(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119015448 A
(43)申请公布日 2024.11.26

(21)申请号 202411342304.6
(22)申请日 2019.12.20
(30)优先权数据
62/782,690 2018.12.20 US
(62)分案原申请数据
201980092976.7 2019.12.20
(71)申请人 芝加哥大学
地址 美国伊利诺斯州
(72)发明人 莱芙·贝克尔 崔畅
(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 于作琛 回振海
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/48(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书28页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

与用于癌症疗法的治疗肽相关的方法和组合物

(57)摘要

本发明的实施方案提供了与平衡患者毒性与癌症疗法的广泛功效相关的问题的解决方案。特别地,实施方案涉及抗癌肽,其表现出广泛的抗癌功效,而对正常细胞或非癌细胞的毒性有限。

CN 119015448 A

1.治疗组合物在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途,其中向患有癌症的对象施用有效量的所述治疗组合物,所述治疗组合物包含编码SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的一种或多于一种肽的表达载体或表达盒。

2.根据权利要求1所述的用途,其中肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。

3.根据权利要求1所述的用途,其中肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:4。

4.根据权利要求1所述的用途,其中肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:5。

5.根据权利要求1所述的用途,其中治疗组合物通过注射施用。

6.根据权利要求1所述的用途,其中治疗组合物是瘤内施用的。

7.根据权利要求1所述的用途,其中癌症是膀胱癌、血癌、骨癌、骨髓癌、脑/神经系统癌、乳腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃肠癌、头癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、舌癌、或子宫癌。

8.根据权利要求1所述的用途,其中表达载体是病毒载体。

9.根据权利要求8所述的用途,其中病毒载体是逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛痘病毒。

10.根据权利要求9所述的用途,其中逆转录病毒包括慢病毒载体。

11.根据权利要求1所述的用途,其中第二抗癌疗法被施用。

12.根据权利要求11所述的用途,其中第二抗癌疗法是化学疗法、放射疗法、免疫疗法或抗激素疗法。

13.根据权利要求11所述的用途,其中第二抗癌疗法是ELANE蛋白酶。

14.一种诱导癌细胞凋亡的方法,其包括使癌细胞与有效量的编码SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的一种或多于一种肽的表达载体或表达盒接触,其中所述方法是体外方法。

15.根据权利要求14所述的方法,其中癌细胞在膀胱瘤、血瘤、骨瘤、骨髓瘤、脑/神经系统瘤、乳腺瘤、结肠直肠瘤、食道瘤、胃肠瘤、头瘤、肾瘤、肝瘤、肺瘤、鼻咽瘤、颈瘤、卵巢瘤、胰腺瘤、前列腺瘤、皮肤瘤、胃瘤、睾丸瘤、舌瘤或子宫瘤中。

16.根据权利要求15所述的方法,其中表达载体是病毒载体。

17.根据权利要求16所述的方法,其中病毒载体是逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛痘病毒。

18.根据权利要求17所述的方法,其中逆转录病毒包括慢病毒载体。

19.一种包含抗癌肽构建体的基因治疗载体组合物,其包含编码SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的一种或多于一种肽组分的表达载体或表达盒。

20.根据权利要求19所述的组合物,其中肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。

21.根据权利要求19所述的组合物,其中肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:4。

22.根据权利要求19所述的组合物,其中肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:5。

23.根据权利要求19所述的组合物,其中表达载体是病毒载体。

24.根据权利要求23所述的组合物,其中病毒载体是逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛痘病毒。

25.根据权利要求24所述的组合物,其中逆转录病毒包括慢病毒载体。

与用于癌症疗法的治疗肽相关的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为2019年12月20日,申请号为201980092976.7,发明名称为“与用于癌症疗法的治疗肽相关的方法和组合物”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2018年12月20日提交的美国临时专利申请第62/782690号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本文描述的组合物和方法的实施方案总体上涉及分子生物学、医学和癌症疗法领域。特别地,实施方案涉及癌症疗法和抗癌肽组合物。

背景技术

[0005] 癌症是突变的增殖性疾病,其表现出高度的空间和时间遗传异质性(Stratton等人,Nature,2009;Vogelstein等人,Science,2013)。除了克服这种异质性之外,在保留非癌细胞的同时根除肿瘤细胞仍然是一项艰巨的任务。出于这些原因,鉴定对癌症类型具有广泛功效且保持特异性以限制宿主毒性的试剂一直是具有挑战性的。

[0006] 广泛的功效和特异性是先天免疫的整体特性。先天免疫系统进化为可以抵御多种传染性病原体,包括细菌、真菌和原生动物,其遗传多样性远远超过癌症。作为先天免疫的关键效应物,中性粒细胞消除了遗传多样性的病原体,因此可能理想地在癌症中发挥相当的功能。事实上,人类血液多形核中性粒细胞(PMN)可以杀伤癌细胞(Sagiv,Cell Rep.,2015;Yan等人,Oncoimmunology,2014),并且在旨在将它们作为细胞疗法递送的临床试验中正在探索其治疗潜力。尽管人们对人类PMN的关注越来越多,但它们杀伤癌细胞的机制尚不完全清楚。

[0007] 与PMN的抗癌功能相反,许多研究表明,肿瘤相关中性粒细胞(TAN)促进肿瘤发生。这种矛盾可能是由于中性粒细胞的来源和激活状态造成的,这会产生显著的功能差异(Coffelt等人,Nat Rev Cancer,2016;Eruslanov等人,Trends Cancer,2017;Kruger等人,PLoS Pathog.,2015)。例如,小鼠研究表明,肿瘤细胞劫持中性粒细胞以释放分子从而促进转移扩散(Coffelt等人,Nature,2015;Finisguerra等人,Nature,2015)。此外,增加的TAN积累是许多癌症类型的不良预后标志物(Coffelt等人,Nat Rev Cancer,2016;Shen等人,PLoS One,2014;Powell等人,Immunol.,2016)。

[0008] 仍然需要用于治疗癌症的另外抗癌组合物和另外疗法,其具有广泛的抗癌功效和有限的患者毒性。

发明内容

[0009] 本发明的实施方案提供了与平衡患者毒性与癌症疗法的广泛功效相关的问题的解决方案。特别地,实施方案涉及抗癌肽,其表现出广泛的抗癌功效,而对正常细胞或非癌细胞的毒性有限。

[0010] 鉴于人类PMN释放杀伤多种病原体的细胞外因子,本发明人试图探索这些因子是否具有相似的杀伤癌细胞的能力。使用这种策略,ELANE被鉴定为由人类PMN释放的主要抗癌蛋白,其作用机制涉及在V^{220}/A^{221}和I^{331}/Q^{332}处切割人CD95(hCD95)以释放含有死亡结构域(DD)的蛋白水解片段,该蛋白水解片段选择性杀伤癌细胞。ELANE在多种模型中显示出具有广泛的抗癌功效和选择性。

[0011] ELANE在临床前模型中具有几个有趣的特性。首先,其杀伤多种癌细胞的能力能够使得在不用了解其遗传学知识的情况下得以实施。其次,其对癌细胞相对于非癌细胞的特异性可以会限制潜在的毒性。再次,初步研究表明,癌细胞获得对ELANE的抗性是具有挑战性的。从机制上讲,有人提出这些特性源于ELANE靶向CD95的能力。事实上,ELANE的杀伤程序、广泛的功效、特异性和耐药性密切模拟在用shRNA处理的癌细胞中报道的那些,以降低CD95水平(L.Chen等人,Nature,2010),但有一个重要区别。所提出的机制涉及CD95的功能获得(即释放含有DD的片段)而不是功能丧失(即CD95敲低)。已知CD95会根据生理环境发挥促凋亡和抗凋亡作用(Martin-Villalba,Liorens-Bobadilla,Wollny.Trends Mol Med,2013),并且研究将ELANE鉴定为一种潜在的治疗方法,该治疗方法可利用其促凋亡功能。

[0012] 本发明人的研究表明,ELANE蛋白水解地释放CD95 DD以选择性地杀伤范围广泛的癌细胞。事实上,瞬时过表达全长CD95(aa 1-335)或含有两个切割位点的C-末端CD95肽(aa.212-335)加速了人类癌细胞中ELANE介导的杀伤,同时瞬时过表达N-末端结构域(aa 1-209)没有影响。然而,在没有ELANE的情况下,瞬时过表达这些hCD95蛋白/肽不足以杀伤癌细胞。在没有ELANE的情况下诱导细胞凋亡需要表达模拟ELANE在一个或两个位点(位点1:aa 221-335;位点2:aa 212-331;两个位点:aa 221-331)切割的C-末端hCD95肽。证明这些hCD95肽可以杀伤多种类型的人类癌细胞而不损害非癌细胞,这支撑了递送特定CD95肽或编码CD95肽的DNA用于治疗许多癌症的方法。

[0013] 数据显示一些人CD95肽(其含有ELANE切割位点)对癌细胞没有毒性并且仅使ELANE更有效。另一方面,在没有ELANE的情况下,瞬时表达模拟ELANE在一个或两个位点切割的人类CD95肽会杀伤癌细胞。C肽没有毒性,但C1(模拟位点1的切割)、C2(模拟位点2的切割)和C1-2(模拟两个位点的切割)都是有毒的。此外,CD95和全长CD95的N-末端结构域肽对癌细胞没有毒性。最后,结果表明,在MDA-MB-231细胞中表达C1-2肽诱导的杀伤机制与用ELANE处理这些细胞相同(即抑制存活途径,以及诱导DNA损伤、线粒体ROS和凋亡效应物)。

[0014] 为了研究表达CD95 C1-2肽是否可以减弱体内肿瘤生长,研究人员建立了MDA-MB-231癌细胞(TNBC),其在强力霉素可诱导的启动子的控制下稳定地表达CD95C或C1-2肽。在体外研究中,强力霉素治疗诱导了两种蛋白质的表达。与瞬时表达系统一致,被诱导表达C1-2肽的细胞经历了凋亡,而那些被诱导表达C肽的细胞则没有。此外,强力霉素诱导的C1-2肽在MCF10a细胞(非癌细胞)中的表达未能诱导凋亡。对MDA-MB-231细胞的不同C1-2肽表达集落的分析表明,凋亡程度与C1-2的表达水平显著正相关。将表达强力霉素可诱导的C1-2肽的MDA-MB-231细胞注射到小鼠的乳腺脂肪中,使肿瘤生长至约100mm^3大小。此时,强力霉素通过腹腔注射或通过食物向小鼠施用。结果表明,在MDA-MB-231细胞中诱导C1-2表达可减少肿瘤生长并增加肿瘤中$CD45^+$免疫细胞的数量。

[0015] 某些实施方案涉及包括抗癌肽或其变体、表达载体或编码其的表达盒的各种组合的治疗性或抗癌组合物。在某些方面中的组合物可以包括一种或多于一种肽,所述肽包含、

基本上组成为、或组成为:氨基酸序列

SPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQD

TAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNF

RNEIQSLV (SEQ ID NO:2),或区段

AINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQL

LRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQSLV

(SEQ ID NO:3),和/或

SPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQD

TAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNF

RNEI (SEQ ID NO:4)和/或

AINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQL

LRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEI (SEQ

ID NO:5)。某些实施方案涉及一种或多于一种肽或其变体,其具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的超过5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124个连续氨基酸(包括其间的所有值和范围)具有90、92、94、96、98、99至100%的同一性,包括其间所有值和范围。抗癌肽的功能区段可以从SEQ ID NO:2的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118或119位氨基酸开始并且终止于5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124位。在某些方面,可以通过氨基酸侧链的化学修饰(例如,交联、糖基化等)或通过在肽的氨基或羧基末端包括异源肽序列来修饰本文所述的抗癌肽。

[0016] 抗癌肽在组合物中存在的浓度可以各自为1、50、100、150、200、250、300、350、400、450μg/mL至500、550、600、650、700、750、800、850、900、950μg/mL;或者1、10、20、30、40、50、60、70、80、90mg/mL至100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200mg/mL,包括其间所有范围和值。

[0017] 某些实施方案涉及一种或多于一种抗癌肽和/或包含其的组合物。在某些方面,一种或多于一种肽组分与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5的肽或其功能区段具有90％至100％的同一性。在某些方面,肽具有与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90％的同一性的氨基酸序列。肽组分可以与基材偶联。在某些方面,基材是递送载体。递送载体可以是纳米颗粒(例如,脂质体)。

[0018] 某些实施方案涉及治疗癌症的方法,其包括向患有癌症的对象施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含一种或多于一种肽,所述肽与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4的肽或其功能区段具有90％至100％的同一性。治疗组合物可以通过注射施用。在某些方面,治疗组合物是瘤内施用的(例如,通过瘤内注射)。癌症可以是膀胱癌、血癌、骨癌、骨髓癌、脑/神经系统癌、乳腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃肠癌、头癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、舌癌或子宫癌。在某些方面,肽以0.001mg/kg至10mg/kg体重,优选至少、至多或约0.1至5mg/kg体重,最优选0.5至1mg/kg体重的剂量存在。在其他方面,该方法可以包括施用第二抗癌疗法。第二种抗癌疗法可以是化学疗法、放射疗法、免疫疗法(例如检查点抑制剂)或抗激素疗法。

[0019] 某些实施方案涉及在癌细胞中诱导凋亡的方法,其包括使癌细胞与有效量的一种或多于一种肽接触,所述肽与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4的肽或其功能区段具有90％至100％的同一性。癌细胞可以在膀胱瘤、血瘤、骨瘤、骨髓瘤、脑/神经系统瘤、乳腺瘤、结肠直肠瘤、食道瘤、胃肠瘤、头瘤、肾瘤、肝瘤、肺瘤、鼻咽瘤、颈瘤、卵巢瘤、胰腺瘤、前列腺瘤、皮肤瘤、胃瘤、睾丸瘤、舌瘤或子宫瘤中。

[0020] 发现本文所述的抗癌肽是人CD95同种型1的片段,其具有

MLGIWTLLPLVLTSVARLSSKSVNAQVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQ
FCHKPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCRRCRLCDEGHGL
EVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSTVCEHCDPCTKCEHGIIKECTLTSNTKCKEEGSR
SNLGWLCLLLLPIPLIVWVKRKEVQKTCRKHRKENQGSHESPTLNPETVAINLSDVD
LSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQL
HGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQSLV (SEQ ID NO:1,登录号NP_000034.1,自本申请提交日起,通过引用将其并入本文)的氨基酸序列。氨基酸1至25是信号肽,且成熟形式包含氨基酸26至335。某些实施方案涉及一种或多于一种肽或其变体,其具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的超过10、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250或255个连续氨基酸(包括其间所有值和范围)具有90、92、94、96、98、99至100％的同一性,包括其间的所有值和范围。在某些方面,可以通过氨基酸侧链的化学修饰(例如,交联、糖基化等)或通过在肽的氨基或羧基末端包括异源肽序列来修饰本文所述的抗癌肽。本文所指的N末端来自(SEQ ID NO:1)的1至209位氨基酸,本文所指的C末端来自(SEQ ID NO:1)的212至335位氨基酸。

[0021] 本文所述的组合物可杀伤多种癌细胞,而与癌细胞遗传学无关。因此,本文所述的组合物可治疗各种类型的癌症。在某些方面,癌症是膀胱癌、血癌、骨癌(例如骨肉瘤)、骨髓癌(例如白血病)、脑/神经系统(例如成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤)、乳腺癌、结肠直肠癌(例如结肠癌)、食道癌、胃肠道癌、头癌、肾癌、肝癌(例如肝细胞癌)、肺癌(例如非小细胞肺

癌)、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌(例如黑色素瘤)、胃癌、睾丸癌、舌癌或子宫癌。本文所述的组合物对癌细胞有毒,但对非癌细胞无毒或具有有限的毒性。

[0022] 某些实施方案涉及通过使癌细胞或肿瘤与有效量的治疗性抗癌肽组合物接触来杀伤癌细胞的方法。在某些方面,将抗癌肽组合物施用于患有癌症的患者。在某些方面,癌症是膀胱癌、血癌、骨癌、骨髓癌、脑癌、乳腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃肠癌、头癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、舌癌或子宫癌。在某些方面,抗癌肽组合物可进一步包含额外的抗癌剂或与额外的抗癌剂联合施用以增强肽组合物的有效性。在某些方面,这些额外的抗癌剂可以在施用多肽组合物之前;期间;之后;之前和期间;之前和之后;期间和之后;或者之前、期间和之后施用。在某些方面,本文所述的组合物可以在施用免疫疗法、化学疗法、抗激素疗法或放射疗法之前;期间;之后;之前和期间;之前和之后;期间和之后;或者之前、期间和之后施用。在某些方面,本文所述的肽组合物与化学疗法例如阿霉素和/或紫杉醇联合施用。

[0023] 某些实施方案涉及编码一种或多于一种抗癌肽的表达载体或表达盒。出于在靶癌症或肿瘤中或附近表达一种或多于一种抗癌肽的目的,可以向对象施用此类载体或盒。

[0024] 术语“有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的治疗或预防结果的量。

[0025] 关于降低癌细胞生长的抗癌剂(例如,本文所述的肽组合物)的“有效量”是指能够在一定程度上降低某些癌细胞或肿瘤细胞的生长的量。该术语包括能够引起癌症或肿瘤细胞的生长抑制、细胞生长抑制和/或细胞毒性作用和/或凋亡的量。

[0026] 关于治疗癌症的“治疗有效量”是指能够引起一种或多于一种以下作用的量:(1)在一定程度上抑制癌症或肿瘤生长,包括减缓生长或完全停滞生长;(2)癌细胞或肿瘤细胞数量减少;(3)肿瘤体积缩小;(4)抑制(即减少、减缓或完全停止)癌细胞或肿瘤细胞向周围器官的浸润;(5)抑制(即减少、减缓或完全停止)转移;(6)增强抗肿瘤免疫应答,其可能但不是必须导致肿瘤消退或排斥,或(7)在一定程度上缓解与癌症或肿瘤相关的一种或多于一种症状。治疗有效量可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及一种或多于一种抗癌剂在个体中引发所需应答的能力等因素而变化。“治疗有效量”也是治疗有益作用超过任何毒性或有害作用的量。

