂盒 (Operon Biotechnologies,Cologne, German)提取总 RNA。用第一链合成试剂盒 (Amershan Biosciences)进行反转录。

结果

LL-37 抑制 CAM 诱导的细胞凋亡

我们观察了 LL-37 对细胞死亡和 CAM 诱导的细胞凋亡的效应,CAM 广泛用作诱导细胞凋亡的试剂。处理细胞后,通过流式细胞仪采用两种方法对膜完整性和 DNA 断裂进行分析。第一个方法是双染色系统,它使我们能够辨别细胞膜通透性的增加;未处理细胞用于染色强度的分析(图 7),并且可以将细胞分为三类:活的非染色细胞,凋亡的 YO-PRO 染色细胞以及 YO-PRO 和 PL 染色的坏死细胞。第二个方法是通过 PI 分析乙醇透化处理的细胞内的 DNA 含量。凋亡细胞由于基因断裂其 DNA 含量较少。

为了选择诱导 HaCaT 和 HEK293 细胞凋亡的剂量和时间,在之前进行了浓度和时间点实验(数据未显示)。暴露于 6 μ M 的 CAM 24 小时,HaCaT 细胞和角质形成细胞都表现出凋亡特有的形态改变,例如膜完整性和

DNA 谱的改变（图 7）。细胞用 LL-37 单独处理或者用 LL-37 和 CAM 同时处理 24 小时，没有观察到凋亡细胞数量的改变（数据未显示）。然而，高浓度 LL-37（4.6 和 11.5 μ M）有细胞毒性，可以增加坏死细胞数量，但是不会增加凋亡细胞数量。细胞在 CAM 诱导凋亡之前，与 LL-37 暴露 24 小时，其结果与同时处理的结果不同。LL-37 浓度从 0.23 μ M 到 2.3 μ M 都可以抑制 HEK_n 和 HaCaT 细胞内 DNA 的断裂和膜通透性的丧失（图 7 和 8）。在这些条件下，较高浓度（4.6 和 11.5 μ M）LL-37 也可以引起细胞死亡。即使在毒性浓度条件下，凋亡细胞数量仍很低，表明 LL-37 通过非凋亡机制引起细胞死亡。

LL-37 在 HaCaT 和 HEK_n 细胞内抑制 CAM 对半胱天冬酶 3 的诱导作用

由于半胱天冬酶 3 是凋亡途径中的一个关键蛋白，是凋亡的早期显示物，我们决定对 LL-37 处理或者未处理的角质形成细胞内半胱天冬酶 3 活性进行测定。CAM 处理前 12 小时内，角质形成细胞内半胱天冬酶活性显著增强，24 小时达到最大值。用 2.3 μ M 的 LL-37 预处理可以减少 camptothecin 诱导的半胱天冬酶的激活（图 9a 和 b）。这些数据表明 LL-37 通过减少半胱天冬酶活性抑制人角质形成细胞凋亡。

LL-37 诱导人角质形成细胞中 IAP-2 的表达

凋亡蛋白（IAP）抑制因子的成员是细胞凋亡的关键调节因子。该家族成员能够抑制半胱天冬酶 3 的活性。猪 cathelicidin 成员 PR39 的抗凋亡功能与 IAP-2 表达的诱导相关。因此我们通过反转录 PCR 分析不同浓度 LL-37 以及不同的时间点处理的角质形成细胞的 IAP-2 在 HEK_n 细胞中的表达。用 2.3 μ M LL-37 刺激可以增加刺激后 6-12 小时 IAP-2 mRNA 量（图 10）。LL-37 浓度低于 2.3 μ M 则不会影响 c-IAP-2 的水平（数据未显示）。

LL-37 上调 COX-2 刺激角质形成细胞

由于抑制上皮细胞内 COX-2 可以减少 IAP-2 的表达，以前研究表

明 COX-2 是 IAP-2 表达的调节剂。因此我们对 2.3 μ M 的 LL-37 处理的 HEK_n 细胞内 COX-2 的表达进行分析。结果发现 mRNA 水平的增加是时间依赖性的（图 11），而且 12 小时后达到最高水平。为了分析 COX-2 是否调控 LL-37 刺激后 IAP-2 的表达增加，用 25nM 的 COX-2 的特定抑制剂 SC-791 预处理 HEK_n 细胞 12 小时，然后用 2 μ M LL-37 刺激。在这些条件下，LL-37 处理没有以前所观察到的增加 IAP-2 的 mRNA 水平（图 12）。这些数据表明 LL-37 通过提高 COX-2 酶的表达来增加 IAP-2 的水平。