[0027] 短语“治疗癌症”和“癌症的治疗”是指减少、降低或抑制癌细胞的复制;减少、降低或抑制癌症的扩散(形成转移);减小肿瘤大小;减少肿瘤数量(即减少肿瘤负荷);减少或降低体内癌细胞的数量;防止手术切除或其他抗癌疗法后癌症复发;或改善或减轻由癌症引起的疾病的症状。

[0028] 术语“表达载体”或“表达构建体”是指适合转化宿主细胞并含有指导和/或控制(与宿主细胞结合)一种或多于一种与其可操作地连接的异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于下述序列:其影响或控制与其可操作连接的编码区的转录、翻译,并且如果存在内含子时,影响与其可操作连接的编码区的RNA剪接。

[0029] 术语“表达盒”是指包含至少一个编码序列以及指导转录起始和终止的序列元件的核苷酸序列。表达盒可以包括但不限于额外的序列,包括但不限于启动子、增强子和参与转录后或翻译后过程的序列。

[0030] 当在权利要求和/或说明书中使用时,术语“抑制”、“减少”或“预防”或这些术语的

任何变体包括任何可测量的减少或完全抑制以实现期望的结果。

[0031] 当与权利要求和/或说明书中的术语“包括”结合使用时,词语前不含有数量词可能意味着“一个”,但是其也符合“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的意思。

[0032] 在整个本申请中,术语“约”用于指示值包括针对装置、用于确定值的方法的误差的固有变化,或者研究对象之间存在的变化的值。

[0033] 权利要求中使用的术语“或”用于表示“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,尽管本公开支持仅指替代方案和“和/或”的定义。还预期使用术语“或”列出的任何内容也可被明确排除。

[0034] 如本说明书和权利要求中所使用的,词语“包括”(以及任何形式的包括,例如“包含”和“含有”)、“具有”(以及任何形式的具有,例如“拥有”和“具备”)、“包括”(以及任何形式的包括,例如“包括”和“包含”)或“包含”(以及任何形式的包含,例如“包含”和“含有”)是包括或开放式的,并且不排除额外的、未列举的要素或方法步骤。

[0035] 在本文讨论的任何实施方案中,术语“由……组成”或“基本上由……组成”可以替代术语“包括”。

[0036] 预期本文讨论的任何实施方案可以关于任何方法或组合物实施,反之亦然。此外,组合物和试剂盒可用于实现方法。

[0037] 贯穿本申请讨论了其他实施方案。关于一个方面讨论的任何实施方案也适用于其他方面,反之亦然。实施例部分中的实施方案应理解为适用于所有方面的实施方案。本发明的其他目的、特征和优点将从以下详细描述中变得明显。然而,应当理解,详细说明和具体实施例虽然表明了本发明的优选实施方案,但其仅以说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言从该详细描述将变得显而易见。。

附图说明

[0038] 下列附图构成本说明书的一部分,并被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一幅或多于一幅并结合本文所呈现的说明书实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0039] 图1A-1K.ELANE切割CD95以选择性杀伤癌细胞。(A):ELANE对癌细胞和健康细胞中存活、应激和凋亡途径影响的热图总结。定量结果参见图2。(B-C):用ELANE(100nM)处理癌细胞,并使用抗N-末端(B)或抗-C末端(C)抗体通过蛋白质印迹评估CD95切割。*,较低分子量的CD95片段。(D):转导癌细胞或非癌细胞以过度表达CD95蛋白,并且在30分钟时通过ANXA5定量对ELANE介导的凋亡的影响。n=2/组。转导和CD95过表达参见图1I。(E):通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色评估ELANE对重组人CD95 N-末端(aa 1-173)或C-末端(aa212-335)蛋白的切割。(F):来自(E)的条带用胰蛋白酶消化并通过质谱法分析以鉴定推定的ELANE切割位点(即具有非胰蛋白酶末端的肽)。主要的非胰蛋白酶肽通过离子色谱图定量。(G):CD95中ELANE切割位点的示意图。热图显示了2个CD95切割位点与ELANE序列特异性之间的重叠(位于URL web.expasy.org)。(H):通过质谱法监测ELANE对CD95中对应于aa 214-231和aa 317-335的重组肽的切割。(I):将癌细胞或非癌细胞用荧光素标记的ELANE处理10分钟,并通过免疫荧光使吸收可视化。(J):在存在和不存在Dynasore(60μM,一种内吞作用抑制剂)的情况下,暴露于ELANE 30分钟后癌细胞裂解物中的ELANE催化活性。Dynasore对

ELANE的癌细胞杀伤能力的影响(通过钙黄绿素-AM测量)。n＝6/组。(K):转导癌细胞或非癌细胞以过表达各种CD95蛋白,并且在没有ELANE的情况下的细胞活力由钙黄绿素-AM确定。n＝10/组。*,p<0.05学生t检验。

[0040] 图2A-2D过表达CD95蛋白促进ELANE杀伤癌细胞。制备多顺反子腺病毒载体以表达人和小鼠CD95序列,然后是脑心肌炎病毒(EMCV)内部核糖体进入位点和在巨细胞病毒(CMV)启动子控制的dTomato序列。转导人和鼠类癌细胞或非癌细胞以过表达全长CD95、N-末端CD95(人:aa 1-209;小鼠:aa 1-204)或C-末端CD95(人:aa 212-335;鼠标:aa 204-327)。(A):通过dTomato定量的转导效率(左)。dTomato-和dTomato+细胞中的CD95水平通过几何平均值(MFI)定量(中)。用ELANE(40nM)处理30分钟后dTomato-和dTomato+细胞中的ANXA5水平(右)。显示了A549细胞的代表性数据。(B-C):癌细胞和非癌细胞的转导效率(B)和相对CD95过表达(C)的定量。(D):小鼠癌细胞系(E0771,B16F10)在ELANE处理(40nM,30分钟)后ANXA5水平的定量。*,p<0.05学生t检验。

[0041] 图3C1-2肽的功效。C1-2表达对癌细胞和非癌细胞中存活、应激和凋亡途径影响的热图。

[0042] 图4诱导表达系统。强力霉素诱导型Tet-on系统表达C(aa.157-335)或C1-2(aa.221-331)的方案。添加强力霉素后的C1-2(含有DD的片段)(体外和体内)。

[0043] 图5A-5C C1-2表达和癌细胞选择性杀伤的确认。(A)Tet-on C或C1-2转导的MDA-MB-231细胞用2μg/mL强力霉素(2μg/mL)处理24小时。收集细胞裂解物以用于蛋白质印迹。确认C或C1-2表达的表达。(B)Tet-onC或C1-2转导的MDA-MB-231细胞用0.2或2μg/mL强力霉素处理72小时。通过钙黄绿素AM测量细胞活力。表达C1-2而不是C导致MDA-MB-231细胞死亡。(C)Tet-on C1-2转导的MCF10A细胞用2μg/mL强力霉素处理。通过钙黄绿素AM在不同时间点测量细胞活力。在MCF10A细胞中表达C1-2不会导致细胞死亡。

[0044] 图6A-6C C1-2诱导后体外测试MDA-MB-231细胞死亡。(A)Tet-on C1-2转导的MDA-MB-231细胞的各种单集落用2μg/mL强力霉素(2μg/mL)处理72小时。通过钙黄绿素AM测量细胞活力。不同的集落对C1-2诱导后的死亡易感性不同。(B)强力霉素处理后Tet-on C1-2转导的MDA-MB-231细胞的各种单集落的C1-2表达通过蛋白质印迹法(C)测量,24小时时的水平与死亡百分比相关(相对于全长标准化)。C1-2表达与MDA-MB-231细胞死亡相关。(C)各种集落的C1-2和全长(FL)CD95表达的免疫印迹。

[0045] 图7A-7C C1-2诱导后的体内测试MDA-MB-231肿瘤消退。(A)肿瘤重量。(B)肿瘤细胞(百万)计数(post-ficoll梯度)。(C)通过流式细胞术测量肿瘤(小鼠CD45+)中的免疫细胞百分比。

具体实施方式

[0046] ELANE切割CD95以释放选择性杀伤多种癌细胞的蛋白水解片段。这些结果与之前的工作(Chen等人,Nature,2010;Hadji等人,Cell Rep.,2014;Peter等人,Cell Death Differ.,2015)相结合,强调了CD95对癌细胞活力的关键选择性重要性。从治疗的角度来看,将CD95片段递送至肿瘤可能会克服保护机制并通过具有广泛治疗窗口的基因型独立机制杀伤癌细胞。CD95降解(CD95片段的产生)已被鉴定为ELANE杀伤癌细胞的作用机制,并进一步表明广泛的蛋白酶可以模拟ELANE的CD95降解和癌细胞杀伤特性。本发明的方面部分

地基于以下观察。用α-1-抗胰蛋白酶或PMSF(两种不可逆的非竞争性ELANE抑制剂)处理ELANE或中性粒细胞条件培养基可保护癌细胞免于凋亡。ELANE降解纯化CD95的C-末端结构域。重要的是,这种切割模式不同于MMP7产生的切割模式,MMP7先前显示切割CD95的胞外N-末端结构域,从而保护癌细胞免受FASL介导的凋亡(Strand等人,Oncogene,2004)。

[0047] 某些实施方案涉及包括抗癌肽或其变体、编码其的表达载体或表达盒的各种组合的治疗性或抗癌组合物。在某些方面肽组合物可以包括一种或多于一种肽,所述肽包含、基本上组成为、或组成为:氨基酸序列

SPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQD

TAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNF

RNEIQSLV (SEQ ID NO:2),或区段

AINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQL

LRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQSLV

(SEQ ID NO:3),和/或

SPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQD

TAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNF

RNEI (SEQ ID NO:4)和/或

AINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQL

LRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEI (SEQ

ID NO:5)。某些实施方案涉及一种或多于一种肽或其变体,其具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的超过5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或124个连续氨基酸(包括其间的所有值和范围)具有90、92、94、96、98、99至100%的同一性,包括其间所有值和范围,。抗癌肽的功能区段可以从SEQ ID NO:2的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118或119位氨基酸开始并且终止于5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123或

124位。在某些方面,可以通过氨基酸侧链的化学修饰(例如,交联、糖基化等)或通过在肽的氨基或羧基末端包括异源肽序列来修饰本文所述的抗癌肽。

[0048] I.多肽组合物和制剂

[0049] 在某些实施方案中,多肽和肽包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的多肽及其功能区段。“多肽”是指包含通过肽键或修饰的肽键连接的氨基酸的任何肽或蛋白质。“多肽”可以包括短链多肽,包括肽、寡肽或寡聚体,以及长链多肽,包括蛋白质。多肽可能含有20个基因编码氨基酸以外的氨基酸。“多肽”包括通过天然过程,例如翻译后加工,或通过化学修饰或本领域众所周知的其他合成技术修饰的氨基酸序列。修饰可以发生在多肽的任何地方,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基末端或羧基末端。应当理解,相同类型的修饰可以相同或不同程度存在于给定多肽的几个位点处。此外,给定的多肽可能包含多种类型的修饰。修饰包括末端融合(N-和/或C-末端)、乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒酰化、硫酸化、转移RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加,例如精氨酸化,和泛素化。

[0050] 可以将多种可检测的标记附着到多肽及其变体上。对于用于细胞外检测和细胞内检测的流式细胞仪应用,常用的荧光团可以是异硫氰酸荧光素(FITC)、别藻蓝蛋白(APC)、R-藻红蛋白(PE)、芹菜素叶绿素蛋白(PerCP)、德克萨斯红、Cy3、Cy5荧光共振能量串联荧光团,如PerCPCy5.5、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red和APC-Cy7。其他荧光团尤其包括Alexa Fluor® 350、Alexa Fluor® 488、Alexa 25 Fluor® 532、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 568、Alexa Fluor® 594、Alexa Fluor® 647(单克隆抗体标记试剂盒,购自Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR,USA)、BODIPY染料,例如BODIPY 493/503、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY 530/550、BODIPY TMR、BODIPY 558/568、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、级联蓝(Cascade Blue)、级联黄(Cascade Yellow)、丹磺酰氯(Dansyl)、丽丝胺罗丹明B、海洋蓝、俄勒冈绿488、俄勒冈绿514、太平洋蓝、罗丹明6G、罗丹明绿、罗丹明红、四甲基罗丹明、德克萨斯红(可获自Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR,USA和Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7。对于使用标记的抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、加帽抗生物素蛋白(captavidin)或中性抗生物素蛋白(neutravidin)的二次检测,用生物素标记多肽可能是有用的。多肽可以用放射性同位素标记,例如^{33}P、^{32}P、^{35}S、^{3}H和^{125}I。作为另一实例,当多肽可用于靶向放射疗法时,标记可以是^{3}H、^{228}Th、^{227}Ac、^{225}Ac、^{223}Ra、^{213}Bi、^{212}Pb、^{212}Bi、^{211}At、^{203}Pb、^{194}Os、^{188}Re、^{186}Re、^{153}Sm、^{149}Tb、^{131}I、^{125}I、^{111}In、^{105}Rh、^{99}mTc、^{97}Ru、^{90}Y、^{90}Sr、^{88}Y、^{72}Se、^{67}Cu或^{47}Sc。

[0051] 术语“分离的”可以指基本上不含其原始来源的细胞材料、细菌材料、病毒材料或培养基(当通过重组DNA技术产生时)、或化学前体或其他化学物质(当化学合成时)的核酸或多肽。此外,分离的多肽是指可以作为分离的多肽施用给对象的多肽;换句话说,如果多肽黏附在色谱柱上或包埋在凝胶中,则不能简单地将其视为“分离的”。此外,“分离的核酸

片段”或“分离的肽”是并非天然作为片段存在和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白片段。

[0052] 术语“氨基酸”或“残基”应理解为表示含有氨基(NH_2)、羧酸基(COOH)和各种侧基中的任一种的化合物,其具有基本式$NH_2CHRCOOH$,并通过肽键连接在一起形成蛋白质。氨基酸可以是例如酸性、碱性、芳族、极性或衍生化的。非标准氨基酸可以称为“非规范”氨基酸。氨基酸以α性和L-形式天然存在,但是,也可以制备β式和D-形式的氨基酸。

[0053] 通常使用单字母缩写系统来确定通常掺入天然存在的肽和蛋白中的二十种“规范”氨基酸残基,这些名称在本领域中是众所周知的。这样的单字母缩写在含义上可以与三字母缩写的或非缩写的氨基酸名称完全互换。规范氨基酸及其三字母和单字母代码包括丙氨酸(Ala)A、谷氨酰胺(Gln)Q、亮氨酸(Leu)L、丝氨酸(Ser)S、精氨酸(Arg)R、谷氨酸(Glu)E、赖氨酸(Lys)K、苏氨酸(Thr)T、天冬酰胺(Asn)N、甘氨酸(Gly)G、蛋氨酸(Met)M、色氨酸(Trp)W、天冬氨酸(Asp)D、组氨酸(His)H、苯丙氨酸(Phe)F、酪氨酸(Tyr)Y、半胱氨酸(Cys)C、异亮氨酸(Ile)I、脯氨酸(Pro)P和缬氨酸(Val)V。

[0054] 一些实施方案还包括本文所述多肽的变体。所公开的多肽的变体可以通过在多肽序列内进行氨基酸添加或插入、氨基酸缺失、氨基酸置换和/或氨基酸残基的化学衍生来产生。本领域技术人员可以根据本文提供的用于增加稳定性、同时保持或增强多肽效力的指导,确定所需的氨基酸置换(无论是保守的还是非保守的)。在一些实施方案中,保守氨基酸置换可涵盖非天然存在的氨基酸残基,其通常通过化学肽合成而不是通过生物系统合成引入。

[0055] 保守修饰可产生的肽具有与进行此类修饰的肽相似的功能、物理和化学特性。相较而言,可以通过选择在氨基酸序列中的置换来实现肽的功能和/或化学特性的实质性修饰,在该置换在维持(a)置换区域中分子骨架的结构,例如,作为α螺旋构象,(b)分子在靶位点的电荷或疏水性,或(c)分子的大小方面有明显不同作用。例如,“保守氨基酸置换”可以涉及用非天然残基置换天然氨基酸残基,从而对该位置上氨基酸残基的极性或电荷几乎没有影响。

[0056] 重组DNA和/或RNA介导的蛋白表达和蛋白工程技术或制备肽的任何其他方法,可用于制备本文公开的多肽或在靶细胞或组织中表达本文公开的多肽。术语“重组”应理解为是指材料(例如,核酸或多肽)已通过人为干预人工地或合成地(即,非天然地)改变。可以在材料的自然环境或自然状态内进行改变或从其自然环境或自然状态移除。例如,“重组核酸”是通过例如在克隆、DNA改组或其他众所周知的分子生物学过程中对核酸进行重组而制成的。这种分子生物学方法的实例可见于Maniatis等人,Molecular Cloning.A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,1982。“重组DNA分子”由通过这种分子生物学技术连接在一起的DNA片段组成。如本文所用,术语“重组蛋白质”或“重组多肽”是指使用重组DNA分子表达的蛋白质分子。“重组宿主细胞”是含有和/或表达重组核酸的细胞。

[0057] 可以根据本领域技术人员已知的方法在转化的宿主细胞中制备多肽。简而言之,制备编码该肽的重组DNA分子或构建体。制备这种DNA分子的方法是本领域众所周知的。例如,可以使用合适的限制性内切酶从DNA中切除编码肽的序列。大量可用的和众所周知的宿主细胞中的任何一种都可以用于各种实施方案的实践中。特定宿主的选择取决于许多因

素,包括例如与所选表达载体的相容性、由DNA分子编码的多肽的毒性、转化率、多肽回收的难易程度、表达特性、生物安全性和成本等。意识到并非所有宿主对特定DNA序列的表达可具有等同的效果,应在这些因素之间取得平衡。在这些通用指南中,培养中可用的微生物宿主细胞包括细菌(例如大肠杆菌)、酵母(例如糖酵母)和其他真菌细胞、昆虫细胞、植物细胞、哺乳动物(包括人)细胞,例如CHO细胞和HEK293细胞。也可以在DNA水平上进行修饰。可以将编码肽的DNA序列改变为与所选宿主细胞更相容的密码子。对于大肠杆菌,优化的密码子是本领域已知的。可以替换密码子以消除限制位点或包括沉默的限制性内切位点,这可以帮助在选定的宿主细胞中加工DNA。接下来,培养并纯化转化的宿主。可以在常规发酵条件下培养宿主细胞,从而表达所需的多肽。另外,所述DNA任选地还在融合蛋白的5'至编码区编码可操作地连接至表达的多肽的信号肽序列(例如,分泌信号肽)。