讨论

有报道表明皮肤损伤后抗菌肽 LL-37 的表达增加。该多肽的表达与促进伤口愈合相关，其不仅通过预防感染，而且还通过不同的伤口愈合相关过程中的积极参与，例如趋化性、迁移、血管发生和上皮再生。

这些数据表明 LL-37 也可以通过对凋亡的抑制效应促进角质形成细胞内细胞的存活。

缩写

hCAP18/LL-37, 人 cathelicidin 抗菌肽 18kDa/LL-37; IAP-2, 抑制性凋亡蛋白-2; COX-2, cicloxygenase-2; VDVAD-AMC, 半胱天冬酶 3 底物; HEK_n, 人新生的表皮角质形成细胞; DMEM, Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基; PBS, 磷酸盐缓冲生理盐水。DEVDase, 天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸蛋白酶活性。CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio] propane-1-sulphonic acid, CAM: 喜树碱。

参考文献

1. Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D. (1995) FEBS Lett 374(1), 1-5
2. Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N. (2001) Blood 97(12), 3951-3959

3. Sorensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F., and Borregaard, N. (1997) *Blood* 90(7), 2796-2803
4. Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16), 9541-9546
5. Frohm, M., Agerberth, B., Aloungari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H. (1997) *J Biol Chem* 272(24), 15258- 15263
6. Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., and Gudmundsson, G. H. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92(1), 195-199
7. Frohm Nilsson, M., Sandstedt, B., Sorensen, O., Weber, G., Borregaard, N., and Stahle-Backdahl, M. (1999) *Infect Immun* 67(5), 2561-2566
8. De, Y., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., and Chertov, O. (2000) *J Exp Med* 192(7), 1069-1074
9. Zasloff, M. (2002) *Nature* 415(6870), 389-395
10. Dorschner, R. A., Pestonjamas, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., Agerberth, B., Gudmundsson, G. H., and Gallo, R. L. (2001) *J Invest Dermatol* 117(1), 91-97
11. Oren, Z., Lerman, J. C, Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., and Shai, Y. (1999) *Biochem J* 341 (Pt 3), 501-513
12. Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., and Blecha, F. (2002) *Microbes Infect* 4(3), 361-372
13. Braff, M. H., Hawkins, M. A., Di Nardo, A., Lopez-Garcia, B., Howell, M. D., Wong, C, Lin, K., Streib, J. E., Dorschner, R., Leung, D. Y., and Gallo, R. L. (2005) *J Immunol* 174(7), 4271-4278
14. Shaykhiev, R.; Beisswenger, C, Kandler, K., Senske, J., Puchner, A., - Damm, T., Behr, J., and Bals, R. (2005) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(5), L842-L848.
15. Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C, Krotz, F., Zahier, S.,

Gioe, T., Issbrucker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C, Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C, Gallo, R. L., Clauss, M., and Bals₃ R. (2003) J Clin Invest 111(11), 1665-1672

16. Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Jimenez, C. L, Sandstedt, B., Borregaard, N., Tham, E., Sorensen, O. E., Weber, G., and Stahle, M. (2005) Int J Cancer 114(5), 713-719

17. Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Kratz, G., Weber, G., Sorensen, O., Borregaard, N., and Stahle-Backdahl, M. (2003) J Invest Dermatol 120(3), 379-389