[0058] 也可以通过合成方法制备多肽。固相合成可以用作制备单个多肽的技术,因为它是制备小肽类的最具成本效益的方法。例如,众所周知的固相合成技术包括使用保护基、接头和固相支持物,以及特定的保护和脱保护反应条件,接头切割条件,清除剂的使用以及固相肽合成的其他方面。合适的技术是本领域众所周知的。参见,例如,Merrifield,Chem.Polypeptides,Katsoyannis and Panayotis eds.,pp.335-361,1973;Merrifield,J.Am.Chem.Soc.85:2149,1963;Davis等人,Biochem.Intl.10:394-414,1985;Stewart and Young,Solid Phase Peptide Synthesis,1969;U.S.Patent 3,941,763;Finn等人,The Proteins,3rd ed.,2:105-253,1976;and Erickson等人,The Proteins,3rd ed.,2:257-527,1976;"Protecting Groups in Organic Synthesis,"3rd ed.,T.W.Greene and P.G.M.Wuts,Eds.,John Wiley&Sons,Inc.,1999;NovaBiochem Catalog,2000;"Synthetic Peptides,A User's Guide,"G.A.Grant,Ed.,W.H.Freeman&Company,New York,N.Y.,1992;"Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial&Solid Phase Organic Chemistry,"W.D.Bennet,J.W.Christensen,L.K.Hamaker,M.L.Peterson,M.R.Rhodes,and H.H.Saneii,Eds.,Advanced Chemtech,1998;"Principles of Peptide Synthesis,2nd ed.,"M.Bodanszky,Ed.,Springer-Verlag,1993;"The Practice of Peptide Synthesis,2nd ed.,"M.Bodanszky and A.Bodanszky,Eds.,Springer-Verlag,1994;"Protecting Groups,"P.J.Kocienski,Ed.,Georg Thieme Verlag,Stuttgart,Germany,1994;"Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,A Practical Approach,"W.C.Chan and P.D.White,Eds.,Oxford Press,2000;G.B.Fields等人,Synthetic Peptides:A User's Guide,77-183,1990。

[0059] 包含直接或间接通过接头部分共价连接、附着或结合至另一肽的多肽、载体(例如载剂)或半衰期延长部分的组合物是"缀合物"或"缀合"分子,无论是通过化学方法(例如,翻译后或合成后)还是通过重组融合而缀合。多肽的缀合可以通过多肽的N端和/或C端进行,或者可以在肽的一级氨基酸序列的中间进行。由于多肽对癌细胞的特异性,该多肽可以与其他细胞毒性部分偶联,以促进向癌细胞的特异性递送并增强本文所述的多肽的细胞毒性。接头可用于产生融合蛋白,其允许引入额外的部分以增强多肽的杀伤或定位。感兴趣的特定部分可包括化学治疗剂、促凋亡因子、靶向治疗剂(例如激酶抑制剂等)或促进杀伤的其他试剂。

[0060] 在一些实施方案中,将1个、2个、3个或4个多肽偶联或包封在相同或不同的递送载

体中,例如载剂(例如,颗粒)或脂质体。在一些实施方案中,一种或多于一种多肽与载体的偶联包括一种或多于一种共价和/或非共价相互作用。在一个实施方案中,载体是金属或聚合物颗粒。在一个实施方案中,载体是脂质体。颗粒的尺寸可以是微米级或纳米级的。在一些方面,颗粒的直径为至少、至多或约0.1μm至至少、至多或约10μm。在另一方面,颗粒的平均直径为至少、至多或约0.3μm至至少、至多或约5μm,0.5μm至至少、至多或约3μm,或0.2μm至至少、至多或约2μm。在一些方面,颗粒的平均直径可为至少、至多或约0.1μm,或至少、至多或约0.2μm,或至少、至多或约0.3μm,或至少、至多或约0.4μm,或至少、至多或约0.5μm,或至少、至多或约1.0μm,或至少、至多或约1.5μm,或至少、至多或约2.0μm,或至少、至多或约2.5μm,或至少、至多或约3.0μm,或至少、至多或约3.5μm,或至少、至多或约4.0μm,或至少至多包括约4.5μm,或至少、至多或约5.0μm,包括其间的所有值和范围。

[0061] 在一些实施方案中,选择载体的电荷(例如,正、负、中性)以赋予特定于应用的益处(例如,生理相容性、有益的表面-肽相互作用等)。在一些实施方案中,载体具有净中性电荷或净负电荷(例如,以减少与通常带有净负电荷的细胞表面的非特异性结合)。在一些情况下,载体与多个多肽偶联并且可以具有暴露于表面的某些多肽的2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个……20个……50个……100个或多于100个拷贝或多肽的组合。在一些实施方案中,载体展示单一类型的多肽。在一些实施方案中,载体在表面上展示多种不同的多肽。

[0062] 如本文所用,术语“包装”、“包封”和“包裹”是指多肽在脂质体或类似载体中的引入或与其结合。多肽可以与脂质双层结合或存在于脂质体的水性内部中,或两者。

[0063] 脂质体可以由标准的形成囊泡的脂质形成,所述脂质通常包括中性和带负电荷的磷脂和固醇,例如胆固醇。通常通过考虑例如脂质体的大小和血流中脂质体的稳定性来指导脂质的选择。使用各种类型的脂质来产生脂质体。例如,发现有用的两亲脂质是两性离子、酸性脂质或阳离子脂质。两性离子两亲脂质的实例是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂等。酸性两亲脂质的实例是磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸等。阳离子两亲脂质的实例是二酰基三甲基铵丙烷、二酰基二甲基铵丙烷、硬脂胺等。中性脂质的实例包括甘油二酯,例如甘油二油酸酯、甘油一油酸二棕榈油酸酯和混合的辛酸-癸酸甘油酯;甘油三酯,例如甘油三油酸酯、甘油一油酸三棕榈酸酯、甘油三亚油酸酯、甘油三辛酸酯和甘油三月桂酸酯;及其组合。另外,在一些实施方案中,胆固醇或植物固醇用于例如制备多囊脂质体。

[0064] 可使用多种方法制备脂质体,如例如Szoka等人,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467(1980),美国专利4235871、4501728和4837028所述,其全部内容通过引用并入本文。一种方法产生非均一大小的多层囊泡。在该方法中,将形成囊泡的脂质溶解在合适的有机溶剂或溶剂体系中,并在真空或惰性气体下干燥以形成薄的脂质膜。或者,可以将脂质溶解在合适的溶剂例如叔丁醇中,然后冻干以形成更均质的脂质混合物,其呈更容易水合的粉末状形式。将该膜或粉末用缓冲水溶液覆盖,并通常在搅拌下在15分钟至60分钟内使其水合。通过在更剧烈的搅拌条件下使脂质水合或通过添加增溶剂如脱氧胆酸盐,可以使所得多层囊泡的尺寸分布向较小的尺寸移动。

[0065] 多层脂质体例如通过搅拌分散体而形成,优选通过使用薄膜蒸发器设备或通过摇动或涡旋混合来形成。通过对脂质固相的水分散体施加剪切力,例如通过超声处理或使用

微流化设备例如均化器或弗氏压碎器施加剪切力,来形成单层囊泡。剪切力还可以通过注射、冻融、从脂质中透析洗涤剂溶液或其他已知的用于制备脂质体的方法来施加。脂质体的大小可以使用多种已知技术来控制,包括控制剪切力的持续时间。

[0066] “单层脂质体”也称为“单层囊泡”,是包括一个脂质双层膜的球形囊泡,该双层膜限定了单个封闭的水性隔室。双层膜包括两层脂质(或“脂单层(leaflet)”),即内层和外层。脂质分子的外层的亲水性头部朝向外部水性环境,疏水性尾部朝内指向脂质体内部。脂质的内层直接位于外层的下方,脂质的头部朝向脂质体的水性内部,而尾部朝向脂质的外层的尾部。

[0067] “多层脂质体”也称为“多层囊泡”或“多个层状囊泡”,包括多于一个的脂质双层膜,该膜限定了一个以上的封闭水性隔室。膜同心排列,以使不同的膜被水性隔室隔开,就像洋葱一样。

[0068] II.药物制剂和施用

[0069] 实施方案涉及组合物,其包含1、2、3、4或多于4种抗癌肽或其变体或功能区段,以及以下中的一种或多于一种:药学上可接受的稀释剂;载剂;增溶剂;乳化剂;和/或防腐剂。这样的组合物可以包含有效量的至少一种抗癌剂或复合物。因此,还包括本文所述的一种或多于一种抗癌剂在制备药物组合物中的用途。这样的组合物可以用于治疗多种癌症。

[0070] 可以将抗癌剂配制成各种剂型的治疗组合物,各种剂型例如但不限于液体溶液或混悬剂、片剂、丸剂、散剂、栓剂、聚合物微胶囊或微囊泡、脂质体和可注射或可输注溶液。优选的剂型取决于施用方式和所针对的特定疾病。所述组合物还优选包含本领域众所周知的药学上可接受的载体、载剂或佐剂。

[0071] 用于药物制剂的可接受的制剂组分在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。除了提供的抗癌剂外,组合物还可包含用于修饰、维持或保持组合物的例如pH、渗透压、黏度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶出或释放率、吸附或渗透的组分。用于配制药物组合物的合适物质包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗菌剂;抗氧化剂(例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(例如乙酸盐、硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);填充剂(例如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(例如,咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其他糖类(例如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐的抗衡离子(例如钠);防腐剂(例如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(例如甘露醇或山梨糖醇);助悬剂;表面活性剂或湿润剂(例如普朗尼克类、PEG、山梨聚糖酯、聚山梨酯,如聚山梨酯20、聚山梨酯80、曲通、三甲胺、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊);稳定性增强剂(如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(例如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾、甘露醇、山梨糖醇);递送载剂;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。(参见Remington’s Pharmaceutical Sciences,第18版,(A.R.Gennaro编),1990,Mack Publishing Company),其通过引用并入本文。

[0072] 制剂组分以施用部位可接受的浓度存在。缓冲剂有利地用于将组合物维持在生理pH或稍低的pH,通常维持在至少、至多或约4.0至至少、至多或约8.5的pH范围,或替代地,维

持在至少、至多、或约5.0至8.0的pH范围,包括其间的所有值和范围。药物组合物可包含至少、至多或约pH 6.5至8.5(包括其间的所有值和范围)的TRIS缓冲液,或至少、至多或约pH 4.0至5.5(包括其间的所有值和范围)的乙酸盐缓冲液,还可以包含山梨糖醇或其合适的替代物。

[0073] 用于体内施用的药物组合物通常是无菌的。可以通过无菌滤膜过滤来实现灭菌。如果将组合物冻干,则可以在冻干和重构之前或之后进行灭菌。肠胃外施用的组合物可以冻干形式或溶液形式储存。在一些实施方案中,肠胃外组合物被置于具有无菌进入口的容器中,例如,具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶,或准备用于注射的无菌预填充注射器。

[0074] 上述组合物可以使用常规的递送方式施用,包括但不限于静脉内施用、腹膜内施用、经口施用、淋巴管内施用、皮下施用、动脉内施用、肌内施用、胸膜内施用、鞘内施用、以及通过局部导管灌注。还考虑了对所讨论的肿瘤的局部施用(例如,瘤内施用)。当通过注射施用组合物时,可以通过连续输注或通过单次或多次剂量施用。对于肠胃外施用,抗转移剂可以无热原的肠胃外可接受的水溶液形式施用,所述水溶液包含所需的在药学上可接受的载剂中的抗癌剂。用于肠胃外注射的特别合适的载剂是无菌蒸馏水,在无菌蒸馏水中将一种或多于一种抗癌剂配制为无菌等渗溶液,适当防腐。

[0075] 一旦配制了药物组合物,就可以将其以溶液、混悬剂、凝胶、乳剂、固体或脱水或冻干粉的形式储存在无菌小瓶中。这样的制剂可以即用形式或在施用前重构的(例如冻干)形式存储。

[0076] 如果需要,可以使用常规用于药物组合物中的稳定剂,例如蔗糖、海藻糖或甘氨酸。通常,这种稳定剂将以例如至少、至多、或约0.1重量/体积%至至少、至多、或约0.5重量/体积%的微小量添加。也可以常规量加入表面活性剂稳定剂,例如吐温®-20或吐温®-80(ICI Americas,Inc.,Bridgewater,N.J.,USA)。

[0077] 用于配制药物组合物的组分优选具有高纯度并且基本上不含潜在有害的污染物(例如,至少是国家食品(NF)级,通常至少是分析级,更通常至少是药物级)。此外,意在用于体内的组合物通常是无菌的。如果必须在使用前合成给定化合物,所得产物通常基本上不含任何潜在的毒性剂。肠胃外施用的组合物也是无菌的,基本上是等渗的,并在GMP条件下制备。

[0078] 对于本文所述的化合物(单独或作为药物组合物的一部分),这样的剂量为至少、至多或约0.001mg/kg至10mg/kg体重,优选至少、至多或约1至5mg/kg体重,最优选0.5至1mg/kg体重,包括其间的所有值和范围。

[0079] 治疗有效剂量可以通过本领域技术人员容易地确定,并且取决于疾病的严重程度和病程,患者的健康状况和对治疗的反应,患者的年龄、体重、身高、性别、既往病史和主治医师的判断。

[0080] 在一些方法中,癌细胞是肿瘤细胞。癌细胞可能在患者体内。患者可能患有实体瘤。在这种情况下,实施方案还可以包括对患者进行手术,例如切除全部或部分肿瘤。可以在手术之前、之后或同时将组合物施用于患者。在另外的实施方案中,还可以直接、通过内窥镜、气管内、肿瘤内、静脉内、病灶内、肌肉内、腹膜内、区域、经皮、局部、动脉内、膀胱内或皮下施用于患者。治疗组合物可施用1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、

12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次或多于20次;并且组合物可以每1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时施用,或每1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天施用或每1周、2周、3周、4周、5周施用,或每1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个月施用。

[0081] 该方法还可以包括向对象施用选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法(或其他靶向疗法)或基因疗法的第二癌症疗法。该方法还可以包括多于一次向对象施用1种、2种、3种、4种或全部5种多肽或其变体。在某些方面,第二癌症疗法可以是与本文所述的抗癌肽组合施用ELANE或类似蛋白酶。

[0082] 治疗癌症的方法还可以包括向患者施用化学疗法或放射疗法,其可以施用多于一次。化学疗法包括但不限于顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素D、柔红霉素、阿霉素、博莱霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、泰索帝、紫杉醇、跨铂、5-氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、吉西他滨、奥沙利铂、伊立替康、拓扑替康或其任何类似物或衍生变体。放射疗法包括但不限于X射线辐照、UV辐照、γ辐照、电子束辐照或微波。此外,作为方法的一部分,可以向细胞或患者施用微管稳定剂,包括但不限于紫杉烷。特别考虑,任何化合物或衍生物或类似物可以与这些联合疗法一起使用。

[0083] 在一些方面,可用于与本文描述的多肽组合的癌症疗法的其他治疗剂包括抗血管生成剂。许多抗血管生成剂已被鉴定并且是本领域已知的,包括例如TNP-470、血小板因子4、血小板应答蛋白-1、金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP1和TIMP2)、催乳素(16-Kd片段)、血管抑素(纤溶酶原的38-Kd片段)、内皮细胞抑制素、bFGF可溶性受体、转化生长因子β、干扰素α、可溶性KDR和FLT-1受体、胎盘增殖素相关蛋白、以及Carmeliet和Jain(2000)列出的那些。在一个实施方案中,抑制剂可以与VEGF拮抗剂或VEGF受体拮抗剂例如抗VEGF抗体、VEGF变体、可溶性VEGF受体片段、能够阻断VEGF或VEGFR的适体、中和抗VEGFR抗体、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂及其任何组合(例如,抗-hVEGF抗体A4.6.1、贝伐单抗或雷珠单抗)联合使用。

[0084] 可与本文所述疗法组合使用免疫疗法或生物反应调节剂疗法。这些疗法利用免疫系统抵抗疾病。免疫疗法可以帮助免疫系统识别癌细胞,或增强对癌细胞的应答。免疫疗法包括主动免疫疗法和被动免疫疗法。主动免疫疗法刺激机体自身的免疫系统,而被动免疫疗法通常使用在体外产生的免疫系统组分。

[0085] 主动免疫疗法的实例包括但不限于疫苗,包括癌症疫苗、肿瘤细胞疫苗(自体或同种异体)、病毒疫苗、树突状细胞疫苗、抗原疫苗、抗独特型疫苗、DNA疫苗、或具有白介素2(IL-2)的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疫苗、或淋巴因子激活杀伤(LAK)细胞疗法。

[0086] 被动免疫疗法的实例包括但不限于单克隆抗体和含有毒素的靶向疗法。单克隆抗体包括裸抗体和缀合抗体(也称为标签抗体、标记抗体或负载抗体)。裸单克隆抗体不具有结合的药物或放射性物质,而缀合的单克隆抗体则与例如化疗药物(化学标记)、放射性颗粒(放射性标记)或毒素(免疫毒素)结合。

[0087] 在一些实施方案中,被动免疫疗法例如裸单克隆抗体药物可以与本文所述的多肽组合物组合使用以治疗癌症。这些裸单克隆抗体药物的实例包括但不限于抗CD20抗原的抗体利妥昔单抗(Rittman),其用于治疗例如B细胞非霍奇金淋巴瘤;抗HER2蛋白的抗体曲妥