例 E: 本发明目标试剂的体内生产和应用

抗 hCAP18/LL-37 抗体/抗 HMFG1 抗体融合蛋白的表达

融合蛋白包含一个抑制剂部分（抗 hCAP18/LL-37 抗体）和一个靶向部分（抗多形上皮细胞粘蛋白抗体，HMFG1），该融合蛋白在 NSO 骨髓瘤细胞中表达。

简而言之，编码组成融合蛋白的轻链和重链的表达载体通过电穿孔共转染 NSO 骨髓瘤细胞。然后通过 ELISA 筛选生产抗体的转染瘤。

患者施用

融合蛋白配制成无菌水注射液。

对于患有乳腺癌的患者，该组分可以通过 90 分钟的静脉输液给药。

根据医生决定的每个患者的个体需要来选择剂量。典型地，首次剂量采用 4mg/kg，以后每周剂量保持在 2mg/kg。

监测疾病的发展

采用融合蛋白治疗对乳腺癌的发展的影响通过常规乳房 X 线照相进行监测。

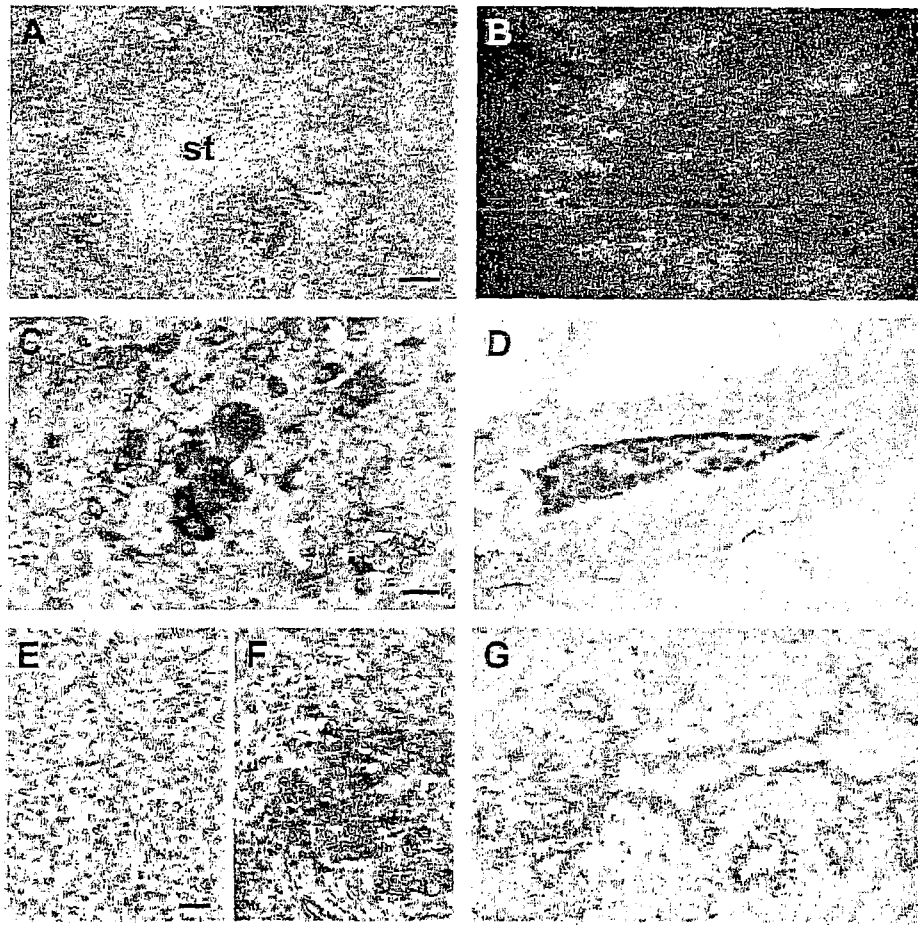


图1

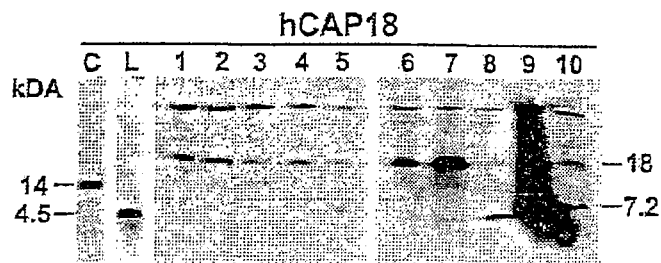


图2

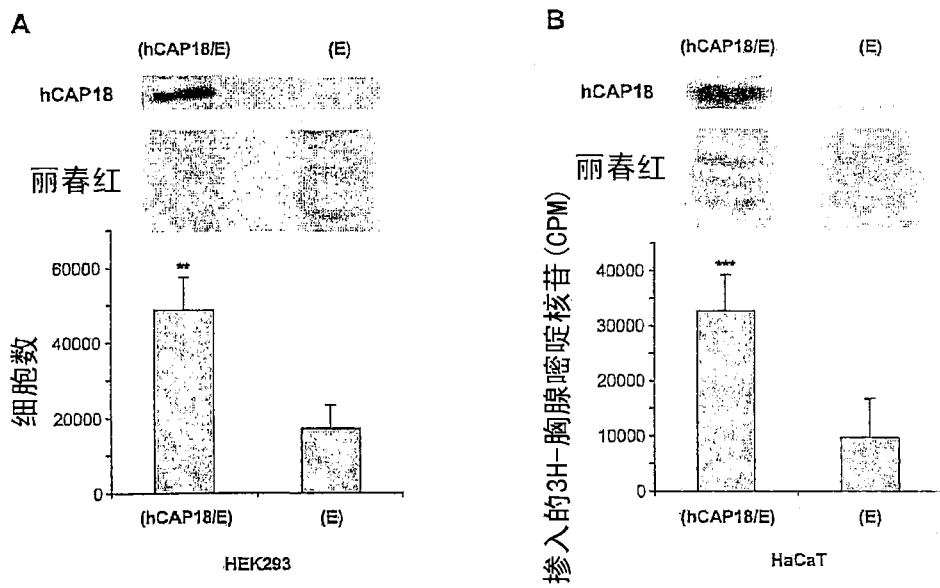


图3