珠单抗(赫赛汀),其用于治疗例如晚期乳腺癌;抗CD52抗原的抗体阿仑单抗(坎帕斯),其用于治疗例如B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL);抗EGFR蛋白的抗体西妥昔单抗(爱必妥),其例如与伊立替康联合用于治疗例如晚期结直肠癌和头颈癌;作为抗血管生成疗法的贝伐单抗(阿瓦斯汀),其可对抗VEGF蛋白,并与例如化学疗法联合使用以治疗例如转移性结直肠癌。可以使用的治疗性抗体的其他实例包括但不限于:HERCEPTIN®(曲妥珠单抗)(Genentech,CA),其是用于治疗转移性乳腺癌患者的人源化抗HER2单克隆抗体;REOPRO®(阿昔单抗)(Centocor),其为血小板上的抗糖蛋白IIb/IIIa受体,用于防止血块形成;ZENAPAX®(达克珠单抗)(Roche Pharmaceuticals,Switzerland),其为免疫抑制性人源化抗CD25单克隆抗体,用于预防急性肾移植排斥反应;PANOREX™,其为鼠抗17-IA细胞表面抗原IgG2a抗体(Glaxo Wellcome/Centocor);BEC2,其为鼠抗独特型(GD3表位)IgG抗体(ImClone系统);IMC-C225,其为嵌合抗EGFR IgG抗体(ImClone系统);VITAXIN™,其为人源化抗-αVβ3整联蛋白抗体(Applied Molecular Evolution/MedImmune);Campath 1H/LDP-03,其为人源化抗CD52 IgG1抗体(Leukosite);SmartM195,其为人源化抗CD33 IgG抗体(蛋白设计实验室/Kanebo);RITUXAN™,其为嵌合的抗CD20 IgG1抗体(IDEC Pharm/Genentech,Roche/Zettyaku);LYMPHOCIDE™,其为人源化抗CD22 IgG抗体(Immunomedics);LYMPHOCIDE™ Y-90(Immunomedics);Lymphoscan(Tc-99m标记;放射成像;Immunomedics);Nuvion(针对CD3;Protein Design Labs);CM3,其为人源化抗ICAM3抗体(ICOS Pharm);IDEC-114,其为灵长源化的抗CD80抗体(IDEC Pharm/三菱);ZEVALIN™,其为放射性标记的鼠抗CD20抗体(IDEC/ScheringAG);IDEC-131,其为人源化抗CD40L抗体(IDEC/Eisai);IDEC-151,其为灵长源化的抗CD4抗体(IDEC);IDEC-152,其为灵长源化的抗CD23抗体(IDEC/Seikagaku);SMART抗CD3,其为人源化抗CD3 IgG(Protein Design Lab);5G1.1,其为人源化的抗补体因子5(C5)抗体(MexionPharm);D2E7,其为人源化抗TNF-a抗体(CAT/BASF);CDP870,其为人源化的抗TNF-化Fab片段(Celltech);IDEC-151,其为灵长源化的抗CD4 IgG1抗体(IDEC Pharm/Smith Kline Beecham);MDX-CD4,其为人抗CD4 IgG抗体(Medarex/Eisai/Genmab);CD20-链霉抗生物素蛋白(+生物素-钇90;NeoRx);CDP571,其为人源化抗TNF-αIgG4抗体(Celltech);LDP-02,其为人源化抗α4β7抗体(LeukoSite/Genentech);Orthodone OKT4A,其为人源化抗CD4 IgG抗体(Ortho Biotech);ANTOVA™,其为人源化抗CD40L IgG抗体(Biogen);ANTEGREN™,其为人源化抗VLA-4IgG抗体(Elan);和CAT-152,其为人抗TGF-β2抗体(Cambridge Ab Tech)。

[0088] 在一些实施方案中,被动免疫疗法,例如缀合的单克隆抗体,可以与本文所述的多肽组合物组合使用以治疗癌症。这些缀合的单克隆抗体的实例包括但不限于放射性标记的抗体替伊莫单抗(Zevalin),其直接向癌性B淋巴细胞传递放射性,用于治疗例如B细胞非霍奇金淋巴瘤;放射性标记的抗体托西莫单抗(Bexxar),其用于治疗例如一些类型的非霍奇金淋巴瘤;以及含有卡奇霉素的免疫毒素吉妥珠单抗奥佐米星(Mylotarg),其用于治疗例如急性骨髓性白血病(AML)。BL22是缀合的单克隆抗体,用于治疗例如毛细胞白血病,免疫毒素用于治疗例如白血病、淋巴瘤和脑瘤,以及放射性标记的抗体例如OncoScint例如用于结直肠癌和卵巢癌,ProstaScint例如用于前列腺癌。

[0089] 在一些实施方案中,可以将含有毒素的靶向疗法与本文所述的多肽组合物联合使用以治疗癌症。包含毒素的靶向疗法是毒素与生长因子连接,或在特定实施方案中与本文

所述的多肽连接,并且不包含抗体。

[0090] 一些实施方案还包括将辅助免疫疗法与本文所述的多肽组合物组合使用,这种辅助免疫疗法包括但不限于细胞因子,例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞炎性蛋白(MIP)-1-α、白介素(包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27)、肿瘤坏死因子(包括TNF-α)和干扰素(包括IFN-α、IFN-β和IFN-γ);氢氧化铝(明矾);Bacille Calmette-Guérin(BCG);钥孔血蓝蛋白(KLH);弗氏不完全佐剂(IFA);QS-21;DETOX;左旋咪唑;二硝基苯吩(DNP)及其组合,例如白介素(例如IL-2)与其他细胞因子例如IFN-α的组合。

[0091] 一些实施方案还包括将激素疗法(抗激素剂)与本文所述的多肽组合物组合使用。抗激素剂包括但不限于起到调节或抑制激素作用于肿瘤的作用的药物,例如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、凯奥昔芬、LY117018、奥那斯酮和FARESTON托瑞米芬;调节肾上腺雌激素产生的抑制芳香化酶的芳香化酶抑制剂,例如4(5)-咪唑、氨基戊二酰亚胺、MEGASE®孕甾醇乙酸酯、AROMASIN®依西美坦、福美坦、法倔唑、RIVISOR®伏氯唑、FEMARA®来曲唑和ARIMIDEX®阿那曲唑;和抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制涉及细胞增殖的信号传导途径中的基因表达的寡核苷酸,例如PKC-α、Ralf和H-Ras;核酶,例如VEGF表达抑制剂(例如ANGIOZYME®核酶)和HER2表达抑制剂;疫苗,例如基因治疗疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;PROLEUKIN®Ril-2;LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂;ABARELIX®rmRH;以及任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0092] 在一些实施方案中,施用本文所述组合物的癌症可以是膀胱癌、血癌、骨癌、骨髓癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、胃肠癌、头癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、舌癌或子宫细胞癌。

[0093] III.表达和表达载体

[0094] 可以将编码本文所述的任何多肽(例如抗癌肽)的核酸插入任何合适的表达系统中或与其一起使用。重组表达可以使用载体例如质粒、病毒等完成。载体可以包含可操作地连接到编码一种或多于一种多肽的核酸的启动子。载体还可以包含转录和翻译所需的其他元件。如本文所用,载体是指含有外源DNA的任何载体。因此,载体是将外源核酸转运到细胞中而不发生降解的物质,并且包含在其被递送到的细胞中产生核酸表达的启动子。载体包括但不限于质粒、病毒核酸、病毒、噬菌体核酸、噬菌体、黏粒和人工染色体。可以产生适合携带、编码和/或表达编码蛋白酶的核酸的多种原核和真核表达载体。这样的表达载体包括例如pET、pET3d、pCR2.1、pBAD、pUC和酵母载体。载体可以例如在多种体内和体外情况下使用。载体可以是基因治疗载体,例如腺病毒载体、慢病毒载体或CRISP-R载体。

[0095] 表达盒、表达载体以及该表达盒或表达载体中的序列可以是异源的。如本文所用,当术语“异源”用于表达盒、表达载体、调节序列、启动子或核酸时,是指已经通过一定方式进行过操作的表达盒、表达载体、调节序列或核酸。例如,异源启动子可以是非天然地与待表达的核酸连接的启动子,或者是已经通过细胞转化程序引入细胞的启动子。异源核酸或

启动子还包括天然存在于生物体中但已经以一定方式产生改变(例如,置于不同的染色体位置、突变、以多拷贝添加、与非天然启动子或增强子序列连接等)的核酸或启动子。异源核酸可包含包括cDNA的序列。例如,当异源编码区与包含调控元件例如启动子的核苷酸序列连接,其中未发现该启动子与编码区天然结合时,或者当异源编码区与自然界中未发现的染色体部分结合时(例如,在基因座中表达的基因,其中编码区所编码的蛋白未正常表达),可以将异源编码区与内源编码区区分开。类似地,异源启动子可以是连接到编码区的启动子,其中不存在该启动子与该编码区的天然连接。

[0096] 可以使用的病毒载体包括与慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、AIDS病毒、神经营养性病毒、辛德毕斯和其他病毒有关的那些载体。同样有用的是任何具有这些病毒特性的病毒家族,这些特性使它们也适合用作载体。可以使用的逆转录病毒载体包括Verma,I.M.,Retroviral vectors for gene transfer.In Microbiology-1985,American Society for Microbiology,pp.229-232,Washington,(1985)中描述的那些。例如,这样的逆转录病毒载体可以包括马洛尼鼠科白血病病毒、MMLV和表达所需特性的其他逆转录病毒。通常,病毒载体包含非结构早期基因、结构晚期基因、RNA聚合酶III转录物、复制和衣壳化所必需的反向末端重复序列、以及控制病毒基因组转录和复制的启动子。当病毒工程化为载体时,通常去除一个或多于一个早期基因,并且将基因或基因/启动子盒插入病毒基因组代替去除的病毒核酸。

[0097] 表达盒和/或表达载体中可以包括多种调控元件,包括启动子、增强子、翻译起始序列、转录终止序列和其他元件。“启动子”通常是当转录起始位点处于相对固定的位置时起作用的一个或多个DNA序列。例如,启动子可以在编码蛋白酶的核酸区段的上游。“启动子”包含RNA聚合酶和转录因子的基本相互作用所需的核心元件,并且可以包含上游元件和响应元件。“增强子”通常是指在距转录起始位点不固定距离处起作用的DNA序列,“增强子”可以在转录单元的5’或3’。此外,增强子可以在内含子内以及在编码序列本身内。它们通常长度为10个至300个核苷酸,并且以顺式起作用。增强子的功能是增强附近启动子的转录。像启动子一样,增强子也通常包含介导转录调控的反应元件。增强子通常决定表达的调节。

[0098] 真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或有核细胞)中使用的表达载体也可以包含终止转录所必需的序列,该序列可能影响mRNA的表达。这些区域在编码组织因子蛋白的mRNA的非翻译部分被转录为聚腺苷酸化区段。3’非翻译区还包含转录终止位点。优选地,转录单元还包含聚腺苷酸化区域。该区域的一个优点是,其增加了转录的单元像mRNA一样被加工和运输的可能性。已很好地建立了表达构建体中多腺苷酸化信号的鉴定和使用。优选在表达构建体中使用同源的聚腺苷酸化信号。

[0099] 来自表达盒或表达载体的一种或多于一种蛋白酶的表达可以由能够在原核细胞或真核细胞中表达的任何启动子控制。可以使用的原核启动子的实例包括但不限于SP6、T7、T5、tac、bla、trp、gal、lac或麦芽糖启动子。可以使用的真核启动子的实例包括但不限于组成型启动子,例如病毒启动子,例如CMV、SV40和RSV启动子,以及可调节启动子,例如诱导型启动子或抑制性启动子,例如tet启动子、hsp70启动子和受CRE调控的合成启动子。用于细菌表达的载体包括pGEX-5X-3,而用于真核表达的载体包括pCIneo-CMV。

[0100] 表达盒或载体可包含编码标记产物的核酸序列。该标记产物用于确定基因是否已经被递送至细胞,以及是否在递送后就被表达。优选的标记基因是编码β-半乳糖苷酶的大

肠杆菌lacZ基因和绿色荧光蛋白。在一些实施方案中,标记可以是选择性标记。当这些选择性标记成功地转移到宿主细胞中时,如果置于选择压力下,转化的宿主细胞可以存活。有两种广泛使用的不同类别的选择方案。第一类是基于细胞的新陈代谢和突变细胞系的使用,该突变细胞系缺乏独立于补充培养基进行生长的能力。第二类是显性选择,其是指在任何细胞类型中使用的选择方案,并且不需要使用突变细胞系。这些方案通常使用药物来阻止宿主细胞的生长。具有新基因的那些细胞将表达传递抗药性的蛋白,并在选择中存活下来。这种显性选择的实例使用药物新霉素(Southern P.and Berg,P.,J.Molec.Appl.Genet.1:327(1982))、霉酚酸(Mulligan,R.C.and Berg,P.Science209:1422(1980))或潮霉素(Sugden,B.等人,Mol.Cell.Biol.5:410-413(1985))。

[0101] 基因转移可以通过以下方式获得:使用包括但不限于质粒、病毒载体、病毒核酸、噬菌体核酸、噬菌体、黏粒和人工染色体中的遗传物质的直接转移,或者通过转移细胞或载体例如阳离子脂质体或病毒中的遗传物质。这样的方法在本领域中是众所周知的,并且容易适用于本文所述的方法。转移载体可以是用于将基因递送到细胞(例如质粒)中的任何核苷酸构建体,或者是作为递送基因的一般策略的一部分,例如作为重组逆转录病毒或腺病毒的一部分(Ram等人,Cancer Res.53:83-88,(1993))。用于转染的合适手段包括病毒载体、化学转染子或物理机械方法,例如电穿孔和DNA的直接扩散,例如Wolff等人,Science,247,1465-1468,(1990);和Wolff,Nature,352,815-818,(1991)所描述的。

[0102] 例如,可以通过任何方法将核酸分子、编码蛋白酶的表达盒和/或载体引入细胞,所述方法包括但不限于钙介导的转化、电穿孔、显微注射、脂质转染、粒子轰击等。可以在培养物中扩增细胞,然后将其施用于对象,例如哺乳动物,例如人。所施用的细胞的量或数量可以变化,但是可以使用约10^6个至约10^9个细胞的量。细胞通常在生理溶液如盐水或缓冲盐水中递送。细胞也可以在诸如脂质体、外泌体或微囊泡的载体中递送。

[0103] 可由产生含有该蛋白酶的外泌体或微囊泡的转基因细胞产生蛋白酶。外泌体和微囊泡介导蛋白、脂质、mRNA和微小RNA中的多种的分泌,与邻近细胞相互作用,从而可以在细胞之间传递信号、蛋白、脂质和核酸(参见,例如Shen等人,J Biol Chem.286(16):14383-14395(2011);Hu等人,Frontiers in Genetics 3(April 2012);Pegtel等人,Proc.Nat'l Acad Sci 107(14):6328-6333(2010);WO/2013/084000;其中每一个通过引用完整地并入本文)。

[0104] 因此,可以将具有表达一种或多于一种蛋白酶的异源表达盒或表达载体的转基因细胞施用给对象,并且由转基因细胞产生的外泌体将蛋白酶递送至对象的肿瘤和/或癌细胞。

[0105] 根据以上内容,本公开涉及产生在基因工程和基因治疗中常规使用的载体特别是质粒、黏粒、病毒和噬菌体的方法,该载体包含编码本文定义的蛋白酶的多肽序列的核酸分子。在一些情况下,载体是表达载体和/或基因转移或靶向载体。衍生自病毒如逆转录病毒、牛痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可用于将所述的多核苷酸或载体递送至靶细胞群中。可以使用本领域技术人员众所周知的方法来构建重组载体。或者,可以将所述的核酸分子和载体重构到脂质体中以递送至靶细胞。可以通过众所周知的方法将含有本公开内容的核酸分子的载体转移到宿主细胞中,所述方法根据细胞宿主的类型而变化。

[0106] 本发明的另一方面涉及包含抗癌肽构建体的基因治疗载体。基因治疗载体是本领域已知的,包括但不限于慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、质粒等。本发明的基因治疗载体的构建可以通过本领域已知的方法进行。在一些方面,基因治疗载体可以为约、至多或至少10个、100个、1000个、1×10^4个、1×10^5个、1×10^6个、1×10^7个、1×10^8个、1×10^9个、1×10^{10}个、1×10^{11}个、1×10^{12}个病毒颗粒(VP)或集落形成单位(CFU)的量(包括其间的所有值和范围)施用。

[0107] 作为基因治疗载体的实例,表达盒可以包含在慢病毒载体中。治疗载体可以体外转导到细胞中,并将细胞递送给患者。同样,可以将本发明的治疗载体直接递送给患者。

[0108] IV.实施例

[0109] 包括以下实施例以及附图以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,实施例或附图中公开的技术代表了发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以被认为构成其实践的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开内容应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变并且仍然获得相似或类似的结果。

[0110] 实施例1

[0111] 中性粒细胞弹性蛋白酶切割CD95以广泛安全地杀伤癌细胞

[0112] A.结果

[0113] 人中性粒细胞释放选择性杀伤癌细胞的因子。人外周多形核中性粒细胞(PMN)在体内的半衰期很短(约8小时),并且会迅速发生凋亡以在细胞外释放具有有效抗微生物特性的因子(Dancey等人,J Clin Invest.,1976;Nathan等人,Nat Rev Immunol.,2006)。为了确定凋亡中性粒细胞是否也释放杀伤癌细胞的因子,用无血清培养基处理35种不同的人/鼠癌细胞,该培养基由循环至凋亡的纯化PMN(PMN培养基)调理。PMN培养基在24小时内有效杀伤所有测试的癌细胞系。与此形成鲜明对比的是,PMN培养基没有杀伤所测试的6种人/鼠正常细胞或非癌细胞中的任何一种。来自健康对象的网膜中性粒细胞(ON)的条件培养基也选择性地杀伤癌细胞。然而,来自各种来源和激活状态的鼠中性粒细胞缺乏这种癌细胞杀伤能力。