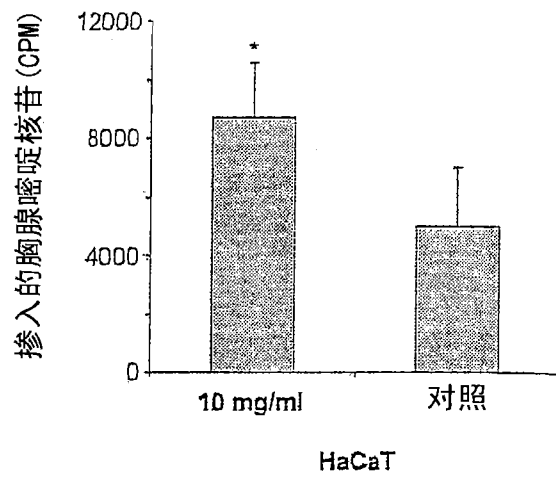


图4

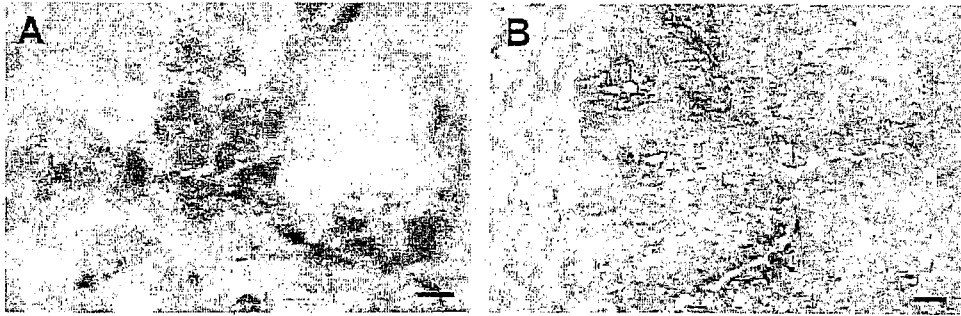


图5

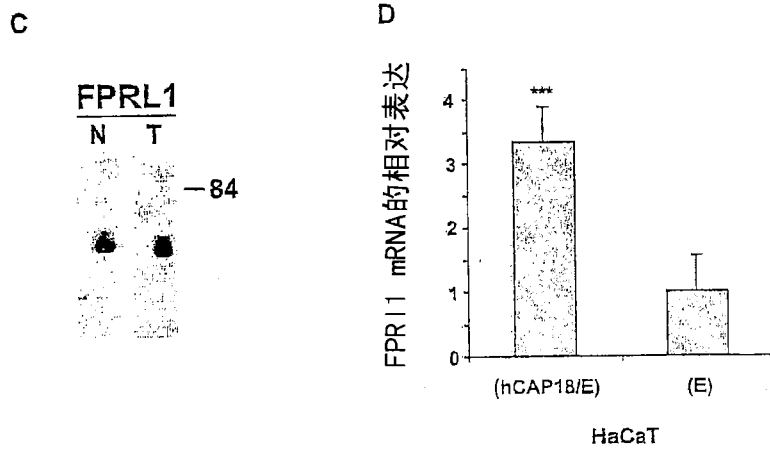


图5

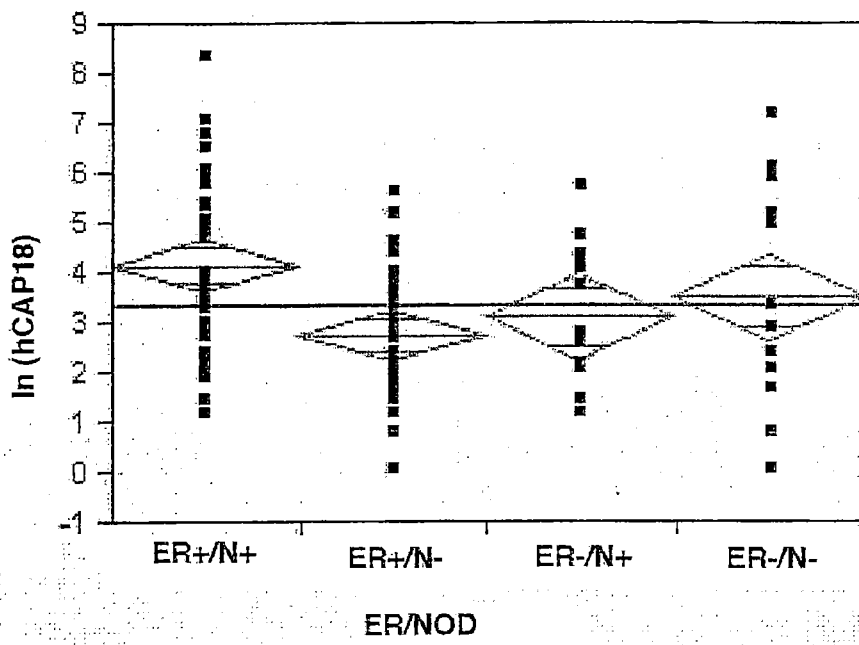


图6

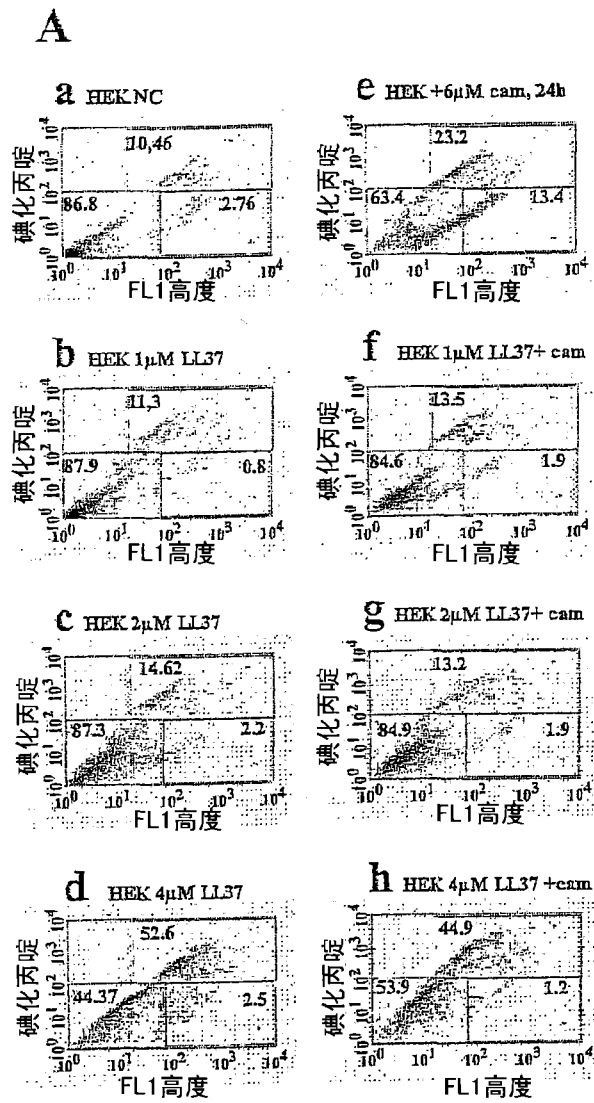


图7

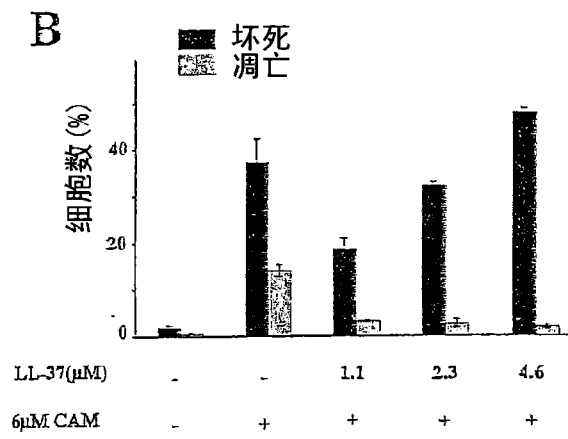


图7

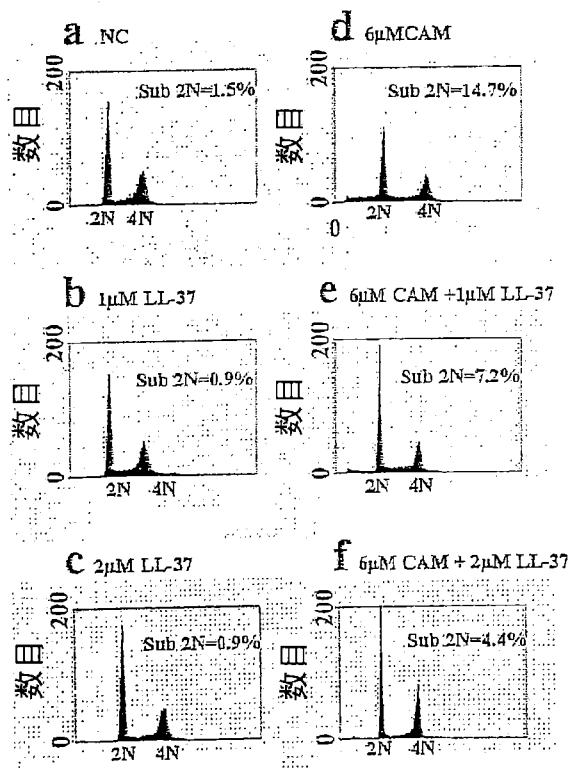


图8

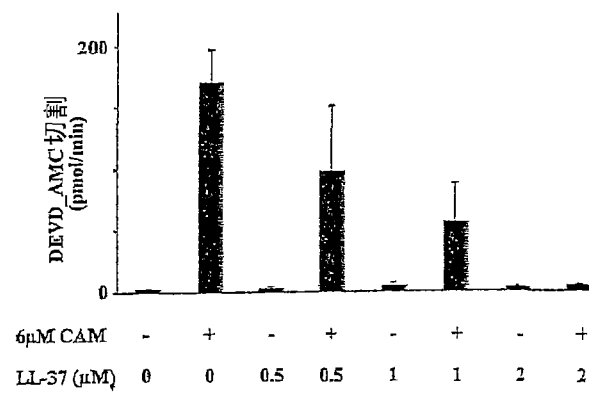


图9

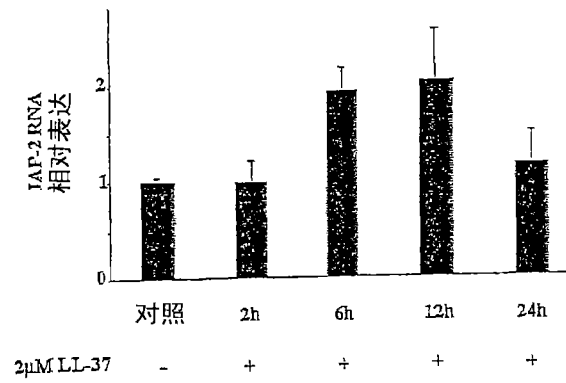


图10

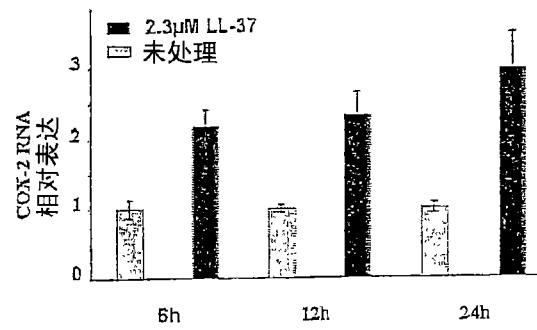


图11

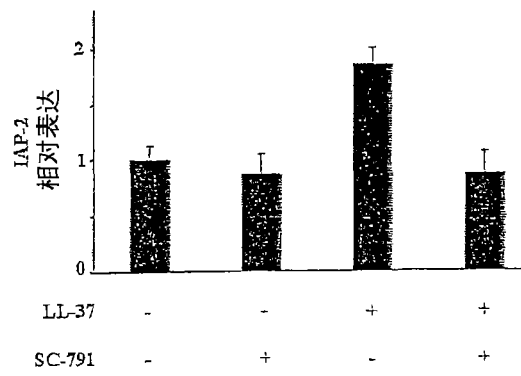


图 12