[0114] 通过在胎牛、鼠或人血清中培养癌细胞来抑制PMN培养基的癌细胞杀伤能力。然而,如果在无血清条件下暴露于PMN培养基5分钟后递送血清,则血清不能挽救癌细胞,这表明血清含有直接拮抗PMN培养基中的一种或多于一种抗癌因子的抑制剂(见下文))。PMN培养基对无血清条件的依赖,可以解释为什么之前在血清存在下进行的研究表明,人类中性粒细胞需要细胞间接触来杀伤癌细胞(Yan等,Oncoimmunology,2014)。

[0115] 为了开始理解PMN培养基杀伤癌细胞的机制,代表性研究集中于具有不同突变谱的三种癌症类型:黑色素瘤(MEL888,B16F10)、肺癌(A549,LLC1)和三阴性乳腺癌(MDA-MB-231,E0771)。发现PMN培养基通过诱导细胞凋亡杀伤所有这些癌细胞。

[0116] 进行研究以确定PMN培养基是否可以在体内诱导癌细胞凋亡。在同系模型(E0771、LLC1、B16F10)和三阴性乳腺癌的PDX模型(TNBC,4195)中向小鼠注射各种癌细胞,以产生约$100mm^3$大小的肿瘤。由于血清在体外拮抗PMN培养基的癌症杀伤能力,因此PMN培养基是通过肿瘤内(IT)递送的。肿瘤每天注射人血清白蛋白(HSA)或PMN培养基,每天一次,持续5天,并通过TUNEL、切割的PARP(cPARP)和切割的CASP3(cCASP3)的染色来检查细胞凋亡。在每个

测试模型中,PMN培养基减弱肿瘤生长并诱导癌细胞凋亡。在同系模型中的作用不是由于将人类蛋白质注射到具有免疫能力的小鼠中,而是因为使PMN培养基中的生物活性因子失活会阻止其抗肿瘤作用。相比之下,来自小鼠骨髓来源的中性粒细胞(BMDN)的培养基不能在体内减弱肿瘤发生,这与它们无法在体外杀伤癌细胞一致。与其在体外对正常细胞或非癌细胞没有毒性一致的是,将PMN培养基注射到无肿瘤C57BL/6小鼠的乳腺脂肪垫中(每天一次,持续5天)不会在注射部位诱导凋亡,也不会影响体重、脾脏重量或肝功能。

[0117] ELANE是由人PMN释放的主要抗癌蛋白。研究结果表明,PMN释放在体外和体内选择性地杀伤多种癌细胞的因子。为了鉴定负责的因子,开发了一种定量癌细胞杀伤试验来跟踪生物活性因子,并使用煮沸、透析和微量浓缩器(centricon)实验来证明寻找蛋白质的合理性。接下来,进行研究以纯化负责的蛋白质。PMN培养基通过0.22μm过滤器澄清,准备用于分级分离。令人惊讶的是,该步骤消除了来自2个独立供体的PMN培养基的癌症杀伤活性,而不会降低总蛋白水平,这表明生物活性蛋白的选择性消耗。

[0118] 鸟枪蛋白质组学分析在PMN培养基中鉴定了890种蛋白质(≥2肽,FDR<1%),其中在两个供体中只有2种通过过滤显著被降低(G检验,$p<0.05$,Bonferroni校正):弹性蛋白酶(ELANE)和嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)。ELANE是一种丝氨酸蛋白酶,之前的研究表明它会促进肿瘤发生(Houghton等人,Nat Med.,2010),而ECP是一种对癌细胞和健康细胞都有毒的成孔蛋白(Young等人,Nature,1986)。

[0119] 使用两种方法来确定ELANE和/或ECP是否负责PMN培养基的选择性癌症杀伤活性。首先,ELANE或ECP从PMN培养基中免疫耗尽,并发现耗尽任何一种蛋白质都会减弱PMN培养基杀伤MDA-MB-231细胞的能力。其次,用纯化的ELANE或ECP处理癌细胞或正常细胞或非癌细胞,并监测细胞活力。ELANE以剂量依赖性方式杀伤MDA-MB-231细胞,这种作用是选择性的,因为它不会杀伤人单核细胞衍生的巨噬细胞(HMDM)。相比之下,ECP仅在对HMDM也有毒的剂量下杀伤MDA-MB-231细胞。

[0120] 接下来,MDA-MB-231细胞用存在于PMN培养基中的一定浓度的ELANE(0.25μg/mL)和ECP(0.05μg/mL)处理。尽管ECP的PMN培养基水平不能单独杀伤这些细胞,但它们显著增强了ELANE的选择性杀伤能力,表明这两种蛋白质之间存在协同作用。

[0121] 由于ELANE通过蛋白水解影响生物途径(Pham,Nat Rev Immunol.,2006),假设其抗癌功能可能需要催化活性,并且ECP可能增强该活性以支持协同杀伤。ELANE用PMSF或α-1-抗胰蛋白酶(A1AT)处理,通过显色底物活性测定来证实失活,并且发现催化失活的ELANE不再能杀伤癌细胞。PMSF或A1AT处理也消除了PMN培养基在体外和体内杀伤癌细胞的能力。这些结果表明ELANE是PMN培养基中的主要抗癌因子。事实上,来自9名健康供体的PMN培养基中的ELANE催化活性与其杀伤MDA-MB-231细胞的能力密切相关。

[0122] 通过ELANE了解人类中性粒细胞的抗癌功能也有助于解释为什么鼠中性粒细胞缺乏这种能力。尽管鼠ELANE会杀伤癌细胞并且鼠中性粒细胞含有在细胞内具有催化活性的ELANE并在细胞凋亡过程中释放ELANE,但这种释放的ELANE没有催化活性。

[0123] 进行研究以进一步确定ECP是否可以增强ELANE的催化活性。ELANE与增加浓度的ECP一起孵育,发现ECP作为ELANE的II型变构激活剂,其中ECP以高亲和力(K_D=17nM)结合ELANE,并将其催化转化率(k_{cat})增加约12倍。共免疫沉淀实验证实ECP与人类PMN培养基中的ELANE结合。这些结果可以解释为什么从PMN培养基中消耗ECP(也消耗ELANE)会减弱其杀

伤活性,即使ECP在存在于PMN培养基中的剂量下对癌细胞没有毒性。此外,由于ECP对生物膜具有高亲和力(Young等人,Nature,1986),这些发现可能有助于解释为什么通过0.22μm过滤器的过滤会选择性地耗尽PMN培养基中的ECP(以及相关联的ELANE)。展望未来,ELANE成为焦点,因为它在体外既有效又安全,并且可以通过提高ELANE的浓度来模拟ECP增强其催化活性的能力。事实上,较高剂量的ELANE(3μg/ml)在所有测试的癌细胞系中有效诱导凋亡,但对所有测试的正常细胞或非癌细胞没有毒性。

[0124] ELANE通过切割CD95选择性地杀伤癌细胞。ELANE如何选择性杀伤癌细胞?研究集中在CD95途径上,因为它对多种癌细胞的存活至关重要,但对于正常细胞或非癌细胞的存活在很大程度上是可有可无的(Chen等人,Nature,2010),独特的性质反映了ELANE的广泛抗癌和低毒特征。此外,CD95功能可以通过蛋白水解进行调节(Strand等人,Oncogene,2004)。先前的研究表明,使用shRNA降低癌细胞中的CD95激活了强大的杀伤程序,该程序的特征在于抑制存活途径,并诱导DNA损伤、线粒体ROS(MT ROS)和凋亡效应物(Chen等人,Nature,2010;Hadji,等人,Cell Rep,2014)。相比之下,这种杀伤程序在Cd95-/-正常细胞或非癌细胞中没有被诱导。因此假设ELANE通过涉及CD95切割的机制杀伤癌细胞。为了开始检验这一假设,进行研究以调查ELANE是否可以模拟由癌细胞中CD95敲低引起的独特杀伤程序(Chen等人,Nature,2010)。ELANE治疗(i)抑制至少一种存活途径(ERK、NFκB或JNK的磷酸化(p)),(ii)诱导DNA损伤(γH2AX),(iii)增加MT ROS,以及(iv)激活测试的所有6种癌细胞系中的促凋亡途径(cCASP3和cPARP)(图1a)。与其对正常细胞或非癌细胞没有毒性一致的是,ELANE并未在所有测试的正常细胞或非癌细胞中诱导该程序(图1a)。

[0125] 鉴于ELANE模拟在CD95无效癌细胞(CD95 null cancer cells)中观察到的杀伤程序,确定ELANE是否可以切割癌细胞中的CD95,如果是,则确定这是否导致CD95的损失。癌细胞用ELANE处理,在细胞死亡前不久观察到较低分子量的CD95条带(图1b-1c)。尽管ELANE在所有测试的癌细胞中切割CD95,但这种切割不会导致全长CD95的丢失,这表明ELANE对CD95的切割可能通过功能获得而不是功能丧失过程杀伤癌细胞。与这种解释一致的是,在癌细胞中过表达人CD95(hCD95)或小鼠CD95(mCD95)并不能防止ELANE介导的杀伤,而是加速了杀伤(图1d,图2)。

[0126] 为了鉴定hCD95中的ELANE切割位点,对应于hCD95的N-末端(SEQ ID NO:1的aa.1-173)或C-末端(SEQ ID NO:1的aa.212-335)结构域的重组蛋白hCD95与ELANE一起孵育。结果显示ELANE优先切割C-末端结构域(图1e),质谱分析鉴定出两个主要切割位点——位点1:V^{220}和A^{221}之间,位点2:I^{321}和Q^{332}之间,导致蛋白水解释放CD95的死亡结构域(DD)(图1f)。这两个位点都很好地映射到ELANE的序列特异性,并且利用合成肽的研究证实了这些发现(图1g-1h)。

[0127] 因为CD95是质膜蛋白并且其C-末端结构域是细胞内的,所以推断其抗癌功能应该需要ELANE内化。事实上,癌细胞迅速内化了荧光素标记的ELANE,而内化的ELANE保留了其催化活性(图1i-1j)。内吞作用抑制剂Dynasore治疗减弱了ELANE摄取并保护癌细胞免于凋亡(图1j)。Dynasore还保护癌细胞免受PMN培养基介导的杀伤。此外,过表达包含两个切割位点(SEQ ID NO:1的aa.212-335)的CD95的C-末端结构域加速了人类和鼠癌细胞中ELANE介导的杀伤,同时,过表达N-末端结构域(SEQ ID NO:1的aa 1-209)没有影响(图1d,图2)。这些结果表明ELANE切割释放的C-末端CD95蛋白水解片段可能足以诱导癌细胞凋亡。

[0128] 为了进一步测试这种可能性,模拟ELANE在位点1(SEQ ID NO:1的aa.221-335)和/或位点2(SEQ ID NO:1的aa.212-331)处切割的C-末端hCD95蛋白过表达,并发现在没有ELANE的情况下表达这些蛋白质中的任一种都诱导癌细胞死亡(图1k)。与此形成鲜明对比的是,在来自健康对象的MCF10A细胞或人网膜脂肪组织成纤维细胞中过表达这些相同的C-末端hCD95蛋白不会诱导毒性(图1k)。因此,虽然正常细胞或非癌细胞内化ELANE,并且内化的ELANE具有催化活性,但CD95蛋白水解片段对它们没有毒性(图1a、1d、1i、1k)。这些发现加强了这种杀伤机制对癌细胞的特异性。

[0129] IT递送的ELANE减弱肿瘤发生。已经显示ELANE在体外选择性地杀伤癌细胞,研究了IT递送的ELANE是否可以减缓体内肿瘤进展。为了建立治疗条件,将不同剂量的ELANE注射到E0771 TNBC模型中,发现12μg/天可提供可重复的良好治疗效果。经证实,用PMSF使ELANE失活消除了这种治疗益处,并且PMSF-ELANE不会产生不期望的恶化。最后,结果表明,将ELANE(12μg/天)注射到非荷瘤C57BL6小鼠的乳腺脂肪垫中不会产生明显的副作用。

[0130] 接下来,在TNBC、肺癌和黑色素瘤模型中探索了ELANE的治疗潜力。对无胸腺裸鼠注射MDA-MB-231、A549或MEL888细胞(异种移植模型);具有M1或4195肿瘤的SCID小鼠(TNBC PDX模型)和具有E0771、LLC1或B16F10细胞的C57BL/6小鼠(同系模型),以产生约100mm^{3}大小的肿瘤。此时,IT注射PMSF-ELANE或ELANE(12μg/天)并监测对肿瘤生长的影响。

[0131] ELANE在所有测试模型中减弱了肿瘤生长。免疫组织化学显示,在所有ELANE治疗的肿瘤中,TUNEL、cPARP和cCASP3的染色增加,表明ELANE在体内诱导癌细胞凋亡。与此形成鲜明对比的是,当ELANE注射到无肿瘤的C57BL/6小鼠中时,没有发现凋亡的证据。这些发现与体外机制工作一致,表明ELANE的抗肿瘤作用既靶向又安全。

[0132] 为了探索癌细胞是否可以获得对ELANE的抗性,使用了体外和体内方法的组合。MDA-MB-231细胞在体外重复暴露于ELANE(7次暴露以产生约90%的死亡/暴露)未赋予抗性。同样,在体内用ELANE反复治疗E0771或MEL888肿瘤(每天一次,持续7天),并没有减弱ELANE离体杀伤分离的癌细胞的能力。这些发现表明,对ELANE产生抗性可能具有挑战性,这类似于先前在CD95敲低癌细胞中报道的情况(Murmann等人,Oncotarget,2017)。

[0133] IT递送的ELANE诱导CD8+T细胞攻击远处肿瘤。ELANE的抗癌功能对其催化活性的依赖,以及血液中丝氨酸蛋白酶抑制剂的丰度限制了其向IT途径的治疗传递,并成为进入转移部位的障碍。如果ELANE对原发肿瘤的作用可以诱导/激活免疫细胞攻击远处肿瘤(这一特性被称为远位效应(Ngwa等人,Rev Cancer,2018)),那么这个障碍就可以被克服。

[0134] 为了测试这种可能性,进行了研究以检查ELANE是否可以增加肿瘤免疫细胞。在测试的所有三种免疫活性模型中,ELANE增加了树突状细胞(DC)、$CD8^+$T细胞和$CD8^+$T效应细胞($CD8^+T_{eff}$)的数量。如果将ELANE注射到无肿瘤小鼠的乳腺脂肪垫中,则未观察到免疫细胞增加,如果将ELANE注射到荷瘤小鼠的对侧部位(即肿瘤对面),则未观察到免疫细胞增加,在那里它未能减弱肿瘤发生。因此,ELANE增加了肿瘤中的先天性和适应性免疫细胞,这种作用不是由于对人ELANE的免疫应答导致的。

[0135] 进行研究以确定用ELANE治疗原发性肿瘤是否产生免疫应答以减少远处部位的肿瘤发生。E0771细胞注射到左侧(1°肿瘤)和右侧(2°肿瘤)乳腺脂肪垫中以产生基因相同的肿瘤。用ELANE治疗1°肿瘤(12μg/天,持续5天)减弱了两个部位的肿瘤发生,这种效果是特异性的,因为用ELANE治疗1° E0071肿瘤不会影响2° B16F10肿瘤的肿瘤发生,并且不是由

于ELANE满溢。为了在另一个模型中测试这一点,在胁腹产生1° B16F10肿瘤并将B16F10细胞注入尾静脉以产生2°肺转移瘤。用ELANE(12μg/天,持续5天)治疗1°肿瘤降低了肺转移的数量。重要的是,消耗CD8+T细胞减弱了ELANE在两种模型中的远位效应。

[0136] 值得注意的是,ELANE疗法在所有测试的免疫活性模型中约40%的肿瘤中产生了“坑(crater)”。在无肿瘤小鼠中未观察到坑,在任何免疫功能低下的癌症模型中也未观察到它们,包括CD8-T细胞耗尽的C57BL/6小鼠。这些数据表明,ELANE介导的癌细胞杀伤和随后的适应性免疫应答相结合,在肿瘤中形成了“坑”。然而,坑形成的潜在机制及其对治疗功效的重要性需要进一步研究。

[0137] 肽的体外和体内表达。图3说明C1-2表达对癌症(例如MDA-MB-231、MEL888和A549)和非癌细胞(MCF10A和成纤维细胞)中的存活、应激和凋亡途径的影响。图4说明强力霉素诱导型Tet-on系统表达C(aa.157-335)或C1-2(aa.221-331)的方案。添加强力霉素后的C1-2(含有DD的片段)(体外和体内)。C1-2表达可以选择性杀伤癌细胞(图5A-5C)。体外测试证实了C1-2在MDA-MB-231细胞中诱导细胞死亡(图6A-6C)。体内测试证明C1-2诱导的MDA-MB-231肿瘤消退(图7A-7C)。

[0138] B.方法

[0139] 监管.人体研究已获得芝加哥大学机构审查委员会的批准(IRB16-0321)。动物研究得到芝加哥大学机构动物护理和使用委员会的批准(ACUP72209,72504)。癌细胞系和病毒研究得到了机构生物安全委员会的批准(IBC1503)。

[0140] 细胞系。卵巢癌细胞系-CAOV3、OVCAR3、OVCAR4、OVCAR5、A2780、A2780/CP70、HeyA8、TykNu、SKOV3、ID8和ID8p53-/-由芝加哥大学Ernst Lengyel博士惠赠。乳腺癌细胞系-MDA-MB-231、MDA-MB-231.BM1、MCF-7、M6C、E0771和E0771.LMB由芝加哥大学Marsha Rosner博士惠赠。结肠癌细胞系RKO、成胶质细胞瘤癌细胞系T98G、骨肉瘤细胞系U-2OS和Saos-2以及肝细胞癌细胞系HepG2由芝加哥大学Kay McLeod博士惠赠。肺癌细胞系NCI-H552由芝加哥大学Stephanie Huang博士惠赠,A549和LLC1细胞购自ATTC。黑色素瘤细胞系-B16F10、Mel888、Mell106和SK-MEL-28细胞由芝加哥大学Thomas Gajewski博士惠赠。胰腺癌细胞系PANC1由芝加哥大学Yamuna Krishnan博士惠赠。白血病细胞系K562由芝加哥大学Amittha Wickrema博士惠赠。细胞在含有10%热灭活FBS(Gemini Bio Products)和1%青霉素/链霉素(Gibco)的Dubecco改良Eagles培养基(DMEM;HyClone)中培养。

[0141] 前列腺癌细胞系-CWR22Rv1、LAPC4和LNCaP由芝加哥大学Donald Vander Griend博士惠赠。成神经胶质瘤细胞系-SK-N-BE(2)和NBL-WN细胞由芝加哥大学Lucy Godley博士惠赠。细胞在含有10%热灭活FBS(Gemini Bio Products)和1%青霉素/链霉素(Gibco)的RPMI 1640培养基(Hyclone)中培养。

[0142] 乳腺上皮细胞系MCF10A由芝加哥大学Marsha Rosner博士惠赠。细胞在含有10%热灭活FBS(Gemini Bio Products)、20ng/mL EGF(Peprotech)、0.5mg/ml氢化可的松(Sigma)、100ng/mL霍乱毒素(Sigma)、10μg/mL胰岛素(Sigma)、1%青霉素/链霉素(Gibco)。

[0143] 原代人血衍生细胞。经芝加哥大学机构审查委员会(IRB16-0321)批准并在获得书面同意后,从健康志愿者捐赠人外周血。将血液收集到EDTA涂布的收集管(BD Vacutainer)中,并用Ficoll Paque Plus(GE Healthcare)分离细胞以获得血沉棕黄层(含有单核细胞和淋巴细胞)和底层(含有中性粒细胞和红细胞)。人外周血中性粒细胞(PMN)——如前所述

(Kuhns等人,Curr Protoc Immunol.,2015),通过重复RBC切割从底层纯化PMN。HMDM-使用CD14微珠(MiltenylBiotec)从血沉棕黄层纯化单核细胞,并使用人类M-CSF(125ng/mL,R&D Systems)分化为HMDM,如前所述(Kratz等人,Cell Metab.,2014)。人淋巴细胞——通过收集来自CD14和CD16微珠(Miltenyi Biotec)的流,来从血沉棕黄层中分离出人淋巴细胞。由此产生的细胞群受到约90%T细胞和约10%B细胞的损害。

[0144] 原代人网膜脂肪衍生细胞。人类网膜脂肪组织是经芝加哥大学机构审查委员会批准并获得书面同意后从健康志愿者那里获得的。人网膜中性粒细胞(ON)——用1型胶原酶(Worthington,1mg/mL)在37℃下以130rpm振荡75分钟消化网膜组织,以获得基质血管细胞(SVC)。根据制造商的方案,使用CD16微珠(Miltenyi Biotec)从SVC中分离ON。人网膜成纤维细胞-人原代成纤维细胞分离自网膜脂肪组织,并在含有20%热灭活FBS(Gemini Bio Products)和1%青霉素/链霉素(Gibco)的DMEM(HyClone)中培养,如前所述(Kenny at al.,Int J Cancer,2007)。

[0145] 原代小鼠细胞。除非另有说明,否则从6-8周大的C57BL/6小鼠中分离细胞。鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)——利用L细胞条件培养基从骨髓干细胞分化BMDM,如前所述(Kratz等人,Cell Metab.,2014)。小鼠脾细胞——如前所述分离小鼠脾细胞(Reardon等人,Cell Rep,2018)。所得细胞由约5%中性粒细胞、约2%单核细胞、约38% T细胞、约53% B细胞组成。小鼠原代角质形成细胞——分离小鼠原代角质形成细胞,并在含有15%热灭活FBS和1%青霉素/链霉素的E低钙黄绿素培养基中培养,如前所述(Wu等人,Cell,2008)。小鼠骨髓来源的中性粒细胞(BMDN)——BMDN使用Histopaque 1119(Sigma)和Histopaque10771(Sigma)密度梯度离心法纯化,如前所述(Swamydas等人,Curr Protoc Immunol.,2015)。对于PMA激活,BMDN用PMA(100nM,Abcam)处理15分钟,洗涤并培养以收集条件培养基。鼠巯基乙酸盐诱发的腹腔中性粒细胞(PN)——注射4%巯基乙酸盐(3mL/小鼠,Sigma)后7小时从腹腔中分离PN,如前所述(Swamydas等人,Curr Protoc Immunol.,2015)。鼠肿瘤相关中性粒细胞(TAN)——将E0771细胞注射到C57BL/6小鼠的乳腺脂肪垫中。当肿瘤体积达到约500mm^3时,用4型胶原酶(Worthington,3mg/mL)和透明质酸酶(Sigma,1.5mg/mL)在37℃下以200rpm振荡消化肿瘤45分钟。根据制造商的方案,使用Ly6G微珠(Miltenyi Biotec)纯化TAN。鼠肺中性粒细胞(LN)——从8-9周(转移性传播之前的时间点)大的MMTV-PyMT小鼠中分离鼠LN。肺用Liberase TL(Roche,200μg/mL)和DNase I(Sigma,0.1mg/mL)消化,如前所述(Swamydas等人,Curr Protoc Immunol.,2015)。根据制造商的方案,用Ly6G微珠(Miltenyi Biotec)纯化鼠类LN。

[0146] 中性粒细胞培养基集合。将新鲜分离的人或鼠中性粒细胞接种在无血清DMEM中24小时。收集条件培养基,以500xg旋转5分钟,并用Bradford测定法(Biorad)确定培养基蛋白质水平。

[0147] PMN培养基操作。对于煮沸,将PMN培养基在95℃下煮沸5分钟,然后以15000x g旋转10分钟以去除沉淀的蛋白质。对于透析,将PMN培养基放入Slide-a-Lyzer™盒(3.5kDa截断值,ThermoFisher Scientific)中,并在4℃下对2x4L PBS透析4小时。对于PMSF灭活,PMN培养基用PMSF(1mM,Sigma)或A1AT(42nM,Athens Research&Technology)处理,并在室温下孵育至多2小时。使用PD-10脱盐柱(GE Healthcare Life)去除残留的PMSF。使用显色底物活性测定(见下文)证实了对ELANE催化活性的抑制。对于血清加标实验,在暴露癌细胞之前

或之后,将人、小鼠或胎牛血清(1%或10%)添加到PMN培养基中。对于免疫耗竭研究,使用与Pierce™蛋白A/G磁珠(ThermoFisher Scientific)偶联的抗ELANE(N2C3,GeneTx)或抗ECP(MBS2535165,MyBioSource)对ELANE或ECP进行免疫沉淀。

[0148] 体外细胞活力测定。将癌细胞或正常细胞或非癌细胞接种在完全生长培养基中并生长至80-90%汇合。细胞用无血清DMEM洗涤,用各种治疗剂(例如PMN培养基、ELANE等)处理4-24小时,并使用几种方法评估细胞活力:钙黄绿素-AM测定。处理后4-24小时,将细胞与钙黄绿素-AM(ThermoFisher Scientific,4ng/mL)一起孵育,用无血清DMEM洗涤,并使用Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader(Biotek)在495nm/516nm处测量荧光。CASP3活性测定-使用Caspase-Glo®3/7测定系统(Promega)在处理后6小时测量细胞相关的CASP3活性。使用Victor X3光度计(PerkinElmer)测量发光。ANXA5染色-处理后30分钟-6小时,根据制造商的方案,使用FITC Annexin V凋亡检测试剂盒(BD Pharmingen™)对细胞进行染色。使用FACSCanto™II流式细胞仪(BD Pharmingen™)分析样品。

[0149] 蛋白质印迹分析。用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Sigma)的1% SDS切割细胞,并用BCA蛋白质测定试剂盒(Pierce)定量蛋白质。蛋白质(10-20μg)根据目标蛋白质在10%、12.5%、15%或20%SDS-PAGE凝胶上分离,转移到PVDF膜(Millipore),用在0.1% TBS/Tween-20中的5%BSA(Sigma)溶液在室温下封闭2小时,用一抗和二抗染色,并使用ECL检测试剂盒(Biorad)和LI-COR成像仪可视化。抗体——针对pERK(4370)、ERK(4695)、pNFκB(3033)、NFκB(8242)、pJNK(4668)、JNK(9252)、CASP3(9662)、PARP(9542)、H2AX(2595)、TUBB(2125)的抗体来自Cell Signaling Technology。针对γH2AX(05-636-I,Millipore)、ELANE(68672,Abcam)、N-末端CD95(3070R,BioVision)和C-末端CD95(60196,Proteintech)的抗体。

[0150] 线粒体ROS测量。细胞用不同剂量的ELANE处理30分钟,洗涤,用CM-H2DCFDA染料(ThermoFisher Scientific,10μM)在37℃下标记30分钟,并通过流式细胞术定量荧光。

[0151] CD95过表达研究。制备多顺反子腺病毒载体以表达人和小鼠CD95序列,然后是脑心肌炎病毒(EMCV)内部核糖体进入位点和受巨细胞病毒(CMV)启动子(VectorBuilder)控制的dTomato序列。转导人和鼠癌细胞或正常细胞或非癌细胞以过表达全长CD95、N-末端CD95(人:aa 1-209;小鼠:aa 1-204)、C-末端CD95(人:aa 212-335;小鼠:aa 204-327),或模拟ELANE在位点1(人:aa 221-335)、位点2(人:aa 212-331)或两个位点(aa 221-331)切割的C-末端CD95。根据细胞类型,用腺病毒以50-250的MOI转导癌细胞或正常细胞或非癌细胞,并通过流式细胞术确认dTomato和CD95(人类:558814;小鼠、小鼠:565130,BD Biosciences)的表达。使用编码GFP(Vector Builders)的载体作为对照。

[0152] ELANE活性测定。根据制造商的方案,使用显色底物N-甲氧基琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Val对硝基苯胺(Sigma,100μg/mL)测量催化活性。使用accuSkan GO UV/Vis微孔板分光光度计(ThermoFisher Scientific)在405nm处测量吸光度。对于失活,将ELANE与PMSF(1mM,Sigma)或A1AT(42nM,Athens Research&Technology)一起孵育2小时。使用PD-10脱盐柱(GE Healthcare Life)消除残留的PMSF。为了监测ECP对ELANE活性的影响,将ELANE(10nM)与各种底物浓度(0-1.7mM)的不同剂量的ECP(0-180nM)一起孵育。

[0153] 重组小鼠ELANE激活。根据制造商的方案(R&D Systems),用CTSC(50μg/mL)激活重组小鼠ELANE(50μg/mL)。

[0154] 鸟枪蛋白质组学分析。使来自2个独立供体的PMN培养基通过0.22μm过滤器(MilliporeSigma)。前和后过滤培养基(50μg)用胰蛋白酶消化。

[0155] 通过质谱法鉴定CD95中的ELANE切割位点。重组人C-末端CD95(aa212-335,MyBioSource,10μg)或重组N-末端CD95(aa 1-173,ThermoFisher Scientific,10μg)用人ELANE(0.1μg)在37℃消化2小时,用SDS-PAGE上样缓冲液终止反应。蛋白质在20% SDS-PAGE凝胶上运行,用考马斯蓝(ThermoFisher Scientific)染色,并切下条带用于质谱分析。从切除的条带中提取蛋白质。

[0156] 通过质谱法分析重组肽。将与人CD95(ThermoFisher Scientific)的aa214-(TLNPETVAINLSDVDLSK)-231(SEQ ID NO:6)或317-(DITSDSENSNFRNEIQSLV)-335(SEQ ID NO:7)对应的重组肽(10μM)与ELANE(0.1-0.2μM)在37℃下孵育15-30分钟。用0.1%甲酸终止反应。

[0157] 肿瘤接种和治疗。将MDA-MB-231细胞($2x10^6$)、具有3型Matrix的A549细胞($2x10^6$)或MEL888细胞($2x10^6$)注射到无胸腺裸鼠(Charles River)中;将M1或4195细胞(50000)注射到NOD.SCID小鼠(JAX)中;将E0771细胞($0.5x10^6$)、LLC1细胞($0.5x10^6$)或B16F10细胞($1x10^6$)注射到C57BL/6小鼠(JAX)中。对于TNBC模型(MDA-MB-231、E0771、M1、4195),将细胞注射到右腹侧的第4乳腺脂肪垫中。对于所有其他模型(A549、LLC1、MEL888、B16F10),将细胞注射到胁腹。一旦肿瘤达到约$100mm^3$,鞘内(IT)递送ELANE或PMSF-ELANE(11.6μg/100μL),或中性粒细胞培养基或HSA(50μg/100μL),每天一次,持续5天。用卡尺评估肿瘤体积,当对照小鼠中的肿瘤体积达到>$1000mm^3$时终止实验。

[0158] 肿瘤免疫组织化学。将肿瘤在PBS中的4%多聚甲醛中固定24小时,包埋在石蜡块中,并切片(5μm)。载玻片用来自Cell Signaling Technology的cCASP3(9661)和cPARP(9625)抗体染色。使用VECTASTAIN ABC试剂盒(Vector Laboratories)或荧光标记的二抗(黑色素瘤模型)显示信号。对于TUNEL分析,使用DeadEnd™比色或荧光TUNEL系统(Promega)进行染色。细胞核用苏木精或Hoechst 33342(ThermoFisher Scientific)标记。图像使用Nikon Eclipse Ti2显微镜获得,并使用NIS-Elements软件进行分析。

[0159] 肿瘤免疫细胞分析。用4型胶原酶(Worthington,3mg/mL)和透明质酸酶(Sigma,1.5mg/mL)在37℃下以200rpm振荡消化肿瘤45分钟(E0771)或30分钟(LLC1和B16F10)。细胞用各种抗体标记并通过流式细胞术进行分析。数据由FlowJo v.10.4.1定量。抗体包括:来自ThermoFisher Scientific的CD45(47-0451)、CD11b(25-0112)、MHCII(11-5321)、CD4(17-0041)、CD8(12-0081)、CD44(25-0441),来自BD Biosciences的CD3(560527)、CD62L(561917),和来自BioLegend的Ly6G(127614)。

[0160] 远位效应研究。对于E0771模型,将$0.5x10^6$个细胞注射到C57BL/6小鼠右腹侧(1°肿瘤)的第4乳腺脂肪垫,将$0.4x10^6$个细胞注射到C57BL/6小鼠左腹侧(2°肿瘤)的第4乳腺脂肪垫。一旦1°肿瘤达到约$100mm^3$,将ELANE或PMSF-ELANE(11.6μg/100μL)IT注射到1°肿瘤中,每天一次,持续5天,并通过卡尺测量1°和2°肿瘤体积。对于B16F10模型,将$0.5x10^6$个细胞注射到胁腹(1°肿瘤)中。7天后,将$0.2x10^6$个细胞注入侧尾静脉以产生2°肺转移瘤。一旦1°肿瘤达到约$100mm^3$,将ELANE或PMSF-ELANE(11.6μg/100μL)IT注射到1°肿瘤中,每天一次,持续5天,并通过卡尺测量1°肿瘤体积。在最后一次ELANE治疗后10天切除肺,并计数2°肺转移瘤。对于$CD8^+$T细胞耗竭,在第一次ELANE治疗前3天静脉(IV)注射抗小鼠CD8α(克隆

2.43,Bio X细胞)或大鼠IgG2b(同种型对照,Bio X细胞)(200μg/注射),并且在最后一次ELANE治疗后每周进行一次。$CD8^+$T细胞耗竭通过流式细胞术确认。

[0161] 对于“满溢控制”,将$0.5x10^6$个E0771细胞注射到左腹侧(2°肿瘤)的第4乳腺脂肪垫中。将ELANE或PMSF-ELANE(11.6μg/100μL)注射到右腹侧垫的无瘤第4乳腺脂肪垫,每天一次,连续5天,用卡尺测量2°肿瘤体积。

[0162] 对于“特异性对照”,将$0.5x10^6$个E0771细胞注射到右腹侧(1°肿瘤)的第4乳腺脂肪垫中,7天后,将$1x10^6$个B16F10细胞注射到胁腹(2°肿瘤)。一旦1°肿瘤达到约100mm^3,将ELANE或PMSF-ELANE(11.6μg/100μL)注射到1°肿瘤中,每天一次,持续5天,并通过卡尺测量1°和2°肿瘤体积。

[0163] 潜在副作用的评估。ELANE或PMSF-ELANE(11.6μg/100μL)注射到无瘤C57BL/6小鼠右腹侧垫的第4乳腺脂肪垫中,每天一次,持续5天。最后一次注射后一天,研究小鼠的潜在副作用。测量体重和脾重量。使用与上述肿瘤相同的方法,通过分离、固定和染色乳腺脂肪组织的TUNEL、cCASP3和cPARP来研究注射部位的凋亡。注射部位的乳腺脂肪组织免疫细胞群使用与上述肿瘤相同的方法通过流式细胞术确定。通过使用丙氨酸转氨酶比色活性测定试剂盒(Cayman Chemical)测量血浆ALT活性来评估肝功能。

[0164] 体内测试。向裸鼠模型的乳腺注射200万个Tet-on C1-2转导的MDA-MB-231细胞。一旦肿瘤达到约80到100mm^3,小鼠就会每5天接受强力霉素饮食或腹膜内注射强力霉素(50mg/ml)以诱导Tet-on系统。监测肿瘤生长。在强力霉素治疗后第21天分离和消化肿瘤,测量肿瘤重量,计数肿瘤细胞数,并通过流式细胞术测量CD45+细胞。

[0165] 统计。除蛋白质组学研究外,统计显著性是通过学生的双尾未配对t检验确定的。使用Prism v.7软件进行线性回归、Michaelis-Menten和双曲线拟合。

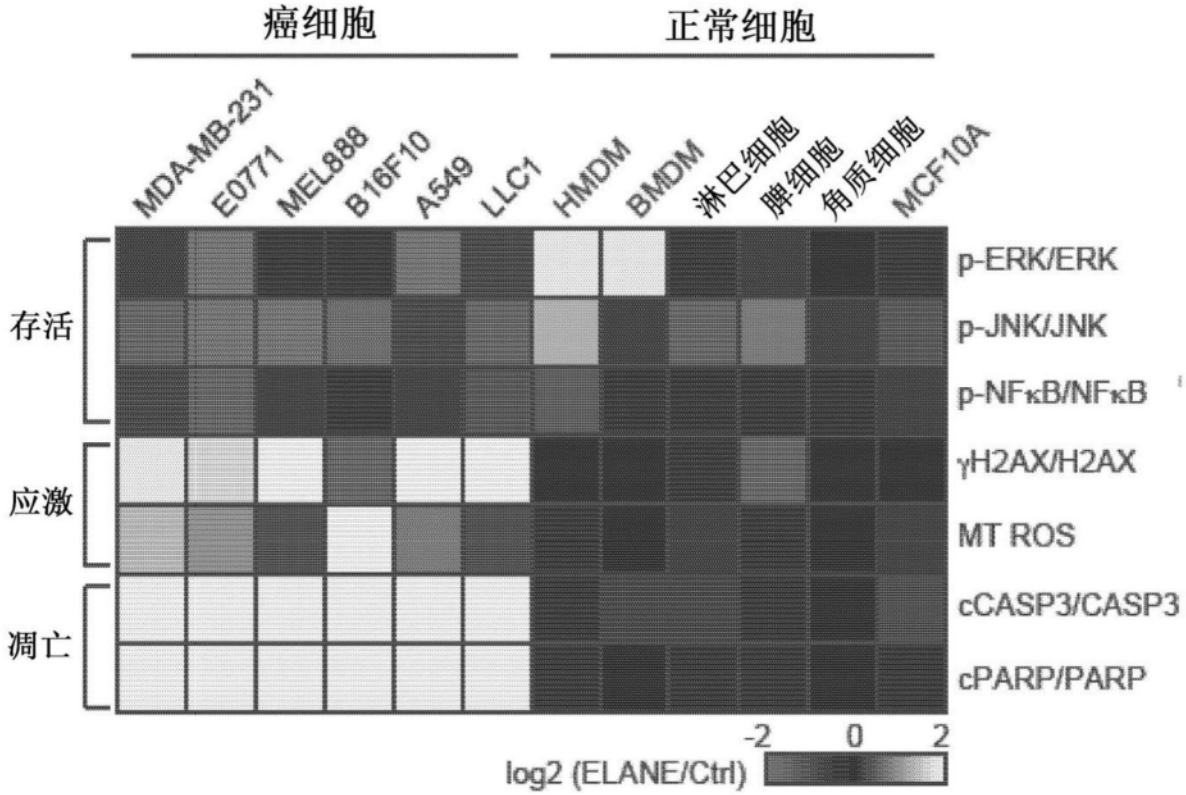

癌细胞
正常细胞
MDA-MB-231
E0771
MEL888
B16F10
A549
LLC1
HMDM
BMDM
淋巴细胞
脾细胞
角质细胞
MCF10A
存活
应激
凋亡
p-ERK/ERK
p-JNK/JNK
p-NFκB/NFκB
γH2AX/H2AX
MT ROS
cCASP3/CASP3
cPARP/PARP
-2
0
2
log2 (ELANE/Ctrl)

图1A

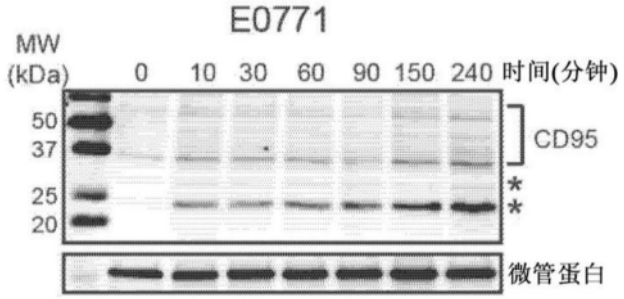

E0771
MW
(kDa)
0 10 30 60 90 150 240 时间(分钟)
50
37
25
20
CD95
*
*
微管蛋白

图1B

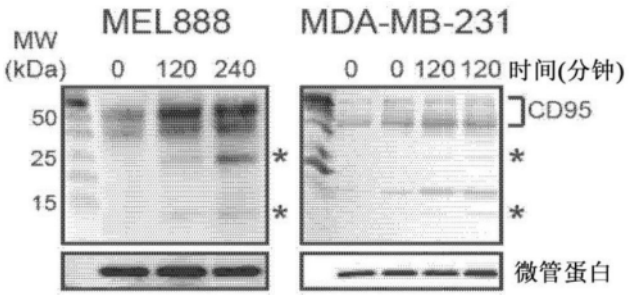

MEL888
MDA-MB-231
MW
(kDa)
0 120 240
0 0 120 120 时间(分钟)
50
25
15
CD95
*
*
*
*
微管蛋白

图1C

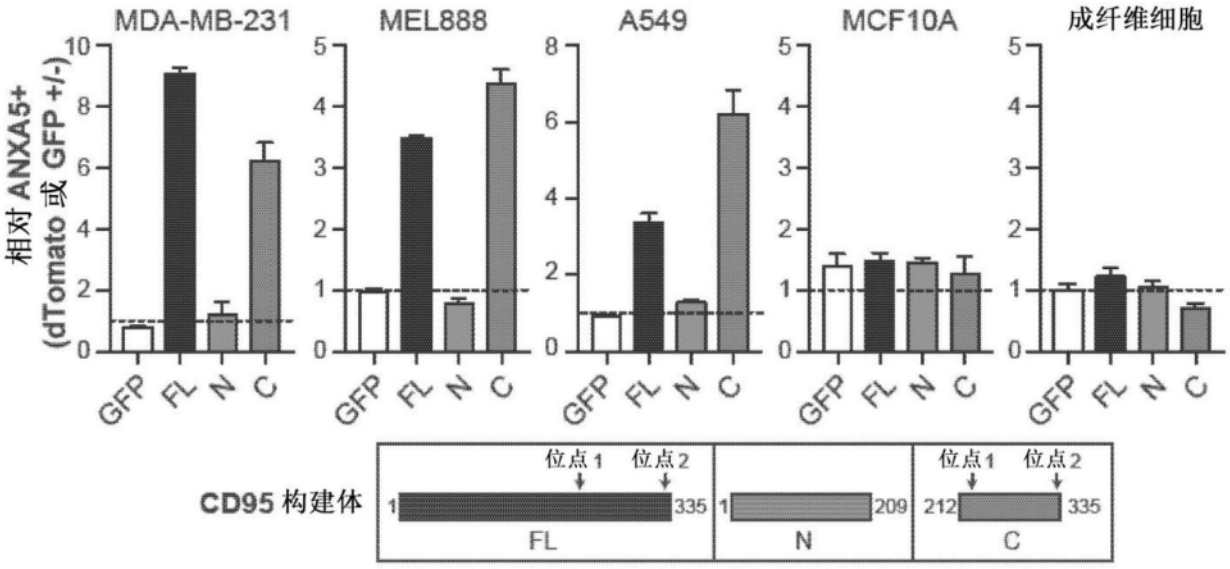

MDA-MB-231
MEL888
A549
MCF10A
成纤维细胞
相对 ANXA5+
(dTomato 或 GFP +/-)
GFP
FL
N
C
CD95 构建体
位点 1
位点 2
1
335
209
212
FL
N
C

图1D

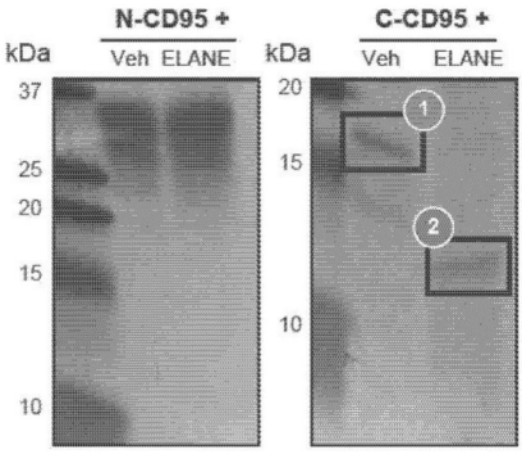

N-CD95 +
C-CD95 +
kDa
Veh
ELANE
37
25
20
15
10
1
2

图1E

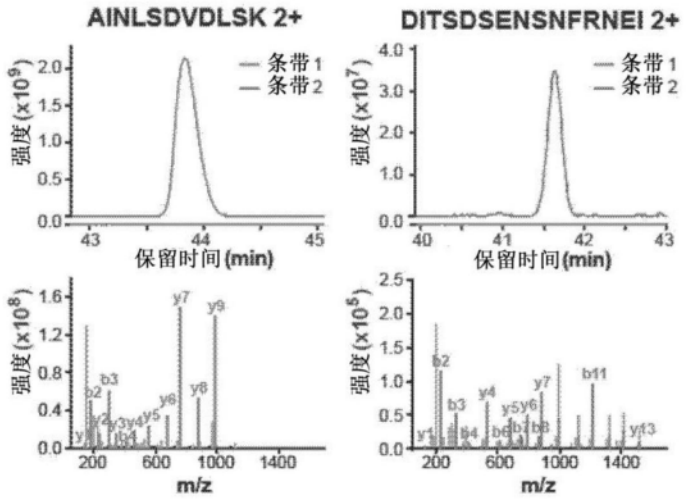

AINLSDVDLSK 2+
DITSDSENSNFRNEI 2+
条带1
条带2
强度(x10^9)
强度(x10^7)
保留时间(min)
强度(x10^8)
强度(x10^5)
m/z

图1F

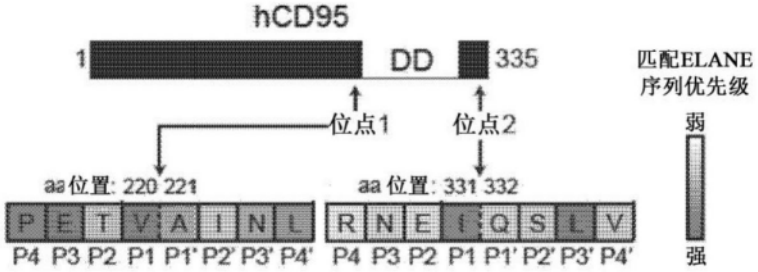

hCD95
1
DD
335
位点1
位点2
匹配ELANE
序列优先级
弱
强
aa位置: 220 221
aa位置: 331 332
P4 P3 P2 P1 P1' P2' P3' P4'

图1G

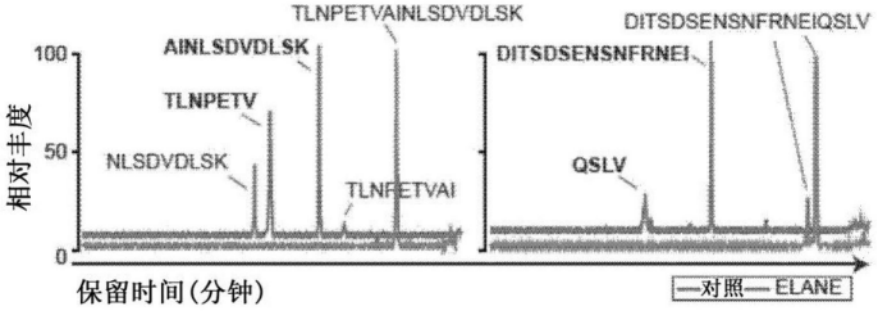

TLNPETVAINLSDVDLSK
AINLSDVDLSK
TLNPETV
NLSDVDLSK
TLNPETVAI
DITSDSENSNFRNEIQSLV
DITSDSENSNFRNEI
QSLV
相对丰度
保留时间(分钟)
—对照— ELANE

图1H

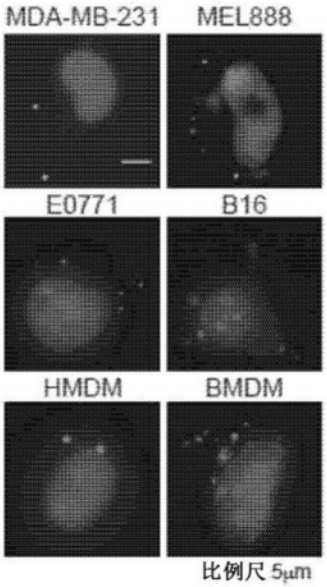

MDA-MB-231
MEL888
E0771
B16
HMDM
BMDM
比例尺 5μm

图1I

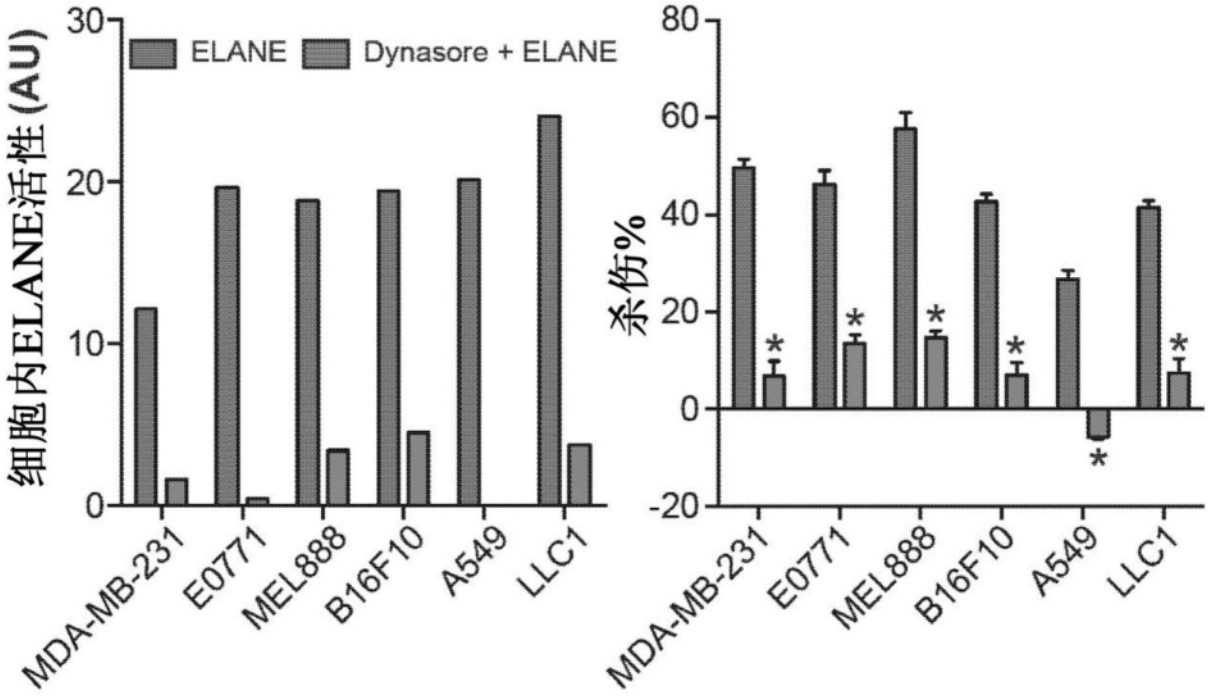

细胞内ELANE活性 (AU)
ELANE
Dynasore + ELANE
杀伤%
MDA-MB-231
E0771
MEL888
B16F10
A549
LLC1

图1J

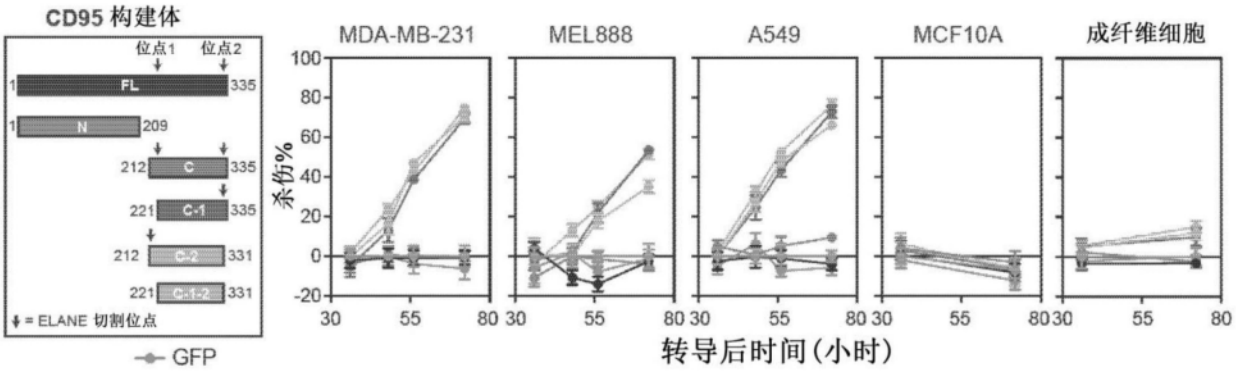


图1K

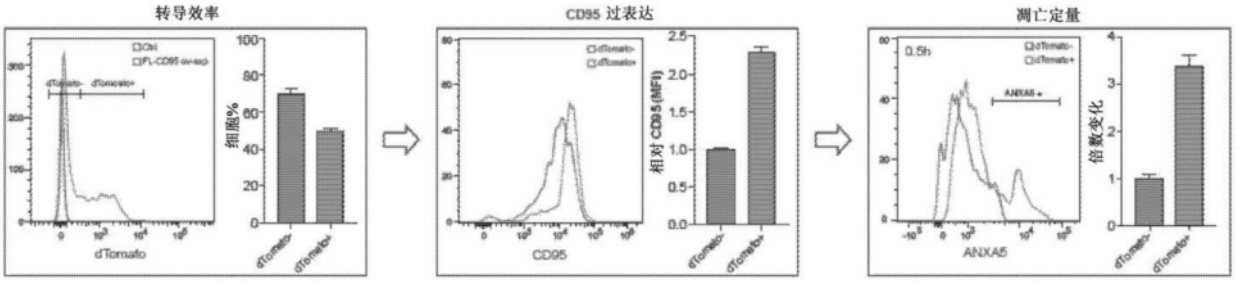


图2A

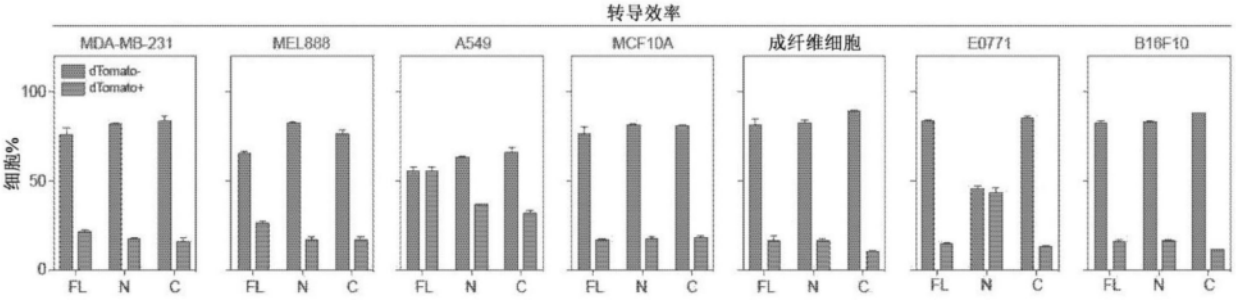


图2B

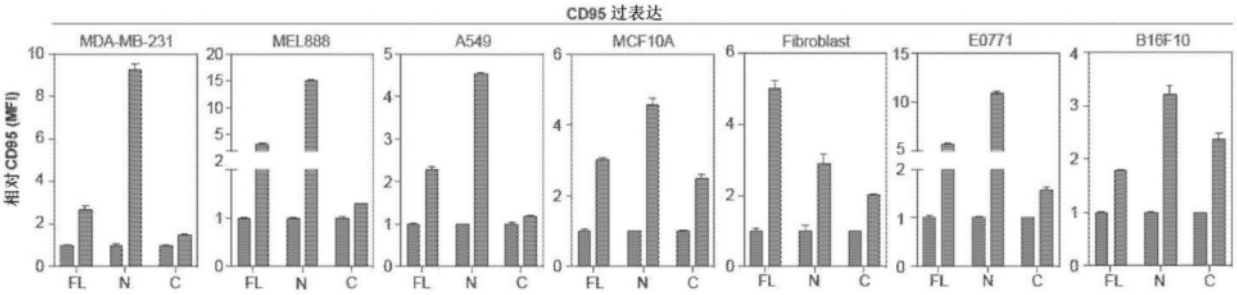


图2C

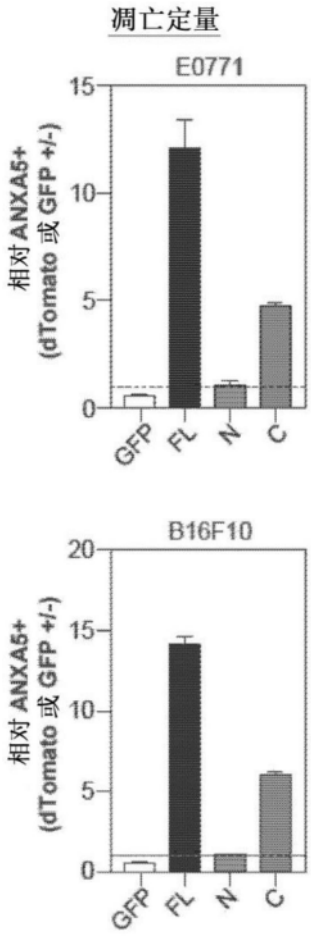

凋亡定量
E0771
相对 ANXA5+
(dTomato 或 GFP +/-)
15
10
5
0
GFP
FL
N
C
B16F10
20
15
10
5
0
GFP
FL
N
C

图2D

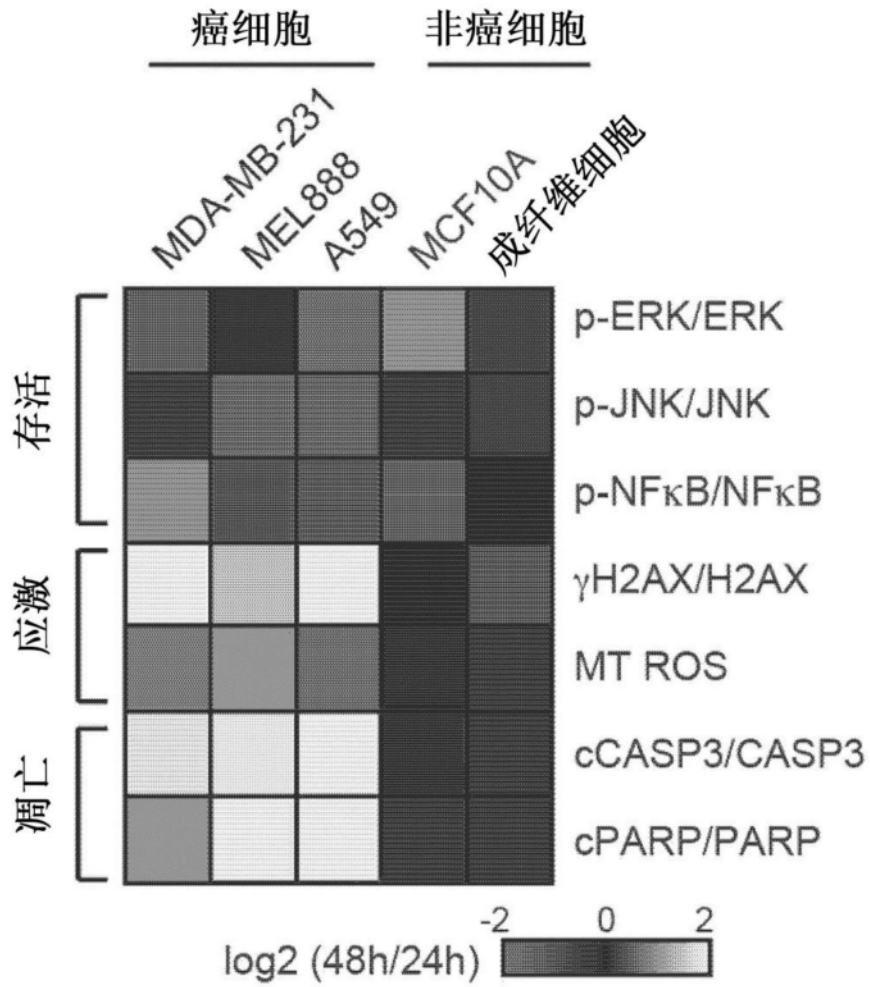

癌细胞
非癌细胞
MDA-MB-231
MEL888
A549
MCF10A
成纤维细胞
存活
应激
凋亡
p-ERK/ERK
p-JNK/JNK
p-NFκB/NFκB
γH2AX/H2AX
MT ROS
cCASP3/CASP3
cPARP/PARP
-2
0
2
log2 (48h/24h)

图3

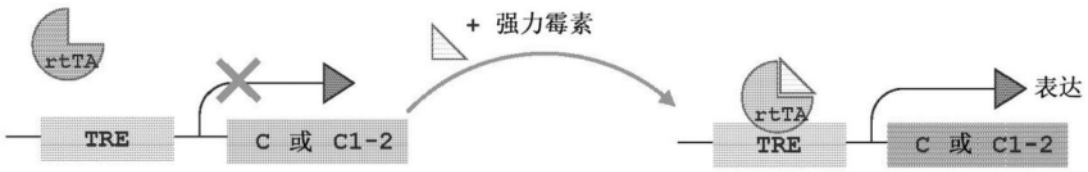

rtTA
TRE
C 或 C1-2
+ 强力霉素
rtTA
TRE
表达
C 或 C1-2

图4

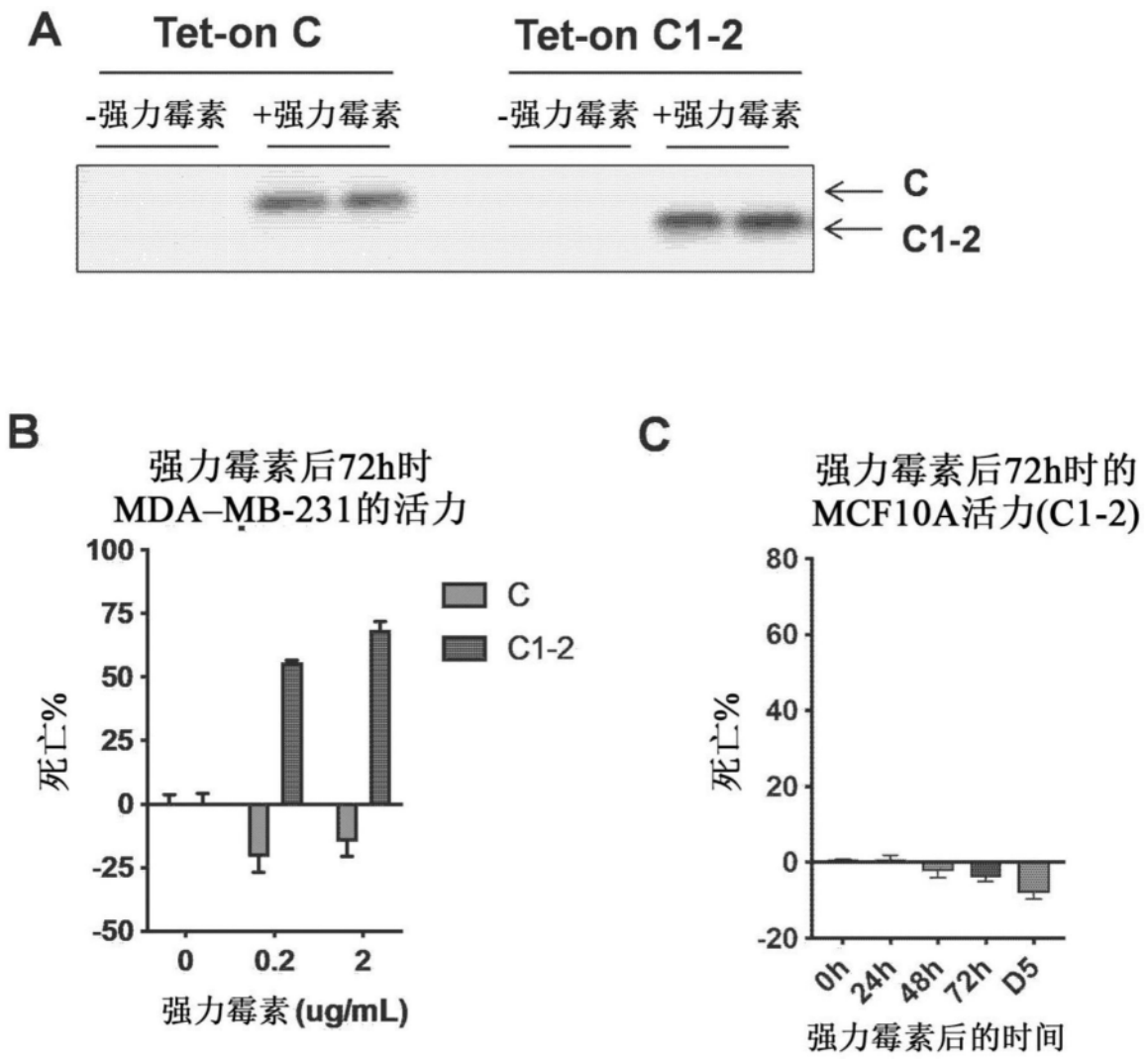

A
Tet-on C
Tet-on C1-2
-强力霉素
+强力霉素
-强力霉素
+强力霉素
C
C1-2
B
强力霉素后72h时
MDA–MB-231的活力
100
75
50
25
0
-25
-50
死亡%
C
C1-2
0
0.2
2
强力霉素(ug/mL)
C
强力霉素后72h时的
MCF10A活力(C1-2)
80
60
40
20
0
-20
死亡%
0h
24h
48h
72h
D5
强力霉素后的时间

图5A-5C

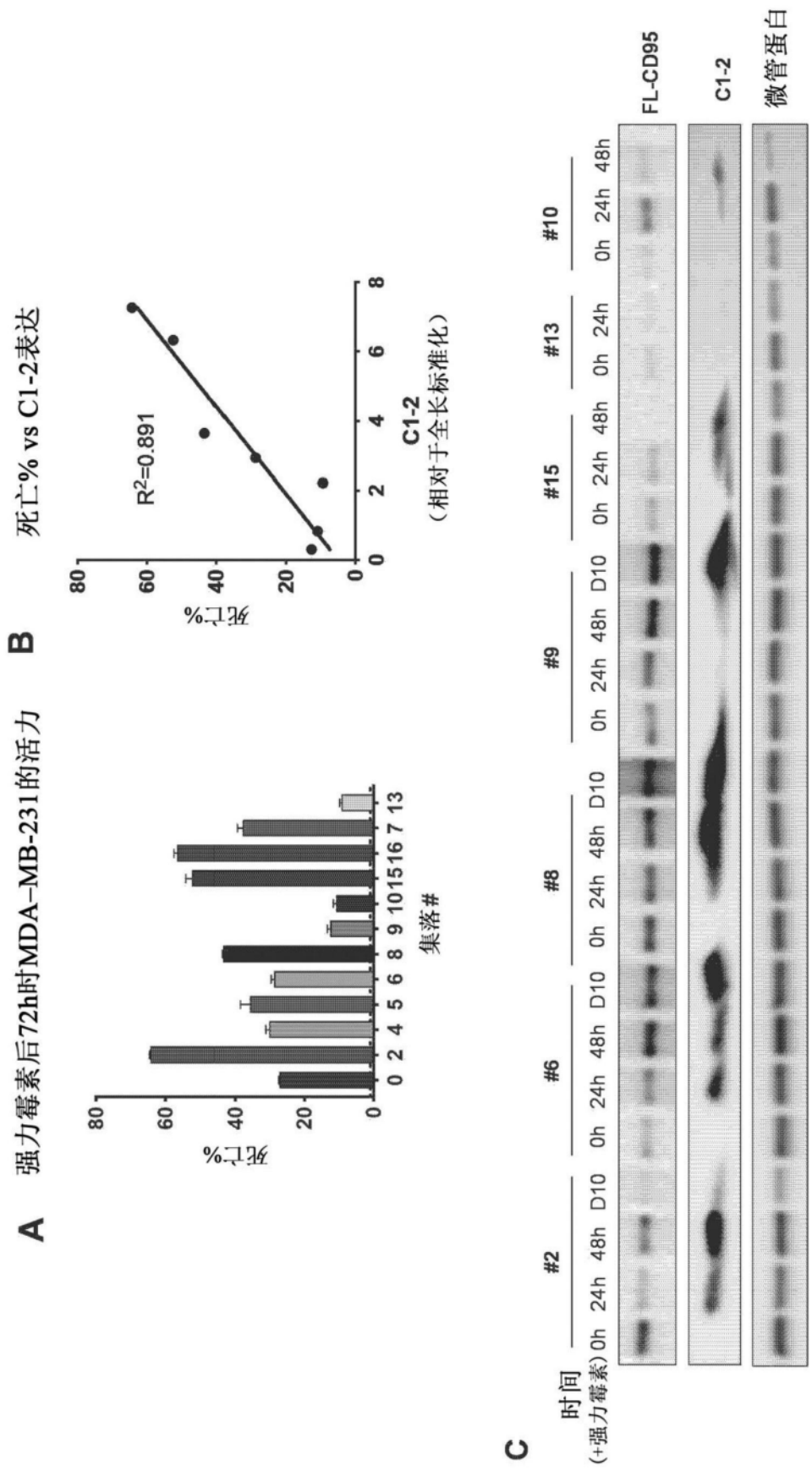

A
强力霉素后72h时MDA-MB-231的活力
死亡%
集落#
B
死亡% vs C1-2表达
R²=0.891
死亡%
C1-2
（相对于全长标准化）
C
时间
(+强力霉素)
#2
#6
#8
#9
#15
#13
#10
0h 24h 48h D10
FL-CD95
C1-2
微管蛋白

图6A-6C

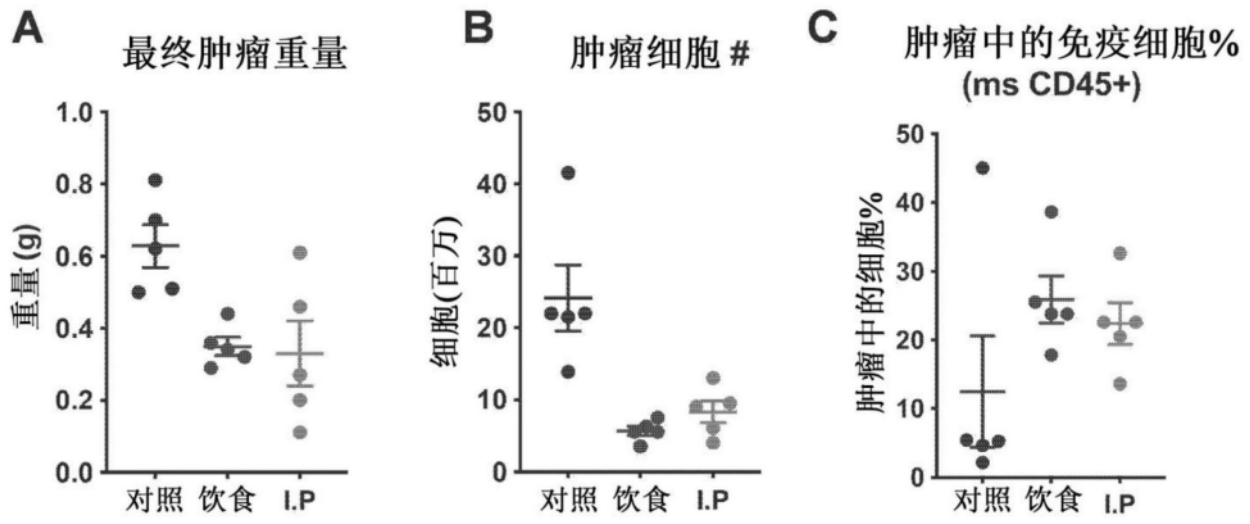

A
最终肿瘤重量
重量(g)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
对照 饮食 I.P
B
肿瘤细胞 #
细胞(百万)
50
40
30
20
10
0
对照 饮食 I.P
C
肿瘤中的免疫细胞%
(ms CD45+)
肿瘤中的细胞%
50
40
30
20
10
0
对照 饮食 I.P

图7A-7C